

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7654240号

(P7654240)

(45)発行日 令和7年4月1日(2025.4.1)

(24)登録日 令和7年3月24日(2025.3.24)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/39 (2006.01)

A 6 1 K 39/39

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00

H Z N A

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K 47/54

A 6 1 K 40/31 (2025.01)

A 6 1 K 40/31

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

請求項の数 12 (全96頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-515969(P2020-515969)

(86)(22)出願日 平成30年9月19日(2018.9.19)

(65)公表番号 特表2020-535128(P2020-535128
A)

(43)公表日 令和2年12月3日(2020.12.3)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/051764

(87)国際公開番号 WO2019/060425

(87)国際公開日 平成31年3月28日(2019.3.28)

審査請求日 令和3年9月17日(2021.9.17)

(31)優先権主張番号 62/560,588

(32)優先日 平成29年9月19日(2017.9.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 596060697

マサチューセッツ インスティテュート
オブ テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02
139ケンブリッジ, マサチューセッツ
・アヴェニュー・77

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 アーバイン, ダレル ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
476, アーリントン, グレー スト
リート 17

(72)発明者 マ, レュアン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キメラ抗原受容体T細胞治療のための組成物およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象においてCAR-T細胞の増殖を活性化、拡大または増加させることにおける使用のための組成物であって、脂質に作動可能に連結されたキメラ抗原受容体(CAR)リガンドを含む両親媒性リガンドコンジュゲートを含み、前記脂質が、生理的条件下でアルブミンに結合し、かつ、生理的条件下で細胞膜中にそれ自身を挿入することができ、前記脂質が1,2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)であり、前記CARリガンドが、前記CAR-T細胞上のCARに結合して前記CAR-T細胞上の前記CARを活性化する、組成物。

【請求項2】

対象において腫瘍のサイズを低減もしくは減少させるまたは腫瘍成長を阻害する、あるいはがんを有する対象において抗腫瘍応答を誘導することにおける使用のための組成物であって、脂質に作動可能に連結されたキメラ抗原受容体(CAR)リガンドを含む両親媒性リガンドコンジュゲートを含み、前記対象が、CAR-T細胞治療を受けているまたは受けたことがあり、前記脂質が、生理的条件下でアルブミンに結合し、かつ、生理的条件下で細胞膜中にそれ自身を挿入することができ、前記脂質が1,2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)であり、前記CARリガンドが、前記CAR-T細胞上のCARに結合して前記CAR-T細胞上の前記CARを活性化する、組成物。

【請求項3】

10

20

対象において抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答を刺激する方法における使用のための組成物であって、脂質に作動可能に連結されたキメラ抗原受容体（CAR）リガンドを含む両親媒性リガンドコンジュゲートを含み、前記対象が、前記抗原に標的化されたCAR-T細胞と、前記組成物とを投与され、前記脂質が、生理的条件下でアルブミンに結合し、かつ、生理的条件下で細胞膜中にそれ自身を挿入することができ、前記脂質が1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）であり、前記CARリガンドが、前記CAR-T細胞上のCARに結合して前記CAR-T細胞上の前記CARを活性化し、必要に応じて、前記標的細胞集団または標的組織が、ウイルスに感染した細胞の集団または組織である、組成物。

【請求項4】

10

抗原の発現または発現の上昇に関連する疾患、障害または状態を有する対象を処置する方法における使用のための組成物であって、脂質に作動可能に連結されたキメラ抗原受容体（CAR）リガンドを含む両親媒性リガンドコンジュゲートを含み、前記対象が、前記抗原に標的化されたCAR-T細胞と、前記組成物とを投与され、前記脂質が、生理的条件下でアルブミンに結合し、かつ、生理的条件下で細胞膜中にそれ自身を挿入することができ、前記脂質が1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）であり、前記CARリガンドが、前記CAR-T細胞上のCARに結合して前記CAR-T細胞上の前記CARを活性化し、必要に応じて、前記抗原がウイルス抗原またはがん抗原である、組成物。

【請求項5】

20

前記CARリガンドが、リンカーを介して前記脂質に作動可能に連結している、請求項1～4のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項6】

（i）前記リンカーが、親水性ポリマー、一連の親水性アミノ酸、多糖、またはそれらの組合せからなる群から選択される；または

（ii）前記リンカーが、「N」個連続するポリエチレングリコール単位を含み、Nが25～50の間である、
請求項5に記載の使用のための組成物。

【請求項7】

前記CARリガンドが

30

（i）タグであり、必要に応じて、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン（PE）、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル、ニトロシル、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびマルトース結合タンパク質からなる群から選択される、タグ；または

（ii）腫瘍関連抗原またはその断片
である、請求項1～6のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項8】

前記CARリガンドが、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）であり、前記CARリガンドが、ポリエチレングリコール部分を介して前記脂質に作動可能に連結している、請求項1に記載の使用のための組成物。

40

【請求項9】

前記ポリエチレングリコール部分がPEG-2000である、請求項8に記載の使用のための組成物。

【請求項10】

前記CARリガンドがCARに結合し、前記CARが共刺激ドメインを含み、必要に応じて、前記CARが二特異的結合ドメインを含み、必要に応じて、前記二特異的結合ドメインが、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含む、または第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

50

【請求項 1 1】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 2】

アジュバントをさらに含み、必要に応じて、前記アジュバントが、リンカーを用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、必要に応じて、前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが CpG を含むか、または toll 様受容体に対するリガンドである、請求項 1 1 に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連情報の段落

本出願は、2017年9月19日出願の米国仮特許出願第62／560，588号の優先日の利益を主張し、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

免疫療法を使用するがんの臨床的処置において、劇的な進歩が生じている。今日までに開発された最も強力な処置の1つは、キメラ抗原受容体T細胞（CAR-T細胞、即ちCAR-T）による養子細胞治療である。CAR-Tは、抗原結合ドメインを、T細胞受容体複合体由来のCD3シグナル伝達鎖およびT細胞活性化の間に支持的シグナルを提供する複数の周知の共受容体のうちの1つに由来の共刺激ドメインに融合させることによって形成された合成抗原受容体を形質導入した患者由来の自家リンパ球である。CAR-T細胞は、血液学的悪性腫瘍において劇的な完全奏効を示しており、FDAは最近、B細胞白血病の処置のためのCAR-T治療を承認した。

【0003】

しかし、CAR-T細胞は現在、患者に単純に注入され、*in vivo*での腫瘍細胞の遭遇を介したものを除くさらなる刺激は受けず、それらの完全なエフェクター機能を促進するためにT細胞に通常提供される重要なシグナル伝達合図の多くを欠く。さらに、CAR-T細胞は、一部の患者において機能的に持続することができず、固形腫瘍では概して不十分な応答を示す。したがって、CAR-T細胞治療を改善する薬剤が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は、キメラ抗原受容体（CAR）リガンドが、ヒト血清アルブミンに結合し、常在性抗原提示細胞（APC）の膜中に分配する両親媒性物質コンジュゲートの使用によって、リンパ節に効率的に送達され、それによって、ネイティブサイトカイン／受容体共刺激シグナルと一緒に、細胞表面上にCAR-T細胞リガンドを共提示するという発見に、少なくとも一部基づく。理論に束縛されないが、両親媒性物質コンジュゲートのこれら二重の特性（即ち、リンパ節標的化および膜挿入）は、組み合わせさせて、CAR-T細胞のためのブースターワクチンを可能にし、これが、CAR-T細胞を*in vivo*で効率的に拡大させ、それらの機能性を増加させ、抗腫瘍活性を増強すると考えられる。

【0005】

タグまたは腫瘍関連抗原のいずれかを含む両親媒性リガンドコンジュゲートが、タグもしくは腫瘍関連抗原結合ドメイン、またはその両方を含むCARを発現するT細胞の増殖を活性化および誘導したことが実証されている。特に、かかる両親媒性リガンドコンジュゲートは、*in vivo*でこの活性を保持し、したがって、対象への投与後のCAR-T細胞の拡大および活性化を可能にした。さらに、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートの投与は、腫瘍中への有意に増加したCAR-T浸潤もまたもたらし、腫瘍浸潤性C

10

20

30

40

50

A R-T細胞は、チェックポイントインヒビターPD1およびTIM3の表面発現にもかかわらず、腫瘍細胞に対する増強された反応性を示した。CAR-T細胞治療と併せた本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートによる処置は、腫瘍成長を有意に遅延させ、生存を延長させた。

【0006】

本開示はまた、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲートが、固形腫瘍において示されるCAR-T細胞の不十分な応答を克服するという発見に、少なくとも一部基づく。本明細書で実証されるように、腫瘍関連抗原を発現するCAR-T細胞の投与は、両親媒性リガンドコンジュゲートと組み合わせて投与された場合、対照およびCAR-T細胞単独と比較して、固形腫瘍の腫瘍成長を遅延させ、腫瘍保有マウスの生存を増加させることが可能であった。

10

【0007】

さらに、本開示は、CAR-T細胞治療の増強された有効性が、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートと組み合わせてリンパ充満状態 (lymphoreplete condition) において維持されるという発見に、少なくとも一部基づく。現行のCAR-T細胞治療は、重篤な毒性に関連するリンパ枯渇 (lymphodepletion) を必要とする。本明細書に示されるように、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートと組み合わせたCAR-T細胞治療は、遅延された腫瘍成長およびリンパ枯渇腫瘍保有マウスの増加した生存をもたらした。遅延された腫瘍成長および増加した生存は、同じ治療レジメンを受けたリンパ枯渇されたマウスと同等であった。理論に束縛されることは望まないが、これらの結果は、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートの投与が、CAR-T細胞治療の前のリンパ枯渇の必要性をなくし、それによって、対象において毒性を緩和し得ることを示している。

20

【0008】

したがって、一態様では、本開示は、キメラ抗原受容体 (CAR) リガンドおよびCARリガンドに作動可能に連結した脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。一部の態様では、脂質は、生理的条件下で細胞膜中に挿入する。一部の態様では、脂質は、生理的条件下でアルブミンに結合する。一部の態様では、脂質は、生理的条件下で細胞膜中に挿入し、生理的条件下でアルブミンに結合する。一部の態様では、両親媒性リガンドコンジュゲートは、リンパ節に輸送され、常在性抗原提示細胞 (APC) の細胞膜中に挿入する脂質を含み、それによって、ネイティブサイトカイン/受容体共刺激シグナルと一緒に、細胞表面上にCAR-T細胞リガンドを共提示する。

30

【0009】

上述または関連の態様のいずれかでは、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは、ジアシル脂質を含む。一部の態様では、ジアシル脂質は、12~30個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。一部の態様では、ジアシル脂質は、14~25個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。一部の態様では、ジアシル脂質は、16~20個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。一部の態様では、ジアシル脂質は、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。一部の態様では、ジアシル脂質は、18個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。

40

【0010】

上述または関連の態様のいずれかでは、両親媒性リガンドコンジュゲートは、リンカーを介して脂質に作動可能に連結したCARリガンドを含む。一部の態様では、リンカーは、親水性ポリマー、一連の親水性アミノ酸、多糖、またはそれらの組合せからなる群から選択される。一部の態様では、リンカーは、「N」個連続するポリエチレングリコール単位を含み、Nは25~50の間である。

【0011】

他の態様では、本開示は、リンカーを介してジアシル脂質に作動可能に連結したCARリガンドを含む両親媒性リガンドコンジュゲートであって、ジアシル脂質が、12~30個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含み、リンカーが、「N」個連続するポリエチレング

50

リコール単位を含み、Nが25～50の間である、両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。

【0012】

上述または関連の態様のいずれかでは、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは、タグであるCARリガンドを含む。一部の態様では、タグは、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン（PE）、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase）、グルコースオキシダーゼおよびマルトース結合タンパク質からなる群から選択される。

【0013】

他の態様では、両親媒性リガンドコンジュゲートは、腫瘍関連抗原またはその断片であるCARリガンドを含む。例示的な腫瘍抗原には、CD19、CD20、CD22、k軽鎖、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbbB2、ErbbB3/4、EGFrvII、癌胎児性抗原、EGP2、EGP40、メソテリン、TAG72、PSMA、NKG2Dリガンド、B7-H6、IL-13受容体α2、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、ルイスY、G250/CALX、HLA-AIIMAGEA1、HLA-A2NY-ESO-1、PSC1、葉酸受容体-α、CD44v7/8、8H9、NCAM、VEGF受容体、5T4、胎児AchR、NKG2Dリガンド、CD44v6、TEM1および/またはTEM8のうち1つまたは複数が含まれる。

【0014】

他の態様では、本開示は、ポリエチレングリコール部分を介してフルオレセインイソチオシアネート（FITC）に作動可能に連結した脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。さらに他の態様では、本開示は、ポリエチレングリコール部分を介して腫瘍関連抗原（例えば、CD19、CD20、CD22、HER2、EGFrvII）の断片に作動可能に連結した脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。一部の態様では、脂質は、1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）であり、ポリエチレングリコール部分は、PEG-2000である。

【0015】

上述または関連の態様のいずれかでは、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは脂質を含み、この脂質は、1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）である。一部の態様では、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは、PEG-2000を介してCARリガンドに連結した1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）を含む。

【0016】

別の態様では、本開示は、ポリエチレングリコール部分を介してフルオレセインイソチオシアネート（FITC）に作動可能に連結した1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）を含む両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。他の態様では、本開示は、ポリエチレングリコール部分を介して腫瘍関連抗原（例えば、CD19、CD20、CD22、HER2、EGFrvII）の断片に作動可能に連結した1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）を含む両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。

【0017】

さらに他の態様では、本開示は、PEG-2000を介してフルオレセインイソチオシアネート（FITC）に作動可能に連結した1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）を含む両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。なおさらなる態様では、本開示は、PEG-2000を介して腫瘍関連抗原（例えば、CD19、CD20、CD22、HER2、EGFrvII）の断片に作動可能に連結した1，2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSP

10

20

30

40

50

E)を含む両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。

【0018】

上述または関連の態様のいずれかでは、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは、CARに結合するCARリガンドを含み、このCARは、共刺激ドメインを含む。

【0019】

上述または関連の態様のいずれかでは、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは、CARに結合するCARリガンドを含み、このCARは、二特異的結合ドメインを含む。一部の態様では、二特異的結合ドメインは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメイン（例えば、CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII）を含む。一部の態様では、二特異的結合ドメインは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメイン（例えば、CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII）および第2の腫瘍関連抗原結合ドメイン（例えば、CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII）を含む。一部の態様では、二特異的結合ドメインは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、CARリガンドは、タグである。一部の態様では、二特異的結合ドメインは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、CARリガンドは、第1もしくは第2の腫瘍関連抗原、またはその断片を含む。

10

【0020】

上述または関連の態様のいずれかでは、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは、タグを含むCARリガンドを含み、このCARは、タグ結合ドメインを含む。他の態様では、CARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片であり、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含む。

20

【0021】

別の態様では、本開示は、タグに作動可能に連結したジアシル脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートであって、タグが、タグ結合ドメインを含むCARに結合する、両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。別の態様では、本開示は、ポリエチレングリコール部分を介してタグに作動可能に連結したジアシル脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートであって、タグが、タグ結合ドメインを含むCARに結合する、両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。

【0022】

別の態様では、本開示は、タグに作動可能に連結したジアシル脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートであって、タグが、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含むCARに結合する、両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。別の態様では、本開示は、ポリエチレングリコール部分を介してタグに作動可能に連結したジアシル脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートであって、タグが、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含むCARに結合する、両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。

30

【0023】

別の態様では、本開示は、腫瘍関連抗原またはその断片に作動可能に連結したジアシル脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートであって、腫瘍関連抗原が、腫瘍関連抗原結合ドメイン（例えば、CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII）を含むCARに結合する、両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。別の態様では、本開示は、ポリエチレングリコール部分を介して腫瘍関連抗原またはその断片に作動可能に連結したジアシル脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートであって、腫瘍関連抗原またはその断片が、腫瘍関連抗原結合ドメイン結合ドメインを含むCARに結合する、両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する。一部の態様では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートは、第1または第2の腫瘍関連抗原のいずれかを含む。

40

【0024】

他の態様では、本開示は、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲートおよび薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

50

【0025】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載される組成物およびアジュバントを含む免疫原性組成物を提供する。

【0026】

一部の態様では、免疫原性組成物は、アジュバントを含み、アジュバントは、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。一部の態様では、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、パターン認識受容体に結合する。一部の態様では、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、CpGを含む。一部の態様では、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、 toll 様受容体に対するリガンドである。

10

【0027】

上述の態様のいずれかでは、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、リンカーを含み、このリンカーは、オリゴヌクレオチドリリンカーである。一部の態様では、オリゴヌクレオチドリリンカーは、「N」個連続するグアニンを含み、Nは0～2の間である。一部の態様では、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの脂質は、ジアシル脂質である。一部の態様では、ジアシル脂質は、12～30個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。一部の態様では、ジアシル脂質は、14～25個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。一部の態様では、ジアシル脂質は、16～20個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。一部の態様では、ジアシル脂質は、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。一部の態様では、ジアシル脂質は、18個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む。

20

【0028】

他の態様では、免疫原性組成物は、アジュバントを含み、このアジュバントは、サイクリックジ-GMP (CDG) である。

【0029】

別の態様では、本開示は、対象においてCAR-T細胞の増殖を活性化、拡大または増加させる方法であって、対象に、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物を投与することを含む、方法を提供する。一部の態様では、CAR(-)T細胞の増殖は、対象において増加されない。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、第1もしくは第2の腫瘍関連抗原、またはその断片である。

30

【0030】

さらに他の態様では、本開示は、それを必要とする対象において腫瘍のサイズを低減もしくは減少させるまたは腫瘍成長を阻害する方法であって、対象に、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物を投与することを含み、対象が、CAR-T細胞治療を受けているまたは受けたことがある、方法を提供する。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、第1もしくは第

40

50

2の腫瘍関連抗原、またはその断片である。

【0031】

さらなる態様では、本開示は、がんを有する対象において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、対象に、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物を投与することを含み、対象が、CAR-T細胞治療を受けているまたは受けたことがある、方法を提供する。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、第1もしくは第2の腫瘍関連抗原、またはその断片である。

10

【0032】

別の態様では、本開示は、対象において抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答を刺激する方法であって、対象に、抗原に標的化されたCAR-T細胞、および本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物を投与することを含む、方法を提供する。一部の態様では、免疫応答は、T細胞媒介性免疫応答または抗腫瘍免疫応答である。一部の態様では、標的細胞集団または標的組織は、腫瘍細胞または腫瘍組織である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、第1もしくは第2の腫瘍関連抗原、またはその断片である。

20

【0033】

別の態様では、本開示は、対象において抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答を刺激する方法であって、対象に、抗原に標的化されたCAR-T細胞、および本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物を投与することを含み、標的細胞集団または標的組織が、ウイルスに感染した細胞の集団または組織である、方法を提供する。一部の態様では、ウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)である。一部の態様では、免疫応答は、T細胞媒介性免疫応答である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。

30

【0034】

さらなる態様では、本開示は、抗原の発現または発現の上昇に関連する疾患、障害または状態を有する対象を処置する方法であって、対象に、抗原に標的化されたCAR-T細胞、および本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物を投与することを含む、方法を提供する。一部の態様では、抗原は、ウイルス抗原またはがん抗原である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。

40

【0035】

上述の態様のいずれかでは、この方法は、CAR-T細胞を受ける前の、対象への両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与を含む。他の態様では

50

、この方法は、C A R－T細胞を受けた後の、対象への両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与を含む。別の態様では、この方法は、同時に投与されるC A R－T細胞と併せた、対象への両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与を含む。

【0036】

関連する上述の態様のいずれかでは、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは、リンパ節に輸送される。一部の態様では、両親媒性リガンドコンジュゲートは、鼠径リンパ節および補助リンパ節 (auxiliary lymph node) に輸送される。一部の態様では、両親媒性リガンドコンジュゲートは、リンパ節に輸送されると、抗原提示細胞の膜中に挿入される。一部の態様では、抗原提示細胞は、髄質マクロファージ、C D 8 + 樹状細胞および／またはC D 1 1 b + 樹状細胞である。

10

【0037】

上述の態様のいずれかでは、C A Rリガンドは、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間、少なくとも15日間、少なくとも16日間、少なくとも17日間、少なくとも18日間、少なくとも19日間、少なくとも20日間、少なくとも21日間、少なくとも22日間、少なくとも23日間、少なくとも24日間または少なくとも25日間にわたって、リンパ節中で保持される。

【0038】

C A Rリガンドがタグであり、C A Rがタグ結合ドメインを含む上述の態様のいずれかでは、これらの方法は、タグ化タンパク質の製剤を投与することをさらに含み、タグ結合ドメインは、タグ化タンパク質に結合する。一部の態様では、タグ化タンパク質のタンパク質は、抗体またはその抗原結合性断片である。一部の態様では、タグ結合ドメインは、抗体またはその抗原結合性断片である。一部の態様では、タグ化タンパク質の製剤は、C A R T細胞、および両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与の前に対象に投与される。他の態様では、タグ化タンパク質の製剤は、C A R－T細胞、および両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与と併せて対象に投与される。さらに他の態様では、タグ化タンパク質の製剤は、C A R－T細胞、および両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与の後に対象に投与される。

20

30

【0039】

上述の態様のいずれかでは、C A R－T細胞は、両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与の前に投与される。他の態様では、C A R－T細胞は、両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与の後に投与される。さらに他の態様では、C A R－T細胞は、両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与と併せて投与される。

【0040】

上述の態様のいずれかでは、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物は、非腫瘍流入領域リンパ節において非経口で、腫瘍流入領域リンパ節において非経口で、または腫瘍内に投与される。

40

【0041】

上述の態様のいずれかでは、対象はがんを有する。上述の態様のいずれかでは、対象はヒトである。

【0042】

別の態様では、本開示は、C A R－T細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物の投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の態様では、C A Rは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのC A Rリガンドは、タ

50

グである。一部の態様では、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、第1もしくは第2の腫瘍関連抗原、またはその断片である。

【0043】

さらに他の態様では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびにその医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせての投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、第1もしくは第2の腫瘍関連抗原、またはその断片である。

【0044】

他の態様では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞の増殖を活性化、拡大または増加させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物ワクチンの投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、第1もしくは第2の腫瘍関連抗原、またはその断片である。

【0045】

一部の態様では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞の増殖を活性化、拡大または増加させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびにその医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせての投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の態様では、CARは、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、タグである。一部の態様では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、第1もしくは第2の腫瘍関連抗原、またはその断片である。

【0046】

上述の態様のいずれかでは、キットは、CAR-T細胞治療を受けている個体において

がんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、アジュバント、およびアジュバントの投与に関する指示を含む。一部の態様では、アジュバントは、本明細書に記載される免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。

【0047】

別の態様では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞の増殖を活性化、拡大または増加させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の使用を提供する。

【0048】

さらに他の態様では、本開示は、個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の使用を提供する。

【0049】

別の態様では、本開示は、個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための医薬の製造における、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の使用を提供する。

【0050】

他の態様では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてウイルス感染症を処置するためまたはその進行を遅延させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、および組成物の投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の態様では、キットは、タグ化タンパク質の製剤、およびタグ化タンパク質の製剤の投与に関する指示を含み、CARは、タグ化タンパク質に結合するタグ結合ドメインを含む。一部の態様では、キットは、CAR-T細胞治療を受けている個体においてウイルス感染症を処置するためまたはその進行を遅延させるための、アジュバント、およびアジュバントの投与に関する指示を含む。一部の態様では、アジュバントは、本明細書に記載される両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。

(項目1)

キメラ抗原受容体(CAR)リガンド；および
前記CARリガンドに作動可能に連結した脂質
を含む両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目2)

前記脂質が、生理的条件下で細胞膜中に挿入する、生理的条件下でアルブミンに結合する、またはその両方である、項目1に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目3)

前記脂質がジアシル脂質である、項目1または項目2に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目4)

前記ジアシル脂質が、12～30個の炭化水素単位、14～25個の炭化水素単位、16～20個の炭化水素単位、または12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29もしくは30個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む、項目3に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目5)

前記CARリガンドが、リンカーを介して前記脂質に作動可能に連結した、項目1から4のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目6)

前記リンカーが、親水性ポリマー、一連の親水性アミノ酸、多糖、またはそれらの組合せからなる群から選択される、項目5に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目7)

前記リンカーが、「N」個連続するポリエチレングリコール単位を含み、Nが25～5

10

20

30

40

50

0の間である、項目5に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目8)

リンカーを介してジアシル脂質に作動可能に連結したCARリガンドを含む両親媒性リガンドコンジュゲートであって、前記ジアシル脂質が、12～30個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含み、前記リンカーが、「N」個連続するポリエチレングリコール単位を含み、Nが25～50の間である、両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目9)

前記CARリガンドがタグである、項目1から8のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目10)

前記タグが、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン(PE)、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびマルトース結合タンパク質からなる群から選択される、項目9に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目11)

前記CARリガンドが、腫瘍関連抗原またはその断片である、項目1から8のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目12)

ポリエチレングリコール部分を介してフルオレセインイソチオシアネート(FITC)に作動可能に連結した脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目13)

前記脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)であり、前記ポリエチレングリコール部分がPEG-2000である、項目8から12のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目14)

前記CARリガンドがCARに結合し、前記CARが共刺激ドメインを含む、項目1から13のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目15)

前記CARが二特異的結合ドメインを含む、項目14に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目16)

前記二特異的結合ドメインが、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含む、または第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含む、項目15に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目17)

前記二特異的結合ドメインが、タグ結合ドメインおよび腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、前記CARリガンドがタグである、項目16に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目18)

前記二特異的結合ドメインが、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、前記CARリガンドが、前記第1もしくは第2の腫瘍関連抗原、またはその断片である、項目15に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目19)

前記CARがタグ結合ドメインを含み、前記CARリガンドがタグである、項目14に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目20)

前記CARが腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、前記CARリガンドが、腫瘍関連抗原またはその断片である、項目14に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート。

(項目21)

項目 1 から 19 のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲートおよび薬学的に許容される担体を含む組成物。

(項目 22)

項目 21 に記載の組成物およびアジュバントを含む免疫原性組成物。

(項目 23)

前記アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、項目 22 に記載の免疫原性組成物。

(項目 24)

前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが、パターン認識受容体に結合する、項目 23 に記載の免疫原性組成物。

(項目 25)

前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが CpG を含む、項目 24 に記載の免疫原性組成物。

(項目 26)

前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが、 toll 様受容体に対するリガンドである、項目 23 に記載の免疫原性組成物。

(項目 27)

前記リンカーが、オリゴヌクレオチドリinkerである、項目 23 から 26 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 28)

前記オリゴヌクレオチドリinkerが、「N」個連続するグアニンを含み、N が 0 ～ 2 の間である、項目 27 に記載の免疫原性組成物。

(項目 29)

前記脂質がジアシル脂質である、項目 23 から 28 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 30)

前記ジアシル脂質が、12 ～ 30 個の炭化水素単位を含むアシル鎖を含む、項目 29 に記載の免疫原性組成物。

(項目 31)

前記アジュバントが、サイクリックジ-GMP (CDG) である、項目 22 に記載の免疫原性組成物。

(項目 32)

対象において CAR-T 細胞の増殖を活性化、拡大または増加させる方法であって、前記対象に、項目 1 から 20 のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、項目 21 に記載の組成物または項目 23 から 31 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与することを含む、方法。

(項目 33)

CAR(-) T 細胞の増殖が、前記対象において増加されない、項目 32 に記載の方法。

(項目 34)

それを必要とする対象において腫瘍のサイズを低減もしくは減少させるまたは腫瘍成長を阻害する方法であって、前記対象に、項目 1 から 20 のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、項目 21 に記載の組成物または項目 23 から 31 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与することを含み、前記対象が、CAR-T 細胞治療を受けているまたは受けたことがある、方法。

(項目 35)

がんを有する対象において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、前記対象に、項目 1 から 20 のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、項目 21 に記載の組成物または項目 23 から 31 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与することを含み、前記対象が、CAR-T 細胞治療を受けているまたは受けたことがある、方法。

(項目 36)

10

20

30

40

50

対象において抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答を刺激する方法であって、前記対象に、前記抗原に標的化されたC A R-T細胞、および項目1から20のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、項目21に記載の組成物または項目23から31のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与することを含む、方法。

(項目37)

前記免疫応答が、T細胞媒介性免疫応答または抗腫瘍免疫応答である、項目36に記載の方法。

(項目38)

前記標的細胞集団または標的組織が、腫瘍細胞または腫瘍組織である、項目36または項目37に記載の方法。

10

(項目39)

抗原の発現または発現の上昇に関連する疾患、障害または状態を有する対象を処置する方法であって、前記対象に、前記抗原に標的化されたC A R-T細胞、および項目1から20のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、項目21に記載の組成物または項目23から31のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与することを含む、方法。

(項目40)

C A R-T細胞を受ける前に、前記対象に、前記両親媒性リガンドコンジュゲート、前記組成物または前記免疫原性組成物が投与される、項目32から34のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目41)

C A R-T細胞を受けた後に、前記対象に、前記両親媒性リガンドコンジュゲート、前記組成物または前記免疫原性組成物が投与される、項目32から34のいずれか一項に記載の方法。

(項目42)

前記両親媒性リガンドコンジュゲート、前記組成物または前記免疫原性組成物、およびC A R-T細胞が、同時に投与される、項目32から34のいずれか一項に記載の方法。

(項目43)

前記両親媒性リガンドコンジュゲートが、リンパ節に輸送される、項目32から42のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目44)

前記両親媒性リガンドコンジュゲートが、鼠径リンパ節および補助リンパ節に輸送される、項目32から42のいずれか一項に記載の方法。

(項目45)

前記両親媒性リガンドコンジュゲートが、前記リンパ節に輸送されると、抗原提示細胞の膜中に挿入される、項目32から44のいずれか一項に記載の方法。

(項目46)

前記抗原提示細胞が、髄質マクロファージ、C D 8+樹状細胞および／またはC D 1 1 b+樹状細胞である、項目45に記載の方法。

40

(項目47)

前記C A Rリガンドが、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間、少なくとも15日間、少なくとも16日間、少なくとも17日間、少なくとも18日間、少なくとも19日間、少なくとも20日間、少なくとも21日間、少なくとも22日間、少なくとも23日間、少なくとも24日間または少なくとも25日間にわたって、前記リンパ節中で保持される、項目32から46のいずれか一項に記載の方法。

(項目48)

前記C A Rリガンドがタグであり、前記C A Rがタグ結合ドメインを含み、前記方法が

50

、タグ化タンパク質の製剤を投与することをさらに含み、前記タグ結合ドメインが、前記タグ化タンパク質に結合する、項目 3 2 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 9)

前記タグ化タンパク質のタンパク質が、抗体またはその抗原結合性断片である、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記タグ結合ドメインが、抗体またはその抗原結合性断片である、項目 4 8 または項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記タグ化タンパク質の製剤が、前記 C A R - T 細胞、および両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与の前に前記対象に投与される、項目 4 8 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 5 2)

前記タグ化タンパク質の製剤が、前記 C A R - T 細胞、および両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与と併せて前記対象に投与される、項目 4 8 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記タグ化タンパク質の製剤が、前記 C A R - T 細胞、および両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与の後に前記対象に投与される、項目 4 8 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 5 4)

前記 C A R - T 細胞が、前記両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与の前に投与される、項目 5 1 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 5)

前記 C A R - T 細胞が、前記両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与の後に投与される、項目 5 1 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 6)

前記 C A R - T 細胞が、前記両親媒性リガンドコンジュゲート、組成物または免疫原性組成物の投与と併せて投与される、項目 5 1 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 7)

前記対象ががんを有する、項目 3 2 から 3 4 および 4 9 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 5 8)

前記対象がヒトである、項目 3 2 から 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 9)

C A R - T 細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、項目 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および前記組成物の投与に関する指示を含む添付文書を含むキット。

(項目 6 0)

40

C A R - T 細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、項目 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびに前記医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせる投与に関する指示を含む添付文書を含むキット。

(項目 6 1)

C A R - T 細胞治療を受けている個体において C A R - T 細胞の増殖を活性化、拡大または増加させるための、項目 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物ワクチンの投与に関する指示を含む添付文書を含むキット。

50

(項目 6 2)

CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞の増殖を活性化、拡大または増加させるための、項目1から20のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびに前記医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせての投与に関する指示を含む添付文書を含むキット。

(項目 6 3)

CAR-T細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、アジュバント、および前記アジュバントの投与に関する指示をさらに含む、項目59または項目61に記載のキット。

10

(項目 6 4)

前記アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、項目60、62および63のいずれか一項に記載のキット。

(項目 6 5)

CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞の増殖を活性化、拡大または増加させるための、項目1から20のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、項目21に記載の組成物または項目23から31のいずれか一項に記載の免疫原性組成物の使用。

(項目 6 6)

個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、項目1から20のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、項目21に記載の組成物または項目23から31のいずれか一項に記載の免疫原性組成物の使用。

20

(項目 6 7)

個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための医薬の製造における、項目1から20のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、項目21に記載の組成物または項目23から31のいずれか一項に記載の免疫原性組成物の使用。

(項目 6 8)

前記両親媒性リガンドコンジュゲート、前記組成物または前記免疫原性組成物を、非腫瘍流入領域リンパ節において非経口で、腫瘍流入領域リンパ節において非経口で、または腫瘍内に投与することを含む、項目32から58のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 6 9)

前記標的細胞集団または標的組織が、ウイルスに感染した細胞の集団または組織である、項目36に記載の方法。

(項目 7 0)

前記ウイルスがヒト免疫不全ウイルス(HIV)である、項目69に記載の方法。

(項目 7 1)

前記免疫応答がT細胞媒介性免疫応答である、項目69または項目70に記載の方法。

(項目 7 2)

前記抗原が、ウイルス抗原またはがん抗原である、項目39に記載の方法。

40

(項目 7 3)

CAR-T細胞治療を受けている個体においてウイルス感染症を処置するためまたはその進行を遅延させるための、項目1から20のいずれか一項に記載の両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、および前記組成物の投与に関する指示を含む添付文書を含むキット。

(項目 7 4)

タグ化タンパク質の製剤、および前記タグ化タンパク質の製剤の投与に関する指示をさらに含むキットであって、前記CARが、前記タグ化タンパク質に結合するタグ結合ドメインを含む、項目73に記載のキット。

(項目 7 5)

50

CAR-T細胞治療を受けている個体においてウイルス感染症を処置するためまたはその進行を遅延させるための、アジュバント、および前記アジュバントの投与に関する指示をさらに含む、項目73または項目74に記載のキット。

(項目76)

前記アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、項目75に記載のキット。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1A】図1Aは、PEG-2000リンカーを介して小分子（上）、短い直鎖ペプチド（中央）またはタンパク質ドメイン（下）にコンジュゲートされた脂質テイル（例えば、DSPE）を含む両親媒性リガンドコンジュゲートの概略図を提供する。

10

【0052】

【図1B】図1Bは、キメラ抗原受容体（CAR）リガンドを含む両親媒性リガンドコンジュゲートで装飾された（decorated）抗原提示細胞とCAR-T細胞との間での相互作用を示す概略図を提供する。

【0053】

【図2A】図2Aは、膜貫通抗FITC CARのドメイン構造および配向の概略図を提供する。

【0054】

【図2B】図2Bは、初代マウスT細胞中へのレトロウイルス形質導入後の抗FITC CAR表面発現の程度を示すフローサイトメトリーデータのグラフを提供する。

20

【0055】

【図2C】図2Cは、示された種々の濃度のDSPE-PEG-FITCで装飾されたK562細胞との相互作用後の、抗FITC CAR-T細胞によって産生されたIFN γ の定量を示すグラフを提供する。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0056】

【図2D】図2Dは、10:1のエフェクター対標的（E:T）比における、FITC-CAR-T細胞との共培養の6時間後の、DSPE-PEG-FITCコーティングされたDC2.4細胞の細胞死のパーセンテージを示すグラフを提供する。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

30

【0057】

【図3A】図3Aは、示された種々の用量のDSPE-PEG-FITCまたはFITC単独によるワクチン接種後の引き続く数日後に（after subsequent days）マウスから取り出されたリンパ節におけるDSPE-PEG-FITC保持（放射効率によって測定される）の程度を示すグラフを提供する。

【0058】

【図3B】図3Bは、皮下注射の24時間後の流入領域鼠径リンパ節中の異なるリンパ系集団によるDSPE-PEG-FITC取込みを示すグラフを提供する。

40

【0059】

【図3C】図3Cは、皮下注射後の3つの異なるAPCによる、種々の用量のDSPE-PEG-FITCの取込みを示すフローサイトメトリーデータのグラフを提供する。

【0060】

【図4】図4は、PBS、c-ジージンMP（CDG）、DSPE-PEG-FITCまたはDSPE-PEG-FITC+CDGによってプライムされた鼠径リンパ節中のFITC CAR-T細胞の増殖指数を示すグラフを提供する。PBSおよびCDG単独の効果は、ワクチン接種の1日後に評価した。

【0061】

【図5】図5は、リンパ節細胞集団における、CDGありまたはなしの、抗原提示細胞表

50

面上のDSPE-PEG-FITC表示を示すグラフを提供する。リンパ節は、DSPE-PEG-FITCワクチン接種+/-CDGの24時間後および3日後に収集した。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0062】

【図6】図6は、CDGありまたはなしの、DSPE-PEG-FITCを取り込むCD11c+細胞上の種々の共刺激分子の平均蛍光強度(MFI)を示すグラフを提供する。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0063】

【図7】図7は、実験タイムラインを示す概略図(上)およびリンパ枯渇されたCD45.2マウスにおける2ラウンドのDSPE-PEG-FITCワクチン接種によるCD45.1FITC CAR-T細胞のパーセンテージを示すグラフ(下)を提供する。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0064】

【図8】図8は、実験タイムラインを示す概略図(上)およびリンパ充満CD45.2マウスにおける2ラウンドのDSPE-PEG-FITCワクチン接種によるCD45.1FITC CAR-T細胞のパーセンテージを示すグラフを提供する。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0065】

【図9】図9は、反復DSPE-PEG-FITCワクチン接種に対する経時的な抗体応答を示すグラフを提供する。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0066】

【図10A】図10Aは、DSPE-PEGにコンジュゲートされたEGFRvIIIペプチドを示す概略図を提供する。

【0067】

【図10B】図10Bは、DSPE-PEG-EGFRvIIIによる免疫後のマウスT細胞上のEGFRvIII CARの表面発現を示す。

【0068】

【図10C】図10Cは、cell trace violet追跡によって決定した、DSPE-PEG-EGFRvIIIワクチン接種の48時間後のリンパ節中のEGFRvIII CAR T細胞の増殖を示す。

【0069】

【図11A】図11Aは、細胞表面上に発現されたEGFRvIIIを有するまたは有さないCT-2Aグリオーマ細胞との相互作用後の、EGFRvIII CAR-T細胞または対照T細胞によって産生されたIFN γ の定量を示すグラフを提供する。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0070】

【図11B】図11Bは、EGFRvIII CAR-T細胞または対照T細胞との共培養後の、野生型EGFRまたはEGFRvIIIを有するCT-2Aグリオーマ細胞の細胞死のパーセンテージを示すグラフを提供する。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0071】

【図12】図12は、DSPE-PEG-EGFRvIII(「VAX」)または対照ワクチン接種を受けたマウスにおけるEGFRvIII CAR T細胞のパーセンテージを示すグラフを提供する。

【0072】

【図13】図13は、in vitroのDSPE-PEG-EGFRvIII(「VAX」)ありまたはなしの、EGFRvIII発現標的細胞に応答した循環CAR Tまたは非CAR T細胞(n=5)のサイトカイン(IFN γ およびTNF α)分泌を示すグラフを提供する。

10

20

30

40

50

【0073】

【図14】図14は、実験タイムラインを示す概略図（上）およびEGFRvIII発現CT-2A細胞が移植されDSPE-PEG-EGFRvIII（「PepVIII Vax」）が投与されたマウスにおける腫瘍1mg当たりのCAR-T細胞の数によって測定したEGFRvIII CAR-T細胞の腫瘍浸潤を示すグラフを提供する。

【0074】

【図15】図15は、PBSまたはDSPE-PEG-EGFRvIII（「VAX」）に応答した腫瘍浸潤性CAR-T細胞のサイトカイン（IFN γ およびTNF α ）分泌を示すグラフを提供する。

【0075】

【図16】図16は、PBSまたはDSPE-PEG-EGFRvIII（「PepVIII Vax」）に応答した腫瘍浸潤性CAR-T細胞の、グランザイムBの発現レベル（左）およびKi67によって決定した増殖（右）を示すグラフを提供する。

【0076】

【図17】図17は、DSPE-PEG-EGFRvIII（「VAX」）ありまたはなしの、腫瘍浸潤性EGFRvIII CAR-T細胞上のPD-1およびTIM3の発現を示すグラフを提供する。

【0077】

【図18A】図18Aは、リンパ枯渇条件下でEGFRvIII CAR-T+/-DSPE-PEG-EGFRvIIIワクチン接種（「VAX」）で処置したCT-2A腫瘍保有マウスにおける腫瘍体積を示すグラフを提供する。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0078】

【図18B】図18Bは、図18AのCT-2A腫瘍保有マウスのKaplan-Meier生存グラフを提供する。

【0079】

【図19】図19は、FITCおよび黒色腫関連抗原TRP1の両方を標的化するFITC-抗原二特異性CAR設計の概略図を提供する。

【0080】

【図20】図20は、T細胞表面上のFITC-TRP1 CAR発現を示すグラフを提供する。

【0081】

【図21】図21は、DSPE-PEG-FITCコーティングされたK562細胞またはB16F10細胞と共に共培養した際のFITC-TRP1二特異性CAR-TのIFN γ 分泌を示すグラフを提供する。単一特異性FITC CAR-T細胞およびTRP1 CAR-T細胞を対照として含めた。*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【0082】

【図22】図22は、*in vitro*でFITC-TRP1二特異性CAR-Tまたは単一特異性TRP1 CAR-T細胞と共に共培養した場合のTRP1発現標的細胞の細胞死のパーセンテージを示すグラフを提供する。共培養は、10:1のエフェクター対標的（E:T）比で6時間に設定した。

【0083】

【図23】図23は、cell trace violet追跡によって測定したDSPE-PEG-FITCワクチン接種の48時間後のリンパ節中のFITC-TRP1 CAR-T増殖を示すグラフを提供する。

【0084】

【図24A】図24Aおよび24Bは、リンパ枯渇プレコンディショニングを用いた、FITC-TRP1二特異性CAR-T治療単独またはCAR-TプラスDSPE-PEG-FITCワクチン接種（「VAX」）で処置したB16F10腫瘍保有マウスの腫瘍成

10

20

30

40

50

長（図24A）および動物生存（図24B）を示す。

【図24B】図24Aおよび24Bは、リンパ枯渇プレコンディショニングを用いた、FITC-TRP1二特異性CAR-T治療単独またはCAR-TプラスDSPE-PEG-FITCワクチン接種（「VAX」）で処置したB16F10腫瘍保有マウスの腫瘍成長（図24A）および動物生存（図24B）を示す。

【0085】

【図25】図25は、PBSまたはDSPE-PEG-FITCワクチン接種（「VAX」）を受けているマウスの末梢血中のFITC-TRP1二特異性CAR-Tの数を示すグラフを提供する。

【0086】

【図26】図26は、PBSまたはDSPE-PEG-FITCワクチン接種を受けているマウスにおけるB16F10腫瘍中へのFITC/TRP1-CAR T細胞の浸潤を示すグラフを提供する。

【0087】

【図27A】図27Aおよび27Bは、FITC-TRP1二特異性CAR-T治療単独またはCAR-TプラスDSPE-PEG-FITCワクチン接種（「VAX」）で処置したリンパ充満B16F10腫瘍保有マウスの腫瘍成長（図27A）および動物生存（図27B）を示す。

【図27B】図27Aおよび27Bは、FITC-TRP1二特異性CAR-T治療単独またはCAR-TプラスDSPE-PEG-FITCワクチン接種（「VAX」）で処置したリンパ充満B16F10腫瘍保有マウスの腫瘍成長（図27A）および動物生存（図27B）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0088】

概要

種々の疾患が、患者における進行性の免疫抑制の発達によって特徴付けられる。悪性腫瘍を有する患者における障害された免疫応答の存在は、特に十分に報告されてきた。がん患者および腫瘍保有マウスは、種々の変更された免疫機能、例えば、遅延型過敏症における減少、リンパ球の溶解機能および増殖応答における減少を示す。がん患者において免疫機能を増大させることは、腫瘍制御にとって有益な効果を有することができた。

【0089】

キメラ抗原受容体（CAR）T細胞治療は、血液学的悪性腫瘍を処置することに成功してきた。しかし、CAR-T細胞は、一部の患者において機能的に持続することができず、固形腫瘍では概して不十分な応答を示す。CAR-T治療のための現行のプロトコールは、多数のCAR-T細胞の注入に依存するが、これらの細胞は、死に絶え、または腫瘍に対する機能的活性を迅速に喪失する可能性がある。前臨床動物モデルでは、ワクチン接種を介してT細胞を*in vivo*で拡大させることは、T細胞治療の有効性を支えるための最も有効な戦略の1つであるが、伝統的なワクチンは、それらのキメラ抗原受容体を介してCAR-Tをブーストすることができないことが公知である。

【0090】

本開示に基づくと、CAR-Tの活性化および増殖の増強が、キメラ抗原受容体のリガンドおよび脂質を含む両親媒性リガンドコンジュゲートを使用して達成される。本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは、移入されたCAR-T細胞を*in vivo*で刺激することによる治療用CAR-T細胞の生成のための現行のアプローチのいくつかの欠点に対する解答を提供し、耐久性のある治療応答のために必要とされる注入されるCAR-T細胞の量を低下させ得、患者リンパ枯渇の必要を緩和し得る。

定義

【0091】

特許請求の範囲および本明細書において使用される用語は、特記しない限り、以下に示されるように定義される。

10

20

30

40

50

【0092】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「この(the)」は、文脈が明らかに他を示さない限り、複数形の指示対象を含むことに留意すべきである。

【0093】

本明細書で使用される場合、「約」は、当業者に理解され、それが使用される文脈に依存してある程度変動する。この用語の使用が、それが使用される文脈を考慮して当業者に明らかでない場合、「約」は、特定の値の最大でプラスまたはマイナス10%を意味する。

【0094】

本明細書で使用される場合、用語「アジュバント」は、特定の免疫原または抗原と共に、生じる免疫応答を増大させるまたは他の方法で変更もしくは改変する化合物を指す。免疫応答の改変には、抗体および細胞性免疫応答のいずれかまたは両方の特異性の強化または広がりが含まれる。免疫応答の改変は、ある特定の抗原特異的免疫応答を減少または抑制することも意味し得る。ある特定の実施形態では、アジュバントは、サイクリックジヌクレオチドである。一部の実施形態では、アジュバントは、本明細書に記載される免疫賦活性オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、アジュバントは、両親媒性リガンドコンジュゲート、またはこのコンジュゲートを含む組成物の投与の前に、それと併せて、またはその後投与される。一部の実施形態では、アジュバントは、両親媒性リガンドコンジュゲートと同じ組成物中で共製剤化される。

【0095】

「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および合成のアミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と類似の様式で機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣物を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝コードによってコードされるもの、ならびに後に改変されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメートおよびO-ホスホセリンである。アミノ酸アナログは、天然に存在するアミノ酸と同じ基礎的化学構造、即ち、水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基に結合した α 炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。かかるアナログは、改変されたR基（例えば、ノルロイシン）または改変されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基礎的化学構造を保持する。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と類似の様式で機能する化学化合物を指す。

【0096】

アミノ酸は、一般に公知の3文字記号、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨される1文字記号のいずれかによって、本明細書で言及され得る。同様に、ヌクレオチドは、一般に受容された1文字コードによって言及され得る。

【0097】

「アミノ酸置換」は、所定のアミノ酸配列（出発ポリペプチドのアミノ酸配列）中の少なくとも1つの既存のアミノ酸残基の、第2の異なる「置き換え」アミノ酸残基による置き換えを指す。「アミノ酸挿入」は、少なくとも1つのさらなるアミノ酸の、所定のアミノ酸配列中への取込みを指す。挿入は通常、1つまたは2つのアミノ酸残基の挿入からなるが、本発明のより大きい「ペプチド挿入」、例えば、約3個から約5個まで、またはさらには最大で約10、15または20個までのアミノ酸残基の挿入がなされ得る。挿入された残基（複数可）は、上で開示されるように、天然に存在しても天然に存在しなくてもよい。「アミノ酸欠失」は、所定のアミノ酸配列からの少なくとも1つのアミノ酸残基の除去を指す。

【0098】

本明細書で使用される場合、「両親媒性物質」または「両親媒性」は、親水性頭部基および疎水性テイルを含み、それによって両親媒性コンジュゲートを形成する、コンジュゲートを指す。一部の実施形態では、両親媒性物質コンジュゲートは、キメラ抗原受容体（

CAR) リガンドおよび1つまたは複数の疎水性脂質テイルを含み、本明細書で「両親媒性リガンドコンジュゲート」と呼ばれる。一部の実施形態では、両親媒性物質コンジュゲートは、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）をさらに含み、このポリマーは、1つもしくは複数の脂質またはCARリガンドにコンジュゲートされる。

【0099】

用語「軽減すること」は、疾患状態の予防、重症度もしくは進行における低下、軽快または治癒を含む、疾患状態、例えば、がんの処置における任意の治療的に有益な結果を指す。

【0100】

本明細書で使用される場合、用語「抗原性製剤」または「抗原性組成物」または「免疫原性組成物」は、脊椎動物、特に哺乳動物に投与された場合に、免疫応答を誘導する調製物を指す。

【0101】

用語「抗原提示細胞」または「APC」は、その表面上にMHCと複合体化した外来抗原を提示する細胞である。T細胞は、T細胞受容体(TCR)を使用してこの複合体を認識する。APCの例には、樹状細胞(DC)、末梢血単核球(PBMC)、単球（例えば、THP-1）、Bリンパ芽球様細胞（例えば、C1R、A2、1518 B-LCL）および単球由来樹状細胞(DC)が含まれるがこれらに限定されない。一部のAPCは、ファゴサイトーシスまたは受容体媒介性エンドサイトーシスのいずれかによって、抗原を内部移行させる。

【0102】

本明細書で使用される場合、用語「二特異性／二特異的(bispecific)」または「二機能性抗体」は、2つの異なる重鎖／軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体またはその断片を指す。二特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含む種々の方法によって産生され得る。例えば、Songsvilai & Lachmann, (1990) Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., (1992) J. Immunol. 148:1547-1553を参照のこと。

【0103】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗原受容体(CAR)」は、(i)少なくとも1つの所定のCARリガンドもしくは抗原、または所定のCARリガンドおよび抗原に結合することが可能な細胞外ドメイン、(ii)細胞外ドメインが由来するポリペプチドとは異なるシグナル伝達タンパク質に由来する1つまたは複数の細胞質ドメインを含む細胞内セグメント、ならびに(iii)膜貫通ドメインを含む人工膜貫通タンパク質受容体を指す。「キメラ抗原受容体(CAR)」は、「キメラ受容体」、「T-ボディ(T-body)」または「キメラ免疫受容体(CIR)」と呼ばれる場合がある。

【0104】

「CAR抗原」と相互交換可能に使用される「CARリガンド」という語句は、任意の天然もしくは合成の分子（例えば、小分子、タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物、核酸）、またはCAR（例えば、CARの細胞外ドメイン）に特異的に結合できるそれらの一部もしくは断片を意味する。一部の実施形態では、CARリガンドは、腫瘍関連抗原またはその断片である。一部の実施形態では、CARリガンドは、タグである。当業者は、細胞治療において利用されているCARに基づく両親媒性リガンドコンジュゲートにおける使用のための適切なCARリガンドを決定できる。

【0105】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、細胞における生物学的プロセスの活性化または阻害、例えば、T細胞またはNK細胞などの免疫細胞の活性化を引き起こすシグナルを伝達するように機能することが公知の任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドドメインを意味する。例には、ILR鎖、CD28および／またはCD3ζが含まれる。

【0106】

本明細書で使用される場合、「がん抗原」は、(i)腫瘍特異的抗原、(ii)腫瘍関

10

20

30

40

50

連抗原、(i i i) 腫瘍特異的抗原を発現する細胞、(i v) 腫瘍関連抗原を発現する細胞、(v) 腫瘍上の胎児性抗原、(v i) 自家腫瘍細胞、(v i i) 腫瘍特異的膜抗原、(v i i i) 腫瘍関連膜抗原、(i x) 成長因子受容体、(x) 成長因子リガンド、および(x i) がんに関連する任意の他の型の抗原もしくは抗原提示細胞または材料を指す。

【0107】

本明細書で使用される場合、「CGオリゴデオキシヌクレオチド(CG ODN)」は、「CpG ODN」とも呼ばれ、グアニヌヌクレオチド(G)が後に続くシトシンヌクレオチド(C)を含む短い一本鎖合成DNA分子である。ある特定の実施形態では、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、CG ODNである。

【0108】

本明細書で使用される場合、用語「共刺激リガンド」は、T細胞上の同族共刺激分子に特異的に結合し、それによって、例えば、TCR/CD3複合体とペプチドがロードされたMHC分子との結合によって提供される一次シグナルに加えて、増殖、活性化、分化などが含まれるがこれらに限定されないT細胞応答を媒介するシグナルを提供する、抗原提示細胞(例えば、APC、樹状細胞、B細胞など)上の分子を含む。共刺激リガンドには、CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド(ICOS-L)、細胞間接着分子(rCAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンボトキシンベータ受容体、TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3に特異的に結合するリガンドが含まれ得るがこれらに限定されない。共刺激リガンドは、とりわけ、例えば、CD27、CD28、4-1BB、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に特異的に結合するリガンドであるがこれらに限定されない、T細胞上に存在する共刺激分子に特異的に結合する抗体もまた包含する。

【0109】

「共刺激分子」は、共刺激リガンドに特異的に結合し、それによって、例えば増殖であるがこれに限定されない、T細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激分子には、MHCクラスII分子、BTLAおよびTollリガンド受容体が含まれるがこれらに限定されない。

【0110】

「共刺激シグナル」は、本明細書で使用される場合、一次シグナル、例えばTCR/CD3ライゲーションと組み合わせさせて、T細胞増殖および/または重要な分子の上方調節もしくは下方調節をもたらすシグナルを指す。

【0111】

指定のポリペプチドまたはタンパク質「に由来する」ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、ポリペプチドの起源を指す。好ましくは、特定の配列に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は、その配列またはその一部分と本質的に同一であるアミノ酸配列を有し、この部分は、少なくとも10~20アミノ酸、好ましくは少なくとも20~30アミノ酸、より好ましくは少なくとも30~50アミノ酸からなるか、またはその配列中にその起源を有するとして当業者には他の方法で同定可能である。

【0112】

別のペプチドに由来するポリペプチドは、出発ポリペプチドと比較して1つまたは複数の変異、例えば、別のアミノ酸残基で置換されたまたは1つもしくは複数のアミノ酸残基挿入もしくは欠失を有する1つまたは複数のアミノ酸残基を有し得る。

【0113】

ポリペプチドは、天然に存在しないアミノ酸配列を含み得る。かかるバリエーションは、出発分子と100%未満の配列同一性または類似性を必然的に有する。好ましい実施形態では、バリエーションは、例えば、バリエーション分子の長さにわたって、出発ポリペプチドのアミノ酸配列と約75%~100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性、より好ましくは

10

20

30

40

50

約80%～100%未満、より好ましくは約85%～100%未満、より好ましくは約90%～100%未満（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）、最も好ましくは約95%～100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性のアミノ酸配列を有する。

【0114】

一実施形態では、出発ポリペプチド配列とそれに由来する配列との間には、1アミノ酸の差異が存在する。この配列に関する同一性または類似性は、配列をアラインさせ、必要な場合最大のパーセント配列同一性を達成するためにギャップを導入した後に、候補配列中の、出発アミノ酸残基と同一（即ち、同じ残基）であるアミノ酸残基のパーセンテージとして、本明細書で定義される。

【0115】

本明細書で使用される場合、抗原「交差提示」という用語は、APC上のMHCクラスIおよびクラスII分子を介した、T細胞への外因性タンパク質抗原の提示を指す。

【0116】

本明細書で使用される場合、用語「細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答」は、細胞傷害性T細胞によって誘導される免疫応答を指す。CTL応答は、CD8⁺T細胞によって主に媒介される。

【0117】

本明細書で使用される場合、用語「有効用量」または「有効投薬量」は、所望の効果を達成するまたは少なくとも部分的に達成するのに十分な量として定義される。用語「治療有効用量」は、疾患に既に罹患している患者において、その疾患およびその合併症を治療するまたは少なくとも部分的に停止させるのに十分な量として定義される。この使用のために有効な量は、処置されている障害の重症度および患者自身の免疫系の全般的状態に依存する。

【0118】

本明細書で使用される場合、用語「エフェクター細胞」または「エフェクター免疫細胞」は、免疫応答に、例えば、免疫エフェクター応答の促進に関与する細胞を指す。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、抗原を特異的に認識する。免疫エフェクター細胞の例には、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、単球、マクロファージ、T細胞（例えば、細胞傷害性Tリンパ球（CTL））が含まれるがこれらに限定されない。一部の

【0119】

本明細書で使用される場合、用語「免疫エフェクター機能」または「免疫エフェクター応答」は、標的に対する免疫応答を促進する免疫エフェクター細胞の機能または応答を指す。

【0120】

本明細書で使用される場合、用語「血液学的がん」は、リンパ腫、白血病、骨髄腫またはリンパ性悪性腫瘍、ならびに脾臓およびリンパ節のがんを含む。例示的なリンパ腫には、B細胞リンパ腫（B細胞血液学的がん）およびT細胞リンパ腫の両方が含まれる。B細胞リンパ腫には、ホジキンリンパ腫およびほとんどの非ホジキンリンパ腫の両方が含まれる。B細胞リンパ腫の限定的な例には、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、小細胞リンパ球性リンパ腫（small cell lymphocytic lymphoma）（慢性リンパ球性白血病と重複する）、マンツル細胞リンパ腫（MCL）、バーキットリンパ腫、縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（mediastinal large B cell lymphoma）、ワルデンストレームマクログロブリン血症、節性辺縁帯B細胞リンパ腫（nodal marginal zone B cell lymphoma）、脾辺縁帯リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症が含まれる。T細胞リンパ腫の非限定的な例には、節外性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫および血管免疫芽球性T細胞リンパ腫が含まれる。血液学的悪性腫瘍には、例えば、二次性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病および急性リ

10

20

30

40

50

ンパ芽球性白血病であるがこれらに限定されない白血病もまた含まれる。血液学的悪性腫瘍には、例えば、多発性骨髄腫およびくすぶり型多発性骨髄腫であるがこれらに限定されない骨髄腫がさらに含まれる。他の血液学のおよび／またはB細胞もしくはT細胞関連がんが、血液学的悪性腫瘍という用語によって包含される。

【0121】

本明細書で使用される場合、「免疫細胞」は、免疫応答において役割を果たす造血起源の細胞である。免疫細胞には、リンパ球（例えば、B細胞およびT細胞）、ナチュラルキラー細胞および骨髄性細胞（例えば、単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球および顆粒球）が含まれる。

【0122】

本明細書で使用される場合、「免疫賦活性オリゴヌクレオチド」は、免疫応答を刺激（例えば、誘導または増強）できるオリゴヌクレオチドである。

【0123】

用語「免疫応答を誘導すること」および「免疫応答を増強すること」は、相互交換可能に使用され、特定の抗原に対する免疫応答（即ち、受動または適応のいずれか）の刺激を指す。CDCまたはADCCを誘導することに関して使用される場合、「誘導する」という用語は、特定の直接的細胞殺滅機構の刺激を指す。

【0124】

本明細書で使用される場合、「予防を必要とする」、「処置を必要とする」または「それを必要とする」対象は、適切な医療施術者（例えば、ヒトの場合には医師、看護師またはナース・プラクティショナー；非ヒト哺乳動物の場合には獣医師）の判断によって、所与の処置（例えば、両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物による処置）から合理的に利益を得る対象を指す。

【0125】

用語「*in vivo*」は、生きた生物において生じるプロセスを指す。

【0126】

本明細書で使用される場合、用語「連結した」、「作動可能に連結した」、「融合した」または「融合」は、相互交換可能に使用される。これらの用語は、化学的コンジュゲーションまたは組換えDNAテクノロジーを含む適切な手段によって、さらに2つのエレメントまたは構成成分またはドメインと一緒に接続することを指す。化学的コンジュゲーション（例えば、ヘテロ二機能性架橋剤を使用する）の方法は、組換えDNAテクノロジーの方法と同様、当該分野で公知である。

【0127】

用語「脂質」は、非極性溶媒中で可溶性であり水中で不溶性である生体分子を指す。脂質は、水性環境において小胞または膜などの構造をそれらが形成することを可能にする、疎水性または両親媒性分子と記載される場合が多い。脂質には、脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質（コレステロールを含む）、プレノール（prenol）脂質、サッカロ脂質（saccharolipid）およびポリケチドが含まれる。一部の実施形態では、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートに適切な脂質は、生理的条件下でヒト血清アルブミンに結合する。一部の実施形態では、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートに適切な脂質は、生理的条件下で細胞膜中に挿入する。一部の実施形態では、脂質は、生理的条件下でアルブミンに結合し、細胞膜中に挿入する。一部の実施形態では、脂質は、ジアシル脂質である。一部の実施形態では、ジアシル脂質は、12個よりも多くの炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個または少なくとも18個の炭素を含む。

【0128】

用語「哺乳動物」または「対象」または「患者」は、本明細書で使用される場合、ヒトおよび非ヒトの両方を含み、これには、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマおよびブタが含まれるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0129】

「核酸」は、一本鎖形態または二本鎖形態のいずれかの、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらのポリマーを指す。特に限定しない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似の様式で代謝される、天然ヌクレオチドの公知のアナログを含む核酸を包含する。他に指示がなければ、特定の核酸配列は、その保存的に改変されたバリエーション（例えば、縮重コドン置換）および相補配列ならびに明示的に示される配列もまた暗黙に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって、達成され得る（Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; および Cassol et al., 1992; Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994）。アルギニンおよびロイシンについては、2番目の塩基における改変もまた保存的であり得る。核酸という用語は、遺伝子、遺伝子によってコードされるcDNAおよびmRNAと相互交換可能に使用される。

10

【0130】

本発明のポリヌクレオチドは、未改変RNAもしくはDNAまたは改変RNAもしくはDNAであり得る、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチド（polydeoxribonucleotide）から構成され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖もしくはより典型的には二本鎖であり得るまたは一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子から構成され得る。さらに、ポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖領域から構成され得る。ポリヌクレオチドは、1つもしくは複数の改変塩基、または安定性もしくは他の理由のために改変されたDNAもしくはRNA骨格もまた含み得る。「改変」塩基には、例えば、トリチル化塩基および普通でない塩基、例えばイノシンが含まれる。種々の改変が、DNAおよびRNAに対してなされ得る；したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的または代謝的に改変された形態を包含する。

20

【0131】

一部の実施形態では、本発明のペプチドは、ヌクレオチド配列によってコードされる。本発明のヌクレオチド配列は、クローニング、遺伝子治療、タンパク質の発現および精製、変異導入、それを必要とする宿主のDNAワクチン接種、例えば受動免疫のための抗体生成、PCR、プライマーおよびプローブ生成などを含むいくつかの適用のために有用であり得る。

30

【0132】

本明細書で使用される場合、「非経口投与」、「非経口（で）投与される」および他の文法的に等価な語句は、通常は注射による、経腸および外用投与以外の投与の様式を指し、これには、静脈内、鼻腔内、眼内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節腔内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、脳内、頭蓋内、頸動脈内および胸骨内の注射および注入が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0133】

本明細書で一般に使用される場合、「薬学的に許容される」は、合理的なベネフィット／リスク比に相応した、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトおよび動物の組織、臓器および／または体液と接触して使用するのに適切である、確かな医学的判断の範囲内の化合物、材料、組成物および／または投薬形態を指す。

【0134】

本明細書で使用される場合、用語「生理的条件」は、対象のin vivo状態を指す。一部の実施形態では、生理的条件は、中性pH（例えば、6～8の間のpH）を指す。

50

【0135】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために、本明細書で相互交換可能に使用される。これらの用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学的模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに当てはまる。

【0136】

本明細書で使用される場合、「小分子」は、約500ダルトン未満の分子量を有する分子である。

【0137】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。例えば、本発明の方法および組成物は、がんまたは感染症を有する対象を処置するために使用され得る。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などを含む。

【0138】

用語「十分な量」または「～するのに十分な量」は、所望の効果を生じるのに十分な量、例えば、腫瘍の直径を低減させるのに十分な量を意味する。

【0139】

用語「T細胞」は、細胞表面上のT細胞受容体の存在によって他の白血球から識別され得るある型の白血球を指す。Tヘルパー細胞（別名、 T_H 細胞または $CD4^+$ T細胞）ならびに T_H1 、 T_H2 、 T_H3 、 T_H17 、 T_H9 および T_{FH} 細胞を含むサブタイプ、細胞傷害性T細胞（即ち、 T_C 細胞、 $CD8^+$ T細胞、細胞傷害性Tリンパ球、Tキラー細胞、キラーT細胞）、メモリーT細胞ならびにセントラルメモリーT細胞（ T_{CM} 細胞）、エフェクターメモリーT細胞（ T_{EM} および T_{EMRA} 細胞）および常在性メモリーT細胞（ T_{RM} 細胞）を含むサブタイプ、調節性T細胞（別名、 T_{reg} 細胞またはサプレッサーT細胞）ならびに $CD4^+FOXP3^+T_{reg}$ 細胞、 $CD4^+FOXP3^-T_{reg}$ 細胞、 T_r1 細胞、 T_h3 細胞および $T_{reg}17$ 細胞を含むサブタイプ、ナチュラルキラーT細胞（別名、NK T細胞）、粘膜関連インバリアントT細胞（MAIT）、ならびに $V\gamma9/V\delta2$ T細胞を含むガンマデルタT細胞（ $\gamma\delta$ T細胞）が含まれるがこれらに限定されない、T細胞のいくつかのサブセットが存在する。上述のまたは言及していないT細胞のうちいずれか1つまたは複数が、本発明の使用の方法のための標的細胞型であり得る。

【0140】

本明細書で使用される場合、用語「T細胞活性化」または「T細胞の活性化」は、それらの表面上に抗原特異的T細胞受容体を発現する成熟T細胞が、それらの同族抗原を認識し、細胞周期に入ること、サイトカインまたは溶解酵素を分泌すること、および細胞ベースのエフェクター機能を開始することまたは細胞ベースのエフェクター機能を実施するのにコンピテントになることによって応答する、細胞プロセスを指す。T細胞活性化は、完全に活性化されるために、少なくとも2つのシグナルを必要とする。第1は、抗原-主要組織適合複合体（MHC）によるT細胞抗原特異的受容体（TCR）の係合後に生じ、第2は、共刺激分子（例えば、 $CD28$ ）の引き続く係合によって生じる。これらのシグナルは、核に伝達され、T細胞のクローン性拡大、細胞表面上の活性化マーカーの上方調節、エフェクター細胞への分化、細胞傷害性もしくはサイトカイン分泌の誘導、アポトーシスの誘導、またはそれらの組合せを生じる。

【0141】

本明細書で使用される場合、用語「T細胞媒介性応答」は、エフェクターT細胞（例えば、 $CD8^+$ 細胞）およびヘルパーT細胞（例えば、 $CD4^+$ 細胞）が含まれるがこれらに限定されないT細胞によって媒介される任意の応答を指す。T細胞媒介性応答には、例えば、T細胞細胞傷害性および増殖が含まれる。

【0142】

用語「T細胞細胞傷害性」は、CD8+T細胞活性化によって媒介される任意の免疫応答を含む。例示的な免疫応答には、サイトカイン産生、CD8+T細胞増殖、グランザイムまたはパーフォリン産生、および感染性病原体のクリアランスが含まれる。

【0143】

「治療用抗体」は、抗体、抗体の断片、または抗体に由来する構築物であり、標的細胞上の細胞表面抗原に結合して、治療効果を引き起こすことができる。かかる抗体は、キメラ、ヒト化または完全ヒト抗体であり得る。かかる抗体を産生するための方法は、当該分野で公知である。かかる抗体には、抗体の単鎖Fc断片、ミニボディ（minibody）およびダイアボディ（diabody）が含まれる。がん治療に有用であることが当該分野で公知の治療用抗体のいずれかが、本明細書に記載される組成物との併用療法において使用され得る。治療用抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。好ましい実施形態では、治療用抗体は、がん抗原を標的とする。一部の実施形態では、治療用抗体は、タグを含む両親媒性リガンドコンジュゲートによって認識されるタグ結合ドメインを含む。

10

【0144】

本明細書で使用される場合、「治療用タンパク質」は、医薬として対象に投与され得る、任意のポリペプチド、タンパク質、タンパク質バリエーション、融合タンパク質および／またはそれらの断片を指す。

【0145】

用語「治療有効量」は、疾患の症状を軽減するのに有効な量である。予防は治療とみなされ得るので、治療有効量は「予防有効量」であり得る。

20

【0146】

用語「処置する（treat）」、「処置すること（treating）」および「処置」は、本明細書で使用される場合、本明細書に記載される治療的または予防的手段を指す。「処置」の方法は、かかる処置を必要とする対象、例えば、CAR T細胞治療を受けている対象への、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートの投与を使用する。一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートは、障害もしくは再発している障害を予防、治療、遅延させるため、障害もしくは再発している障害の重症度を低減させるため、または障害もしくは再発している障害の1つもしくは複数の症状を軽減するため、あるいはかかる処置の非存在下で予測される生存を超えて対象の生存を延長させるために、特定の抗原に対する増強された免疫応答を必要とする対象、またはかかる障害を最終的に獲得し得る対象に投与される。

30

【0147】

本明細書で使用される場合、「ワクチン」は、アジュバントと組み合わせて本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲートを含む製剤を指し、これは、脊椎動物に投与することが可能である形態であり、感染症もしくは疾患を予防するおよび／もしくは軽減するために、ならびに／または感染症もしくは疾患の少なくとも1つの症状を低減させるために、ならびに／または合成ナノ粒子の別の用量の有効性を増強するために免疫を誘導するのに十分な防御免疫応答を誘導する。典型的には、ワクチンは、本明細書に記載される組成物が懸濁または溶解される従来の食塩水または緩衝水溶液媒体を含む。この形態では、本明細書に記載される組成物は、感染症または疾患を予防、軽減または他の方法で処置するために使用される。宿主中に導入されると、ワクチンは、抗体および／もしくはサイトカインの産生ならびに／または細胞傷害性T細胞、抗原提示細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞および／もしくは他の細胞応答の活性化が含まれるがこれらに限定されない免疫応答を惹起する。

40

キメラ抗原受容体

【0148】

一部の態様では、本開示は、キメラ抗原受容体（CAR）エフェクター細胞と併せて使用または実施される組成物および方法を提供する。

【0149】

50

キメラ抗原受容体（CAR）は、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、ナチュラルキラー細胞または他の免疫細胞）に、リガンドに対する任意の特異性を付与し、認識およびリガンドへの結合の際にエフェクター細胞の活性化を生じる、遺伝子操作された人工膜貫通受容体である。典型的には、これらの受容体は、T細胞に、モノクローナル抗体の抗原特異性を付与するために使用される。

【0150】

一部の実施形態では、CARは、以下の3つのドメインを含む：1）シグナルペプチド、リガンドまたは抗原認識領域（例えば、scFv）および可動性スペーサーを典型的には含む、外部ドメイン；2）膜貫通（TM）ドメイン；3）1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを典型的には含む、内部ドメイン（endodomain）（あるいは「活性化ドメイン」としても公知）。CARの外部ドメインは、細胞の外側に存在し、細胞外空間に曝露され、それによって、その同族リガンドとの相互作用のために利用しやすい。TMドメインは、エフェクター細胞の細胞膜中にCARがアンカリングされるのを可能にする。3番目の内部ドメイン（「活性化ドメイン」としても公知）は、その特異的リガンドへのCARの結合の際のエフェクター細胞活性化を補助する。一部の実施形態では、エフェクター細胞活性化は、サイトカインおよびケモカイン産生の誘導、ならびに細胞の細胞溶解活性の活性化を含む。一部の実施形態では、CARは、細胞傷害性を腫瘍細胞へと再方向付ける。

【0151】

一部の実施形態では、CARは、特異的標的リガンドまたは抗原に結合するリガンド特異的または抗原特異的な認識ドメイン（結合ドメインとも呼ばれる）を含む。一部の実施形態では、結合ドメインは、シグナル伝達ドメインに次に連結される膜貫通ドメインに融合された、単鎖抗体可変断片（scFv）、係留されたリガンド、または共受容体の細胞外ドメインである。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、CD3ζまたはFcRγに由来する。一部の実施形態では、CARは、CD28、CD137（4-1BBとしても公知）、CD134（OX40としても公知）およびCD278（ICOSとしても公知）などのタンパク質に由来する1つまたは複数の共刺激ドメインを含む。

【0152】

CARの抗原結合ドメインと標的細胞の表面上のその標的抗原との係合は、CARのクラスターリングを生じ、活性化刺激をCAR含有細胞に送達する。一部の実施形態では、CARの主な特徴は、免疫エフェクター細胞の特異性を再方向付けし、それによって、増殖、サイトカイン産生、ファゴサイトーシス、またはモノクローナル抗体、可溶性リガンドもしくは細胞特異的共受容体の細胞特異的標的化能を活用する主要組織適合複合体（major histocompatibility）（MHC）非依存的様式で標的抗原発現細胞の細胞死を媒介できる分子の産生を誘発するそれらの能力である。CD3ζまたはFcRγ由来のシグナル伝達ドメインを含むように操作されたscFvベースのCARは、T細胞活性化およびエフェクター機能のための強力なシグナルを送達することが示されているが、これらは、随伴性の共刺激シグナルの非存在下でT細胞の生存および拡大を促進するシグナルを惹起するのには不十分である。1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、CD28、CD137、CD134およびCD278に由来する細胞内共刺激ドメイン）と一緒にCD3ζまたはFcRγに由来する結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通およびシグナル伝達ドメインを含むCARの新たな生成は、*in vitro*のCAR発現T細胞において、動物モデルおよびがん患者において、抗腫瘍活性ならびに増加したサイトカイン分泌、溶解活性、生存および増殖をより効率的に方向付けることが示されている（Milone et al., Molecular Therapy, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., Molecular Therapy, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., PNAS, 2009; 106:3360-3365）。

【0153】

一部の実施形態では、キメラ抗原受容体発現エフェクター細胞（例えば、CAR-T細胞）は、疾患または状態を有する患者に由来し、リガンドに対する任意の特異性を有する少なくとも1つのCARを発現するように *in vitro* で遺伝子改変された細胞であ

10

20

30

40

50

る。これらの細胞は、CARへのリガンドの特異的結合によって刺激または誘導され、同じ患者の疾患または状態の処置にとって有用な、少なくとも1つのエフェクター機能（例えば、サイトカインの誘導）を実行する。エフェクター細胞は、T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞またはヘルパーT細胞）であり得る。当業者は、他の細胞型（例えば、ナチュラルキラー細胞または幹細胞）がCARを発現し得ること、およびキメラ抗原受容体エフェクター細胞が、T細胞以外のエフェクター細胞を含み得ることを理解するはずである。一部の実施形態では、エフェクター細胞は、標的もしくは標的細胞（例えば、がん細胞）に接触した場合またはそれと近位になった場合に、標的細胞に対してそのエフェクター機能（例えば、細胞傷害性T細胞応答）を発揮するT細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）である（例えば、Chang and Chen (2017) Trends Mol Med 23(5):430-450を参照のこと）。

10

【0154】

それらの同族抗原へのT細胞の長期にわたる曝露は、感染したまたは形質転換された細胞の持続を可能にする、エフェクター機能の消耗を生じ得る。免疫チェックポイント遮断を誘導する薬剤を使用して宿主エフェクター機能を刺激するまたは若返らせるための最近開発された戦略は、いくつかのがんの処置について成功をもたらしている。出現しつつある証拠は、T細胞消耗が、キメラ抗原受容体発現T細胞（CAR-T細胞）による持続性の長寿命の抗腫瘍活性における顕著な妨害もまた示し得ることを示唆している。一部の実施形態では、CAR形質導入の前の患者から回収されたT細胞の分化状態、およびCAR-T細胞を再導入する前に患者が受けるコンディショニングレジメン（例えば、アルキル化剤、フルダラビン、全身照射の追加または排除）は、CAR-T細胞の持続および細胞傷害潜在力に大きく影響し得る。T細胞集団を（抗CD3／CD28または刺激細胞を介して）刺激するおよび（IL-2などのサイトカインを介して）拡大させる*in vitro*培養条件もまた、CAR-T細胞の分化状態およびエフェクター機能を変更させることができる（Ghoneim et al., (2016) Trends in Molecular Medicine 22(12):1000-1011）。

20

【0155】

本開示は、治療用CAR-T細胞の生成のための現行のアプローチのいくつかの欠点に取り組む。治療用CAR-T細胞調製の既存の方法は、養子細胞移入に十分な数の改変細胞を得るために*in vitro*での広範な細胞培養を必要とする場合が多く、その間に、T細胞の天然の実体（identity）または分化状態が変化している場合があり、T細胞機能が損なわれている場合がある。さらに、患者が疾患進行を予防するための治療を緊急に必要としている場合、十分な量のCAR-T細胞を生成するために必要とされる時間は、患者を処置する機会と一致しない場合があり、治療の失敗および患者の死亡を生じる。本開示によって提供される組成物および方法は、この障害を回避し、CAR-T細胞の活性化および増殖を*in vivo*で刺激することによって、好都合でより生理学的に適切な治療的アプローチを提供する。さらに、現行のCAR-T細胞治療投薬計画は、患者の健康を弱め、CAR-Tの有効性を改善し得る助長的な環境を破壊するリンパ枯渇を事前に必要とする。一部の態様では、本開示は、養子移入されたCAR-T細胞が、リンパ枯渇の非存在下で*in vivo*でなおも生着でき、活発に増殖でき、拡大できるように、そのCAR-T細胞を刺激する方法を提供する。

30

40

【0156】

現行のCAR-T細胞治療は、CAR-Tエフェクター機能を維持するために、操作された共刺激シグナルのみに依拠する。他の共刺激シグナルおよび天然の刺激環境の欠如は、不完全なT細胞成熟化およびT細胞消耗の増加をもたらし得る。一態様では、本開示は、免疫細胞にとって生理学的に適切な活性化環境であるリンパ節中にT細胞を動員するための方法および組成物、ならびに最適なCAR-T細胞活性化のための必須の共刺激シグナルの完全な一揃いを提供するAPCを活性化するためのアジュバントの共投与を提供する。

【0157】

50

一部の実施形態では、特に、ALLおよび／またはNHLの処置について、適切なCARは、CD19またはCD20を標的とする。非限定的な例には、以下の構造を含むCARが含まれる：(i)抗CD19 scFv、CD8 H/TMDメイン、4-1BB CSドメインおよびCD3ζ TCRシグナル伝達ドメイン；(ii)抗CD19 scFv、CD28ヒンジおよび膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメインならびにCD3ζ TCRシグナル伝達ドメイン；ならびに(iii)抗CD20 scFv、IgGヒンジおよび膜貫通ドメイン、CD28/4-1BB共刺激ドメインならびにCD3ζ TCRシグナル伝達ドメイン。一部の実施形態では、Kymriah（商標）（チサゲンレクルユーセル；Novartis；以前にはCTL019）およびYescarta（商標）（アキシカブタジン シロルーセル；Kite Pharma）が含まれるがこれらに限定されない、本明細書で開示される組合せおよび方法との組合せに適切なCARエフェクター細胞が、CD19またはCD20を標的とする。

10

再標的化CAR T細胞

【0158】

一部の実施形態では、ユニバーサル免疫受容体、タグ、スイッチ、または免疫グロブリン上のFc領域に結合するCARを発現するように改変されたエフェクター細胞（例えば、T細胞）は、本明細書に記載される組成物および方法に適切である。

【0159】

一部の実施形態では、エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、ユニバーサル免疫受容体、即ちUniVIRを発現するように改変される。UniVIRの1つの型は、ビオチン結合免疫受容体(BBIR)である（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開US20140234348A1を参照のこと）。ユニバーサルキメラ受容体および／またはユニバーサルキメラ受容体を発現するエフェクター細胞に関する方法および組成物の他の例は、国際特許出願WO2016123122A1、WO2017143094A1、WO2013074916A1、米国特許出願US20160348073A1に記載されており、それらは全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0160】

一部の実施形態では、エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、ユニバーサルモジュラー抗タグキメラ抗原受容体(UniCAR)を発現するように改変される。この系は、複数の抗原に対するUniCAR移植された免疫細胞の再標的化を可能にする（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開US20170240612A1；その全体が参照により本明細書に組み込まれるCartellieri et al., (2016) Blood Cancer Journal 6, e458を参照のこと）。

30

【0161】

一部の実施形態では、エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、切り替え可能なキメラ抗原受容体およびキメラ抗原受容体エフェクター細胞(CAR-EC)スイッチを発現するように改変される。この系では、CAR-ECスイッチは、CAR-EC上のキメラ抗原受容体によって結合される第1の領域および標的細胞上の細胞表面分子に結合する第2の領域を有し、それによって、結合した標的細胞に対して細胞傷害性であるCAR-ECからの免疫応答を刺激する。一部の実施形態では、CAR-ECはT細胞であり、CAR-ECスイッチは、CAR-EC活性のための「オンのスイッチ」として作用し得る。活性は、スイッチの投与を低減させるまたは止めることによって「オフにされ」得る。これらのCAR-ECスイッチは、疾患または状態、例えばがんの処置のために、本明細書で開示されるCAR-EC、ならびに既存のCAR T細胞と共に使用され得、ここで、標的細胞は、悪性細胞である。かかる処置は、本明細書で、切り替え可能な免疫療法と呼ばれ得る（その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開US9624276B2）。

40

【0162】

一部の実施形態では、エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、ヒト免疫グロブリンの

50

Fc部分に結合する受容体（例えば、CD16V-BB-ζ）を発現するように改変される（その全体が参照により本明細書に組み込まれるKudo et al., (2014) Cancer Res 74(1):93-103）。

【0163】

一部の実施形態では、エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、ペプチドネオエピトープ（PNE）に結合するユニバーサル免疫受容体（例えば、切り替え可能なCAR、sCAR）を発現するように改変される。一部の実施形態では、ペプチドネオエピトープ（PNE）は、抗原を標的化する抗体（抗体スイッチ）内の規定された異なる位置に取り込まれている。したがって、sCAR-T細胞特異性は、ヒトプロテオーム中に存在しないPNEに対してのみ再方向付けられ、そうして、sCAR-T細胞と抗体スイッチとの間の直交性の相互作用を可能にする。この方法では、sCAR-T細胞は、完全に活性化されるために、抗体スイッチの存在に厳密に依存し、そうして、抗体スイッチの非存在下での内因性組織または抗原のCAR-T細胞オフターゲット認識を排除する（その全体が参照により本明細書に組み込まれるArcangeli et al., (2016) Transl Cancer Res 5(Suppl 2):S174-S177）。切り替え可能なCARの他の例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願US 20160272718 A1によって提供される。

【0164】

本明細書で使用される場合、用語「タグ」は、上記ユニバーサル免疫受容体、タグ、スイッチ、または免疫グロブリンのFc領域を包含する。一部の実施形態では、エフェクター細胞は、タグ結合ドメインを含むCARを発現するように改変される。一部の実施形態では、CARは、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン（PE）、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼまたはマルトース結合タンパク質に結合する。

抗タグキメラ抗原受容体（AT-CAR）

【0165】

CAR-T細胞の一般化された臨床適用には、いくつかの制限が存在する。例えば、全てのがん型によって普遍的に発現される単一の腫瘍抗原は存在しないので、CAR中の各scFvは、所望の腫瘍抗原に対する特異性を有するように操作される必要がある。さらに、CARによって標的とされる腫瘍抗原は、処置に応答して下方調節または変異されて、腫瘍回避を生じ得る。

【0166】

代替法として、ユニバーサル抗タグキメラ抗原受容体（AT-CAR）およびCAR-T細胞が開発されている。例えば、ヒトT細胞は、抗フルオレセインイソチオシアネート（FITC）CAR（抗FITC-CARと呼ばれる）を発現するように操作されている。このプラットフォームは、抗FITC scFv（細胞の表面上）とFITCとの間の高親和性相互作用、ならびに任意の抗がんベースのモノクローナル抗体、例えば、セツキシマブ（抗EGFR）、リツキシマブ（retuximab）（抗CD20）およびハーセプチン（抗Her2）にFITC分子（または他のタグ）をコンジュゲートする能力を利用して

【0167】

したがって、一部の実施形態では、エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO 2012082841およびUS 20160129109 A1中に少なくとも記載されるように、ユニバーサル抗タグキメラ抗原受容体（AT-CAR）を発現するように改変される。かかるAT-CAR系では、T細胞は、抗体などのタグ化タンパク質を認識し、それに結合する。例えば、一部の実施形態では、AT-CAR-T細胞は、タグ標識された抗体、例えば、FITC標識された抗体を認識する。一部の実施形態では、抗腫瘍抗原抗体は、タグ（例えば、FITC）にコンジュゲートされ、AT-CAR治療の前に、それと併せて、またはその後投与される。抗腫瘍

抗原抗体は、当業者に公知である。

【0168】

示されるように、タグ結合ドメインの結合特異性は、標的細胞に結合するために使用されるタンパク質にコンジュゲートされるタグの実体に依存する。例えば、本開示の一部の態様では、タグはFITCであり、タグ結合ドメインは抗FITC scFvである。あるいは、本開示の一部の態様では、タグは、ビオチンまたはPE（フィコエリトリン）であり、タグ結合ドメインは、抗ビオチンscFvまたは抗PE scFvである。

【0169】

一部の実施形態では、タグ化タンパク質の各製剤のタンパク質は、同じまたは異なり、このタンパク質は、抗体またはその抗原結合性断片である。一部の態様では、抗体またはその抗原結合性断片は、セツキシマブ（抗EGFR）、ニモツズマブ（抗EGFR）、パニツムマブ（抗EGFR）、リツキシマブ（抗CD20）、オマリズマブ（抗CD20）、トシツモマブ（抗CD20）、トラスツズマブ（抗Her2）、ゲムツズマブ（抗CD33）、アレムツズマブ（抗CD52）およびベバシズマブ（bevacuzimab）（抗VEGF）である。

【0170】

したがって、一部の実施形態では、タグ化タンパク質には、FITCコンジュゲート抗体、ビオチンコンジュゲート抗体、PEコンジュゲート抗体、ヒスチジンコンジュゲート抗体およびストレプトアビジンコンジュゲート抗体が含まれ、この抗体は、標的細胞によって発現されるTAAまたはTSAに結合する。例えば、タグ化タンパク質には、FITCコンジュゲートセツキシマブ、FITCコンジュゲートリツキシマブ、FITCコンジュゲートハーセプチン、ビオチンコンジュゲートセツキシマブ、ビオチンコンジュゲートリツキシマブ、ビオチンコンジュゲートハーセプチン、PEコンジュゲートセツキシマブ、PEコンジュゲートリツキシマブ、PEコンジュゲートハーセプチン、ヒスチジンコンジュゲートセツキシマブ、ヒスチジンコンジュゲートリツキシマブ、ヒスチジンコンジュゲートハーセプチン、ストレプトアビジンコンジュゲートセツキシマブ、ストレプトアビジンコンジュゲートリツキシマブおよびストレプトアビジンコンジュゲートハーセプチンが含まれるがこれらに限定されない。

【0171】

一部の実施形態では、AT-CAR発現T細胞の各集団のAT-CARは、同じまたは異なり、AT-CARは、タグ結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび活性化ドメインを含む。一部の実施形態では、タグ結合ドメインは、抗体またはその抗原結合性断片である。一部の態様では、タグ結合ドメインは、FITC、ビオチン、PE、ヒスチジンまたはストレプトアビジンに特異的に結合する。一部の実施形態では、タグ結合ドメインは抗原結合性断片であり、抗原結合性断片は、単鎖可変断片（scFv）、例えば、FITC、ビオチン、PE、ヒスチジンまたはストレプトアビジンに特異的に結合するscFvである。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒトCD8α鎖のヒンジおよび膜貫通領域である。一部の実施形態では、活性化ドメインは、CD28の細胞質領域、CD137（41BB）、OX40、HVEM、CD3ζおよびFcRεの細胞質領域のうち1つまたは複数を含む。

【0172】

一部の実施形態では、タグ化タンパク質の各製剤のタグは、同じまたは異なり、タグは、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ストレプトアビジン、ビオチン、ヒスチジン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン（PE）、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびマルトース結合タンパク質からなる群から選択される。

【0173】

タグは、化学的カップリングおよび化学的クロスリンカーなどの技術を使用して、タンパク質にコンジュゲートされ得る。あるいは、タグ化タンパク質を融合タンパク質として

10

20

30

40

50

コードするポリヌクレオチドベクターが調製され得る。次いで、細胞系は、タグ化タンパク質を発現するように操作され得、タグ化タンパク質は、培養培地から単離され得、精製され得、本明細書で開示される方法において使用され得る。

【0174】

一部の実施形態では、タグ化タンパク質は、A T - C A R 発現 T 細胞の投与の前に、それと併せて、またはその後、対象に投与される。一部の実施形態では、本開示は、対象においてがんを処置する方法であって、(a) 処置を必要とする対象に、タグ化タンパク質の製剤を投与することであって、タグ化タンパク質が、対象におけるがん細胞に結合すること、および (b) 対象に、抗タグキメラ抗原受容体 (A T - C A R) 発現 T 細胞の治療有効集団を投与することであって、A T - C A R 発現 T 細胞が、タグ化タンパク質に結合し、がん細胞死を誘導することを含み、それによって対象においてがんを処置する方法を提供する。

10

タンデム C A R (T a n C A R) エフェクター細胞

【0175】

がん処置、腫瘍不均一性および免疫編集のために C A R アプローチを使用することは、C A R 処置からの回避を引き起こし得ることが観察されている (Grupp et al., New England J. Med (2013) 368:1509-1518)。代替的アプローチとして、タンデム C A R または T a n C A R として公知の二特異性 C A R が、複数のがん特異的マーカーを同時に標的とするための試みにおいて開発されている。T a n C A R では、細胞外ドメインは、リンカーによって接続された 2 つの抗原結合特異性をタンデムで含む。したがって、2 つの結合特異性 (s c F v) は共に、単一の膜貫通部分に連結される：一方の s c F v は、膜に隣接し、他方の s c F v は、遠位位置にある。例示的な T a n C A R として、Grada et al. (Mol Ther Nucleic Acids (2013) 2, e105) は、C D 19 特異的 s c F v とそれに続く G l y - S e r リンカーおよび H E R 2 特異的 s c F v とを含む T a n C A R を記載している。H E R 2 - s c F v は、膜近傍位置にあり、C D 19 - s c F v は、遠位位置にあった。T a n C A R は、2 つの腫瘍制限抗原 (tumor restricted antigen) の各々に対する別個の T 細胞反応性を誘導することが示された。

20

【0176】

したがって、本開示の一部の態様は、T 細胞の二特異性活性化および標的化を媒介するタンデムキメラ抗原受容体に関する。本開示は、C A R について二特異性に言及するが、一部の態様では、C A R は、3 つ、4 つまたはそれよりも多くの腫瘍抗原を標的とすることができる。C A R T 細胞を使用して複数の抗原を標的化することは、T 細胞活性化を増強し得るおよび／または抗原喪失による腫瘍回避を相殺し得る。T a n C A R はまた、複数の発現された抗原を標的とし得、広い特異性を有する同じ細胞産物を使用して種々の腫瘍を標的とし得、および／または複数の特異性に起因して同じ結果を達成するあまり強くシグナル伝達しない C A R によるより良い毒性プロファイルを提供し得る。

30

【0177】

一部の実施形態では、本開示は、2 つの標的化ドメインを含む T a n C A R を提供する。一部の実施形態では、本開示は、3 つまたはそれよりも多くの標的化ドメインを含む多特異性 T a n C A R を提供する。別の実施形態では、本開示は、細胞表面において第 1 の C A R および第 2 の C A R を提供し、各 C A R は抗原結合ドメインを含み、第 1 の C A R の抗原結合ドメインは、第 1 の腫瘍抗原 (例えば、C D 19、C D 20、C D 22、H E R 2) に結合し、第 2 の C A R の抗原結合ドメインは、別の (異なる) 腫瘍抗原に結合する。T a n C A R は、参照により本明細書に組み込まれる U S 20160303230A1 および U S 20170340705A1 に記載されている。

40

【0178】

一部の実施形態では、本開示の T a n C A R は、2 つまたはそれよりも多くの腫瘍抗原を標的とする。例示的な腫瘍抗原には、C D 19、C D 20、C D 22、k 軽鎖、C D 30、C D 33、C D 123、C D 38、R O R 1、E r b B 2、E r b B 3 / 4、E G F r v I I I、癌胎児性抗原、E G P 2、E G P 40、メソテリン、T A G 72、P S M

50

A、NKG2Dリガンド、B7-H6、IL-13受容体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、ルイスY、G250/CALX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSC1、葉酸受容体- α 、CD44v7/8、8H9、NCAM、VEGF受容体、5T4、胎児AchR、NKG2Dリガンド、CD44v6、TEM1および/またはTEM8のうち1つまたは複数が含まれる。

【0179】

一部の実施形態では、本開示は、CD19および別の腫瘍抗原を標的とする二特異性TaN CARを提供する。一部の実施形態では、本開示は、CD22および別の腫瘍抗原を標的とする二特異性TaN CARを提供する。一部の実施形態では、本開示は、HER2および別の腫瘍抗原を標的とする二特異性TaN CARを提供する。一部の実施形態では、本開示は、IL13R- α 2および別の腫瘍抗原を標的とする二特異性TaN CARを提供する。一部の実施形態では、本開示は、VEGF-Aおよび別の腫瘍抗原を標的とする二特異性TaN CARを提供する。一部の実施形態では、本開示は、Tem8および別の腫瘍抗原を標的とする二特異性TaN CARを提供する。一部の実施形態では、本開示は、FAPおよび別の腫瘍抗原を標的とする二特異性TaN CARを提供する。一部の実施形態では、本開示は、EphA2および別の腫瘍抗原を標的とする二特異性TaN CARを提供する。一部の実施形態では、本開示は、以下の腫瘍抗原のうち1つもしくは複数、2つもしくはそれよりも多く、3つもしくはそれよりも多く、または4つもしくはそれよりも多くを標的とする二特異性TaN CARを提供する：CD19、CD22、HER2、IL13R- α 2、VEGF-A、Tem8、FAPまたはEphA2、およびそれらの任意の組合せ。一部の実施形態では、本開示は、HER2およびIL13R- α 2を標的とする二特異性TaN CARを提供する。一部の実施形態では、本開示は、CD19およびCD22を標的とする二特異性TaN CARを提供する。

キメラ抗原受容体およびCARエフェクター細胞を生成するための方法

【0180】

一部の実施形態では、対象のエフェクター細胞（例えば、T細胞）は、キメラ抗原受容体で遺伝子改変される（Sadelain et al., Cancer Discov. 3:388-398, 2013）。例えば、エフェクター細胞（例えば、T細胞）が提供され、キメラ抗原受容体をコードする組換え核酸が、CAR細胞を生成するために、患者由来エフェクター細胞（例えば、T細胞）中に導入される。一部の実施形態では、対象に由来しないエフェクター細胞（例えば、T細胞）が、キメラ抗原受容体で遺伝子改変される。例えば、一部の実施形態では、エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、「既製の」養子細胞治療として使用されるように操作された同種細胞、例えば、Celllectisによって開発されたユニバーサルキメラ抗原受容体T細胞（Universal Chimeric Antigen Receptor T cell）（UCART）である。UCARTは、特定のがん型を有する最大数の患者を処置するために使用されるように操作された同種CAR T細胞である。Celllectisが開発中のUCARTの非限定的な例には、以下の腫瘍抗原を標的とするものが含まれる：CD19、CD123、CD22、CS1およびCD38。

【0181】

当該分野で公知の種々の異なる方法が、本明細書で開示される核酸または発現ベクターのいずれかをエフェクター細胞（例えば、T細胞）中に導入するために使用され得る。核酸をエフェクター細胞（例えば、T細胞）中に導入するための方法の非限定的な例には、リポフェクション、トランスフェクション（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、高度に分岐した有機化合物を使用したトランスフェクション、カチオン性ポリマーを使用したトランスフェクション、デンドリマーベースのトランスフェクション、光学的トランスフェクション、粒子ベースのトランスフェクション（例えば、ナノ粒子トランスフェクション）、またはリポソーム（例えば、カチオン性リポソーム）を使用したトランスフェクション）、マイクロインジェクション、電気穿孔、細胞圧搾、ソノポレーション、プロトプラスト融合、インペイルフェクション（impalefection）、水力学的送達、遺

伝子銃、マグネトフェクション、ウイルストランスフェクションおよびヌクレオフェクションが含まれる。さらに、当該分野で公知のCRISPR/Cas9ゲノム編集テクノロジーが、CAR細胞活性を増強するために、CAR核酸をエフェクター細胞（例えば、T細胞）中に導入するため、および／または他の遺伝子改変（例えば、以下に記載されるもの）をエフェクター細胞（例えば、T細胞）中に導入するために使用され得る（CAR T細胞に関してのCRISPR/Cas9テクノロジーの使用については、例えば、US 9,890,393; US 9,855,297; US 2017/0175128; US 2016/0184362; US 2016/0272999; WO 2015/161276; WO 2014/191128; CN 106755088; CN 106591363; CN 106480097; CN 106399375; CN 104894068を参照のこと）。

10

【0182】

本明細書に記載される細胞または組成物のいずれかを生成するために使用され得る方法が本明細書に提供され、各細胞は、CAR（例えば、本明細書に記載されるCARのいずれか）を発現し得る。

【0183】

キメラ抗原受容体（CAR）は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および抗原結合ドメインが抗原に結合した場合にT細胞を刺激するのに十分なCD3ζ配列の細胞質配列を含み、必要に応じて、抗原結合ドメインが抗原に結合した場合にT細胞の共刺激を提供する1つまたは複数の（例えば、2つ、3つまたは4つの）共刺激タンパク質の細胞質配列（例えば、B7-H3、BTLA、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD80、CD160、CD244、ICOS、LAG3、LFA-1、LIGHT、NKG2C、4-1BB、OX40、PD-1、PD-L1、TIM3、およびCD83に特異的に結合するリガンドのうち1つまたは複数の細胞質配列）を含む細胞質シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、リンカーをさらに含み得る。CARの非限定的な態様および特色は、以下に記載される。例示的な抗原結合ドメイン、リンカー、膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含むCARおよびCAR細胞のさらなる態様は、例えば、Kakarla et al., Cancer J. 20:151-155, 2014; Srivastava et al., Trends Immunol. 36:494-502, 2015; Nishio et al., Oncoimmunology 4(2): e988098, 2015; Ghorashian et al., Br. J. Haematol. 169:463-478, 2015; Levine, Cancer Gene Ther. 22:79-84, 2015; Jensen et al., Curr. Opin. Immunol. 33:9-15, 2015; Singh et al., Cancer Gene Ther. 22:95-100, 2015; Li et al., Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 22:1753-1756, 2014; Gill et al., Immunol. Rev. 263:68-89, 2015; Magee et al., Discov. Med. 18:265-271, 2014; Gargett et al., Front. Pharmacol. 5:235, 2014; Yuan et al., Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 22:1137-1141, 2014; Pedgram et al., Cancer J. 20:127-133, 2014; Eshhar et al., Cancer J. 20:123-126, 2014; Ramos et al., Cancer J. 20:112-118, 2014; Maus et al., Blood 123:2625-2635, 2014; Jena et al., Curr. Hematol. Malig. Rep. 9:50-56, 2014; Maher et al., Curr. Gene Ther. 14:35-43, 2014; Riches et al., Discov. Med. 16:295-302, 2013; Cheadle et al., Immunol. Rev. 257:83-90, 2014; Davila et al., Int. J. Hematol. 99:361-371, 2014; Xu et al., Cancer Lett. 343:172-178, 2014; Kochenderfer et al., Nat. Rev. Clin. Oncol. 10:267-276, 2013; Hosing et al., Curr. Hematol. Malig. Rep. 8:60-70, 2013; Hombach et al., Curr. Mol. Med. 13:1079-1088, 2013; Xu et al., Leuk. Lymphoma 54:255-260, 2013; Gilham et al., Trends Mol. Med. 18:377-384, 2012; Lipowska-Bhalla et al., Cancer Immunol. Immunother. 61:953-962, 2012; Chmielewski et al., Cancer Immunol. Immunother. 61:1269-1277, 2013; Jena et al., Blood 116:1035-1044, 2010; Dotti et al., Immunolog

20

30

40

50

y Reviews 257(1): 107-126, 2013; Dai et al., Journal of the National Cancer Institute 108(7): djv439, 2016; Wang and Riviere, Molecular Therapy-Oncolytics 3: 16015, 2016; 米国特許出願公開第2018/0057609号; 同第2018/0037625号; 同第2017/0362295号; 同第2017/0137783号; 同第2016/0152723号、同第2016/0206656号、同第2016/0199412号、同第2016/0208018号、同第2015/0232880号、同第2015/0225480号; 同第2015/0224143号; 同第2015/0224142号; 同第2015/0190428号; 同第2015/0196599号; 同第2015/0152181号; 同第2015/0140023号; 同第2015/0118202号; 同第2015/0110760号; 同第2015/0099299号; 同第2015/0093822号; 同第2015/0093401号; 同第2015/0051266号; 同第2015/0050729号; 同第2015/0024482号; 同第2015/0023937号; 同第2015/0017141号; 同第2015/0017136号; 同第2015/0017120号; 同第2014/0370045号; 同第2014/0370017号; 同第2014/0369977号; 同第2014/0349402号; 同第2014/0328812号; 同第2014/0322275号; 同第2014/0322216号; 同第2014/0322212号; 同第2014/0322183号; 同第2014/0314795号; 同第2014/0308259号; 同第2014/0301993号; 同第2014/0296492号; 同第2014/0294784号; 同第2014/0286973号; 同第2014/0274909号; 同第2014/0274801号; 同第2014/0271635号; 同第2014/0271582号; 同第2014/0271581号; 同第2014/0271579号; 同第2014/0255363号; 同第2014/0242701号; 同第2014/0242049号; 同第2014/0227272号; 同第2014/0219975号; 同第2014/0170114号; 同第2014/0134720号; 同第2014/0134142号; 同第2014/0120622号; 同第2014/0120136号; 同第2014/0106449号; 同第2014/0106449号; 同第2014/0099340号; 同第2014/0086828号; 同第2014/0065629号; 同第2014/0050708号; 同第2014/0024809号; 同第2013/0344039号; 同第2013/0323214号; 同第2013/0315884号; 同第2013/0309258号; 同第2013/0288368号; 同第2013/0287752号; 同第2013/0287748号; 同第2013/0280221号; 同第2013/0280220号; 同第2013/0266551号; 同第2013/0216528号; 同第2013/0202622号; 同第2013/0071414号; 同第2012/0321667号; 同第2012/0302466号; 同第2012/0301448号; 同第2012/0301447号; 同第2012/0060230号; 同第2011/0213288号; 同第2011/0158957号; 同第2011/0104128号; 同第2011/0038836号; 同第2007/0036773号; および同第2004/0043401号に記載されている。例示的な抗原結合ドメイン、リンカー、膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含むCARおよびCAR細胞のさらなる態様は、WO2016/168595; WO12/079000; 同2015/0141347; 同2015/0031624; 同2015/0030597; 同2014/0378389; 同2014/0219978; 同2014/0206620; 同2014/0037628; 同2013/0274203; 同2013/0225668; 同2013/0116167; 同2012/0230962; 同2012/0213783; 同2012/0093842; 同2012/0071420; 同2012/0015888; 同2011/0268754; 同2010/0297093; 同2010/0158881; 同2010/0034834; 同2010/0015113; 同2009/0304657; 同2004/0043401; 同2014/0322253; 同2015/0118208; 同2015/0038684; 同2

10

20

30

40

50

014/0024601; 同2012/0148552; 同2011/0223129;
同2009/0257994; 同2008/0160607; 同2008/000368
3; 同2013/0121960; 同2011/0052554; および同2010/0
178276に記載されている。

A. 抗原結合ドメイン

【0184】

キメラ抗原受容体 (CAR) 中に含まれる抗原結合ドメインは、抗原 (例えば、腫瘍関連抗原 (TAA) または非がん性細胞上では発現されない抗原) またはユニバーサル受容体 (例えば、タグ) に特異的に結合し得る。抗原結合ドメインの非限定的な例には、モノクローナル抗体 (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgE および IgD) (例えば、完全ヒトまたはキメラ (例えば、ヒト化) 抗体)、抗体の抗原結合性断片 (例えば、Fab、Fab' または F(ab')₂ 断片) (例えば、完全ヒトまたはキメラ (例えば、ヒト化) 抗体の断片)、ダイアボディ、トリアボディ (triabody)、テトラボディ (tetrabody)、ミニボディ、scFv、scFv-Fc、(scFv)₂、scFab、bis-scFv、hc-IgG、BiTE、単ドメイン抗体 (例えば、V-NAR ドメインまたは VhH ドメイン)、IgNAR、および多特異性 (例えば、二特異性抗体) 抗体が含まれる。これらの抗原結合ドメインを作製する方法は、当該分野で公知である。

【0185】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、標的抗原に特異的に結合することが可能な抗体、例えば、免疫グロブリン分子 (例えば、軽鎖または重鎖免疫グロブリン分子) および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な (抗原結合性) 断片の、少なくとも1つの (例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの) CDR (例えば、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン由来の3つのCDRのいずれかまたは免疫グロブリン重鎖可変ドメイン由来の3つのCDRのいずれか) を含む。

【0186】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、単鎖抗体 (例えば、V-NAR ドメインもしくは VhH ドメイン、または本明細書に記載される単鎖抗体のいずれか) である。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体分子全体 (例えば、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体) またはマルチマー抗体 (例えば、二特異性抗体) である。

【0187】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインには、抗体断片および多特異性 (例えば、二特異性) 抗体または抗体断片が含まれる。抗体およびその抗原結合性断片の例には、単鎖 Fv (scFv)、Fab 断片、Fab' 断片、F(ab')₂、ジスルフィド連結 Fv (sdFv)、Fv、および VL または VH ドメインのいずれかを含む断片が含まれるがこれらに限定されない。

【0188】

本明細書に提供されるさらなる抗原結合ドメインは、ポリクローナル、モノクローナル、多特異性 (マルチマー、例えば、二特異性)、ヒト抗体、キメラ抗体 (例えば、ヒトーマウスキメラ)、単鎖抗体、細胞内で作製された抗体 (即ち、イントラボディ)、およびそれらの抗原結合性断片である。抗体またはその抗原結合性断片は、任意の型 (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA および IgY)、クラス (例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ および IgA₂) またはサブクラスのものであり得る。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、IgG₁ 抗体またはその抗原結合性断片である。一部の例では、抗原結合ドメインは、IgG₄ 抗体またはその抗原結合性断片である。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンである。

【0189】

抗原結合ドメインのさらなる例は、IgG の抗原結合性断片 (例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃ または IgG₄ の抗原結合性断片) (例えば、ヒトまたはヒト化 IgG、

10

20

30

40

50

例えば、ヒトまたはヒト化 I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 の抗原結合性断片)、I g A の抗原結合性断片 (例えば、I g A 1 または I g A 2 の抗原結合性断片) (例えば、ヒトまたはヒト化 I g A、例えば、ヒトまたはヒト化 I g A 1 または I g A 2 の抗原結合性断片)、I g D の抗原結合性断片 (例えば、ヒトまたはヒト化 I g D の抗原結合性断片)、I g E の抗原結合性断片 (例えば、ヒトまたはヒト化 I g E の抗原結合性断片) または I g M の抗原結合性断片 (例えば、ヒトまたはヒト化 I g M の抗原結合性断片) である。

【0190】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、例えば、食塩水中またはリン酸緩衝食塩水中で、約 1×10^{-7} M もしくは 1×10^{-7} M 未満 (例えば、約 1×10^{-8} M もしくは 1×10^{-8} M 未満、約 5×10^{-9} M もしくは 5×10^{-9} M 未満、約 2×10^{-9} M もしくは 2×10^{-9} M 未満、または約 1×10^{-9} M もしくは 1×10^{-9} M 未満) の親和性 (K_D) で、特定の抗原 (例えば、腫瘍関連抗原) に結合できる。

10

【0191】

当業者に理解され得るように、CAR 中に含める抗原結合ドメインの選択は、それを必要とする対象において標的とされる細胞 (例えば、がん細胞または腫瘍) の表面を定義するリガンドの型および数に依存し、ならびに／または両親媒性リガンドコンジュゲート上に存在するリガンドに依存する。例えば、一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、がん細胞上の細胞表面マーカーとして作用する、または腫瘍関連抗原 (例えば、CD19、CD30、Her2/neu、EGFR または BCMA) もしくは腫瘍特異的抗原 (TSA) であるリガンドを認識するように選択される。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、両親媒性リガンドコンジュゲート上のリガンドを認識する。

20

【0192】

一部の実施形態では、CAR エフェクター細胞 (例えば、CAR T 細胞) は、腫瘍抗原に結合する CAR 分子を含む (例えば、腫瘍抗原結合ドメインを含む)。一部の実施形態では、CAR 分子は、固形腫瘍 (例えば、乳がん、結腸がんなど) の腫瘍抗原を認識する抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、CAR 分子は、少なくとも 2 つの抗原結合ドメインを含む、上記タンデム CAR 分子である。一部の実施形態では、CAR 分子は、血液学的悪性腫瘍 (例えば、白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、急性前骨髄球性白血病、慢性白血病、慢性骨髄球性 (顆粒球性) 白血病、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫および辺縁帯 B 細胞リンパ腫、真性赤血球増加症、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫など) の腫瘍抗原を認識する抗原結合ドメインを含む。

30

【0193】

一部の実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍特異的抗原 (TSA) である。TSA は、腫瘍細胞に特有であり、身体中の他の細胞上には存在しない。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍関連抗原 (TAA) である。TAA は、腫瘍細胞に特有ではなく、その代わり、抗原に対する免疫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、免疫系が抗原に対して応答できるようにする条件下で生じ得る。一部の実施形態では、TAA は、免疫系が未熟であって応答できない胎児発生の間に正常細胞上で発現される、または正常細胞上では非常に低いレベルで通常は存在するが、腫瘍細胞上ではかなり高いレベルで発現される。

40

【0194】

ある特定の実施形態では、腫瘍関連抗原は、患者の腫瘍細胞を配列決定し、腫瘍中でのみ見出される変異したタンパク質を同定することによって決定される。これらの抗原は、「ネオ抗原」と呼ばれる。ネオ抗原が同定されると、治療用抗体がそれに対して産生され得、本明細書に記載される方法において使用され得る。

【0195】

一部の実施形態では、腫瘍抗原は、上皮がん抗原 (例えば、乳房、胃腸、肺)、前立腺特異的がん抗原 (PSA) もしくは前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、膀胱がん抗原、肺

50

(例えば、小細胞肺)がん抗原、結腸がん抗原、卵巣がん抗原、脳がん抗原、胃がん抗原、腎細胞癌抗原、膵がん抗原、肝臓がん抗原、食道がん抗原、頭頸部がん抗原または結腸直腸がん抗原である。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、リンパ腫抗原(例えば、非ホジキンリンパ腫またはホジキンリンパ腫)、B細胞リンパ腫がん抗原、白血病抗原、骨髄腫(例えば、多発性骨髄腫または形質細胞性骨髄腫)抗原、急性リンパ芽球性白血病抗原、慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leukemia)抗原または急性骨髄性白血病(acute myelogenous leukemia)抗原である。

【0196】

CARエフェクター細胞(例えば、CAR T細胞)によって標的とされ得る腫瘍抗原(例えば、腫瘍関連抗原(TAA)および腫瘍特異的抗原(TSA))には、IGH-I G K、43-9F、5T4、791Tgp72、シクロフィリン(acyclophilin) C関連タンパク質、アルファフエトプロテイン(AFP)、 α -アクチニン-4、A3、A33抗体に特異的な抗原、ART-4、B7、Ba733、BAGE、BCR-ABL、ベータカテニン、ベータHCG、BrE3-抗原、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3/CA 27.29/BCAA、CA195、CA242、CA-50、CAM43、CAMEL、CAP-1、炭酸脱水酵素IX、c-Met、CA19-9、CA72-4、CAM17.1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD68、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK4、CDK4m、CDKN2A、CO-029、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1a、結腸特異的抗原-p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-Met、DAM、E2A-PRL、EGFR、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、線維芽細胞成長因子(FGF)、FGF-5、Flt-1、Flt-3、葉酸受容体、G250抗原、Ga733VEpCAM、GAGE、gp100、GRO- β 、H4-RET、HLA-DR、HM1.24、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸素誘導性因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、HTgp-175、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、インスリン様成長因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KSA、KS-1-抗原、KS1-4、LAGE-1a、Le-Y、LDR/FUT、M344、MA-50、マクロファージ遊走阻害因子(MIF)、MAGE、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、MART-1、MART-2、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MG7-Ag、MOV18、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、MYL-RAR、NB/70K、Nm23H1、NuMA、NCA66、NCA95、NCA90、NY-ESO-1、p15、p16、p185erbB2、p180erbB3、PAM4抗原、膵がんムチン、PD1受容体(PD-1)、PD-1受容体リガンド1(PD-L1)、PD-1受容体リガンド2(PD-L2)、PI5、胎盤成長因子、p53、PLAGL2、Pmel17前立腺酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、PLGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RCAS1、RS5、RAGE、RANTES、Ras、T101、SAGE、S100、サバイビン、サバイビン-2B、SDDCAG16、TA-90/Mac2結合タンパク質、TAAL6、TAC、TAG-72

10

20

30

40

50

、TLP、テネイシン、TRAIL受容体、TRP-1、TRP-2、TSP-180、TNF- α 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、腫瘍壊死抗原、チロシナーゼ、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-1A-抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管新生マーカー、bc1-2、bc1-6およびK-ras、癌遺伝子マーカーおよび癌遺伝子産物が含まれるがこれらに限定されない（例えば、Sensi et al., Clin Cancer Res 2006, 12:5023-32; Parmiani et al., J Immunol 2007, 178:1975-79; Novellino et al. Cancer Immunol Immunother 2005, 54:187-207を参照のこと）。

【0197】

一部の実施形態では、腫瘍抗原は、ヒト慢性疾患またはがん（例えば、子宮頸がん）に関連するウイルスに由来するウイルス抗原である。例えば、一部の実施形態では、ウイルス抗原は、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、HPV抗原E6および／もしくはE7、C型肝炎ウイルス（HCV）、B型肝炎ウイルス（HBV）またはサイトメガロウイルス（CMV）に由来する。

【0198】

例示的ながんまたは腫瘍およびかかる腫瘍に関連する特異的腫瘍抗原（排他的ではないが）には、急性リンパ芽球性白血病（etv6、aml1、シクロフィリンb）、B細胞リンパ腫（Ig-イディオタイプ）、グリオーマ（E-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、 γ -カテニン、p120ctn）、膀胱がん（p21ras）、胆道がん（p21ras）、乳がん（MUCファミリー、HER2/neu、c-erbB-2）、子宮頸癌（p53、p21ras）、結腸癌（p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUCファミリー）、結腸直腸がん（結腸直腸関連抗原（CRC）-CO17-1A/GA733、APC）、絨毛癌（CEA）、上皮細胞がん（シクロフィリンb）、胃がん（HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖タンパク質）、肝細胞がん（ α -フェトプロテイン）、ホジキンリンパ腫（Imp-1、EBNA-1）、肺がん（CEA、MAGE-3、NY-ESO-1）、リンパ系細胞由来白血病（シクロフィリンb）、黒色腫（p5タンパク質、gp75、癌瘍胎児性抗原、GM2およびGD2ガングリオシド、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100）、骨髄腫（mycloma）（MUCファミリー、p21ras）、非小細胞肺癌（HER2/neu、c-erbB-2）、鼻咽頭がん（Imp-1、EBNA-1）、卵巣がん（MUCファミリー、HER2/neu、c-erbB-2）、前立腺がん（前立腺特異的抗原（PSA）ならびにその抗原性エピトープPSA-1、PSA-2およびPSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖タンパク質）、腎がん（HER2/neu、c-erbB-2）、子宮頸部および食道の扁平上皮がん、精巣がん（NY-ESO-1）、およびT細胞白血病（HTLV-1エピトープ）、ならびにウイルス産物またはタンパク質が含まれる。

【0199】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法において有用なCAR分子を含む免疫エフェクター細胞（例えば、CAR T細胞）は、メソテリン結合ドメインを含むCARを発現する（即ち、CAR T細胞は、メソテリンを特異的に認識する）。メソテリンは、卵巣がん、肺がんおよび膵がんを含む種々のがんにおいて過剰発現される腫瘍抗原である。

【0200】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法において有用なCAR分子を含む免疫エフェクター細胞（例えば、CAR T細胞）は、CD19結合ドメインを含むCARを発現する。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法において有用なCAR分子を含む免疫エフェクター細胞（例えば、CAR T細胞）は、HER2結合ドメインを含むCARを発現する。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法において有用なCAR分子を含む免疫エフェクター細胞（例えば、CAR T細胞）は、EGFR結合ドメインを含むCARを発現する。

【0201】

一部の実施形態では、CD19 標的化または結合ドメインを含むCARを発現するCARエフェクター細胞は、Kymriah (商標) (チサゲンレクルユーセル; Novartis; その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2016109410を参照のこと) またはYescarta (商標) (アキシカブタジン シロルーセル; Kite; その全体が参照により本明細書に組み込まれるUS20160346326を参照のこと) である。

B. リンカー

【0202】

(1) 抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間、および／または(2) 膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間にリンカーを必要に応じて含み得るCARが、本明細書に提供される。一部の実施形態では、リンカーは、ポリペプチドリンカーであり得る。例えば、リンカーは、約1アミノ酸と約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、約20アミノ酸、約18アミノ酸、約16アミノ酸、約14アミノ酸、約12アミノ酸、約10アミノ酸、約8アミノ酸、約6アミノ酸、約4アミノ酸もしくは約2アミノ酸との間; 約2アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、約20アミノ酸、約18アミノ酸、約16アミノ酸、約14アミノ酸、約12アミノ酸、約10アミノ酸、約8アミノ酸、約6アミノ酸もしくは約4アミノ酸; 約4アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、約20アミノ酸、約18アミノ酸、約16アミノ酸、約14アミノ酸、約12アミノ酸、約10アミノ酸もしくは約8アミノ酸; 約8アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、約20アミノ酸、約18アミノ酸、約16アミノ酸、約14アミノ酸、約12アミノ酸もしくは約10アミノ酸; 約10アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、約20アミノ酸、約18アミノ酸、約16アミノ酸、約14アミノ酸もしくは約12アミノ酸; 約12アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、約20アミノ酸、約18アミノ酸、約16アミノ酸もしくは約14アミノ酸; 約14アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、約20アミノ酸、約18アミノ酸もしくは約16アミノ酸; 約16アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60

10

20

30

40

50

アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、約20アミノ酸もしくは約18アミノ酸；約18アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸もしくは約20アミノ酸；約20アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸もしくは約25アミノ酸；約25アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸もしくは約30アミノ酸；約30アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸もしくは約35アミノ酸；約35アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸もしくは約40アミノ酸；約40アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸もしくは約50アミノ酸；約50アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸もしくは約60アミノ酸；約60アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約150アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸もしくは約70アミノ酸；約70アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸もしくは約80アミノ酸；約80アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸もしくは約90アミノ酸；約90アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸もしくは約100アミノ酸；約100アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸もしくは約200アミノ酸；約200アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸もしくは約300アミノ酸；約300アミノ酸～約500アミノ酸もしくは約400アミノ酸；または約400アミノ酸～約500アミノ酸の長さを有し得る。

【0203】

リンカーのさらなる例および態様は、本明細書で引用される参考文献に記載され、したがって、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

C. 膜貫通ドメイン

【0204】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるCARは、膜貫通ドメインもまた含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞質ドメイン中の配列と天然に会合する。一部の実施形態では、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、ドメインの他の膜貫通ドメイン（例えば、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、1つまたは複数の（例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の）アミノ酸置換によって改変され得る。

【0205】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、天然の供給源に由来し得る。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、任意の膜結合型または膜貫通タンパク質に由来し得る。本明細書で使用され得る膜貫通ドメインの非限定的な例は、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、CD33、CD37、CD64、CD80、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD86、CD

10

20

30

40

50

134、CD137またはCD154に由来し得る（例えば、それらの膜貫通配列または膜貫通配列の一部を少なくとも含み得る）。

【0206】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、合成であり得る。例えば、膜貫通ドメインが合成供給源由来である一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、疎水性残基（例えば、ロイシンおよびバリン）を含み得る（例えば、優勢に含み得る）。一部の実施形態では、合成膜貫通ドメインは、合成膜貫通ドメインの最後に、少なくとも1つの（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つまたは少なくとも6つの）、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットを含む。一部の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、CD8ヒンジドメインを含み得る。

10

【0207】

膜貫通ドメインのさらなる具体的な例は、本明細書で引用される参考文献に記載されている。

D. 細胞質ドメイン

【0208】

例えば、抗原結合ドメインが抗原に結合した場合にT細胞を刺激するのに十分なCD3ζの細胞質配列を含み、必要に応じて、T細胞の共刺激を提供する共刺激タンパク質のうちの1つまたは複数の細胞質配列（例えば、本明細書に記載されるまたは当該分野で公知の、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40L、CD40、PD-1、PD-L1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、CD160、LIGHT、BTLA、TIM3、CD244、CD80、LAG3、NKG2C、B7-H3、CD83に特異的に結合するリガンド、およびITAM配列のいずれかのうち1つまたは複数の細胞質配列）を含む細胞質シグナル伝達ドメインを含むCAR分子もまた、本明細書に提供される。CAR免疫エフェクター細胞の刺激は、CAR免疫エフェクター細胞の1つまたは複数の抗がん活性の活性化を生じ得る。例えば、一部の実施形態では、CAR免疫エフェクター細胞の刺激は、サイトカインの分泌を含む、CAR免疫エフェクター細胞の細胞溶解活性またはヘルパー活性における増加を生じ得る。一部の実施形態では、共刺激タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメイン全体が、細胞質シグナル伝達ドメイン中に含まれる。一部の実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、共刺激タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインの短縮された部分（例えば、CAR免疫エフェクター細胞においてエフェクター機能シグナルを伝達する細胞内シグナル伝達ドメインの短縮された部分）を含む。細胞質シグナル伝達ドメイン中に含まれ得る細胞内シグナル伝達ドメインの非限定的な例には、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始す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、ならびに少なくとも1つの（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の）置換を含み、同じまたはほぼ同じ機能的能力を有する、これらの配列の任意のバリエーションが含まれる。

20

30

【0209】

一部の実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、2つの別個のクラスの細胞質シグナル伝達配列を含み得る：TCRを介した抗原依存的活性化を開始するシグナル伝達配列（一次細胞質シグナル伝達配列）（例えば、CD3ζ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非依存的様式で作用する共刺激タンパク質のうちの1つまたは複数の細胞質配列（二次細胞質シグナル伝達配列）。

40

【0210】

一部の実施形態では、CARの細胞質ドメインは、それ自体で、またはCARとの関連で有用な任意の他の所望の細胞質シグナル伝達配列（複数可）と組み合わせて、CD3ζシグナル伝達ドメインを含むように設計され得る。一部の例では、CARの細胞質ドメインは、CD3ζ鎖部分および共刺激細胞質シグナル伝達配列を含み得る。共刺激細胞質シグナル伝達配列は、共刺激タンパク質（例えば、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C

50

D 8 3 に特異的に結合するリガンド) の細胞質シグナル伝達配列を含む C A R の一部分を指す。

【0 2 1 1】

一部の実施形態では、C A R の細胞質シグナル伝達ドメイン内の細胞質シグナル伝達配列は、ランダムな順序で位置付けられる。一部の実施形態では、C A R の細胞質シグナル伝達ドメイン内の細胞質シグナル伝達配列は、特定の順序で互いに連結される。一部の実施形態では、リンカー（例えば、本明細書に記載されるリンカーのいずれか）が、異なる細胞質シグナル伝達配列間に連結を形成するために使用され得る。

【0 2 1 2】

一部の実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、C D 3 ζ の細胞質シグナル伝達配列および共刺激タンパク質 C D 2 8 の細胞質シグナル伝達配列を含むように設計される。一部の実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、C D 3 ζ の細胞質シグナル伝達配列および共刺激タンパク質 4 - 1 B B の細胞質シグナル伝達配列を含むように設計される。一部の実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、C D 3 ζ の細胞質シグナル伝達配列ならびに共刺激タンパク質 C D 2 8 および 4 - 1 B B の細胞質シグナル伝達配列を含むように設計される。一部の実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、4 - 1 B B の細胞質シグナル伝達配列を含まない。

C A R T 細胞のさらなる改変

【0 2 1 3】

別の実施形態では、C A R エフェクター細胞（例えば、C A R T 細胞）の治療有効性は、P C T 公開 W O 2 0 1 7 / 0 4 9 1 6 6 に記載されるように、増殖の増強、エフェクターサイトカイン産生の調節および脱顆粒に関連する 5 - ヒドロキシメチルシトシンの総レベルの減少をもたらす、それによって、C A R エフェクター細胞（例えば、C A R T 細胞）の増殖および／または機能を増加させる、メチルシトシンジオキシゲナーゼ遺伝子（例えば、T e t 1、T e t 2、T e t 3）の破壊によって増強される。したがって、エフェクター細胞（例えば、T 細胞）は、C A R を発現するように操作され得、前記エフェクター細胞（例えば、T 細胞）における T e t 1、T e t 2 および／または T e t 3 の発現および／または機能は、低減または排除されている。

【0 2 1 4】

別の実施形態では、C A R エフェクター細胞（例えば、C A R T 細胞）の治療有効性は、P C T 公開 W O 2 0 1 6 / 1 2 6 6 0 8 および米国公開第 2 0 1 8 / 0 0 4 4 4 2 4 号に記載されるように、C A R を構成的に発現し（非条件的 C A R (nonconditional C A R) と呼ばれる）、がんを処置するのに有用な別の薬剤を条件的に発現するエフェクター細胞（例えば、T 細胞）を使用することによって増強される。かかる実施形態では、条件的に発現される薬剤は、エフェクター細胞（例えば、T 細胞）の活性化、例えば、非条件的 C A R のその標的への結合の際に発現される。一実施形態では、条件的に発現される薬剤は、C A R である（本明細書で条件的 C A R と呼ばれる）。別の実施形態では、条件的に発現される薬剤は、免疫応答のチェックポイントインヒビターを阻害する。別の実施形態では、条件的に発現される薬剤は、C A R の有効性を改善または増強し、これには、サイトカインを含み得る。

【0 2 1 5】

別の実施形態では、C A R T 細胞の治療有効性は、P C T 公開 W O 2 0 1 6 / 0 6 9 2 8 2 および米国公開第 2 0 1 7 / 0 3 3 5 3 3 1 号に記載されるように、T C R α 鎖、T C R β 鎖、ペーター 2 ミクログロブリン、H L A 分子、C T L A - 4、P D 1 および F A S からなる群から選択される内因性遺伝子の発現を変更（例えば、下方モジュレート）することが可能な核酸を用いて、C A R T 細胞を改変することによって増強される。

【0 2 1 6】

別の実施形態では、C A R T 細胞の治療有効性は、P C T 公開 W O 2 0 1 5 / 1 1 2 6 2 6 および米国公開第 2 0 1 6 / 0 3 4 0 4 0 6 号に記載されるように、T 細胞において、C A R および 1 つまたは複数の、T 細胞プライミングのエンハンサー（「E T P」）

10

20

30

40

50

を共発現させることによって増強される。CAR T細胞へのETP構成成分の添加は、増強された「専門的」抗原提示細胞（APC）機能を付与する。ある実施形態では、CARおよび1つまたは複数のETPは、T細胞において一過的に共発現される。したがって、操作されたT細胞は、（CAR／ETP発現の一過的な性質を考慮すると）安全であり、APC機能を介して長期にわたる免疫を誘導する。

【0217】

別の実施形態では、CAR T細胞の治療有効性は、PCT公開WO2016／055551および米国公開第2017／0292118号に記載されるように、T細胞において、CAR、および結合（またはダイマー化）ドメインを含む阻害性膜タンパク質（IMP）を共発現させることによって増強される。CARおよびIMPは共に、特に、CAR内に含まれる第2の結合ドメインを介して、可溶性化合物に対して反応性にされ、それによって、ダイマー化またはリガンド認識による、CAR活性化を低下させる効果を有する、IMPが有する阻害性シグナル伝達ドメインとCARが有するシグナル伝達ドメインとの共局在化を可能にする。阻害性シグナル伝達ドメインは、好ましくは、IL-2産生およびT細胞増殖のT細胞受容体（TCR）媒介性活性化を減弱させるプログラム死-1（PD-1）である。

【0218】

別の実施形態では、CAR T細胞の治療有効性は、PCT公開WO2017／032777に記載されるように、抗原結合ドメインを含むCARの細胞外部分のコンフォメーションにおける制御されたバリエーションが、小分子の添加の際に得られるシステムを使用して増強される。この統合システムは、抗原と抗原結合ドメインとの間の相互作用を、オン／オフ状態の間でスイッチする。CARの細胞外部分のコンフォメーションを制御することができることによって、CAR T細胞の下流機能、例えば、細胞傷害性が、直接モジュレートされ得る。したがって、CARは、a) i) 細胞外抗原結合ドメイン；ならびにii) 所定の多価リガンドに結合して、前記2つの結合ドメインおよびそれらが結合することが可能な多価リガンドを含むマルチマーを形成することが可能な、少なくとも第1のマルチマー化リガンド結合ドメインおよび第2のマルチマー化リガンド結合ドメインを含むスイッチドドメインを含む少なくとも1つの外部ドメイン；b) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン；ならびにc) シグナル伝達ドメインおよび必要に応じて共刺激ドメインを含む少なくとも1つの内部ドメインを含むという点で特徴付けられ得る；ここで、スイッチドドメインは、細胞外抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置する。

両親媒性コンジュゲート

A. 概要

【0219】

アジュバントまたは抗原（例えば、ペプチド）を、リンパ節へのワクチンの局在化を促進する親油性ポリマーテイルに連結することを含む両親媒性物質ワクチンテクノロジーが開発されている（Liu et al. (2014) Nature 507:519-522）。かかる両親媒性物質-抗原（例えば、amp h-ペプチド）は、細胞膜中に挿入することも可能である（例えば、Liu et al. (2011) Angewandte Chemie-Intl. Ed. 50:7052-7055を参照のこと）。したがって、本開示は、CARエフェクター細胞（例えば、CAR-T細胞）を刺激、拡大、活性化するのに使用するための、CARリガンドを含む両親媒性コンジュゲートを提供する。

【0220】

一部の実施形態では、本開示の両親媒性コンジュゲートは、キメラ抗原受容体（CAR）発現細胞治療（例えば、CAR-T細胞治療）で使用される。一部の実施形態では、本開示の両親媒性コンジュゲートは、特異的標的、例えば腫瘍関連抗原に対する特異的免疫応答を刺激する。一部の実施形態では、本開示の両親媒性コンジュゲートは、CAR発現細胞（例えば、CAR-T細胞）の増殖をin vivoで刺激する。一部の実施形態では、本開示の両親媒性コンジュゲートは、CARリガンドを含み、本明細書で両親媒性リガンドコンジュゲートと呼ばれる。一部の実施形態では、両親媒性コンジュゲートは、免

疫賦活性オリゴヌクレオチドを含み、本明細書で両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートと呼ばれる。

【0221】

図1Aに示されるように、多様な両親媒性リガンドコンジュゲート構造が開示され、図中、親油性部分、即ち「脂質テイル」（例えば、DSP E）は、リンカー（例えば、PEG-2000）を介してCARリガンドに連結（例えば、共有結合的に連結）される。この設計のモジュール性は、小分子（例えば、FITC）、短いペプチド（例えば、CARに特異的なエピトープを提供する直鎖ペプチド）、またはモジュラータンパク質ドメイン（例えば、CARに特異的なコンフォメーションエピトープを提供するフォールディングされたポリペプチドまたはポリペプチド断片）が含まれるがこれらに限定されない種々のリガンドが、脂質に（例えば、共有結合的に）連結されて、調整された（tailored）特異性を有する両親媒性リガンドコンジュゲートを生じるのを可能にする。

【0222】

理論に束縛されないが、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートは、リンパ節に主に送達されると考えられ、この場所で、脂質テイル部分は、抗原提示細胞（APC）の膜中に挿入され、CARリガンドによるAPCの装飾を生じる（図1B）。埋め込まれたCARリガンドは、CAR発現細胞（例えば、CAR-T細胞）（これらは、本開示の両親媒性リガンドコンジュゲートの前に投与され、それに引き続いて投与され、またはそれと共投与される）の表面上に発現されたCARに対する特異的な標的として機能し、CARリガンドで装飾されたAPCへの、CAR発現細胞の動員を生じる。CARと埋め込まれたCARリガンドとの相互作用は、CARを介した刺激シグナルを提供するが、APCは、他の天然に存在する共刺激シグナルをさらに提示し、最適なCAR発現細胞活性化、長期にわたる生存および効率的なメモリー形成を生じる。

B. 脂質コンジュゲート

【0223】

ある特定の実施形態では、参照により本明細書に組み込まれるUS2013/0295129に記載される脂質コンジュゲート（例えば、両親媒性コンジュゲート）が、本明細書で開示される方法において使用される。一部の実施形態では、脂質コンジュゲートは、細胞膜中に挿入する疎水性テイルを含む。一部の実施形態では、脂質コンジュゲートは、そのコンジュゲートをリンパ節に *in vivo* で効率的に標的化するために、アルブミン結合脂質を含む。一部の実施形態では、脂質コンジュゲートは、疎水性テイルを含むアルブミン結合脂質を含み、この疎水性テイルは、細胞膜中に挿入し、そのコンジュゲートは、リンパ節に *in vivo* で効率的に標的化される。一部の実施形態では、脂質コンジュゲートは、それらをリンパ管および流入領域リンパ節に標的化する内因性アルブミンに結合し、それらは、抗原提示細胞によるアルブミンの選別に起因して、そこに蓄積する。一部の実施形態では、脂質コンジュゲートは、抗原性ペプチドまたは分子アジュバントを含み、それによって、ロバストな免疫応答を誘導または増強する。一部の実施形態では、脂質コンジュゲートは、CARリガンドを含み、それによって、CAR発現細胞（例えば、CARエフェクター細胞、例えば、CAR-T細胞）の拡大、増殖および／または活性化を誘導または増強する。CARリガンドを含む脂質コンジュゲートは、上で定義したように、「両親媒性リガンドコンジュゲート」と呼ばれる。

【0224】

一部の実施形態では、リンパ節に効率的に標的化される脂質コンジュゲートは、「リンパ節標的化コンジュゲート」と呼ばれる。一部の実施形態では、リンパ節標的化コンジュゲートは、高度に親油性のアルブミン結合ドメイン（例えば、アルブミン結合脂質）、およびカーゴ、例えば、CARリガンドまたは分子アジュバントを含む。一部の実施形態では、リンパ節標的化コンジュゲートは、以下の3つのドメインを含む：高度に親油性のアルブミン結合ドメイン（例えば、アルブミン結合脂質）、カーゴ、例えば、CARリガンドまたは分子アジュバント、およびコンジュゲートの溶解度を促進し、脂質が細胞形質膜中に挿入する能力を低減させる極性ブロックリンカー。したがって、ある特定の実施形態

では、コンジュゲートの一般構造はL-P-Cであり、式中、「L」はアルブミン結合脂質であり、「P」は極性ブロックであり、「C」は、カーゴ、例えば、CARリガンドまたは分子アジュバントである。一部の実施形態では、カーゴ自体が極性ブロックドメインとしても機能し得、別の極性ブロックドメインは必要とされない。したがって、ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、以下の2つのドメインのみを有する：アルブミン結合脂質およびカーゴ。

【0225】

一部の実施形態では、コンジュゲートのカーゴは、CARリガンドであり、それによって、両親媒性リガンドコンジュゲートを生じる。一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートは、アジュバントと共に投与または製剤化され、このアジュバントは、分子アジュバント、例えば、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、またはペプチド抗原をカーゴとして含む両親媒性リガンドである。

(i) 脂質

【0226】

一部の実施形態では、両親媒性コンジュゲートの脂質構成成分は、疎水性テイルを含む。一部の実施形態では、疎水性テイルは、細胞膜中に挿入する。一部の実施形態では、脂質は、直鎖、分岐鎖または環状である。一部の実施形態では、脂質は、12よりも大きい炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、13炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、14炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、15炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、16炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、17炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、18炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、19炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、20炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、21炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、22炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、23炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、24炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、25炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、26炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、27炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、28炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、29炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、30炭素長である。一部の実施形態では、脂質は、少なくとも17～18炭素長であるが、それが良好なアルブミン結合およびリンパ節への適切な標的化を示す場合には、より短くてもよい。

【0227】

リンパ節標的化コンジュゲートには、送達の部位からリンパを介してリンパ節へと輸送され得る、両親媒性リガンドコンジュゲートおよび両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートが含まれる。ある特定の実施形態では、活性は、コンジュゲートが対象の血液中のアルブミンに会合する能力に一部依拠する。したがって、リンパ節標的化コンジュゲートは、典型的には、生理的条件下でアルブミンに結合できる脂質を含む。リンパ節を標的とするのに適切な脂質は、脂質または脂質を含む脂質コンジュゲートがアルブミンに結合する能力に基づいて選択され得る。脂質または脂質コンジュゲートがアルブミンに結合する能力を試験するのに適切な方法は、当該分野で公知である。

【0228】

例えば、ある特定の実施形態では、複数の脂質コンジュゲートは、水溶液中で自発的にミセルを形成することができる。ミセルは、アルブミン、またはウシ胎仔血清(FBS)などのアルブミンを含む溶液と共にインキュベートされる。試料は、結合が生じたかどうかを決定するために、例えば、ELISA、サイズ排除クロマトグラフィーまたは他の方法によって解析され得る。脂質コンジュゲートは、上で議論したように、アルブミン、またはウシ胎仔血清(FBS)などのアルブミンを含む溶液の存在下で、ミセルが解離し、脂質コンジュゲートがアルブミンに結合する場合に、リンパ節標的化コンジュゲートとして選択され得る。

【0229】

リンパ節標的化脂質コンジュゲートにおける使用のために好ましい脂質の例には、直鎖

10

20

30

40

50

不飽和および飽和脂肪酸、分岐鎖飽和および不飽和脂肪酸、ならびに脂肪酸誘導体、例えば、脂肪酸エステル、脂肪酸アミドおよび脂肪酸チオエステル、ジアシル脂質、コレステロール、コレステロール誘導体、およびステロイド酸、例えば胆汁酸、リピド A、またはそれらの組合せが含まれるがこれらに限定されない、8～30個の炭素の脂肪族テイルを有する脂肪酸が含まれるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、脂質は、飽和である。一部の実施形態では、脂質は、8～30、12～30、15～25または16～20個の炭素を含む少なくとも1つの脂質テイルを含む。

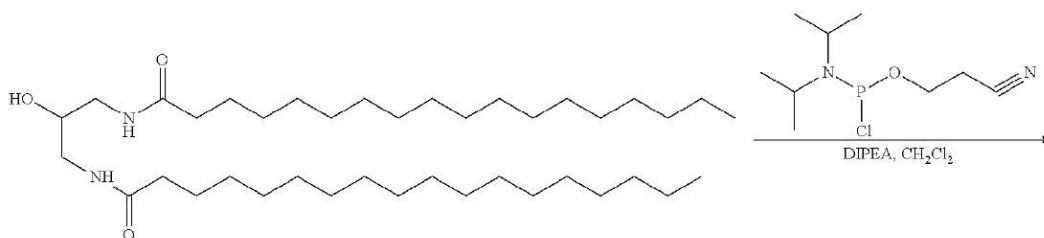
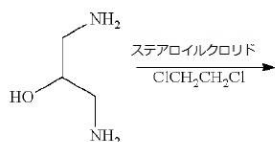
【0230】

ある特定の実施形態では、脂質は、ジアシル脂質または二本鎖脂質である。一部の実施形態では、ジアシル脂質中のテイルは、約8～約30個の炭素を含み、飽和、不飽和、またはそれらの組合せであり得る。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和である。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、約8～約30個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、12個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、13個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、14個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、15個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、16個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、17個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、18個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、19個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、20個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、21個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、22個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、23個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、24個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、25個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、26個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、27個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、28個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、29個の炭素を含む。一部の実施形態では、ジアシル脂質は飽和であり、各テイルは、30個の炭素を含む。テイルは、エステル結合連結、アミド結合連結、チオエステル結合連結、またはそれらの組合せを介して、頭部基にカップリングされ得る。特定の実施形態では、ジアシル脂質は、リン酸脂質 (phosphate lipid)、糖脂質、スフィンゴ脂質、またはそれらの組合せである。

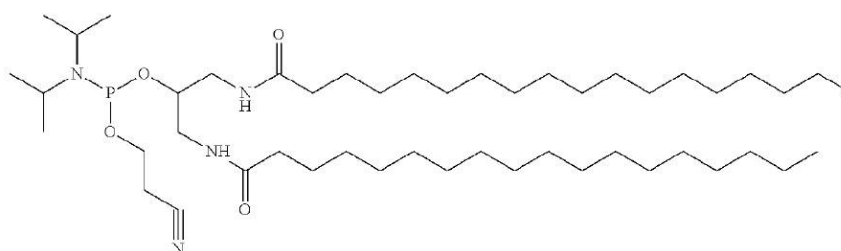
【0231】

一部の実施形態では、脂質は、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DSPE) である。一部の実施形態では、ジアシル脂質は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるUS9,107,904に記載されるように合成される。一部の実施形態では、ジアシル脂質は、以下に提供されるように合成される：

【化 1】



10



20

1 ステアロイルクロリド

【0232】

好ましくは、リンパ節標的化コンジュゲートは、8またはそれよりも多くの炭素単位長の脂質を含む。脂質単位の数を増加させると、細胞の形質膜中への脂質の挿入が低減し、これにより、脂質コンジュゲートが自由にアルブミンに結合して、リンパ節に移動できるようになると考えられる。

30

【0233】

例えば、一部の実施形態では、脂質は、2つのC18炭化水素テイルから構成されるジアシル脂質であり得る。ある特定の実施形態では、リンパ節標的化脂質コンジュゲートを調製する際の使用のための脂質は、単鎖炭化水素（例えば、C18）ではない。

(ii) 分子アジュバント

【0234】

ある特定の実施形態では、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、両親媒性リガンドコンジュゲートと共に使用される。オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、典型的には、免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む。

【0235】

ある特定の実施形態では、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、パターン認識受容体（PRR）に対するリガンドとして機能し得る。PRRの例には、自然免疫応答の開始において役割を果たし、後のより抗原特異的な適応免疫応答にも影響を与える、Toll様ファミリーのシグナル伝達分子が含まれる。したがって、オリゴヌクレオチドは、Toll様ファミリーシグナル伝達分子、例えばToll様受容体9（TLR9）に対するリガンドとして機能し得る。

40

【0236】

例えば、非メチル化 CpG 部位は、ヒトでは、形質細胞様樹状細胞およびB細胞上のTLR9によって検出され得る (Zaida, et al., Infection and Immunity, 76(5):2123-2129, (2008))。したがって、オリゴヌクレオチドの配列は、1つまたは複数の非

50

メチル化シトシンーグアニン（相互交換可能に使用されるC GまたはC p G）ジヌクレオチドモチーフを含み得る。「p」は、以下でより詳細に議論されるように、DNAのホスホジエステル骨格を指し、C Gを含む一部のオリゴヌクレオチドは、改変骨格、例えばホスホロチオエート（P S）骨格を有し得る。

【0237】

ある特定の実施形態では、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、近接して整列された、または介在するヌクレオチド（複数可）によって分離された、1つよりも多くのC Gジヌクレオチドを含み得る。C p Gモチーフ（複数可）は、オリゴヌクレオチド配列の内部にあり得る。多数のヌクレオチド配列は、C Gジヌクレオチド（複数可）の数および位置ならびにC Gダイマーに隣接する正確な塩基配列におけるバリエーションを伴って、TLR9を刺激する。

10

【0238】

典型的には、C G ODNは、それらの配列、二次構造、およびヒト末梢血単核球（PBMC）に対する効果に基づいて分類される。5つのクラスは、クラスA（D型）、クラスB（K型）、クラスC、クラスPおよびクラスSである（参照により本明細書に組み込まれるVollmer, J & Krieg, A M, Advanced drug delivery reviews 61(3): 195-204 (2009))。C G ODNは、I型インターフェロン（例えば、IFN α ）の産生を刺激でき、樹状細胞（DC）の成熟化を誘導できる。一部のクラスのODNは、間接的サイトカインシグナル伝達を介したナチュラルキラー（NK）細胞の強いアクチベーターでもある。一部のクラスは、ヒトB細胞および単球成熟化の強い刺激因子である（Weiner, G L, PNAS USA 94(20): 10833-7 (1997); Dalpke, A H, Immunology 106(1): 102-12 (2002); Hartmann, G, J of Immun. 164(3):1617-2 (2000)、これらは各々、参照により本明細書に組み込まれる）。

20

【0239】

一部の実施形態によれば、親油性-C p Gオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、抗原に対する免疫応答を増強するために使用される。親油性-C p Gオリゴヌクレオチドは、以下によって示され、式中、「L」は親油性化合物、例えばジアシル脂質であり、「G_n」はグアニンリピートリンカーであり、「n」は1、2、3、4または5を示す。



【0240】

他のPRR TOLL様受容体には、それぞれ二本鎖RNA、一本鎖および短い二本鎖RNAを認識し得るTLR3およびTLR7、ならびにレチノイン酸-誘導性遺伝子I（RIG-I）様受容体、即ちRIG-I、ならびにサイトゾル中のRNA感知性受容体として最も知られる黒色腫分化関連遺伝子5（MDA5）が含まれる。したがって、ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、TLR3、TLR7もしくはRIG-I様受容体、またはそれらの組合せに対する機能的リガンドを含む。

30

【0241】

免疫賦活性オリゴヌクレオチド、およびそれらを作製する方法の例は、当該分野で公知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれるBodera, P. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 5(1):87-93 (2011)を参照のこと。

40

【0242】

ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドカーゴは、2つまたはそれよりも多くの免疫賦活性配列を含む。

【0243】

オリゴヌクレオチドは、例えば、5ヌクレオチド塩基長、10ヌクレオチド塩基長、15ヌクレオチド塩基長、20ヌクレオチド塩基長、25ヌクレオチド塩基長、30ヌクレオチド塩基長、35ヌクレオチド塩基長、40ヌクレオチド塩基長、45ヌクレオチド塩基長、50ヌクレオチド塩基長、60ヌクレオチド塩基長、70ヌクレオチド塩基長、80ヌクレオチド塩基長、90ヌクレオチド塩基長、95ヌクレオチド塩基長、98ヌクレオチド塩基長、100ヌクレオチド塩基長またはそれよりも長い塩基長を含め、2~10

50

0ヌクレオチド塩基長の間であり得る。

【0244】

オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端は、極性ブロックまたは脂質にコンジュゲートされ得る。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの5'末端は、極性ブロックまたは脂質に連結される。

【0245】

オリゴヌクレオチドは、複素環式塩基（核酸塩基）、複素環式塩基に結合した糖部分、および糖部分のヒドロキシル官能基をエステル化するリン酸部分を典型的には含む、DNAまたはRNAヌクレオチドであり得る。主要な天然に存在するヌクレオチドは、複素環式塩基としてウラシル、チミン、シトシン、アデニンおよびグアニンを含み、ホスホジエステル結合によって連結されたりボースまたはデオキシリボース糖を含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、DNAまたはRNAカウンターパートと比較して、安定性、半減期、または標的受容体に対する特異性もしくは親和性を改善するために化学的に改変されたヌクレオチドアナログから構成される。化学的改変には、核酸塩基、糖部分、ヌクレオチド連結の化学的改変、またはそれらの組合せが含まれる。本明細書で 사용되는場合、「改変ヌクレオチド」または「化学的に改変されたヌクレオチド」は、複素環式塩基、糖部分またはリン酸部分構成要素のうち1つまたは複数の化学的改変を有するヌクレオチドを定義する。ある特定の実施形態では、改変ヌクレオチドの電荷は、同じ核酸塩基配列のDNAまたはRNAオリゴヌクレオチドと比較して低減される。例えば、オリゴヌクレオチドは、低い負の電荷を有する、電荷を有さない、または正の電荷を有することができる。

【0246】

典型的には、ヌクレオシドアナログは、標準的なポリヌクレオチド塩基とWatson-Crick塩基対合によって水素結合することが可能な塩基を支持し、ここで、アナログ骨格は、標準的なポリヌクレオチド（例えば、一本鎖RNAまたは一本鎖DNA）中のオリゴヌクレオチドアナログ分子と塩基との間での、配列特異的様式でのかかる水素結合を許容する様式で塩基を提示する。ある特定の実施形態では、アナログは、実質的に非荷電のリン含有骨格を有する。

(iii) キメラ抗原受容体リガンド

【0247】

一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、抗原性タンパク質またはポリペプチド、例えば、腫瘍関連抗原またはその部分である。一部の実施形態では、CARリガンドは、小分子、ペプチドもしくはタンパク質ドメイン、またはそれらの断片である。一部の実施形態では、リガンドは、CAR発現細胞（例えば、CAR-T細胞）上のCARに結合する。したがって、本明細書に記載される方法および組成物は、CAR発現細胞（例えば、CAR-T細胞）に対して相補的な両親媒性リガンドコンジュゲートを利用する。一部の実施形態では、CARリガンドは、上記CARのいずれか1つに結合する。

【0248】

一部の実施形態では、ペプチドは、例えば、5アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸、30アミノ酸、35アミノ酸、40アミノ酸、45アミノ酸または50アミノ酸を含め、2〜100アミノ酸である。一部の実施形態では、ペプチドは、50アミノ酸よりも大きい。一部の実施形態では、ペプチドは、>100アミノ酸である。

【0249】

一部の実施形態では、タンパク質／ペプチドは、直鎖、分岐鎖または環状である。一部の実施形態では、ペプチドは、Dアミノ酸、Lアミノ酸、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、ペプチドまたはタンパク質のN末端またはC末端において、極性ブロックまたは脂質にコンジュゲートされる。

【0250】

一部の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドは、このタンパク質またはペプチドに対する抗体およびT細胞応答を発達させる免疫系の能力を誘導または増強できる、任意のタンパク質またはペプチドであり得る。がん抗原は、典型的にはがん細胞によって優先的に発現される抗原であり（即ち、これは、非がん細胞上よりもがん細胞においてより高いレベルで発現される）、一部の例では、がん細胞のみによって発現される。がん抗原は、がん細胞内で、またはがん細胞の表面上に発現され得る。がん抗原は、CD19、TRP-1、TRP-2、MART-1/Melan-A、gp100、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ADAbp）、FAP、シクロフィリンb、結腸直腸関連抗原（CRC）-C017-1A/GA733、癌胎児性抗原（CEA）、CAP-1、CAP-2、etv6、AML1、前立腺特異的抗原（PSA）、PSA-1、PSA-2、PSA-3、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、T細胞受容体/CD3-ゼータ鎖およびCD20であり得るが、これらに限定されない。がん抗原は、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2（MAGE-B2）、MAGE-Xp3（MAGE-B3）、MAGE-Xp4（MAGE-B4）、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-05）、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -フェトプロテイン、E-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、 γ -カテニン、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫性ポリポーシスタンパク質（APC）、フォドリン、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2ガングリオシド、GD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルススタンパク質、Smadファミリーの腫瘍抗原、lmp-1、P1A、EBVコード核抗原（EBNA）-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2（HOM-MEL-40）、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1およびCT-7、CD20、またはc-erbB-2からなる群から選択され得る。

【0251】

一部の実施形態では、本開示の方法および組成物は、以前にはCTL019であった静脈内注入用Kymriah（商標）（チサゲンレクルユーセル；Novartis）懸濁物と組み合わせて使用される。例えば、一実施形態では、本開示の組成物は、CARリガンドがCD19またはその抗原性部分である両親媒性リガンドコンジュゲートを含む。かかる組成物は、CD19特異的CAR-T細胞（例えば、CD19特異的CAR-T細胞の集団）、がん、例えば、B細胞急性リンパ芽球性白血病（ALL）の処置のためのKymriah（商標）（チサゲンレクルユーセル；Novartis）などと組み合わせて、対象に投与され得る。

【0252】

適切な抗原は、当該分野で公知であり、commercial governmentおよび科学的情報源（scientific source）から入手可能である。ある特定の実施形態では、抗原は、不活性化されたまたは照射された腫瘍細胞全体である。抗原は、腫瘍に由来する、精製されたまたは部分的に精製されたポリペプチドであり得る。抗原は、異種発現系においてポリペプチド抗原をコードするDNAを発現させることによって産生される組換えポリペプチドであり得る。抗原は、抗原性タンパク質の全てまたは一部をコードするDNAであり得る。DNAは、ベクターDNA、例えば、プラスミドDNAの形態であり得る。

【0253】

ある特定の実施形態では、抗原は、単一の抗原として提供され得る、または組み合わせて提供され得る。抗原は、ポリペプチドまたは核酸の複雑な混合物としても提供され得る。

【0254】

一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートのCARリガンドは、上記タグ結合ドメインを含むCARに結合するタグである。一部の実施形態では、タグは、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン（PE）、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼまたはマルトース結合タンパク質である。

【0255】

一部の実施形態では、CARは腫瘍抗原結合ドメインを含み、CARリガンドは、腫瘍抗原またはその断片である。一部の実施形態では、CARはタグ結合ドメイン（例えば、AT-CAR）を含み、CARリガンドはタグである。一部の実施形態では、CARはタンデムCARであり、CARリガンドは、タンデムCAR上に存在する抗原結合ドメインのうち少なくとも1つに結合する。一部の実施形態では、CARは二特異性であり、腫瘍抗原結合ドメインおよびタグ結合ドメインを含み、CARリガンドはタグである。一部の実施形態では、CARは二特異性であり、腫瘍抗原結合ドメインおよびタグ結合ドメインを含み、CARリガンドは、腫瘍抗原またはその断片である。一部の実施形態では、CARは、第1の腫瘍関連抗原結合ドメインおよび第2の腫瘍関連抗原結合ドメインを含み、CARリガンドは、第1または第2の腫瘍関連抗原である。

（iv）極性ブロック／リンカー

【0256】

コンジュゲートがリンパ節に効率的に輸送されるためには、コンジュゲートは、可溶性のままであるべきである。したがって、一部の実施形態では、極性ブロックリンカーが、コンジュゲートの溶解度を増加させるために、カーゴと脂質との間に含まれる。極性ブロックは、細胞、例えば、注射部位に隣接する組織中の細胞の形質膜中に脂質が挿入する能力を低減または防止する。極性ブロックは、カーゴ、例えば、PS骨格を含む合成オリゴヌクレオチドが、投与の部位において細胞外基質タンパク質と非特異的に会合する能力を低減または防止することもできる。一部の実施形態では、極性ブロックは、それがアルブミンに結合する能力を防止することなしに、コンジュゲートの溶解度を増加させる。特徴のこの組合せは、コンジュゲートを、血清または間質液中に存在するアルブミンに結合させ、アルブミンがリンパ節に輸送されそこで保持されるまで、循環中に残存させると考えられる。一部の実施形態では、カーゴは、極性ブロックとして機能し、したがって、別の極性ブロックは必要とされない。

【0257】

極性ブロックの長さおよび組成は、選択された脂質およびカーゴに基づいて調整され得る。例えば、オリゴヌクレオチドコンジュゲートについて、オリゴヌクレオチド自体、例えば、10、15、20またはそれよりも多くのヌクレオチド長であるオリゴヌクレオチドが、コンジュゲートの溶解度を保証するのに十分に極性であり得る。したがって、ある特定の実施形態では、さらなる極性ブロックリンカーは必要とされない。しかし、アミノ酸配列に依存して、一部の脂質付加されたペプチドは、本質的に不溶性であり得る。これらの場合には、極性オリゴヌクレオチドの効果を模倣する極性ブロックを含むことが望ましい場合がある。

【0258】

一部の実施形態では、極性ブロックは、細胞膜挿入／アルブミンへの優先的分配を低減させる、本明細書で開示される方法における使用に適切な脂質コンジュゲート、例えば、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートおよび両親媒性リガンドコンジュゲートのいずれかの一部として使用される。一部の実施形態では、適切な極性ブロックには、オリゴヌクレオチド、例えば、上で議論したもの、ポリ（エチレングリコール）（MW：500 Da～20,000 Da）、ポリアクリルアミド（MW：500 Da～20,000 Da）、ポリアクリル酸が含まれるがこれらに限定されない親水性ポリマー；一連の親水性アミノ酸、例えば、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン、ヒスチジンもしくはそれらの

組合せ；デキストラン（MW：1,000Da～2,000,000Da）が含まれるがこれに限定されない多糖、またはそれらの組合せが含まれるがこれらに限定されない。

【0259】

一部の実施形態では、極性ブロックは、別々の構成成分であれカーゴ自体であれ、極性ブロックの分子量に基づいて、脂質コンジュゲート全体に溶解度を提供する。例えば、一部の実施形態では、2,000Daの分子量を有する極性ブロックが、脂質コンジュゲートをアルブミン結合のために可溶性にするのに十分である。一部の実施形態では、極性ブロックは、約300～約20,000Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約1,000～約15,000Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約1,500～約10,000Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約2,000～約5,000Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約1,000～約2,500Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約1,000～約3,000Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約1,000～約3,500Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約1,000～約4,000Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約1,000～約5,000Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約5,000～約10,000Daの分子量を有する。一部の実施形態では、極性ブロックは、約15,000～約20,000Daの分子量を有する。

10

【0260】

一部の実施形態では、疎水性脂質およびリンカー／カーゴは、共有結合的に連結される。一部の実施形態では、共有結合は、非切断性連結または切断性連結である。一部の実施形態では、非切断性連結には、アミド結合またはリン酸結合が含まれ、切断性連結には、ジスルフィド結合、酸切断性連結、エステル結合、無水物結合、生分解性結合または酵素切断性連結が含まれる。

20

a. エチレングリコールリンカー

【0261】

ある特定の実施形態では、極性ブロックは、1つまたは複数のエチレングリコール（EG）単位、より好ましくは2つまたはそれよりも多くのEG単位（即ち、ポリエチレングリコール（PEG））である。例えば、ある特定の実施形態では、脂質コンジュゲートは、ポリエチレングリコール（PEG）分子またはその誘導体もしくはアナログによって連結されたカーゴ（即ち、CARリガンドまたは分子アジュバント）および疎水性脂質を含む。

30

【0262】

ある特定の実施形態では、本明細書で開示される方法における使用に適切な脂質コンジュゲートは、共有結合的に、またはオリゴミセルにハイブリダイズするタンパク質-オリゴコンジュゲートの形成を介して、疎水性脂質または脂質-G_n-ONコンジュゲートに次に連結される、PEGに連結されたCARリガンドを含む。EG単位の正確な数は、脂質およびカーゴに依存するが、典型的には、極性ブロックは、約1個と約100個との間、約20個と約80個との間、約30個と約70個との間または約40個と約60個との間のEG単位を有し得る。ある特定の実施形態では、極性ブロックは、約45個と55個との間のEG単位を有する。例えば、ある特定の実施形態では、極性ブロックは、48個のEG単位を有する。

40

【0263】

一部の実施形態では、PEG分子は、約300～20,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約1,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約1,500ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約2,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約2,500ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約3,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約

50

3,500ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約4,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約5,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約6,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約7,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約8,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約9,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約10,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約11,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約12,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約13,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約14,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約15,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約16,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約17,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約18,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約19,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG分子は、約20,000ダルトンの分子量を有する。

10

b. オリゴヌクレオチドリンカー

【0264】

上で議論したように、ある特定の実施形態では、極性ブロックは、オリゴヌクレオチドである。極性ブロックリンカーは、任意の配列を有し得、例えば、オリゴヌクレオチドの配列は、ランダム配列、またはその分子のもしくはは生化学的特性（例えば、高度に極性）について具体的に選択された配列であり得る。ある特定の実施形態では、極性ブロックリンカーは、1つまたは複数の、一連の連続するアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）、ウラシル（U）、またはそれらのアナログを含む。ある特定の実施形態では、極性ブロックリンカーは、一連の連続するアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）、ウラシル（U）、またはそれらのアナログからなる。

20

【0265】

ある特定の実施形態では、リンカーは、1つまたは複数のグアニン、例えば、1~10個の間のグアニンである。CpGオリゴヌクレオチドなどのカーゴと脂質テイルとの間のグアニンの数を変更することは、血清タンパク質の存在下でのミセル安定性を制御することが発見されている。したがって、リンカー中のグアニンの数は、アルブミンなどの血清タンパク質に対するコンジュゲートの所望の親和性に基づいて選択され得る。カーゴがCpG免疫賦活性オリゴヌクレオチドであり、脂質テイルがジアシル脂質である場合、グアニンの数は、水溶液中で形成されたミセルが血清の存在下で解離する能力に影響を与える：非安定化ミセル（ $\text{Lipo-G}_{10}\text{T}_0\text{-CG}$ ）の20%はインタクトであったが、残り80%は破壊され、FBS構成成分に結合した。グアニンの存在下では、インタクトなミセルのパーセンテージは、36%（ $\text{Lipo-G}_2\text{T}_8\text{-CG}$ ）から73%（ $\text{Lipo-G}_4\text{T}_6\text{-CG}$ ）へと増加し、最終的に90%（ $\text{Lipo-G}_6\text{T}_4\text{-CG}$ ）に達した。グアニンの数を8（ $\text{Lipo-G}_8\text{T}_2\text{-CG}$ ）および10（ $\text{Lipo-G}_{10}\text{T}_0\text{-CG}$ ）に増加させることがミセル安定性をさらに増強させることはなかった。

30

40

【0266】

したがって、ある特定の実施形態では、本明細書で開示される方法における使用に適切なリンパ節標的化コンジュゲート中のリンカーは、0個、1個または2個のグアニンを含み得る。以下でより詳細に議論するように、3つまたはそれよりも多くの連続するグアニンを含むリンカーが、本明細書で開示される方法における使用に適切な特性を有するミセル安定化コンジュゲートを形成するために使用され得る。

c. 免疫原性組成物

【0267】

本明細書で開示される方法における使用に適切な脂質コンジュゲートは、免疫原性組成物中で、またはワクチン中の構成成分として使用され得る。典型的には、本明細書で開示

50

される免疫原性組成物は、アジュバント、抗原、またはそれらの組合せを含む。アジュバントおよび抗原の組合せは、ワクチンと呼ばれ得る。組み合わせて対象に投与される場合、アジュバントおよび抗原は、別々の医薬組成物中で投与され得、またはこれらは、同じ医薬組成物中で一緒に投与され得る。組み合わせて投与される場合、アジュバントは脂質コンジュゲートであり得、抗原は脂質コンジュゲートであり得、またはアジュバントおよび抗原は共に脂質コンジュゲートであり得る。

【0268】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法における使用に適切な免疫原性組成物は、単独で、またはアジュバントと組み合わせて投与される両親媒性リガンドコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、アジュバントは、限定なしに、アラム (alum) (例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム) ; Q. saponaria 木の樹皮から精製されたサポニン、例えば QS21 (HPLC 分画で 21 番目のピーク中に溶出する糖脂質; Antigenics, Inc., Worcester, Mass.) ; ポリ [ジ (カルボキシラトフェノキシ) ホスファゼン] (poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene]) (PCPP ポリマー; Virus Research Institute, USA) 、Flt3 リガンド、Leishmania 伸長因子 (精製された Leishmania タンパク質; Corixa Corporation, Seattle, Wash.) 、ISCOMS (混合サポニン、脂質を含み、抗原を保持できる孔を有するウイルスサイズの粒子を形成する、免疫賦活性複合体; CSL, Melbourne, Australia) 、Pam3Cys、SB-AS4 (アラムおよび MPL を含む SmithKline Beecham アジュバントシステム #4; SBB, Belgium) 、ミセルを形成する非イオン性ブロックコポリマー、例えば CRL 1005 (これらは、ポリオキシエチレンの鎖が隣接した疎水性ポリオキシプロピレンの直鎖を含む、Vaxcel, Inc., Norcross, Ga.) 、ならびに Montanide IMS (例えば、IMS 1312、可溶性免疫賦活薬と組み合わせた水ベースのナノ粒子、Seppic) である。

【0269】

一部の実施形態では、アジュバントは、上で議論したものなどの TLR リガンドである。一部の実施形態では、TLR3 を介して作用するアジュバントには、限定なしに二本鎖 RNA が含まれる。一部の実施形態では、TLR4 を介して作用するアジュバントには、限定なしに、リポ多糖の誘導体、例えば、モノホスホリルリポ A (MPLA; Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.) および ムラムルジペプチド (MDP; Ribi) および スレオニル ムラムルジペプチド (t-MDP; Ribi) ; OM-174 (リポ A に関連するグルコサミン二糖; OM Pharma SA, Meyrin, Switzerland) が含まれる。一部の実施形態では、TLR5 を介して作用するアジュバントには、限定なしにフラジェリンが含まれる。一部の実施形態では、TLR7 および / または TLR8 を介して作用するアジュバントには、一本鎖 RNA、オリゴリボヌクレオチド (ORN) 、合成低分子量化合物、例えば、イミダゾキノリンアミン (例えば、イミキモド (R-837) 、レシキモド (R-848)) が含まれる。一部の実施形態では、TLR9 を介して作用するアジュバントには、ウイルスもしくは細菌起源の DNA、または合成オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) 、例えば、CpG ODN が含まれる。一部の実施形態では、別のアジュバントクラスは、ホスホロチオエート含有分子、例えば、ホスホロチオエート骨格連結を含むホスホロチオエートヌクレオチドアナログおよび核酸である。

【0270】

一部の実施形態では、アジュバントは、油エマルジョン (例えば、フロイントアジュバント) ; サポニン製剤; ビロソームおよびウイルス様粒子; 細菌および微生物誘導体; 免疫賦活性オリゴヌクレオチド; ADP リボシル化毒素および解毒された誘導体; アラム; BCG; 鉍物含有組成物 (例えば、鉍物塩、例えば、アルミニウム塩およびカルシウム塩、水酸化物、リン酸塩、硫酸塩など) ; 生体接着物質 (bioadhesive) および / または粘

10

20

30

40

50

膜接着物質（mucoadhesive）；マイクロ粒子；リボソーム；ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル製剤；ポリホスファゼン；ムラミルペプチド；イミダゾキノロン化合物；ならびに表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニック（登録商標）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノール）から選択される。

【0271】

一部の実施形態では、アジュバントは、免疫調節物質、例えば、サイトカイン、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12など）、インターフェロン（例えば、インターフェロン-γ）、マクロファージコロニー刺激因子および腫瘍壊死因子から選択される。

10

【0272】

一部の実施形態では、アジュバントは、上記のような、免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。

【0273】

一部の実施形態では、アジュバントは、STING（インターフェロン遺伝子の刺激因子（STimulator of Interferon Genes））アゴニストである。免疫細胞中のSTINGシグナル伝達経路は、自然免疫応答の中心的メディエーターであり、刺激されると、免疫活性を増幅および強化する種々のインターフェロン、サイトカインおよびT細胞動員因子の発現を誘導する。例えば参照により本明細書に組み込まれるDubensky, T., et al., Therapeutic Advances in Vaccines, Vol. 1(4): 131-143 (2013)；およびHanson, M., et al., The Journal of Clinical Investigation, Vol. 125 (6): 2532-2546 (2015)に記載される、最近の研究により、STINGアゴニストが有効なアジュバントであり、免疫応答を効率的に惹起することが示されている。

20

【0274】

一部の実施形態では、STINGアゴニストは、サイクリックジヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、サイクリックジヌクレオチドには、cdAMP、cdGMP、cdIMP、c-AMP-GMP、c-AMP-IMPおよびc-GMP-IMP、ならびにホスホロチオエートアナログが含まれるがこれに限定されないそれらのアナログが含まれるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、本開示における使用に適切なサイクリックジヌクレオチドは、例えば、米国特許第7,709,458号および同第7,592,326号；WO2007/054279；US2014/0205653；ならびにYan et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18: 5631 (2008)にいくらか詳細に記載されており、これらは各々、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0275】

ある特定の実施形態では、STINGアゴニストは、化学的に合成される。ある特定の実施形態では、STINGアゴニストは、天然に存在するサイクリックジヌクレオチドのアナログである。サイクリックジヌクレオチドのアナログを含む、本開示における使用に適切なSTINGアゴニストは、米国特許第7,709,458号および同第7,592,326号；ならびにUS2014/0205653に提供される。

40

ポリペプチドを作製する方法

【0276】

一部の実施形態では、両親媒性コンジュゲートにおける使用のための本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、腫瘍関連抗原）は、組換えDNA技術を使用して、形質転換された宿主細胞において作製される。そのために、ペプチドをコードする組換えDNA分子が調製される。かかるDNA分子を調製する方法は、当該分野で周知である。例えば、ペプチドをコードする配列は、適切な制限酵素を使用して、DNAから切り取られ得る。あるいは、DNA分子は、ホスホロアミデート法などの化学的合成技術を使用して合成され得る。また、これらの技術の組合せが使用され得る。

【0277】

50

ポリペプチドを作製する方法は、適切な宿主においてペプチドを発現することが可能なベクターもまた含む。ベクターは、適切な発現制御配列に作用的に連結した、ペプチドをコードするDNA分子を含む。DNA分子がベクター中に挿入される前または後のいずれかにこの作用的連結に影響を与える方法は、周知である。発現制御配列には、プロモーター、アクチベーター、エンハンサー、オペレーター、リボソームヌクレアーゼドメイン、開始シグナル、停止シグナル、キャップシグナル、ポリアデニル化シグナル、および転写または翻訳の制御に関与する他のシグナルが含まれる。

【0278】

その上にDNA分子を有する得られたベクターは、適切な宿主を形質転換するために使用される。この形質転換は、当該分野で周知の方法を使用して実施され得る。

10

【0279】

多数の利用可能で周知の宿主細胞のいずれかが、本明細書で開示される方法における使用に適切であり得る。特定の宿主の選択は、当該分野で認識されるいくつかの因子に依存する。これらには、例えば、選択された発現ベクターとの適合性、DNA分子によってコードされるペプチドの毒性、形質転換の比率、ペプチドの回収の容易さ、発現特徴、バイオセーフティーおよびコストが含まれる。全ての宿主が特定のDNA配列の発現にとって等しく有効なわけではない場合があることを理解して、これらの因子のバランスをとるべきである。これらの一般的ガイドライン内で、有用な微生物宿主には、培養物中の細菌（例えば、*E. coli* 種）、酵母（例えば、*Saccharomyces* 種）および他の真菌、昆虫、植物、哺乳動物（ヒトを含む）細胞、または当該分野で公知の他の宿主が含まれる。

20

【0280】

次に、形質転換された宿主は、培養および精製される。宿主細胞は、所望の化合物が発現されるように、従来の発酵条件下で培養され得る。かかる発酵条件は、当該分野で周知である。最後に、ペプチドは、当該分野で周知の方法によって、培養物から精製される。

【0281】

化合物は、合成方法によっても作製され得る。例えば、固相合成技術が使用され得る。適切な技術は、当該分野で周知であり、これには、Merrifield (1973), *Chem. Polypeptides*, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis et al. (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart and Young (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*; 米国特許第3,941,763号; Finn et al. (1976), *The Proteins* (3rd ed.) 2: 105-253; および Erickson et al. (1976), *The Proteins* (3rd ed.) 2: 257-527に記載されるものが含まれる。固相合成は、小さいペプチドを作製するための最もコスト効率の良い方法であるので、個々のペプチドを作製する好ましい技術である。誘導体化されたペプチドを含むまたは非ペプチド基を含む化合物は、周知の有機化学技術によって合成され得る。

30

【0282】

他の方法は、分子発現／合成の方法であり、これは、当該分野で当業者に一般に公知である。

40

【0283】

上記核酸分子は、例えば、そのベクターを形質導入した細胞においてそれらの発現を指示することが可能なベクター内に含まれ得る。したがって、ポリペプチド変異体に加えて、変異体をコードする核酸分子を含む発現ベクター、およびこれらのベクターをトランスフェクトした細胞は、ある特定の実施形態内にある。

【0284】

使用に適切なベクターには、細菌における使用のためのT7ベースのベクター（例えば、Rosenberg et al., *Gene* 56: 125, 1987を参照のこと）、哺乳動物細胞における使用のためのpMSXND発現ベクター（Lee and Nathans, *J. Biol. Chem.* 263:3521, 1988）、および昆虫細胞における使用のためのバキュロウイルス由来ベクター

50

(例えば、C l o n t e c h、P a l o A l t o、C a l i f. の発現ベクター p B a c P A K S) が含まれる。かかるベクター中の、目的のポリペプチドをコードする核酸挿入物は、例えば、その中での発現が求められる細胞型に基づいて選択されるプロモーターに作動可能に連結し得る。例えば、T 7 プロモーターは、細菌において使用され得、ポリヘドリンプロモーターは、昆虫細胞において使用され得、サイトメガロウイルスまたはメタロチオネインプロモーターは、哺乳動物細胞において使用され得る。また、高等真核生物の場合、組織特異的および細胞型特異的プロモーターが、広く利用可能である。これらのプロモーターは、身体内の所与の組織または細胞型における核酸分子の発現を方向付けるそれらの能力にちなんでそのように名づけられた。当業者は、核酸の発現を方向付けるために使用され得る多数のプロモーターおよび他の調節エレメントを十分承知している。

10

【0285】

挿入された核酸分子の転写を促進する配列に加えて、ベクターは、複製起点、および選択可能なマーカーをコードする他の遺伝子を含み得る。例えば、ネオマイシン耐性 (n e o^r) 遺伝子は、それが発現される細胞に G 4 1 8 耐性を付与し、したがって、トランスフェクトされた細胞の表現型選択を可能にする。当業者は、所与の調節エレメントまたは選択可能なマーカーが、特定の実験的環境における使用に適切かどうかを容易に決定できる。

【0286】

使用に適切なウイルスベクターには、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ベクター、ヘルペスウイルスベクター、サルウイルス 4 0 (S V 4 0) ベクターおよびウシパピローマウイルスベクターが含まれる (例えば、Gluzman (Ed.), Eukaryotic Viral Vectors, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. を参照のこと)。

20

【0287】

ポリペプチド変異体をコードする核酸分子を含みそれを発現する原核細胞または真核細胞もまた、使用に適切である。細胞は、トランスフェクトされた細胞、即ち、核酸分子、例えば、変異体ポリペプチドをコードする核酸分子が組換え DNA 技術によってその中に導入された細胞である。かかる細胞の子孫もまた、本明細書で開示される方法における使用に適切とみなされる。

【0288】

発現系の正確な構成成分は、重要ではない。例えば、ポリペプチド変異体は、原核生物宿主、例えば、細菌 E . c o l i 中で、または真核生物宿主、例えば、昆虫細胞 (例えば、S f 2 1 細胞) もしくは哺乳動物細胞 (例えば、C O S 細胞、N I H 3 T 3 細胞または H e L a 細胞) 中で産生され得る。これらの細胞は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (M a n a s s a s , V a .) を含む多くの供給源から入手可能である。発現系を選択する際には、構成成分が互いに適合性であることのみが重要である。当業者は、かかる決定を行うことができる。さらに、発現系を選択する際にガイダンスが必要とされる場合、当業者は、Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1993) および P o u w e l s et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985 Suppl. 1987) を参考にできる。

30

【0289】

発現されたポリペプチドは、日常的な生化学的手順を使用して発現系から精製され得、本明細書に記載されるように使用され得る、例えば、脂質にコンジュゲートされ得る。

医薬組成物および投与の様式

【0290】

一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートおよび C A R 発現細胞 (例えば、C A R⁺ T 細胞) は、一緒に (同時にまたは逐次) 投与される。一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートおよびアジュバント (例えば、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲート) は、一緒に (同時にまたは逐次) 投与される。一部の実施形態では

50

、両親媒性リガンドコンジュゲート、アジュバント（例えば、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲート）およびCAR発現細胞（例えば、CAR T細胞）は、一緒に（同時にまたは逐次）投与される。一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートおよびCAR発現細胞（例えば、CAR T細胞）は、別々に投与される。一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートおよびアジュバント（例えば、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲート）は、別々に投与される。一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲート、アジュバント（例えば、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲート）およびCAR発現細胞（例えば、CAR T細胞）は、別々に投与される。

【0291】

一部の実施形態では、本開示は、薬学的に許容される賦形剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤および／またはアジュバントと共に両親媒性リガンドコンジュゲートを含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、アジュバントは、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。一部の実施形態では、アジュバントは、STINGアゴニスト（例えば、CDG）である。一部の実施形態では、アジュバントは、別々の医薬組成物中で製剤化される。

【0292】

一部の実施形態では、許容される製剤材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度においてレシipientにとって非毒性である。ある特定の実施形態では、製剤材料（複数可）は、s.c. および／またはI.V. 投与用のものである。一部の実施形態では、医薬組成物は、例えば、組成物のpH、重量オスモル濃度、粘度、透明性、色、等張性、臭い、無菌性、安定性、溶解または放出の速度、吸着または透過を改変、維持または保全するための製剤材料を含む。一部の実施形態では、適切な製剤材料には、アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン）；抗菌薬；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム）；バッファ（例えば、ボレート、ピカーボネート、トリス-HCl、シトレート、ホスフェートまたは他の有機酸）；増量剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））；錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ-シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピルベータ-シクロデキストリン）；フィラー；単糖；二糖；および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；着色剤、香味剤および希釈剤（diluting agent）；乳化剤；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；低分子量ポリペプチド；塩形成性対イオン（例えば、ナトリウム）；防腐剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素）；溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；懸濁化剤；界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック（登録商標）、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポール（tyloxapal））；安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）；張度増強剤（例えば、アルカリ金属ハライド、好ましくは、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトール）；送達ビヒクル；賦形剤（diluent）；添加剤（excipient）および／または医薬品アジュバントが含まれるがこれらに限定されない（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995)）。ある特定の実施形態では、製剤は、PBS；20mM NaOAc、pH5.2、50mM NaCl；および／または10mM NaOAc、pH5.2、9%スクロースを含む。一部の実施形態では、最適な医薬組成物は、例えば、投与の意図した経路、送達形式および所望の投薬量に依存して、当業者によって決定される。例えば、上記Remington's Pharmaceutical Sciencesを参照のこと。一部の実施形態では、かかる組成物は、両親媒性コンジュゲートの物理的状態、安定性、in vivo放出

10

20

30

40

50

の速度および *in vivo* クリアランスの速度に影響し得る。

【0293】

一部の実施形態では、医薬組成物中の主要なビヒクルまたは担体は、性質が水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、一部の実施形態では、適切なビヒクルまたは担体は、非経口投与のための組成物において一般的な他の材料が場合により補充された、注射用水、生理学的食塩水溶液または人工脳脊髄液である。一部の実施形態では、食塩水は、等張リン酸緩衝食塩水を含む。ある特定の実施形態では、中性緩衝食塩水または血清アルブミンと混合された食塩水が、さらなる例示的なビヒクルである。一部の実施形態では、医薬組成物は、ソルビトールまたはその適切な代用品をさらに含み得る、約 pH 7.0 ~ 8.5 のトリス緩衝液、または約 pH 4.0 ~ 5.5 の酢酸緩衝液を含む。一部の実施形態では、両親媒性コンジュゲートを含む組成物は、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、必要に応じた製剤化剤と混合することによって、貯蔵のために調製され得る (Remington's Pharmaceutical Sciences、上記)。さらに、一部の実施形態では、両親媒性コンジュゲートを含む組成物は、スクロースなどの適切な添加剤を使用して、凍結乾燥物として製剤化され得る。

10

【0294】

一部の実施形態では、医薬組成物は、非経口送達のために選択され得る。一部の実施形態では、組成物は、吸入のため、または消化管を介した送達のため、例えば経口送達のために選択され得る。かかる薬学的に許容される組成物の調製は、当業者の技能の範囲内である。

20

【0295】

一部の実施形態では、製剤構成成分は、投与の部位にとって許容される濃度で存在する。一部の実施形態では、緩衝液は、組成物を、生理学的 pH に、またはわずかに低い pH に、典型的には、約 5 ~ 約 8 の pH 範囲内に維持するために使用される。

【0296】

一部の実施形態では、非経口投与が企図される場合、治療用組成物は、薬学的に許容されるビヒクル中の、両親媒性コンジュゲートを含む、発熱物質を含まない非経口的に許容される水溶液の形態であり得る。一部の実施形態では、非経口注射のためのビヒクルは、無菌蒸留水であり、その中に、両親媒性コンジュゲートが、適切に防腐された無菌等張溶液として製剤化される。一部の実施形態では、調製は、デポー注射を介して次いで送達され得る生成物の制御または持続放出を提供できる、注射可能なミクロスフェア、生体侵食性 (bio-erodible) 粒子、ポリマー化合物 (例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸)、ビーズまたはリポソームなどの剤とともに、所望の分子の製剤化を含み得る。一部の実施形態では、ヒアルロン酸もまた使用され得、循環における持続性の持続時間を促進する効果を有し得る。一部の実施形態では、移植可能な薬物送達デバイスが、所望の分子を導入するために使用され得る。

30

【0297】

一部の実施形態では、医薬組成物は、吸入のために製剤化され得る。一部の実施形態では、両親媒性コンジュゲートは、吸入用の乾燥粉末として製剤化され得る。一部の実施形態では、両親媒性コンジュゲートを含む吸入溶液は、エアロゾル送達のための噴霧剤とともに製剤化され得る。一部の実施形態では、溶液は噴霧され得る。肺投与が、化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する PCT 出願第 PCT/US94/001875 号にさらに記載されている。

40

【0298】

一部の実施形態では、製剤は、経口投与され得ることが企図される。一部の実施形態では、この様式で投与される両親媒性コンジュゲートは、錠剤およびカプセル剤などの固体投薬形態の調合において習慣的に使用される担体ありまたはなしで製剤化され得る。一部の実施形態では、カプセル剤は、胃腸管において、バイオアベイラビリティが最大化され、全身循環前の (pre-systemic) 分解が最小化される時点で製剤の活性部分を放出するように設計され得る。一部の実施形態では、少なくとも 1 つのさらなる剤が、両親媒性コン

50

ジュゲートの吸収を促進するために含まれ得る。ある特定の実施形態では、賦形剤、香味料、低融点ワックス、植物油、潤滑剤 (lubricant)、懸濁化剤、錠剤崩壊剤およびバインダーもまた使用され得る。

【0299】

一部の実施形態では、医薬組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性添加剤との混合物中に、有効量の両親媒性コンジュゲートを含み得る。一部の実施形態では、錠剤を無菌水または別の適切なビヒクル中に溶解させることによって、溶液は、単位用量形態で調製され得る。一部の実施形態では、適切な添加剤には、不活性賦形剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム、ラクトースまたはリン酸カルシウム；あるいは結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム；あるいは滑沢剤 (lubricating agent)、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクが含まれるがこれらに限定されない。

【0300】

持続送達または制御送達製剤中に両親媒性コンジュゲートを含む製剤を含む、さらなる医薬組成物が、当業者に明らかである。一部の実施形態では、種々の他の持続送達または制御送達手段、例えば、リポソーム担体、生体侵食性マイクロ粒子または多孔性ビーズおよびデポー注射剤を製剤化するための技術もまた、当業者に公知である。例えば、医薬組成物の送達のための多孔性ポリマーマイクロ粒子の制御放出を記載する PCT 出願第 PCT/US93/00829 号を参照のこと。一部の実施形態では、持続放出調製物は、成形物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態の、半透性ポリマーマトリックスを含み得る。持続放出マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド (米国特許第 3,773,919 号および EP 058,481)、L-グルタミン酸およびガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー (Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 (1983))、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) および Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982))、エチレン酢酸ビニル (Langer et al., 上記) またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (EP 133,988) を含み得る。一部の実施形態では、持続放出組成物には、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得るリポソームもまた含まれ得る。例えば、Eppstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); EP 036,676; EP 088,046 および EP 143,949 を参照のこと。

【0301】

一部の実施形態では、in vivo 投与に使用される医薬組成物は、無菌である。一部の実施形態では、無菌性は、無菌濾過膜を介した濾過によって達成される。組成物が凍結乾燥されるある特定の実施形態では、この方法を使用した無菌化は、凍結乾燥および復元の前または後のいずれかに実施される。一部の実施形態では、非経口投与用の組成物は、凍結乾燥形態または溶液で貯蔵される。一部の実施形態では、非経口組成物は、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、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中に入れる。

【0302】

一部の実施形態では、医薬組成物は、製剤化されると、溶液、懸濁物、ゲル、エマルジョン、固体として、または脱水もしくは凍結乾燥された粉末として、無菌バイアル中に貯蔵される。一部の実施形態では、かかる製剤は、使用準備済の形態で、または投与の前に復元される形態 (例えば、凍結乾燥形態) のいずれかで、貯蔵される。

【0303】

一部の実施形態では、単一用量投与単位を産生するためのキットが提供される。一部の実施形態では、キットは、乾燥タンパク質を有する第1の容器および水性製剤を有する第2の容器の両方を含み得る。一部の実施形態では、単一のおよびマルチチャンバーのプレフィルドシリンジ (例えば、液体シリンジおよびリオシリンジ (lysyringe)) を含むキットが含まれる。

【0304】

一部の実施形態では、治療的に使用される両親媒性コンジュゲートを含む医薬組成物の有効量は、例えば、治療状況および目的に依存する。したがって、当業者は、ある特定の実施形態に従う処置に適切な投薬量レベルが、送達される分子、両親媒性コンジュゲートが使用される適応症、投与の経路、ならびに患者のサイズ（体重、体表面または臓器のサイズ）および／または状態（年齢および一般的健康）に一部依存して変動することを理解する。一部の実施形態では、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し、投与の経路を改変することができる。

【0305】

一部の実施形態では、投薬の頻度は、使用される製剤中の両親媒性コンジュゲートの薬物動態学的パラメーターを考慮する。一部の実施形態では、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで、組成物を投与する。したがって、一部の実施形態では、組成物は、単一用量として、または2つもしくはそれよりも多くの用量（これは、同じ量の所望の分子を含んでいてもいなくてもよい）として経時的に、または、移植デバイスもしくはカテーテルを介した連続的注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる精密化は、当業者によって日常的に行われ、当業者が日常的に実施する作業の範囲内である。一部の実施形態では、適切な投薬量は、適切な用量－応答データの使用を介して確認され得る。

【0306】

一部の実施形態では、医薬組成物の投与の経路は、公知の方法に従う、例えば、経口で、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、皮下、眼内、動脈内、門脈内もしくは病巣内経路による注射を介する；持続放出系または移植デバイスによる。ある特定の実施形態では、組成物は、ボーラス注射によって、もしくは注入によって連続的に、または移植デバイスによって投与され得る。ある特定の実施形態では、併用療法の個々の要素は、異なる経路によって投与され得る。

【0307】

一部の実施形態では、組成物は、所望の分子がその上で吸収されたかまたは封入されたメンブレン、スポンジまたは別の適切な材料の移植を介して、局所投与され得る。移植デバイスが使用される一部の実施形態では、デバイスは、任意の適切な組織または臓器中に移植され得、所望の分子の送達は、拡散、時限放出（timed-release）ボーラスまたは連続的投与を介してであり得る。一部の実施形態では、両親媒性コンジュゲートを含む医薬組成物を *ex vivo* 様式で使うことが望まれ得る。かかる例では、患者から取り出された細胞、組織および／または臓器は、両親媒性コンジュゲートを含む医薬組成物に曝露され、その後、この細胞、組織および／または臓器は、患者中に引き続いて移植して戻される。

【0308】

一部の実施形態では、両親媒性コンジュゲートは、コンジュゲートを発現させ分泌するように、本明細書に記載される方法などの方法を使用して遺伝子操作されたある特定の細胞を移植することによって送達され得る。一部の実施形態では、かかる細胞は、動物またはヒトの細胞であり得、自家、異種（heterologous）または異種（xenogeneic）であり得る。一部の実施形態では、細胞は不死化され得る。一部の実施形態では、免疫学的応答の機会を減少させるために、細胞は、周辺組織の浸潤を回避するためにカプセル封入され得る。一部の実施形態では、カプセル封入材料は、典型的には、タンパク質産物（複数可）の放出を可能にするが、患者の免疫系によるまたは周辺組織からの他の有害因子による細胞の破壊を防止する、生体適合性の半透性ポリマー封入体またはメンブレンである。

使用の方法

【0309】

一部の実施形態では、本開示は、対象において *in vivo* でCARエフェクター細胞（例えば、CAR-T細胞）を拡大または活性化する方法であって、本明細書に記載される両親媒性脂質コンジュゲートを含む組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【0310】

一部の実施形態では、本開示は、対象において *in vivo* で CAR エフェクター細胞（例えば、CAR-T 細胞）の増殖を刺激する方法であって、本明細書に記載される両親媒性脂質コンジュゲートを含む組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【0311】

細胞の拡大、活性化および増殖を決定するための方法は、当業者に公知である。例えば、特定の位置（例えば、リンパ節、血液、腫瘍）における細胞の数は、細胞を単離し、フローサイトメトリーを介してそれらを解析することによって決定され得る。一部の実施形態では、細胞は、適切なマーカー、例えば、活性化マーカー（例えば、CD80、CD86、41BBL、ICOSL または OX40L）および／または増殖マーカー（例えば、Ki67）で染色される。一部の実施形態では、細胞の数は、色素（例えば、クリスタルバイオレット）を細胞中に導入し、色素の希釈度を経時的に測定することによって測定され、ここで、希釈度は、細胞増殖を示す。

10

【0312】

一部の実施形態では、本開示は、抗原の発現または発現の上昇に関連する疾患、障害または状態を有する対象を処置するための方法であって、対象に、抗原に標的化された CAR エフェクター細胞（例えば、CAR-T 細胞）および両親媒性脂質コンジュゲートを投与することを含む、方法を提供する。

【0313】

一部の実施形態では、対象には、両親媒性脂質コンジュゲートを受ける前に CAR エフェクター細胞（例えば、CAR-T 細胞）が投与される。一部の実施形態では、対象には、両親媒性脂質コンジュゲートを受けた後に CAR エフェクター細胞（例えば、CAR-T 細胞）が投与される。一部の実施形態では、対象には、CAR エフェクター細胞（例えば、CAR-T 細胞）および両親媒性脂質コンジュゲートが、逐次または同時に投与される。

20

【0314】

CAR がタグ結合ドメインを含む一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、タグ化タンパク質の製剤を投与することをさらに含み、タグ結合ドメインは、タグ化タンパク質に結合する。一部の実施形態では、タグ化タンパク質のタンパク質は、抗体または抗原結合性断片である。一部の実施形態では、タグ結合ドメインは、抗体またはその抗原結合性断片である。一部の実施形態では、タグ化タンパク質の製剤は、CAR エフェクター細胞（例えば、CAR-T 細胞）および両親媒性リガンドコンジュゲートの投与の前に対象に投与される。一部の実施形態では、タグ化タンパク質の製剤は、CAR エフェクター細胞（例えば、CAR-T 細胞）および両親媒性リガンドコンジュゲートと併せて（同時にまたは逐次）、対象に投与される。一部の実施形態では、タグ化タンパク質の製剤は、CAR エフェクター細胞（例えば、CAR-T 細胞）および両親媒性リガンドコンジュゲートの投与の後に対象に投与される。

30

がんおよびがん免疫療法

【0315】

一部の実施形態では、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲートは、異常なアポトーシスまたは分化プロセスに関連する障害（例えば、細胞増殖障害（例えば、過剰増殖障害（hyperproliferative disorder））または細胞分化障害、例えば、がん）を処置するのに有用である。本発明の方法による処置に適したがんの非限定的な例は、以下に記載される。

40

【0316】

細胞増殖および／または分化障害の例には、がん（例えば、癌、肉腫、転移性障害または造血新生物性障害、例えば、白血病）が含まれる。転移性腫瘍は、前立腺、結腸、肺、乳房および肝臓のものが含まれるがこれらに限定されない多数の原発性腫瘍型から生じ得る。したがって、両親媒性リガンドコンジュゲートを含む本明細書で使用される組成物は、がんを有する患者に投与され得る。

【0317】

50

本明細書で使用される場合、本発明者らは、自律的成長の能力を有する細胞（即ち、迅速に増殖している細胞成長によって特徴付けられる異常な状態（state）または状態（condition））を指すために、用語「がん」（または「がん性」）、「過剰増殖」および「新生物性」を使用する場合がある。過剰増殖および新生物性疾患状態は、病的（即ち、疾患状態を特徴付けるまたは構成する）として分類され得る、または非病的（即ち、疾患状態に関連しない正常からの逸脱として）として分類され得る。これらの用語は、組織病理学的型または侵襲性の段階にかかわらず、全ての型のがん性成長もしくは発癌プロセス、転移性組織、または悪性形質転換した細胞、組織もしくは臓器を含むことを意味する。「病的過剰増殖」細胞は、悪性腫瘍成長によって特徴付けられる疾患状態において生じる。非病的過剰増殖細胞の例には、創傷修復に関連する細胞の増殖が含まれる。

10

【0318】

用語「がん」または「新生物」は、肺、乳房、甲状腺、リンパ腺およびリンパ系組織、胃腸臓器ならびに泌尿生殖器に影響するものを含む種々の臓器系の悪性腫瘍、ならびに悪性腫瘍、例えば、ほとんどの結腸がん、腎細胞癌、前立腺がんおよび／または精巣腫瘍、肺の非小細胞癌、小腸のがんおよび食道のがんを含むと一般に見なされる腺癌を指すために使用される。

【0319】

用語「癌」は、当該分野で認識されており、呼吸器系癌、胃腸系癌、泌尿生殖器系癌、精巣癌、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌および黒色腫を含む上皮または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。両親媒性リガンドコンジュゲートは、腎癌もしくは黒色腫を含む任意の型のがん、または任意のウイルス疾患を有する患者、それを有すると疑われる患者、またはそれを発生させる高いリスクがあり得る患者を処置するために使用され得る。例示的な癌には、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸および卵巣の組織から形成されるものが含まれる。この用語は、癌性および肉腫性組織から構成される悪性腫瘍を含む癌肉腫もまた含む。「腺癌」は、腺性組織に由来する癌または腫瘍細胞が認識可能な腺性構造を形成する癌を指す。

20

【0320】

増殖障害のさらなる例には、造血新生物性障害が含まれる。本明細書で使用される場合、用語「造血新生物性障害」は、例えば、骨髄系系統、リンパ系系統もしくは赤血球系系統、またはそれらの前駆体細胞から生じる、造血起源の過形成性／新生物性細胞が関与する疾患を含む。好ましくは、これらの疾患は、低分化急性白血病（例えば、赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病）から生じる。さらなる例示的な骨髄性障害には、急性前骨髄性白血病（APML）、急性骨髄性白血病（AML）および慢性骨髄性白血病（CML）が含まれるがこれらに限定されず（Vaickus, L. (1991) Crit. Rev. in Oncol. / Hemotol. 11:267-97において概説される）；リンパ系悪性腫瘍には、B系統ALLおよびT系統ALLを含む急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、前リンパ球性白血病（PLL）、ヘアリー細胞白血病（HLL）ならびにワルデンストレームマクログロブリン血症（WM）が含まれるがこれらに限定されない。悪性リンパ腫のさらなる形態には、非ホジキンリンパ腫およびそのバリエーション、末梢性T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病／リンパ腫（ATL）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、大顆粒リンパ球性白血病（LGF）、ホジキン病およびリード・シュテルンベルク病（Reed-Sternberg disease）が含まれるがこれらに限定されない。

30

40

【0321】

腫瘍の成長およびサイズを低減させるのに十分な両親媒性コンジュゲートの量、即ち治療有効量は、選択された特定の化合物または組成物だけでなく、投与の経路、処置されている状態の性質、ならびに患者の年齢および状態によっても変動し、最終的には、患者の医師または薬剤師の裁量であることが、当業者によって理解される。本方法において使用される化合物が与えられる時間の長さは、個体によって変動する。

【0322】

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とする対象において腫瘍のサイズを低減も

50

しくは減少させるまたは腫瘍成長を阻害する方法であって、対象に、本明細書に記載される両親媒性脂質コンジュゲートを投与することを含み、対象が、CARエフェクター細胞治療（例えば、CAR-T細胞治療）を受けているまたは受けたことがある、方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、がんを有する対象において抗腫瘍応答を誘導するための方法であって、対象に、本明細書に記載される両親媒性脂質コンジュゲートを投与することを含み、対象が、CARエフェクター細胞治療（例えば、CAR-T細胞治療）を受けているまたは受けたことがある、方法を提供する。

【0323】

一部の実施形態では、本開示は、対象において抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答を刺激するための方法であって、抗原に標的化されたエフェクターCAR細胞（例えば、CAR-T細胞）および両親媒性脂質コンジュゲートを投与することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、免疫応答は、T細胞媒介性免疫応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、抗腫瘍免疫応答である。一部の実施形態では、標的細胞集団または標的組織は、腫瘍細胞または腫瘍組織である。

【0324】

処置に対する本明細書の言及は、注目したがんおよび症状の予防および処置に及ぶことが、当業者によって理解される。

感染性疾患

【0325】

一部の実施形態では、本明細書で開示される両親媒性脂質コンジュゲートは、急性または慢性の感染性疾患を処置するのに有用である。ウイルス感染症は、T細胞によって主に排除されるので、T細胞活性における増加は、感染性ウイルス病原体のより迅速なまたは徹底的なクリアランスが動物またはヒト対象にとって有益である状況において、治療的に有用である。

最近、CAR-T細胞治療は、PCT公開第WO2015/077789号；Hale et al., (2017) Engineering HIV-Resistant, Anti-HIV Chimeric Antigen Receptor T Cells. Molecular Therapy, Vol. 25(3): 570-579；Liu et al., (2016). ABSTRACT. Journal of Virology, 90(21), 9712-9724；Liu et al., (2015). ABSTRACT. Journal of Virology, 89(13), 6685-6694；Sahu et al., (2013). Virology, 446(1-2), 268-275に記載されるように、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）などのウイルス感染症を処置する際のその有用性について調査されている。

【0326】

したがって、一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートは、免疫不全（例えば、HIV）、パピローマ（例えば、HPV）、ヘルペス（例えば、HSV）、脳炎、インフルエンザ（例えば、ヒトインフルエンザウイルスA）および風邪（例えば、ヒトライノウイルス）ウイルス感染症が含まれるがこれらに限定されない局所または全身ウイルス感染症の処置のために投与される。一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートを含む医薬製剤は、ウイルス皮膚疾患、例えば、ヘルペス病変もしくは帯状疱疹、または性器疣贅を処置するために、外用投与される。一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートは、AIDS、インフルエンザ、風邪または脳炎が含まれるがこれらに限定されない全身ウイルス疾患を処置するために投与される。

【0327】

一部の実施形態では、本開示は、ウイルス感染症を有する対象において*in vivo*でCARエフェクター細胞（例えば、CAR-T細胞）の増殖を増加させるための方法であって、両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物を投与することを含み、CARが、ウイルスペプチド結合ドメイン（例えば、HIV Env結合ドメイン）を含み、両親媒性リガンドコンジュゲートが、ウイルスペプチド（例えば、HIV Env）を含む、方法を提供する。

【0328】

一部の実施形態では、本開示は、ウイルス感染症を有する対象において*in vivo*

でCARエフェクター細胞（例えば、CAR-T細胞）を拡大させるための方法であって、両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物を投与することを含み、CARが、ウイルスペプチド結合ドメイン（例えば、HIV Env 結合ドメイン）を含み、両親媒性リガンドコンジュゲートが、ウイルスペプチド（例えば、HIV Env）を含む、方法を提供する。

【0329】

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とする対象においてウイルス感染症を低減させる方法であって、対象に、本明細書に記載される両親媒性脂質コンジュゲートを投与することを含み、対象が、CARエフェクター細胞治療（例えば、CAR-T細胞治療）を受けているまたは受けたことがある、方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、がんを有する対象において抗ウイルス応答を誘導するための方法であって、対象に、本明細書に記載される両親媒性脂質コンジュゲートを投与することを含み、対象が、CARエフェクター細胞治療（例えば、CAR-T細胞治療）を受けているまたは受けたことがある、方法を提供する。

10

【0330】

処置に対する本明細書の言及は、注目した感染症および症状の予防および処置に及ぶことが、当業者によって理解される。

キット

【0331】

本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲートおよび使用に関する指示を少なくとも含むキットが、本明細書に提供される。一部の実施形態では、キットは、適切な容器中に、両親媒性リガンドコンジュゲート、1つまたは複数の対照、ならびに種々のバッファ、試薬、酵素および当該分野で周知の他の標準的な成分を含む。一部の実施形態では、キットは、アジュバント（例えば、両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートまたはSTINGアゴニスト（例えば、CDG））をさらに含む。したがって、一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートおよびアジュバントは、同じバイアル中にある。一部の実施形態では、両親媒性リガンドコンジュゲートおよびアジュバントは、別々のバイアル中にある。

20

【0332】

一部の実施形態では、容器は、両親媒性リガンドコンジュゲートがその中に入れられ得、一部の場合にはその中に適切にアリコート化され得る、少なくとも1つのバイアル、ウェル、試験管、フラスコ、ビン、シリンジまたは他の容器手段である。さらなる構成成分が提供される場合、キットは、この化合物がその中に入れられ得るさらなる容器を含み得る。キットは、市販のために、両親媒性リガンドコンジュゲートを含むための手段、および密閉された任意の他の試薬容器もまた含み得る。かかる容器には、所望のバイアルがその中に保持される射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器が含まれ得る。容器および／またはキットは、使用に関する指示および／または警告を有するラベルを含み得る。

30

【0333】

一部の実施形態では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物の投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の実施形態では、キットは、CAR-T細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、アジュバント、およびアジュバントの投与に関する指示をさらに含む。一部の実施形態では、アジュバントは、本明細書に記載される両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。一部の実施形態では、アジュバントは、STINGアゴニストである。一部の実施形態では、アジュバントは、CDGである。

40

【0334】

一部の実施形態では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてがんを

50

処置するためまたはその進行を遅延させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびにその医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせての投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。

【0335】

一部の実施形態では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞を拡大させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物ワクチンの投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の実施形態では、キットは、CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞を拡大させるための、アジュバント、およびアジュバントの投与に関する指示をさらに含む。一部の実施形態では、アジュバントは、本明細書に記載される両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。一部の実施形態では、アジュバントは、STINGアゴニストである。一部の実施形態では、アジュバントは、CDGである。

10

【0336】

一部の実施形態では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞を拡大させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびにその医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせての投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の実施形態では、アジュバントは、本明細書に記載される両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。一部の実施形態では、アジュバントは、STINGアゴニストである。一部の実施形態では、アジュバントは、CDGである。

20

【0337】

一部の実施形態では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞の増殖を増加させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物の投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の態様では、キットは、CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞の増殖を増加させるための、アジュバント、およびアジュバントの投与に関する指示をさらに含む。一部の実施形態では、アジュバントは、本明細書に記載される両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。一部の実施形態では、アジュバントは、STINGアゴニストである。一部の実施形態では、アジュバントは、CDGである。

30

【0338】

一部の実施形態では、本開示は、CAR-T細胞治療を受けている個体においてCAR-T細胞の増殖を増加させるための、本明細書に記載される両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびにその医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせての投与に関する指示を含む添付文書を含むキットを提供する。一部の実施形態では、アジュバントは、本明細書に記載される両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。一部の実施形態では、アジュバントは、STINGアゴニストである。一部の実施形態では、アジュバントは、CDGである。

40

【0339】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるキットのいずれかは、両親媒性リガンドコンジュゲート中に存在するCARリガンドに結合するCARを含むCAR-T細胞をさらに含む。

本開示の他の実施形態

【0340】

このセクションを通じて、実施形態という用語は、「E」とその後ろの序数として略される。例えば、E1は、実施形態1と等価である。

50

【0341】

E1. 対象において *in vivo* でキメラ抗原受容体 (CAR) T細胞を拡大させるまたはCAR T細胞の増殖を増加させる方法であって、対象においてCAR T細胞を拡大させるのに十分な量で組成物を投与することを含み、組成物が、脂質、CARリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む両親媒性リガンドコンジュゲートを含む、方法。

【0342】

E2. 両親媒性リガンドコンジュゲートが、生理的条件下でアルブミンに結合する、実施形態1に記載の方法。

【0343】

E3. CAR (−) T細胞の増殖が、対象において増加されない、実施形態2に記載の方法。

【0344】

E4. それを必要とする対象において腫瘍のサイズを低減もしくは減少させるまたは腫瘍成長を阻害する方法であって、対象に組成物を投与することを含み、対象が、キメラ抗原受容体 (CAR) T細胞治療を受けているまたは受けたことがあり、組成物が、脂質、CARリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む両親媒性リガンドコンジュゲートを含む、方法。

【0345】

E5. がんを有する対象において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、対象に組成物を投与することを含み、対象が、キメラ抗原受容体 (CAR) T細胞治療を受けているまたは受けたことがあり、組成物が、脂質、CARリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む両親媒性リガンドコンジュゲートを含む、方法。

【0346】

E6. 対象において抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答を刺激する方法であって、対象に、抗原に標的化されたキメラ抗原受容体 (CAR) T細胞および組成物を投与することを含み、組成物が、脂質、CARリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む両親媒性リガンドコンジュゲートを含む、方法。

【0347】

E7. 免疫応答が、T細胞媒介性免疫応答または抗腫瘍免疫応答である、実施形態6に記載の方法。

【0348】

E8. 標的細胞集団または標的組織が、腫瘍細胞または腫瘍組織である、実施形態6または7に記載の方法。

【0349】

E9. 抗原の発現または発現の上昇に関連する疾患、障害または状態を有する対象を処置する方法であって、対象に、抗原に標的化されたキメラ抗原受容体 (CAR) T細胞および組成物を投与することを含み、組成物が、脂質、CARリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む両親媒性リガンドコンジュゲートを含む、方法。

【0350】

E10. CAR T細胞を受ける前に、対象に組成物が投与される、実施形態1から3のいずれか1つに記載の方法。

【0351】

E11. CAR T細胞を受けた後に、対象に組成物が投与される、実施形態1から3のいずれか1つに記載の方法。

【0352】

E12. 組成物およびCAR T細胞が同時に投与される、実施形態1から3のいずれか1つに記載の方法。

【0353】

E13. CAR T細胞が、1つの共刺激ドメインを含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0354】

E14. 1つの共刺激ドメインが、CD28または4-1BBである、実施形態13に記載の方法。

【0355】

E15. 両親媒性リガンドコンジュゲートが、リンパ節に輸送される、実施形態1から14のいずれか1つに記載の方法。

【0356】

E16. 両親媒性リガンドコンジュゲートが、鼠径リンパ節および補助リンパ節に輸送される、実施形態1から14のいずれか1つに記載の方法。

【0357】

E17. 両親媒性リガンドコンジュゲートが、リンパ節に輸送されると、抗原提示細胞の膜中に挿入される、実施形態1から16のいずれか1つに記載の方法。

【0358】

E18. 抗原提示細胞が、髄質マクロファージ、CD8+樹状細胞および／またはCD11b+樹状細胞である、実施形態17に記載の方法。

【0359】

E19. CARリガンドが、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間、少なくとも15日間、少なくとも16日間、少なくとも17日間、少なくとも18日間、少なくとも19日間、少なくとも20日間、少なくとも21日間、少なくとも22日間、少なくとも23日間、少なくとも24日間または少なくとも25日間にわたって、リンパ節中で保持される、実施形態1から18のいずれか1つに記載の方法。

【0360】

E20. 組成物が、アジュバントをさらに含む、実施形態1から19のいずれか1つに記載の方法。

【0361】

E21. アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、実施形態20に記載の方法。

【0362】

E22. 免疫賦活性オリゴヌクレオチドが、パターン認識受容体に結合する、実施形態21に記載の方法。

【0363】

E23. 免疫賦活性オリゴヌクレオチドがCpGを含む、実施形態22に記載の方法。

【0364】

E24. 免疫賦活性オリゴヌクレオチドが、 toll様受容体に対するリガンドである、実施形態21に記載の方法。

【0365】

E25. リンカーが、親水性ポリマー、一連の親水性アミノ酸、多糖、またはそれらの組合せからなる群から選択される、実施形態1から20のいずれか1つに記載の方法。

【0366】

E26. リンカーが、「N」個連続するポリエチレングリコール単位を含み、Nが25～50の間である、実施形態1から20のいずれか1つに記載の方法。

【0367】

E27. 脂質がジアシル脂質である、実施形態1から26のいずれか1つに記載の方法。

【0368】

E28. リンカーが、オリゴヌクレオチドリンカーである、実施形態21から24のいずれか1つに記載の方法。

【0369】

10

20

30

40

50

E 2 9 . オリゴヌクレオチドリンカーが、「N」個連続するグアニンを含み、N が 0 ～ 2 の間である、実施形態 2 8 に記載の方法。

【 0 3 7 0 】

E 3 0 . 脂質がジアシル脂質である、実施形態 2 1 から 2 4 および 2 8 から 2 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 7 1 】

E 3 1 . C A R リガンドが腫瘍関連抗原であり、C A R が腫瘍関連抗原結合ドメインを含む、実施形態 1 から 3 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 7 2 】

E 3 2 . C A R リガンドがタグであり、C A R がタグ結合ドメインを含む、実施形態 1 から 3 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 7 3 】

E 3 3 . タグが、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) 、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン (P E) 、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびマルトース結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態 3 2 に記載の方法。

【 0 3 7 4 】

E 3 4 . タグ化タンパク質の製剤を投与することをさらに含む方法であって、タグ結合ドメインが、タグ化タンパク質に結合する、実施形態 3 2 または 3 3 に記載の方法。

【 0 3 7 5 】

E 3 5 . タグ化タンパク質のタンパク質が、抗体またはその抗原結合性断片である、実施形態 3 4 に記載の方法。

【 0 3 7 6 】

E 3 6 . タグ結合ドメインが、抗体またはその抗原結合性断片である、実施形態 3 4 または 3 5 に記載の方法。

【 0 3 7 7 】

E 3 7 . タグ化タンパク質の製剤が、C A R T 細胞、および両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物の投与の前に対象に投与される、実施形態 3 4 から 3 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 7 8 】

E 3 8 . タグ化タンパク質の製剤が、C A R T 細胞、および両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物の投与と併せて対象に投与される、実施形態 3 4 から 3 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 7 9 】

E 3 9 . タグ化タンパク質の製剤が、C A R T 細胞、および両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物の投与の後に対象に投与される、実施形態 3 4 から 3 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 8 0 】

E 4 0 . C A R T 細胞が、両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物の投与の前に対象に投与される、実施形態 3 7 から 3 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 8 1 】

E 4 1 . C A R T 細胞が、両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物の投与の後に対象に投与される、実施形態 3 7 から 3 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 8 2 】

E 4 2 . C A R T 細胞が、両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物の投与と併せて投与される、実施形態 3 7 から 3 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 8 3 】

E 4 3 . 対象ががんを有する、実施形態 1 から 3 および 6 から 4 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0384】

E 44. 対象がヒトである、実施形態 1 から 43 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0385】

E 45. 両親媒性リガンドコンジュゲートおよび薬学的に許容される担体を含む組成物であって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、キメラ抗原受容体 (CAR) リガンド、脂質および必要に応じてリンカーを含む、組成物。

【0386】

E 46. リンカーが、親水性ポリマー、一連の親水性アミノ酸、多糖、またはそれらの組合せからなる群から選択される、実施形態 45 に記載の組成物。

【0387】

E 47. リンカーが、「N」個連続するポリエチレングリコール単位を含み、N が 25 ～ 50 の間である、実施形態 45 に記載の組成物。

【0388】

E 48. 脂質がジアシル脂質である、実施形態 45 から 47 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【0389】

E 49. CAR リガンドがタグである、実施形態 45 から 48 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【0390】

E 50. タグが、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン (PE)、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびマルトース結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態 49 に記載の組成物。

【0391】

E 51. 実施形態 45 から 50 のいずれか 1 つに記載の組成物およびアジュバントを含む免疫原性組成物。

【0392】

E 52. アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、実施形態 51 に記載の免疫原性組成物。

【0393】

E 53. 免疫賦活性オリゴヌクレオチドが、パターン認識受容体に結合する、実施形態 52 に記載の免疫原性組成物。

【0394】

E 54. 免疫賦活性オリゴヌクレオチドが CpG を含む、実施形態 53 に記載の免疫原性組成物。

【0395】

E 55. 免疫賦活性オリゴヌクレオチドが、 toll 様受容体に対するリガンドである、実施形態 52 に記載の免疫原性組成物。

【0396】

E 56. 脂質がジアシル脂質である、実施形態 52 から 55 のいずれか 1 つに記載の免疫原性組成物。

【0397】

E 57. リンカーが、オリゴヌクレオチドリンカーである、実施形態 52 から 56 のいずれか 1 つに記載の免疫原性組成物。

【0398】

E 58. オリゴヌクレオチドリンカーが、「N」個連続するグアニンを含み、N が 0 ～ 2 の間である、実施形態 57 に記載の免疫原性組成物。

【0399】

10

20

30

40

50

E 5 9 . C A R T細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物の投与に関する指示を含む添付文書を含むキットであって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、脂質、C A Rリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む、キット。

【 0 4 0 0 】

E 6 0 . キメラ抗原受容体 (C A R) T細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、アジュバント、およびアジュバントの投与に関する指示をさらに含む、実施形態 5 9 に記載のキット。

【 0 4 0 1 】

E 6 1 . アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、実施形態 6 0 に記載のキット。

【 0 4 0 2 】

E 6 2 . キメラ抗原受容体 (C A R) T細胞治療を受けている個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための、両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびにその医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせての投与に関する指示を含む添付文書を含むキットであって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、脂質、C A Rリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む、キット。

【 0 4 0 3 】

E 6 3 . C A R T細胞治療を受けている個体においてC A R T細胞を拡大させるための、両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物ワクチンの投与に関する指示を含む添付文書を含むキットであって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、脂質、C A Rリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む、キット。

【 0 4 0 4 】

E 6 4 . キメラ抗原受容体 (C A R) T細胞治療を受けている個体においてC A R T細胞を拡大させるための、アジュバント、およびアジュバントの投与に関する指示をさらに含む、実施形態 6 3 に記載のキット。

【 0 4 0 5 】

E 6 5 . アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、実施形態 6 4 に記載のキット。

【 0 4 0 6 】

E 6 6 . C A R T細胞治療を受けている個体においてC A R T細胞を拡大させるための、両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびにその医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせての投与に関する指示を含む添付文書を含むキットであって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、脂質、C A Rリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む、キット。

【 0 4 0 7 】

E 6 7 . C A R T細胞治療を受けている個体においてC A R T細胞の増殖を増加させるための、両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物の投与に関する指示を含む添付文書を含むキットであって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、脂質、C A Rリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む、キット。

【 0 4 0 8 】

E 6 8 . キメラ抗原受容体 (C A R) T細胞治療を受けている個体においてC A R T細胞の増殖を増加させるための、アジュバント、およびアジュバントの投与に関する指示

10

20

30

40

50

をさらに含む、実施形態 67 に記載のキット。

【0409】

E69. アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、実施形態 66 または 68 に記載のキット。

【0410】

E70. CAR T細胞治療を受けている個体において CAR T細胞の増殖を増加させるための、両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む医薬、ならびにその医薬単独で、またはアジュバントおよび必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせての投与に関する指示を含む添付文書を含むキットであって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、脂質、CARリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む、キット。

10

【0411】

E71. 対象において *in vivo* で CAR T細胞を拡大させる際の使用のための、実施形態 45 から 50 のいずれか 1 つに記載の組成物、実施形態 51 から 58 のいずれか 1 つに記載の免疫原性組成物または実施形態 59 から 70 のいずれか 1 つに記載のキットの使用。

【0412】

E72. 対象において *in vivo* で CAR T細胞の増殖を増加させる際の使用のための、実施形態 45 から 50 のいずれか 1 つに記載の組成物、実施形態 51 から 58 のいずれか 1 つに記載の免疫原性組成物または実施形態 59 から 70 のいずれか 1 つに記載のキットの使用。

20

【0413】

E73. 個体においてがんを処置するまたはその進行を遅延させる際の使用のための、実施形態 45 から 50 のいずれか 1 つに記載の組成物、実施形態 51 から 58 のいずれか 1 つに記載の免疫原性組成物または実施形態 59 から 70 のいずれか 1 つに記載のキットの使用。

【0414】

E74. 個体においてがんを処置するためまたはその進行を遅延させるための医薬の製造における、実施形態 45 から 50 のいずれか 1 つに記載の組成物の使用であって、医薬が、組成物および必要に応じた薬学的に許容される担体を含む、使用。

30

【0415】

E75. 両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物であって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、ポリエチレングリコール部分を介してフルオレセインイソチオシアネート (FITC) にコンジュゲートされた脂質を含む、組成物。

【0416】

E76. 脂質が、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DSPE) であり、ポリエチレングリコール部分が PEG-2000 である、実施形態 75 に記載の組成物。

【0417】

E77. 両親媒性リガンドコンジュゲートおよびアジュバントを含む免疫原性組成物であって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、脂質、CARリガンドおよび必要に応じてリンカーを含み、アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、免疫原性組成物。

40

【0418】

E78. 両親媒性リガンドコンジュゲートおよびアジュバントを含む免疫原性組成物であって、両親媒性リガンドコンジュゲートが、脂質、CARリガンドおよび必要に応じてリンカーを含み、CARリガンドがタグであり、アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴ

50

ヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、免疫原性組成物。

【0419】

E79. 両親媒性リガンドコンジュゲートが、生理的条件下でアルブミンに結合する、実施形態4から44のいずれか1つに記載の方法。

【0420】

E80. 両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、生理的条件下でアルブミンに結合する、実施形態21から24および27から44のいずれか1つに記載の方法。

【0421】

E81. 両親媒性リガンドコンジュゲートを含む組成物を、非腫瘍流入領域リンパ節において非経口で、腫瘍流入領域リンパ節において非経口で、または腫瘍内に投与することを含む、実施形態1から44のいずれか1つに記載の方法。

【0422】

E82. 標的細胞集団または標的組織が、ウイルスに感染した細胞の集団または組織である、実施形態6に記載の方法。

【0423】

E83. ウイルスがヒト免疫不全ウイルス（HIV）である、実施形態82に記載の方法。

【0424】

E84. 免疫応答がT細胞媒介性免疫応答である、実施形態82または83に記載の方法。

【0425】

E85. 抗原が、ウイルス抗原またはがん抗原である、実施形態9に記載の方法。

【0426】

E86. CAR T細胞治療を受けている個体においてウイルス感染症を処置するためまたはその進行を遅延させるための、両親媒性リガンドコンジュゲート、必要に応じた薬学的に許容される担体を含む組成物を含む容器、および組成物の投与に関する指示を含む添付文書を含むキットであって、両親媒性リガンドが、脂質、CARリガンドおよび必要に応じてリンカーを含む、キット。

【0427】

E87. CAR T細胞治療を受けている個体においてウイルス感染症を処置するためまたはその進行を遅延させるための、アジュバント、およびアジュバントの投与に関する指示をさらに含む、実施形態86に記載のキット。

【0428】

E88. アジュバントが、リンカーおよび必要に応じて極性化合物を用いてまたは用いずに脂質にコンジュゲートされた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、実施形態87に記載のキット。

【0429】

E89. 両親媒性リガンドコンジュゲートが、親水性ポリマー、一連の親水性アミノ酸、多糖、またはそれらの組合せからなる群から選択されるリンカーを含む、実施形態59から70および86から88のいずれか1つに記載のキット。

【0430】

E90. 両親媒性リガンドコンジュゲートが、「N」個連続するポリエチレングリコール単位を含むリンカーを含み、Nが25～50の間である、実施形態59から70および86から88のいずれか1つに記載のキット。

【0431】

E91. 脂質がジアシル脂質である、実施形態59から70および86から90のいずれか1つに記載のキット。

【0432】

E92. 両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、オリゴヌクレオチドリンカーを含む、実施形態61、65、69または88のいずれか1つに記載のキット。

10

20

30

40

50

【0433】

E93. オリゴヌクレオチドリンカーが、「N」個連続するグアニンを含み、Nが0～2の間である、実施形態92に記載のキット。

【0434】

E94. CARリガンドが腫瘍関連抗原であり、CARが腫瘍関連抗原結合ドメインを含む、実施形態59から70および89から93のいずれか1つに記載のキット。

【0435】

E95. CARリガンドがタグであり、CARがタグ結合ドメインを含む、実施形態59から70および89から93のいずれか1つに記載のキット。

【0436】

E96. タグが、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン (PE)、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびマルトース結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態95に記載のキット。

【0437】

E97. キットが、タグ化タンパク質の製剤、およびタグ化タンパク質の製剤の投与に関する指示をさらに含み、タグ結合ドメインが、タグ化タンパク質に結合する、実施形態95または96に記載のキット。

【0438】

E98. タグ化タンパク質のタンパク質が、抗体またはその抗原結合性断片である、実施形態97に記載のキット。

【0439】

E99. 両親媒性リガンドコンジュゲートが、親水性ポリマー、一連の親水性アミノ酸、多糖、またはそれらの組合せからなる群から選択されるリンカーを含む、実施形態77または78に記載の免疫原性組成物。

【0440】

E100. 両親媒性リガンドコンジュゲートが、「N」個連続するポリエチレングリコール単位を含むリンカーを含み、Nが25～50の間である、実施形態77または78に記載の免疫原性組成物。

【0441】

E101. 脂質がジアシル脂質である、実施形態77、78、99または100に記載の免疫原性組成物。

【0442】

E102. CARリガンドが、腫瘍関連抗原またはウイルス抗原である、実施形態77または99から101に記載の免疫原性組成物。

【0443】

E103. 両親媒性オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、オリゴヌクレオチドリンカーを含む、実施形態77、78または99から102に記載の免疫原性組成物。

【0444】

E104. オリゴヌクレオチドリンカーが、「N」個連続するグアニンを含み、Nが0～2の間である、実施形態103に記載の免疫原性組成物。

【0445】

E105. タグが、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン (PE)、西洋ワサビペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびマルトース結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態78、99から101および103から104のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

【0446】

本開示は、以下の実施例によってさらに例示され、これらの実施例はさらなる限定として解釈すべきではない。本出願を通じて引用された全ての図面ならびに全ての参考文献、特許および公開された特許出願の内容は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0447】

以下は、本明細書に記載される方法を実施するための具体的な実施形態の実施例である。これらの実施例は、例示目的のためにのみ提供され、本発明の範囲を限定する意図では決してない。使用される数（例えば、量、温度など）に関して正確さを確実にするための努力がなされているが、いくつかの実験誤差および偏差が当然許容されるべきである。

（実施例1）

DSPE-PEG-FITCおよびDSPE-PEG-ペプチド／タンパク質リガンドの生成

【0448】

一部の患者集団におけるCAR-T細胞の不十分な持続、および固形腫瘍においてCAR-T治療が最適な応答を誘導できないことに起因して、より強力なCAR-T細胞拡大および増強された機能性が、CAR自体を介した刺激によって達成され得ると仮説を立てた。これを達成するために、アルブミン結合リン脂質ポリマーを、以前に記載されたように利用した（Liu, H., Moynihan, K. D., Zheng, Y., Szeto, G. L., Li, A. V., Huang, B., Irvine, D. J. (2014). Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines. *Nature*, 507(7493), 519-522.）。具体的には、CARに対する小分子、ペプチドまたはタンパク質リガンドを、図1Aに示されるようにポリマー-脂質テイルに結合させて、両親媒性物質ワクチンを形成する。

【0449】

最初に、再標的化可能なCARを使用した。このキメラ抗原受容体は、FITCコンジュゲートした抗腫瘍抗体を介して腫瘍に対して標的化される小分子フルオレセイン（FITC）を認識する（Ma, J. S., Kim, J. Y., Kazane, S. A., Choi, S. H., Yun, H. Y., Kim, M. S., Cao, Y. (2016). Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(4), E450-458）。同族リガンドは、FITC-ポリ（エチレングリコール（PEG）-DSPE（「DSPE-PEG-FITC」）である。図1Bは、対応する両親媒性物質ワクチンでコーティングされた抗原提示細胞によるCAR-T細胞の刺激を示す概略図を提供する。

【0450】

DSPE-PEG-FITCワクチンを生成するために、PE（ホスホエタノールアミン）脂質（例えば、DSPE）を、500 μ LのCHCl₃および500 μ LのDMF中に溶解させ、3当量のトリエチルアミンおよび1.2当量のフルオレセイン-PEG₂₀₀₀-NHS（Creative PEG Works Inc.）を添加し、反応混合物を一晩攪拌した。両親媒性フルオレセインPEG両親媒性物質を、C4カラム（BioBasic-4、200mm×4.6mm、Thermo Scientific）を使用し、溶出剤として100mMトリエチルアミン-酢酸緩衝液（TEAA、pH7.5）-メタノール（0～30分、10～100%）を使用する逆相HPLCによって精製した。最終産物を、H₂O中に溶解させ、UV-Vis分光法（フルオレセイン、吸光係数は490nm、pH9で70,000M⁻¹cm⁻¹）によって定量し、MALDI-TOF質量分析によって特徴付けた。DSPE-PEG-ペプチド／タンパク質リガンドを生成するために、N末端システインが改変されたペプチドまたはタンパク質リガンドを、DMF中に溶解させ、2当量のマレイミド-PEG₂₀₀₀-DSPE（Laysan Bio, Inc.）と混合し、混合物を、25℃で24時間攪拌した。バイオコンジュゲーションは、HPLC解析によって本質的に完全であると判定された。ペプチド両親媒性物質を、MALDI-TOF質量分析によって特徴付けた。次いで、ペプチドコンジュゲートを、10×ddH₂O中に希釈し、凍結乾燥して粉末にし、H₂O中に再溶解させ、-80℃で

貯蔵した。

(実施例2)

DSPE-PEG-FITCコーティングされた細胞による抗FITC CAR-T細胞の*in vitro*活性化

【0451】

キメラ抗原受容体(CAR)T細胞に対する両親媒性リガンドコンジュゲートの効果を決定するために、CAR-T細胞の*in vitro*刺激を、両親媒性リガンドコンジュゲートを提供する抗原提示細胞(APC)との共培養後に評価した。具体的には、抗FITC CARを発現するモデルCAR-T細胞を、Mycエピトープタグコード領域に、ならびにCD8膜貫通ドメイン、CD28シグナル伝達ドメインおよびCD3ζシグナル伝達ドメインを含むCARコード領域にインフレーションで融合された抗FITC(フルオレセイン)scFV(4m5.3)コード領域を含むDNAベクターの、初代マウスT細胞中へのレトロウイルス形質導入によって生成した。Mycタグ化抗FITC CARのドメイン構造および配向は、図2Aに示される。初代マウスT細胞におけるMycタグ化抗FITC CARの表面発現を、形質導入された細胞を、蛍光標識された抗Myc抗体と共にインキュベートし、フローサイトメトリーによって蛍光細胞を定量することによって定量した(図2B)。

【0452】

次に、モデル標的細胞K562細胞を、PEG-2000リンカーを介してFITCに共有結合的に連結された親油性部分(即ち、DSPE)を含む両親媒性リガンドコンジュゲートの効率的な膜挿入について試験した。低用量(即ち、25nM)のDSPE-PEG-FITCでは、血清濃度の増加が、表面挿入をほぼ完全に消失させた。しかし、高用量(500nM)では、DSPE-PEG-FITCは、高レベルの細胞表面装飾を保持した(データ示さず)。

【0453】

リンパ節中の抗原提示細胞を模倣するために、樹状細胞(DC2.4)を、漸増濃度のDSPE-PEG-FITCで装飾し、次いで、0時間、48時間および96時間にわたって、抗FITC CAR T細胞と共に共培養した。FITC装飾されたDC2.4細胞が抗FITC CAR T細胞を刺激する能力を、CAR-T細胞によるIFNγ分泌によってモニタリングした。ほとんどのFITC分子が24時間以内に内部移行されたように見えたが、CAR-T細胞によるIFNγの強い誘導が、0時間および48時間の時点で観察され、次いで、96時間の時点では減退し(データ示さず)、用量依存的活性化が観察された(図2C)。さらに、FITC装飾されたDC2.4細胞を、FITC-CAR-T細胞と共に10:1のエフェクター対標的(E:T)比で6時間にわたって共培養した場合、DC2.4細胞は、FITC-CAR-T細胞にDSPE-PEG-FITCを投与したときには死滅させられた(図2D)。さらに、以前に報告されたように(Ma et al., 2016)、FITC-CAR T細胞を、対照抗体ではなくFITCコンジュゲートした抗CD19抗体の存在下でCD19+標的細胞と共に共培養することは、IFNγ分泌によって決定される強力なCAR-T活性化をもたらした(データ示さず)。全体として、これらの結果は、両親媒性リガンドコンジュゲートがCAR-T細胞を活性化することが可能であることを示している。

(実施例3)

リンパ節(LN)へのDSPE-PEG-FITC輸送、APCによる保持および取込み

【0454】

実施例2の結果に基づいて、次に、両親媒性リガンドコンジュゲートDSPE-PEG-FITCが、リンパ節(LN)中の抗原提示細胞をコーティングして、FITC-CAR-T細胞を*in vivo*でプライムできるかどうかを決定した。リンパ節へのDSPE-PEG-FITC輸送ならびにAPCによる保持および取込みを評価するために、C57BL/6マウスに、様々な用量のDSPE-PEG-FITCを与えた。具体的には、鼠径LN、補助LNおよび腸骨(iliac)LNを、マウスの尾静脈中への2nmol、5

10

20

30

40

50

nmolまたは10nmol用量のDSPE-PEG-FITCの投与の24時間後に回収した。遊離FITCを対照として使用した。マウスを殺し、LNを、IVISイメージング（励起465nm、発光520nm）のために異なる時点において取り出して、FITCシグナルのLN保持をモニタリングした。最も効率的な排出は、鼠径LN中へであり、次が補助LNへの排出であった（データ示さず）。高用量では、DSPE-PEG-FITCは、腸骨LN中に流れ込むことも観察された。

【0455】

FITCシグナルは、最も低い用量（2nmol）では4日後にほぼ失われたが、シグナルは、高用量（10nmol）のDSPE-PEG-FITCでは、21日間よりも長きにわたって保持された（図3A）。遊離FITCシグナルは、24時間で失われた（図3A）。LN細胞のフローサイトメトリー解析により、CD8+およびCD11b+樹状細胞（DC）、ならびにマクロファージにおけるDSPE-PEG-FITCの実質的な取込みが明らかになったが、T細胞またはB細胞においては最小の蓄積であった（図3Bおよび3C）。LNの共焦点イメージングにより、DSPE-PEG-FITCが、1日後に濾胞間（interfollicular）領域において最初は蓄積したが、経時的にT細胞領域中のCD11c+DC上に分配し、抗FITC抗体で明るく染色されたこれらのLNからFITC+CD11c+細胞を選別したことが示された（データ示さず）。

【0456】

全体として、これらの結果は、両親媒性リガンドコンジュゲートが、リンパ節中の抗原提示細胞上で発現されることを示している。

（実施例4）

LN中に保持されたDSPE-PEG-FITCは、CAR-T細胞増殖をロバストに刺激する

【0457】

リンパ節抗原提示細胞上に蓄積しているDSPE-PEG-FITCが、CAR-T細胞のプライミングをもたらすかどうか、およびこの刺激効果がどのくらい長く持続するかを評価するために、1日目に、マウスに、野生型C57BL/6マウス中に、PBS、c-ジ- GMP （25 μg ）、DSPE-PEG-FITC（10nmol）、またはDSPE-PEG-FITC（10nmol）+c-ジ- GMP （25 μg ）を投与した。図7A中のタイムラインに示されたように、種々の時点の後、 2×10^6 のCTV標識されたCAR-T細胞を、尾静脈注射を介して各マウス中に移入した。CAR-T細胞を、1:1の比のCAR+細胞およびCAR-細胞の混合物になるように用量設定した。さらに48時間後、マウスを殺し、LNをFACS解析のために取り出した。図7B中の代表的な結果で実証されるように、ワクチン接種の7日後まで、FITC-CAR-Tは、養子移入の48時間後にリンパ節において効率的に刺激され、強いT細胞促進性アジュバントであるサイクリック- GMP （CDG、STINGアゴニスト）の共投与は、14日まで、DSPE-PEG-FITC刺激を有意に延長させた（図7B）。CAR-T細胞の最小の増殖が、PBSまたはアジュバント単独を受けている対照マウスにおいて観察された。これらの結果は、両親媒性リガンドコンジュゲートがCAR-T細胞増殖を*in vivo*で誘導する能力を示している。

【0458】

さらに、CDG共投与は、マクロファージおよびCD11c+CD11b+DCを含む複数のAPC細胞表面上でのDSPE-PEG-FITCの持続時間および到達可能性を有意に増加させた（図5）。さらに、CDG共投与は、DSPE-PEG-FITC単独と比較して、いくつかの共刺激分子、即ち、CD80、CD86、41BBL、ICOSLおよびOX40Lの発現レベルを増加させた（図6）。発現を、ワクチン接種の24時間後および3日後に測定した。

（実施例5）

長期CAR-T細胞拡大に対するDSPE-PEG-FITCの効果

【0459】

10

20

30

40

50

CAR-T細胞の長期 *in vivo* 拡大に対するDSPE-PEG-FITCの効果を追跡するために、CD45.1/CD45.2コンジュニック移植モデルを利用した。具体的には、リンパ枯渇されたCD45.2レシピエントマウスに、0日目に種々の用量のCD45.1ドナーFITC CAR-T細胞 (0.25×10^6 ; 0.05×10^6 ; 0.01×10^6) を与えた。24時間後、マウスに、PBS、または25 μ gのCDGありもしくはなしの10 nmol DSPE-PEG-FITCによるワクチン接種を与えた。図7は、実験のタイムラインを提供する。循環CAR-T細胞のパーセンテージを、ワクチン接種の7日後および14日後に収集した末梢血のFACS解析によって決定した。CAR-T細胞を、CD3+CD8+ / Mycタグ+集団と定義した。

【0460】

劇的な縦軸方向のCD45.1 CAR-T拡大が、単独またはCDGと組み合わせたDSPE-PEG-FITCによるワクチン接種後に観察された。具体的には、1回目のワクチン接種の7日後に、 0.25×10^6 群は、末梢CD8+T細胞の>70%を占め、 0.05×10^6 群は>50%を占めたが、これは、 10×10^6 の *ex vivo* で拡大されたCAR-T細胞を移入したマウスよりも有意に大きかった(図7)。2回目のブースト(boost)により、 0.01×10^6 群はまた、14日目までに50%に達した。

【0461】

さらに、DSPE-PEG-FITCの有効性を、リンパ充満マウス(lymphoreplete mice)において評価した。リンパ枯渇レジメンは、養子細胞治療の有効性を増強するが、重篤な毒性に関連する。リンパ枯渇された状況におけるDSPE-PEG-FITCによる強力なCAR-Tブーストを考慮して、DSPE-PEG-FITCがリンパ充満マウスにおいてCAR-T細胞をかなりのレベルまで拡大させることができたかどうかを次に検討した。具体的には、図8に示されるように、複数用量のCD45.1 FITC CAR-T細胞を、リンパ充満CD45.2レシピエントマウス中に移入し、その後同じワクチン接種スキームおよび上記の引き続く解析を行った。結果も図8に示され、これは、 10×10^6 のCAR-Tのみを受けた対照マウスは、約5%の循環CD8+T細胞集団を有したが、 0.25×10^6 のCAR-TプラスDSPE-PEG-FITCを受けたマウスは、14日目までに約10%に達し、約20%が 1×10^6 CART-T群において達成されたことを示している。1つの懸念は、反復ワクチン接種が、DSPE-PEGにコンジュゲートされた場合のFITCに対する抗体を惹起し、したがって、リンパ節におけるCARに対するその刺激を遮断し得ることであった。しかし、FITCをDSPE-PEGまたは担体タンパク質OVAにコンジュゲートした場合には抗体応答は観察されなかったが(図9)、それは、DSPE-PEGがT細胞の助けの供給源を提供しなかったからである。

【0462】

全体として、これらの結果は、アジュバント(即ち、CDG)と組み合わせたDSPE-PEG-FITCワクチンが、*in vivo* で強力なCAR-Tブースターワクチンとして作用したことを示した。

(実施例6)

腫瘍特異的抗原を有する両親媒性物質ワクチンの有効性

【0463】

次に、上記実施例に記載された同じブースターワクチンの概念が、真正の腫瘍抗原特異的CARのために使用できるかどうかを評価した。具体的には、EGFRvIII由来する短い直鎖エピトープを認識するマウスEGFRvIII特異的CAR 139 scFvを利用した(Sampson, et al. (2014). EGFRvIII mCAR-modified T-cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss. Clin Cancer Res, 20(4), 972-984)。マウスT細胞に、このCARを形質導入し、両親媒性物質-EGFRvIIIペプチドワクチン分子を、以下の方法によって合成した:ジメチルホルムアミド(DMSO)中に溶解させたc末端システインが改変されたEGFRvIIIペプチドを、2.5当

10

20

30

40

50

量の1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[マレイミド(ポリエチレングリコール)-2000](DSPE-PEG2k)および1当量のトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩および触媒量のトリエチルアミンと混合した。混合物を、室温で24時間攪拌し、引き続いてHPLCによって精製し、H₂O中に溶解させた。DSPE-PEG-EGFRvIII両親媒性物質ワクチンの概略図は、図10Aに示され、図10Bは、T細胞上での抗EGFRvIII CARの発現を示す。

【0464】

DSPE-PEG-FITCと同様、DSPE-PEG-EGFRvIIIは、*in vitro*で細胞膜中に挿入し、DSPE-PEG-EGFRvIIIコーティングされた細胞は、EGFRvIII-CAR-T細胞を刺激した(データ示さず)。さらに、 2×10^6 のcell trace violet (CTV) 標識されたEGFRvIII-CAR-T細胞の静脈内注射の24時間後の、10 μ gのDSPE-PEG-EGFRvIIIおよびアジュバント(25 μ gのサイクリックジ-GMP)によるマウスの免疫は、48時間後に流入領域鼠径リンパ節において*in vivo*で広範なCAR-T細胞増殖を誘発した(図10C)。ワクチンブーストの治療的影響を試験するために、マウスCT-2Aグリオーマ細胞に、EGFRvIIIを形質導入し、EGFRvIII-CAR-T細胞と共に共培養した。CAR-T細胞は、EGFRvIII発現CT-2Aグリオーマ細胞の存在下でIFN γ を分泌した(図11A)。さらに、野生型EGFRまたはEGFRvIIIを発現するCT-2Aグリオーマ細胞をEGFRvIII-CAR-Tと共に1:10の比で6時間にわたって*in vitro*で共培養することで、EGFRvIII-CAR-T細胞によるEGFRvIII発現CT-2Aグリオーマ細胞の効率的な殺滅が生じたが、野生型EGFR発現CT-2Aグリオーマ細胞の殺滅は生じなかった(図11B)。

【0465】

DSPE-PEG-EGFRvIII両親媒性物質ワクチンの有効性をさらに調査するために、*in vivo*モデルを利用した。具体的には、野生型CD45.2 C57BL/6マウスに、 4×10^6 のEGFRvIII発現CT-2A細胞を移植した。7日目に、CT-2A-mEGFRvIII腫瘍保有マウスに、致死量以下の照射、およびCD45.1マウスから産生された異なる用量のEGFRvIII CAR-T細胞の引き続く注入を与え、その後、10 μ gのDSPE-PEG-EGFRvIIIプラス25 μ gのCDGを与えたまたは与えなかった。 10×10^6 のCAR-T細胞を与えた群では、循環CAR-T細胞は、末梢血CD8+T細胞の約40%を占めた(図12)。より少ない細胞数を受けたマウスは、最小の循環CAR-T細胞を有したが、劇的なEGFRvIII CAR-T拡大が、DSPE-PEG-EGFRvIIIプラスCDGを受けた群において達成された(図12)。

【0466】

EGFRvIII CAR-T機能に対する両親媒性リガンドコンジュゲートの影響を評価するために、細胞内サイトカイン染色(ICS)を、ワクチン接種の7日後に収集した末梢血を使用することによって実施した。末梢血単核球(PBMC)を、1 $\times 10^6$ の存在下で96ウェルプレート中で6時間にわたって1:1の比でEGFRvIII発現CT-2A細胞と混合した。次いで、細胞を表面染色し、固定し、透過処理し、次いで、抗IFN γ および抗TNF α 抗体でさらに染色して、標的細胞に応答した、ワクチンでブーストしたまたはブーストしていないEGFRvIII CAR-T細胞のサイトカイン産生を評価した。DSPE-PEG-EGFRvIIIでブーストしたEGFRvIII CAR-T細胞は、有意に増強された機能性を有し、循環CAR-Tの大部分は、標的腫瘍細胞に応答した(図13)。さらに、DSPE-PEG-EGFRvIII+CDGブースト群における腫瘍中への有意に増加したCAR-T浸潤が、腫瘍1mg当たりのCAR-T細胞の数をFACS解析することによって決定した場合、ワクチン接種の7日後に観察された(図14)。さらに、腫瘍浸潤性CAR-T細胞は、ワクチン接種の

7日後に、腫瘍細胞に対する増強された反応性を示した。具体的には、図15は、腫瘍浸潤性CAR-T細胞によるサイトカイン分泌のレベルが、PBSと比較してDSPE-PEG-EGFRvIII+CDGの存在下で増強されたことを示すが、図16は、腫瘍浸潤性CAR-T細胞において増加した、細胞傷害性の指標であるグランザイムBのレベルを示し、増殖の指標であるKi67もまた増加した。興味深いことに、この増強された反応性は、PD1およびTIM3の表面発現にもかかわらずに生じた（図17）。CAR-TおよびDSPE-PEG-EGFRvIII+CDGの両方を受けた動物は、有意に遅延された腫瘍成長（図18A）および長期にわたる生存（図18B）を有した。特に、DSPE-PEG-FITCをワクチン接種したマウスと同様、4ラウンドの毎週のワクチン接種の後に、EGFRvIIIに対する抗体応答は惹起されず、各ワクチン接種の後にわずかな体重減少のみが観察され、これは、毒性が管理可能なレベルであることを示している（データ示さず）。

（実施例7）

DSPE-PEG-FITCをワクチン接種した二特異性CAR-T細胞の設計および有効性

【0467】

CAR-T細胞に対するサロゲートペプチドリガンドの使用は有効であるが、一部のCARは、3次元構造エピトープを認識し（De Oliveira, et al. (2013). A CD19/Fc fusion protein for detection of anti-CD19 chimeric antigen receptors. J Transl Med, 11, 23. doi:10.1186/1479-5876-11-23）、これについて、単純なサロゲートリガンドを同定することは、困難または不可能であり得る。かかる制限を排除し、その結合ドメインの性質またはその特異性にかかわらず任意のCARをブーストするための手段を提供するために、タンデムscFvベースの二特異性CARを設計した。具体的には、抗FITC-scFV_{4m5}.3を、N末端シグナルペプチドの直後の（G₄S）₄ペプチドリンカーを介して、腫瘍標的化CARのN末端細胞外ドメインに付加した（図19）。このアプローチの実現可能性を評価するために、初代マウスT細胞において良好に発現される、FITCおよび黒色腫関連抗原TRP1の両方を標的とする二特異性マウスCARを利用した。図20は、T細胞上での二特異性CARの発現を示す。この二特異性CARの反応特異性を確認するために、FITC/TRP1-CAR-T細胞を、DSPE-PEG-FITCコーティングされた標的細胞またはTRP1発現B16F10細胞のいずれかと共に、10:1のエフェクター:標的比で6時間にわたって*in vitro*で共培養したところ、FITC/TRP1-CAR-Tは、IFN γ 分泌によって示されるように、両方の抗原に対して、特異的かつ強力に応答した（図21）。さらに、FITC/TRP1-CAR-T細胞は、10:1のエフェクター対標的（E:T）比での6時間にわたる細胞の共培養によって決定した場合、単一特異性TRP1-CAR-T細胞と等価に、TRP1⁺標的細胞を死滅させた（図22）。*in vivo*では、DSPE-PEG-FITCワクチン接種は、ワクチン接種の48時間後のcell trace violet輸送によって決定した場合、FITC/TRP1二特異性CAR-T増殖を口バストに刺激した（図23）。

【0468】

DSPE-PEG-FITCプラスCDGと併せた二特異性CAR-Tの治療的潜在力を評価するために、野生型C57BL/6マウスに、 5×10^5 のB16F10腫瘍細胞を移植した。5日後、腫瘍保有動物に、500cGyの照射によるリンパ枯渇（lymphodepletion）処置を与え、続いて、次の日に、 10×10^6 のFITC/TRP1-CAR-T細胞の静脈内注射を与えた。CAR-T細胞単独は、対照T細胞と比較して、腫瘍成長に対してわずかな影響を有したが、CAR-Tおよびワクチン（10nmolのDSPE-PEG-FITC+25 μ gのCDG）の両方を与えたマウスは、劇的に遅延された腫瘍成長（図24A）および有意に長期にわたる生存（図24B）を示した。これは、増加した循環CAR-Tレベル（図25）および増強された腫瘍浸潤（図26）と一致した。体重減少もまた、ワクチン接種を受けた動物群において制御下にあった（データ示さず）。

）。

【0469】

DSPE-PEG-FITC+CDGブーストによる強力なCAR-T拡大および機能的増強によって動機付けられて、リンパ枯渇プレコンディショニングなしの腫瘍保有マウスにおけるCAR-TプラスDSPE-PEG-FITC+CDGの治療有効性を評価した。in vivo追跡を促進するために、CD45.1 FITC/TRP1 CAR-T細胞を、類似のワクチン接種スキームに従って、B16F10黒色腫を有するCD45.2レシピエントマウス中に移入した。CAR-T単独を受けたマウスは、対照T細胞を受けたマウスとほとんど識別不能な腫瘍成長を有したが、CAR-TおよびDSPE-PEG-FITC+CDGワクチン接種の両方による併用処置は、腫瘍成長を有意に遅延させ、動物生存を増加させ（図27Aおよび27B）、動物の体重に対しては最小の影響を有した（データ示さず）。

10

【0470】

DSPE-PEG-FITCは、リンパ節に優先的に輸送され、そこに蓄積し、リンパ節中に存在するAPC中に取り込まれるが、小さいパーセンテージの両親媒性物質が、末梢血中に漏出し得、バイスタンダー細胞中に挿入して、それらをde novoのCAR-T標的にし得る。リンパ排出を回避した両親媒性物質によって引き起こされるかかる意図しない毒性を解析するために、DSPE-PEG-FITCを、重度に欠損したリンパ管を有するNSGマウス中に静脈内注射して、FITC CAR-T細胞を刺激した。それにもかかわらず、FITC CAR-T増殖の刺激は無視できるものであった（データ示さず）。

20

【0471】

全体として、これらの結果は、両親媒性物質ワクチンの使用と併せたCAR-T細胞治療が、固形腫瘍において有効であることを示した。

等価物

【0472】

当業者は、慣用に過ぎない実験を使用して、本明細書に記載される本明細書に記載される具体的実施形態の多くの等価物を認識する、または確認することができる。かかる等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

30

40

50

【図面】
【図 1 A】

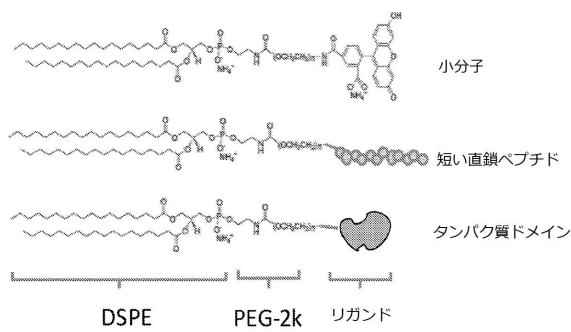


FIG. 1A

【図 1 B】

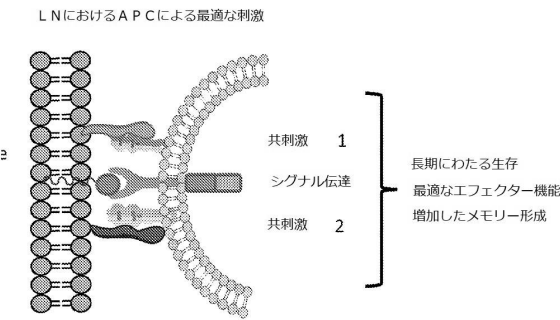


FIG. 1B

【図 2 A】

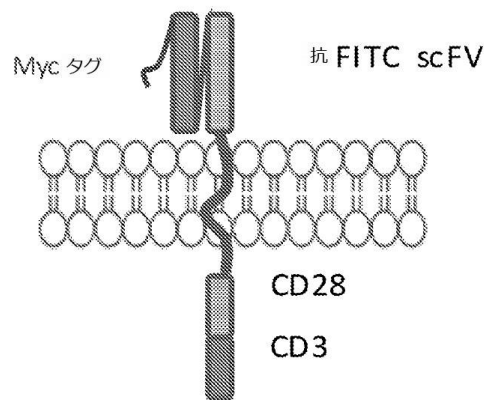


FIG. 2A

【図 2 B】

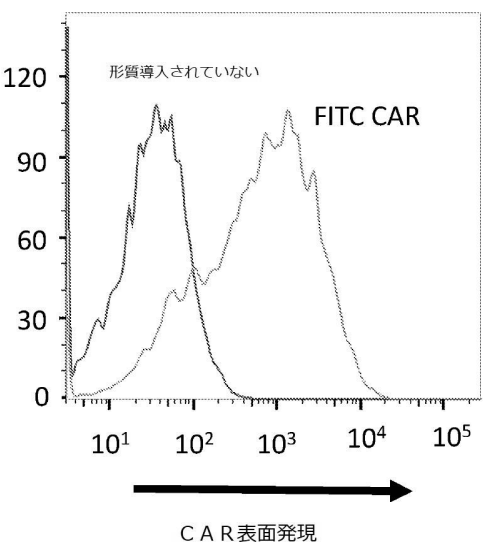


FIG. 2B

10

20

30

40

50

【図 2 C】

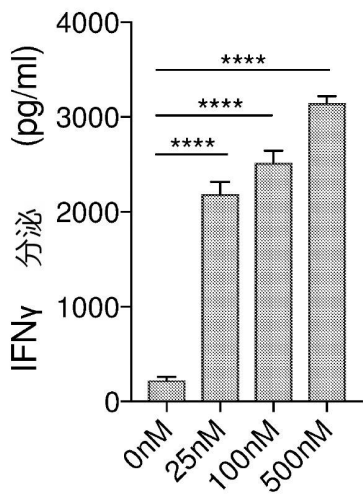


FIG. 2C

【図 2 D】

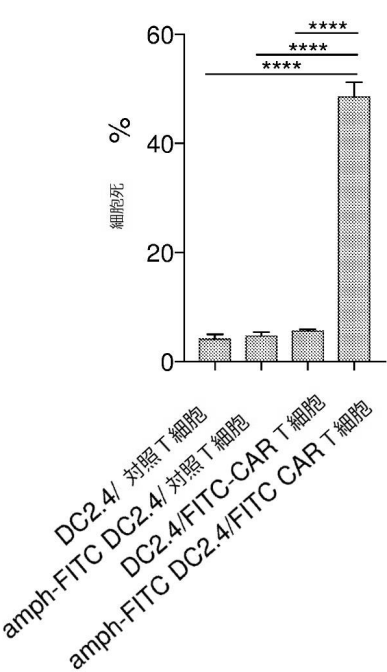


FIG. 2D

【図 3 A】

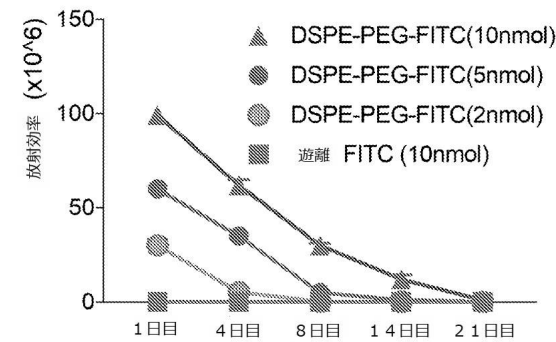


FIG. 3A

【図 3 B】

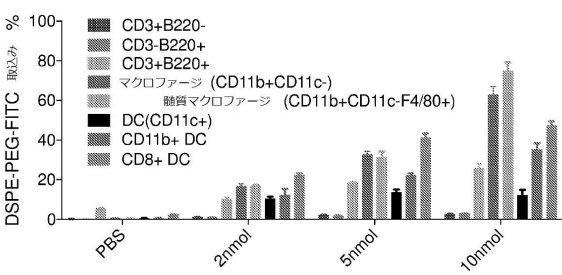


FIG. 3B

10

20

30

40

50

【図 3 C】

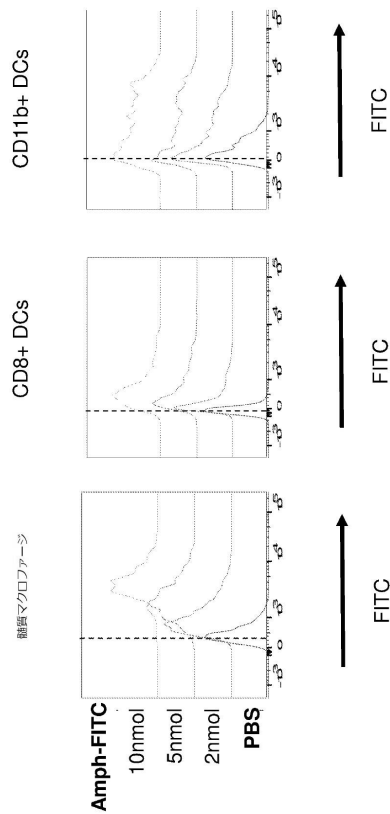


FIG. 3C

【図 4】

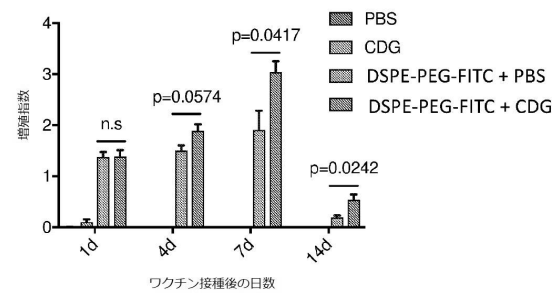


FIG. 4

【図 5】

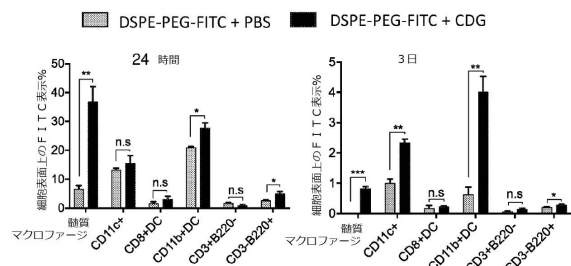


FIG. 5

【図 6】

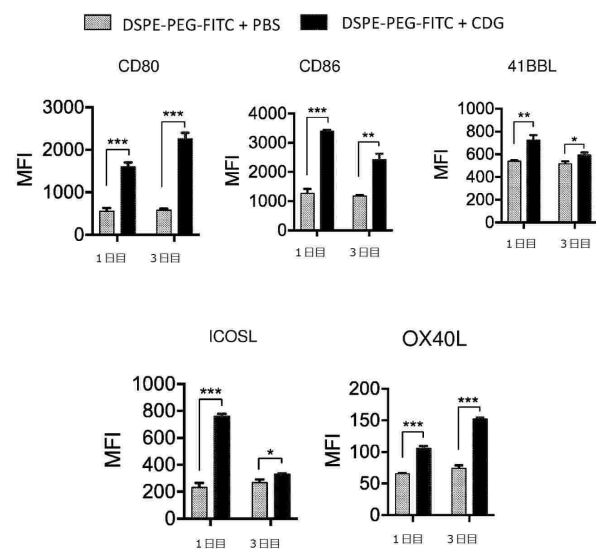


FIG. 6

【図 7】

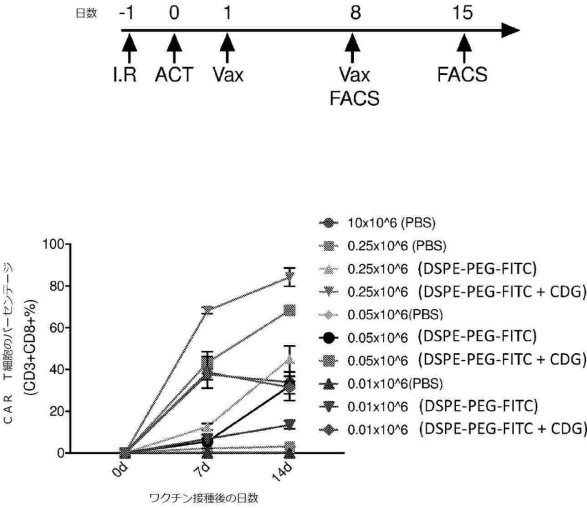


FIG. 7

【図 8】

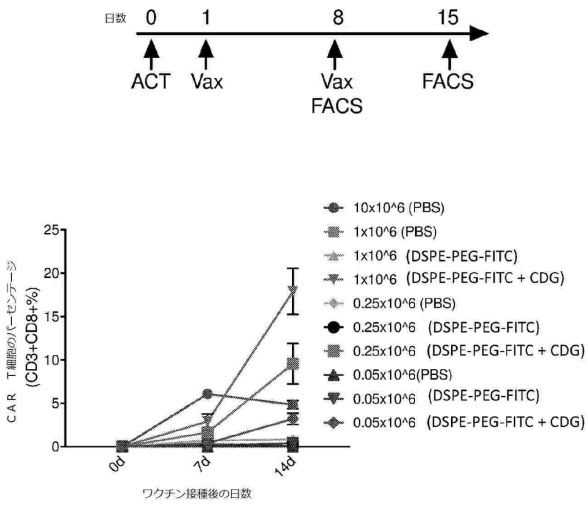


FIG. 8

【図 9】

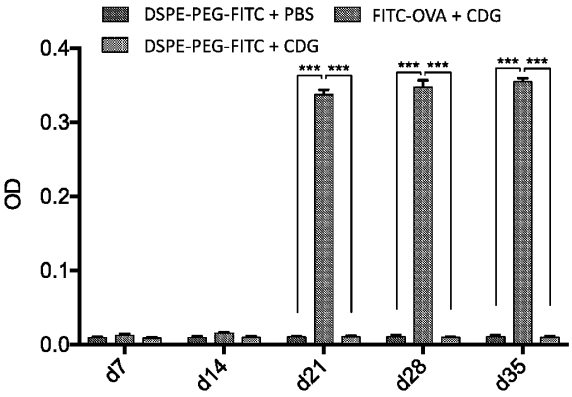


FIG. 9

【図 10 A】

LEKKKGNYVVDHC-PEG2k-DSPE

FIG. 10A

10

20

30

40

50

【図 1 0 B】

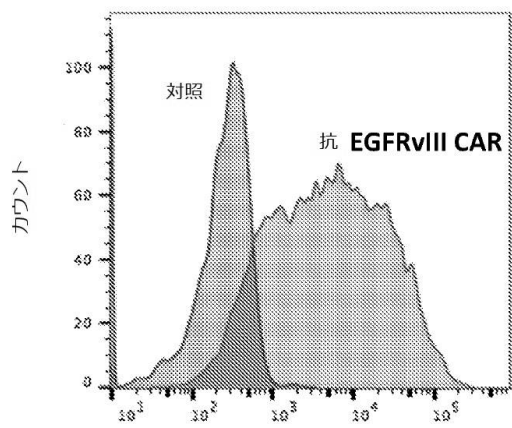


FIG. 10B

【図 1 0 C】

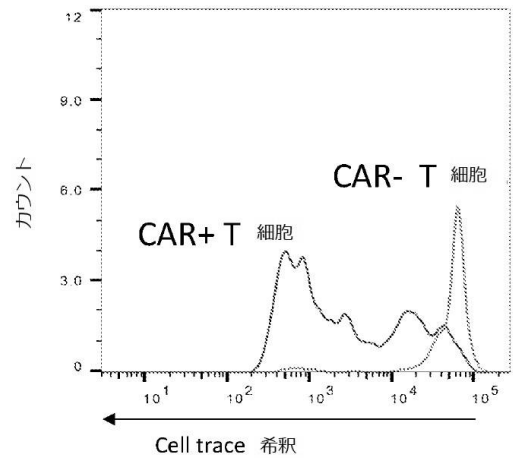


FIG. 10C

【図 1 1 A】

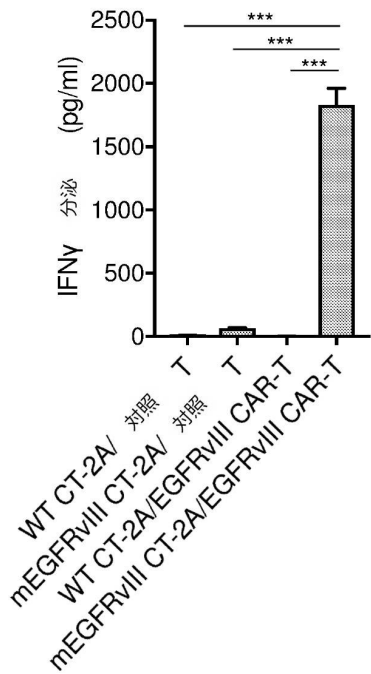


FIG. 11A

【図 1 1 B】

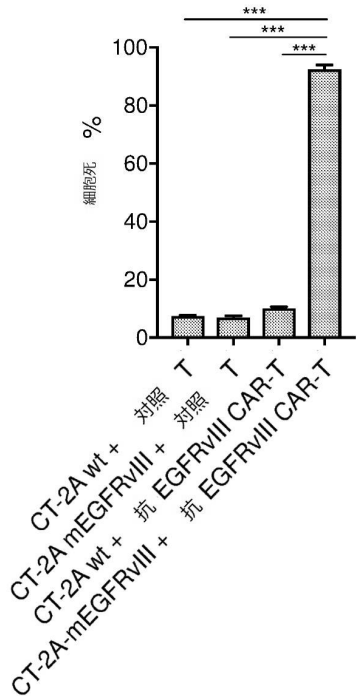


FIG. 11B

10

20

30

40

50

【図 1 2】

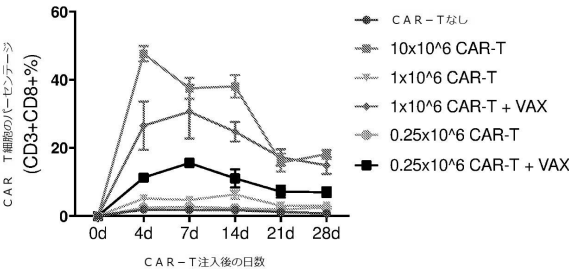


FIG. 12

【図 1 3】

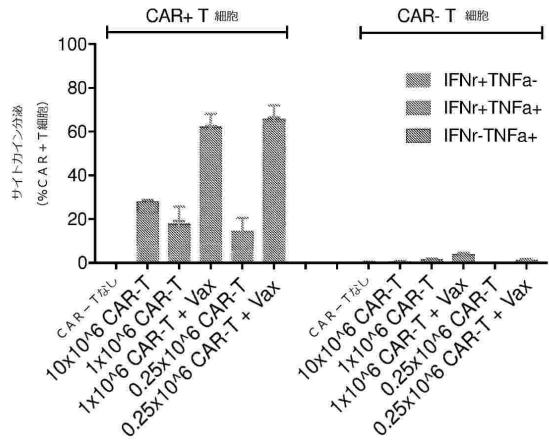


FIG. 13

【図 1 4】

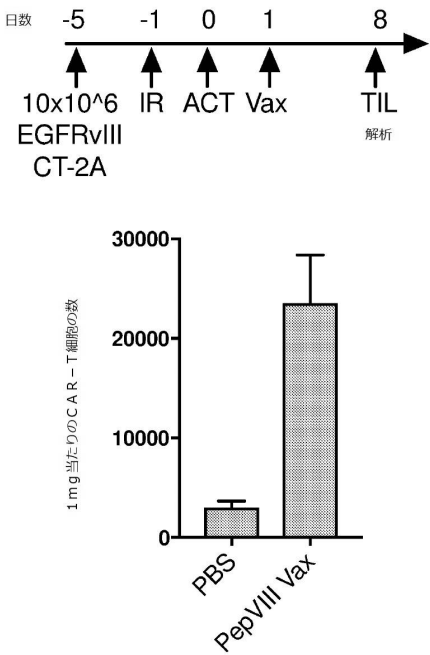


FIG. 14

【図 1 5】

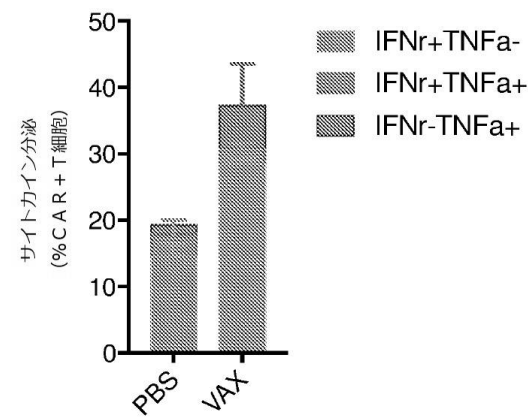


FIG. 15

10

20

30

40

50

【図 16】

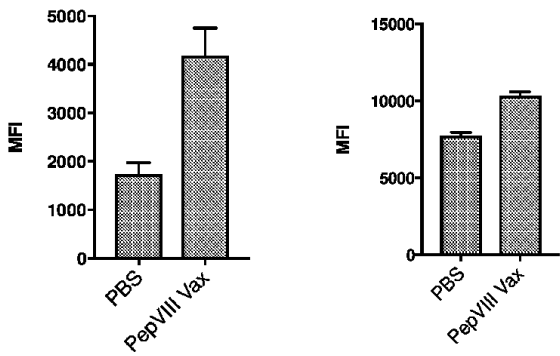


FIG. 16

【図 17】

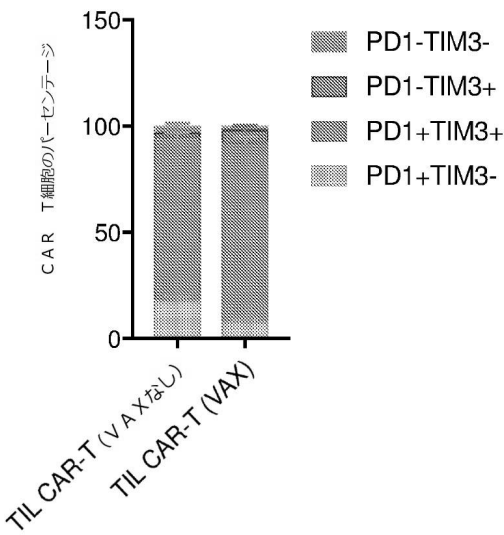


FIG. 17

【図 18 A】

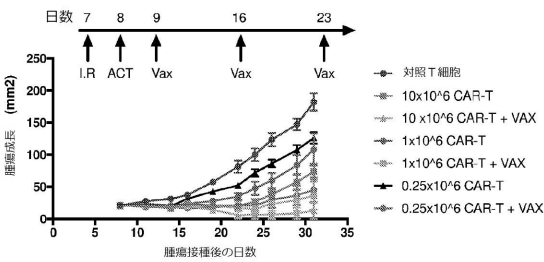


FIG. 18A

【図 18 B】

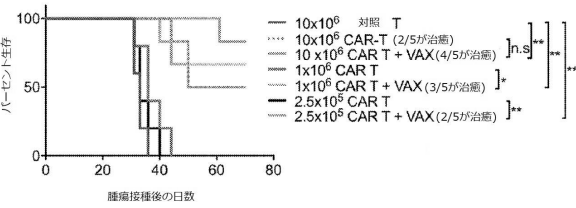


FIG. 18B

10

20

30

40

50

【図 19】

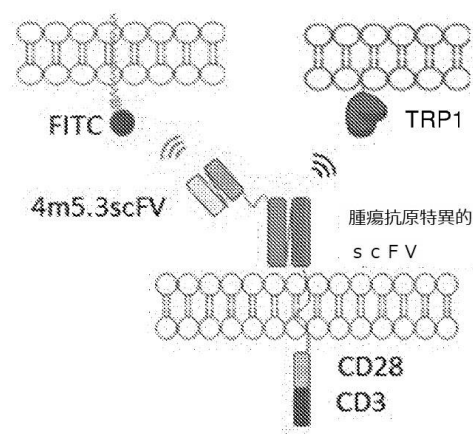


FIG. 19

【図 20】

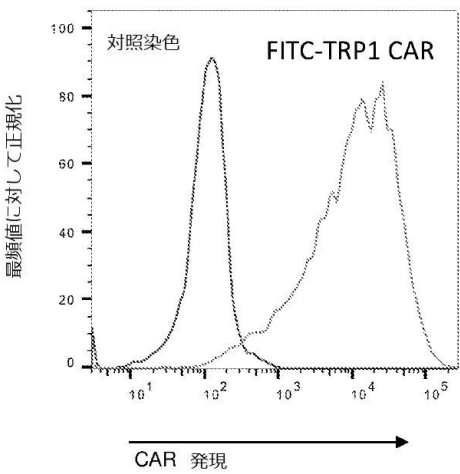


FIG. 20

【図 21】

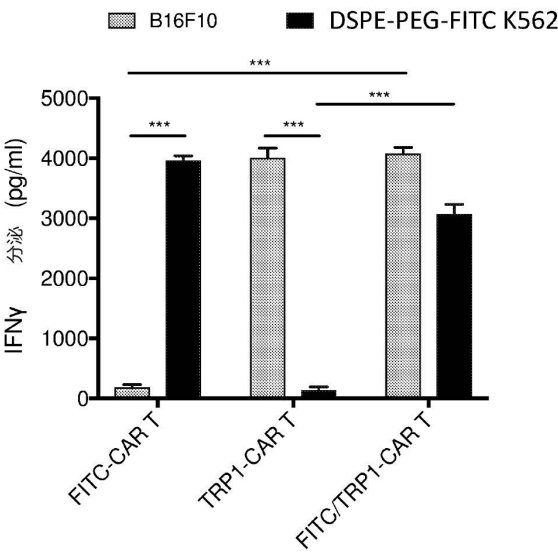


FIG. 21

【図 22】

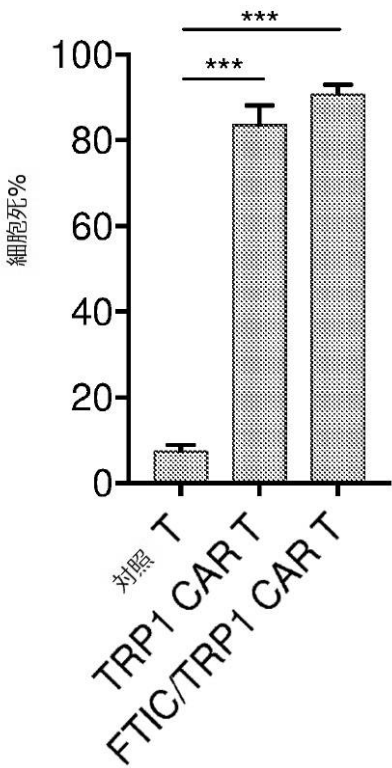


FIG. 22

10

20

30

40

50

【図 2 3】

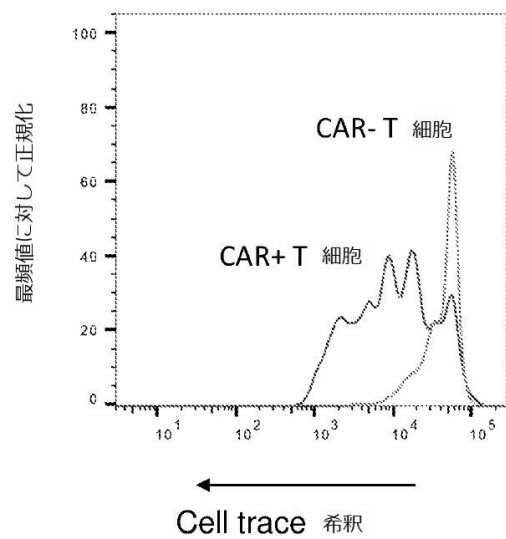


FIG. 23

【図 2 4 A】

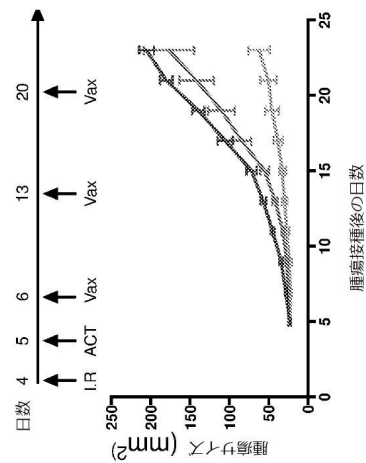


FIG. 24A

【図 2 4 B】

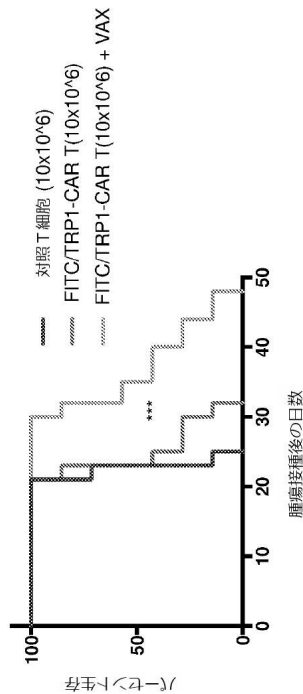


FIG. 24B

【図 2 5】

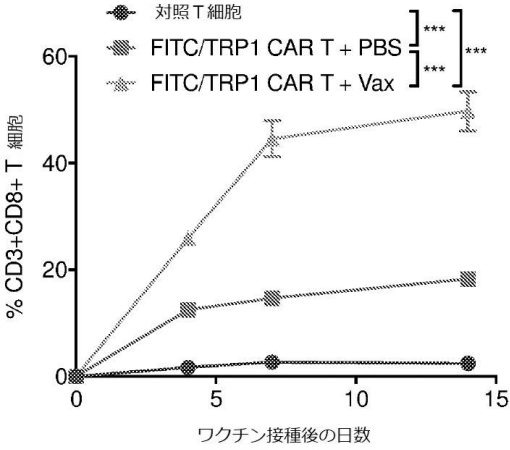


FIG. 25

10

20

30

40

50

【図 2 6】

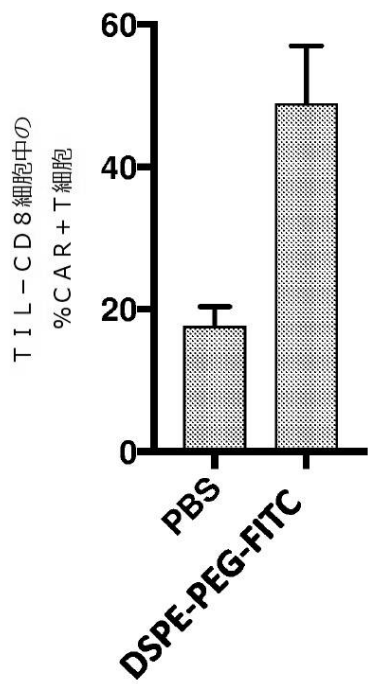


FIG. 26

【図 2 7 A】

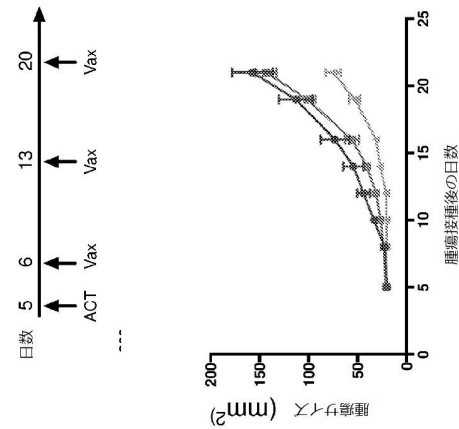


FIG. 27A

【図 2 7 B】

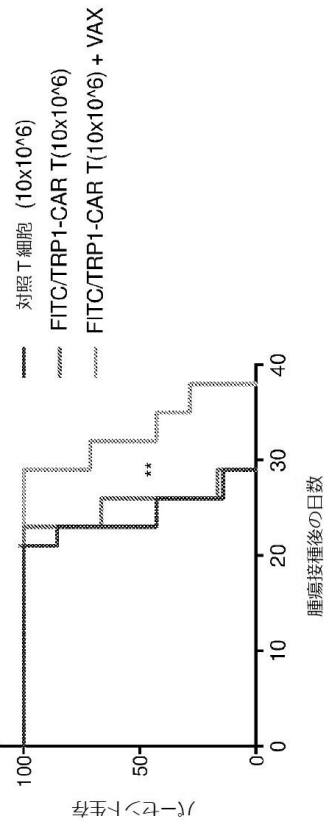


FIG. 27B

10

20

30

40

50

【配列表】
0007654240000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
			A 6 1 P	43/00	1 2 1

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6 , ブルックライン, アダムズ ストリート 3 5

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表 2 0 1 5 - 5 1 4 1 0 8 (J P , A)

特表 2 0 1 4 - 5 0 4 2 9 4 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K

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)