

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-511758
(P2025-511758A)

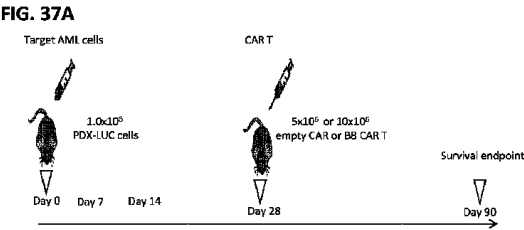
(43)公表日 令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全160頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-559214(P2024-559214)	(71)出願人	523379959		
(86)(22)出願日	令和5年4月5日(2023.4.5)		アルテイア サイエンス エッセ. エッレ		
(85)翻訳文提出日	令和6年12月3日(2024.12.3)		. エッレ.		
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/059054		イタリア国 2 0 1 2 2 ミラノ, ヴィア		
(87)国際公開番号	WO2023/194501		コンセルヴァトリーオ 3 0		
(87)国際公開日	令和5年10月12日(2023.10.12)	(74)代理人	100107489		
(31)優先権主張番号	63/327,757		弁理士 大塩 竹志		
(32)優先日	令和4年4月5日(2022.4.5)	(72)発明者	ピガッツィ, マルティーナ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		イタリア国 2 0 1 2 2 ミラノ, ヴィア		
(31)優先権主張番号	63/478,068		コンセルヴァトリーオ 3 0, アルティ		
(32)優先日	令和4年12月30日(2022.12.30)		ア サイエンス エッセ. エッレ. エッレ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ビッフィ, アレッサンドラ		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		イタリア国 2 0 1 2 2 ミラノ, ヴィア		
			コンセルヴァトリーオ 3 0, アルティ		
			最終頁に続く		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 新規腫瘍特異的抗原を標的とする骨髄性障害および急性白血病の処置

(57)【要約】

本開示は、CD 6 3、CD 1 5 1、CD 7 2、CD 8 4、CD 6 9およびCD 1 0 9から選択される腫瘍特異的抗原を使用することによって、骨髄性障害および急性白血病を診断または処置する方法に関する。抗原結合タンパク質（A B P）、A B P－薬物コンジュゲート、および腫瘍特異的抗原を標的化するC A R、ならびにそれらの使用のための方法がさらに提供される。本開示は、対象における骨髄性障害（M D）および急性白血病（A L）を診断する方法であって、対象の生体試料中の腫瘍特異的抗原の存在またはレベルを検出するステップを含み、腫瘍特異的抗原が、CD 6 3、CD 1 5 1、CD 7 2、CD 8 4、CD 6 9およびCD 1 0 9からなる群から選択される、方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CD 63、CD 151、CD 72、CD 84、CD 69 および CD 109 から選択される標的タンパク質に特異的に結合する抗原結合タンパク質 (ABP)。

【請求項 2】

ヒト CD 84 に特異的に結合する、請求項 1 に記載の ABP。

【請求項 3】

配列番号 97、配列番号 98 または配列番号 90 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の ABP。

10

【請求項 4】

a. 配列番号 131 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 132 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 133 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 251 の配列を有する V_HCDR1、配列番号 252 の配列を有する V_HCDR2、および配列番号 253 の配列を有する V_HCDR3；

b. 配列番号 134 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 135 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 136 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 254 の配列を有する V_HCDR1、配列番号 255 の配列を有する V_HCDR2、および配列番号 256 の配列を有する V_HCDR3。

20

c. 配列番号 110 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 111 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 112 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 230 の配列を有する V_HCDR1、配列番号 231 の配列を有する V_HCDR2、および配列番号 232 の配列を有する V_HCDR3；

d. 配列番号 161 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 162 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 163 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 281 の配列を有する V_HCDR1、配列番号 282 の配列を有する V_HCDR2、および配列番号 283 の配列を有する V_HCDR3；

e. 配列番号 164 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 165 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 166 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 284 の配列を有する V_HCDR1、配列番号 285 の配列を有する V_HCDR2、および配列番号 286 の配列を有する V_HCDR3；

30

f. 配列番号 140 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 141 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 142 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 260 の配列を有する V_HCDR1、配列番号 261 の配列を有する V_HCDR2、および配列番号 262 の配列を有する V_HCDR3；

g. 配列番号 191 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 192 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 193 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 311 の配列を有する V_HCDR1、配列番号 312 の配列を有する V_HCDR2、および配列番号 313 の配列を有する V_HCDR3；

40

h. 配列番号 194 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 195 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 196 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 314 の配列を有する V_HCDR1、配列番号 315 の配列を有する V_HCDR2、および配列番号 316 の配列を有する V_HCDR3；

i. 配列番号 170 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 171 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 172 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 290 の配列を有する V_HCDR1、配列番号 291 の配列を有する V_HCDR2、および配列番号 292 の配列を有する V_HCDR3；

j. 配列番号 221 の配列を有する V_LCDR1、配列番号 222 の配列を有する V_LCDR2、配列番号 223 の配列を有する V_LCDR3、配列番号 341 の配列を有する

50

V_HCDR1、配列番号342の配列を有するV_HCDR2、および配列番号343の配列を有するV_HCDR3；あるいは

配列番号224の配列を有するV_LCDR1、配列番号225の配列を有するV_LCDR2、配列番号226の配列を有するV_LCDR3、配列番号344の配列を有するV_HCDR1、配列番号345の配列を有するV_HCDR2、および配列番号346の配列を有するV_HCDR3；あるいは

k. 配列番号200の配列を有するV_LCDR1、配列番号201の配列を有するV_LCDR2、配列番号202の配列を有するV_LCDR3、配列番号320の配列を有するV_HCDR1、配列番号321の配列を有するV_HCDR2、および配列番号322の配列を有するV_HCDR3

を含む、請求項3に記載のABP。

【請求項5】

a. 配列番号80のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号88のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；あるいは

b. 配列番号81のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号88のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；あるいは

c. 配列番号74のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号83のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン

を含む、請求項1から4のいずれか一項に記載のABP。

【請求項6】

ヒトCD69に特異的に結合する、請求項1に記載のABP。

【請求項7】

配列番号89～96から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項6に記載のABP。

【請求項8】

a. 配列番号107の配列を有するV_LCDR1、配列番号108の配列を有するV_LCDR2、配列番号109の配列を有するV_LCDR3、配列番号227の配列を有するV_HCDR1、配列番号228の配列を有するV_HCDR2および配列番号229の配列を有するV_HCDR3；

b. 配列番号110の配列を有するV_LCDR1、配列番号111の配列を有するV_LCDR2、配列番号112の配列を有するV_LCDR3、配列番号230の配列を有するV_HCDR1、配列番号231の配列を有するV_HCDR2、および配列番号232の配列を有するV_HCDR3；

c. 配列番号113の配列を有するV_LCDR1、配列番号114の配列を有するV_LCDR2、配列番号115の配列を有するV_LCDR3、配列番号233の配列を有するV_HCDR1、配列番号234の配列を有するV_HCDR2、および配列番号235の配列を有するV_HCDR3；

d. 配列番号116の配列を有するV_LCDR1、配列番号117の配列を有するV_L

10

20

30

40

50

p. 配列番号 158 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 159 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 160 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 278 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 279 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 280 の配

50

c c . 配列番号 209 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 210 の配列を有する V_H

50

e e . 配列番号 2 1 5 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 2 1 6 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 2 1 7 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 3 3 5 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 3 3 6 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 3 3 7 の配列を有する V_H C D R 3

【請求項 9】

ｂ．配列番号７９のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９５％、少なくとも９７％もしくは１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号８７のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９５％、少なくとも９７％もしくは１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

c. 配列番号 74 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号 83 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

d. 配列番号 74 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号 82 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

e. 配列番号 75 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号 84 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

f. 配列番号 77 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号 86 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

g. 配列番号 77 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号 84 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

h. 配列番号 78 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % もしくは 100

50

%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号84のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；あるいは

i. 配列番号74のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号83のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、請求項6から8のいずれか一項に記載のABP。

10

【請求項10】

ヒトCD69およびCD84に特異的に結合する、請求項1に記載のABP。

【請求項11】

配列番号36のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項10に記載のABP。

【請求項12】

配列番号45の配列を有するV_LCDR1、配列番号52の配列を有するV_LCDR2、配列番号55の配列を有するV_LCDR3、配列番号63の配列を有するV_HCDR1、配列番号66の配列を有するV_HCDR2および配列番号71の配列を有するV_HCDR3を含む、請求項10から11のいずれか一項に記載のABP。

20

【請求項13】

配列番号74のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号83のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、請求項10に記載のABP。

【請求項14】

配列番号89～98から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のABP。

30

【請求項15】

Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、直鎖状抗体またはVドメイン抗体を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載のABP。

【請求項16】

Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、直鎖状抗体またはVドメイン抗体である、請求項15に記載のABP。

【請求項17】

モノクローナル抗体である、請求項1から16のいずれか一項に記載のABP。

40

【請求項18】

IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE抗体から選択される、請求項1から17のいずれか一項に記載のABP。

【請求項19】

クラスIgGならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から選択されるサブクラスの重鎖定常領域を含む、請求項1から18のいずれか一項に記載のABP。

【請求項20】

薬物にコンジュゲートされている、請求項1から19のいずれか一項に記載のABP。

【請求項21】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を誘導することが可能であり、

50

C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 および C D 1 0 9 からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合し、

ヒト F c を含む、

請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の A B P。

【請求項 2 2】

ヒト、ヒト化またはキメラである、請求項 2 1 に記載の A B P。

【請求項 2 3】

モノクローナルである、請求項 2 1 または 2 2 に記載の A B P。

【請求項 2 4】

二重特異性または多重特異性である、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の A B P

10

。

【請求項 2 5】

I g G の重鎖定常領域を含む、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の A B P。

【請求項 2 6】

脱フコシル化されている、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の A B P。

【請求項 2 7】

表面プラズモン共鳴 (S P R) アッセイによって測定した場合に、5 0 n M、1 0 n M、5 n M、1 n M、0 . 5 n M または 0 . 1 n M 未満またはそれと等しい K_D で前記標的タンパク質に結合する、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の A B P。

【請求項 2 8】

請求項 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の A B P、前記 A B P に連結された細胞傷害剤、および必要に応じて、前記細胞傷害剤を前記 A B P に連結するリンカーを含む A B P - 薬物コンジュゲート。

20

【請求項 2 9】

前記細胞傷害剤が、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、有糸分裂阻害剤、抗キナーゼ剤、アルキル化剤、ホルモン、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト、ケモカイン、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、代謝拮抗薬、抗生物質、アルカロイドまたは放射性同位体を含む、請求項 2 8 に記載の A B P - 薬物コンジュゲート。

【請求項 3 0】

前記リンカーが、切断可能なリンカーまたは非切断性リンカーである、請求項 2 8 または 2 9 に記載の A B P - 薬物コンジュゲート。

30

【請求項 3 1】

請求項 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の A B P および T 細胞活性化ドメインを含む二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E)。

【請求項 3 2】

請求項 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の A B P、請求項 2 8 から 3 0 のいずれか一項に記載の A B P - 薬物コンジュゲートまたは請求項 3 0 に記載の B i T E、および賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 3 3】

請求項 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の A B P または請求項 3 1 に記載の B i T E をコードする、単離されたポリヌクレオチドまたは単離されたポリヌクレオチドのセット。

40

【請求項 3 4】

請求項 3 3 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクターまたはベクターのセット。

【請求項 3 5】

請求項 3 3 に記載の単離されたポリヌクレオチドまたは請求項 3 4 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 3 6】

単離された抗原結合タンパク質 (A B P) を産生する方法であって、前記 A B P を請求項 3 5 に記載の宿主細胞において発現させるステップ、および前記 A B P を単離するステ

50

ップを含む、方法。

【請求項 37】

- a. 細胞外抗原結合ドメイン、
- b. 膜貫通ドメイン、
- c. シグナル伝達ドメイン、および
- d. 必要に応じて少なくとも 1 つの共刺激ドメイン

を含むキメラ抗原受容体 (CAR) であって、前記細胞外抗原結合ドメインが、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69 および CD109 からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する、CAR。

【請求項 38】

前記細胞外抗原結合ドメインが、前記標的タンパク質に特異的に結合する抗体の単鎖可変断片 (scFv) を含む、請求項 37 に記載の CAR。

【請求項 39】

前記細胞外抗原結合ドメインが、請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の ABP を含む、請求項 37 に記載の CAR。

【請求項 40】

前記シグナル伝達ドメインが、CD3ζ の細胞内ドメインを含む、請求項 37 から 39 のいずれか一項に記載の CAR。

【請求項 41】

共刺激ドメインをさらに含み、前記共刺激ドメインが、CD28 共刺激ドメイン、4-1BB 共刺激ドメイン、CD27 共刺激ドメイン、OX40 共刺激ドメインまたは ICOS 共刺激ドメインである、請求項 37 から 39 のいずれか一項に記載の CAR。

【請求項 42】

前記共刺激ドメインが 4-1BB 共刺激ドメインである、請求項 41 に記載の CAR。

【請求項 43】

前記 4-1BB 共刺激ドメインが、配列番号 105 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列である、請求項 41 から 42 のいずれか一項に記載の CAR。

【請求項 44】

前記膜貫通ドメインが CD28 膜貫通ドメインである、請求項 37 から 39 のいずれか一項に記載の CAR。

【請求項 45】

前記 CD28 膜貫通ドメインが、配列番号 100 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列である、請求項 44 に記載の CAR。

【請求項 46】

ヒンジ領域をさらに含む、請求項 37 から 45 のいずれか一項に記載の CAR。

【請求項 47】

前記ヒンジ領域が、CD28 ポリペプチドに由来するヒンジ領域である、請求項 46 に記載の CAR。

【請求項 48】

前記ヒンジ領域が、配列番号 99 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 47 に記載の CAR。

【請求項 49】

前記シグナル伝達ドメインが CD3ゼータシグナル伝達ドメインである、請求項 37 から 48 のいずれか一項に記載の CAR。

【請求項 50】

前記 CD3ゼータシグナル伝達ドメインが、配列番号 101 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 100% の配列同一性を有するアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含む、請求項 49 に記載の C A R。

【請求項 51】

配列番号 35～44 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 37 から 50 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 52】

前記細胞外抗原結合ドメインが、ヒト C D 8 4 に特異的に結合する、請求項 37 から 51 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 53】

前記細胞外抗原結合ドメインが、ヒト C D 6 9 に特異的に結合する、請求項 37 から 51 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 54】

配列番号 35～42 から選択されるアミノ酸に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 37 から 53 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 55】

配列番号 43、44 または 36 のアミノ酸に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 37 から 53 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 56】

請求項 37 から 55 のいずれか一項に記載の C A R をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 57】

配列番号 24～34 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % または 100 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 56 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 58】

請求項 56 から 57 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 59】

請求項 37 から 55 のいずれか一項に記載の C A R を発現する免疫応答性細胞。

【請求項 60】

請求項 56 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 58 に記載のベクターを含む免疫応答性細胞。

【請求項 61】

$\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞またはナチュラルキラー (NK) 細胞である、請求項 59 から 60 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 62】

前記 $\alpha\beta$ T 細胞が、C D 4⁺ T 細胞または C D 8⁺ T 細胞である、請求項 61 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 63】

請求項 56 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 58 に記載のベクターを免疫細胞中にトランスフェクトまたは形質導入するステップを含む、請求項 59 から 62 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞を調製する方法。

【請求項 64】

前記免疫細胞を少なくとも 48 時間にわたって拡大増殖させるステップを含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

10

20

30

40

50

前記免疫細胞が、1～100の範囲の感染多重度で形質導入される、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

形質導入するステップの後に、請求項58に記載のベクターを洗浄するステップ、および前記形質導入された免疫細胞を少なくとも2日間にわたって拡大増殖させるステップをさらに含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

対象を処置する方法であって、請求項1から27のいずれか一項に記載のABP、請求項28から30のいずれか一項に記載のABP-薬物コンジュゲート、請求項32に記載の医薬組成物または請求項59から62のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップを含む、方法。

10

【請求項68】

前記対象が、骨髄性障害(MD)または急性白血病(AL)を有する、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

前記骨髄性障害(MD)および急性白血病(AL)が、小児または成人発症型のものである、請求項67に記載の方法。

【請求項70】

前記ABP、前記医薬組成物または前記免疫応答性細胞が、追加の薬剤と組み合わせて投与される、請求項67から69に記載の方法。

20

【請求項71】

前記追加の薬剤が、化学療法剤または生物剤である、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記化学療法剤が、シタラビン、ダウノルビシン、イダルビシン、クラドリビン、ミトキサントロン、アザシチジン、デシタビンおよびCPX-351(Vyxeeos(登録商標))からなる群から選択される、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

前記追加の薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤である、請求項70に記載の方法。

【請求項74】

前記ヘッジホッグ経路阻害剤がソニックヘッジホッグ経路阻害剤である、請求項73に記載の方法。

30

【請求項75】

前記ソニックヘッジホッグ経路阻害剤が、ビスモデギブ、ソニデギブおよび三酸化ヒ素(ATO)から選択される、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

前記ヘッジホッグ経路阻害剤がグラスデギブ(Daurismo(商標))である、請求項73に記載の方法。

【請求項77】

前記追加の薬剤が、FMS様チロシンキナーゼ3(FLT3)阻害剤である、請求項71に記載の方法。

40

【請求項78】

前記FLT3阻害剤が、ミドスタウリン(Rydapt(登録商標))、ギルテリチニブ(Xospata(登録商標))、ソラフェニブ、レスタウルチニブ、キザルチニブおよびクレノラニブからなる群から選択される、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

前記追加の薬剤が、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1(IDH1)またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ2(IDH2)阻害剤である、請求項73に記載の方法。

【請求項80】

前記IDH1またはIDH2阻害剤が、イボシデニブ(Tibsavo(登録商標))またはエナシデニブ(Idhifa(登録商標))である、請求項79に記載の方法。

50

【請求項 8 1】

前記追加の薬剤が B 細胞リンパ腫 2 (BCL2) 阻害剤である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記 BCL2 阻害剤がベネトクラクス (Venclexta (登録商標)) である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記追加の薬剤が CD33 標的化剤である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記 CD33 標的化剤が、ゲムツズマブオゾガマイシン (Mylotarg (商標)) またはバダスツキシマブタリリン (SGN-CD33A) である、請求項 8 3 に記載の方法。

10

【請求項 8 5】

前記追加の薬剤が細胞周期チェックポイント阻害剤である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記細胞周期チェックポイント阻害剤が、Aurora キナーゼ阻害剤、Polo 様キナーゼ 1 (PLK1) 阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害剤またはチェックポイントキナーゼ 1 (CHK1) 阻害剤である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記追加の薬剤が免疫チェックポイント阻害剤である、請求項 7 3 に記載の方法。

20

【請求項 8 8】

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記 ABP、前記医薬組成物または前記免疫応答性細胞を投与するステップの前に、前記対象を化学療法剤または造血幹細胞で処置するステップをさらに含む、請求項 6 7 から 6 9 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記投与するステップが、免疫グロブリン療法、または造血を助けるための自己/同種異系造血幹細胞療法 (HSC) が後に続きも、それと組み合わせて実施されもしない、請求項 6 7 から 6 9 に記載の方法。

30

【請求項 9 1】

前記免疫グロブリン療法が、静脈内免疫グロブリン (IVIg) 処置である、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記対象が、不応性疾患を有する、請求項 6 7 から 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記対象が、再燃を有する、請求項 6 7 から 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記対象が、成人 AML 患者である、請求項 6 7 から 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 9 5】

前記対象が、小児 AML 患者である、請求項 6 7 から 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記対象に前記 ABP、前記医薬組成物または前記免疫応答性細胞の前記治療有効量を投与するステップの前に、前記対象が、化学療法剤を投与されたことがある、または造血幹細胞療法を受けたことがある、請求項 6 7 から 9 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記対象が、化学療法に対しても造血幹細胞療法に対しても応答性でない、請求項 6 7

50

から 95 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

前記対象が、骨髄芽球性（M0）型の AML を有する、請求項 67 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 99】

前記対象が、骨髄芽球性（M1）型の AML を有する、請求項 67 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 100】

前記対象が、骨髄芽球性（M2）型の AML を有する、請求項 67 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 101】

前記対象が、前骨髄球性（M3）型の AML を有する、請求項 67 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 102】

前記対象が、骨髄単球性（M4）型の AML を有する、請求項 67 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 103】

前記対象が、単球性（M5）型の AML を有する、請求項 67 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 104】

前記対象が、赤白血病（M6）型の AML を有する、請求項 67 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 105】

前記対象が、巨核球性（M7）型の AML を有する、請求項 67 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

前記免疫応答性細胞が、細胞 10 万個／kg ～細胞 2 千 5 百万個／kg の範囲の用量で前記対象に投与される、請求項 67 から 105 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2022 年 4 月 5 日出願の米国仮特許出願第 63／327,757 号および 2022 年 12 月 30 日出願の米国仮特許出願第 63／478,068 号の利益を主張し、それらの開示は、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

1. 配列表

本出願は、XML フォーマットで電子的に提出された、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる配列表を含有する。2023 年 4 月 5 日に作成された当該 XML コピーは、34619-55205__WO（005WO）と命名され、サイズは 1,66,998 バイトである。

【背景技術】

【0003】

2. 背景

急性骨髄球性白血病（AML）は、骨髄に起源し、全ての小児悪性疾患のおよそ 3 分の 1 を占める血液がんである。AML は、5 年間の追跡で 55 ～ 70 % の範囲の全生存期間で、小児における最多数のがん関連死を引き起こす。化学療法は、40 年よりも長きにわたって標準的な AML 処置であったが、がんを寛解状態にする場合が多く、がん細胞を完全に排除することはまれである。これは、疾患再発をもたらし、最終的には患者の死をもたらす場合が多いが、それは、第 2 治療が限定されているからである。高用量化学療法および造血細胞移植などの積極的な寛解後処置が、最初の寛解に達した後に、患者の 50 %

10

20

30

40

50

よりも多くにおいて現在採用されている。かかる積極的な寛解後処置に耐えるのに十分なほど健康ではない多くの再燃した患者について利用可能な治療選択肢は存在しない。

【0004】

このように、AMLの代替的な一次処置および寛解後処置を開発するために大きな努力がなされてきたが、注目に値する成功は得られていない。AMLがん細胞は、転写因子占有率および転写調節においてバリエーションを示し、AML患者は、種々のサブタイプの白血病関連の症候的差異および予後的差異を有する。白血病の特定のサブタイプを標的化することは、より有効な個別化治療を可能にし得ることが示唆されてきた。しかし、個々の患者内の白血病のサブタイプは、経時的にまたは処置の結果として変化し得、個々の患者は、複数のサブクローンを有し得る。

10

【0005】

AMLを処置するための免疫療法アプローチに関する研究も行われてきた。インターロイキン-3受容体 α 鎖（IL3RA、CD123としても公知）は、正常骨髄と比較した、AML細胞の圧倒的多数の上でのその過剰発現に起因して、AMLの処置のために標的化された最初の抗原の1つである。CD123を標的化するモノクローナル抗体および組換え免疫毒素は、前臨床評価において有望さを示した。CD33は、AML悪性細胞の80%よりも多くの上で発現されるので、関心がもたれる別の抗原である；しかし、これは、正常な骨髄性前駆細胞系上でも発現される。有望な前臨床データに基づいて、これら2つの表面分子を標的化する、CAR-T細胞が含まれる免疫療法が、再燃したおよび不応性のAML患者における初期臨床試験において試験された。しかし、これらのアプローチは、疾患に対する長期利益なしに短期応答のみを示し、用いられる標的の低い特異性に起因して重症な有害効果を引き起こした、即ち、造血幹および前駆細胞にもよる標的の発現に起因して、重症汎血球減少症および重症骨髄破壊を引き起こしたので、予備的な臨床結果は期待外れであった。

20

【0006】

したがって、AMLの処置のための安全かつ有効な代替的治療の開発が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

1. 概要

30

本出願人は、*in silico*分析とその後の実験的分析および検証とを使用して、造血幹細胞区画内での発現がほとんどない～全くない、AML細胞に特異的な6つの新規抗原（即ち、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109）を同定した。これら6つの腫瘍特異的抗原（TSA）は、AML細胞系（SHI-1、HL-60、KASUMI-1、MOLM-13、MV4-1およびAML）を使用するフローサイトメトリーによって測定した場合の、AML細胞における安定で特異的かつ高いレベルの発現に一部基づいて選択された。

【0008】

この発見に基づいて、本出願人は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択されるTSAを標的化することによって、骨髄性障害および急性白血病（例えば、AML）を診断および処置する方法を提供する。これらの処置方法のために使用され得る抗原結合タンパク質（ABP）、ABP-薬物コンジュゲートおよびキメラ抗原受容体（CAR）が、本明細書でさらに提供される。

40

【0009】

したがって、本開示は、対象における骨髄性障害（MD）および急性白血病（AL）を診断する方法であって、対象の生体試料中の腫瘍特異的抗原の存在またはレベルを検出するステップを含み、腫瘍特異的抗原が、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される、方法を提供する。

【0010】

一部の実施形態では、生体試料は、血液試料または骨髄試料である。一部の実施形態で

50

は、生体試料は、芽細胞を含む。一部の実施形態では、芽細胞は、骨髄性芽細胞（myeloid blast cell）、リンパ性芽細胞（lymphoid blast cell）、または骨髄性芽細胞およびリンパ性芽細胞の組合せから選択される。

【0011】

一部の実施形態では、検出するステップは、生体試料を抗体と接触させることを含み、抗体は、腫瘍特異的抗原に特異的に結合する。一部の実施形態では、検出するステップは、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、免疫組織化学、蛍光または酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）を含む。一部の実施形態では、抗体は、標識されている。一部の実施形態では、抗体は、フルオロフォアまたは酵素で標識されている。一部の実施形態では、標的結合タンパク質は、標識されている。一部の実施形態では、標的結合タンパク質は、フルオロフォアまたは酵素で標識されている。一部の実施形態では、検出するステップは、生体試料中の腫瘍特異的抗原のmRNAレベルを測定することを含む。

10

【0012】

一部の実施形態では、検出するステップは、生体試料中の腫瘍特異的抗原のmRNAレベルを測定することを含む。一部の実施形態では、mRNAレベルは、in situハイブリダイゼーション、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）または次世代配列決定によって測定される。

【0013】

一部の実施形態では、骨髄性障害（MD）および急性白血病（AL）は、小児または成人年齢での発症を有する。一部の実施形態では、方法は、対象由来の血液および／または骨髄試料中の腫瘍特異的抗原の存在またはレベルの検出に基づいて、対象におけるがん細胞の存在または非存在を決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、対象由来の生体試料中の腫瘍特異的抗原の存在またはレベルの検出に基づいて、対象におけるがん細胞の存在または非存在を決定するステップをさらに含む。

20

【0014】

一部の実施形態では、方法は、対象に、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される腫瘍特異的抗原に特異的に結合する治療剤の治療的有効量を投与するステップをさらに含む。

【0015】

一部の実施形態では、治療剤は、抗原結合タンパク質（ABP）、ABP-薬物コンジュゲート、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫応答性細胞、または二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）であり、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、CARまたはBiTEは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される腫瘍特異的抗原に特異的に結合する。一部の実施形態では、治療剤は、本開示に記載されるABP、本開示に記載されるABP-薬物コンジュゲート、本開示に記載されるキメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫応答性細胞、または本開示に記載される二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）である。

30

【0016】

別の態様では、本開示は、骨髄性障害（MD）または急性白血病（AL）を有する対象を処置する方法であって、a）対象の生体試料中の腫瘍特異的抗原の存在またはレベルを検出するステップであって、腫瘍特異的抗原が、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される、ステップ；b）対象に、抗原結合タンパク質（ABP）、ABP-薬物コンジュゲート、またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップであって、ABP、ABP-薬物コンジュゲートまたはCARが、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する、ステップを含む方法を提供する。

40

【0017】

一部の実施形態では、生体試料は、血液試料、骨髄試料である。一部の実施形態では、生体試料は、骨髄性障害（MD）および急性白血病（AL）芽細胞を含む。一部の実施形

50

態では、芽細胞は、骨髄性芽細胞、リンパ性芽細胞、または骨髄性芽細胞およびリンパ性芽細胞の組合せから選択される。

【0018】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原の存在またはレベルは、生体試料を抗体と接触させることによって検出され、抗体は、腫瘍特異的抗原に特異的に結合する。一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原の存在またはレベルは、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、免疫組織化学、蛍光または酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）によって検出される。

【0019】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原の存在またはレベルは、生体試料中の腫瘍特異的抗原のmRNAレベルを測定することによって検出される。一部の実施形態では、mRNAレベルは、*in situ*ハイブリダイゼーション、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）または次世代配列決定によって測定される。

【0020】

一態様では、本開示は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される標的タンパク質に特異的に結合する抗原結合タンパク質（ABP）を提供する。

【0021】

一部の実施形態では、ABPは、ヒトCD84に特異的に結合する。

【0022】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号97、配列番号98または配列番号90のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0023】

一部の実施形態では、ABPは、

a. 配列番号51の配列を有するV_LCDR1、配列番号54の配列を有するV_LCDR2、配列番号61の配列を有するV_LCDR3、配列番号63の配列を有するV_HCDR1、配列番号68の配列を有するV_HCDR2および配列番号72の配列を有するV_HCDR3；

b. 配列番号47の配列を有するV_LCDR1、配列番号54の配列を有するV_LCDR2、配列番号55の配列を有するV_LCDR3、配列番号63の配列を有するV_HCDR1、配列番号68の配列を有するV_HCDR2および配列番号72の配列を有するV_HCDR3；または

c. 配列番号45の配列を有するV_LCDR1、配列番号52の配列を有するV_LCDR2、配列番号55の配列を有するV_LCDR3、配列番号63の配列を有するV_HCDR1、配列番号66の配列を有するV_HCDR2および配列番号71の配列を有するV_HCDR3

を含む。

【0024】

一部の実施形態では、ABPは、

d. 配列番号80のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号88のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

e. 配列番号81のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号88のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；あるいは

10

20

30

40

50

は

f. 配列番号74のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号83のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。

【0025】

一部の実施形態では、ABPは、

a. 配列番号131の配列を有するV_LCDR1、配列番号132の配列を有するV_LCDR2、配列番号133の配列を有するV_LCDR3、配列番号251の配列を有するV_HCDR1、配列番号252の配列を有するV_HCDR2、および配列番号253の配列を有するV_HCDR3；

b. 配列番号134の配列を有するV_LCDR1、配列番号135の配列を有するV_LCDR2、配列番号136の配列を有するV_LCDR3、配列番号254の配列を有するV_HCDR1、配列番号255の配列を有するV_HCDR2、および配列番号256の配列を有するV_HCDR3。

c. 配列番号110の配列を有するV_LCDR1、配列番号111の配列を有するV_LCDR2、配列番号112の配列を有するV_LCDR3、配列番号230の配列を有するV_HCDR1、配列番号231の配列を有するV_HCDR2、および配列番号232の配列を有するV_HCDR3；

d. 配列番号161の配列を有するV_LCDR1、配列番号162の配列を有するV_LCDR2、配列番号163の配列を有するV_LCDR3、配列番号281の配列を有するV_HCDR1、配列番号282の配列を有するV_HCDR2、および配列番号283の配列を有するV_HCDR3；

e. 配列番号164の配列を有するV_LCDR1、配列番号165の配列を有するV_LCDR2、配列番号166の配列を有するV_LCDR3、配列番号284の配列を有するV_HCDR1、配列番号285の配列を有するV_HCDR2、および配列番号286の配列を有するV_HCDR3；

f. 配列番号140の配列を有するV_LCDR1、配列番号141の配列を有するV_LCDR2、配列番号142の配列を有するV_LCDR3、配列番号260の配列を有するV_HCDR1、配列番号261の配列を有するV_HCDR2、および配列番号262の配列を有するV_HCDR3；

g. 配列番号191の配列を有するV_LCDR1、配列番号192の配列を有するV_LCDR2、配列番号193の配列を有するV_LCDR3、配列番号311の配列を有するV_HCDR1、配列番号312の配列を有するV_HCDR2、および配列番号313の配列を有するV_HCDR3；

h. 配列番号194の配列を有するV_LCDR1、配列番号195の配列を有するV_LCDR2、配列番号196の配列を有するV_LCDR3、配列番号314の配列を有するV_HCDR1、配列番号315の配列を有するV_HCDR2、および配列番号316の配列を有するV_HCDR3；

i. 配列番号170の配列を有するV_LCDR1、配列番号171の配列を有するV_LCDR2、配列番号172の配列を有するV_LCDR3、配列番号290の配列を有するV_HCDR1、配列番号291の配列を有するV_HCDR2、および配列番号292の配列を有するV_HCDR3；

j. 配列番号221の配列を有するV_LCDR1、配列番号222の配列を有するV_LCDR2、配列番号223の配列を有するV_LCDR3、配列番号341の配列を有するV_HCDR1、配列番号342の配列を有するV_HCDR2、および配列番号343の配列を有するV_HCDR3；あるいは

配列番号224の配列を有するV_LCDR1、配列番号225の配列を有するV_LCD

10

20

30

40

50

R 2、配列番号 2 2 6 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 3 4 4 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 3 4 5 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 3 4 6 の配列を有する V_H C D R 3；あるいは

k．配列番号 2 0 0 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 2 0 1 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 2 0 2 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 3 2 0 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 3 2 1 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 3 2 2 の配列を有する V_H C D R 3

を含む。

【0 0 2 6】

一部の実施形態では、A B P は、ヒト C D 6 9 に特異的に結合する。

10

【0 0 2 7】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 8 9 ～ 9 6 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0 0 2 8】

一部の実施形態では、A B P は、

a．配列番号 4 7 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 4 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 7 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 4 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 7 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3；

20

b．配列番号 5 0 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 4 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 6 0 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 2 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 9 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 7 3 の配列を有する V_H C D R 3；

c．配列番号 4 5 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 2 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 5 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 2 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 5 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 7 0 の配列を有する V_H C D R 3；

d．配列番号 4 6 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 3 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 6 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 7 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3；

30

e．配列番号 4 8 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 4 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 8 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 8 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 7 2 の配列を有する V_H C D R 3；

f．配列番号 4 9 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 2 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 9 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 7 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3；

40

g．配列番号 4 9 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 2 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 9 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 7 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3；あるいは

h．配列番号 4 5 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 2 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 5 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 6 の配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3

を含む。

50

【0029】

一部の実施形態では、ABPは、

a. 配列番号107の配列を有するV_LCDR1、配列番号108の配列を有するV_LCDR2、配列番号109の配列を有するV_LCDR3、配列番号227の配列を有するV_HCDR1、配列番号228の配列を有するV_HCDR2および配列番号229の配列を有するV_HCDR3；

b. 配列番号110の配列を有するV_LCDR1、配列番号111の配列を有するV_LCDR2、配列番号112の配列を有するV_LCDR3、配列番号230の配列を有するV_HCDR1、配列番号231の配列を有するV_HCDR2、および配列番号232の配列を有するV_HCDR3；

c. 配列番号113の配列を有するV_LCDR1、配列番号114の配列を有するV_LCDR2、配列番号115の配列を有するV_LCDR3、配列番号233の配列を有するV_HCDR1、配列番号234の配列を有するV_HCDR2、および配列番号235の配列を有するV_HCDR3；

d. 配列番号116の配列を有するV_LCDR1、配列番号117の配列を有するV_LCDR2、配列番号118の配列を有するV_LCDR3、配列番号236の配列を有するV_HCDR1、配列番号237の配列を有するV_HCDR2、および配列番号238の配列を有するV_HCDR3；

e. 配列番号119の配列を有するV_LCDR1、配列番号120の配列を有するV_LCDR2、配列番号121の配列を有するV_LCDR3、配列番号239の配列を有するV_HCDR1、配列番号240の配列を有するV_HCDR2、および配列番号241の配列を有するV_HCDR3；

f. 配列番号122の配列を有するV_LCDR1、配列番号123の配列を有するV_LCDR2、配列番号124の配列を有するV_LCDR3、配列番号242の配列を有するV_HCDR1、配列番号243の配列を有するV_HCDR2、および配列番号244の配列を有するV_HCDR3；

g. 配列番号125の配列を有するV_LCDR1、配列番号126の配列を有するV_LCDR2、配列番号127の配列を有するV_LCDR3、配列番号245の配列を有するV_HCDR1、配列番号246の配列を有するV_HCDR2、およびV_HCDR3 having a sequence of 配列番号247；

h. 配列番号128の配列を有するV_LCDR1、配列番号129の配列を有するV_LCDR2、配列番号130の配列を有するV_LCDR3、配列番号248の配列を有するV_HCDR1、配列番号249の配列を有するV_HCDR2、および配列番号250の配列を有するV_HCDR3；

i. 配列番号137の配列を有するV_LCDR1、配列番号138の配列を有するV_LCDR2、配列番号139の配列を有するV_LCDR3、配列番号257の配列を有するV_HCDR1、配列番号258の配列を有するV_HCDR2、および配列番号259の配列を有するV_HCDR3；

j. 配列番号140の配列を有するV_LCDR1、配列番号141の配列を有するV_LCDR2、配列番号142の配列を有するV_LCDR3、配列番号260の配列を有するV_HCDR1、配列番号261の配列を有するV_HCDR2、および配列番号262の配列を有するV_HCDR3；

k. 配列番号143の配列を有するV_LCDR1、配列番号144の配列を有するV_LCDR2、配列番号145の配列を有するV_LCDR3、配列番号263の配列を有するV_HCDR1、配列番号264の配列を有するV_HCDR2、および配列番号265の配列を有するV_HCDR3；

l. 配列番号146の配列を有するV_LCDR1、配列番号147の配列を有するV_LCDR2、配列番号148の配列を有するV_LCDR3、配列番号266の配列を有するV_HCDR1、配列番号267の配列を有するV_HCDR2、および配列番号268の配列を有するV_HCDR3；

10

20

30

40

50

y. 配列番号197の配列を有するV_LCDR1、配列番号198の配列を有するV_LCDR2、配列番号199の配列を有するV_LCDR3、配列番号317の配列を有する

40

V_HCDR1、配列番号318の配列を有するV_HCDR2、および配列番号319の配列を有するV_HCDR3；

z. 配列番号200の配列を有するV_LCDR1、配列番号201の配列を有するV_LCDR2、配列番号202の配列を有するV_LCDR3、配列番号320の配列を有するV_HCDR1、配列番号321の配列を有するV_HCDR2、および配列番号322の配列を有するV_HCDR3；

aa. 配列番号203の配列を有するV_LCDR1、配列番号204の配列を有するV_LCDR2、配列番号205の配列を有するV_LCDR3、配列番号323の配列を有するV_HCDR1、配列番号324の配列を有するV_HCDR2、および配列番号325の配列を有するV_HCDR3；

bb. 配列番号206の配列を有するV_LCDR1、配列番号207の配列を有するV_LCDR2、配列番号208の配列を有するV_LCDR3、配列番号326の配列を有するV_HCDR1、配列番号327の配列を有するV_HCDR2、および配列番号328の配列を有するV_HCDR3；

cc. 配列番号209の配列を有するV_LCDR1、配列番号210の配列を有するV_LCDR2、配列番号211の配列を有するV_LCDR3、配列番号329の配列を有するV_HCDR1、配列番号330の配列を有するV_HCDR2、および配列番号331の配列を有するV_HCDR3；

dd. 配列番号212の配列を有するV_LCDR1、配列番号213の配列を有するV_LCDR2、配列番号214の配列を有するV_LCDR3、配列番号332の配列を有するV_HCDR1、配列番号333の配列を有するV_HCDR2、および配列番号334の配列を有するV_HCDR3；

ee. 配列番号215の配列を有するV_LCDR1、配列番号216の配列を有するV_LCDR2、配列番号217の配列を有するV_LCDR3、配列番号335の配列を有するV_HCDR1、配列番号336の配列を有するV_HCDR2、および配列番号337の配列を有するV_HCDR3；あるいは

ff. 配列番号218の配列を有するV_LCDR1、配列番号219の配列を有するV_LCDR2、配列番号220の配列を有するV_LCDR3、配列番号338の配列を有するV_HCDR1、配列番号339の配列を有するV_HCDR2、および配列番号340の配列を有するV_HCDR3

を含む。

【0030】

一部の実施形態では、ABPは、

a. 配列番号76のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号85のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

b. 配列番号79のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号87のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

c. 配列番号74のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号83のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

d. 配列番号74のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%

10

20

30

40

50

%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号82のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

e. 配列番号75のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号84のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

f. 配列番号77のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号86のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

g. 配列番号77のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号84のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；

h. 配列番号78のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号84のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン；あるいは

i. 配列番号74のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号83のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。

【0031】

一部の実施形態では、ABPは、ヒトCD69およびCD84に特異的に結合する。

【0032】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号36のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0033】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号45の配列を有するV_LCDR1、配列番号52の配列を有するV_LCDR2、配列番号55の配列を有するV_LCDR3、配列番号63の配列を有するV_HCDR1、配列番号66の配列を有するV_HCDR2および配列番号71の配列を有するV_HCDR3を含む。

【0034】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号74のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号83のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。

【0035】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号89～98から選択されるアミノ酸配列を含

10

20

30

40

50

む。

【0036】

一部の実施形態では、ABPは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、直鎖状抗体またはVドメイン抗体を含む。

【0037】

一部の実施形態では、ABPは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、直鎖状抗体またはVドメイン抗体である。

【0038】

一部の実施形態では、ABPは、モノクローナル抗体である。

【0039】

一部の実施形態では、ABPは、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE抗体から選択される。

【0040】

一部の実施形態では、ABPは、クラスIgGならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から選択されるサブクラスの重鎖定常領域を含む。

【0041】

一部の実施形態では、ABPは、薬物にコンジュゲートされている。

【0042】

一部の実施形態では、ABPは、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を誘導することが可能であり、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合し、ヒトFcを含む。

【0043】

一部の実施形態では、ABPは、ヒト、ヒト化またはキメラABPである。

【0044】

一部の実施形態では、ABPは、モノクローナルである。

【0045】

一部の実施形態では、ABPは、二重特異性または多重特異性である。

【0046】

一部の実施形態では、ABPは、IgGの重鎖定常領域を含む。

【0047】

一部の実施形態では、ABPは、脱フコシル化されている。

【0048】

一部の実施形態では、ABPは、表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイによって測定した場合に、50 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nMまたは0.1 nM未満またはそれと等しいK_Dで標的タンパク質に結合する。

【0049】

一態様では、本開示は、本開示に記載されるABPをコードする、単離されたポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを提供する。別の態様では、本開示は、本開示に記載される単離されたポリヌクレオチドを含むベクターまたはベクターのセットを提供する。別の態様では、本開示は、本開示に記載される単離されたポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0050】

一態様では、本開示は、単離された抗原結合タンパク質(ABP)を産生する方法であって、ABPを本開示に記載される宿主細胞において発現させるステップ、およびABPを単離するステップを含む、方法を提供する。

【0051】

一態様では、本開示は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を誘導することが可能であり、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109か

10

20

30

40

50

らなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合し、ヒトFcを含む、抗原結合タンパク質 (ABP) を提供する。

【0052】

一部の実施形態では、ABPは、ヒト、ヒト化またはキメラABPである。一部の実施形態では、ABPは、モノクローナルである。一部の実施形態では、ABPは、二重特異性または多重特異性である。一部の実施形態では、ABPは、IgGの重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、ABPは、IgG1の重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、ABPは、脱フコシル化されている。

【0053】

一部の実施形態では、ABPは、表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイによって測定した場合に、50 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nMまたは0.1 nM未満またはそれと等しい K_D で標的タンパク質に結合する。

【0054】

別の態様では、本開示は、本明細書で提供されるABPおよび薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【0055】

さらに別の態様では、本開示は、骨髓性障害 (MD) または急性白血病 (AL) を有する対象を処置する方法であって、本明細書で提供されるABPまたは医薬組成物の治療有効量を投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、骨髓性障害 (MD) および急性白血病 (AL) は、小児または成人発症型のものである。

【0056】

一部の実施形態では、ABPまたは医薬組成物は、追加の薬剤と組み合わせて投与される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、化学療法剤または生物剤である。一部の実施形態では、化学療法剤は、シタラビン、ダウノルビシン、イダルビシン、クラドリビン、ミトキサントロン、アザシチジン、デシタビンおよびCPX-351 (Vyxeos (登録商標)) からなる群から選択される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、ヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤は、ビスモデギブ、ソニデギブ (sonidagib) および三酸化ヒ素 (ATO) から選択される。一部の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、グラスデギブ (Daurismo (商標)) である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、FMS様チロシンキナーゼ3 (FLT3) 阻害剤である。一部の実施形態では、FLT3阻害剤は、ミドスタウリン (Rydapt (登録商標))、ギルテリチニブ (Xospata (登録商標))、ソラフェニブ、レスタウルチニブ、キザルチニブおよびクレノラニブからなる群から選択される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1 (IDH1) またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ2 (IDH2) 阻害剤である。一部の実施形態では、IDH1またはIDH2阻害剤は、イボシデニブ (Tibsovo (登録商標)) またはエナシデニブ (Idhifa (登録商標)) である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、B細胞リンパ腫2 (BCL2) 阻害剤である。一部の実施形態では、BCL2阻害剤は、ベネトクラクス (Venclexta (登録商標)) である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、CD33標的化剤である。一部の実施形態では、CD33標的化剤は、ゲムツズマブオゾガマイシン (Mylotarg (商標)) またはバダスツキシマブタリリン (vadastuximab talirine) (SGN-CD33A) である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、細胞周期チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、細胞周期チェックポイント阻害剤は、Auroraキナーゼ阻害剤、Polo様キナーゼ1 (PLK1) 阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害剤またはチェックポイントキナーゼ1 (CHK1) 阻害剤である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体である。

【0057】

一部の実施形態では、A B Pまたは医薬組成物は、免疫療法剤と組み合わせて投与されない。一部の実施形態では、A B Pまたは医薬組成物は、併用療法によって投与されない。一部の実施形態では、A B Pまたは医薬組成物は、免疫療法によって投与されない。一部の実施形態では、方法は、C A Rを含む免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップを含み、投与するステップは、造血を助けるための自己もしくは同種異系造血幹細胞療法が後に続き、それと組み合わせて実施されもしない。

【0058】

さらに別の態様では、本開示は、抗原結合タンパク質（A B P）、A B Pに連結された細胞傷害剤、および必要に応じて、細胞傷害剤をA B Pに連結するリンカーを含む、抗原結合タンパク質（A B P）-薬物コンジュゲートであって、A B Pが、C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9およびC D 1 0 9からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する、抗原結合タンパク質（A B P）-薬物コンジュゲートを提供する。

10

【0059】

一部の実施形態では、A B Pは、ヒト、ヒト化またはキメラA B Pである。一部の実施形態では、A B Pは、モノクローナルである。一部の実施形態では、A B Pは、二重特異性または多重特異性である。一部の実施形態では、A B Pは、F a b、F a b”、F（a b”）₂、F v、s c F v、（s c F v）₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、直鎖状抗体、Vドメイン抗体、または二重特異性タンデム二価s c F v、または二重特異性T細胞エンゲージャー（B i T E）を含む。一部の実施形態では、A B Pは、F c、必要に応じてヒトF cを含む。一部の実施形態では、A B Pは、I g G、I g A、I g D、I g EおよびI g Mから選択されるクラスの重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、A B Pは、クラスI g GならびにI g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4から選択されるサブクラスの重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、A B Pは、I g G 1の重鎖定常領域を含む。

20

【0060】

ある特定の実施形態では、A B Pは、B i T Eである。特定の実施形態では、B i T Eは、抗原結合ドメインおよびT細胞活性化ドメインを含む。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9およびC D 1 0 9からなる群から選択される標的タンパク質／抗原に特異的に結合する。

30

【0061】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、標的タンパク質（C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9またはC D 1 0 9）に特異的に結合する抗体の単鎖可変断片（s c F v）を含む。

【0062】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9またはC D 1 0 9標的抗原上のエピトープに結合する。一部の実施形態では、当該抗原結合ドメインは、C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9またはC D 1 0 9抗体のC D Rを含む。一部の実施形態では、当該抗原結合ドメインは、C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9またはC D 1 0 9抗体のV_HおよびV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗原結合ドメインは、C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9またはC D 1 0 9単鎖可変断片（s c F v）を含む。

40

【0063】

一部の実施形態では、T細胞活性化ドメインは、C D 3 ζの細胞内ドメインを含む。ある特定の実施形態では、T細胞活性化ドメインは、C D 3に結合する。

【0064】

一部の実施形態では、A B Pは、表面プラズモン共鳴（S P R）アッセイによって測定した場合に、5 0 n M、1 0 n M、5 n M、1 n M、0 . 5 n Mまたは0 . 1 n M未満またはそれと等しいK_Dで標的タンパク質に結合する。

【0065】

50

一部の実施形態では、細胞傷害剤は、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、有糸分裂阻害剤、抗キナーゼ剤、アルキル化剤、ホルモン、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト、ケモカイン、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、代謝拮抗薬、抗生物質、アルカロイドまたは放射性同位体を含む。一部の実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、リンカーは、非切断性リンカーである。

【0066】

本開示の一態様は、本開示に記載されるABP-薬物コンジュゲートおよび薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【0067】

一態様では、本開示は、骨髄性障害(MD)または急性白血病(AL)を有する対象を処置する方法であって、本開示に記載されるABP-薬物コンジュゲートまたは医薬組成物の治療有効量を投与するステップを含む、方法を提供する。

【0068】

一部の実施形態では、骨髄性障害(MD)および急性白血病(AL)は、小児または成人発症型のものである。一部の実施形態では、ABP-薬物コンジュゲートまたは医薬組成物は、追加の薬剤と組み合わせて投与される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、化学療法剤または生物剤である。一部の実施形態では、化学療法剤は、シタラビン、ダウノルビシン、イダルビシン、クラドリビン、ミトキサントロン、アザシチジン、デシタビンおよびCPX-351(Vyxeeos(登録商標))からなる群から選択される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、ヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤は、ビスモデギブ、ソニデギブおよび三酸化ヒ素(ATO)から選択される。一部の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、グラスデギブ(Daurismo(商標))である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、FMS様チロシンキナーゼ3(FLT3)阻害剤である。一部の実施形態では、FLT3阻害剤は、ミドスタウリン(Rydapt(登録商標))、ギルテリチニブ(Xospata(登録商標))、ソラフェニブ、レスタウルチニブ、キザルチニブおよびクレノラニブからなる群から選択される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1(IDH1)またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ2(IDH2)阻害剤である。一部の実施形態では、IDH1またはIDH2阻害剤は、イボシデニブ(Tibsovo(登録商標))またはエナシデニブ(Idhifa(登録商標))である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、B細胞リンパ腫2(BCL2)阻害剤である。一部の実施形態では、BCL2阻害剤は、ベネトクラクス(Venclexta(登録商標))である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、CD33標的化剤である。一部の実施形態では、CD33標的化剤は、ゲムツズマブオゾガマイシン(Mylostar(商標))またはバダスツキシマブタリリン(SGN-CD33A)である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、細胞周期チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、細胞周期チェックポイント阻害剤は、Auroraキナーゼ阻害剤、Polo様キナーゼ1(PLK1)阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤またはチェックポイントキナーゼ1(CHK1)阻害剤である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体である。

【0069】

さらに別の態様では、本開示は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、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キメラ抗原受容体(CAR)であって、細胞外抗原結合ドメインが、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質または抗原に特異的に結合する、キメラ抗原受容体(CAR)を提供する。

【0070】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、標的タンパク質に特異的に結合する

10

20

30

40

50

抗体の単鎖可変断片（s c F v）を含む。

【0071】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、本開示に記載されるA B Pを含む。

【0072】

一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、C D 3 ζの細胞内ドメインを含む。

【0073】

一部の実施形態では、C A Rは、共刺激ドメインをさらに含み、共刺激ドメインは、C D 2 8 共刺激ドメイン、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、C D 2 7 共刺激ドメイン、O X 4 0 共刺激ドメインまたはI C O S 共刺激ドメインである。

【0074】

一部の実施形態では、共刺激ドメインは、4 - 1 B B 共刺激ドメインである。一部の実施形態では、4 - 1 B B 共刺激ドメインは、配列番号105のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0075】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 2 8 膜貫通ドメインである。

【0076】

一部の実施形態では、C D 2 8 膜貫通ドメインは、配列番号100のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0077】

一部の実施形態では、C A Rは、ヒンジ領域をさらに含む。

【0078】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は、C D 2 8 ポリペプチドに由来するヒンジ領域である。

【0079】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号99のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0080】

一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインである。

【0081】

一部の実施形態では、C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインは、配列番号101のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0082】

一部の実施形態では、C A Rは、配列番号35～44から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0083】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、ヒトC D 8 4に特異的に結合する。

【0084】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、ヒトC D 6 9に特異的に結合する。

【0085】

一部の実施形態では、C A Rは、配列番号35～42から選択されるアミノ酸に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

10

20

30

40

50

【0086】

一部の実施形態では、CARは、配列番号43、44または36のアミノ酸に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0087】

一態様では、本開示は、本開示に記載されるCARをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0088】

一部の実施形態では、CARは、配列番号24～34のヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0089】

一態様では、本開示は、本開示のCARポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0090】

一態様では、本開示は、本開示に記載されるCARを発現する免疫応答性細胞を提供する。

【0091】

一態様では、本開示は、本開示に記載されるCARポリヌクレオチドまたは本開示に記載されるベクターを含む免疫応答性細胞を提供する。

【0092】

一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞である。

【0093】

一部の実施形態では、 $\alpha\beta$ T細胞は、CD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞である。

【0094】

一態様では、本開示は、本開示に記載される免疫応答性細胞を調製する方法であって、本開示に記載されるCARポリヌクレオチドまたはベクターを免疫細胞中にトランスフェクトまたは形質導入するステップを含む、方法を提供する。

【0095】

一部の実施形態では、方法は、免疫細胞を少なくとも48時間にわたって拡大増殖させるステップを含む。

【0096】

一部の実施形態では、免疫細胞は、1～100の範囲の感染多重度で形質導入される。

【0097】

一部の実施形態では、方法は、形質導入するステップの後に、ベクターを洗浄するステップ、および形質導入された免疫細胞を少なくとも2日間にわたって拡大増殖させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、形質導入するステップの後に、ベクターを洗浄するステップ、および形質導入された免疫細胞を2～30日の範囲の期間にわたって拡大増殖させるステップをさらに含む。

【0098】

一態様では、本開示は、対象を処置する方法であって、本開示に記載されるABP、本開示に記載されるABP-薬物コンジュゲート、本開示に記載される医薬組成物または本開示に記載される免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップを含む、方法を提供する。

【0099】

一部の実施形態では、対象は、骨髄性障害（MD）または急性白血病（AL）を有する。一部の実施形態では、急性白血病は、急性リンパ芽球性白血病（ALL）である。

【0100】

一部の実施形態では、骨髄性障害（MD）および急性白血病（AL）は、小児または成

10

20

30

40

50

人発症型のものである。

【0101】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、標的タンパク質に特異的に結合する抗体の単鎖可変断片（s c F v）を含む。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、C D 3 ζの細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、C A Rは、共刺激ドメインをさらに含み、共刺激ドメインは、C D 2 8共刺激ドメイン、4-1 B B共刺激ドメイン、C D 2 7共刺激ドメイン、O X 4 0共刺激ドメインまたはI C O S共刺激ドメインである。

【0102】

一態様では、本開示は、C A Rをコードするポリヌクレオチドを提供する。別の態様では、本開示は、ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。さらに別の態様では、本開示は、本開示に記載されるC A Rを発現する免疫応答性細胞およびポリヌクレオチドを含む免疫応答性細胞を提供する。

【0103】

一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、α β T細胞、γ δ T細胞またはナチュラルキラー（N K）細胞である。一部の実施形態では、α β T細胞は、C D 4 + T細胞、C D 3 + T細胞またはC D 8 + T細胞である。

【0104】

一態様では、本開示は、免疫応答性細胞を調製する方法であって、ポリヌクレオチドまたはベクターを免疫応答性細胞中にトランスフェクトまたは形質導入するステップを含む、方法を提供する。

【0105】

別の態様では、本開示は、骨髄性障害（M D）または急性白血病（A L）を有する対象を処置する方法であって、免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、骨髄性障害（M D）および急性白血病（A L）は、小児または成人発症型のものである。

【0106】

一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、追加の薬剤と組み合わせて投与される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップの前または後に投与される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップと並行して投与される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップの前に投与される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップの後に投与される。

【0107】

一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、追加の薬剤と組み合わせて投与される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、化学療法剤または生物剤である。一部の実施形態では、化学療法剤は、シタラビン、ダウノルビシン、イダルビシン、クラドリビン、ミトキサントロン、デシタビンおよびC P X-3 5 1（V y x e o s（登録商標））からなる群から選択される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、ヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤は、ビスモデギブ、ソニデギブおよび三酸化ヒ素（A T O）から選択される。一部の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、グラスデギブ（D a u r i s m o（商標））である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、F M S様チロシンキナーゼ3（F L T 3）阻害剤である。一部の実施形態では、F L T 3阻害剤は、ミドスタウリン（R y d a p t（登録商標））、ギルテリチニブ（X o s p a t a（登録商標））、ソラフェニブ、レスタウルチニブ、キザルチニブおよびクレノラニブからなる群から選択される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1（I D H 1）またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ2（I D H 2）阻害剤である。一部の実施形態では、I D H 1またはI D H 2阻害剤は、イボシデニブ（T i b s o v o（登録商標））またはエナシデニブ（I d h i f a（登録商標））である

。一部の実施形態では、追加の薬剤は、B細胞リンパ腫2（BCL2）阻害剤である。一部の実施形態では、BCL2阻害剤は、ベネトクラクス（Venclexta（登録商標））である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、CD33標的化剤である。一部の実施形態では、CD33標的化剤は、ゲムツズマブオゾガマイシン（Mylotarg（商標））またはバダスツキシマブタリリン（SGN-CD33A）である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、細胞周期チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、細胞周期チェックポイント阻害剤は、Auroraキナーゼ阻害剤、Polo様キナーゼ1（PLK1）阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害剤またはチェックポイントキナーゼ1（CHK1）阻害剤である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体である。

10

【0108】

一部の実施形態では、処置方法は、ABP、医薬組成物または免疫応答性細胞を投与するステップの前に、対象を化学療法剤または造血幹細胞で処置するステップをさらに含む。一部の実施形態では、処置方法は、ABP、医薬組成物または免疫応答性細胞を投与するステップの後に、対象を化学療法剤または造血幹細胞で処置するステップをさらに含む。一部の実施形態では、投与するステップは、免疫グロブリン療法が後に続き、それと組み合わせて実施されもしない。一部の実施形態では、免疫グロブリン療法は、静脈内免疫グロブリン（IVIg）処置である。

【0109】

一部の実施形態では、対象は、不応性疾患を有する。一部の実施形態では、対象は、再燃を有する。一部の実施形態では、対象は、成人AML患者である。一部の実施形態では、対象は、小児AML患者である。

20

【0110】

一部の実施形態では、対象にABP、医薬組成物または免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップの前に、対象は、化学療法剤を投与されたことがある、または造血幹細胞療法を受けたことがある。

【0111】

一部の実施形態では、対象は、化学療法に対しても造血幹細胞療法に対しても応答性でない。

30

【0112】

一部の実施形態では、対象は、骨髓芽球性（M0）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、骨髓芽球性（M1）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、骨髓芽球性（M2）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、前骨髓球性（promyelocytic）（M3）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、骨髓単球性（M4）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、単球性（M5）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、赤白血病（M6）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、巨核球性（M7）型のAMLを有する。

【0113】

一部の実施形態では、処置方法は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109を標的とするCARを含む免疫応答性細胞の有効量を投与するステップを含む。一部の実施形態では、有効量は、細胞10万個/kg～細胞2千5百万個/kgの範囲の用量である。一部の実施形態では、有効量は、細胞10万個/kg～細胞2千5百万個/kgの範囲の用量である。一部の実施形態では、有効量は、細胞10万個/kg～細胞1千5百万個/kgの範囲の用量である。

40

【0114】

一態様では、本開示は、抗原結合ドメインおよびT細胞活性化ドメインを含む二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）であって、抗原結合ドメインが、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質／抗原に特異的に結合する、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）を提

50

供する。

【0115】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、標的タンパク質に特異的に結合する抗体の単鎖可変断片（s c F v）を含む。

【0116】

一部の実施形態では、T細胞活性化ドメインは、C D 3 ζの細胞内ドメインを含む。

【0117】

一部の実施形態では、T細胞活性化ドメインは、C D 3に特異的に結合する抗体の単鎖可変断片（s c F V）を含む。

【0118】

別の態様では、本開示は、B i T Eをコードするポリヌクレオチドを提供する。別の態様では、本開示は、B i T Eをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0119】

別の態様では、本開示は、骨髄性障害（M D）または急性白血病（A L）を有する対象を処置する方法であって、B i T Eの治療有効量を投与するステップを含む、方法を提供する。

【0120】

一部の実施形態では、骨髄性障害（M D）および急性白血病（A L）は、小児または成人発症型のものである。

【0121】

一部の実施形態では、B i T Eまたはベクターは、追加の薬剤と組み合わせて投与される。

【0122】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、化学療法剤または生物剤である。一部の実施形態では、化学療法剤は、シタラビン、ダウノルビシン、イダルビシン、クラドリビン、ミトキサントロン、アザシチジン、デシタビンおよびC P X - 3 5 1（V y x e o s（登録商標））からなる群から選択される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、ヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤は、ビスモデギブ、ソニデギブおよび三酸化ヒ素（A T O）から選択される。一部の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、グラスデギブ（D a u r i s m o（商標））である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、F M S様チロシンキナーゼ3（F L T 3）阻害剤である。一部の実施形態では、F L T 3阻害剤は、ミドスタウリン（R y d a p t（登録商標））、ギルテリチニブ（X o s p a t a（登録商標））、ソラフェニブ、レスタウルチニブ、キザルチニブおよびクレノラニブからなる群から選択される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1（I D H 1）またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ2（I D H 2）阻害剤である。一部の実施形態では、I D H 1またはI D H 2阻害剤は、イボシデニブ（T i b s o v o（登録商標））またはエナシデニブ（I d h i f a（登録商標））である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、B細胞リンパ腫2（B C L 2）阻害剤である。一部の実施形態では、B C L 2阻害剤は、ベネトクラクス（V e n c l e x t a（登録商標））である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、C D 3 3標的化剤である。一部の実施形態では、C D 3 3標的化剤は、ゲムツズマブオゾガマイシン（M y l o t a r g（商標））またはバダスツキシマブタリリン（S G N - C D 3 3 A）である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、細胞周期チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、細胞周期チェックポイント阻害剤は、A u r o r aキナーゼ阻害剤、P o l o様キナーゼ1（P L K 1）阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ（C D K）阻害剤またはチェックポイントキナーゼ1（C H K 1）阻害剤である。一部の実施形態では、追加の薬剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗C T L A - 4抗体、抗P D - 1抗体または抗P D - L 1抗体である。

【0123】

10

20

30

40

50

2. いくつかの図面の簡単な説明

本開示のこれらおよび他の特色、態様および利点は、以下の説明および添付の図面により、より良く理解されるようになる。

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図1】図1は、実施例1に記載される新規AML-TSAを同定するプロセスを示すフローチャートである。このスクリーニングフローチャートは、AML細胞系（SHI-1、HL-60、MOLM-13、MV4;11およびKasumi-1）ならびに健康な対照造血細胞（CD3⁺、CD19⁺およびCD33⁺下位集団について選別したPBMCならびに臍帯血から単離されたCD34⁺細胞）におけるフローサイトメトリー発現分析に進んだ26/76個の遺伝子を規定する特定の組み入れ基準および除外基準に基づく優先順位付けと共に、診断時のAML遺伝子発現データから選択された遺伝子の元の2つのリストを示す。AML細胞表面上での最良の候補TSA局在化を、免疫蛍光によって確認した。

10

【0125】

【図2-1】図2Aは、いくつかのAML細胞系（HL-60、SHI-1、KASUM-1、MOLM-13およびMV4-11）においてCD69（明灰色のヒストグラム）対アイソタイプ（暗灰色のヒストグラム）に対する2つの異なる抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す。アイソタイプについてのサイトメトリー分析データが対照として提供される（暗灰色のヒストグラム）。アイソタイプ対照は、一次抗体と類似の特性を維持するが、特異的標的結合を欠く抗体である。図2Bは、膜染色（Membrite：CD69と形質膜特異的色素との共局在化）と併せた、CD69に対する2つの抗体を用いたAML細胞系（SHI-1）の蛍光免疫組織化学（白色のドット）の画像を示す。図2Cは、健康な造血細胞、即ち、PBMCに由来する健康なCD3、CD19およびCD33下位集団ならびに臍帯血に由来するCD34陽性細胞に対してCD69抗体を用いて実施した分析からのフローサイトメトリーデータを示す。

20

【図2-2】同上。

【図2-3】同上。

【0126】

【図3-1】図3Aは、いくつかのAML細胞系（HL-60、SHI-1、KASUM-1、MOLM-13およびMV4-11）に対してCD63に対する2つの異なる抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す（明灰色のヒストグラム）。アイソタイプについてのサイトメトリー分析データが対照として提供される（暗灰色のヒストグラム）。図3Bは、膜染色（Membrite：CD63と形質膜特異的色素との共局在化）と併せた、CD63に対する2つの抗体を用いたAML細胞系（HL-60）の蛍光免疫組織化学（白色のドット）の画像を示す。図3Cは、健康な造血細胞、即ち、PBMCに由来する健康なCD3、CD19およびCD33下位集団ならびに臍帯血に由来するCD34陽性細胞に対してCD63抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す。

30

【図3-2】同上。

【図3-3】同上。

【図3-4】同上。

40

【0127】

【図4-1】図4Aは、いくつかのAML細胞系（HL-60、SHI-1、KASUM-1、MOLM-13およびMV4-11）に対してCD151に対する2つの異なる抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す（明灰色のヒストグラム）。アイソタイプについてのサイトメトリー分析データが対照として提供される（暗灰色のヒストグラム）。図4Bは、膜染色（Membrite：CD151と形質膜特異的色素との共局在化）と併せた、CD151に対する2つの抗体を用いたAML細胞系（HL-60）の蛍光免疫組織化学（白色のドット）の画像を示す。図4Cは、健康な造血細胞

50

胞、即ち、P B M C に由来する健康な C D 3、C D 1 9 および C D 3 3 下位集団ならびに臍帯血に由来する C D 3 4 陽性細胞に対して C D 1 5 1 抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す。

【図 4 - 2】 同上。

【図 4 - 3】 同上。

【図 4 - 4】 同上。

【 0 1 2 8 】

【図 5 - 1】 図 5 A は、いくつかの A M L 細胞系（H L - 6 0、S H I - 1、K A S U M - 1、M O L M - 1 3 および M V 4 - 1 1）に対して C D 8 4 に対する 2 つの異なる抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す（明灰色のヒストグラム）。アイソタイプについてのサイトメトリー分析データが対照として提供される（暗灰色のヒストグラム）。図 5 B は、膜染色（M e m b r i t e : C D 8 4 と形質膜特異的色素との共局在化）と併せた、C D 8 4 に対する 2 つの抗体を用いた A M L 細胞系（H L - 6 0）の蛍光免疫組織化学（白色のドット）の画像を示す。図 5 C は、健康な造血細胞、即ち、P B M C に由来する健康な C D 3、C D 1 9 および C D 3 3 下位集団ならびに臍帯血に由来する C D 3 4 陽性細胞に対して C D 8 4 抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す。

【図 5 - 2】 同上。

【図 5 - 3】 同上。

【 0 1 2 9 】

【図 6 - 1】 図 6 A は、いくつかの A M L 細胞系（H L - 6 0、S H I - 1、K A S U M - 1、M O L M - 1 3 および M V 4 - 1 1）に対して C D 1 0 9 に対する 2 つの異なる抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す（明灰色のヒストグラム）。アイソタイプについてのサイトメトリー分析データが対照として提供される（暗灰色のヒストグラム）。図 6 B は、膜染色（M e m b r i t e : C D 1 0 9 と形質膜特異的色素との共局在化）と併せた、C D 1 0 9 に対する 2 つの抗体を用いた A M L 細胞系（K a s u m i - 1 または H L - 6 0）の蛍光免疫組織化学（白色のドット）の画像を示す。図 6 C は、健康な造血細胞、即ち、P B M C に由来する健康な C D 3、C D 1 9 および C D 3 3 下位集団ならびに臍帯血に由来する C D 3 4 陽性細胞に対して C D 1 0 9 抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す。

【図 6 - 2】 同上。

【図 6 - 3】 同上。

【 0 1 3 0 】

【図 7 - 1】 図 7 A は、いくつかの A M L 細胞系（H L - 6 0、S H I - 1、K A S U M - 1、M O L M - 1 3 および M V 4 - 1 1）に対して C D 7 2 に対する 2 つの異なる抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す（明灰色のヒストグラム）。アイソタイプについてのサイトメトリー分析データが対照として提供される（暗灰色のヒストグラム）。図 7 B は、膜染色（M e m b r i t e : C D 7 2 と形質膜特異的色素との共局在化）と併せた、C D 7 2 に対する 2 つの抗体を用いた A M L 細胞系（S H I - 1）の蛍光免疫組織化学（白色のドット）の画像を示す。図 7 C は、健康な造血細胞、即ち、P B M C に由来する健康な C D 3、C D 1 9 および C D 3 3 下位集団ならびに臍帯血に由来する C D 3 4 陽性細胞に対して C D 7 2 抗体を用いて実施したフローサイトメトリー分析からのデータを示す。

【図 7 - 2】 同上。

【図 7 - 3】 同上。

【 0 1 3 1 】

【図 8 - 1】 図 8 は、T S A の特異性を試験するためのヒト初代皮膚線維芽細胞に対するフローサイトメトリー結果を示す。

【図 8 - 2】 同上。

【図 8 - 3】 同上。

【図 8 - 4】 同上。

【図 8 - 5】 同上。

【図 8 - 6】 同上。

【0132】

【図 9 - 1】 図 9 は、T S A の特異性を試験するための異なるがん細胞系に対するフローサイトメトリー結果を示す。T S A 発現レベルは、フローサイトメトリーによって、異なるがん型由来の細胞系において評価され、ヒストグラム（明灰色） 対 アイソタイプ対照（灰色）として示される。

【図 9 - 2】 同上。

【図 9 - 3】 同上。

【図 9 - 4】 同上。

【図 9 - 5】 同上。

【図 9 - 6】 同上。

【0133】

【図 10 - 1】 図 10 は、異なる市販の抗体を使用する A M L 細胞系に対するフローサイトメトリー結果を示す。

【図 10 - 2】 同上。

【0134】

【図 11】 図 11 は、診断時および治療後の寛解時に収集した A M L 試料における T S A m R N A 発現を示す。T S A m R N A 発現を、診断時（R Q = 1）および治療後の寛解時に収集した 14 の対になった小児 A M L 骨髄試料における定量的 P C R によって評価した（ドットは、診断時に対する、寛解時の m R N A 発現値を示す）。患者を、A M L の遺伝的リスク（S R = 標準リスク；H R = 高リスク）によって層別する。T S A m R N A 発現が不均一であるにもかかわらず、治療後の C D 6 9、C D 6 3 および C D 8 4 m R N A 発現における有意な（*は $p < 0.05$ を示す）低減が検出された（R Q < 1）。

【0135】

【図 12 - 1】 図 12 A ~ 12 B は、クリニックにおけるフローサイトメトリーによる T S A 発現を示す。図 12 A は、C D 3 4 + C D 3 8 - 下位集団における C D 6 9 および C D 8 4 発現の欠如を示す。図 12 B は、A M L 芽球における C D 6 9 および C D 8 4 の最も高い発現を示す、診断時の A M L 試料における T S A 発現を示す。

【図 12 - 2】 同上。

【0136】

【図 13】 C D 6 9 および C D 8 4 に対する新規 A M L C A R の選択および構築のパイプライン。10 個の S c F v 配列を、ファージディスプレイから選択し、発現のために第 3 世代レンチウイルス移入プラスミド中の C A R カセット中にクローニングするために、特異性に基づいて優先順位付けした。

【0137】

【図 14】 C A R - T 細胞製造ワークフロー。レンチウイルス形質導入プロセスおよび C A R - T 細胞製造の概略図表示。このワークフローは、1 日目のドナー T 細胞の単離、T r a n s A c t による効率的な活性化、および 3 日目の C A R - L V 構築物の遺伝子移入を含む。4 日目から、C A R - T 細胞（C D 8 4 については S c F v 配列 B 8 または F 1 2 を用いて、C D 6 9 については G 1 または H 3 を用いて生成した）は、I L - 7 および I L - 1 5 を補充した T e x M A C S 培地における 14 日間にわたる拡大増殖を受けた。17 日目に、C A R - T 細胞は、免疫表現型検査を受け、H L - 6 0 または S H I - 1（C D 8 4 + C D 6 9 +）A M L 細胞系との共培養物中で成長させた。

【0138】

【図 15】 形質導入効率を、ベクターコピー数（V C N、細胞 1 つ当たりの組み込まれたウイルスコピーの数）の測定によって、17 日目に決定した。V C N を、実施した全ての実験について、全ての C A R - T 細胞構築物についてのレンチウイルス骨格内のプライマーを用いたデジタル液滴 P C R（d d P C R）分析によって決定した。各記号は、異なる

10

20

30

40

50

CAR構築物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、およびモック形質導入したもの〔空のCAR〕）を示す。

【0139】

【図16-1】示されたAML細胞系上のCD69およびCD84のフローサイトメトリー細胞表面発現、ならびにアイソタイプ対照（暗灰色のピーク）。3回の独立した実験の代表的なヒストグラム。

【図16-2】同上。

【0140】

【図17】CAR-T細胞製造（0日目～14日目）の間のT細胞の代表的な拡大増殖倍率動態学。モック形質導入された（空のCAR）およびT細胞をモニタリングし、細胞数をフローサイトメトリーによって計算した。データは、平均±SEMとして示される（ $n=2\sim7$ 、 $P>0.05$ ）。各記号は、異なるCAR構築物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、およびモック形質導入したもの〔空のCAR〕）を示す。

10

【0141】

【図18】フローサイトメトリーによって測定した、製造の終了時（14日目）のリンパ球内の生存Tリンパ球の頻度（図18A）ならびにCD4⁺およびCD8⁺細胞のパーセンテージ（図18B）。バーおよび記号は、異なるCAR-T細胞産物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、およびモック形質導入したもの〔空のCAR〕）を示す。データは、2～5回の異なる実験の平均±SEMとして示される。

20

【0142】

【図19】1日目からCAR-T細胞製造の終了時（14日目）までの代表的なフローサイトメトリープロット（図19A）およびT細胞サブセットの頻度（図19B）。免疫表現型を、フローサイトメトリーによって決定した：ナイーブ（T_n）および幹細胞メモリー（T_{scm}）、CD197（CCR7）⁺CD45RO⁻；セントラルメモリー（T_{cm}）、CD197（CCR7）⁺CD45RO⁺；最終分化した（T_{ef}）、CD197（CCR7）⁻CD45RO⁻；エフェクターメモリー（T_{em}）ならびに移行（transitional）メモリー（T_{tm}）、CD197（CCR7）⁻CD45RO⁺。バーは、異なるCAR-T細胞産物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、およびモック形質導入したもの〔空のCAR〕）を示す。

30

【0143】

【図20-1】示されたマーカーの発現によってそれらの活性化（図20A）および消耗（図20B）を評価するためのCAR-T細胞の免疫表現型を、1日目および17日目にフローサイトメトリーによって決定した。データは、1～4回の異なる実験の平均±SEMを示す。バーは、異なるCAR-T細胞産物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、およびモック形質導入したもの〔空のCAR〕）を示す。

40

【図20-2】同上。

【0144】

【図21】CD84（F12、B8）CARおよびCD69（G1、H3）CARを発現するように操作されたT細胞は、標的AML細胞系を認識しそれを殺滅する。標的HL-60およびSHI-1（CD84⁺CD69⁺）AML細胞系を、TexMACS培地（-）、または1：1のE：T比でのエフェクターCAR-T細胞との共培養物中で、48時間にわたって成長させた。7AADおよびAnnexin-Vで染色した標的AML細胞系（CD33⁺によってモニタリングする）を、フローサイトメトリーによって分析した。SHI-1およびHL-60細胞系は、モック形質導入された細胞（空のCAR）と共に共培養した場合よりも、CAR-T細胞と共に共培養した場合に、より高い割合の

50

細胞死を有した（空のCARに対して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ ）。バーは、異なるCAR-T細胞産物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、および空のCAR）を示す。データは、1～4回の異なる実験の平均±SEMとして示される。

【0145】

【図22】各バーは、標的AML細胞系に対して異なるCAR-T産物によってなされた殺滅のパーセンテージ（溶解効力の%）を示す。バーは、異なるCAR-T細胞産物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、およびモック形質導入したもの〔空のCAR〕）を示す。データは、1～3回の異なる実験の平均±SEMとして示される（空のCARに対して* $P < 0.05$ ）。CAR-T細胞溶解効力は、以下のように計算される：

10

【数1】

$$\text{溶解の\%} = 100 - \frac{\text{CAR-T細胞との共培養物中の生存AML細胞のN}}{\text{単独で培養した生存AML細胞のN}} * 100$$

【0146】

【図23】ルシフェラーゼ（LUC）形質導入した標的AML細胞系における生物発光（BLI）によって測定したCAR-T細胞溶解のパーセンテージ。各バーは、単独で培養した関連するAML細胞系のBLI値に関して正規化した、AML-LUC細胞系に対して異なるCAR-T産物によってなされた殺滅のパーセンテージを示す。バーは、異なるCAR-T細胞産物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、およびモック形質導入したもの〔空のCAR〕）を示す。データは、2回の異なる実験の平均±SEMとして示される（空のCARに対して*** $P < 0.001$ ；**** $P < 0.0001$ ）。

20

【0147】

【図24】フローサイトメトリーによって定量化した、48時間にわたって単独で培養した（-）、または1：1のエフェクター：標的（E：T）比で標的AML細胞系と共に培養した生CAR-T細胞の絶対数。データは、エフェクター細胞の持続および標的AML細胞の溶解を示す。点線は、共培養前の17日目におけるCAR-T細胞を示す。各記号は、異なるCAR-T細胞産物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、およびモック形質導入したもの〔空のCAR〕）および細胞系を示す。

30

【0148】

【図25】6時間にわたって単独で培養し（---）、または1：1のE：T比でCAR-T細胞と共に培養し、次いでMethoCult中に14日間プレートしたCD34⁺細胞から生成された（図25A）代表的な画像および（図25B）コロニー形成単位（CFU）の絶対数。バーおよび記号は、異なるCAR-T細胞産物（CD84についてはScFv配列B8またはF12を用いて、CD69についてはG1またはH3を用いて生成したもの、およびモック形質導入したもの〔空のCAR〕）およびヒトCD34⁺細胞を示す。データは、2～3回の異なる実験の平均±SEMとして示される（n.s.は $p > 0.05$ で有意ではない）。

40

【0149】

【図26-1】白血病マウス異種移植片において観察されたルシフェラーゼ生物発光シグナルが図26Aに提供される。白血病マウス異種移植片におけるCD69⁺AML細胞系の成長に対するCD69（H3）CAR-T細胞の効果が示される。図26Bは、ルシフェラーゼシグナル低減によって示される（全光束として示される）CAR-T細胞による対応するAML細胞系のin vivo溶解効力を提供する（モック形質導入された細胞〔空のCAR〕に対して* $P < 0.05$ ）。図26Cは、CD69⁺CD84⁺AML細胞系に対するCD69（H3およびG1）およびCD84（B8およびF12）CAR-T細胞のin vivo溶解効力を示す（空のCARに対して* $P < 0.05$ ）。NSG

50

マウスに、 0.5×10^6 個の SHI-1-LUC 細胞を注射し、2 日後、 1.5×10^6 個の CAR-T を注射した（1：3 の比。N = 7 動物／群）。データは、平均 ± SEM として示される。AML の生着および広がり、ルシフェラーゼ生物発光によって毎週モニタリングした。

【図 26-2】同上。

【0150】

【図 27-1】図 27A ~ 27D は、CD84 に指向された B8 および F12 ScFv 鎖、ならびに CD69 に指向された H3 ScFv の *in vivo* 有効性を提供する。SHI-1 標的 AML 細胞系に対する対応する CAR-T 細胞の *in vivo* 溶解効力は、ルシフェラーゼシグナル低減によって示される（全光束として示される）。(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ 、*** $p < 0.0005$ 、**** $p < 0.0001$ マンホイットニー検定)。NSG マウスに 0.5×10^6 個の SHI-1 ルシフェラーゼ陽性細胞を注射し、2 日後、 1.5×10^6 個の CAR-T を注射した（1：3 の比。n = 3 ~ 7 動物／群）。SHI-1 (CD84⁺CD69⁺) AML 細胞系、および（図 27C）F12 / B8 または空の CAR-T 細胞（scFv なし）、および（図 27D）H3 または空の CAR-T 細胞を注射した、NSG マウスの生存率。データは、平均 ± SEM として示される。AML の生着および広がりをルシフェラーゼ生物発光によって毎週モニタリングした；* $p < 0.05$ マンテルーコックス検定。

10

【図 27-2】同上。

【0151】

【図 28】図 28A ~ 28B は、CD84 に指向された B8 および F12 ScFv 鎖の *in vivo* 特異性を提供する。（図 28A）CD84^{neg}K562 に対するおよび（図 28B）CD84^{neg}U937 AML 細胞系に対する抗 CD84 (B8) CAR-T 細胞の効果。非標的 AML 細胞系に対する CAR-T 細胞の *in vivo* 溶解効力は、ルシフェラーゼシグナル低減によって示される（全光束として示される）。NSG マウスに 0.5×10^6 個の AML-LUC⁺ 細胞を注射し、2 日後、 1.5×10^6 個の CAR-T を注射した（1：3 の比。n = 6 ~ 10 動物／群）。データは、平均 ± SEM として示される。AML の生着および広がりをルシフェラーゼ生物発光によって毎週モニタリングした。

20

【0152】

【図 29】図 29 は、患者由来異種移植片に由来する初代 AML 細胞 (AML-PDX) における新規 TSA の発現を提供する。フローサイトメトリーによる AML *de novo* 診断時の小児 AML 試料から生成した PDX モデルから収集した AML 細胞上での CD84、CD69 および CD72 細胞表面発現の蛍光強度中央値 (MFI) (アイソタイプ対照、左側のピーク暗灰色；AML、右側のピーク明灰色)。2 回の独立した実験の代表的なヒストグラム。

30

【0153】

【図 30】図 30 は、初代 AML 細胞に対する抗 CD84 CAR-T 細胞の *in vitro* 溶解効力を提供する。AML-PDX モデルから収集した標的初代 *ex vivo* 細胞と共に共培養したとき（1：1 のエフェクター：標的比、48 時間）に抗 CD84 (PDX #5 については B8 を除外) ScFv を発現するように生成した CAR-T 細胞によって殺滅された AML 細胞のパーセンテージ。7AAD および Annexin-V で染色した *ex vivo* 標的 AML 初代細胞 (CD33 発現によってモニタリングした) を、フローサイトメトリーによって分析した（溶解効力を、空の CAR-T 細胞によって誘導された溶解効力に正規化した）。

40

【0154】

【図 31】図 31A ~ 31B は、抗 CD69 A1、F1、C2、H2 ScFv (複数可) の *in vitro* 溶解効力を提供する。標的 (図 31A) SHI-1 および (図 31B) HL60 AML CD84 + CD69 + 細胞系と共に 48 時間にわたって共培養し、7AAD および Annexin-V 発現によりフローサイトメトリーによって測定し

50

たときの、抗CD69 A1、F1、C2、H2 ScFv（複数可）によって誘導された溶解効力。各バーは、CAR-T細胞を単独で培養した（――）場合の細胞系におよび空のCAR-T細胞に対して正規化した、細胞系に対して異なるCAR-T細胞産物によってなされた殺滅のパーセンテージを示す。

【0155】

【図32】図32A～32Bは、抗CD84 B8、F12 ScFv（複数可）CAR-T細胞の*in vitro*サイトカイン産生能力を示す。フローサイトメトリーによって測定した、空のまたは抗CD84 B8もしくはF12 CAR-T細胞と標的SHI-1およびHL60（CD84⁺/CD69⁺）AML細胞系の1：1のE：T比での共培養の48時間後の（図32A）IFN γ および（図32B）TNF α 陽性発現細胞のパーセンテージ。各バーは、1～4回の独立した実験の平均 $\pm$ SEMを示す。（* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ 、*** $p < 0.0005$ マンホイットニーT検定）。

10

【0156】

【図33】図33A～33Bは、CD34⁺HSCと共に共培養したときのCD84 ScFvに指向されたB8およびF12 ScFv鎖の*in vitro*オフターゲット細胞傷害性結果を示す。多能性顆粒球、赤血球、マクロファージおよび巨核球コロニーと、顆粒球-マクロファージコロニーと、顆粒球コロニーと、マクロファージコロニー（それぞれ、CFU-GEMM、CFU-GM、CFU-G、およびCFU-M）を弁別するために単独で（――）または1：1のE：T比でCAR-T細胞と共に6時間にわたって培養し、次いでMethoCult培地中に12日間プレートしたCAR-T細胞のCD34⁺HSCによって生成された（図33A）総コロニー形成単位（CFU）の絶対数および（図34B）コロニーの形態の代表的な実験（データは平均 $\pm$ SEMとして示され、 $n = 1 \sim 2$ 、 $p > 0.05$ で有意ではない）。

20

【0157】

【図34】図34A～34Bは、CD84に指向されたB8およびF12 ScFv鎖の*in vivo*特異性を提供する。（図34A）SHI-1-CD84^{k α} AML細胞系に対する、抗CD84（B8）CAR-T細胞の効果。CAR-T細胞の*in vivo*溶解効力は、ルシフェラーゼシグナル低減によって示される（全光束として示される）。NSGマウスに 0.5×10^6 個のAML-LUC⁺SHI-1^{k α} 細胞を注射し、マウスを2および8日目に 1.5×10^6 個のCAR-Tで処置した（E：T 1：3、 $n = 4$ 動物/群）。データは、平均 $\pm$ SEMとして示される。SHI-1^{k α} の生着および広がりルシフェラーゼ生物発光によって毎週モニタリングした。（図34B）SHI-1-CD84^{k α} AML細胞系およびF12/B8または空のCAR-T細胞を注射したNSGマウスの生存率。（データは、平均 $\pm$ SEMとして示され、 $p > 0.05$ で有意ではない）。

30

【0158】

【図35】図35A～35Bは、B8 CD84およびF12 CD84 CAR-T細胞ならびにA1 CD69 C2 CD68 CAR-T細胞の*in vitro*殺滅能力を提供する。AML-PDXモデルから収集した標的初代*ex vivo*細胞と共に共培養したとき（E：T比 1：1、48時間）に（図35A）抗CD84（B8およびF12）または（図35B）抗CD69（A1およびC2）ScFv鎖を発現するように生成したCAR-T細胞によって殺滅されたAML細胞のパーセンテージ。フローサイトメトリーによる、AML初代細胞（CD33発現によってモニタリングし、7AADおよびAnnexin-Vで染色した）の細胞死を示したヒストグラム。溶解抗力を空のCAR-T細胞によって誘導された溶解効力に正規化した。各ヒストグラムは、各反復測定の平均 $\pm$ SEMを示す（1群当たり $n = 1 \sim 2$ 反復測定）。

40

【0159】

【図36】図36A～36Bは、抗CD84 B8、F12 ScFv（複数可）の*in vitro*サイトカイン産生能力を提供する。フローサイトメトリーによって測定した、AML-PDXモデルに由来する標的CD84⁺AML初代細胞との1：1のE：T比で

50

の共培養の48時間後のCAR T細胞の(図36A)IFN γ および(図36B)TNF α 産生。データを単独での培地中のCAR T細胞のサイトカイン産生(---)に対して正規化する。代表的な実験($p > 0.05$ で有意ではない)。

【0160】

【図37-1】図37A~37Cは、CD84を発現するAML-PDXに指向されたB8 ScFv鎖の*in vivo*有効性を提供する。(図37A)NSGマウスに 1.0×10^6 個のAML-ルシフェラーゼ(LUC)発現細胞を注射し、AMLの生着および広がりをもLUC生物発光(全光束として示される)によって毎週モニタリングした。AML注射から+28日目に、LUC分析は、AML生着の信頼性のあるシグナルを生じさせ、マウスに 5×10^6 個のCAR-T細胞(5:1のE:T比)または 10×10^6 個のCAR-T細胞(10:1のE:T比、 $n = 5 \sim 10$ 動物/群)を尾部注射した。(図37B~37C)CAR-T細胞接種後(図37B)7日目にまたは(図37C)12日目および16日目にAML-PDXおよびCAR-T細胞を注射したマウスの末梢血(PB)、骨髓(BM)および脾臓(SPL)におけるCAR T細胞(%リンパ球CD3+)およびPDX-AML細胞の頻度の分布。 $(n.d. = \text{不検出、データは1群当たり1} \sim 2 \text{匹のマウスの平均} \pm \text{SEMとして示される})$ 。

10

【図37-2】同上。

【0161】

【図38】図38A~38Bは、CD84を発現するAML-PDX細胞に指向されたB8 ScFv鎖の*in vivo*有効性を提供する。(図38A)NSGマウスに 1.0×10^6 個のAML-ルシフェラーゼ(LUC)発現細胞を尾部注射し、2日後、 5×10^6 個のCAR-T細胞(5:1のE:T比)または 10×10^6 個のCAR-T細胞(10:1のE:T比、 $n = 5 \sim 10$ 動物/群)で処置した。(図38B)CAR-T接種後12日目にAML-PDXおよびCAR-T細胞を注射したマウスの末梢血(PB)、骨髓(BM)、脾臓(SPL)および肺(LNG)におけるリンパ球およびPDX-AML細胞の頻度の分布。(データは1群当たり1~2匹のマウスの平均 $\pm$ SEMとして示される)。

20

【0162】

【図39-1】図39A~39Hは、造血前駆体に対するB8 ScFv鎖の*in vivo*オフターゲット効果を提供する。(図39A)NSGマウスに垂致死照射後に 10^6 個のヒトCD34⁺造血幹細胞(HSC)を生着させ、フローサイトメトリーによってヒト白血球生着について毎週チェックした。移植後+8週目に、マウスに 3×10^6 個の空のまたは抗CD84 B8 CAR T細胞を尾部静脈注射し、注入後+1日目から+8日目まで末梢血白血球組成のバリエーションについて毎日モニタリングした。(図39B)hCD34⁺HSCを移植したマウスの末梢血における白血球生着をモニタリングするための代表的なフローサイトメトリー戦略。(図39C~39H)空のCARまたはB8 CAR T細胞注入後のマウス($n = 1$)の末梢血においてフローサイトメトリーによって同定されたヒト造血前駆体の細胞の頻度のバリエーション。

30

【図39-2】同上。

【図39-3】同上。

40

【図39-4】同上。

【0163】

【図40-1】図40A~40Kは、CAR結合因子(ScFv)とCD69(図40A~40H)またはCD84(図40I~40K)との結合界面の予測を示す。ChimeraXソフトウェア(v.1.5)を使用すると、ScFvの分子モデルは、CD69またはCD84の細胞外ドメイン(uniprotによる配列)との複合体で存在し;配列中の接触残基が表示され、強調される。図40A~40Hは、scFv A1、C1、F1、G1、C2、F2、H2またはH3に結合したCD69細胞外ドメインの予測構造(上部)、ならびに結合ドメインが強調されたscFvのアミノ酸配列(下部)を示す。結果は、scFv A1、C1、F1、G1、C2、F2、H2およびH3がCD69の細

50

胞外ドメインに同様に結合することを示す。アミノ酸鎖ドッキングは、s c F v A 1、C 1、F 1、G 1、C 2、F 2、H 2およびH 3の間で同様であり、C D 6 9の細胞外ドメイン全体はもちろんS c F v（複数可）の細胞外ドメイン全体にも及ぶ。図40I～40Kは、s c F v B 8およびF 1 2に結合したC D 8 4細胞外ドメインの予測構造（上部）、ならびに結合ドメインが強調されたs c F vのアミノ酸配列（下部）を示す。これらの結果は、S c F v B 8およびF 1 2がC D 8 4の細胞外ドメインに同様に結合することを示す。アミノ酸鎖ドッキングは、s c F v B 8およびF 1 2の間で同様であり、C D 8 4の細胞外ドメイン全体はもちろんS c F v（複数可）の細胞外ドメイン全体にも及ぶ。

10

【図40-2】同上。

【図40-3】同上。

【図40-4】同上。

【図40-5】同上。

【図40-6】同上。

【図40-7】同上。

【図40-8】同上。

【図40-9】同上。

【図40-10】同上。

【図40-11】同上。

【発明を実施するための形態】

20

【0164】

3. 詳細な説明

3.1. 定義

本明細書で他に定義しない限り、本開示と併せて使用される科学用語および技術用語は、当業者が一般に理解する意味を有するものとする。さらに、文脈が他を要求しない限り、単数形の用語は、複数を含むものとし、複数形の用語は、単数形を含むものとする。一般に、本明細書に記載される細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーションと併せて使用される命名法、ならびにそれらの技法は、当該分野で周知であり、一般に使用されるものである。本開示の方法および技法は、一般に、他に示されない限り、当該分野で周知の従来の方法に従って、本明細書を通じて引用および議論される種々の一般的なおよびより具体的な参考文献に記載されるように、実施される。酵素反応および精製技法は、製造業者の仕様書に従って、当該分野で一般に遂行されるように、または本明細書に記載されるように、実施される。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学ならびに医薬および医薬品化学と併せて使用される術語、ならびにそれらの実験室手順および技法は、当該分野で周知であり、一般に使用されるものである。標準的な技法が、化学的合成、化学的分析、医薬品の調製、製剤化および送達、ならびに患者の処置のために使用され得る。

30

【0165】

以下の用語は、他に示されない限り、以下の意味を有すると理解するものとする。

【0166】

40

非ヒト種の名称によってさらに修飾されない限り、用語「C D 6 3」、「C D 6 3 タンパク質」および「C D 6 3 抗原」は、ヒトC D 6 3、または新生物細胞が含まれる細胞によって天然に発現される、もしくはC D 6 3 遺伝子（NCBIアクセッション番号：NG_008347、遺伝子ID 967）をトランスフェクトされた細胞によって発現されるヒトC D 6 3の任意のバリエーション（例えば、スプライスバリエーションおよび対立遺伝子バリエーション）、アイソフォームもしくは種オルソログを指すために本明細書で相互交換可能に使用される。

【0167】

非ヒト種の名称によってさらに修飾されない限り、用語「C D 1 5 1」、「C D 1 5 1 タンパク質」および「C D 1 5 1 抗原」は、ヒトC D 1 5 1、または新生物細胞が含まれ

50

る細胞によって天然に発現される、もしくはCD151遺伝子（NCBIアクセッション番号：NG_007478.1、遺伝子ID 977）をトランスフェクトされた細胞によって発現されるヒトCD151の任意のバリエーション（例えば、スプライスバリエーションおよび対立遺伝子バリエーション）、アイソフォームもしくは種オルソログを指すために本明細書で相互交換可能に使用される。

【0168】

非ヒト種の名称によってさらに修飾されない限り、用語「CD72」、「CD72タンパク質」および「CD72抗原」は、ヒトCD72、または新生物細胞が含まれる細胞によって天然に発現される、もしくはCD72遺伝子（NCBIアクセッション番号：NC_000009.12、遺伝子ID 971）をトランスフェクトされた細胞によって発現されるヒトCD72の任意のバリエーション（例えば、スプライスバリエーションおよび対立遺伝子バリエーション）、アイソフォームもしくは種オルソログを指すために本明細書で相互交換可能に使用される。

10

【0169】

非ヒト種の名称によってさらに修飾されない限り、用語「CD84」、「CD84タンパク質」および「CD84抗原」は、ヒトCD84、または新生物細胞が含まれる細胞によって天然に発現される、もしくはCD84遺伝子（NCBIアクセッション番号：NC_000001.11、遺伝子ID 8832）をトランスフェクトされた細胞によって発現されるヒトCD84の任意のバリエーション（例えば、スプライスバリエーションおよび対立遺伝子バリエーション）、アイソフォームもしくは種オルソログを指すために本明細書で相互交換可能に使用される。

20

【0170】

非ヒト種の名称によってさらに修飾されない限り、用語「CD69」、「CD69タンパク質」および「CD69抗原」は、ヒトCD69、または新生物細胞が含まれる細胞によって天然に発現される、もしくはCD69遺伝子（NCBIアクセッション番号：NC_000012.12、遺伝子ID 969）をトランスフェクトされた細胞によって発現されるヒトCD69の任意のバリエーション（例えば、スプライスバリエーションおよび対立遺伝子バリエーション）、アイソフォームもしくは種オルソログを指すために本明細書で相互交換可能に使用される。

【0171】

非ヒト種の名称によってさらに修飾されない限り、用語「CD109」、「CD109タンパク質」および「CD109抗原」は、ヒトCD69、または新生物細胞が含まれる細胞によって天然に発現される、もしくはCD109遺伝子（NCBIアクセッション番号：NC_000006.12、遺伝子ID 135228）をトランスフェクトされた細胞によって発現されるヒトCD109の任意のバリエーション（例えば、スプライスバリエーションおよび対立遺伝子バリエーション）、アイソフォームもしくは種オルソログを指すために本明細書で相互交換可能に使用される。

30

【0172】

用語「抗原結合タンパク質」（ABP）は、抗原またはエピトープに特異的に結合する1つまたは複数の抗原結合ドメインを含むタンパク質を指す。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、天然に存在する抗体の特異性および親和性と類似の特異性および親和性で抗原またはエピトープに結合する。一部の実施形態では、ABPは、抗体を含む。一部の実施形態では、ABPは、抗体からなる。一部の実施形態では、ABPは、抗体から本質的になる。一部の実施形態では、ABPは、代替的足場を含む。一部の実施形態では、ABPは、代替的足場からなる。一部の実施形態では、ABPは、代替的足場から本質的になる。一部の実施形態では、ABPは、抗体断片を含む。一部の実施形態では、ABPは、抗体断片からなる。一部の実施形態では、ABPは、抗体断片から本質的になる。例えば、「CD63」、「抗CD63 ABP」または「CD63特異的ABP」は、抗原CD63に特異的に結合する、本明細書で提供されるABPである。一部の実施形態では、ABPは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109の

40

50

細胞外ドメインに結合する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109 A B Pは、異なる種由来のCD151、CD72、CD84、CD69またはCD109タンパク質の間でまたはそれらの中で保存されている、それぞれCD151、CD72、CD84、CD69またはCD109のエピトープに結合する。

【0173】

用語「抗体」は、その最も広い意味で本明細書で使用され、抗原またはエピトープに特異的に結合する1つまたは複数の抗原結合ドメインを含むある特定の型の免疫グロブリン分子を含む。抗体には、無傷抗体（例えば、無傷免疫グロブリン）、抗体断片および多重特異性抗体が具体的に含まれる。抗原結合ドメインの一例は、 V_H-V_L ダイマーによって形成される抗原結合ドメインである。抗体は、A B Pの1つの型である。

10

【0174】

用語「抗原結合ドメイン」は、抗原またはエピトープに特異的に結合することが可能なA B Pの部分の意味する。

【0175】

用語「全長抗体」、「無傷抗体」および「全抗体」は、天然に存在する抗体構造と実質的に類似の構造を有し、F c領域を含む重鎖を有する抗体を指すために、本明細書で相互交換可能に使用される。

【0176】

用語「F c領域」は、天然に存在する抗体中の、F c受容体、および補体系のある特定のタンパク質と相互作用する、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を意味する。種々の免疫グロブリンのF c領域の構造、ならびにその中に含有されるグリコシル化部位は、当該分野で公知である。その全体が参照により組み込まれるSchroeder and Cavacini, J. Allergy Clin. Immunol., 2010, 125: S41-S52を参照されたい。F c領域は、天然に存在するF c領域、または本開示の他の場所で記載されるように改変されたF c領域であり得る。

20

【0177】

「抗体断片」は、無傷抗体の一部、例えば、無傷抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片には、例えば、F v断片、F a b断片、 $F(a b')_2$ 断片、F a b'断片、s c F v (s F v)断片およびs c F v-F c断片が含まれる。

30

【0178】

「F v」断片は、1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの非共有結合的に連結されたダイマーを含む。

【0179】

「F a b」断片は、重鎖および軽鎖可変ドメインに加えて、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン(C_H1)を含む。F a b断片は、例えば、組換え方法によって、または全長抗体のパイン消化によって、生成され得る。

【0180】

「 $F(a b')_2$ 」断片は、ジスルフィド結合によってヒンジ領域近傍で接合された2つのF a b'断片を含有する。F(a b')₂断片は、例えば、組換え方法によって、または無傷抗体のペプシン消化によって、生成され得る。F(a b')断片は、例えば、 β -メルカプトエタノールによる処置によって解離され得る。

40

【0181】

「単鎖F v」または「s F v」または「s c F v」抗体断片は、単一のポリペプチド鎖中に1つの V_H ドメインおよび1つの V_L ドメインを含む。 V_H および V_L は、一般に、ペプチドリンカーによって連結される。Pluckthun A. (1994)を参照されたい。一部の実施形態では、リンカーは、(GGGGG)_n (配列番号1)である。一部の実施形態では、n=1、2、3、4、5または6である。その全体が参照により組み込まれるAntibodies from Escherichia coli. In Rosenberg M. & Moore G. P. (Eds.), The P

50

harmacology of Monoclonal Antibodies vol. 113 (pp. 269-315). Springer-Verlag, New Yorkを参照されたい。

【0182】

「scFv-Fc」断片は、Fcドメインに結合されたscFvを含む。例えば、Fcドメインは、scFvのC末端に結合され得る。Fcドメインは、scFv中の可変ドメインの配向（即ち、V_H-V_LまたはV_L-V_H）に依存して、V_HまたはV_Lの後になり得る。当該分野で公知のまたは本明細書に記載される任意の適切なFcドメインが使用され得る。一部の 경우에는、Fcドメインは、IgG4 Fcドメインを含む。

【0183】

用語「単ドメイン抗体」は、他の可変ドメインの存在のない、抗体の1つの可変ドメインが抗原に特異的に結合する、分子を指す。

【0184】

「単一特異性ABP」は、単一のエピトープに特異的に結合する結合部位を含むABPである。単一特異性ABPの一例は、二価であるが、各抗原結合ドメインにおいて同じエピトープを認識する、天然に存在するIgG分子である。結合特異性は、任意の適切な価数で存在し得る。

【0185】

用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団由来の抗体を指す。実質的に均質な抗体の集団は、モノクローナル抗体の産生の際に通常生じ得るバリエーションを除いて、実質的に類似であり、同じエピトープ（複数可）に結合する抗体を含む。かかるバリエーションは、一般に、微量でのみ存在する。モノクローナル抗体は、典型的には、複数の抗体からの単一の抗体の選択を含むプロセスによって得られる。例えば、選択プロセスは、複数のクローン、例えば、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、酵母クローン、細菌クローンまたは他の組換えDNAクロンのプールからの、独自のクロンの選択であり得る。選択された抗体は、例えば、標的に対する親和性を改善するために（「親和性成熟」）、抗体をヒト化するために、細胞培養物中でのその産生を改善するために、および／または対象におけるその免疫原性を低減させるために、さらに変更され得る。

【0186】

用語「キメラ抗体」は、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の供給源または種に由来するが、重鎖および／または軽鎖の残部が、異なる供給源または種に由来する、抗体を指す。

【0187】

「ヒト化」形態の非ヒト抗体は、非ヒト抗体に由来する最小限の配列を含有するキメラ抗体である。ヒト化抗体は、一般に、1つまたは複数のCDR由来の残基が、非ヒト抗体（ドナー抗体）の1つまたは複数のCDR由来の残基によって置き換えられた、ヒト抗体（レシピエント抗体）である。ドナー抗体は、所望の特異性、親和性または生物学的効果を有する任意の適切な非ヒト抗体、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科動物または非ヒト霊長類抗体であり得る。一部の例では、レシピエント抗体の選択されたフレームワーク領域残基は、ドナー抗体由来の対応するフレームワーク領域残基によって置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体またはドナー抗体のいずれにおいても見出されない残基を含み得る。かかる改変は、抗体機能をさらに改良するためになされ得る。

【0188】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生された、またはヒト抗体レパートリーもしくはヒト抗体コード配列（例えば、ヒト供給源から得られたまたはde novoで設計された）を利用して非ヒト供給源から誘導された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体は、ヒト化抗体を具体的に除外する。

【0189】

「単離されたABP」または「単離された核酸」は、その天然の環境の構成要素から分

10

20

30

40

50

離および／または回収された A B P または核酸である。天然の環境の構成要素には、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性材料が含まれ得る。一部の実施形態では、単離された A B P は、例えば、スピニングカップシークエネーター (s p i n n i n g c u p s e q u e n a t o r) の使用によって N 末端または内部アミノ酸配列の少なくとも 15 残基を得るのに十分な程度まで、精製される。一部の実施形態では、単離された A B P は、クマシーブルーまたは銀染色による検出を用いる、還元条件または非還元条件下でのゲル電気泳動 (例えば、S D S - P A G E) によって、均質になるまで精製される。単離された A B P には、組換え細胞内の i n s i t u の A B P が含まれるが、それは、A B P の天然の環境の少なくとも 1 つの構成要素が存在しないからである。一部の実施形態では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 1 回の精製ステップによって調製される。一部の実施形態では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 80 重量%、85 重量%、90 重量%、95 重量%または 99 重量%まで精製される。一部の実施形態では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 80 体積%、85 体積%、90 体積%、95 体積%または 99 体積%まで精製される。一部の実施形態では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 85 重量%、90 重量%、95 重量%、98 重量%、99 重量%〜100 重量%の A B P または核酸を含む溶液として提供される。一部の実施形態では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 85 体積%、90 体積%、95 体積%、98 体積%、99 体積%〜100 体積%の A B P または核酸を含む溶液として提供される。

10

20

30

40

50

【0190】

「親和性」は、分子 (例えば、A B P) の単一の結合部位とその結合パートナー (例えば、抗原またはエピトープ) との間での非共有結合的相互作用の総計の強さを指す。他に示されない限り、本明細書で使用される場合、「親和性」は、結合対のメンバー (例えば、A B P および抗原またはエピトープ) 間での 1 : 1 の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。そのパートナー Y に対する分子 X の親和性は、解離平衡定数 (K_D) によって示され得る。解離平衡定数に寄与する速度論的構成要素は、以下でより詳細に記載される。親和性は、本明細書に記載されるものが含まれる当該分野で公知の一般的な方法によって測定され得る。親和性は、例えば、表面プラズモン共鳴 (S P R) 技術 (例えば、B I A C O R E (登録商標)) もしくはバイオレイヤー干渉法 (例えば、F O R T E B I O (登録商標)) を使用して、またはモノクローナル競合 E L I S A 試験によって、決定され得る。

【0191】

標的分子への A B P の結合に関して、特定の抗原 (例えば、ポリペプチド標的) または特定の抗原上のエピトープに「結合する」、「特異的結合」、「に特異的に結合する」、「に対して特異的な」、「選択的に結合する」および「に対して選択的な」という用語は、非特異的または非選択的相互作用 (例えば、非標的分子との) とは測定可能に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、標的分子への結合を測定し、それを非標的分子への結合と比較することによって、測定され得る。特異的結合は、標的分子上の認識されるエピトープを模倣する対照分子との競合によっても決定され得る。その場合、特異的結合は、標的分子への A B P の結合が、対照分子によって競合的に阻害される場合に示される。一部の実施形態では、非標的分子に対する C D 63、C D 151、C D 72、C D 84、C D 69 または C D 109 A B P の親和性は、それぞれ C D 63、C D 151、C D 72、C D 84、C D 69 または C D 109 に対する親和性の約 50 % 未満である。一部の実施形態では、非標的分子に対する C D 63、C D 151、C D 72、C D 84、C D 69 または C D 109 A B P の親和性は、それぞれ C D 63、C D 151、C D 72、C D 84、C D 69 または C D 109 に対する親和性の約 40 % 未満である。一部の実施形態では、非標的分子に対する C D 63、C D 151、C D 72、C D 84、C D 69 または C D 109 A B P の親和性は、C D 63、C D 151、C D 72、C D 84、C D 69 または C D 109 に対する親和性の約 30 % 未満である。一部の実施形態では、非標的分子に対する C D 63、C D 151、C D 72、C D 84、C D 69 または C D 109

A B P の親和性は、それぞれ C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 または C D 1 0 9 に対する親和性の約 2 0 % 未満である。一部の実施形態では、非標的分子に対する C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 または C D 1 0 9 A B P の親和性は、それぞれ C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 または C D 1 0 9 に対する親和性の約 1 0 % 未満である。一部の実施形態では、非標的分子に対する C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 または C D 1 0 9 A B P の親和性は、それぞれ C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 または C D 1 0 9 に対する親和性の約 1 % 未満である。一部の実施形態では、非標的分子に対する C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 または C D 1 0 9 A B P の親和性は、それぞれ C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 または C D 1 0 9 に対する親和性の約 0 . 1 % 未満である。

10

【0192】

用語「 k_d 」(秒^{-1})は、本明細書で使用される場合、特定の A B P - 抗原相互作用の解離速度定数を指す。この値は、 k_{off} 値とも呼ばれる。

【0193】

用語「 k_a 」($M^{-1} \times \text{秒}^{-1}$)は、本明細書で使用される場合、特定の A B P - 抗原相互作用の会合速度定数を指す。この値は、 k_{on} 値とも呼ばれる。

【0194】

用語「 K_D 」(M)は、本明細書で使用される場合、特定の A B P - 抗原相互作用の解離平衡定数を指す。 $K_D = k_d / k_a$ 。

20

【0195】

用語「 K_A 」(M^{-1})は、本明細書で使用される場合、特定の A B P - 抗原相互作用の会合平衡定数を指す。 $K_A = k_a / k_d$ 。

【0196】

「親和性成熟された」A B P は、変更を有さない親 A B P と比較して、その抗原に対する A B P の親和性における改善を生じる、1 つまたは複数の変更 (例えば、1 つまたは複数の C D R または F R 中の) を有する A B P である。一実施形態では、親和性成熟された A B P は、標的抗原に対するナノモル濃度またはピコモル濃度の親和性を有する。親和性成熟された A B P は、当該分野で公知の種々の方法を使用して産生され得る。例えば、Marks et al. (Bio/Technology, 1992, 10:779-783、その全体が参照により組み込まれる) は、V H および V L ドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載している。C D R および / またはフレームワーク残基のランダム突然変異誘発は、例えば、Barbas et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1994, 91:3809-3813); Schier et al., Gene, 1995, 169:147-155; Yelton et al., J. Immunol., 1995, 155:1994-2004; Jackson et al., J. Immunol., 1995, 154:3310-33199; および Hawkins et al., J. Mol. Biol., 1992, 226:889-896 によって記載され、それらは各々、その全体が参照により組み込まれる。

30

40

【0197】

「イムノコンジュゲート」は、1 つまたは複数の異種分子 (複数可) にコンジュゲートされた A B P である。

【0198】

「エフェクター機能」は、抗体の F c 領域によって媒介される生物活性を指し、これらの活性は、抗体アイソタイプに依存して変動し得る。抗体エフェクター機能の例には、補体依存性細胞傷害 (C D C) を活性化するための C 1 q 結合、抗体依存性細胞性細胞傷害 (A D C C) および抗体依存性細胞性ファゴサイトーシス (A D C P) を活性化するための F c 受容体結合が含まれる。

【0199】

50

2つまたはそれよりも多くのABPに関して本明細書で使用する場合、用語「～と競合する」または「～と交差競合する」は、2つまたはそれよりも多くのABPが、抗原（例えば、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109）への結合について競合することを示す。1つの例示的なアッセイでは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109が、表面上にコーティングされ、それぞれ第1のCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109 ABPと接触され、その後、第2のCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109 ABPが添加される。別の例示的なアッセイでは、第1のCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109 ABPが、表面上にコーティングされ、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109と接触され、次いで、第2のCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109 ABPが添加される。いずれのアッセイにおいても、第1のCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109 ABPの存在が、第2のCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109 ABPの結合を低減させる場合、これらのABPは競合する。用語「～と競合する」は、1つのABPが別のABPの結合を低減させるが、ABPが逆の順序で添加される場合には競合が観察されない、ABPの組合せもまた含む。しかし、一部の実施形態では、第1および第2のABPは、それらが添加される順序にかかわらず、互いの結合を阻害する。一部の実施形態では、1つのABPは、その抗原への別のABPの結合を、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%低減させる。当業者は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109に対するABPの親和性、およびABPの価数に基づいて、競合アッセイで使用する抗体の濃度を選択することができる。この定義に記載されるアッセイは例示的であり、当業者は、抗体が互いと競合するかどうかを決定するために、任意の適切なアッセイを利用することができる。適切なアッセイは、例えば、Cox et al., "Immunoassay Methods," in Assay Guidance Manual [Internet], Updated December 24, 2014 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/; accessed September 29, 2015); Silman et al., Cytometry, 2001, 44:30-37; および Finco et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 2011, 54:351-358に記載され、それらは各々、その全体が参照により組み込まれる。

【0200】

用語「エピトープ」は、ABPに特異的に結合する抗原の一部を意味する。エピトープは、頻繁に、表面アクセス可能なアミノ酸残基および／または糖側鎖からなり、特定の三次元構造特徴、ならびに特定の電荷特徴を有し得る。コンフォメーションエピトープおよび非コンフォメーションエピトープは、変性溶媒の存在下で前者への結合が喪失され得るが、後者への結合は喪失されないという点で、区別される。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基、および結合に直接的には関与しない他のアミノ酸残基を含み得る。ABPが結合するエピトープは、エピトープ決定のための公知の技法、例えば、異なる点突然変異を有するCD63、CD151、CD72、CD84、CD69もしくはCD109バリエーションへの、またはキメラCD63、CD151、CD72、CD84、CD69もしくはCD109バリエーションへのABP結合についての試験などを使用して、決定され得る。

【0201】

ポリペプチド配列と参照配列との間のパーセント「同一性」は、配列をアラインさせ、最大のパーセント配列同一性を達成するために、必要な場合、ギャップを導入した後の、参照配列中のアミノ酸残基と同一な、ポリペプチド配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定することを目的としたアライ

ンメントは、例えば、公に利用可能なコンピューターソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN (DNASTAR)、CLUSTAL W、CLUSTAL OMEGAまたはMUSCLEソフトウェアを使用して、当業者の技術範囲内の種々の方法で達成され得る。当業者は、比較されている配列の全長にわたって最大限のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含め、配列をアラインするための適切なパラメーターを決定することができる。

【0202】

用語「処置すること」（およびそのバリエーション、例えば、「処置する」または「処置」）は、それを必要とする対象における疾患または状態の天然の過程を変更することを試みた臨床的介入を指す。処置は、予防のために、および臨床病理の過程の間に、実施され得る。処置の望ましい効果は、疾患の発生または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減弱、転移の予防、疾患進行の速度の減少、病状の回復または緩和、および寛解、または改善された予後が含まれる。

10

【0203】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、哺乳動物対象を意味する。例示的な対象には、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ラクダ、ヤギ、ウサギおよびヒツジが含まれる。ある特定の実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、対象は、本明細書で提供されるABP、ABP-薬物コンジュゲート、またはCARを含む免疫応答性細胞で処置され得る疾患または状態を有する。一部の実施形態では、疾患または状態は、がんである。

20

【0204】

用語「細胞傷害剤」は、本明細書で使用される場合、細胞機能を阻害もしくは防止するおよび／または細胞死もしくは細胞破壊を引き起こす物質を指す。

【0205】

用語「骨髄性」は、本明細書で使用される場合、顆粒細胞（即ち、好中球、好酸球、好塩基球）、単球／マクロファージ、赤血球、巨核球および肥満細胞系譜に属する全ての細胞を含む。骨髄性悪性疾患は、造血幹または前駆細胞のクローン性疾患である。これらの悪性疾患は、骨髄および末梢血中に存在し得る。これらは、重要なプロセス、例えば、自己再生、増殖および損なわれた分化を乱す遺伝的変更およびエピジェネティック変更から生じ得る。

30

3.2. 他の解釈上の慣習

【0206】

本明細書で列举された範囲は、列举された端点を含めた、その範囲内の全ての値についての簡略表現であると理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50からなる群からの任意の数、数の組合せ、または部分範囲を含むと理解される。

【0207】

他に示されない限り、1つまたは複数の立体中心を有する化合物に対する言及は、その各立体異性体、および立体異性体の全ての組合せを意図する。

40

3.3. 腫瘍特異的抗原を標的化する組成物

【0208】

本開示の一態様は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される腫瘍特異的抗原を標的化するタンパク質に関する。

【0209】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原は、CD63である。一部の実施形態では、CD63は、CD63遺伝子（12q13.2）（NCBIアクセッション番号：NG_008347、遺伝子ID 967）によってコードされるタンパク質である。

50

【0210】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原は、CD151である。一部の実施形態では、CD151は、CD151遺伝子(11p15.5)(NCBIアクセッション番号: NG_007478.1、遺伝子ID 977)によってコードされるタンパク質である。同じタンパク質をコードする、複数の選択的にスプライスされた転写物バリエーションが、この遺伝子について記載されている。スプライスバリエーションのいずれもが、種々の実施形態で使用され得る。

【0211】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原は、CD72である。一部の実施形態では、CD72は、CD72遺伝子(9p13.3)(NCBIアクセッション番号: NC_000009.12、遺伝子ID 971)によってコードされるタンパク質である。

【0212】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原は、CD84である。一部の実施形態では、CD84は、CD84遺伝子(1q23.3)(NCBIアクセッション番号: NC_000001.11、遺伝子ID 8832)によってコードされるタンパク質である。

【0213】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原は、CD69である。一部の実施形態では、CD69は、CD69遺伝子(12p13.31)(NCBIアクセッション番号: NC_000012.12、遺伝子ID 969)によってコードされるタンパク質である。

【0214】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原は、CD109である。一部の実施形態では、CD109は、CD109遺伝子(6q13)(NCBIアクセッション番号: NC_000006.12、遺伝子ID 135228)によってコードされるタンパク質である。
3.3.1. 抗原結合タンパク質(ABP)

【0215】

一態様では、本開示は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109に特異的に結合する抗原結合タンパク質(ABP)を提供する。

【0216】

ある特定の実施形態では、ABPは、CD63に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD151に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD72に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD84に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD69に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD109に特異的に結合する。一部の実施形態では、ABPは、ヒトCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109に特異的に結合する単離された抗原結合タンパク質(ABP)である。ある特定の実施形態では、ABPは、CD84またはCD69に特異的に結合する。

【0217】

一部の実施形態では、ABPは、ヒトFcを含む。

【0218】

一部の実施形態では、ABPは、ヒト、ヒト化またはキメラABPである。

【0219】

特定の実施形態では、ABPは、モノクローナルである。

【0220】

一部の実施形態では、ABPは、投与された場合に、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を誘導することが可能である。一部の実施形態では、細胞表面CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109に結合するABPは、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)をもたらす。一部の実施形態では、ナチュラルキラー(NK)細胞は、NK細胞表面上のCD16への、ABPのFcドメインの結合によって、ADCCをもたらす。

【0221】

一部の実施形態では、A B P は、抗体断片を含む。一部の実施形態では、A B P は、免疫グロブリン定常領域を含む。抗体断片はまた、任意の合成のまたは遺伝子操作されたタンパク質であり得る。例えば、抗体断片には、軽鎖可変領域からなる単離された断片、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「F v」断片、軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって接続された組換え単鎖ポリペプチド分子（s c F v タンパク質）が含まれる。

【0222】

別の形態の抗体断片は、抗体の1つまたは複数の相補性決定領域（CDR）を含むペプチドである。CDR（「最小認識単位（minimal recognition unit）」または「超可変領域」とも呼ばれる）は、分子を抗原結合タンパク質にするために、共有結合的にまたは非共有結合的にのいずれかで分子中に取り込まれ得る。CDRは、目的のCDRをコードするポリヌクレオチドを構築することによって得られ得る。かかるポリヌクレオチドは、例えば、抗体産生細胞のmRNAを鋳型として使用して可変領域を合成するためにポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって、調製される（例えば、Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay Luck, “Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies, in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166 (Cambridge University Press 1995); および Ward et al., “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,” in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), page 137 (Wiley Liss, Inc. 1995) を参照されたい)。

【0223】

したがって、一実施形態では、抗体断片は、本明細書に記載される少なくとも1つのCDRを含む。結合剤は、本明細書に記載される少なくとも2、3、4、5または6つのCDRを含み得る。抗体断片は、本明細書に記載される抗体の少なくとも1つの可変領域ドメインをさらに含み得る。可変領域ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成のものであり得、ヒトCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109への結合を担う少なくとも1つのCDR配列、例えば、本明細書に具体的に記載されるHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2およびLC DR3を一般には含み、これらは、1つもしくは複数のフレームワーク配列と隣接しているまたはそれとインフレームである。一般的な用語では、可変（V）領域ドメインは、免疫グロブリン重（V_H）および／または軽（V_L）鎖可変ドメインの任意の適切な配置であり得る。したがって、例えば、V領域ドメインは、モノマー性であり得、1nM～1pMの範囲の親和性で標的抗原に独立して結合することが可能なV_HまたはV_Lドメインであり得る。あるいは、V領域ドメインは、ダイマー性であり得、V_HV_H、V_HV_LまたはV_LV_Lダイマーを含有し得る。V領域ダイマーは、非共有結合的に会合され得る少なくとも1つのV_H鎖および少なくとも1つのV_L鎖を含む（本明細書で以後F_vと呼ばれる）。所望により、これらの鎖は、単鎖F_v（s c F_v）を形成するために、例えば、2つの可変ドメイン間のジスルフィド結合を介して直接的に、またはペプチドリンカーなどのリンカーを介して、共有結合的にカップリングされ得る。

【0224】

可変領域ドメインは、任意の天然に存在する可変ドメインまたはその操作されたバージョンであり得る。操作されたバージョンとは、組換えDNA操作技法を使用して創出された可変領域ドメインを意味する。かかる操作されたバージョンには、例えば、特異的抗体のアミノ酸配列中のまたはそれへの挿入、欠失または変化によって、特異的抗体可変領域

から創出されたものが含まれる。特定の例には、少なくとも1つのCDR、ならびに必要なに応じて、第1の抗体由来の1つまたは複数のフレームワークアミノ酸および第2の抗体由来の可変領域ドメインの残部を含有する、操作された可変領域ドメインが含まれる。

【0225】

可変領域ドメインは、少なくとも1つの他の抗体ドメインまたはその断片に、C末端アミノ酸において共有結合的に結合され得る。したがって、例えば、可変領域ドメイン中に存在するV_Hドメインは、免疫グロブリンC_H1ドメインまたはその断片に連結され得る。同様に、V_Lドメインは、C_Kドメインまたはその断片に連結され得る。この方法で、例えば、抗体は、抗原結合ドメインが、それぞれC_H1およびC_KドメインにそれらのC末端において共有結合的に連結された会合したV_HおよびV_Lドメインを含有する、F_ab断片であり得る。C_H1ドメインは、例えば、F_ab'断片において見出されるヒンジ領域もしくはヒンジ領域ドメインの一部を提供するために、またはさらなるドメイン、例えば、抗体C_H2およびC_H3ドメインを提供するために、さらなるアミノ酸で延長され得る。

10

【0226】

本明細書に記載されるように、抗体は、これらのCDRのうちの少なくとも1つを含む。例えば、1つまたは複数のCDRは、公知の抗体フレームワーク領域（IgG1、IgG2など）中に取り込まれ得、またはその半減期を増強するために適切なビヒクルにコンジュゲートされ得る。適切なビヒクルには、Fc、ポリエチレングリコール（PEG）、アルブミン、トランスフェリンなどが含まれるがこれらに限定されない。これらおよび他の適切なビヒクルは、当該分野で公知である。かかるコンジュゲートされたCDRペプチドは、モノマー性、ダイマー性、テトラマー性または他の形態であり得る。一実施形態では、1つまたは複数の水溶性ポリマーが、結合剤の1つまたは複数の特定の位置において、例えば、アミノ末端において結合される。

20

【0227】

CD84またはCD69に特異的に結合する本開示のABPは、表10（V_LおよびV_HCDR）および表11（軽鎖および重鎖可変領域）中に見出され得る。

30

40

50

【表 10 - 1】

表 10: ABP の VL および VH CDR 配列

名称	標的 位置	LC CDR1	LC CDR2	LC CDR3	HC CDR1	HC CDR2	HC CDR3
Kabot 位置							
A1	CD69	SGSSNIGSNYYVA (配列番号 45)	DTNKRPS (配列番号 52)	GTWDSLSAEV (配列番号 55)	SNTASWN (配列番号 62)	KTEYRSGWFFEYAPSVGG (配列番号 65)	DSYNDYDNDGFDI (配列番号 70)
C1	CD69 および CD84	SGSSNIGSNYYVA (配列番号 45)	DTNKRPS (配列番号 52)	GTWDSLSAEV (配列番号 55)	SNSASWN (配列番号 63)	KTEYRSKWYFEYAPSVKS (配列番号 66)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 71)
F1	CD69	SGSSNIGSNYYVA (配列番号 46)	DNYKRPS (配列番号 53)	GSWDSLSAEV (配列番号 56)	SNSASWN (配列番号 63)	KTEYRSKWFEYAPSVKG (配列番号 67)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 71)
G1	CD69	SGSSNIGSNYYVS (配列番号 47)	DNNKRPS (配列番号 54)	GTWDSLSAEM (配列番号 57)	STTASWN (配列番号 64)	KTEYRSKWFEYAPSVKG (配列番号 67)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 71)
C2	CD69	SGSSNIGDNLVS (配列番号 48)	DNNKRPS (配列番号 54)	ESWDNLTAEV (配列番号 58)	SNSASWN (配列番号 63)	KVEYRSKWYDEYAPSVKS (配列番号 68)	DSYNGHAFDGFV (配列番号 72)
F2	CD69	SGSSNIEKNYYVS (配列番号 49)	DTNKRPS (配列番号 52)	GAWDNLTSEM (配列番号 59)	SNSASWN (配列番号 63)	KTEYRSKWFEYAPSVKG (配列番号 67)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 71)
H2	CD69	SGSSNIEKNYYVS (配列番号 49)	DTNKRPS (配列番号 52)	GAWDNLTSEM (配列番号 59)	SNSASWN (配列番号 63)	KTEYRSKWFEYAPSVKG (配列番号 67)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 71)
H3	CD69	SGRNSNIANNFVS (配列番号 50)	DNNKRPS (配列番号 54)	ESWDSLTAEV (配列番号 60)	SNTASWN (配列番号 62)	KTEYRSQWLHEYAPSVRS (配列番号 69)	DSYNGYAFDGFDT (配列番号 73)
F12	CD84	SGSSNIGSNYYVS (配列番号 47)	DNNKRPS (配列番号 54)	GTWDSLSAEV (配列番号 55)	SNSASWN (配列番号 63)	KVEYRSKWYDEYAPSVKS (配列番号 68)	DSYNGHAFDGFV (配列番号 72)
B8	CD84	SGTTSNIANNFVS (配列番号 51)	DNNKRPS (配列番号 54)	GVWDNLTSEM (配列番号 61)	SNSASWN (配列番号 63)	KVEYRSKWYDEYAPSVKS (配列番号 68)	DSYNGHAFDGFV (配列番号 72)
Chothia 位置							
A1	CD69	SGSSNIGSNYYVA (配列番号 107)	DTNKRPS (配列番号 108)	GTWDSLSAEV (配列番号 109)	GDSISNTA (配列番号 227)	EYRSGWF (配列番号 228)	DSYNDYDNDGFDI (配列番号 229)
HC CDR3							

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

C1	CD69 および CD84	SGSSNIGSNYVA (配列番号 110)	DTNKRPS (配列番号 111)	GTWSSLSAEV (配列番号 112)	GDSVSSNSA (配列番号 230)	EYRSKWY (配列番号 231)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 232)
F1	CD69	SGSSNVGNYYVA (配列番号 113)	DNYKRPS (配列番号 114)	GSWSSLSAEV (配列番号 115)	GDSVFSNSA (配列番号 233)	EYRSKWF (配列番号 234)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 235)
G1	CD69	SGSSNIGSNYVA (配列番号 116)	DTNKRPS (配列番号 117)	GTWSSLSAEV (配列番号 118)	GDSVFSITTA (配列番号 236)	EYRSKWF (配列番号 237)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 238)
C2	CD69	SGSSNIGDNLVS (配列番号 119)	DNKRPS (配列番号 120)	ESWDNLTAEV (配列番号 121)	GDSVSSNSA (配列番号 239)	EYRSKWY (配列番号 240)	DSYNGHAFDGFVDV (配列番号 241)
F2	CD69	SGSSNIGDNLVS (配列番号 122)	DNKRPS (配列番号 123)	ESWDNLTAEV (配列番号 124)	GDSVSSNSA (配列番号 242)	EYRSKWY (配列番号 243)	DSYNGHAFDGFVDV (配列番号 244)
H2	CD69	SGSSNIGNNYVS (配列番号 125)	DNKRPS (配列番号 126)	GTWSSLSAEV (配列番号 127)	GDSVSSNSA (配列番号 245)	EYRSKWY (配列番号 246)	DSYNGHAFDGFVDV (配列番号 247)
H3	CD69	SGRNSNIANNFVS (配列番号 128)	DNKRPS (配列番号 129)	ESWSSLSAEV (配列番号 130)	GDSVFSNTA (配列番号 248)	EYRSQWL (配列番号 249)	DSYNGYAFDGFDT (配列番号 250)
F12	CD84	SGSSNIGNNYVS (配列番号 131)	DNKRPS (配列番号 132)	GTWSSLSAEV (配列番号 133)	GDSVSSNSA (配列番号 251)	EYRSKWY (配列番号 252)	DSYNGHAFDGFVDV (配列番号 253)
B8	CD84	SGTTSNIANNFVS (配列番号 134)	DNKRPS (配列番号 135)	GVWDNLNAEV (配列番号 136)	GDSVSSNSA (配列番号 254)	EYRSKWY (配列番号 255)	DSYNGHAFDGFVDV (配列番号 256)
ARM 位置							
名称	標的	LC CDR1	LC CDR2	LC CDR3	HC CDR1	HC CDR2	HC CDR3
A1	CD69	SGSSNIGSNYVA (配列番号 137)	DTNKRPS (配列番号 138)	GTWSSLSAEV (配列番号 139)	GDSISNTASWN (配列番号 257)	KTEYRSGWFFE (配列番号 258)	DSYNDYDNDGFDI (配列番号 259)
C1	CD69 および CD84	SGSSNIGSNYVA (配列番号 140)	DTNKRPS (配列番号 141)	GTWSSLSAEV (配列番号 142)	GDSVSSNSASWN (配列番号 260)	KTEYRSKWYYE (配列番号 261)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 262)
F1	CD69	SGSSNVGNYYVA (配列番号 143)	DNYKRPS (配列番号 144)	GSWSSLSAEV (配列番号 145)	GDSVFSNSASWN (配列番号 263)	KTEYRSKWFFE (配列番号 264)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 265)
G1	CD69	SGSSNIGNNYVS (配列番号 146)	DNKRPS (配列番号 147)	GTWSSLSAEM (配列番号 148)	GDSVFSITASWN (配列番号 266)	KTEYRSKWFFE (配列番号 267)	DSYNGYDFDGFDI (配列番号 268)

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 3】

C2	CD69	SGSSNIGDNLVS (配列番号 149)	147) DNKRPS (配列番号 150)	ESWDNNLTAEV (配列番号 151)	GDSVSSNSASWN (配列番号 269)	KVEYRSKWYDE (配列番号 270)	DSYNGHAFDGFDFV (配列番号 271)
F2	CD69	SGSSNIGDNLVS (配列番号 152)	DNKRPS (配列番号 153)	ESWDNNLTAEV (配列番号 154)	GDSVFSNSASWN (配列番号 272)	KTEYRSKWFE (配列番号 273)	DSYNGYDFDGFDFI (配列番号 274)
H2	CD69	SGSSNIGNNYVS (配列番号 155)	DNKRPS (配列番号 156)	GTWDSSLSAEV (配列番号 157)	GDSVFSNSASWN (配列番号 275)	KTEYRSKWFE (配列番号 276)	DSYNGYDFDGFDFI (配列番号 277)
H3	CD69	SGRNSNIANNFVS (配列番号 158)	DNKRPS (配列番号 159)	ESWDSSLTAEV (配列番号 160)	GDSVFSNTASWN (配列番号 278)	KTEYRSQWLHE (配列番号 279)	DSYNGYAFDGFDT (配列番号 280)
F12	CD84	SGSSNIGNNYVS (配列番号 161)	DNKRPS (配列番号 162)	GTWDSSLSAEV (配列番号 163)	GDSVSSNSASWN (配列番号 281)	KVEYRSKWYDE (配列番号 282)	DSYNGHAFDGFDFV (配列番号 283)
B8	CD84	SGTTSNIANNFVS (配列番号 164)	DNKRPS (配列番号 165)	GVWDNLSLNAEV (配列番号 166)	GDSVSSNSASWN (配列番号 284)	KVEYRSKWYDE (配列番号 285)	DSYNGHAFDGFDFV (配列番号 286)
CONTACT 位置							
A1	CD69	IGSNYVAWY (配列番号 167)	LC CDR1	LC CDR2	LC CDR3	HC CDR1	HC CDR2
			LLIYDTNKRP (配列番号 168)	LLIYDTNKRP (配列番号 169)	GTWDSSLSAE (配列番号 170)	SSNTASWN (配列番号 287)	WVGKTEYRSGWFFE (配列番号 288)
C1	CD69 および CD84	IGSNYVAWY (配列番号 170)	LLIYDTNKRP (配列番号 171)	LLIYDTNKRP (配列番号 172)	GTWDSSLSAE (配列番号 173)	SSNSASWN (配列番号 290)	VLGKTEYRSKWYYE (配列番号 291)
F1	CD69	VGNMYVAWY (配列番号 173)	LLIYDNYKRP (配列番号 174)	LLIYDNYKRP (配列番号 175)	GSWDSSLSAE (配列番号 176)	FSNSASWN (配列番号 293)	VLGKTEYRSKWFE (配列番号 294)
G1	CD69	IGNNYVSWY (配列番号 176)	LLIYDNNKRP (配列番号 177)	LLIYDNNKRP (配列番号 178)	GTWDSSLSAE (配列番号 179)	FSTTASWN (配列番号 296)	VLGKTEYRSKWFE (配列番号 297)
C2	CD69	IGDNLVSWY (配列番号 179)	LLIYDNNKRP (配列番号 180)	LLIYDNNKRP (配列番号 181)	ESWDNNLTAE (配列番号 182)	SSNSASWN (配列番号 299)	VLGKVEYRSKWYDE (配列番号 300)
F2	CD69	IGDNLVSWY (配列番号 182)	LLIYDNNKRP (配列番号 183)	LLIYDNNKRP (配列番号 184)	ESWDNNLTAE (配列番号 185)	FSNSASWN (配列番号 302)	VLGKTEYRSKWFE (配列番号 303)

10

20

30

40

50

【表 10 - 4】

H2	CD69	IGNNYVSWY (配列番号 185)	LLIYDNNKRP (配列番号 186)	GTWDSLSAE (配列番号 187)	FSNSASWN (配列番号 305)	WLGKTEYRSKWFE (配列番号 306)	VRDSYNGYDFDGFDF (配列番号 307)
H3	CD69	IANNFVSWY (配列番号 188)	LLIYDNNKRP (配列番号 189)	ESWDSSLTAE (配列番号 190)	FSNTASWN (配列番号 308)	WLGKTEYRSQWLHE (配列番号 309)	VRDSYNGYAFDGFDF (配列番号 310)
F12	CD84	IGNNYVSWY (配列番号 191)	LLIYDNNKRP (配列番号 192)	GTWDSLSAE (配列番号 193)	SSNSASWN (配列番号 311)	WLGKVEYRSKWYDE (配列番号 312)	ARDSYNGHAFDGFDF (配列番号 313)
B8	CD84	IANNFVSWY (配列番号 194)	LLINDNNKRP (配列番号 195)	GVWDNLSLNAE (配列番号 196)	SSNSASWN (配列番号 314)	WLGKVEYRSKWYDE (配列番号 315)	ARDSYNGHAFDGFDF (配列番号 316)
IMGT 位置							
名称	標的	LC CDR1	LC CDR2	LC CDR3	HC CDR1	HC CDR2	HC CDR3
A1	CD69	SSNIGSNY (配列番号 197)	DT (配列番号 198)	GTWDSLSAEV (配列番号 199)	GDSISNTAS (配列番号 317)	TEYRSKWFF (配列番号 318)	ARDSYNDYDNDGFDFI (配列番号 319)
C1	CD69 および CD84	SSNIGSNY (配列番号 200)	DT (配列番号 201)	GTWDSLSAEV (配列番号 202)	GDSVSSNSAS (配列番号 320)	TEYRSKWYY (配列番号 321)	VRDSYNGYDFDGFDFI (配列番号 322)
F1	CD69	SSNIGSNY (配列番号 203)	DN (配列番号 204)	GTWDSLSAEV (配列番号 205)	GDSVFSNSAS (配列番号 323)	TEYRSKWFD (配列番号 324)	VRDSYNGYDFDGFDFI (配列番号 325)
G1	CD69	SSNIGSNY (配列番号 206)	DN (配列番号 207)	GTWDSLSAEM (配列番号 208)	GDSVFSNTAS (配列番号 326)	TEYRSKWFD (配列番号 327)	VRDSYNGYDFDGFDFI (配列番号 328)
C2	CD69	SSNIGDNL (配列番号 209)	DN (配列番号 210)	ESWDNNLTAEV (配列番号 211)	GDSVSSNSAS (配列番号 329)	VEYRSKWYD (配列番号 330)	ARDSYNGHAFDGFDFV (配列番号 331)
F2	CD69	SSNIGDNL (配列番号 212)	DN (配列番号 213)	ESWDNNLTAEV (配列番号 214)	GDSVFSNSAS (配列番号 332)	TEYRSKWFD (配列番号 333)	VRDSYNGYDFDGFDFI (配列番号 334)
H2	CD69	SSNIGSNY (配列番号 215)	DN (配列番号 216)	GTWDSLSAEV (配列番号 217)	GDSVFSNSAS (配列番号 335)	TEYRSKWFD (配列番号 336)	VRDSYNGYDFDGFDFI (配列番号 337)
H3	CD69	NSNIANNF (配列番号 218)	DN (配列番号 219)	ESWDSSLTAEV (配列番号 220)	GDSVFSNTAS (配列番号 338)	TEYRSQWLH (配列番号 339)	VRDSYNGYAFDGFDFI (配列番号 340)
F12	CD84	SSNIGSNY (配列番号 221)	DN (配列番号 222)	GTWDSLSAEV (配列番号 223)	GDSVSSNSAS (配列番号 341)	VEYRSKWYD (配列番号 342)	ARDSYNGHAFDGFDFV (配列番号 343)

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 5】

B8	CD84	TSNIANNF (配列番号 224)	DN (配列番号 225)	GVWDNSLNAEV (配列番号 226)	GDSVSSNSAS (配列番号 344)	VEYRSKWYD (配列番号 345)	ARDSYNGHAFDGFDDV (配列番号 346)
----	------	------------------------	------------------	---------------------------	--------------------------	-------------------------	--------------------------------

10

20

30

【0 2 2 8】

一部の実施形態では、A B Pは、表 1 0の配列番号 4 5 ～ 5 1 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %または 1 0 0 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（V_L）C D R 1を含む。

40

【0 2 2 9】

一部の実施形態では、A B Pは、表 1 0の配列番号 5 2 ～ 5 4 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %または 1 0 0 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（V_L）C D R 2を含む。

【0 2 3 0】

一部の実施形態では、A B Pは、表 1 0の配列番号 5 5 ～ 6 1 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8

50

%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_L)CDR3を含む。

【0231】

一部の実施形態では、ABPは、表10の(a)配列番号45~51から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_LCDR1；(b)配列番号52~54から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_LCDR2；および(c)配列番号55~61から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_LCDR3を含む。

10

【0232】

一部の実施形態では、ABPは、(a)表10のV_LCDR1アミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_LCDR1；(b)表10のV_LCDR2アミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_LCDR2；および(c)表10のV_LCDR3アミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_LCDR3を含む。

20

【0233】

一部の実施形態では、ABPは、(a)表10のV_HCDR1アミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_H)CDR1を含む。一部の実施形態では、ABPは、(b)表10のV_HCDR2アミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_HCDR2を含む。一部の実施形態では、ABPは、表10のV_HCDR3アミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_HCDR3を含む。

30

【0234】

一部の実施形態では、ABPは、(a)配列番号62~64から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_H)CDR1を含む。一部の実施形態では、ABPは、(b)配列番号65~69から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_HCDR2を含む。一部の実施形態では、ABPは、配列番号70~73から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_HCDR3を含む。

40

【0235】

一部の実施形態では、ABPは、(a)SNTASWN(配列番号62)；SNSASWN(配列番号63)；およびSTTASWN(配列番号64)から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV_HCDR1；(b)配列番号65~69から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%

50

、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V_H C D R 2 ; ならびに (c) 配列番号 70 ~ 73 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V_H C D R 3 を含む。

【 0 2 3 6 】

一部の実施形態では、A B P は、A 1、C 1、F 1、G 1、C 2、F 2、H 2、H 3、F 1 2 および B 8 から選択される抗体と同一な C D R 配列を含む。

【 0 2 3 7 】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 4 5 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 2 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 5 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 2 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 5 の配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 7 0 の配列を有する V_H C D R 3 を含む。

10

【 0 2 3 8 】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 4 5 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 2 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 5 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 6 の配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3 を含む。

【 0 2 3 9 】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 4 6 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 3 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 6 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 7 の配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3 を含む。

20

【 0 2 4 0 】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 4 7 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 4 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 7 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 4 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 7 の配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3 を含む。

【 0 2 4 1 】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 4 8 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 4 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 8 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 8 の配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 7 2 の配列を有する V_H C D R 3 を含む。

30

【 0 2 4 2 】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 4 9 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 2 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 9 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 7 の配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3 を含む。

【 0 2 4 3 】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 4 9 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 2 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 5 9 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 3 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 7 の配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 7 1 の配列を有する V_H C D R 3 を含む。

40

【 0 2 4 4 】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 5 0 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号 5 4 の配列を有する V_L C D R 2、配列番号 6 0 の配列を有する V_L C D R 3、配列番号 6 2 の配列を有する V_H C D R 1、配列番号 6 9 の配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 7 3 の配列を有する V_H C D R 3 を含む。

【 0 2 4 5 】

一部の実施形態では、A B P は、配列番号 4 7 の配列を有する V_L C D R 1、配列番号

50

54の配列を有するV_LCDR2、配列番号55の配列を有するV_LCDR3、配列番号63の配列を有するV_HCDR1、配列番号68の配列を有するV_HCDR2および配列番号72の配列を有するV_HCDR3を含む。

【0246】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号51の配列を有するV_LCDR1、配列番号54の配列を有するV_LCDR2、配列番号61の配列を有するV_LCDR3、配列番号63の配列を有するV_HCDR1、配列番号68の配列を有するV_HCDR2および配列番号72の配列を有するV_HCDR3を含む。

【0247】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号45の配列を有するV_LCDR1、配列番号52の配列を有するV_LCDR2、配列番号55の配列を有するV_LCDR3、配列番号63の配列を有するV_HCDR1、配列番号66の配列を有するV_HCDR2および配列番号71の配列を有するV_HCDR3を含む。

【0248】

一部の実施形態では、ABPは、抗体を含む。一部の実施形態では、ABPは、モノクローナル抗体である。一部の実施形態では、ABPは、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体から選択される。一部の実施形態では、ABPは、単鎖可変断片(scfv)である。一部の実施形態では、ABPは、抗体断片を含む。一部の実施形態では、ABPは、免疫グロブリン定常領域を含む。

【0249】

一部の実施形態では、ABPは、表11の配列番号74～88のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%または少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 1 1 : Kabat位置によるABPのV_LおよびV_H CDR配列

名称	標的	重鎖可変配列	軽鎖可変配列
A1	CD69	QVQLQQSGFGLVQPSRSLTCAISGDSISNTA SWNWIRQSPSRGLEWVGKTEYRSGWFFAYAPS VGGRVNISPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYFC ARDSYNDYDNDGFDIWGQGTLLVTVSS (配列番号 82)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVITISCGSSSN IGSNYVAWYQQLPGLTAPKLLIYDITNK RPSGIPDRFSGSKSGTSATLITGLQTG DEADYYCGTWDSSLAEVFGTGKVT VL (配列番号 74)
C1	CD69 および CD84	QVQLQQSGFGLVKPSQTLTCAISGDSVFSNSA SWNWIRQSPSRGLEWLGKTEYRSKWYFEFAPS VKSRITTPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCV RDSYNGYDFDGDIGWGQGTLLVTVSS (配列番号 83)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVITISCGSSSN IGSNYVAWYQQLPGLTAPKLLIYDITNK RPSGIPDRFSGSKSGTSATLITGLQTG DEADYYCGTWDSSLAEVFGTGKVT VL (配列番号 74)
F1	CD69	QVQLQQSGFGLVKPSQTLTCAISGDSVFSNSA SWNWIRQSPSRGLEWLGKTEYRSKWFFDEYAPS VKGRIAIRPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYC VRDSYNGYDFDGDIGWGQGTLLVTVSS (配列番号 84)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVITISCGSSSN VGNVYVAWYQQVPGAAPRLIYDNY KRPSGIPDRFSGSKSGTSATLITGLQS GDEADYYCGSWDSSLAEVFGGIGTKL TAL (配列番号 75)
G1	CD69	QVQLQQSGFGLVKPSQTLTCAISGDSVFSITTA SWNWIRQSPSRGLEWLGKTEYRSKWFFDEYAPS VKGRIAIRPDTSRNQVSLQLNSMTPTDITAVYYFC VRDSYNGYDFDGDIGWGQGTLLVTVSS (配列番号 85)	QSVVTPPPSVSAAPGQKVITISCGSSSN IGNNYVSWYQQLPGLTAPKLLIYDNNK RPSGIPDRFSGSKSGTSATLITGLQTG DEADYYCGTWDSSLAEVFGGIGTKVT VL (配列番号 76)
C2	CD69	QVQLQQSGFGLVKPSQTLTCAISGDSVFSNSA SWNWIRQSPSRGLEWLGKTEYRSKWYFEYAPS VKSRIAIRPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCA RDSYNGHAFDGDVWGQGTLLVTVSS (配列番号 86)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVITISCGSSSN IGDNLVSWYQQLPGLTAPKLLIYDNNK RPSGIPDRFSGSKSGTSATLITGLQTG DEADYYCESWDNNLTAEVFGTGKVT VL (配列番号 77)
F2	CD69	QVQLQQSGFGLVKPSQTLTCAISGDSVFSNSA SWNWIRQSPSRGLEWLGKTEYRSKWFFDEYAPS VKGRIAIRPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYC VRDSYNGYDFDGDIGWGQGTLLVTVSS (配列番号 84)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVITISCGSSSN IGDNLVSWYQQLPGLTAPKLLIYDNNK RPSGIPDRFSGSKSGTSATLITGLQTG DEADYYCESWDNNLTAEVFGTGKVT VL (配列番号 77)
H2	CD69	QVQLQQSGFGLVKPSQTLTCAISGDSVFSNSA	QSVVTPPPSVSAAPGQKVITISCGSSSN

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

H3	CD69	SWNWIRQSPSRGLEWLGKTEYRSKWFDEYAPS VKGRIRPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYC VRDSYNGYDFDGFDFWGGQTLVTSS (配列番号 84)	IGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNK RPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTG DEADYYCGTWDSSLAEVFGGGTKLT VL (配列番号 78)
		QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLTCDSIGDSVFSNTA SWNWIRQSPSRGLEWLGKTEYRSQWLHEYAPS VRSRIARPDTSKNQVSLQLSFVTPEDTAVYYCV RDSYNGYAFDGFDTWGGQTLVTSS (配列番号 87)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSSGRNS NIANNFVSWYRQLPGTAPKLLIYDNNK RPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTG DEADYYCESWDSSLAEVFGGTGKVT VL (配列番号 79)
F12	CD84	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLTCASIGDSVSSNSA SWNWIRQSPSRGLEWLGKVEYRSKWDYDEYAPS VKSRIARPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCA RDSYNGHAFDGFDFWGGQTMVTSS (配列番号 88)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSSSSN IGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNK RPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTG DEADYYCGTWDSSLAEVFGGGTKVT VL (配列番号 80)
		QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLTCASIGDSVSSNSA SWNWIRQSPSRGLEWLGKVEYRSKWDYDEYAPS VKSRIARPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCA RDSYNGHAFDGFDFWGGQTMVTSS (配列番号 88)	QSVLTQPPSLSAAPGQRVTISCSTTSN IANNFVSWYQQLSGSAAPKLLINDNNKR PSGIPDRFSGSKSGASATLGITGLQTED EADYYCGVWDNSLNAEVFGGGTKVT VL (配列番号 81)

【0250】

一部の実施形態では、ABPは、表11の配列番号82～88のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%または少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0251】

一部の実施形態では、ABPは、表11の配列番号74～81のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%または少なくとも100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0252】

一部の実施形態では、ABPは、A1、C1、F1、G1、C2、F2、H2、H3、F12およびB8から選択される抗体の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む

10

20

30

40

50

。

【0253】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号82の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号74の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0254】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号83の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号74の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0255】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号84の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号75の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0256】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号85の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号76の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0257】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号86の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号77の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0258】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号84の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号77の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0259】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号84の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号78の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0260】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号87の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号79の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0261】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号88の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号80の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0262】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号88の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号81の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0263】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号83の配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号74の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0264】

一部の実施形態では、ABPは、scFvを含む。一部の実施形態では、ABPは、scFvである。一部の実施形態では、scFvは、表12の配列番号89～98のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【表12-1】

表12: Kabat位置によるABPのscFvアミノ酸配列

scFv	アミノ酸配列	配列番号

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

A1	QVQLQQSGPGLVQPSRTLSLTCAISGDSISSNTASWNWIRQSPSRGLEWVGKTEYRSGWFFEY APSVGGRVNISPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYFCARDSYNDYDNDGFDIWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGSGGGSGSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGSNYVAWYQQLPG TAPKLLIYDTNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWSSLSAEVFGTGTK VTVL	89
C1	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLKTEYRSKWYWE FAPSVKSRITITPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCVRDSYNGYDFDGFDIWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGSGGGSGSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGSNYVAWYQQLPG TAPKLLIYDTNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWSSLSAEVFGTGTK VTVL	90
F1	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFSNSASWNWIRQSPSRGLEWLKTEYRSKWFDE YAPSVKGRIARPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCVRDSYNGYDFDGFDIWGQGLTVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGSVLTQPPSVSAAPGQVVIISCSGSSNIGSNYVAWYQQVP GAAPRLIYDNYKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQSGDEADYYCGSWDSSLSAEVFGGG TKLTAL	91
G1	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFSTTASWNWIRQSPSRGLEWLKTEYRSKWFDE YAPSVKGRIARPDTSKNQVSLQLNSMTPEDTAVYFCVRDSYNGYDFDGFDIWGQGLTVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGSNYVSWYQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWSSLSAEMFGGG TKVTVL	92
C2	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLKVEYRSKWYDE YAPSVKSRLAIRPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCARDSYNGHAFDGFVWGQGLTVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGDNLVSWYQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLDITGLQTGDEADYYCESWDNNLTAEVFGTG TKVTVL	93
F2	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFSNSASWNWIRQSPSRGLEWLKTEYRSKWFDE YAPSVKGRIARPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCVRDSYNGYDFDGFDIWGQGLTVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIEKNYVSWYQQLP	94

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 3】

	GTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGAWDNILNSEMFGGG TKLTVL	
H2	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFSNSASWNWIRQSPSRGLEWLKTEYRSKWFE YAPSVKGRIRPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCVRDSYNGYDFDGFDTWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWSSLSAEVFGGG TKLTVL	95
H3	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCDISGDSVFSNTASWNWIRQSPSRGLEWLKTEYRSQWLHE YAPSVRSRIARPDTSKNQVSLQLSFVTPEDTAVYYCVRDSYNGYAFDGFDTWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGRNSNIANNFVSWYRQLP GTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCESWDSSLTAEVFGTGT KVTVL	96
F12	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLKVEYRSKWYDE YAPSVKSRIARPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCARDSDYNGHAFDGFDTWGQGMVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWSSLSAEVFGGG TKVTVL	97
B8	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLKVEYRSKWYDE YAPSVKSRIARPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCARDSDYNGHAFDGFDTWGQGMVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSVLTQPPSLSAAPGQKVTISCSGTTSNIANNFVSWYQQLS GSAPKLLINDNNKRPSGIPDRFSGSKSGASATLAITGLQTEADYYCGVWDNSLNAEVFGGG TKVTVL	98

10

20

【0 2 6 5】

ある特定の実施形態では、A B Pは、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、s c F v、(s c F v)₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、直鎖状抗体、Vドメイン抗体、二重特異性タンデム二価s c F vまたは二重特異性T細胞エンゲージャー (B i T E) を含む。

【0 2 6 6】

特定の実施形態では、A B Pは、F c、必要に応じてヒトF cを含む。

30

【0 2 6 7】

一部の実施形態では、A B Pは、I g G、I g A、I g D、I g EおよびI g Mから選択されるクラスの重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、A B Pは、クラスI g GならびにI g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4から選択されるサブクラスの重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、A B Pは、I g Gの重鎖定常領域を含む。ある特定の実施形態では、A B Pは、I g G 1の重鎖定常領域を含む。

【0 2 6 8】

一部の実施形態では、A B Pは、二重特異性または多重特異性である。一部の実施形態では、A B Pは、脱フコシル化されている。

【0 2 6 9】

A B Pを含む医薬組成物のうちの1つまたは複数、および医薬組成物の使用のための使用説明書を含むキットもまた提供される。本明細書に記載されるA B Pを含む医薬組成物もまた提供される。

40

【0 2 7 0】

本明細書で提供されるA B Pをコードする単離されたポリヌクレオチド、またはその部分もまた提供される。かかるポリヌクレオチドを含むベクターもまた提供される。かかるポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞およびかかるベクターを含む組換え宿主細胞もまた提供される。

【0 2 7 1】

本明細書で提供されるポリヌクレオチド、ベクターまたは宿主細胞を使用してA B Pを

50

產生する方法もまた提供される。一部の態様では、本開示は、ヒトCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109に特異的に結合するABPを產生する方法であって、ABPを宿主細胞において発現させるステップ、およびABPを単離するステップを含む、方法を提供する。

3.3.2. ABP-薬物コンジュゲート

【0272】

本開示の別の態様は、抗原結合タンパク質（ABP）-薬物コンジュゲートを提供すること。

【0273】

一部の実施形態では、ABP-薬物コンジュゲートは、抗原結合タンパク質（ABP）、ABPに連結された細胞傷害剤、および必要に応じて、細胞傷害剤をABPに連結するリンカーを含み、ABPは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する。

【0274】

一部の実施形態では、ABP-薬物コンジュゲートは、3.3.1に記載される抗原結合タンパク質（ABP）のうちの1つまたは複数を含む。

【0275】

ある特定の実施形態では、ABPは、CD63に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD151に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD72に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD84に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD69に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ABPは、CD109に特異的に結合する。

【0276】

一部の実施形態では、ABPは、ヒト、ヒト化またはキメラABPである。一部の実施形態では、ABPは、モノクローナルである。一部の実施形態では、ABPは、二重特異性または多重特異性である。

【0277】

一部の実施形態では、ABPは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、直鎖状抗体またはVドメイン抗体を含む。

【0278】

一部の実施形態では、ABPは、Fc、必要に応じてヒトFcを含む。

【0279】

一部の実施形態では、ABPは、IgG、IgA、IgD、IgEおよびIgMから選択されるクラスの重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、ABPは、クラスIgGならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から選択されるサブクラスの重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、ABPは、IgG1の重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、ABPは、可変重鎖領域を含む。一部の実施形態では、ABPは、可変軽鎖領域を含む。一部の実施形態では、ABPは、可変重鎖領域および可変軽鎖領域を含む。一部の実施形態では、ABPは、抗体結合性断片である。抗体および抗原結合性断片は、3.4.1「抗原結合タンパク質（ABP）」に記載されている。

【0280】

一部の実施形態では、細胞傷害剤は、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、有糸分裂阻害剤、抗キナーゼ剤、アルキル化剤、ホルモン、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト、ケモカイン、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、代謝拮抗薬、抗生物質、アルカロイドまたは放射性同位体を含む。

【0281】

一部の実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、リンカーは、非切断性リンカーである。

【0282】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、リンカーの骨格は、長さが100原子もしくはそれ未満、例えば、長さが50原子もしくはそれ未満、または20原子もしくはそれ未満である。他の実施形態では、リンカーの骨格は、長さが100原子またはそれよりも大きい。リンカーまたは連結は、2つの基を接続する共有結合、または長さが1原子と100原子との間、例えば、長さが1原子と50原子との間もしくは長さが1原子と20原子との間の、例えば、長さが約1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18もしくは20炭素原子の鎖であり得、リンカーは、直鎖状、分岐鎖、環状または単一原子であり得る。ある特定の実施形態では、リンカー骨格の1、2、3、4もしくは5つまたはそれよりも多くの炭素原子は、硫黄、窒素または酸素ヘテロ原子で必要に応じて置換され得る。骨格原子間の結合は、飽和または不飽和であり得、通常、1、2または3つ以下の不飽和結合が、リンカー骨格中に存在する。リンカーは、1つまたは複数の置換基を含み得る、例えば、アルキル、アリールまたはアルケニル基を有する。リンカーには、オリゴ（エチレングリコール）；エーテル、チオエーテル、第3級アミン、直鎖または分岐鎖であり得るアルキル、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、1-メチルエチル（イソプロピル）、*n*-ブチル、*n*-ペンチル、1,1-ジメチルエチル（*t*-ブチル）などが含まれ得るがこれらに限定されない。リンカー骨格は、環状基、例えば、アリール、複素環またはシクロアルキル基を含み得、環状基の2つまたはそれよりも多くの原子、例えば、2、3または4つの原子は、骨格中に含まれる。リンカーは、ペプチド性または非ペプチド性であり得る。

10

20

【0283】

抗体-薬物コンジュゲートリンカーおよび化学の非限定的な例は、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20200277306号および同第20190328900号A1；ならびに米国特許第7750116号B1において見出され得る。ADC化学の追加の非限定的な例は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Olivier et al., (2017) “Antibody-Drug Conjugates: Fundamentals, Drug Development, and Clinical Outcomes to Target Cancer” ISBN: 978-1-119-06068-0)に記載されている。

30

【0284】

本開示の態様は、ABP-薬物コンジュゲートをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、部位特異的組込みのための標的ゲノム領域に対して相同な配列をさらに含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼ、例えば、CRISPR-Casシステム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）およびメガヌクレアーゼを使用する遺伝子編集のために設計される。

40

【0285】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ウイルスまたは非ウイルスベクター中にある。ベクターは、ポリヌクレオチドを標的細胞に*in vitro*または*in vivo*で送達するために使用され得る。

50

【0286】

一部の実施形態では、方法は、ポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクター、またはその医薬組成物を投与するステップを含む。一部の実施形態では、非ウイルスベクターまたは非ウイルス的方法は、ポリヌクレオチドを標的細胞に*in vitro*または*in vivo*で送達するために使用される。

【0287】

ポリヌクレオチドを送達するための本発明の方法において使用され得る非ウイルス的送達方法の非限定的な例には、物理的方法、針、マイクロプロジェクトイル遺伝子移入もしくは遺伝子銃、電気穿孔、ソノポレーション、フォトポレーション（*photoporation*）、マグネトフェクション、ハイドロポレーション（*hydroporation*）

50

n)、機械的マッサージ、化学的ベクター無機粒子、リン酸カルシウム粒子、磁気粒子、ポリマーベースのベクター、または遺伝子送達剤、例えば、シリカ、金、カチオン性脂質、脂質ナノエマルジョン、固体脂質ナノ粒子ポリエチレンイミン (PEI)、キトサン、ポリ (DL-ラクチド) (PLA) およびポリ (DL-ラクチド-co-グリコシド) (PLGA)、デンドリマーもしくはポリメタクリレートが含まれるがこれらに限定されない。かかる方法は、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ramamoorthy et al., (Ramamoorthy et al., (2015) J. Clin. Diagnostic Res. 9 (1): GE01-GE06) および Sung et al., (Sung et al., (2019) Biomaterials Research 23 (8), pgs 1-87) において見出され得る。

10

3.3.3. 二重特異性T細胞エンゲージャー (BiTE)

【0288】

本開示の態様は、抗原結合ドメインおよびT細胞活性化ドメインを含む二重特異性T細胞エンゲージャー (BiTE) を含む。

【0289】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的抗原に特異的に結合する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、本明細書に記載されるABPのうちのいずれか1つである。

20

【0290】

ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、細胞外抗原結合ドメインである。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD63に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD151に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD72に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD84に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD69に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD109に特異的に結合する。

【0291】

BiTEの一例は、細胞外認識ドメイン (例えば、抗原結合ドメイン) および1つまたは複数のT細胞活性化ドメインの融合物である。抗原エンゲージメントの際に、BiTEの細胞内シグナル伝達部分は、T細胞特異的分子で活性化関連応答を開始させ得、それにより、T細胞活性化、腫瘍殺滅および／またはサイトカイン産生を刺激する。

30

【0292】

一部の実施形態では、BiTEは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0293】

一部の実施形態では、二重特異性T細胞エンゲージャー (BiTE) は、単一のポリペプチド鎖として産生される2つのscFvを含有し得る。ある特定の実施形態では、BiTEは、標的タンパク質 (CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109) に特異的に結合する抗体の2つのscFvを含む。BiTE抗体を作製する方法および使用する方法は、当該分野で記載されている。例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Cioffi et al., Clin Cancer Res 18: 465, Brischwein et al., Mol Immunol 43: 1129-43 (2006); Amann M et al., Cancer Res 68: 143-51 (2008); Schlereth et al., Cancer Res 65: 2882-2889 (2005); および Schlereth et al., Cancer Immunol Immunother 55: 785-796 (2006); Huehls A., et al

40

50

l., Immunol Cell Biol. 93 (3): 290-296 (2014); Wang et al., Antibodies. 8 (32): 1-30 (2019) を参照されたい。

【0294】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、標的タンパク質（CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109）に特異的に結合する抗体の単鎖可変断片（scFv）を含む。

【0295】

一部の実施形態では、T細胞活性化ドメインは、CD3に特異的に結合する抗体の単鎖可変断片（scFv）を含む。一部の実施形態では、T細胞活性化ドメインは、CD3ζの細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、T細胞活性化ドメインは、ZAP-70細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を含む。

【0296】

抗原結合ドメインおよびT細胞活性化ドメインが共にscFvを含む非限定的な例では、scFvは、各Fvの重鎖および軽鎖をセリン-グリシンリンカー配列で接続することによって生成され得る。

【0297】

ある特定の実施形態では、リンカーは、1つまたは複数の、2つまたはそれよりも多くの、3つまたはそれよりも多くの、4つまたはそれよりも多くの、5つまたはそれよりも多くの、あるいは6つまたはそれよりも多くのGGGGSリピート（配列番号2として開示される「GGGGS」）を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、GGGGS（配列番号2）のアミノ酸配列を含む。

【0298】

ある特定の実施形態では、リンカーは、1つまたは複数の、2つまたはそれよりも多くの、3つまたはそれよりも多くの、4つまたはそれよりも多くの、5つまたはそれよりも多くの、6つまたはそれよりも多くの、7つまたはそれよりも多くの、8つまたはそれよりも多くの、9つまたはそれよりも多くの、あるいは10個またはそれよりも多くのSGGGGリピート（配列番号3として開示される「SGGGG」）を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、SGGGG（配列番号3）のアミノ酸配列を含む。

【0299】

ある特定の実施形態では、リンカーは、ペプチドを、重鎖および軽鎖が正常なコンフォメーションで会合するのを可能にするのに十分に長くかつ柔軟なものにし得る。

【0300】

一部の実施形態では、リンカーは、剛性リンカー、切断可能なリンカーまたは柔軟なリンカーである。

【0301】

ある特定の実施形態では、BiTEは、抗原結合ドメインおよびT細胞活性化ドメインを接続するリンカーを含む。非限定的な例として、抗原結合ドメインおよびT細胞活性化ドメインが共にscFvを含む場合、GGGGS（配列番号2）リピートリンカーが、2つのscFvを接続し得る。

【0302】

一部の実施形態では、リンカーは、GGGGS（配列番号2）のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列モチーフ（G4S）_nを含み、式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である（配列番号4）。一部の実施形態では、リンカーは、SGGGG（配列番号3）のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列モチーフ（SG4）_nを含み、式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である（配列番号5）。一部の実施形態では、リンカーは、2つのscFvを接続する。一部の実施形態では、リンカーは、1つまたは複数の、2つまたはそれよりも多くの、3つまたはそれよりも多くの、4つまたは

それよりも多くの、5つまたはそれよりも多くの、6つまたはそれよりも多くの、7つまたはそれよりも多くの、8つまたはそれよりも多くの、9つまたはそれよりも多くの、あるいは10個またはそれよりも多くのGGGGSリピート（配列番号2として開示される「GGGGS」）を含む。

【0303】

一部の実施形態では、リンカーは、1～25個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、リンカーは、1～20個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、リンカーは、1～15個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、1～10個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、1～9個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、1～8個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、1～7個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、リンカーは、1～6個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、1～5個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、1～4個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、リンカーは、1～2個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、1～10個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、リンカーの長さは、2つのscFv間の動きの柔軟性を決定し得、両方の標的細胞への結合を最適化するためにより多くのまたはより少ないリンカーリピートを含めることによって調整され得る。例えば、一部の実施形態では、2つのscFvを接続する短い柔軟なリンカーは、抗原結合ドメインとT細胞活性化ドメインとの自由な回転を提供し得る。

10

【0304】

一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSG（配列番号6）を含む。一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG（配列番号7）を含む。

20

【0305】

リンカーの非限定的な例は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Chen et al., (Chen X., Zaro J. L., Shen W. C. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. Adv. Drug Deliv. Rev. 2013; 65: 1357–1369)において見出され得る。

【0306】

ある特定の実施形態では、リンカーは、以下から選択される：(GGGGGS)₃（配列番号8）、(G)₈（配列番号9）、(G)₆（配列番号10）、(EAAAK)₃（配列番号11）、(EAAAK)_n（配列番号12）、式中、nは、1～3である、A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄A（配列番号13）、PAPAP（配列番号14）、AEAAAKEAAAKA（配列番号15）、(Ala-Pro)_n（式中、nは、5～17である）（配列番号16）、VSQTSKLTR↓AETVFDPV^b（配列番号17）、PLG↓LWA^c（配列番号18）、RVL↓AEA（配列番号19）；EDVVCC↓SMSY（配列番号20）、GGIEGR↓GS^c（配列番号21）、TRHRQPR↓GWE（配列番号22）、およびAGNRVRR↓SVG（配列番号23）。^aプロテアーゼ感受性切断部位は「↓」で示される；^b第XIa／FVIIa因子感受性切断；^cマトリックスメタロプロテアーゼ-1感受性切断配列、本明細書で提供される1つの例；^dHIVPR（HIV-1プロテアーゼ）；NS3プロテアーゼ（HCVプロテアーゼ）；それぞれ、第XIa因子感受性切断；^eフューリン感受性切断；^fカテプシンB感受性切断。

30

40

【0307】

本開示の態様は、BiTEを含む宿主細胞を含む。

【0308】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109上のエピトープに結合する。一部の実施形態では、当該抗原結合ドメインは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD1

50

09 抗体のCDRを含む。一部の実施形態では、当該抗原結合ドメインは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109抗体のV_HおよびV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗原結合ドメインは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109単鎖可変断片(scfv)を含む。

【0309】

本開示の態様は、BiTEをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、部位特異的組込みのための標的ゲノム領域に対して相同な配列をさらに含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼ、例えば、CRISPR-Casシステム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)およびメガヌクレアーゼを使用する遺伝子編集のために設計される。

10

【0310】

本開示の態様は、ポリヌクレオチドを含むベクターを含む。遺伝子送達のために使用され得る任意のベクターが使用され得る。一部のバリエーションでは、ウイルスベクター(例えば、AAV、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス)が使用される。本開示において使用され得るベクターの非限定的な例には、ヒト免疫不全ウイルス; HSV、単純ヘルペスウイルス; MMSV、モロニー Maus 肉腫ウイルス; MSCV、レンチウイルス、マウス幹細胞ウイルス; SFV、セムリキ森林ウイルス; SIN、シンドビスウイルス; VEE、ベネズエラウマ脳炎ウイルス; VSV、水疱性口内炎ウイルス; および VV、ワクシニアウイルスが含まれるがこれらに限定されない。

20

【0311】

一部の実施形態では、ベクターは、組換えAAVベクターである。一部の実施形態では、本開示の方法における使用のためのベクターは、ウイルス粒子(例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15およびAAV16が含まれるがこれらに限定されないAAVウイルス粒子)中にカプシド封入される。

【0312】

一部の実施形態では、方法は、BiTEをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、またはその医薬組成物を投与するステップを含む。例えば、T細胞は、外因性BiTEの発現を介した芽細胞の特異的標的化を促進するために、ウイルスまたは非ウイルスベクターを使用して改変され得る。一部の実施形態では、ベクターは、BiTEを発現する免疫応答性細胞を生成するためにin vitroで使用される。

30

【0313】

一部の実施形態では、方法は、BiTEをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、またはその医薬組成物を投与するステップを含む。

【0314】

一部の実施形態では、方法は、ポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクター、またはその医薬組成物を投与するステップを含む。一部の実施形態では、非ウイルスベクターまたは非ウイルス的方法は、ポリヌクレオチドを標的細胞にin vitroまたはin vivoで送達するために使用される。

40

【0315】

ポリヌクレオチドを送達するための本発明の方法において使用され得る非ウイルス的送達方法の非限定的な例には、物理的方法、針、マイクロプロジェクトイル遺伝子移入もしくは遺伝子銃、電気穿孔、ソノレーション、フォトリレーション、マグネトフェクション、ハイドロレーション、機械的マッサージ、化学的ベクター無機粒子、リン酸カルシウム粒子、磁気粒子、ポリマーベースのベクター、または遺伝子送達剤、例えば、シリカ、金、カチオン性脂質、脂質ナノエマルジョン、固体脂質ナノ粒子ポリエチレンジオキシポリエチレングリコシド(PLGA)、デンドリマーもしくはポリメタクリレートが含まれるがこれらに限定されない。かかる方法は、それらの全体がこれにより参照により本明細書

50

に組み込まれる、Ramamoorth et al., (Ramamoorth et al., (2015) J. Clin. Diagnostic Res. 9 (1): GE01-GE06) および Sung et al., (Sung et al., (2019) Biomaterials Research 23 (8), pgs 1-87) において見出され得る。

3.3.4. キメラ抗原受容体 (CAR)

【0316】

本開示の態様は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、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キメラ抗原受容体 (CAR) を含む。

【0317】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69 および CD109 からなる群から選択される標的抗原に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD63 に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD151 に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD72 に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD84 に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD69 に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、CD109 に特異的に結合する。

【0318】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、本明細書に記載される ABP のうちのいずれか1つである。

【0319】

CAR の一例は、細胞外認識ドメイン (例えば、抗原結合ドメイン)、膜貫通ドメイン、および1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインの融合物である。抗原エンゲージメントの際に、CAR の細胞内シグナル伝達部分は、免疫細胞において活性化関連応答を開始させ得、それは、腫瘍細胞死を誘導するための細胞溶解分子の放出などである。

【0320】

一部の実施形態では、CAR は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、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み、細胞外抗原結合ドメインは、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69 および CD109 からなる群から選択される標的タンパク質／抗原に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、CAR は、ポリペプチドのヒンジ領域をさらに含む。

【0321】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、標的タンパク質 (CD63、CD151、CD72、CD84、CD69 または CD109) に特異的に結合する抗体の単鎖可変断片 (scFv) を含む。

【0322】

一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、CD3ζ の細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、ZAP-70 細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) を含む。

【0323】

一部の実施形態では、1つまたは複数の (例えば、2つまたはそれよりも多くの、3つまたはそれよりも多くの、4つまたはそれよりも多くの、あるいは5つまたはそれよりも多くの) 共刺激ドメインをさらに含み、共刺激ドメインは、CD28 共刺激ドメイン、4-1BB 共刺激ドメイン、CD27 共刺激ドメイン、OX40 共刺激ドメインまたはICOS 共刺激ドメインである。一部の実施形態では、共刺激ドメインは、4-1BB、CD28、ICOS、OX-40、BTLA、CD27、CD30、GITR および HVEM から選択される。

【0324】

一部の実施形態では、CARは、4-1BB、CD28またはそれらの断片を含む。ある特定の実施形態では、CARは、CD28膜貫通ドメインおよび4-1BBを含む。ある特定の実施形態では、CARは、ヒンジ領域、CD28膜貫通ドメインおよび4-1BBを含む。ある特定の実施形態では、ヒンジ領域は、CD28ポリペプチド由来である。

【0325】

一部の実施形態では、CARは、CD28ポリペプチドのヒンジ領域を含み、ヒンジ領域は、IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKP（配列番号99）のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を含む。

【0326】

一部の実施形態では、CARは、FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV（配列番号100）のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する、CD28ポリペプチドの膜貫通ドメインを含む。

【0327】

一部の実施形態では、CD28共刺激ドメインは、

【化1】

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVVGGLACYSL

LVTVAFIIFWV（配列番号102）

のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する。

【0328】

一部の実施形態では、ゼータ（CD3ζ）シグナル伝達ドメインは、

【化2】

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRK

NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL

HMQUALPPR（配列番号101）

のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する。

【0329】

一部の実施形態では、CARは、ゼータ（CD3ζ）シグナル伝達ドメインと組み合わせて、CD28膜貫通（TM）および4-1BB共刺激ドメインを含む。

【0330】

一部の実施形態では、CAR構築物は、プラスミド、例えば、pUC57プラスミド中に配置される。制限酵素技術を使用して、CARのコード配列が切断され得、高力価ウイルスベクター産生のためにベクター移入プラスミド中に配置され得る（例えば、図13および14を参照されたい）。

【0331】

一部の実施形態では、CARは、シグナルペプチド（例えば、シグナル干渉性ペプチド（SIP））を含む。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、MKHLWFFLLLVAAPRWVLS（配列番号103）のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する。ある特定の実施形態

10

20

30

40

50

では、シグナルペプチドは、

【化 3】

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCT
GTCC (配列番号 104)

のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる。

【0332】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、単鎖可変断片 (s c F v) である。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、標的タンパク質 (C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 および / または C D 1 0 9) に特異的に結合する抗体の s c F v を含む。ある特定の実施形態では、s c F v は、標的タンパク質 C D 6 3 に結合する。ある特定の実施形態では、s c F v は、標的タンパク質 C D 1 5 1 に結合する。ある特定の実施形態では、s c F v は、標的タンパク質 C D 7 2 に結合する。ある特定の実施形態では、s c F v は、標的タンパク質 C D 8 4 に結合する。ある特定の実施形態では、s c F v は、標的タンパク質 C D 6 9 に結合する。ある特定の実施形態では、s c F v は、標的タンパク質 C D 1 0 9 に結合する。一部の実施形態では、s c F v は、表 1 2 の配列番号 8 9 ~ 9 8 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0333】

一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 8 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0334】

一部の実施形態では、s c F v は、s c F v 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチド配列は、上記配列番号 8 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する s c F v をコードする。

【0335】

一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 9 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、s c F v は、s c F v 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチド配列は、配列番号 9 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する s c F v をコードする。

【0336】

一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 9 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、s c F v は、s c F v 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチド配列は、配列番号 9 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する s c F v をコードする。

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 97 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、s c F v は、s c F v 領域をコードするヌクレオチド配列を

含み、ヌクレオチド配列は、配列番号 97 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する s c F v をコードする。

【0343】

一部の実施形態では、s c F v は、配列番号 98 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、s c F v は、s c F v 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチド配列は、配列番号 98 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する s c F v をコードする。

【0344】

一部の実施形態では、C A R は、シグナルペプチド、s c F v 領域、1 つまたは複数の共刺激ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む。

【0345】

登場の順に、それぞれ、表 14 は、C A R 構築物のヌクレオチド配列（配列番号 24 ~ 34）を提供し、表 14 は、C A R 構築物のタンパク質配列（配列番号 35 ~ 44 および 36）を提供する。

【0346】

【0347】

一部の実施形態では、C A R は、表 13 において提供される表 13 の配列番号 35 ~ 44 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0348】

【表 13 - 1】

表13: CAR構築物タンパク質配列

名称	標的	タンパク質配列
A1 SIP-scFv(14721- P1-A1)- hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ-494AAs MW=53.75kDa 特色: SIP: [1: 19] scFv: [20:	CD69	MKILWFFLLVAAPRWVLSQVQLQSGPGLVQPSRTLSLTCAISGDSISSNTASWNW IRQSPSRGLEWVGKTEYRS GWFFEYAPSVGGRVNISPDTSKNQFSLQNSVTPEDTAVYFCARDSYNDYDNGFDI WGQGTLLTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGSNYVAWYQQLPGTAP KLLIYDTNKRPSGIPDRFS GSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAEVFGTGTKVTVLIEVMYPPPYLD NEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVVLVVVGGVLCYSLLVTVAFIIFVWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKN

10

20

30

40

50

【表 13-2】

274] hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ: [275 : 494] (配列番号 35)		PQEGLYNELQDKMAEAYSEI GMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
C1 SIP-scFv(14721-P1-C1)- hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ-494AAs MW=53.93kDa 特色: SIP: [1 : 19] scFv: [20 : 274] hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ: [275 : 494] (配列番号 36)	CD69	MKHLWFFLLVAAAPRWVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWN WIRQSPSRGLEWL GKTEYRS KWYYEFAPSVKSRITITPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCVRD SYNGYDFDGFDI WGQGTLLVTVS SGGGSGGG GSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGSNYVAWYQQLPGTAP KLLIYD TNKRPSGIPDRFS GSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWSSLSAEVFGTGKVTVLIEVMYPPPYLD NEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCS CRFP EEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKN PQEGLYNELQDKMAEAYSEI GMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
F1 >SIP-scFv(14721-P1-F1)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ- 494AAsMW=53.87kDa 特色: SIP: [1 : 19] scFv: [20 : 274] hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ: [275 : 494] (配列番号 37)	CD69	MKHLWFFLLVAAAPRWVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWN WIRQSPSRGLEWL GKTEYRS KWFDEYAPSVKGRIARPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCVRD SYNGYDFDGFDI WGQGTLLVTVS SGGGSGGG GSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQVVIISCSGSSSNVGN NYVAWYQQVPGAA PRLIYD NYKRPSGIPDRFS GSKSGTSATLGITGLQSGDEADYYCGSWDSSLSAEVFGGKLTALIEVMYPPPYLD NEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCS CRFP EEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKN PQEGLYNELQDKMAEAYSEI GMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
G1 SIP-scFv(14721-P1-G1)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ- 494AAsMW=53.95kDa 特色: SIP: [1 : 19] scFv: [20 : 274] hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ: [275 : 494] (配列番号 38)	CD69	MKHLWFFLLVAAAPRWVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWN WIRQSPSRGLEWL GKTEYRS KWFDEYAPSVKGRIARPDTSRNQVSLQLNSMTPEDTAVYYCVRD SYNGYDFDGFDI WGQGTLLVTVS SGGGSGGG GSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAP KLLIYD NNKRPSGIPDRFS GSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWSSLSAEMFGGKVTVLIEVMYPPPYLD NEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCS CRFP EEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKN PQEGLYNELQDKMAEAYSEI GMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
C2 SIP-scFv(14721-P1-C2)-	CD69	MKHLWFFLLVAAAPRWVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWN WIRQSPSRGLEWL GKVEYRS KWYDEYAPSVKSRIARPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCARD SYNGHAF

10

20

30

40

50

【表 13-3】

hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼーター 494AAsMW=53.94 kDa 特色: SIP: [1: 19] scFv: [20: 274] hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼーター: [275: 494] (配列番号 39)		DGFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGDNLVSWYQQL PGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLDTGLQTGDEADYYCESWD NNLTAEVFGTGKVTVLIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVWLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
F2 SIP-scFv(14721-P1- F2)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼーター 494AAsMW=54.06k Da 特色: SIP: [1: 19] scFv: [20: 274] hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼーター: [275: 494] (配列番号 40)	CD69	MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFSNS ASWNWIRQSPSRGLEWLKTEYRS KWFDEYAPSVKGRIAIRPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCVRDSYNGYD FDGFDIWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIEKNYVSWYQQL PGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFS GSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGAWDNILNSEMFGGGTKLTVLIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVWLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
H2 SIP-scFv(14721-P1- H2)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼーター 494AAsMW=53.90k Da 特色: SIP: [1: 19] scFv: [20: 274] hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼーター: [275: 494] (配列番号 41)	CD69	MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFSNS ASWNWIRQSPSRGLEWLKTEYRS KWFDEYAPSVKGRIAIRPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCVRDSYNGYD FDGFDIWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGGSGGGGSQSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQL PGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFS GSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSSLAEVFGGGTKLTVLIEVMYP PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVWLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
H3 SIP-scFv(14721- P1-H3)- hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼーター 494AAsMW=54.22 kDa 特色: SIP: [1: 19] scFv: [20:	CD69	MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCDISGDSVFSNTASWN WIRQSPSRGLEWLKTEYRS QWLHEYAPSVRSRIAIRPDTSKNQVSLQLSFVTPEDTAVYYCVRDSYNGYAFDGFDT WGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGGSGGGGSQSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGRNSNIANNFVSWYRQLPGTAP KLLIYDNNKRPSGIPDRFS GSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCESWSSSLTAEVFGTGKVTVLIEVMYPPPYLD NEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVWLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKN

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

274] hCD28ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ: [275 : 494] (配列番号 42)		PQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
F12 SIP-scFv(14722- P1-F12)- hCD28ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ 494AAsMW=53.77 kDa 特色: SIP: [1 : 19] scFv: [20 : 274] hCD28ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ: [275 : 494] (配列番号 43)	CD84	MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNS ASWNWIRQSPSRGLEWLKVEYRS KWYDEYAPSVKSRIARPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCARDSSYNHAF DGFDFVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQL PGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFS GSKSGTSAITLGITGLTGDEADYYCGTWDSLSAEVFGGGTKVTVLIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVWLTVVVGGLACYSLLVTAFIIFVWKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
B8 SIP-scFv(14722- P2-B8)- hCD28ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ 494AAsMW=53.89 kDa 特色: SIP: [1 : 19] scFv: [20 : 274] hCD28ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ: [275 : 494] > (配列番号 44)	CD84	MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNS ASWNWIRQSPSRGLEWLKVEYRS KWYDEYAPSVKSRIARPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCARDSSYNHAF DGFDFVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGTTSNIANNFVSWYQQL SGSAPKLLINDNNKRPSGIPDRFS GSKSGASATLITGLQTEADYYCGVWDNSLNAEVFGGGTKVTVLIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKPFVWLTVVVGGLACYSLLVTAFIIFVWKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

【0 3 4 9】

一部の実施形態では、CARは、図27の配列番号35のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、CARは、表14の配列番号24のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する核酸を含む。

30

【0 3 5 0】

一部の実施形態では、CARは、図27の配列番号36のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、CARは、表14の配列番号25のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する核酸を含む。

40

【0 3 5 1】

一部の実施形態では、CARは、図27の配列番号37のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、CARは、表14の配列番号26のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する核酸を含む。

【0 3 5 2】

一部の実施形態では、CARは、図27の配列番号38のアミノ酸配列に対して少なく

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

一部の実施形態では、CARは、図27の配列番号44のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するポリペプ

チドを含む。一部の実施形態では、CARは、表14の配列番号33のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する核酸を含む。

【0359】

一部の実施形態では、CARは、図27の配列番号36のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、CARは、表14の配列番号34のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有する核酸を含む。

【0360】

【表14-1】

表14: CAR構築物cDNA配列

名称	標的	cDNA配列
A1 SIP-scFv(14721-P1-A1)- hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータcDNA-1 506bp (配列番号 24)	CD69	ggatcgcgcgcaccATGAAGCACCTGTGGTTTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCCAGG TGGGTCTGAGCCAGG TGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGGCCTGGTGCAGCCTAGCAGAACCCTGAGCCT GACATGTGCCATCAGCGGCGA TTCCATCTCCAGCAATACCGCCTCCTGGAAGTGGATCAGACAGAGCCCTAGCAGG GGCCTGGAGTGGGTGGCAAG ACAGAGTACAGATCCGGCTGGTTCTTCGAGTACGCCCCCTCCGTGGGCGGCAGA GTGAATATCTCCCCGATACAA GCAAGAACCAGTTCAGCCTGCAGCTGAATAGCGTGACACCTGAGGATACAGCCG TGTAATCTGCGCCAGGACTC CTACAATGACTACGATAACGACGGCTTTGACATCTGGGGCCAGGGCACACTGGT GACAGTGAGCAGCGGCGGCGG GGAAGCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGGCGGTAGCGGAGGAGGTGGATCTCA GTCCGTGCTGACCCAGCCCCCA GCGGTGCCGTGCTCCTGGACAGAAGGTGACCATCAGCTGCAGCGGCTCCTCTC CAATATCGGCTCAACTACGT GGCCTGGTACCAGCAGCTGCCCGGCACAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACAC CAACAAGAGGCCAGCGGCATC CCCGATAGGTTTACGGCTCCAAGAGCGGCACATCCGCCACCTGGGCATCACC GGCCTGCAGACAGCGCATGAGG CCGACTACTACTGTGGCAGATGGGACAGCTCCCTGAGCGCGAGGTGTTCCGGCAG AGGCACAAAGGTGACCGTGCT GATCGAGGTGATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCAC AATCATCCACGTGAAGGCAAG CACCTGTGTCCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGGCGTGCTGG CTTGTTACAGCCTGTGGTGACAGTCGCCTTCATCATCTTTGGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTATGAGGCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGTTTCTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGTCCGCCGACGCCCC GCCTACCAACAGGGACAGAATC AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATA AGAGGAGAGGCAGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAAACCC CAGGAGGGCCTGTACAATGAATGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTA CCAGGGCCTGTCCA CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGtg agtcgac
C1 SIP-scFv(14721-P1-	CD69	ggatcgcgcgcaccATGAAGCACCTGTGGTTTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCTAGA TGGGTGCTGTCCAGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

C1)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータcDNA - 1 506bp (配列番号 25)		TGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCAGCCAGACCCCTGTCCC TGACCTGCGCCATCAGCGGCGA TAGCGTGAGCAGCAACTCCGCCAGCTGGAATTGGATCAGGCAGTCCCCCAGCAG GGGCTGGAGTGGCTGGGAAAG ACAGAGTACAGATCCAAGTGGTACTACGAGTTTGCCCTAGCGTGAAGAGCAGA ATCACCATCACCCCTGATACCA GCAAGAACCAGTTTCCCTGCAGCTGAATTCCTGACCCCTGAGGACACCGCCGT GTACTACTGCGTGAGAGACTC CTACAACGGCTACGATTTTGACGGCTTCGATATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACCGTGTCCAGCGGCGGAGGC GGAAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGTGGAAGCC AGAGCGTGCTGACACAGCCCCCTA GCGTGTCCGCCGCCAGGACAAAAGGTGACAATCAGTGCTCCGGCTCCTCCTC CAATATCGGCAGCAACTACGT GGCCTGGTACCAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACACC AATAAGAGGGCCCTCCGGCATC CCCGATAGATTCTCCGGCTCCAAGAGCGGCACATCCGCCACCCCTGGGCATCACCG GCCTGCAGACAGGCGATGAGG CCGACTACTACTGTGGCACATGGGATTCCTCCCTGTCCGCCGAGGTGTTTGGCAC CGGCACAAAGGTGACCGTGCT GATCGAGGTGATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCAC AATCATCCACGTGAAGGGCAAG CACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGCGTGCTGG CTTGTTACAGCCTGCTGGTGACAGTCGCTTCATCATCTTTGGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTTATGAGGCCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGGTTTCTTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTGAGCAGGTCCGCCGACGCCCCC GCCTACCAACAGGGACAGAATC AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATA AGAGGAGAGGCAGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAAACCCC CAGGAGGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTA CCAGGGCCTGTCCA CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGtg agtcgac
F1 SIP-scFv(14721-P1- F1)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータcDNA - 1 506bp (配列番号 26)	CD69	ggatccgccgccaccATGAAGCACCTGTGGTTCTTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCTAGA TGGGTGCTGAGCCAGG TGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCTTCCAGACACTGTCCCT GACATGTGCCATCAGCGGCGA CTCCGTGTCTCCAATAGCGCCAGCTGGAATTGGATCAGACAGAGCCCCTCCAGA GGCCTGGAGTGGCTGGGCAAGACAGAGTACAGGTCCAAGTGGTTTGACGAGTAC GCCCCCAGCGTGAAGGGCAGAATCGCCATCAGACCTGACACCT CCAAGAACCAGGTGTCCCTGCAGCTGAATAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCG TGTAATACTGTGTGAGAGATAG CTACAACGGCTACGATTTTGATGGCTTTGACATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACCGTGAGCTCCGGCGGAGGC GGAAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGAGGCGGTAGCGGAGGAGGTGGAAGCC AGAGCGTGCTGACCCAGCTCCTAGCGTGAGCGCCGCCCTGGACAGCAGGTGA TCATCTCTGCAGCGGCTCCAGCTCCAACGTGGGCAATAACTACGT GGCCTGGTACCAGCAGGTGCCCGGCGCTGCTCCAGGCTGCTGATCTACGACAAC TACAAGAGACCCTCCGGCATC CCCGACAGGTTTCCGGCAGCAAGTCCGGCACCTCCGCCACCCCTGGGCATCACCG GACTGCAGAGCGGCGACGAGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

		CCGACTACTACTGTGGCAGCTGGGATAGCTCCCTGAGCGCCGAGGTGTTTGGCGG CGGCACCAAGCTGACAGCCCT GATCGAGGTGATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCAC AATCATCCACGTGAAGGGCAAG CACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGCGGGCGTGCTGG CTTGTTACAGCCTGCTGGTGACAGTCGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTTATGAGGCCCGTGAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGGTTTCCTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGTCCGCCGACGCCCC GCCTACCAACAGGGACAGAATC AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATA AGAGGAGAGGCAGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAACCCC CAGGAGGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTA CCAGGGCCTGTCCA CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCAAGGtg agtcgac
G1 SIP-scFv(14721-P1- G1)-hCD28ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ cDNA - 1 506bp (配列番号 27)	CD69	ggatccgcgcgcaccATGAAGCACCTGTGGTTTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCCAGG TGGGTTCTGAGCCAGG TGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCCTCCAGACACTGAGCCT GACATGCGCCATCTCCGGCGA CAGCGTGTTTCAGCACCACCGCCAGCTGGAATTGGATCAGACAGAGCCCCAGCAG AGGCCTGGAGTGGCTGGGCAAG ACCGAGTACAGGAGCAAGTGGTTCGACGAGTACGCCCCAGCGTGAAGGGCAGG ATCGCCATCAGACCTGACACAT CCAGAAATCAGGTGAGCCTGAGCTGAATAGCATGACACCCGAGGATACCGCCG TGTACTTCTGTGTGAGAGACAG CTACAACGGCTACGACTTCGACGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACAACAGT GACAGTGAGCTCCGGCGGCGGC GGCTCTGGAGGAGGAGGATCTGGCGGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGTTCTCA GAGCGTGGTGACACAGCCCCCA GCGTGAGCGCCGCTCCTGGACAAAAGGTGACCATCTCTGTCCGGCAGCAGCA GCAACATCGGCAATAACTACGT GTCCTGGTACCAGCAGCTGCCTGGCACC GCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACAAC AATAAGAGGCCAGCGGCATC CCTGACAGATTCTCCGGCTCCAAGAGCGGCACCTCCGCCACCCTGGGCATCACAG GCCTGCAGACAGGCGACGAGG CCGACTACTACTGTGGCACATGGGATAGCTCCCTGTCCGCCGAGATGTTTGGCGG CGGCACCAAGGTGACCGTGCT GATCGAGGTGATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCAC AATCATCCACGTGAAGGGCAAG CACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGCGGGCGTGCTGG CTTGTTACAGCCTGCTGGTGACAGTCGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTTATGAGGCCCGTGAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGGTTTCCTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGTCCGCCGACGCCCC GCCTACCAACAGGGACAGAATC AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATA AGAGGAGAGGCAGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAACCCC CAGGAGGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTA CCAGGGCCTGTCCA

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

		CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCAAGGig agtcgac
C2 SIP-scFv(14721-P1- C2)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ cDNA - 1 506bp (配列番号 28)	CD69	ggatccgcgcaccATGAAGCACCTGTGGTTTTCTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCTAGG TGGGTGCTGAGCCAGG TGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGCTGGTGAAGCCAGCCAGACCTGTCCC TGACATGCGCCATCAGCGGCGA TAGCGTGTCCAGCAATAGCGCCTCCTGGAATTGGATCAGACAGAGCCCTAGCAG AGGCCTGGAGTGGCTGGGCAAG GTGGAGTACAGGTCCAAGTGGTACGATGAGTACGCCCCCTCCGTGAAGAGCAGA ATCGCCATCAGACCTGACACAT CCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGATCTCCGTGACACCTGATGATACAGCCGT GTACTACTGCGCCAGGGACTC CTACAACGGCCACGCCTTCGATGGCTTTGATGTGTGGGGCCAGGGCACACTGGTG ACCGTGTCCAGCGGCGGCGG GGATCTGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGCGGAGGCTCTGGAGGAGGTGGAAGCCA GTCCGTGCTGACCCAGCCCCCT CCGTGAGCGCTGCTCCAGGACAGAAGGTGACAATCAGCTGCTCCGGCTCCAGCT CCAACATCGGCGATAATCTGGT GAGCTGGTACCAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGATAAC AATAAGAGACCCCTCCGGCATCCCGACAGGTTACGCGGCAGCAAGTCCGGCAC TCCGCCACACTGGACATCACAGGCCTGCAGACCGGCGACGAGG CCGACTACTACTGCGAGAGCTGGGATAACAACCTGACCGCCGAGGTGTTTCGCA CCGGCACAAAGGTGACAGTGCT GATCGAGGTGATGTACCCCCCTTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCAC AATCATCCACGTGAAGGCAAG CACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGGCTGTGG CTTGTACAGCCTGCTGGTGACAGTTCGCTTATCATCTTTTGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTATGAGGCCCTGTCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGGTTTCTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTACAGAGTCCGCCGACGCCCC GCCTACCAACAGGGACAGAATC AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATA AGAGGAGAGGCAGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAACCCC CAGGAGGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGCAAGGGCCACGATGCGCTGTA CCAGGGCCTGTCCA CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCAAGGig agtcgac
F2 SIP-scFv(14721-P1- F2)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ cDNA - 1 506bp (配列番号 29)	CD69	ggatccgcgcaccATGAAGCACCTGTGGTTCTTCTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCCAGCA TGGGTGCTGTCCAGG TGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCAGACCTGAGCCT GACCTGCGCCATCAGCGGCGA CTCCGTGTTTAGCAACTCCGCCTCCTGGAATGGATCAGACAGTCCCCCTCCAGA GGCCTGGAGTGGCTGGGCAAG ACAGAGTACAGGAGCAAGTGGTTGACGAGTACGCCCCCTCCGTGAAGGGCAGG ATCGCCATCAGACCCGATACCT CCAAGAATCAGGTGAGCCTGCAGCTGAATAGCGTGACACCCGAGGACACCGCG TGTAATACTGTGTGAGAGACTC CTACAATGGCTACGACTTCGACGGCTTTGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTG ACCGTGTCCAGCGGCGGAGGC GGAAGCGGAGGAGGGAAGCGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGTTCCCA GAGCGTGTGACCCAGCCCCCTAGCGTGAGCGCCGCTCCTGGACAGAAGGTGAC CATCAGCTGCTCCGGCGGCTCCAGCAACATCGAGAAGAAGTACGT

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 5】

		GAGCTGGTACCAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACACC AATAAGAGGCCTAGCGGCATC CCCGACAGATTTCAGCGGCTCCAAGTCCGGCACAAGCGCCCACTGGGCATCACC GGCCTGCAGACCGGCGACGAGG CCGATTACTACTGTGGCGCCTGGGATAATATCTGAACTCCGAGATGTTTCGGCGG CGGCACAAAGCTGACAGTGCT GATCGAGGTGATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCAC AATCATCCACGTGAAGGGCAAG CACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGGCGTGCTGG CTTGTTACAGCCTGCTGGTGACAGTCGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTATGAGGCCCGTGACAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGGTTTCTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGTCCGCCGACGCCCC GCCTACCAACAGGGACAGAATC AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAGAAGAGGAGTACGACGTGCTGGATA AGAGGAGAGGAGGAGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAAGACCCC CAGGAGGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTA CCAGGGCCTGTCCA CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGtg agtcgac	10
H2 SIP-scFv(14721-P1- H2)-hCD28 ヘンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータcDNA - 1 506bp (配列番号 30)	CD69	ggatccgcgcaccATGAAGCACCTGTGGTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCCAGA TGGGTGCTGAGCCAGG TGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGCTGTTGAAGCCITCCAGACACTGAGCC TGACCTGTGCCATCAGCGGCGA TAGCGTGTTTAGCAACAGCGCCAGCTGGAATTGGATCAGGCAGAGCCCTCCAG GGGCTTGGAGTGGCTGGGCAAG ACCGAGTACAGTCCAAGTGGTTCGATGAGTACGCCCTAGCGTGAAGGGCAGG ATCGCCATCAGGCCTGACACCT CCAAGAACCAAGGTGTCCCTGCAGCTGAATTCCGTGACACCTGAGGATACCGCCGT GTACTACTGCGTGAGGGATT CTACAACGGCTACGACTTCGACGGCTTTGATATCTGGGGCCAGGGCACACTGGTG ACAGTGTCTCCGGCGGCGG GGAAGCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGCGGTTCCGGAGGAGGAGTTCCTCA GTCCGTGGTGACCCAGCCTCCCA GCGTGAGCGCGCTCCTGGACAGAAGGTGACCATCAGCTGTAGCGGCAGCTCCT CCAACATCGGCAACAACCTACGT GTCTTGGTACCAGCAGCTGCCCGGCCACCGCCCAAGCTGTGATCTACGATAAT AATAAGAGACCTTCCGGCATC CCCGATAGATTTTCCGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCACCTGGGCATCACA GGCCTGCAGACCGGCGACGAGG CCGATTACTACTGCGGCACCTGGGATAGCAGCCTGTCCGCCGAGGTGTTTGGCGG CGGCACCAAGCTGACCGTGCT GATCGAGGTGATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCAC AATCATCCACGTGAAGGGCAAG CACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGGCGTGCTGG CTTGTTACAGCCTGCTGGTGACAGTCGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTATGAGGCCCGTGACAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGGTTTCTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGTCCGCCGACG CCCCCGCCTACCAACAGGGACAGAATC	20
			30

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 6】

		AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCT GGATAAGAGGAGAGGCAGGGACCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAG AAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAGGACAAGAT GGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGG CAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGTCCA CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCC AAGGtgagtcgac
H3 SIP-scFv(14721-P1- H3)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータcDNA - 1 506bp (配列番号 31)	CD69	ggatccgcgcaccATGAAGCACCTGTGGTTTTCTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCCAGG TGGGTTCTGTCCAGG TGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGACTGGTGAAGCCCAGCCAGACACTGAGCC TGACATGTGACATCTCCGGCGA TTCCGTGTTCTCCAACACAGCCAGCTGGAATTGGATCAGGCAGAGCCCCAGCAG GGGCCTGGAGTGGCTGGGAAAG ACAGAGTACAGATCCAGTGGCTGCACGAGTACGCCCCCTCCGTGAGATCCAGG ATCGCCATCAGACCCGACACCT CCAAGAACCAGGTGTCCTGCAGCTGTCTTCTGTGACCCCCGAGGACACCGCGCT GTACTACTGTGTAGGGATT CTACAATGGCTACGCCCTTCGATGGCTTTGACACCTGGGGCCAGGGCACCTGTGTG ACCGTGAGCAGCGCGGAGGC GGAAGCGGAGGAGGGAAGCGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGTAGCCA GAGCGTGGTGACCCAGCCCCCA GCGTGTCCGCTGCTCTGGACAGAAGGTGACCATCAGCTGTTCGGCAGGAATC CAACATCGCCAACAACCTTGT GTCTGGTACAGACAGCTGCCTGGCACC GCCCTAAGCTGCTGATCTACGACAAT AATAAGAGGGCTAGCGGCATC CCCGATAGATTCTCCGGCTCCAAGAGCGGCACATCCGCCACCCTGCCATCACCG GCCTGCAGACCGCGACGAGG CCGATTACTACTGCGAGTCTGGGATAGCTCCTGACCGCCGAGGTGTTTGGCAC CGGCACCAAGGTGACCGTGT GATCGAGGTGATGTACCCCCCTTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGCGAC AATCATCCACGTGAAGGGCAAG CACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGCGTGTGG CTTGTTACAGCCTGCTGGTGACAGTCGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTTATGAGGCCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGGTTTCTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGTCCGCCGACGCCCC GCCTACCAACAGGGACAGAATC AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACCTGTGGATA AGAGGAGAGGCAGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAACCCC CAGGAGGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTA CCAGGGCCTGTCCA CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGtg agtcgac
F12 SIP-scFv(14722-P1- F12)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3ゼータ cDNA - 1 506bp (配列番号 32)	CD84	ggatccgcgcaccATGAAGCACCTGTGGTTCTTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCTAGG TGGGTGCTGAGCCAGG TGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCCAGCCAGACACTGAGCC TGACCTGTGCCATCTCCGGCGA CTCCGTGTCCAGCAACAGCGCCTCTGGAAGTGGATCAGACAGTCCCTAGCAGG GGCCTGGAGTGGCTGGGCAAG GTGGAGTACAGATCCAAGTGGTACGATGAGTACGCCCCAGCGTGAAGAGCAGA ATCGCCATCAGACCTGACACCA

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 7】

		GCAAGAACCAGGTGTCCTGCACCTGATCAGCGTGACCCCTGATGACACAGCCG TGTAATACTGCGCCAGAGATAG CTACAACGGCCACGCCTTTGATGTGTGGGGCCAGGGCACAATGGTG ACCGTGAGCTCCGGCGGCGGC GGATCTGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGCGGCTTCTGGAGGAGGTGGAAGCCA GAGCGTGGTGACACAGCCTCCCT CCGTGTCCGCGCCCTTGACAAAAGGTGACCATCTCTGCAGCGGCAGCAGCA GCAACATCGGCAATAACTACGT GTCCTGGTACCAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACAA AATAAGAGGCCAGCGGCATC CCCGACAGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCACCTCCGCCACACTGGGCATCACAG GCCTGCAGACCGGCGACGAGG CCGACTACTACTGTGGCACCTGGGATTCCAGCCTGAGCGCCGAGGTGTTTGGCGG CGGCACAAAGGTGACAGTGCT GATCGAGGTGATGTACCCCCCTTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCAC AATCATCCACGTGAAGGGCAAG CACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGGCGTGCTGG CTTGTACAGCCTGCTGGTGACAGTCGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTTATGAGGCCCGTGAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGGTTTCTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGTCCGCCGACGCCCC GCCTACCAACAGGGACAGAATC AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATA AGAGGAGAGGAGGAGGCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAACCCC CAGGAGGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGGACAAGATGGCCGAGGCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTA CCAGGGCCTGTCCA CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCAAGGtg agtcgac
B8 SIP-scFv(14722-P2- B8)-hCD28 ヒンジ- hCD28TMD-4IBB- CD3 ゼータcDNA - 1 506bp (配列番号 33)	CD84	ggatccgcgcaccATGAAGCACCTGTGGTTTTTCTGCTGCTGGTGCCGCCCCAG TGGGTGCTGAGCCAGG TGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCTTCCAGACACTGTCCCT GACCTGCGCCATCAGCGCGCA CAGCGTGAGCAGCAATTCGCCAGCTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCAGCAG GGGCTGGAGTGGCTGGGAAAG GTGGAGTACAGGAGCAAGTGGTACGACGAGTACGCCCCAGCGTGAAGAGCAG AATGCCATCAGGCCCGACACAT CCAAGAATCAGGTGAGCCTGCACCTGATCAGCGTGACCCCGATGACACAGCCG TGTAATACTGCGCCAGAGACTC CTACAACGGCCACGCCTTCGACGGCTTTGACGTGTGGGGCCAGGGCACAATGGT GACAGTGAGCTCCGGCGGCGGC GGCTCTGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGGGAAGCGGAGGAGGAGGTTCTCA GAGCGTGTGACCCAGCCCCCTA GCCTGAGCGCCGCTCCTGGACAGAGTGACCATCAGCTGCTCCGGCACAACCT CCAATATCGCCAATAATTTCTG GTCCTGGTACCAGCAGCTGTCCGGCTCCGCCCAAGCTGCTGATCAATGACAA AACAGAGACCTCCGGCATC CCCGATAGGTTCTCCGGCAGCAAGTCCGGCGCTCCGCCACACTGGCCATCACCG GACTGCAGACAGAGGACGAGG CCGACTACTACTGTGGCGTGTGGGACAACAGCCTGAATGCCAGGTGTTTGGCG GCGGCACCAAGGTGACCGTGCT GATCGAGGTGATGTACCCCCCTTACCTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCAC AATCATCCACGTGAAGGGCAAG

10

20

30

【表 1 4 - 8】

		CACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGGCGTGCTGG CTTGTACAGCCTGCTGGTGACAGTCGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAGAGGGG CAGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAGCCCTTTATGAGGCCCGTGAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTG TAGCTGCAGGTTTCTGAGGAG GAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGTCCGCCGACGCCCC GCCTACCAACAGGGACAGAATC AGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATA AGAGGAGAGGAGGAGGCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAACCCC CAGGAGGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGGACAAGATGGCCGAGGCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGGAGGGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTA CCAGGGCCTGTCCA CAGCCACCAAGGACACATACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCAAGGtg agtcgac
--	--	--

40

【0 3 6 1】

【0 3 6 2】

本開示の態様は、CARを含む宿主細胞を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、T細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、CD4⁺およびCD8⁺T細胞である。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、ナイーブ細胞メモリー（T_n⁺）T細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、幹細胞メモリー（T_{scm}）T細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、幹細胞メモリー（（T_{cm}）CD197 [CCR7⁺]+CD45RO⁻）T細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、セントラルメモリー（T

50

$c m$ 、 $C D 1 9 7 (C C R 7)^+ C D 4 5 R 0^+$) T細胞である。 $C D 1 9 7$ は、本明細書で「 $C C R 7$ 」と相互交換可能に使用される。

【0363】

本開示の態様は、 $C A R$ を含む1つまたは複数の宿主細胞を含む。ある特定の実施形態では、 $C A R$ を含む1つまたは複数の宿主細胞は、ナイーブおよび幹細胞メモリー ($T_n + T_{sc m}$ 、 $C D 1 9 7 [C C R 7^+] + C D 4 5 R 0^-$)、ならびにセントラルメモリー (T_{cm} 、 $C D 1 9 7 [C C R 7] + C D 4 5 R 0^+$) T細胞から選択される。一部の実施形態では、 $C A R$ を含む1つまたは複数の細胞は、ナチュラルキラー (NK) 細胞である。

【0364】

一部の実施形態では、 $C A R$ は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、 $C A R$ は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメインを含む第2世代 $C A R$ である。一部の実施形態では、 $C A R$ は、細胞外抗原結合ドメイン、ポリペプチドのヒンジ領域、膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを含む。

【0365】

一部の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、 $C D 6 3$ 、 $C D 1 5 1$ 、 $C D 7 2$ 、 $C D 8 4$ 、 $C D 6 9$ または $C D 1 0 9$ 標的抗原上のエピトープに結合する。一部の実施形態では、当該細胞外抗原結合ドメインは、 $C D 6 3$ 、 $C D 1 5 1$ 、 $C D 7 2$ 、 $C D 8 4$ 、 $C D 6 9$ または $C D 1 0 9$ 抗体の $C D R$ を含む。一部の実施形態では、当該細胞外抗原結合ドメインは、 $C D 6 3$ 、 $C D 1 5 1$ 、 $C D 7 2$ 、 $C D 8 4$ 、 $C D 6 9$ または $C D 1 0 9$ 抗体の V_H および V_L ドメインを含む。一部の実施形態では、当該細胞外抗原結合ドメインは、 $C D 6 3$ 、 $C D 1 5 1$ 、 $C D 7 2$ 、 $C D 8 4$ 、 $C D 6 9$ または $C D 1 0 9$ 単鎖可変断片 ($s c F v$) を含む。

【0366】

本開示の態様は、 $C A R$ をコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、部位特異的組込みのための標的ゲノム領域に対して相同な配列をさらに含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼ、例えば、 $C R I S P R - C a s$ システム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ ($T A L E N$) およびメガヌクレアーゼを使用する遺伝子編集のために設計される。

【0367】

本開示の態様は、ポリヌクレオチドを含むベクターを含む。遺伝子送達のために使用され得る任意のベクターが使用され得る。一部のバリエーションでは、ウイルスベクター (例えば、 $A A V$ 、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス) が使用される。本開示において使用され得るベクターの非限定的な例には、ヒト免疫不全ウイルス; $H S V$ 、単純ヘルペスウイルス; $M M S V$ 、モロニー Maus 肉腫ウイルス; $M S C V$ 、レンチウイルス; マウス幹細胞ウイルス; $S F V$ 、セムリキ森林ウイルス; $S I N$ 、シンドビスウイルス; $V E E$ 、ベネズエラ脳炎ウイルス; $V S V$ 、水疱性口内炎ウイルス; および $V V$ 、ワクシニアウイルスが含まれるがこれらに限定されない。

【0368】

一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスは、レトロウイルスの亜網である。しかし、レンチウイルスは、非分裂細胞のゲノム中に組み込まれることができるが、レトロウイルスは、分裂細胞のみに感染することができる。

【0369】

レンチウイルスベクターは、通常、いくつかのプラスミドで形質転換されたパッケージング細胞系、一般には $H E K 2 9 3$ から産生される。これらのプラスミドには、(1) ビリオンタンパク質、例えば、カプシドおよび逆転写酵素をコードするパッケージングプラスミド、(2) 標的に送達される外因性遺伝子を含むプラスミドが含まれる。

【0370】

ウイルスが細胞に侵入するときに、RNAの形態のウイルスゲノムは、DNAを産生するように逆転写され、このDNAは次いで、ウイルスインテグラーゼ酵素によってゲノム中に挿入される。したがって、レンチウイルスベクターを用いて送達される外因性は、ゲノム中に残り得、細胞が分裂したときに細胞の子孫に伝えられる。

【0371】

一部の実施形態では、ベクターは、組換えAAVベクターである。一部の実施形態では、本開示の方法における使用のためのベクターは、ウイルス粒子（例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15およびAAV16が含まれるがこれらに限定されないAAVウイルス粒子）中にカプシド封入される。

10

【0372】

アデノ随伴ウイルスは、非分裂細胞および種々の型の細胞に感染することが可能であり、そのことにより、本開示の遺伝子送達系を構築する際に有用なものになっている。AAVベクターの使用および調製についての詳細な記載は、米国特許第5,139,941号および同第4,797,368号において見出される。

【0373】

遺伝子送達系としてのAAVに関する研究結果は、LaFace et al., Virology, 162: 483486 (1988)、Zhou et al., Exp. Hematol. (NY), 21:928-933 (1993)、Walsh et al., J. Clin. Invest., 94:1440-1448 (1994) および Flotte et al., Gene Therapy, 2:29-37 (1995) に開示されている。典型的には、組換えAAVウイルスは、2つのAAV末端リピートが隣接する目的の遺伝子（即ち、送達されるデコリン遺伝子および目的のヌクレオチド配列）を含有するプラスミド（McLaughlin et al., 1988; Samulski et al., 1989）および末端リピートなしの野生型AAVコード配列を含有する発現プラスミド（McCarty et al., J. Viral., 65:2936-2945 (1991)）を共トランスフェクトすることによって作製される。

20

【0374】

一部の実施形態では、方法は、CARをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、またはその医薬組成物を投与するステップを含む。例えば、T細胞は、外因性CARの発現を介した芽細胞の特異的標的化を促進するために、ウイルスまたは非ウイルスベクターを使用して改変され得る。一部の実施形態では、ベクターは、CARを発現する免疫応答性細胞（例えば、CAR-T細胞）を生成するためにin vitroで使用される。本開示の態様は、CARを発現する免疫応答性細胞を含む。本開示の態様は、CARをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含むベクターを含む免疫応答性細胞を含む。

30

【0375】

一部の実施形態では、方法は、ポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクター、またはその医薬組成物を投与するステップを含む。一部の実施形態では、非ウイルスベクターまたは非ウイルス的方法は、ポリヌクレオチドを標的細胞にin vitroまたはin vivoで送達するために使用される。

40

【0376】

ポリヌクレオチドを送達するための本発明の方法において使用され得る非ウイルス的送達方法の非限定的な例には、物理的方法、針、マイクロプロジェクティル遺伝子移入もしくは遺伝子銃、電気穿孔、ソノポレーション、フォトポレーション、マグネトフェクション、ハイドロポレーション、機械的マッサージ、化学的ベクター無機粒子、リン酸カルシウム粒子、磁気粒子、ポリマーベースのベクター、または遺伝子送達剤、例えば、シリカ、金、カチオン性脂質、脂質ナノエマルジョン、固体脂質ナノ粒子ポリエチレンイミン（PEI）、キトサン、ポリ（DL-ラクチド）（PLA）およびポリ（DL-ラクチド-

50

c o o グリコシド) (P L G A)、デンドリマーもしくはポリメタクリレートが含まれるがこれらに限定されない。かかる方法は、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ramamoorth et al., (Ramamoorth et al., (2015) J. Clin. Diagnostic Res. 9 (1): GE01-GE06) および Sung et al., (Sung et al., (2019) Biomaterials Research 23 (8), pgs 1-87) において見出され得る。

【0377】

一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される2つの標的タンパク質を標的化する二重特異性CAR-Tである。一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、(i) CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される1つの標的タンパク質；ならびに(ii) CD3を標的化する二重特異性CAR-Tである。一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、(i) CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される1つの標的タンパク質；ならびに(ii) CD123を標的化する二重特異性CAR-Tである。

10

【0378】

一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞である。一部の実施形態では、 $\alpha\beta$ T細胞は、CD3⁺T細胞、またはCD4⁺T細胞もしくはCD8⁺T細胞である。

20

【0379】

本開示の態様は、免疫応答性細胞を調製する方法を含む。一部の実施形態では、方法は、CARをコードするポリヌクレオチドまたはCARをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを免疫応答性細胞中にトランスフェクトまたは形質導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、免疫応答性細胞を少なくとも48時間にわたって拡大増殖させるステップを含む。一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、少なくとも10の感染多重度で形質導入される。

【0380】

一部の実施形態では、方法は、形質導入するステップの後に、ベクターを洗浄するステップ、およびCAR T細胞を少なくとも14日間にわたって拡大増殖させるステップをさらに含む。

30

【0381】

形質導入効率は、デジタル液滴PCR(ddPCR)によって測定され得、細胞1つ当たりのベクターコピー数(VCN)として表され得る。一部の実施形態では、免疫応答性CAR T細胞は、2.5~33.5の範囲(例えば、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、30.5、31、31.5、32、32.5、33、33.5など)の平均VCNを含む。

40

【0382】

一部の実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドまたはCARをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを免疫応答性細胞中に形質導入するステップの後に、方法は、免疫応答性細胞の拡大増殖率を測定するステップを含む。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞の拡大増殖率は、2倍と20倍との間(例えば、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20倍)である。

【0383】

一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、ナイーブおよび幹細胞メモリー($T_n + T_{scm}$ 、CD197 [CCR7]⁺CD45RO⁻)、ならびに／またはセントラルメモリー

50

－ (T_{cm}、CD197 (CCR7) + CD45RO⁺) T細胞である。

【0384】

一部の実施形態では、免疫応答性CAR T細胞は、空のCAR-T細胞と同じ程度で、活性化および消耗の両方を示す。これは、CD25、CD154、CD107aおよびCD137の上方調節、ならびにCD366、CD223およびCD279の上方調節によって示され得る。ある特定の実施形態では、CARを含有する免疫応答性細胞は、T細胞機能を変更しない。

3.4. 診断の方法

【0385】

一態様では、本開示は、がんを診断する方法を提供する。特に、方法は、対象における骨髓性障害または急性白血病を診断するために使用され得る。方法は、対象の生体試料中の腫瘍特異的抗原の存在もしくは非存在またはレベルを検出するステップを含み、腫瘍特異的抗原は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される。

【0386】

一部の実施形態では、検出するステップは、生体試料をABPと接触させることを含み、ABPは、腫瘍特異的抗原に特異的に結合する。一部の実施形態では、ABPは、腫瘍特異的抗原に結合する抗体または抗原結合性断片である。

【0387】

検出するステップのために使用され得るABPは、セクション3.3.1「抗原結合タンパク質 (ABP)」に記載されている。

【0388】

一部の実施形態では、検出するステップは、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、免疫組織化学、蛍光または酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) を含む。一部の実施形態では、ABPは、標識されている。一部の実施形態では、ABPは、フルオロフォアまたは酵素で標識されている。

【0389】

一部の実施形態では、検出するステップは、生体試料中の腫瘍特異的抗原のmRNAレベルを測定することを含む。一部の実施形態では、mRNAレベルは、in situハイブリダイゼーション、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) または次世代配列決定によって測定される。

【0390】

一部の実施形態では、方法は、診断結果に基づく処置のステップをさらに含む。

3.4.1. 生体試料

【0391】

一部の実施形態では、生体試料は、対象の血液試料である。ある特定の実施形態では、血液試料は、末梢血試料である。一部の実施形態では、生体試料は、骨髓試料である。一部の実施形態では、生体試料は、固形または液性腫瘍を含む。一部の実施形態では、生体試料は、AML患者由来異種移植片 (PDX) である。

【0392】

一部の実施形態では、生体試料は、芽細胞を含む。ある特定の実施形態では、芽細胞は、骨髓性芽球 (例えば、骨髓芽球)、リンパ性芽細胞、または骨髓性芽細胞およびリンパ性芽細胞の組合せから選択される。一部の実施形態では、芽細胞は、骨髓性芽細胞である。一部の実施形態では、芽細胞は、リンパ性芽細胞である。一部の実施形態では、芽細胞は、骨髓性芽細胞およびリンパ性芽細胞の組合せである。一部の実施形態では、生体試料は、AML芽球である。

3.4.2. TSAの存在またはレベルの検出

【0393】

一部の実施形態では、方法は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される1つのTSAの存在／非存在またはレベル (量) を検出

10

20

30

40

50

するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、CD 63、CD 151、CD 72、CD 84、CD 69およびCD 109から選択される2つのTSAの存在／非存在またはレベルを検出するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、CD 63、CD 151、CD 72、CD 84、CD 69およびCD 109から選択される3つのTSAの存在／非存在またはレベルを検出するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、CD 63、CD 151、CD 72、CD 84、CD 69およびCD 109から選択される4つのTSAの存在／非存在またはレベルを検出するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、CD 63、CD 151、CD 72、CD 84、CD 69およびCD 109から選択される5つのTSAの存在／非存在またはレベルを検出するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、CD 63、CD 151、CD 72、CD 84、CD 69およびCD 109から選択される6つのTSAの存在／非存在またはレベルを検出するステップを含む。

10

【0394】

一部の実施形態では、検出するステップは、生体試料をABPと接触させることを含む。一部の実施形態では、ABPは、腫瘍特異的抗原のうちの1つに特異的に結合する。一部の実施形態では、ABPは、抗CD 63抗体である。一部の実施形態では、ABPは、抗CD 151抗体である。一部の実施形態では、ABPは、抗CD 72抗体である。一部の実施形態では、ABPは、抗CD 84抗体である。一部の実施形態では、ABPは、抗CD 69抗体である。一部の実施形態では、ABPは、抗CD 109抗体である。

【0395】

一部の実施形態では、ABPは、標識されている。一部の実施形態では、ABPは、フルオロフォアまたは酵素で標識されている。一部の実施形態では、ABPは、放射性同位体で標識されている。一部の実施形態では、ABPは、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ペクターガラクトシダーゼ、タバコエッチウイルス核封入体—エンドペプチダーゼ (nuclear-inclusion-endopeptidase) (「TEVプロテアーゼ」) とカップリングされる。一部の実施形態では、ABPは、1, 8-ANS、4-メチルウンベリフェロン、7-アミノ-4-メチルクマリン、7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン、アクリジン、Alexa Fluor 350 (商標)、Alexa Fluor 405 (商標)、AMCA、AMCA-X、ATTO Rho 6G、ATTO Rho 11、ATTO Rho 12、ATTO Rho 13、ATTO Rho 14、ATTO Rho 101、Pacific Blue、Alexa Fluor 43Q (商標)、Alexa Fluor 480 (商標)、Alexa Fluor 488 (商標)、BODIPY 492/515、Alexa Fluor 532 (商標)、Alexa Fluor 546 (商標)、Alexa Fluor 555 (商標)、Alexa Fluor 594 (商標)、BODIPY 505/515、Cy2、cyQUANT GR、FITC、Fluo-3、Fluo-4、GFP (EGFP)、mHoneydew、Oregon Green (商標) 488、Oregon Green (商標) 514、EYFP、DsRed、DsRed2、dTomato、Cy3.5、フィコエリトリン (PE)、Rhodamine Red、mTangerine、mStrawberry、mOrange、mBanana、テトラメチルローダミン (TRITC)、R-フィコエリトリン、ROX、DyLight 594、Calcium Crimson、Alexa Fluor 594 (商標)、Alexa Fluor 610 (商標)、Texas Red、mCherry、mKate、Alexa Fluor 660 (商標)、Alexa Fluor 680 (商標)、アロフィコシアニン、DRAQ-5、カルボキシナフトフルオレセイン、C7、DyLight 750、Cellvue NIR780、DM-NERF、エオシン、エリスロシン (Erythrosin)、フルオレセイン、FAM、ヒドロキシクマリン、IRDye (IRD 400、IRD 700、IRD 800)、JOE、LissamineローダミンB、Marina Blue、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、PyMPO、5-カルボキシ-4', 5'-ジクロロ-2', 7'-ジメトキシフルオレセイン、5-カルボキシ-2', 4', 5', 7'-テトラクロロフルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン、

20

30

40

50

ーカルボキシローダミン、6-カルボキシローダミン、6-カルボキシテトラメチルアミノ、Cascade Blue、Cy2、Cy3、Cy5、6-FAM、塩化ダンシル、HEX、6-JOE、NBD（7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール）、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、cresyl fast violet、cresyl blue violet、brilliant cresyl blue、パラ-アミノ安息香酸、エリスロシン（erythrosine）、フタロシアニン、アゾメチン、シアニン、キサンチン、サクシニルフルオレセイン、希土類金属クリプテート（cryptate）、ユーロピウムトリスピリジンジアミン（europium trisbipyridine diamine）、ユーロピウムクリプテートまたはキレート、ジアミン、ジシアニン（dicyanin）、およびLa Jolla blue色素からなる群から選択されるフルオロフォアとカップリングされる。一部の実施形態では、ABPは、量子ドットとコンジュゲートされている。

10

【0396】

一部の実施形態では、検出するステップは、フローサイトメトリー、免疫組織化学、免疫蛍光または酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）を含む。一部の実施形態では、検出するステップは、ウエスタンブロッティングを含む。一部の実施形態では、検出するステップは、質量分析を含む。

20

【0397】

一部の実施形態では、検出するステップは、生体試料中の腫瘍特異的抗原のmRNAレベルを測定することを含む。ある特定の実施形態では、方法は、CD63のmRNAレベルを測定することを含む。ある特定の実施形態では、方法は、CD151のmRNAレベルを測定することを含む。ある特定の実施形態では、方法は、CD72のmRNAレベルを測定することを含む。ある特定の実施形態では、方法は、CD84のmRNAレベルを測定することを含む。ある特定の実施形態では、方法は、CD69のmRNAレベルを測定することを含む。ある特定の実施形態では、方法は、CD109のmRNAレベルを測定することを含む。

30

【0398】

一部の実施形態では、mRNAレベルは、in situハイブリダイゼーション、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）または配列決定（例えば、次世代配列決定）によって測定される。

40

【0399】

一部の実施形態では、方法は、対象由来の試料中のTSAの存在／非存在またはレベルに基づいて、対象におけるがんの存在または非存在を決定するステップをさらに含む。

【0400】

一部の実施形態では、対象は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される少なくとも1つのTSAの発現を示す場合に、骨髄性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される少なくとも2、3、4または5つのTSAの発現を示す場合に、骨髄性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。

50

【0401】

一部の実施形態では、対象は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される1つのTSAの発現を示す場合に、骨髄性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される2、3、4または5つのTSAの発現を示す場合に、骨髄性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109の発現を示す場合に、骨髄性障害（MD）ま

50

たは急性白血病（AL）を有すると診断される。

【0402】

一部の実施形態では、対象は、対照試料と比較して、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される少なくとも1つのTSAの増加した発現を示す場合に、骨髓性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、対照試料と比較して、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される1つのTSAの増加した発現を示す場合に、骨髓性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、対照試料と比較して、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される2、3、4または5つのTSAの増加した発現を示す場合に、骨髓性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、対照試料と比較して、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109の増加した発現を示す場合に、骨髓性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。

10

【0403】

一部の実施形態では、対象は、対照試料と比較して、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69、CD109から選択される少なくとも1つのTSA、ならびにさらにはCD19、CD34、CD33、CD7、CD38、CD117、CD45、CD3およびHLA-DRから選択される少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、または少なくとも9つのTSAの増加した発現を示す場合に、骨髓性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、対照試料と比較して、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69、CD109から選択される1つのTSA、ならびにさらにはCD19、CD34、CD33、CD7、CD38、CD117、CD45、CD3およびHLA-DRから選択される少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、または少なくとも9つのTSAの増加した発現を示す場合に、骨髓性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、対照試料と比較して、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69、CD109、ならびにさらにはCD19、CD34、CD33、CD7、CD38、CD117、CD45、CD3およびHLA-DRから選択される少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、または少なくとも9つのTSAの増加した発現を示す場合に、骨髓性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、対照試料と比較して、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69、CD109、ならびにさらにはCD19、CD34、CD33、CD7、CD38、CD117、CD45、CD3およびHLA-DRから選択される少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、または少なくとも9つのTSAの増加した発現を示す場合に、骨髓性障害（MD）または急性白血病（AL）を有すると診断される。

20

30

40

【0404】

一実施形態では、対象は、TSAの所定の参照レベルと比較して、または健康な対象由来の試料と比較して、TSAの発現における少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%の増加を示す場合に、MDまたはALを有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、TSAの所定の参照レベルと比較して、または健康な対象由来の試料と比較して、TSAの発現における少なくとも2、3、4、5、10、20、50または100倍の増加を示す場合に、MDまたはALを有すると診断される。

【0405】

50

一部の実施形態では、方法は、対象由来の試料中の腫瘍特異的抗原の存在またはレベルの検出に基づいて、対象におけるがんの存在または非存在を決定するステップをさらに含む。

3.4.3. 骨髄性障害および急性白血病

【0406】

一部の実施形態では、骨髄性障害は、骨髄性悪性疾患である。一部の実施形態では、骨髄性障害は、骨髄球性白血病である。ある特定の実施形態では、骨髄球性白血病は、急性骨髄球性白血病（AML）である。ある特定の実施形態では、骨髄球性白血病は、小児急性骨髄球性白血病である。

【0407】

一部の実施形態では、骨髄性障害は、骨髄性新生物である。一部の実施形態では、骨髄性障害は、骨髄異形成症候群（MDS）、骨髄増殖性新生物（MPN）、骨髄異形成／骨髄増殖性新生物（MDS／MPN）、ならびに好酸球増加症、および血小板または線維芽細胞に由来する増殖因子受容体の異常に関連する骨髄性悪性疾患から選択される。

【0408】

一部の実施形態では、MDSは、単一系統に異形成を有する不応性血球減少症（不応性貧血；不応性好中球減少症、不応性血小板減少症）、環状鉄芽球を伴う不応性貧血（refractory anemia with ring siderblasts）、多系統に異形成を有する不応性血球減少症、芽球増加を伴う不応性貧血-1、芽球増加を伴う不応性貧血-2、5q単独欠失を伴う骨髄異形成症候群、および骨髄異形成症候群から選択される。一部の実施形態では、MPNは、慢性骨髄性白血病、真性赤血球増加症、本態性血小板血症（thrombocythemia）、原発性骨髄線維症、慢性好中球性白血病、慢性好酸球性白血病、好酸球増加症候群および肥満細胞疾患から選択される。一部の実施形態では、MDS／MPNは、慢性骨髄単球性白血病、若年性骨髄単球性白血病および非定型慢性骨髄球性白血病から選択される。一部の実施形態では、骨髄性新生物は、PDGFR A再編成に関連する骨髄性新生物、PDGFR B再編成に関連する骨髄性新生物、およびFGFR1再編成に関連する骨髄性新生物（例えば、8p11骨髄増殖症候群）から選択される。一部の実施形態では、急性白血病は、急性リンパ球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、リンパ球性白血病（LL）、骨髄性白血病（ML）から選択される。

【0409】

一部の実施形態では、骨髄性障害および急性白血病は、小児または成人年齢での発症を有する。一部の実施形態では、骨髄性障害および急性白血病は、小児AMLである。ある特定の実施形態では、骨髄性障害および急性白血病は、1歳～18歳の間の対象において発症を有する。ある特定の実施形態では、骨髄性障害および急性白血病は、1日～18歳の間の対象において発症を有する。ある特定の実施形態では、骨髄性障害および急性白血病は、1日～1歳の間の対象において発症を有する。

【0410】

一部の実施形態では、骨髄性障害および急性白血病は、成人AMLである。ある特定の実施形態では、骨髄性障害および急性白血病は、18歳よりも年上、20歳よりも年上、25歳よりも年上、30歳よりも年上、35歳よりも年上、40歳よりも年上、45歳よりも年上、50歳よりも年上、55歳よりも年上、60歳よりも年上または65歳よりも年上の成人において発症を有する。

3.5. 処置の方法

【0411】

別の態様では、本開示は、血液学的悪性疾患を有する対象を処置する方法を提供する。一部の実施形態では、対象は、不応性疾患を有する。一部の実施形態では、対象は、再燃を有する。

【0412】

ある特定の実施形態では、血液学的悪性疾患は、不応性B細胞悪性疾患である。B細胞

10

20

30

40

50

悪性疾患には、B細胞急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、モノクローナルB細胞リンパ球増加症、B細胞前リンパ球性白血病、脾辺縁帯リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、脾B細胞リンパ腫／白血病・分類不能型、脾びまん性赤脾髄小型B細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病・バリエーション型、リンパ形質細胞性リンパ腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症（MGUS）IgM、m重鎖病、g重鎖病、a重鎖病、MGUS IgG／A、形質細胞性骨髄腫、骨の孤立性形質細胞腫、骨外形質細胞腫、モノクローナル免疫グロブリン沈着症、粘膜関連リンパ組織の節外性辺縁帯リンパ腫（MALTリンパ腫）、節性辺縁帯リンパ腫、小児節性辺縁帯リンパ腫、濾胞性リンパ腫、in situ濾胞性新生物、十二指腸型濾胞性リンパ腫、小児型濾胞性リンパ腫、IRF4再編成を伴う大細胞型B細胞リンパ腫、原発性皮膚濾胞中心リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、in situマントル細胞新生物、胚中心B細胞型および活性化B細胞型が含まれるびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）NOS；T細胞／組織球豊富型大細胞型B細胞リンパ腫、中枢神経系の原発性DLBCL、原発性皮膚DLBCL・下肢型、EBV＋DLBCL NOS、EBV＋皮膚粘膜潰瘍、慢性炎症に関連するDLBCL、リンパ腫様肉芽腫症、原発性縦隔（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、ALK＋大細胞型B細胞リンパ腫、形質芽球性リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、HHV8＋DLBCL NOS、バーキットリンパ腫、llq異常を伴うバーキット様リンパ腫、MYCならびにBCL2および／またはBCL6再編成を伴う高悪性度B細胞リンパ腫、高悪性度B細胞リンパ腫NOS、およびDLBCLと古典的ホジキンリンパ腫との間の中間的特色を有するB細胞リンパ腫・分類不能型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、本明細書に記載される抗CD72ナノボディで処置される悪性疾患は、ホジキンリンパ腫、例えば、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、または結節性硬化型古典的ホジキンリンパ腫、リンパ球豊富型古典的ホジキンリンパ腫、混合細胞型古典的ホジキンリンパ腫およびリンパ球枯渇型古典的ホジキンリンパ腫が含まれる古典的ホジキンリンパ腫である。一部の実施形態では、対象は、移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、例えば、形質細胞性過形成PTLD、伝染性単核球症PTLD、華飾性濾胞過形成PTLD、多形性PTLD、単形性PTLD（BおよびT／NK細胞型）または古典的ホジキンリンパ腫PTLDを有する。

10

20

30

40

【0413】

一態様では、本開示は、血液学的悪性疾患、例えば悪性B細胞、または悪性骨髄性細胞を含む悪性疾患を有する対象を処置する方法を提供する。一部の実施形態では、血液学的悪性疾患は、B細胞白血病である。一部の実施形態では、B細胞白血病は、慢性リンパ球性白血病である。一部の実施形態では、B細胞白血病は、混合型白血病（MLL）である。一部の実施形態では、血液学的悪性疾患は、非ホジキンリンパ腫である。一部の実施形態では、血液学的悪性疾患は、多発性骨髄腫である。一部の実施形態では、血液学的悪性疾患は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109から選択される標的タンパク質のうちのいずれか1つを発現する骨髄性細胞を含む。一部の実施形態では、血液学的悪性疾患は、標的タンパク質のうちの1つまたは複数、2つまたはそれよりも多く、3つまたはそれよりも多く、4つまたはそれよりも多く、あるいは5つまたはそれよりも多くを含む。

【0414】

一態様では、本開示は、骨髄性障害（MD）または急性白血病（AL）を有する対象を処置する方法を提供する。一部の実施形態では、急性白血病は、急性リンパ芽球性白血病である。

【0415】

一部の実施形態では、対象は、骨髄芽球性（M0）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、骨髄芽球性（M0）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、骨髄芽球性（M1）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、骨髄芽球性（M2）型のAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、前骨髄球性（M3）型のAM

50

Lを有する。一部の実施形態では、対象は、骨髄単球性（M4）型のAMLであるAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、単球性（M5）型のAMLであるAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、赤白血病（M6）型のAMLであるAMLであるAMLを有する。一部の実施形態では、対象は、巨核球性（M7）型のAMLであるAMLであるAMLを有する。

【0416】

一部の実施形態では、対象は、標的タンパク質のうちの1つまたは複数、2つまたはそれよりも多く、3つまたはそれよりも多く、4つまたはそれよりも多く、あるいは5つまたはそれよりも多くを含む。

【0417】

一部の実施形態では、本開示の方法は、対象に、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤の有効量を投与するステップを含む。治療剤は、本明細書に記載される抗原結合タンパク質（ABP）、ABP-薬物コンジュゲート、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）、または標的タンパク質に対して特異的なキメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫応答性細胞であり得る。

【0418】

ある特定の実施形態では、治療剤は、CAR-T細胞である。ある特定の実施形態では、治療剤は、CAR-NK細胞である。ある特定の実施形態では、CAR-T細胞またはCAR-NK細胞は、対象への投与後に血液毒性を引き起こさない。一部の実施形態では、本明細書で提供されるCAR-T細胞またはCAR-NK細胞による処置の方法は、支持療法を必要としない。一部の実施形態では、方法は、CARを含む免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップを含み、投与するステップは、免疫グロブリン療法、または造血を助けるための自己／同種異系HSCが後に続き、それと組み合わせて実施されもしない。一部の実施形態では、免疫グロブリン療法は、静脈内免疫グロブリン（IVIg）処置である。

【0419】

一部の実施形態では、ABPまたは医薬組成物は、免疫療法剤と組み合わせて投与されない。一部の実施形態では、ABPまたは医薬組成物は、併用療法によって投与されない。一部の実施形態では、ABPまたは医薬組成物は、免疫療法によって投与されない。一部の実施形態では、方法は、CARを含む免疫応答性細胞の治療有効量を投与するステップを含み、投与するステップは、造血を助けるための自己もしくは同種異系造血幹細胞療法が後に続き、それと組み合わせて実施されもしない。

【0420】

一部の実施形態では、方法は、ABP、医薬組成物または免疫応答性細胞を投与するステップの前に、対象を化学療法剤または造血幹細胞で処置するステップをさらに含む。一部の実施形態では、対象は、不応性疾患を有する。一部の実施形態では、対象は、不応性がんを有する。一部の実施形態では、対象は、再燃を有する。一部の実施形態では、対象は、化学療法剤または造血幹細胞移植による処置に対して応答性でない。

【0421】

一部の実施形態では、治療剤は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109を発現する細胞の生存に影響を与えるのに十分な量で投与される。ある特定の実施形態では、治療剤は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109を発現する細胞を排除するのに十分な量で投与される。一部の実施形態では、治療剤は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109を発現する細胞を低減または殺滅するのに十分な量で投与される。一部の実施形態では、治療剤は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109を発現するがん細胞を低減または殺滅するのに十分な量で投与される。一部の実施形態では、治療剤は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109に関連する生物学的効果を阻害するのに十分な量で投与される。一部の実施形態では、治

10

20

30

40

50

療剤は、対象におけるがん細胞の生存に影響を与えるのに十分な量で投与される。

【0422】

一部の実施形態では、本開示の方法は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤の有効量を対象に投与するステップを含み、この処置は、血液悪性疾患の処置のために対象に施される第1の処置（例えば、第1の治療または第一選択療法）である。一部の実施形態では、本開示の方法は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤の有効量を対象に投与するステップを含み、この処置は、血液悪性疾患の処置のために対象に施される第2の処置（例えば、第2の治療または第二選択療法）である。例えば、ある特定の実施形態では、対象は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤による処置の前に血液悪性疾患を処置するための第1の治療を受けたことがある。ある特定の実施形態では、第1の治療は、化学療法および造血幹細胞移植治療のうちの1つまたは複数から選択される。

10

【0423】

一部の実施形態では、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤を対象に投与するステップは、第一選択療法である。一部の実施形態では、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤を対象に投与するステップは、第二選択療法である。ある特定の実施形態では、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤を対象に投与するステップは、第一選択療法である。ある特定の実施形態では、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤を対象に投与するステップは、いずれの他のがん治療とも組み合わせられない。

20

【0424】

一部の実施形態では、対象は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤による処置の前に、不応性疾患を有する。ある特定の実施形態では、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤による処置の前の対象である対象は、がん治療に応答しなくなっている。ある特定の実施形態では、対象は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤による処置の前に、がん細胞ががん処置後に患者に存在する再燃した対象である。ある特定の実施形態では、対象は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤による処置の前に、第一選択療法に応答したことがない。ある特定の実施形態では、患者は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109からなる群から選択される標的タンパク質に特異的に結合する治療剤による処置の前に、第一選択療法に対して非応答性である。

30

40

【0425】

一部の実施形態では、対象は、成人である。ある特定の実施形態では、対象は、18歳より高齢、20歳より高齢、25歳より高齢、30歳より高齢、35歳より高齢、40歳より高齢、45歳より高齢、50歳より高齢、55歳より高齢、60歳より高齢、または65歳より高齢の成人である。ある特定の実施形態では、対象は、小児対象である。ある特定の実施形態では、対象は、18歳より若年、20歳より若年、25歳より若年、30歳より若年、35歳より若年、40歳より若年、45歳より若年、50歳より若年、55歳より若年、60歳より若年、または65歳より若年である。

50

【0426】

本開示の態様は、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）またはキメラ抗原受容体（CAR）をコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、部位特異的組込みのための標的ゲノム領域に対して相同な配列をさらに含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼ、例えば、CRISPR-Casシステム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）およびメガヌクレアーゼを使用する遺伝子編集のために設計される。

【0427】

本開示の態様は、ポリヌクレオチドを含むベクターを含む。遺伝子送達のために使用され得る任意のベクターが使用され得る。一部のバリエーションでは、ウイルスベクター（例えば、AAV、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス）が使用される。本開示において使用され得るベクターの非限定的な例には、ヒト免疫不全ウイルス；HSV、単純ヘルペスウイルス；MMSV、モロニー Maus 肉腫ウイルス；MSCV、レンチウイルス、マウス幹細胞ウイルス；SFV、セムリキ森林ウイルス；SIN、シンドビスウイルス；VEE、ベネズエラウマ脳炎ウイルス；VSV、水疱性口内炎ウイルス；およびVV、ワクシニアウイルスが含まれるがこれらに限定されない。

【0428】

一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスは、レトロウイルスの亜綱である。しかし、レンチウイルスは、非分裂細胞のゲノム中に組み込まれることができるが、レトロウイルスは、分裂細胞のみに感染することができる。

【0429】

一部の実施形態では、ベクターは、組換えAAVベクターである。一部の実施形態では、本開示の方法における使用のためのベクターは、ウイルス粒子（例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15およびAAV16が含まれるがこれらに限定されないAAVウイルス粒子）中にカプシド封入される。

【0430】

一部の実施形態では、方法は、ポリヌクレオチドを含むベクター、またはその医薬組成物を投与するステップを含む。一部の実施形態では、ベクターは、ポリヌクレオチドを標的細胞に *in vitro* または *in vivo* で送達するために使用される。

【0431】

一部の実施形態では、方法は、治療剤をコードするポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクター、またはその医薬組成物を投与するステップを含む。一部の実施形態では、非ウイルスベクターまたは非ウイルス的方法は、ポリヌクレオチドを標的細胞に *in vitro* または *in vivo* で送達するために使用される。

【0432】

ABPをコードするポリヌクレオチドを送達するための本発明の方法において使用され得る非ウイルス的送達方法の非限定的な例には、物理的方法、針、マイクロプロジェクトイル遺伝子移入もしくは遺伝子銃、電気穿孔、ソノポレーション、フォトポレーション、マグネトフェクション、ハイドロポレーション、機械的マッサージ、化学的ベクター無機粒子、リン酸カルシウム粒子、磁気粒子、ポリマーベースのベクター、または遺伝子送達剤、例えば、シリカ、金、カチオン性脂質、脂質ナノエマルジョン、固体脂質ナノ粒子ポリエチレンイミン（PEI）、キトサン、ポリ（DL-ラクチド）（PLA）およびポリ（DL-ラクチド-co-グリコシド）（PLGA）、デンドリマーもしくはポリメタクリレートが含まれるがこれらに限定されない。かかる方法は、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ramamoorthi et al., (Ramamoorthi et al., (2015) J. Clin. Diagnostic Res. 9 (1): GE01-GE06) および Sung et al., (Sung et al., (2019) Biomaterials Research

10

20

30

40

50

c h 23 (8) , p g s 1 - 87) において見出され得る。

【0433】

一部の実施形態では、方法は、治療剤の投与の前または後に、セクション3.4に記載されるように、対象の生体試料中の腫瘍特異的抗原の存在／非存在またはレベルを検出するステップをさらに含む。一部の実施形態では、本明細書で提供される処置方法は、セクション3.4に記載される方法を使用してMDまたはALを有すると診断された対象を処置するために使用される。一部の実施形態では、セクション3.4に記載される診断方法は、本明細書で提供される処置方法の有効性をチェックするために使用される。一部の実施形態では、方法は、対象から得られた試料中の骨髓性障害(MD)および急性白血病(AL)芽細胞の存在または非存在を決定するステップを含む。

10

【0434】

一部の実施形態では、本開示の方法は、骨髓性障害(MD)または急性白血病(AL)を有する対象を処置することを含み、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTE、CAR、もしくはCARを含む免疫応答性細胞、またはそれらの医薬組成物の有効量を投与するステップを含む。

【0435】

一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTE、またはCARを発現する免疫応答性細胞は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109を発現する細胞の生存に影響を与えるのに十分な量で投与される。ある特定の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTE、またはCARを発現する免疫応答性細胞は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109を発現する細胞を排除するのに十分な量で投与される。一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTE、またはCARを発現する免疫応答性細胞は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109を発現する細胞を低減または殺滅するのに十分な量で投与される。一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTE、またはCARを発現する免疫応答性細胞は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109を発現するがん細胞を低減または殺滅するのに十分な量で投与される。一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTE、またはCARを発現する免疫応答性細胞は、対象におけるがん細胞を低減または殺滅するのに十分な量で投与される。

20

30

【0436】

一部の実施形態では、CARを発現する免疫応答性細胞の有効量は、細胞10万個/kg～細胞1千5百万個/kgの範囲である。一部の実施形態では、方法は、CARを発現する免疫応答性細胞を対象に細胞10万個/kg～細胞2千5百万個/kgの間の範囲の用量で投与するステップを含む。

【0437】

一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTEまたはCARは、表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイによって測定した場合に、50nM、10nM、5nM、1nM、0.5nMまたは0.1nM未満またはそれと等しいK_Dで標的タンパク質に結合する。一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTEまたはCARは、表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイによって測定した場合に、50nM、10nM、5nM、1nM、0.5nMまたは0.1nM未満またはそれと等しいK_Dで標的タンパク質に結合する抗原結合ドメインを含む。

40

【0438】

一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTEまたはCARは、バイオレイヤー干渉法によって測定した場合に、500nM、50nM、10nM、5nM、1nM、0.5nMまたは0.1nM未満のK_DでヒトCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109に結合する。一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTEまたはCARは、バイオレイヤー干渉法によって測定した場合に、500nM、50nM、10nM、5nM、1nM、0.5nMまた

50

は0.1 nM未満の K_D でヒトCD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0439】

一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTEまたはCARは、市販の抗体または親和性成熟によって得られるその改変の、抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、市販の抗体は、CD69に対する抗体（例えば、Invitrogen 14-0699-82、ab201570、R&D MAB2359）である。一部の実施形態では、市販の抗体は、CD63に対する抗体（例えば、ab59479、BD 556019）である。一部の実施形態では、市販の抗体は、CD151に対する抗体（例えば、Invitrogen MA5-16443、BD 556056）である。一部の実施形態では、市販の抗体は、CD84に対する抗体（例えば、Biolegend 326002、NOVUS NBP2-44345）である。一部の実施形態では、市販の抗体は、CD109に対する抗体（例えば、R&D MAB4385、BD 56019）である。一部の実施形態では、市販の抗体は、CD72に対する抗体（例えば、Biolegend 316202、BD 555917、MAB 5405、Invitrogen PAS-97567）である。

10

【0440】

一部の実施形態では、ABP、ABP-薬物コンジュゲート、BiTEまたはCARは、A1、C1、F1、G1、C2、F2、H2、H3、F12もしくはB8、またはその改変の抗原結合ドメインを含む。

20

3.5.1. 追加の薬剤

【0441】

一部の実施形態では、本明細書で提供される処置の方法は、追加の薬剤を、ABPもしくはその医薬組成物、ABP-薬物コンジュゲートもしくはその医薬組成物、BiTEもしくはその医薬組成物、またはCARを発現する免疫応答性細胞もしくはその医薬組成物と組み合わせて投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、追加の薬剤は、ABPもしくはその医薬組成物、ABP-薬物コンジュゲートもしくはその医薬組成物、BiTEもしくはその医薬組成物、またはCARを発現する免疫応答性細胞もしくはその医薬組成物とは別々に、それと逐次に、またはそれと一緒に、投与される。

【0442】

一部の実施形態では、ABPまたはその医薬組成物は、追加の薬剤と組み合わせて投与される。一部の実施形態では、CARを発現する免疫応答性細胞またはその医薬組成物は、追加の薬剤と組み合わせて投与される。追加の薬剤をABPまたはその医薬組成物と組み合わせて用いて投与することは、ABPまたは医薬組成物を投与する前、投与している間または投与した後の追加の薬剤の投与を含み得る。一部の実施形態では、追加の薬剤をABPまたはその医薬組成物と組み合わせて用いて投与することは、追加の薬剤の投与を、ABPまたはその医薬組成物を投与する前に含む。一部の実施形態では、追加の薬剤をABPまたはその医薬組成物と組み合わせて用いて投与することは、追加の薬剤の投与をABPまたはその医薬組成物を投与した後に含む。一部の実施形態では、追加の薬剤をABPまたはその医薬組成物と組み合わせて用いて投与することは、追加の薬剤の投与をABPまたはその医薬組成物を投与するのと並行して含む。

30

40

【0443】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、化学療法剤または生物剤である。

【0444】

ある特定の実施形態では、追加の薬剤は、化学療法剤である。特定の実施形態では、化学療法剤は、シタラビン、ダウノルビシン、イダルビシン、クラドリビン、ミトキサントロン、アザシチジン、デシタビンおよびCPX-351（Vyxeos（登録商標））からなる群から選択される。

【0445】

特定の実施形態では、化学療法剤は、フルダラビンである。他の特定の実施形態では、

50

化学療法剤は、シクロホスファミドである。

【0446】

ある特定の実施形態では、追加の薬剤は、生物剤である。一部の実施形態では、生物剤は、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69またはCD109以外の標的タンパク質に対する抗体である。

【0447】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、ヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤である。一部の実施形態では、ソニックヘッジホッグ経路阻害剤は、ビスモデギブ、ソニデギブおよび三酸化ヒ素（ATO）から選択される。ある特定の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、

10

グラスデギブ（Daurismo（商標））である。

【0448】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、FMS様チロシンキナーゼ3（FLT3）阻害剤である。ある特定の実施形態では、FLT3阻害剤は、ミドスタウリン（Rydapt（登録商標））、ギルテリチニブ（Xospata（登録商標））、ソラフェニブ、レスタウルチニブ、キザルチニブおよびクレノラニブからなる群から選択される。

【0449】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1（IDH1）またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ2（IDH2）阻害剤である。ある特定の実施形態では、IDH1またはIDH2阻害剤は、イボシデニブ（Tibsovo（登録商標））またはエナシデニブ（Idhifa（登録商標））である。

20

【0450】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、B細胞リンパ腫2（BCL2）阻害剤である。ある特定の実施形態では、BCL2阻害剤は、ベネトクラクス（Venclexta（登録商標））である。

【0451】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、CD33標的化剤である。ある特定の実施形態では、CD33標的化剤は、ゲムツズマブオゾガマイシン（Mylotarg（商標））またはバダスツキシマブタリリン（SGN-CD33A）である。

【0452】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、細胞周期チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、細胞周期チェックポイント阻害剤は、Auroraキナーゼ阻害剤、Plk様キナーゼ1（PLK1）阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害剤またはチェックポイントキナーゼ1（CHK1）阻害剤である。

30

【0453】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体である。

3.6. 医薬組成物

【0454】

さらに別の態様では、本開示は、本明細書に記載される抗原結合タンパク質（ABP）、ABP-薬物コンジュゲート、BiTE、またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫応答性細胞を含有する医薬組成物を提供する。かかる組成物は、薬学的に許容される賦形剤との混合物中に、抗原結合タンパク質（ABP）、ABP-薬物コンジュゲート、BiTE、またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫応答性細胞の有効量を含む。

40

【0455】

一態様では、本開示は、ABPおよび薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を含む。

【0456】

50

別の態様では、本開示は、A B P－薬物コンジュゲートおよび薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を含む。

【0457】

別の態様では、本開示は、B i T Eおよび薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を含む。

【0458】

別の態様では、本開示は、キメラ抗原受容体（C A R）を発現する免疫応答性細胞および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を含む。

【0459】

医薬組成物は、例えば、組成物のpH、モル浸透圧濃度、粘度、透明さ、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解もしくは放出の速度、吸着または浸透を改変、維持または保存するための製剤化材料を含有し得る。

【0460】

適切な製剤化材料には、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）；緩衝剤（例えば、ホウ酸塩、重炭酸塩、T r i s－H C l、クエン酸塩、リン酸塩、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（E D T A））；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）；着色料；香味剤および希釈剤；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、クロロヘキシジン、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、p l u r o n i c（登録商標）、P E G、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（t y l o x a p a l））；安定性増強剤（スクロースまたはソルビトール）；浸透圧増強剤（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カリウム、マンニトールソルビトール）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤ならびに／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。中性緩衝食塩水、または同種血清アルブミンと混合した食塩水は、適切な希釈剤の例である。適切な業界標準に従って、防腐剤、例えば、ベンジルアルコールもまた添加され得る。組成物は、適切な賦形剤溶液（例えば、スクロース）を希釈剤として使用して、凍結乾燥物として製剤化され得る。適切な構成要素は、用いられる投薬量および濃度においてレシピエントにとって非毒性である。

【0461】

必要に応じて、組成物は、1つまたは複数の追加の薬剤、例えば、生理学的に活性な薬剤、例えば、抗血管新生物質、化学療法物質（例えば、カペシタビン、5－フルオロウラシルまたはドキシソルビン）、鎮痛物質などをさらに含み、これらの非排他的な例は、本明細書で提供される。

【0462】

本開示の別の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、中性または塩形態で製剤化され得る。事例的な薬学的に許容される塩には、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基と形成される）および無機酸、例えば、塩酸もしくはリン酸など、または有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などと形成される塩が含まれる。遊離カルボキシル基と形成される塩も、無機塩基、例えば、水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは第二鉄など、ならびに有機塩基、例えば、イソプロピルアミン、トリ

メチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどに由来し得る。製剤化の際に、溶液は、投薬製剤と適合性の様式で、治療有効な量で投与される。

【0463】

担体は、あらゆる溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗真菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁物、コロイドなどをさらに含み得る。医薬品活性物質のためのかかる媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。補足的活性成分もまた、組成物中に取り込まれ得る。語句「薬学的に許容される」は、ヒトに投与した場合にアレルギー反応も類似の有害反応も生じない、分子実体および組成物を指す。

【0464】

最適な医薬組成物は、例えば、意図した投与経路、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、Remington's Pharmaceutical Sciences、上記を参照されたい。かかる組成物は、ポリペプチドの物理的状態、安定性、in vivo放出の速度、およびin vivoクリアランスの速度に影響し得る。例えば、適切な組成物は、注射のための水、非経口投与のための生理的食塩水溶液であり得る。

【0465】

一部の実施形態では、活性成分（例えば、ABP、ABP-薬物コンジュゲート）は、少なくとも0.01mg/ml、少なくとも0.1mg/ml、少なくとも0.5mg/mlまたは少なくとも1mg/mlの濃度で、医薬組成物中に存在する。ある特定の実施形態では、活性成分は、少なくとも1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/mlまたは25mg/mlの濃度で、医薬組成物中に存在する。ある特定の実施形態では、活性成分は、少なくとも30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/mlまたは50mg/mlの濃度で、医薬組成物中に存在する。

【0466】

一部の実施形態では、医薬組成物は、本開示のタンパク質またはポリペプチドに加えて、1つまたは複数の追加の活性成分をさらに含む。追加の活性成分は、3.5.1に記載される追加の薬剤のうちの1つまたは複数である。

【0467】

医薬組成物は、ヒトまたは獣医薬のために適切な任意の投与経路による投与のために製剤化され得る。一部の実施形態では、医薬組成物は、注射のために適応される。一部の実施形態では、医薬組成物は、静脈内、筋肉内、腹腔内または皮下投与のために製剤化される。一部の実施形態では、医薬組成物は、静脈内注入のために適応される。一部の実施形態では、医薬組成物は、くも膜下腔内または脳室内投与のために製剤化される。

【0468】

一部の実施形態では、医薬組成物の用量は、細胞10万個/kg～細胞2千5百万個/kgの範囲である。一部の実施形態では、医薬組成物の用量は、細胞10万個/kg～細胞1千5百万個/kgの範囲である。様々な実施形態では、医薬組成物の用量は、細胞10万個/kg～細胞1千万個/kgの範囲である。様々な実施形態では、医薬組成物の用量は、細胞10万個/kg～細胞2千5百万個/kgの範囲である。一部の実施形態では、医薬組成物の用量は、細胞30万個/kg～細胞1千万個/kgの範囲である。一部の実施形態では、医薬組成物の用量は、細胞30万個/kg～細胞2千5万個/kgの範囲である。

【0469】

種々の実施形態では、単位投薬形態は、バイアル、アンプル、ボトルまたは事前充填されたシリンジである。種々の実施形態では、単位投薬形態は、点滴バッグで投与される。一部の実施形態では、単位投薬形態は、少なくとも0.01mg、0.1mg、0.5mg、1mg、2.5mg、5mg、10mg、12.5mg、25mg、50mg、75mgまたは100mgのABPまたはABP-薬物コンジュゲートを含有する。一部の実

10

20

30

40

50

施形態では、単位投薬形態は、少なくとも125mg、150mg、175mgまたは200mgのABPまたはABP-薬物コンジュゲートを含有する。一部の実施形態では、単位投薬形態は、少なくとも250mgのABPまたはABP-薬物コンジュゲートを含有する。一部の実施形態では、単位投薬形態は、少なくとも 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1.5×10^6 、 1×10^7 、 2×10^6 、 2.5×10^6 、 2.5×10^7 、 3×10^6 、 3.5×10^6 、 4×10^6 、 4.5×10^6 、 5×10^6 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2.5×10^8 、 5×10^8 、 7.5×10^8 、 1×10^9 、 2.5×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 2.5×10^{10} 、 5×10^{10} または 1×10^9 個の、CARを発現する免疫応答性細胞を含有する。一部の実施形態では、単位投薬形態は、少なくとも 1.5×10^4 、 1.5×10^5 、 1.5×10^6 、 1.5×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2.5×10^8 、 5×10^8 、 7.5×10^8 、 1×10^9 、 2.5×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 2.5×10^{10} 、 5×10^{10} または 1×10^9 個の、CARを発現する免疫応答性細胞を含有する。

10

【0470】

典型的な実施形態では、単位投薬形態の医薬組成物は、液体形態である。種々の実施形態では、単位投薬形態は、0.1mLと50mLとの間の医薬組成物を含有する。一部の実施形態では、単位投薬形態は、1mL、2.5mL、5mL、7.5mL、10mL、25mLまたは50mLの医薬組成物を含有する。

【0471】

特定の実施形態では、単位投薬形態は、0.01mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mLまたは1mg/mLの濃度の医薬組成物1mLを含有するバイアルである。一部の実施形態では、単位投薬形態は、0.01mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mLまたは1mg/mLの濃度の医薬組成物2mLを含有するバイアルである。

20

【0472】

一部の実施形態では、単位投薬形態の医薬組成物は、固体形態、例えば、可溶化のために適切な凍結乾燥物である。

【0473】

単一の投薬形態を産生するために担体材料と組み合わせられ得る活性成分の量は、一般に、治療効果を生じる化合物の量である。

【実施例】

30

【0474】

4. 実施例

4.1. 実施例1：腫瘍特異的抗原の同定

腫瘍特異的抗原(TSA)を、図1中に要約したように、AML患者試料から同定した。

【0475】

簡潔に述べると、腫瘍特異的抗原の候補遺伝子を、改良された選択プロセスを適用することによって、in silico標的抗原発見分析から得た。遺伝子を、HTA 2.0(Affymetrix)プラットフォームによって85個の小児AML試料からリスク層別化のために以前に生成された遺伝子発現プロファイル(GSE75461)に従って、AML芽球によって高発現されているものについて選択した。HTA 2.0(Affymetrix)プラットフォームは、アレイ上で合成される保存された配列を最小化することによって、有益な情報の収集を最大化する。この高解像度アレイ設計は、コード転写物および非コード転写物をカバーする、前例のない600万個よりも多くのプローブを含有した。このアレイ上のプローブの70%は、コード転写物のエクソンをカバーし、アレイ上のプローブの残り30%は、エクソン-エクソンスプライスジャンクションおよび非コード転写物をカバーした。このアレイの比類のないカバー範囲は、利用可能な全てのコード転写物および非コード転写物に関する洞察を提供した。

40

【0476】

データを使用して、高発現される遺伝子、即ち、85個全てのAML試料が分布の上の

50

変曲点を上回る (> 3.4) 発現を有したが、健康な骨髄対照試料はそのような発現を有さない遺伝子 (Benjamin-Hochberg 多重補正後の、AML 患者コホート、および健康な小児ドナーの 3 つの骨髄試料から得られた 3 つの HTA-アレイの limma コントラストによる、過剰発現された遺伝子) を同定した。

【0477】

これらの遺伝子の中で、それらが、検証されたサーフェソーム (surfaceome) タンパク質データセット <http://wlab.ethz.ch/cspa/> に従って細胞表面タンパク質抗原

(CSPA) であった場合に、サブセットを選択した。次いで、このプロセスからの候補を、公のデータセットである TARGET データベースを使用して検証し、そこから、262 個の AML 小児試料の遺伝子発現マトリックスをダウンロードした。TARGET データを RMA 正規化した；イタリア人 AML の 85 人の患者コホートおよび 262 個の TARGET AML 試料を、z-スコア正規化し、それにより、2 つのコホート間の箱ひげ図を介して、選択された遺伝子の相対的発現を比較することが可能となった。これは、疾患の発症の時点での小児 AML の最良の代表的な表面抗原としての、健康なドナー骨髄では発現されない 44 個の遺伝子 (第 1 のリスト - FL) の同定を可能にした。

【0478】

次いで、この第 1 のリスト - FL の 44 個の候補遺伝子を、タンパク質発現の以下の *in vitro* 試験に入るための最も有望な標的を選択することを目的として、広いカバー範囲および特異性について公のデータベースに問い合わせることによって分析した。GeneCards ソフトウェアを使用して、TSA の機能的説明、遺伝子染色体局在、公知の病理／がんとの関連、正常ヒト組織における mRNA 発現、推定されたタンパク質発現、細胞内位置、および関与する経路を調べ；PubMed を使用して、AML が含まれるがんにおける TSA の以前の関与について情報を得、以前の CART 開発プロジェクトにおけるそれらの関与を除外し、Xena Browser を使用して、AML における候補 TSA の発現選択性を予測した。これは、1500+ のデータセットおよび 50+ のがん型を含む公的なおよびプライベートの、マルチオミック (multi-omic) および臨床／表現型を探索するためのオンラインプラットフォームである。このツールは、The Cancer Genome Atlas (TCGA)、International Cancer Genome Consortium (ICGC)、Genomic Data Commons (GDC) および UCSC RNA-seq compendium からデータを含み影響力のあるがんゲノミクスデータセットのインタラクティブなオンライン視覚化を提供する。Xena は、SNV、INDEL、大きな構造的バリエーション (large structural variant)、コピー数バリエーション、遺伝子、転写物、エクソン、miRNA、lncRNA、タンパク質発現、DNA メチル化、ATAC-seq シグナル、表現型アノテーションおよび高レベルで導かれるゲノムパラメーター (higher-level derived genomic parameters) が含まれる任意の機能的ゲノムデータをバーチャルでサポートする。改良のこのプロセスは、組み入れ基準として、遺伝子機能 (がんに関連する) および細胞表面上での局在化を、ならびに除外基準として、i) 酵素およびリボソーム構成要素を考慮した上での機能、ii) 核膜が含まれる細胞表面以外の局在化；iii) AML 診断パネルまたは CART 開発における以前の関与、iv) Espacenet、Trade Mark information、patentscope から判断して以前に特許の一部であったこと、ならびに v) 複数のヒト組織における報告された高い発現を用いた。この改良プロセスの終了時に、FL の 44 個の遺伝子のうち 26 個を破棄し、18 個の候補 TSA を提供した。

【0479】

次いで、本出願人は、同じ *in silico* データセットに問い合わせ、その発現が分布の変曲点を下回った (> 2.4 かつ < 3.4) 遺伝子を選択することによって、第 2 のリスト - SL を生成した。この新たなリストは、TSA 改良について上記したのと

同じ分析プロセスを受けた追加の32個の候補TSAを含んだ。SLにおいて同定された32個のTSAのうち24個を、除外基準(i~v)に起因して破棄し、8つの追加の候補TSAを提供した。

【0480】

次いで、これら26個の候補TSA(FLからの18個の候補TSAおよびSLからの8つの追加の候補TSA)を、フローサイトメトリー(FC)によって、タンパク質の発現および局在化について特徴付けた。候補TSAを認識する市販の一次抗体を、陽性対照細胞を用いて最初に試験した。抗体が対照上の染色を提供することが実証されたところで、TSAについての細胞表面染色を、最低2つのAML細胞系(SHI-1およびHL-60)で実施した。26個の候補TSAのうち11個は、フローサイトメトリーによって、AML細胞表面上で発現されることが確認された(図1中に示されるように、強くまたは弱く発現される)。

10

【0481】

6つのAML-TSA(CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109)を、AML細胞系SHI-1およびHL-60を用いるフローサイトメトリーによって検出された強い陽性シグナルおよび特異性に基づいて、最終的に選択した(図1)。さらなる検証のために、KASUMI-1、MOLM-13およびMV4-11が含まれる追加のAML細胞系上でのそれらの発現を、フローサイトメトリーに使用したのと同じ抗体を用いる免疫蛍光によって試験した。

20

【0482】

フローサイトメトリーおよび蛍光免疫組織化学データは、図2Aおよび2B(CD69)、図3Aおよび3B(CD63)、図4Aおよび4B(CD151)、図5Aおよび5B(CD84)、図6Aおよび6B(CD109)、ならびに図7Aおよび7B(CD72)中に提供される。図2C(CD69)、図3C(CD63)、図4C(CD151)、図5C(CD84)、図6C(CD109)、および図7C(CD72)に提供されるように、抗原の発現は、AML細胞に特異的であった。はるかに低い発現または発現なしが、健康な造血細胞:CD19+Bリンパ球、CD3+Tリンパ球、CD33+骨髓性前駆体細胞が含まれる健康なドナー末梢血単核球(PBMC)から得られた分画された下位集団の、および臍帯血試料から抽出したCD34+細胞に対する、フローサイトメトリーによって検出された。正常な再生中の骨髓中の健康なBM下位集団における、正常な再生中の骨髓中のCD34+およびCD34+CD38-下位集団における、急性リンパ芽球性白血病患者のゲートされた芽球における、診断時のAML患者のゲートされた芽球における、再燃時のAML患者のゲートされた芽球における、残存芽球を有するAML患者のゲートされた芽球における、ならびに他の悪性疾患患者、例えば、骨髓性新生物を有する患者のゲートされた芽球におけるTSAの発現もまた、それぞれ以下の表1~8に要約する。

30

【0483】

表1:健康な血液単核球下位集団における選択されたTSAの発現 表1は、健康な血液試料におけるTSAの発現を提供し、末梢血単核球下位集団におけるTSAの不均一な薄暗い発現を示した。

40

【表 1】

	CD19 B-リンパ球	CD3 T-リンパ球	CD33 単球	CD33 顆粒球
CD69	1/6 POS D 5/6 NEG	3/9 POS D 6/9 NEG	1/8 POS D 7/8 NEG	3/9 POS M 6/9 NEG
CD63	6/6 NEG	9/9 NEG	1/8 POS B 2/8 POS M 5/8 NEG	1/9 POS B 3/9 POS D 5/9 NEG
CD151	6/6 NEG	5/9 POS D 4/9 NEG	3/8 POS M 1/8 POS D 4/8 NEG	3/9 POS D 6/9 NEG
CD84	6/6 NEG	6/9 POS D 3/9 NEG	3/8 POS M 5/8 NEG	9/9 NEG
CD109	2/6 POS D 4/6 NEG	1/8 POS M 6/8 POS D 1/8 NEG	8/8 NEG	9/9 NEG
CD72	1/6 POS D 5/6 POS M	2/9 POS D 7/9 NEG	8/8 NEG	9/9 NEG

強い陽性（WHO分類）

POS B：陽性 bright

POS M：陽性 中間

POS H：陽性 不均一

PP2：部分的陽性2

（AIEOP-BFM分類）

弱い陽性（WHO分類）

POS D：陽性 dim

PP1：部分的陽性1

（AIEOP-BFM分類）

表2：正常な再生中の骨髄の選択されたTSA下位集団の発現

【表 2】

	B-リンパ球	T-リンパ球	単球	骨髄球
CD69	NEG	POS B* (強い)	NEG	NEG
CD63	NEG	NEG	POS M (強い)	POS H (強い)
CD151	NEG	NEG	POS M (強い)	NEG
CD84	NEG	NEG	POS B (強い)	POS H (強い)
CD109	NEG	NEG	NEG	NEG
CD72	POS B (強い)	NEG	NEG	NEG

強い陽性（WHO分類）

POS B：陽性 bright

POS M：陽性 中間

POS H：陽性 不均一

PP2：部分的陽性2

（AIEOP-BFM分類）

【0484】

弱い陽性（WHO分類）

POS D：陽性 dim

PP1：部分的陽性1

（AIEOP-BFM分類）

表2は、治療の終了時に収集した再生中の骨髄由来の健康な下位集団におけるTSA発現を提供し、3／6のTSAにおいて、骨髄性系譜の下位集団における低い／薄暗い発現を示した。

表3：正常な再生中のCD34⁺およびCD34⁺CD38⁻下位集団における選択されたTSAの発現

10

20

30

40

50

【表 3】

	CD34+	CD34+ CD38-
CD69	NEG	NEG
CD63	6/11 弱いPOS (D) 5/11 NEG	6/11 弱いPOS (D) 5/11 NEG
CD151	9/12 弱いPOS (PP1) 1/12 強いPOS (PP2) 2/12 NEG	7/12 弱いPOS (D) 3/12 強いPOS (M) 2/12 NEG
CD84	11/12 弱いPOS (PP1) 1/12 強いPOS (PP2)	12/12 弱いPOS (D)
CD109	強いPOS (H)	強いPOS (B)
CD72	強いPOS (PP2)	NEG

10

強い陽性 (WHO分類)

POS B : 陽性 bright

POS M : 陽性 中間

POS H : 陽性 不均一

PP2 : 部分的陽性 2

(AIEOP-BFM分類)

【0485】

弱い陽性 (WHO分類)

POS D : 陽性 dim

PP1 : 部分的陽性 1

(AIEOP-BFM分類)

20

表 3 は、治療の終了時に収集した再生中の骨髄由来の幹-前駆体 CD34⁺CD38⁻ 下位集団における TSA 発現を提供し、TSA の一部について弱い発現を示した。

表 4 : 診断時の B または T 急性リンパ芽球性白血病における TSA の発現

【表 4】

	B-芽球	T-芽球
CD69	3/6 POS H (強いPOS) 3/6 POS D (弱いPOS)	POS D (弱いPOS)
CD63	1/6 POS H 5/6 NEG	NEG
CD151	6/6 NEG	NEG
CD84	6/6 NEG	POS M (強いPOS)
CD109	5/6 POS D (弱いPOS) 1/6 NEG	NEG
CD72	4/6 POS B (強いPOS) 2/6 POS H (強いPOS)	NEG

30

40

強い陽性 (WHO分類)

POS B : 陽性 bright

POS M : 陽性 中間

POS H : 陽性 不均一

弱い陽性 (WHO分類)

POS D : 陽性 dim

PP1 : 部分的陽性 1

(AIEOP-BFM分類)

50

PP2：部分的陽性2

(AIEOP-BFM分類)

【0486】

表4は、診断時の急性リンパ芽球性白血病試料におけるTSA発現を提供し、Bリンパ芽球を検出するのに適切な全てのTSAを示したが、Tリンパ芽球は、CD69およびCD84を排他的に発現していた。

表5：診断時のAMLにおけるTSAの発現

【表5】

	芽球 (WHO分類)	芽球 (AIEOP-BFM分類)
CD69	1/10 POS B 3/10 POS M 1/10 POS H 3/10 POS D 2/30 NEG	4/10 強いPOS 4/30 弱いPOS 2/30 NEG
CD63	1/10 POS B 3/10 POS H 1/10 POS M 1/10 PP2 D 2/10 POS D 2/10 NEG	5/10 強いPOS 3/10 弱いPOS 2/10 NEG
CD151	1/10 POS B 2/10 POS M 2/10 POS H 3/10 POS D 2/10 NEG	3/10 強いPOS 5/10 弱いPOS 2/10 NEG
CD84	5/10 POS B 3/10 POS M 1/10 POS D 1/10 PP1	8/10 強いPOS 2/10 弱いPOS
CD109	2/5 POS H 3/5 NEG	2/5 強いPOS 3/5 NEG
CD72	1/3 POS D 2/3 NEG	1/3 弱いPOS 2/3 NEG

強い陽性 (WHO分類)

POS B：陽性 bright

POS M：陽性 中間

POS H：陽性 不均一

PP2：部分的陽性2

(AIEOP-BFM分類)

【0487】

表5は、診断時の急性骨髄球性白血病試料におけるTSA発現を提供し、骨髄性芽球を検出するのに適切な全てのTSAを示し、CD69およびCD84は、最も特異的であった。表6：再燃時のAMLにおけるTSAの発現

弱い陽性 (WHO分類)

POS D：陽性 dim

PP1：部分的陽性1

(AIEOP-BFM分類)

10

20

30

40

50

【表 6】

	芽球 (WHO分類)	芽球 (AIEOP-BFM分類)
CD69	2/3 POS B 1/3 DIM	2/3 強いPOS 1/3 弱いPOS
CD63	1/3 POS H 1/3 POS D 1/3 NEG	1/3 強いPOS 1/3 弱いPOS 1/3 NEG
CD151	1/3 POS B 1/3 POS M 1/3 POS D	2/3 強いPOS 1/3 弱いPOS
CD84	3/3 POS B	3/3 強いPOS
CD109	1/3 POS B 1/3 POS H 1/3 NEG	2/3 強いPOS 1/3 NEG
CD72	1/3 POS M 2/3 NEG	1/3 強いPOS 2/3 NEG

強い陽性（WHO分類）

POS B：陽性 bright

POS M：陽性 中間

POS H：陽性 不均一

PP2：部分的陽性2

（AIEOP-BFM分類）

【0488】

弱い陽性（WHO分類）

POS D：陽性 dim

PP1：部分的陽性1

（AIEOP-BFM分類）

表6は、診断時の急性骨髄球性白血病試料におけるTSA発現を提供し、疾患再燃時に芽球を検出するのに適切な全てのTSAを示し、CD69およびCD84は、より特異的である。

表7：残存芽球（＜5％）を有する処置されたAMLにおけるTSAの発現

10

20

30

40

50

【表 7】

	芽球 (WHO分類)	芽球 (AIEOP-BFM分類)
CD69	2/7 POS M 1/7 PP1 2/7 POS D 2/7 NEG	2/7 強いPOS 3/7 弱いPOS 2/7 NEG
CD63	2/6 POS B 3/6 POS D 1/6 NEG	2/6 強いPOS 3/6 弱いPOS 1/6 NEG
CD151	1/3 POS M 2/3 POS D	1/3 強いPOS 2/3 弱いPOS
CD84	6/7 POS M 1/7 NEG	6/7 強いPOS 1/7 NEG
CD109	1/1 NEG	1/1 NEG
CD72	1/1 NEG	1/1 NEG

強い陽性 (WHO分類)

POS B : 陽性 bright

POS M : 陽性 中間

POS H : 陽性 不均一

PP2 : 部分的陽性 2

(AIEOP-BFM分類)

【0489】

弱い陽性 (WHO分類)

POS D : 陽性 dim

PP1 : 部分的陽性 1

(AIEOP-BFM分類)

表 7 は、芽球が 0 % と 5 % との間の範囲である骨髄性残存疾患を伴う、治療の間に収集した骨髄試料における TSA 発現を提供し、CD 69 および CD 84 は、低い疾患レベルを検出するのに最も適切である。

表 8 : 骨髄性新生物における TSA の発現

【表 8】

	芽球 (WHO分類)	芽球 (AIEOP-BFM分類)
CD69	1/4 POS B 2/4 POS D 1/4 NEG	1/4 強いPOS 2/4 弱いPOS 1/4 NEG
CD63	2/3 POS D 1/3 NEG	5/7 強いPOS 2/7 NEG
CD151	1/2 POS B 1/2 POS M	2/2 強いPOS
CD84	2/4 POS B 1/4 POS M 1/4 POS D	3/4 強いPOS 1/4 弱いPOS

10

20

強い陽性 (WHO分類)

POS B : 陽性 bright

POS M : 陽性 中間

POS H : 陽性 不均一

PP2 : 部分的陽性 2

(AIEOP-BFM分類)

【0490】

表 8 は、診断時の骨髄性新生物の骨髄試料における TSA 発現を提供し、異形成細胞を明らかにする CD 69、CD 84 および CD 72 の能力を示した。

30

【0491】

特異的発現を、健康なドナー初代線維芽細胞上での TSA の発現がないことまたは TSA の低い発現を観察することによって、さらに確認した (図 8)。

【0492】

TSA の発現を、AML とは異なる固形および液性腫瘍を示す他のがん細胞系においても試験した (図 10)。6 つの TSA は、種々のレベルで発現されたが、全体的な発現レベルは、これらの他のがん細胞では低かった。

【0493】

これらの研究は、6 つの選択された TSA が、試験した全ての AML 細胞系ではないにしても、その大多数においてロバストかつ選択的に発現されることを示している。6 つの TSA の高発現をまた、それらの遺伝子発現プロファイルを調べることによって、実験室で入手可能な 2 つの AML 患者由来外植片 (PDX) (初代小児 AML 試料から生成した) を用いて、評価および確認した。

40

【0494】

TSA の安定性および予測値を、遺伝的リスク層別化に従って、診断のためまたは治療後の寛解を試験するために得た小児 AML 試料におけるそれらの mRNA 発現を評価することによって調査した。TSA の高発現が、疾患の活動期の間 (診断時) に確認され、低減された発現が、治療の終了時に収集した試料において確認された。

方法

50

【0495】

患者の試料および細胞系。骨髓（BM）試料を、標準化された操作手順に従って、収集、処理および分析した。AMLに*de novo*で罹患した患者由来の42個の試料 – 診断時の30個および再燃時の12個のAML。骨髓性新生物由来の4つの試料、残存芽球（<5%）を有する、治療の間に収集したAMLの7つの試料、診断時のB-ALLの6つの試料およびT-ALLの1つの試料、ならびに疾患寛解状態にある場合には追跡の間に収集した13個のBM試料、再生中であるとの特徴は、以前に定義された通りである（Buldini B. et al., BJH 2018）。

【0496】

全てのAML細胞系は、DSMZが購入した。HL-60、Kasumi-1およびMOLM-13は、1%ペニシリン-ストレプトマイシン（GIBCO、Life Technologies、Grand Island、NY、USA）、1%L-グルタミン（GIBCO）および10%胎仔ウシ血清（GIBCO）を補充したRPMI（GIBCO、Life Technologies、Paisley、UK）中で培養した。MV4-11およびSHI-1は、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1%L-グルタミンおよび10%胎仔ウシ血清を補充したダルベッコ改変培地（GIBCO）中で培養した。

【0497】

末梢血単核球（PBMC）を、Ficoll密度分離によって、インフォームドコンセントを得た健康なドナーのバフィーコートから得た。CD34陽性細胞を、Ficoll密度分離と、その後の、プロトコルに従うCD34 MicroBead Kit（Miltenyi Biotech GmbH、Bergish Gladbach Germany）からのカラムにおける磁気単離とによって、インフォームドコンセントを得た健康なドナーの臍帯血から得た。全血由来の初代細胞（管1つあたり最大で100μL）を、コンジュゲート抗体で染色した。

フローサイトメトリー分析。

【0498】

BM試料を、暗中で15分間にわたって一次コンジュゲート抗体で染色し、次いで、溶血させ、遠心分離した。細胞を、PBS中に再懸濁し、最低30,000個の事象を獲得するBD FACS CANTO IIによって分析した。

【0499】

臨床的多パラメーター分析（表4）のために使用した一次抗体は、以下の抗ヒト抗体：CD45 V500（BD Pharmingen、カタログ番号560777）、CD45 APC-Cy7（BD Pharmingen、カタログ番号348815）、CD34 PC5（Beckman Coulter、カタログ番号A07777）、CD38 PE-Cy7（BD Pharmingen、カタログ番号335825）、CD33 APC（BD Pharmingen、カタログ番号551378）、CD7 V450（BD Pharmingen、カタログ番号642916）、HLA-DR V500（BD Horizon、カタログ番号561224）、CD33 PC5（Beckman Coulter、カタログ番号I112647）、CD117 PC7（Beckman Coulter、カタログ番号IM3698）、CD34 A750（Beckman Coulter、カタログ番号B92463）、CD38 V450（BD Pharmingen、カタログ番号561378）、CD19 PE（exbio、カタログ番号1P-305-T100）、CD7 PC5（Beckman Coulter、カタログ番号I113613）、CD34 APC（BD Pharmingen、カタログ番号345804）、CD3 APC-Cy7（BD Pharmingen、カタログ番号341110）と共に、CD69 A488（R&D Systems、カタログ番号FAB23591G）、CD63 PE（BD Pharmingen、カタログ番号556020）、CD151 PE（R&D Systems、カタログ番号FAB1884P）、CD84 APC（Biolegend、カタログ番号3260

10

20

30

40

50

10)、CD109 A488 (R&D Systems、カタログ番号FAB4385G)、CD72 BV421 (BD Pharmingen、カタログ番号743794)であった。

【表9】

表9: 多パラメーターフローサイトメトリー分析によってTSA発現を検出するためのパネル

	FITC	PE	PC5	PC7	APC	APCCY7	V450	V500
1	CD69	CD63	CD34	CD38	CD33	CD45	CD7	HLA-DR
2	CD109	CD151	CD33	CD117	CD84	CD34	CD38	CD45
3	CD69	CD19	CD7	CD38	CD34	CD3	CD72	CD45
4	CD69	(CD4)	CD7	CD34	CD84	CD45	CD38	CD8

10

【0500】

表9は、急性白血病または骨髄性新生物のフローサイトメトリーによる、診断時の免疫表現型を決定するための抗体診断パネルを示す。

抗体の検証のための細胞内染色。

【0501】

上に列挙した全ての一次抗体を、ガイドラインによって示唆されたように、PBMCの細胞内染色を実施することによって、最初に検証した。

【0502】

簡潔に述べると、細胞 (6×10^5 個) を、リン酸 (Phosphatase) 緩衝食塩水 (PBS) 中4%のパラホルムアルデヒドで、室温で15分間固定し、次いで、PBSで3回リンスした。次に、これらの細胞を、PBS中0.1%のTWEEN (登録商標) 20で20分間透過処理し、PBS中3%のウシ血清アルブミン (BSA) で30分間ブロッキングした。透過処理した細胞を、Fc Receptor Blocking (Miltenyi) と一緒に一次抗体で30分間染色し、次いで、二次抗体と共に20分間インキュベートした。

30

細胞表面染色。

【0503】

一次抗体を、AMLおよび他のがん細胞系、PBMC、ならびに臍帯血に由来するCD34陽性細胞の表面上でのそれらの結合について試験した。細胞 (3×10^5 個) を、PBS中3%のBSAでブロッキングし、Fc Receptor Blockingと一緒に一次抗体で20分間染色した。PBSで洗浄した後、細胞を、二次抗体で20分間染色した。

40

【0504】

PBMC下位集団について、TSAに対する抗体を、以下の抗ヒト抗体: CD3-APC (Beckam Coulter, Marseille, France)、CD19-PE (Beckam Coulter)、CD33-PC5 (Beckam Coulter) と一緒に、20分間使用した。次に、細胞を、二次抗体で20分間染色した。細胞を、CytoFLEX (Beckam Coulter) およびFlow Joソフトウェア (バージョン9.7, TreeStar Inc.) を使用して分析した。

免疫蛍光。

【0505】

50

これらの分析に使用した一次抗体は、eBioscience、AbcamおよびBDからである；二次抗体は、ヤギ抗マウスIgG Alexa488抗体（Life Technologies）である。細胞（ 3×10^5 個）を、フィブロネクチン（40 μ g/ml）（Corning）で事前コーティングした培養チャンバースライド（FALCON、Big Flats、NY、USA）の底に、37℃で2時間播種した。このインキュベーション時間の後、細胞を、ガイドラインに従って、特異的膜色素であるMembrane Fix色素（Biotium）で37℃で5分間染色した。細胞を、PBS中4%のホルムアルデヒドで15分間固定し、洗浄した後、PBS中3%のBSAで30分間ブロッキングした。飽和後、細胞を、Fc Receptor Blockingと一緒に一次抗体で4℃で一晩染色し、次いで、二次抗体で室温で1時間染色した。細胞を、Zeiss 2.6レーザー走査顕微鏡でイメージングした。画像を、Image Jwin 32ソフトウェアを使用して分析した。

10

4.2. 実施例2：AML-TSAを標的化する処置の方法

【0506】

6つのAML-TSA（即ち、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69およびCD109）を、実施例1に記載したように試験し、以下に基づいて選択した：i）原発性骨髄性新生物、急性白血病および急性骨髄球性白血病におけるロバストな広い発現、ii）CD34+CD38+HSPCにおける発現の欠如／低い発現、iii）腫瘍発生との関連、ならびにiv）AML細胞系における発現。

20

【0507】

TSAのうちの1つを標的化する治療の開発のために、各標的に対する2～4つの異なる市販の抗体を試験して、各TSAに対する最良の単鎖可変断片（ScFv）を設計した。抗体の各々について、AML細胞系に対するフローサイトメトリー結果は、図8に提供される。

【0508】

さらに、TSAに対する新規抗体を、当該分野で公知の方法を使用して、例えば、免疫原調製、免疫化、ハイブリドーマ産生、スクリーニングおよび精製が関与する手順、またはファージディスプレイされたライブラリーもしくは免疫化抗体ライブラリーのパニングのための手順を使用して、生成する。新規抗体を、TSA標的に対するそれらの結合親和性および特異性についても試験する。

30

【0509】

その結合親和性および特異性について選択された抗体を、ABP-薬物コンジュゲートおよびCAR-T細胞の開発のために使用する。ABP-薬物コンジュゲートを、選択された抗体を細胞傷害剤にコンジュゲートすることによって生成する。CARを、選択された抗体の抗原結合ドメインを細胞外ドメインとして使用することによって生成する。抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメインおよび必要に応じて少なくとも1つの共刺激ドメインを含むCARをコードするポリヌクレオチドを生成する。ポリヌクレオチドを、T細胞またはNK細胞にトランスフェクトして、CAR-T細胞またはCAR-NK細胞を生成する。

【0510】

ABP、ABP-薬物コンジュゲートおよびCAR-T細胞の各々を、AML細胞系ならびに初代小児AML試料を使用してin vitroで試験する。ABP、ABP-薬物コンジュゲートまたはCAR-T細胞が、AML細胞系または初代AML細胞の細胞培養物に適用される場合、これは、がん細胞に対して特異的に、細胞傷害効果を誘導する。

40

【0511】

ABP-薬物コンジュゲートおよびCAR-T細胞を、AML細胞系を静脈内注射したNSG（NOD/scid IL-2Rgnull）マウス（同質遺伝子ヒト疾患モデル）を使用して、および患者由来異種移植片（PDX）動物モデルを使用することによって、in vivoでも試験する。動物モデルにおけるがん細胞は、末梢血、骨髄または脾臓において、ABP、ABP-薬物コンジュゲートまたはCAR-T細胞の投与後に減少

50

する。

4. 3. 実施例 3 : C A R - T 細胞を使用して A M L - T S A を標的化する処置の方法

【0512】

生成された C A R 構築物の使用に基づく T 細胞 - 免疫療法アプローチのための標的としての選択された T S A (C D 6 3、C D 1 5 1、C D 7 2、C D 8 4、C D 6 9 および C D 1 0 9) の使用の検証。

【0513】

6 つの腫瘍関連抗原、即ち、C D 6 9、C D 6 3、C D 1 5 1、C D 8 4、C D 1 0 9 および C D 7 2 が、小児急性白血病および骨髄性障害に独自に関連すると同定された。C D 6 9 および C D 8 4 抗原を、*in vitro* および *in vivo* で特徴付けたところ、診断時および再燃時に収集した急性骨髄球性白血病 (A M L) 初代試料に高度に特異的であることが実証された。C D 6 9 および C D 8 4 抗原は、診断 (症例のそれぞれ 7 5 % および 9 6 % において) または再燃時に収集した急性骨髄球性白血病 (A M L) 骨髄試料を含む骨髄性障害において、および芽球 > 1 かつ ≤ 1 0 % と定義される残存疾患に関する試料である治療後に収集した試料において、高度に発現されることが判明した。興味深いことに、C D 7 2 は、診断時に調べた B 細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病試料の大部分 (B C P - A L L の 9 8 %) において、ならびに診断時に A M L 症例の大多数 (6 6 %) において発現された。

10

【0514】

このデータに基づいて、11 個の新規単鎖可変断片 (S c F v) 配列 (A 1、C 1、F 1、G 1、C 2、F 2、H 2、H 3、F 1 2 および B 8) をファージディスプレイによって開発して、A M L 芽球上の C D 6 9 または C D 8 4、または C D 6 9 および C D 8 4 の組合せを認識するキメラ抗原受容体 (C A R) を生成した。C D 7 2 抗原は、急性リンパ芽球性白血病 (A L L) に高度に特異的であることが示され、C D 1 9 マーカーを高頻度で喪失している、C D 1 9 指向性免疫療法で処置された A L L 患者の診断のための大きい潜在的可能性を有していた。

20

新規 C D 8 4 および C D 6 9 C A R - T 細胞の設計および製造

【0515】

2 つの新規抗原 C D 8 4 および C D 6 9 を、A M L 免疫療法のための潜在的標的として優先順位付けした。ファージディスプレイを使用して、最大で数十億個の抗体標的を含有する大きいコンビナトリアルライブラリーから、両方の抗原に対する高親和性抗原バインダーを見出した。方法は、他と比較して本発明者らの標的への高い親和性の結合を有するファージ集団内のファージを富化するための反復プロセスとして、高い親和性を有するファージの集団を富化した後に、ライブラリーを本発明者らの抗原に曝露させ、次いで、最も高い結合親和性を有するもののみを溶出および増幅することによる、6 ラウンドのパニングを検討した。この定性的選択プロセスにより、C D 6 9 について 8 7 個のクローンおよび C D 8 4 について 6 つのクローンが同定された。定量的イムノアッセイによる抗体 - 抗原相互作用のより正確な評価を可能にする E L I S A 技法を使用する検証により、それぞれ C D 6 9 および C D 8 4 に対する良好な候補である 8 つおよび 2 つの S c F v 配列が確認された。遺伝子合成により、10 個の新規 S c F v 遺伝子が産生され、次いでこれらを、p U C 5 7 プラスミド中に、ゼータ (C D 3 ζ) シグナル伝達ドメインと組み合わせ

30

40

【0516】

C A R - T 細胞を、ヒトナイーブ抗原結合性断片 (F a b) ファージライブラリー内で

50

同定された4つの異なる特異的 S c F v、即ち、C D 8 4 を認識する 1 4 7 2 2 - P 1 - F 1 2 および 1 4 7 2 2 - P 1 - B 8、ならびに C D 6 9 を認識する 1 4 7 2 1 - P 1 - H 3 および 1 4 7 2 1 - P 1 - G 1 を用いて製造した。4つの C A R 構築物のヌクレオチド（配列番号 2 4 ~ 3 4）およびアミノ酸配列（配列番号 3 5 ~ 4 4）は図 2 7 に提供される。ウイルス形質導入の前に、T 細胞を、C D 4 および C D 8 M i c r o B e a d s を使用する磁気富化によって、健康なドナーから収集した末梢血単核球（P B M C）から単離し、引き続いて、T C e l l T r a n s A c t（商標）培地で活性化した。次いで、T e x M A C S（商標）中での 4 8 時間の拡大増殖後、T 細胞を、I L - 7 および I L - 1 5 補充培地中で、1 0 の感染多重度（M O I）で、C A R をコードする L V で形質導入した。2 4 時間の形質導入後、ベクターを洗浄し、C A R - T 細胞は、1 4 日間の拡大増殖を受けた（図 1 4）。形質導入効率を、デジタル液滴ポリメラーゼ連鎖反応（d d P C R）によって測定し、細胞 1 つ当たりのベクターコピー数（V C N）として表した；平均 V C N は、製造された全ての C A R - T 細胞において 2 . 5 と 3 3 . 7 との間の範囲であり、異なる C A R - T 産物間で V C N における有意差は存在しなかった（図 1 5）。モック形質導入した T 細胞（空の C A R）を対照として使用した。

10

20

30

40

50

【0517】

新たに製造された C D 8 4 および C D 6 9 C A R - T 細胞の効力および特異性を *i n v i t r o* および *i n v i v o* で適切に試験するために、A M L 細胞系を、フローサイトメトリーによって、C D 8 4 および C D 6 9 の細胞膜発現について最初にスクリーニングした。H L - 6 0 および S H I - 1 は、両方の抗原を高いレベルで発現し、標的細胞であった（図 1 6）；M V 4 - 1 1 および M O L M - 1 3 は、C D 8 4 のみを発現したが、K a s u m i - 1、U 9 3 7 および K 5 6 2 細胞は C D 6 9 のみを発現し（図 1 6）、それぞれ C D 6 9 または C D 8 4 についての対照細胞系として適切であった。

【0518】

C A R 設計は、C D 8 4 および C D 6 9 C A R - T 細胞の拡大増殖、生存度および表現型に影響を与えない。

【0519】

1 4 日間の拡大増殖の終了時（C A R - T 細胞製造プロセスの 1 7 日目に対応する）の製造された C A R - T 細胞を計数したところ、2 倍と 2 0 倍との間の範囲の拡大増殖率が示され（図 1 7）、出発ドナー P B M C に主に起因して大きい可変性を有した（図 1 8 A）。T 細胞は生存しており、C D 8 ⁺ 細胞よりも C D 4 ⁺ 細胞が富化されており（図 1 8 B）、大部分は、予想されたように、ナイーブおよび幹細胞メモリー（T_n + T_{scm}、C D 1 9 7 [C C R 7] ⁺ C D 4 5 R 0 ⁻）、ならびにセントラルメモリー（T_{cm}、C D 1 9 7 (C C R 7) ⁺ C D 4 5 R 0 ⁺) T 細胞を含んだ（図 1 9 A および 1 9 B）。拡大増殖の際に、C D 8 4 および C D 6 9 C A R - T 細胞は、培養条件に应答して、C D 2 5、C D 1 5 4、C D 1 0 7 a および C D 1 3 7 の上方調節、ならびに C D 3 6 6、C D 2 2 3 および C D 2 7 9 の上方調節によって示されるように、空の C A R - T 細胞と同じ程度で、活性化および消耗の両方を示した。同じ結果が対照 T 細胞（空の C A R）で観察され、C A R カセットが T 細胞機能を変更していなかったことが確認されたことは、注目に値する（図 2 0 A および 2 0 B）。

C D 8 4 および C D 6 9 C A R - T 細胞は、*i n v i t r o* で、有効な抗腫瘍溶解活性を有する

【0520】

新たに生成された C D 8 4 および C D 6 9 C A R - T 細胞の活性を試験するために、C A R - T 細胞を、培地単独（---）中で、または抗原を発現する標的 A M L 細胞系との共培養物中で維持した。H L - 6 0 に対しては 1 0 % と 8 0 % との間の範囲、S H I - 2 細胞に対しては 5 0 % と 9 0 % との間の範囲の、標的細胞系に対する、試験した 4 つの S c F v 配列による有意な *i n v i t r o* 抗腫瘍活性が測定された。これらの結果を、1) C D 3 3 ⁺ 死細胞の頻度（A n n e x i n V ⁺ および / または 7 A A D ⁺、図 2 1）、2) 溶解効力（図 2 2）、ならびに 3) ルシフェラーゼ形質導入した A M L 細胞におけ

る生物発光シグナル（図23）を評価することによって、さらに確認する。活性化されたCAR-T細胞の持続もまた、細胞計数によって*in vitro*で最大で48時間モニタリングした。CAR-T細胞の活性は、標的AML細胞数の付随する低減（白の四角）を伴う、Tリンパ球の増加した増殖（黒の四角）によって特徴付けられる（図24）。

【0521】

CD69を発現する標的細胞系を標的とする、A1、F1、C2およびH2 ScFv（複数可）のAML標的細胞系の特異的溶解活性が、*in vitro*で示された。抗CD-84 B8およびF12 ScFv（複数可）を有するCAR-Tによる、小児AML異種移植片（PDX）に由来する初代AML細胞の特異的溶解活性が、*in vitro*で示された。

10

【0522】

CD84およびCD69 CAR-T細胞は、CD34⁺造血幹および前駆細胞（HSPC）に対して毒性を示さない

【0523】

CD34⁺造血幹および前駆細胞（HSPC）に対するCD84およびCD69 CAR-T細胞の潜在的オフターゲット活性を、1：1のエフェクター：標的比（E：T）で、標準的なコロニー形成単位（CFU）アッセイで調べた。CD84およびCD69 CAR-T構築物は共に、CD34⁺細胞に対して有意な効果を生じなかったが、それは、これらが、CD34⁺HSPCによって形成されたCFUの数における有意な低減も、CD34⁺生存度における低減も誘導しなかったからである（図25Aおよび図25B）。CD84およびCD69 CARを発現するT細胞は、AML細胞標的を*in vivo*で認識しそれを殺滅する

20

【0524】

CAR-T細胞活性を*in vivo*で試験するために、CD84およびCD69を標的化するCAR-T細胞を産生し、標的AML細胞系を生着させたNOD／SCIDガンマ（NSG）マウス中に注入した。AML細胞系を操作して、非侵襲性生物発光イメージング（BLI）のためにルシフェラーゼを発現させた。簡潔に述べると、マウスに、 0.5×10^6 個のAML細胞／マウスを尾部静脈注射し（1日目）、次いで（3日目）、 1.5×10^6 個のCAR-T細胞またはモック形質導入されたT細胞（MOI 10の空のCAR／マウス；試験した条件1つ当たりn=6～8）を注射した。B8およびF12（CD84）ならびにG1およびH3（CD69）CAR-T細胞で処置したマウスは、BLIによって評価して、AMLチャレンジの14日後の時点で既に、白血病負荷における統計的に有意な低減を経験し、これは、経時的に（23日目および35日目の時点で）さらにより明らかになった（図26A、26B、26C）。

30

材料および方法

【0525】

ヒト細胞系

【0526】

HL-60およびSHI-1 AML細胞系を、TSAスクリーニングのための標的細胞として使用した。10%FBSおよび1%P/Sを補充したDMEM（Life Technologies；41965039）中で培養したSHI-1細胞系を除き、これらの細胞系を、10%胎仔ウシ血清（FBS；Life Technologies；10270106）、1%ペニシリン-ストレプトマイシン（P/S、10000U/mL、Life Technologies；15140148）および1%L-グルタミン（200mM、ThermoFisher；25030024）を補充したRPMI（Life Technologies；11875093）中で成長させた。HEK293Tを、10%FBS、1%P/Sおよび1%L-グルタミンを補充したIMDM（Euroclone；ECB2072L）中で成長させた。全ての細胞を、5%CO₂を含む加湿インキュベーター中で37℃で培養した。

40

【0527】

50

クローニング

【0528】

CARカセット (1506 bp) を、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター (hPGK) の制御下で、pUC57ベクター (ProteoGenix SAが合成した) から第3世代LV移入プラスミド中にクローニングした。One Shot TOP10の化学的にコンピテントなE. coli (ThermoFisher、Waltham、MA、USA) を形質転換し、DNAを、Plasmid DNA Maxiprep Kit (Thermo Fisher Scientific; K210017) を用いて抽出した。手順を、BamHIおよびSalI酵素による消化ならびにアガロースゲル電気泳動によって制御した。プラスミドのSanger配列決定を実施して、骨格中のカセットの正確な挿入を検証した。

10

【0529】

PBMCからのCD4⁺およびCD8⁺単離ならびにT細胞拡大増殖

【0530】

PBMCを、Lymphoprep (StemCell technologies; 07861) を使用する密度勾配遠心分離によって、健康なドナーから単離した。PBMCから、CD4⁺およびCD8⁺T細胞を、製造業者の使用説明書に従って、CD4およびCD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec; それぞれ、130-045-101および130-045-201) と共にautoMACS機器 (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) を使用して、磁氣的に単離した。次いで、単離されたT細胞を、1% P/Sを含む、組換えヒトIL-7 (500 IU/ml) およびIL-15 (84 IU/ml) (Miltenyi Biotec; それぞれ、130-095-362および130-095-764) を補充したTexMACS培地 (Miltenyi Biotec; 130-097-196) 中で、TransAct (Miltenyi Biotec; 130-111-160) を使用してin vitro拡大増殖のために1日目に活性化した。4日目に、細胞を、TransActおよびレンチウイルスから洗浄し、次いで、1mL当たり1~2×10⁶細胞で、IL-7およびIL-15を含むTexMACS中で維持した。

20

【0531】

レンチウイルスベクター産生およびヒトT細胞の形質導入

30

【0532】

LVを、以前に記載されたように (Langford-Smith et al., 2012)、HEK293Tパッケージング細胞系の一過的トランスフェクションを介して産生した。簡潔に述べると、70%コンフルエントな細胞に、Gag/Pol (IIIGen)、EnvおよびRevパッケージングプラスミド、pAdvantageプラスミド (pADV)、ならびにカセットを有する移入ベクタープラスミドを、共トランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後、レンチウイルス上清を収集し、超遠心分離し、アリコート化し、-65℃以下で貯蔵した。

【0533】

T細胞を、3日目に、0.01mg/mLのVectofusin-1 (Miltenyi Biotec; 130-111-163) を用いて、10のMIOでLVで形質導入した。形質導入から16時間後、細胞をLVおよびTransACTから洗浄した。形質導入効率を評価するために、細胞1つ当たりのVCNを測定した。形質導入されたT細胞からの総ゲノムDNAを、形質導入から14日後に、Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen; 69504) を用いて抽出した。細胞1つ当たりのVCNを決定するために、ddPCRを、ddPCR Supermix for Probes without dUTP (Bio-Rad; 1863024) ならびに標的および参照ゲノムのためのプライマー-プローブセット (ddPCR™ CNV Assay [FAM]) 10031277; ddPCR™ CNV Assay [HEX] 10031244) を含有する反応混合物と共に使用した。液滴を、Automate

40

50

d Droplet Generator (Bio-Rad) で作製し、QX200 液滴リーダー (Bio-Rad) で読み取った。VCNを、QuantaSoft 液滴リーダーソフトウェアを用いて分析し、標的遺伝子濃度の参照遺伝子濃度に対する比によって決定し、参照ゲノム中の参照遺伝子のコピー数で乗算した。

【0534】

フローサイトメトリーによる活性化、消耗および分化マーカー

【0535】

細胞を、蛍光色素コンジュゲートされた一次抗体およびアイソタイプ対照で、室温で15分間染色した。染色された細胞を洗浄し、FACS Celesta (商標) Cell Analyzer (BD Biosciences) を用いて即座に分析した。以下の抗体を使用した: CD3 (PE-Vio615、Miltenyi Biotec; 130-114-520)、CD4 (VioGreen、Miltenyi Biotec; 130-113-230)、CD8 (APC、Miltenyi Biotec; 130-110-681)、CD45 (VioBlue、Miltenyi Biotec; 130-110-637)、CD34 (PE、Miltenyi Biotec; 130-124-456)、CD38 (APC、Miltenyi Biotec; 130-123-852)、CD197 (CCR7) (VioBlue、Miltenyi Biotec; 130-117-353)、CD45RO (APC、Miltenyi Biotec; 130-113-556)、CD223 (VioBlue、Miltenyi Biotec; 130-118-549)、CD279 (PE、Miltenyi Biotec; 130-120-385)、CD366 (APC、Miltenyi Biotec; 130-119-781)、CD154 (VioBlue、Miltenyi Biotec; 130-116-615)、CD25 (PE、Miltenyi Biotec; 130-114-541)、CD137 (APC、Miltenyi Biotec; 130-110-764)、CD69 (PE、Miltenyi Biotec; 130-112-613)、CD84 (APC、BioLegend; 326010)、CD107a (PE、Miltenyi Biotec; 130-111-621) および CD33 (FITC、Miltenyi Biotec; 130-111-018)。分析を、FlowJoソフトウェア (BD Biosciences、v10) を使用することによって実施した。

【0536】

in vitro 細胞傷害性アッセイ

【0537】

細胞傷害アッセイを、T細胞拡大増殖の終了時(17日目)に、1:1のE:T比で、AML 標的細胞系(抗原について陽性)を、CAR-T細胞または形質導入されていないT細胞と共に48時間共培養することによって実施した。共培養した細胞を、Annexin V-PE (Miltenyi Biotec; 130-118-363) および 7-AAD Staining Solution (Miltenyi Biotec; 130-11-568) で染色し、FACS Celesta (商標) Cell Analyzer および FlowJoソフトウェアによるフローサイトメトリーによって分析した。細胞溶解のパーセンテージを、以下の式を使用して計算した:

【0538】

【数2】

$$\text{溶解の\%} = 100 - \frac{\text{CAR T細胞との共培養物中の生存AML細胞のN}}{\text{単独で培養した生存AML細胞のN}} * 100$$

【0539】

あるいは、ルシフェラーゼ形質導入したAML細胞の生物発光を、CAR-T細胞との共培養から48時間後に分析した。簡潔に述べると、細胞を遠心分離し、50μlのPBS 1×中に再懸濁し、次いで、XenoLight D-ルシフェリンホタル (PBS

中15mg/mL; Perkin Elmer, Waltham, MA) と共に10分間インキュベートした。ルシフェラーゼ活性を、Spark-Tecanマルチウェルプレートリーダー (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) によって測定し、データシグナル低減を、生物発光イメージング (BLI) によって評価したAML細胞溶解のパーセンテージとして報告する。

コロニー形成アッセイ

【0540】

1:1の比での6時間の共培養後に、合計で 2×10^3 個の初代CD34⁺細胞 (健康な骨髄または臍帯血から単離した) を、24ウェルプレート中で、500μlのMethoCult (商標) (H4534, Stemcell Technologies, Meda MB, Italy) 中に播種し、37°Cでインキュベートした。各共培養物について、4つの複製をプレートした。播種の14日後、ハンクス中の3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT, Sigma-Aldrich-Merck) の1:6溶液の適切な体積を、半固体培地に添加した。画像を、カメラを備えた光学顕微鏡によって獲得し、コロニーを、ImageJソフトウェアを使用して計数した。

NSGマウスにおけるin vivo実験

【0541】

動物およびそれらのケアに関与する手順を、国内および国際的な法および政策 (EEC Council Directive 86/609, OJ L 358, 1987年12月12日) ならびに「ARRIVE」ガイドライン (Animals in Research Reporting In Vivo Experiments) を順守する制度的ガイドラインに従って実施した。省庁権限付与承認: 131/2022-PR。NSGマウス (NOD.Cg-PrkdcscidII2rgtm1Wjl/SzJ、4~5週齢の雌性、20~25g/マウス、最大5動物/ケージ) に、 0.75×10^6 個のSHI-1-LUC (ルシフェラーゼ遺伝子で形質導入した) 細胞を静脈内 (尾部静脈) 注射した。AML注射から2日後、マウスを、1:3の標的:エフェクター比で、 1.5×10^6 個のCAR-Tまたは対照としての形質導入されていない/モック形質導入されたT細胞の静脈内注射によって処置した。生物発光を、測定 (Xenogen IVIS Spectrum生物発光/光学イメージングシステム、Xenogen Corporation, Alameda, CA) の10分前のXenoLight D-ルシフェリンホタル (PBS中15mg/mL; Perkin Elmer) による腹腔内注射によってモニタリングして、腫瘍成長を検証した。

【0542】

統計的分析

【0543】

平均における有意差を、平均分布に従って、スチューデントt検定またはWilcoxonノンパラメトリック検定のいずれかによって試験した。2つよりも多くの群/条件を比較する場合には、一元配置多重比較ANOVAをTukey多重比較検定と共に使用した。グラフおよび関連する統計的分析を、GraphPad Prism 8を使用して生成した。全てのデータは、平均±平均の標準誤差 (SEM) として示される。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ および**** $P < 0.0001$ の値は、統計的に有意である。

結果

【0544】

本明細書に提示されるデータにより、以下が確認される:

【0545】

健康な再生中の骨髄細胞および造血幹細胞上での非常に低い/ヌル発現に関連する、診断時ならびに骨髄球性およびリンパ性急性白血病の再燃時に収集した多数の原発性症例における、6つ全ての抗原の高い発現; ならびに

10

20

30

40

50

【0546】

in vitro 実験における、および AML 細胞系を生着させたマウス異種移植片における、CD69 および CD84 の両方を認識する新規 scFv（複数可）を用いて創出した CAR-T 細胞による AML 芽球の特異的溶解活性。

【0547】

このデータは、骨髄球性およびリンパ性白血病のための、CD63、CD151、CD72、CD84、CD69 または CD109 に基づく免疫療法および診断アプローチの開発を支持する。

4.4. 実施例 4：ゼブラフィッシュにおける CAR-T 結合および芽球溶解の検証

【0548】

TSA への scFv 結合の有効性を試験する。高レベルの TSA を発現する GFP + AML 細胞系（ならびに対照として、TSA を発現しない GFP + 細胞系）を、1:1 の比の mCherry + CAR-T または対照 T 細胞との混合溶液（本明細書で以後「混合細胞」と称する）中で、受精の 48 時間後のゼブラフィッシュ胚中に注射する。

【0549】

移植を受けた動物について、循環蛍光 GFP / mCherry 陽性細胞の数、ならびに注射の 1、5、24 および 72 時間後の時点における結合複合体を示すイエローマージした（yellow-merged）複合体を、動物の全てのコホート（各々およそ 30 個の胚）において、蛍光顕微鏡および ImageJ ソフトウェアによって評価して、AML と CAR-T 細胞との間の結合を決定する。

【0550】

次に、scFv 特異性および殺滅効力を評価する。胚における異種移植した CAR-T 細胞の増殖／死および AML 芽球の低減を評価する。

【0551】

1 群当たり 25 個の胚を、注射の 5 時間後および 24 時間後の時点で殺して、フローサイトメトリーによって GFP + および mCherry + 細胞を計数する。レポーター発現特異的 TSA-CAR-T 細胞と対照ベクターとの間の比較は、結合後に生じる溶解有効性を示す。

4.5. 実施例 5：初代 AML 細胞に対する抗 CD84（B8 および F12）および抗 CD69（A1、F1、C2 および H2）CAR-T 細胞の *in vitro* 溶解効力

【0552】

抗 CD84 CAR-T 細胞の活性を試験するために、scFv B8 および F12 を含有する CAR-T 細胞を、培地中で単独で（---）、または AML 患者由来異種移植片モデル（AML-PDX）に由来する AML 細胞との共培養で、培養した。

AML-PDX 生成

【0553】

AML 患者由来異種移植片（PDX）を、*de novo* AML の診断時に小児患者の骨髄に由来する芽球を使用して生成した。図 29 は、AML-PDX に由来する初代 AML 細胞における TSA CD84、CD69 および CD72 の発現を示す。以前の実験からの特定の CAR 候補を AML-PDX で試験した。

【0554】

PDX 生成のために、NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ（NSG）マウス（4～8 週齢）を白血病細胞移植の 24 時間前に 1.5 Gy の照射によって条件付けた。簡単に述べると、移植片対宿主病（GvHD）を回避するために CD3 MicroBead Kit（Miltenyi Biotec）を使用して免疫磁気細胞分離（Miltenyi Biotec）によって CD3⁺T 細胞を予防的に枯渇させた 1 × 10⁶ 個の初代 AML 細胞を第 1 のマウスレシピエント（P0）に静脈内注射（i.v.）によって注射した。生着をモニタリングするために、腫瘍負荷を、AML 細胞注射の 1 ヶ月後に開始して 2 週間ごとに、末梢血（PB）中のヒト（h）CD45⁺細胞のフローサイトメトリー測定によって評価した。PB 中の hCD45⁺細胞 > 5% は、A

10

20

30

40

50

ML 生着を示し、hCD45+細胞 $\geq 20\%$ でマウスを殺した。器官（大腿骨および脾臓）を回収し、洗い流し、機械的に解離させてバイオバンキングのための細胞を採取した。連続する2継代にわたって、 1×10^6 個のhCD45+細胞を第2および第3のレシピエントマウスに静脈内注射してP1およびP2-PDXモデルを生じさせた。P2モデルの安定性をRNAおよびエクソーム配列決定によって試験した。ex vivo細胞をin vitro試験に使用した。

【0555】

抗CD84 CAR-T細胞、B8およびF12を、AML-PDXモデルに由来するAML細胞と共に共培養すると、抗CD84 CAR-T細胞B8およびF12は、図30に「殺滅の%」として示されているように、標的細胞に対する溶解効力を示した。CAR-T細胞B8およびF12の溶解効力は、空のCAR-T細胞の溶解効力に対して正規化したときに観察され、それによって、CARカセットがT細胞機能を変更していないこと、およびCD84が初代AMLの特異的標的であることが確認された。一貫して、B8およびF12抗CD84 CAR-T細胞のin vitro抗腫瘍活性は、5つの異なるAMLモデルからのAML細胞において5~80%の間の範囲であった。活性化されたCAR-T細胞の持続をin vitroで最大で48時間モニタリングした（図30）。

【0556】

新たに生成したCD69 CAR-T細胞の活性を試験するために、CD69に対するA1、F1、C2およびH2、ScFv（複数可）を異なるCAR-T細胞産物において試験した。CAR-T細胞を、培地中で単独で、またはCD69抗原を発現する標的AML細胞系（SHI-1およびHL60細胞系）との共培養で、維持した。HL-60およびSHI-1 AML細胞系を標的細胞として使用し、U937およびK562細胞系を陰性対照として使用した。10%胎仔ウシ血清（FBS; Life Technologies; 10270106）および1%ペニシリン-ストレプトマイシン（P/S、10000U/mL、Life Technologies; 15140148）を補充したDMEM（Life Technologies; 41965039）中で培養したSHI-1細胞系を除いて、これらの細胞系を、10%FBS、1%P/Sおよび1%L-グルタミン（200mM、ThermoFisher; 25030024）を補充したRPMI（Life Technologies; 11875093）中で成長させた。HEK-293T細胞を、10%FBS、1%P/Sおよび1%L-グルタミンを補充したIMDM（Euroclone; ECB2072L）中で成長させた。全ての細胞を、5%CO₂を含む加湿インキュベーター中で、37℃で培養した。初代AML ex vivo細胞は、10%FBS、2mMグルタミン（Gibco、Life Technologies）、100U/mLのストレプトマイシン/ペニシリン（Gibco、Life Technologies）を含有するRPMI Medium 1640であって、50ng/mLのトロンボポエチン（TPO）、50ng/mLの幹細胞因子（SCF）、50ng/mLのFMS様チロシンキナーゼ3リガンド（Flt3L）、20ng/mLのインターロイキン（IL）-3および20ng/mLのIL-6（全てMiltenyi Biotec（Bergisch Gladbach, Germany）から購入した）を補充した、RPMI Medium 1640中で、37℃で培養した。

【0557】

CD69抗原を発現する標的AML細胞系と共に共培養すると、CD69 CAR-T細胞は、SHI-1標的細胞系とHL60標的細胞系の両方において溶解効力を示した（図31）。CD69 CAR-T細胞の同じ結果は、空のCAR-T細胞（MOI 5、モック形質導入されたT細胞）では観察されなかった。一貫して、試験した4つのScFv配列（表13~14のA1、F1、C2およびH2）による標的細胞系に対する有意なin vitro抗腫瘍活性が測定され、細胞系に依存して20~90%の間の範囲であった。したがって、CAR-T産物A1、F1、C2およびH2は、in vitroで最大48時間モニタリングしたところ所望の有効性および特異性を示した。

【0558】

10

20

30

40

50

CAR-T細胞溶解効力は、以下のように計算する：

【数3】

$$\text{溶解の\%} = 100 - \frac{\text{CAR-T細胞との共培養物中の生存AML細胞のN}}{\text{単独で培養した生存AML細胞のN}} * 100$$

【0559】

図31中の各バーは、AML試料に対して異なるCAR-T産物によってなされた殺滅のパーセンテージを示す。

4.6. 実施例6：CD69 CAR-T細胞についてのB8およびF12 CD84 ScFv（複数可）およびH3 ScFvのin vivoでの有効性

【0560】

2つの抗原、CD84およびCD69を、AML免疫療法の標的としてin vivoで調べた。CAR-T細胞を、ヒトナイーブ抗原結合性断片（Fab）ファージライブラリー、即ち、CD84を認識するF12およびB8、ならびにCD69を認識するH3、G1、A1、F1、C2およびH2、内で同定された4つの異なる特異的ScFvを用いて、実施例3に記載したように製造した。ヌクレオチド配列を図27に提供する。製造した抗CD84 B8鎖の特異性と共に、製造したCAR-T細胞のCD84（F12およびB8鎖）に対するおよびCD69（H3鎖）に対するin vivo効力を、CD84とCD69の両方を高レベルで発現するSHI-1 AML細胞系を標的細胞として用いて、およびCD84陰性（CD84⁻）であるU937（図28A）およびK562（図28B）細胞系を非標的細胞として用いて、試験した。SHI-1（CD84⁺CD69⁺）AML細胞系を操作して、非侵襲性生物発光イメージング（BLI）のためにルシフェラーゼを発現させた。CD84（B8およびF12鎖）およびCD69（H3鎖）を標的とする製造したCAR-T細胞を、標的AML細胞系を生着させたNOD/SCIDガンマ（NSG）マウスに注入した（CD84についてはN=7、CD69についてはN=10）。簡潔に述べると、マウスに、 0.5×10^6 個のAML細胞/マウスを尾部静脈注射し（1日目）、次いで（3日目）、 1.5×10^6 個のCAR-T細胞またはモック形質導入されたT細胞（MOI 5、空のCAR：マウス）を注射した。

溶解活性

【0561】

CD84を標的とするCAR-T細胞およびCD69を標的とするCAR-T細胞の溶解活性を図28Aおよび図27Bにそれぞれ示す。示されているように、CAR-T細胞を注射したマウスは、CD84を標的とするB8による24日目から38日目への（*p<0.05、**p<0.005、マンホイットニー検定）、CD84を標的とするF12による38日目から45日目への（*p<0.05、マンホイットニー検定）、およびCD69を標的とするH3による24日目から45日目への（**p<0.005、***p<0.0005、****p<0.0001、マンホイットニー検定）生物発光（BLI）の低減によって測定されたように白血病負荷を低減させる、SHI-1（CD84⁺CD69⁺）AML細胞系に対する溶解活性の有意な増加を示した。CAR-T細胞を注射したマウスの溶解効力の増大は、図27A~27Bに示されているように、全光束として示されるルシフェラーゼ生物発光シグナルの低減によって示される。対照的に、空のCAR-T細胞では24日目から45日目へのルシフェラーゼシグナルの増加があった。

【0562】

図27C~27Dに示されているように、マウスの生存は、CD84を標的とするためにF12、B8のscFvを含有するおよびCD69を標的とするためにH3を含有するCAR-T細胞の注射後90日に達した。これは、AMLを処置するための、scFv（複数可）F12、B8またはH3を含有するCAR-T細胞構築物の重ね合わせ可能なin vivo有効性を示す（図27C~27D、*p<0.05、マンテル-コックス検定）。対照的に、空のCAR-T細胞を注射したマウスの生存は、約49日であった。

4. 7. 実施例 7 : B 8 C D 8 4 s c F v C A R - T 細胞の i n v i v o での特異性【0563】

新たな抗 C D 8 4 B 8 鎖の特異性を試験するために、抗 C D 8 4 B 8 C A R - T 細胞を、C D 8 4 発現を欠いている非標的細胞としての U 9 3 7 (C D 8 4 ^{n e g}) および K 5 6 2 (C D 8 4 ^{n e g}) A M L 細胞系を生着させた N S G マウスに注入した。(C D 8 4 ^{n e g}) および K 5 6 2 (C D 8 4 ^{n e g}) A M L 細胞系を操作して、非侵襲性生物発光イメージング (B L I) のためにルシフェラーゼを発現させた。C D 8 4 を標的とする製造した C A R - T 細胞を、2 つの U 9 3 7 (C D 8 4 ^{n e g}) および K 5 6 2 (C D 8 4 ^{n e g}) A M L 非標的細胞系を生着させた N S G マウスに注入した。簡潔に述べると、マウスに、 0.5×10^6 個の A M L 細胞 / マウスを尾部静脈注射し (1 日目) 、次いで (3 日目) 、 1.5×10^6 個の C A R - T 細胞またはモック形質導入された T 細胞 (M O I 5、m C h e r r y : マウス) (N = 6 ~ 10 動物 / 群) を注射した。図 2 8 A ~ 2 8 B に示されているように、抗 C D 8 4 C A R - T 細胞を注射したマウスは、K 5 6 2 および U 9 3 7 細胞でチャレンジした後にそれぞれ 30 日目および 22 日目まで B L I によってモニタリングしたところ白血球負荷が低減することなく空の C A R - T 細胞と同様の A M L 生着増加を示した。マウスの死亡または 殺時に、T 細胞の存在を、骨髓と A M L 浸潤脾臓の両方における C D 8 4 の発現と共に C D 3 によってモニタリングした。C D 8 4 の発現は検出されず、T 細胞のパーセンテージは 2 ~ 86 % の間の範囲であった。

10

20

【0564】

3 つの新規 S c F v (複数可) (表 12 の C D 6 9 に対する 1 つ (H 3) および C 8 4 に対する 2 つ (B 8 および F 1 2)) は、標的 A M L 細胞系に対して高度に特異的であることが判明し、i n v i v o N G S マウスにおいて高度な有効性を示した。加えて、C D 6 9 に対する S c F v (複数可) (表 12 の A 1、F 1、C 2 または H 2) を含む操作された C A R - T 細胞は、標的細胞系に対して i n v i t r o で溶解効力を発揮することが判明した。

【0565】

5 つの A M L 患者由来異種移植片 (P D X) モデルを、図 2 9 に示されているような、および C A R T 細胞によって発現されたときに本開示の S c F v (複数可) の標的となる、3 つの T S A、C D 8 4、C D 6 9 および C D 7 2、のそれらの高度な発現のために用意した。患者の疾患を厳密に再現する P D X は、末期 i n v i v o 研究の特定の要求を満たした。P D X モデルは、トランスレーショナルリサーチにおいて効率的にベンチデータと臨床データの橋渡しをするための基礎前臨床ツールとして出現した。P D X 生成は、遺伝子形質転換またはクローン選択を誘導し得る中間 i n v i t r o 培養継代を回避して初代試料を免疫不全マウスに直接移入することによって腫瘍を i n v i v o でモデル化することからなった。その結果として、A M L - P D X における T S A 発現の最新の研究結果によって、A M L 細胞系における研究結果は、検証され、支持された。

30

i n v i t r o 細胞傷害性アッセイ

【0566】

細胞傷害アッセイを、T 細胞拡大増殖の終了時 (17 日目) に、1 : 1 の E : T 比で、A M L 標的細胞系 (抗原について陽性) または e x v i v o A M L を、C A R - T 細胞または形質導入されていない T 細胞と共に 48 時間共培養することによって実施した。共培養した細胞を、Annexin V - P E (M i l t e n y i B i o t e c ; 130 - 118 - 363) および 7 - A A D S t a i n i n g S o l u t i o n (M i l t e n y i B i o t e c ; 130 - 11 - 568) で染色し、F A C S C e l e s t a (商標) C e l l A n a l y z e r および F l o w J o ソフトウェアによるフローサイトメトリーによって分析した。細胞溶解のパーセンテージを、以下の式を使用して計算した：

40

【数 4】

50

$$\text{溶解の\%} = 100 - \frac{\text{CAR T細胞との共培養物中の生存AML細胞のN}}{\text{単独で培養した生存AML細胞のN}} * 100$$

NSGマウスにおける *in vivo* 実験

【0567】

動物およびそれらのケアに関する手順を、国内および国際的な法および政策（E E C Council Directive 86/609、O J L 358、1987年12月12日）ならびに「ARRIVE」ガイドライン（Animals in Research Reporting In Vivo Experiments）を順守する制度的ガイドラインに従って実施した。省庁権限付与承認：131/2022-PR。NSGマウス（4～5週齢の雌、20～25g/マウス、最大N=5動物/ケージ）の尾部静脈に 0.5×10^6 個のSHI-1-LUC（ルシフェラーゼ遺伝子で形質導入された）細胞を注射した。AML注射から2日後、マウスを、3:1のE:T比で、 1.5×10^6 個のCAR-Tまたは対照としての形質導入されていない/モック形質導入されたT細胞の静脈内注射によって処置した。生物発光を、測定（Xenogen IVIS Spectrum生物発光/光学イメージングシステム、Xenogen Corporation、Alameda、CA）の10分前のXenolight Dールシフェリンホタル（PBS中15mg/ml; Perkin Elmer、Waltham、MA）による腹腔内注射によってモニタリングして、腫瘍成長を検証した。

統計的分析

【0568】

平均における有意差を、マンホイットニー検定およびマンテル-コックス検定のいずれかによって試験した。グラフおよび関連する統計的分析を、GraphPad Prism 8を使用して生成した。全てのデータを平均±平均の標準誤差（SEM）として示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0005$ 、および**** $P < 0.0001$ の値は、統計的に有意である。

4.8. 実施例8：新規B8およびF12 CD84 ScFv（複数可）CAR-T細胞の *in vitro*でのサイトカイン産生能力

【0569】

抗CD84 CAR-T細胞を、2つの異なるScFv、即ち、F12およびB8を用いて製造し、*in vitro*でSHI-1およびHL60（CD84⁺とCD69⁺の両方を発現する）AML細胞系への標的抗原の結合に応答してT細胞関連サイトカインを産生するそれらの機能的な能力について試験した。

【0570】

標的細胞として使用したHL-60およびSHI-1 AML細胞系を、10%胎仔ウシ血清（FBS; Life Technologies; 10270106）、1%ペニシリン-ストレプトマイシン（P/S、10000U/mL、Life Technologies; 15140148）および1%L-グルタミン（200mM、Thermo Fisher; 25030024）を補充した、RPMIおよびDMEM（Life Technologies; 41965039; 11875093）中でそれぞれ成長させた。SHI-1-CD84^{ko} AML細胞系を、CD84遺伝子をノックアウトした対照として使用した（Synthego Corporation、Redwood City、CA）。全ての細胞系を、5%CO₂を含む加湿インキュベーター中で培養した。初代AML *ex vivo*細胞は、10%FBS、2mMグルタミン（Gibco、Life Technologies）、100U/mLのストレプトマイシン/ペニシリン（Gibco、Life Technologies）を含有する、RPMI Medium 1640であって、50ng/mLのトロンボポエチン（TPO）、50ng/mLの幹細胞因子（SCF）、50ng/mLのFMS様チロシンキナーゼ3リガンド（Flt3L）、20ng/mLのインターロイキン-3（IL-3）および20ng/mL

のインターロイキン-6 (IL-6) を補充した、RPMI Medium 1640 中で、37℃で培養した。全てのサイトカインを Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE) から購入した。
【0571】

B8 もしくは F12 CAR T 細胞、または空のベクターを有する CAR T 細胞を、48 時間、標的 AML 細胞系 SHI-1 または HL60 と共に 1:1 のエフェクター対標的 (E:T) 比で培養した。次いで、細胞を細胞表面抗原発現のために標識し、固定し、透過処理し、抗 IFN γ および抗 TNF α 抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析して、IFN γ または抗 TNF α を発現する細胞のパーセンテージを決定した。
サイトカイン細胞内染色

【0572】

B8 CD84 または F12 CD84 CAR-T 細胞と AML 細胞 SHI-1 または HL-60 (1:1 の E:T 比)、および A1 CD69 または C2 CD69 CAR T と AML 細胞 SHI-1 または HL-60 (1:1 の E:T 比) の 6、24 および 48 時間の共培養後、B8 CD84、F12 CD84、A1 CD69 および C2 CD69 CAR-T 細胞のサイトカイン産生能力をフローサイトメトリーによって評価した。簡単に述べると、エフェクター CAR T 細胞と標的 AML 細胞を弁別するために、最初に、 0.4×10^6 個の細胞を細胞表面抗原発現 (即ち、CD45、CD3、CD33) のために標識した。次いで、Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec; 130-090-477) を使用することにより、製造業者の使用説明書に従って、細胞を固定し、透過処理し、抗 IFN γ および抗 TNF α 抗体で染色した。最終的に、総リンパ球に対する IFN γ および TNF α 陽性発現細胞のパーセンテージを推定し、データを反復測定の前平均 + SEM を用いてヒストグラムとして示した。

結果

【0573】

B8 および F12 scFv 鎖を有する CD84 を標的とする製造した CAR-T 細胞 (本明細書で「B8 CD84」および「F12 CD84」CAR-T 細胞と交換可能に使用される) は、標的 SHI-1 および HL60 (CD84⁺/CD69⁺) AML 細胞系のどちらかと共に培養したとき、1:1 のエフェクター対標的 (E:T) 比で、単独での CAR-T 細胞 (「-」) と比較して IFN γ および TNF α を発現する陽性細胞のより高い頻度を示し (それぞれ、図 32A および図 32B)、したがって、抗原結合時に炎症性サイトカインを適切に産生するそれらの能力を実証した (* p < 0.05、** p < 0.005、マンホイットニー T 検定、n = 1~4 の独立した実験)。

4.9. 実施例 9: 抗 CD84 CAR-T 細胞は、CD34⁺造血幹および前駆細胞 (HSPC) に対して毒性を示さない

【0574】

市販の健康なドナー CD34⁺造血幹/前駆細胞 (HSC) に対する抗 CD84 CAR-T 細胞の *in vitro* オフ活性を、1:1 のエフェクター対標的比 (E:T) で、標準的なコロニー形成単位 (CFU) アッセイで調査した。

CFU アッセイ

【0575】

健康なドナーからの市販の CD34⁺細胞 (Hu BM CD34⁺、StemExpress; BM34001C) を、培地単独、空の CAR、1:1 のエフェクター対標的比での B8 CD84 または F12 CD84 CAR T 細胞のいずれかと共に 4 時間、共培養した。インキュベーション後、細胞懸濁液を半固体メチルセルロースベースの培地 MethoCult H4534 Classic without EPO (StemCell Technologies Inc, Vancouver, British Columbia, Canada) に添加し、3cm 組織培養皿にプレートした。10~12 日後、顆粒球-マクロファージ (G、M、および GM) および多能性顆粒球、赤血球、マクロファージ、巨核球 (GEMM) 前駆体に由来するコロニーを、製造業者の使用説

10

20

30

40

50

明書に従ってスコア化して数え、コロニーの総数を評価した。データを独立した反復測定
の平均±SEMとして示す。

結果

【0576】

CD84 抗原に特異的なB8およびF12 scFv鎖を用いて製造した構築物と共に、
B8 CD84 CAR T細胞とF12 CD84 CAR T細胞の両方は、図3
3A～33Bによって示されるように、CD34⁺細胞に対して有意な効果を生じさせな
かった。B8 CD84およびF12 CD84 CAR T細胞は、CD34⁺HSC
によって形成されるCFUの総数の低減を誘導せず（図33A）、CD34⁺HSCから
生じるコロニーサブタイプ（顆粒球-マクロファージ（G、M、およびGM）、および多
能性顆粒球、赤血球、マクロファージ、巨核球（GEMM）前駆体）の低減も誘導しな
かった（図33B）。この結果は、全ての造血前駆体が再構成され得るという研究結果を支持する（図33B）。

10

4.10. 実施例10：新規B8 CD84 ScFv CAR-T細胞のin vivoでの特異性

【0577】

B8 CD84およびF12 CD84 CAR-T細胞の特異性を試験するために、
SHI-1-CD84^k AML細胞系をそれらのヌルCD84発現のための非標的細胞
系として使用した。具体的に言うと、このルシフェラーゼで形質導入されたAML細胞系
は、第三者によって操作されたものであり、それをSynthego Corporation
から購入して、フローサイトメトリー分析によって確認しながらCD84抗原を遺
伝子的にノックアウトした。CD84を標的とする製造したB8およびF12 CD84
CAR-T細胞を、ルシフェラーゼを発現するSHI-1-CD84^k AML細胞系を
生着させたNOD/SCIDガンマ（NSG）マウスに注入した。

20

【0578】

動物およびそれらのケアに關与する手順を、国内および国際的な法および政策（EEC
Council Directive 86/609、OJ L 358、1987年1
2月12日）ならびに「ARRIVE」ガイドライン（Animals in Research
Reporting In Vivo Experiments）を順守する
制度的ガイドラインに従って実施した。省庁権限付与承認：131/2022-PR。N
SGマウス（NOD.Cg-PrkdcscidII2rgtm1Wjl/SzJ、4～
5週齢の雌性、20～25g/マウス、最大5動物/ケージ）に、 0.5×10^6 個のS
HI-1-LUC（ルシフェラーゼ遺伝子で形質導入された）またはHL60-LUC細
胞のどちらかを静脈内（尾部静脈）注射した。AML注射から2日後（3日目）、マウス
を、1：3の標的：エフェクター比で、 1.5×10^6 個の標的T細胞または対照として
のモック形質導入されたT細胞（空のCAR、感染多重度（MOI）5 mCherry
/マウス）の静脈内注射によって処置した。

30

結果

【0579】

B8およびF12 CD84 CAR-T細胞を注射したマウスは、15日目から45
日目まで生物発光イメージング（BLI）によってモニタリングしたところ白血病負荷の
低減を伴うことなく空のCARを注入したマウスと同等のAML生着増加を示した（図3
4A）。B8 CD84 CAR-T細胞を注入したマウスおよびF12 CD84 C
AR-T細胞を注入したマウスの生存率も、空のCARを注射したマウスと同等であった
（図34B）。

40

4.11. 実施例11：初代小児AML ex vivo細胞に対するB8 CD84お
よびF12 CD84 CAR-T細胞、ならびにA1 CD69およびC2 CD69
CAR-T細胞のin vitro溶解効力。

【0580】

CD84を標的とする新たに生成し製造したCAR-T細胞（B8またはF12 CD

50

84 CAR-T細胞)およびCD69を標的とする新たに生成し製造したCAR-T細胞(A1またはC2 CD69 CAR-T細胞)の活性を試験するために、CD84およびCD69 CAR-T細胞を、培地中で単独で、またはAML患者由来異種移植片モデル(AML-PDX)に由来するAML細胞との共培養で、維持した。

AML-PDX生成

【0581】

PDX生成のために、NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)マウス(4~8週齢)を白血病細胞移植の24時間前に1.5Gyでの照射によって条件付けた。簡単に述べると、移植片対宿主病(GVHD)を回避するためにCD3 MicroBead Kit(Miltenyi Biotec)を使用して免疫磁気細胞分離(Miltenyi Biotec)によってCD3+T細胞を予防的に枯渇させた 1×10^6 個の初代AML細胞を第1のマウスレシピエント(P0)に静脈注射(i.v.)によって注射した。生着をモニタリングするために、腫瘍負荷を、AML細胞注射の1ヵ月後に開始して2週間ごとに、末梢血(PB)中のhCD45陽性細胞のフローサイトメトリー測定によって評価した。PB中のhCD45が>5%の場合、AMLが生着したと見なした。20%でマウスを殺す。器官(大腿骨および脾臓)を回収し、洗い流す、または機械的に解離させて細胞を採取し、バイオバンクした。連続する2継代にわたって、 1×10^6 個のヒトCD45(hCD45)を第2および第3のレシピエントマウスに静脈内注射してP1およびP2-PDXモデルを生じさせた。P2モデルの安定性をRNAおよびエクソーム配列決定によって試験した。ex vivo細胞をin vitro試験に使用し、P2世代をin vivo試験のために拡大増殖させた。

細胞傷害アッセイ

【0582】

細胞傷害アッセイを、T細胞拡大増殖の終了時(17日目)に、1:1のE:T比で、ex vivo PDX-AML細胞をCAR-T細胞または空のCAR-T細胞と共に48時間共培養することによって実施した。共培養した細胞を、Annexin V-PE(Miltenyi Biotec; 130-118-363)および7-AAD Staining Solution(Miltenyi Biotec; 130-11-568)で染色し、FACS Celesta(商標)Cell AnalyzerおよびFlowJoソフトウェアによるフローサイトメトリーによって分析した。殺滅のパーセンテージを、以下の式を使用して計算した：

【0583】

【数5】

$$\text{溶解の\%} = 100 - \frac{\text{CAR-T細胞との共培養物中の生存AML細胞のN}}{\text{空のCARと共に培養した生存AML細胞のN}} * 100$$

結果

【0584】

B8およびF12 CD84(図35A)ならびにA1およびC2 CD69(図35B)CAR-T細胞は、共培養後のAML-PDX細胞のパーセント殺滅によって示されるように、3つの異なる小児AML-PDXモデルに由来する初代標的細胞に対して高度な溶解効力を示した。溶解効力は、3つの異なるAML症例(PDX #3、6および7)で5~70%の間の範囲であった。各バーは、AML試料に対して異なるCAR-T産物によってなされた殺滅のパーセンテージを示した。

【0585】

この結果は、全てのPDX由来AML細胞(図35A~35BのPDX #3、PDX #6およびPDX #7)にわたってのB8およびF12 CD84 CAR-T細胞ならびにA1およびC2 CD69 CAR-T細胞の陽性かつ一貫した抗腫瘍活性を示す。

4.12. 実施例12: AML-PDX細胞に対するB8およびF12 CD84 CA

R-T細胞の *in vitro*でのサイトカイン産生能力

【0586】

B8およびF12 CD84 CAR-T細胞を、*in vitro*でAML-PDXに由来する初代AML細胞への結合に応答してT細胞関連サイトカインを産生するそれらの機能的な能力について試験した。簡単に述べると、B8およびF12 CD84 CAR-Tまたは空のCAR細胞を、単独で(---)、または1:1のE:T比で3つの異なるPDX-AMLモデルに由来する標的細胞と共に、どちらかで48時間培養し、続いて、実施例8に記載したように細胞表面抗原発現のために細胞を標識し、固定し、透過処理し、細胞を抗IFN γ および抗TNF α 抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

10

結果

【0587】

CD84を標的とするB8およびF12 CD84 CAR-T細胞は、AML-PDX標的細胞(図36A~36BのPDX#3、PDX#6およびPDX#7)と共に培養したとき、AML-PDXを空のCAR-T細胞と共に培養したときと比較して、IFN γ およびTNF α に対して陽性の細胞のより高いパーセンテージを示し(それぞれ、図36Aおよび36B)、したがって、抗原結合時に炎症性サイトカインを適切に産生する能力の増強を実証した(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ 、マンホイットニー-T検定、 $n = 1 \sim 4$ の独立した実験)。

4.13. 実施例13: AML-PDXに対する新規B8 CD84 ScFv CAR-T細胞の *in vivo*抗腫瘍溶解活性

20

【0588】

新たに製造したB8 CD84 CAR-T細胞の *in vivo*での効力および特異性を試験するために、CD84を高レベルで発現するAMLと診断された小児患者から得た1つのAML-PDXモデルを使用した。

【0589】

NSGマウスに、ルシフェラーゼ遺伝子で形質導入されたAML-PDXモデルから収集した 10^6 個のAML *ex vivo*細胞を尾部静脈注射した。次いで、AML細胞注射から+28日目に、マウスに5または 10×10^6 個のCAR-T細胞を尾部注射した。生物発光を、測定(Xenogen IVIS Spectrum生物発光/光学イメージングシステム、Xenogen Corporation、Alameda、CA)の10分前のXenolight D-ルシフェリンホタル(PBS中15mg/ml; Perkin Elmer、Waltham、MA)による腹腔内注射によってモニタリングして、腫瘍成長を検証した。

30

【0590】

簡単に述べると、NSGマウスに 10^6 個のAML-ルシフェラーゼ(LUC)発現細胞を注射し、AMLの生着および広がりをLUC生物発光(全光束として示される)によって毎週モニタリングした。AML注射から+28日目に、LUC分析は、AML生着の信頼性のあるシグナルを生じさせ、次いで、マウスに 5×10^6 個のB8 CD84 CAR-T細胞(5:1のE:T比)または 10×10^6 個のB8 CD84 CAR-T細胞(10:1のE:T比、 $n = 5 \sim 10$ 動物/群、図37A)を尾部注射した。それらが注入されたエフェクター対標的比とは無関係にCAR-T注入後+7日目の疾患進行のモニタリング(図37B)は、図37Bの+7日目「%リンパ球」で示されるように、CAR-T細胞とAML細胞の両方が、空のおよびB8 CAR-T細胞を接種したマウスの末梢血(PB)、骨髄(BM)および脾臓(SPL)に存在することを示した。CAR-T細胞がAML細胞に遭遇すると、リンパ球および無AML細胞の増加によって示されるようにCAR-T細胞は、拡大増殖し、5:1および10:1両方のE:T比でAML細胞は、空のCARおよびB8 CD84 CAR-T細胞群のPB、BMおよびSPLに存在したが、より少量のAML細胞が両方の群のPBに存在した。

40

【0591】

50

図37Cに示されているように、CAR-T細胞注入後+12日目に、B8 CD84 CAR T細胞と空のCAR細胞の両方は、図37Cの「%リンパ球」によって示されるように、BMおよびSPLには存在したが、PBには存在しなかった。+12日目に、AML細胞は、図37Cの「%AML細胞」によって示されるように、空のCARを投与したマウスにおけるPBおよびBMにおいてのみ検出可能であった。少量のAML細胞が、B8 CD84 CARを投与したマウスのSPLにおいて検出された。

【0592】

図37Cに示されているように、CAR-T細胞注入後+16日目に、B8 CD84 CAR T細胞と空のCAR細胞の両方は、図37Cの「%リンパ球」によって示されるように、PB、BMおよびSPLに存在した。加えて、+16日目に、B8 CD84 CAR-T細胞を注入したマウスは、全ての器官（PB、BMおよびSPL）において総AMLクリアランスを示した。AML細胞は、空のCAR T細胞でのPB、BMおよびSPLにしか存在しなかった。

【0593】

これらの結果は、まとめると、B8 CD84 CAR T細胞が初代AML細胞を有効に排除し、したがって、疾患負荷を迅速に低減させることを示唆した。

【0594】

次に、異なる投薬量（ 5×10^6 個の細胞または 10×10^6 個の細胞）でのB8 CD84 CAR T細胞の有効性を、LUCを発現する 10^6 個のAML-PDX細胞を2日前に接種したNSGマウスにおいて評価した（図38A）。細胞分布のフローサイトメトリー分析は、B8 CD84 CAR T細胞投与後+12日後から、B8 CD84 CAR T細胞が、図38Bの「%リンパ球」によって示されるように空のCAR T細胞で処置した動物とB8 CD84 CAR T細胞で処置した動物の両方の全ての位置（PB、BM、SPL、および肺）に存在することを、重ねて実証した。初代AML細胞は、NSGマウスにおける接種後2日目後でさえ、両方のE:T比について空のCARで処置したマウスにおいて検出可能であった（図38B）。これは、B8 CD84 CAR T細胞が、疾患の完全なクリアランスに反映されるAMLの特異的溶解を媒介したことを示す。研究は、5:1のエフェクター対標的比と10:1のエフェクター対標的比とに差がなく、したがって、小児患者からの初代AMLに対するB8 CD84 CAR-T細胞のB8 scFv鎖の同様のかつ強い有効性を媒介することを示した。

【0595】

したがって、両方の実験設定（AML-PDX細胞の接種の28日後およびAML-PDX細胞の接種の2日後のB8 CD84 CAR-T細胞の処置）は、初代AMLを根絶する上でのB8 CD84 CAR-T細胞の特異性および有効性を支持する。

4.14. 実施例14: 抗CD84 B8 CAR-T細胞は、*in vivo*で正常なヒト造血生着を変更しなかった

【0596】

新規の製造した抗B8 CD84 CAR-T細胞の潜在的造血毒性を評価するために、B8 CD84 CAR-T細胞を*in vivo*で試験した。NSGマウスに、亜致死照射（1.5グレイ）後に健康なヒトドナーの骨髄に由来する 10^6 個のヒトCD34⁺造血幹／前駆細胞（HSC）を尾部静脈注射した。マウスをフローサイトメトリーによってヒト細胞生着について毎週モニタリングした（図39A）。具体的に言うと、造血細胞をフローサイトメトリーによって分析して、それらの頻度および拡大増殖の動態を決定した（図39B）。

NSGマウスモデルにおける造血に対するオフターゲット効果

【0597】

NSG（NOD.Cg-PrkdcscidII2rgtm1Wjl/SzJ、4~5週齢の雌性、20~25g／マウス、最大5動物／ケージ）マウスに、亜致死照射（1.5グレイ）後に健康なドナーのヒト骨髄に由来する 10^6 個のCD34⁺造血幹細胞（StemExpress、Folsom、CA）（HSC）を静脈内（尾部静脈）注射し、

10

20

30

40

50

フローサイトメトリーによってヒト細胞生着について毎週、品質チェックした。移植後＋8週目に、マウスに 10^6 個の空のCARまたは抗CD84 B8 ScFv CAR T細胞を尾部静脈注射し、＋1日目から＋8日目まで末梢血細胞生着および組成のバリエーションについて毎日モニタリングした。

【0598】

総循環ヒトCD45⁺細胞のパーセンテージが、CD34⁺細胞接種後8週目に>25%になったとき、マウスに、 3×10^6 個の空のCARまたはB8 CD84 CAR-T細胞を静脈内注射した。

結果

【0599】

フローサイトメトリーを使用して、CAR T細胞の注入は、空のCARまたはB8 CD84 CAR T細胞を施したマウスの両方においてCAR T細胞注入時（CD34⁺接種の8週間後）（図39B～39C）に対して動物における生着したヒト造血細胞の組成のバリエーションを誘導しないことが観察された（CD34（図39C）、CD19（図39D）、CD38（図39E、CD34陽性細胞の中で）、CD3（図39F）CD33（図39G）、CD16／CD56（図39H））。これらの結果は、新規B8 CD84 CAR-T細胞を用いて生成したCAR-T細胞が、長期HSCをはじめとする造血細胞サブセットに対してin vivoでオフターゲット毒性を発揮せず、したがって、それらは、正常な造血に潜在的に影響を与え得る細胞傷害効果を示さないことを示した。

【0600】

実施例8～14についての統計的分析

【0601】

平均における有意差を、マンホイットニーT検定およびマンテルーコックス検定のいずれかによって試験した。グラフおよび関連する統計的分析を、GraphPad Prism 8を使用して生成した。全てのデータを平均±平均の標準誤差（SEM）として示す。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.005$ 、 $***P<0.0005$ 、および $****P<0.0001$ の値は、統計的に有意である。

4.15. 実施例15：CD69またはCD84に対するscFvの結合親和性予測

【0602】

結晶構造予測ソフトウェア（Pettersen et al., (2021) UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. Protein Science. 2021; 30: 70–82に記載されているようなUCSF Chimeaxソフトウェアv. 1.5）を使用して、CD69またはCD84の細胞外ドメインへのScFv（A1、C1、F1、G1、C2、F2、H2、H3、B8およびF12）の結合に関与する残基を予測した。

【0603】

図40A～40Kは、予測構造（上方）によってまたはタンパク質配列（下方）によってscFv（A1、C1、F1、G1、C2、F2、H2、およびH3）とCD69の細胞外ドメインとの結合またはscFv（B8およびF12）とCD84の細胞外ドメインとの結合に関与すると予測されたドメインを示す。予測分析は、試験したscFv（A1、C1、F1、G1、C2、F2、H2、およびH3）がCD69の同様の細胞外ドメインに結合すること、およびScFv（B8およびF12）がCD84の同様の細胞外ドメインに結合することを示す。

5. 均等物および参照による組込み

【0604】

本開示は、好ましい実施形態および種々の代替的实施形態を参照して特に示され記載されてきたが、形態および詳細における種々の変化が、本開示の精神および範囲から逸脱することなしにその中でなされ得ることが、当業者によって理解される。

10

20

30

40

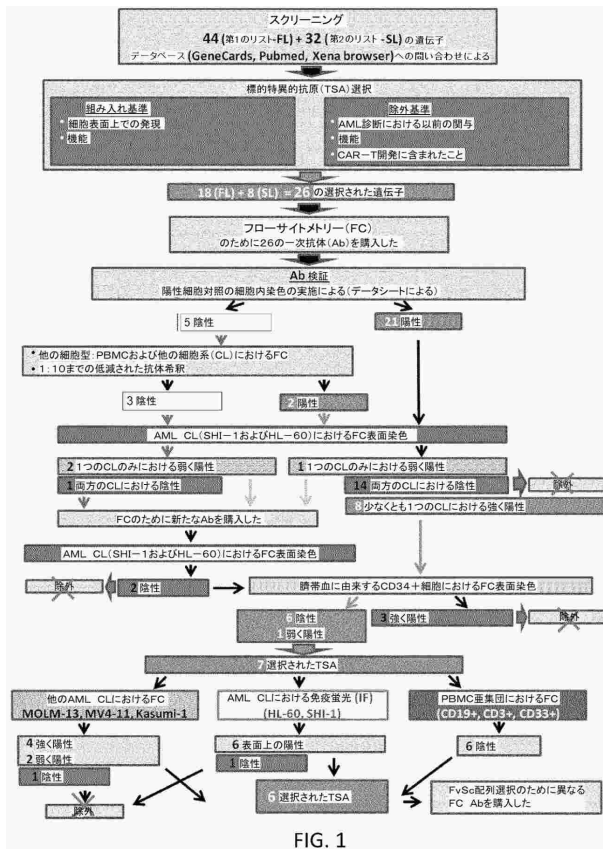
50

【0605】

本明細書の主部において引用された全ての参考文献、発行された特許および特許出願は、全ての目的のために、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

【図1】

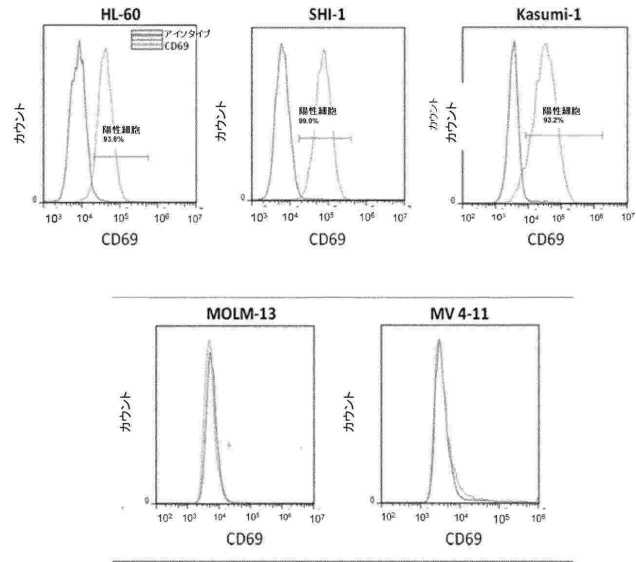


【図2-1】

FIG. 2A

AML細胞系

Ab CD69 (Invitrogen 14-0699-82)



10

20

30

40

50

【図 2 - 2】

FIG. 2A (続き)

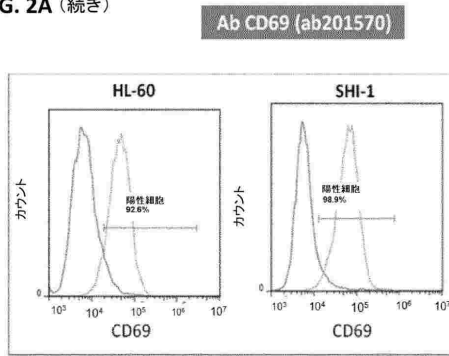
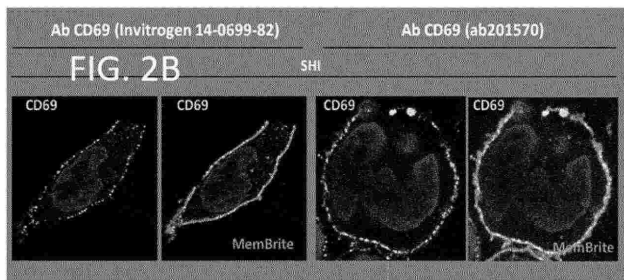
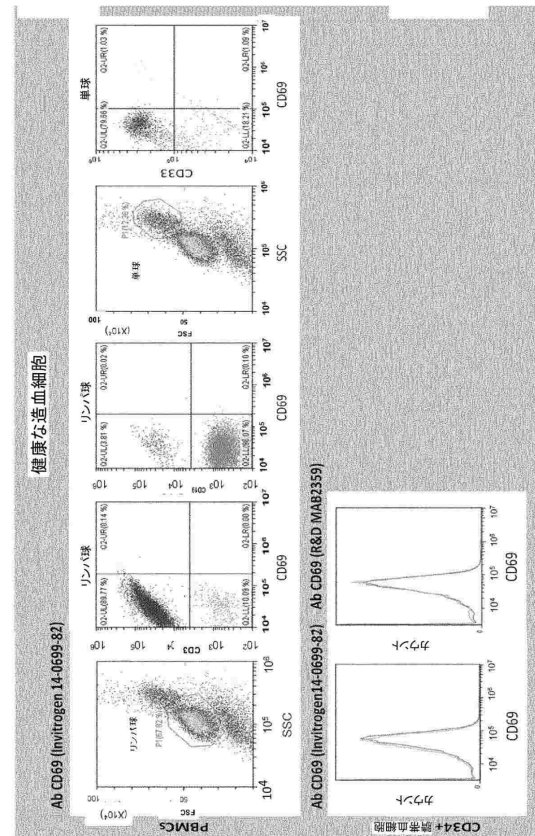


FIG. 2B



【図 2 - 3】

FIG. 2C



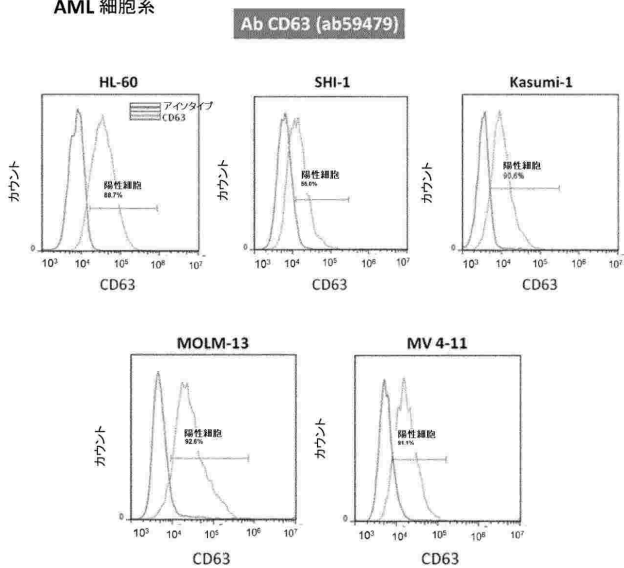
10

20

【図 3 - 1】

FIG. 3A

AML 細胞系



【図 3 - 2】

FIG. 3A (続き)

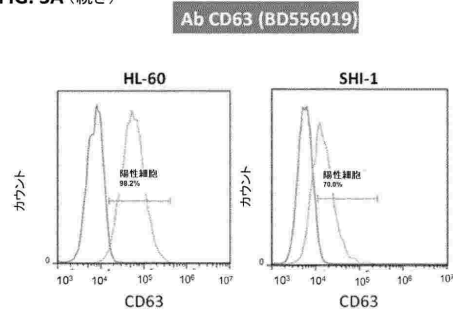
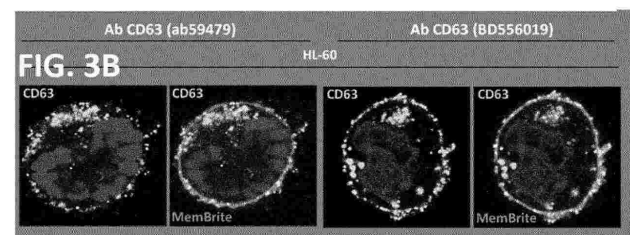


FIG. 3B

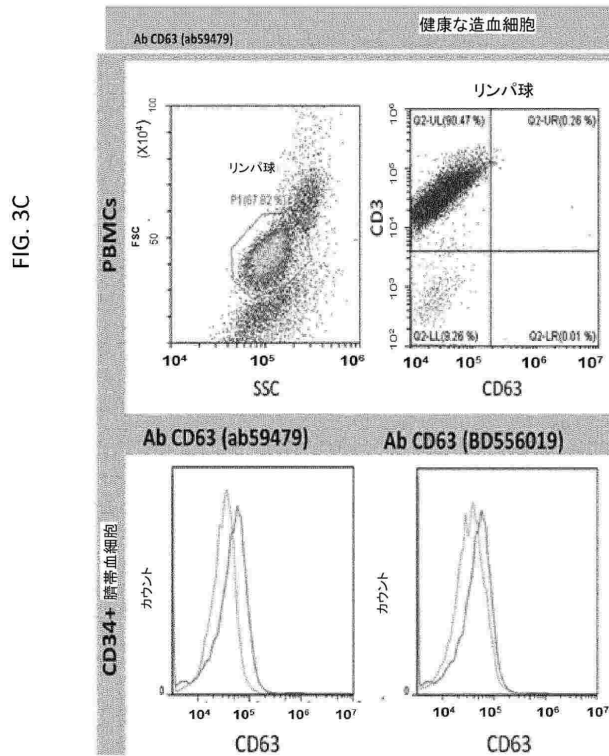


30

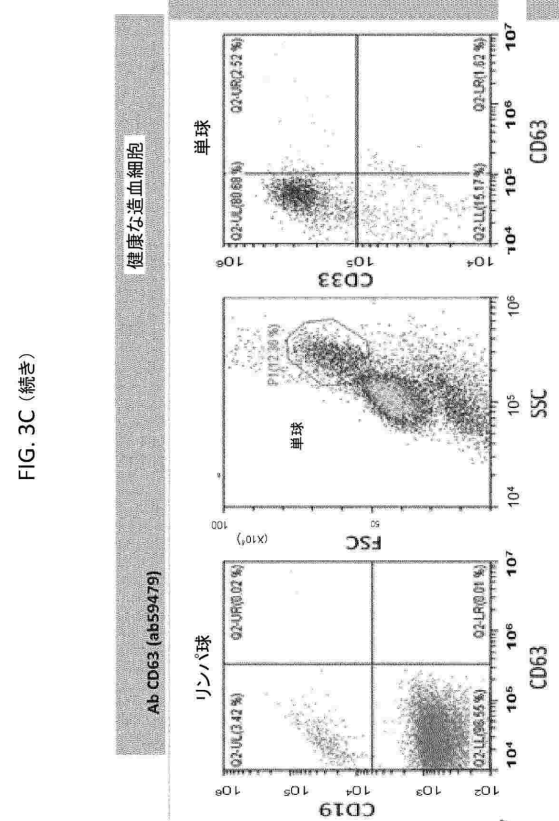
40

50

【図 3 - 3】



【図 3 - 4】

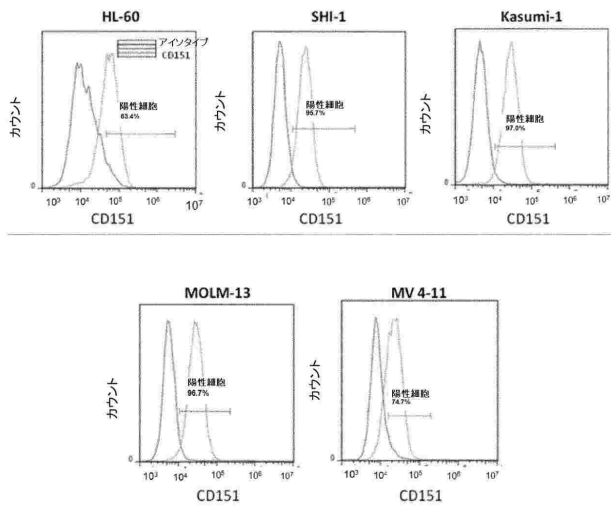


【図 4 - 1】

FIG. 4A

AML 細胞系

Ab CD151 (Invitrogen MA5-16443)



【図 4 - 2】

FIG. 4A (続き)

Ab CD151 (BD 556056)

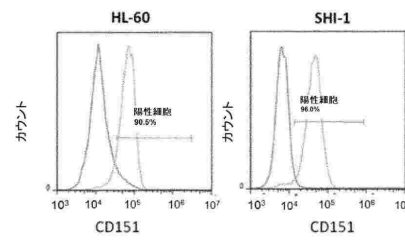
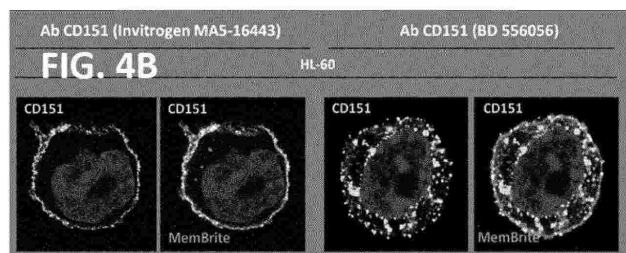


FIG. 4B



10

20

30

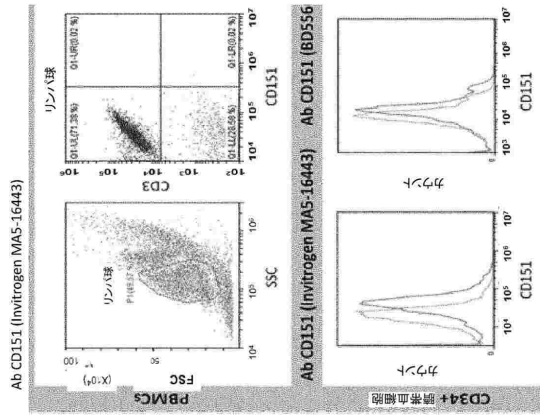
40

50

【図 4 - 3】

FIG. 4C

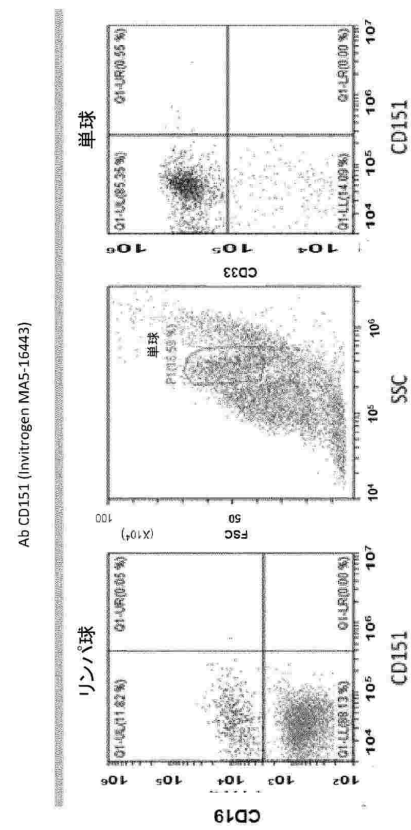
健康な造血細胞



【図 4 - 4】

FIG. 4C (続き)

健康な造血細胞

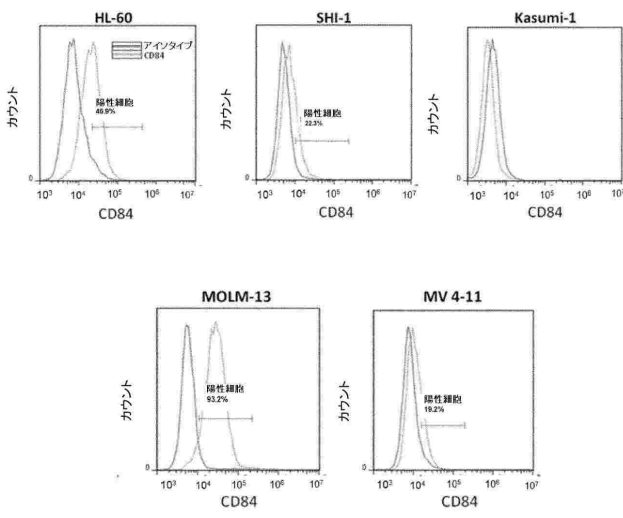


【図 5 - 1】

FIG. 5A

AML 細胞系

Ab CD84 (Biolegend 326002)



【図 5 - 2】

FIG. 5A (続き)

Ab CD84 (NOVUS NBP2-44345)

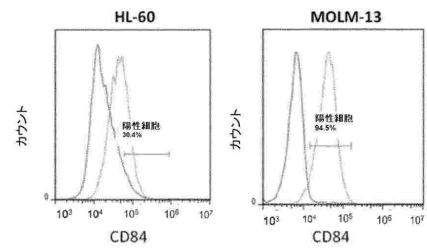
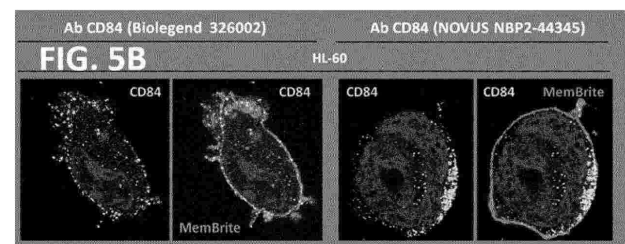


FIG. 5B



10

20

30

40

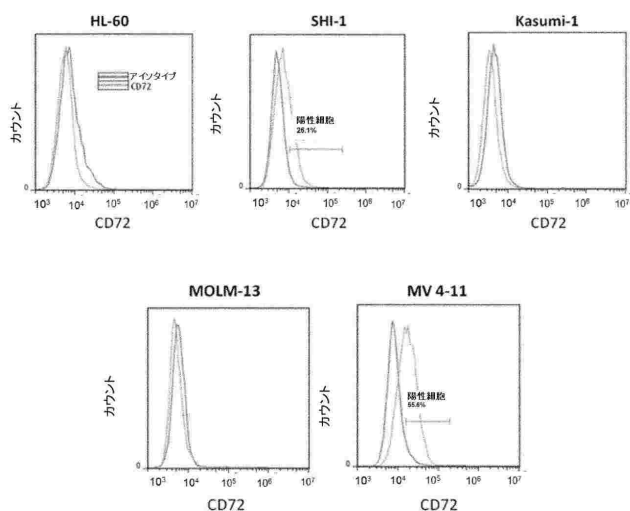
50

【圖 7-1】

FIG. 7A

AML 細胞系

Ab CD72 (Biolegend 316202)



【图 7-2】

FIG. 7A (続き)

Ab CD72 (BD 555917)

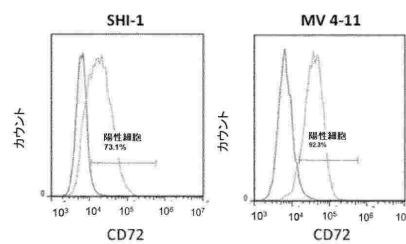
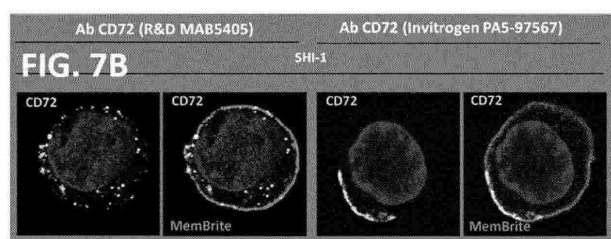
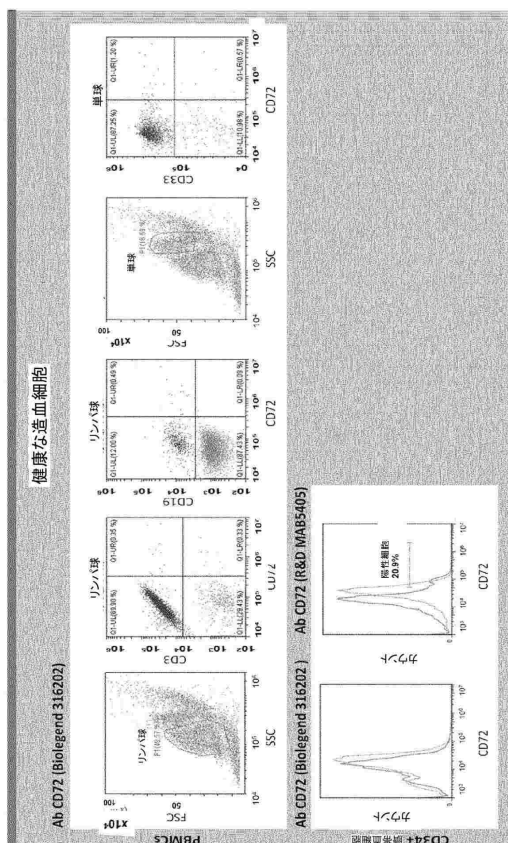


FIG. 7B



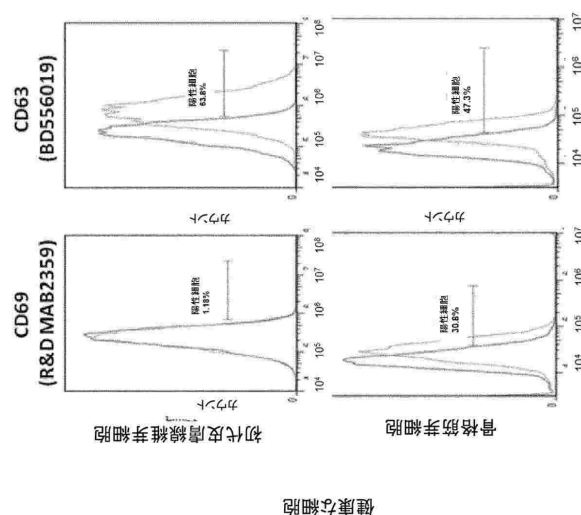
【圖 7-3】

FIG. 7C

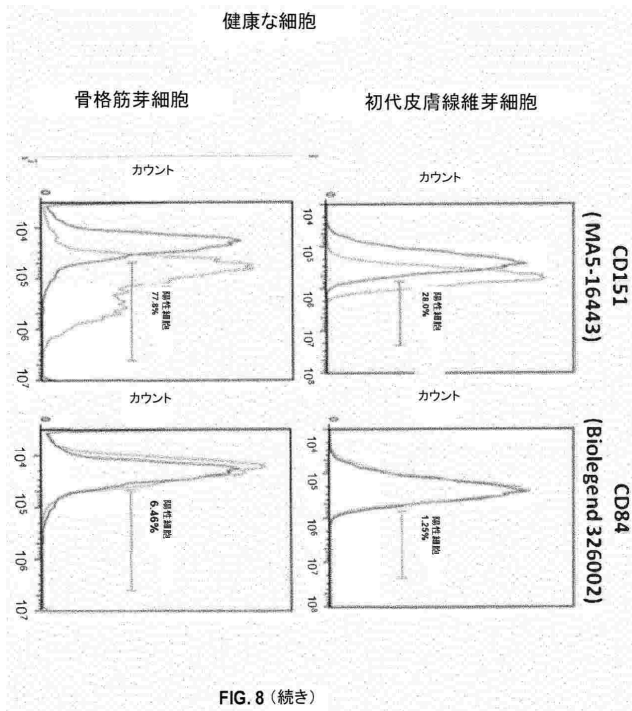


【圖 8-1】

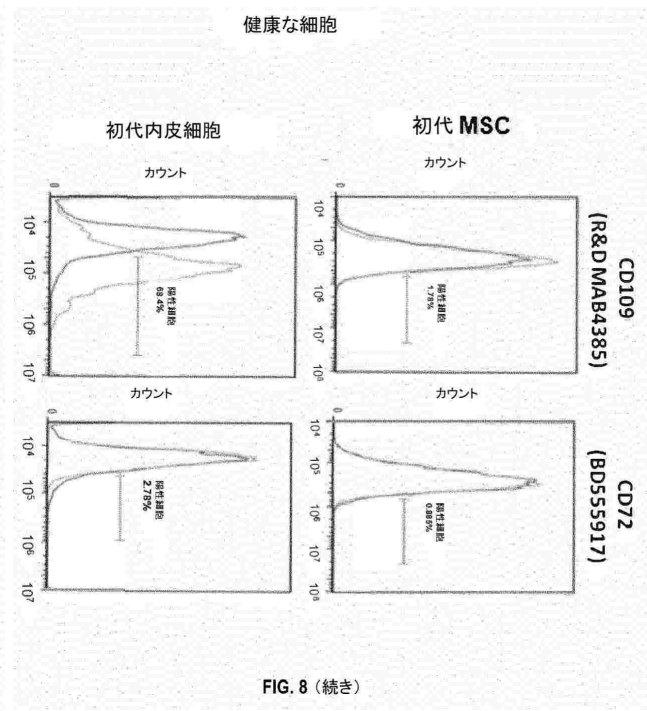
FIG. 8



【図 8 - 2】



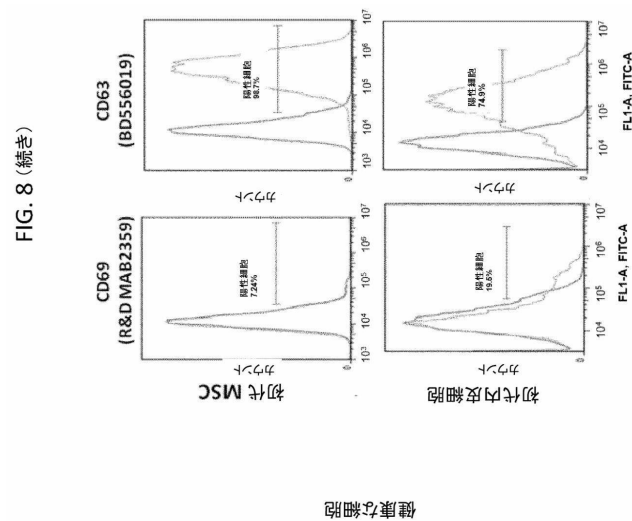
【図 8 - 3】



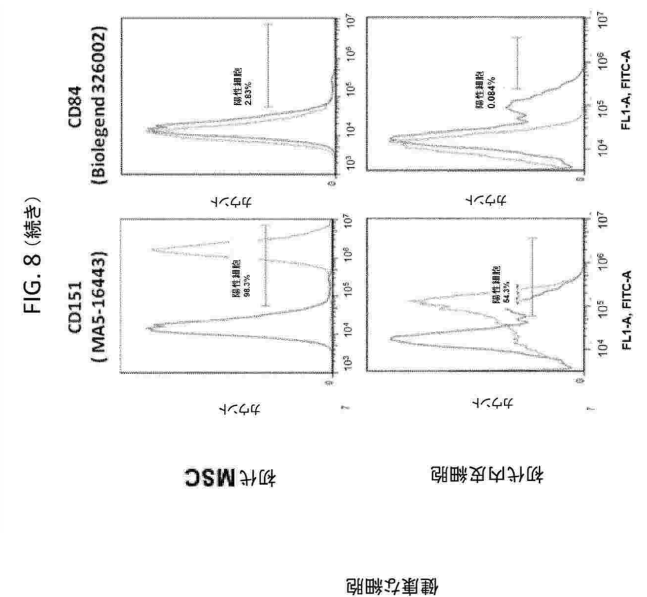
10

20

【図 8 - 4】



【図 8 - 5】



30

40

50

10

20

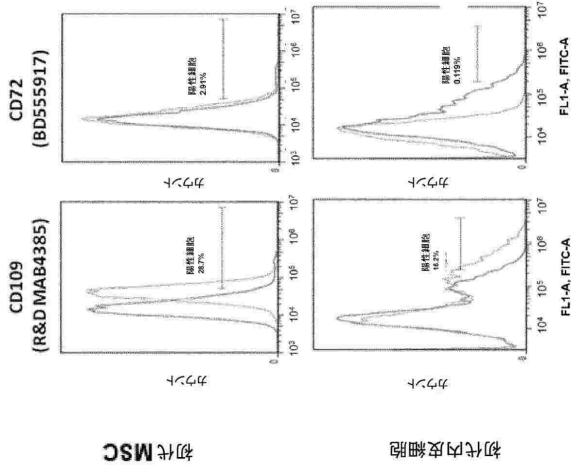
30

40

50

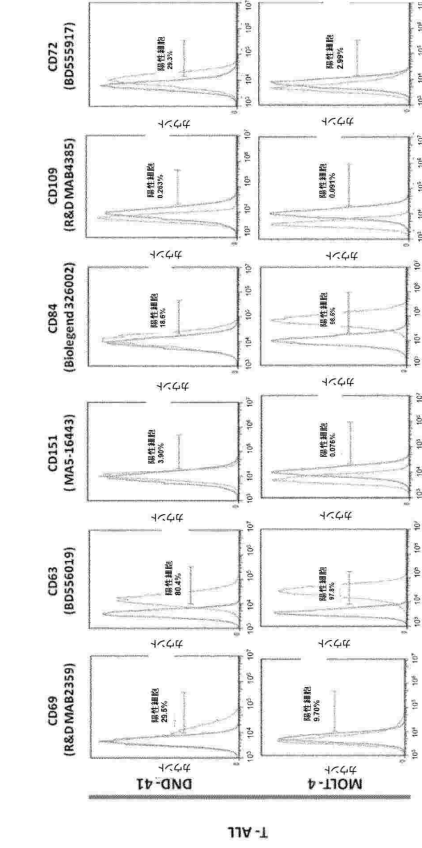
【図 8 - 6】

FIG. 8 (続き)



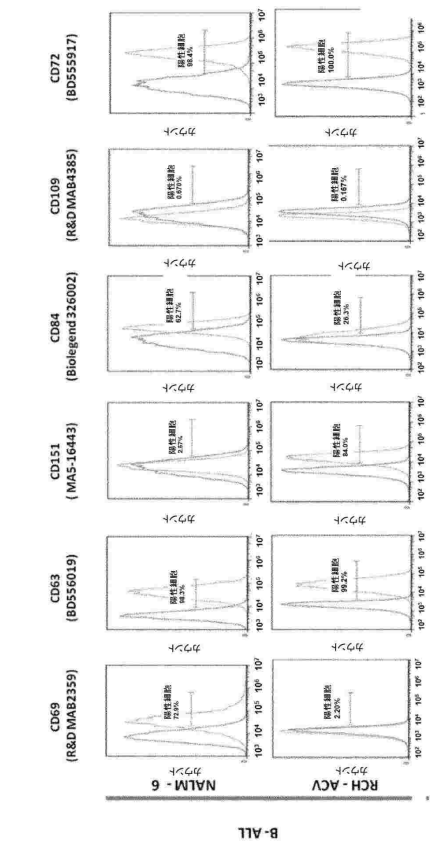
【図 9 - 1】

FIG. 9



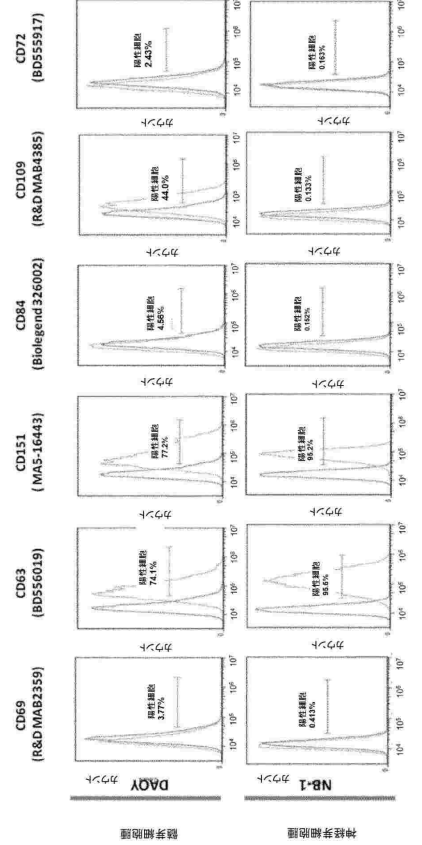
【図 9 - 2】

FIG. 9 (続き)



【図 9 - 3】

FIG. 9 (続き)



10

20

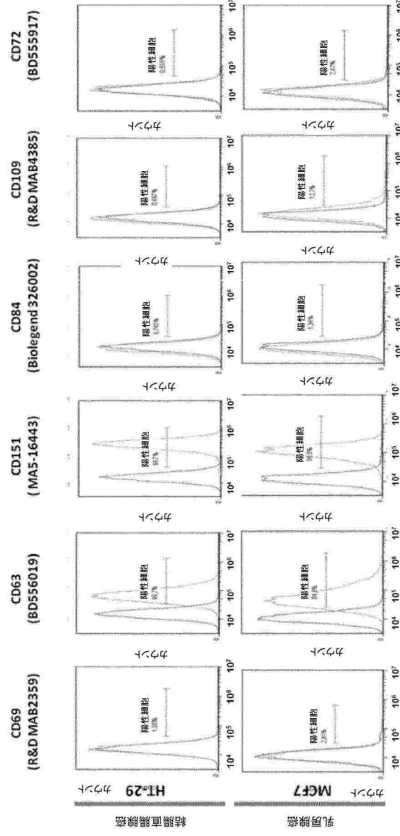
30

40

50

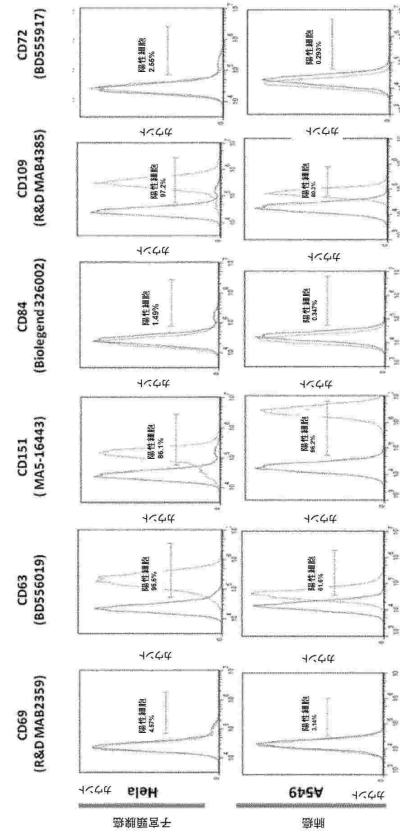
【図 9 - 4】

FIG. 9 (続き)



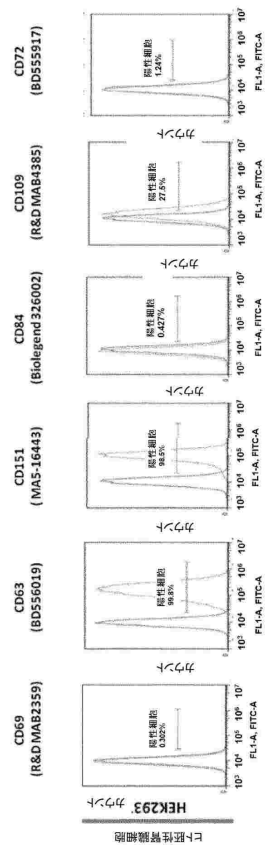
【図 9 - 5】

FIG. 9 (続き)



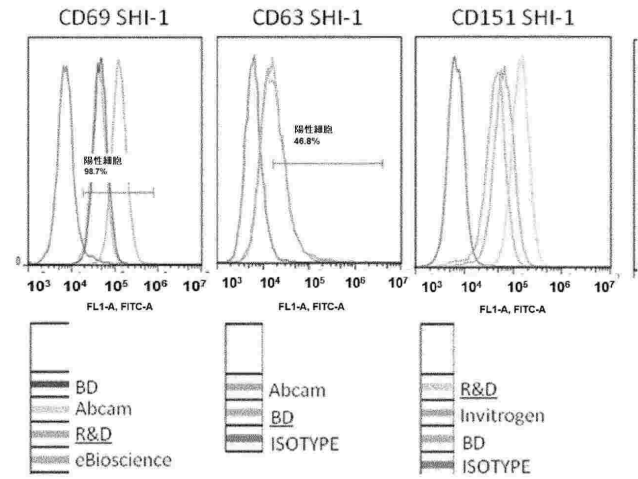
【図 9 - 6】

FIG. 9 (続き)



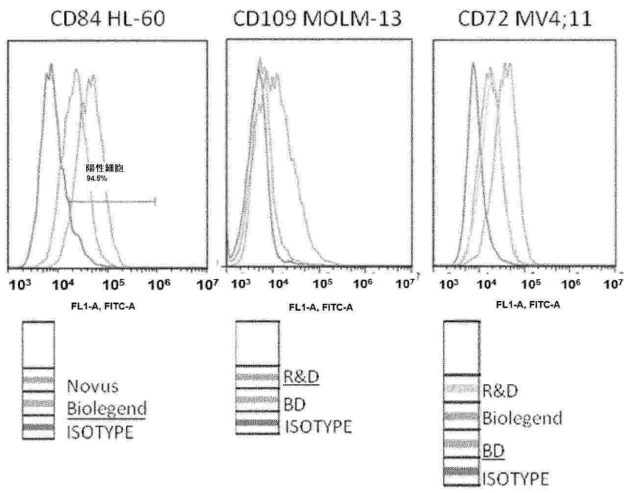
【図 10 - 1】

FIG. 10



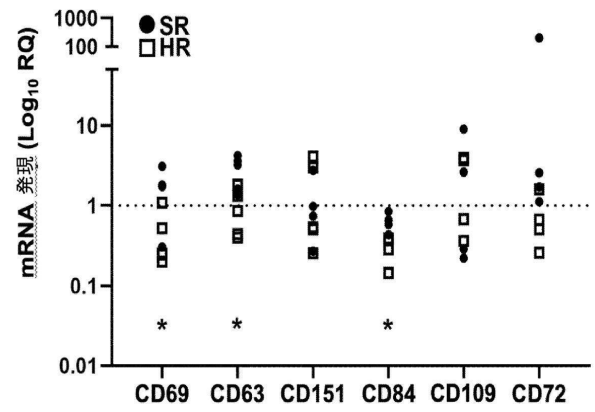
【図 10 - 2】

FIG. 10 (続き)



【図 11】

FIG. 11



【図 12 - 1】

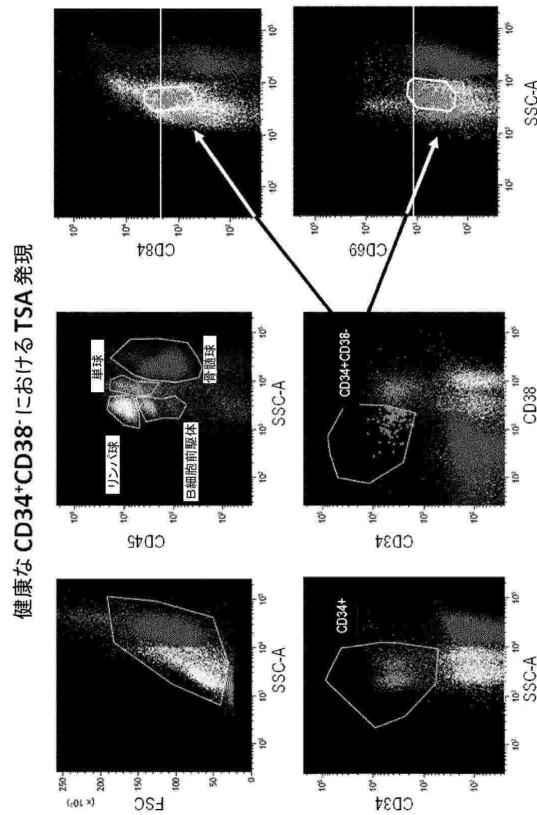


FIG. 12A

【図 12 - 2】

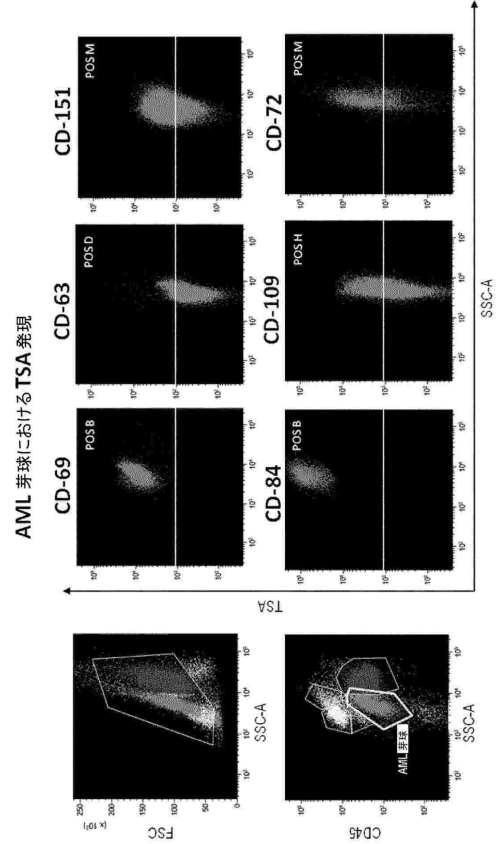


FIG. 12B

10

20

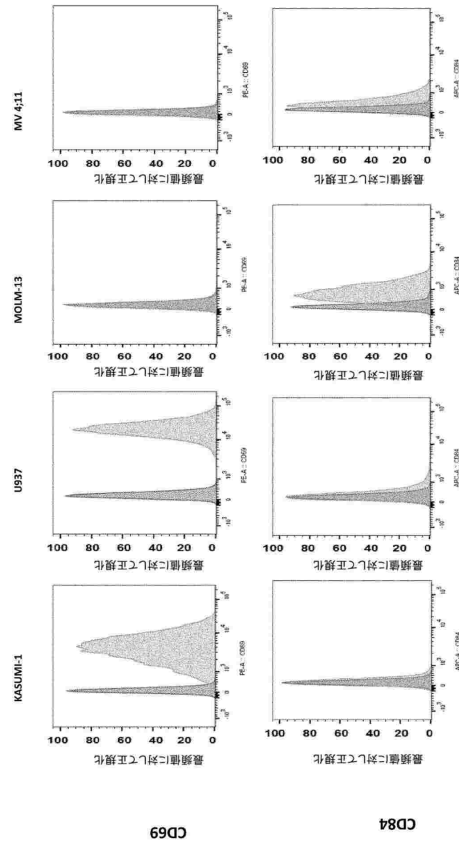
30

40

50

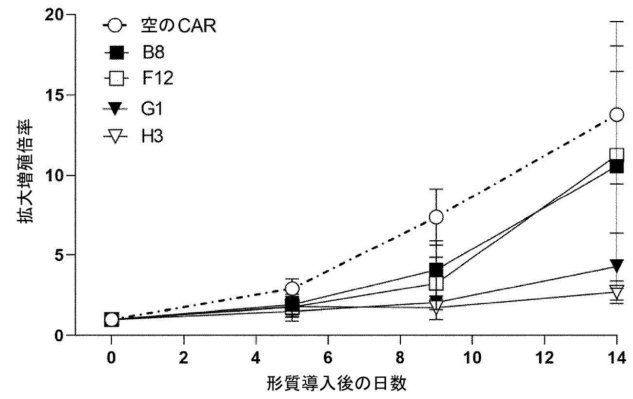
【図 16-2】

FIG. 16 (続き)



【図 17】

FIG. 17



10

20

【図 18】

FIG. 18A

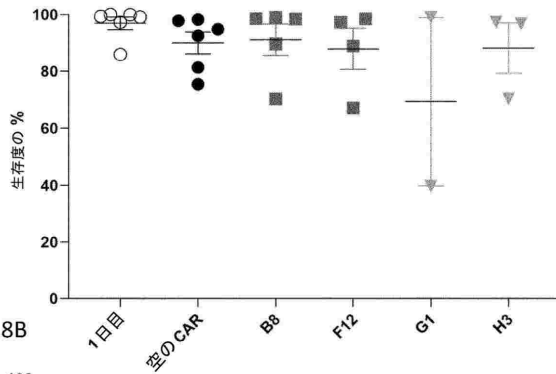
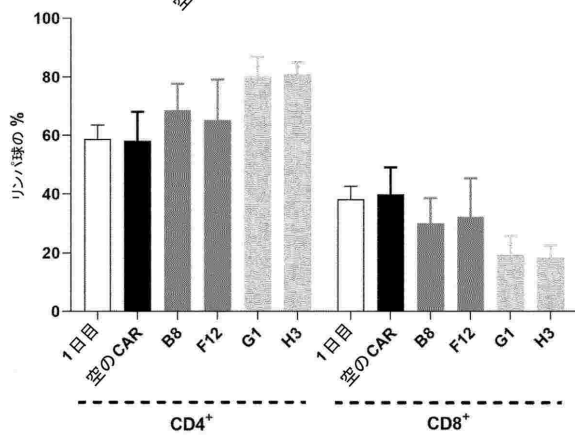


FIG. 18B



【図 19】

FIG. 19A

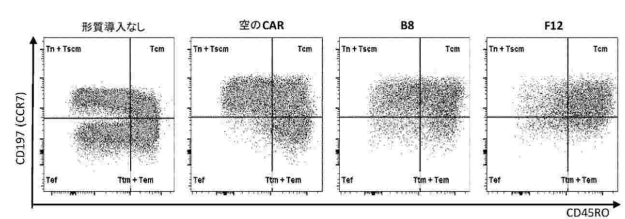
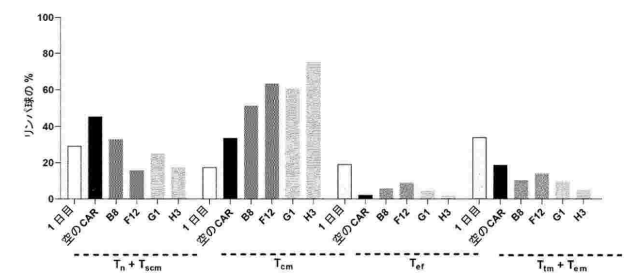


FIG. 19B



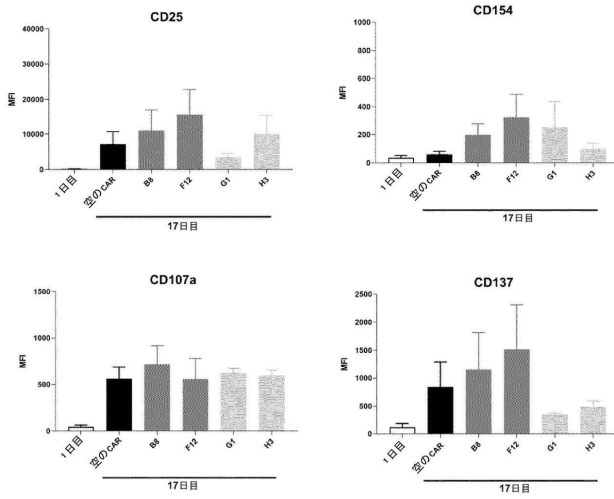
30

40

50

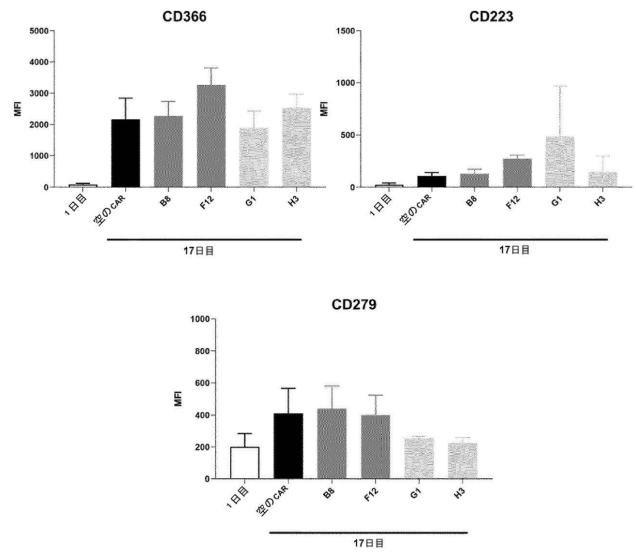
【図 20-1】

FIG. 20A



【図 20-2】

FIG. 20B

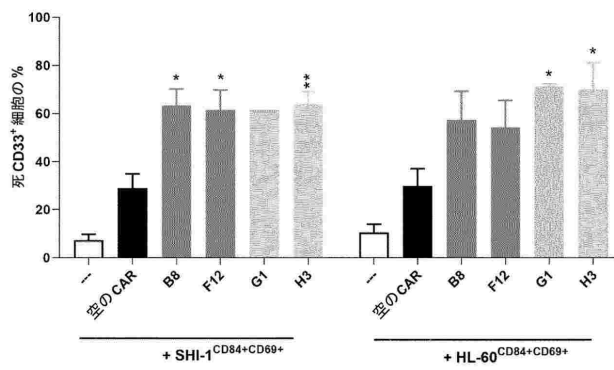


10

20

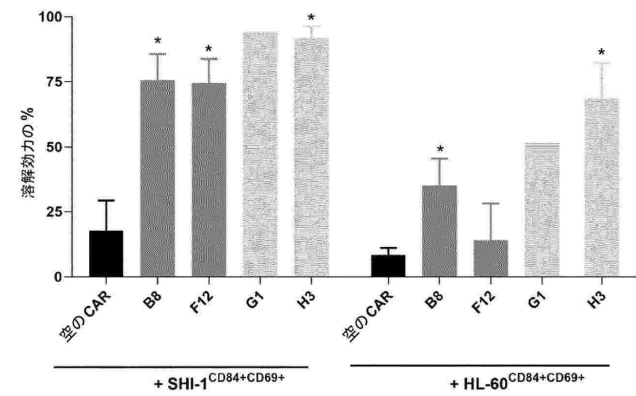
【図 21】

FIG. 21



【図 22】

FIG. 22



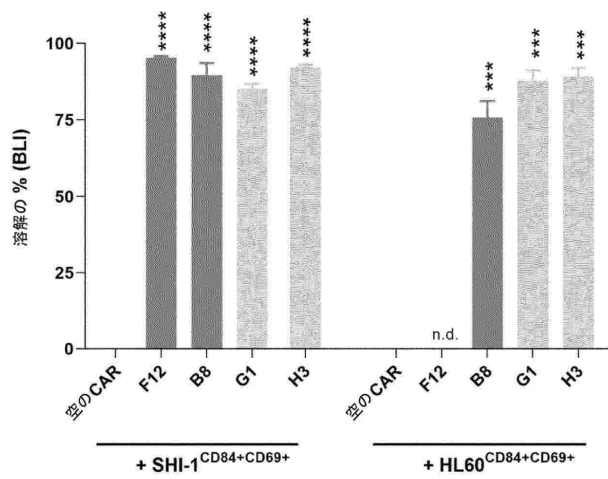
30

40

50

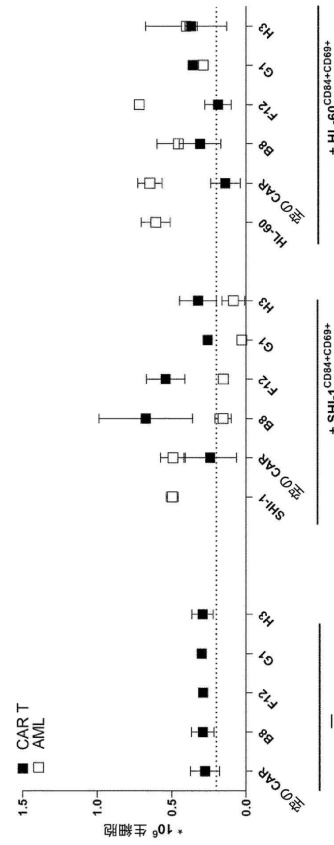
【図 2 3】

FIG. 23



【図 2 4】

FIG. 24



【図 2 5】

FIG. 25A

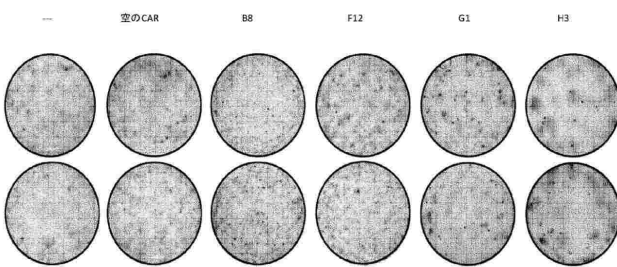
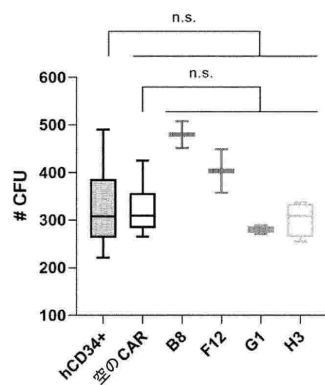
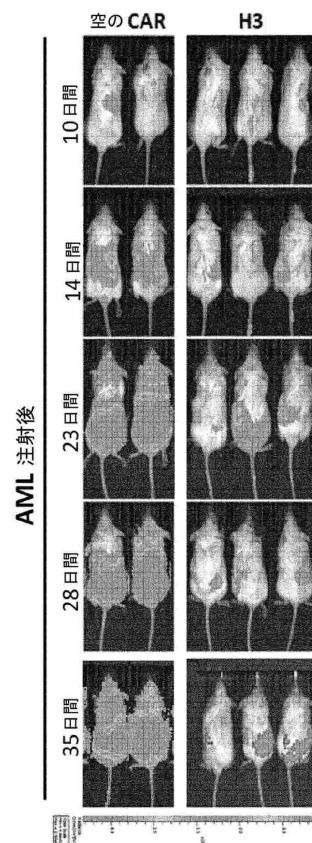


FIG. 25B



【図 2 6 - 1】

FIG. 26A



10

20

30

40

50

【図 26-2】

FIG. 26B

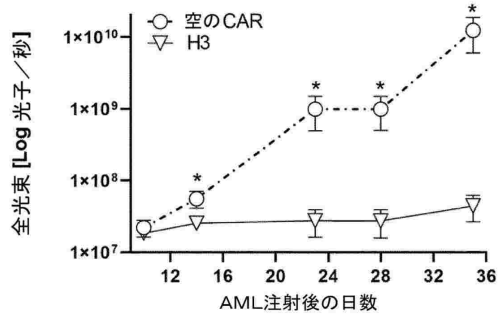
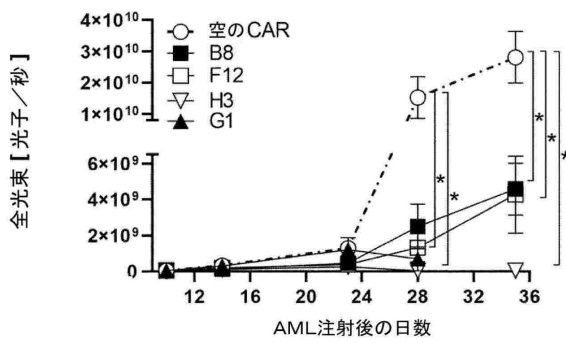


図 26C



【図 27-2】

FIG. 27C

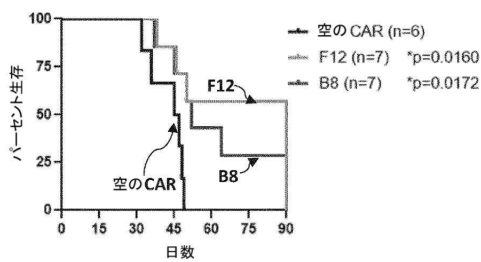
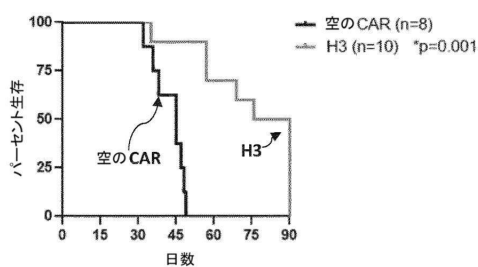


FIG. 27D



【図 27-1】

FIG. 27A

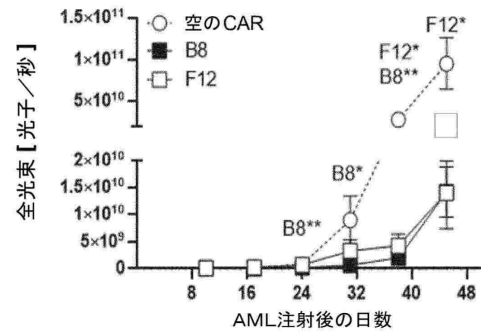
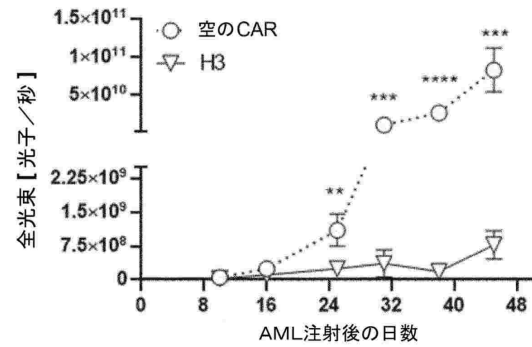


FIG. 27B



【図 28】

FIG. 28A

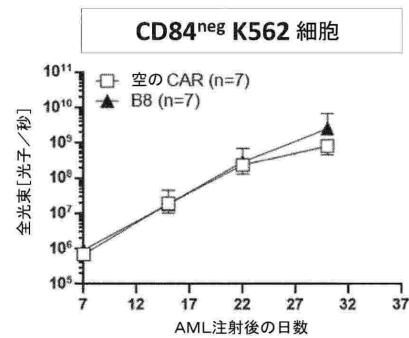
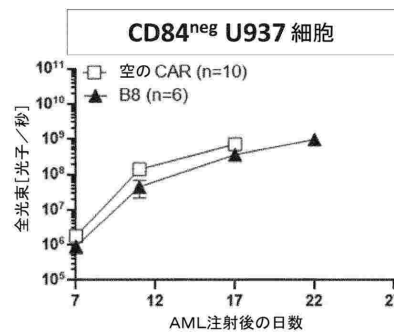


FIG. 28B



10

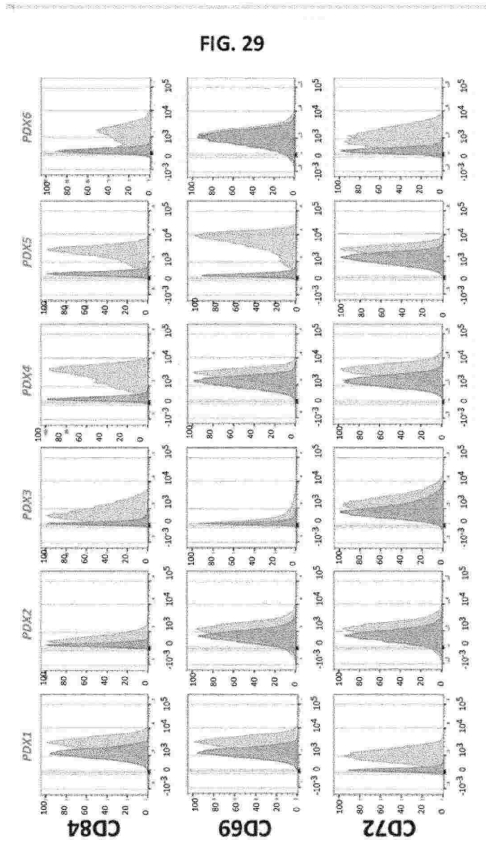
20

30

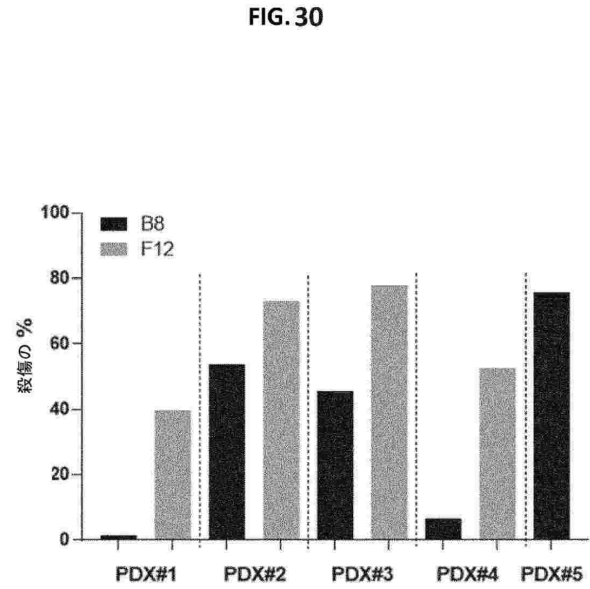
40

50

【図 29】



【図 30】



【図 31】

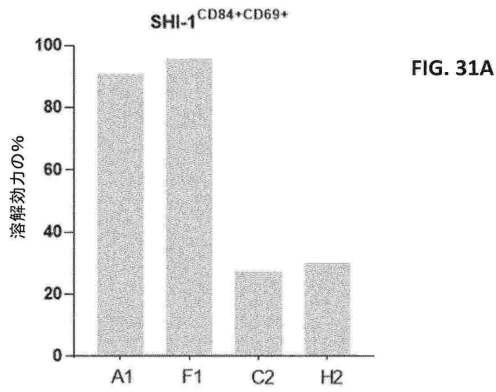
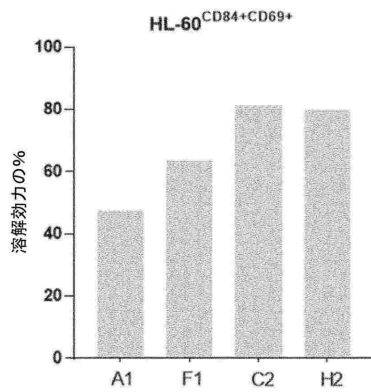


FIG. 31B



【図 32】

FIG. 32A

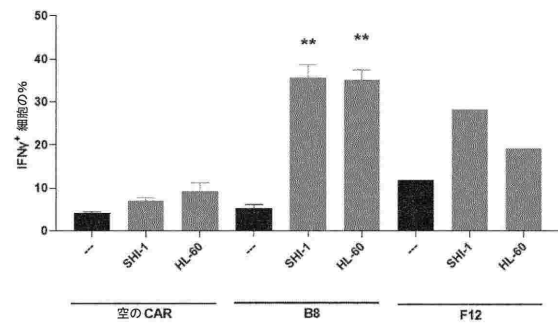
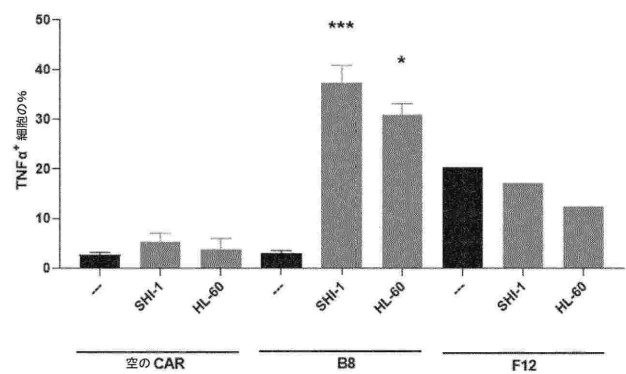


FIG. 32B



10

20

30

40

50

【図 3 3】

FIG. 33A

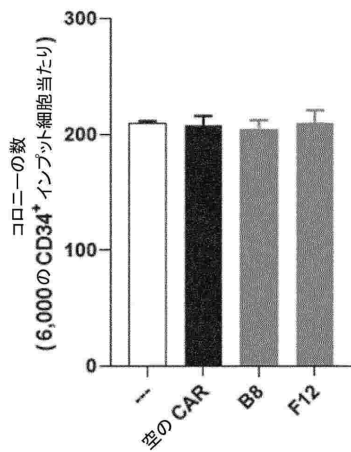
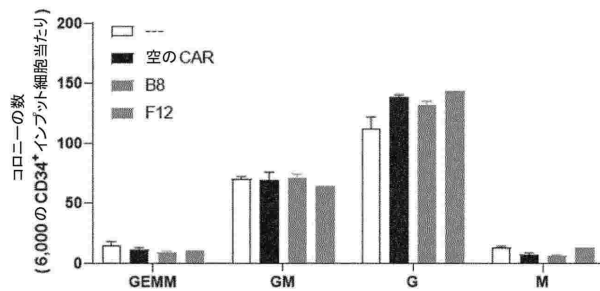


FIG. 33B



【図 3 4】

FIG. 34A

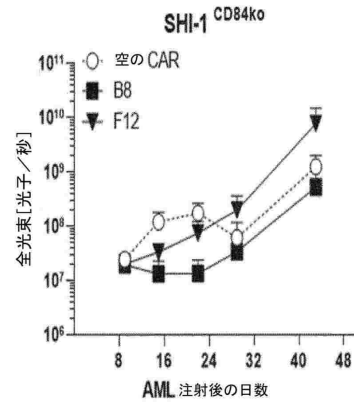
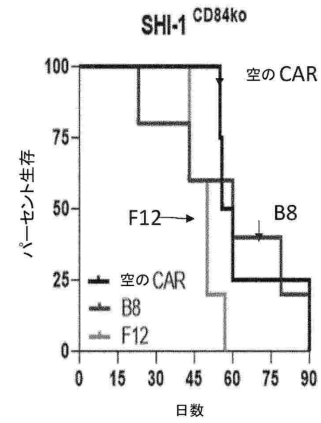


FIG. 34B



【図 3 5】

FIG. 35A

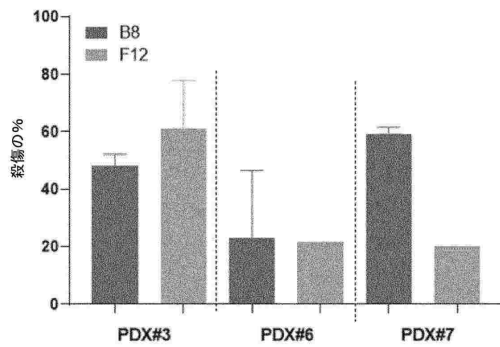
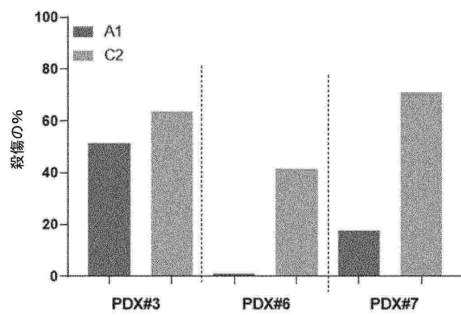


FIG. 35B



【図 3 6】

FIG. 36A

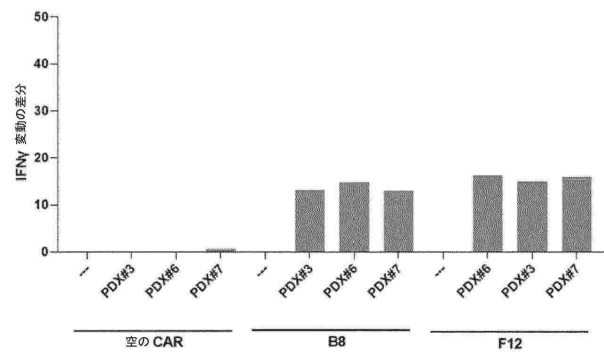
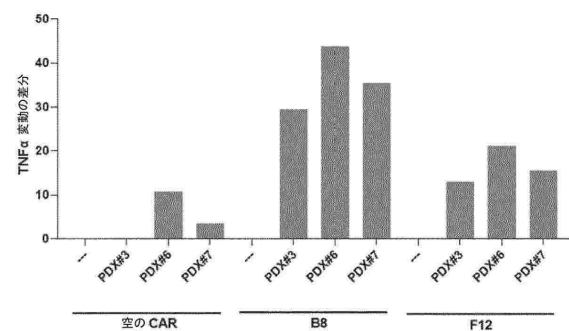


FIG. 36B



10

20

30

40

50

【図 37-1】

FIG. 37A

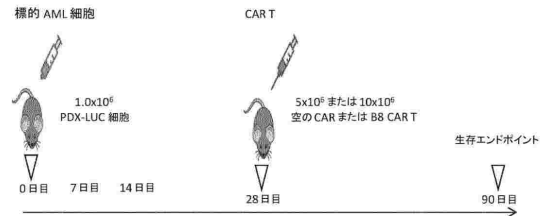
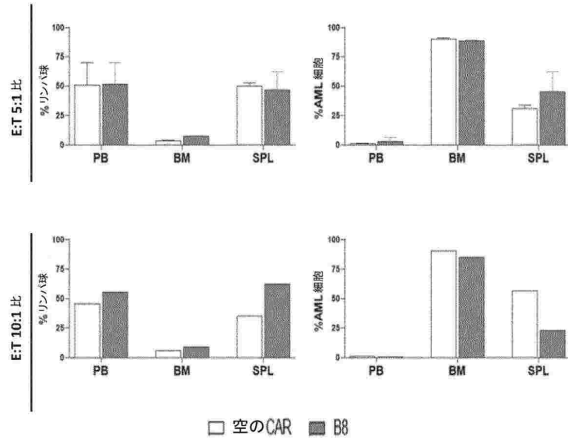


FIG. 37B

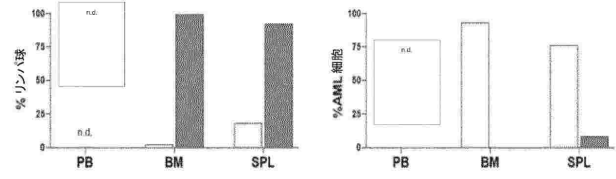
CAR T 細胞注射後+7日目



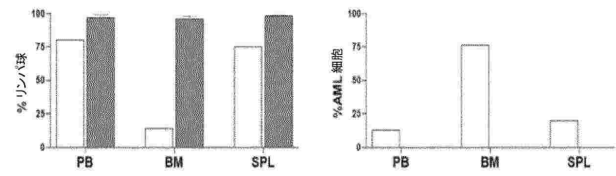
【図 37-2】

FIG. 37C

CAR T 細胞注射後+12日目



CAR T 細胞注射後+16日目



□ 空の CAR ■ B8

10

20

【図 38】

FIG. 38A

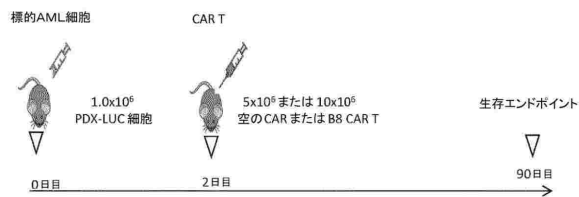
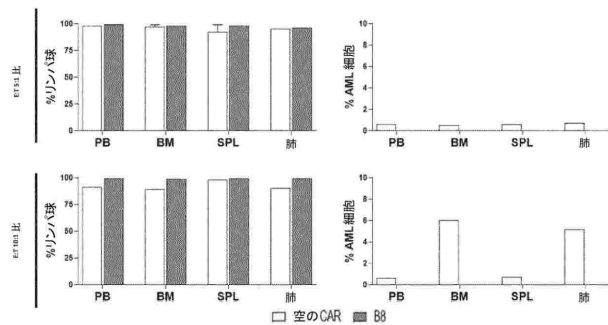


FIG. 38B

CAR T 細胞注射後+12日目



□ 空の CAR ■ B8

【図 39-1】

FIG. 39A

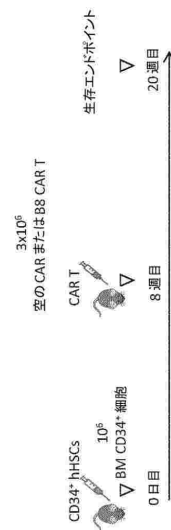
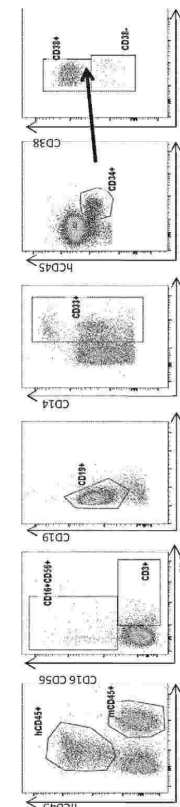


FIG. 39B



30

40

50

【図 3 9 - 2】

FIG. 39C

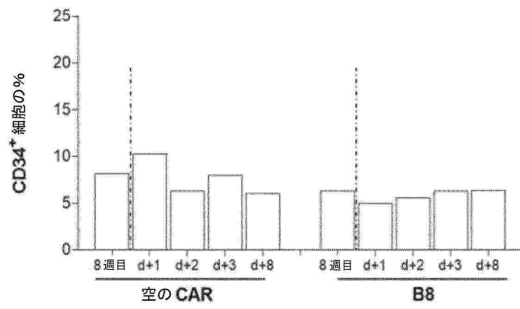
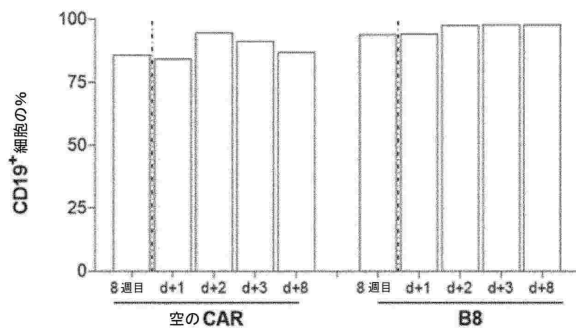


FIG. 39D



【図 3 9 - 4】

FIG. 39G

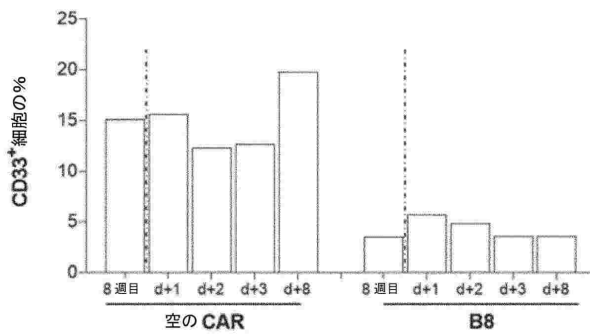
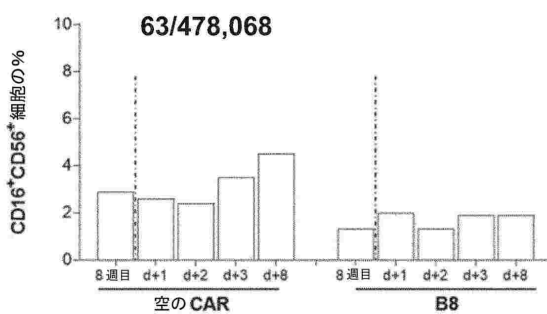


FIG. 39H



【図 3 9 - 3】

FIG. 39E

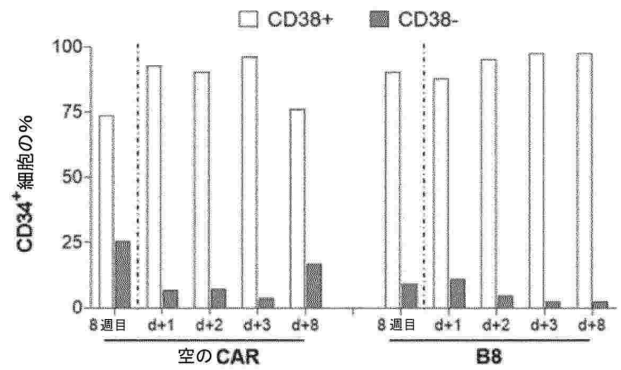
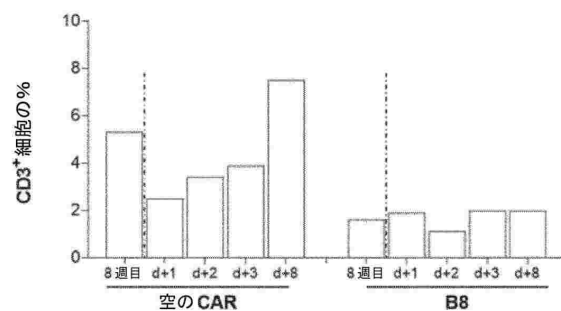


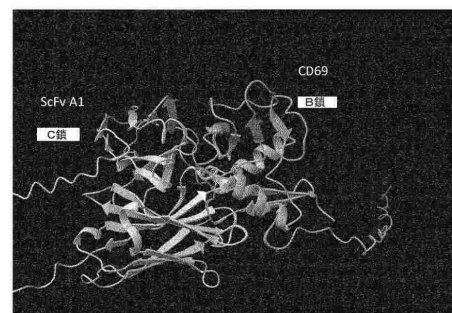
FIG. 39F



【図 4 0 - 1】

FIG. 40A

CD69 細胞外ドメイン対 ScFv A1



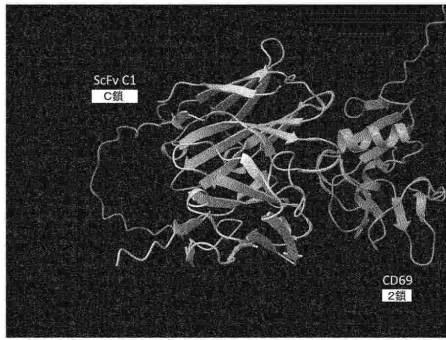
1 SVGQYNC PGQYTF SMPSDSHVSSCSE DWVGYQRKCYFI STVKRSWTS AQN
51 ACSEHGATLAVI DSEKDMNFKRYAGREEHWVGL KKEPGHPWKWSNGKEF
101 NNWFNVTGSDKCVFLKNT EVSSMECEKNLYWICNKPKYK

1 QVQLQQSGPGLVQPSRTLSLTCAISGDSISSNTASWNWIRQSPSRGLEWV
51 GKTEYRSGWFEYAPSVGGRRVNI SPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYFCA
101 RDSYNDYDNDGFDI WGGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGSVLT
151 QPPSVSAAPGQKVITISGSSSSNIGSNYVAWYQQLPGTAPKLLIYDTNKR
201 PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAEVFGTGT
251 KVTVL I

【図 40-2】

FIG. 40B

CD69 細胞外ドメイン対 ScFv C1



```
2 1 SVGQYNC PGQYTF SMPSDSHVSSCEDWVG YQRKCYFI STVKRSW
2 46 TSAQNACSEHGATLAVIDSEKDMNFKRYAGREEHWVGLKKEPGH
2 91 PWKWSNGKEFNWFWNTGSDKCVFLKNT EVSSMECEKNLYWICNK
2 136 PYK
```

```
C 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWL
C 51 GKTEYRSKWYEFAPSVKSRITITPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCV
C 101 RDSYNGYDFDGFDIWGGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLT
C 151 QPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGSNYVAWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR
C 201 PSGIPDRFSGSKSGTSATLGIITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAEVFGTGT
C 251 KVTVL IEVM
```

【図 40-3】

FIG. 40C

CD69 細胞外ドメイン対 ScFv F1



```
B 1 SVGQYNC PGQYTF SMPSDSHVSSCEDWVG YQRKCYFI STVKRSW
B 46 TSAQNACSEHGATLAVIDSEKDMNFKRYAGREEHWVGLKKEPGH
B 91 PWKWSNGKEFNWFWNTGSDKCVFLKNT EVSSMECEKNLYWICNK
B 136 PYK
```

```
C 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSR
C 46 GLEWLKTEYRSKWFEYAPSVKGRIRPDTSKNQVSLQLNSVT
C 91 PEDTAVYYCVRDSYNGYDFDGFDIWGGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSSQSVLT
C 136 GGGGSGGGGSSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGSNYVA
C 181 WYQQVPGAAPRLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGIITGLQ
C 226 SGDEADYYCGSWDSSLAEVFGGGLKLTALIEVMYPP
```

【図 40-4】

FIG. 40D

CD69 細胞外ドメイン対 ScFv G1



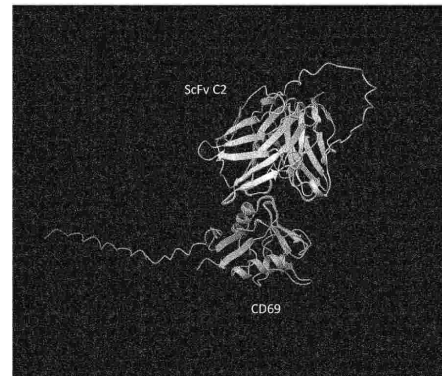
```
B 1 SVGQYNC PGQYTF SMPSDSHVSSCEDWVG YQRKCYFI STVKRSW
B 46 TSAQNACSEHGATLAVIDSEKDMNFKRYAGREEHWVGLKKEPGH
B 91 PWKWSNGKEFNWFWNTGSDKCVFLKNT EVSSMECEKNLYWICNK
B 136 PYK
```

```
C 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSR
C 46 GLEWLKTEYRSKWFEYAPSVKGRIRPDTSKNQVSLQLNSMT
C 91 PEDTAVYYFCVRDSYNGYDFDGFDIWGGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSSQSVLT
C 136 GGGGSGGGGSSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGSNYVS
C 181 WYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGIITGLQ
C 226 TGDEADYYCGTWDSLSAEMFGGGLKVTVLIEVMYPPPYL
```

【図 40-5】

FIG. 40E

CD69 細胞外ドメイン対 ScFv C2



```
B 1 SVGQYNC PGQYTF SMPSDSHVSSCEDWVG YQRKCYFI STVKRSWTSQAN
B 51 ACSEHGATLAVIDSEKDMNFKRYAGREEHWVGLKKEPGHPWKWSNGKEF
B 101 NNWFWNTGSDKCVFLKNT EVSSMECEKNLYWICNPKPYK
```

```
C 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWL
C 51 GKVEYRSKWYDEYAPSVKSRIRPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCA
C 101 RDSYNGHAFDGFVWGGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLT
C 151 QPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGDNLVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR
C 201 PSGIPDRFSGSKSGTSATLDITGLQTGDEADYYCESWNNLTAEVFGTGT
C 251 KVTVL
```

10

20

30

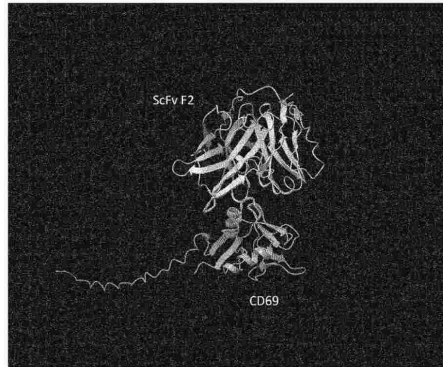
40

50

【図 40 - 6】

FIG. 40F

CD69 細胞外ドメイン対 ScFv F2



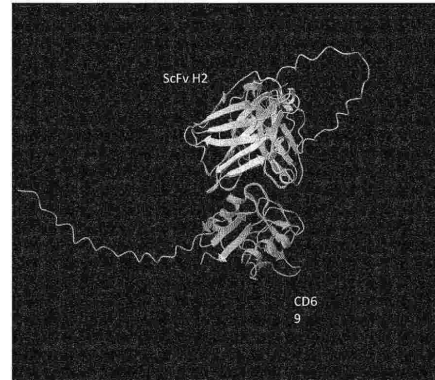
```
1 SVGQYNC PGQYTF SMPSDSHVSSCEDWVG YQRKCYFI STVKRSWTS AQN
51 ACSEHGATLAVIDSEKDMNFKRYAGREEHWVGLKKEPGHPWKWSNGKEF
101 NNWFNVTGSDKCVFLKNT EVSSMECEKNLYWICNKPYK
```

```
1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVFSNSASWNWIRQSPSRGLEWL
51 GKTEYRSKWDFEYAPSVKGR IAI RPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCV
101 RDSYNGYDFDGFDIWGGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQSVLT
151 QPPSYSAAPGQKVTISCSSGSSNI EKNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR
201 PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGAWDNILNSEMFGGGT
251 KLTVL
```

【図 40 - 7】

FIG. 40G

CD69 細胞外ドメイン対 ScFv H2



```
1 SVGQYNC PGQYTF SMPSDSHVSSCEDWVG YQRKCYFI STVKRSWTS AQN
51 ACSEHGATLAVIDSEKDMNFKRYAGREEHWVGLKKEPGHPWKWSNGKEF
101 NNWFNVTGSDKCVFLKNT EVSSMECEKNLYWICNKPYK
```

```
1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVFSNSASWNWIRQSPSRGLEWL
51 GKTEYRSKWDFEYAPSVKGR IAI RPDTSKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCV
101 RDSYNGYDFDGFDIWGGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQSVLT
151 QPPSYSAAPGQKVTISCSSGSSNI EKNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR
201 PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAEVFGGGT
251 KLTVL
```

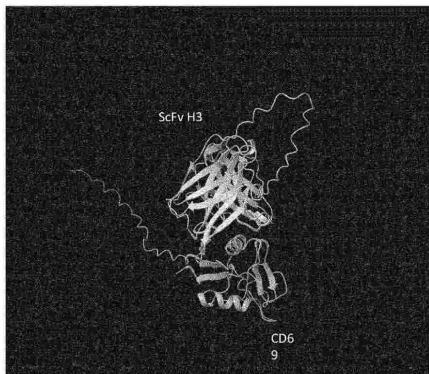
10

20

【図 40 - 8】

FIG. 40H

CD69 細胞外ドメイン対 ScFv H3



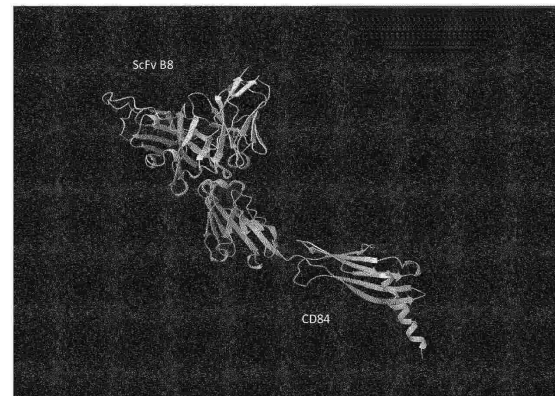
```
1 SVGQYNC PGQYTF SMPSDSHVSSCEDWVG YQRKCYFI STVKRSWTS AQN
51 ACSEHGATLAVIDSEKDMNFKRYAGREEHWVGLKKEPGHPWKWSNGKEF
101 NNWFNVTGSDKCVFLKNT EVSSMECEKNLYWICNKPYK
```

```
1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCDISGDSVFSNTASWNWIRQSPSRGLEWL
51 GKTEYRSQWLHEYAPSVRSR IAI RPDTSKNQVSLQLSFVTPEDTAVYYCV
101 RDSYNGYAFDGFDTWGGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQSVVT
151 QPPSYSAAPGQKVTISCGRNSNI ANNFVSWYRQLPGTAPKLLIYDNNKR
201 PSGIPDRFSGSKSGTSATLAIITGLQTGDEADYYCESWDSSTAEVFGTGT
251 KVTVL
```

【図 40 - 9】

Fig.40I

CD84 細胞外ドメイン対 ScFv B8



```
Best_model.pdb (#1) B8 (ID: 1/B)
1 QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWL
51 GKVEYRSKWDFEYAPSVKSR IAI RPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCA
101 RDSYNGYAFDGFDTWGGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGQSVLT
151 QPPSLSAAPGQKVTISCSTTSNI ANNEVSWYQQLSGSAPKLLINDNNKR
201 PSGIPDRFSGSKSGASATLAIITGLQTEDEADYYCGVWDNLSLNAEVFGGGT
251 KVTVL
```

```
Best_model.pdb (#1) C8 (ID: 1/C)
1 KDSEITFTVNGTILGESVTFPVNIQEPQVKIIAWTSKTSVAYVTPGDSETA
51 PVVTVTTHRYERIHAGPNYNLVISDLRMEDAGDYKADINTQADPYTTT
101 KRYNLQIYRRLGKPKITQSLMASVNSTCNVTLTCSVEKEKNVTYNWSPL
151 GEEGNVLQIFGTPEQQELTYTGTAQNPVSNNSDSISARQLCADIAMGFRT
201 HHTG
```

30

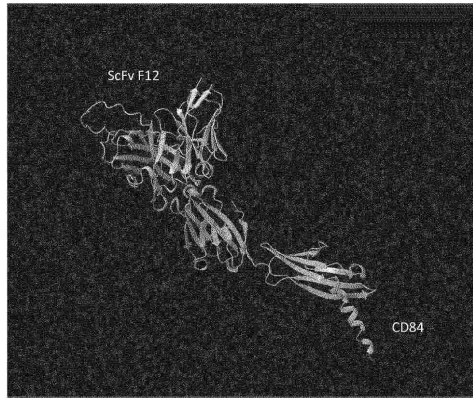
40

50

【図 40 - 10】

CD84 細胞外ドメイン対 ScFv F12

Fig.40J

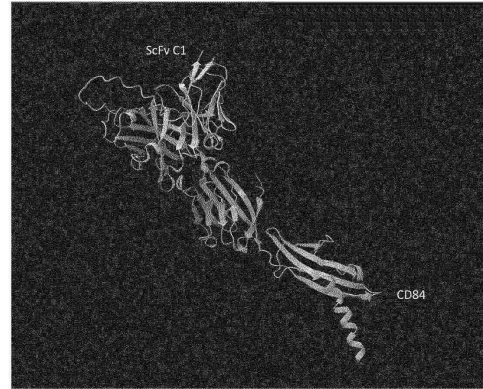


Best_model.pdb (#1) B3D (ID: 10)	
図 1	1 QVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWNIRQSPSRGLEWL
図 51	51 GKVEYRSKWYDEYAPSVKSRITAIRPDTSKNQVSLHLISVTPDDTAVYYCA
図 101	101 RDSYNGHAFDQFDVWGQTMVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSVVT
図 151	151 QPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNKR
図 201	201 PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAEVFGGT
図 251	251 KVTVL
再フォーマットしたアライメント	
Best_model.pdb (#1) C3D (ID: 10)	
図 1	1 KDSEIFTVNGILGESVTFPVIQEPQVKIIAWTSKTSVAYVTPGDSETA
図 51	51 PVVTVTHRNYYERIHAGPNYNLVISDLRMEDAGDYKADINTQADPYTIT
図 101	101 KRYNLQIYRRLGKPKITQSLMASVNSTQVTLTCSVEKEEKVNTYNSPL
図 151	151 GEEGNVLQIFQTFEDQELTYTCTAQNPNVSNSSDSISARQLCADIAMGFRT
図 201	201 HHTG
再フォーマットしたアライメント	

【図 40 - 11】

CD84 細胞外ドメイン対 ScFv C1

Fig.40K



Best_model.pdb (#1) B3D (ID: 10)	
図 1	1 KDSEIFTVNGILGESVTFPVIQEPQVKIIAWTSKTSVAYVTPGDSETA
図 51	51 PVVTVTHRNYYERIHAGPNYNLVISDLRMEDAGDYKADINTQADPYTIT
図 101	101 KRYNLQIYRRLGKPKITQSLMASVNSTQVTLTCSVEKEEKVNTYNSPL
図 151	151 GEEGNVLQIFQTFEDQELTYTCTAQNPNVSNSSDSISARQLCADIAMGFRT
図 201	201 HHTG
Best_model.pdb (#1) C3D (ID: 10)	
図 1	1 QVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWNIRQSPSRGLEWL
図 51	51 GKTEYRSKWYEFAPSVKSRITITPDTSKNQFSLQNSVTPEDTAVYYCV
図 101	101 RDSYNGYDFDQFDIWGGQLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSVLT
図 151	151 QPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGSNYVAWYQQLPGTAPKLLIYDTNKR
図 201	201 PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAEVFGGT
図 251	251 KVTVL

【配列表】

202551175800001.xml

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2023/059054

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/059054

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims.; it is covered by claims Nos.:
1, 15-50, 56, 58-106(all partially)

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/059054

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/00 A61P35/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. JAN ET AL: "Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 12, 7 March 2011 (2011-03-07), pages 5009-5014, XP055029836, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1100551108 abstract, figure 2 on page 5011, introduction, penultimate paragraph -----	1
A	EP 3 875 484 A1 (CAFA THERAPEUTICS LTD [IE]) 8 September 2021 (2021-09-08) paragraphs [0003] - [0006], [0022] ----- -/--	1
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 June 2023		Date of mailing of the international search report 28/08/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stein, Annette

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/059054

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUMBEA HORIA ET AL: "Platelet Defects in Acute Myeloid Leukemia-Potential for Hemorrhagic Events", JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE, vol. 11, no. 1, 26 December 2021 (2021-12-26), page 118, XP055929493, DOI: 10.3390/jcm11010118 the whole document, in particular introduction and 2.1 -----	1
X	WO 2019/222663 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 21 November 2019 (2019-11-21) paragraphs [0004] - [0032], [0038], [0039], [0051], [0061] - [0068], [0094], [0095], [0099], [0100] paragraphs [0161], [0173], [0217], [0225] - [0230]; claims 1-25; example 1 -----	1, 15-50, 56, 58-106
A	DATABASE Biosis [Online] 16 November 2000 (2000-11-16), Jaime Au-Claudio ET AL: "Identification of ML1 a member of a novel family of adaptor and scaffold genes expressed in myeloma and leukemias", XP055935238, Database accession no. PREV200100324417 the whole document -----	1, 15-50, 56, 58-106
A	WO 2015/121454 A1 (CELLECTIS [FR]) 20 August 2015 (2015-08-20) table 14 -----	1, 15-50, 56, 58-106
A	LARSON REBECCA C ET AL: "Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells", NATURE REVIEWS, vol. 21, 22 January 2021 (2021-01-22), pages 145-161, XP055801557, Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41568-020-00323-z.pdf> the whole document -----	37-50, 56, 58-106
X,P	WO 2022/214499 A2 (ALTHEIA SCIENCE S R L [IT]) 13 October 2022 (2022-10-13) the whole document -----	1, 15-50, 56, 58-106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/059054

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3875484	A1	08-09-2021	CA 3117759 A1	30-04-2020
			CN 113039205 A	25-06-2021
			EP 3875484 A1	08-09-2021
			JP 2022505921 A	14-01-2022
			KR 20210089179 A	15-07-2021
			SG 11202104240T A	28-05-2021
			US 2021324087 A1	21-10-2021
			WO 2020083406 A1	30-04-2020

WO 2019222663	A1	21-11-2019	AU 2019269685 A1	03-12-2020
			BR 112020023145 A2	02-02-2021
			CA 3100021 A1	21-11-2019
			CL 2020002965 A1	06-08-2021
			CL 2022000094 A1	24-02-2023
			CN 112135624 A	25-12-2020
			CO 2020015052 A2	10-12-2020
			EP 3793591 A1	24-03-2021
			JP 2021524231 A	13-09-2021
			KR 20210010916 A	28-01-2021
			MA 52626 A	24-03-2021
			PH 12020551955 A1	16-08-2021
			SG 11202011232V A	30-12-2020
			US 2021079109 A1	18-03-2021
			WO 2019222663 A1	21-11-2019

WO 2015121454	A1	20-08-2015	AU 2015216875 A1	28-07-2016
			BR 112016017806 A2	10-10-2017
			CA 2937711 A1	22-07-2016
			CN 106029875 A	12-10-2016
			DK 3105317 T3	14-01-2019
			EP 3105317 A1	21-12-2016
			EP 3505623 A1	03-07-2019
			ES 2711498 T3	06-05-2019
			HU E041497 T2	28-05-2019
			JP 6673838 B2	01-04-2020
			JP 2017506636 A	09-03-2017
			KR 20160138404 A	05-12-2016
			PL 3105317 T3	28-02-2019
			PT 3105317 T	27-02-2019
			RU 2016136702 A	19-03-2018
			TR 201819571 T4	21-01-2019
			US 2018201901 A1	19-07-2018
			US 2020407682 A1	31-12-2020
			WO 2015121454 A1	20-08-2015

WO 2022214499	A2	13-10-2022	NONE	

International Application No. PCT/EP2023/059054

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 15-50, 56, 58-106(all partially)

An antigen-binding protein (ABP) that specifically binds CD63 and related subject-matter.

2. claims: 1, 15-50, 56, 58-106(all partially)

An antigen-binding protein (ABP) that specifically binds CD151 and related subject-matter.

3. claims: 1, 15-50, 56, 58-106(all partially)

An antigen-binding protein (ABP) that specifically binds CD72 and related subject-matter.

4. claims: 2-5, 52, 55(completely); 1, 10-51, 56-106(partially)

An antigen-binding protein (ABP) that specifically binds CD84 and related subject-matter.

5. claims: 6-9, 53, 54(completely); 1, 10-51, 56-106(partially)

An antigen-binding protein (ABP) that specifically binds CD69 and related subject-matter.

6. claims: 1, 15-50, 56, 58-106(all partially)

An antigen-binding protein (ABP) that specifically binds CD109 and related subject-matter.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)
C 1 2 N 5/0783(2010.01)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)
A 6 1 K 35/17 (2025.01)
A 6 1 K 31/7068(2006.01)
A 6 1 K 31/704 (2006.01)
A 6 1 K 31/7076(2006.01)
A 6 1 K 31/706 (2006.01)
A 6 1 K 31/136 (2006.01)
A 6 1 K 33/36 (2006.01)
A 6 1 K 31/4402(2006.01)
A 6 1 K 31/5377(2006.01)
A 6 1 K 31/4439(2006.01)
A 6 1 K 31/553 (2006.01)
A 6 1 K 31/497(2006.01)
A 6 1 K 31/44 (2006.01)
A 6 1 K 31/4709(2006.01)
A 6 1 K 31/53 (2006.01)
A 6 1 K 31/496 (2006.01)

C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/08
C 0 7 K 19/00
C 0 7 K 14/705
C 1 2 N 15/62 Z
C 1 2 N 5/0783
A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 35/17
A 6 1 K 31/7068
A 6 1 K 31/704
A 6 1 K 31/7076
A 6 1 K 31/706
A 6 1 K 31/136
A 6 1 K 33/36
A 6 1 K 31/4402
A 6 1 K 31/5377
A 6 1 K 31/4439
A 6 1 K 31/553
A 6 1 K 31/497
A 6 1 K 31/44
A 6 1 K 31/4709
A 6 1 K 31/53
A 6 1 K 31/496

4 C 0 8 6
 4 C 0 8 7
 4 C 2 0 6
 4 H 0 4 5

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

ア サイエンス エッセ. エッレ. エッレ. 気付

F ターム (参考)

4B064 AG20 AG27 CA10 CA19 CC24
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 BC01 CA24
 CA25 CA44
 4C076 CC27 CC41 EE59
 4C084 AA19 NA05 ZB271 ZC021 ZC202 ZC751
 4C085 AA13 AA14 BB11 EE03
 4C086 AA01 AA02 BC17 BC39 BC50 BC64 BC73 CB05 CB22 CB27
 EA10 EA17 EA18 GA02 GA07 GA08 HA07 NA05 ZB27 ZC20 ZC75
 4C087 AA01 AA02 BB65 NA14 ZB27
 4C206 AA01 AA02 FA31 KA05 NA05 ZB27 ZC75
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA24
 FA74