

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7526097号
(P7526097)

(45)発行日 令和6年7月31日(2024.7.31)

(24)登録日 令和6年7月23日(2024.7.23)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/675(2006.01)	A 6 1 K	31/675	
請求項の数 13 (全249頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2020-546318(P2020-546318)	(73)特許権者	500429103	
(86)(22)出願日	平成31年3月5日(2019.3.5)		ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ	
(65)公表番号	特表2021-514658(P2021-514658		ティ オブ ペンシルバニア	
	A)		アメリカ合衆国ペンシルバニア州1 9 1	
(43)公表日	令和3年6月17日(2021.6.17)		0 4 , フィラデルフィア , チェスナッ	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/020729		ト ストリート 3 8 1 9 , スイート 2	
(87)国際公開番号	WO2019/173324		1 4	
(87)国際公開日	令和1年9月12日(2019.9.12)	(74)代理人	100102978	
審査請求日	令和4年3月2日(2022.3.2)		弁理士 清水 初志	
(31)優先権主張番号	62/639,321	(74)代理人	100205707	
(32)優先日	平成30年3月6日(2018.3.6)		弁理士 小寺 秀紀	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100160923	
前置審査			弁理士 山口 裕孝	
		(74)代理人	100119507	
			弁理士 刑部 俊	
		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 前立腺特異的膜抗原 C A R およびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a)標的細胞上の前立腺特異的膜抗原 (P S M A) に対して親和性を有するキメラ抗原受容体 (C A R) であって、C A R が P S M A 結合ドメインを含み、P S M A 結合ドメインが、

(i)SEQ ID NO:13もしくは14に示されるアミノ酸配列を含むマウスP S M A 結合ドメインである、または

(ii)SEQ ID NO:26、38、50、および62からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むヒトP S M A 結合ドメインである、C A R と；

(b)SEQ ID NO:115に示されるアミノ酸配列を含むドミナントネガティブ型受容体とを含む、改変された免疫細胞。

【請求項 2】

P S M A 結合ドメインが、抗体、Fab、またはs c F v である、請求項1記載の改変された細胞。

【請求項 3】

P S M A 結合ドメインがs c F v である、請求項2記載の改変された細胞。

【請求項 4】

C A R が、ヒンジ領域と、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとをさらに含み、

(a)ヒンジ領域が、CD8ヒンジ領域であり、SEQ ID NO：86に示されるアミノ酸配列を含む、

(b)膜貫通ドメインが、CD8膜貫通ドメインであり、SEQ ID NO：88に示されるアミノ酸

配列を含む、

請求項1～3のいずれか一項記載の改変された細胞。

【請求項5】

細胞内ドメインが、

(a)SEQ ID NO：92に示されるアミノ酸配列を含む4-1BBシグナル伝達ドメインと、SEQ ID NO：97または100に示されるアミノ酸配列を含むCD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む、

(b)SEQ ID NO：203に示されるアミノ酸配列を含むICOSシグナル伝達ドメインと、SEQ ID NO：97または100に示されるアミノ酸配列を含むCD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む、あるいは

(c)SEQ ID NO：95に示されるアミノ酸配列を含むバリアントICOSシグナル伝達ドメインと、SEQ ID NO：97または100に示されるアミノ酸配列を含むCD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む、

請求項4記載の改変された細胞。

【請求項6】

改変された細胞が、二重特異性抗体をさらに含み、二重特異性抗体が、第1の抗原結合ドメインと、第2の抗原結合ドメインとを含む、請求項1～5のいずれか一項記載の改変された細胞。

【請求項7】

第1の抗原結合ドメインが、CTLA4、PD-1、BTLA、TIM-3、およびTGF Rからなる群より選択される負のシグナルに結合し、第2の抗原結合ドメインが共刺激分子に結合するか、または、第2の抗原結合ドメインがCD28に結合する、請求項6記載の改変された細胞。

【請求項8】

(a)改変されたT細胞もしくは細胞傷害性Tリンパ球（CTL）である、

(b)ナチュラルキラー（NK）細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞である、

(c)自己細胞である、および/または

(d)ヒトに由来する、

請求項1～7のいずれか一項記載の改変された細胞。

【請求項9】

キメラ抗原受容体がSEQ ID NO：105のアミノ酸配列を含む、請求項1記載の改変された細胞。

【請求項10】

(a)前記CARをコードする第1の核酸配列であって、第1の核酸配列が、SEQ ID NO：106、108、110、112、114、210、および212からなる群より選択される核酸配列を含む、第1の核酸配列；ならびに

(b)前記ドミナントネガティブ型受容体をコードする第2の核酸配列であって、SEQ ID NO：116に示される核酸配列を含む、第2の核酸配列を免疫細胞内に導入する段階を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の改変された免疫細胞を生成するための方法。

【請求項11】

請求項1～9のいずれか一項記載の改変された免疫細胞を含む、それを必要とする対象におけるがんを処置するための医薬。

【請求項12】

シクロホスファミドおよび/またはフルダラビンを含むリンパ球枯渇化学療法剤と組み合わせて用いられることを特徴とする、請求項11記載の医薬。

【請求項13】

がんが、前立腺がんまたは転移性去勢抵抗性前立腺がんである、請求項11または12記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願には、米国特許法第119条(e)項(35 U.S.C. § 119(e))の下で、2018年3月6日に提出された米国特許仮出願第62/639,321号への優先権が与えられており、その出願はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

自己抗原に対する耐容性を打破することは、固形悪性腫瘍に対する免疫療法の適用への大きな課題である。内因性抗腫瘍T細胞を役立てることを目標とするワクチン戦略は、T細胞受容体(TCR)レパトリーによって制限され、中枢性トレランスの一部として胸腺内で除去されるか、または末梢性トレランスの胸腺後メカニズムにより非機能性にされる可能性がある。そのような障害を克服するための一戦略は、キメラ抗原受容体(CAR)アプローチを使用して腫瘍抗原に再方向付けされる遺伝子操作T細胞を産生することである。CAR T細胞は、特異的抗体の抗原認識ドメインをTCRのシグナル伝達ドメインと組み合わせるために、キメラ受容体遺伝子を形質導入された、遺伝的にプログラミングされた患者由来リンパ球を使用する。

10

【0003】

前立腺特異的膜抗原(PSMA)は、細胞表面に発現される膜結合型タンパク質であって、前立腺がん組織において高度に過剰発現されると報告されている。PSMAの発現は、腫瘍のグレードおよびステージの進行と直接的に相関しており、前立腺がん細胞に選択的な成長優位性を付与すると考えられている。このように、PSMAは前立腺がんに対する免疫療法の理想的な標的であり得る。

20

【0004】

がん免疫療法における別の主な課題は、標的となる腫瘍が存在する敵対的微小環境である。例えば、PD1(CD279)に結合するPDL1(CD274)などの免疫抑制性受容体リガンドは、腫瘍微小環境においてアップレギュレーションされ、T細胞活性を負に調節する。加えて、前立腺腫瘍細胞において過剰発現されるTGF- β は、免疫抑制分子として作用することができる。

30

【0005】

したがって、当技術分野において、PSMAを標的とする新規ながん免疫療法の必要性がある。本発明はこの必要性を満たすものである。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、ヒトおよびマウス前立腺特異的膜抗原(PSMA)キメラ抗原受容体(CAR) T細胞が強力な抗腫瘍活性を示すという知見に基づく。本発明はまた、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体を含むPSMA-CAR T細胞が、顕著に高まった抗腫瘍活性を示すという知見に基づく。

【0007】

40

したがって、ある特定の局面において、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原(PSMA)に対して親和性を有するキメラ抗原受容体(CAR)であって、PSMA結合ドメインを含む、CARと；ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【0008】

ある特定の例示的な態様では、PSMA結合ドメインはマウスPSMA結合ドメインである。

【0009】

ある特定の例示的な態様では、PSMA結合ドメインはヒトPSMA結合ドメインである。

【0010】

ある特定の例示的な態様では、PSMA結合ドメインは、抗体、Fab、またはscFvからな

50

る群より選択される。

【0011】

ある特定の例示的な態様では、scFvは、SEQ ID NO : 13、14、26、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。

【0012】

ある特定の例示的な態様では、CARは、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含む。

【0013】

ある特定の例示的な態様では、膜貫通ドメインは、CD8に由来する膜貫通領域を含む。

【0014】

ある特定の例示的な態様では、CD8に由来する膜貫通領域は、SEQ ID NO : 88に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0015】

ある特定の例示的な態様では、膜貫通ドメインは、CD8に由来するヒンジ領域をさらに含む。

【0016】

ある特定の例示的な態様では、CD8に由来するヒンジ領域は、SEQ ID NO : 86に示されるアミノ酸配列を含む。

【0017】

ある特定の例示的な態様では、細胞内ドメインは、4-1BBシグナル伝達ドメインと、CD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む。

20

【0018】

ある特定の例示的な態様では、細胞内ドメインは、ICOSシグナル伝達ドメインと、CD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む。

【0019】

ある特定の例示的な態様では、細胞内ドメインは、バリエーションICOSシグナル伝達ドメインと、CD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む。

【0020】

ある特定の例示的な態様では、4-1BBシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO : 92に示されるアミノ酸配列を含む。

【0021】

ある特定の例示的な態様では、ICOSシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO : 203に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0022】

ある特定の例示的な態様では、バリエーションICOSシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO : 95に示されるアミノ酸配列を含む。

【0023】

ある特定の例示的な態様では、CD3ゼータシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO : 97または100に示されるアミノ酸配列を含む。

【0024】

ある特定の例示的な態様では、ドミナントネガティブ型受容体は、負のシグナルに関連する野生型タンパク質の切断型バリエーションである。

40

【0025】

ある特定の例示的な態様では、負のシグナルに関連する野生型タンパク質の切断型バリエーションは、SEQ ID NO : 115に示されるアミノ酸配列を含む。

【0026】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、負のシグナルに関連する第1のポリペプチドに由来する第1のドメインと；正のシグナルに関連する第2のポリペプチドに由来する第2のドメインとを含む。

【0027】

ある特定の例示的な態様では、第1のドメインは、負のシグナルに関連する第1のポリペ

50

プチドの細胞外ドメインの少なくとも一部分を含み、第2のドメインは、正のシグナルに関連する第2のポリペプチドの細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む。

【0028】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、スイッチ受容体の膜貫通ドメインをさらに含む。

【0029】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体の膜貫通ドメインは、負のシグナルに関連する第1のポリペプチドの膜貫通ドメイン；または正のシグナルに関連する第2のポリペプチドの膜貫通ドメインを含む。

【0030】

ある特定の例示的な態様では、負のシグナルに関連する第1のポリペプチドは、CTLA4、PD-1、BTLA、TIM-3、およびTGF Rからなる群より選択される。

【0031】

ある特定の例示的な態様では、正のシグナルに関連する第2のポリペプチドは、CD28、ICOS、4-1BB、およびIL-12Rからなる群より選択される。

【0032】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；CD28の膜貫通ドメインの少なくとも一部分を含むスイッチ受容体の膜貫通ドメインと；CD28の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインとを含む。

【0033】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、SEQ ID NO：117に示されるアミノ酸配列を含む。

【0034】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；PD1の膜貫通ドメインの少なくとも一部分を含むスイッチ受容体の膜貫通ドメインと；CD28の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインとを含む。

【0035】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、SEQ ID NO：119に示されるアミノ酸配列を含む。

【0036】

ある特定の例示的な態様では、第1のドメインは、アミノ酸位置132にアラニン（A）からロイシン（L）への置換を含むPD1の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む。

【0037】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、SEQ ID NO：121に示されるアミノ酸配列を含む。

【0038】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、アミノ酸位置132にアラニン（A）からロイシン（L）への置換を含むPD1の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと、CD28の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインとを含む。

【0039】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、SEQ ID NO：121に示されるアミノ酸配列を含む。

【0040】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、アミノ酸位置132にアラニン（A）からロイシン（L）への置換を含むPD1の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと、4-1BBの細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインとを含む。

【0041】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、SEQ ID NO：215に示されるアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含む。

【 0 0 4 2 】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、TIM-3の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；CD28の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインとを含む。

【 0 0 4 3 】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、SEQ ID NO：127に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 4 】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、TGF Rの細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；IL12R 1の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインとを含む。

【 0 0 4 5 】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、SEQ ID NO：123に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 6 】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、TGF Rの細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；IL12R 2の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインとを含む。

【 0 0 4 7 】

ある特定の例示的な態様では、スイッチ受容体は、SEQ ID NO：125に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 8 】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含むドミナントネガティブ型受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【 0 0 4 9 】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；SEQ ID NO：213または215に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【 0 0 5 0 】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；SEQ ID NO：117または119に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【 0 0 5 1 】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；SEQ ID NO：121に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【 0 0 5 2 】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと

10

20

30

40

50

；SEQ ID NO：127に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【0053】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；SEQ ID NO：123に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【0054】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；SEQ ID NO：125に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【0055】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14に示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞を提供する。

【0056】

ある特定の例示的な態様では、改変された細胞は、二重特異性抗体を分泌する。

【0057】

ある特定の例示的な態様では、二重特異性抗体は、第1の抗原結合ドメインと、第2の抗原結合ドメインとを含む。

【0058】

ある特定の例示的な態様では、第1の抗原結合ドメインは、CTLA4、PD-1、BTLA、TIM-3、およびTGF Rからなる群より選択される負のシグナルに結合する。

【0059】

ある特定の例示的な態様では、第2の抗原結合ドメインは、共刺激分子に結合する。

【0060】

ある特定の例示的な態様では、共刺激分子はCD28である。

【0061】

ある特定の例示的な態様では、改変された細胞は改変されたT細胞である。

【0062】

ある特定の例示的な態様では、改変されたT細胞は自己細胞である。

【0063】

ある特定の例示的な態様では、改変された細胞は細胞傷害性Tリンパ球（CTL）である。

【0064】

ある特定の例示的な態様では、改変された細胞はナチュラルキラー（NK）細胞である。

【0065】

ある特定の例示的な態様では、改変された細胞は造血幹細胞または造血前駆細胞である。

【0066】

ある特定の例示的な態様では、改変された細胞は自己細胞である。

【0067】

ある特定の例示的な態様では、改変された細胞は、ヒトに由来する。

【0068】

ある特定の例示的な態様では、改変されたT細胞は、ヒトに由来する。

【0069】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）をコードする、第1の核酸配列であって、CARがPSM

10

20

30

40

50

A結合ドメインを含む、第1の核酸配列と；ドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体をコードする第2の核酸配列とを含む、単離された核酸を提供する。

【0070】

ある特定の例示的な態様では、第1の核酸配列は、SEQ ID NO：106、108、110、112、114、210、212のいずれか1つに示される核酸配列を含む。

【0071】

ある特定の例示的な態様では、第2の核酸配列は、SEQ ID NO：116、118、120、122、124、126、128、214または216のいずれか1つに示される核酸配列を含む。

【0072】

ある特定の例示的な態様では、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、リンカーにより隔てられている。

10

【0073】

ある特定の例示的な態様では、リンカーは、配列内リボソーム進入部位（IRES）をコードする核酸配列を含む。

【0074】

ある特定の例示的な態様では、リンカーは、自己切断型ペプチドをコードする核酸配列を含む。

【0075】

ある特定の例示的な態様では、自己切断型ペプチドは2Aペプチドである。

【0076】

20

ある特定の例示的な態様では、2Aペプチドは、ブタテッシュウイルス-1 2A（P2A）、ゾセアアシグナ（Thoseaasigna）ウイルス2A（T2A）、ウマ鼻炎Aウイルス2A（E2A）、および口蹄疫ウイルス2A（F2A）からなる群より選択される。

【0077】

ある特定の例示的な態様では、2AペプチドはT2Aである。

【0078】

ある特定の例示的な態様では、2AペプチドはF2Aである。

【0079】

ある特定の例示的な態様では、単離された核酸は、5'から3'方向に、第1の核酸配列と、リンカーと、第2の核酸配列とを含む。

30

【0080】

ある特定の例示的な態様では、単離された核酸は、5'から3'方向に、第2の核酸配列と、リンカーと、第1の核酸配列とを含む。

【0081】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）をコードする、第1の核酸配列であって、CARが、SEQ ID NO：180、15、27、39、51、または63のいずれか1つに示される核酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、第1の核酸配列と；SEQ ID NO：116、118、120、122、124、126、128、214または216のいずれか1つに示される核酸配列を含む、ドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体をコードする第2の核酸配列とを含む、単離された核酸を提供する。

40

【0082】

別の局面では、本開示は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）をコードする、第1の核酸配列であって、CARが、SEQ ID NO：180に示される核酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、第1の核酸配列と；SEQ ID NO：116に示される核酸配列を含む、ドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体をコードする第2の核酸配列とを含む、単離された核酸を提供する。

【0083】

ある特定の例示的な態様では、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、T2Aをコードする核酸配列を含むリンカーにより隔てられている。

50

【 0 0 8 4 】

ある特定の例示的な態様では、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、F2Aをコードする核酸配列を含むリンカーにより隔てられている。

【 0 0 8 5 】

別の局面では、本開示は、SEQ ID NO : 152 ~ 168、210、212、および217 ~ 226のいずれか1つに示される核酸配列を含む、単離された核酸を提供する。

【 0 0 8 6 】

別の局面では、本開示は、SEQ ID NO : 130、132、134、136、または138のいずれか1つに示される、二重特異性抗体をコードする核酸配列を含む、単離された核酸を提供する。

10

【 0 0 8 7 】

別の局面では、本開示は、上記態様のいずれかの単離された核酸を含む発現構築物を提供する。

【 0 0 8 8 】

ある特定の例示的な態様では、発現構築物は、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択されるウイルスベクターである。

【 0 0 8 9 】

ある特定の例示的な態様では、発現構築物はレンチウイルスベクターである。

【 0 0 9 0 】

ある特定の例示的な態様では、レンチウイルスベクターは、EF-1 プロモーターをさらに含む。

20

【 0 0 9 1 】

ある特定の例示的な態様では、レンチウイルスベクターは、rev応答エレメント (RRE) をさらに含む。

【 0 0 9 2 】

ある特定の例示的な態様では、レンチウイルスベクターは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) をさらに含む。

【 0 0 9 3 】

ある特定の例示的な態様では、レンチウイルスベクターは、cPPT配列をさらに含む。

30

【 0 0 9 4 】

ある特定の例示的な態様では、レンチウイルスベクターは、EF-1 プロモーター、rev応答エレメント (RRE)、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE)、およびcPPT配列をさらに含む。

【 0 0 9 5 】

ある特定の例示的な態様では、レンチウイルスベクターは自己不活化レンチウイルスベクターである。

【 0 0 9 6 】

別の局面では、本開示は、上記態様のいずれかの改変された免疫細胞またはその前駆細胞を生成するための方法であって、上記態様のいずれかの核酸または上記態様のいずれかの発現構築物の1つまたは複数を免疫細胞内に導入する段階を含む方法を提供する。

40

【 0 0 9 7 】

別の局面では、本開示は、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、上記態様のいずれかの改変された免疫細胞を含む治療的に有効な組成物を対象に投与する段階を含む方法を提供する。

【 0 0 9 8 】

ある特定の例示的な態様では、方法は、リンパ球枯渇化学療法を対象に投与する段階をさらに含む。

【 0 0 9 9 】

ある特定の例示的な態様では、リンパ球枯渇化学療法は、シクロホスファミドおよび /

50

またはフルダラビンの治療有効量を対象に投与することを含む。

【0100】

別の局面では、本開示は、それを必要とする対象における前立腺がんを処置する方法を提供する。この方法は、シクロホスファミドの治療有効量を含むリンパ球枯渇化学療法、および標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13に示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含むドミナントネガティブ型受容体とを含む、改変されたT細胞を、対象に投与する段階を含む。

【0101】

別の局面では、本開示は、それを必要とする対象における転移性去勢抵抗性前立腺がんを処置する方法であって、シクロホスファミドの治療有効量を対象に投与することを含むリンパ球枯渇化学療法を対象に投与する段階；ならびに標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13に示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと、SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含むドミナントネガティブ型受容体とを含む、改変されたT細胞を、対象に投与する段階を含む、方法を提供する。

10

[本発明1001]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、PSMA結合ドメインを含む、CARと；

ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞。

20

[本発明1002]

PSMA結合ドメインがマウスPSMA結合ドメインである、本発明1001の改変された細胞。

[本発明1003]

PSMA結合ドメインがヒトPSMA結合ドメインである、本発明1001の改変された細胞。

[本発明1004]

PSMA結合ドメインが、抗体、Fab、またはscFvからなる群より選択される、前記本発明のいずれかの改変された細胞。

[本発明1005]

scFvがマウスである場合、scFvが、SEQ ID NO：13または14のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含み、scFvがヒトである場合、scFvが、SEQ ID NO：26、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、前記本発明のいずれかの改変された細胞。

30

[本発明1006]

CARが、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含む、前記本発明のいずれかの改変された細胞。

[本発明1007]

膜貫通ドメインが、CD8に由来する膜貫通領域を含む、本発明1006の改変された細胞。

[本発明1008]

CD8に由来する膜貫通領域が、SEQ ID NO：88に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1007の改変された細胞。

40

[本発明1009]

膜貫通ドメインが、CD8に由来するヒンジ領域をさらに含む、本発明1006～1008のいずれかの改変された細胞。

[本発明1010]

CD8に由来するヒンジ領域が、SEQ ID NO：86に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1009の改変された細胞。

[本発明1011]

細胞内ドメインが、4-1BBシグナル伝達ドメインと、CD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む、本発明1006～1010のいずれかの改変された細胞。

50

[本発明1012]

細胞内ドメインが、ICOSシグナル伝達ドメインと、CD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む、本発明1006～1010のいずれかの改変された細胞。

[本発明1013]

細胞内ドメインが、バリエーションICOSシグナル伝達ドメインと、CD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む、本発明1006～1010のいずれかの改変された細胞。

[本発明1013]

4-1BBシグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO：92に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1011の改変された細胞。

[本発明1014]

ICOSシグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO：203に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1012の改変された細胞。

[本発明1015]

バリエーションICOSシグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO：95に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1013の改変された細胞。

[本発明1016]

CD3ゼータシグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO：97または100に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1011～1013のいずれかの改変された細胞。

[本発明1017]

ドミナントネガティブ型受容体が、負のシグナルに関連する野生型タンパク質の切断型バリエーションである、前記本発明のいずれかの改変された細胞。

[本発明1018]

負のシグナルに関連する野生型タンパク質の切断型バリエーションが、SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1017の改変された細胞。

[本発明1019]

スイッチ受容体が、
負のシグナルに関連する第1のポリペプチドに由来する第1のドメインと；
正のシグナルに関連する第2のポリペプチドに由来する第2のドメインと
を含む、本発明1001～1016のいずれかの改変された細胞。

[本発明1020]

第1のドメインが、負のシグナルに関連する第1のポリペプチドの細胞外ドメインの少なくとも一部分を含み、第2のドメインが、正のシグナルに関連する第2のポリペプチドの細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む、本発明1019の改変された細胞。

[本発明1021]

スイッチ受容体が、スイッチ受容体の膜貫通ドメインをさらに含む、前記本発明のいずれかの改変された細胞。

[本発明1022]

スイッチ受容体の膜貫通ドメインが、
負のシグナルに関連する第1のポリペプチドの膜貫通ドメイン；または
正のシグナルに関連する第2のポリペプチドの膜貫通ドメイン
を含む、本発明1021の改変された細胞。

[本発明1023]

負のシグナルに関連する第1のポリペプチドが、CTLA4、PD-1、BTLA、TIM-3、およびTGF Rからなる群より選択される、本発明1019～1022のいずれかの改変された細胞。

[本発明1024]

正のシグナルに関連する第2のポリペプチドが、CD28、ICOS、4-1BB、およびIL-12Rからなる群より選択される、本発明1019～1023のいずれかの改変された細胞。

[本発明1025]

スイッチ受容体が、
PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；

10

20

30

40

50

CD28の膜貫通ドメインの少なくとも一部分を含むスイッチ受容体の膜貫通ドメインと；
CD28の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインと
を含む、本発明1019～1022のいずれかの改変された細胞。

[本発明1026]

スイッチ受容体が、SEQ ID NO：117に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1025の
改変された細胞。

[本発明1027]

スイッチ受容体が、
PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；
PD1の膜貫通ドメインの少なくとも一部分を含むスイッチ受容体の膜貫通ドメインと；
CD28の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインと
を含む、本発明1019～1022のいずれかの改変された細胞。

10

[本発明1028]

スイッチ受容体が、SEQ ID NO：119に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1027の
改変された細胞。

[本発明1029]

第1のドメインが、アミノ酸位置132にアラニン（A）からロイシン（L）への置換を含
むPD1の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む、本発明1027の改変された細胞。

[本発明1030]

スイッチ受容体が、SEQ ID NO：121に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1029の
改変された細胞。

20

[本発明1031]

スイッチ受容体が、
アミノ酸位置132にアラニン（A）からロイシン（L）への置換を含むPD1の細胞外ドメ
インの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；
CD28の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインと
を含む、本発明1019～1022のいずれかの改変された細胞。

[本発明1032]

スイッチ受容体が、SEQ ID NO：121に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1031の
改変された細胞。

30

[本発明1033]

スイッチ受容体が、
アミノ酸位置132にアラニン（A）からロイシン（L）への置換を含むPD1の細胞外ドメ
インの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；
4-1BBの細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインと
を含む、本発明1019～1021のいずれかの改変された細胞。

[本発明1034]

スイッチ受容体が、SEQ ID NO：215に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1033の
改変された細胞。

[本発明1035]

40

スイッチ受容体が、
TIM-3の細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；
CD28の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインと
を含む、本発明1019～1021のいずれかの改変された細胞。

[本発明1036]

スイッチ受容体が、SEQ ID NO：127に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1035の
改変された細胞。

[本発明1037]

スイッチ受容体が、
TGF Rの細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；

50

IL12R 1の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインとを含む、本発明1019～1021のいずれかの改変された細胞。

[本発明1038]

スイッチ受容体が、SEQ ID NO：123に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1037の改変された細胞。

[本発明1039]

スイッチ受容体が、
TGF Rの細胞外ドメインの少なくとも一部分を含む第1のドメインと；
IL12R 2の細胞内ドメインの少なくとも一部分を含む第2のドメインと
を含む、本発明1019～1021のいずれかの改変された細胞。

10

[本発明1040]

スイッチ受容体が、SEQ ID NO：125に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1039の改変された細胞。

[本発明1041]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含むドミナントネガティブ型受容体と
を含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞。

[本発明1042]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：213または215に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体と
を含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞。

20

[本発明1043]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：117または119に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体と
を含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞。

30

[本発明1044]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：121に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体と
を含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞。

[本発明1045]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：127に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体と
を含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞。

40

[本発明1046]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：123に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体と
を含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞。

[本発明1047]

50

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13、14、16、38、50、または62のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：125に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞。

[本発明1048]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13に示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含むスイッチ受容体とを含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞。

10

[本発明1049]

二重特異性抗体をさらに含む、前記本発明のいずれかの改変された細胞。

[本発明1050]

二重特異性抗体が、第1の抗原結合ドメインと、第2の抗原結合ドメインとを含む、本発明1049の改変された細胞。

[本発明1051]

第1の抗原結合ドメインが、CTLA4、PD-1、BTLA、TIM-3、およびTGF Rからなる群より選択される負のシグナルに結合する、本発明1050の改変された細胞。

[本発明1052]

第2の抗原結合ドメインが、共刺激分子に結合する、本発明1050または1051の改変された細胞。

20

[本発明1053]

共刺激分子がCD28である、本発明1052の改変された細胞。

[本発明1054]

改変されたT細胞である、前記本発明のいずれかの改変された細胞。

[本発明1055]

自己細胞である、本発明1054の改変されたT細胞。

[本発明1056]

細胞傷害性Tリンパ球（CTL）である、本発明1001～1055のいずれかの改変された細胞。

30

[本発明1057]

ナチュラルキラー（NK）細胞である、本発明1001～1053のいずれかの改変された細胞。

[本発明1058]

造血幹細胞または造血前駆細胞である、本発明1001～1053のいずれかの改変された細胞。

[本発明1059]

自己細胞である、前記本発明のいずれかの改変された細胞。

[本発明1060]

ヒトに由来する、前記本発明のいずれかの改変された細胞。

40

[本発明1061]

ヒトに由来する、本発明1054または1055の改変されたT細胞。

[本発明1062]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）をコードする、第1の核酸配列であって、CARがPSMA結合ドメインを含む、第1の核酸配列と；

ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする第2の核酸配列と

を含む、単離された核酸。

50

[本発明1063]

第1の核酸配列が、SEQ ID NO : 106、108、110、112、114、210、212のいずれか1つに示される核酸配列を含む、本発明1062の単離された核酸。

[本発明1064]

第2の核酸配列が、SEQ ID NO : 116、118、120、122、124、126、128、214、または216のいずれか1つに示される核酸配列を含む、本発明1062または1063の単離された核酸。

[本発明1065]

第1の核酸配列および第2の核酸配列が、リンカーにより隔てられている、本発明1062～1064のいずれかの単離された核酸。

10

[本発明1066]

リンカーが、配列内リボソーム進入部位 (IRES) をコードする核酸配列を含む、本発明1065の単離された核酸。

[本発明1067]

リンカーが、自己切断型ペプチドをコードする核酸配列を含む、本発明1065の単離された核酸。

[本発明1068]

自己切断型ペプチドが2Aペプチドである、本発明1067の単離された核酸。

[本発明1069]

2Aペプチドが、ブタテッショウウイルス-1 2A (P2A)、ゾセアアシグナ (Thoseaasigna) ウイルス2A (T2A)、ウマ鼻炎Aウイルス2A (E2A)、および口蹄疫ウイルス2A (F2A) からなる群より選択される、本発明1068の単離された核酸。

20

[本発明1070]

2AペプチドがT2Aである、本発明1068の単離された核酸。

[本発明1071]

2AペプチドがF2Aである、本発明1068の単離された核酸。

[本発明1072]

5'から3'方向に、第1の核酸配列と、リンカーと、第2の核酸配列とを含む、本発明1062～1071のいずれかの単離された核酸。

[本発明1073]

30

5'から3'方向に、第2の核酸配列と、リンカーと、第1の核酸配列とを含む、本発明1062～1071のいずれかの単離された核酸。

[本発明1074]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原 (PSMA) に対して親和性を有するキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする、第1の核酸配列であって、CARが、SEQ ID NO : 180、15、27、39、51、または63のいずれか1つに示される核酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、第1の核酸配列と；

SEQ ID NO : 116、118、120、122、124、126、128、214、または216のいずれか1つに示される核酸配列を含む、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする第2の核酸配列とを含む、単離された核酸。

40

[本発明1075]

標的細胞上の前立腺特異的膜抗原 (PSMA) に対して親和性を有するキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする、第1の核酸配列であって、CARが、SEQ ID NO : 180に示される核酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、第1の核酸配列と；

SEQ ID NO : 116に示される核酸配列を含む、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする第2の核酸配列とを含む、単離された核酸。

[本発明1076]

第1の核酸配列および第2の核酸配列が、T2Aをコードする核酸配列を含むリンカーによ

50

り隔てられている、本発明1075の単離された核酸。

[本発明1077]

第1の核酸配列および第2の核酸配列が、F2Aをコードする核酸配列を含むリンカーにより隔てられている、本発明1075の単離された核酸。

[本発明1078]

SEQ ID NO: 152 ~ 168、210、212、および217 ~ 226のいずれか1つに示される核酸配列

を含む、単離された核酸。

[本発明1079]

SEQ ID NO: 130、132、134、136、または138のいずれか1つに示される、二重特異性抗体をコードする核酸配列

を含む、単離された核酸。

[本発明1080]

本発明1062 ~ 1079のいずれかの単離された核酸を含む、発現構築物。

[本発明1081]

レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択されるウイルスベクターである、本発明1080の発現構築物。

[本発明1082]

レンチウイルスベクターである、本発明1081の発現構築物。

[本発明1083]

レンチウイルスベクターが、EF-1 プロモーターをさらに含む、本発明1082の発現構築物。

[本発明1084]

レンチウイルスベクターが、rev応答エレメント (RRE) をさらに含む、本発明1082または1083の発現構築物。

[本発明1085]

レンチウイルスベクターが、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) をさらに含む、本発明1081 ~ 1084のいずれかの発現構築物。

[本発明1086]

レンチウイルスベクターが、cPPT配列をさらに含む、本発明1081 ~ 1084のいずれかの発現構築物。

[本発明1087]

レンチウイルスベクターが、EF-1 プロモーター、rev応答エレメント (RRE)、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE)、およびcPPT配列をさらに含む、本発明1082の発現構築物。

[本発明1088]

レンチウイルスベクターが、自己不活化レンチウイルスベクターである、本発明1081 ~ 1087のいずれかの発現構築物。

[本発明1089]

本発明1062 ~ 1079のいずれかの核酸または本発明1080 ~ 1088のいずれかの発現構築物の1つまたは複数を免疫細胞内に導入する段階を含む、本発明1001 ~ 1061のいずれかの改変された免疫細胞またはその前駆細胞を生成するための方法。

[本発明1090]

それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、本発明1001 ~ 1061のいずれかの改変された免疫細胞を含む組成物の治療有効量を対象に投与する段階を含む、方法。

[本発明1091]

リンパ球枯渇化学療法を対象に投与する段階をさらに含む、本発明1090の方法。

[本発明1092]

10

20

30

40

50

リンパ球枯渇化学療法が、シクロホスファミドおよび/またはフルダラビンの治療有効量を対象に投与することを含む、本発明1091の方法。

[本発明1093]

それを必要とする対象における前立腺がんを処置する方法であって、シクロホスファミドの治療有効量を対象に投与することを含む、リンパ球枯渇化学療法を対象に投与する段階；および標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13に示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含むドミナントネガティブ型受容体とを含む、改変されたT細胞を対象に投与する段階を含む、方法。

10

[本発明1094]

それを必要とする対象における転移性去勢抵抗性前立腺がんを処置する方法であって、シクロホスファミドの治療有効量を対象に投与することを含む、リンパ球枯渇化学療法を対象に投与する段階；および標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）であって、SEQ ID NO：13//に示されるアミノ酸配列を含むPSMA結合ドメインを含む、CARと；

SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含むドミナントネガティブ型受容体とを含む、改変されたT細胞を対象に投与する段階を含む、方法。

20

【0102】

本発明の前述および他の特徴および利点は、添付の図面と併せて以下の例示的な態様の詳細な説明から、より十分に理解されるであろう。本発明は図面に示される態様の厳密な配置および手段に限定されないことが、理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1A】アガロースゲル上で分離された精製IVT PSMA RNA CARおよび完全長PSMA RNAを使用した結果を図示する。

30

【図1B】ND444 T細胞内にエレクトロポレーションされた精製PSMA RNA CARを使用し、CARの発現をフローサイトメトリーによって検査した結果を示す。平均蛍光強度をグラフの下に表示する。

【図1C】PSMAの発現を図示する。精製された完全長PSMA RNAをNaIm6細胞またはK562細胞内にエレクトロポレーションした（中央および右欄）。PSMAの発現をフローサイトメトリーによって検査した。

【図1D】混合したPC3.PSMA単一細胞クローンを使用した結果を図示する。PC3.PSMA細胞（左欄）を用いて限界希釈を行い、7つの単一コロニーを単離し、プールして、新しい細胞株PC3.PSMA.7SCとした（右欄）。PSMAの発現をフローサイトメトリーによって検査した。

40

【図2A】腫瘍細胞と共にインキュベートし、CD107aアッセイを行った、様々なPSMA RNA CARを使用した結果を図示する。細胞をCD3によりゲーティングした。

【図2B】腫瘍細胞と共にインキュベートし、ルシフェラーゼに基づくCTLアッセイを行った、様々なPSMA RNA CARを使用した結果を図示する。T細胞の非存在下で腫瘍のみを有するウェル中のルシフェラーゼ活性に基づく死滅率として結果を報告する。

【図2C】腫瘍細胞と共にインキュベートし、ELISAアッセイを行った、様々なPSMA RNA CARを使用した結果を示す（IL-2、左欄；IFN- γ 、右欄）。

【図3A】初代ヒトT細胞内に構築および形質導入されたPSMA Lenti CARを使用した結果を図示する（MOI=3）。CARの発現を8日目にフローサイトメトリーによって検査した。

。

50

【図 3 B】腫瘍細胞と共にまたは腫瘍細胞の非存在下でインキュベートし、CD107aアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。細胞をCD3によりゲーティングした。12日目の結果を示す。

【図 3 C】腫瘍細胞と共にインキュベートし、ルシフェラーゼに基づくCTLアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。T細胞の非存在下で腫瘍のみを有するウェル中のルシフェラーゼ活性に基づく死滅率として結果を報告する。12日目の結果を示す。

【図 3 D】PC3細胞またはPC3.PSMA細胞と共にインキュベートし、ELISAアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を図示する（IL-2、左欄；IFN- γ 、右欄）。12日目の結果を示す。

10

【図 4 A】F2Aを介してそれぞれのヒトPSMA Lenti CARに連結され、初代ヒトT細胞内に形質導入されたスイッチ受容体PD1*PTM.CD28またはPD1.CD28を使用した結果を図示する。PD1およびCARの発現を12日目にフローサイトメトリーによって検査した。

【図 4 B】T2Aを介してそれぞれのヒトPSMA Lenti CARに連結されたドミナントネガティブ型（dn）形質転換増殖因子 受容体II（TGFR II）配列を使用した結果を図示する。7日目にdn-TGFR II-PSMA CAR形質導入T細胞をフローサイトメトリーによって分析した。

【図 4 C】PC3.PSMA細胞内にエレクトロポレーションし、13日目にPDL1の発現をフローサイトメトリーによって検査した、様々な量の精製された完全長PDL1 RNAを使用した結果を図示する。

20

【図 4 D】PC3.PSMA細胞またはPDL1をエレクトロポレーションしたPC3.PSMA細胞と共にインキュベートし、CD107aアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。細胞をCD3によりゲーティングした。14日目の結果を示す。

【図 4 E】PC3.PSMA細胞またはPDL1をエレクトロポレーションしたPC3.PSMA細胞と共にインキュベートし、CD107aアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。細胞をCD3によりゲーティングした。14日目の結果を示す。

【図 4 F】PC3.PSMA細胞またはPDL1をエレクトロポレーションしたPC3.PSMA細胞と共にインキュベートし、CD107aアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。細胞をCD3によりゲーティングした。14日目の結果を示す。

【図 4 G】PC3.PSMA細胞またはPDL1をエレクトロポレーションしたPC3.PSMA細胞と共にインキュベートし、CD107aアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。細胞をCD3によりゲーティングした。14日目の結果を示す。

30

【図 4 H】PC3.PSMA細胞と共にインキュベートし、ルシフェラーゼに基づくCTLアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。T細胞の非存在下で腫瘍のみを有するウェル中のルシフェラーゼ活性に基づく死滅率として結果を報告する。

【図 4 I】PC3.PSMA細胞またはPDL1をエレクトロポレーションしたPC3.PSMA細胞と共にインキュベートし、ELISAアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す（IL-2、上欄；IFN- γ 、下欄）。

【図 5 A】初代ヒトT細胞内に形質導入された、F2Aを介してそれぞれのヒトPSMA Lenti CARに連結されたスイッチ受容体PD1.CD28を使用した結果を示す。PD1およびCARの発現をフローサイトメトリーにより検査した。

40

【図 5 B】T2Aを介してヒト2A10 PSMA Lenti CARに連結されたドミナントネガティブ型（dn）TGFR II配列を使用した結果を示す。CAR形質導入T細胞をフローサイトメトリーにより分析した。

【図 5 C】PC3.PSMA.7SC細胞と共にインキュベートし、CD107aアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。細胞をCD3によりゲーティングした。

【図 5 D】PDL1をエレクトロポレーションしたPC3.PSMA.7SC細胞と共にインキュベートし、CD107aアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。細胞をCD3によりゲーティングした。

【図 5 E】腫瘍細胞と共にインキュベートし、ルシフェラーゼに基づくCTLアッセイを行

50

った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。T細胞の非存在下で腫瘍のみを有するウェル中のルシフェラーゼ活性に基づく死滅率として結果を報告する。

【図5 F】PC3細胞、PC3.PSMA.7SC細胞またはPDL1をエレクトロポレーションしたPC3.PSMA.PDL1細胞と共にインキュベートし、ELISAアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す（IL-2、上欄；IFN- γ 、下欄）。

【図5 G】PSMA発現についての定量PCRを用いた結果を示す。変化倍率（ $2^{-\Delta\Delta CT}$ ）をNaIm6.CBG細胞に対して正規化した。略語については表1を参照されたい。

【図5 H】腫瘍細胞または初代ヒト細胞と共にインキュベートし、CD107aアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す。細胞をCD3によりゲーティングした。

【図5 I】図5Hに示される実験からの定量データを示す。HSAEpC：ヒト小気道上皮細胞。HPMEC：ヒト肺微小血管上皮細胞。

【図5 J】初代ヒト細胞と共にインキュベートし、ELISAアッセイを行った、様々なPSMA Lenti CARを使用した結果を示す（IL-2、左欄；IFN- γ 、右欄）。HREpC：ヒト腎上皮細胞。HSAEpC：ヒト小気道上皮細胞。HPMEC：ヒト肺微小血管上皮細胞。

【図5 K】クリックビートル（click beetle）を形質導入し、マウスに注射（i.v.）した 2×10^6 個のPC3.PSMA.7SC細胞を用いた結果を示す。27日後に、 2×10^6 個のPSMA CAR-T陽性形質導入T細胞を担腫瘍マウスに注射（i.v.）した。バイオルミネセンスイメージング（BLI）を複数の時点で行った。上欄は最小平均放射輝度 5×10^5 を有し；下欄は最小平均放射輝度 3×10^5 を有する。

【図5 L】図5Kの量的平均放射輝度を図示する。

【図6】dn-TGFR II PSMA CAR構築物およびpTRPE構築物のマップの略図である。

【図7】2F5 PSMA CAR単独を形質導入されたT細胞（2F5 ICOS）または表示された様々なスイッチ受容体と一緒に2F5 PSMA CARが共形質導入されたT細胞におけるCARの発現のフローサイトメトリー検査を示す。

【図8】2F5 PSMA CAR単独を形質導入されたT細胞（2F5 ICOS）または表示された様々なスイッチ受容体と一緒に2F5 PSMA CARが共形質導入されたT細胞のPD1およびTim3発現のフローサイトメトリー検査を示す。

【図9】2F5 PSMA ICOS-CAR単独を形質導入されたT細胞（ICOS）、PSMA 41BB-CAR単独を形質導入されたT細胞（41BB）、または表示された様々なスイッチ受容体と一緒に2F5 PSMA CARが共形質導入されたT細胞におけるCD107a発現を示すグラフである。UTDは非形質導入を意味する。

【図10】2F5 PSMA ICOS-CAR単独を形質導入されたT細胞（ICOS）、PSMA 41BB-CAR単独を形質導入されたT細胞（41BB）、または表示された様々なスイッチ受容体と一緒に2F5 PSMA CARが共形質導入されたT細胞におけるグランザイムB発現を示すグラフである。UTDは非形質導入を意味する。

【図11 A】2F5 PSMA ICOS-CAR単独を形質導入されたT細胞（ICOS）、PSMA 41BB-CAR単独を形質導入されたT細胞（41BB）、または表示される様々なスイッチ受容体と一緒に2F5 PSMA CARが共形質導入されたT細胞のIL-2分泌を示す図である。NTDは非形質導入を意味する。

【図11 B】2F5 PSMA ICOS-CAR単独を形質導入されたT細胞（ICOS）、PSMA 41BB-CAR単独を形質導入されたT細胞（41BB）、または表示される様々なスイッチ受容体と一緒に2F5 PSMA CARが共形質導入されたT細胞のIFN γ 分泌を示すグラフである。UTDは非形質導入を意味する。

【図12 A】表示のように形質導入されたT細胞により処置された、PC3-PSMA.CBG誘導腫瘍を担持するNSGマウスのイメージングから得られたバイオルミネセンスの定量を示すグラフである。

【図12 B】表示のように形質導入されたT細胞により処置された、PC3-PSMA.CBG誘導腫瘍を担持するNSGマウスのイメージングから得られたバイオルミネセンスの定量を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図13】表示のように形質導入されたT細胞により処置された、PC3-PSMA.CBG誘導腫瘍を担持するNSGマウスの腫瘍サイズを示すグラフである。

【図14A】表示のように形質導入されたT細胞により処置された、PC3-PSMA.CBG誘導腫瘍を担持するNSGマウスのイメージングから得られたバイオルミネセンスの定量を示すグラフである。

【図14B】表示のように形質導入されたT細胞により処置された、PC3-PSMA.CBG誘導腫瘍を担持するNSGマウスのイメージングから得られたバイオルミネセンスの定量を示すグラフである。

【図14C】表示のように形質導入されたT細胞により処置された、PC3-PSMA.CBG誘導腫瘍を担持するNSGマウスのイメージングから得られたバイオルミネセンスの定量を示すグラフである。

10

【図14D】表示のように形質導入されたT細胞により処置された、PC3-PSMA.CBG誘導腫瘍を担持するNSGマウスのイメージングから得られたバイオルミネセンスの定量を示すグラフである。

【図14E】表示のように形質導入されたT細胞により処置された、PC3-PSMA.CBG誘導腫瘍を担持するNSGマウスのイメージングから得られたバイオルミネセンスの定量を示すグラフである。

【図14F】表示のように形質導入されたT細胞により処置された、PC3-PSMA.CBG誘導腫瘍を担持するNSGマウスのイメージングから得られたバイオルミネセンス（左）および腫瘍サイズ（右）の定量を示すグラフである。

20

【図14G】表示のように形質導入されたT細胞を上から下に腫瘍制御能の順で列挙する表である。ICOS^{YMN}Mは、WT ICOSよりも優れる。ICOSzまたはICOSzYMNと一緒の場合にPD1*BBはPD1*CD28に勝る。

【図15A】CART-PSMA-TGF Rdn細胞（dnTGFB2-T2A-Pbbz）が、42日の共培養およびPSMA発現腫瘍細胞による繰り返し刺激（矢印）にわたりCART-PSMA（Pbbz）と比べて高い抗原特異的増殖を実証したことを示すグラフである。CD19-BBz CART（19bbz）および形質導入T細胞（モック）を対照として使用した。

【図15B】CART-PSMA-TGF Rdn細胞（dnTGFB2-T2A-Pbbz）、CART-PSMA細胞（Pbbz）、および対照として使用した非形質導入細胞（モック）を用いたT細胞注射の27日後まで担腫瘍マウスにおいて検出された平均放射輝度を示すグラフである。

30

【図15C】毎週のバイオルミネセンスイメージング（BLI）評価により腫瘍の部位負荷量および全身負荷量を示す写真である。

【図16】第1相臨床試験に使用される治験スキームを説明する。

【図17】対象におけるCART-PSMA-TGF Rdn DNAのqPCRによるCAR-T細胞動態の評価を示すグラフである。対象32816-02、-04、および-05はコホート1に属し、対象32816-06、-07、および-08はコホート2に属する。

【図18A】対象32816-06におけるグレード3サイトカイン放出症候群事象と関連づけた炎症性サイトカイン（IL-6、IL-15、IL-2、IFNガンマ）およびフェリチンの顕著な増加を示すグラフである。

【図18B】対象32816-07におけるグレード3サイトカイン放出症候群事象と関連づけた炎症性サイトカイン（IL-6、IL-15、IL-2、IFNガンマ）およびフェリチンの顕著な増加を示すグラフである。

40

【図19】コホート1およびコホート2の患者の間の前立腺特異抗原（PSA）応答を示すグラフである。

【図20】図20Aは、注入の1日後に対象において表れたサイトカイン放出症候群を示す、対象32816-07におけるPSMA-TGF RDN CARTの発現（コピー数/ゲノムDNAのugを単位とする左のy軸）およびIL-6のレベル（pg/mlを単位とする右のy軸）を示すグラフである。図20Bは、サイトカイン放出症候群の管理が、C反応性タンパク質のレベル（CRP；mg/Lを単位とする左のy軸）および血清フェリチンのレベル（ng/Lを単位とする右のy軸）により測定された一過性のPSA低下を伴ったことを示すグラフである。

50

【図 2 1】各対象において経時的に検出されたPSMA陽性循環腫瘍細胞（CTC）の数を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0104】

詳細な説明

本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を含む改変された免疫細胞、例えばT細胞およびNK細胞、またはその前駆細胞、例えば、改変されたT細胞のための組成物および方法を提供する。いくつかの態様では、CARは、前立腺特異的膜抗原（PSMA）結合ドメイン（PSMA-CAR）を含み、標的細胞、例えば前立腺がん細胞上のPSMAに対して親和性を有する。いくつかの態様では、改変された免疫細胞は、マウスPSMA結合ドメインを含むPSMA-CARを含む。いくつかの態様では、改変された免疫細胞は、ヒトPSMA結合ドメインを含むPSMA-CARを含む。そのような遺伝子操作された細胞を産生する方法もまた提供される。いくつかの態様では、細胞および組成物は、養子細胞療法、例えば養子腫瘍免疫療法に使用することができる。

【0105】

いくつかの態様では、提供される免疫細胞は、腫瘍微小環境中の免疫細胞の有効性を高めるために追加的な受容体、例えばドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体を含む。そのような細胞は、腫瘍微小環境中の免疫抑制シグナルの効果を変更または低減することが可能である。本発明の改変された免疫細胞は、T細胞の活性化およびT細胞の機能の負の制御を行うことができる阻害受容体またはリガンドのアップレギュレーションおよび/または発現と対抗する。例えば、T細胞上および/または腫瘍微小環境中のある特定の免疫チェックポイントタンパク質、例えばPD-1またはPD-L1の発現は、養子T細胞療法の効力および有効性を低減する可能性がある。例えば、T細胞上および/または腫瘍微小環境中のTGF- β の発現は、養子T細胞療法の効力および有効性を低減する可能性がある。そのような免疫抑制シグナルはそれ以外に、養子細胞療法に関連してある特定の望ましいエフェクター機能を損なう場合がある。腫瘍細胞および/または腫瘍微小環境中の細胞は、多くの場合に免疫抑制タンパク質、例えばPD-L1をアップレギュレーションし、免疫抑制シグナルを送達する。そのような免疫抑制タンパク質はまた、腫瘍微小環境中のT細胞上、例えば腫瘍浸潤T細胞上でアップレギュレーションされる場合があり、それは、抗原受容体を経由するシグナル伝達またはある特定の他の活性化シグナルに続いて起こる可能性がある。そのような事象は、遺伝子操作された免疫細胞（例えば、PSMAを標的とする）T細胞が、そのようなタンパク質を発現する他の細胞の近くに存在する場合などに疲弊表現型を獲得する一因になる場合があり、それが今度は低減した機能性をもたらし可能性がある。したがって、本発明の改変された免疫細胞は、従来の養子細胞療法の有効性および治療成績への障壁であるT細胞の疲弊および/またはT細胞の持続の欠如に対処するものである。

【0106】

本発明は、PSMA CARおよびがんの処置におけるその使用を含む。ある特定の態様では、本発明は、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体を有するヒトPSMA CARを含む。がん免疫療法に関する主要な妨げの1つは、腫瘍微小環境である。免疫抑制分子、例えば、PD-1のアップレギュレーションは、T細胞活性を負に調節する。

【0107】

本発明は、PSMA-CARと、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体とを含むT細胞が、腫瘍微小環境中の免疫抑制分子の作用を回避することが可能であり、継続する強力な抗腫瘍活性を提供するという知見に基づく。

【0108】

本開示に記載される方法は、本明細書において開示される特定の方法および/または実験条件が変動し得るので、そのような方法および条件に限定されないことを理解されたい。また、本明細書において使用される用語は、特定の態様だけを説明することを目的とし、限定的であることは意図しないことも理解されたい。

10

20

30

40

50

【0109】

さらに、本明細書に記載される実験は、特に示さないかぎり、当業者の技能の範囲内で従来の分子細胞生物学的および免疫学的技法を使用する。そのような技法は、熟練の作業者に周知であり、文献に十分に説明されている。例えば、すべての補遺を含むAusubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008)、MR GreenおよびJ. SambrookによるMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)ならびにHarlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2nd edition)を参照されたい。

【0110】

A. 定義

特に定義されないかぎり、本明細書において用いられる科学用語および技術用語は、当業者によって広く理解されている意味を有する。何らかの潜在的意味不確定が発生した場合、本明細書において提供される定義が、任意の辞書または外部の定義よりも優先される。状況により特に必要とされないかぎり、単数の用語は複数を含むものとし、複数の用語は単数を含むものとする。特に述べないかぎり、「または」の使用は「および/または」を意味する。「含んでいる (including)」という用語ならびに「含む (includes)」および「含んだ (included)」などの他の形態の使用は、非限定的である。

【0111】

一般的に、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の化学およびハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法は周知であり、当技術分野において広く使用される。本明細書において提供される方法および技法は、特に示さないかぎり一般的に当技術分野において周知の従来法に従って、本明細書全体にわたり引用され、論じられる様々な一般的でより具体的な参考文献に記載されるように行われる。酵素反応および精製技法は、当技術分野において広く成し遂げられる、または本明細書に記載されるように製造業者の規格に従って行われる。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、および医薬化学に関連して使用される命名法ならびにその検査手技および技法は、周知であり、当技術分野において広く使用されるものである。化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、および送達ならびに患者の処置のために標準的な技法が使用される。

【0112】

本開示がより容易に理解され得るように、選ばれた用語を以下に定義する。

【0113】

「1つの (a)」および「1つの (an)」という冠詞は、本明細書においてその冠詞の文法的対象物の1つまたは1つよりも多く (すなわち、少なくとも1つ) をいうように用いられる。例として、「1つの (an) 要素」は、1つの要素または1つよりも多い要素を意味する。

【0114】

量、時間的持続期間などのような測定可能な値をいう場合に本明細書において用いられる「約」は、特定された値から $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 1\%$ 、なおより好ましくは $\pm 0.1\%$ のばらつきを包含するものとするが、これはそのようなばらつきが、開示された方法を実施する上で妥当なためである。

【0115】

本明細書において用いられる「活性化」とは、検出可能な細胞増殖を誘導するように十分に刺激されたT細胞の状態のことを指す。活性化はまた、誘導されたサイトカイン産生、および検出可能なエフェクター機能に関連することができる。「活性化T細胞」という用語は、特に、細胞分裂を起こしているT細胞のことを指す。

【0116】

本明細書において使用される場合、疾患を「緩和する」は、疾患の1つまたは複数の症状の重症度を低減することを意味する。

10

20

30

40

50

【0117】

本明細書において用いられる「抗体」という用語は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子をいう。抗体は、天然供給源または組み換え供給源に由来する無傷の免疫グロブリンであることができ、無傷の免疫グロブリンの免疫応答性部分（例えば、抗体の結合フラグメント）であることができる。抗体は、典型的には、免疫グロブリン分子の四量体である。本発明における抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)2、ならびに一本鎖抗体（scFv）およびヒト化抗体を含む、種々の形態で存在し得る（Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426）。

10

【0118】

「抗体フラグメント」という用語は、無傷の抗体の一部をいい、無傷の抗体の抗原決定可変領域をいう。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')2およびFvフラグメント、直鎖状抗体、scFv抗体、ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられるが、それに限定されるわけではない。

【0119】

本明細書において用いられる「抗体重鎖」は、天然に存在する立体配座にある全抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち大きい方をいう。

【0120】

20

本明細書において用いられる「抗体軽鎖」は、天然に存在する立体配座にある全抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち小さい方をいう。 および 軽鎖は、2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプをいう。

【0121】

本明細書において用いられる用語「合成抗体」とは、例えば、本明細書において記述されるバクテリオファージによって発現される抗体のような、組み換えDNA技法を用いて生成された抗体を意味する。この用語はまた、抗体タンパク質またはその抗体を規定するアミノ酸配列を発現する抗体コードDNA分子の合成によって生成された抗体であって、そのDNA配列またはアミノ酸配列が、利用可能でかつ当技術分野において周知であるDNA配列またはアミノ酸配列の合成技術を用いて得られた抗体も意味するとみなされるべきである。

30

【0122】

本明細書において用いられる「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を引き起こす分子と定義される。この免疫応答には、抗体産生、または特異的免疫適格細胞の活性化のいずれかまたは両方が含まれ得る。当業者は、事実上、すべてのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原として働くことができることを理解するであろう。

【0123】

さらに、抗原は、組み換えDNAまたはゲノムDNAに由来することができる。当業者は、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、それゆえ、本明細書においてその用語が用いられる通りの「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列のみによってコードされる必要はないことを理解するであろう。本発明が、1つよりも多い遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含むが、これに限定されるわけではないこと、およびこれらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発するために様々な組み合わせで配置されることは、容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要はまったくないことを理解するであろう。抗原が生物学的試料から生成、合成または由来することができることは、容易に明らかである。そのような生物学的試料は、組織試料、腫瘍試料、細胞または生体液を含むことができるが、それに限定されるわけではない。

40

【0124】

本明細書において用いられる場合、「自己」という用語は、後にその個体に再び導入さ

50

れる、同じ個体に由来する任意の材料をいうよう意図される。「同種」とは、同じ種の異なる動物に由来する任意の材料をいう。「異種」とは、異なる種の動物に由来する任意の材料をいう。

【0125】

本明細書において用いられる「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、免疫細胞上で発現されるように操作され、抗原と特異的に結合する人工T細胞受容体をいう。CARは、養子細胞移入を伴う療法として用いられ得る。T細胞を患者から取り出し、抗原または特定の形態の抗原に特異的な受容体を発現するように改変する。いくつかの態様では、CARは、選ばれた標的、例えば前立腺特異的膜抗原を発現している細胞に特異性を有する。CARはまた、細胞内活性化ドメイン、膜貫通ドメイン、および腫瘍関連抗原結合領域を含む細胞外ドメインも含み得る。

10

【0126】

「共刺激リガンド」は、この用語が本明細書で使用される場合、抗原提示細胞（例えば、人工APC（aAPC）、樹状細胞、B細胞など）上の分子であって、T細胞上の同族共刺激分子と特異的に結合し、それによって、例えばペプチドが負荷されたMHC分子とのTCR/CD3複合体の結合によって提供される一次シグナルに加えて、増殖、活性化、分化などを非限定的に含むT細胞応答を媒介するシグナルを提供する、分子を含む。共刺激リガンドは、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド（ICOS-L）、細胞間接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンホトキシンベータ受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体と結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3と特異的に結合するリガンドを含むことができるが、それに限定されるわけではない。共刺激リガンドはまた、とりわけ、非限定的に、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3などのT細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体、およびCD83と特異的に結合するリガンドも包含する。

20

【0127】

「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、非限定的に増殖などのT細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受容体が含まれるが、それに限定されるわけではない。

30

【0128】

「共刺激シグナル」は、本明細書において使用される場合、TCR/CD3の連結などの一次シグナルとの組み合わせで、T細胞増殖および/または鍵となる分子のアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションを導くシグナルを指す。

【0129】

「疾患」は、動物が恒常性を維持できず、疾患が改善されなければその動物の健康が悪化し続ける、動物の健康状態である。対照的に、動物における「障害」は、その動物が恒常性を維持できるが、その動物の健康状態が障害のない場合よりも好ましくない健康状態である。未処置のまま放置されても、障害が必ずしも動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすとは限らない。

40

【0130】

用語「ダウンレギュレーション」は、本明細書において使用される場合、1つまたは複数の遺伝子の遺伝子発現の減少または消失を指す。

【0131】

「有効量」または「治療的有效量」は、本明細書において互換的に用いられ、特定の生物学的結果を達成するのに有効な、または治療的もしくは予防的利益をもたらす、本明細書において記述される化合物、製剤、材料または組成物の量を指す。そのような結果には、哺乳動物に投与した場合に、本発明の組成物の非存在下で検出される免疫応答と比較して検出可能なレベルの免疫抑制または耐容性を引き起こす量が含まれ得るが、それ

50

に限定されるわけではない。免疫応答は、おびたしい数の当技術分野において認識されている方法によって容易に評価することができる。当業者は、本明細書において投与される組成物の量が、変動すること、そして、処置されている疾患または状態、処置されている哺乳動物の年齢および健康および身体の状態、疾患の重症度、投与されている特定の化合物などの多数の要因に基づいてこれを容易に決定できることを理解するであろう。

【0132】

「コードする」とは、定義されたヌクレオチド（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）配列または定義されたアミノ酸配列のいずれかを有する、生物学的過程において他のポリマーおよび高分子の合成のための鋳型として働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAのようなポリヌクレオチドにおける特定のヌクレオチド配列の固有の特性ならびにそれに起因する生物学的特性をいう。したがって、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によって細胞または他の生体系においてタンパク質が産生される場合、タンパク質をコードする。mRNA配列と同一であり通常は配列表に示されるヌクレオチド配列であるコード鎖も、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として用いられる非コード鎖も共に、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードするということができる。

【0133】

本明細書において用いられる場合、「内因性」とは、生物、細胞、組織もしくは系の内部に由来するか、またはそれらの内部で産生される、任意の材料をいう。

【0134】

用語「エピトープ」は、本明細書において使用される場合、免疫応答を誘発し、B細胞応答および/またはT細胞応答を誘導することができる、抗原上の小化学分子として定義される。抗原は、1つまたは複数のエピトープを有することができる。ほとんどの抗原は、多くのエピトープを有する；すなわち、これらは多価である。一般に、エピトープは、おおよそ約10アミノ酸および/または糖のサイズである。好ましくは、エピトープは、約4~18アミノ酸、より好ましくは約5~16アミノ酸、さらにより最も好ましくは6~14アミノ酸、より好ましくは約7~12、そして、最も好ましくは約8~10アミノ酸である。一般には、分子の特定の直鎖状配列よりも全体の三次元構造が抗原の特異性の主な基準であること、それゆえ、これによってあるエピトープが別のエピトープと区別されることを、当業者は理解する。本開示に基づいて、本発明のペプチドは、エピトープであることができる。

【0135】

本明細書において用いられる場合、「外因性」という用語は、生物、細胞、組織もしくは系の外部から導入されるか、またはそれらの外部で産生される、任意の材料をいう。

【0136】

本明細書において用いられる「増大する」という用語は、T細胞の数の増加のように、数が増加することをいう。一態様では、エクスピボで増大したT細胞は、培養物中に当初存在している数と比べて数が増加する。別の態様では、エクスピボで増大したT細胞は、培養物中の他の細胞型と比べて数が増加する。本明細書において用いられる「エクスピボ」という用語は、生物（例えば、ヒト）から取り出され、生物の外側で（例えば、培養皿、試験管、またはバイオリアクタ中で）繁殖させた細胞をいう。

【0137】

本明細書において用いられる「発現」という用語は、そのプロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳と定義される。

【0138】

「発現ベクター」とは、発現されるべきヌクレオチド配列に機能的に連結された発現制御配列を含む組み換えポリヌクレオチドを含むベクターをいう。発現ベクターは、発現のために十分なシス作用性エレメントを含み；発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、またはインピトロ発現系において供給されることができる。発現ベクターには、組み換えポリヌクレオチドを組み入れたコスミド、プラスミド（例えば、裸のもの、またはリポソーム中に含まれるもの）ならびにウイルス（例えば、センダイウイルス、レンチ

10

20

30

40

50

ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような、当技術分野において公知のすべてのものが含まれる。

【0139】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含んだキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント(Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列のような)である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性および容量を有するマウス、ラットまたはウサギのような非ヒト種(ドナー抗体)のCDR由来の残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、持ち込まれたCDRまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含むことができる。これらの改変は、抗体の性能をさらに洗練および最適化するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、かつFR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つの、および典型的には2つの、可変ドメインの実質的にすべてを含む。また、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを含む場合がある。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992を参照されたい。「完全ヒト」は、分子全体がヒト起源であるか、または抗体のヒト形態と同一のアミノ酸配列からなる、抗体などの免疫グロブリン、またはその結合フラグメントを指す。

【0140】

本明細書において用いられる「免疫グロブリン」または「Ig」という用語は、抗体として機能するタンパク質のクラスと定義される。このタンパク質のクラスに含まれる5つのメンバーは、IgA、IgG、IgM、IgDおよびIgEである。IgAは、唾液、涙液、乳汁、消化管分泌物、ならびに気道および泌尿生殖路の粘液分泌物のような、身体分泌物中に存在する主要な抗体である。IgGは、最も一般的な循環抗体である。IgMは、ほとんどの対象で一次免疫応答において産生される主な免疫グロブリンである。これは凝集反応、補体結合および他の抗体応答において最も効率的な免疫グロブリンであり、細菌およびウイルスに対する防御において重要である。IgDは抗体機能が判明していない免疫グロブリンであるが、抗原受容体として働き得る。IgEは、アレルゲンに対する曝露時に肥満細胞および好塩基球からのメディエータの放出を引き起こすことによって即時型過敏症を媒介する免疫グロブリンである。

【0141】

本明細書において用いられる「同一性」とは、2つのポリマー分子間の、特に2つのポリペプチド分子間のような2つのアミノ酸分子間のサブユニット配列の同一性をいう。2つのアミノ酸配列が同じ位置に同じ残基を有する場合;例えば、2つのポリペプチド分子の各々における位置がアルギニンによって占有されているなら、それらはその位置で同一である。2つのアミノ酸配列がアライメントにおいて同じ位置に同じ残基を有する同一性または程度は、百分率として表現されることが多い。2つのアミノ酸配列間の同一性は、一致しているまたは同一である位置の数の一次関数である;例えば、2つの配列における位置の半分(例えば、10アミノ酸長のポリマーにおける5つの位置)が同一であるなら、2つの配列は50%同一であり;位置の90%(例えば、10中9)が一致しているまたは同一であるなら、2つのアミノ酸配列は90%同一である。

【0142】

本明細書において用いられる「免疫応答」という用語は、リンパ球が抗原分子を異物と同定し、抗体の形成を誘導し、かつ/またはリンパ球を活性化して抗原を除去する場合に起きる、抗原に対する細胞応答と定義される。

【0143】

10

20

30

40

50

「免疫抑制」という用語は、本明細書において免疫応答全体を低減することを指すために使用される。

【0144】

「単離された」とは、天然の状態から変えられたまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離されて」いないが、その天然状態の共存物質から部分的にまたは完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離されて」いる。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができ、または例えば、宿主細胞のような、非天然環境で存在することができる。

【0145】

本明細書において用いられる「レンチウイルス」とは、レトロウイルス科 (Retroviridae) ファミリーの属をいう。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染できるという点で、レトロウイルスの中でも独特である；それらはかなりの量の遺伝情報を宿主細胞のDNA中に送達することができるため、それらは遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIVおよびFIVはすべて、レンチウイルスの例である。レンチウイルスに由来するベクターは、インビボで有意なレベルの遺伝子移入を達成するための手段を与える。

【0146】

本明細書において用いられる用語「改変された」とは、本発明の分子または細胞の変化した状態または構造を意味する。分子は化学的に、構造的に、および機能的になど、多くの方法で改変され得る。細胞は、核酸の導入によって改変され得る。

【0147】

本明細書において用いられる用語「モジュレートする」とは、処置もしくは化合物の非存在下での対象における応答のレベルと比較して、および/または他の点では同一であるが処置を受けていない対象における応答のレベルと比較して、対象における応答のレベルの検出可能な増加または減少を媒介することを意味する。この用語は、対象、好ましくはヒトにおいて、天然のシグナルもしくは応答を攪乱させ、かつ/またはそれに影響を与え、それにより有益な治療応答を媒介することを包含する。

【0148】

本発明の文脈において、一般的に存在する核酸塩基に関する以下の略語が用いられる。「A」はアデノシンをいい、「C」はシトシンをいい、「G」はグアノシンをいい、「T」はチミジンをいい、そして「U」はウリジンをいう。

【0149】

特別の定めのないかぎり、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重型である、かつ同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という語句はまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、型によってはイントロンを含み得るかぎり、イントロンを含み得る。

【0150】

「機能的に連結された (operably linked)」または「機能的に連結された (operatively linked)」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間の、後者の発現を結果的にもたらず機能的連結をいう。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列との機能的関係の下で配置されている場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と機能的に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与えるなら、プロモーターはコード配列に機能的に連結されている。

【0151】

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖と定義される。さらに、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書において用いられる核酸およびポリヌクレオチドは互換的である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、それらは単量体「ヌクレオチド」に加水分解することができるという一般知識を有する。単量体ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解することができる。本

10

20

30

40

50

明細書において用いられる場合、ポリヌクレオチドには、非限定的に、組み換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCRなどを用いた組み換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングを含む、当技術分野において利用可能な任意の手段により、ならびに合成手段により得られるすべての核酸配列が含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0152】

本明細書において用いられる場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、互換的に用いられ、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基で構成される化合物をいう。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成することができるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって相互につなが合わされた2つまたはそれよりも多いアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書において用いられる場合、この用語は、例えば、当技術分野において一般的にはペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーともいわれる短鎖と、当技術分野において一般にタンパク質といわれる長鎖の両方をいい、その中には多くのタイプがある。「ポリペプチド」には、とりわけ、例えば、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組み換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0153】

抗体に関して本明細書において用いられる用語「特異的に結合する」とは、特異的抗原を認識するが、試料中の他の分子を実質的に認識またはそれと結合しない抗体を意味する。例えば、1つの種由来の抗原に特異的に結合する抗体が、1つまたは複数の種由来のその抗原にも結合する場合がある。しかし、そのような異種間反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。別の例において、抗原に特異的に結合する抗体が、その抗原の異なる対立遺伝子型にも結合する場合がある。しかし、そのような交差反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語を、抗体、タンパク質またはペプチドと第2の化学種との相互作用に関連して用いて、相互作用が化学種上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味することができる；例えば、抗体は、タンパク質全体ではなく特定のタンパク質構造を認識し、それに結合する。抗体がエピトープ「A」に特異的であるなら、標識された「A」およびその抗体を含む反応物中にエピトープAを含む分子（または遊離した、標識されていないA）が存在することにより、その抗体に結合した標識されたAの量が低減するであろう。

【0154】

「刺激」という用語は、刺激分子（例えば、TCR/CD3複合体）がその同族リガンドと結合し、それによって、非限定的に、TCR/CD3複合体を介するシグナル伝達のような、シグナル伝達事象を媒介することにより誘導される一次応答を意味する。刺激は、TGF-ベータのダウンレギュレーション、および/または細胞骨格構造の再編成などのような、ある特定の分子の発現の変化を媒介することができる。

【0155】

「刺激分子」とは、この用語が本明細書において用いられる場合、抗原提示細胞上に存在する同族刺激リガンドと特異的に結合する、T細胞上の分子を意味する。

【0156】

本明細書において用いられる「刺激リガンド」は、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）に存在する場合、T細胞上の同族結合パートナー（本明細書において「刺激分子」といわれる）と特異的に結合でき、それによって、活性化、免疫応答の開始、増殖などを含むが、それに限定されるわけではない、T細胞による一次応答を媒介するリガンドを意味する。刺激リガンドは当技術分野において周知であり、とりわけ、ペプチドが負荷されたMHCクラスI分子、抗CD3抗体、スーパーアゴニスト抗CD28抗体、およびス

ーパーアゴニスト抗CD2抗体を包含する。

【0157】

「対象」という用語は、免疫応答を誘発することができる生物（例えば、哺乳動物）を含むよう意図される。本明細書において用いられる「対象」または「患者」は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物であり得る。非ヒト哺乳動物には、例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコおよびマウス哺乳動物のような、家畜およびペットが含まれる。好ましくは、対象はヒトである。

【0158】

「標的部位」または「標的配列」とは、結合が起きるのに十分な条件の下で結合分子が特異的に結合し得る核酸の一部を規定するゲノム核酸配列をいう。

10

【0159】

本明細書において用いられる「治療的」という用語は、処置および/または予防を意味する。治療効果は、疾患状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。

【0160】

「移植片」は、移植されることになる生体適合性の格子またはドナーの組織、臓器または細胞のことをいう。移植片の例には、皮膚細胞または組織、骨髄ならびに心臓、脾臓、腎臓、肺および肝臓などの実質臓器が含まれ得るが、それに限定されるわけではない。移植片はまた、宿主に投与されることになる任意の材料を指すことができる。例えば、移植片は、核酸またはタンパク質を指すことができる。

【0161】

20

本明細書において用いられる「トランスフェクションされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入される過程をいう。「トランスフェクションされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外因性核酸でトランスフェクションされた、形質転換された、または形質導入されたものである。この細胞には初代対象細胞およびその子孫が含まれる。

【0162】

疾患を「処置する」とは、この用語が本明細書において用いられる場合、対象が被っている疾患または障害の少なくとも1つの徴候または症状の頻度または重症度を低減することを意味する。

【0163】

30

「ベクター」は、単離された核酸を含み、かつ単離された核酸を細胞の内部に送達するために使用できる材料の組成物である。直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と結び付いたポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを含むが、それに限定されるわけではない、多数のベクターが当技術分野において公知である。したがって、「ベクター」という用語は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。この用語はまた、例えばポリリシン化合物、リポソームなどのような、細胞内への核酸の移入を容易にする非プラスミド性および非ウイルス性の化合物を含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例としては、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられるが、それに限定されるわけではない。

40

【0164】

範囲：本開示の全体を通じて、本発明の様々な局面を範囲の形式で提示することができる。範囲の形式の記述は、単に便宜および簡略化のためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限と解釈されるべきではないことが理解されるべきである。したがって、範囲の記述は、可能なすべての部分範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示したものとみなされるべきである。例えば、1～6のような範囲の記述は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などのような部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を具体的に開示したものとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0165】

50

B. キメラ抗原受容体

本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を含む改変された免疫細胞またはその前駆細胞、例えば、改変されたT細胞のための組成物および方法を提供する。したがって、いくつかの態様では、免疫細胞は、CARを発現するように遺伝的に改変されている。本発明のCARは、抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、ヒンジドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。

【0166】

抗原結合ドメインは、細胞における発現のために、どちらも本明細書のどこか他に記載される、膜貫通ドメインまたは細胞内ドメインなどのCARの別のドメインに機能的に連結される場合がある。一態様では、抗原結合ドメインをコードする第1の核酸配列は、膜貫通ドメインをコードする第2の核酸に機能的に連結され、細胞内ドメインをコードする第3の核酸配列にさらに機能的に連結される。

【0167】

本明細書に記載される抗原結合ドメインは、本明細書に記載される膜貫通ドメインのいずれか、本明細書に記載される細胞内ドメインもしくは細胞質ドメインのいずれか、または本発明のCARに含まれ得る本明細書に記載されるその他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。本発明の対象のCARはまた、本明細書に記載されるような Spacer ドメインを含み得る。いくつかの態様では、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインのそれぞれは、リンカーにより隔てられている。

【0168】

抗原結合ドメイン

CARの抗原結合ドメインは、タンパク質、糖質、および糖脂質を含む特異的標的抗原に結合するためのCARの細胞外領域である。いくつかの態様では、CARは、標的細胞上の標的抗原に対する親和性を含む。標的抗原は、標的細胞に関連する任意の種類のタンパク質、またはそのエピトープを含む場合がある。例えば、CARは、標的細胞の特定の疾患状態を指し示す、標的細胞上の標的抗原に対する親和性を含む場合がある。

【0169】

例示的な態様では、標的細胞抗原は、前立腺特異的膜抗原（PSMA）である。PSMAは、細胞表面に発現される膜結合タンパク質であって、前立腺がん組織に高度に過剰発現されると報告されている。PSMAの発現は、腫瘍のグレードおよびステージの進行と直接相関しており、前立腺がん細胞に選択的な成長優位性を付与すると考えられている。このように、本開示の例示的なCARは、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有する。

【0170】

本明細書に記載されるように、標的細胞上の特異的標的抗原に対して親和性を有する本開示のCARは、標的特定の結合ドメインを含む場合がある。いくつかの態様では、標的特定の結合ドメインは、マウス標的特定の結合ドメインであり、例えば、標的特定の結合ドメインはマウス起源である。いくつかの態様では、標的特定の結合ドメインはヒト標的特定の結合ドメインであり、例えば、標的特定の結合ドメインはヒト起源である。例示的な態様では、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有する本開示のCARは、PSMA結合ドメインを含む場合がある。いくつかの態様では、PSMA結合ドメインはマウスPSMA結合ドメインであり、例えば、PSMA結合ドメインはマウス起源である。いくつかの態様では、PSMA結合ドメインはヒトPSMA結合ドメインであり、例えば、PSMA結合ドメインはヒト起源である。

【0171】

いくつかの態様では、本開示のCARは、1つまたは複数の標的細胞上の1つまたは複数の標的抗原に対して親和性を有する場合がある。いくつかの態様では、CARは、標的細胞上の1つまたは複数の標的抗原に対して親和性を有する場合がある。そのような態様では、CARは二重特異性CAR、または多重特異性CARである。いくつかの態様では、CARは、1つまたは複数の標的抗原に対する親和性を付与する1つまたは複数の標的特定の結合ドメインを含む。いくつかの態様では、CARは、同じ標的抗原に対する親和性を付与する1つま

たは複数の標的特異的結合ドメインを含む。例えば、同じ標的抗原に対して親和性を有する1つまたは複数の標的特異的結合ドメインを含むCARは、標的抗原の別個のエピトープと結合することもできる。複数の標的特異的結合ドメインがCARに存在する場合、結合ドメインは、直列に配置される場合があり、リンカーペプチドにより隔てられる場合もある。例えば、2つの標的特異的結合ドメインを含むCARにおいて、結合ドメインは、オリゴペプチドもしくはポリペプチドリンカー、Fcヒンジ領域、または膜ヒンジ領域を経由して単一のポリペプチド鎖に相互に共有結合される。

【0172】

いくつかの態様では、抗原結合ドメインは、抗体、抗原結合フラグメント(Fab)、および一本鎖可変フラグメント(scFv)からなる群より選択される。いくつかの態様では、本発明のPSMA結合ドメインは、PSMA特異的抗体、PSMA特異的Fab、およびPSMA特異的scFvからなる群より選択される。一態様では、PSMA結合ドメインはPSMA特異的抗体である。一態様では、PSMA結合ドメインはPSMA特異的Fabである。一態様では、PSMA結合ドメインはPSMA特異的scFvである。

10

【0173】

抗原結合ドメインは、抗原に結合する任意のドメインを含むことができ、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、非ヒト抗体、およびそれらの任意のフラグメントを含む場合があるが、それに限定されるわけではない。いくつかの態様では、抗原結合ドメイン部分は、哺乳動物抗体またはそのフラグメントを含む。抗原結合ドメインの選択は、標的細胞の表面に存在する抗原の種類および数に依存する場合がある。

20

【0174】

本明細書に用いられる用語「一本鎖可変フラグメント」または「scFv」は、(例えば、マウスまたはヒトの)免疫グロブリンの重鎖(VH)および軽鎖(VL)の可変領域が共有結合して、VH::VLヘテロ二量体を形成した融合タンパク質である。重鎖(VH)および軽鎖(VL)は、直接的に繋がっているか、またはVHのN末端をVLのC末端と、もしくはVHのC末端をVLのN末端と接続するペプチドコードリンカーによって繋がっている。いくつかの態様では、抗原結合ドメイン(例えば、PSMA結合ドメイン)は、N末端からC末端方向に、VH-リンカー-VLの配置を有するscFvを含む。いくつかの態様では、抗原結合ドメイン(例えば、PSMA結合ドメイン)は、N末端からC末端方向に、VL-リンカー-VHの配置を有するscFvを含む。当業者は、本発明への使用に適した配置を選択することが可能であろう。

30

【0175】

リンカーは、通常、可動性のためにグリシンに富むだけでなく、可溶性のためにセリンまたはトレオニンに富む。リンカーは、細胞外抗原結合ドメインの重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを連結することができる。リンカーの非限定的な例は、Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008)および国際公開公報第2014/087010号に開示されており、それらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:1)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:2)、および(GGGGS)_n(SEQ ID NO:3) [配列中、nは少なくとも1の整数を表す]などのグリシンセリン(GS)リンカーを含むが、それに限定されるわけではない様々なリンカー配列が当技術分野において公知である。例示的なリンカー配列は、

40

GGSG (SEQ ID NO:4), GGSGG (SEQ ID NO:5), GSGSG (SEQ ID NO:6),

GSGGG (SEQ ID NO:7), GGGSG (SEQ ID NO:8), GSSSG (SEQ ID NO:9), GGGGS

(SEQ ID NO:10), GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:11)

などを含むが、それに限定されるわけではないアミノ酸配列を含むことができる。当業者は、本発明への使用に適したリンカー配列を選択することが可能であろう。一態様では、本発明の抗原結合ドメイン(例えば、PSMA結合ドメイン)は、重鎖可変領域(VH)およ

50

び軽鎖可変領域 (VL) を含み、その際、VHおよびVLは、核酸配列
GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCT (SEQ ID
NO:12)

によってコードされ得るアミノ酸配列
GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:11)

を有するリンカー配列により隔てられている。

【 0 1 7 6 】

定常領域の除去およびリンカーの導入にもかかわらず、scFvタンパク質は、本来の免疫グロブリンの特異性を保持する。一本鎖Fvポリペプチド抗体は、Hustonら (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988) によって記載されるようなVHおよびVLコード配列を含む核酸から発現させることができる。米国特許第5,091,513号、同第5,132,405号および同第4,956,778号; ならびに米国特許出願公開第20050196754号および同第20050196754号も参照されたい。阻害活性を有するアンタゴニスト性scFvが、記載されている (例えば、Zhao et al., Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40を参照されたい)。刺激活性を有するアゴニスト性scFvが記載されている (例えば、Peter et al., J Biol Chem 2003 278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66を参照されたい)。

【 0 1 7 7 】

本明細書に用いられる「Fab」は、抗原に結合するが、一価であってFc部分を有しない抗体構造のフラグメントを指し、例えば、酵素パパイニンによって消化された抗体は、2つのFabフラグメントおよび1つのFcフラグメント (例えば、重 (H) 鎖定常領域; 抗原に結合しないFc領域) をもたらす。

【 0 1 7 8 】

本明細書に用いられる「F(ab')₂」は、IgG抗体全体のペプシン消化によって生成される抗体フラグメントを指し、その際、このフラグメントは2つの抗原結合(ab') (二価) 領域を有し、各(ab')領域は、抗原との結合のためのH鎖の一部および軽 (L) 鎖という2つの別々のアミノ酸鎖がS-S結合によって連結されたものを含み、残ったH鎖部分は一緒に連結している。「F(ab')₂」フラグメントは、2つの個別のFab'フラグメントに分割することができる。

【 0 1 7 9 】

いくつかの態様では、抗原結合ドメインは、CARが最終的に使用される種と同じ種に由来する場合がある。例えば、ヒトにおける使用のために、CARの抗原結合ドメインは、本明細書の他の箇所に記載されるようなヒト抗体またはそのフラグメントを含む場合がある。

【 0 1 8 0 】

例示的な態様では、本発明のPSMA-CARは、PSMA結合ドメイン、例えば、PSMA特異的scFvを含む。

【 0 1 8 1 】

(a) マウスPSMA結合ドメインおよびそのバリエーション

ある特定の態様では、本発明のPSMA-CARは、マウスPSMA結合ドメインまたはそのバリエーションを含む。

【 0 1 8 2 】

ある特定の態様では、本発明のPSMA-CARは、非ヒトPSMA抗体 (例えば、マウスまたはラットPSMA抗体) のPSMA結合ドメイン、またはそのバリエーションを含む。当技術分野

10

20

30

40

50

において周知のように、マウスまたは他の非ヒト抗体は、非ヒト（例えば、マウス）にヒトPSMAまたはそのフラグメントを免疫処置することによって産生される場合がある。

【 0 1 8 3 】

一態様では、PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：

```
ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGC
CGCCAGACCTGGATCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCA
CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGG
TACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTG
ATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG
TGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAACGTTTCAGTCTGAAGACT
TGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCCGGTGCT
GGGACCATGCTGGACCTGAAAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGGCGGAGGAAGT
TCTGGCGGAGGCAGCGAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAGCTCGTGA
AGCCTGGAACAAGCGTGCGGATCAGCTGCAAGACCAGCGGCTACACCTTCAC
CGAGTACACCATCCACTGGGTCAAGCAGTCCCACGGCAAGAGCCTGGAGTGG
ATCGGCAATATCAACCCCAACAACGGCGGCACCACCTACAACCAGAAGTTTCG
AGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGG
AACTGCGGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGTGCCGCCGG
TTGGAACCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAAACCCTGACAGTGTCTAGC
```

(SEQ ID NO:15)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

```
MALPVTALLLPLALLHAARPGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTA
VDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYF
CQQYNSYPLTFGAGTMLDLKGGGGSGGGGSSGGGSEVQLQQSGPELVKPGTSV
RISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVD
KSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:14)
```

中に含まれるマウスJ591 PSMA結合ドメインである。

【 0 1 8 4 】

PSMAとの結合性を保ちながらのマウスJ591 PSMA結合ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：14中に含まれるマウスJ591 PSMA結合ドメインのアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むマウスJ591 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：14に示されるアミノ酸配列中に含まれるマウスJ591 PSMA結合ドメインである。

【 0 1 8 5 】

いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：15中に含まれるマウスJ591 PSMA結合ドメインのコード配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるマウスJ591 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：15に示される核酸配列中に含まれるコード配列によってコードされるマウスJ591 PSMA結合ドメインである。

10

【0186】

例示的な態様では、本発明のPSMA-CARは、PSMA結合ドメイン、例えば、PSMA特異的scFvを含む。一態様では、PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACA
GGGTCAGCATCATCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTG
GTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCA
CTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATTAACGTTTCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTG
TCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCATGCTGGACC
TGAAAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGAAGTTCTGGCGGAGGCAGCG
AGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAGCTCGTGAAGCCTGGAACAAGCGT
GCGGATCAGCTGCAAGACCAGCGGCTACACCTTCACCGAGTACACCATCCAC
TGGGTCAAGCAGTCCACGCGCAAGAGCCTGGAGTGGATCGGCAATATCAACC
CCAACAACGGCGGCACCACTACAACCAGAAGTTTCGAGGACAAGGCCACCCT
GACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTGCAGGAGCCTGACC
AGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGTGCCGCCGGTTGGAAGTTCGACTACT
GGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO:180)

20

30

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
HTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKG
GGGSGGGGSSGGGSEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSH
GKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYY
CAAGWNFDYWQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:13)

40

を含むマウスJ591 PSMA結合ドメインである。

【0187】

ヒトPSMAとの結合性を保ちながらのマウスJ591 PSMA結合ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：13に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なく

50

とも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むマウスJ591 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 13に示されるアミノ酸配列を含むマウスJ591 PSMA結合ドメインである。

【0188】

いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 180に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるマウスJ591 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 180に示される核酸配列によってコードされるマウスJ591 PSMA結合ドメインである。

【0189】

一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：
GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACA
GGGTCAGCATCATCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTG
GTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCA
CTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATTACTAACGTTTCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTG
TCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCATGCTGGACC
TGAAA (SEQ ID NO:17)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIWASTR
HTGVPRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLK
(SEQ ID NO:16)

を含む軽鎖可変領域を含む。

【0190】

ヒトPSMAの結合性へのそのの寄与を保ちながらの軽鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 16に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 16に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0191】

いくつかの態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 17に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも

94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 17に示される核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。

【0192】

一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、以下に示されるアミノ酸配列：
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
HTGVPDRFTGSGSGTDFTLAITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIKR
(SEQ ID NO:181)

10

を含む、NCBI GenBank配列データベースID: CCA78125.1に記載される軽鎖可変領域を含む。

【0193】

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 181に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 181に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。マウスJ591 PSMA結合ドメインの軽鎖可変領域は、3つの軽鎖相補性決定領域(CDR)を含む。本明細書に用いられる「相補性決定領域」または「CDR」は、特異的抗原に結合する抗原結合分子の可変鎖の領域を指す。したがって、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列KASQDVGTAVD (SEQ ID NO: 18) によって表されるCDR1; アミノ酸配列WASTRHT (SEQ ID NO: 19) によって表されるCDR2; およびアミノ酸配列QQYNSYPLT (SEQ ID NO: 20) によって表されるCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。PSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖のCDRへの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 18に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 19に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 20に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、3つの前記軽鎖可変領域のCDRを含む軽鎖可変領域を含む。

20

30

40

【0194】

一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：

50

GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAGCTCGTGAAGCCTGGAACAAGC
GTGCGGATCAGCTGCAAGACCAGCGGCTACACCTTACCGAGTACACCATCC
ACTGGGTCAAGCAGTCCCACGGCAAGAGCCTGGAGTGGATCGGCAATATCAA
CCCCAACAACGGCGGCACCACCTACAACCAGAAGTTTCGAGGACAAGGCCACC
CTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTGCAGGAGCCTGA
CCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGTGCCGCCGGTTGGAAGTTCGACTA
CTGGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO:22)

10

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列

EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNN
GGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGGQ
TTLTVSS (SEQ ID NO:21)

を含む重鎖可変領域を含む。

【0195】

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:21に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:21に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

20

【0196】

いくつかの態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:22に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる重鎖可変領域を含む。一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:22に示される核酸配列によってコードされる重鎖可変領域を含む。

30

【0197】

一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、以下に示されるアミノ酸配列：
EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNN
GGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGGQ
TTLTVSS (SEQ ID NO:182)

40

を含む、NCBI GenBank配列データベースID: CCA78124.1に記載される重鎖可変領域を含む。

【0198】

PSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、マウスJ591 PSMA結合ド

50

メインは、SEQ ID NO : 182に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 182に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0199】

マウスJ591 PSMA結合ドメインの重鎖可変領域は、3つの重鎖相補性決定領域 (CDR) を含む。したがって、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列GYTFTEYTIH (SEQ ID NO : 23) によって表されるCDR1 ; アミノ酸配列NINPNNGGTTYNQKFED (SEQ ID NO:24)

10

によって表されるCDR2 ; およびアミノ酸配列GWNFDY (SEQ ID NO : 25) によって表されるCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖のCDRへの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 23に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 24に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 25に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。一態様では、マウスJ591 PSMA結合ドメインは、3つの前記重鎖可変領域のCDRを含む重鎖可変領域を含む。

20

30

【0200】

一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 16および21に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むマウスJ591 PSMA結合ドメインである。

40

【0201】

一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 181および182に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むマウスJ591 PSMA結合ドメインである。

50

【 0 2 0 2 】

(b) ヒト化PSMA結合ドメイン

ある特定の態様では、本発明のPSMA-CARは、非ヒトPSMA抗体、またはそのバリエーションもしくはフラグメントのPSMA結合ドメインのヒト化バリエーションを含む。ある特定の例示的な態様では、PSMA CARは、ヒトPSMAと結合するマウスJ591抗体のヒト化バリエーションを含む。マウス抗体をヒト化するための方法は、当技術分野において周知である。

【 0 2 0 3 】

一態様では、PSMA結合ドメインはヒト化PSMA特異的結合ドメインである。ある特定の態様では、PSMA結合ドメインはヒト化J591 PSMA結合ドメインである。ある特定の態様では、PSMA結合ドメインは、それらの開示が参照によりその全体が本明細書に組み入れられるPCT公報番号WO2017212250A1およびWO2018033749A1に開示される重鎖可変領域および軽鎖可変領域のいずれかを含む。例えば、本発明のPSMA結合ドメインは、本明細書に開示される重鎖可変領域および軽鎖可変領域のいずれかを含むscFvを含むことができる。したがって、本発明のPSMA-CARは、WO2017212250A1およびWO2018033749A1に開示されるような、ヒトPSMAと結合するマウスJ591抗体のヒト化バリエーションを含む。

10

【 0 2 0 4 】

ある特定の態様では、本発明のPSMA結合ドメインは、表19に示されるもののうちいずれかの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むことができる。

【 0 2 0 5 】

20

(表19) ヒト化PSMA結合性重鎖可変配列および軽鎖可変配列

30

40

50

重鎖可変領域の配列	軽鎖可変領域の配列
VH コンセンサス配列 SEQ ID NO:183 EVQLVQSGX ₁ EX ₂ KKPGASVKVSCCKX ₃ SGYTFTEYTIHWVX ₄ QAX ₅ GKGLEWIG NINPNX ₆ GGTTYNQKFEDRX ₇ TX ₈ TVD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAG WNFQYWGQGTTTVTVSS 配列中 : X ₁ は、AまたはPであり ; X ₂ は、VまたはLであり ; X ₃ は、AまたはTであり ; X ₄ は、RまたはKであり ; X ₅ は、PまたはHであり ; X ₆ は、NまたはQであり ; X ₇ は、VまたはAであり ; かつ X ₈ は、IまたはLである。	VL コンセンサス配列 SEQ ID NO:184 DIX ₁ MTQSPSX ₂ LSASVGDRVITITCKASQDV GTAVDWYQQKPGQAPKLLIWASTRHTG VPDRFX ₃ GSFGSGTDFTLTISRLQX ₄ EDFAX ₅ Y X ₆ CQQYNSYPLTFGQGTGX ₇ VDIK 配列中 : X ₁ は、QまたはVであり ; X ₂ は、TまたはFであり ; X ₃ は、SまたはTであり ; X ₄ は、PまたはSであり ; X ₅ は、VまたはDであり ; X ₆ は、YまたはFであり ; かつ X ₇ は、KまたはMである。
SEQ ID NO:185 EVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKTSG YTFTEYTIHWVKQAHGKGLEWIGNIN PNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFD YWGQGTTTVTVSS	SEQ ID NO:186 DIVMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDVG TAVDWYQQKPGQAPKLLIWASTRHTGV PDRFTGSGSGTDFTLTISRLQSEDFADYFCQ QYNSYPLTFGQGTMTVDIK
SEQ ID NO:187 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSG YTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNIN PNNGGTTYNQKFEDRATITVDKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFD YWGQGTTTVTVSS	SEQ ID NO:188 DIVMTQSPSTLSASVGDRVITITCKASQDVG TAVDWYQQKPGQAPKLLIWASTRHTGV PDRFTGSGSGTDFTLTISRLQSEDFADYFCQ QYNSYPLTFGQGTCKVDIK
SEQ ID NO:189 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSG YTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNIN PNNGGTTYNQKFEDRATITVDKSTST	SEQ ID NO:190 DIVMTQSPSTLSASVGDRVITITCKASQDVG TAVDWYQQKPGQAPKLLIWASTRHTGV PDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFADYYCQ

10

20

30

40

50

AYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFD YWGQGTTVTVSS	QYNSYPLTFGQGTKVDIK
SEQ ID NO:191 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNI NPNNGGTTYNQKFEDRVTTITVDKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNF DYWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO:192 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITCKASQDVG TAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHTGV PDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQ QYNSYPLTFGQGTKVDIK
SEQ ID NO:193 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNI NPNQGGTTYNQKFEDRVTTITVDKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNF DYWGQGTTVTVSS	
VH コンセンサス配列 SEQ ID NO:194 EVQLVQSGX ₁ EX ₂ KKPGASVKVSCKX ₃ SGYTFTEYTIHWVX ₄ QAX ₅ GKGLEWIG NINPNX ₆ GGTTYNQKFEDRX ₇ TX ₈ TVD KSTSTAYMELSSX ₉ RSEDTAVYYCAX ₁ 0X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ DYWGQGTTVTVSS 配列中： X ₁ は、AまたはPであり； X ₂ は、VまたはLであり； X ₃ は、AまたはTであり； X ₄ は、RまたはKであり； X ₅ は、PまたはHであり； X ₆ は、NまたはQであり； X ₇ は、VまたはAであり； X ₈ は、IまたはLであり； X ₉ は、LまたはPであり；かつ X ₁₀ ～X ₁₄ は、は、AYWLF、GGWTF、 またはGAWTMである。	VL コンセンサス配列 SEQ ID NO:195 DIX ₁ MTQSPSX ₂ LSASVGDRVTTITCKASQDV GTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHTG VPDRFX ₃ GSGSGTDFTLTISRLQX ₄ EDFAX ₅ Y X ₆ CQQX ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ LTFGQGTGX ₁₂ VDIK 配列中： X ₁ は、QまたはVであり； X ₂ は、TまたはFであり； X ₃ は、SまたはTであり； X ₄ は、PまたはSであり； X ₅ は、VまたはDであり； X ₆ は、YまたはFであり； X ₇ ～X ₁₁ は、FTRYPまたはYNAYSであり；かつ X ₁₂ は、KまたはMである。
SEQ ID NO:196 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNI NPNNGGTTYNQKFEDRVTTITVDKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAAYWLF DYWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO:197 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITCKASQDVG TAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHTGV PDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQ QYNSYPLTFGQGTKVDIK
SEQ ID NO:198 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNI NPNNGGTTYNQKFEDRVTTITVDKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAGGWTF	SEQ ID NO:199 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITCKASQDVG TAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHTGV PDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQ QFTRYPLTFGQGTKVDIK

10

20

30

40

50

DYWGQGTTVTVSS	
SEQ ID NO:200	SEQ ID NO:201
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNI NPNNGGTTYNQKFEDRVITITVDKSTS TAYMELSSLRSED TAVYYCAGAWTM DYWGQGTTVTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVG TAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHTGV PDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQ QYNAYSLTFGQGTKVDIK
SEQ ID NO:202	
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNI NPNNGGTTYNQKFEDRVITITVDKSTS TAYMELSSPRSED TAVYYCAAGWNF DYWGQGTTVTVSS	

10

【 0 2 0 6 】

(c) ヒトPSMA結合ドメイン

ある特定の態様では、本発明のPSMA-CARは、ヒトPSMA抗体のPSMA結合ドメインまたはそのバリエーションを含む。一態様では、PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：

20

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCCGCAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT
GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA
TGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
GTTATATCATATGATGGAAACAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGTCCTCC
TGGGGATCGAGGTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCA
CGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCTGGGTGG
CGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGC
TTTAGCCTGGTATCAGCAGAAATCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTTTG
ATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAA
CTTATTACTGTCAACAGTTTAAACAGTTATCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACC
AAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:27)

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYA
MHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCARAVPWGSRYYYYGMDVWGQGT VTVVSSGGGGSGGGGSGG
GGSAILTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKSGKAPKLLIFDASS
LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
(SEQ ID NO:26)

を含むヒト1C3 PSMA結合ドメインである。

10

【0207】

ヒトPSMAとの結合性を保ちながらのヒト1C3 PSMA結合ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 26に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヒト1C3 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 26に示されるアミノ酸配列を含むヒト1C3 PSMA結合ドメインである。

20

【0208】

いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 27に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるヒト1C3 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 27に示される核酸配列によってコードされるヒト1C3 PSMA結合ドメインである。

30

【0209】

一態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：
CCGCAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGT
CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATAT
CATATGATGGAAACAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAC
CATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGTCCCCTGGGGAT
CGAGGTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC
CGTCTCCTCA (SEQ ID NO:29)

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
PQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVIS
YDGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAVPWGSR
YYYYGMDVWGQGT VTVVSS (SEQ ID NO:28)

50

を含む重鎖可変領域を含む。

【0210】

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

10

【0211】

いくつかの態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:29に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる重鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:29に示される核酸配列によってコードされる重鎖可変領域を含む。

20

【0212】

ヒト1C3 PSMA結合ドメインの重鎖可変領域は、3つの重鎖相補性決定領域(CDR)を含む。したがって、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列SYAMH (SEQ ID NO:30)によって表されるCDR1;アミノ酸配列VISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO:31)

によって表されるCDR2;およびアミノ酸配列AVPWGSRYYYYGMDV (SEQ ID NO:32)

30

によって表されるCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。PSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖のCDRへの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:30に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:31に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:32に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。一態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、3つの前記重鎖可変領域のCDRを含む重鎖可変領域を含む。

40

50

【 0 2 1 3 】

一態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：
GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGT
ATCAGCAGAAATCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTTTGATGCCTCCAGT
TTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATT
TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT
CAACAGTTTAACAGTTATCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA
TCAAA (SEQ ID NO:34)

10

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAWYQKSGKAPKLLIFDASSLESG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID
NO:33)

を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 1 4 】

20

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 33に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 33に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【 0 2 1 5 】

いくつかの態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 34に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 34に示される核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。

40

【 0 2 1 6 】

ヒト1C3 PSMA結合ドメインの軽鎖可変領域は、3つの軽鎖相補性決定領域 (CDR) を含む。したがって、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列RASQGISSALA (SEQ ID NO : 35) によって表されるCDR1 ; アミノ酸配列DASSLES (SEQ ID NO : 36) によって表されるCDR2 ; およびアミノ酸配列QQFNSYPLT (SEQ ID NO : 37) によって表されるCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。PSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖のCDRへの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 35に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なく

50

とも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:36に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO:37に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。一態様では、ヒト1C3 PSMA結合ドメインは、3つの前記軽鎖可変領域のCDRを含む軽鎖可変領域を含む。

【0217】

一態様では、PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCC
CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTA
ACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGG
GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCC
AGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAG
CAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGGCAAACTGGT
TTCCTCTGGTCCTCCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGCCATCC
AGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAACA
GAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCTATGGATCTGGGACAGATTTCACTCT
CACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGT
TTAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
(SEQ ID NO:39)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWI
GWVRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKA
SDTAMYYCARQTGFLWSSDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQS
PSSLSASVGDRVTTICRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS
GYGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:38)

を含むヒト2A10 PSMA結合ドメインである。

【0218】

ヒトPSMAとの結合性を保ちながらのヒト2A10 PSMA結合ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 38に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヒト2A10 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 38に示されるアミノ酸配列を含むヒト2A10 PSMA結合ドメインである。

10

【0219】

いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 39に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるヒト2A10 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 39に示される核酸配列によってコードされるヒト2A10 PSMA結合ドメインである。

20

【0220】

一態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：
CCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAG
TCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTAACTGGAT
CGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATC
TATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCAC
CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTG
AAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGGCAAACCTGGTTTCCTCTG
GTCCTCCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID
NO:41)

30

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
PEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYP
GDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQTGLWSSDL
WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:40)

40

を含む重鎖可変領域を含む。

【0221】

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 40に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配

50

列を含む重鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 40に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0222】

いくつかの態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 41に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる重鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 41に示される核酸配列によってコードされる重鎖可変領域を含む。

10

【0223】

ヒト2A10 PSMA結合ドメインの重鎖可変領域は、3つの重鎖相補性決定領域 (CDR) を含む。したがって、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列SNWIG (SEQ ID NO : 42) によって表されるCDR1 ; アミノ酸配列IIYPGDS DTRYSPSFQG (SEQ ID NO:43)

によって表されるCDR2 ; およびアミノ酸配列QTGFLWSSDL (SEQ ID NO : 44) によって表されるCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖のCDRへの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 42に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 43に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 44に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。一態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、3つの前記重鎖可変領域のCDRを含む重鎖可変領域を含む。

20

30

【0224】

一態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列 :
GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGT
ATCAACAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAG
TTTGGAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCTATGGATCTGGGACAGAT
TTCATCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTG
TCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG
ATCAAA (SEQ ID NO:46)

40

50

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFSGYGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO:45)

を含む軽鎖可変領域を含む。

【0225】

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 45に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 45に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0226】

いくつかの態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 46に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 46に示される核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。

【0227】

ヒト2A10 PSMA結合ドメインの軽鎖可変領域は、3つの軽鎖相補性決定領域 (CDR) を含む。したがって、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列CRASQDISSAL (SEQ ID NO: 47) によって表されるCDR1; アミノ酸配列YDASSLES (SEQ ID NO: 48) によって表されるCDR2; およびアミノ酸配列CQQFNSYPLT (SEQ ID NO: 49) によって表されるCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。PSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖のCDRへの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 47に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 48に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 49に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を

含み得る。一態様では、ヒト2A10 PSMA結合ドメインは、3つの前記軽鎖可変領域のCD Rを含む軽鎖可変領域を含む。

【0228】

一態様では、PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCC
CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTACCAGCA
ACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG
GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCC
AGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAA
CAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAACTGGT
TTCCTCTGGTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCC
AGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCA
GAAACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC
TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG
TTTAATAGTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAA
TCAAA (SEQ ID NO:51)

10

20

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWI
GWVRQMPGKGLEWMGIHYPGDSDFTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWNSLKA
SDTAMYYCARQTGFLWSFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQS
PSSLSASVGDRVTTICRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKI (SEQ ID
NO:50)

30

を含むヒト2F5 PSMA結合ドメインである。

【0229】

ヒトPSMAとの結合性を保ちながらのヒト2F5 PSMA結合ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：50に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヒト2F5 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：50に示されるアミノ酸配列を含むヒト2F5 PSMA結合ドメインである。

40

【0230】

50

いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 51に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるヒト2F5 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 51に示される核酸配列によってコードされるヒト2F5 PSMA結合ドメインである。

【0231】

一態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：
CCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAG
TCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGAT
CGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATC
TATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCAC
CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGCCTG
AAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAACTGGTTTCCTCTG
GTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID
NO:53)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
PEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYP
GDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWNSLKASDTAMYYCARQTGFLWSFD
LWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:52)

を含む重鎖可変領域を含む。

【0232】

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 52に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 52に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0233】

いくつかの態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 53に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる重鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 53に示される核酸配列によってコ

ードされる重鎖可変領域を含む。

【 0 2 3 4 】

ヒト2F5 PSMA結合ドメインの重鎖可変領域は、3つの重鎖相補性決定領域（CDR）を含む。したがって、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列SNWIG（SEQ ID NO：54）によって表されるCDR1；アミノ酸配列
IIYPGDS DTRYSPSFQG（SEQ ID NO:55）

によって表されるCDR2；およびアミノ酸配列QTGFLWSFDL（SEQ ID NO：56）によって表されるCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。PSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖のCDRへの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：54に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：55に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：56に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。一態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、3つの前記重鎖可変領域のCDRを含む重鎖可変領域を含む。

【 0 2 3 5 】

一態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：
GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAG
TTTGGAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
TTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTG
TCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG
ATCAAAATCAAA（SEQ ID NO:58）

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKIK（SEQ
ID NO:57）

を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 3 6 】

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：57に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%

、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 57に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0237】

いくつかの態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 58に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 58に示される核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。

【0238】

ヒト2F5 PSMA結合ドメインの軽鎖可変領域は、3つの軽鎖相補性決定領域(CDR)を含む。したがって、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列RASQDISSALA (SEQ ID NO : 59) によって表されるCDR1 ; アミノ酸配列DASSLES (SEQ ID NO : 60) によって表されるCDR2 ; およびアミノ酸配列QQFNSYPLT (SEQ ID NO : 61) によって表されるCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。PSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖のCDRへの許容されるパリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 59に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 60に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 61に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。一態様では、ヒト2F5 PSMA結合ドメインは、3つの前記軽鎖可変領域のCDRを含む軽鎖可変領域を含む。

【0239】

一態様では、PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列 :

10

20

30

40

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGATCAGAGGTGAAAAAGCCC
GGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAACTA
CTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGG
ATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCA
GGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTATCTGCAGTGGAGC
AGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCCCCGGGTATA
CCAGCAGTTGGACTTCTTTTGA TACTG GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTG
AAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGA
GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTA
CCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAC
AGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT
TCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT
CAGCAGCGTAGCAACTGGCCCCCTATTCAC TTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGG
ATATCAAA (SEQ ID NO:63)

10

20

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGSEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWI
GWVRQMPGKGLEWMGIHYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKA
SDTAMYYCASP GYTSSWTSFDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLT
QSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQR SNWPLFTFGPGTKVDIK (SEQ ID
NO:62)

30

を含むヒト2C6 PSMA結合ドメインである。

【0240】

ヒトPSMAとの結合性を保ちながらのヒト2C6 PSMA結合ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：62に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヒト2C6 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：62に示されるアミノ酸配列を含むヒト2C6 PSMA結合ドメインである。

40

【0241】

いくつかの態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：63に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくと

50

も90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるヒト2C6 PSMA結合ドメインである。一態様では、PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 63に示される核酸配列によってコードされるヒト2C6 PSMA結合ドメインである。

【0242】

一態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：
CCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGATCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGT
CTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAACTACTGGATC
GGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCT
ATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACC
ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTATCTGCAGTGGAGCAGCCTGA
AGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCCCCGGGTATACCAGCAG
TTGGACTTCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO:65)

10

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
PEVQLVQSGSEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYP
GDSDFRYSPSFQGVVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCASPGYTSSWTSF
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:64)

20

を含む重鎖可変領域を含む。

【0243】

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 64に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 64に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

30

【0244】

いくつかの態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 65に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる重鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO: 65に示される核酸配列によってコードされる重鎖可変領域を含む。

40

【0245】

ヒト2C6 PSMA結合ドメインの重鎖可変領域は、3つの重鎖相補性決定領域(CDR)を含む。したがって、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列TNYWI (SEQ ID NO

50

：66)によって表されるCDR1；アミノ酸配列
GIHYPGDSDDTRYSPSFQG (SEQ ID NO:67)

によって表されるCDR2；およびアミノ酸配列SPGYTSSWTS (SEQ ID NO：68)によって表されるCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。PSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの重鎖のCDRへの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：66に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：67に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：68に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。一態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、3つの前記重鎖可変領域のCDRを含む重鎖可変領域を含む。

【0246】

一態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、以下に示される核酸配列：
GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGT
ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAA
CAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTG
TCAGCAGCGTAGCAACTGGCCCCTATTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGG
ATATCAAA (SEQ ID NO:70)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPLFTFGPGTKVDIK (SEQ
ID NO:69)

を含む軽鎖可変領域を含む。

【0247】

ヒトPSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖可変領域の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO：69に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、

少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 69に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0248】

いくつかの態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 70に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。一態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 70に示される核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域を含む。

10

【0249】

ヒト2C6 PSMA結合ドメインの軽鎖可変領域は、3つの軽鎖相補性決定領域(CDR)を含む。したがって、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、アミノ酸配列CRASQSVSSYL (SEQ ID NO : 71) によって表されるCDR1 ; アミノ酸配列YDASNRAT (SEQ ID NO : 72) によって表されるCDR2 ; およびアミノ酸配列CQQRSNWPLFT (SEQ ID NO : 73) によって表されるCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。PSMAの結合性へのその寄与を保ちながらの軽鎖のCDRへの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 71に示されるCDR1アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 72に示されるCDR2アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、SEQ ID NO : 73に示されるCDR3アミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。一態様では、ヒト2C6 PSMA結合ドメインは、3つの前記軽鎖可変領域のCDRを含む軽鎖可変領域を含む。

20

30

【0250】

膜貫通ドメイン

本発明のCAR (例えば、PSMA-CAR) は、CARの抗原結合ドメインをCARの細胞内ドメインと接続する膜貫通ドメインを含み得る。対象のCARの膜貫通ドメインは、細胞 (例えば、免疫細胞またはその前駆細胞) の形質膜を貫通することが可能な領域である。膜貫通ドメインは、細胞膜、例えば、真核生物細胞膜内への挿入のためのものである。いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、CARの抗原結合ドメインと細胞内ドメインとの間に挟まれている。

40

【0251】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、CARにおけるドメインの1つまたは複数に自然に関連している。いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、このようなドメインと、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとの結合を回避するように、選択または1つもしくは複数のアミノ酸置換によって修飾して、受容体複合体の他のメンバーとの

50

相互作用を最小限にすることができる。

【0252】

膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来する場合がある。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質、例えば、I型膜貫通タンパク質に由来し得る。供給源が合成である場合、膜貫通ドメインは、細胞膜へのCARの挿入を容易にする任意の人工配列、例えば、人工疎水性配列であり得る。本発明における特定の使用の膜貫通ドメインの例は、非限定的に、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、Toll様受容体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8およびTLR9に由来する（すなわち、これらの少なくとも膜貫通領域を含む）膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、合成であり得るが、この場合、それは、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含むであろう。好ましくは、合成膜貫通ドメインの各末端で、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンの3つ組が見出されるであろう。

10

【0253】

本明細書に記載の膜貫通ドメインを、本明細書に記載の抗原結合ドメインのいずれか、本明細書に記載の細胞内ドメインのいずれか、または対象のCARに含まれ得る本明細書に記載の他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。

【0254】

20

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、ヒンジ領域をさらに含む。本発明の対象のCARはまた、ヒンジ領域も含み得る。CARのヒンジ領域は、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置する親水性領域である。いくつかの態様では、このドメインは、CARにふさわしいタンパク質フォールディングを容易にする。ヒンジ領域は、CARの任意の成分である。ヒンジ領域は、抗体のFcフラグメント、抗体のヒンジ領域、抗体のCH2領域、抗体のCH3領域、人工的なヒンジ配列またはそれらの組み合わせより選択されるドメインを含み得る。ヒンジ領域の例は、非限定的に、CD8aヒンジ、3つのグリシン (Gly) ほどの小ささであり得るポリペプチドから構成される人工的なヒンジ、ならびにIgG (ヒトIgG4など) のCH1ドメインおよびCH3ドメインを含む。

【0255】

30

いくつかの態様では、本開示の対象のCARは、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインと接続してこれを次いで細胞内ドメインに接続する、ヒンジ領域を含む。ヒンジ領域は、好ましくは、抗原結合ドメインが標的細胞上の標的抗原を認識してこれに結合することを支援することが可能である（例えば、Hudecek et al., Cancer Immunol. Res. (2015) 3(2): 125-135を参照されたい）。いくつかの態様では、ヒンジ領域は、可動性ドメインであり、その結果、抗原結合ドメインが、腫瘍細胞などの細胞上の標的抗原の特異的な構造および密度を最適に認識する構造を有することが可能となる（Hudecekら、上記）。そのヒンジ領域の可動性は、ヒンジ領域が多くの異なる立体配座をとることを許容する。

【0256】

いくつかの態様では、ヒンジ領域は、免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域である。いくつかの態様では、ヒンジ領域は、受容体に由来するヒンジ領域ポリペプチド（例えば、CD8由来ヒンジ領域）である。

40

【0257】

ヒンジ領域は、約4アミノ酸～約50アミノ酸、例えば、約4aa～約10aa、約10aa～約15aa、約15aa～約20aa、約20aa～約25aa、約25aa～約30aa、約30aa～約40aa、または約40aa～約50aaの長さを有することができる。

【0258】

適切なヒンジ領域を、容易に選択することができ、いくつかの適切な長さ、例えば、4アミノ酸～10アミノ酸、5アミノ酸～9アミノ酸、6アミノ酸～8アミノ酸、または7アミノ酸～8アミノ酸を含む、1アミノ酸（例えば、Gly）～20アミノ酸、2アミノ酸～15アミ

50

ノ酸、3アミノ酸～12アミノ酸のいずれかであることができ、1、2、3、4、5、6、または7アミノ酸であることができる。

【0259】

例えば、ヒンジ領域は、グリシンポリマー(G)_n、グリシン-セリンポリマー(例えば、(GS)_n、($GSGGS$)_n(SEQ ID NO: 1)および(GGS)_n(SEQ ID NO: 2)を含み、その際、 n は少なくとも1の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、および当技術分野において公知の他の可動性リンカーを含む。グリシンポリマーおよびグリシン-セリンポリマーを使用することができる; GlyおよびSerの両方は、相対的に構造不定であり、したがって、成分間の中性の繋ぎ鎖(tether)として役立つことができる。グリシンポリマーを使用することができる; グリシンは、アラニンより有意に多く、

10

空間にアクセスし、より長い側鎖を有する残基よりもはるかに制限を受けない(例えば、Scheraga, Rev. Computational. Chem. (1992) 2: 73-142を参照されたい)。例示的なヒンジ領域は、非限定的にGGSG(SEQ ID NO: 4)、GGSGG(SEQ ID NO: 5)、GSGSG(SEQ ID NO: 6)、GSGGG(SEQ ID NO: 7)、GGGSG(SEQ ID NO: 8)、GSSSG(SEQ ID NO: 9)などを含むアミノ酸配列を含むことができる。

【0260】

いくつかの態様では、ヒンジ領域は、免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域である。免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列は、当技術分野において公知である; 例えば、Tan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87(1):162-166; およびHuck et al., Nucleic Acids Res. (1986) 14(4): 1779-1789を参照されたい。非限定的な例として、免疫グロブリンヒンジ領域は、以下のアミノ酸配列:

20

DKTHT(SEQ ID

NO:74); CPPC(SEQ ID NO:75); CPEPKSCDTPPPCPR(SEQ ID NO:76)

(例えば、Glaser et al., J. Biol. Chem. (2005) 280:41494-41503を参照されたい); ELKTPLGDTTHT(SEQ ID

NO:77); KSCDKTHTTCP(SEQ ID NO:78); KCCVDCP(SEQ ID NO:79); KYGPPCP

(SEQ ID NO:80); EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:81)(ヒトIgG1ヒンジ);

ERKCCVECPPCP(SEQ ID NO:82)(ヒトIgG2ヒンジ); ELKTPLGDTTHTCPRCP

30

(SEQ ID NO:83)(ヒトIgG3ヒンジ); SPNMVPHAHHAQ(SEQ ID NO:84)(ヒト

IgG4ヒンジ)

などのうちの1つを含むことができる。

【0261】

ヒンジ領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4ヒンジ領域のアミノ酸配列を含むことができる。一態様では、ヒンジ領域は、野生型(天然に存在する)ヒンジ領域と比較して、1つまたは複数のアミノ酸置換および/または挿入および/または欠失を含むことができる。例えば、ヒトIgG1ヒンジのHis229は、Tyrにより置換することができ、それによって、ヒンジ領域は、配列

40

EPKSCDKTYTCPPCP(SEQ ID NO:85)

を含む; 例えば、Yan et al., J. Biol. Chem. (2012) 287: 5891-5897を参照されたい。一態様では、ヒンジ領域は、ヒトCD8に由来するアミノ酸配列またはそのバリエーションを含むことができる。

【0262】

膜貫通ドメインは、任意のヒンジ領域と組み合わせられる場合があり、かつ/または本明細書に記載される1つもしくは複数の膜貫通ドメインを含む場合がある。一態様では、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。一態様では、膜貫通ドメインは、CD8ヒン

50

ジ領域およびCD8膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様では、対象のCARは、以下に示される核酸配列：
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGC
AGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO:87)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:86)

10

を有するCD8ヒンジ領域を含む。

【0263】

その意図する機能を保ちながらの膜貫通ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 86に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCD8ヒンジ領域を含む膜貫通ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 86に示されるアミノ酸配列を含むCD8ヒンジ領域を含む膜貫通ドメインを含む。

20

【0264】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 87に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるCD8ヒンジ領域を含む膜貫通ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 87に示される核酸配列によってコードされるCD8ヒンジ領域を含む膜貫通ドメインを含む。

30

【0265】

いくつかの態様では、対象のCARは、以下に示される核酸配列：
ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACT
GGTTATCACCCCTTTACTGC (SEQ ID NO:89)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:88)

40

を有するCD8膜貫通ドメインを含む。

【0266】

その意図する機能を保ちながらの膜貫通ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 88に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメ

50

インを含む膜貫通ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 88に示されるアミノ酸配列を含むCD8膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。

【0267】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 89に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるCD8膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 89に示される酸配列によってコードされるCD8膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。

【0268】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、以下に示される核酸配列：
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGC
AGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTG
CCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC (SEQ
ID NO:91)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
GVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:90)

を有するCD8ヒンジ領域およびCD8膜貫通ドメインを含む。

【0269】

その意図する機能を保ちながらの膜貫通ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 90に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、CD8ヒンジ領域およびCD8膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 90に示されるアミノ酸配列を含む、CD8ヒンジ領域およびCD8膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。

【0270】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 91に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、CD8ヒンジ領域およびCD8膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 91に示される核酸配列によってコードされる、CD8ヒンジ領域およびCD8膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。

【0271】

CARの細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、またはCARの細胞内ドメインと膜貫通ドメインとの間に、スペーサドメインが組み入れられる場合がある。本明細書に用いられる用語「スペーサドメイン」は、一般に、膜貫通ドメインをポリペプチド鎖内の細胞外ドメインまたは細胞内ドメインのいずれかと連結するように機能する任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。スペーサドメインは、最大300アミノ酸、例えば、10~100アミノ酸、または25~50アミノ酸を含む場合がある。いくつかの態様では、スペーサドメインは、短いオリゴペプチドリinkerまたはポリペプチドリinker、例えば、2~10アミノ酸長であり得る。例えば、グリシン-セリン2つ組は、対象のCARの膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間の特に適切なリンカーを提供する。

10

【0272】

細胞内シグナル伝達ドメイン

本発明の対象のCARはまた、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」および「細胞内ドメイン」は、本明細書において互換的に使用される。CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが発現される細胞（例えば、免疫細胞）のエフェクター機能の少なくとも1つの活性化を担っている。細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞（例えば、免疫細胞）がその特殊な機能、例えば、標的細胞の損傷および/または破壊を遂行するように指示する。

【0273】

本発明において使用するための細胞内ドメインの例は、表面受容体の細胞質部分、共刺激分子、およびT細胞においてシグナル伝達を開始するように協力して作用する任意の分子、ならびにこれらのエレメントの任意の誘導体またはバリエーションおよび同じ機能的能力を有する任意の合成配列を含むが、それに限定されるわけではない。

20

【0274】

細胞内シグナル伝達ドメインの例は、非限定的に、T細胞受容体複合体の鎖またはそのホモログのいずれか、例えば、鎖、FcγRI および 鎖、MB 1 (IgA) 鎖、B29 (Ig) 鎖など、ヒトCD3ゼータ鎖、CD3ポリペプチド(、 および)、sykファミリーチロシンキナーゼ (Syk、ZAP 70など)、srcファミリーチロシンキナーゼ (Lck、Fyn、Lynなど)、ならびに、CD2、CD5およびCD28などのT細胞形質導入に関連する他の分子を含む。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3ゼータ鎖、FcγRIII、FcγRI、Fc受容体の細胞質尾部、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) 保有細胞質受容体、およびそれらの組み合わせであり得る。

30

【0275】

一態様では、CARの細胞内シグナルドメインは、1つまたは複数の共刺激分子の任意の部分、例えば、CD3、CD8、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、PD-1由来の少なくとも1つのシグナル伝達ドメイン、それらの任意の誘導体またはバリエーション、同じ機能的能力を有するそれらの任意の合成配列、およびそれらの任意の組み合わせを含む。

【0276】

細胞内ドメインの他の例には、TCR、CD3ゼータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD86、共通FcRガンマ、FcRベータ (FcイプシロンRib)、CD79a、CD79b、FcγガンマRIIa、DAP10、DAP12、T細胞受容体 (TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、OX40L、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIRファミリータンパク質、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9 (CD229)、CD160

40

50

(BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、Toll様受容体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、本明細書に記載される他の共刺激分子、それらの任意の誘導体、バリエーション、またはフラグメント、同じ機能的能力を有する共刺激分子の任意の合成配列、およびそれらの任意の組み合わせを含むが、それに限定されるわけではない1つまたは複数の分子または受容体に由来するフラグメントまたはドメインが含まれる。

【0277】

細胞内ドメインの追加的な例には、非限定的に、CD3、B7ファミリー共刺激受容体および腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリー受容体を含む第1、第2および第3世代のT細胞シグナル伝達タンパク質を非限定的に含む、数種類の様々な他の免疫シグナル伝達受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが含まれる (例えば、Park and Brentjens, J. Clin. Oncol. (2015) 33(6): 651-653を参照されたい)。追加的に、細胞内シグナル伝達ドメインは、NK細胞およびNKT細胞によって使用されるシグナル伝達ドメイン (例えば、Hermanson and Kaufman, Front. Immunol. (2015) 6: 195を参照されたい)、例えば、NKp30 (B7-H6) (例えば、Zhang et al., J. Immunol. (2012) 189(5): 2290-2299を参照されたい)、およびDAP12 (例えば、Topfer et al., J. Immunol. (2015) 194(7): 3201-3212を参照されたい)、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10、およびCD3ζのシグナル伝達ドメインを含み得る。

【0278】

本発明の対象のCARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、CARの活性化 (すなわち、抗原および二量体化剤によって活性化される) に反応して別個のかつ検出可能なシグナル (例えば、細胞による1つまたは複数のサイトカインの産生の増加; 標的遺伝子の転写の変化; タンパク質の活性の変化; 細胞挙動の変化、例えば、細胞死; 細胞増殖; 細胞分化; 細胞生存; 細胞シグナル伝達応答のモジュレーションなど) を提供する任意の所望のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、以下に記載のような少なくとも1つ (例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つなど) のITAMモチーフを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP10/CD28型シグナル伝達鎖を含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、膜結合CARに共有結合することなく、代わりに細胞質中に拡散される。

【0279】

本発明の対象のCARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) 含有細胞内シグナル伝達ポリペプチドを含む。いくつかの態様では、ITAMモチーフは、細胞内シグナル伝達ドメイン内で二度反復され、そこで、ITAMモチーフの第1および第2の例は、6~8アミノ酸により互いに隔てられている。一態様では、対象のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、3つのITAMモチーフを含む。

【0280】

いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、非限定的に、Fcガンマリ、FcガンマRIIA、FcガンマRIIC、FcガンマRIIIA、FcRL5などの、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含有するヒト免疫グロブリン受容体のシグナル伝達ドメインを含む (例えば、Gillis et al., Front. Immunol. (2014) 5:254を参照されたい)。

【0281】

適切な細胞内シグナル伝達ドメインは、ITAMモチーフを含有するポリペプチドに由来する、ITAMモチーフ含有部分であることができる。例えば、適切な細胞内シグナル伝達ドメインは、任意のITAMモチーフ含有タンパク質由来のITAMモチーフ含有ドメインであることができる。したがって、適切な細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来するタンパク質全体の配列全体を含有する必要はない。適切なITAMモチーフ含有ポリペプチドの例は、DAP12、FCER1G (Fcイプシロン受容体Iガンマ鎖)、CD3D (CD3デルタ)、C

10

20

30

40

50

D3E (CD3イプシロン)、CD3G (CD3ガンマ)、CD3Z (CD3ゼータ)、およびCD79A (抗原受容体複合体関連タンパク質アルファ鎖)を含むが、それに限定されるわけではない。

【0282】

一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP12 (TYROBP; TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質; KARAP; PLOSL; DNAX活性化タンパク質12; KAR関連タンパク質; TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質; キラー活性化受容体関連タンパク質; キラー活性化受容体関連タンパク質などとしても知られている)に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、FCER1G (FCRG; Fcイプシロン受容体Iガンマ鎖; Fc受容体ガンマ鎖; fc-イプシロンRI-ガンマ; fcRガンマ; fceRIガンマ; 高親和性免疫グロブリンイプシロン受容体サブユニットガンマ; 免疫グロブリンE受容体、高親和性ガンマ鎖などとしても知られている)に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3デルタ鎖 (CD3D; CD3-DELTA; T3D; CD3抗原、デルタサブユニット; CD3デルタ; CD3d抗原、デルタポリペプチド (TiT3複合体); OKT3、デルタ鎖; T細胞受容体T3デルタ鎖; T細胞表面糖タンパク質CD3デルタ鎖などとしても知られている)に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖 (CD3e、T細胞表面抗原T3/Leu-4イプシロン鎖、T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖、A1504783、CD3、CD3イプシロン、T3eなどとしても知られている)に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3ガンマ鎖 (CD3G、T細胞受容体T3ガンマ鎖、CD3-GAMMA、T3G、ガンマポリペプチド (TiT3複合体) などとしても知られている)に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3ゼータ鎖 (CD3Z、T細胞受容体T3ゼータ鎖、CD247、CD3-ZETA、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZなどとしても知られている)に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD79A (B細胞抗原受容体複合体関連タンパク質アルファ鎖; CD79a抗原 (免疫グロブリン関連アルファ); MB-1膜糖タンパク質; ig-アルファ; 膜結合免疫グロブリン関連タンパク質; 表面IgM関連タンパク質などとしても知られている)に由来する。一態様では、本開示のFN3 CARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP10/CD28型シグナル伝達鎖を含む。一態様では、本開示のFN3 CARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、ZAP70ポリペプチドを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79bまたはCD66dの細胞質シグナル伝達ドメインを含む。一態様では、CAR中の細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3ゼータの細胞質シグナル伝達ドメインを含む。

【0283】

通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、必ずしも鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断型部分を使用される範囲内で、そのような切断型部分は、エフェクター機能シグナルを伝達するかぎり、無傷の鎖の代わりに使用され得る。細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断型部分を含む。

【0284】

本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインを、本明細書に記載の抗原結合ドメインのいずれか、本明細書に記載の膜貫通ドメインのいずれか、またはCARに含まれ得る本明細書に記載の他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。

【0285】

一態様では、対象のCARの細胞内ドメインは、以下に示される核酸配列:
AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
CAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA
AGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO:93)

10

20

30

40

50

または以下に示される核酸配列：

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
CAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA
AGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO:94)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:92)

を含む4-1BBドメインを含む。

10

【0286】

その意図する機能を保ちながらの細胞内ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：92に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む4-1BBドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO：92に示されるアミノ酸配列を含む4-1BBドメインを含む細胞内ドメインを含む。

20

【0287】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：93または94に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる4-1BBドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO：93または94に示される核酸配列によってコードされる4-1BBドメインを含む細胞内ドメインを含む。

30

【0288】

一態様では、対象のCARの細胞内ドメインは、以下に示される核酸配列：
ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGT
TCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCT
A (SEQ ID NO:204)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO:203)

40

を含むICOSドメインを含む。

【0289】

その意図する機能を保ちながらの細胞内ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：203に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少

50

なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むICOSドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO: 203に示されるアミノ酸配列を含むICOSドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【0290】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO: 204に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるICOSドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO: 204に示される核酸配列によってコードされるICOSドメインを含む細胞内ドメインを含む。

10

【0291】

一態様では、対象のCARの細胞内ドメインは、以下に示される核酸配列：
ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGA
ACATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCT
A (SEQ ID NO:96)

20

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
TKKKYSSSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO:95)

を含むバリエーションICOSドメインを含む。

【0292】

バリエーションICOSドメインはまた、本明細書においてICOS (YMMN) とも称される。

【0293】

その意図する機能を保ちながらの細胞内ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO: 95に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むICOSドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO: 95に示されるアミノ酸配列を含むICOSドメインを含む細胞内ドメインを含む。

30

【0294】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO: 96に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるICOSドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO: 96に示される核酸配列によってコードされるICOSドメインを含む細胞内ドメインを含む。

40

【0295】

一態様では、対象のCARの細胞内ドメインは、以下に示される核酸配列：

50

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:98)

10

または以下に示される核酸配列：

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGACGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGC
ACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:99)

20

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR (SEQ ID NO:97)

を含むCD3ゼータドメインを含む。

【0296】

その意図する機能を保ちながらの細胞内ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：97に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：97に示されるアミノ酸配列を含むCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

30

【0297】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：98または99に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：98または99に示される核酸配列によってコードされるCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

40

。

50

【 0 2 9 8 】

CD3ゼータドメインは、以下に示される核酸配列：

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGG
CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT
GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG
GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:101)

10

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR (SEQ ID NO:100)

を含み得る。

【 0 2 9 9 】

20

その意図する機能を保ちながらの細胞内ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：100に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：100に示されるアミノ酸配列を含むCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

30

【 0 3 0 0 】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：101に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：101に示される核酸配列によってコードされるCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

40

【 0 3 0 1 】

一態様では、CARは、SEQ ID NO：97または100に示されるアミノ酸配列を含むCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【 0 3 0 2 】

例示的な一態様では、対象のCARの細胞内ドメインは、以下に示される核酸配列：

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA
AGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
CCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
CGAAGAGAGGAGTACGACGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAACGAA
CTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG
CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

(SEQ ID NO:103)

または以下に示される核酸配列：

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA
AGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
CCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAA
CTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG
CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

(SEQ ID NO:104)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY
KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
NO:102)

を含む4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。

【0303】

その意図する機能を保ちながらの細胞内ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：102に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO：102に示されるアミノ酸配列を含む、4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【0304】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：103または104に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO：103または104に示される核酸配列によってコードされる、4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

10

【0305】

例示的な一態様では、対象のCARの細胞内ドメインは、以下に示される核酸配列：
ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGT
TCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCT
AAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT
TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG
GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:206)

20

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
NO:205)

30

を含むICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。

【0306】

その意図する機能を保ちながらの細胞内ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：205に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO：205に示されるアミノ酸配列を含む、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

40

【0307】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：206に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも

50

85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO: 206に示される核酸配列によってコードされる、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【0308】

例示的な一態様では、対象のCARの細胞内ドメインは、以下に示される核酸配列：

ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGA
ACATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCT
AAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT
TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG
GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:208)

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

TKKKYSSSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
NO:207)

を含むバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。

【0309】

その意図する機能を保ちながらの細胞内ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO: 207に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO: 207に示されるアミノ酸配列を含む、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【0310】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO: 208に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、バリエーションICOSドメインおよびC

D3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 208に示される核酸配列によってコードされる、バリアントICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【 0 3 1 1 】

CAR配列

本発明の対象のCARは、J591マウスPSMA-CAR、ヒト化J591 PSMA-CAR、1C3ヒトPSMA-CAR、2A10ヒトPSMA-CAR、2F5ヒトPSMA-CAR、および2C6ヒトPSMA-CARからなる群より選択される場合がある。

【 0 3 1 2 】

一態様では、本発明の対象のCARは、J591マウスPSMA-CARである。一態様では、J591マウスPSMA-CARは、以下に示される核酸配列：

10

20

30

40

50

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGC
CGCCAGACCTGGATCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCA
CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGG
TACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTG
ATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG
TGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAACGTTTCAGTCTGAAGACT
TGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCCGGTGCT
GGGACCATGCTGGACCTGAAAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGAAGT
TCTGGCGGAGGCAGCGAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAGCTCGTGA
AGCCTGGAACAAGCGTGCGGATCAGCTGCAAGACCAGCGGCTACACCTTCAC
CGAGTACACCATCCACTGGGTCAAGCAGTCCCACGGCAAGAGCCTGGAGTGG
ATCGGCAATATCAACCCCAACAACGGCGGCACCACTACAACCAGAAGTTCG
AGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGG
AACTGCGGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGTGCCGCCGG
TTGGA ACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAAACCCTGACAGTGTCTAGCGCT
AGCTCCGGAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCA
TCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGG
GGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGG
GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTT
TACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTA
TGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTC
AGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC
AGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT
CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGACGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGAC
CCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTAC
AACGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG
AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCTC
AGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCC
CTCGC (SEQ ID NO:106)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTA
VDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYF
CQQYNSYPLTFGAGTMLDLKGGGSGGGGSSGGGSEVQLQQSGPELVKPGTSV
RISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVD
KSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTTLTVSSASSGTTTPAPRP
PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV
ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD
APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

(SEQ ID NO:105)

を含む。

【 0 3 1 3 】

一態様では、本発明の対象のCARは、ヒト化PSMA-CAR、例えば、ヒト化J591 PSMA-CARである。そのような態様では、ヒト化PSMA-CARは、PCT公報番号WO2017212250A1およびWO2018033749A1に開示される重鎖可変領域および軽鎖可変領域のいずれかを含む。例えば、本発明のヒト化PSMA-CARは、本明細書に開示される重鎖可変領域および軽鎖可変領域のいずれかを含むscFvを含むことができ、例えば、本開示の表19に示される配列を参照されたい。

20

【 0 3 1 4 】

一態様では、本発明の対象のCARは、1C3ヒトPSMA-CARである。一態様では、1C3ヒトPSMA-CARは、以下に示される核酸配列：

30

40

50

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCCGCAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT
GGGAGGTCCTTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA
TGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
GTTATATCATATGATGGAAACAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGTCCCC
TGGGGATCGAGGTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCA
CGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCTGGGTGG
CGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGC
TTAGCCTGGTATCAGCAGAAATCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTTTG
ATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAA
CTTATTACTGTCAACAGTTTAAACAGTTATCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACC
AAGGTGGAGATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCG
CCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAG
CGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGCGCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTA
TCACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACA
ACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGC
CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGC
AGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC
GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGACGTTTTTGGACAAGAGACGTG
GCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAG
GCCTGTACAACGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGAT
TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCA
GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
CTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:108)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYA
MHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCARAVPWGSRYYYYGMDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGG
GGSAIQLTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQG ISSALAWYQQKSGKAPKLLIFDASS
LESGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKF
SRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR (SEQ ID NO:107)

10

を含む。

【 0 3 1 5 】

一態様では、本発明の対象のCARは2A10ヒトPSMA-CARである。一態様では、2A10ヒトPSMA-CARは、以下に示される核酸配列：

20

30

40

50

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCC
CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTA
ACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG
GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCC
AGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAG
CAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGGCAAACCTGGT
TTCCTCTGGTCCTCCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCA
GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGGGCGGATCTGCCATCC
AGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAACA
GAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCTATGGATCTGGGACAGATTTCACTCT
CACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGT
TTAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAAC
CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG
CCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGC
ACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCC
GGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACG
GGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTA
CAAATACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAG
AAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG
CGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG
AGAGGAGTACGACGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGG
GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAACGAACCTGCA
GAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
CCGGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC
AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID
NO:110)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWI
GWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGGVTVISADKSISTAYLQWSSLKA
SDTAMYYCARQTGFLWSSDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS
GYGSGTDFLTINSLQPEDFATYYCQQFN SYPLTFGGG TKVEIKTTTPAPRPPTPA
PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCEL RVKFSRSADAPA
YKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ
ID NO:109)

10

を含む。

【 0 3 1 6 】

一態様では、本発明の対象のCARは2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、2F5ヒトPSMA-CARは、以下に示される核酸配列：

20

30

40

50

ATGGCCTTACCAAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCC
ACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAA
AGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACC
AGCAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGA
TGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAA
GGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGT
GGAACAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAAC
TGGTTTCCTCTGGTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTC
CTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCC
ATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATC
AGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTT
GGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT
ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCA
ACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATC
AAAATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACC
ATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGG
GGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTG
GGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCC
TTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTT
ATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTT
CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAAGTTCAGCAGGAGCG
CAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA
TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGACGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGA
CCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTA
CAACGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT
GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCT
CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCC
CCTCGC (SEQ ID NO:112)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWI
GWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGV TISADKSISTAYLQWNSLKA
SDTAMYYCARQTGFLWSFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQS
PSSLSASVGDRV TITCRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPLTFGGGTKVEIKIKTTTPAPRPPTP
APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAP
AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ
ID NO:111)

10

を含む4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。

【 0 3 1 7 】

一態様では、本発明の対象のCARは2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、2F5ヒトPSMA-CARは、以下に示される核酸配列：

20

30

40

50

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCC
CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCA
ACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG
GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCC
AGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAA
CAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAACTGGT
TTCCTCTGGTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCC
AGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCA
GAAACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC
TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG
TTTAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAA
TCAAAACACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGC
GTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGC
GCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGG
ATGTGCAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCT
TACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATG
TTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCC
TAAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC
AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGT
TTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAG
AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA
GGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC
GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:210)

10

20

30

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

40

50

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWI
GWVRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWNSLKA
SDTAMYYCARQTGFLWSFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQS
PSSLASVGDRTITCRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPLTFGGGTKVEIKIKTTTPAPRPPTP
APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWLPIGCAAFV VVCILGCILIC
WLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
NO:209)

10

を含むICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。

【 0 3 1 8 】

一態様では、本発明の対象のCARは2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、2F5ヒトPSMA-CARは、以下に示される核酸配列：

20

30

40

50

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCC
CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCA
ACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG
GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCC
AGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAA
CAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAACTGGT
TTCCTCTGGTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCC
AGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCA
GAAACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC
TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG
TTTAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAA
TCAAAACACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGC
GTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGC
GCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGG
ATGTGCAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCT
TACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATG
AACATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCC
TAAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC
AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGT
TTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAG
AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA
GGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC
GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:212)

10

20

30

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

40

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWI
GWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWNSLKA
SDTAMYYCARQTGFLWSFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQS
PSSLASVGDRVTITCRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKIKTTTPAPRPPTP
APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWLPIGCAAFVVCILGCILIC
WLTKKKYSSSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
NO:211)

10

を含むバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。

【 0 3 1 9 】

一態様では、本発明の対象のCARは2C6ヒトPSMA-CARである。一態様では、2C6ヒトPSMA-CARは、以下に示される核酸配列：

20

30

40

50

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGATCAGAGGTGAAAAAGCCC
GGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAACTA
CTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGG
ATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCA
GGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTATCTGCAGTGGAGC
AGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCCCGGGTATA
CCAGCAGTTGGACTTCTTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTG
AAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGA
GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTA
CCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAC
AGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT
TCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT
CAGCAGCGTAGCAACTGGCCCCTATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGG
ATATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCAT
CGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGG
GGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGG
CGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTT
ACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTAT
GAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA
GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATC
TAGGACGAAGAGAGGAGTACGACGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACC
CTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ACGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA
AAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCC
TCGC (SEQ ID NO:114)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGSEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWI
GWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDSDDTRYSPSFQGGVTVISADKSISTAYLQWSSLKA
SDTAMYYCASPQYTSSWTSFDYWGGQTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLT
QSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLFTFGPGTKVDIKTTTPAPRPP
TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI
TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD
APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

(SEQ ID NO:113)

を含む。

【0320】

その機能を保ちながらの対象のCARの配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。

【0321】

例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：105に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むJ591マウスPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO：105に示されるアミノ酸配列を含むJ591マウスPSMA-CARである。

20

【0322】

例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARはヒト化J591 PSMA-CARである。ヒト化J591 PSMA-CARは、表19に示される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列のいずれかより選択される重鎖および軽鎖可変領域を含むヒト化J591 PSMA結合ドメインを含む。いくつかの態様では、ヒト化J591 PSMA-CARは、4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。

30

【0323】

例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：107に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む1C3ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO：107に示されるアミノ酸配列を含む1C3ヒトPSMA-CARである。

40

【0324】

例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO：109に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくと

50

も94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む2A10ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 109に示されるアミノ酸配列を含む2A10ヒトPSMA-CARである。

【0325】

例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 111に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 111に示されるアミノ酸配列を含む4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 209に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 209に示されるアミノ酸配列を含むICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 211に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 211に示されるアミノ酸配列を含むバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 113に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む2C6ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 113に示されるアミノ酸配列を含む2C6ヒトPSMA-CARである。

【0326】

いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 106に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるJ591マウスPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 106に示される核酸配列によってコードされるJ591マ

10

20

30

40

50

ウスPSMA-CARである。

【0327】

例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 108に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる1C3ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 108に示される核酸配列によってコードされる1C3ヒトPSMA-CARである。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 110に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる2A10ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 110に示される核酸配列によってコードされる2A10ヒトPSMA-CARである。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 112に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 112に示される核酸配列によってコードされる4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 210に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 210に示される核酸配列によってコードされる、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 212に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO : 212に示される核酸配列によってコードされる、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含む2F5ヒトPSMA-CARである。例えば、いくつかの態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO : 114に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なく

10

20

30

40

50

とも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる2C6ヒトPSMA-CARである。一態様では、CARは、SEQ ID NO: 114に示される核酸配列によってコードされる2C6ヒトPSMA-CARである。

【0328】

ある特定の態様では、本発明の対象のCARは、SEQ ID NO: 209、211、または227～236に対応するアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含み得る。

【0329】

SEQ ID NO:	CAR	配列
227	PD1-CD28 – 2F5-ICOS _z	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPFTS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDK LAAPFEDRSQPGQDCRFVTLPLNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSP SPRPAGQFQTLVFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR SVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPMALPVTALLPLALLLH AARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGW VRQMPGKGLEWMGHIYPGDSDFTRYSPSFQGGVTSADKSI STAYLQWNSLKASDTAMYCCARQTGFLWSFDLWGRGTL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISSALAWYQKPKGAPKLLIYDASSLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPLTFGGGT KVEIKIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDFWLPICCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYS SSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADA PAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PQRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
228	PD1*CD28 – 2F5-ICOS _z	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPFTS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDK LAAPFEDRSQPGQDCRFVTLPLNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSP SPRPAGQFQTLVVGVLGGSLVLLVWVLAIRSKRSR LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSVKQT LNFDLLKLAGDVESNPGPMALPVTALLPLALLLHAARPE VQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWVRQM PGKGLEWMGHIYPGDSDFTRYSPSFQGGVTSADKSI STAYLQWNSLKASDTAMYCCARQTGFLWSFDLWGRGTL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISSALAWYQKPKGAPKLLIYDASSLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPLTFGGGT KVEIKIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDFWLPICCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSVH DPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQ QQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PQRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
229	PD1*BB – 2F5-ICOS _z	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPFTS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDK LAAPFEDRSQPGQDCRFVTLPLNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSP SPRPAGQFQTLVIYIWAAPLAGTCGVLLLSLVTLYCKKGR KKLKLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELVK QTLNFDLLKLAGDVESNPGPMALPVTALLPLALLLHAA RPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWVR QMPGKGLEWMGHIYPGDSDFTRYSPSFQGGVTSADKSI STAYLQWNSLKASDTAMYCCARQTGFLWSFDLWGRGTL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISSALAWYQKPKGAPKLLIYDASSLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPLTFGGGT KVEIKIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH

10

20

30

40

50

		TRGLDFACDFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
230	TIM3-CD28 – 2F5-ICOS _z	MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLKLVIPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGMALPVTALLPLALLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDSDDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWNSLKASDTAMYCARQTGFLWSFDLWGRGTLTVTVSSGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGKVEIKIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
231	PD1*BB – TIM3-CD28 – 2F5-ICOS _z	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGMFHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLKLVIPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGMALPVTALLPLALLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDSDDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWNSLKASDTAMYCARQTGFLWSFDLWGRGTLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGKVEIKIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG

10

20

30

40

		MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
232	PD1-CD28 – 2F5-ICOSz YMN	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPPTFS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDK LAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSP SPRPAGQFQTLVFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR SVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPMALPVTALLPLALLH AARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGW VRQMPGKGLEWMGHIYPGDS TRYSPSFQGGQVTISADKSI STAYLQWNSLKASDTAMY YCARQTGFLWSFDLWGRGTL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISSALAWYQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSR FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGT KVEIKIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDFWLPICAAAFVVVCILGCILICWLTKKKYS SSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
233	PD1*CD28 – 2F5-ICOSz YMN	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPPTFS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDK LAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSP SPRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLVLLVWVLAVIRSKRSR LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSVKQT LNFDLLKLAGDVESNPGPMALPVTALLPLALLLHAAARPE VQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWVRQM PGKGLEWMGHIYPGDS TRYSPSFQGGQVTISADKSI STAYLQWNSLKASDTAMY YCARQTGFLWSFDLWGRGTL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISSALAWYQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSR FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGT KVEIKIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDFWLPICAAAFVVVCILGCILICWLTKKKY SSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
234	PD1*BB – 2F5-ICOSz YMN	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPPTFS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDK LAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSP SPRPAGQFQTLVIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELVK QTLNFDLLKLAGDVESNPGPMALPVTALLPLALLLHAA RPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWVR QMPGKGLEWMGHIYPGDS TRYSPSFQGGQVTISADKSI STAYLQWNSLKASDTAMY YCARQTGFLWSFDLWGRGTL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISSALAWYQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSR FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGT KVEIKIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDFWLPICAAAFVVVCILGCILICWLTKKKY SSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

30

40

		CRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPLTFGGGK VEIKIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDFWLPICCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSS VHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPK QRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
235	TIM3-CD28 - 2F5-ICOSz YMN	MFSHLPFDCVLLLLLLLLLTSSEVEYRAEVGQNAYLPCFY TPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYW TSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMN DEKFNKLKLVKPAKVTPAPTRQDFTAAFPRLTTRGHGP AETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIR FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSVKQTLNFDLL KLAGDVESNPGMALPVTALLPLALLHAARPEVQLVQ SGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWVRQMPGKGL EWMGHIYPGDSDDTRYSPSFQGGVTVISADKSISTAYLQWNSL KASDTAMYYCARQTGFLWSFDLWGRGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISS ALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPLTFGGGKVEIKIKTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD FWLPICCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEY MNMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPKRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
236	PD1*BB - TIM3-CD28 - 2F5-ICOSz YMN	MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFS PALLVVTEDGNATFTCSFNTSESVLWYRMSPSNQTDK LAAPFEDRSQPGQDCFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHSP SPRPAGQFQTLVIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCKKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELVK QTLNFDLLKLAGDVESNPGMFSHLPFDCVLLLLLLLLLTS SSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGAC PVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIE NVTADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLKLVKPAKVTPAPT RQRDFTAAFPRLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLA NELRDSRLANDLRDSGATIRFWVLVVVGGVLACYSLLV VAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAP PRDFAAYRSVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGMALPVTAL LLPLALLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGY SFTSNWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDSDDTRYSPSFQ QVTISADKSISTAYLQWNSLKASDTAMYYCARQTGFLWS FDLWGRGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQSPSS SASVGDRVITICRASQDISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDA SSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPLTFGGGKVEIKIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWLPICCAAFVVVCILGILI CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

30

40

【 0 3 3 0 】

したがって、本発明は、標的細胞（例えば、前立腺がん細胞）上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するキメラ抗原受容体（CAR）を含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞、例えば、改変されたT細胞を提供する。いくつかの態様では、CARは、PSMA結合ドメインを含む。いくつかの態様では、CARは、マウスPSMA結合ドメインを含む。一態様では、CARは、J591マウスPSMA結合ドメインを含む。一態様では、CARは、ヒト化J591 PSMA結合ドメインを含む。いくつかの態様では、CARは、ヒトPSMA結合ドメインを含む。いくつかの態様では、CARは、1C3、2A10、2F5、および2C6ヒトPSMA結合ドメインからなる群より選択されるヒトPSMA結合ドメインを含む。

50

【0331】

したがって、本発明の対象のCARは、PSMA結合ドメインおよび膜貫通ドメインを含む。一態様では、CARは、PSMA結合ドメインおよび膜貫通ドメインを含み、その際、膜貫通ドメインは、CD8ヒンジ領域を含む。一態様では、CARは、PSMA結合ドメインおよび膜貫通ドメインを含み、その際、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。一態様では、CARは、PSMA結合ドメインおよび膜貫通ドメインを含み、その際、膜貫通ドメインは、CD8ヒンジ領域およびCD8膜貫通ドメインを含む。

【0332】

したがって、本発明の対象のCARは、PSMA結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む。一態様では、CARは、PSMA結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含み、その際、細胞内ドメインは、4-1BBドメインを含む。一態様では、CARは、PSMA結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含み、その際、細胞内ドメインは、CD3ゼータドメインを含む。一態様では、CARは、PSMA結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含み、その際、細胞内ドメインは、4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。

【0333】

C. ドミナントネガティブ型受容体およびスイッチ受容体

本発明は、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体を含む、改変された免疫細胞またはその前駆細胞、例えば、改変されたT細胞のための組成物および方法を提供する。したがって、いくつかの態様では、免疫細胞は、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体を発現するように遺伝的に改変されている。本明細書に用いられる用語「ドミナントネガティブ型受容体」は、負のシグナル伝達分子の効果、例えば、本発明の改変された免疫細胞に対する負のシグナル伝達分子の効果を低減するように設計された分子を指す。本発明のドミナントネガティブ型受容体は、負のシグナルに関連する細胞外ドメインにより負のシグナル伝達分子、例えば、TGF- またはPD-1と結合し、負のシグナル伝達分子の効果を低減する場合がある。そのようなドミナントネガティブ型受容体は、本明細書に記載される。例えば、ドミナントネガティブ型受容体を含む改変された免疫細胞は、改変された免疫細胞の微小環境中の負のシグナル伝達分子と結合し、改変された免疫細胞に対して負のシグナル伝達分子が有し得る効果を低減する場合がある。

【0334】

本発明のスイッチ受容体は、負のシグナル伝達分子の効果を低減することに加えて、正のシグナルに関連する細胞内ドメインを含むことにより、負のシグナルを正のシグナルに変換するように設計される場合がある。負のシグナルを正のシグナルに変換するように設計されたスイッチ受容体は、本明細書に記載される。したがって、スイッチ受容体は、負のシグナルに関連する細胞外ドメインおよび/または正のシグナルに関連する細胞内ドメインを含む。

【0335】

腫瘍細胞は、腫瘍細胞を免疫認識および除去から保護するように役立つ免疫抑制微小環境を生成する。この免疫抑制微小環境は、CAR-T細胞療法などの免疫抑制療法の有効性を制限する可能性がある。分泌されるサイトカイン形質転換増殖因子（TGF）は、細胞傷害性T細胞の機能を直接阻害し、追加的に制御性T細胞の形成を誘導して、免疫応答をさらに抑制する。前立腺がんの状況でのTGFによるT細胞免疫抑制が、以前に実証されている（Donkor et al., 2011; Shalapour et al., 2015）。TGFの免疫抑制効果を低減するために、免疫細胞を改変して、TGF- に対するドミナントネガティブ型受容体であるドミナントネガティブ型受容体を発現させることができる。

【0336】

いくつかの態様では、ドミナントネガティブ型受容体は、負のシグナルに関連する野生型タンパク質の切断型バリエーションである。いくつかの態様では、ドミナントネガティブ型受容体は、TGF- に対するドミナントネガティブ型受容体である。したがって、いくつか

の態様では、TGF- に対するドミナントネガティブ型受容体は、野生型TGF- 受容体の切断型バリエーションである。いくつかの態様では、ドミナントネガティブ型受容体は、TGF- 受容体II型の切断型ドミナントネガティブ型バリエーション（TGF RII-DN）である。一態様では、TGF RII-DNは、以下に示される核酸配列：

```
ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGA
CGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAAGTTCGGTTAATAACGA
CATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAA
TTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAA
CTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTAT
GGAGAAAGAATGACGAGAACATAAAGTCTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCA
AGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCAAAGTGCATT
ATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTC
TGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAAACACCAGCAAT
CCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACC
ACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACC
GGCAGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGA (SEQ ID NO:116)
```

10

20

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

```
MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAVVWRKNDENITLETVCHDPKLPYH
DFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQ
VTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQKLSSSG (SEQ ID NO:115)
```

を含む。

【0337】

30

その意図する機能を保ちながらのTGF RII-DNの配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、本発明のドミナントネガティブ型受容体は、SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むTGF RII-DNである。一態様では、ドミナントネガティブ型受容体は、SEQ ID NO：115に示されるアミノ酸配列を含むTGF RII-DNである。

40

【0338】

いくつかの態様では、本発明のドミナントネガティブ型受容体は、SEQ ID NO：116に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるTGF RII-DNである。一態様では、ドミナントネガティブ型受容体は、SEQ ID NO：116に示される核酸配列によってコードされるTGF RII-DNである。

50

【 0 3 3 9 】

一態様では、本発明において使用するために適したスイッチ受容体は、PD1-CTM-CD28受容体である。PD1-CTM-CD28受容体は、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正のCD28シグナルに変換する。PD1-CTM-CD28受容体は、PD1細胞外ドメインのバリエーション、CD28膜貫通ドメイン、およびCD28細胞質ドメインを含む。一態様では、PD1-CTM-CD28受容体は、以下に示される核酸配列：

```
ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGG
GCTGGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGTTTTGGGTGCTG
GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTT
TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC
ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:118)
```

10

20

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

```
MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT
CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
MSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
AGQFQTLVFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRR
PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:117)
```

30

を含む。

【 0 3 4 0 】

その意図する生物学的活性（例えば、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正のCD28シグナルに変換すること）を保ちながらのPD1-CTM-CD28受容体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のPD1-CTM-CD28受容体は、SEQ ID NO：117に示されるPD1-CTM-CD28受容体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のPD1-CTM-CD28受容体は、SEQ ID NO：118に示されるPD1-CTM-CD28受容体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも

40

50

86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

【0341】

一態様では、本発明において使用するために適したスイッチ受容体は、PD1-PTM-CD28受容体である。PD1-PTM-CD28受容体は、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正のCD28シグナルに変換する。PD1-PTM-CD28受容体は、PD1細胞外ドメインのバリエーション、PD1膜貫通ドメイン、およびCD28細胞質ドメインを含む。一態様では、PD1-PTM-CD28受容体は、以下に示される核酸配列：

```
ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTG
GGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCCTGGCCGTCATCAG
GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT
TCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:120)
```

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

```
MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT
CSFSNTSESFVLNWRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
MSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPA
GQFQTLVVGVVGGLLGSLLVWVLAVIRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK
HYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:119)
```

を含む。

【0342】

その意図する生物学的活性（例えば、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正のCD28シグナルに変換すること）を保ちながらのPD1-PTM-CD28受容体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のPD1-PTM-CD28受容体は、SEQ ID NO：119に示されるPD1-PTM-CD28受容体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列

同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のPD1-PTM-CD28受容体は、SEQ ID NO: 120に示されるPD1-PTM-CD28受容体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

【0343】

一態様では、本発明において使用するために適したスイッチ受容体は、PD1^{A132L}-PTM-CD28受容体である。PD1^{A132L}-PTM-CD28受容体は、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正のCD28シグナルに変換する。PD1のアミノ酸位置132のアラニンをロイシンにより置換する点変異(A132L)は、それとPD-L1との親和性を2倍増加させることが見出された(例えば、Zhang et al., Immunity (2004) 20(3), 337-347を参照されたい)。PD1^{A132L}-PTM-CD28受容体は、132位にアミノ酸置換(A132L)を有するPD1細胞外ドメインのバリエーション、PD1膜貫通ドメイン、およびCD28細胞質ドメインを含む。一態様では、PD1^{A132L}-PTM-CD28受容体は、以下に示される核酸配列:

```
ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTG
GGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCCTGGCCGTCATCAG
GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT
TCGCAGCCTATCGC (SEQ ID NO:122)
```

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列:

```
MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT
CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
MSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPA
GQFQTLVVGVGGLLGSLLVWVLAVIRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK
HYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:121)
```

を含む。

【0344】

その意図する生物学的活性(例えば、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正のCD28シグナルに変換すること)を保ちながらのPD1^{A132L}-PTM-CD28受容体の

許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のPD1^{A132L}-PTM-CD28受容体は、SEQ ID NO: 121に示されるPD1^{A132L}-PTM-CD28受容体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のPD1^{A132L}-PTM-CD28受容体は、SEQ ID NO: 122に示されるPD1^{A132L}-PTM-CD28受容体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

【0345】

一態様では、本発明において使用するために適したスイッチ受容体は、PD1-4-1BB受容体である。PD1-4-1BB受容体（本明細書においてPD1-BBとも称される）は、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正の4-1BBシグナルに変換する。一態様では、PD1-4-1BB受容体は、以下に示される核酸配列：

```
ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGG
GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCT
TACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT
TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATT
TCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO:214)
```

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

```
MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT
CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
MSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
AGQFQTLVIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT
QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:213)
```

を含む。

【 0 3 4 6 】

その意図する生物学的活性（例えば、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正の4-1BBシグナルに変換すること）を保ちながらのPD1-4-1BB受容体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のPD1-4-1BB受容体は、SEQ ID NO：213に示されるPD1-4-1BB受容体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のPD1-4-1BB受容体は、SEQ ID NO：214に示されるPD1-4-1BB受容体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

10

【 0 3 4 7 】

一態様では、本発明において使用するために適したスイッチ受容体は、PD1^{A132L}-4-1BB受容体である。PD1^{A132L}-4-1BB受容体（本明細書においてPD1*BBとも称される）は、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正の4-1BBシグナルに変換する。一態様では、PD1^{A132L}-4-1BB受容体は、以下に示される核酸配列：

20

```
ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCCGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGG
GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTT
TACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT
TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATT
TCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO:216)
```

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFELDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFT
CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
MSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPA
GQFQTLVIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
EEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:215)

を含む。

【 0 3 4 8 】

その意図する生物学的活性（例えば、細胞において発現された場合に負のPD1シグナルを正の4-1BBシグナルに変換すること）を保ちながらのPD1^{A132L}-4-1BB受容体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のPD1^{A132L}-4-1BB受容体は、SEQ ID NO：215に示されるPD1^{A132L}-4-1BB受容体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のPD1^{A132L}-4-1BB受容体は、SEQ ID NO：216に示されるPD1^{A132L}-4-1BB受容体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

【 0 3 4 9 】

一態様では、本発明において使用するために適したスイッチ受容体は、TGF R-IL12R 1受容体である。TGF R-IL12R 1受容体は、細胞において発現された場合に負のTGF - シグナルを正のIL-12シグナルに変換する。一態様では、TGF R-IL12R 1受容体は、以下に示される核酸配列：

10

20

30

40

50

ATGGAGGCGGCGGTGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCTGGC
GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCTGCTCCCGGGGGCGACGGCGTTACA
GTGTTTCTGCCACCTCTGTACAAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGC
TCTGCTTTGTCTCTGTACAGAGACCACAGACAAAGTTATACACAACAGCATG
TGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGTTTGTATGTGCACC
CTCTTCAAAAACCTGGGTCTGTGACTACAACATATTGCTGCAATCAGGACCATT
GCAATAAAATAGAACTTCCAACCTACTGTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCCT
GTGGAACCTGGCAGCTGTCATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGTCTGCATCTCACT
CATGTTGATGGTCTATATCAGGGCCGCACGGCACCTGTGCCCCGCCGCTGCCCCA
CACCTGTGCCAGCTCCGCCATTGAGTTCCCTGGAGGGAAGGAGACTTGGCA
GTGGATCAACCCAGTGGACTTCCAGGAAGAGGCATCCCTGCAGGAGGCCCTG
GTGGTAGAGATGTCCTGGGACAAAGGCGAGAGGACTGAGCCTCTCGAGAAG
ACAGAGCTACCTGAGGGTGCCCCCTGAGCTGGCCCTGGATACAGAGTTGTCCTT
GGAGGATGGAGACAGGTGCAAGGCCAAGATG (SEQ ID NO:124)

10

20

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：
MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGL
CFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCPSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIE
LPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPVCFVCISLMLMVYIRAAARHLCPLPTPCASSAIE
FPGGKETWQWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELA
LDTELSLEDGDRCKAKM (SEQ ID NO:123)

を含む。

30

【 0 3 5 0 】

その意図する生物学的活性（例えば、細胞において発現された場合に負のTGF-シグナルを正のIL-12シグナルに変換すること）を保ちながらのTGF R-IL12R 1受容体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のTGF R-IL12R 1受容体は、SEQ ID NO:123に示されるTGF R-IL12R 1受容体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のTGF R-IL12R 1受容体は、SEQ ID NO:124に示されるTGF R-IL12R 1受容体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

40

【 0 3 5 1 】

一態様では、本発明において使用するために適したスイッチ受容体は、TGF R-IL12R

50

2受容体である。TGF R-IL12R 2受容体は、細胞において発現された場合に負のTGFシグナルを正のIL-12シグナルに変換する。一態様では、TGF R-IL12R 2受容体は、以下に示される核酸配列：

```
ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGA
CGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAGAAGTCGGTTAATAACGA
CATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAA
TTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAA
CTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTAT
GGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCA
AGCTCCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATT
ATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTC
TGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAAT
CCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACC
ACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACCAGCAAAAGGTGTTTG
TTCTCCTAGCAGCCCTCAGACCTCAGTGGTGTAGCAGAGAAATTCCAGATCCA
GCAAATAGCACTTGCGCTAAGAAATATCCCATTCAGAGGAGAAGACACAGC
TGCCCTTGACAGGCTCCTGATAGACTGGCCCACGCCTGAAGATCCTGAACC
GCTGGTCATCAGTGAAGTCCTTCATCAAGTGACCCCAGTTTTTCAGACATCCCC
CCTGCTCCAACTGGCCACAAAGGGAAAAAGGAATCCAAGGTCATCAGGCCTC
TGAGAAAGACATGATGCACAGTGCCTCAAGCCCACCACCTCCAAGAGCTCTC
CAAGCTGAGAGCAGACAACCTGGTGGATCTGTACAAGGTGCTGGAGAGCAGG
GGCTCCGACCCAAAGCCAGAAAACCCAGCCTGTCCCTGGACGGTGCTCCCAG
CAGGTGACCTTCCCACCCATGATGGCTACTTACCCTCCAACATAGATGACCTC
CCCTCACATGAGGCACCTCTCGCTGACTCTCTGGAAGAACTGGAGCCTCAGC
ACATCTCCCTTTCTGTTTTCCCTCAAGTTCTCTTACCCACTCACCTTCTCCTG
TGGTGATAAGCTGACTCTGGATCAGTTAAAGATGAGGTGTGACTCCCTCATGC
TC (SEQ ID NO:126)
```

10

20

30

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

```
MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYH
DFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQ
VTGISLLPPLGVAISVIIIIFYQQKVFVLLAALRPQWCSREIPDPANSTCAKKYPIAEE
KTQLPLDRLLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQVTPVFRHPPCSNWPQREKGIQGHQAS
EKDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLYKVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGD
LPTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLD
QLKMRCDSLML (SEQ ID NO:125)
```

40

50

を含む。

【0352】

その意図する生物学的活性（例えば、細胞において発現された場合に負のTGF-シグナルを正のIL-12シグナルに変換すること）を保ちながらのTGF R-IL12R 2受容体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のTGF R-IL12R 2受容体は、SEQ ID NO: 125に示されるTGF R-IL12R 2受容体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のTGF R-IL12R 2受容体は、SEQ ID NO: 126に示されるTGF R-IL12R 2受容体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

【0353】

一態様では、本発明において使用するために適したスイッチ受容体は、TIM3-CD28受容体である。TIM3-CD28受容体は、細胞において発現された場合に負のTIM-3シグナルを正のCD28シグナルに変換する。一態様では、TIM3-CD28受容体は、以下に示される核酸配列：

```
ATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCTGCTACTACTT
ACAAGGTCCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATGCCTATC
TGCCCTGCTTCTACACCCAGCCGCCAGGGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGG
GGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTG
ATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTT
CCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGT
GGGATCTACTGCTGCCGAATCCAAATCCCAGGCATAATGAATGATGAAAAAT
TTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCG
GCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACAT
GGCCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGACATAAATCTAACAC
AAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGGTTGGCCAATGACTTA
CGGGACTCCGGAGCAACCATCAGATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAG
TCCTGGCTTGCTATAGCTTACTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG
CCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
TTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:128)
```

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

10

20

30

40

50

MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWG
KGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIY
CCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRMLTTRGHGPAETQT
LGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRFWVLVVVGVLACYSLLVT
VAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID
NO:127)

を含む。

10

【0354】

その意図する生物学的活性（例えば、細胞において発現された場合に負のTIM-3シグナルを正のCD28シグナルに変換すること）を保ちながらのTIM3-CD28受容体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のTIM3-CD28受容体は、SEQ ID NO:127に示されるTIM3-CD28受容体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のTIM3-CD28受容体は、SEQ ID NO:128に示されるTIM3-CD28受容体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

20

【0355】

本発明において使用するために適した他のドミナントネガティブ型受容体およびスイッチ受容体は、PCT公報番号WO2013019615A2に記載されており、その開示は、参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0356】

D. 二重特異性抗体

本発明は、二重特異性抗体をコードする核酸を含む改変された免疫細胞またはその前駆細胞、例えば、改変されたT細胞のための組成物および方法を提供する。したがって、いくつかの態様では、免疫細胞は、二重特異性抗体を発現するように遺伝的に改変されている。本明細書に用いられる「二重特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原エピトープに対して結合特異性を有する抗体を指す。一態様では、エピトープは、同じ抗原に由来する。別の態様では、エピトープは、2つの異なる抗原に由来する。二重特異性抗体を製作するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、二重特異性抗体は、2つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の共発現を用いて組み換え産生することができる。例えば、Milstein et al. (1983) Nature 305: 537-39を参照されたい。あるいは、二重特異性抗体は、化学結合を用いて調製することができる。例えば、Brennan et al. (1985) Science 229:81を参照されたい。二重特異性抗体は、二重特異性抗体フラグメントを含む。例えば、Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48, Gruber et al. (1994) J. Immunol. 152:5368を参照されたい。

40

【0357】

ある特定の態様では、本発明の改変された細胞は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するCARおよび二重特異性抗体を含む。ある特定の態様では

50

、本発明の改変された細胞は、二重特異性抗体を分泌する。

【0358】

一態様では、二重特異性抗体は、第1の抗原に結合する第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原に結合する第2の抗原結合ドメインを含む。いくつかの態様では、二重特異性抗体は、第1および第2の一本鎖可変フラグメント (scFv) 分子を含む抗原結合ドメインを含む。一態様では、第1および第2の抗原結合ドメインは、標的細胞上の抗原および活性化T細胞上の抗原と結合する。

【0359】

一態様では、二重特異性抗体は、活性化T細胞上の少なくとも1つの抗原に対する特異性を含む。活性化T細胞抗原は、別の細胞を活性化することができるT細胞の表面に見出される抗原を含む。活性化T細胞抗原は、共刺激分子と結合する場合がある。共刺激分子は、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要な、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子である。活性化T細胞抗原の例は、CD3、CD4、CD8、T細胞受容体 (TCR)、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、またはそれらの任意のフラグメントが含むことができるが、それに限定されるわけではない。いくつかの態様では、二重特異性抗体は、T細胞抗原CD28に対する特異性を含む。

【0360】

他の共刺激エレメントもまた、本発明の範囲内である。これらの例では、二重特異性抗体はT細胞抗原を認識し、Bispecific T Cell Engager (BiTE) と称される場合がある。しかし、本発明は、いずれかの特定の二重特異性抗体の使用に限定されるわけではない。それどころか、あらゆる二重特異性抗体またはBiTEを使用することができる。二重特異性抗体またはBiTE分子はまた、少なくとも1つの標的細胞関連抗原に対して特異性を有する可溶性タンパク質として発現される場合もある。

【0361】

一態様では、二重特異性抗体は、1つよりも多い抗原結合ドメインを含む。この態様では、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、合成抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖可変フラグメント、単ドメイン抗体、それらの抗原結合フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせを含む。ヒト抗体およびヒト化抗体を作製するための技法は、本明細書の他の箇所に記載されている。

【0362】

いくつかの態様では、二重特異性抗体は、1つよりも多い抗原結合ドメインを含み、その際、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、負のシグナル伝達分子 (例えば、二重特異性抗体を分泌している細胞の微小環境中に見出され得る負のシグナル伝達分子) またはその相互作用パートナー (例えば、受容体) に結合する。いくつかの態様では、二重特異性抗体の少なくとも1つの抗原結合ドメインは、TGF- β またはその相互作用パートナー (例えば、受容体) に結合する。いくつかの態様では、二重特異性抗体の少なくとも1つの抗原結合ドメインは、PD-1またはその相互作用パートナーに結合する。一態様では、二重特異性抗体の少なくとも1つの抗原結合ドメインは、TGF- β Rに結合する。別の態様では、二重特異性抗体の少なくとも1つの抗原結合ドメインは、PD-L1に結合する。

【0363】

いくつかの態様では、二重特異性抗体は、T細胞上の分子に結合し、かつT細胞を活性化する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。例えば、本開示の二重特異性抗体は、その内容がその全体で本明細書に組み入れられる米国特許第7,585,960号に記載されるようなスーパーアゴニスト抗CD28結合ドメインを含み得る。

【0364】

いくつかの態様では、二重特異性抗体は、PD-L1と結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。例えば、本開示の二重特異性抗体は、非限定的に、その内容がその全体で本明細書に組み入れられるPCT公報番号WO2007005874A2に記載のような、10A5、

10

20

30

40

50

13G4、または1B12に由来するPD-L1結合ドメインを含み得る。いくつかの態様では、二重特異性抗体は、TGF- β 受容体、例えば、TGF β RIIと結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。例えば、本開示の二重特異性抗体は、非限定的に、その内容がその全体で本明細書に組み入れられる米国特許第8,147,834号に記載のような、TGF β 1またはTGF β 3に由来するTGF β RII結合ドメインを含み得る。

【0365】

したがって、一態様では、本開示の二重特異性抗体は、PD-L1またはTGF β RIIと結合する少なくとも1つの抗原結合ドメイン、およびCD28と結合する抗原結合ドメインを含む。

【0366】

いくつかの態様では、標的細胞抗原は、T細胞受容体が結合するものと同じ抗原であり得、または異なる抗原であり得る。標的細胞抗原は、任意の腫瘍関連抗原（TAA）またはウイルス、細菌および寄生虫抗原、またはそれらの任意のフラグメントを含む。標的細胞抗原は、標的細胞を定義する任意の種類のリガンドを含み得る。例えば、標的細胞抗原は、特定の疾患状態に関連する標的細胞上の細胞マーカーとして作用するリガンドを認識するように選ばれる場合がある。したがって、細胞マーカーは、ウイルス、細菌および寄生虫感染、自己免疫疾患およびがん細胞に関連するものを含む、二重特異性抗体における抗原結合ドメインに対するリガンドとして作用する場合がある。

【0367】

いくつかの態様では、標的細胞抗原は、非限定的に、CD3、CD4、CD8、T細胞受容体（TCR）、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびそれらのフラグメントを含む、活性化T細胞抗原と同じ抗原である。一局面では、本発明は、標的細胞上の抗原および活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸を含み、その際、T細胞は、二重特異性抗体を一過性に分泌する。二重特異性抗体を操作および発現させるための技法は、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え共発現（例えば、Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)、WO93/08829、およびTraunecker et al, EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照されたい）、および「ノブ-イン-ホール（knob-in-hole）」技法（例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい）を含むが、それに限定されるわけではない。多重特異性抗体はまた、抗体Fc-ヘテロ二量体分子（WO2009/089004A1）を作製するために静電操縦効果（electrostatic steering effect）を操作すること；2つ以上の抗体またはフラグメントを架橋すること（例えば、米国特許第4,676,980号、およびBrennan et al, Science 229:81 (1985)を参照されたい）；ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること（例えば、Kostelny et al, J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992)を参照されたい）；二重特異性抗体フラグメントを作製するために「ダイアボディー（diabody）」技法を使用すること（例えば、Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照されたい）；および一本鎖Fv（scFv）二量体を使用すること（例えば Gruber et al, J. Immunol, 152:5368 (1994)を参照されたい）；および例えば、Tutt et al, J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されるように三重特異性抗体を調製することによって作製される場合がある。「タコ足型抗体（Octopus antibody）」を含む、3つまたはそれよりも多い機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる（例えば、US2006/0025576A1を参照されたい）。二重特異性抗体は、2つの異なる抗体またはその部分を連結することによって構築することができる。例えば、二重特異性抗体は、2つの異なる抗体由来のFab、F(ab')₂、Fab'、scFv、およびsdAbを含むことができる。

【0368】

本発明の二重特異性抗体は、PD-L1およびCD28に対して親和性を有する二重特異性抗体を含む。一態様では、本発明の13G4-1211 PD-L1/CD28二重特異性抗体は、以下に示される核酸配列：

10

20

30

40

ATGGGGTGGTCGTGTATCATCCTGTTCTGGTCGCGACAGCAACCGGCGTGCA
TTCGGCCATACAGCTGACCCAGAGCCCCTCCTCCCTCTCCGCTTCCGTGGGGG
ACCGCGTGACAATCACGTGCCGCGCCAGCCAGGGAATCTCCTCGGCCCTCGC
CTGGTACCAGCAGAAACCCGGGAAGGCTCCCAAGCTGCTCATCTACGATGCC
TCCTCGCTTGAGTCGGGCGTGCCATCCAGGTTCTCCGGATCCGGGTCCGGAAC
CGACTTTACACTCACGATTTCTCTCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACATACT
ACTGTCAGCAGTTCAACTCCTACCCATTCACCTTCGGCCCCGGGCACCAAGGTG
GACATCAAGTCTGGCGGGGGAGGCTCCGAAGTCCAGCTCGTGGAATCCGGGG
GCGGTCTCGTGCAGCCAGGCCGGAGTCTGCGCCTGTCTTGCGCTGCCTCGGGG
ATCACTTTTCGACGACTACGGCATGCATTGGGTTCGCCAGGCCCCAGGGAAGG
GGTTGGAGTGGGTCAGTGGCATTTCATGGAACAGGGGGCGCATCGAATACGC
CGACTCCGTTAAGGGCAGATTACCATCTCGCGCGATAACGCCAAAAACAGT
CTCTACCTCCAGATGAACTCGCTTCGAGCAGAGGATACTGCCCTGTACTATTG
CGCGAAGGGACGCTTCCGCTACTTTGACTGGTTTCTGGACTACTGGGGCCAGG
GGACACTGGTGACGGTGTCTCGTGGGGGGCGGGGGGAGTCAGGTGCAGCTGGT
GCAGTCCGGAGCCGAGGTAAAGAAGCCAGGCGCTTCCGTCAAGGTGTCATGC
AAGGCCTCAGGCTACACCTTCACAAGCTATTACATCCACTGGGTGCGCCAAG
CTCCCGGTCAGGGCTTGGAGTGGATCGGGTGCATTTACCCAGGGAACGTCAA
CACAACTACAACGAGAAGTTCAAGGATCGGGCAACCCTGACCGTGGACACA
TCCATCTCTACCGCCTACATGGAGCTGTACGCCTGCGCTCTGATGACACCGC
AGTGTACTTCTGTACCAGGAGTCACTACGGCCTGGACTGGAACCTTTGATGTCT
GGGGCCAGGGAACCAACCGTGACGGTGTCCAGTGTGGAGGGCGGTAGTGGCG
GCTCTGGTGGGTCCGGAGGCTCAGGCGGCGTGATGGATGACATTCAGATGAC
CCAGAGTCCCTCCTCCCTCTCCGCTTCCGTCCGAGACCGCGTGACCATCACTT
GTCACGCCTCACAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAACAGAAGCC
CGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTTATCTATAAAGCGTCCAACCTCCACACGGGA
GTCCCTTCCCGCTTCTCCGGATCCGGCAGTGGGACGGACTTCACACTCACAAT
CTCGTCGCTGCAGCCAGAGGACTTTGCGACGTACTACTGCCAGCAGGGCCAG
ACCTACCCATATACTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAGAT (SEQ ID NO:130)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

MGWSCHLFLVATATGVHSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ
QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSY
PFTFGPGTKVDIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGITFDDYGMH
WVRQAPGKGLEWVSGISWNRGRIEYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE
DTALYYCAKGRFRYFDWFLDYWGQGLTVTVSSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG
ASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRAT
LTVDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSVEG
GSGGSGGSGGSGGVMDDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ
QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQT
YPYTFGGGKVEI (SEQ ID NO:129)

10

を含む。

【0369】

その意図する生物学的活性（例えば、PD-L1およびCD28への結合性）を保ちながらの13G4-1211 PD-L1/CD28二重特異性抗体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明の13G4-1211 PD-L1/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO:129に示される13G4-1211 PD-L1/CD28二重特異性抗体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明の13G4-1211 PD-L1/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO:130に示される13G4-1211 PD-L1/CD28二重特異性抗体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

20

30

【0370】

本発明の二重特異性抗体は、PD-L1およびCD28に対して親和性を有する二重特異性抗体を含む。一態様では、本発明の10A5-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGGGCTGGAGTTGCATCATTCTCTTCCTCGTGGCGACCGCAACAGGGGTGCA
CTCCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGTTCCTGTCTGCTTCCGTGGGAG
ATCGCGTGACTATCACCTGCCGGGCTTCCCAGGGCATCTCTTCCTGGCTGGCG
TGGTACCAGCAGAAACCAGAAAAGGCTCCTAAGTCCCTGATCTACGCAGCTT
CGTCCCTCCAATCCGGCGTCCCTCTCGCTTCTCCGGCTCCGGATCCGGCACC
GACTTCACGCTGACAATCTCGAGTTTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTA
CTGCCAGCAGTACAACCTCCTACCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTC
GAAATCAAGTCGGGGGGGGGGCGGGTCGCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCG
CCGAAGTCAAGAAGCCCGGAGCAAGTGTGAAAGTGTCTGCAAGGCAAGTG
GGTATACCTTCACCTCATACGACGTACACTGGGTGCGCCAGGCGCCCGGTCA
GCGCCTTGAGTGGATGGGCTGGCTCCACGCCGACACCGGCATTACCAAGTTCT
CTCAGAAGTTCCAGGGAAGAGTGACCATAACACGCGACACCAGTGCTTCCAC
AGCTTACATGGAACTTTCGAGTCTGAGATCCGAGGACACAGCCGTGTATTACT
GTGCCCGTGAGCGCATCCAGCTGTGGTTCGACTACTGGGGGCAGGGCACCCCT
CGTGACGGTGTCGTCTGGGGGGCGGGGGGAGTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCC
GGAGCCGAGGTAAAGAAGCCAGGCGCTTCCGTCAAGGTGTCATGCAAGGCCT
CAGGCTACACCTTCACAAGCTATTACATCCACTGGGTGCGCCAAGCTCCCGGT
CAGGGCTTGGAGTGGATCGGGTGCATTTACCCAGGGAACGTCAACACAACT
ACAACGAGAAGTTCAAGGATCGGGCAACCCTGACCGTGGACACATCCATCTC
TACCGCCTACATGGAGCTGTCACGCCTGCGCTCTGATGACACCGCAGTGTACT
TCTGTACCAGGAGTCACTACGGCCTGGACTGGAACTTTGATGTCTGGGGCCAG
GGAACCACCGTGACGGTGTCCAGTGTGGAGGGCGGTAGTGGCGGCTCTGGTG
GGTCCGGAGGCTCAGGCGGCGTGATGGATGACATTCAGATGACCCAGAGTCC
CTCCTCCCTCTCCGCTTCCGTCTGGAGACCGCGTGACCATCACTTGTCACGCCT
CACAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAACAGAAGCCCGGCAAGGC
CCCCAAGCTGCTTATCTATAAAGCGTCCAACCTCCACACGGGAGTCCCTTCCC
GCTTCTCCGGATCCGGCAGTGGGACGGACTTCACACTCACAATCTCGTCGCTG
CAGCCAGAGGACTTTGCGACGTACTACTGCCAGCAGGGCCAGACCTACCCAT
ATACTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAGAT (SEQ ID NO:132)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MGWSCHLFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWY
QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN
SYPYTFGQGTKLEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYD
VHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARERIQLWFDYWGGQTLTVTVSSGGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGA
SVKVSCASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATL
TVDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTITVTVSSVEGG
SGGSGSGSGSGVMDDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICHASQNIYVWLNWYQQ
KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTY
PYTFGGGGTKVEI (SEQ ID NO:131)

10

を含む。

【 0 3 7 1 】

その意図する生物学的活性（例えば、PD-L1およびCD28への結合性）を保ちながらの10A5-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明の10A5-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO : 131に示される10A5-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明の10A5-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO : 132に示される10A5-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

20

30

【 0 3 7 2 】

本発明の二重特異性抗体は、PD-L1およびCD28に対して親和性を有する二重特異性抗体を含む。一態様では、本発明の1B12-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGGGCTGGAGTTGCATCATCCTCTTTCTAGTCGCCACGGCCACCGGCGTACA
CTCAGAGATCGTGCTGACACAGTCGCCTGCGACGCTGTCGCTCAGTCCAGGG
GAGCGCGCTACTCTCTCCTGCCGCGCGTCGCAGAGCGTGTGCTCCTACTTGGC
CTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCGCGCCTGCTGATATACGACGCC
TCGAACAGAGCCACGGGCATCCCCGCCCGTTTTAGTGGCTCCGGGTCTGGGGA
CCGACTTCACTCTGACAATCTCATCCCTCGAGCCCGAGGATTTGCGCGTGTAC
TACTGTGAGCAGCGCTCGAATTGGCCAACCTTCGGGCAGGGGACGAAAGTTG
AGATCAAAAGCGGCGGCGGGGGCAGCCAGGTCCAGCTCGTCCAGTCTGGCGC
CGAGGTCAAAAAGCCGGGCTCTTCGGTCAAGGTCTCCTGCAAGACTTCCGGC
GACACCTTCTCCTCCTATGCTATCTCCTGGGTGCGGCAGGCCCCGGGGCAGGG
CCTGGAGTGGATGGGAGGCATCATCCCAATCTTTGGGAGGGGCCACTACGCC
CAGAAGTTCCAGGGACGCGTGACAATCACCGCAGACGAGTCCACATCCACTG
CCTACATGGAGTTGTCTCGCTCCGGTCGGAGGATACTGCCGTGTACTTCTGC
GCCCCGGAAGTTCCACTTCGTGTGAGGCTCCCCCTTCGGGATGGACGTGTGGGG
ACAAGGAACCGTGACGGTGTGTCGGGGGGCTCGTCGGGGGGCGGGGGGAG
TCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTAAAGAAGCCAGGCGCTTCC
GTCAAGGTGTCATGCAAGGCCTCAGGCTACACCTTCACAAGCTATTACATCCA
CTGGGTGCGCCAAGCTCCCGGTGAGGGCTTGGAGTGGATCGGGTGCATTTAC
CCAGGGAACGTCAACACAACTACAACGAGAAGTTCAAGGATCGGGCAACC
CTGACCGTGGACACATCCATCTCTACCGCCTACATGGAGCTGTCACGCCTGCG
CTCTGATGACACCGCAGTGTACTTCTGTACCAGGAGTCACTACGGCCTGGACT
GGAACTTTGATGTCTGGGGCCAGGGAACCAACCGTGACGGTGTCCAGTGTGGA
GGGCGGTAGTGGCGGCTCTGGTGGGTCCGGAGGCTCAGGCGGCGTGATGGAT
GACATTCAGATGACCCAGAGTCCCTCCTCCCTCTCCGCTTCCGTCGGAGACCG
CGTGACCATCACTTGTACGCCTCACAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGT
ACCAACAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTTATCTATAAAGCGTCCAA
CCTCCACACGGGAGTCCCTTCCCGCTTCTCCGGATCCGGCAGTGGGACGGACT
TCACACTCACAATCTCGTCGCTGCAGCCAGAGGACTTTGCGACGTACTACTGC
CAGCAGGGCCAGACCTACCCATATACTTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAGA
T (SEQ ID NO:134)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MGWSCHLFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ
QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSN
WPTFGQGTKVEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSSYAI
WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGRAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED
TAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGT VTVSSGGSSGGGGGSQVQLVQSGAEVK
KPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKD
RATLTVDTISSTAYMELSR LRSDDTAVYFCSTRSHYGLDWNFDVWGQGT VTVSS
VEGGSGSGSGSGSGGVMDDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNW
YQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQG
QTPYPTFGGGTKVEI (SEQ ID NO:133)

10

を含む。

【 0 3 7 3 】

その意図する生物学的活性（例えば、PD-L1およびCD28への結合性）を保ちながらの1B12-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明の1B12-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO: 133に示される1B12-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明の1B12-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO: 134に示される1B12-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

20

30

【 0 3 7 4 】

本発明の二重特異性抗体は、TGF- 受容体II型（TGF RII）およびCD28に対して親和性を有する二重特異性抗体を含む。一態様では、本発明のTGF R-1-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGGGTTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTCGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCA
CTCCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG
AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGCGAGCTACTTAGC
CTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCAT
CCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
AGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATT
ACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGT
GGAAATCAAAAGTGGAGGGGGCGGTTTACAGCTGCAGGTGCAGGAGTCGGG
CCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTG
GTGGCTCCATCAGCAACAGTTATTTCTCCTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCA
GGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGAGTTTCTATTATGGTGAAAAAACCTACT
ACAACCCGTCCCTCAAGAGCCGAGCCACCATATCCATTGACACGTCCAAGAG
CCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATT
ACTGTCCGAGAGGGCCTACTATGATTTCGGGGAGTTATAGACTCCTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTGACGGTGTCTGTCGGGGGGCGGGGGGAGTCAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCCGGAGCCGAGGTAAAGAAGCCAGGCGCTTCCGTCAAGGTGTCAT
GCAAGGCCTCAGGCTACACCTTCACAAGCTATTACATCCACTGGGTGCGCCA
AGCTCCCGGTGAGGGCTTGGAGTGGATCGGGTGCAATTAACCAAGGAACGTC
AACACAACTACAACGAGAAGTTCAAGGATCGGGCAACCCTGACCGTGGACA
CATCCATCTCTACCGCCTACATGGAGCTGTCACGCCTGCGCTCTGATGACACC
GCAGTGTACTTCTGTACCAGGAGTCACTACGGCCTGGACTGGAACCTTTGATGT
CTGGGGCCAGGGAACCAACCGTGACGGTGTCCAGTGTGGAGGGCGGTAGTGGC
GGCTCTGGTGGGTCCGGAGGCTCAGGCGGCGTGATGGATGACATTCAGATGA
CCCAGAGTCCCTCCTCCCTCTCCGCTTCCGTTCGGAGACCGCGTGACCATCACT
TGTCACGCCTCACAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAACAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTTATCTATAAAGCGTCCAACCTCCACACGGG
AGTCCCTTCCCGCTTCTCCGGATCCGGCAGTGGGACGGACTTCACACTCACAA
TCTCGTCGCTGCAGCCAGAGGACTTTGCGACGTACTACTGCCAGCAGGGCCA
GACCTACCCATATACTTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAGATTAAG (SEQ ID
NO:136)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQ
QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSN
WPPTFGQGKVEIKSGGGGSQLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSW
GWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRAITISIDTSKSFSLKLSSVTAADT
AVYYCPRGPTMIRGVDSWGQGTLLTVSSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTSYIHWRQAPGGGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVD
TSISTAYMELSRRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTITVTVSSVEGGSGG
SGGSGGSGGVMDDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPG
KAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTPYT
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:135)

10

を含む。

【 0 3 7 5 】

その意図する生物学的活性（例えば、TGF RIIおよびCD28への結合性）を保ちながらのTGF R-1-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のTGF R-1-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO：135に示されるTGF R-1-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のTGF R-1-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO：136に示されるTGF R-1-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

20

30

【 0 3 7 6 】

本発明の二重特異性抗体は、TGF- 受容体II型（TGF RII）およびCD28に対して親和性を有する二重特異性抗体を含む。一態様では、本発明のTGF R-3-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGGGTTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTCGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCA
CTCCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG
AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGAAGTTTCTTAGCC
TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATC
CAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA
CTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
GAAATCAAAAGTGGAGGGGGGCGGTTACAGCTACAGCTGCAGGAGTCGGGC
CCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTATCCCTCACCTGCACTGTCTCTGG
TGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTCCTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG
GGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTTTCTATTACAGTGGGATCACCTACTA
CAGCCCGTCCCTCAAGAGTCGAATTATCATATCCGAAGACACGTCCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTA
CTGTGCGAGCGGGTTTACTATGATTTCGGGGAGCCCTTGACTACTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTGACGGTGTCTGTCGGGGGGCGGGGGGAGTCAGGTGCAGCTGG
TGCAGTCCGGAGCCGAGGTAAAGAAGCCAGGCGCTTCCGTCAAGGTGTCATG
CAAGGCCTCAGGCTACACCTTACAAGCTATTACATCCACTGGGTGCGCCAA
GCTCCCGGTCAGGGCTTGGAGTGGATCGGGTGCATTTACCCAGGGAACGTCA
ACACAAACTACAACGAGAAGTTCAAGGATCGGGCAACCCTGACCGTGGACAC
ATCCATCTCTACCGCCTACATGGAGCTGTACGCCTGCGCTCTGATGACACCG
CAGTGTACTTCTGTACCAGGAGTCACTACGGCCTGGACTGGAACTTTGTATGTC
TGGGGCCAGGGAACCACCGTGACGGTGTCCAGTGTGGAGGGCGGTAGTGGCG
GCTCTGGTGGGTCCGGAGGCTCAGGCGGCGTGATGGATGACATTCAGATGAC
CCAGAGTCCCTCCTCCCTCTCCGCTTCCGTTCGGAGACCGCGTGACCATCACTT
GTCACGCCTCACAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAACAGAAGCC
CGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTTATCTATAAAGCGTCCAACCTCCACACGGGA
GTCCCTTCCCGCTTCTCCGGATCCGGCAGTGGGACGGACTTCACACTCACAAT
CTCGTCGCTGCAGCCAGAGGACTTTGCGACGTACTACTGCCAGCAGGGCCAG
ACCTACCCATATACTTTCGGCGGGCGGGACCAAGGTGGAGATTAAG (SEQ ID
NO:138)

10

20

30

40

によってコードされ得る、以下に示されるアミノ酸配列：

50

MGWSCHLFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSFLAWYQ
QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSN
WPPTFGQGKVEIKSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYSW
GWIRQPPGKGLEWIGSFYYSGITYYSPSLKSRHISEDTSKNQFSKLSSVTAADTA
VYYCASGFTMIRGALDYWGQGTLLVTVSSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV
SCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVD
SISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSVEGGSGGS
GGSGSGGVMDDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGK
APKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSSLQPEDFATYYCQQGQTPYTF
GGGKVEIK (SEQ ID NO:137)

を含む。

【0377】

その意図する生物学的活性（例えば、TGF RIIおよびCD28への結合性）を保ちながらのTGF R-3-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。したがって、本発明のTGF R-3-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO:137に示されるTGF R-3-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体のアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。したがって、本発明のTGF R-3-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体は、SEQ ID NO:138に示されるTGF R-3-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体の核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸によってコードされ得る。

【0378】

本発明において使用するための他の適切な二重特異性抗体は、その開示が、参照により本明細書に組み入れられるPCT公報番号WO2016122738A1に記載されている。

【0379】

E. 核酸および発現ベクター

本発明は、CARならびに／またはドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体をコードする核酸を提供する。一態様では、本開示の核酸は、本発明の対象のCAR（例えば、PSMA-CAR）をコードする核酸配列を含む。一態様では、本開示の核酸は、ドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体（例えば、PD1-PTM-CD28受容体）をコードする核酸配列を含む。

【0380】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、例えば、哺乳動物細胞における本明細書に記載されるようなCARならびに／またはドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体の産生を提供する。いくつかの態様では、本開示の核酸は、CARならびに／またはドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体をコードする核酸の増幅を提供する。

【0381】

本明細書に記載されるように、対象のCARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む。したがって、本開示は、対象のCARの抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインをコードする核酸を提供する。本明細書に記載されるように、様々なドミナントネガティブ型受容体およびスイッチ受容体が提供される。したがって、本発明は、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸を提供する。

【0382】

いくつかの態様では、CARをコードする核酸は、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸と別個である。例示的な態様では、CARをコードする核酸と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸とは、同じ核酸内に存在する。

【0383】

いくつかの態様では、本発明の核酸は、CARのコード配列と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体のコード配列とを含む核酸を含む。いくつかの態様では、本発明の核酸は、リンカーにより隔てられている、CARのコード配列と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体のコード配列とを含む核酸を含む。本発明において使用するための（例えば、CARのコード配列と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体のコード配列とを連結する状況での）リンカーは、複数のタンパク質が同じ核酸配列（例えば、多シストロン性または2シストロン性配列）によってコードされることを可能にし、それらのタンパク質は、別々のタンパク質成分に解離されるポリタンパク質として翻訳される。例えば、CARのコード配列と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体のコード配列とを含む本開示の核酸に使用するためのリンカーは、CARならびにドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体が、別々のCARならびにドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体成分に解離されるポリタンパク質として翻訳されることを可能にする。

【0384】

いくつかの態様では、リンカーは、配列内リボソーム進入部位（IRES）をコードする核酸配列を含む。本明細書に用いられる「配列内リボソーム進入部位」または「IRES」は、タンパク質コード領域のATGなどの開始コドンへの直接の配列内リボソーム進入を促進するエレメントであって、それにより、遺伝子のcap非依存的翻訳をもたらすエレメントを指す。非限定的に、ウイルスまたは細胞mRNA供給源から入手可能なIRES、例えば、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質（BiP）；血管内皮増殖因子（VEGF）；線維芽細胞増殖因子2；インスリン様増殖因子；翻訳開始因子eIF4G；酵母転写因子TFIIDおよびHAP4；ならびに例えば、カルジオウイルス、ライノウイルス、アフトウイルス、HCV、フレンドマウス白血病ウイルス（FrMLV）、およびモロニー Maus白血病ウイルス（MoMLV）から入手可能なIRESを含む、様々な配列内リボソーム進入部位が、当業者に公知である。当業者は、本発明において使用するために適したIRESを選択することが可能であろう。

【0385】

いくつかの態様では、リンカーは、自己切断型ペプチドをコードする核酸配列を含む。本明細書に用いられる「自己切断型ペプチド」または「2Aペプチド」は、翻訳されると成分タンパク質に解離するポリタンパク質として複数のタンパク質をコードできるようにするオリゴペプチドを指す。「自己切断型」という用語の使用は、タンパク質分解切断反応を意味することが意図されない。ピコルナウイルス科（Picornaviridae）ウイルスファミリーのメンバー、例えば、口蹄疫ウイルス（FMDV）、ウマ鼻炎Aウイルス（ERAV）、ゾセアアシグナウイルス（TaV）、およびブタテッシュウウイルス-1（PTV-1）；ならびにタイロウイルスおよび脳心筋炎ウイルスなどのカルジオウイルスに見出されるものを非限定的に含む様々な自己切断型ペプチドまたは2Aペプチドが、当業者に公知である。FMDV、ERAV、PTV-1、およびTaVに由来する2Aペプチドは、本明細書においてそれぞれ「F2A」、「E2A」、「P2A」、および「T2A」と称される。当業者は、本発明において使用

10

20

30

40

50

するために適した自己切断型ペプチドを選択することが可能であろう。

【0386】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、T2Aペプチド配列を含むリンカーにより隔てられている、CARのコード配列と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体のコード配列とを含む核酸配列を含む。いくつかの態様では、T2Aペプチド配列は、核酸配列

GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCC

CT (SEQ ID NO:140)

によってコードされ得る、アミノ酸配列

EGRGSLTCDVEENPGP (SEQ ID NO:139)

10

を含む。いくつかの態様では、T2Aペプチド配列を含むリンカーは、本明細書に記載されるようなスペーサー配列をさらに含み得る。例えば、T2Aペプチド配列を含むリンカーは、核酸配列

TCCGGAAGATCTGGCGGCGGA (SEQ ID NO:142)

によってコードされ得る、アミノ酸配列SGRSGGG (SEQ ID NO:141) を含むスペーサー配列をさらに含み得る。

【0387】

20

いくつかの態様では、本開示の核酸は、F2Aペプチド配列を含むリンカーにより隔てられている、CARのコード配列と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体のコード配列とを含む核酸配列を含む。いくつかの態様では、F2Aペプチド配列は、核酸配列

GTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTC

CAACCCAGGGCCG (SEQ ID NO:144)

によってコードされ得る、アミノ酸配列

VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:143)

30

を含む。

【0388】

いくつかの態様では、リンカーは、フューリン切断部位をコードする核酸配列をさらに含む。フューリンは、トランスゴルジ中に存在し、かつタンパク質前駆体をそれらの分泌の前にプロセッシングする、遍在的に発現されるプロテアーゼである。フューリンは、そのコンセンサス認識配列のCOOH-末端で切断する。非限定的に、Arg-Gln-Lys-Arg (SEQ ID NO:148) などのArg-X-Lys-Arg (SEQ ID NO:145) またはArg-X-Arg-Arg (SEQ ID NO:146)、およびArg-X-X-Arg (SEQ ID NO:147) [配列中、Xは、任意の天然アミノ酸である] を含む、様々なフューリンコンセンサス認識配列 (または「フューリン切断部位」) が、当業者に公知である。フューリン切断部位の別の例は、X1-Arg-X2-X3-Arg (SEQ ID NO:149) [配列中、X1はLysまたはArgであり、X2は任意の天然アミノ酸であり、X3はLysまたはArgである] である。当業者は、本発明において使用するために適したフューリン切断部位を選択することが可能であろう。

40

【0389】

いくつかの態様では、リンカーは、フューリン切断部位と2Aペプチドとの組み合わせをコードする核酸配列を含む。例には、フューリンおよびF2Aをコードする核酸配列を含むリンカー、フューリンおよびE2Aをコードする核酸配列を含むリンカー、フューリンおよびP2Aをコードする核酸配列を含むリンカー、フューリンおよびT2Aをコードする核酸配列を含むリンカーが含まれるが、それに限定されるわけではない。当業者は、本発明において使用するために適した組み合わせを選択することが可能であろう。そのような態様で

50

は、リンカーは、フューリンと2Aペプチドとの間にスペーサー配列をさらに含み得る。非限定的に、(GS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 1) および(GGGGS)_n (SEQ ID NO: 2) [配列中、nは少なくとも1の整数を表す]などのグリシンセリン(GS)スペーサーを含む、様々なスペーサー配列が当技術分野において公知である。例示的なスペーサー配列は、非限定的に、

GGSG (SEQ ID NO:4), GSGGG (SEQ ID

NO:5), GSGSG (SEQ ID NO:6), GSGGG (SEQ ID NO:7), GGGSG (SEQ ID NO:8),

GSSSG (SEQ ID NO:9)

10

などを含むアミノ酸配列を含むことができる。当業者は、本発明において使用するために適したスペーサー配列を選択することが可能であろう。

【0390】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、フューリン-(G4S)₂-T2A (F-GS2-T2A) リンカーにより隔てられている、CARのコード配列と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体のコード配列とを含む核酸配列を含む。F-GS2-T2Aリンカーは、核酸配列

CGTGCGAAGAGGGGCGGCGGGGGCTCCGGCGGGGGAGGCAGTGAGGGCCGC

GGCTCCCTGCTGACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAACCCAGGCCCC (SEQ ID

NO:150)

20

によってコードされ得、アミノ酸配列

RAKRGGGGSGGGGSEGRGSLTCDVEENPGP (SEQ ID NO:151)

を含み得る。当業者は、本発明のリンカーが、許容される配列バリエーションを含み得ることを認識しているであろう。

【0391】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載されるようなドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸配列を含む核酸を提供する。いくつかの態様では、核酸は、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸配列と、本明細書に記載されるようなCAR (例えば、PSMA-CAR) をコードする核酸配列とを含む。一態様では、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸配列と、CARをコードする核酸配列とは、別々の核酸上に存在する。一態様では、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸配列と、CARをコードする核酸配列とは、同じ核酸内に存在する。そのような態様では、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸配列と、CARをコードする核酸配列とは、本明細書に記載されるようなリンカーにより隔てられている。

30

【0392】

例えば、本開示の核酸は、ドミナント型受容体をコードする核酸配列、リンカー、およびCARをコードする核酸配列を含み得る。一態様では、リンカーは、2Aペプチド (例えば、T2A) をコードする核酸配列を含む。例示的な態様では、本開示の核酸は、T2Aをコードする核酸配列を含むリンカー配列により隔てられた、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸配列と、CARをコードする核酸配列を含み得る。

40

【0393】

したがって、一態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸配列、リンカーをコードする核酸配列、ならびにCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、本開示の核酸は、5'から

50

3'方向に：CARをコードする核酸配列、リンカーをコードする核酸配列、ならびにドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体をコードする核酸配列を含む。

【0394】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：ドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体コードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、ドミナントネガティブ型受容体はTGF RII-DNである。一態様では、CARはマウスJ591 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびマウスJ591 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびマウスJ591 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

```
ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGA
CGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAGAAGTCGGTTAATAACGA
CATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAA
TTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAA
CTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTAT
GGAGAAAGAATGACGAGAACATAA CACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCA
AGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATT
ATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTC
TGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAAT
CCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACC
ACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACC
GGCAGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGAAGATCTGGCGGCGGAGAGGGCAGAG
GAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGAGCCAC
CATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACG
CCGCCAGACCTGGATCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCC
```

10

20

30

40

50

ACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGG
GTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACT
GATTTATTGGGCATCCACTCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCA
GTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTACTAACGTTCACTCTGAAGAC
TTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCCGGTGC
TGGGACCATGCTGGACCTGAAAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGAAG
TTCTGGCGGAGGCAGCGAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAGCTCGTG
AAGCCTGGAACAAGCGTGCGGATCAGCTGCAAGACCAGCGGCTACACCTTCA
CCGAGTACACCATCCACTGGGTCAAGCAGTCCACGGCAAGAGCCTGGAGTG
GATCGGCAATATCAACCCCAACAACGGCGGCACCACTACAACCAGAAGTTC
GAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATG
GAACTGCGGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGTGCCGCCG
GTTGGAAC TTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGTCTAGCGC
TAGCTCCGGAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACC
ATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGG
GGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTG
GGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTCTCCTGTCACTGGTTATCACCC
TTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT
ATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTTC
CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG
CAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA
TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGACGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGA
CCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTA
CAACGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT
GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCT
CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCC
CCTCGC (SEQ ID NO:152)

10

20

30

を含む。

【0395】

40

一態様では、CARはヒト化J591 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、2Aペプチド（例えば、T2A）を含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト化J591 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：ヒト化PSMA-CARをコードする核酸、2Aペプチド（例えば、T2A）を含むリンカーをコードする核酸、ならびにドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸を含む。

【0396】

一態様では、CARはヒト化J591 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリン

50

カーをコードする核酸配列、およびヒト化J591 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、核酸は、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト化J591 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。

【0397】

ヒト化PSMA-CARは、PCT公報番号WO2017212250A1およびWO2018033749A1に開示された重鎖可変領域および軽鎖可変領域のうちのいずれかを含むことができる。例えば、本発明のヒト化PSMA-CARは、それに開示された重鎖可変領域および軽鎖可変領域のうちのいずれかを含むscFvを含むことができる。いくつかの態様では、ヒト化J591 PSMA-CARは、表19に示される重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列のうちのいずれかより選択される重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むヒト化J591 PSMA結合ドメインを含む。

10

【0398】

一態様では、CARはヒト1C3 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGA
CGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAAGTCGGTTAATAACGA
CATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAA
TTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAA
CTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTAT
GGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCA
AGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATT
ATGAAGGAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTC
TGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAAACACCAGCAAT

20

30

40

50

CCTGACTTGTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACC
ACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACC
GGCAGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGAAGATCTGGCGGCGGAGAGGGCAGAG
GAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGAGCCAC
CATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACG
CCGCCAGGCCGCGAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCC
TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCT
ATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATCATATGATGGAAACAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
CGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA
ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGTCCC
CTGGGGATCGAGGTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCTGGGTG
GCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT
GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTG
CTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAATCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTTT
GATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
ACTTATTACTGTCAACAGTTTAAACAGTTATCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGAC
CAAGGTGGAGATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGC
GCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCA
GCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCT
ACATCTGGGCGCCCTTGCGCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTT
ATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAC
AACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTG
CCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAG
CAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC
GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGACGTTTTGGACAAGAGACGTG
GCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAG
GCCTGTACAACGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGAT
TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCA
GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCC
CTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:153)

10

20

30

40

を含む。

【 0 3 9 9 】

一態様では、CARはヒト2A10 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

50

ATGGGTCTGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGA
CGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAGAAGTCGGTTAATAACGA
CATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAA
TTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAA
CTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTAT
GGAGAAAGAATGACGAGAACATAAACAAGTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCA
AGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATT
ATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTC
TGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAAACACCAGCAAT
CCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACC
ACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACC
GGCAGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGAAGATCTGGCGGCGGAGAGGGCAGAG
GAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGAGCCAC
CATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACG
CCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGC
CCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGT
AACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCAGGAAAGGCCTGGAGTGGATGG
GGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGC
CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGA
GCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGGCAAACCTGG
TTTCTCTGGTCTCCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTC
AGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCCATC
CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAAC
AGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCTATGGATCTGGGACAGATTTCACT

10

20

30

40

50

CTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACA
GTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGC
AGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGG
CCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAA
CGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAG
TACAAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA
AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC
CGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA
AGAGAGGAGTACGACGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAACGAACTG
CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA
CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID
NO:154)

10

20

を含む。

【 0 4 0 0 】

一態様では、CARはヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本
発明の核酸は、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカ
ーをコードする核酸配列、およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一
態様では、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーを
コードする核酸配列、およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、
以下に示される核酸配列：

30

ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGA
CGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAGAAGTCGGTTAATAACGA
CATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAA
TTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAA
CTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTAT
GGAGAAAGAATGACGAGAACATAAATACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCA
AGCTCCCCCTACCATGACTTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATT
ATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTCTGTAGCTC
TGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAAT
CCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACC

40

ACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACC
GGCAGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGAAGATCTGGCGGCGGAGAGGGCAGAG
GAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGAGCCAC
CATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACG
CCGCCAGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGC
CCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGC
AACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGG
GGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGC
CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGA
ACAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAACTGG
TTTCTCTGGTCTTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCTGGTCACTGTCTCCTC
AGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCCATC
CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGC
AGAAACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT
CTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACA
GTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
ATCAAAACACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCG
CGTCGCAGCCCCGTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGG
CGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCG
CCCTTGCCCGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTAC
TGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA
GACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGA
AGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGA
CGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
GGACGAAGAGAGGAGTACGACGTTTTTGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCT
GAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAAC
GAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA
GGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA
CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG
C (SEQ ID NO:155)

10

20

30

40

を含む。

【 0 4 0 1 】

一態様では、CARはヒト2C6 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：TGF RII-DNをコードする核酸配列、T2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

50

ATGGGTCTGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGA
CGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAGAAGTCGGTTAATAACGA
CATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAA
TTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAA
CTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTAT
GGAGAAAGAATGACGAGAACATAAACAAGTCTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCA
AGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATT
ATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTC
TGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAAT
CCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACC
ACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACC
GGCAGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGAAGATCTGGCGGCGGAGAGGGCAGAG
GAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGAGCCAC
CATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACG
CCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGATCAGAGGTGAAAAAGCC
CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAACT
ACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGG
GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCC
AGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTATCTGCAGTGGAG
CAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCCCGGGTAT
ACCAGCAGTTGGACTTCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
CTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCT
GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGT
ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCAA
CAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TTCCTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTG
TCAGCAGCGTAGCAACTGGCCCCCTATTCATTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGG

10

20

30

40

50

ATATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCAT
 CGCGTTCGACGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGG
 GGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGG
 CGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTT
 ACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTAT
 GAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA
 GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
 GACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATC
 TAGGACGAAGAGAGGAGTACGACGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACC
 CTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
 ACGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA
 AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCA
 GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCC
 TCGC (SEQ ID NO:156)

10

20

を含む。

【 0 4 0 2 】

TGF RII-DNおよびPSMA-CARをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO : 152 ~ 156のいずれか1つに示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、TGF RII-DNおよびマウスJ591 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 152に示される核酸配列を含む。一態様では、TGF RII-DNおよびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 153に示される核酸配列を含む。一態様では、TGF RII-DNおよびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 154に示される核酸配列を含む。一態様では、TGF RII-DNおよびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 155に示される核酸配列を含む。一態様では、TGF RII-DNおよびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 156に示される核酸配列を含む。

30

【 0 4 0 3 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1-CTM-CD28である。一態様では、CARはヒト1C3 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGT TTTGGGTGCTG
GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTT
TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC
ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAAT
TTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGG
CCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCC
AGGCCGCAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA
GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCT
ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTA
TATCATATGATGGAAACAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT
CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC
CTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGTCCCCTGGG
GATCGAGGTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCGGTGGCGGC
GGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGG

10

20

30

40

50

AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTA
GCCTGGTATCAGCAGAAATCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTTTGATGC
CTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA
TACTGTCAACAGTTTAAACAGTTATCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGG
TGGAGATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCAC
CATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGGCGTGCCGGCCAGCGGCG
GGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCT
GGGCGCCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACC
CTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT
TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATT
TCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAG
CGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC
AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG
GACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTG
TACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGG
ATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGT
CTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC
CCCCTCGC (SEQ ID NO:157)

10

20

を含む。

【 0 4 0 4 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1-CTM-CD28である。一態様では、CARはヒト2A10 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28コードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

30

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA

40

50

CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTACACAAGTGCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGTTTTGGGTGCTG
GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTT
TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGA CTAC
ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAAT
TTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGG
CCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCC
AGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGG
GAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTAACTG
GATCGGCTGGGTGCCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATC
ATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGT
CACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGC
CTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGGCAAACCTGGTTTCCT
CTGGTCTCTCCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTG
GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTT
GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA
CTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAA
ACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAGTG
GGGTCCCATCAAGGTTACGCGCTATGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAA
TAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAACCACG
ACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAACATCGCGTGCAGCCCC
TGTCCTTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACAC
GAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGG
ACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGG
CAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAG
GAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA

10

20

30

40

CAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGA
GGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGA
AAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAA
GATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG
AGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG
ACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:158)

50

を含む。

【 0 4 0 5 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1-CTM-CD28である。一態様では、CARはヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

```
ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGTTTTGGGTGCTG
GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTT
TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC
ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAAT
TTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGG
CCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCC
AGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGG
```

10

20

30

40

50

GAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTG
GATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATC
ATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGT
CACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGC
CTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAACTGGTTTTCT
CTGGTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTG
GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTT
GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA
CTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAA
ACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAGTG
GGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAA
TAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAA
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGC
AGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGG
CCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAA
CGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAG
TACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA
AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC
CGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA
AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG
GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC
AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC
GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC
CAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID
NO:159)

10

20

30

を含む。

【 0 4 0 6 】

40

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1-CTM-CD28である。一態様では、CARはヒト2C6 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

50

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTACACAACTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGTTTTGGGTGCTG
GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTT
TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC
ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAAT
TTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGG
CCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCC
AGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGATCAGAGGTGAAAAAGCCCCGG
GAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAACTACTG
GATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATC
ATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGT
CACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTATCTGCAGTGGAGCAGC
CTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCCCGGGTATACCA
GCAGTTGGACTTCTTTTGACTIONTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
TCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAAA
TTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCA
ACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGG
GCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA
CTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG
CAGCGTAGCAACTGGCCCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT

10

20

30

40

50

CAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCG
TCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCG
CAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCC
CTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTG
CAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGA
CCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG
AAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACG
CCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG
ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA
GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGA
ACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG
CGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA
GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
(SEQ ID NO:160)

10

20

を含む。

【 0 4 0 7 】

PD1-CTM-CD28およびPSMA-CARをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO : 157 ~ 160のいずれか1つに示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、PD1-CTM-CD28およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 157に示される核酸配列を含む。一態様では、PD1-CTM-CD28およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 158に示される核酸配列を含む。一態様では、PD1-CTM-CD28およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 159に示される核酸配列を含む。一態様では、PD1-CTM-CD28およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 160に示される核酸配列を含む。

30

【 0 4 0 8 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1^{A132L}-PTM-CD28である。一態様では、CARはヒト1C3 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTG
GGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCAG
GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT
TCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTG
GCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCCT
TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGCAGGTGCAACTG
GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAG
GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAACA
ATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACG
GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGTCCCCTGGGGATCGAGGTACTACTACTA
CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCGGTGGCGGGATCTGCCATCCAGTTGA
CCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAT

10

20

30

40

50

CAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTTTGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGG
GTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAAACA
GTTATCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAACACGAC
GCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCAACATCGCGTCGCAGCCCCTG
TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGA
GGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACT
TGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAG
AAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACT
ACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGA
GGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACA
AGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG
AGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAA
GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGA
TAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAG
GGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGAC
ACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:161)

10

20

を含む。

【0409】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1^{A132L}-PTM-CD28である。一態様では、CARはヒト2A10 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

30

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC

40

AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAAGTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCCA
GCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCTGGTGGTTGGTGTCTGTG
GGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGTGTCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCAG
GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG
CGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT
TCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTG
GCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCCT
TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCT
GTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCT
GATACCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGGCCAACTGGTTTCTCTGGTCCTCCGATCTCT
GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG
TGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCT
CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCTCCT
AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGCGGCTATGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGC
CTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTT
TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAACACGACGCCAGCGCCGCGAC
CACCAACACCGGCGCCCAACATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGA
GGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTT
CGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTC
TCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTG
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG
ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAG
AGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAA
CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAG

10

20

30

40

AACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG
GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC
GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCC
TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:162)

を含む。

【 0 4 1 0 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする

50

核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1^{A132L}-PTM-CD28である。一態様では、CARはヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTG
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCCA
GCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTG
GGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCAG
GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT
TCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTG
GCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCCT
TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCT
GTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA

10

20

30

40

50

GATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCT
GATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGACAACTGGTTTCCTCTGGTCCTTCGATCTCT
GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG
TGGTGGGTTCGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCT
CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCT
AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCAC
TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAACCACGACGCCAGC
GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTG
CGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG
CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGG
GGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGA
AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAA
GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGT
GAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAG
GGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG
ATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGA
GAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGA
TGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCA
AGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:163)

10

20

30

を含む。

【 0 4 1 1 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1^{A132L}-PTM-CD28である。一態様では、CARはヒト2C6 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCCACCCA
GCCCCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTG
GGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGTGTCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCAG
GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT
TCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTG
GCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCCT
TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGTCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCTGGATCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCT
GTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCT
GATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTATCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGTCCCGGGTATACCAGCAGTTGGACTTCTTTTG
ACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTC
GGGCGGTGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGAAATTGTGTTGACACAGTCT
CCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGC
CAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGC
CAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGC
CTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCC
CCTATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGATATCAAACACGACGCCA
GCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCC

10

20

30

40

50

TGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGG
GGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGT
GGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAA
GAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTC
AAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGAT
GTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCA
GGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTAC
GATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG
AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG
ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC
AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT
ACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:164)

10

を含む。

【0412】

PD1^{A132L}-PTM-CD28およびPSMA-CARをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO: 161~164のいずれか1つに示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、PD1^{A132L}-PTM-CD28およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 161に示される核酸配列を含む。一態様では、PD1^{A132L}-PTM-CD28およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 162に示される核酸配列を含む。一態様では、PD1^{A132L}-PTM-CD28およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 163に示される核酸配列を含む。一態様では、PD1^{A132L}-PTM-CD28およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 164に示される核酸配列を含む。

20

30

【0413】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はTIM3-CD28である。一態様では、CARはヒト1C3 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

ATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCTGCTACTACTT
ACAAGGTCCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATGCCTATC
TGCCCTGCTTCTACACCCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGG
GGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTG
ATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTT
CCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGT
GGGATCTACTGCTGCCGAATCCAAATCCCAGGCATAATGAATGATGAAAAAT
TTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCG
GCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACAT
GGCCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGACATAAATCTAACAC
AAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGGTTGGCCAATGACTTA
CGGGACTCCGGAGCAACCATCAGATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAG
TCCTGGCTTGCTATAGCTTACTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG
CCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
TTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTT
GGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCC
TTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGCAGGTGCAACT
GGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAAC
AATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGTCCCCTGGGGATCGAGGTACTACTACT
ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGG
CGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTG
ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAA
TCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTTTGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGG

10

20

30

40

50

GGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAAC
AGTTATCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAACCACGA
CGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCT
GTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACG
AGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGAC
TTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCA
GAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAAC
TACTCAAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGG
AGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTAC
AAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG
GAGTACGACGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGA
AAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAA
GATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG
AGGGGCAAGGGGACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG
ACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:165)

10

20

を含む。

【 0 4 1 4 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はTIM3-CD28である。一態様では、CARはヒト2A10 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

30

ATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCTACTACTT
ACAAGGTCCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATGCCTATC
TGCCCTGCTTCTACACCCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGG
GGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTG
ATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTT
CCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGT
GGGATCTACTGCTGCCGAATCCAAATCCCAGGCATAATGAATGATGAAAAAT

40

50

TTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCG
GCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACAT
GGCCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGACATAAATCTAACAC
AAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGGTTGGCCAATGACTTA
CGGGACTCCGGAGCAACCATCAGATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAG
TCCTGGCTTGCTATAGCTTACTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGAACATGACTCCCCG
CCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
TTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTT
GGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCC
TTGCTCCTGCCGTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCT
GGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCC
TGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGAATCT
GATACCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGGCAAACTGGTTTCTCTGGTCTCCGATCTCT
GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG
TGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCT
CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCTCCT
AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGCGGCTATGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGC
CTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTT
TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGAC
CACCAACACCGGCGCCCAACATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGA
GGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTT
CGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTC
TCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG
ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAG
AGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAA
CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAG

10

20

30

40

AACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG
GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC
GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCC
TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:166)

を含む。

【 0 4 1 5 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする

50

核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はTIM3-CD28である。一態様では、CARはヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

ATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTACTACTT
ACAAGGTCCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATGCCTATC
TGCCCTGCTTCTACACCCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGG
GGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTG
ATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTT
CCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGT
GGGATCTACTGCTGCCGAATCCAAATCCCAGGCATAATGAATGATGAAAAAT
TTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCG
GCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACAT
GGCCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGACATAAATCTAACAC
AAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGGTTGGCCAATGACTTA
CGGGACTCCGGAGCAACCATCAGATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAG
TCCTGGCTTGCTATAGCTTACTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG
CCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
TTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTT
GGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCC
TTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCT
GGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCC

10

20

30

40

50

TGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCT
GATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAAACAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAACTGGTTTCCTCTGGTCCTTCGATCTCT
GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG
TGGTGGGTTCGGGTGGCGGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCT
CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCT
AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCAC
TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAACCACGACGCCAGC
GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTG
CGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG
CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGG
GGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGA
AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAA
GAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGT
GAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAG
GGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG
ACGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGA
GAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAAGATAAGA
TGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCA
AGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:167)

10

20

30

を含む。

【 0 4 1 6 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はTIM3-CD28である。一態様では、CARはヒト2C6 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCTGCTACTACTT
ACAAGGTCCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATGCCTATC
TGCCCTGCTTCTACACCCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGG
GGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTG
ATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTT
CCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGT
GGGATCTACTGCTGCCGAATCCAAATCCCAGGCATAATGAATGATGAAAAAT
TTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCG
GCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACAT
GGCCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGACATAAATCTAACAC
AAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGGTTGGCCAATGACTTA
CGGGACTCCGGAGCAACCATCAGATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAG
TCCTGGCTTGCTATAGCTTACTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG
CCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
TTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTT
GGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCC
TTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCT
GGTGCAGTCTGGATCAGAGGTGAAAAAGCCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCC
TGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCT
GATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTATCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGTCCCGGGTATACCAGCAGTTGGACTTCTTTTG
ACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTC
GGGCGGTGGTGGGTCTGGGTGGCGCGGATCTGAAATTGTGTTGACACAGTCT
CCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGC
CAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGC
CAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGC
CTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCC

10

20

30

40

50

CCTATTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAACCACGACGCCA
GCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCC
TGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGG
GGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGT
GGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAA
GAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTC
AAGAGGAAGACGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGAT
GTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCA
GGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTAC
GACGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG
AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAAGATAAG
ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC
AAGGGGCACGACGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT
ACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:168)

10

20

を含む。

【 0 4 1 7 】

TIM3-CD28およびPSMA-CARをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO : 165 ~ 168のいずれか1つに示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、TIM3-CD28およびヒト1C3 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 165に示される核酸配列を含む。一態様では、TIM3-CD28およびヒト2A10 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 166に示される核酸配列を含む。一態様では、TIM3-CD28およびヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 167に示される核酸配列を含む。一態様では、TIM3-CD28およびヒト2C6 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 168に示される核酸配列を含む。

30

【 0 4 1 8 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1-CTM-CD28である。一態様では、CARは、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGT TTTGGGTGCTG
GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTT
TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC
ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAAT
TTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGG
CCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCC
AGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGG
GAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTTACCAGCAACTG
GATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATC
ATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGT
CACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGC
CTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAACTGGTTTCCT
CTGGTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTG
GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTT
GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA

10

20

30

40

50

CTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAA
ACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTG
GGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAA
TAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAA
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAACATCGCGTCGC
AGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTG
CAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAA
AAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCAT
GAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAG
AGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA
CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGG
AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCG
GAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG
CACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACG
CCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:217)

10

20

を含む。

【0419】

PD1-CTM-CD28と、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO: 217に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、PD1-CTM-CD28と、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 217に示される核酸配列を含む。

30

【0420】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1-CTM-CD28である。一態様では、CARは、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1-CTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGT TTTGGGTGCTG
GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTT
TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC
ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAAT
TTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGG
CCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCC
AGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGG
GAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTTACCAGCAACTG
GATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATC
ATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGT
CACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGC
CTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAACTGGTTTCCT
CTGGTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTG
GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTT
GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA

10

20

30

40

50

CTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAA
ACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTG
GGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAA
TAGTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAA
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAACATCGCGTCGC
AGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTG
CAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAA
AAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGAACAT
GAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAG
AGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA
CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGG
AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCG
GAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG
CACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACG
CCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:218)

10

20

を含む。

【 0 4 2 1 】

PD1-CTM-CD28と、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO : 218に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、PD1-CTM-CD28と、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 218に示される核酸配列を含む。

30

【 0 4 2 2 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1^{A132L}-PTM-CD28である。一態様では、CARは、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTG
GGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCAG
GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT
TCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTG
GCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCCT
TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCT
GTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCT
GATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAACTGGTTTTCTCTGGTCCTTCGATCTCT
GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG
TGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCT
CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA

10

20

30

40

50

GGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCT
AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCAC
TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAACACGACGCCAGC
GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTG
CGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG
CTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTA
GTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAAGAAGTATTC
ATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAAC
ACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCA
GGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA
GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA
GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAG
ATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTAC
CAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG
CCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:219)

10

20

を含む。

【0423】

PD1^{A132L}-PTM-CD28と、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 P
SMA-CARとをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知である
う。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO:219に示される核酸配列と
少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80
%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも
85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なく
とも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少
なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%
の配列同一性を有する。一態様では、PD1^{A132L}-PTM-CD28と、ICOSドメインおよびCD
3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列は、SEQ ID NO:2
19に示される核酸配列を含む。

30

【0424】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする
核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列
を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1^{A132L}-PTM-CD28である。一態様では、CA
Rは、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARで
ある。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-P
TM-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびに
バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコード
する核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-PTM-CD28をコードす
る核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにバリエーションICOSドメ
インおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核
酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTG
GGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCAG
GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT
TCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTG
GCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCCT
TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCT
GTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCT
GATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAACTGGTTTTCTCTGGTCCTTCGATCTCT
GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG
TGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCT
CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA

10

20

30

40

50

GGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCT
AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCAC
TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAACACGACGCCAGC
GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTG
CGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG
CTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTA
GTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAAGAAGTATTC
ATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGAACATGAGAGCAGTGAAC
ACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCA
GGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA
GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA
GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAG
ATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTAC
CAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG
CCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:220)

10

20

を含む。

【 0 4 2 5 】

PD1^{A132L}-PTM-CD28と、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO: 220に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、PD1^{A132L}-PTM-CD28と、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 220に示される核酸配列を含む。

30

【 0 4 2 6 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1^{A132L}-4-1BBである。一態様では、CARは、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-4-1BBをコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-4-1BBをコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGG
GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTT
TACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT
TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATT
TCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGGTGAAACAGACTTTGAATTTT
GACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCT
TACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGG
CCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAG
TCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGAT
CGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATC
TATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCAC
CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGCCTG
AAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAACTGGTTTCCTCTG
GTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCG
GTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGAC
CCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC

10

20

30

40

50

GGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGG
GTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAAATA
GTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAAC
CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG
CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGC
ACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCA
GCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAA
AAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGA
GAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGT
GAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGGCCAGAACCA
GCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAG
AACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG
GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC
GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCC
TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:221)

10

20

を含む。

【0427】

PD1^{A132L}-4-1BBと、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO: 221に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、PD1^{A132L}-4-1BBと、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 221に示される核酸配列を含む。

30

【0428】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はPD1^{A132L}-4-1BBである。一態様では、CARは、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-4-1BBをコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-4-1BBをコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGG
GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTT
TACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT
TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATT
TCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGGTGAAACAGACTTTGAATTTT
GACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCT
TACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGG
CCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAG
TCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGAT
CGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATC
TATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCAC
CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGCCTG
AAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAACTGGTTTCCTCTG
GTCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCG
GTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGGGATCTGCCATCCAGTTGAC
CCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC

10

20

30

40

50

GGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGG
GTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAAATA
GTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAAC
CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG
CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGC
ACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCA
GCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAA
AAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGAACATGA
GAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGT
GAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGGCCAGAACCA
GCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAG
AACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG
GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC
GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCC
TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:222)

10

20

を含む。

【0429】

PD1^{A132L}-4-1BBと、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO:222に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、PD1^{A132L}-4-1BBと、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列は、SEQ ID NO:222に示される核酸配列を含む。

30

【0430】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、スイッチ受容体はTIM3-CD28である。一態様では、CARは、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARである。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCTGCTACTACTT
ACAAGGTCCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATGCCTATC
TGCCCTGCTTCTACACCCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGG
GGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTG
ATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTT
CCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGT
GGGATCTACTGCTGCCGAATCCAAATCCCAGGCATAATGAATGATGAAAAAT
TTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCG
GCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACAT
GGCCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGACATAAATCTAACAC
AAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGGTTGGCCAATGACTTA
CGGGACTCCGGAGCAACCATCAGATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAG
TCCTGGCTTGCTATAGCTTACTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG
CCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
TTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTT
GGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCC
TTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCT
GGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCC
TGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCT
GATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGACAACTGGTTTCCTCTGGTCCTTCGATCTCT
GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG
TGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCT
CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA

10

20

30

40

50

GGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCT
AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCAC
TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAACACGACGCCAGC
GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTG
CGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG
CTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTA
GTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAAGAAGTATTC
ATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAAC
ACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCA
GGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA
GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA
GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAG
ATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTAC
CAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG
CCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:223)

10

20

を含む。

【 0 4 3 1 】

TIM3-CD28と、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CAR
とをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば
、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO : 223に示される核酸配列と少なくとも
60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なく
とも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少
なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%
、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも9
5%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一
性を有する。一態様では、TIM3-CD28と、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含
むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列は、SEQ ID NO : 223に示される核酸配
列を含む。

30

【 0 4 3 2 】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：スイッチ受容体をコードする
核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、およびCARをコードする核酸配列
を含む。一態様では、スイッチ受容体はTIM3-CD28である。一態様では、CARは、バリ
アントICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARである。した
がって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードす
る核酸配列、F2Aを含むリンカーをコードする核酸配列、ならびにバリエーションICOSドメ
インおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。
一態様では、5'から3'方向に：TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含むリンカー
をコードする核酸配列、ならびにバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含
むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

40

50

ATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCTGCTACTACTT
ACAAGGTCCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATGCCTATC
TGCCCTGCTTCTACACCCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGG
GGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTG
ATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTT
CCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGT
GGGATCTACTGCTGCCGAATCCAAATCCCAGGCATAATGAATGATGAAAAAT
TTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCG
GCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACAT
GGCCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGACATAAATCTAACAC
AAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGGTTGGCCAATGACTTA
CGGGACTCCGGAGCAACCATCAGATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAG
TCCTGGCTTGCTATAGCTTACTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG
CCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
TTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTT
GGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCC
TTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCT
GGTGCACTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCC
TGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTTACCAGCAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCT
GATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA
AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGCCTGAAGGCCTCGGACAC
CGCCATGTATTACTGTGCGAGACAACTGGTTTTCCTCTGGTCCTTCGATCTCT
GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG
TGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCT

10

20

30

40

50

CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCT
AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCAC
TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAACACGACGCCAGC
GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTG
CGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG
CTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTA
GTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAGAAGTATTC
ATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGAACATGAGAGCAGTGAAC
ACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCA
GGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA
GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA
GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAG
ATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTAC
CAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG
CCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:224)

10

20

を含む。

【0433】

TIM3-CD28と、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO:224に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、TIM3-CD28と、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARとをコードする核酸配列は、SEQ ID NO:224に示される核酸配列を含む。

30

40

【0434】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：第1のスイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含む第1のリンカーをコードする核酸配列、第2のスイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含む第2のリンカーをコードする核酸、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、第1のスイッチ受容体はTIM3-CD28であり、第2のスイッチ受容体はPD1^{A132L}-4-1BBである。一態様では、第1のスイッチ受容体はPD1^{A132L}-4-1BBであり、第2のスイッチ受容体はTIM3-CD28である。一態様では、CARは、ICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARである。一態様では、第1のリンカーおよび第2のリンカーは同じである。一態様では、第1のリンカーおよび第2のリンカーは異なる。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方

50

向に：PD1^{A132L}-4-1BBをコードする核酸配列、F2Aを含む第1のリンカーをコードする核酸配列、TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含む第2のリンカーをコードする核酸配列、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-4-1BBをコードする核酸配列、F2Aを含む第1のリンカーをコードする核酸配列、TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含む第2のリンカーをコードする核酸、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTG
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGG
GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTT
TACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT
TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATT
TCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGGTGAAGCAGACGTTGAACTT
CGATTTGCTCAAACCTTGCCGGTGACGTGGAATCCAATCCGGGGCCGATGTTTT
CACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCTGCTACTACTTACAAGGT
CCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTGGTTCAGAATGCCTATCTGCCCTG

10

20

30

40

50

CTTCTACACCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGGGGCAAA
GGAGCCTGTCCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTGATGAAA
GGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTTCCGCAA
AGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGTGGGATC
TACTGCTGCCGAATCCAAATCCCAGGCATAATGAATGATGAAAAATTTAACC
TGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCGGCAGAG
AGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACATGGCCCA
GCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGACATAAATCTAACACAAATAT
CCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGGTTGGCCAATGACTTACGGGA
CTCCGGAGCAACCATCAGATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGG
CTTGCTATAGCTTACTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGT
AAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCC
CCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGC
AGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGG
GAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCT
CCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTG
CAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTA
AGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGAT
GCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGAT
ACCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGT
CCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAACAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGC
CATGTATTACTGTGCGAGACAACTGGTTTCCTCTGGTCCCTCGATCTCTGGG
GCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT
GGGTGCGGTGGCGGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCT
GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGAC
ATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCTAAGC
TCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACG
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTTCG
GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGC
GACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCGTGCCCTGCGCCC
AGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGA
CTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTAGTCTG
CATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAAGAAGTATTCATCCA

10

20

30

40

50

GTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTCATGAGAGCAGTGAACACAGC
CAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA
ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGG
ACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC
TGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG
GATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGG
TCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
CCCCCTCGC (SEQ ID NO:225)

10

を含む。

【0435】

PD1^{A132L}-4-1BB、TIM3-CD28、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO:225に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、PD1^{A132L}-4-1BB、TIM3-CD28、ならびにICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO:225に示される核酸配列を含む。

20

【0436】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、5'から3'方向に：第1のスイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含む第1のリンカーをコードする核酸配列、第2のスイッチ受容体をコードする核酸配列、F2Aを含む第2のリンカーをコードする核酸、およびCARをコードする核酸配列を含む。一態様では、第1のスイッチ受容体はTIM3-CD28であり、第2のスイッチ受容体はPD1^{A132L}-4-1BBである。一態様では、第1のスイッチ受容体はPD1^{A132L}-4-1BBであり、第2のスイッチ受容体はTIM3-CD28である。一態様では、CARは、バリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARである。一態様では、第1のリンカーおよび第2のリンカーは同じである。一態様では、第1のリンカーおよび第2のリンカーは異なる。したがって、例示的な態様では、本発明の核酸は、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-4-1BBをコードする核酸配列、F2Aを含む第1のリンカーをコードする核酸配列、TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含む第2のリンカーをコードする核酸配列、ならびにバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む。一態様では、5'から3'方向に：PD1^{A132L}-4-1BBをコードする核酸配列、F2Aを含む第1のリンカーをコードする核酸配列、TIM3-CD28をコードする核酸配列、F2Aを含む第2のリンカーをコードする核酸、ならびにバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列を含む核酸は、以下に示される核酸配列：

30

40

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGG
GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTT
TACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT
TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATT
TCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGGTGAAGCAGACGTTGAACCT
CGATTTGCTCAAACTTGCCGGTGACGTGGAATCCAATCCGGGGCCGATGTTTT
CACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCTGCTACTACTTACAAGGT
CCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTCCGGTCAGAATGCCTATCTGCCCTG
CTTCTACACCCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGGGGCAAA
GGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTGATGAAA
GGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTTCCGCAA
AGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGTGGGATC
TACTGCTGCCGAATCCAAATCCCAGGCATAATGAATGATGAAAAATTTAACC
TGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCGGCAGAG
AGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACATGGCCCA
GCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGACATAAATCTAACACAAATAT
CCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGGTTGGCCAATGACTTACGGGA
CTCCGGAGCAACCATCAGATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGG

10

20

30

40

50

CTTGCTATAGCTTACTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGT
AAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACATGACTCCCCGCCGCC
CCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGC
AGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGG
GAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCGATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCT
CCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTG
CAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTA
AGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCAACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGAT
GCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGAT
ACCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGT
CCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAAACAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGC
CATGTATTACTGTGCGAGACAACTGGTTTTCTCTGGTCCTTCGATCTCTGGG
GCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT
GGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCT
GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGAC
ATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGGAAAGCTCCTAAGC
TCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAG
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGAACCTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTTCG
GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGC
GACCACCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGAGCCCCCTGTCCCTGCGCCC
AGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGA
CTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTAGTCTG
CATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAGAAGTATTCATCCA
GTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGAACATGAGAGCAGTGAACACAGC
CAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA
ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGG
ACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC
TGTAACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG
GATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGG
TCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
CCCCCTCGC (SEQ ID NO:226)

10

20

30

40

を含む。

【 0 4 3 7 】

PD1^{A132L}-4-1BB、TIM3-CD28、ならびにバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 PSMA-CARをコードする核酸配列の許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、核酸配列は、SEQ ID NO: 226に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも9

50

3%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する。一態様では、PD1^{A132L}-4-1BB、TIM3-CD28、ならびにバリエーションICOSドメインおよびCD3ゼータドメインを含むヒト2F5 P SMA-CARをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 226に示される核酸配列を含む。

【0438】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、転写制御エレメント、例えば、プロモーター、およびエンハンサーなどに機能的に連結される場合がある。適切なプロモーターおよびエンハンサーエレメントは、当業者に公知である。

【0439】

細菌細胞における発現に適したプロモーターには、*lacI*、*lacZ*、T3、T7、*gpt*、ラムダ P および *trc* が含まれるが、それに限定されるわけではない。真核細胞における発現に適したプロモーターには、軽鎖および/または重鎖免疫グロブリン遺伝子プロモーターおよびエンハンサーエレメント；サイトメガロウイルス前初期プロモーター；単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター；初期および後期SV40プロモーター；レトロウイルス由来の長鎖末端反復配列に存在するプロモーター；マウスメタロチオネイン-1プロモーター；ならびに当技術分野において公知の様々な組織特異的プロモーターが含まれるが、それに限定されるわけではない。可逆誘導性プロモーターを含む、適切な可逆プロモーターは、当技術分野において公知である。そのような可逆プロモーターは、多数の生物、例えば、真核生物および原核生物から単離され、それに由来する場合がある。第2の生物における使用のために第1の生物に由来する可逆プロモーターの改変（例えば、第1の原核生物および第2の真核生物、第1の真核生物および第2の原核生物など）は、当技術分野において周知である。そのような可逆プロモーター、およびそのような可逆プロモーターに基づくが、追加的な制御タンパク質も含むシステムには、アルコール調節プロモーター（例えば、アルコールデヒドロゲナーゼI (*alcA*) 遺伝子プロモーター、アルコールトランス活性化因子タンパク質 (*A1cR*) 応答プロモーターなど）、テトラサイクリン調節プロモーター、（例えば、TetActivator、TetON、TetOFFなどを含むプロモーターシステム）、ステロイド調節プロモーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体プロモーターシステム、ヒトエストロゲン受容体プロモーターシステム、レチノイドプロモーターシステム、甲状腺プロモーターシステム、エクジソンプロモーターシステム、ミフェプリストンプロモーターシステムなど）、金属調節プロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーターシステムなど）、病原性関連調節プロモーター（例えば、サリチル酸調節プロモーター、エチレン調節プロモーター、ベンゾチアジアゾール調節プロモーターなど）、温度調節プロモーター（例えば、熱ショック誘導プロモーター（例えば、HSP-70、HSP-90、ダイズ熱ショックプロモーターなど）、光調節プロモーター、合成誘導プロモーターなどが含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0440】

いくつかの態様では、プロモーターは、CD8細胞特異的プロモーター、CD4細胞特異的プロモーター、好中球特異的プロモーター、またはNK特異的プロモーターである。例えば、CD4遺伝子プロモーターを使用することができる；例えば、Salmon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 7739；およびMarodon et al. (2003) Blood 101:3416を参照されたい。別の例として、CD8遺伝子プロモーターを使用することができる。NK細胞特異的発現は、*Ncr1* (p46) プロモーターの使用により達成することができる；例えば、Eckelhart et al. Blood (2011) 117:1565を参照されたい。

【0441】

酵母細胞における発現に適したプロモーターは、ADH1プロモーター、PGK1プロモーター、ENOプロモーター、PYK1プロモーターなどのような構成的プロモーター；またはGAL1プロモーター、GAL10プロモーター、ADH2プロモーター、PHOSプロモーター、CUP1プロモーター、GALTプロモーター、MET25プロモーター、MET3プロモーター、CYC1プロモーター、HIS3プロモーター、ADH1プロモーター、PGKプロモーター、GAPDHプロモーター、ADC1プロモーター、TRP1プロモーター、URA3プロモーター、LEU2プロ

10

20

30

40

50

モーター、ENOプロモーター、TP1プロモーター、およびAOX1（例えば、ピキア（*Pichia*）における使用のため）のような調節可能なプロモーターである。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分に当業者のレベルの範囲内である。原核生物宿主細胞における使用に適したプロモーターには、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼプロモーター；trpプロモーター；lacオペロンプロモーター；雑種プロモーター、例えば、lac/tac雑種プロモーター、tac/trc雑種プロモーター、trp/lacプロモーター、T7/lacプロモーター；trcプロモーター；tacプロモーターなど；araBADプロモーター；ssaGプロモーターなどのインビボ調節プロモーターまたは関連プロモーター（例えば、米国特許出願公開第20040131637号を参照されたい）、pagCプロモーター（Pulkkinen and Miller, *J. Bacteriol.* (1991) 173(1): 86-93；Alpuche-Aranda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1992) 89(21): 10079-83）、nirBプロモーター（Harborne et al. *Mol. Micro.* (1992) 6:2805-2813）など（例えば、Dunstan et al., *Infect. Immun.* (1999) 67:5133-5141；McKelvie et al., *Vaccine* (2004) 22:3243-3255；およびChatfield et al., *Biotechnol.* (1992) 10:888-892を参照されたい）；sigma70プロモーター、例えば、コンセンサスsigma70プロモーター（例えば、GenBankアクセッション番号AX798980、AX798961、およびAX798183を参照されたい）；静止期プロモーター、例えば、dpsプロモーター、spvプロモーターなど；病原性アイランドSPI-2に由来するプロモーター（例えば、WO96/17951を参照されたい）；actAプロモーター（例えば、Shetron-Rama et al., *Infect. Immun.* (2002) 70:1087-1096を参照されたい）；rpsMプロモーター（例えば、Valdivia and Falkow *Mol. Microbiol.* (1996). 22:367を参照されたい）；tetプロモーター（例えば、Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein--Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, London, UK, Vol. 10, pp. 143-162を参照されたい）；SP6プロモーター（例えば、Melton et al., *Nucl. Acids Res.* (1984) 12:7035を参照されたい）などが含まれるが、それに限定されるわけではない。大腸菌（*Escherichia coli*）などの原核生物における使用に適した強力なプロモーターには、Trc、Tac、T5、T7、およびPラムダが含まれるが、それに限定されるわけではない。細菌宿主細胞における使用のためのオペレーターの非限定的な例には、ラクトースプロモーターオペレーター（LacIリプレッサータンパク質は、ラクトースと接触した場合に立体配座を変化させ、それにより、Ladリプレッサータンパク質がオペレーターに結合するのを阻止する）、トリプトファンプロモーターオペレーター（トリプトファンと複合体化した場合、TrpRリプレッサータンパク質は、オペレーターと結合する立体配座を有し；トリプトファンの非存在下で、TrpRリプレッサータンパク質は、オペレーターに結合しない立体配座を有する）、およびtacプロモーターオペレーターが含まれる（例えば、deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1983) 80:21-25を参照されたい）。

【0442】

適切なプロモーターの他の例には、前初期サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター配列が含まれる。このプロモーター配列は、それに機能的に連結される任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を推進することが可能な、強力な構成的プロモーター配列である。サルウイルス40（SV40）初期プロモーター、マウス乳がんウイルス（MMTV）またはヒト免疫不全ウイルス（HIV）長鎖末端反復配列（LTR）プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病毒プロモーター、エプスタイン-バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、EF-1アルファプロモーター、ならびに非限定的にアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およびクレアチンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターを含むが、それに限定されるわけではない他の構成的プロモーター配列も使用される場合がある。さらに、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導プロモーターもまた、本発明の一部として考えられている。誘導プロモーターの使用は、それが機能的に連結されるポリヌクレオチド配列の発現が望ましい場合に、そのような発現をオンにすること、または発現が望ましくない場合に発現をオフにすることが可能な分子スイッチを提供する。

10

20

30

40

50

誘導プロモーターの例には、メタロチオニン (metallothionine) プロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリンプロモーターが含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0443】

いくつかの態様では、適切なプロモーターを含有する遺伝子座または構築物または導入遺伝子は、誘導システムの誘導を経由して不可逆的にスイッチされる。不可逆スイッチの誘導に適したシステムは、当技術分野において周知であり、例えば、不可逆スイッチの誘導は、Cre-lox媒介組み換えを利用する場合がある（例えば、その開示が参照により本明細書に組み入れられる、Fuhrmann-Benzakein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 28:e99を参照されたい）。当技術分野において公知であるリコンビナーゼ、エンドヌクレアーゼ、リガーゼ、組み換え部位などの任意の適切な組み合わせが、不可逆的にスイッチ可能なプロモーターを生成するために使用される場合がある。本明細書の他の箇所に記載される部位特異的組み換えを行うための方法、メカニズム、および要件が、不可逆的にスイッチされたプロモーターの生成に用いられ、当技術分野において周知である。例えば、その開示が、参照により本明細書に組み入れられる、Grindley et al. Annual Review of Biochemistry (2006) 567-605；およびTropp, Molecular Biology (2012) (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, Mass.) を参照されたい。

10

【0444】

いくつかの態様では、本開示の核酸は、TCR/CAR誘導発現カセットをコードする核酸配列をさらに含む。一態様では、TCR/CAR誘導発現カセットは、TCR/CARシグナル伝達の際に放出されるトランスジェニックポリペプチド産物の産生のためである。例えば、Chmielewski and Abken, Expert Opin. Biol. Ther. (2015) 15(8): 1145-1154；およびAbken, Immunotherapy (2015) 7(5): 535-544を参照されたい。いくつかの態様では、本開示の核酸は、T細胞活性化応答プロモーターに機能的に連結されるサイトカインをコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの態様では、T細胞活性化応答プロモーターに機能的に連結されるサイトカインは、別々の核酸配列上に存在する。一態様では、サイトカインはIL-12である。

20

【0445】

本開示の核酸は、発現ベクターおよび/またはクローニングベクター内に存在し得る。発現ベクターは、選択マーカー、複製起点、ならびにベクターの複製および/または維持を提供する他の特徴を含むことができる。適切な発現ベクターには、例えば、プラスミド、ウイルスベクターなどが含まれる。多数の適切なベクターおよびプロモーターが、当業者に公知であり、対象の組み換え構築物を生成するために多くが市販されている。以下のベクターが例として提供されるが、これらは、いかようにも限定として解釈されるべきではない：細菌：pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA)；pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、およびpRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。原核生物：pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL (Pharmacia)。

30

【0446】

発現ベクターは、一般的に、プロモーター配列近くに位置する好都合な制限部位を有して、異種タンパク質をコードする核酸配列の挿入を提供する。発現宿主において作動する選択マーカーが存在する場合がある。適切な発現ベクターには、ウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；アデノウイルス（例えば、Li et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1994) 35: 2543-2549；Borras et al., Gene Ther. (1999) 6: 515-524；Li and Davidson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 7700-7704；Sakamoto et al., H. Gene Ther. (1999) 5: 1088-1097；国際公開公報第94/12649号、同第93/03769号；同第93/19191号；同第94/28938号；同第95/11984号および同第95/00655号を参照されたい）；アデノ随伴ウイルス（例えば、Ali et al., Hum. Gene Ther. (1998) 9: 81-86, Flannery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1

40

50

997) 94: 6916-6921 ; Bennett et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1997) 38: 2857-2863 ; Jomary et al., Gene Ther. (1997) 4:683 690, Rolling et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10: 641-648 ; Ali et al., Hum. Mol. Genet. (1996) 5: 591-594 ; 国際公開公報第93/09239号におけるSrivastava, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63: 3822-3828 ; Mendelson et al., Virol. (1988) 166: 154-165 ; およびFlotte et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 10613-10617を参照されたい) ; SV40 ; 単純ヘルペスウイルス ; ヒト免疫不全ウイルス (例えば、Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 10319-23 ; Takahashi et al., J. Virol. (1999) 73: 7812-7816を参照されたい) に基づくウイルスベクター ; レトロウイルスベクター (例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ならびにラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳がんウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクター) などが含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0447】

使用に適した追加的な発現ベクターは、例えば、非限定的に、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、泡沫状ウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ボックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、操作雑種ウイルスベクター、トランスポゾン媒介ベクターなどである。ウイルスベクター技法は、当技術分野において周知であり、例えば、Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY) ならびに他のウイルス学および分子生物学のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、およびレンチウイルスが含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0448】

一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能性の複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つまたは複数の選択マーカーを含有する (例えば、国際公開公報第01/96584号 ; 同第01/29058号 ; および米国特許第6,326,193号) 。

【0449】

いくつかの態様では、免疫細胞またはその前駆細胞 (例えば、T細胞) 中にTCR/CARならびに / またはドミナントネガティブ型受容体および / もしくはスイッチ受容体を導入するために、発現ベクター (例えば、レンチウイルスベクター) が使用される場合がある。したがって、本発明の発現ベクター (例えば、レンチウイルスベクター) は、TCR/CARならびに / またはドミナントネガティブ型受容体および / もしくはスイッチ受容体をコードする核酸を含む場合がある。いくつかの態様では、発現ベクター (例えば、レンチウイルスベクター) は、その中にコードされるTCR/CARならびに / またはドミナントネガティブ型受容体および / もしくはスイッチ受容体の機能的発現を助ける追加的なエレメントを含むであろう。いくつかの態様では、TCR/CARならびに / またはドミナントネガティブ型受容体および / もしくはスイッチ受容体をコードする核酸を含む発現ベクターは、哺乳動物プロモーターをさらに含む。一態様では、ベクターは、伸長因子-1-アルファプロモーター (EF-1 プロモーター) をさらに含む。EF-1 プロモーターの使用は、下流の導入遺伝子 (例えば、TCR/CARならびに / またはドミナントネガティブ型受容体および / もしくはスイッチ受容体をコードする核酸配列) の発現における効率を上げる場合がある。生理的プロモーター (例えば、EF-1 プロモーター) は、組み込み媒介遺伝毒性を誘導する可能性が低い場合があり、レトロウイルスベクターが幹細胞を形質転換する能力を打ち消す場合がある。ベクター (例えば、レンチウイルスベクター) における使用に適した他の生理的プロモーターは、当業者に公知であり、本発明のベクターに組み込まれる場合がある。いくつかの態様では、ベクター (例えば、レンチウイルスベクター) は、力価および遺伝子発現を改善する場合がある、必須ではないシス作用配列をさらに含む。必須ではないシス作用配列の非限定的な一例は、効率的な逆転写および核内輸送に重要なセントラルポリプ

10

20

30

40

50

リントラクトおよびセントラルターミネーション配列（cPPT/CTS）である。他の必須ではないシス作用配列は、当業者に公知であり、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）に組み込まれる場合がある。いくつかの態様では、ベクターは、転写後調節エレメントをさらに含む。転写後調節エレメントは、RNAの翻訳を改善し、導入遺伝子の発現を改善し、RNA転写物を安定化する場合がある。転写後調節エレメントの一例は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPPE）である。したがって、いくつかの態様では、本発明のためのベクターは、WPPE配列をさらに含む。様々な転写後調節因子エレメントは、当業者に公知であり、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）に組み込まれる場合がある。本発明のベクターは、RNAの輸送のためのrev応答エレメント（RRE）、パッケージング配列、ならびに5'および3'長鎖末端反復配列（LTR）などの追加的なエレメントをさらに含む場合がある。「長鎖末端反復配列」または「LTR」という用語は、U3、RおよびU5領域を含むレトロウイルスDNAの末端に位置する塩基対のドメインを指す。LTRは、一般的にレトロウイルス遺伝子の発現（例えば、プロモーション、イニシエーションおよび遺伝子転写物のポリアダニル化）およびウイルス複製に必要な機能を提供する。一態様では、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）は、3' U3欠失LTRを含む。したがって、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）は、本明細書に記載されるエレメントの任意の組み合わせを含んで、導入遺伝子の機能的発現の効率を高める場合がある。例えば、本発明のベクター（例えば、レンチウイルスベクター）は、TCR/CARならびに／またはドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体をコードする核酸に加えてWPPE配列、cPPT配列、RRE配列、5'LTR、3' U3欠失LTRを含む場合がある。

10

20

【0450】

本発明のベクターは、自己不活化ベクターであり得る。本明細書に用いられる「自己不活化ベクター」という用語は、3' LTRエンハンサープロモーター領域（U3領域）が改変されている（例えば、欠失または置換により）、ベクターを指す。自己不活化ベクターは、ウイルス複製の第1ラウンドを超えたウイルス転写を防止し得る。結果として、自己不活化ベクターは、感染して、次いで宿主ゲノム（例えば、哺乳動物ゲノム）中に1回だけ組み込まれることができ得るが、さらに継代され得ない。したがって、自己不活化ベクターは、複製適格ウイルスを生み出すリスクを大きく低減し得る。

【0451】

いくつかの態様では、本発明の核酸は、RNA、例えば、インビトロ合成されたRNAであり得る。RNAのインビトロ合成のための方法は、当業者に公知であり；任意の公知の方法を使用して、本開示のTCR/CARならびに／またはドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体をコードする配列を含むRNAを合成することができる。宿主細胞内にRNAを導入するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、Zhao et al. Cancer Res. (2010) 15: 9053を参照されたい。本開示のTCR/CARならびに／またはドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体をコードするヌクレオチド配列を含むRNAを宿主細胞中に導入することは、インビトロまたはエキスピボまたはインピボで実施することができる。例えば、宿主細胞（例えば、NK細胞、細胞傷害性Tリンパ球など）に、本開示のTCR/CARならびに／またはドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体をコードするヌクレオチド配列を含むRNAをインビトロまたはエキスピボでエレクトロポレーションすることができる。

30

40

【0452】

ポリペプチドまたはその部分の発現を評価するために、細胞内に導入されるべき発現ベクターはまた、ウイルスベクターによりトランスフェクションまたは感染させようとする細胞集団から発現している細胞の特定および選択を容易にするために、選択マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子の一方または両方を含む場合がある。いくつかの態様では、選択マーカーは、別々のDNA片上に保有され、共トランスフェクション手順に使用される場合がある。選択マーカーおよびレポーター遺伝子の両方は、宿主細胞における発現を可能にするために適切な調節配列に隣接する場合がある。有用な選択マーカーには抗生物

50

質耐性遺伝子が含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0453】

トランスフェクションされた可能性のある細胞を特定するためおよび調節配列の機能性を評価するために、レポーター遺伝子が使用される。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物または組織中に存在することもそれによって発現されることもない遺伝子であって、いくつかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によってその発現が明らかにされるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞内に導入された後の適切な時間に評価される。適切なレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子が含まれる場合があるが、それに限定されるわけではない（例えば、Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82）。

10

【0454】

F. 改変された免疫細胞

本発明は、CARならびに／またはドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体を含む改変された免疫細胞またはその前駆細胞（例えば、T細胞）を提供する。したがって、このような改変された細胞は、それにおいて発現されるCARによって導かれる特異性を有する。例えば、PSMA-CARを含む本発明の改変された細胞は、標的細胞上のPSMAに対する特異性を有する。

【0455】

20

いくつかの態様では、本発明の改変された細胞は、CARを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、標的細胞上の前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して親和性を有するCARを含む。いくつかの態様では、本発明の改変された細胞は、ドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、微小環境における負のシグナル伝達分子の効果を低減することが可能なドミナントネガティブ型受容体を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、微小環境中の負のシグナル伝達分子の効果を低減し、負のシグナルを、改変された細胞内で正のシグナルに変換することが可能なスイッチ受容体を含む。いくつかの態様では、本発明の改変された細胞は、CARならびにドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有するCARならびにドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体を含む。本発明のドミナントネガティブ型受容体および／またはスイッチ受容体を含む改変された細胞は、それらのそれぞれの細胞外ドメインにより、微小環境中の負のシグナル伝達分子（例えば、阻害性リガンド）と会合することが可能である。いくつかの態様では、ドミナントネガティブ型受容体を含む本発明の改変された細胞は、微小環境中の負のシグナル伝達分子の効果を低減することが可能であり、その際、ドミナントネガティブ型受容体は、負のシグナルに関連する細胞外ドメインを含む。いくつかの態様では、スイッチ受容体を含む本発明の改変された細胞は、微小環境中の負のシグナル伝達分子の効果を正のシグナルに変換することが可能であり、その際、スイッチ受容体は、負のシグナルに関連する細胞外ドメインおよび正のシグナルに関連する細胞内ドメインを含む。

30

40

【0456】

例示的な態様では、本発明の改変された細胞は、負のシグナル伝達分子の効果を低減することが可能なドミナントネガティブ型受容体を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、TGF RII-DNを含む。

【0457】

例示的な態様では、本発明の改変された細胞は、負のシグナル伝達分子の効果を、改変された細胞内で正の（例えば、活性化）シグナルに変換することが可能なスイッチ受容体を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、PD1-CTM-CD28を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、PD1^{A132L}-PTM-CD28を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、TIM3-CD28を含む。

50

【 0 4 5 8 】

例示的な態様では、本発明の改変された細胞は、PSMA-CARと、負のシグナル伝達分子の効果を低減することが可能なドミナントネガティブ型受容体とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CARとTGF RII-DNとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト化J591 PSMA-CARとTGF RII-DNとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト1C3 PSMA-CARとTGF RII-DNとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2A10 PSMA-CARとTGF RII-DNとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2F5 PSMA-CARとTGF RII-DNとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2C6 PSMA-CARとTGF RII-DNとを含む。そのような改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）は、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有することに加え、それらが存在する微小環境からの阻害性TGF- シグナルを低減することが可能である。

10

【 0 4 5 9 】

例示的な態様では、本発明の改変された細胞は、PSMA-CARと、負のシグナル伝達分子の阻害性効果を、改変された細胞内で正のシグナルに変換することが可能なスイッチ受容体とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CARとPD1-CTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト化J591 PSMA-CARとPD1-PTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト1C3 PSMA-CARとPD1-CTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2A10 PSMA-CARとPD1-CTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2F5 PSMA-CARとPD1-CTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2C6 PSMA-CARとPD1-CTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CARとPD1^{A132L}-PTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト化J591 PSMA-CARとPD1^{A132L}-PTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト1C3 PSMA-CARとPD1^{A132L}-PTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2A10 PSMA-CARとPD1^{A132L}-PTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2F5 PSMA-CARとPD1^{A132L}-PTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2C6 PSMA-CARとPD1^{A132L}-PTM-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CARとTIM3-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト化J591 PSMA-CARとTIM3-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト1C3 PSMA-CARとTIM3-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2A10 PSMA-CARとTIM3-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2F5 PSMA-CARとTIM3-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2C6 PSMA-CARとTIM3-CD28とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CARとPD1-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト化J591 PSMA-CARとPD1-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト1C3 PSMA-CARとPD1-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2A10 PSMA-CARとPD1-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2F5 PSMA-CARとPD1-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2C6 PSMA-CARとPD1-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CARとPD1^{A132L}-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト化J591 PSMA-CARとPD1^{A132L}-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト1C3 PSMA-CARとPD1^{A132L}-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2A10 PSMA-CARとPD1^{A132L}-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2F5 PSMA-CARとPD1^{A132L}-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2C6 PSMA-CARとPD1^{A132L}-4-1BBとを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CARとTGF R-IL12R 1とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト化J591 PSMA-CARとTGF R-IL12R 1とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト

20

30

40

50

1C3 PSMA-CARとTGF R-IL12R 1とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2A10 PSMA-CARとTGF R-IL12R 1とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2F5 PSMA-CARとTGF R-IL12R 1とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2C6 PSMA-CARとTGF R-IL12R 1とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CARとTGF R-IL12R 2とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト化J591 PSMA-CARとTGF R-IL12R 2とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト1C3 PSMA-CARとTGF R-IL12R 2とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2A10 PSMA-CARとTGF R-IL12R 2とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2F5 PSMA-CARとTGF R-IL12R 2とを含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、ヒト2C6 PSMA-CARとTGF R-IL12R 2とを含む。そのような改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）は、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有することに加え、微小環境からの阻害性PD-1またはTGF シグナルを、改変された細胞内で正の（例えば、活性化）シグナルに変換することが可能である。そのような改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）は、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有することに加え、微小環境からの阻害性PD-1またはTIM-3シグナルを、改変された細胞内で正の（例えば、活性化）CD28シグナルに変換することが可能である。

【0460】

例示的な態様では、本発明の改変された細胞は、二重特異性抗体をコードする核酸を含む。一態様では、そのような改変された細胞は、改変された細胞の外側に二重特異性抗体を分泌することができる。一態様では、本発明の改変された細胞は、二重特異性抗体をコードする核酸を含み、その際、二重特異性抗体は、1つよりも多い抗原結合ドメインを含み、その際、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、負のシグナル伝達分子（例えば、改変された細胞の微小環境中に見出される負のシグナル伝達分子）に結合し、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、改変された細胞の表面の共刺激分子と結合する。一態様では、本発明の改変された細胞は、本明細書に記載されるような13G4-1211 PD-L1/CD28二重特異性抗体をコードする核酸を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、本明細書に記載されるような10A5-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体をコードする核酸を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、本明細書に記載されるような1B12-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体をコードする核酸を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、本明細書に記載されるようなTGF R-1-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体をコードする核酸を含む。一態様では、本発明の改変された細胞は、本明細書に記載されるようなTGF R-3-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体をコードする核酸を含む。

【0461】

例示的な態様では、本発明の改変された細胞は、PSMA-CAR、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体を含み、かつ二重特異性抗体をコードする核酸をさらに含む場合がある。そのような改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）は、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有することに加え、それらが存在する微小環境からの阻害シグナルを低減し、それらが存在する微小環境中に二重特異性抗体を分泌することが可能である。そのような細胞では、二重特異性抗体の活性は、改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）の活性化をさらに増加させる場合がある。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CAR、ヒト化J591 PSMA-CAR、ヒト1C3 PSMA-CAR、ヒト2A10 PSMA-CAR、ヒト2F5 PSMA-CAR、およびヒト2C6 PSMA-CARからなる群より選択されるPSMA-CAR；TGF RII-DNを含み；かつ13G4-1211 PD-L1/CD28二重特異性抗体、10A5-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体、1B12-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体、TGF R-1-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体、およびTGF R-3-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体からなる群より選択される二重特異性抗体を発現および分泌する。

【0462】

例示的な態様では、本発明の改変された細胞は、PSMA-CAR、スイッチ受容体を含み、

二重特異性抗体をコードする核酸をさらに含む場合がある。そのような改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）は、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有することに加え、それらが存在する微小環境からの阻害シグナルを、改変された細胞内で正の（例えば、活性化）シグナルに変換し、それらが存在する微小環境中に二重特異性抗体を分泌することが可能である。そのような細胞では、二重特異性抗体の活性は、改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）の活性化をさらに増加させる場合がある。一態様では、本発明の改変された細胞は、マウスJ591 PSMA-CAR、ヒト化J591 PSMA-CAR、ヒト1C3 PSMA-CAR、ヒト2A10 PSMA-CAR、ヒト2F5 PSMA-CAR、およびヒト2C6 PSMA-CARからなる群より選択されるPSMA-CAR；PD1-CTM-CD28スイッチ受容体、PD1A132L-PTM-CD28スイッチ受容体、およびTIM3-CD28スイッチ受容体からなる群より選択されるスイッチ受容体を含み；かつ13G4-1211 PD-L1/CD28二重特異性抗体、10A5-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体、1B12-1412 PD-L1/CD28二重特異性抗体、TGF R-1-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体、およびTGF R-3-1412 TGF RII/CD28二重特異性抗体からなる群より選択される二重特異性抗体を発現および分泌する。

【0463】

本発明のPSMA-CAR、本発明のドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体を含み、かつ/または本発明の二重特異性抗体を発現および分泌する任意の改変された細胞が構想され、本明細書における開示を考慮して当業者により容易に理解および作製されることができる。

【0464】

G. 改変された免疫細胞を産生する方法

本発明は、腫瘍免疫療法、例えば、養子免疫療法のための本発明の改変された免疫細胞またはその前駆細胞（例えば、T細胞）を産生または生成するための方法を提供する。細胞は、一般的に、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする1つまたは複数の核酸を導入することによって操作される。

【0465】

いくつかの態様では、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体をコードする1つまたは複数の核酸は、発現ベクターにより細胞内に導入される。本発明の対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする核酸配列を含む発現ベクターが、本明細書において提供される。適切な発現ベクターには、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、泡沫状ウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、操作雑種ウイルス、トランスポゾン媒介ベクターを非限定的に含むネイキッドDNA、例えばSleeping Beauty、Piggybak、およびPhi31などのインテグラーゼが含まれる。いくつかの他の適切な発現ベクターには、単純ヘルペスウイルス（HSV）およびレトロウイルス発現ベクターが含まれる。

【0466】

アデノウイルス発現ベクターは、アデノウイルスに基づき、ゲノムDNA内への組み込みについて低い容量を有するが、宿主細胞へのトランスフェクションについて高い効率を有する。アデノウイルス発現ベクターは、（a）発現ベクターのパッケージングを支援するため、ならびに（b）宿主細胞において対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせを最終的に発現させるために十分なアデノウイルス配列を含有する。いくつかの態様では、アデノウイルスゲノムは、36kbの直鎖状二本鎖DNAであり、本発明の発現ベクターを作製するために、そこに外来DNA配列（例えば、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする核酸）を挿入して、アデノウイルスDNAの大型片と置換する場合がある（例えば、Danthinne and Imperiale, Gene Therapy

10

20

30

40

50

(2000) 7(20): 1707-1714を参照されたい)。

【0467】

別の発現ベクターは、アデノ随伴ウイルスに基づき、アデノウイルス共役系(coupled system)を利用する。このAAV発現ベクターは、宿主ゲノム内への高い組み込み頻度を有する。このベクターは、非分裂細胞に感染することができ、したがって、例えば組織培養またはインビボで哺乳動物細胞中に遺伝子を送達するのに役立つ。AAVベクターは、感染度について広い宿主範囲を有する。AAVベクターの生成および使用に関する詳細は、米国特許第5,139,941号および同第4,797,368号に記載されている。

【0468】

レトロウイルス発現ベクターは、宿主ゲノム内に組み込み、大量の外来遺伝物質を送達し、広域の種および細胞型に感染し、特別な細胞株にパッケージングすることが可能である。レトロウイルスベクターは、核酸(例えば、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする核酸)をウイルスゲノム内のある特定の位置に挿入して、複製欠損のウイルスを産生することによって構築される。レトロウイルスベクターは、多種多様な細胞型に感染することができるが、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせの組み込みおよび安定な発現は、宿主細胞の分裂を必要とする。

【0469】

レンチウイルスベクターは、レンチウイルスに由来し、一般的なレトロウイルス遺伝子gag、pol、およびenvに加え、調節機能または構造的機能を有する他の遺伝子を含む複合レトロウイルスである(例えば、米国特許第6,013,516号および同第5,994,136号を参照されたい)。レンチウイルスのいくつかの例は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1、HIV-2)およびサル免疫不全ウイルス(SIV)を含む。レンチウイルスベクターは、HIV病原性遺伝子を何重にも減弱することによって生成されており、例えば、遺伝子env、vif、vpr、vpuおよびnefが欠失されて、ベクターが生物学的に安全になる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染することが可能であり、例えば、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする核酸の、インビボおよびエキスピボの両方の遺伝子移入および発現のために使用することができる(例えば、米国特許第5,994,136号を参照されたい)。

【0470】

本開示の核酸を含む発現ベクターは、当業者に公知の任意の手段によって宿主細胞内に導入することができる。発現ベクターは、所望であればトランスフェクションのためのウイルス配列を含む場合がある。あるいは、発現ベクターは、融合、エレクトロポレーション、バイオリスティックス、トランスフェクション、リポフェクションなどにより導入される場合がある。宿主細胞は、発現ベクターの導入前に培養において成長および増大され、続いてベクターの導入および組み込みに適した処理が行われる場合がある。次いで、宿主細胞が増大され、ベクター中に存在するマーカーによりスクリーニングされる場合がある。使用され得る様々なマーカーが当技術分野において公知であり、hprt、ネオマイシン耐性、チミジンキナーゼ、ヒグロマイシン耐性などを含み得る。本明細書に用いられる「細胞」、「細胞株」および「細胞培養」という用語は、互換的に使用される場合がある。いくつかの態様では、宿主細胞は、免疫細胞またはその前駆細胞、例えば、T細胞、NK細胞、またはNKT細胞である。

【0471】

本発明はまた、本開示の対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせを含み、それらを安定的に発現する遺伝子操作された細胞も提供する。いくつかの態様では、遺伝子操作された細胞は、治療に関連する子孫を生じさせることが可能な遺伝子操作されたTリンパ球(T細胞)、ナイーブT細胞(TN)、メモリーT細胞(例えば、中枢

10

20

30

40

50

性メモリーT細胞（TCM）、エフェクターメモリー細胞（TEM）、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、およびマクロファージである。一態様では、遺伝子操作された細胞は自己細胞である。

【0472】

改変された細胞（例えば、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体を含み、かつ／または二重特異性抗体、および／もしくはそれらの組み合わせを発現および分泌する）は、本開示の核酸を含む発現ベクターを宿主細胞に安定的にトランスフェクションすることによって産生され得る。本開示の改変された細胞を生成するための追加的な方法には、化学的形質転換方法（例えば、リン酸カルシウム、デンドリマー、リボソームおよび／もしくは陽イオン性ポリマーを使用する）、非化学的形質転換方法（例えば、エレクトロポレーション、光形質転換、遺伝子電気移入および／もしくは流体力学的送達）ならびに／または粒子に基づく方法（例えば、遺伝子銃を使用するインペールフェクション（impalefection）および／もしくはマグネトフェクション）が含まれるが、それに限定されるわけではない。本開示の対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および／もしくはスイッチ受容体、ならびに／または二重特異性抗体、ならびに／またはそれらの組み合わせを発現しているトランスフェクションされた細胞は、エキスピボで増大される場合がある。

10

【0473】

宿主細胞中に発現ベクターを導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。ベクターおよび／または外因性核酸を含む細胞を産生するための方法は、当技術分野において周知である。例えば、Sambrook et al. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New Yorkを参照されたい。宿主細胞中に発現ベクターを導入するための化学的方法は、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリボソームを含む脂質ベース系などのコロイド分散系を含む。

20

【0474】

使用に適した脂質は、商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma, St. Louis, MOから得ることができ；リン酸ジセチル（「DCP」）はK & K Laboratories (Plainview, NY) から得ることができ；コレステロール（「Choi」）は、Calbiochem-Behringから得ることができ；ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL) から得られる場合がある。脂質のクロロホルムまたはクロロホルム／メタノール溶液の原液は、約-20℃で保管することができる。クロロホルムは、メタノールよりも容易に蒸発するので唯一の溶媒として使用される場合がある。「リポソーム」は、封入された脂質二重層または凝集物の生成により形成される多様な単一および多重膜脂質ビヒクルを包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部水性媒質を有する小胞構造を有すると特徴づけることができる。多重膜リポソームは、水性媒質により分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質を過剰の水溶液中に懸濁した場合に自然に形成する。閉じた構造の形成前に、脂質成分は自己再編成を受け、水および溶解した溶質を脂質二重層の間に閉じ込める（Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10）。溶液状態で通常の小胞構造と異なる構造を有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造を呈するか、または単に脂質分子の非均一凝集物として存在する場合がある。リポフェクタミン-核酸複合体も企図される。

30

40

【0475】

宿主細胞中に外因性核酸を導入するためまたはその他の方法で細胞を本発明の阻害剤に曝露するために使用される方法にかかわらず、宿主細胞中の核酸の存在を確認するために多様なアッセイが行われる場合がある。そのようなアッセイには、例えば、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、RT-PCRおよびPCRなどの当業者に周知の分子生物学的アッセイ；特定のペプチドの存在または非存在を検出することなどの生化学的アッセ

50

イ、例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウエスタンブロット）によるもの、または本発明の範囲内に入る作用物質を特定するための本明細書に記載されるアッセイによるものが含まれる。

【0476】

一態様では、宿主細胞中に導入される核酸はRNAである。別の態様では、RNAは、インビトロ転写されたRNAまたは合成RNAを含むmRNAである。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により生成された鋳型を使用するインビトロ転写によって産生される場合がある。任意の供給源からの関心対象のDNAを、PCRにより、適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを使用して、インビトロmRNA合成のための鋳型に直接変換することができる。DNAの供給源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列または任意の他の適切なDNA供給源であり得る。

10

【0477】

PCRは、mRNAのインビトロ転写のための鋳型を生成するために使用される場合があり、そのmRNAが次いで細胞中に導入される。PCRを行うための方法は、当技術分野において周知である。PCRに使用するためのプライマーは、PCRのための鋳型として使用されるべきDNA領域と実質的に相補的な領域を有するように設計される。本明細書に用いられる「実質的に相補的」は、プライマー配列中の塩基の大部分またはすべてが相補的なヌクレオチド配列を指す。実質的に相補的な配列は、PCRのために使用されるアニーリング条件下で目的となるDNA標的とアニールまたはハイブリダイズすることが可能である。プライマーは、DNA鋳型の任意の部分と実質的に相補的であるように設計することができる。例えば、プライマーは、5' UTRおよび3' UTRを含む、細胞において通常転写される遺伝子部分（オープンリーディングフレーム）を増幅するように設計することができる。プライマーはまた、関心対象の特定のドメインをコードする遺伝子の部分を増幅するように設計される場合がある。一態様では、プライマーは、5' UTRおよび3' UTRのすべてまたは部分を含む、ヒトcDNAのコード領域を増幅するように設計される。PCRに有用なプライマーは、当技術分野において周知の合成方法により生成される。「フォワードプライマー」は、増幅されるべきDNA配列の上流であるDNA鋳型上のヌクレオチドと実質的に相補的なヌクレオチド領域を含有するプライマーである。「上流」は、本明細書において、コード鎖に対して増幅されるべきDNA配列の5'位を指すために使用される。「リバースプライマー」は、増幅されるべきDNA配列の下流である二本鎖DNA鋳型と実質的に相補的なヌクレオチド領域を含有するプライマーである。「下流」は、本明細書において、コード鎖に対して増幅されるべきDNA配列の3'位を指すために使用される。

20

30

【0478】

RNAの安定性および/または翻訳効率を促進する能力を有する化学構造も使用される場合がある。RNAは、好ましくは5' UTRおよび3' UTRを有する。一態様では、5' UTRは、0~3000ヌクレオチド長である。コード領域に付加されるべき5' UTR配列および3' UTR配列の長さは、UTRの異なる領域にアニールするPCR用プライマーを設計することを非限定的に含む、異なる方法により変更することができる。このアプローチを使用して、当業者は、転写されたRNAのトランスフェクション後に最適な翻訳効率を達成するために必要な5' UTRおよび3' UTRの長さを改変することができる。

40

【0479】

5' UTRおよび3' UTRは、関心対象の遺伝子についての天然の内因性5' UTRおよび3' UTRであることができる。あるいは、関心対象の遺伝子に内因性でないUTR配列を、フォワードプライマーおよびリバースプライマー中にUTR配列を組み込むことによって、または鋳型の任意の他の改変によって付加することができる。関心対象の遺伝子に内因性でないUTR配列の使用は、RNAの安定性および/または翻訳効率を改変するために有用であることができる。例えば、3' UTR配列中のAUに富むエレメントはmRNAの安定性を減少させることが公知である。したがって、転写されたRNAの安定性を当技術分野において周知であるUTRの特性に基づいて増加させるように、3' UTRを選択または設計することができる。

50

【0480】

一態様では、5' UTRは、内因性遺伝子のKozak配列を含有することができる。あるいは、関心対象の遺伝子に内因性でない5' UTRが上記のようなPCRにより付加される場合、5' UTR配列を付加することによりコンセンサスKozak配列を再設計することができる。Kozak配列は、いくつかのRNA転写物の翻訳効率を増加させることができるが、すべてのRNAが効率的な翻訳を可能にするために必要であるとは思えない。多くのmRNAにとってのKozak配列の必要性は、当技術分野において公知である。他の態様では、5' UTRは、RNAゲノムが細胞中で安定なRNAウイルスに由来することができる。他の態様では、mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨害するために、様々なヌクレオチド類似体を3' UTRまたは5' UTR中に使用することができる。

10

【0481】

遺伝子クローニングの必要なしにDNA鋳型からのRNA合成を可能にするために、転写プロモーターは、転写されるべき配列の上流のDNA鋳型に結び付けられるべきである。RNAポリメラーゼについてのプロモーターとして機能する配列がフォワードプライマーの5'末端に付加される場合、RNAポリメラーゼプロモーターは、PCR産物中の転写されるべきオープンリーディングフレームの上流に組み込まれるようになる。一態様では、プロモーターは、本明細書における他の箇所に記載されるようなT7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターには、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが含まれるが、それに限定されるわけではない。T7、T3およびSP6プロモーターについてのコンセンサスヌクレオチド配列は、当技術分野において公知である。

20

【0482】

一態様では、mRNAは、5'末端上のキャップおよび3'ポリ(A)尾部の両方を有しており、これらが、リボソームの結合、翻訳開始および細胞中でのmRNAの安定性を決定する。環状DNA鋳型、例えばプラスミドDNA上で、RNAポリメラーゼは、真核細胞における発現に適さない長いコンカテマー産物を産生する。3' UTRの末端で直鎖状にされたプラスミドDNAの転写は、通常サイズのmRNAを生じ、このmRNAは、転写後にポリアデニル化された場合であっても真核生物のトランスフェクションに有効でない。

【0483】

直鎖DNA鋳型上で、ファージT7 RNAポリメラーゼは、鋳型の最終塩基を超えて転写物の3'末端を延長することができる (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13: 6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003))。

30

【0484】

転写DNA鋳型のポリA/Tセグメントは、100T尾部などのポリT尾部(サイズは50~5000Tであることができる)を含有するリバースプライマーを使用することによりPCRの間に、または非限定的にDNAの連結もしくはインビトロ組み換えを含む任意の他の方法によりPCRの後に、産生することができる。ポリ(A)尾部はまた、RNAに安定性を提供し、それらの分解を低減する。一般的に、ポリ(A)尾部の長さは、転写されたRNAの安定性と正に相関する。一態様では、ポリ(A)尾部は、100~5000アデノシンである。

【0485】

RNAのポリ(A)尾部は、インビトロ転写後に大腸菌(*E. coli*)ポリAポリメラーゼ(E-PAP)などのポリ(A)ポリメラーゼの使用によりさらに伸長することができる。一態様では、ポリ(A)尾部の長さを100ヌクレオチドから300~400ヌクレオチドへと増加させることは、RNAの翻訳効率に約2倍の増加をもたらす。追加的に、3'末端への異なる化学基の付加は、mRNAの安定性を増加させることができる。そのような付加は、修飾/人工ヌクレオチド、アプタマーおよび他の化合物を含有することができる。例えば、ATP類似体を、ポリ(A)ポリメラーゼを使用してポリ(A)尾部に組み込むことができる。ATP類似体は、RNAの安定性をさらに増加させることができる。

40

【0486】

5'キャップもまた、RNA分子に安定性を提供する。好ましい態様では、本明細書に開示

50

される方法により産生されるRNAは、5'キャップを含む。5'キャップは、当技術分野において公知の技法および本明細書に記載される技法を使用して提供される (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005))。

【0487】

いくつかの態様では、RNAは、インビトロ転写されたRNAのように細胞中にエレクトロポレーションされる。糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤、および界面活性剤などの、細胞透過性および生存率を助長する因子を含有することができる、細胞エレクトロポレーションに適した任意の溶質が含まれることができる。

10

【0488】

いくつかの態様では、本開示の対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする核酸は、RNA、例えば、インビトロ合成されたRNAであろう。RNAのインビトロ合成のための方法は、当技術分野において公知であり; 対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする配列を含むRNAを合成するために任意の公知の方法を使用することができる。宿主細胞中にRNAを導入するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、Zhao et al. Cancer Res. (2010) 15: 9053を参照されたい。対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードするヌクレオチド配列を含むRNAを宿主細胞中に導入することは、インビトロまたはエキスピボまたはインピボで実施することができる。例えば、宿主細胞 (例えば、NK細胞、細胞傷害性Tリンパ球など) に、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードするヌクレオチド配列を含むRNAをインビトロまたはエキスピボでエレクトロポレーションすることができる。

20

【0489】

開示される方法は、遺伝子改変されたT細胞が標的がん細胞を死滅させる能力の評価を含む、がん、幹細胞、急性および慢性感染、ならびに自己免疫疾患の分野の基礎研究および治療法におけるT細胞活性のモジュレーションに適用することができる。

30

【0490】

これらの方法はまた、例えば、プロモーターまたは投入RNAの量を変化させることにより、発現レベルを広い範囲で制御する能力を提供し、発現レベルを個別に調節することを可能にする。さらに、PCRに基づくmRNA産生の技法は、異なる構造およびそれらのドメインの組み合わせを有するmRNAの設計を極めて容易にする。

【0491】

本発明のRNAトランスフェクション法の1つの利点は、RNAトランスフェクションが本質的に一過性であり、ベクターを用いないことである。RNA導入遺伝子は、リンパ球に送達することができ、いかなる追加的なウイルス配列の必要もなしに、最小の発現カセットとして、短時間のインビトロ細胞活性化後にその中で発現させることができる。これらの条件下では、宿主細胞ゲノム中への導入遺伝子の組み込みは、起こる可能性が低そうである。RNAのトランスフェクション効率およびリンパ球集団全体を均一に改変するRNAの能力により、細胞のクローニングは不必要である。

40

【0492】

インビトロ転写されたRNA (IVT-RNA) によるT細胞の遺伝的改変は、共に様々な動物モデルにおいて試験に成功した2つの異なる戦略を利用する。インビトロ転写されたRNAは、リポフェクションまたはエレクトロポレーションにより細胞にトランスフェクションされる。移入されたIVT-RNAの長期発現を達成するために、様々な改変を使用してIVT-RNAを安定化することが望ましい。

50

【0493】

インビトロ転写のための鋳型として標準的に利用されるIVTベクターであって、安定化されたRNA転写物が産生されるように遺伝的に改変されているいくつかのIVTベクターが文献から公知である。現在、当技術分野において使用されるプロトコルは、以下の構造を有するプラスミドベクターに基づく：RNA転写を可能にする5'RNAポリメラーゼプロモーターに続いて、3'および/または5'のいずれかに非翻訳領域（UTR）が隣接する関心対象の遺伝子、ならびに50～70個のAヌクレオチドを含有する3'ポリアデニルカセット。インビトロ転写の前に、II型制限酵素により環状プラスミドがポリアデニルカセットの下流で直鎖状にされる（認識配列は切断部位に対応する）。したがって、ポリアデニルカセットは、転写物中のその後のポリ（A）配列に対応する。この手順の結果として、いくつかのヌクレオチドは、直鎖状にされた後に酵素切断部位の部分として残り、ポリ（A）配列を3'末端で伸長またはマスクする。この非生理的オーバーハングがそのような構築物から細胞内で産生されるタンパク質の量に影響するかどうかは明らかでない。

10

【0494】

別の局面では、RNA構築物は、エレクトロポレーションによって細胞内に送達される。例えば、US 2004/0014645、US 2005/0052630A1、US 2005/0070841A1、US 2004/0059285A1、US 2004/0092907A1に教示されるような、哺乳動物細胞内への核酸構築物のエレクトロポレーションの公式化および方法論を参照されたい。任意の公知の細胞型のエレクトロポレーションに必要な電場の強さを含む様々なパラメーターは、関連する研究文献ならびに本分野の数多くの特許および出願から一般的に公知である。例えば、米国特許第6,678,556号、同第7,171,264号、および同第7,173,116号を参照されたい。エレクトロポレーションの治療的応用のための装置は、市販されており、例えば、MedPulser（商標）DNAエレクトロポレーション治療システム（Inovio/Genetronics, San Diego, Calif.）であり、米国特許第6,567,694号；同第6,516,223号、同第5,993,434号、同第6,181,964号、同第6,241,701号、および同第6,233,482号などの特許に記載されており；エレクトロポレーションはまた、例えばUS20070128708A1に記載されるように、細胞のインビトロでのトランスフェクションのために使用される場合がある。エレクトロポレーションはまた、核酸を細胞内にインビトロで送達するために利用される場合がある。したがって、当業者に公知の多数の利用可能なデバイスおよびエレクトロポレーションシステムのいずれかを利用した、発現構築物を含む核酸の細胞内へのエレクトロポレーション媒介投与は、関心対象のRNAを標的細胞に送達するための刺激的な新しい手段を提示する。

20

30

【0495】

いくつかの態様では、免疫細胞（例えばT細胞）は、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする核酸分子を導入する前、その途中および/または後にインキュベートまたは培養することができる。いくつかの態様では、細胞（例えばT細胞）は、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする核酸分子を導入する前、その途中または後に、例えば、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードするウイルスベクター（例えばレンチウイルスベクター）で細胞を形質導入する前、その途中または後に、インキュベートまたは培養することができる。いくつかの態様では、この方法は、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせをコードする核酸分子を導入する前に、刺激物質または活性化物質（例えば抗CD3/抗CD28抗体）で細胞を活性化または刺激することを含む。

40

【0496】

いくつかの態様では、本発明の対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組

50

み合わせをコードする核酸配列が1つまたは複数の別々の核酸配列に存在する場合、該1つまたは複数の核酸配列のそれぞれを導入する順序は異なる場合がある。例えば、対象のCARならびにドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸配列が、最初に宿主細胞内に導入され、続いて対象の二重特異性抗体をコードする核酸配列が導入される場合がある。例えば、対象の二重特異性抗体をコードする核酸配列が、最初に宿主細胞内に導入され、続いて対象のCARならびにドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体をコードする核酸配列が導入される場合がある。いくつかの態様では、1つまたは複数の核酸配列のそれぞれは、宿主細胞内に同時に導入される。当業者は、1つまたは複数の核酸配列のそれぞれが宿主細胞内に導入される順序を決定することが可能であろう。

10

【0497】

H. 免疫細胞の供給源

増大の前に、エクスピボ操作のために免疫細胞の供給源が対象から得られる。エクスピボ操作のための標的細胞の供給源はまた、例えば、自己または異種のドナー血、臍帯血、または骨髄も含む場合がある。例えば、免疫細胞の供給源は、本発明の改変された免疫細胞により処置されるべき対象に由来する場合があり、例えば、対象の血液、対象の臍帯血、または対象の骨髄であり得る。対象の非限定的な例には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が含まれる。好ましくは、対象はヒトである。

【0498】

20

免疫細胞は、血液、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、臍帯、リンパ液、またはリンパ器官を含むいくつかの供給源から得ることができる。免疫細胞は、免疫系の細胞、例えば自然免疫または適応免疫の細胞、例えば、リンパ球、典型的にはT細胞および/またはNK細胞を含む骨髄系細胞またはリンパ球系細胞である。他の例示的な細胞には、人工多能性幹細胞(iPSC)を含む、複能性および多能性幹細胞などの幹細胞が含まれる。いくつかの局面では、細胞はヒト細胞である。処置されるべき対象に関して、細胞は、同種および/または自己であり得る。細胞は、典型的には、初代細胞、例えば、対象から直接単離され、かつ/または対象から単離され凍結された初代細胞である。

【0499】

ある特定の態様では、免疫細胞は、T細胞、例えば、CD8+ T細胞(例えば、CD8+ ナイーブT細胞、中枢性メモリーT細胞、またはエフェクターメモリーT細胞)、CD4+ T細胞、ナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)、制御性T細胞(Treg)、幹細胞メモリーT細胞、リンパ球系前駆細胞、造血幹細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)または樹状細胞である。いくつかの態様では、細胞は、単球または顆粒球、例えば、骨髄系細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、および/または好塩基球である。ある態様では、標的細胞は、人工多能性幹(iPS)細胞またはiPS細胞に由来する細胞、例えば、対象から生成され、1つまたは複数の標的遺伝子の発現を変化させる(例えばそれに変異を誘導する)または操作するように操作され、例えば、T細胞、例えば、CD8+ T細胞(例えば、CD8+ ナイーブT細胞、中枢性メモリーT細胞、またはエフェクターメモリーT細胞)、CD4+ T細胞、幹細胞メモリーT細胞、リンパ球系前駆細胞または造血幹細胞に分化したiPS細胞である。

30

【0500】

いくつかの態様では、細胞は、T細胞または他の細胞型の1つまたは複数のサブセット、例えばT細胞集団全体、CD4+細胞、CD8+細胞、およびその部分集団、例えば機能、活性化状態、成熟、分化能、増大、再循環、局在、および/もしくは持続能、抗原特異性、抗原受容体の種類、特定の器官もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、および/または分化の度合いにより定義されるものを含む。T細胞ならびに/またはCD4+および/もしくはCD8+ T細胞のサブタイプおよび部分集団は中でも、ナイーブT(TN)細胞、エフェクターT細胞(TEFF)、メモリーT細胞およびそれらのサブタイプ、例えば幹細胞メモリーT(TSCM)、中枢性メモリーT(TCM)、エフェクタ

40

50

ーメモリーT (TEM)、または最終分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、未熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT (MAIT)細胞、自然および適応制御性T (Treg)細胞、ヘルパーT細胞、例えばTH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞、アルファ/ベータT細胞、およびデルタ/ガンマT細胞である。ある特定の態様では、当技術分野において入手可能ないくつかのT細胞系が、使用される場合がある。

【0501】

いくつかの態様では、方法は、対象から免疫細胞を単離する段階、それらを調製、処理、培養、および/または操作する段階を含む。いくつかの態様では、操作された細胞の調製は、1つまたは複数の培養および/または調製段階を含む。記載のように操作するための細胞は、生物学的試料などの試料、例えば対象から得られたまたは対象に由来する試料から単離される場合がある。いくつかの態様では、細胞が単離される対象は、疾患もしくは状態を有する対象、または細胞療法を必要とする、もしくは細胞療法が投与されるであろう対象である。対象は、いくつかの態様では、そのために細胞が単離、処理、および/または操作される、養子細胞療法などの特定の治療的介入の必要のあるヒトである。したがって、細胞は、いくつかの態様では、初代細胞、例えば、初代ヒト細胞である。試料には、対象から直接採取された組織、液体、および他の試料、ならびに分離、遠心分離、遺伝子操作 (例えばウイルスベクターによる形質導入)、洗浄、および/またはインキュベーションなどの1つまたは複数の処理段階の結果として生じる試料が含まれる。生物学的試料は、生物学的供給源から直接得られる試料または処理された試料であることができる。生物学的試料には、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗などの体液、組織、ならびに器官試料が、それらに由来する処理された試料を含めて含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0502】

いくつかの局面では、細胞が由来または単離される試料は、血液もしくは血液由来試料であるか、またはアフエーシスもしくは白血球アフエーシス産物である、もしくはそれに由来する。例示的な試料には、全血、末梢血単核細胞 (PBMC)、白血球、骨髓、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、腸管関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、他のリンパ系組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸、精巣、卵巣、扁桃、もしくは他の器官、および/またはそれらに由来する細胞が含まれる。試料は、細胞療法、例えば、養子細胞療法に関連して、自己および同種供給源からの試料を含む。

【0503】

いくつかの態様では、細胞は、細胞株、例えば、T細胞株に由来する。細胞は、いくつかの態様では、異種供給源から、例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類、およびブタから得られる。いくつかの態様では、細胞の単離は、1つまたは複数の調製段階および/または親和性に基づかない細胞分離段階を含む。いくつかの例では、細胞が、洗浄、遠心分離、および/または1つもしくは複数の試薬の存在下でインキュベートされて、例えば、望まれない成分が除去され、所望の成分が濃縮され、特定の試薬に感受性の細胞が溶解または除去される。いくつかの例では、細胞は、密度、接着特性、サイズ、特定の成分に対する感受性および/または耐性などの1つまたは複数の特性に基づき分離される。

【0504】

いくつかの例では、対象の循環血からの細胞は、例えば、アフエーシスまたは白血球アフエーシスにより得られる。試料は、いくつかの局面では、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、および/または血小板を含有し、いくつかの局面では、赤血球および血小板以外の細胞を含有する。いくつかの態様では、対象から収集された血液細胞は、洗浄されて、例えば、血漿画分を除去し、その後の処理段階に適した緩衝液または媒質中に細胞を入れる。いくつかの態様では、細胞は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄される。いくつかの局面では、洗浄段階は、タンジェント流濾過 (TFF) により、製造業者の説明に従って成し遂げられる。いくつかの態様では、細胞は洗浄後

10

20

30

40

50

に多様な生体適合性緩衝液中に再懸濁される。ある特定の態様では、血液細胞試料の成分が除去され、細胞が培地中に直接再懸濁される。いくつかの態様では、方法は、赤血球を溶解し、PercollまたはFicoll勾配による遠心分離を行うことによる末梢血からの白血球の調製などの、密度に基づく細胞分離方法を含む。

【0505】

一態様では、免疫は、アフェレーシスまたは白血球アフェレーシスによって得られた個体の循環血から得られた細胞である。アフェレーシス産物は、典型的には、T細胞を含むリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含有する。血漿画分を除去するため、および適切な緩衝液もしくは媒質、例えばリン酸緩衝食塩水（PBS）中に細胞を入れるために、アフェレーシスによって収集された細胞が洗浄される場合があり、または洗浄溶液は、その後の処理段階のためにカルシウムを欠如し、かつマグネシウムを欠如する場合があり、もしくはすべてとは言わないまでも多くの二価陽イオンを欠如する場合がある。洗浄後、細胞は、多様な生体適合性緩衝液、例えば、Ca不含、Mg不含PBSなどの中に再懸濁される場合がある。あるいは、アフェレーシス試料の望ましくない成分が、除去され、細胞が培地中に直接再懸濁される場合がある。

【0506】

いくつかの態様では、単離方法は、1種または複数種の特異的分子、例えば表面マーカー、例えば、表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸の細胞中の発現または存在に基づく、異なる細胞型の分離を含む。いくつかの態様では、そのようなマーカーに基づく分離のために、任意の公知の方法が使用される場合がある。いくつかの態様では、分離は、親和性または免疫親和性に基づく分離である。例えば、分離は、いくつかの局面では、例えば、そのようなマーカーに特異的に結合する抗体または結合パートナーと一緒にインキュベーション、一般的にそれに続く洗浄段階、および抗体または結合パートナーに結合していない細胞からの抗体または結合パートナーと結合した細胞の分離による、1つまたは複数のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの細胞発現または発現レベルに基づく細胞および細胞集団の分離を含む。

【0507】

そのような分離段階は、試薬と結合した細胞がさらなる使用のために保持される正の選択、および/または抗体もしくは結合パートナーに結合していない細胞が保持される負の選択に基づくことができる。いくつかの例では、両方の画分がさらなる使用のために保持される。いくつかの局面では、所望の集団以外の細胞により発現されるマーカーに基づいて分離が最も良好に行われるように、不均一な集団中の細胞型を特異的に特定する抗体が利用不能な場合に、負の選択は特に有用であることができる。分離は、特定の細胞集団または特定のマーカーを発現している細胞の100%の濃縮または除去を生じる必要はない。例えば、特定の種類の細胞、例えばマーカーを発現している細胞の正の選択または濃縮は、そのような細胞の数またはパーセンテージを増加させることを指すが、マーカーを発現していない細胞の完全な非存在をもたらす必要はない。同様に、マーカーを発現している細胞などの特定の種類の細胞の負の選択、除去、または枯渇は、そのような細胞の数またはパーセンテージを減少させることを指すが、そのような細胞のすべての完全な除去をもたらす必要はない。

【0508】

いくつかの例では、複数ラウンドの分離段階が実施され、その際、1つの段階から正または負の選択をされた画分が、後続の正または負の選択などの別の分離段階に供される。いくつかの例では、それぞれが負の選択のための標的とされるマーカーに特異的な複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることなどによって、複数のマーカーを同時発現している細胞を単一の分離段階で枯渇させることができる。同様に、複数の抗体または様々な細胞型に発現される結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞型に同時に正の選択を行うことができる。

【0509】

いくつかの態様では、T細胞集団の1つまたは複数は、1つまたは複数の特定のマーカー

10

20

30

40

50

、例えば表面マーカーについて陽性（マーカー⁺）である、もしくはそれを高レベル発現する（マーカー^{high}）細胞、または1つもしくは複数のマーカーについて陰性である（マーカー⁻）もしくはそれを比較的lowレベルを発現する（マーカー^{low}）細胞が濃縮または枯渇されている。例えば、いくつかの局面では、T細胞の特定の部分集団、例えば、1つまたは複数の表面マーカー、例えば、CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、および/またはCD45RO⁺ T細胞について陽性またはそれを高レベル発現している細胞は、正または負の選択技法により単離される。場合によっては、そのようなマーカーは、T細胞のある特定の集団（非メモリー細胞など）に存在しない、または比較的lowレベルで発現されるが、T細胞のある特定の他の集団（メモリー細胞など）に存在する、または比較的高レベル発現されるマーカーである。一態様では、細胞（CD8⁺細胞、またはT細胞、例えばCD3⁺細胞など）は、CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127、および/もしくはCD62Lについて陽性である、もしくはその高い表面レベルを発現する細胞が濃縮されている（すなわち、正の選択をされている）、かつ/またはCD45RAについて陽性である、もしくはその高い表面レベルを発現する細胞が枯渇されている（例えば、それについて負の選択をされている）。いくつかの態様では、細胞は、CD122、CD95、CD25、CD27、および/またはIL7-Ra（CD127）について陽性であるまたはその高い表面レベルを発現している細胞が濃縮されているまたはそれを枯渇している。いくつかの例では、CD8⁺ T細胞は、CD45ROについて陽性（またはCD45RAについて陰性）およびCD62Lについて陽性の細胞が濃縮されている。例えば、CD3⁺、CD28⁺ T細胞は、CD3/CD28コンジュゲート磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T Cell Expander）を使用して正の選択を行うことができる。

【0510】

いくつかの態様では、T細胞は、B細胞、単球、または他の白血球などの非T細胞に発現されるマーカー、例えばCD14の負の選択によってPBMC試料から分離される。いくつかの局面では、CD4⁺またはCD8⁺選択段階は、CD4⁺ヘルパーT細胞およびCD8⁺細胞傷害性T細胞を分離するために使用される。そのようなCD4⁺集団およびCD8⁺集団は、1つまたは複数のナীব、メモリー、および/またはエフェクターT細胞部分集団上に発現されるまたは比較的高い割合で発現されるマーカーについて正の選択または負の選択により部分集団にさらに選別することができる。いくつかの態様では、CD8⁺細胞は、例えば、それぞれの部分集団に関連する表面抗原に基づく正の選択または負の選択により、ナীব、中枢性メモリー、エフェクターメモリー、および/または中枢性メモリー幹細胞についてさらに濃縮または枯渇される。いくつかの態様では、中枢性メモリーT（TCM）細胞についての濃縮は、有効性を増加させるために、例えば、投与後に長期生存、増大、および/または生着を改善するために実施され、それは、いくつかの局面ではそのような部分集団において特に堅固である。いくつかの態様では、TCMが濃縮されたCD8⁺ T細胞およびCD4⁺ T細胞を組み合わせることで、有効性がさらに高まる。

【0511】

態様では、メモリーT細胞は、CD8⁺末梢血リンパ球のCD62L⁺およびCD62L⁻サブセットの両方に存在する。PBMCは、抗CD8抗体および抗CD62L抗体などを使用して、CD62L⁻CD8⁺および/またはCD62L⁺CD8⁺画分について濃縮されているまたはそれを枯渇していることができる。いくつかの態様では、CD4⁺ T細胞集団およびCD8⁺ T細胞部分集団、例えば、中枢性メモリー（TCM）細胞について濃縮された部分集団である。いくつかの態様では、中枢性メモリーT（TCM）細胞についての濃縮は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、および/またはCD127について陽性またはその高い表面発現に基づく；いくつかの局面では、それは、CD45RAおよび/またはグランザイムBを発現しているまたは高度に発現している細胞についての負の選択に基づく。いくつかの局面では、TCM細胞が濃縮されたCD8⁺集団の単離は、CD4、CD14、CD45RAを発現している細胞の枯渇、およびCD62Lを発現している細胞についての正の選択または濃縮により実施される。一局面では、中枢性メモリーT（TCM）細胞の濃縮は、CD4の発現に基づき選択される細胞の負の画分から開始して実施され、それが、CD14およびCD45RAの発現に基づく負の選択、

10

20

30

40

50

ならびにCD62Lに基づく正の選択に供される。そのような選択は、いくつかの局面では、同時に実施され、他の局面では、どちらかの順序で順次に実施される。いくつかの局面では、CD8+細胞集団または部分集団を調製するのに使用されるCD4発現に基づく同じ選択段階はまた、CD4+細胞集団または部分集団を生成するために使用され、それにより、CD4に基づく分離からの正の画分および負の画分の両方が、任意で1つまたは複数のさらなる正または負の選択段階に続いて、方法のその後の段階において保持および使用される。

【0512】

CD4+ Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することにより、ナイーブ、中枢性メモリー、およびエフェクター細胞に選別される。CD4+ リンパ球は、標準的な方法により得ることができる。いくつかの態様では、ナイーブCD4+ Tリンパ球は、CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4+ T細胞である。いくつかの態様では、中枢性メモリーCD4+細胞は、CD62L⁺およびCD45RO⁺である。いくつかの態様では、エフェクターCD4+細胞は、CD62L⁻およびCD45RO⁺である。一例では、負の選択によりCD4+細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。いくつかの態様では、抗体または結合パートナーは、正および/または負の選択のための細胞の分離を可能にするために磁気ビーズまたは常磁性ビーズなどの固体支持体またはマトリックスに結合される。

【0513】

いくつかの態様では、細胞は、遺伝子操作の前またはそれに関連してインキュベートおよび/または培養される。インキュベーション段階は、培養(culture)、培養(cultivation)、刺激、活性化、および/または繁殖を含むことができる。いくつかの態様では、組成物または細胞は、刺激条件または刺激物質の存在下でインキュベートされる。そのような条件には、集団中の細胞の増殖、増大、活性化、および/もしくは生存を誘導するために、抗原曝露を模倣するために、ならびに/または遺伝子操作、例えば組み換え抗原受容体の導入のために細胞をプライミングするために設計された条件が含まれる。条件は、特定の媒質、温度、酸素含量、二酸化炭素含量、時間、作用物質、例えば、栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオン、および/または刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組み換え可溶性受容体、および細胞を活性化するように設計された任意の他の作用物質のうちの1つまたは複数を含むことができる。いくつかの態様では、刺激条件または刺激物質は、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することが可能な1つまたは複数の作用物質、例えば、リガンドを含む。いくつかの局面では、作用物質は、T細胞におけるTCR/CD3細胞内シグナル伝達カスケードを開始する、または開始する。そのような作用物質は、例えば、ビーズなどの固体支持体に結合した抗体、例えば、TCR成分および/もしくは共刺激受容体に特異的な抗体、例えば、抗CD3、抗CD28、ならびに/または1つもしくは複数のサイトカインを含むことができる。任意で、増大方法は、培地に抗CD3および/または抗CD28抗体を(例えば、少なくとも約0.5ng/mlの濃度で)添加する段階をさらに含む場合がある。いくつかの態様では、刺激物質は、IL-2および/またはIL-15、例えば、少なくとも約10ユニット/mLのIL-2濃度を含む。

【0514】

別の態様では、T細胞は、赤血球を溶解することおよび単球を枯渇させることによって、例えば、PERCOLL(商標)勾配による遠心分離により、末梢血から単離される。あるいは、T細胞は、臍帯から単離することができる。任意の事象では、T細胞の特定の部分集団を正または負の選択技法によりさらに単離することができる。

【0515】

そのように単離された臍帯血単核細胞は、非限定的にCD34、CD8、CD14、CD19、およびCD56を含む、ある特定の抗原を発現している細胞を枯渇していることができる。これらの細胞の枯渇は、単離された抗体、抗体を含む生物学的試料、例えば腹水、物理的支持体に結合した抗体、細胞と結合した抗体を使用して成し遂げることができる。

【0516】

負の選択によるT細胞集団の濃縮は、負の選択をされた細胞に独特な表面マーカーに対する抗体の組み合わせを使用して成し遂げることができる。好ましい方法は、負の選択をされた細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用する負磁気免疫接着 (negative magnetic immunoadherence) またはフローサイトメトリーを介する細胞選別および/または選択である。例えば、負の選択によりCD4⁺細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。

【0517】

正または負の選択により細胞の所望の集団を単離するために、細胞濃度および表面（例えば、ビーズなどの粒子）を変化させることができる。ある特定の態様では、ビーズおよび細胞と一緒に混合される体積を顕著に減少させて（すなわち、細胞の濃度を増加させて）、細胞とビーズとの最大の接触を保証することが望ましい場合がある。例えば、一態様では、20億個/mlの細胞濃度が使用される。一態様では、10億個/mlの細胞濃度が使用される。さらなる態様では、細胞1億個/ml超が使用される。さらなる態様では、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個/mlの細胞濃度が使用される。なお別の態様では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個/mlの細胞濃度が使用される。さらなる態様では、1億2500万または1億5000万個/mlの細胞濃度を使用することができる。高濃度を使用することは、増加した細胞収量、細胞活性化、および細胞増大をもたらすことができる。

【0518】

T細胞はまた、単球の除去段階を必要としない洗浄段階の後に凍結することができる。理論に縛られることを望むわけではないが、凍結およびその後の解凍段階は、細胞集団中の顆粒球およびある程度の単球を除去することによって、より均一な産物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄段階の後で、細胞が凍結溶液中に懸濁される場合がある。多数の凍結溶液およびパラメーターが当技術分野において公知であり、この状況で有用であろうものの、非限定的な例では、1つの方法は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または他の適切な細胞凍結媒を使用することを伴う。次いで細胞は、1 / 分の速度で-80 に凍結され、液体窒素保存タンクの気相中で保管される。制御凍結の他の方法および-20 または液体窒素中での即時の非制御凍結が使用される場合もある。

【0519】

一態様では、T細胞集団は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、T細胞の精製集団、およびT細胞株などの細胞中に含まれる。別の態様では、末梢血単核細胞は、T細胞集団を含む。なお別の態様では、精製T細胞は、T細胞集団を含む。

【0520】

ある特定の態様では、制御性T細胞 (Treg) は、試料から単離することができる。試料は、臍帯血または末梢血を含むことができるが、それに限定されるわけではない。ある特定の態様では、Tregは、フローサイトメトリー選別によって単離される。試料は、当技術分野において公知の任意の手段により単離前にTregが濃縮されることができる。単離されたTregを、凍結保存し、かつ/または使用前に増大させることができる。Tregを単離するための方法は、米国特許第7,754,482号、同第8,722,400号、および同第9,555,105号、ならびに米国特許出願第13/639,927号に記載されており、それらの内容は、その全体で本明細書に組み入れられる。

【0521】

I. 免疫細胞の増大

対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体、および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせを発現させるための細胞の改変の前であろうと後であろうと、例えば、米国特許第6,352,694号；同第6,534,055号；同第6,905,680号；同第6,692,964号；同第5,858,358号；同第6,887,466号；同第6,905,681号；同第7,144,575号；同第7,067,318号；同第7,172,869号；同

10

20

30

40

50

第7,232,566号；同第7,175,843号；同第5,883,223号；同第6,905,874号；同第6,797,514号；同第6,867,041号；および米国特許出願公開第20060121005号に記載されるような方法を使用して、細胞を活性化し、その数を増大させることができる。例えば、本発明のT細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する作用物質およびT細胞表面の共刺激分子を刺激するリガンドが結び付いた表面との接触により増大される場合がある。特に、T細胞集団は、表面に固定化された抗CD3抗体、もしくはその抗原結合フラグメント、または抗CD2抗体との接触により、あるいはカルシウムイオノフォアと一緒にのプロテインキナーゼC活性化因子（例えば、プリオスタチン）との接触により刺激される場合がある。T細胞表面のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子と結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞は、T細胞の増殖を刺激するために適した条件下で抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触することができる。抗CD28抗体の例には、9.3、B-T3、XR-CD28（Diaclone, Besancon, France）が含まれ、これらを本発明に使用することができるが、当技術分野において公知の他の方法および試薬も同様に使用することができる（例えば、ten Berge et al., Transplant Proc. (1998) 30(8): 3975-3977；Haanen et al., J. Exp. Med. (1999) 190(9): 1319-1328；およびGarland et al., J. Immunol. Methods (1999) 227(1-2): 53-63を参照されたい）。

【0522】

本明細書に開示される方法によりT細胞を増大することは、約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれ超、およびそれらの間の任意およびすべての整数（whole integer）および分数（partial integer）倍にすることができる。一態様では、T細胞は約20倍～約50倍の範囲で増大する。

【0523】

培養に続き、T細胞は、培養装置に入れた細胞培地中で、一定期間、または細胞が集密に達する、もしくは別の培養装置に細胞を継代する前の最適な継代のための高い細胞密度に達するまで、インキュベートすることができる。培養装置は、細胞をインビトロ培養するために一般に使用される任意の培養装置であることができる。好ましくは、集密のレベルは、別の培養装置に細胞を継代する前に70%またはそれよりも大きい。より好ましくは、集密のレベルは、90%またはそれよりも大きい。期間は、インビトロ細胞培養に適した任意の時間であることができる。T細胞培地は、任意の時間でのT細胞の培養の間に交換される場合がある。好ましくは、T細胞培地は、約2～3日毎に交換される。次いでT細胞は、培養装置から回収され、そこからT細胞を直ちに使用することができ、または凍結保存して、後で使用するために保管することができる。一態様では、本発明は、増大したT細胞を凍結保存することを含む。凍結保存されたT細胞は、T細胞中に核酸を導入する前に解凍される。

【0524】

別の態様では、方法は、T細胞を単離する段階およびT細胞を増大させる段階を含む。別の態様では、本発明は、増大の前にT細胞を凍結保存する段階をさらに含む。なお別の態様では、凍結保存されたT細胞は、キメラ膜タンパク質をコードするRNAをエレクトロポレーションするために解凍される。

【0525】

細胞をエキスピボ増大させるための別の手順は、米国特許第5,199,942号（参照により本明細書に組み入れられる）に記載されている。米国特許第5,199,942号に記載されるような増大は、本明細書に記載される増大の他の方法の代替または追加であることができる。簡潔には、T細胞のエキスピボ培養および増大は、米国特許第5,199,942号に記載されるものなどの細胞増殖因子または他の因子、例えばflt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドへの追加を含む。一態様では、T細胞を増大することは、flt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドからなる群より選択される因子と共にT細胞を培養することを含む。

【0526】

本明細書に記載されるような培養する段階（本明細書に記載されるような作用物質との接触またはエレクトロポレーション後）は、非常に短く、例えば、24時間未満、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23時間であることができる。本明細書にさらに記載されるような培養する段階（本明細書に記載されるような作用物質との接触）は、より長く、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、またはそれ超の日数であることができる。

【0527】

培養細胞を説明するために様々な用語が使用される。細胞培養物は、一般的に、生きた生物から取得され、制御された条件下で成長させた細胞を指す。初代細胞培養物は、生物から直接取得された細胞、組織または器官の培養物であって、最初の植え継ぎ前の培養物である。細胞の成長および/または分裂を容易にしてより大きい細胞集団をもたらす条件下で細胞が成長培地中に入れられた場合に、細胞は培養において増大される。細胞が培養において増大される場合、細胞の増殖速度は、典型的には細胞が数を倍加するために必要な時間、別の言い方で倍加時間として知られる時間により測定される。

10

【0528】

植え継ぎの各ラウンドは、継代と称される。細胞が植え継がれたとき、それらの細胞は継代されたと称される。特定の細胞集団または細胞株は、時に、継代された回数により称される、または特徴づけられる。例えば、10回継代された培養細胞集団は、P10培養物と称される場合がある。初代培養物、すなわち、組織から細胞を単離後の最初の培養物は、P0と呼ばれる。1回目の植え継ぎの後、細胞は二次培養物（P1または継代1）と説明される。2回目の植え継ぎの後、細胞は三次培養物（P2または継代2）になる、など。継代期間の間に多数の集団倍加があり得ることが、当業者により理解されるであろう；したがって、培養物の集団倍加数は、継代数よりも大きい。継代の間の期間中の細胞の増大（すなわち、集団倍加数）は、非限定的に播種密度、基質、培地、および継代間隔を含む多数の要因に依存する。

20

【0529】

一態様では、細胞は、数時間（約3時間）～約14日間またはその間の任意の時間整数値の間培養される場合がある。T細胞培養に適した条件は、血清（例えば、ウシ胎児血清またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN-ガンマ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF-ベータ、およびTNF- α 、または当業者に公知の細胞の成長のための任意の他の添加剤を含む、増殖および生存に必要な因子を含有し得る適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640または、X-vivo 15、（Lonza））を含む。細胞の成長のための他の添加剤には、界面活性剤、プラスマネート（plasma-manate）、ならびにN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤が含まれるが、それに限定されるわけではない。培地は、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンが添加され、無血清の、または適切な量の血清（または血漿）もしくは所定のセットのホルモンならびに/もしくはT細胞の成長および増大に十分な量のサイトカインが補充された、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20、Optimizerを含むことができる。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験培養物中にのみ含まれ、対象に注入されるべき細胞の培養物中には含まれない。標的細胞は、成長を支援するために必要な条件、例えば、適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5% CO₂）下で維持される。

30

40

【0530】

T細胞を培養するために使用される培地は、T細胞を共刺激することができる作用物質を含む場合がある。例えば、CD3を刺激することができる作用物質は、CD3に対する抗体であり、CD28を刺激することができる作用物質は、CD28に対する抗体である。本明細書に開示される方法によって単離される細胞は、約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、80

50

0倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれ超増大されることができる。一態様では、T細胞は、約20倍～約50倍、またはそれ超の範囲で増大する。一態様では、ヒト制御性T細胞は、抗CD3抗体を被覆したKT64.86人工抗原提示細胞（aAPC）を介して増大される。一態様では、ヒト制御性T細胞は、抗CD3抗体を被覆したK562人工抗原提示細胞（aAPC）を介して増大される。T細胞を増大および活性化するための方法は、それらの内容がそれらの全体で本明細書に組み入れられる、米国特許第7,754,482号、同第8,722,400号、および同第9,555,105号に見出すことができる。

【0531】

一態様では、T細胞を増大する方法は、増大されたT細胞をさらなる適用のために単離する段階をさらに含むことができる。別の態様では、増大する方法は、増大されたT細胞のその後のエレクトロポレーションとそれに続く培養をさらに含むことができる。後続のエレクトロポレーションは、作用物質をコードする核酸を導入すること、例えば、増大されたT細胞を形質導入すること、増大されたT細胞をトランスフェクションすること、または増大されたT細胞に核酸をエレクトロポレーションして、増大されたT細胞集団にすることを含む場合があり、その際、作用物質は、T細胞をさらに刺激する。作用物質は、例えば、さらなる増大、エフェクター機能、または別のT細胞機能を刺激することによって、T細胞を刺激する場合がある。

【0532】

J. 処置方法

本明細書に記載される改変された細胞（例えば、T細胞）は、免疫療法のための組成物中に含まれる場合がある。組成物は、薬学的組成物を含み、薬学的に許容される担体をさらに含む場合がある。改変されたT細胞を含む薬学的組成物の治療有効量が、投与される場合がある。

【0533】

一局面では、本発明は、養子細胞移入療法のための方法であって、それを必要とする対象に本発明の改変されたT細胞を投与する段階を含む方法を含む。別の局面では、本発明は、対象における疾患または状態を処置する方法であって、それを必要とする対象に、改変されたT細胞の集団を投与する段階を含む方法を含む。

【0534】

それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法であって、対象に本発明の改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）を投与する段階を含む方法も、含まれる。一態様では、それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法は、対象に、対象のCAR、ドミナントネガティブ型受容体および/もしくはスイッチ受容体、ならびに/または二重特異性抗体、ならびに/またはそれらの組み合わせを含む改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）を投与する段階を含む。一態様では、それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法は、対象に、対象のCAR（例えば、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有するCAR）と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体とを含む改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）を投与する段階を含む。一態様では、それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法は、対象に、対象のCAR（例えば、標的細胞上のPSMAに対して親和性を有するCAR）と、ドミナントネガティブ型受容体および/またはスイッチ受容体とを含む改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）を投与する段階を含み、その際、改変された細胞は、二重特異性抗体を発現および分泌することが可能である。

【0535】

養子細胞療法のための免疫細胞の投与のための方法は、公知であり、提供される方法および組成物と共に使用される場合がある。例えば、養子T細胞療法は、例えば、Gruenbergらの米国特許出願公開第2003/0170238号；Rosenbergの米国特許第4,690,915号；Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)に記載されている。例えば、

Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933 ; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9 ; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338を参照されたい。いくつかの態様では、細胞療法、例えば、養子T細胞療法は、細胞療法を受けることになる対象もしくはそのような対象に由来する試料から細胞が単離され、かつ／またはその他の方法で調製される、自己移入によって実施される。したがって、いくつかの局面では、細胞は、処置を必要とする対象、例えば、患者に由来し、細胞は、単離および処理の後に同じ対象に投与される。

【0536】

いくつかの態様では、細胞療法、例えば、養子T細胞療法は、細胞が、細胞療法を受けることになる、または最終的に受ける対象、例えば、第1の対象以外の対象から単離され、かつ／またはその他の方法で調製される、同種移入によって実施される。そのような態様では、次いで細胞は、同じ種の異なる対象、例えば、第2の対象に投与される。いくつかの態様では、第1および第2の対象は、遺伝的に同一である。いくつかの態様では、第1および第2の対象は、遺伝的に類似である。いくつかの態様では、第2の対象は、第1の対象と同じHLAクラスまたは上位タイプを発現する。

10

【0537】

いくつかの態様では、対象は、細胞または細胞を含有する組成物の投与前に疾患または状態、例えば、腫瘍を標的とする治療剤により処置されている。いくつかの局面では、対象は、他の治療剤に対して抗療性または非応答性である。いくつかの態様では、対象は、例えば、化学療法、放射線、および／または造血幹細胞移植（HSCT）、例えば、同種HSCTを含む別の治療的介入による処置の後に持続性疾患または再発性疾患を有する。いくつかの態様では、投与は、対象が別の治療法に抵抗性になったにもかかわらず、対象を効果的に処置する。

20

【0538】

いくつかの態様では、対象は、他の治療剤に応答性であり、治療剤による処置は、疾病負荷を低減する。いくつかの局面では、対象は、最初は治療剤に応答性であるが、時間が経つにつれて疾患または状態の再発を示す。いくつかの態様では、対象は再発していない。いくつかのそのような態様では、対象は、再発の危険性がある、例えば再発の高い危険性があると決定され、したがって細胞は、例えば、再発の可能性を低減するまたは再発を防止するために、予防的に投与される。いくつかの局面では、対象は、別の治療剤による事前の処置を受けたことがない。

30

【0539】

いくつかの態様では、対象は、例えば、化学療法、放射線、および／または造血幹細胞移植（HSCT）、例えば、同種HSCTを含む別の治療的介入による処置の後で、持続性疾患または再発性疾患を有する。いくつかの態様では、投与は、対象が別の治療法に抵抗性になったにもかかわらず、対象を効果的に処置する。

【0540】

本発明の改変された免疫細胞を、動物、好ましくは哺乳動物、なおより好ましくはヒトに投与して、がんを処置することができる。加えて、本発明の細胞は、疾患を処置または軽減することが望ましい場合に、がんに関係する任意の状態の処置、特に腫瘍細胞に対する細胞媒介免疫応答のために使用することができる。本発明の改変された細胞または薬学的組成物により処置されるべきがんの種類には、がん腫、芽腫、および肉腫、ならびにある特定の白血病またはリンパ系腫瘍、良性腫瘍および悪性腫瘍、ならびに悪性疾患、例えば、肉腫、がん腫、および黒色腫が含まれる。他の例示的ながんには、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、結腸直腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がん、甲状腺がんなどが含まれるが、それに限定されるわけではない。がんは、非固形腫瘍（血液腫瘍など）または固形腫瘍であり得る。成人腫瘍／がんおよび小児腫瘍／がんもまた含まれる。

40

【0541】

固形腫瘍は、通常、嚢胞または液体領域を含有しない組織の異常塊である。固形腫瘍は

50

、良性または悪性であることができる。異なる種類の固形腫瘍が、それら（肉腫、がん腫、およびリンパ腫など）を形成する細胞の種類にちなんで名付けられる。肉腫およびがん腫などの固形腫瘍の例には、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、および他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸がん、リンパ系腫瘍、膵臓がん、乳がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、肝細胞がん、扁平上皮がん、基底細胞がん、腺がん、汗腺がん、甲状腺髄様がん、乳頭様甲状腺がん、褐色細胞腫、脂腺がん、乳頭状がん、乳頭状腺がん、髄様がん、気管支原性がん、腎細胞がん、肝細胞腫、胆管がん、絨毛がん、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、精上皮腫、膀胱がん、黒色腫、およびCNS腫瘍（神経膠腫（脳幹神経膠腫および混合性神経膠腫など）、神経膠芽腫（多形神経膠芽腫としても知られる）、星状細胞腫、CNSリンパ腫、胚細胞腫、髄芽腫、シュワン細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫および脳転移など）が含まれる。

10

【0542】

本明細書に開示される方法による治療の対象となるがん腫には、食道がん、肝細胞がん、基底細胞がん（皮膚がんの一形態）、扁平上皮がん（様々な組織）、移行上皮がん（膀胱の悪性新生物）を含む膀胱がん、気管支原性がん、結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、肺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、副腎皮質がん、甲状腺がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、腺がん、汗腺がん、脂腺がん、乳頭状がん、乳頭状腺がん、嚢胞腺がん、髄様がん、腎細胞がん、非浸潤性乳管がんまたは胆管がん、絨毛がん、精上皮腫、胎児性がん、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、子宮がん、精巣がん、骨原性がん、上皮がん、および上咽頭がんが含まれるが、それに限定されるわけではない。

20

【0543】

本明細書に開示の方法による治療の対象となる肉腫には、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、脊索腫、骨原性肉腫、骨肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、および他の軟組織肉腫が含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0544】

前立腺腺がんは、極めてよく見られる致死的な疾患である。前立腺がんは、男性の中で最もよく見られる悪性腫瘍である。前立腺がんは、男性の年間がん死の推定10%を占める、男性におけるがん関連死の2番目に多い原因である。PSMAは、悪性前立腺組織に高度に発現され、いくつかの正常ヒト組織において低レベル発現される。通常の生理条件下で、PSMAは、前立腺（分泌腺房上皮）、腎臓（近位尿細管）、神経系グリア（星状細胞およびシュワン細胞）、および小腸（空腸刷子縁）において発現される。PSMAは、前立腺上皮においてずっとより高度に発現され、悪性前立腺組織において顕著にアップレギュレーションされる。正常細胞におけるPSMA発現は、前立腺がん細胞よりも100倍～1000倍少ないことが見出された。PSMAの発現は、良性前立腺肥大症から前立腺腺がんへの形質転換の間に顕著に増加する。PSMAの発現は、悪性前立腺組織の組織学的グレードと直接相関することが見出されており、より進行した疾患では増加する（すなわち、リンパ節および骨における前立腺がん転移で最高のPSMA発現が見出される）。

30

【0545】

一態様では、本発明の方法は、前立腺がん、例えば進行去勢抵抗性前立腺がんを処置するために有用である。本発明の方法を使用して、PSMA腫瘍抗原が発現される任意の種類のがんを処置できることは、当業者により容易に理解されるはずである。例えば、PSMAの新生血管発現は、非小細胞肺がんに見られており、例えば、PLoS One. 2017 Oct 27; 12(10)を参照されたい。したがって、本発明の方法は、非小細胞肺がん（NSCLC）を処置するためにも有用であり得る。

40

【0546】

ある特定の例示的な態様では、本発明の改変された免疫細胞は、前立腺がんを処置するために使用される。一態様では、本開示の方法が使用されて、去勢抵抗性前立腺がんを処置する。一態様では、本開示の方法が使用されて、進行去勢抵抗性前立腺がんを処置する

50

。一態様では、本開示の方法が使用されて、転移性去勢抵抗性前立腺がんを処置する。一態様では、本開示の方法が使用されて、転移性去勢抵抗性前立腺がんを処置し、その際、転移性去勢抵抗性前立腺がんを有する患者は、PSMAを発現している腫瘍細胞を 10% 有する。一態様では、本開示の方法が使用されて、去勢抵抗性前立腺がんを処置し、その際、患者は、アンドロゲン欠乏療法の使用を伴うまたは伴わない去勢レベルのテストステロン（例えば、 $< 50 \text{ ng/mL}$ ）を有する。

【0547】

ある特定の態様では、対象に、二次処置が提供される。二次処置には、化学療法、放射線、手術、および投薬が含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0548】

本発明の細胞は、適切な前臨床および臨床実験および試験において決定されるべき投薬量および経路および回数で投与することができる。細胞組成物は、これらの範囲内の投薬量で複数回投与される場合がある。本発明の細胞の投与は、当業者により決定される、所望の疾患または状態を処置するために有用な他の方法と組み合わせられる場合がある。

【0549】

投与されるべき本発明の細胞は、治療を受けている対象に対して自己であり得る。

【0550】

本発明の細胞の投与は、当業者に公知の任意の好都合な方法で実施される場合がある。本発明の細胞は、エアロゾル吸入、注射、経口摂取、輸注、埋め込みまたは移植により対象に投与される場合がある。本明細書に記載される組成物は、患者に経動脈的、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内に、静脈内（i.v.）注射により、または腹腔内に投与される場合がある。他の例では、本発明の細胞は、対象における炎症部位、対象における局所疾患部位、リンパ節、器官、腫瘍などに直接注射される。

【0551】

いくつかの態様では、細胞は、所望の投薬量で投与され、投薬量は、いくつかの局面では、細胞もしくは細胞型の所望の用量もしくは数および/または細胞型の所望の比を含む。したがって、細胞の投薬量は、いくつかの態様では細胞の合計数（またはkg体重あたりの数）およびCD4+対CD8+の比のように個別の集団またはサブタイプの所望の比に基づく。いくつかの態様では、細胞の投薬量は、個別の集団における、または個別の細胞型の細胞の所望の合計数（またはkg体重あたりの数）に基づく。いくつかの態様では、投薬量は、所望の総細胞数、所望の比、および個別の集団中の所望の細胞合計数などの、そのような特徴の組み合わせに基づく。

【0552】

いくつかの態様では、CD8+ T細胞およびCD4+ T細胞などの細胞の集団またはサブタイプは、所望の用量の総細胞、例えば所望の用量のT細胞の許容される差異または差異内で投与される。いくつかの局面では、所望の用量は、所望の細胞数、または細胞が投与される対象の単位体重あたりの所望の細胞数、例えば、個/kgである。いくつかの局面では、所望の用量は、最小細胞数または単位体重あたりの最小細胞数である、またはそれを超える。いくつかの局面では、所望の用量で投与される総細胞の中で、個別の集団またはサブタイプは、所望のアウトプット比（CD4+対CD8+の比など）でまたはそれ近くで、例えば、そのような比のある特定の許容される差異または誤差内で存在する。

【0553】

いくつかの態様では、細胞は、細胞の個別の集団またはサブタイプのうち1つまたは複数の所望の用量、例えば、CD4+細胞の所望の用量および/またはCD8+細胞の所望の用量の許容される差異または差異内で投与される。いくつかの局面では、所望の用量は、サブタイプもしくは集団の所望の細胞数、または細胞が投与される対象の単位体重あたりのそのような細胞の所望の数、例えば、個/kgである。いくつかの局面では、所望の用量は、集団もしくはサブタイプの最小細胞数、または単位体重あたりの集団もしくはサブタイプの最小細胞数である、またはそれを超える。したがって、いくつかの態様では、投薬量は、総細胞の所望の固定用量および所望の比に基づき、かつ/または個別のサブタイプも

10

20

30

40

50

しくは部分集団の1つもしくは複数、例えば、それぞれの所望の固定用量に基づく。したがって、いくつかの態様では、投薬量は、T細胞の所望の固定用量もしくは最小用量およびCD4⁺細胞対CD8⁺細胞の所望の比に基づき、かつ/またはCD4⁺細胞および/もしくはCD8⁺細胞の所望の固定用量もしくは最小用量に基づく。

【0554】

ある特定の態様では、細胞、または細胞のサブタイプの個別の集団は、対象に、約100万～約1000億個の細胞の範囲で、例えば、100万～約500億個の細胞（例えば、約500万個の細胞、約2500万個の細胞、約5億個の細胞、約10億個の細胞、約50億個の細胞、約200億個の細胞、約300億個の細胞、約400億個の細胞、または前記値の任意の2つにより定義される範囲）、例えば約1000万～約1000億個の細胞（例えば、約2000万個の細胞、約3000万個の細胞、約4000万個の細胞、約6000万個の細胞、約7000万個の細胞、約8000万個の細胞、約9000万個の細胞、約100億個の細胞、約250億個の細胞、約500億個の細胞、約750億個の細胞、約900億個の細胞、または前記値の任意の2つにより定義される範囲）で、場合によっては約1億個の細胞～約500億個の細胞（例えば、約1億2000万個の細胞、約2億5000万個の細胞、約3億5000万個の細胞、約4億5000万個の細胞、約6億5000万個の細胞、約8億個の細胞、約9億個の細胞、約30億個の細胞、約300億個の細胞、約450億個の細胞）またはこれらの範囲の間の任意の値で投与される。

【0555】

いくつかの態様では、総細胞の用量および/または細胞の個別の部分集団の用量は、細胞 1×10^5 個または約 1×10^5 個/kg～約 1×10^{11} 個/kg、細胞 10^4 個～ 10^{11} 個または約 10^{11} 個/キログラム（kg）体重、例えば、細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg体重の範囲内であり、例えば、細胞 1×10^5 個または約 1×10^5 個/kg、細胞 1.5×10^5 個/kg、細胞 2×10^5 個/kg、または細胞 1×10^6 個/kg体重である。例えば、いくつかの態様では、細胞は、T細胞 10^4 個または約 10^4 個～ 10^9 個または約 10^9 個/キログラム（kg）体重、例えば、T細胞 10^5 個～ 10^6 個/kg体重で、またはその誤差のある特定の範囲内、例えば、T細胞 1×10^5 個もしくは約 1×10^5 個/kg、T細胞 1.5×10^5 個/kg、T細胞 2×10^5 個/kg、またはT細胞 1×10^6 個/kg体重で投与される。他の例示的な態様では、本開示の方法に使用するために適した、改変された細胞の投薬量範囲は、細胞約 1×10^5 個/kg～細胞約 1×10^6 個/kg、細胞約 1×10^6 個/kg～細胞約 1×10^7 個/kg、細胞約 1×10^7 個/kg～細胞約 1×10^8 個/kg、細胞約 1×10^8 個/kg～細胞約 1×10^9 個/kg、細胞約 1×10^9 個/kg～細胞約 1×10^{10} 個/kg、細胞約 1×10^{10} 個/kg～細胞約 1×10^{11} 個/kgを含むが、それに限定されるわけではない。例示的な態様では、本開示の方法に使用するために適した投薬量は、細胞約 1×10^8 個/kgである。例示的な態様では、本開示の方法に使用するために適した投薬量は、細胞約 1×10^7 個/kgである。他の態様では、適切な投薬量は、総細胞約 1×10^7 個～総細胞約 5×10^7 個である。いくつかの態様では、適切な投薬量は、総細胞約 1×10^8 個～総細胞約 5×10^8 個である。いくつかの態様では、適切な投薬量は、総細胞約 1.4×10^7 個～総細胞約 1.1×10^9 個である。例示的な態様では、本開示の方法に使用するために適した投薬量は、総細胞約 7×10^9 個である。例示的な態様では、適切な投薬量は、総細胞約 1×10^7 個～総細胞約 3×10^7 個である。

【0556】

いくつかの態様では、総細胞の用量および/または細胞の個別の部分集団の用量は、細胞 1×10^5 または約 1×10^5 個/m²～細胞約 1×10^{11} 個/m²の範囲内である。例示的な態様では、総細胞の用量および/または細胞の個別の部分集団の用量は、 1×10^7 または約 1×10^7 個/m²～ 3×10^7 または約 3×10^7 個/m²の範囲内である。例示的な態様では、総細胞の用量および/または細胞の個別の部分集団の用量は、 1×10^8 または約 1×10^8 個/m²～ 3×10^8 または約 3×10^8 個/m²の範囲内である。いくつかの態様では、総細胞の用量および/または細胞の個別の部分集団の用量は、所与の患者により耐容される最大用量である。

【0557】

いくつかの態様では、細胞は、 10^4 または約 $10^4 \sim 10^9$ または約 10^9 個/キログラム（kg）体重のCD4⁺および/またはCD8⁺細胞、例えば、 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg体重のCD4⁺および/

10

20

30

40

50

またはCD8⁺細胞で、またはその誤差のある特定の範囲内で、例えば、 1×10^5 もしくは約 1×10^5 個/kgのCD4⁺および/もしくはCD8⁺細胞、 1.5×10^5 個/kgのCD4⁺および/もしくはCD8⁺細胞、 2×10^5 個/kgのCD4⁺および/もしくはCD8⁺細胞、または 1×10^6 個/kg体重のCD4⁺および/もしくはCD8⁺細胞で投与される。いくつかの態様では、細胞は、約 1×10^6 個、約 2.5×10^6 個、約 5×10^6 個、約 7.5×10^6 個、もしくは約 9×10^6 個を超える、もしくは少なくとも約 1×10^6 個、約 2.5×10^6 個、約 5×10^6 個、約 7.5×10^6 個、もしくは約 9×10^6 個のCD4⁺細胞、および/または少なくとも約 1×10^6 個、約 2.5×10^6 個、約 5×10^6 個、約 7.5×10^6 個、もしくは約 9×10^6 個のCD8⁺細胞、および/または少なくとも約 1×10^6 個、約 2.5×10^6 個、約 5×10^6 個、約 7.5×10^6 個、もしくは約 9×10^6 個のT細胞で、またはその誤差のある特定の範囲内で投与される。いくつかの態様では、細胞は、約 10^8 個～ 10^{12} 個もしくは約 10^{10} 個～ 10^{11} 個のT細胞、約 10^8 個～ 10^{12} 個もしくは約 10^{10} 個～ 10^{11} 個のCD4⁺細胞、および/または約 10^8 個～ 10^{12} 個もしくは約 10^{10} 個～ 10^{11} 個のCD8⁺細胞で、またはその誤差のある特定の範囲内で投与される。

10

【0558】

いくつかの態様では、細胞は、CD4⁺およびCD8⁺細胞またはサブタイプなどの、複数の細胞集団またはサブタイプの所望のアウトプット比で、またはその耐容される範囲内で投与される。いくつかの局面では、所望の比は、特定の比であることができる、または比の範囲であることができ、例えば、いくつかの態様では、所望の比（例えば、CD4⁺細胞対CD8⁺細胞の比）は、5:1もしくは約5:1～5:1もしくは約5:1（または約1:5よりも大きく、約5:1よりも小さい）、または1:3もしくは約1:3～3:1もしくは約3:1（または約1:3よりも大きく、約3:1よりも小さい）、例えば、2:1もしくは約2:1～1:5もしくは約1:5（または約1:5よりも大きく、約2:1よりも小さい、例えば、5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5、もしくは1:5、または約5:1、約4.5:1、約4:1、約3.5:1、約3:1、約2.5:1、約2:1、約1.9:1、約1.8:1、約1.7:1、約1.6:1、約1.5:1、約1.4:1、約1.3:1、約1.2:1、約1.1:1、約1:1、約1:1.1、約1:1.2、約1:1.3、約1:1.4、約1:1.5、約1:1.6、約1:1.7、約1:1.8、約1:1.9、約1:2、約1:2.5、約1:3、約1:3.5、約1:4、約1:4.5、もしくは約1:5である。いくつかの局面では、耐容される差は、所望の比の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%以内であり、これらの範囲の間の任意の値を含む。

20

30

【0559】

いくつかの態様では、改変された細胞の用量は、それを必要とする対象に単回用量または複数回用量で投与される。いくつかの態様では、改変された細胞の用量は、複数回用量で、例えば、週1回または7日毎、2週1回または14日毎、3週1回または21日毎、4週1回または28日毎に投与される。例示的な態様では、改変された細胞の単回用量が、それを必要とする対象に投与される。例示的な態様では、改変された細胞の単回用量は、急速静脈内注入によりそれを必要とする対象に投与される。

40

【0560】

疾患の予防または治療に適した投薬量は、処置されるべき疾患の種類、細胞もしくは組み換え受容体の種類、疾患の重症度および経過、細胞が予防目的それとも治療目的で投与されるか、事前の療法、対象の臨床歴および細胞に対する応答、ならびに担当医師の判断に依存する場合がある。組成物および細胞は、いくつかの態様では、対象に1回でまたは一連の処置にわたり適宜投与される。

【0561】

いくつかの態様では、細胞は、組み合わせ処置の部分として、例えば、別の治療的介入、例えば、抗体または操作された細胞または受容体または作用物質、例えば細胞傷害剤もしくは治療剤と同時にまたは任意の順序で順次に投与される。細胞は、いくつかの態様で

50

は、1つまたは複数の追加的な治療剤と共に、または別の治療的介入に関連して、同時にまたは任意の順序で順次に共投与される。いくつかの状況では、細胞は、細胞集団が1つまたは複数の追加的な治療剤の効果を高めるように十分に近い時間で別の療法と共に、またはその逆で共投与される。いくつかの態様では、細胞は、1つまたは複数の追加的な治療剤の前に投与される。いくつかの態様では、細胞は、1つまたは複数の追加的な治療剤の後に投与される。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加的な作用物質は、例えば持続性を高めるための、IL-2などのサイトカインを含む。いくつかの態様では、この方法は、化学療法剤の投与を含む。

【0562】

細胞の投与に続き、操作された細胞集団の生物学的活性は、いくつかの態様では、例えば、いくつかの公知の方法のいずれかにより測定される。評価のためのパラメーターは、例えばイメージングによるインピボでの、または例えばELISAもしくはフローサイトメトリーによるエクスピボでの、操作されたまたは天然のT細胞または他の免疫細胞の抗原への特異的結合を含む。ある特定の態様では、操作された細胞が標的細胞を破壊する能力は、例えば、Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)、およびHerman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)に記載される細胞傷害性アッセイなどの、当技術分野において公知の任意の適切な方法を使用して測定することができる。ある特定の態様では、細胞の生物学的活性は、1つまたは複数のサイトカイン、例えばCD107a、IFN γ 、IL-2、およびTNFの発現および/または分泌をアッセイすることにより測定される。いくつかの局面では、生物学的活性は、腫瘍負荷または腫瘍量の低減などの臨床的成果を評価することにより測定される。

【0563】

いくつかの態様では、本開示の特異的投薬レジメンは、改変されたT細胞の投与前のリンパ球枯渇段階を含む。例示的な態様では、リンパ球枯渇段階は、シクロホスファミドおよび/またはフルダラビンの投与を含む。

【0564】

いくつかの態様では、リンパ球枯渇段階は、約200mg/m²/日～約2000mg/m²/日（例えば、200mg/m²/日、300mg/m²/日、または500mg/m²/日）の用量でのシクロホスファミドの投与を含む。例示的な態様では、シクロホスファミドの用量は、約300mg/m²/日である。いくつかの態様では、リンパ球枯渇段階は、約20mg/m²/日～約900mg/m²/日（例えば、20mg/m²/日、25mg/m²/日、30mg/m²/日、または60mg/m²/日）の用量でのフルダラビンの投与を含む。例示的な態様では、フルダラビンの用量は約30mg/m²/日である。

【0565】

ある態様では、リンパ球枯渇段階は、約200mg/m²/日～約2000mg/m²/日（例えば、200mg/m²/日、300mg/m²/日、または500mg/m²/日）の用量のシクロホスファミド、および約20mg/m²/日～約900mg/m²/日（例えば、20mg/m²/日、25mg/m²/日、30mg/m²/日、または60mg/m²/日）の用量のフルダラビンの投与を含む。例示的な態様では、リンパ球枯渇段階は、約300mg/m²/日の用量のシクロホスファミド、および約30mg/m²/日の用量のフルダラビンの投与を含む。

【0566】

例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与前にリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、静脈内注入により500mg/m²または約500mg/m²～1g/m²または約1g/m²のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与の約3日（ \pm 1日）前に、静脈内注入により500mg/m²または約500mg/m²～1g/m²または約1g/m²のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与の最大4日前に、静脈内注入により500mg/m²または約500mg/m²～1g/m²または

約 $1\text{g}/\text{m}^2$ のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与の4日前に、静脈内注入により $500\text{mg}/\text{m}^2$ または約 $500\text{mg}/\text{m}^2 \sim 1\text{g}/\text{m}^2$ または約 $1\text{g}/\text{m}^2$ のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与の3日前に、静脈内注入により $500\text{mg}/\text{m}^2$ または約 $500\text{mg}/\text{m}^2 \sim 1\text{g}/\text{m}^2$ または約 $1\text{g}/\text{m}^2$ のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与の2日前に、静脈内注入により $500\text{mg}/\text{m}^2$ または約 $500\text{mg}/\text{m}^2 \sim 1\text{g}/\text{m}^2$ または約 $1\text{g}/\text{m}^2$ のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。

10

【0567】

例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与の3日前に、静脈内注入により $300\text{mg}/\text{m}^2$ のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、改変されたT細胞の投与前に3日間、静脈内注入により $300\text{mg}/\text{m}^2$ のシクロホスファミドを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。

【0568】

例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、約 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{日} \sim 900\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ （例えば、 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、または $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ ）の用量のフルダラピンを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、 $30\text{mg}/\text{m}^2$ の用量のフルダラピンを含むリンパ球枯渇化学療法を3日間受ける。

20

【0569】

例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、約 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{日} \sim 2000\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ （例えば、 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、または $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ ）の用量のシクロホスファミド、および約 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{日} \sim 900\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ （例えば、 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、または $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ ）の用量のフルダラピンを含むリンパ球枯渇化学療法を受ける。例示的な態様では、去勢抵抗性前立腺がんを有する対象について、対象は、約 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量のシクロホスファミド、および $30\text{mg}/\text{m}^2$ の用量のフルダラピンを含むリンパ球枯渇化学療法を3日間受ける。

30

【0570】

CAR T細胞の注入後の有害作用の1つが、サイトカイン放出症候群（CRS）として知られる免疫活性化の開始であることが、当技術分野において公知である。CRSは、炎症性サイトカインの上昇を招く免疫活性化である。臨床尺度および検査尺度は、軽度のCRS（全身症状および/またはグレード2の臓器毒性）から重度のCRS（sCRS；グレード3の臓器毒性、積極的な臨床介入、および/または場合によっては生死にかかわる）の範囲である。臨床特徴には、高熱、倦怠感、疲労、筋肉痛、悪心、食欲不振、頻脈/低血圧、毛細血管漏出、心機能不全、腎機能障害、肝不全、および播種性血管内凝固が含まれる。インターフェロン-ガンマ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、IL-10、およびIL-6を含むサイトカインの劇的な上昇が、CAR T細胞注入の後に示されている。CRSの存在は、一般的に、養子移入された細胞の増大および進行性免疫活性化と相関する。高い腫瘍量を有する患者は、より大きいsCRSを経験するので、CRSの重症度は注入時の疾病負荷により決まることが実証されている。

40

【0571】

したがって、本発明は、CRSの診断後に、操作された細胞（例えば、CAR T細胞）の抗腫瘍有効性を弱めずに、制御されない炎症の生理的症状を緩和するために適したCRS管理戦略を提供する。CRS管理戦略は、当技術分野において公知である。例えば、全身コルチコステロイドは、最初の抗腫瘍応答を損なわずに、sCRS（例えば、グレード3のCRS）の症状を急速に後退させるために投与される場合がある。

【0572】

50

いくつかの態様では、抗IL-6R抗体が投与される場合がある。抗IL-6R抗体の例は、米国食品医薬品局に承認された、アトリズマブとしても知られるモノクローナル抗体トシリズマブである（ActemraまたはRoActemraとして市販されている）。トシリズマブは、インターロイキン-6受容体（IL-6R）に対するヒト化モノクローナル抗体である。トシリズマブの投与は、CRSのほぼ即時の後退を実証した。

【0573】

いくつかの態様では、本発明の方法は、標準がん療法の少なくとも1つの事前のクールに失敗した対象を選択および処置する段階を伴う。例えば、適切な対象は、再発性前立腺がんと確定診断されている場合がある。いくつかの態様では、本発明の方法は、標準がん療法の少なくとも1つの事前のクールを受けた対象を選択および処置する段階を伴う。例えば、適切な対象は、転移性去勢抵抗性前立腺がんの処置のための少なくとも1つの標準的な17 リアーゼ阻害剤または第2世代の抗アンドロゲン療法による事前療法を受けている場合がある。

10

【0574】

例示的な態様では、適切な対象は、転移性去勢抵抗性前立腺がんを有する対象である。例示的な態様では、適切な対象は、新鮮組織に対する免疫組織化学分析により実証されたPSMAを発現している腫瘍細胞を 10%有する転移性去勢抵抗性前立腺がんを有する対象である。

【0575】

いくつかの態様では、適切な対象は、骨転移疾患および/または測定可能な非骨転移疾患（節または内臓）のX線写真の証拠を有する対象である。

20

【0576】

いくつかの態様では、適切な対象は、0~1のECOGパフォーマンスステータスを有する対象である。

【0577】

いくつかの態様では、適切な対象は、血清クレアチニン 1.5mg/dlもしくはクレアチニンクリアランス 60cc/min；および/または血清総ビリルビン $<1.5 \times \text{ULN}$ ；血清ALT/AST $<2 \times \text{ULN}$ により定義される十分な器官機能を有する対象である。

【0578】

いくつかの態様では、適切な対象は、Hgb $>10\text{g/dl}$ ；PLT $>100\text{k/uI}$ ；および/またはANC $>1.5\text{k/uI}$ により定義される十分な血液学的予備能を有する対象である。

30

【0579】

いくつかの態様では、適切な対象は、輸注に依存しない対象である。

【0580】

いくつかの態様では、適切な対象は、アンドロゲン枯渇療法の使用を伴うもしくは伴わない去勢レベルのテストステロン（ $<50\text{ng/ml}$ ）；ならびに/または進行性疾患の以下の尺度：RECIST 1.1基準による軟組織進行、骨スキャンにより2つ以上の新しい病変を有する骨疾患進行（PCWG2基準による）、最低値から少なくとも25%の血清PSAの増加および 2ng/ml 以上の絶対増加（PCWG2基準による）のうちの1つの証拠により定義される、進行去勢抵抗性前立腺がんの証拠を有する対象である。

40

【0581】

いくつかの態様では、適切な対象は、少なくとも1つの第2世代アンドロゲンシグナル伝達阻害剤により事前処置を受けたことがある。いくつかの態様では、適切な対象は、アピラテロンによる事前処置を受けたことがある。いくつかの態様では、適切な対象は、エンザルタミドによる事前処置を受けたことがある。

【0582】

いくつかの態様では、適切な対象は、転移性組織生検に関する免疫組織化学（IHC）によりPSMAを発現している腫瘍細胞を 10%有する。

【0583】

いくつかの態様では、適切な対象は、転移性疾患（骨または節/内臓）のX線写真の証

50

抛を有する。

【0584】

いくつかの態様では、適切な対象は、転移性CRPCに対する 4種類の療法を受けている。

【0585】

K. 薬学的組成物および製剤

また、本発明の免疫細胞集団、そのような細胞を含有するおよび/またはそのような細胞が濃縮された組成物、例えば、組み換え受容体を発現する細胞が、組成物中の総細胞またはT細胞もしくはCD8+細胞もしくはCD4+細胞などのある特定の種類の細胞に対して、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ超を占める、組成物も提供される。組成物の中でも、養子細胞療法のためなどの、投与のための薬学的組成物および製剤である。また、細胞および組成物を、対象、例えば、患者に投与するための治療法も提供される。

【0586】

また、薬学的組成物および製剤を含めた投与のための細胞を含む組成物、例えば、所与の用量またはその画分での投与のための細胞数を含む単位用量形態組成物も提供される。薬学的組成物および製剤は、一般には、1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体または賦形剤を含む。いくつかの態様では、組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤を含む。

【0587】

用語「薬学的製剤」は、それに含有される活性成分の生物学的活性を有効にさせるような形態の調製物であって、製剤が投与されるであろう対象に対して許容できないほど有毒な追加の成分を含有しない、調製物を指す。「薬学的に許容される担体」は、対象に対して無毒である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、緩衝液、賦形剤、安定剤または保存料を含むが、それに限定されるわけではない。いくつかの局面では、担体の選択は、一部には、特定の細胞によっておよび/または投与方法によって決定される。したがって、多種多様な適切な製剤がある。例えば、薬学的組成物は、保存料を含有することができる。適切な保存料は、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウムおよび塩化ベンザルコニウムを含み得る。いくつかの局面では、2つまたはそれよりも多い保存料の混合物が使用される。保存料またはその混合物は、典型的には、全組成物の重量に対して約0.0001%～約2%の量で存在する。担体は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)により記載されている。薬学的に許容される担体は、一般には、採用される投与量および濃度でレシipientに対して無毒であり、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存料（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン類；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む単糖、二糖および他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含むが、それに限定されるわけではない。

【0588】

いくつかの局面では、緩衝剤が組成物中に含まれる。適切な緩衝剤は、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウムならびに様々な他の酸および塩を含む

10

20

30

40

50

。いくつかの局面では、2種またはそれより多くの緩衝剤の混合物が使用される。緩衝剤またはその混合物は、典型的には、全組成物の重量に対して約0.001%～約4%の量で存在する。投与可能な薬学的組成物を調製するための方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)に、より詳細に記載されている。

【0589】

製剤は、水溶液を含むことができる。製剤または組成物はまた、細胞により処置される特定の適応症、疾患、または状態に有用な1つよりも多い活性成分、好ましくは細胞を補完する活性であって、それぞれが、互いに悪影響を及ぼさない活性を有するもの、を含有し得る。そのような活性成分は、適切には、意図する目的に効果的な量で組み合わせられて存在する。したがって、いくつかの態様では、薬学的組成物は、他の薬学的に活性な作用物質または薬物、例えば、化学療法剤、例えば、アスパラギナーゼ、プスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチンおよび/またはビンクリスチンをさらに含む。薬学的組成物は、いくつかの態様では、疾患または状態を治療または予防するのに有効な量、例えば、治療有効量または予防有効量で細胞を含有する。治療有効性または予防有効性は、いくつかの態様では、処置される対象を定期的に評価することによってモニタリングされる。細胞の単回ボーラス投与によって、細胞の複数回ボーラス投与によって、または細胞の連続注入投与によって、所望の投与量を送達することができる。

【0590】

製剤は、経口、静脈内、腹腔内、皮下、肺内、経皮、筋肉内、鼻腔内、口腔、舌下または坐剤投与のための製剤を含む。いくつかの態様では、細胞集団は、非経口投与される。用語「非経口」は、本明細書において使用される場合、静脈内、筋肉内、皮下、直腸、腔内および腹腔内投与を含む。いくつかの態様では、細胞は、静脈内、腹腔内または皮下注射による末梢全身送達を使用して対象に投与される。組成物は、いくつかの態様では、無菌の液体調製物、例えば、等張性水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液または粘性組成物として提供され、これらは、いくつかの局面では、選択されたpHに緩衝化され得る。液体調製物は、通常、ゲル、他の粘性組成物および固体組成物よりも調製しやすい。追加的に、液体組成物が、投与に、とりわけ、注射による投与にいくらか便利である。他方で、粘性組成物を、特定の組織とのより長い接触期間をもたらすのに適した粘性範囲内で製剤化することができる。液体組成物または粘性組成物は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であることができる、担体を含むことができる。

【0591】

無菌注射液は、溶媒中に、例えば、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどの適切な担体、希釈剤または賦形剤と混合された溶媒中に細胞を取り入れることによって、調製することができる。組成物は、所望の投与経路および調製に応じて、湿潤剤、分散剤、または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、pH緩衝剤、ゲル化もしくは粘性増強添加物、保存料、着香剤および/または着色剤などの補助物質を含有することができる。いくつかの局面では、適切な調製物を調製するために標準的な教科書に助言を求めてよい。

【0592】

抗菌保存料、酸化防止剤、キレート剤、および緩衝液を含む、組成物の安定性および無菌性を増強する様々な添加物を添加することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールおよびソルビン酸によって保証することができる。注射用薬学的剤形の長期吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを使用することによってもたらすことができる。

【0593】

インビボ投与に使用されるべき製剤は、一般に無菌のものである。無菌は、例えば滅菌濾過膜で濾過することによって、容易に達成され得る。

【0594】

本明細書において言及または引用される論文、特許および特許出願、ならびにすべての他の文書および電子的に入手可能な情報の内容は、それぞれの個々の刊行物が参照によって組み入れられることが具体的かつ個々に示されているかのように、参照によってそれらの全体が同程度に本明細書に組み入れられる。出願人等は、そのような任意の論文、特許、特許出願または他の物理的および電子的文書からのあらゆる資料および情報を本出願中に物理的に組み入れる権利を有する。

10

【0595】

本発明は、その具体的な態様を参照しながら記載されてきたが、本発明の真の精神および範囲から逸脱しなければ、様々な変更を行っても等価物に置換してもよいことが、当業者によって理解されるべきである。本明細書に開示の態様の範囲から逸脱しなければ、適切な等価物を使用して本明細書に記載の方法の他の適切な改変および適合を行ってよいことが、当業者には容易に明らかとなろう。加えて、多くの改変を行って、特定の状況、材料、物質の組成、プロセス、1つまたは複数のプロセス段階を本発明の目的、精神および範囲に適合させてもよい。そのような改変はすべて、添付の特許請求の範囲内であることが意図される。ここでは特定の態様を詳細に記載してきたが、同じものが以下の実施例を参照することによってより明確に理解され、以下の実施例は、例証を目的としてのみ含まれるものであって、限定を意図するものではない。

20

【実施例】

【0596】

これから以下の実施例を参照して本発明を説明する。これらの実施例は、例証だけの目的で提供されるものであって、本発明は、これらの実施例に限定されるわけではなく、本明細書において提供される教示の結果として明白であるすべての変形を包含する。

【0597】

これらの実験に採用される材料および方法をこれから説明する。

【0598】

RNA CAR構築物の設計：ヒトPSMA、1C3、2A10、2C6および2F5を特異的に標的とする4つのヒトscFvをIDTからgBlocksとして合成した。4-1BB-ゼータ（BBZ）を有するCARをオーバーラップPCRによって組み立て、RNAインビトロ転写ベクターpD-A中にクローニングした。T細胞トランスフェクション、CARの発現およびRNA産生のためにpD-Aベクターを最適化した。4つのヒトPSMA CARおよび1つのマウスPSMA CAR（J591）を、RNAのIVTの前にSpeI消化により直鎖状にした。T7 mScript Standard mRNA Production System（Cellscript, Inc., Madison, WI）を利用して、キャップ/テールが付いたIVT RNAを作製した。RNeasy Mini Kit（Qiagen, Inc., Valencia, CA）によってIVT RNAを精製した。精製したRNAをRNase不含水中に1～2mg/mLで溶出し、使用まで-80℃で保管した。260/280吸光度により、およびアガロースゲル上で視覚的に、RNAの完全性を確認した。

30

40

【0599】

Lenti CAR構築物の設計：すべてのPSMA CARをpTRPE Lentiベクター中にサブクローニングした。次いで、スイッチ受容体：PD1.CD28-F2A（SW）、PD1^{A132L}PTM.CD28-F2A（SW*）およびドミナントネガティブ型TGFR II配列、dnTGFR II-T2A（dn）を各Lentiベクター中にサブクローニングし、ヒトPSMA scFvが続いた。

【0600】

Lentiベクターによって含まれる配列の例は、以下の通りである：

50

IC3 (SEQ ID NO:169)

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCCGCAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT
GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA
TGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
GTTATATCATATGATGGAAACAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGTCCCC
TGGGGATCGAGGTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCA
CGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCGGTGG
CGGCGGATCTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGC
TTTAGCCTGGTATCAGCAGAAATCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTTTG
ATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAA
CTTATTACTGTCAACAGTTTAAACAGTTATCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACC
AAGGTGGAGATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCG

10

20

30

40

50

2A10 (SEQ ID NO: 170)

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCC
CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGTA
ACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG
GATCATCTATCCTGGTGA CTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCC
AGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAG
CAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGGCAAAC TGGT
TTCCTCTGGTCCTCCGATCTCTGGGGCCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCC
AGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAACA
GAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGCTATGGATCTGGGACAGATTTCACTCT
CACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGT
TTAATAGTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAAC
CACGACGCCAGCGCCGCG

10

20

2F5 (SEQ ID NO: 171)

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCC
CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTTACCAGCA
ACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG
GATCATCTATCCTGGTGA CTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCC
AGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAA
CAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAAACTGGT
TTCCTCTGGTCCTTCGATCTCTGGGGCCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGCCATCC
AGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCA
GAAACCGGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC
TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG

30

40

50

TTTAATAGTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAA
TCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCG

2C6 (SEQ ID NO: 172)

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGATCAGAGGTGAAAAAGCCC
GGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAACTA
CTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGG
ATCATCTATCCTGGTGA CTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCA
GGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTATCTGCAGTGGAGC
AGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGTCCCGGGTATA
CCAGCAGTTGGACTTCTTTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC
TCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGGCGGATCTG
AAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGA
GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTA
CCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAC
AGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT
TCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT
CAGCAGCGTAGCAACTGGCCCCCTATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGG
ATATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCG

10

20

PDI.CD28-F2A (SW) (SEQ ID NO: 173)

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGG
GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG
AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
AGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACA ACTGCCCAACGGGCGTGA
CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCCA
GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGTTTTGGGTGCTG
GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTT
TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC

30

40

50

ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
 ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAAT
 TTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCG

PD1^{A132L}-PTM.CD28-F2A (SW) (SEQ ID NO:174)*

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGG
 GCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCC
 CACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCA
 CCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAACTGGTACCGCATG
 AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTCCCCGAGGACCGCAGCC
 AGCCCCGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAAGTGGCCAACGGGCGTGA
 CTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTC
 TGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG
 CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCCA
 GCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTG
 GGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGTGTCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCAG
 GAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
 CGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACT
 TCGCAGCCTATCGCTCCGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTG
 GCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCG

10

20

dnTGFR β II-T2A (dn) (SEQ ID NO:175)

ATGGGTGCGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGA
 CGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCCAGAAAGTCGGTTAATAACGA
 CATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAAGTGTGTAAA
 TTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAA
 CTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTAT
 GGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCA
 AGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATT
 ATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTC
 TGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAAT
 CCTGACTTGTGTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACC
 ACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACC
 GGCAGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGAAGATCTGGCGGCGGAGAGGGCAGAG

30

40

GAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGAGCCAC

C

【 0 6 0 1 】

形質導入プロトコル：Human Immunology Coreから得たバルクT細胞（CD4およびCD8）を細胞 10^6 個/mLに希釈し、CD3/28ビーズ（T cell expanders, Invitrogen）を用いて1：3の細胞：ビーズ比で刺激した。3：1のMOIを用いて刺激の1日後に、パッケージングされたレンチウイルスベクターの形質導入を行い、37 /5% CO₂インキュベーター中で増大させた。

50

【0602】

形質導入の有効性：CARの形質導入の有効性を、Biotin-SP-AffiniPureヤギ抗マウスIgG (Cat#: 115-065-072, Jackson ImmunoResearch Labs) またはBiotin-SP-AffiniPureウサギ抗ヒトIgG (Cat#: 309-065-082, Jackson ImmunoResearch Labs) に続くストレプトアビジンAPC (Cat#: 17-4317-82, eBioscience) またはストレプトアビジンPE (Cat#: 554061, BD Pharmingen) を用いたフローサイトメトリーによって評価した。APC抗ヒトCD279 (PD-1) 抗体 (Cat#: 329908, BioLegend) およびヒトTGF- β 受容体II APCコンジュゲート型抗体 (Catalog # FAB241A, R&D systems) を使用して、スイッチ受容体またはドミナントネガティブ型TGFRII部分を調べた。

【0603】

T細胞の増大：細胞を培養し、刺激の3日後に始めて2日毎に分けた。4日目にT細胞からビーズを除き、後に使用するために10日目に凍結した。

【0604】

RNAのエレクトロポレーション：BTX830を用いて500Vおよび700 μ sで休止T細胞に10または20 μ gのIVT PSMA RNA CARをエレクトロポレーションした。BTX830を用いて300Vおよび500 μ sでNalm6.CBGまたはK562細胞に5 μ gまたは15 μ gのPSMA IVT RNAをエレクトロポレーションした。BTX830を用いて300Vおよび500 μ sでPC3.PSMA細胞に0.5 μ g、2 μ gまたは5 μ gのPDL1 IVT RNAをエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの後、細胞を直ちに37 °Cおよび5% CO₂で予備加温した培地中に入れた。18時間後に、PSMAまたはPDL1がエレクトロポレーションされた腫瘍細胞をAPC抗ヒトPSMA (FOLH1) 抗体 (Cat#: 342507, BioLegend) またはAPC抗ヒトCD274 (PDL-1もしくはB7-H1) 抗体 (Cat#: 17-5983-42, BD Biosciences) により染色し、フローサイトメトリーにより分析した。

【0605】

細胞の計数：増大-休止サイクル間の様々な時点で、細胞を穏やかに混合し、既知の培養体積から細胞の40 μ L分量を集め、Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter) を使用してCCIの検査室SOPに従って計数するためにIsoton II希釈緩衝液20mLを有するアキュベット (Beckman Coulter) 中にそれを入れた。これらのアッセイにより、細胞濃度、総細胞数、成長速度、および細胞体積が決定され、これらのアッセイを使用して、希釈体積を計算し、凍結のために細胞をいつ休止させるかを決定した。

【0606】

定量PCR：初代細胞または腫瘍細胞株を溶解させ、QIAシュレッダー (Cat#79656) に通した。RNeasy Miniキット (Cat#74104) によって、製造業者のプロトコルに従って総RNAを抽出した。逆転写 (Cat#: 11904-018, Invitrogen) を行ってcDNAを得た。cDNAを、PSMAに特異的なプライマーを用いた定量PCRに供した。

(Fプライマー:

AGGAAGTCTCAAAGTGCCCT (SEQ ID NO:176), Rプライマー:

GAACAACAGCTGCTCCACTC (SEQ ID NO:177)) or GAPDH: (Fプライマー:

GCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTC (SEQ ID NO:178), Rプライマー:

CCCAGCAGTGAGGGTCTCTCTCTTC (SEQ ID NO:179))

【0607】

IL-2およびIFN- γ についてのELISA：T細胞または標的細胞を洗浄し、R10培地中に細胞 1×10^6 個/mLで懸濁した。各細胞株約0.1mLを96ウェルプレート (Corning) のウェルに加え、37 °Cで18~20時間インキュベートした。上清を回収し、ELISAに供した。

【0608】

CD107aアッセイ：1:2 (5×10^4 個のエフェクター： 1×10^5 個の標的) のE:T比の細胞をR10培地100 μ L中に調製し、96ウェルプレートに蒔いた。フィコエリトリン標識

10

20

30

40

50

抗CD107a Ab 10 μ Lを添加し、プレートは37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。Golgi Stop (R10培地3ml中にGolgi Stop 2 μ L、10 μ L/ウェル; BD Biosciences, 51-2092KZ)を添加し、プレートをさらに2.5時間インキュベートした。次いで、FITC-抗CD8 (Cat#: 551347, BD Pharmingen) 2 μ LおよびAPC-抗CD3 (Cat#: 555342, BD Pharmingen) 2 μ Lを添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。インキュベーション後に、試料をFACS緩衝液で洗浄し、フローサイトメトリーにより分析した。

【0609】

ルシフェラーゼに基づくCTLアッセイ: Nalm6-CBG、PC3-CBG、PC3.PSMA-CBG腫瘍細胞をR10培地中に細胞 1×10^5 個/mLで再懸濁し、異なる比のT細胞 (例えば 10:1、5:1、2.5など) と共に37 $^{\circ}$ Cで18時間インキュベートした。等体積の基質を添加し、発光を直ちに決定した。T細胞の非存在下で腫瘍のみを有するウェルにおけるルシフェラーゼ活性に基づく死滅率として結果を報告する (死滅% = $100 - ((\text{エフェクターおよび標的細胞の共培養物を有するウェルからのRLU}) / (\text{標的細胞を有するウェルからのRLU}) \times 100)$)。

10

【0610】

PC3.PSMA腫瘍モデル: クリックビートルを形質導入した2E6 PC3.PSMA.7SC細胞をマウスに注射し (i.v.)、28日後に、2E6 PSMA CAR-T陽性形質導入T細胞を担腫瘍マウスに注射した (i.v.)。バイオルミネセンスイメージング (BLI) を複数の時点で行った。

【0611】

実験結果をこれから説明する。

20

【0612】

実施例1: ヒトRNA PSMA CARは、マウスRNA PSMA CAR、J591と等価な抗腫瘍活性を有する

PSMAを標的とする4つのヒトRNA CARを、4つのscFv配列1C3 (SEQ ID NO: 169)、2A10 (SEQ ID NO: 170)、2C6 (SEQ ID NO: 172) および2F5 (SEQ ID NO: 171) の1つを使用して構築した (参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許出願US 2009/0297438 A1から)。scFvを、CD8膜貫通ドメインならびに4-1BBおよびCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインに連結した。精製RNAをアガロースゲル上で可視化し (図1A)、休止ヒト初代T細胞にエレクトロポレーションした。すべてのCARは、試験した条件下でほぼ100%のCAR発現を有していた。10 μ gのIVT RNA CARは、ヒトPSMA CARであるかマウスPSMA CARであるかにかかわらず、CAR発現について平均蛍光強度 (MFI) が最大に達した; したがって、10 μ gのIVT RNAをさらなる実験に使用した (図1B)。CAR発現は、異なるヒトCAR間で変動し、CAR発現についての最高MFIは、1C3.BBZであった。マウスJ591 CAR発現についてのMFIは、1C3.BBZのMFIよりも4倍高かった; しかしながら、抗体起源の種が異なるので、10 μ gのマウスJ591 RNA CARもさらなる実験に使用した。

30

【0613】

完全長PSMAを、最適なRNA発現のためにPD-Aベクターにクローニングした。精製RNAをアガロースゲル上で可視化し (図1A)、Nalm6.CBGまたはK562腫瘍細胞にエレクトロポレーションし、PSMAの発現をフローサイトメトリーによって分析した (図1C)。15 μ gおよび5 μ gのPSMA RNAを使用して、Nalm6.CBGおよびK562腫瘍細胞のさらなる実験をそれぞれ行った。PSMA発現が減少 (37.5%) したPC3.PSMA.PSCA.CBG腫瘍細胞を過去に構築した (図1C)。PC3.PSMA.CBG腫瘍細胞株に対して限界希釈を実施し、7つの単一細胞クローンを単離し、組み合わせて、新たな細胞株PC3.PSMA.7SC.CBGとした (図1D)。

40

【0614】

PSMA RNAをエレクトロポレーションしたNalm6.CBGもしくはK562、PC3またはPC3.PSMA.PSCA.CBG腫瘍細胞を、様々なPSMA RNA CARと共培養した。CD107aアッセイ、ルシフェラーゼベースのCTLアッセイおよびELISAアッセイを実施して、4つの新たなヒトCARの機能性を判定した。4つのヒトPSMA CARすべてが、PSMA陽性細胞と共培養

50

したとき、マウスPSMA CAR、J591と等価な脱顆粒活性を有していた（図2A）。しかしながら、4つのヒトPSMA CARのうち3つは、J591 CARよりも高い、PC3細胞に対する非特異的活性化を発揮した（図2A）。4つのヒトCARすべてが、J591 CARと比較して同程度の、PSMA陽性細胞に対する細胞毒性および抗腫瘍活性を有していた（図2Bおよび図2C）。サイトカイン産生は、1C3.BBZ、2A10.BBZおよび2F5.BBZ CARに関して、PSMAターゲット特異的であった（図2C）。

【0615】

実施例2：ヒトLenti PSMA CARは、PSMA陽性細胞を特異的に標的とする

4つのヒトPSMA CARをpTRPE Lentiベクターにサブクローニングした。ヒトPSMA CARを形質導入された初代ヒトT細胞は、異なるCAR発現レベルを有していた：1C3.BBZについて40%、2A10.BBZについて66%、2C6.BBZについて50%および2F5.BBZについて61%（図3A）。ドミナントネガティブなTGFR II配列を、T2A配列を介してマウスJ591.BBZ CARに連結した（dnTGFR II-J591.BBZ）。PSMA RNAをエレクトロポレーションしたNaIm6.CBG、PC3またはPC3.PSMA.CBG細胞を、様々なPSMA Lenti CARと共培養した。CD107aアッセイ、ルシフェラーゼベースのCTLアッセイおよびELISAアッセイを実施して、4つの新たなヒトPSMA Lenti CARの機能性を判定し、マウスJ591 CARと比較した。1C3.BBZ、2A10.BBZおよび2F5.BBZは、脱顆粒アッセイおよびルシフェラーゼベースの殺傷アッセイにおいてdnTGFR II-J591と類似の抗腫瘍活性を発揮した（図3Bおよび図3C）。サイトカイン産生に関して、4つのヒトPSMA Lenti CARはすべて、特異的なIL-2およびINF- γ 産生を誘発したが、その量はヒトCAR間で変動した（図3D）。

【0616】

実施例3：スイッチ受容体またはドミナントネガティブなTGFR IIが連結されたヒトLenti CARの構築

PD1の短縮細胞外ドメインならびにCD28の膜貫通および細胞質シグナル伝達ドメインを含むスイッチ受容体（PD1.CD28）をデザインし、T2A配列を介して各ヒトPSMA CARに連結した。PD1に対する132（マウスについて99）位でのアラニンからロイシンへの点突然変異は、PDL1とのその親和性を2倍増加させる（Zhang et al. Immunity 20, 337-347, 2004）。したがって、スイッチ受容体の第2バージョン「PD1^{A132L}PTM.CD28」（PD1の短縮細胞外および膜貫通ドメインならびにCD28の細胞質シグナル伝達ドメインを有する）を各ヒトPSMA CARに連結した。ドミナントネガティブなTGFR II配列も同様に各ヒトPSMA CARにサブクローニングした。フローサイトメトリーを実施して、各スイッチ受容体-CAR（図4A）およびdnTGFR II CAR（図4B）の形質導入効率を調べた。スイッチ受容体-CARを形質導入されたT細胞すべてで、別個のCAR/PD1二重陽性集団が観察された。形質導入効率は、ヒトPSMA Lenti CARとそれらの2つのスイッチ受容体対応物との間で類似していた（図4A）。各2C6 CARは、最低の形質導入効率を有していた。dnTGFR II集団に違いはなかったが、各dnTGFR II連結ヒトPSMA CARについて明らかなシフトが観察された（図4B）。

【0617】

スイッチ受容体の機能性を調べるために、様々な量のPDL1 RNA（0.5ug、2ugおよび5ug）をPC3.PSMA細胞にエレクトロポレーションした（図4C）。5ugのPDL1 RNAをエレクトロポレーションしたPC3.PSMA細胞を各PSMA CARと共培養した。共培養実験の前にdnTGFR II-J591.BBZを50%の形質導入効率に対して正規化した。4つのヒトPSMA CARのうち3つおよびそれらのスイッチ受容体またはdnTGFR II対応物は、PSMA陽性細胞と共培養したとき、dnTGFR II-J591.BBZ CARと同程度の脱顆粒活性を示した（図4D、図4Eおよび図4F）。2C6.BBZ CARおよびその関係する対応物は、より低い形質導入効率に起因するであろうより低い脱顆粒活性を実証した（図4G）。4つのヒトPSMA CARすべておよびそれらのスイッチ受容体またはdnTGFR II対応物は、PC3.PSMA細胞に対して類似の細胞毒性を示した（図4H）。ヒトPSMA CARはすべて、dnTGFR II-J591.BBZ CARと同程度の量のサイトカインを誘発した（図4I）。各スイッチ受容体CARは、PD

L1をエレクトロポレーションしたPC3.PSMA細胞と共培養したとき、それらの非スイッチ受容体またはdnTGFR II CAR対応物と比較してほぼ2倍高いIL-2を分泌した（図4I）。

【0618】

実施例4：PC3.PSMA.7SC異種移植モデル

PC3.PSMA.7SCマウス異種移植モデルで使用するために以下の6つのヒトPSMA CARを選択した：1C3.BBZ、PD1CD28.1C3.BBZ、2A10.BBZ、PD1CD28.2A10.BBZ、dnTGFR II-2A10.BBZおよびdnTGFR II-J591.BBZ。CAR発現をフローサイトメトリーによって試験した（図5Aおよび図5B）。マウスJ591.BBZ Lenti CARを機能性試験に含めた。試験したPSMA CARすべてが、CD107aアッセイにおいて類似の脱顆粒活性（図5Cおよび図5D）と、ルシフェラーゼベースのCTLアッセイにおいて同程度の殺傷活性を示し、2A10.BBZが最も低く、dnTGFR II-J591.BBZが最も高かった（図5E）。各スイッチ受容体CARは、PDL1をエレクトロポレーションしたPC3.PSMA.7SC細胞と共培養したとき、それらの非スイッチ受容体またはdnTGFR II CAR対応物と比較してほぼ2倍高いIL-2を分泌した（図5F）。

【0619】

上述のヒトPSMA CARを使用する安全性を確保するために、定量PCRによってPSMA発現について初代ヒト細胞の一団（表1）を試験した（図5G）。NaIm6.CBGによって正規化したところ、試験した初代細胞のすべて、PSMA Lenti CARにはなくPSMA RNA CARに対してわずかな反応性しか有していなかったPC3細胞（図2A）でさえも、様々なPSMA発現レベルを有していた（図5H）（PC3.PSMA細胞についてのPSMA発現は、PC3細胞よりも1800倍高い）。HREpC、HSAEpCおよびHPMECヒト初代を上述のCARと共培養した。CD107aおよびELISAアッセイを実施した。試験したPSMA CARはすべて、HPMECと共培養したとき、最小の検出可能な脱顆粒活性を有していた（図5Hおよび図5I）。PD1CD28.1C3.BBZは、HPMECと共培養したとき、1C3.BBZと比較して増加したIL-2を誘発した（図5J）。それにもかかわらず、初代ヒト細胞、具体的には、HPMECによって誘発されたサイトカインのレベルは、PC3.PSMA.7SCによるものと比較して無視できるほどのものである（図5J、図5Fとの比較）。

【0620】

（表1）PSMA発現について試験された初代ヒト細胞

HRCEpC	ヒト腎皮質上皮細胞
Hn2	初代ヒト神経細胞
hNP1	ヒト神経前駆細胞
hMSC-BM	骨髄由来のヒト間葉系幹細胞
HPASMC	ヒト肺動脈平滑筋細胞
HCM	ヒト心筋細胞
HOB	ヒト骨芽細胞
HAoSMC	ヒト大動脈平滑筋細胞
HREpC	ヒト腎上皮細胞
HPAEC	ヒト肺動脈内皮細胞
Kera	ケラチノサイト
HSAEpC	ヒト小気道上皮細胞
HPMEC	ヒト肺微小血管内皮細胞

【0621】

6つの上述のPSMA CARと形質導入しなかった対照群を試験するために、7つの群（1群当たり5匹のマウス）についてインビボNSGマウス実験をデザインした。クリックビートルグリーンを形質導入された2E6 PC3.PSMA.7SC細胞をマウスに注射し（i.v.）、28日後、2E6 CAR陽性形質導入T細胞を腫瘍担持マウスに注射した（i.v.）。生物発光イメージング（BLI）を異なる時点で実行した：腫瘍注射後27日目、34日目、42日目、49日目（図5Kおよび図5L）。いかなる理論にも束縛されるものではないが、この実験結果は、試験したPSMA CARすべてがdnTGFR II.J591.BBZと同程度の抗腫瘍活性を有することを示した。

【0622】

図6は、dnTGFR II-T2A PSMA-CAR構築物の様々なドメイン、およびpTRPE dnTGFR II-T2A PSMA CARベクターマップを示す。

10

【0623】

実施例5：PSMA CAR-T細胞によるインビボ腫瘍制御

形質導入プロトコル：Human Immunology Coreから入手したバルクT細胞（CD4およびCD8）を 10^6 個の細胞/mlに希釈し、CD3/28ビーズ（T cell expanders, Invitrogen）により細胞：ビーズ比1：3で刺激した。刺激後1日目に、3：1のMOIを使用して、パッケージングされたレンチウイルスベクターの形質導入を実施し、37℃/5% CO₂インキュベーター内で増大させた。

【0624】

形質導入有効性：PE抗ヒトTCR V α 8抗体（Cat#：348104, BioLegend）およびAPC抗ヒトCD279（PD-1）抗体（Cat#：329908, BioLegend）を使用したフローサイトメトリーによって、形質導入有効性を評価した。

20

【0625】

T細胞増大：細胞を培養し、刺激後3日目から始めて2日毎に分割した。3日目または4日目にT細胞を脱ビーズ化し、後で使用するために12日目に凍結した。

【0626】

細胞計数：増大-休止サイクルの間の様々な時点で、細胞を穏やかに混合して、既知の培養容量から細胞アリコート40 μ lを収集し、CCI laboratory SOPに従いCoulter Multisizer 3（Beckman Coulter）を使用して計数するために20mlのIsoton II Diluent Bufferを含むアキュベット（accuvettes）（Beckman Coulter）に入れた。これらのアッセイで細胞濃度、総細胞数、成長速度および細胞容量を決定し、これを使用して希釈容量を算出し、凍結のために細胞が休止したときを判定した。

30

【0627】

IL-2およびIFN γ に対するELISA：T細胞を洗浄し、R10培地に 1×10^6 個の細胞/mlで懸濁した。各細胞株およそ0.1mlを96ウェルプレート（Corning）のウェルに加え、37℃で18～20時間インキュベートした。上清を採取して、ELISAに供した。

【0628】

CD107aアッセイ：エフェクター：標的（E：T）細胞比1：1（ 10^5 個のエフェクター： 10^5 個の標的）で96ウェルプレート内のR/10培地160 μ l中に細胞を蒔いた。抗CD107a抗体を加え、細胞と共に37℃で1時間インキュベートした後、Golgi Stopを加えてさらに2.5時間インキュベートした。抗CD8抗体および抗CD3抗体を加えて、37℃で30分間インキュベートした。インキュベート後、試料を1回洗浄し、BD Accuri C6によるフローサイトメトリーに供した。データをFlowJoソフトウェアで解析した。

40

【0629】

PC3-PMSEA腫瘍モデル：1E6 PC3-PMSEA-CBGをマウスに皮下（s.c.）注射し、21日後、レンチウイルスを形質導入されたT細胞を腫瘍担持マウスに静脈内（i.v.）注射した。生物発光イメージング（BLI）および腫瘍測定を複数の時点で実行した。

【0630】

結果：表2に示す配列が作製され、それらのインビボでの腫瘍制御能について試験した。

【0631】

50

(表2) 様々なスイッチ受容体配列と組み合わせたPSMA CAR

SEQ ID NO:	参照図面	配列	CAR	スイッチ	説明
111 または 112	B	2F5BBZ	2F5BBZ	N/A	2F5 scFv、4-1BB共刺激性ドメイン、およびCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含む
159	C	PD1CD2 8.2F5BBZ	2F5BBZ	PD1-CD28	PD1-CD28スイッチおよび2F5BBZ PSMA CARを含む
163	D	PD1*CD 28.2F5BBZ	2F5BBZ	PD1 ^{A132L} - CD28	PD1A132L-CD28スイッチおよび2F5BBZ PSMA CARを含む
209 または 210	E	2F5ICOS _z	2F5ICOS _z	N/A	2F5 scFv、ICOS共刺激性ドメイン、およびCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含む
211 または 212	F	2F5ICOS _z YMNM	2F5ICOS _z YMNM	N/A	2F5 scFv、YMNMモチーフを含むバリエーションICOS共刺激性ドメイン、およびCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含む
217 または 227	G	PD1CD2 8.2F5ICOS _z	2F5ICOS _z	PD1-CD28	PD1-CD28スイッチおよび2F5ICOS _z PSMA CARを含む
218 または 232	H	PD1CD2 8.2F5ICOS _z YMNM	2F5ICOS _z YMNM	PD1-CD28	PD1-CD28スイッチおよび2F5ICOS _z YMNM PSMA CARを含む
219 または 233	I	PD1*CD 28.2F5ICOS _z	2F5ICOS _z	PD1 ^{A132L} - CD28	PD1A132L-CD28スイッチおよび2F5ICOS _z PSMA CARを含む
220	J	PD1*CD 28.2F5ICOS _z YMNM	2F5ICOS _z YMNM	PD1 ^{A132L} - CD28	PD1A132L-CD28スイッチおよび2F5ICOS _z YMNM PSMA CARを含む
221 または 229	K	PD1*BB. 2F5ICOS _z	2F5ICOS _z	PD1 ^{A132L} - 41BB	PD1A132L-41BBスイッチおよび2F5ICOS _z PSMA CARを含む
222 または 234	L	PD1*BB. 2F5ICOS _z YMNM	2F5ICOS _z YMNM	PD1 ^{A132L} - 41BB	PD1A132L-41BBスイッチおよび2F5ICOS _z YMNM PSMA CARを含む
223	M	TIM3CD 28.2F5ICOS _z	2F5ICOS _z	TIM3-CD28	TIM3-CD28スイッチおよび2F5ICOS _z PSMA CARを含む
224 または 235	N	TIM3CD 28.2F5ICOS _z YMNM	2F5ICOS _z YMNM	TIM3-CD28	TIM3-CD28スイッチおよび2F5ICOS _z YMNM PSMA CARを含む

10

20

30

40

225	O	PD1*BB. TIM3CD 28.2F5IC OSz	2F5ICOSz	PD1 ^{A132L} - 41BB; および TIM3-CD28	PD1 ^{A132L} -41BBスイッチ、 TIM3-CD28スイッチ、および 2F5ICOSz PSMA CARを含む
226 または 236	P	PD1*BB. TIM3CD 28.2F5IC OSzYM NM	2F5ICOSzY MNM	PD1 ^{A132L} - 41BB; および TIM3-CD28	PD1 ^{A132L} -41BBスイッチ、 TIM3-CD28スイッチ、および 2F5ICOSzYMN PSMA CARを含む

10

【 0 6 3 2 】

ICOSまたはICOS.YMNMのいずれかのシグナル伝達ドメインを有するPSMA CAR、およびCAR+PD1（またはTim3）スイッチ受容体の組み合わせを構築し、レンチウイルスベクターにクローニングした（配列については表2を参照のこと）。形質導入されたT細胞におけるCAR発現レベルは、CAR構築物の大部分において同程度であり（図7）、スイッチ受容体が適切に発現された（図8）。PSMA陽性細胞株PC3.PSMAまたはPC3.PSMA.PD-L1で刺激し、CD107aアップレギュレーションについて調べたとき、ICOS.YMNMシグナル伝達ドメインを有するPSMA CAR（ICOS ynmn）は、野生型ICOS CAR（ICOS）または4-1BB CAR（41BB）と比較して有意に高いCD107a発現を示した（図9）。ICOS PSMA CARとICOS.YMNM PSMA CARの両方についてのグランザイムB発現は、4-1BB PSMA CARに類似していた（図10）。ICOS、ICOS.YMNMまたは4-1BBを含むPSMA CARで同時形質導入されたPD1スイッチ受容体のサイトカイン産生（IL-2およびIFN-ガンマ）は、PD-L1発現PC3.PSMA細胞で刺激したときに有意に高かった（図11Aおよび11B）。

20

【 0 6 3 3 】

図12は、PC3-PSMA.CBGによって誘導された腫瘍を担持するNSGマウスを、表示の通りのCARを形質導入したT細胞で処置した、86日まで（図12A）および151日まで（図12B）の生物発光イメージングの定量を示す。図13は、PC3-PSMA.CBGによって誘導された腫瘍を担持するNSGマウスを、表示の通りのCARを形質導入したT細胞で処置した、164日までの腫瘍サイズを示す。示すように、ICOS PSMA CAR（2F5.ICOSz）とICOS.YMNM PSMA CAR（2F5.ICOSzYMNM）は共に、4-1BB PSMA CAR（2F5.BBZ）よりも悪い腫瘍制御を示した。PD1-CD28スイッチ受容体は、4-1BB共刺激性ドメインを有するPSMA CAR（PD1.CD28.2F5.BBZ）を改善したが、ICOS PSMA CAR（PD1CD28.2F5ICOSz）またはICOS.YMNM PSMA CAR（PD1CD28.2F5ICOSzYMNM）については改善しなかった。PD1.CD28.2F5.BBZとPD1CD28.2F5ICOSzYMNMは共に、4-1BB PSMA CARと比較して劣った腫瘍制御を示した。これらのICOSベースのCARを4-1BBシグナル伝達ドメインを有する高親和性PD1スイッチ受容体（PD1*BB）とT細胞に共送達したときに、4-1BB PSMA CARと同じくらい効率的に腫瘍を制御することができる。図14A~14Fに示すように、ICOS.YMNM CARと4-1BBシグナル伝達ドメインを有するPD1スイッチ受容体とを共送達したT細胞（PD1*BB.2F5ICOSzYMNM）は腫瘍を排除した。図14Gは、T細胞を腫瘍制御の能力順に一覧で提供する。

30

40

【 0 6 3 4 】

実施例7：PD1 CD28スイッチまたはTGFベータ受容体II：CD28スイッチに対する二重特異性抗体を共発現するPSMA CAR-T細胞

PD-L1に結合し得るscFv（10A5、13G4および1B12、例えば、PCT公報番号WO2007005874A2を参照のこと）またはTGFベータ受容体II（aTGFbRII-1およびaTGFbRII-3）に結合し得るscFv（TGFb1およびTGFb3、例えば、米国特許第8,147,834号を参照のこと）および抗CD28 scFv（1412、例えば、米国特許第7,585,960号を参照のこと）を使用した5つの二重特異性抗体をデザインし、その遺伝子をPCRによって合成した。配列検証したDNAを、PGEM.64AベースのRNAインビトロ転写ベクターにクローニングして、

50

pGEM.aTGFbR-1-1412およびpGEM.aTGFbR-3-1412を作製した。例えば、PCT公報番号WO2016122738A1を参照されたい。

【0635】

上記から選択される二重特異性抗体を共発現するPSMA CAR-T細胞が作製される。

【0636】

実施例8：臨床用CART-PSMA-TGF RDN自己T細胞の製造および投与

CART-PSMA-TGF RDN研究用細胞産物の製造、最終製剤化、試験および標識付けを、下記の通り、The Clinical Cell and Vaccine Production Facility (CVPF) の標準操作プロトコル (SOP) に従って実施した。CVPFは、ペンシルベニア大学の病理・臨床検査科 (Department of Pathology and Laboratory Medicine) の輸血医学・治療病理学部門 (Division of Transfusion Medicine and Therapeutic Pathology) 内にある施設である。その部門内には、CVPFおよびアフエーシス収集施設に加えて、臨床用造血幹細胞移植サービスを支援することに主に専念する骨髓および末梢血幹細胞産物を担当している別の造血幹細胞処理研究室もある。CVPFは、登録済みHCT施設であり、Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT) の認定を受けている。

【0637】

Dynabeads CD3/C28 CTS (商標) (以前はClinExVivoと命名されていた) ビーズをT細胞の活性化および増大に使用した。

【0638】

CART-PSMA-TGF RDN研究用産物の製造を白血球アフエーシス産物から開始した。Beckman Coulter MultisizerおよびBD FACS Caliburデバイスによって評価した場合の白血球アフエーシス産物の構成に基づいて、以下を行った：TerumoBCT Elutraでの対向流遠心溶出法 (単回使用の閉鎖系使い捨てセット、半自動の閉鎖系デバイスHaemonetics CellSaver 5を使用した洗浄工程および/またはPBMCのパフィー画分のFicoll分離を採用する) を介した単球の枯渇。0日目に、CART-PSMA TGF RDN製造プロセスを、Dynabeads CD3/CD28 CTSビーズによるTリンパ球の活性化によって開始した。PSMA-TGFbRIIDN CAR LVベクターを1日目に総最終MOIで加えた。1日目～3日目にベクター形質導入を行った。3日目に、細胞を洗浄し、培地を交換した。GE Wave Bioreactor Systemで培養物の増大を継続した。培養最終日に、細胞を採取し、Cell Saverを使用して濃縮した。採取の前に、細胞産物を、Dynabeads CD3/CD28 CTSビーズの除去のためにBaxter MaxSep上に載せた。ビーズ除去に続いて、Haemonetics Cell Saver 5を使用して細胞増大物を洗浄し、残留ベクター、ウイルス粒子および細胞残屑を除去した。CART-PSMA-TGF RDN細胞を、31.25% Plasmalyte-A、31.25% デキストロース5%、0.45% NaCl、1% デキストラン40および5% デキストロース、5% ヒト血清アルブミンおよび7.5% DMSOを含有する凍結保存培地に再懸濁した。コントロールレートフリーザーを使用して、Cryostoreエチレン酢酸ビニル (EVA) (OriGen Biomedical) または等価な透明バッグ中に細胞を凍結した。

【0639】

凍結保存したCART-PSMA-TGF RDN：各点滴バッグは、約10～50mLの細胞を含有した。凍結保存した細胞も、点滴用量と同一の細胞濃度で少量保持され、点滴前に生存率およびエンドトキシン検査を実施するためならびに安定性試験のためセンチネルバイアルとして使用した。

【0640】

白血球アフエーシス収集および細胞分離/濃縮：ペンシルベニア大学病院 (HUP) のアフエーシス施設で白血球アフエーシス収集を介して自己末梢血リンパ球を得た。治験登録の前に患者から収集した凍結保存された過去のアフエーシス産物がCART-PSMA-TGF RDN細胞の製造に使用可能であり得る。使用する場合、試料は、適正に認定されたアフエーシスセンターで収集されていなければならない、その産物は、適切な単核細胞収量を満たしていなければならない。

【0641】

10

20

30

40

50

およそ10～15Lの血液をCOBE Spectra Apheresis Systemまたは等価なシステムで処理して、およそ 5×10^9 個の白血球細胞の集団を得た。プロトコルで提供されるスクリーニング試験要件に加え、すべてのアフェレーシスドナー由来の血液は、American Red Cross National Testing Laboratoryによって実施される感染症検査を受けた。

【0642】

アフェレーシス産物を断熱容器に入れてCVPFに送り、受け取り時に温度を記録した。試料を、細菌および真菌培養、フローサイトメトリーによるリアルタイムフェノタイピング、ならびに研究および相関性研究の目的に取り出した。アフェレーシス産物を凍結保存するかまたはエルトリエーションによって処理した。エルトリエーションまたは細胞洗浄後、細胞数をCoulter Multisizer M3/M4で、生存率をトリパンブルー色素排除アッセイによって判定した。エルトリエーション産物を凍結保存するかまたはさらなる処理に進めた。凍結保存したアフェレーシスまたはエルトリエーション産物を融解し、培養する前に洗浄して凍結保存培地を除去した。次いで、これらの産物を、さらなるT細胞選択のため、1)エルトリエーションリンパ球の洗浄および播種、2)CD3/CD28ビーズによる陽性選択、または3)Ficollベースの勾配分離のいずれかを介して処理した。

10

【0643】

培養開始および増大：濃縮したリンパ球を、静止組織培養フラスコ内、5%ヒトAB血清、2mM L-GlutaMAX、20mM Hepes、1mM ピルビン酸ナトリウム、1% MEMビタミン必須混合物、10mM N-アセチルシステインおよび100IU/ml IL-2を補充したXVIVO-15培地（改変X-VIVO 15培地）中、細胞 $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個の近似範囲でDynabeads CD3/CD28 CTSにより刺激した。ビーズ対細胞比3:1でビーズを加えた。培養5日目に、許容可能な細胞数に達したら、採取、エレクトロポレーション、サンプリングおよび最終製剤化が可能となる適切な細胞数に増大させるために細胞をWAVE 2/10EH Bioreactorに移した。培養最終日に、細胞を採取し、Cell Saver Washシステムを使用して濃縮した。採取の前に、細胞産物を、抗CD3/CD28磁気マイクロビーズの除去のためにBaxter Max Sep上に載せた。採取後、増大したT細胞を、5%ヒトAB血清を補充したX-VIVO培地1mL当たり細胞 2×10^6 個で再懸濁した。細胞を37℃のインキュベーター内に一晩入れた。

20

【0644】

CART-PSMA-TGFBRDN用量製剤化：用量製剤化は、あるコホートに対してCART-PSMA-TGFBRDN細胞 $1 \sim 3 \times 10^7/m^2$ の用量で、別のコホートに対して $1 \sim 3 \times 10^8/m^2$ の用量で開始した。投薬は、抗PSMA CAR発現に基づいた。総用量を単回用量として製剤化した。

30

【0645】

最終製剤化：インキュベーション後、リリース検査試料およびアーカイブのすべてを除去した後、細胞を、31.25% PlasmaLyte-A、NaCl（0.45%）中の31.25%デキストロース（5%）、7.5% DMSO、5%ヒト血清アルブミンおよび1% 低分子量デキストラン（LMD）を含有する不溶解性の凍結保存培地に再懸濁した。

【0646】

産物投与：

細胞融解：細胞は、CVPFまたはベッドサイドで、36℃～38℃で維持された水浴または同等の機器を使用して、訓練を受けた者によって融解された。I.V.管に接続するまで、凍結された凝集塊を容器内に放置しないようにすべきである。CART-PSMA-TGFBRDN細胞産物が、損傷しているバッグもしくは漏出しているバッグに入っているか、または損なわれているようであれば、それを点滴せずに、CVPFに戻した。

40

【0647】

投与：点滴は、CTRRCの隔離室またはペンシルベニア大学病院の他の場所で、免疫抑制患者用の予防措置を講じて行った。点滴の前に、2人の人物が独立して、対象の立ち会いのもとで点滴産物のラベルの情報を確かめ、情報が参加者と正しく一致していることを確認した。細胞を融解後およそ30分以内に点滴した。CART細胞を、末梢静脈（好ましい）または中心静脈のいずれかを通して18ゲージの静脈内カテーテルに静脈内点滴した。Mac

50

rodrip静脈注射管を使用して、CART細胞を、三方活栓を備えたラテックスフリーY型血液セットに通して重力により（すなわち、点滴ポンプなしで）およそ約10mL/分の速度で点滴した。CART細胞産物の点滴に白血球除去フィルターは使用しなかった。対象にアレルギー反応、または重篤な低血圧危機、または点滴に対する任意の他の反応があった場合、点滴中に緊急医療器具（すなわち、緊急トローリー）を利用可能とした。バイタルサイン（体温、呼吸数、脈拍、血圧、およびパルスオキシメトリーによる酸素飽和度）を点滴の前後に測定した。対象のバイタルサインが十分かつ安定でない場合は、バイタルサインを少なくとも1時間毎にまたは安定であると臨床的に示されるまで継続的にモニタリングした。対象が満足のいく状態にあると対象の治療を管理する医師が判断した後、対象を退院させた。

10

【0648】

実施例9：CART-PSMA-TGF RDN臨床試験デザイン

このプロトコルは、2用量レベルのCART-PSMA-TGF RDN細胞を単独で静脈内投与したまたはリンパ球枯渇後にCART-PSMA-TGF RDN細胞の3日前に投与する中等用量のシクロホスファミドと共に静脈内投与した場合の安全性を試験した。用量拡大は3+3デザインに従った。CART-PSMA-TGF RDN細胞を、4-1BBおよびTCR のシグナル伝達ドメインに融合された抗PSMA CARを有するPSMAタンパク質に指向されるように、恒久的に改変した。リンパ節、内臓または骨転移の証拠となるX線像のある去勢抵抗性前立腺がん患者を治験母集団に含めた。患者はすべて、少なくとも1つの標準17 リアーゼ阻害剤による治療または第二世代抗アンドロゲン療法後も、疾患進行していた必要がある。

20

【0649】

最初の患者に投薬した日は、2017年8月31日であった。

【0650】

インフォームドコンセントの一環で、腫瘍のPSMA検査を行う許可を適格基準の1つとして対象に求めた。新鮮な腫瘍生検材料上のPSMA発現の評価は好ましいものであったが；生検が実現可能または臨床的に適切でなかった場合、90日前以内に得られたものならば最近の転移性組織生検由来のアーカイブ組織を使用して適格性を判定した。

【0651】

PSMA発現を有する腫瘍細胞が10%以上であると確認され、かつ、他のすべての組み入れ基準を満たした患者を参加適格とした。

30

【0652】

コホート1の対象（N=3または6）は、0日目に、いかなるコンディショニング化学療法レジメンもなしに、単回用量のレンチウイルスによって形質導入されたCART-PSMA-TGF RDN細胞 $1 \sim 3 \times 10^7/\text{m}^2$ を受けた。製造されたCAR T細胞の数が事前に指定された最小点滴用量 $1 \times 10^7/\text{m}^2$ （細胞）を満たさなかった場合、その用量を投与せずに、治験において対象を交代した。1例のDLT/対象3人が発生したら、治験に、この用量レベルで追加の対象3人を登録する。0例のDLT/対象3人または1例のDLT/対象6人が発生したら、治験はコホート2へ進む。 $1 \sim 3 \times 10^7/\text{m}^2$ の細胞用量で2例のDLT/対象3人が発生したら、このコホートへの登録を停止し、用量を $1 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞/ m^2 まで10倍ずつ縮小させる（コホート-1）。この状況で、最大6人の対象をコホート-1に登録する。

40

【0653】

コホート2の対象（N=3または6）は、0日目に、いかなるコンディショニング化学療法レジメンもなしに、単回用量のレンチウイルスによって形質導入されたCART-PSMA-TGF RDN細胞 $1 \sim 3 \times 10^8/\text{m}^2$ を受けた。製造されたCAR T細胞の数がプロトコルで指定された最小値 $1 \times 10^8/\text{m}^2$ （細胞）を満たさなかったが、少なくとも $1 \times 10^7/\text{m}^2$ （細胞）の最小用量要件を満たした場合、対象は、その用量を受けるが、コホート2のDLT評価に含めなかった。この対象は、この用量でのDLT評価のために交代させる。製造されたCAR T細胞の数がコホート1で概説されたような事前に指定された最小点滴用量を満たさなかった場合、いかなる用量も投与せずに、治験において対象を交代した。1例のDLT/対象3人が発生したら、治験に、この用量レベルで追加の対象3人を登録する。0例のDLT/対象3人

50

または1例のDLT / 対象6人が発生したら、治験はコホート3へ進む。2例のDLT / 対象3人が発生したら、治験を停止し、最大耐量 (MTD) を発表する。

【0654】

コホート1および2は、CART-PSMA-TGF RDN細胞のMTDを特定するのに役立った。MTDは、DLT 0/3または1/6が発生する最高用量として定義される。

【0655】

コホート3の対象 (N = 3または6) は、CAR T細胞の4日前までに (-3日目 ± 1日) 単回用量のシクロホスファミド1.0グラム/m²を投与した後、0日目に、レンチウイルスによって形質導入されたCART-PSMA-TGF RDN細胞のMTDの単回点滴を受けた。0例のDLT / 対象3人が発生したら、治験に追加の患者3人を登録して忍容性を確認する。1例のDLT / 対象3人が発生したら、治験に、この用量レベルで追加の対象3人を登録する。最初の対象3人のうち2人がDLTを経験したら、追加の患者3人を得て、リンパ球枯渇化学療法を500 mg/m²まで用量低下させて、CAR T細胞の4日前までに (-3日目 ± 1日) 投与する。

10

【0656】

対象を逐次的に登録した。コホート進行、増大または用量縮小についてDLTの評価が可能となるように点滴を交互に行った。各コホートにおける1回目の対象2人に対する点滴を28日毎に交互に行った；2回目の対象には、1回目の対象の点滴の28日後まで点滴しなかった。そのコホートにおける1回目の対象がDLTなしで28日目の来院を終えた場合のみ、各コホートにおける2回目および3回目の対象を並行して点滴および追跡した。

【0657】

20

DLTは、T細胞点滴の28日以内に発生したT細胞レジメンに少なくとも関係する可能性のある任意の新たなグレード3以上の有害事象として定義された。ある用量レベルで処置された1回目の対象3人において1例のDLTが発生したら、治験に、その用量レベルで追加の対象3人を登録する。2例のDLT / 対象3人が発生したら、治験を停止し、最大耐量を発表する (但し10倍の用量縮小を行うコホート1を除く)。ある用量レベルで0例のDLT / 対象3人または1例のDLT / 対象6人があれば、治験は次のコホートへ進む。コホート3について、最初の対象3人のうち2人がDLTを経験したら、追加の患者3人を得て、リンパ球枯渇化学療法を500mg/m²まで用量低下させて、CAR T細胞の4日前までに (-3日目 ± 1日) 投与する。それ以外に、コホート3で0 ~ 1例のDLT / 対象3人が発生したら、治験に追加の患者3人を登録して忍容性を確認する。

30

【0658】

対象を安全性評価および研究評価のために経過観察した。安全性評価のため、対象を、1、3、7、10、14、21および28日目に治験経過観察のために戻した。28 (± 5) 日目に、CT胸部 / 腹部 / 骨盤、骨スキャンおよび血清PSAにより病期判定を実施した。28日目のこの早期画像検査評価の理由は、全身性炎症作用について評価し、予想されるCART-PSMA-TGF RDN細胞のホーミング時の疾患状態をモニタリングすることであった。反復疾患評価 (画像検査を含む) を、3ヶ月目および6ヶ月目に、その後の標準治療として実施した。対象が、その標準治療の一環として実施される3ヶ月目および / または6ヶ月目の4週間以内に、関係する画像検査データ (CT腹部 / 骨盤、MRI腹部 / 骨盤、骨スキャン) を有していた場合、これを3ヶ月目および / または6ヶ月目に反復しなかった。

40

【0659】

有害事象の報告は、承諾の時点で開始し、対象が治験停止となるまで継続する。治験期間中、急性および蓄積毒性の証拠について対象を継続的に再評価した。一次経過観察期間の中断後、対象は、CART-PSMA-TGF RDN点滴から最大5年までの長期経過観察に入る。長期経過観察の間、CART-PSMA-TGF RDN細胞の投与に関連し得る遅発性の有害事象について対象をモニタリングする。

【0660】

末梢血試料を規定の時点に得て、安全性および有効性の評価基準についてモニタリングした。また、臨床的適応のために得た追加の血液および組織試料 (例えば、体液、組織生検) を研究分析のために送ってもよい。組織また体液 (例えば、胸水または腹水のドレナ

50

ージ) が得られた時には、そうでなければ廃棄されていただろう体液試料を研究目的に代用した。これらの治験は、Q-PCRによるCART-PSMA-TGF RDN細胞の持続性ならびにLuminexベースのサイトカインおよびケモカインパネルを用いた炎症マーカー評価を含むが、これらに限定されない。

【0661】

予想外のAEが起こった場合、点滴されたCART-PSMA-TGF RDN細胞による予想外の事象の潜在的な因果関係の評価に焦点を当てた研究分析のために、追加の血液および組織を収集した。研究用に収集される追加の試料は、スプーン3杯の血液を1週間に2回、および組織試料収集手順を1ヶ月に1回以下とした。

【0662】

組み入れ基準：

1. 転移性去勢抵抗性前立腺がん
 2. 生検組織での免疫組織化学分析による実証で、PSMAを発現する腫瘍細胞が10%以上
 3. 骨転移性疾患および/または測定可能な非骨転移性疾患(リンパ節または内臓)の証拠となるX線像
 4. 18歳以上の患者
 5. ECOGパフォーマンスステータスが0~1
 6. 以下によって定義されるような、適切な臓器機能：
 - a. 血清クレアチニンが1.5mg/dl以下またはクレアチニンクリアランスが60cc/min以上
 - b. 血清総ビリルビンが1.5 x ULN未満
 - c. 血清ALT/ASTが2 x ULN未満
 7. 以下によって定義されるような、治験登録の4週間以内の適切な血液学的予備能：
 - a. Hgbが10g/dl超
 - b. PLTが100k/uI超
 - c. ANCが1.5k/uI超
- 注記：対象は輸血依存性であってはならない
8. 以下によって定義されるような、進行性去勢抵抗性前立腺がんの証拠：
 - a. アンドロゲン抑制療法ANDの使用を問わずテストステロンの去勢レベル(50ng/ml未満)
 - b. 治験登録前12週間における進行性疾患の以下の評価基準の1つの証拠：
 - i. RECIST 1.1基準による軟部組織進行
 - ii. 骨スキャンで2つ以上の新たな病変を伴う骨疾患進行(PCWG2基準に従う)
 - iii. 血清PSAの少なくとも25%の増加および底から2ng/ml以上の絶対的増加(PCWG2基準に従う)
 9. 転移性去勢抵抗性前立腺がんの処置のための少なくとも1つの標準17 リアーゼ阻害剤または第二世代抗アンドロゲン療法による先行療法
 10. 書面によるインフォームドコンセントの提出
 11. 生殖能のある対象は、許容可能な受胎調節法を使用することに同意しなければならない

【0663】

除外基準：

1. がんワクチン療法(例えば、SipuleucelT, PROSTVAC)、免疫チェックポイント阻害剤、ラジウム-223および免疫コンジュゲート療法を含めた前立腺がんの処置のための免疫ベース療法による先行処置
2. 前の5年以内に活動性の非治癒性非前立腺原発性悪性腫瘍の病歴
3. 全身性副腎皮質ステロイド療法の慢性使用を必要とする対象
4. 去勢抵抗性前立腺がんの処置のための3回を超える先行療法(黄体形成ホルモン放出ホルモン作動薬もしくは拮抗薬、または第一世代抗アンドロゲン療法を除く)を受けている対象。これは、非去勢抵抗性の状況でタキソテレを受けている対象を含む。
5. ニューヨーク心臓協会心機能分類に従うクラスIII/IV心血管障害を有する対象(Attachment 2を参照のこと)

10

20

30

40

50

6. 脊髄機能に影響を及ぼす症候性脊椎転移を有する対象（臨床歴、身体検査またはMRI画像検査による判定）
7. 免疫抑制療法を必要とする活動性自己免疫疾患の病歴
8. 進行中または活動性の感染症を有する患者
9. 治験薬賦形剤（ヒト血清アルブミン、DMSO、およびデキストラン40）に対するアレルギーまたは過敏反応の病歴
10. 活動性のB型肝炎、C型肝炎またはHIV感染

【0664】

実施例10：第1相臨床安全性データ

合計6人の対象が点滴を受け、対象2人は2018年7月25日現在治験中である。コホート1で対象3人に点滴し、コホート2で対象3人に点滴した。したがって、コホート2が満員となった。コホート1とは対照的に、コホート2で点滴した対象3人はすべて、サイトカイン放出症候群（CRS）を経験した：対象2人はグレード3のCRSを有し、対象1人はグレード1のCRSを有し、そのすべてがCAR T細胞点滴の12時間以内に発症した。これらの毒性は、プロトコル/施設内ガイドラインによって管理し、決定した。したがって、コホート2はDLTなく終了した。

【0665】

治験の開始訪問を2017年2月22日の水曜日に行い、治験を2017年3月8日に始動した。2018年7月25日現在、臨床現場は対象8人を承諾した。承諾した対象8人のうち1人はスクリーニング不合格であり、対象1人は処置前に離脱し、対象6人に点滴した。

【0666】

表3は、スクリーニングした対象の人口統計の概要を示す（N=8）。

【0667】

（表3）スクリーニングした対象の人口統計

	対象ID	コホート	性別 (F/M)	承諾時の年齢	人種	スクリーニング不合格 (Y/N)	スクリーニング理由の不合格 (Y/N)	点滴 (Y/N)	終了理由の治験
1	32816-01	N/A	M	66	白色人種	Y	先行免疫療法に基づいて除外	N	スクリーニング不合格
2	32816-02	1	M	55	白色人種	N	N/A	Y	死亡；好中球減少性敗血症*
3	32816-03	N/A	M	67	白色人種	N	N/A	N	対象の承諾撤回
4	32816-04	1	M	50	白色人種	N	N/A	Y	死亡；疾患進行*
5	32816-05	1	M	71	白色人種	N	N/A	Y	疾患進行
6	32816-06	2	M	72	白色人種	N	N/A	Y	疾患進行
7	32816-07	2	M	73	白色人種	N	N/A	Y	治験参加中
8	32816-08	2	M	64	白色人種	N		Y	治験参加中

10

20

30

40

50

N/A = 該当なし

*死亡は、長期経過観察中に起こった。それゆえ、この事象はPDAEとはみなさず、IPに関係しないと判断した。

【 0 6 6 8 】

表4は、点滴された対象についての現行のプロトコルステータスの概要を示す（N = 6）

【 0 6 6 9 】

（表4）点滴された対象についての現行のプロトコルステータス

	対象 ID	最終来院日／ 最終来院日 最終来院日	試験停止日／ 理由	プロトコル逸脱 (Y/N)	有害事象 (Y/N)	関係する 有害事象 (Y/N)	重篤な 有害事象 (Y/N)	試験状況
1	32816-02	28日目/ 9/29/2017	11/16/2017 / 死亡 (好中球減少性敗血症)	N	Y	Y	Y	試験 停止
2	32816-04	3ヶ月目/ 2/15/2018	5/19/2018 / 死亡 (疾患進行)	N	Y	N	N	試験 停止
3	32816-05	6ヶ月目/ 5/22/2018	6/13/2018 / 疾患進行	N	Y	Y	Y	試験 停止
4	32816-06	28日目/ 7/13/2018	7/17/2018 / 疾患進行	Y	Y	Y	Y	試験 停止
5	32816-07	2ヶ月目/ 7/9/2018	N/A	N	Y	Y	Y	試験中
6	32816-08	28日目/ 7/25/2018	N/A	Y	Y	Y	Y	試験中

【 0 6 7 0 】

表5は、点滴された対象についての逸脱または除外の概要を示す（N = 6）。

【 0 6 7 1 】

（表5）点滴された対象についての逸脱または除外

10

20

30

40

50

対象ID	プロトコル除外または逸脱	除外または逸脱の確定日	除外または逸脱の説明	除外または逸脱の状況
32816-02	除外	4/24/2017	対象は反復スクリーニング生検を有していたが、初期に生検された材料が脂肪、骨髄組織を含有していたのでPSMA発現解析に不十分であったと判断された。	スポンサー認可；すべての現地規制審査委員会によって認可された。
32816-04	報告する逸脱または除外なし			
32816-05	報告する逸脱または除外なし			
32816-06	逸脱	6/12/2018	2018年 6月 11日に対象に点滴した；バイタルサインソース書類をICUへの対象の移送中に紛失したので、対象のプロトコルにとって必要な点滴前および後のバイタルサインの記録がない。	スポンサー承認が2018年 8月 7日に現場に伝えられた；対象の安全性に影響を及ぼさなかったので即時報告を必要としなかった。是正・予防措置計画が実行されている。
32816-07	報告する逸脱または除外なし			
32816-08	逸脱	3/29/2018	治験病理学者は、患者が事前スクリーニングのインフォームドコンセントフォームにサインする前に標準治療として収集された検体でPSMA発現試験を実施した。	スポンサー認可；IRB認可；対象の安全性に影響を及ぼさなかったので即時報告を必要としなかった。是正・予防措置計画が実行された。

【 0 6 7 2 】

表6は、点滴された対象のうちでの点滴日および用量の概要を示す（N = 6）。

【 0 6 7 3 】

（表 6）点滴された対象のうちでのPSMA-TGF RDN点滴日および用量の概要

10

20

30

40

50

	対象 ID	コホート	点滴日	点滴された細胞				形質導入効率	
				総細胞用量	総CART-PSMA-TGF β RDN細胞用量	CART-PSMA-TGF β RDN 細胞用量 / m ²	標的用量達成 (Y/N)	フローサイトメトリー scFv のパーセント (%)	標的のフローサイトメトリー scFv のパーセント達成 (Y/N)
1	32816-02	1	8/31/2017	9.25 x 10 ⁷	5.61 x 10 ⁷	3 x 10 ⁷ / m ²	Y	60.5	Y
2	32816-04	1	11/13/2017	1.20 x 10 ⁸	7.56 x 10 ⁷	3 x 10 ⁷ / m ²	Y	62.9	Y
3	32816-05	1	11/20/2017	7.66 x 10 ⁷	5.58 x 10 ⁷	3 x 10 ⁷ / m ²	Y	72.7	Y
4	32816-06	2	6/11/2018	1.05 x 10 ⁹	7.29 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸ / m ²	Y	69.7	Y
5	32816-07	2	5/7/2018	1.18 x 10 ⁹	6.60 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸ / m ²	Y	56.1	Y
6	32816-08	2	6/27/2018	1.13 x 10 ⁹	6.36 x 10 ⁸	3 x 10 ⁸ / m ²	Y	56.4	Y

【 0 6 7 4 】

表7は、点滴された対象についての疾患応答の概要である (N = 6) 。

【 0 6 7 5 】

(表 7) 点滴された対象についての疾患応答

10

20

30

40

50

全腫瘍応答							
	対象 ID	コホート	応答基準	28日目	2ヶ月目	3ヶ月目	6ヶ月目
1	32816-02	1	RECIST 1.1	NE	N/A	N/A	N/A
			骨スキャン	新たな病変	N/A	N/A	N/A
2	32816-04	1	RECIST 1.1	NE	評価なし	PD	N/A
			骨スキャン	新たな病変なし	評価なし	新たな病変	N/A
3	32816-05	1	RECIST 1.1	SD	評価なし	SD	PD
			骨スキャン	新たな病変	評価なし	新たな病変	新たな病変なし
4	32816-06	2	RECIST 1.1	PD	N/A	N/A	N/A
			骨スキャン	評価なし	N/A	N/A	N/A
5	32816-07	2	RECIST 1.1	SD	評価なし	結果待ち	結果待ち
			骨スキャン	新たな病変なし	評価なし	結果待ち	結果待ち
6	32816-08	2	RECIST 1.1	PD	結果待ち	結果待ち	結果待ち
			骨スキャン	新たな病変	結果待ち	結果待ち	結果待ち

NE = 評価不可能

PD = 進行性疾患

SD = 安定疾患

結果待ち = 対象はまだこの時点に達していない

評価なし = この時点で評価を行わなかった

N/A = 該当なし / 対象はこの時点の前に一次経過観察を中断した

【 0 6 7 6 】

表8は、点滴された対象についての血清PSAレベルの概要である（N = 6）。

【 0 6 7 7 】

（表8）点滴された患者についての血清PSAレベル（データはng/mL単位で提供される）

10

20

30

40

50

	対象 ID	コホート	スクリーニング	点滴前の 安全性	28日目	2ヶ月目	3ヶ月目	6ヶ月目	スケジュール 外
1	32816-02	1	163.80	237.80	167.40	317.10¥	N/A	N/A	(+20日): 162.20
2	32816-04	1	9.35	7.60	10.45	19.79	38.11	N/A	---
3	32816-05	1	17.83	10.47	14.01	11.75	18.77	47.31	---
4	32816-06	2	14.26	41.75	132.20	N/A	N/A	N/A	---
5	32816-07	2	219.30	324.30	340.50	372.50	結果待ち	結果待ち	(+10日): 286.80 (+14日): 285.40 (+21日): 341.60
6	32816-08	2	70.56	134.50	197.10	結果待ち	結果待ち	結果待ち	---

N/A = 該当なし

¥ = 対象は2017年11月1日にLTFUに参加した；2ヶ月目のPSAは2017年11月2日に採取された

--- = この対象についてスケジュール外のデータなし

結果待ち = 対象はまだこの時点に達していない

【 0 6 7 8 】

表9は、点滴された対象についてのqPCRによる末梢血中のPSMA-TGF RDN細胞標識を示す概要である（N = 6）。

【 0 6 7 9 】

（表9）点滴された対象についてのqPCRによる末梢血中のPSMA-TGF RDN細胞標識（データはコピー数/ゲノムDNAマイクログラムで提供される）

10

20

30

40

50

対象 ID	コホート	点滴前の安全性	0日目前	0日目後	1日目	3日目	7日目	10日目	14日目	21日目	28日目	2ヶ月目	3ヶ月目	6ヶ月目
32816-02	1	ND	ND	85.15	4.53	101.82	343.70	1412.81	110.46	11.46	8.04	N/A	N/A	N/A
32816-04	1	ND	ND	151.6	ND	25.90	417.31	3351.64	216.02	27.02	ND	ND	ND	N/A
32816-05	1	ND	ND	46.99	5.95	9.23	ND	33.38	43.61	7.85	14.50	ND	ND	ND
32816-06	2	ND	ND	394.94	16.87	201.73	3099.79	1084.13	218.64	収集なし	26.96	N/A	N/A	N/A
32816-07	2	ND	ND	530.57	16.27	89.39	457.40	151.45	84.31	43.40	14.50	まだ結果なし	結果待ち	結果待ち
32816-08	2	ND	ND	422.92	63.32	96.76	253.85	217.28	114.46	72.06	まだ結果なし	結果待ち	結果待ち	結果待ち

ND = 未検出

N/A = 該当なし-対象はこの来院の前に一次経過観察を中断した

結果待ち = 対象はまだこの時点に達していない

収集なし = 分析用に研究試料を収集しなかった

まだ結果なし = 試料をまだ試験していない

【0680】

表10は、点滴された対象についてのqPCRによる他の組織中のPSMA-TGF RDN細胞標識を示す概要である (N = 6)。

【0681】

(表10) 点滴された対象についてのqPCRによる他の組織中のPSMA-TGF RDN細胞標識 (データはコピー数/ゲノムDNAマイクログラムで提供される)

10

20

30

40

50

対象ID	コホート	時点	試料の種類	結果
32816-02	1	10日目	腫瘍（1A FFPE組織カール）	122.32
			腫瘍（2A FFPE組織カール）	57.99
		21日目	他（BMBMXコア細胞）	ND
			他（骨髄）	27.12
		2ヶ月目	他（BMBMXコア細胞）	ND
32816-04	1	10日目	腫瘍（HS17-37343-1A右腸骨）	133.36
			腫瘍（HS17-37343-1B右腸骨）	211.16
32816-05	1	10日目	腫瘍（後腹膜リンパ節）	758.51
32816-06	2	10日目	腫瘍BXカール	98.24
32816-07	2	10日目	腫瘍BXカール	ND
32816-08	2	この時点での他の組織データなし		

FFPE = ホルマリン固定し、パラフィン包埋した

BMBMX = 骨髄生検

BX = 生検

ND = 未検出

【0682】

表11は、免疫組織化学によって判定した場合の登録した対象についてのPSMA陽性腫瘍細胞のパーセントを示す概要である（N=7）。

【0683】

（表11）登録した対象についてのPSMA陽性腫瘍細胞のパーセント

	対象ID	コホート	時点	試料の種類	場所	結果(%)
1	32816-02	1	スクリーニング	新鮮	右腸骨	ND, 生検材料 不適切
			スクリーニング	新鮮	膀胱	100
			10日目	新鮮	膀胱	100
2	32816-03	NA	スクリーニング	新鮮	右外腸骨リンパ節	100
3	32816-04	1	スクリーニング	アーカイブ	腸骨	30
			10日目	新鮮	左腸骨	75
4	32816-05	1	スクリーニング	新鮮	左後腹膜リンパ節	100
			10日目	新鮮	左後腹膜リンパ節	100
5	32816-06	2	スクリーニング	新鮮	大動脈傍リンパ節	25
			10日目	新鮮	大動脈傍リンパ節	100
6	32816-07	2	スクリーニング	新鮮	脊椎後部	100
			10日目	新鮮	L1 椎骨	80
7	32816-08	2	スクリーニング	新鮮	膀胱	100
			10日目	新鮮	原発	70-80

NA = 未特定

ND = 未検出

【0684】

実施例11：転移性去勢抵抗性前立腺がんにおけるPSMA指向 / TGF 非感受性CAR-T細胞の第1相臨床試験

背景：

CAR-T細胞による養子免疫療法は、がん処置への応用可能性を有する。前立腺がんにおけるこれらの療法の成功への第一の課題は、腫瘍浸潤時に再指向されるT細胞が遭遇する、高レベルのTGF を含めた免疫抑制性微小環境である。重要なことに、TGF のこれらの免疫抑制機能は、ドミナントネガティブなTGF 受容体 (TGF Rdn) を使用してT細胞において阻害され、それによって抗腫瘍免疫が増強され得る。インビボ播種性腫瘍モデルでは、PSMA指向CAR-T細胞上でのTGF Rdnの共発現は、増加したT細胞増殖、増強されたサイトカイン分泌、長期持続性、およびより大きな腫瘍根絶誘導をもたらした。適応的な腫瘍抵抗性の機序は知られていない。

【0685】

図15は、インビボ播種性腫瘍モデルにおけるCART-PSMA-TGF Rdn細胞の有効性を示す。図15Aは、CART-PSMA-TGF Rdn細胞が、42日間の共培養およびPSMA発現腫瘍細胞による反復刺激に対してCART-PSMAと比べて増強された抗原特異的増殖を実証したことを示すグラフである。図15Bは、BLI画像検査によって毎週測定して腫瘍負荷量を評価した場合に、インビボのCART-PSMA-TGF Rdn細胞が、CART-PSMAと比較して有意に増加した腫瘍減少を実証したことを示すグラフである。図15Cは、毎週のBLI評価による腫瘍の部位負荷量および全身負荷量を示す写真である。図15において使用する略称：Pbbz = CAR-T PSMA ; dnTGFBR2-T2A-Pbbz = CART-PSMA-TGF Rdn ; 19bbz = 抗CD 19 CAR。

【0686】

治験デザイン：

治験概説：ファースト・イン・ヒューマン第1相臨床試験を開始して、処置難治性の転移性去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) (NCT03089203) を有するヒトにおける、レンチウイルスを形質導入されたPSMA指向 / TGF 非感受性CAR-T細胞 (CART-PSMA-TGF Rdn) の安全性および予備有効性を評価した。予備用量拡大コホートでは、患者は、リンパ球枯渇化学療法なしの単回用量のCART-PSMA-TGF Rdn細胞 $1 \sim 3 \times 10^7 / m^2$ (コホート1) または $1 \sim 3 \times 10^8 / m^2$ (コホート2) を3+3デザインで受けた。コホート3では、患者は、シクロホスファミド $300 mg / m^2$ およびフルダラビン $30 mg / m^2$ による3日間のリンパ球枯渇化学療法後に、最大耐量 (MTD) のCART-PSMA-TGF Rdn細胞を受ける。処置された患者はすべて、ベースライン時ならびにCAR-T細胞点滴後の+10日目に転移性腫瘍生検を受けた。

【0687】

主要適格基準：少なくとも1つの第二世代アンドロゲンシグナル伝達阻害剤 (アピラテロンまたはエンザルタミド) による前処置を受けた転移性CRPC ; 転移性組織生検でのIHCによりPSMAを発現する腫瘍細胞が10%以上 ; 転移性疾患 (骨またはリンパ節 / 内臓) の証拠となるX線像 ; 転移性CRPCに対する4種以下の治療ライン。

【0688】

治験スキーム：図16は、この臨床試験において使用する治験スキームを示す。

【0689】

相関分析：CART-PSMA-TGF Rdn DNAの定量PCRを連続した時点で実施して、末梢血におけるCAR-Tの増大および持続性ならびに標的組織への輸送を評価した。末梢血におけるCART-PSMA-TGF Rdn細胞の生物活性を、免疫学的因子および炎症性因子のLuminex分析を通して評価した。循環腫瘍材料を連続した時点で収集し、臨床応答と相関させた。

【0690】

10

20

30

40

50

治験状況および予備調査結果：6人の患者は、CART-PSMA-TGF Rdn細胞点滴を指定の用量レベルで受けた（コホート1、N=3；コホート2、N=3）。すべてのCART-PSMA-TGF Rdn点滴産物は、標的の形質導入効率を満たした。予備用量拡大において用量制限毒性は観察されなかった。

【0691】

CART-PSMA-TGF Rdn DNAのqPCRを介したCAR-T細胞動態の評価は、末梢血T細胞増大（図17）、ならびに処置後腫瘍生検において腫瘍組織輸送（表17）を実証した。

【0692】

（表17）CART-PSMA-TGF RDN細胞輸送：点滴された対象における組織生検試料中のqPCR検出

対象ID	コホート	時点	試料の種類	結果*
32816-02	1	10日目	膀胱（FFPE組織カール）	122.32
			膀胱（FFPE組織カール）	57.99
		21日目	骨髓生検コア	ND
			骨髓	27.12
		2ヶ月目	骨髓生検コア	ND
32816-04	1	10日目	骨（FFPE組織カール）	133.36
			骨（FFPE組織カール）	211.16
32816-05	1	10日目	リンパ節（FFPE組織）	758.51
32816-06	2	10日目	リンパ節（FFPE組織）	98.24
32816-07	2	10日目	骨（FFPE組織カール）	ND
32816-08	2	データ解析結果待ち		

*コピー数 / ug gDNA

FFPE = ホルマリン固定し、パラフィン包埋した

ND = 未検出

【0693】

コホート2では、2人の患者が予期されたグレード3のサイトカイン放出症候群（CRS）（CAR-T療法による生物学的活性の重要なマーカーである）を発症し、1人の患者が副腎皮質ステロイドを必要とするグレード3のCAR-T神経毒性を発症した。

【0694】

炎症性サイトカイン（IL-6、IL-15、IL-2、IFNガンマ）およびフェリチンの顕著な増加がグレード3のCRS事象のすべてと相関していた（対象32816-06：図18A；対象32816-07：図18B）。CRS事象はすべてトシリズマブ（抗IL6R）救済で急速に改善した。

【0695】

コホート3の登録（リンパ球枯渇化学療法ありのMTD）を2018年9月に始めた。

【0696】

実施例12：コホート1および2の観察および症例研究

図19は、コホート1患者およびコホート2患者の間の前立腺特異抗原（PSA）応答のグラフを示す。

【0697】

対象32816-07：転移性去勢抵抗性前立腺がんを有する74歳（mCRPC；初期診断：20

14年5月)。PSMA-TGF RDN CART点滴(リンパ球枯渇なし)の数時間後に103Fまでの発熱が観察された。PSMA-TGF RDN CARTのおよそ6時間後に最低値83/44mmHgの低血圧が観察された。低血圧は、晶質輸注(ICUに入っている間に薬理学的管理は必要ない)およびトシリズマブで管理し、PSMA-TGF RDN CART点滴の翌日までに改善した。
【0698】

患者32816-07においてPSMA-TGF RDN CART-点滴後にサイトカイン放出症候群(CRS)が観察された(図20A)。図20Aでは、左y軸は、末梢血におけるPSMA-TGF RDN CARTのレベル(コピー数/ゲノムDNA ug単位)を示し(32816-07)、右y軸は、IL-6のレベル(pg/ml単位)を示す(IL6)。CRSに、一時的なPSA減少が付随して起こった(図20B)。図20Bでは、左y軸は、C-反応性タンパク質(CRP)の血清レベル(mg/L単位)を示し、右y軸は、フェリチンの血清レベル(ng/L単位)を示す。

【0699】

コホート1および2におけるPSMA陽性CTCの観察：表18は、様々な時点にわたって各対象において検出されたPSMA陽性循環腫瘍細胞(CTC)の数の概要を示し、そのデータを図21にグラフで描く。

【0700】

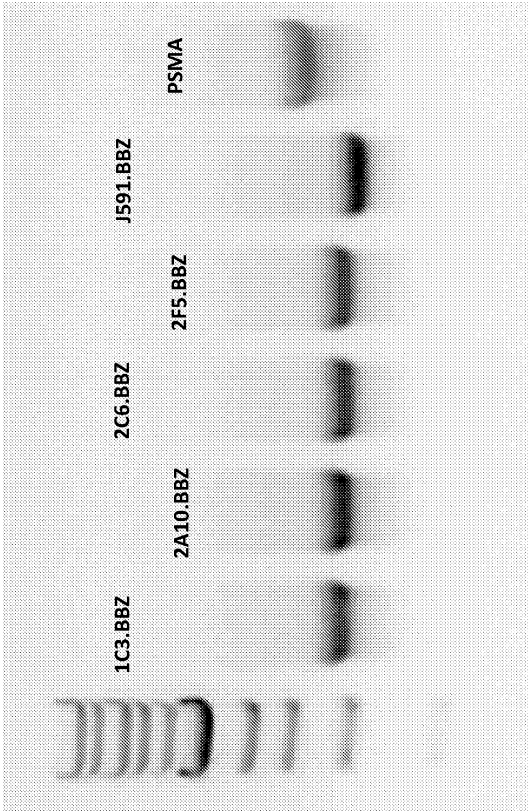
(表18) コホート1および2におけるPSMA陽性CTC

コホート	対象ID	8週目のスクリーニング		点滴後10日目		点滴後28日目		点滴後3ヶ月目	
		総CTC	# PSMA+ CTC (%)	総CTC	# PSMA+ CTC (%)	総CTC	# PSMA+ CTC (%)	総CTC	# PSMA+ CTC (%)
1	32816-02	248	144 (58.1%)	421	241 (57.2%)	230	117 (50.9%)	788	409 (51.9%)
	32816-03	3	3 (100.0%)	治験停止					
	32816-04	3	2 (66.7%)	0	0	15	11 (73.3%)	3	1 (33.3%)
	32816-05	1	0 (0.0%)	1	0 (0.0%)	0	0	3	3 (100.0%)
2	32816-06	12	12 (100.0%)	3	0	0	0	0	治験停止
	32816-07	13	--	3	2	0	0	0	0
	32816-08	3	--	結果待ち					

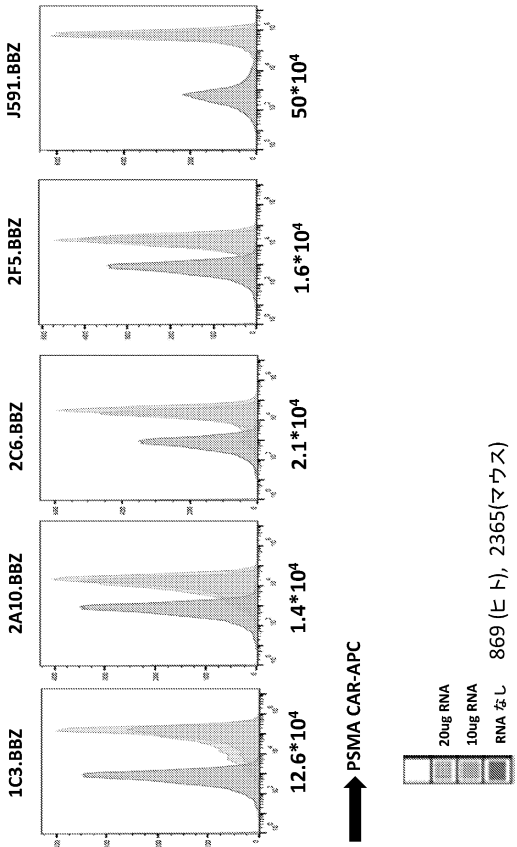
【0701】

本明細書において引用されるありとあらゆる特許、特許出願および刊行物の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本発明は、具体的な態様を参照して開示しているが、本発明の精神および範囲から逸脱することなしに当業者によって本発明の他の態様および変形が考案されてよいことが明らかである。添付の特許請求の範囲は、そのような態様および等価な変形のすべてを包含すると解釈されるものとする。

【図面】
【図 1 A】



【図 1 B】



10

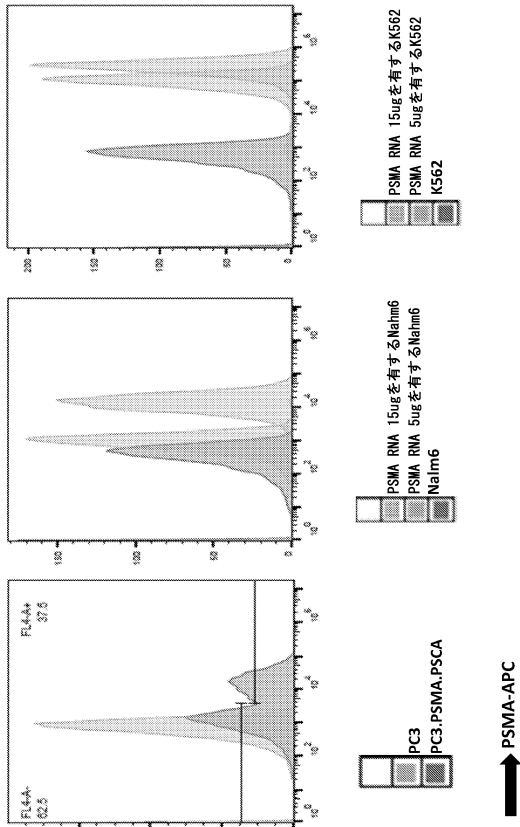
20

30

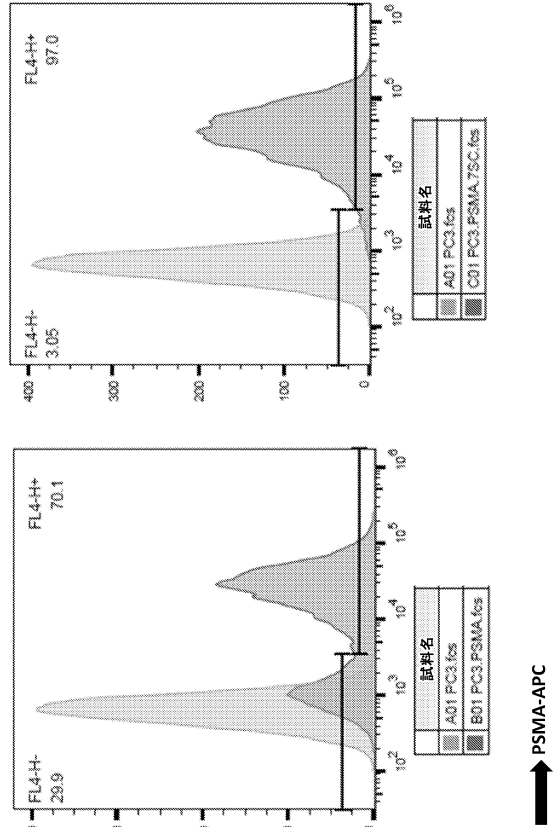
40

50

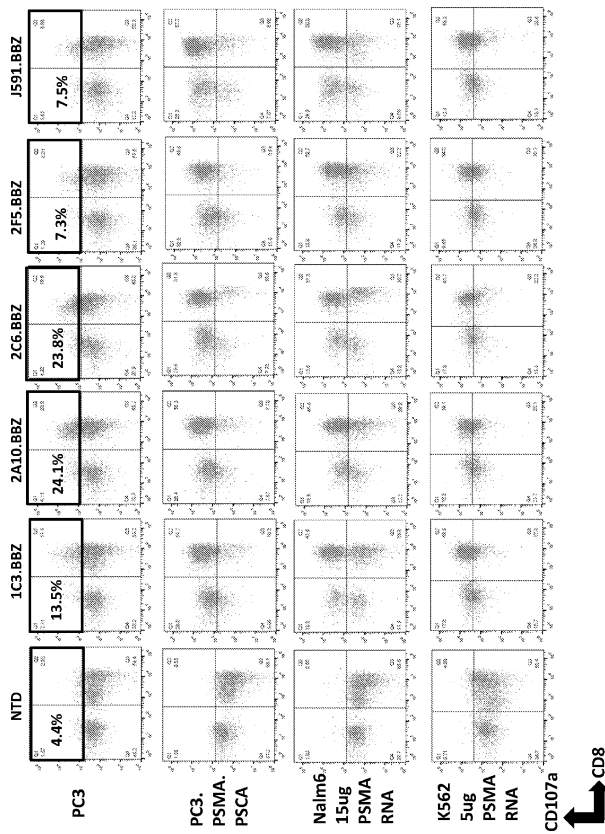
【図 1 C】



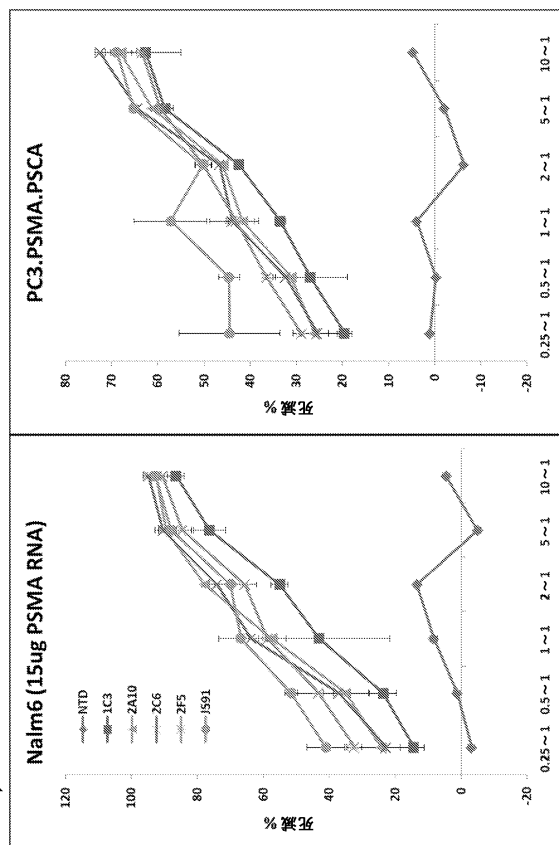
【図 1 D】



【図 2 A】



【図 2 B】



10

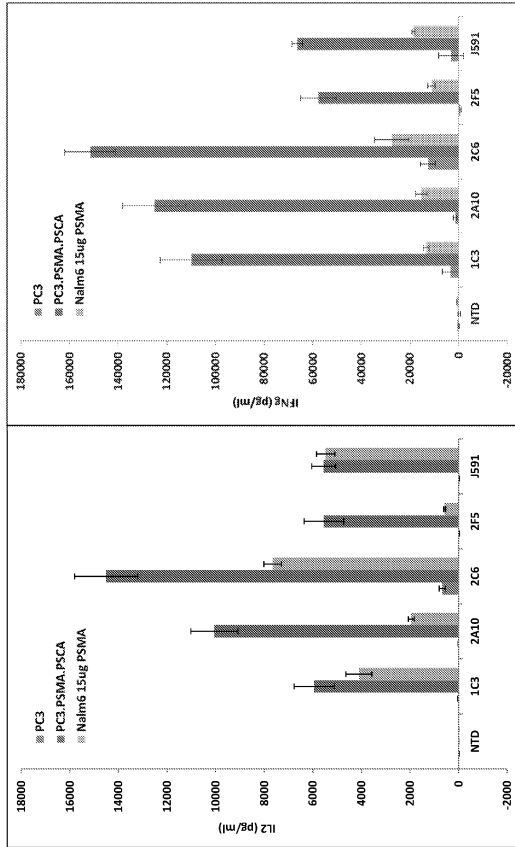
20

30

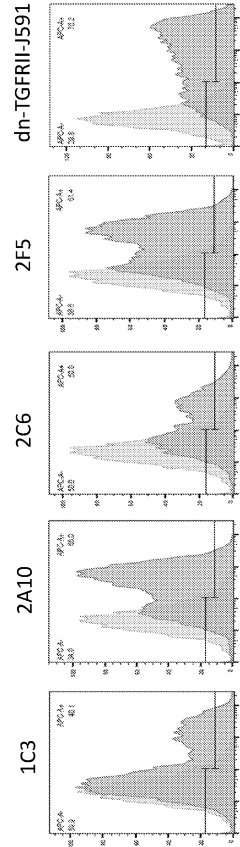
40

50

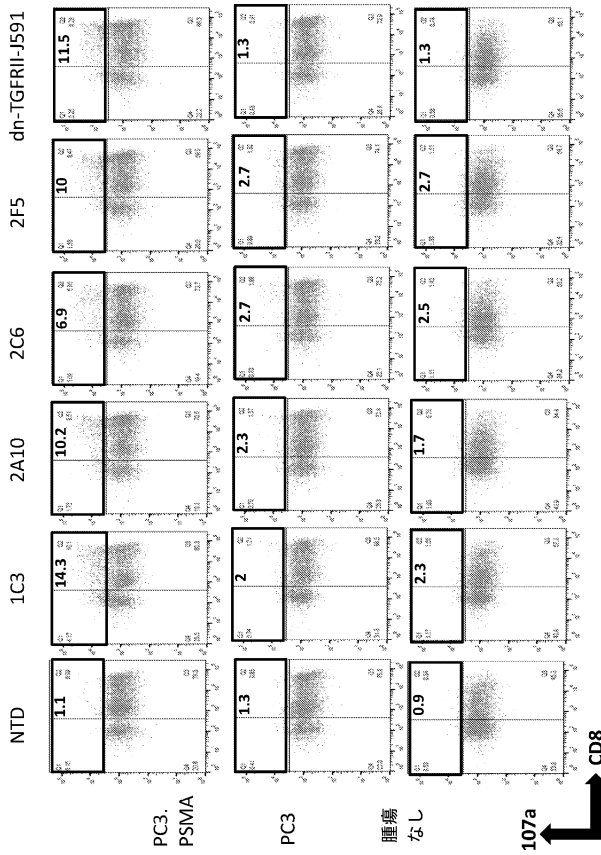
【図 2 C】



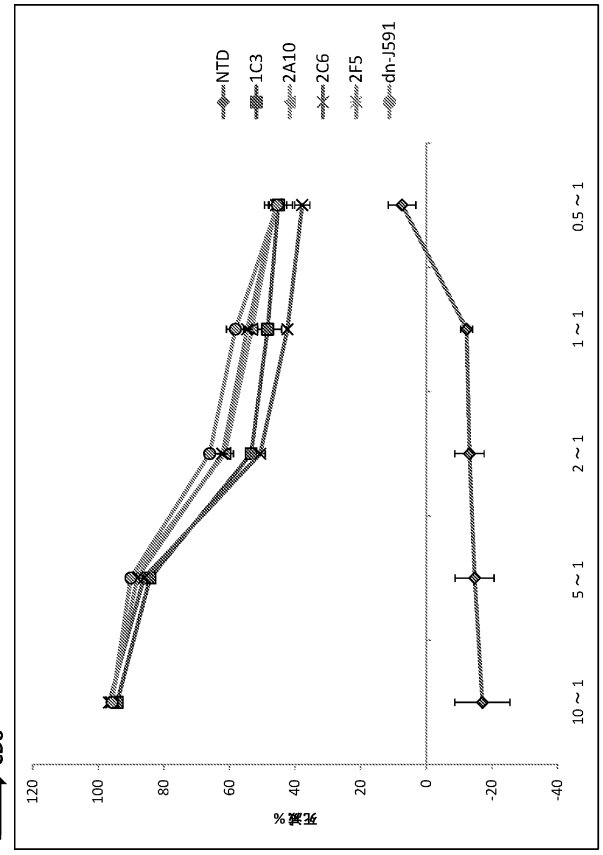
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 3 C】



10

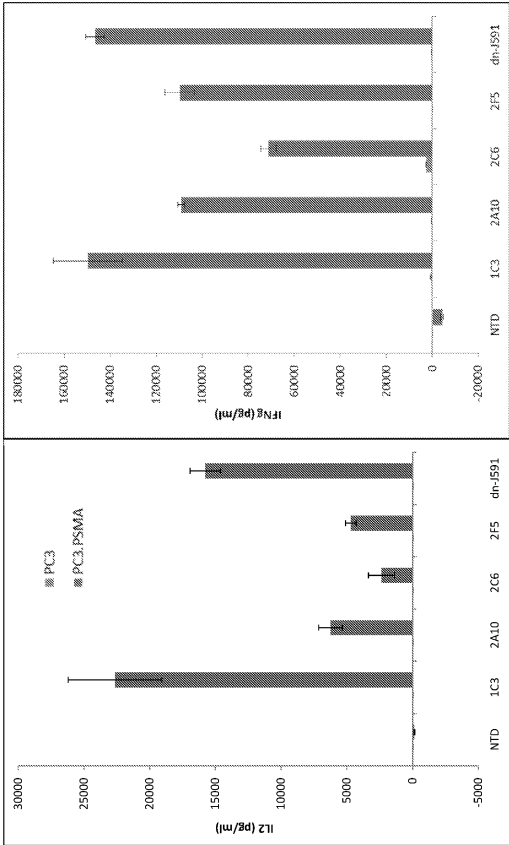
20

30

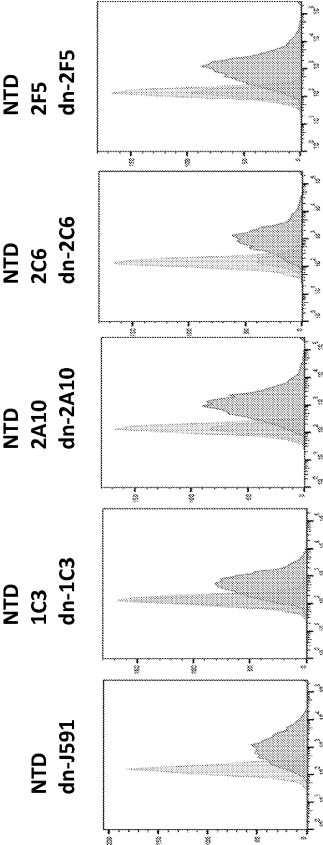
40

50

【図 3 D】

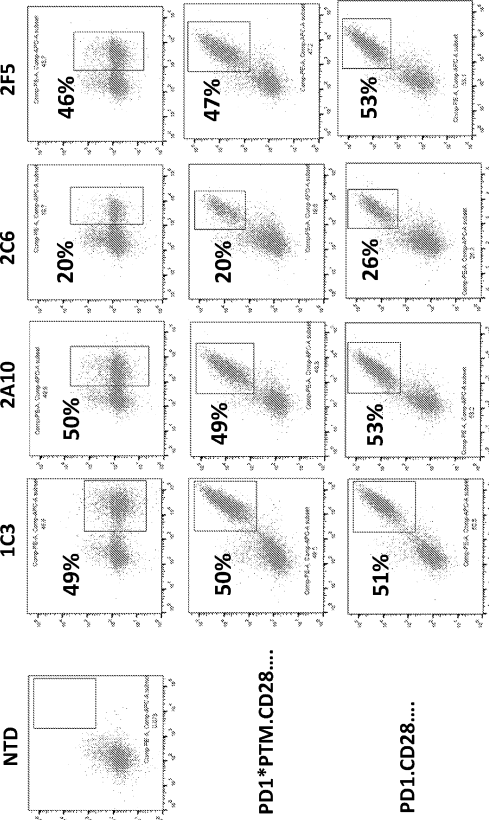


【図 4 B】



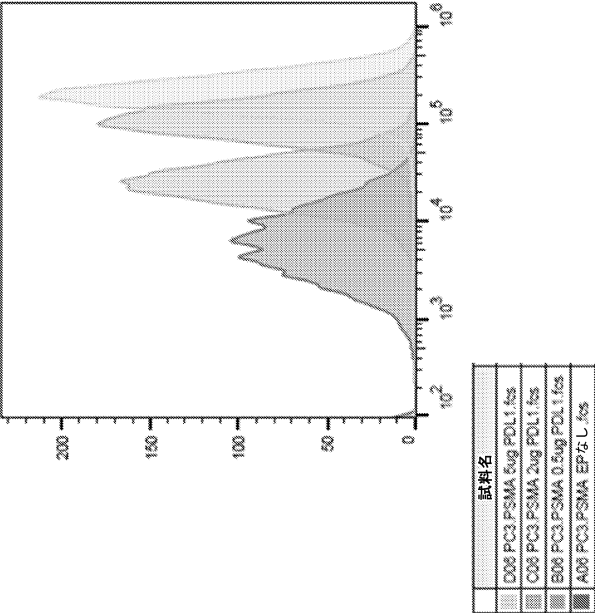
TGF β II

【図 4 A】



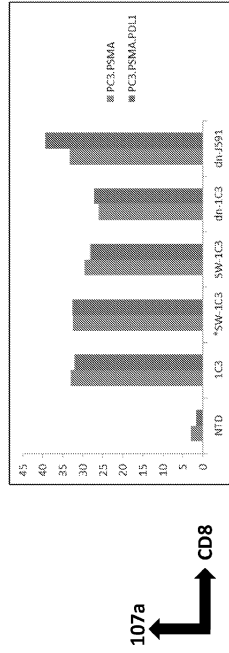
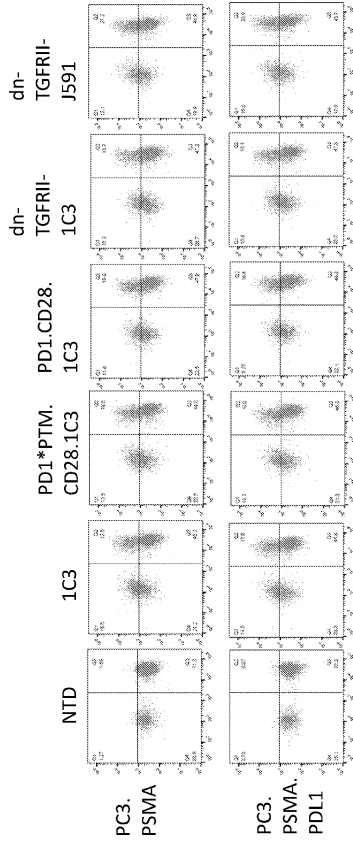
PD1-APC
PD1*PTM.CD28...
PD1.CD28...

【図 4 C】

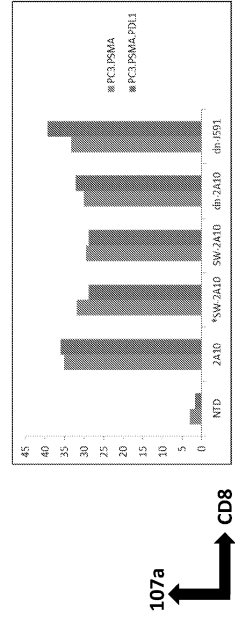
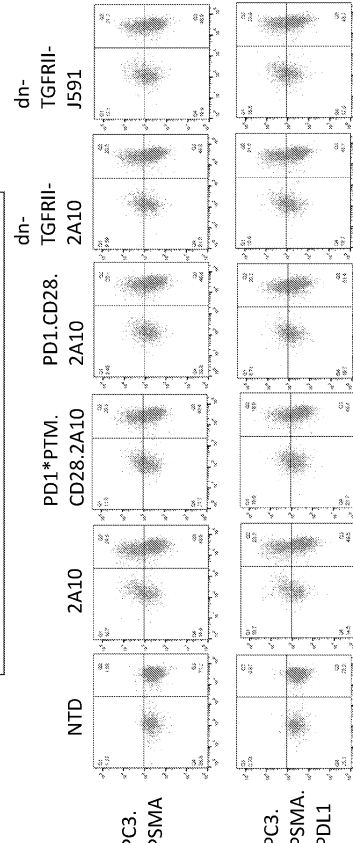


試料名
D06 PC3.PSMA 5ug PDL1.fcs
C06 PC3.PSMA 2ug PDL1.fcs
B06 PC3.PSMA 0.5ug PDL1.fcs
A06 PC3.PSMA EP2.L.fcs

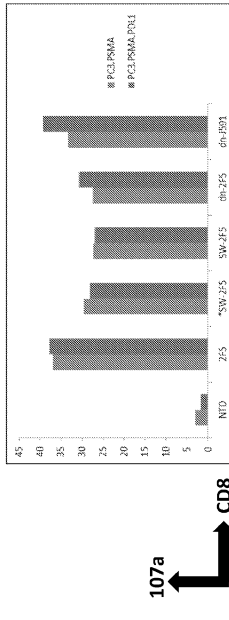
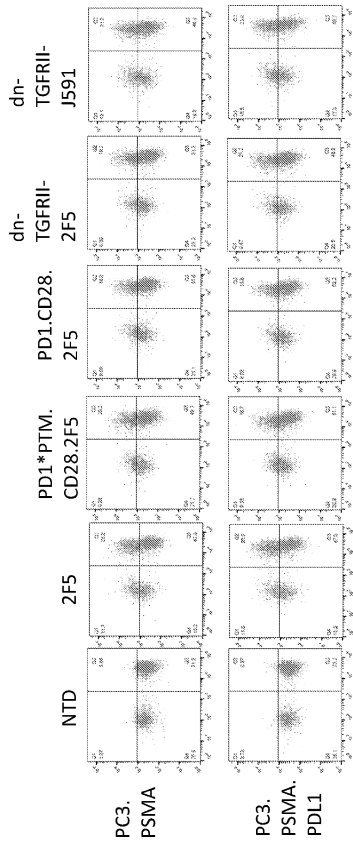
【図 4 D】



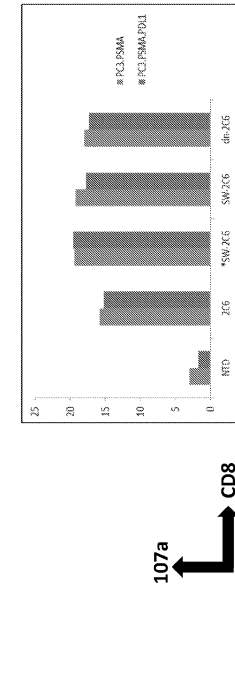
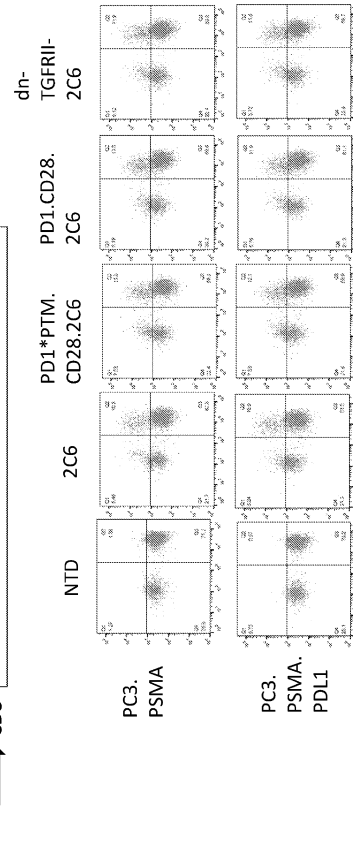
【図 4 E】



【図 4 F】



【図 4 G】



10

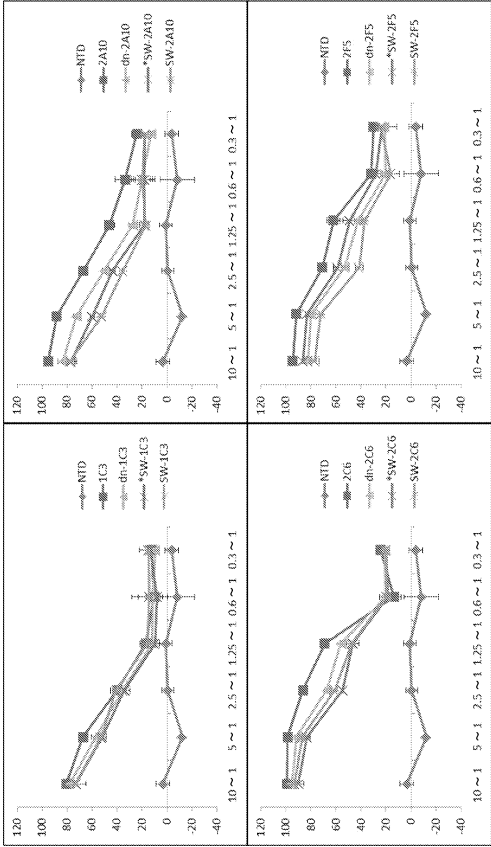
20

30

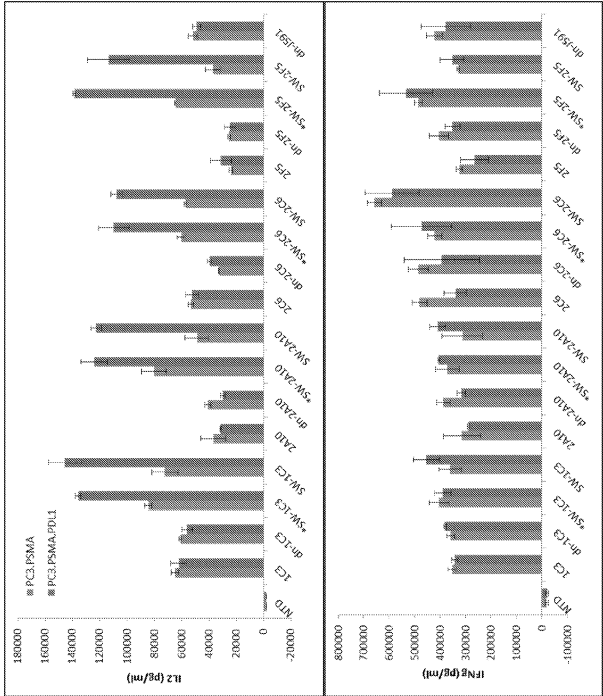
40

50

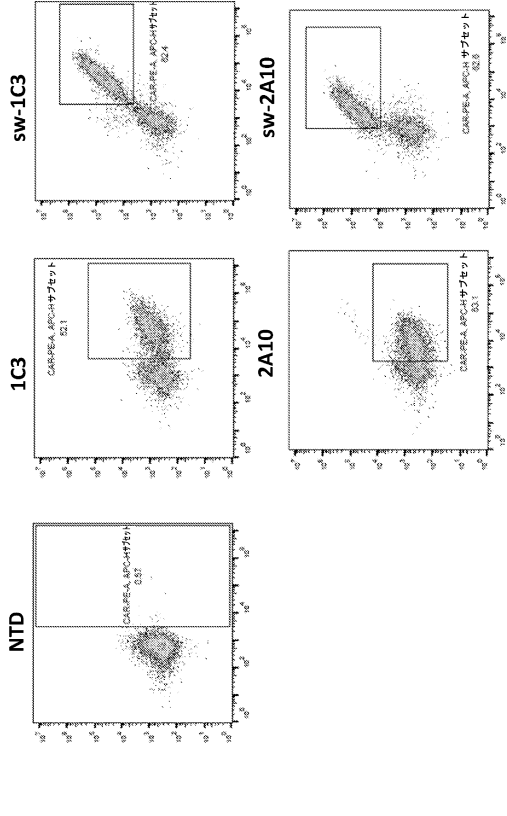
【図 4 H】



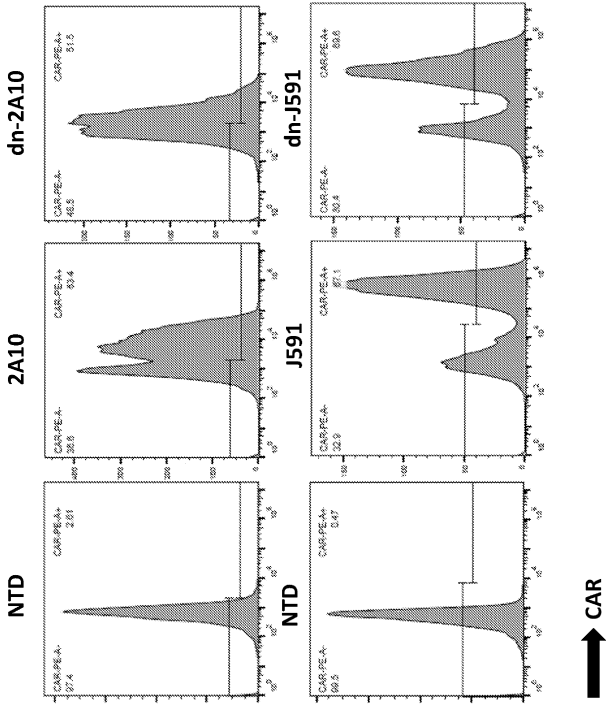
【図 4 I】



【図 5 A】



【図 5 B】



10

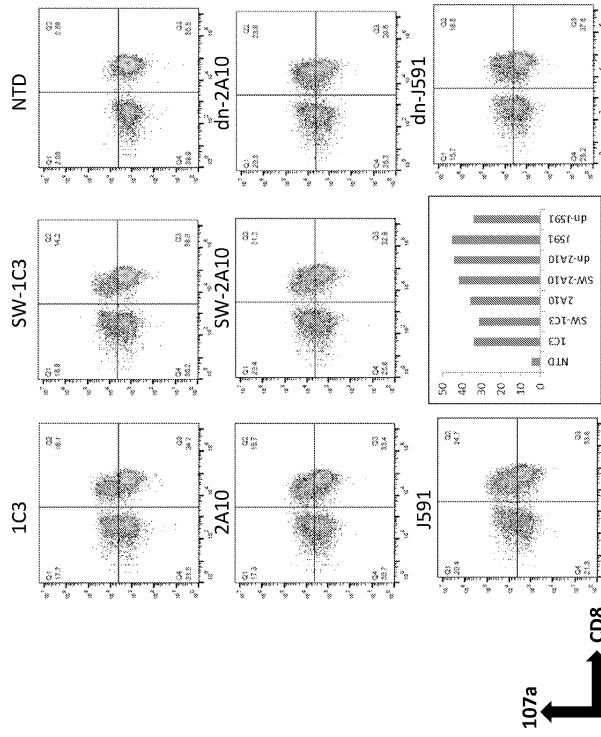
20

30

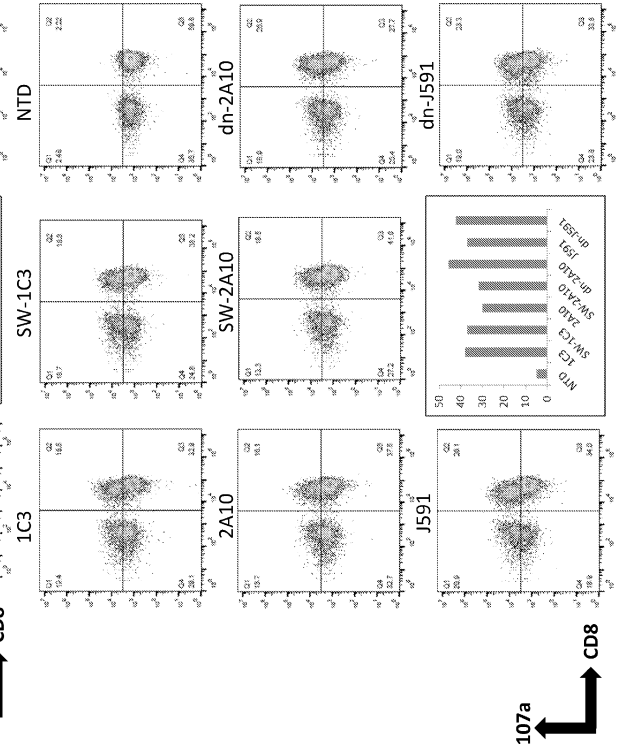
40

50

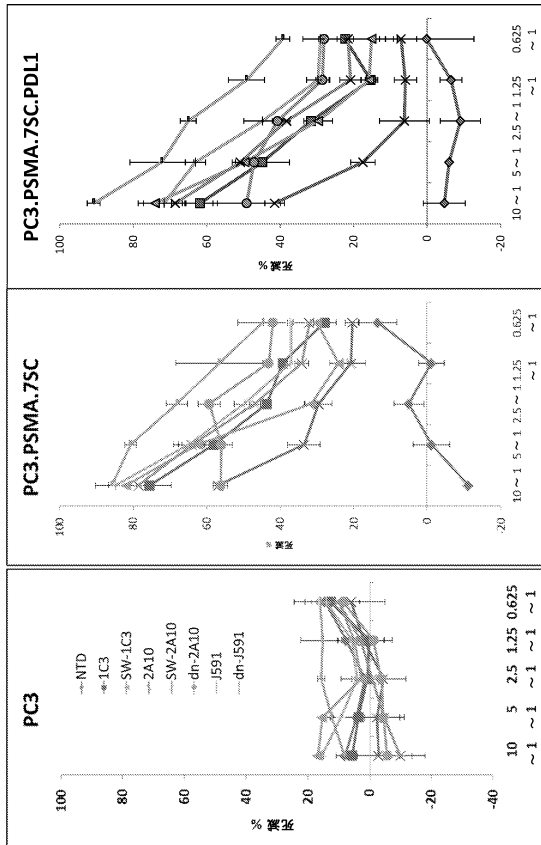
【図 5 C】



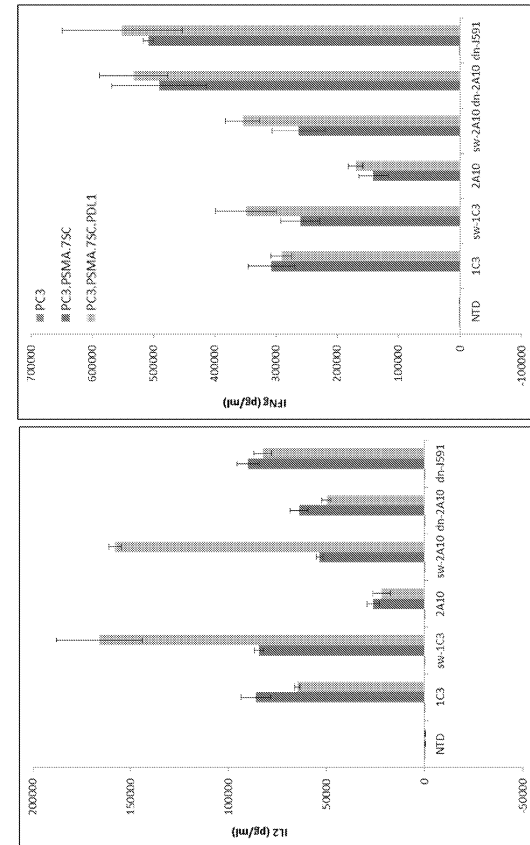
【図 5 D】



【図 5 E】



【図 5 F】



10

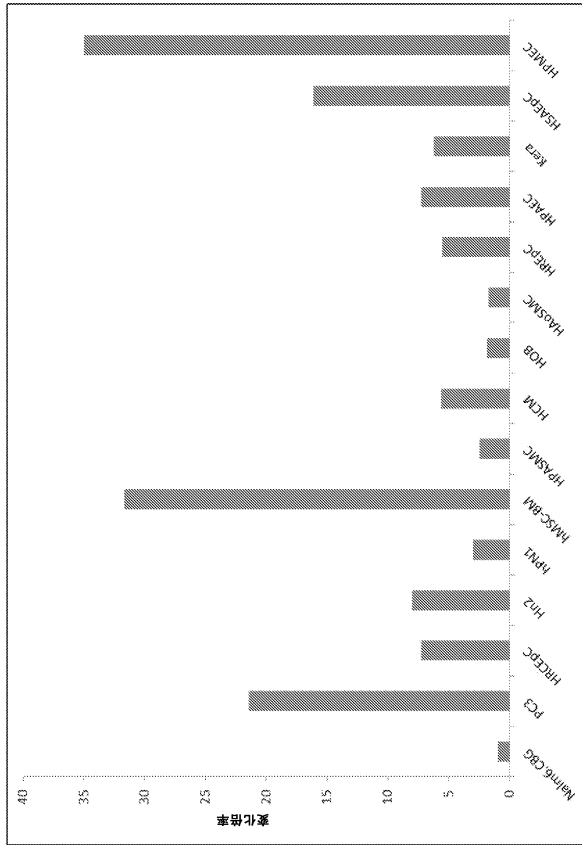
20

30

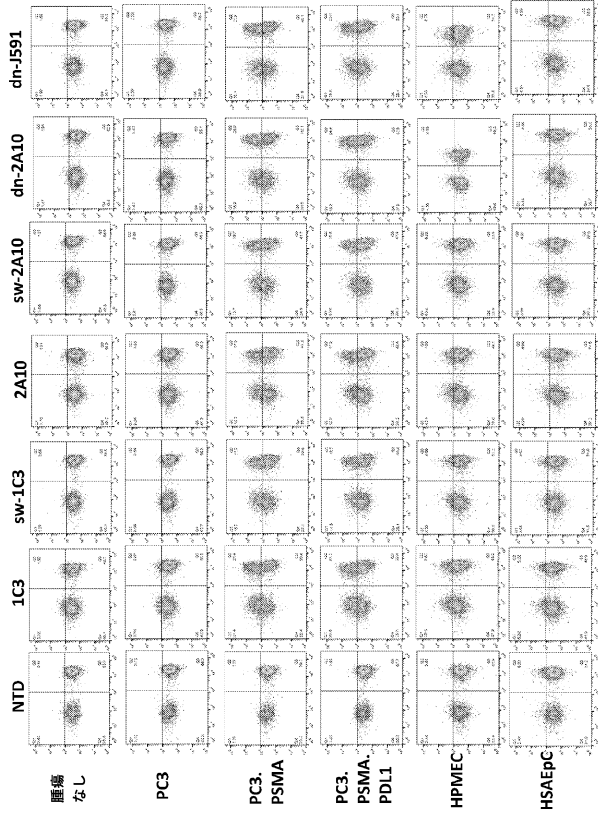
40

50

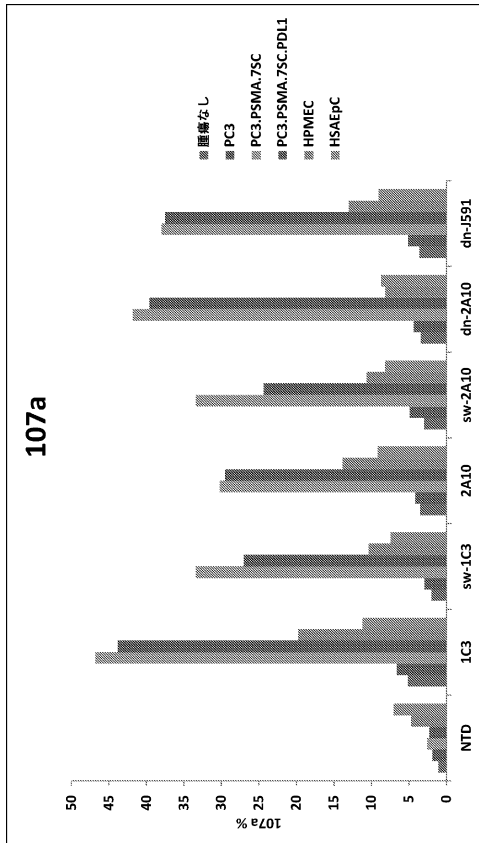
【図 5 G】



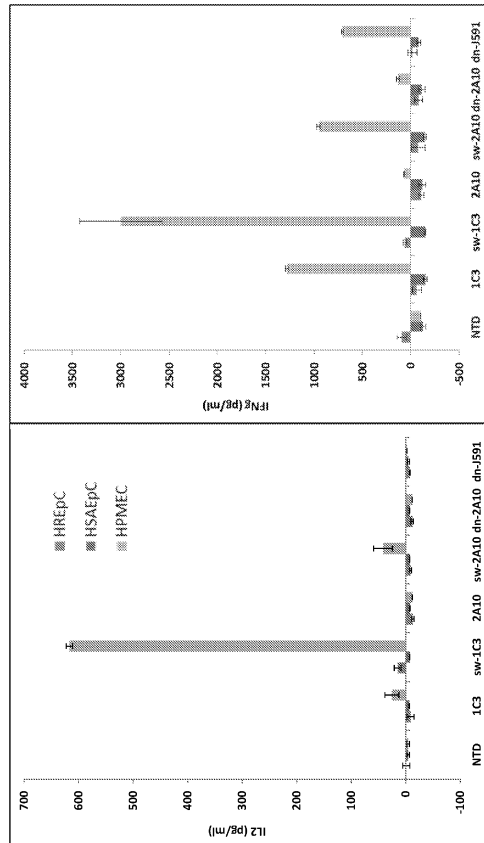
【図 5 H】



【図 5 I】



【図 5 J】



10

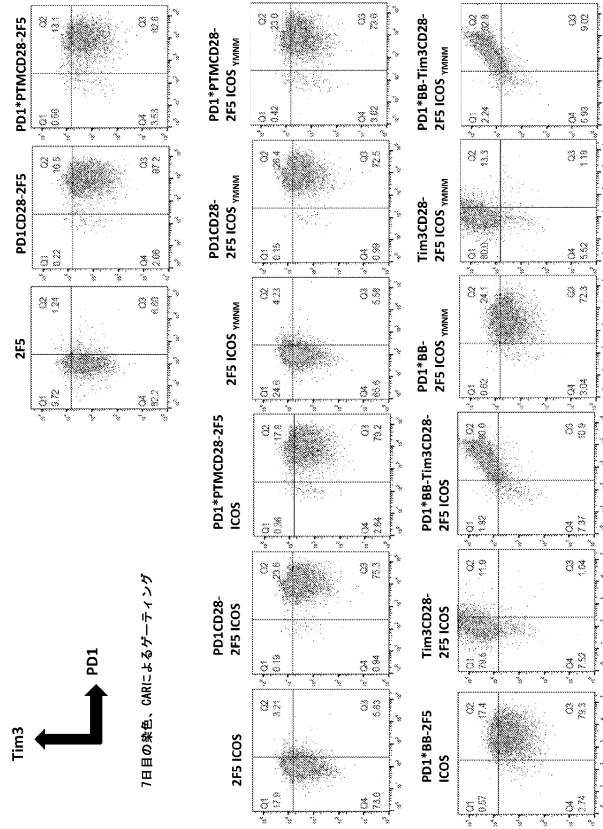
20

30

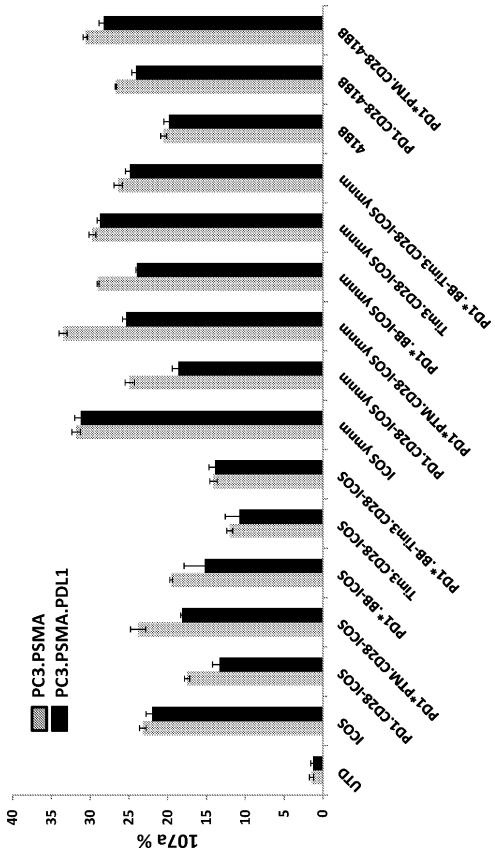
40

50

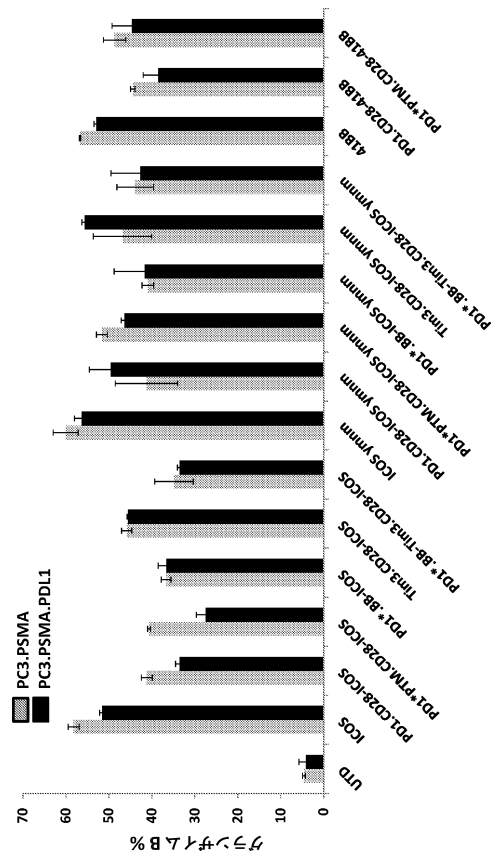
【 図 8 】



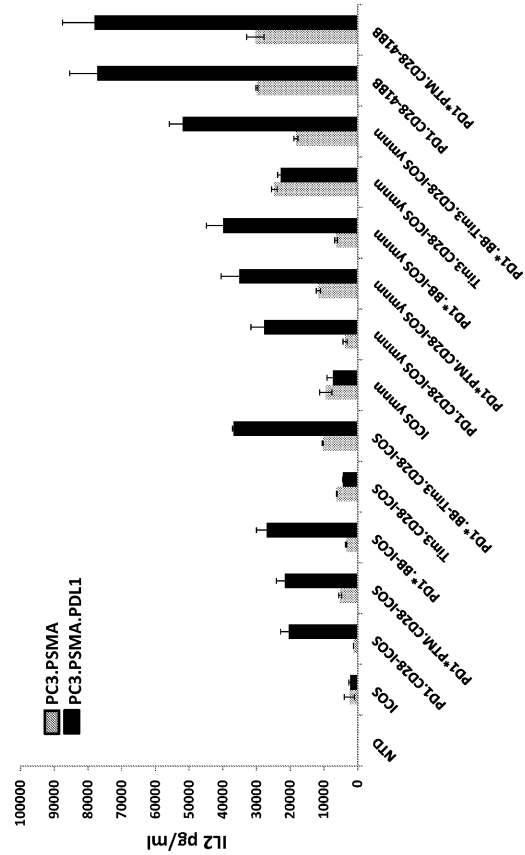
【 図 9 】



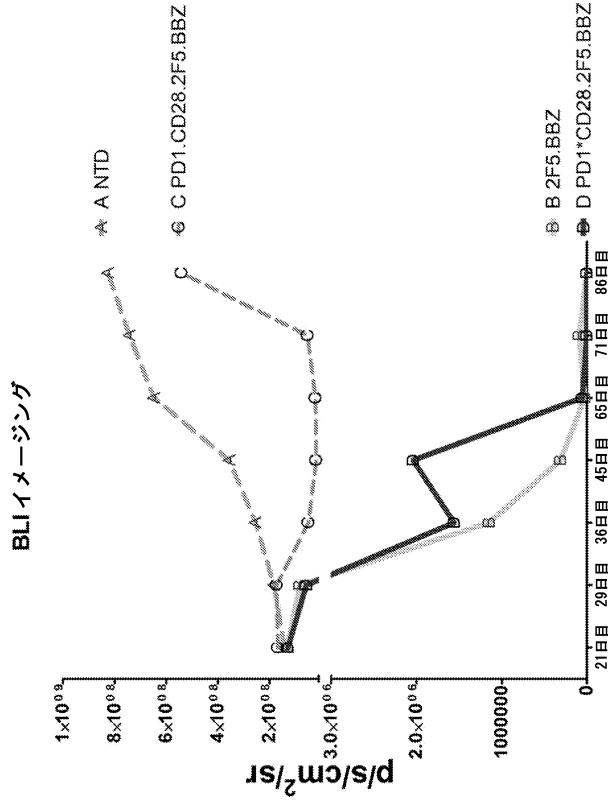
【 図 1 0 】



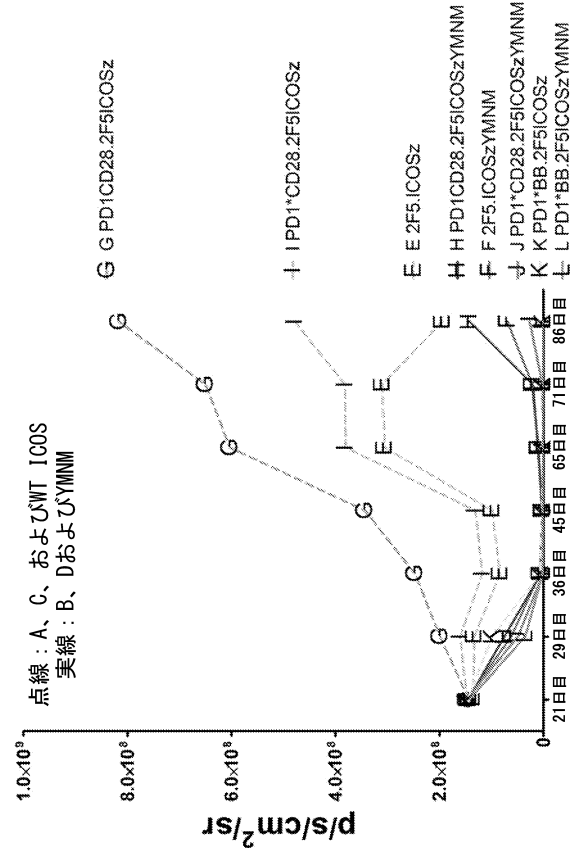
【図 1 1 A】



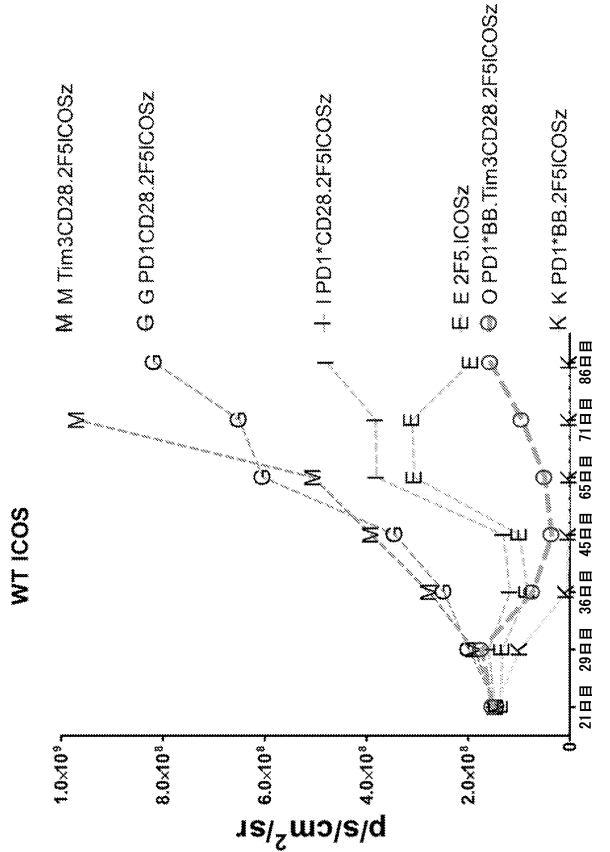
【図 14 A】



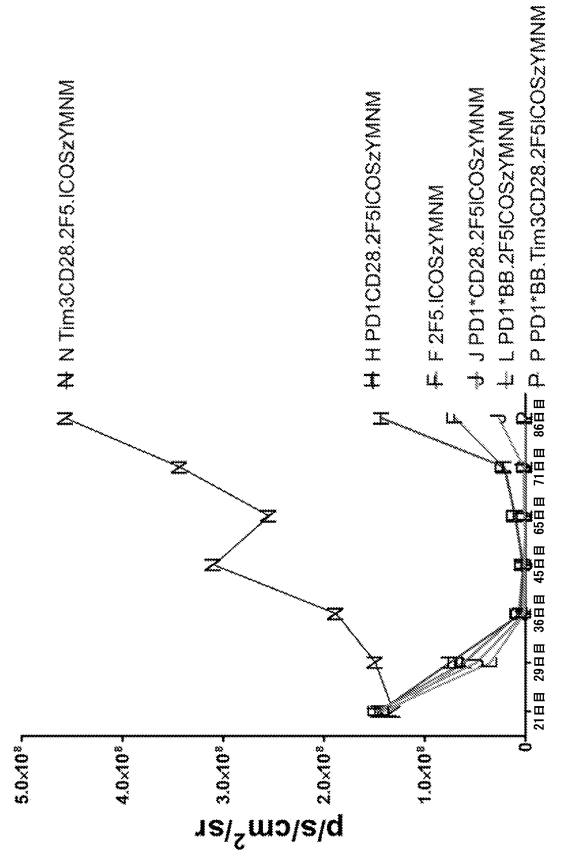
【図 14 B】



【図 14 C】



【図 14 D】



10

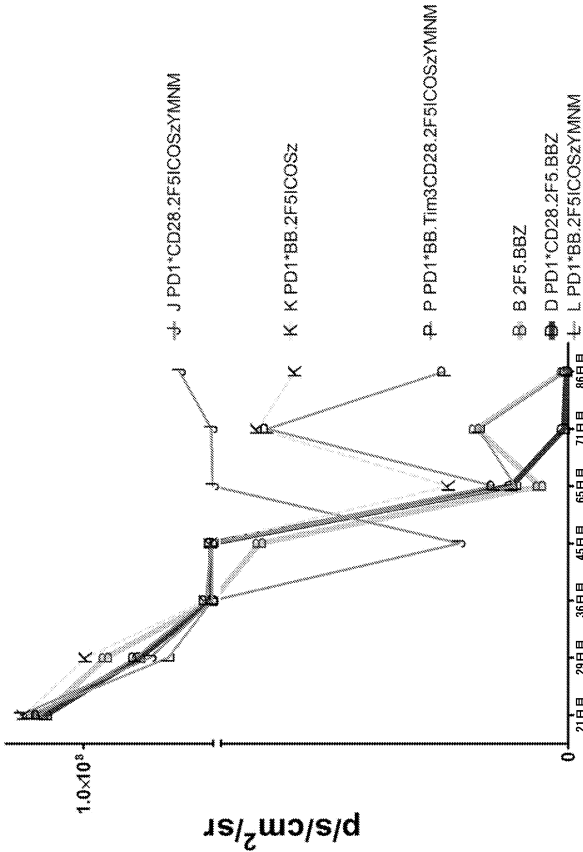
20

30

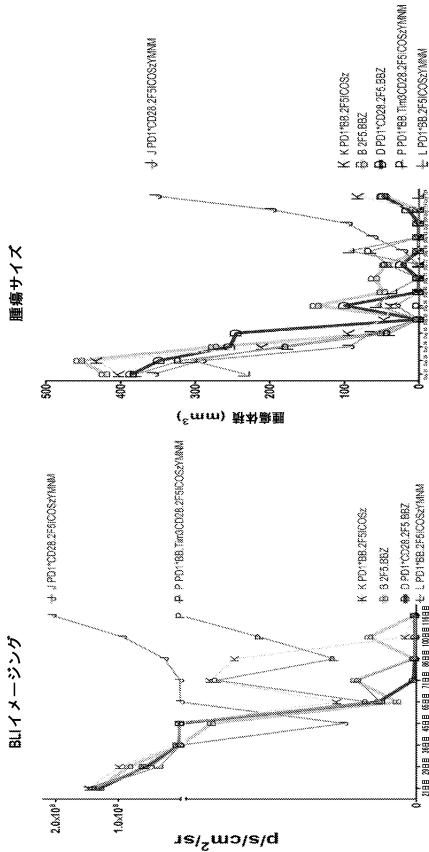
40

50

【図 1 4 E】



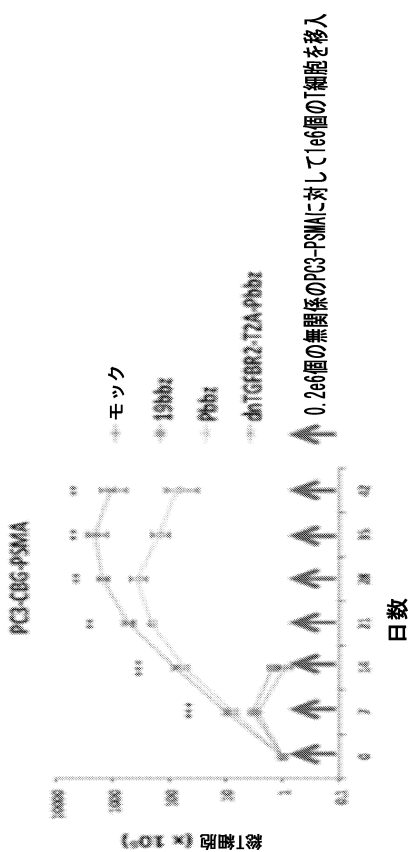
【図 1 4 F】



【図 1 4 G】

D	PD1*CD28.2F5.BBZ
B	2F5.BBZ
L	PD1*BB.2F5ICOSzYMNM
P	PD1*BB.Tim3CD28.2F5ICOSzYMNM
K	PD1*BB.2F5ICOSz
J	PD1*CD28.2F5ICOSzYMNM
F	2F5.ICOSzYMNM
H	PD1CD28.2F5ICOSzYMNM
O	PD1*BB.Tim3CD28.2F5ICOSz
E	2F5.ICOSz
N	Tim3CD28.2F5.ICOSzYMNM
I	PD1*CD28.2F5ICOSz
C	PD1.CD28.2F5.BBZ
G	PD1CD28.2F5ICOSz
A	NTD
M	Tim3CD28.2F5ICOSz

【図 1 5 A】



10

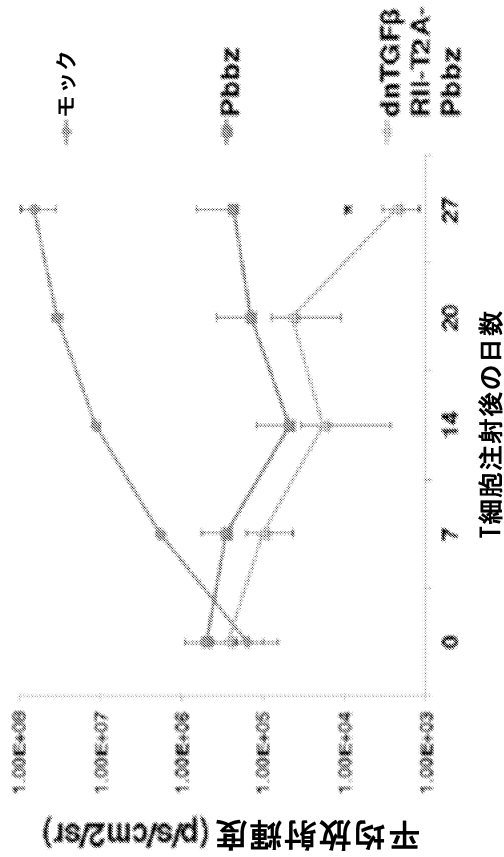
20

30

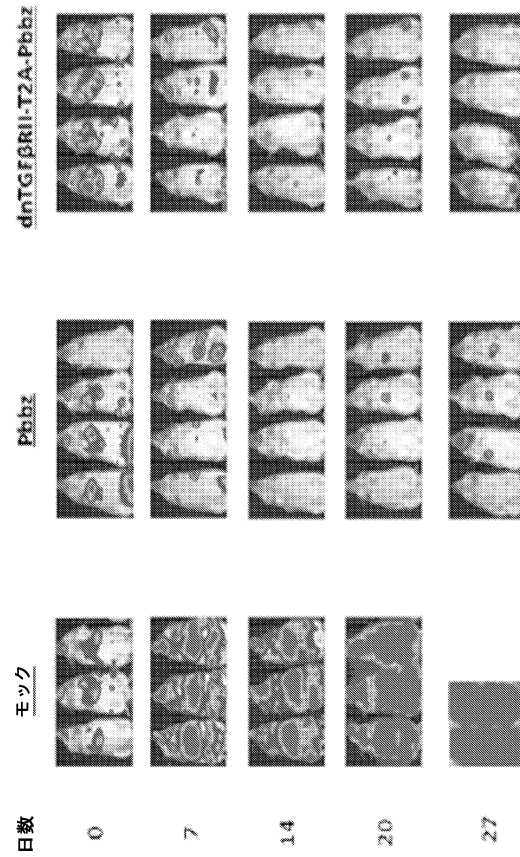
40

50

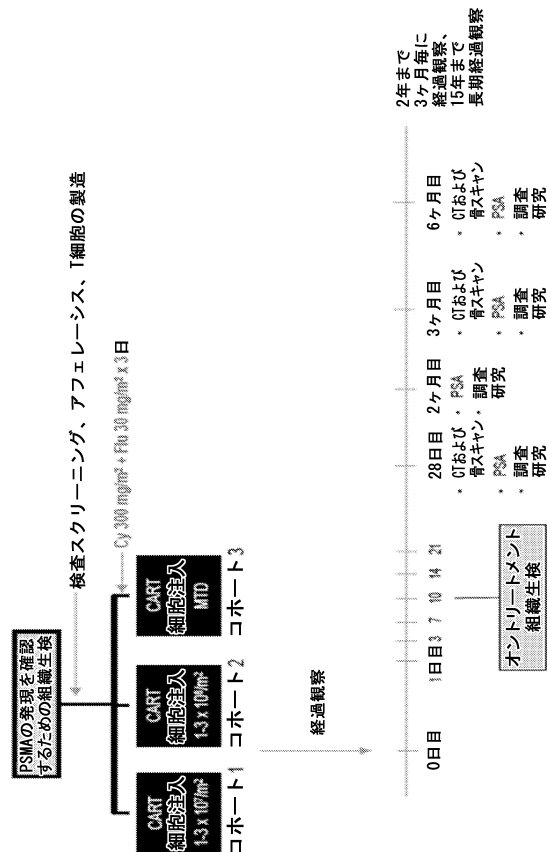
【 図 1 5 B 】



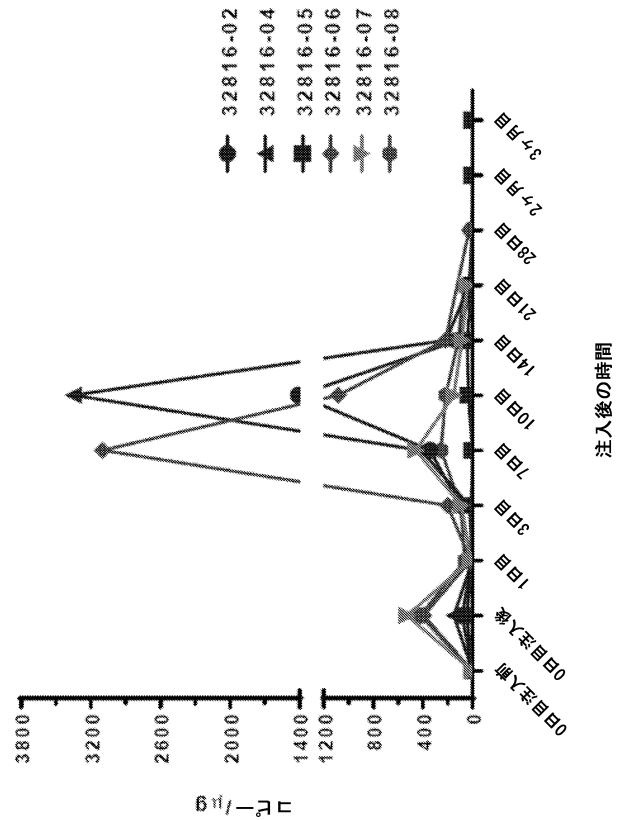
【 図 1 5 C 】



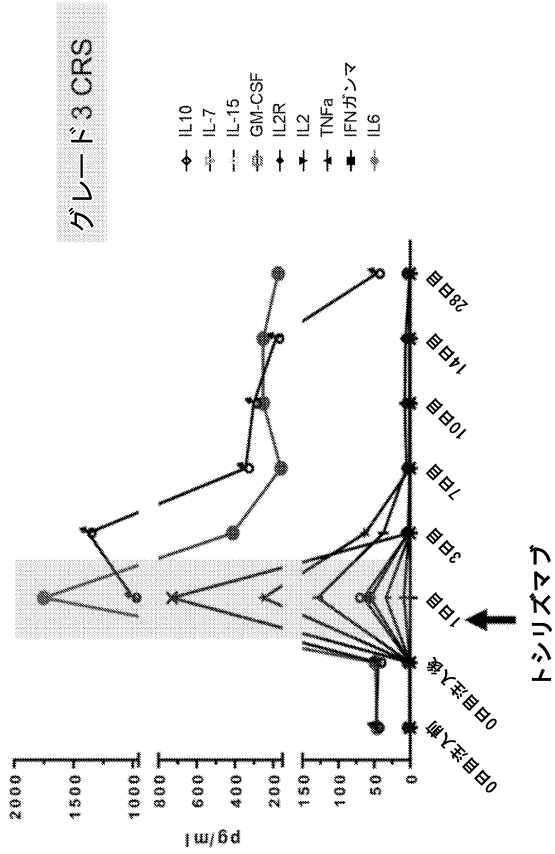
【 図 1 6 】



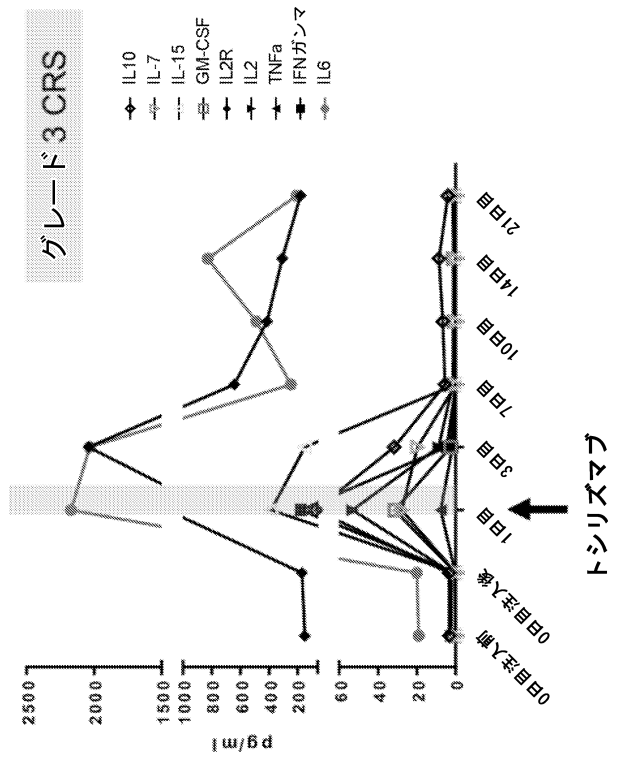
【圖 17】



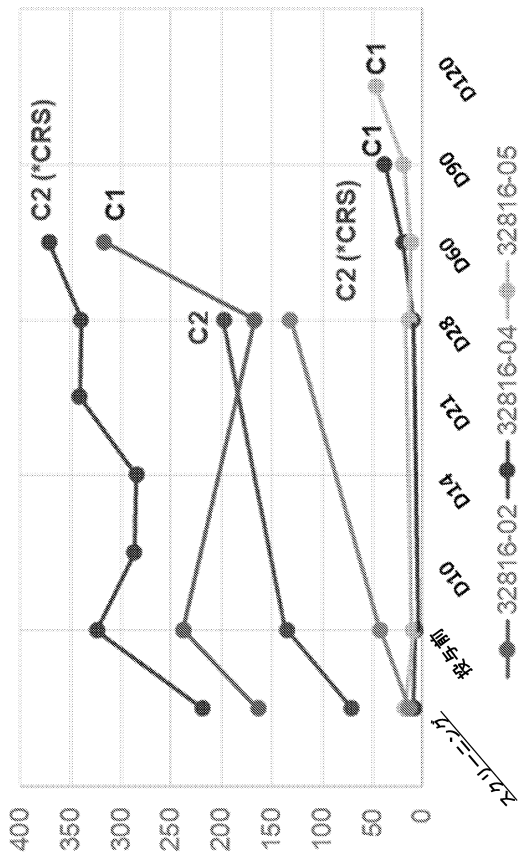
【図 18 A】



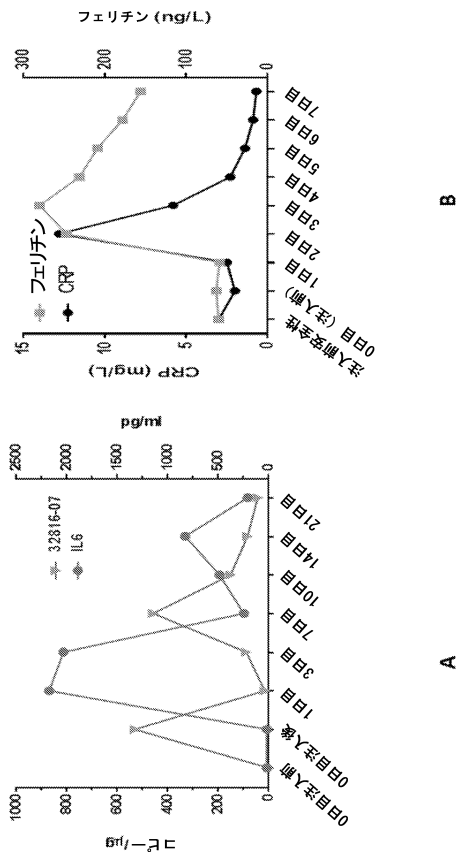
【図 18 B】



【図 19】



【図 20】



10

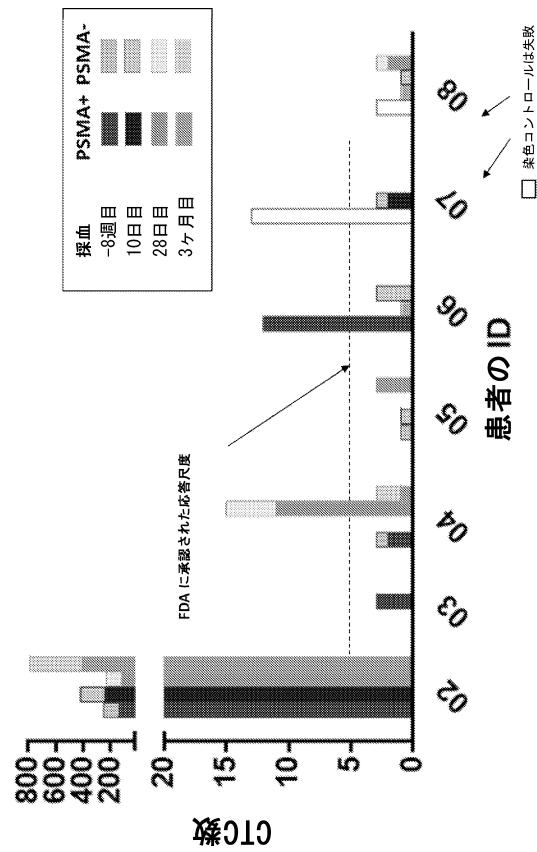
20

30

40

50

【図 21】



【配列表】

0007526097000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/7076(2006.01)	A 6 1 K	31/7076	
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャオ ヤンピン

アメリカ合衆国 0 8 0 4 8 ニュージャージー州 ランバートン グラディオラ レーン 6

(72)発明者 リン スー ファ シャロン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 0 マサチューセッツ州 ボストン サウス ハンティントン アベニュー
7 8 アpartment 4

(72)発明者 リュウ シャオジュン

アメリカ合衆国 1 9 0 8 6 ペンシルベニア州 ウォーリングフォード クリークサイド ロード
6 0 5

(72)発明者 チュー アン

アメリカ合衆国 0 8 0 0 3 ニュージャージー州 チェリー ヒル アウル レーン 1 0 0 4

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 0 4 0 9 4 5 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 2 2 5 0 (W O , A 1)

特表 2 0 0 8 - 5 3 0 2 4 3 (J P , A)

特表 2 0 1 7 - 5 1 8 0 5 3 (J P , A)

特表 2 0 1 6 - 5 2 0 3 0 2 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 6 / 2 0 3 0 4 8 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 2 2 7 3 8 (W O , A 1)

C. Kloss, et al. , Molecular Therapy , 2016年 , Vol.24, Supplement 1 , S252-S253

E.Lazar-Molnar et al. , EBioMedicine , 2017年 , Vol.17 , p.30-44

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

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

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q