

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第6991131号**  
**(P6991131)**

(45)発行日 令和4年2月3日(2022.2.3)

(24)登録日 令和3年12月9日(2021.12.9)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/62 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/62	Z
A 6 1 K	35/17 (2015.01)		A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 K	45/00 (2006.01)		A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	31/18 (2006.01)		A 6 1 P	31/18	
C 0 7 K	14/705 (2006.01)		C 0 7 K	14/705	

請求項の数 22 (全79頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-515108(P2018-515108)  
 (86)(22)出願日 平成28年9月22日(2016.9.22)  
 (65)公表番号 特表2018-527014(P2018-527014  
 A)  
 (43)公表日 平成30年9月20日(2018.9.20)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2016/053097  
 (87)国際公開番号 WO2017/053556  
 (87)国際公開日 平成29年3月30日(2017.3.30)  
 審査請求日 令和1年9月19日(2019.9.19)  
 (31)優先権主張番号 62/222,132  
 (32)優先日 平成27年9月22日(2015.9.22)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/253,790  
 (32)優先日 平成27年11月11日(2015.11.11)  
 最終頁に続く

(73)特許権者 500429103  
 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ ペンシルベニア  
 アメリカ合衆国 19104 ペンシルベニア州 フィラデルフィア シビック センター ブールバード 3600 ナインスフロア  
 (74)代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74)代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74)代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74)代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HIV感染症を処置するためにT細胞を再度方向付ける方法

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

CD4細胞外ドメイン、CD8 ヒンジ、CD8 膜貫通ドメイン、および4-1BB共刺激シグナル伝達領域を含むシグナル伝達ドメインを含む膜結合型キメラ受容体をコードする配列を含む単離された核酸であって、

該核酸が、EF1 プロモーターをさらに含み、

該CD4細胞外ドメインが、SEQ ID NO: 3または64に示される配列を含む核酸配列によってコードされ、かつHIV感染細胞を認識して結合することができる、  
 前記単離された核酸。

**【請求項2】**

前記CD8 ヒンジが、SEQ ID NO: 4または65に示される配列を含む核酸配列によってコードされ、

前記膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 5に示される配列を含む核酸配列によってコードされ、

前記シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 6または69に示される配列を含む核酸配列によってコードされるCD3 シグナル伝達ドメインをさらに含み、かつ / または、

前記CD4細胞外ドメインが、HIVエンベロープ(Env)糖タンパク質に特異的に結合する、  
 請求項1に記載の単離された核酸。

**【請求項3】**

前記核酸が、SEQ ID NO: 1、7、または63に示される配列を含む、請求項1に記載の単離

された核酸を含む、ベクター。

**【請求項 4】**

CD4細胞外ドメイン、CD8 ヒンジ、CD8 膜貫通ドメイン、および4-1BB共刺激シグナル伝達領域を含むシグナル伝達ドメインを含む膜結合型キメラ受容体を含む単離されたポリペプチドであって、

該CD4細胞外ドメインが、SEQ ID NO: 46に示されるアミノ酸配列を含み、EF1 プロモーターに機能的に連結された核酸によってコードされ、かつHIV感染細胞を認識して結合することができる、

前記単離されたポリペプチド。

**【請求項 5】**

前記CD8 ヒンジが、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列を含み、

前記膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 48のアミノ酸配列を含み、

前記シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 51に示される配列を含むCD3 シグナル伝達ドメインを含み、かつ／または、

前記CD4細胞外ドメインが、HIVエンベロープ(Env)糖タンパク質に特異的に結合する、請求項4に記載の単離されたポリペプチド。

**【請求項 6】**

CD4細胞外ドメイン、CD8 ヒンジ、CD8 膜貫通ドメイン、および4-1BB共刺激シグナル伝達領域を含むシグナル伝達ドメインを含む膜結合型キメラ受容体をコードする配列を含む核酸を含むベクターであって、該核酸が、EF1 プロモーターをさらに含み、該CD4 細胞外ドメインが、HIV感染細胞を認識して結合することができ、かつ該核酸が、SEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、前記ベクター。

**【請求項 7】**

CD4細胞外ドメイン、HIV特異的な結合ドメイン、CD8 ヒンジ、CD8 膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激シグナル伝達領域、およびシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列を含む単離された核酸であって、

該核酸が、EF1 プロモーターをさらに含み、

該HIV特異的な結合ドメインが、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはその断片であり、該断片はFab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、および一本鎖Fv(scFv)からなる群より選択され、該scFvが、SEQ ID NO: 13、17、21、25、29、57～60、および61からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、

該scFvが、SEQ ID NO: 12、16、20、24、28、75～78、および79からなる群より選択される配列を含む核酸配列によってコードされ、

該HIV特異的な結合ドメインが、HIV感染細胞またはHIVビリオンの表面に特異的に結合し、

該シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 6または69に示される配列を含む核酸配列によってコードされるCD3 シグナル伝達ドメインを含み、

該CARが、SEQ ID NO: 10、14、18、22、26、34、70～73、および74からなる群より選択される配列を含む核酸配列によってコードされ、かつ／または、

該CARが、SEQ ID NO: 11、15、19、23、27、35、52～55、および56からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、

前記単離された核酸。

**【請求項 8】**

請求項1または請求項7に記載の単離された核酸を含む、改変細胞であって、該細胞が、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、および調節性T細胞からなる群より選択され、

該核酸が、DNAおよびmRNAからなる群より選択され、かつ／または

該核酸が、エレクトロポレーション、レンチウイルスの使用、レトロウイルスの使用、および化学物質ベースのトランスフェクションからなる群より選択される少なくとも1つの手順によって該細胞中に導入されている、

10

20

30

40

50

前記改变細胞。

【請求項 9】

請求項8に記載の改变細胞を含む、組成物。

【請求項 10】

その必要がある対象におけるHIV感染症の処置のための薬剤の製造における、請求項8に記載の細胞の使用。

【請求項 11】

請求項8に記載の改变細胞、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 12】

請求項8に記載の改变細胞を含む、HIV感染哺乳動物において細胞免疫応答を刺激するための薬学的組成物。 10

【請求項 13】

請求項8に記載の改变細胞を含み、

高活性抗レトロウイルス療法（HAART）と組み合わせて使用され、

該改变細胞および該HAARTが、HIV感染哺乳動物に同時に施されるように使用されることを特徴とする、

HIV感染哺乳動物を処置するための薬学的組成物。

【請求項 14】

CD4細胞外ドメイン、CD8 ヒンジ、CD8 膜貫通ドメイン、および4-1BB共刺激シグナル伝達領域を含むシグナル伝達ドメインを含むキメラ受容体を含む改变T細胞であって、該CD4細胞外ドメインが、EF1 プロモーターに機能的に連結されたSEQ ID NO: 3または64に示される配列を含む核酸によってコードされ、かつHIV感染細胞を認識して結合することができる、

改变T細胞。

【請求項 15】

CCR5破壊アリルをさらに含む、請求項14に記載の改变T細胞。

【請求項 16】

CD4細胞外ドメイン、CD8 ヒンジ、CD8 膜貫通ドメイン、および4-1BB共刺激シグナル伝達領域を含むシグナル伝達ドメインを含むキメラ受容体を含む改变T細胞であって、該CD4細胞外ドメインが、SEQ ID NO: 46に示されるアミノ酸配列を含み、EF1 プロモーターに機能的に連結された核酸によってコードされ、かつHIV感染細胞を認識して結合することができる、

前記改变T細胞。

【請求項 17】

CCR5破壊アリルをさらに含む、請求項16に記載の改变T細胞。

【請求項 18】

請求項1に記載の核酸をインピトロでT細胞に導入する段階を含む、HIV感染細胞に特異的なT細胞を作製する方法。

【請求項 19】

請求項1に記載の核酸、および

CCR5アリルを破壊することができる、CCR5遺伝子に特異的なジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）

をインピトロでT細胞に導入する段階を含む、HIV感染細胞に特異的なHIV耐性T細胞を作製する方法。

【請求項 20】

CD4細胞外ドメイン、CD8 ヒンジ、CD8 膜貫通ドメイン、および4-1BB共刺激シグナル伝達領域を含むシグナル伝達ドメインを含むキメラ受容体を含む改变T細胞であって、該CD4細胞外ドメインが、SEQ ID NO: 46に示されるアミノ酸配列を含み、EF1 プロモーターに機能的に連結された核酸によってコードされ、かつHIV感染細胞を認識して結合することができ、かつ該改变T細胞がHIV感染に耐性がある、

10

20

30

40

50

前記改変T細胞。

【請求項 2 1】

CD4細胞外ドメイン、CD8 ヒンジ、CD8 膜貫通ドメイン、および4-1BB共刺激シグナル伝達領域を含むシグナル伝達ドメインを含むキメラ受容体を含む改変T細胞を含む、HIV 感染哺乳動物を処置するための薬学的組成物であって、

該CD4細胞外ドメインが、SEQ ID NO: 46に示されるアミノ酸配列を含み、EF1 プロモーターに機能的に連結された核酸によってコードされ、かつHIV感染細胞を認識して結合することができ、かつ

該改変T細胞がHIV感染に耐性である、

前記薬学的組成物。

10

【請求項 2 2】

高活性抗レトロウイルス療法（HAART）と組み合わせて使用される、請求項21に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119(e)条(35 U.S.C. § 119(e))の下で、2015年9月22日に提出された米国特許仮出願第62/222,132号および2015年11月11日に提出された米国特許仮出願第62/253,790号に対する優先権を主張し、それらは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0 0 0 2】

連邦政府の資金援助を受けて行われた研究または開発に関する陳述

本発明は、米国国立衛生研究所（National Institutes of Health）によって拠出されたAI104280、AI117950、およびAR064220号助成金の下で、政府の援助を受けて行われた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

発明の背景

ヒト免疫不全ウイルスタイプ（HIV）の複製を最小化し、患者の生命の持続期間および質を増加させる抗レトロウイルス療法の能力にもかかわらず、終生の処置レジメンに伴う健康の結果および金銭的負担のために、永久的な治癒が非常に魅力的なものになる。T細胞は、ウイルス複製の制御において重要な役割を果たすが、それら自体が、HIV媒介性破壊の標的である。

30

【0 0 0 4】

免疫増強によろうと欠失からの保護によろうと、CD4 T細胞活性の回復は、高活性抗レトロウイルス療法（HAART）の非存在下でHIV複製の長期制御を可能にする重要な因子である。HIVを処置するための治療剤としてのT細胞を製造する試みが、20年にわたって進行中である。T細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）として公知である、細胞外標的化抗体および細胞内シグナル伝達ドメインから構成される合成免疫受容体を発現するように操作することができる。養子T細胞療法と呼ばれるこの新たな研究分野は、最近、多くの技術的進歩を経験している。重要なことに、T細胞療法アプローチは、ヘルパーCD4 T細胞を保護し、それらに直接的な抗ウイルス機能を備え付ける潜在能力を有し、これは、HIV特異的な細胞傷害を改善し、抗レトロウイルス療法の非存在下でHIV複製の制御を達成するのに重要でありうる。安全性および実行可能性の実証を含み、養子療法のためのT細胞操作の分野において大きな進歩が既になされているが、いかなる臨床試験も、HAARTの非存在下でのHIV複製の、長続きするかつ一貫した制御を結果としてもたらしていない。

40

【0 0 0 5】

患者自身の身体内でのHIV特異的なリンパ球の産生およびプライミングに依拠するワクチンアプローチとは対照的に、養子T細胞療法は、投与の前に治療用T細胞をカスタマイズす

50

る機会を提供する。したがって、T細胞の直接的な遺伝子操作を用いた治療的試みの不成功にもかかわらず、養子細胞療法が、HIV抵抗性細胞の作製、HIV特異的な免疫応答の再度方向付け、またはその2つの戦略の組み合わせによって機能的治癒を助長できるであろうことは明らかである。しかし、現在のところ、HIV複製の持続性の制御を抗レトロウイルス療法の非存在下で達成することができるよう、最も良好にT細胞を操作する方法は、不明である。

#### 【 0 0 0 6 】

HIV複製を阻害し、遺伝子治療媒介性の機能的治癒を提供する、より有効なT細胞遺伝子操作および遺伝子編集戦略について、当技術分野において大きな必要がある。本発明は、この必要に対処する。

10

#### 【 発明の概要 】

#### 【 0 0 0 7 】

本明細書に記載されたように、本発明は、CD4膜結合型キメラ受容体またはHIV特異的な一本鎖可変断片 (scFv) CARを用いた、HIV感染哺乳動物の処置のための組成物および方法に関する。

#### 【 0 0 0 8 】

1つの局面において、本発明は、膜結合型キメラ受容体をコードする単離された核酸配列を含む。単離された核酸配列は、CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含み、該CD4細胞外ドメインは、HIV感染細胞を認識して結合することができる。

20

#### 【 0 0 0 9 】

もう1つの局面において、本発明は、膜結合型キメラ受容体をコードする単離されたアミノ酸配列を含む。単離されたアミノ酸配列は、CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含み、該CD4細胞外ドメインは、HIV感染細胞を認識して結合することができる。

#### 【 0 0 1 0 】

いくつかの態様において、CD4細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 3または64を含む核酸配列によってコードされる。いくつかの態様において、CD4細胞外ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 46を含む。いくつかの他の態様において、CD4細胞外ドメインは、HIVエンベロープ (Env) 糖タンパク質に特異的に結合する。

30

#### 【 0 0 1 1 】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、核酸配列SEQ ID NO: 4または65によってコードされるCD8 ヒンジ、ならびに、SEQ ID NO: 5および8からなる群より選択される1つの核酸配列を含む核酸配列によってコードされる少なくとも1つのドメインを含む膜貫通ドメインを含む。他の態様において、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 47のCD8 ヒンジ、ならびに、SEQ ID NO: 48および49からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む膜貫通ドメインを含む。

#### 【 0 0 1 2 】

他の態様において、シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 6または68を含む核酸配列によってコードされるCD3 シグナル伝達ドメインを含む。他の態様において、シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 51を含むCD3 シグナル伝達ドメインを含む。

40

#### 【 0 0 1 3 】

さらに他の態様において、本発明の単離された核酸配列またはアミノ酸配列は、共刺激シグナル伝達領域をさらに含む。

#### 【 0 0 1 4 】

本明細書において描写されている本発明の上記の局面または任意の他の局面のさまざまな態様において、共刺激シグナル伝達領域は、TCR の 鎖、鎖、もしくは 鎖、FcR 、FcR 、CD3 、CD3 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、またはCD66dからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメイン、CD27、CD28、4-1BB (CD137 )、DAP12、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (L

50

FA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83特異的結合リガンドからの共刺激シグナル伝達領域、およびそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達領域はCD28であり、SEQ ID NO: 9または67を含む核酸配列によってコードされる。他の態様において、共刺激シグナル伝達領域はCD28であり、SEQ ID NO: 49を含む。

#### 【 0 0 1 5 】

1つの局面において、本発明は、膜結合型キメラ受容体をコードする単離された核酸配列を含むベクターを含む。ベクターの単離された核酸配列は、CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含み、該CD4細胞外ドメインは、HIV感染細胞を認識して結合することができる。いくつかの態様において、ベクターの核酸配列は、SEQ ID NO: 1、7、62、および63からなる群由来の少なくとも1つの核酸配列を含む。10

#### 【 0 0 1 6 】

もう1つの局面において、本発明は、膜結合型キメラ受容体を含むベクターを含む。ベクターの膜結合型キメラ受容体は、CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含み、該CD4細胞外ドメインは、HIV感染細胞を認識して結合することができ、該ベクターは、SEQ ID NO: 44および45からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ベクターは、EFプロモーターを含む。。

#### 【 0 0 1 7 】

さらにもう1つの局面において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離された核酸配列を含む。本発明のCARをコードする単離された核酸配列は、HIV特異的な結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびシグナル伝達ドメインを含み、該HIV結合ドメインは、抗HIV抗体またはその断片を含む。20

#### 【 0 0 1 8 】

いくつかの態様において、HIV特異的な結合ドメインは、重鎖および軽鎖を含む。他の態様において、HIV特異的な結合ドメインは、ヒト抗体、ヒト化抗体、およびその断片である。他の態様において、抗体またはその断片は、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、および一本鎖Fv(scFv)からなる群より選択される。さらに他の態様において、scFvは、SEQ ID NO: 13、17、21、25、29、57~60、および61からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。さらなる態様において、scFvは、SEQ ID NO: 12、16、20、24、28、75~78、および79からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。なおさらなる態様において、HIV特異的な結合ドメインは、HIV感染細胞またはHIVビリオンの表面に特異的に結合する。30

#### 【 0 0 1 9 】

いくつかの態様において、本発明のCARの共刺激シグナル伝達領域は、TCR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD86、共通FcR、FcR(Fc R1b)、CD79a、CD79b、FcRIIa、DAP10、DAP12、T細胞受容体(TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX9、OX40、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特異的結合リガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、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、TRANCKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(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からなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメイン4050

、およびそれらの任意の組み合わせを含む。

**【0020】**

いくつかの態様において、本発明のCARのシグナル伝達ドメインは、核酸配列SEQ ID NO: 6または68によってコードされるCD3 シグナル伝達ドメインを含む。

**【0021】**

いくつかの態様において、CARは、SEQ ID NO: 10、14、18、22、26、34、70～73 、および74からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。他の態様において 、CARは、SEQ ID NO: 11、15、19、23、27、35、52～55、および56からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する。

**【0022】**

1つの局面において、本発明は、CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む単離された核酸配列であって、該CD4細胞外ドメインが、HIV感染細胞を認識して結合することができる、単離された核酸配列；または、HIV特異的な結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびシグナル伝達ドメインを含むCARをコードする単離された核酸配列であって、該HIV結合ドメインが、抗HIV抗体またはその断片を含む、単離された核酸配列のいずれかを含む、変形細胞を含む。

10

**【0023】**

いくつかの態様において、本発明の変形細胞は、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、および調節性T細胞からなる群より選択される。他の態様において、変形細胞の核酸配列は、DNAおよびmRNAからなる群より選択される。さらに他の態様において、核酸配列は、エレクトロポレーション、レンチウイルスの使用、レトロウイルスの使用、および化学物質ベースのトランスフェクションからなる群より選択される少なくとも1つの手順によって細胞中に導入される。

20

**【0024】**

もう1つの局面において、本発明は、本明細書中の上記で列挙されたような本発明の変形細胞を含む組成物を含む。

**【0025】**

もう1つの局面において、本発明は、その必要がある対象におけるHIV感染症の処置のための薬剤の製造における、本発明の変形細胞の使用を含む。

30

**【0026】**

さらにもう1つの局面において、本発明は、本発明の変形細胞、および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を含む。

**【0027】**

さらなる局面において、本発明は、HIV感染哺乳動物において細胞免疫応答を刺激するための方法を含む。方法は、本明細書中の上記で列挙されたような本発明の変形細胞の有効量を哺乳動物に投与する段階を含む。

40

**【0028】**

またさらなる局面において、本発明は、HIV感染哺乳動物を処置する方法を含む。方法は 、本明細書中の上記で列挙されたような本発明の変形細胞を哺乳動物に投与する段階を含む。いくつかの態様において、変形細胞は、哺乳動物にとって自己由来である。他の態様において、本発明の方法は、抗レトロウイルス療法（HAART）を哺乳動物に施す段階をさらに含む。さらに他の態様において、変形細胞およびHAARTは、哺乳動物に同時に施される。

**[本発明1001]**

CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む膜結合型キメラ受容体をコードする単離された核酸配列であって、該CD4細胞外ドメインが、HIV感染細胞を認識して結合することができる、前記単離された核酸配列。

**[本発明1002]**

前記CD4細胞外ドメインが、SEQ ID NO: 3または64を含む核酸配列によってコードされる、本発明1001の単離された核酸配列。

50

[本発明1003]

前記膜貫通ドメインが、核酸配列SEQ ID NO: 4または65によってコードされるCD8ヒンジ、ならびに、SEQ ID NO: 5および8からなる群より選択される1つの核酸配列を含む核酸配列によってコードされる少なくとも1つのドメインを含む膜貫通ドメインを含む、本発明1001の単離された核酸配列。

[本発明1004]

前記シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 6または68を含む核酸配列によってコードされるCD3 シグナル伝達ドメインを含む、本発明1001の単離された核酸配列。

[本発明1005]

共刺激シグナル伝達領域をさらに含む、本発明1001の単離された核酸配列。

10

[本発明1006]

前記共刺激シグナル伝達領域が、TCR の 鎖、鎖、もしくは 鎖、FcR 、FcR 、CD3 、CD3 、CD3 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、またはCD66dからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメイン、CD27、CD28、4-1BB (CD137) 、DAP12 、OX9、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特異的結合リガンドからの共刺激シグナル伝達領域、およびそれらの任意の組み合わせを含む、本発明1005の単離された核酸配列。

[本発明1007]

前記共刺激シグナル伝達領域がCD28であり、SEQ ID NO: 9または67を含む核酸配列によってコードされる、本発明1006の単離された核酸配列。

20

[本発明1008]

前記CD4細胞外ドメインが、HIVエンベロープ (Env) 糖タンパク質に特異的に結合する、本発明1001の単離された核酸配列。

[本発明1009]

本発明1001の単離された核酸配列を含む、ベクター。

[本発明1010]

前記核酸配列が、SEQ ID NO: 1、7、62、および63からなる群からの少なくとも1つの核酸配列を含む、本発明1009のベクター。

[本発明1011]

CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む膜結合型キメラ受容体をコードする単離されたアミノ酸配列であって、該CD4細胞外ドメインが、HIV感染細胞を認識して結合することができる、前記単離されたアミノ酸配列。

30

[本発明1012]

前記CD4細胞外ドメインが、アミノ酸配列SEQ ID NO: 46を含む、本発明1011の単離されたアミノ酸配列。

[本発明1013]

前記膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 47のCD8 ヒンジ、ならびに、SEQ ID NO: 48および49からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む膜貫通ドメインを含む、本発明1011の単離されたアミノ酸配列。

[本発明1014]

前記シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 51を含むCD3 シグナル伝達ドメインを含む、本発明1011の単離されたアミノ酸配列。

40

[本発明1015]

共刺激シグナル伝達領域をさらに含む、本発明1011の単離されたアミノ酸配列。

[本発明1016]

前記共刺激シグナル伝達領域が、TCR の 鎖、鎖、もしくは 鎖、FcR 、FcR 、CD3 、CD3 、CD3 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、またはCD66dからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメイン、CD27、CD28、4-1BB (CD137) 、DAP12 、OX9、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特異的結合リガンドからの共刺激シグナル

50

伝達領域、およびそれらの任意の組み合わせを含む、本発明1015の単離されたアミノ酸配列。

[本発明1017]

前記共刺激シグナル伝達領域がCD28であり、SEQ ID NO: 49を含む、本発明1016の単離されたアミノ酸配列。

[本発明1018]

前記CD4細胞外ドメインが、HIVエンベロープ(Env)糖タンパク質に特異的に結合する、本発明1011の単離されたアミノ酸配列。

[本発明1019]

CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む膜結合型キメラ受容体を含むベクターであって、該CD4細胞外ドメインが、HIV感染細胞を認識して結合することができ、該ベクターが、SEQ ID NO: 44および45からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、前記ベクター。

10

[本発明1020]

EFプロモーターを含む、本発明1019のベクター。

[本発明1021]

HIV特異的な結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離された核酸配列であって、該HIV結合ドメインが、抗HIV抗体またはその断片を含む、前記単離された核酸配列。

[本発明1022]

前記HIV特異的な結合ドメインが、重鎖および軽鎖を含む、本発明1021の単離された核酸配列。

20

[本発明1023]

前記HIV特異的な結合ドメインが、ヒト抗体、ヒト化抗体、およびその断片である、本発明1021の単離された核酸配列。

[本発明1024]

前記抗体またはその断片が、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、および一本鎖Fv(scFv)からなる群より選択される、本発明1021の単離された核酸配列。

[本発明1025]

前記scFvが、SEQ ID NO: 13、17、21、25、29、57～60、および61からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1024の単離された核酸配列。

30

[本発明1026]

前記scFvが、SEQ ID NO: 12、16、20、24、28、75～78、および79からなる群より選択される核酸配列によってコードされる、本発明1024の単離された核酸配列。

[本発明1027]

前記HIV特異的な結合ドメインが、HIV感染細胞またはHIVビリオンの表面に特異的に結合する、本発明1021の単離された核酸配列。

[本発明1028]

前記共刺激シグナル伝達領域が、TCR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD86、共通FcR、FcR(Fc R1b)、CD79a、CD79b、Fc RIa、DAP10、DAP12、T細胞受容体(TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX9、OX40、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特異的結合リガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、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、TRANSE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A)、Ly10

40

50

8) 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からなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメイン、およびそれらの任意の組み合わせを含む、本発明1021の単離された核酸配列。

[本発明1029]

前記シグナル伝達ドメインが、核酸配列SEQ ID NO: 6または68によってコードされるCD3 シグナル伝達ドメインを含む、本発明1021の単離された核酸配列。

[本発明1030]

前記CARが、SEQ ID NO: 10、14、18、22、26、34、70～73、および74からなる群より選択される核酸配列によってコードされる、本発明1021の単離された核酸配列。

10

[本発明1031]

前記CARが、SEQ ID NO: 11、15、19、23、27、35、52～55、および56からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、本発明1021の単離された核酸配列。

[本発明1032]

本発明1001または本発明1021の単離された核酸配列を含む、改変細胞。

[本発明1033]

T細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、細胞傷害性Tリンパ球 (CTL)、および調節性T細胞からなる群より選択される、本発明1032の改変細胞。

[本発明1034]

前記核酸配列が、DNAおよびmRNAからなる群より選択される、本発明1033の改変細胞

20

—  
[本発明1035]

前記核酸配列が、エレクトロポレーション、レンチウイルスの使用、レトロウイルスの使用、および化学物質ベースのトランスフェクションからなる群より選択される少なくとも1つの手順によって前記細胞中に導入される、本発明1033の改変細胞。

[本発明1036]

本発明1033の改変細胞を含む、組成物。

[本発明1037]

その必要がある対象におけるHIV感染症の処置のための薬剤の製造における、本発明1033の細胞の使用。

30

[本発明1038]

本発明1033の改変細胞、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

[本発明1039]

HIV感染哺乳動物において細胞免疫応答を刺激するための方法であって、本発明1033の改変細胞の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む、方法。

[本発明1040]

HIV感染哺乳動物を処置する方法であって、本発明1033の改変細胞を該哺乳動物に投与する段階を含む、方法。

[本発明1041]

前記改変細胞が前記哺乳動物にとって自己由来である、本発明1040の方法。

40

[本発明1042]

抗レトロウイルス療法 (HAART) を哺乳動物に施す段階をさらに含む、本発明1041の方法。

[本発明1043]

前記改変細胞およびHAARTが、前記哺乳動物に同時に施される、本発明1041の方法。

【図面の簡単な説明】

【0029】

本発明の好ましい態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読んだ場合に、より良好に理解されるであろう。本発明を実例で説明するために、現時点で好ましい態様を図面

50

において示している。しかし、本発明は、図面中に示されている態様の厳密な配置および手段には限定されないことが理解されるべきである。

【0030】

【図1A】図1A～1Bは、CD4 CARが、インピトロでHIV特異的エリートコントローラーTCRよりも100倍を上回って強力であることを実証する、一連のグラフである。図1A：CD4 T細胞およびCD8 T細胞を、HLA-B57+正常ドナーから取得した。CD4 T細胞に、HIV BaIを感染させ、24時間後に、非形質導入CD8 T細胞（NTD）、KAFSPEVIPMF-B57-KF11（KF11）に特異的なHLA-B57拘束性TCRを発現するCD8 T細胞、またはEF1-CD8 TM CD4 CAR構築物（CD4z）を発現するCD8 T細胞（両方ともEF1プロモーター下で発現させた）を、指定されたエフェクター対標的比で混合した。形質導入効率を、共培養の前に40%に正規化した。6日の共培養後に、Gap p24およびCD4染色を、CD8陰性T細胞について示す。CD4膜結合型キメラ受容体（CD4またはCD4構築物とも呼ばれる）は、HLA-B<sup>\*</sup>57拘束性KF11エリートコントローラーTCRよりも良好に、NL4-3 HIV-1複製を制御する。KF11 TCRは、患者においてHIV-1複製のより良好な制御と関連しており、HIV-1に対する最も強力な患者由来のTCRの1つである。これは、TCRベースの戦略で達成することができるHIV-1の最良の制御に相当する。KF11 TCRとは対照的に、CD4は、示されるすべてのエフェクター細胞対標的細胞（E:T）比で、HIV-1複製を完全に制御することができた。

【図1B】図1A～1Bは、CD4 CARが、インピトロでHIV特異的エリートコントローラーTCRよりも100倍を上回って強力であることを実証する、一連のグラフである。図1B：CD8陰性細胞に対してゲーティングした、三連で行った単一の実験の要約データ。エラーバーは、平均値の標準偏差（SEM）を示す。これらのデータは、3回の独立した実験を代表する。

【図2A】図2A～2Gは、プロモーターおよび膜貫通の変化がCD4膜結合型キメラ受容体の有効性を改善し、HIV-1の制御を増加させることを示す、一連の概略図およびグラフである。図2A：CD8膜貫通（TM）およびEF1プロモーターを有する、新たな改善されたCD4膜結合型キメラ受容体構築物（上）の、PGKプロモーターおよびCD4 TMドメインを含有する、臨床試験に入った構築物（下）と比較した略図。

【図2B】図2A～2Gは、プロモーターおよび膜貫通の変化がCD4膜結合型キメラ受容体の有効性を改善し、HIV-1の制御を増加させることを示す、一連の概略図およびグラフである。図2B：形質導入されたCD8sにおける、CD4の表面発現。臨床試験に入ったレトロウイルスベクターベースの構築物（一番右）と比較して、レンチウイルスベクターを使用した場合に、同じ構築物はより高いレベルで発現した（左から2番目）。この発現は、EF1プロモーターをレンチウイルスベクター中に置換した場合に、さらに増加した（左から2番目）。

【図2C】図2A～2Gは、プロモーターおよび膜貫通の変化がCD4膜結合型キメラ受容体の有効性を改善し、HIV-1の制御を増加させることを示す、一連の概略図およびグラフである。図2C：本提示に示されるデータのすべてについての実験上の時系列。健常ドナーのCD4 Tリンパ球およびCD8 Tリンパ球を、CD3/CD28コーティングビーズおよび100～300IU/ml IL-2で刺激した。24時間後に、CD8sにレンチウイルスで形質導入するか、または、3および5日目にレトロウイルスで形質導入した。5日後にビーズを除去し、48時間後にCD4 T細胞を感染させた。CD4 T細胞を感染させた24時間後に、CD8sを、変動するE:T比で共培養した。HIV-1複製がNTDウェルにおいて最大の複製能力に達するまで（典型的には約10～12日）、培養物に培地およびIL-2を与え、1日おきにCD4、CD8、および細胞内p24について染色した。

【図2D】図2A～2Gは、プロモーターおよび膜貫通の変化がCD4膜結合型キメラ受容体の有効性を改善し、HIV-1の制御を増加させることを示す、一連の概略図およびグラフである。図2D～2E：HIV-1 BaIでのCD4 T細胞の感染の8日後の細胞内p24染色。図2Dは、CD4 T細胞に対してゲーティングし、図2Eは、CD8 T細胞に対してゲーティングした。レンチウイルスベクター、EF1プロモーター、およびCD8膜貫通ドメインを有する、

10

20

30

40

50

新たな改善されたCD4 構築物は、PGKプロモーターおよびCD4膜貫通ドメインを有する構築物（1：5および1：10で制御を喪失）よりもずっと低いE：T比で（およそ1：100まで）、HIV-1を制御した。レンチウイルスPGK CD4 TM構築物のより高い発現が、レトロウイルスPGK CD4 TM構築物と比較した場合に観察されたが、HIV-1複製の制御に関しては小さな有益性が見られた。重要なことに、CD8sがおよそ1：100の比まで非感染のままであったように、EF1 CD8 TM構築物のより高い発現は、より高い感染率を促進せず、他方、PGK CD4 TM<sup>+</sup> CD8sは、より低いE：T比で感染した。

【図2 E】図2Dの説明を参照のこと。

【図2 F】図2A～2Gは、プロモーターおよび膜貫通の変化がCD4膜結合型キメラ受容体の有効性を改善し、HIV-1の制御を増加させることを示す、一連の概略図およびグラフである。図2F：CD8陰性細胞に対してゲーティングした、三連で行った単一の実験の要約データ。エラーバーは、平均値の標準偏差（SEM）を示す。10

【図2 G】図2A～2Gは、プロモーターおよび膜貫通の変化がCD4膜結合型キメラ受容体の有効性を改善し、HIV-1の制御を増加させることを示す、一連の概略図およびグラフである。図2G：実験の時間経過にわたる、CD8陰性T細胞における細胞内p24のレベルの測定値。各グラフは、異なるE：T比に相当する。これらのデータは、3回の独立した実験を代表する。

【図3 A】図3A～3Eは、EF1 プロモーターおよびCD8 膜貫通の変化が、CARの発現およびHIV-1複製の制御を改善するために重要な改変であることを示す、一連の概略図およびグラフである。図3A：プロモーターおよび膜貫通構成要素の変化が、それぞれ個別に、いかにHIV-1複製の制御に影響を及ぼすかを比較するために作製した、4種類のレンチウイルスベクターキメラ受容体構築物の略図。上の構築物は、臨床試験において使用されたが、現在レンチウイルスベクター中に挿入されているものを指す。20

【図3 B】図3A～3Eは、EF1 プロモーターおよびCD8 膜貫通の変化が、CARの発現およびHIV-1複製の制御を改善するために重要な改変であることを示す、一連の概略図およびグラフである。図3B：活性化の8日後の、CD8 T細胞上のCD4 CAR発現。初代ヒトCD8 T細胞を、CD3/ CD28コーティングビーズで活性化し、非形質導入（NTD）で放置したか、または指定されたレンチウイルスベクターで形質導入した。8日の培養後に、CAR発現をCD4染色によって測定した。各構築物の中央蛍光強度（MFI）を、各グラフ上に示す。30

【図3 C】図3A～3Eは、EF1 プロモーターおよびCD8 膜貫通の変化が、CARの発現およびHIV-1複製の制御を改善するために重要な改変であることを示す、一連の概略図およびグラフである。図3C：CD4 T細胞のHIV-1 Balでの感染の8日後の、細胞内p24染色。左のセットのカラムは、CD4 T細胞に対してゲーティングし、右のセットのカラムは、CD8 T細胞に対してゲーティングした。以前に見られたように、EF1 CD8TM構築物は、最低のE：T比でHIV-1を制御した。EF1 プロモーターでCD4 TMの発現を単純に増加させることは（中央のカラム）、HIV-1複製の制御を改善したが、EF1 プロモーターでの発現の増加とCD8 膜貫通の置換との組み合わせは、最良のHIV-1の制御を生じた。CD 8 TMは、特に、EF1 構築物については1：50の比、およびPGK構築物については1：25の比で、キメラ受容体で操作されたCD8 T細胞の感染を低減させるように見られた（右のセットのカラム）。40

【図3 D】図3A～3Eは、EF1 プロモーターおよびCD8 膜貫通の変化が、CARの発現およびHIV-1複製の制御を改善するために重要な改変であることを示す、一連の概略図およびグラフである。図3D：CD8陰性細胞に対してゲーティングした、三連で行った単一の実験の要約データ。エラーバーは、平均値の標準誤差（SEM）を示す。

【図3 E】図3A～3Eは、EF1 プロモーターおよびCD8 膜貫通の変化が、CARの発現およびHIV-1複製の制御を改善するために重要な改変であることを示す、一連の概略図およびグラフである。図3E：実験の時間経過にわたる、CD8陰性T細胞における細胞内p24のレベル。各グラフは、異なるE：T比に相当する。これらのデータは、3回の独立した実験を代表する。50

【図4 A】図4A～4Cは、一本鎖可変断片(scFv)広域中和抗体(bnAb)ベースのCARおよびCD4膜結合型キメラ受容体が両方とも、HIV-1感染を制御できることを実証する、一連の表およびグラフである。図4A：HIV-1特異的bnAbから適合させた一本鎖可変断片(scFv)CARのパネルを、これらの強力なかつ広域に中和するHIV特異的抗体が、HIV感染細胞を標的とする代替の手段を提供するであろうという仮説の下に作製した。HIV-1結合の幅広さおよび中和効力に範囲があるscFvのパネル(図4Aにおける表を参照されたい)を、CD4膜結合型キメラ受容体と同じEF1-CD8-TM-構築物バックボーン中にクローニングして、HIV-1複製を制御するそれらの能力について評価した。活性化の2週間後に、これらのT細胞を、指定されたエフェクター対標的比で、HIV-1 YU2 GP160を発現するCr51標識されたK562標的細胞と混合した。標的の特異的溶解をプロットする。プロットされたデータは、3回の独立した実験の平均値を示す。4時間の共培養由来のCr51放出殺傷アッセイにより、scFv CARまたはCD4膜結合型キメラ受容体のいずれかを発現するCD8 T細胞は、Env発現標的細胞を溶解したが、非形質導入(NTD)T細胞は溶解しなかったことが示された。これにより、scFv CARは、妥当なフォールディング/コンフォメーションで発現し、Envに結合できたことが示される。

【図4 B】図4A～4Cは、一本鎖可変断片(scFv)広域中和抗体(bnAb)ベースのCARおよびCD4膜結合型キメラ受容体が両方とも、HIV-1感染を制御できることを実証する、一連の表およびグラフである。図4B：初代ヒトCD8 T細胞を、CD3/CD28コーティングビーズで活性化し、非形質導入(NTD)で放置したか、または、VRC01、3BNC60、PGT128、もしくはPGDM1400抗体に由来するHIV特異的CAR、またはCD4 CARをコードするEF1-CD8-TMレンチウイルスベクターで形質導入した。活性化の2週間後に、CD8 T細胞を、HIV-1 YU2 GP160を発現するK562細胞と1:1の比で6時間、共培養し、細胞内IFNおよびMIP-1産生を測定した。形質導入効率を、共培養の前に60%に正規化した。

【図4 C】図4A～4Cは、一本鎖可変断片(scFv)広域中和抗体(bnAb)ベースのCARおよびCD4膜結合型キメラ受容体が両方とも、HIV-1感染を制御できることを実証する、一連の表およびグラフである。図4C：図2Cに要約された実験設計を用いて、HIV特異的CARを、初代ヒトCD4 T細胞においてHIV-1複製を制御するそれらの能力について試験した。形質導入効率を、共培養の前に70%に正規化した。CD4 T細胞のHIV-1 Balでの感染の9日後の、CD4 T細胞の細胞内Gag p24およびCD4染色を示す。CD4膜結合型キメラ受容体およびscFv CARは両方とも、最大で1:50～1:200のE:T比で、NTD対照に比べてEnv標的細胞の溶解を示し、これは、最大で1:25のE:T比で有効性を示した、図1Aに示されたKF11 TCRの活性よりも優れている。エラーバーは、平均値の標準偏差(SEM)を示す。データは、3回の独立した実験を代表する。

【図5 A】図5A～5Bは、CD28共刺激がHIV-1 Balの制御を促進すること、ならびに、CD28および4-1BBの共刺激がインピトロでHIV-1複製の制御に対して反対の効果を有することを示す、一連のグラフである。図5A：CD4 T細胞のHIV-1 Balでの感染の10日後の、CD4 T細胞の細胞内p24染色を示す。共通のCAR設計において利用されている共刺激ドメインのパネルを、CD4膜結合型キメラ受容体バックボーン中にクローニングして、インピトロでHIV-1の制御に対する共刺激の効果を決定した。CD4構築物と同様にまたはそれよりも良好に、一貫してHIV-1を制御した唯一の膜結合型キメラ受容体は、CD4 CD28構築物であった。対照的に、4-1BB、ICOS、およびCD27の添加は、HIV-1の制御を損ない、OX40およびCD28-4-1BBの組み合わせは、ほとんど効果を有さないように見られた。

【図5 B】図5A～5Bは、CD28共刺激がHIV-1 Balの制御を促進すること、ならびに、CD28および4-1BBの共刺激がインピトロでHIV-1複製の制御に対して反対の効果を有することを示す、一連のグラフである。図5B：CD8陰性T細胞に対してゲーティングした、三連で行った単一の実験の要約データ。エラーバーは、平均値の標準偏差(SEM)を示す。データは、3回の独立した実験を代表する。

【図6】CD4膜結合型キメラ受容体のヌクレオチド配列である(CD4構築物；SEQ ID

10

20

30

40

50

NO: 1)。この配列には、EF1 プロモーター (SEQ ID NO: 2) に関する区分について赤色で、CD4細胞外ドメイン (SEQ ID NO: 3) について黄色で、CD8 細胞外ヒンジ (SEQ ID NO: 4) について緑色で、CD8 膜貫通ドメイン (SEQ ID NO: 5) について青緑色で、およびCD3 (SEQ ID NO: 6) について桃色で注釈がつけられている。

【図7】CD4 CD28膜結合型キメラ受容体のヌクレオチド配列である (CD4 CD28 構築物 ; SEQ ID NO: 7)。この配列には、EF1 プロモーターに関する区分について赤色で、CD4細胞外ドメインについて黄色で、CD8 細胞外ヒンジについて緑色で、CD28膜貫通ドメイン (SEQ ID NO: 8) について青緑色で、CD28共刺激ドメイン (SEQ ID NO: 9) について青色で、およびCD3 について桃色で注釈がつけられている。

【図8】以下の5種類の抗体ベースのCAR構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸 (aa) 配列の一覧表である : PGDM1400キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) のヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 10および11)、PGDM1400 scFvのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 12および13)、PGT128 KIR のヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 14および15)、PGT128 scFvのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 16および17)、VRC01 KIRのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 18および19)、VRC01 scFvのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 20および21)、3BNC60-KIRのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 22および23)、3BNC60 scFvのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 24および25)、VR C01 c-mut-KIRのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 26および27)、VRC01 c-mut scFvのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 28および29)、CD4 Dap12-KIRS2のヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 30および31)、CD4-KIRのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 32および33)、ならびにVRC01 IgG4 bbzのヌクレオチド配列およびaa配列 (それぞれ、SEQ ID NO: 34および35)。

【図9】図9A～9Cは、scFvベースのCAR (scFv-CAR) の細胞傷害が特異的かつ強力であることを実証する、一連のグラフおよびヒストグラムである。VRC01 CARは、HIV YU-2株を発現する標的細胞に対して特異的な細胞傷害を示した (図9A) が、CD19を発現する細胞に対しては示さず (図9B) ; 細胞傷害は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) 細胞質ドメインを用いることによって増加することができる (図9A)。殺傷効力は、CAR T細胞によるインターフェロン (IFNg) 放出と相關した (図9C)。<sup>10</sup> <sup>20</sup> <sup>30</sup> <sup>40</sup> <sup>50</sup> <sup>60</sup> <sup>70</sup> <sup>80</sup> <sup>90</sup> <sup>100</sup> <sup>110</sup> <sup>120</sup> <sup>130</sup> <sup>140</sup> <sup>150</sup> <sup>160</sup> <sup>170</sup> <sup>180</sup> <sup>190</sup> <sup>200</sup> <sup>210</sup> <sup>220</sup> <sup>230</sup> <sup>240</sup> <sup>250</sup> <sup>260</sup> <sup>270</sup> <sup>280</sup> <sup>290</sup> <sup>300</sup> <sup>310</sup> <sup>320</sup> <sup>330</sup> <sup>340</sup> <sup>350</sup> <sup>360</sup> <sup>370</sup> <sup>380</sup> <sup>390</sup> <sup>400</sup> <sup>410</sup> <sup>420</sup> <sup>430</sup> <sup>440</sup> <sup>450</sup> <sup>460</sup> <sup>470</sup> <sup>480</sup> <sup>490</sup> <sup>500</sup> <sup>510</sup> <sup>520</sup> <sup>530</sup> <sup>540</sup> <sup>550</sup> <sup>560</sup> <sup>570</sup> <sup>580</sup> <sup>590</sup> <sup>600</sup> <sup>610</sup> <sup>620</sup> <sup>630</sup> <sup>640</sup> <sup>650</sup> <sup>660</sup> <sup>670</sup> <sup>680</sup> <sup>690</sup> <sup>700</sup> <sup>710</sup> <sup>720</sup> <sup>730</sup> <sup>740</sup> <sup>750</sup> <sup>760</sup> <sup>770</sup> <sup>780</sup> <sup>790</sup> <sup>800</sup> <sup>810</sup> <sup>820</sup> <sup>830</sup> <sup>840</sup> <sup>850</sup> <sup>860</sup> <sup>870</sup> <sup>880</sup> <sup>890</sup> <sup>900</sup> <sup>910</sup> <sup>920</sup> <sup>930</sup> <sup>940</sup> <sup>950</sup> <sup>960</sup> <sup>970</sup> <sup>980</sup> <sup>990</sup> <sup>1000</sup> <sup>1010</sup> <sup>1020</sup> <sup>1030</sup> <sup>1040</sup> <sup>1050</sup> <sup>1060</sup> <sup>1070</sup> <sup>1080</sup> <sup>1090</sup> <sup>1100</sup> <sup>1110</sup> <sup>1120</sup> <sup>1130</sup> <sup>1140</sup> <sup>1150</sup> <sup>1160</sup> <sup>1170</sup> <sup>1180</sup> <sup>1190</sup> <sup>1200</sup> <sup>1210</sup> <sup>1220</sup> <sup>1230</sup> <sup>1240</sup> <sup>1250</sup> <sup>1260</sup> <sup>1270</sup> <sup>1280</sup> <sup>1290</sup> <sup>1300</sup> <sup>1310</sup> <sup>1320</sup> <sup>1330</sup> <sup>1340</sup> <sup>1350</sup> <sup>1360</sup> <sup>1370</sup> <sup>1380</sup> <sup>1390</sup> <sup>1400</sup> <sup>1410</sup> <sup>1420</sup> <sup>1430</sup> <sup>1440</sup> <sup>1450</sup> <sup>1460</sup> <sup>1470</sup> <sup>1480</sup> <sup>1490</sup> <sup>1500</sup> <sup>1510</sup> <sup>1520</sup> <sup>1530</sup> <sup>1540</sup> <sup>1550</sup> <sup>1560</sup> <sup>1570</sup> <sup>1580</sup> <sup>1590</sup> <sup>1600</sup> <sup>1610</sup> <sup>1620</sup> <sup>1630</sup> <sup>1640</sup> <sup>1650</sup> <sup>1660</sup> <sup>1670</sup> <sup>1680</sup> <sup>1690</sup> <sup>1700</sup> <sup>1710</sup> <sup>1720</sup> <sup>1730</sup> <sup>1740</sup> <sup>1750</sup> <sup>1760</sup> <sup>1770</sup> <sup>1780</sup> <sup>1790</sup> <sup>1800</sup> <sup>1810</sup> <sup>1820</sup> <sup>1830</sup> <sup>1840</sup> <sup>1850</sup> <sup>1860</sup> <sup>1870</sup> <sup>1880</sup> <sup>1890</sup> <sup>1900</sup> <sup>1910</sup> <sup>1920</sup> <sup>1930</sup> <sup>1940</sup> <sup>1950</sup> <sup>1960</sup> <sup>1970</sup> <sup>1980</sup> <sup>1990</sup> <sup>2000</sup> <sup>2010</sup> <sup>2020</sup> <sup>2030</sup> <sup>2040</sup> <sup>2050</sup> <sup>2060</sup> <sup>2070</sup> <sup>2080</sup> <sup>2090</sup> <sup>2100</sup> <sup>2110</sup> <sup>2120</sup> <sup>2130</sup> <sup>2140</sup> <sup>2150</sup> <sup>2160</sup> <sup>2170</sup> <sup>2180</sup> <sup>2190</sup> <sup>2200</sup> <sup>2210</sup> <sup>2220</sup> <sup>2230</sup> <sup>2240</sup> <sup>2250</sup> <sup>2260</sup> <sup>2270</sup> <sup>2280</sup> <sup>2290</sup> <sup>2300</sup> <sup>2310</sup> <sup>2320</sup> <sup>2330</sup> <sup>2340</sup> <sup>2350</sup> <sup>2360</sup> <sup>2370</sup> <sup>2380</sup> <sup>2390</sup> <sup>2400</sup> <sup>2410</sup> <sup>2420</sup> <sup>2430</sup> <sup>2440</sup> <sup>2450</sup> <sup>2460</sup> <sup>2470</sup> <sup>2480</sup> <sup>2490</sup> <sup>2500</sup> <sup>2510</sup> <sup>2520</sup> <sup>2530</sup> <sup>2540</sup> <sup>2550</sup> <sup>2560</sup> <sup>2570</sup> <sup>2580</sup> <sup>2590</sup> <sup>2600</sup> <sup>2610</sup> <sup>2620</sup> <sup>2630</sup> <sup>2640</sup> <sup>2650</sup> <sup>2660</sup> <sup>2670</sup> <sup>2680</sup> <sup>2690</sup> <sup>2700</sup> <sup>2710</sup> <sup>2720</sup> <sup>2730</sup> <sup>2740</sup> <sup>2750</sup> <sup>2760</sup> <sup>2770</sup> <sup>2780</sup> <sup>2790</sup> <sup>2800</sup> <sup>2810</sup> <sup>2820</sup> <sup>2830</sup> <sup>2840</sup> <sup>2850</sup> <sup>2860</sup> <sup>2870</sup> <sup>2880</sup> <sup>2890</sup> <sup>2900</sup> <sup>2910</sup> <sup>2920</sup> <sup>2930</sup> <sup>2940</sup> <sup>2950</sup> <sup>2960</sup> <sup>2970</sup> <sup>2980</sup> <sup>2990</sup> <sup>3000</sup> <sup>3010</sup> <sup>3020</sup> <sup>3030</sup> <sup>3040</sup> <sup>3050</sup> <sup>3060</sup> <sup>3070</sup> <sup>3080</sup> <sup>3090</sup> <sup>3100</sup> <sup>3110</sup> <sup>3120</sup> <sup>3130</sup> <sup>3140</sup> <sup>3150</sup> <sup>3160</sup> <sup>3170</sup> <sup>3180</sup> <sup>3190</sup> <sup>3200</sup> <sup>3210</sup> <sup>3220</sup> <sup>3230</sup> <sup>3240</sup> <sup>3250</sup> <sup>3260</sup> <sup>3270</sup> <sup>3280</sup> <sup>3290</sup> <sup>3300</sup> <sup>3310</sup> <sup>3320</sup> <sup>3330</sup> <sup>3340</sup> <sup>3350</sup> <sup>3360</sup> <sup>3370</sup> <sup>3380</sup> <sup>3390</sup> <sup>3400</sup> <sup>3410</sup> <sup>3420</sup> <sup>3430</sup> <sup>3440</sup> <sup>3450</sup> <sup>3460</sup> <sup>3470</sup> <sup>3480</sup> <sup>3490</sup> <sup>3500</sup> <sup>3510</sup> <sup>3520</sup> <sup>3530</sup> <sup>3540</sup> <sup>3550</sup> <sup>3560</sup> <sup>3570</sup> <sup>3580</sup> <sup>3590</sup> <sup>3600</sup> <sup>3610</sup> <sup>3620</sup> <sup>3630</sup> <sup>3640</sup> <sup>3650</sup> <sup>3660</sup> <sup>3670</sup> <sup>3680</sup> <sup>3690</sup> <sup>3700</sup> <sup>3710</sup> <sup>3720</sup> <sup>3730</sup> <sup>3740</sup> <sup>3750</sup> <sup>3760</sup> <sup>3770</sup> <sup>3780</sup> <sup>3790</sup> <sup>3800</sup> <sup>3810</sup> <sup>3820</sup> <sup>3830</sup> <sup>3840</sup> <sup>3850</sup> <sup>3860</sup> <sup>3870</sup> <sup>3880</sup> <sup>3890</sup> <sup>3900</sup> <sup>3910</sup> <sup>3920</sup> <sup>3930</sup> <sup>3940</sup> <sup>3950</sup> <sup>3960</sup> <sup>3970</sup> <sup>3980</sup> <sup>3990</sup> <sup>4000</sup> <sup>4010</sup> <sup>4020</sup> <sup>4030</sup> <sup>4040</sup> <sup>4050</sup> <sup>4060</sup> <sup>4070</sup> <sup>4080</sup> <sup>4090</sup> <sup>4100</sup> <sup>4110</sup> <sup>4120</sup> <sup>4130</sup> <sup>4140</sup> <sup>4150</sup> <sup>4160</sup> <sup>4170</sup> <sup>4180</sup> <sup>4190</sup> <sup>4200</sup> <sup>4210</sup> <sup>4220</sup> <sup>4230</sup> <sup>4240</sup> <sup>4250</sup> <sup>4260</sup> <sup>4270</sup> <sup>4280</sup> <sup>4290</sup> <sup>4300</sup> <sup>4310</sup> <sup>4320</sup> <sup>4330</sup> <sup>4340</sup> <sup>4350</sup> <sup>4360</sup> <sup>4370</sup> <sup>4380</sup> <sup>4390</sup> <sup>4400</sup> <sup>4410</sup> <sup>4420</sup> <sup>4430</sup> <sup>4440</sup> <sup>4450</sup> <sup>4460</sup> <sup>4470</sup> <sup>4480</sup> <sup>4490</sup> <sup>4500</sup> <sup>4510</sup> <sup>4520</sup> <sup>4530</sup> <sup>4540</sup> <sup>4550</sup> <sup>4560</sup> <sup>4570</sup> <sup>4580</sup> <sup>4590</sup> <sup>4600</sup> <sup>4610</sup> <sup>4620</sup> <sup>4630</sup> <sup>4640</sup> <sup>4650</sup> <sup>4660</sup> <sup>4670</sup> <sup>4680</sup> <sup>4690</sup> <sup>4700</sup> <sup>4710</sup> <sup>4720</sup> <sup>4730</sup> <sup>4740</sup> <sup>4750</sup> <sup>4760</sup> <sup>4770</sup> <sup>4780</sup> <sup>4790</sup> <sup>4800</sup> <sup>4810</sup> <sup>4820</sup> <sup>4830</sup> <sup>4840</sup> <sup>4850</sup> <sup>4860</sup> <sup>4870</sup> <sup>4880</sup> <sup>4890</sup> <sup>4900</sup> <sup>4910</sup> <sup>4920</sup> <sup>4930</sup> <sup>4940</sup> <sup>4950</sup> <sup>4960</sup> <sup>4970</sup> <sup>4980</sup> <sup>4990</sup> <sup>5000</sup> <sup>5010</sup> <sup>5020</sup> <sup>5030</sup> <sup>5040</sup> <sup>5050</sup> <sup>5060</sup> <sup>5070</sup> <sup>5080</sup> <sup>5090</sup> <sup>5100</sup> <sup>5110</sup> <sup>5120</sup> <sup>5130</sup> <sup>5140</sup> <sup>5150</sup> <sup>5160</sup> <sup>5170</sup> <sup>5180</sup> <sup>5190</sup> <sup>5200</sup> <sup>5210</sup> <sup>5220</sup> <sup>5230</sup> <sup>5240</sup> <sup>5250</sup> <sup>5260</sup> <sup>5270</sup> <sup>5280</sup> <sup>5290</sup> <sup>5300</sup> <sup>5310</sup> <sup>5320</sup> <sup>5330</sup> <sup>5340</sup> <sup>5350</sup> <sup>5360</sup> <sup>5370</sup> <sup>5380</sup> <sup>5390</sup> <sup>5400</sup> <sup>5410</sup> <sup>5420</sup> <sup>5430</sup> <sup>5440</sup> <sup>5450</sup> <sup>5460</sup> <sup>5470</sup> <sup>5480</sup> <sup>5490</sup> <sup>5500</sup> <sup>5510</sup> <sup>5520</sup> <sup>5530</sup> <sup>5540</sup> <sup>5550</sup> <sup>5560</sup> <sup>5570</sup> <sup>5580</sup> <sup>5590</sup> <sup>5600</sup> <sup>5610</sup> <sup>5620</sup> <sup>5630</sup> <sup>5640</sup> <sup>5650</sup> <sup>5660</sup> <sup>5670</sup> <sup>5680</sup> <sup>5690</sup> <sup>5700</sup> <sup>5710</sup> <sup>5720</sup> <sup>5730</sup> <sup>5740</sup> <sup>5750</sup> <sup>5760</sup> <sup>5770</sup> <sup>5780</sup> <sup>5790</sup> <sup>5800</sup> <sup>5810</sup> <sup>5820</sup> <sup>5830</sup> <sup>5840</sup> <sup>5850</sup> <sup>5860</sup> <sup>5870</sup> <sup>5880</sup> <sup>5890</sup> <sup>5900</sup> <sup>5910</sup> <sup>5920</sup> <sup>5930</sup> <sup>5940</sup> <sup>5950</sup> <sup>5960</sup> <sup>5970</sup> <sup>5980</sup> <sup>5990</sup> <sup>6000</sup> <sup>6010</sup> <sup>6020</sup> <sup>6030</sup> <sup>6040</sup> <sup>6050</sup> <sup>6060</sup> <sup>6070</sup> <sup>6080</sup> <sup>6090</sup> <sup>6100</sup> <sup>6110</sup> <sup>6120</sup> <sup>6130</sup> <sup>6140</sup> <sup>6150</sup> <sup>6160</sup> <sup>6170</sup> <sup>6180</sup> <sup>6190</sup> <sup>6200</sup> <sup>6210</sup> <sup>6220</sup> <sup>6230</sup> <sup>6240</sup> <sup>6250</sup> <sup>6260</sup> <sup>6270</sup> <sup>6280</sup> <sup>6290</sup> <sup>6300</sup> <sup>6310</sup> <sup>6320</sup> <sup>6330</sup> <sup>6340</sup> <sup>6350</sup> <sup>6360</sup> <sup>6370</sup> <sup>6380</sup> <sup>6390</sup> <sup>6400</sup> <sup>6410</sup> <sup>6420</sup> <sup>6430</sup> <sup>6440</sup> <sup>6450</sup> <sup>6460</sup> <sup>6470</sup> <sup>6480</sup> <sup>6490</sup> <sup>6500</sup> <sup>6510</sup> <sup>6520</sup> <sup>6530</sup> <sup>6540</sup> <sup>6550</sup> <sup>6560</sup> <sup>6570</sup> <sup>6580</sup> <sup>6590</sup> <sup>6600</sup> <sup>6610</sup> <sup>6620</sup> <sup>6630</sup> <sup>6640</sup> <sup>6650</sup> <sup>6660</sup> <sup>6670</sup> <sup>6680</sup> <sup>6690</sup> <sup>6700</sup> <sup>6710</sup> <sup>6720</sup> <sup>6730</sup> <sup>6740</sup> <sup>6750</sup> <sup>6760</sup> <sup>6770</sup> <sup>6780</sup> <sup>6790</sup> <sup>6800</sup> <sup>6810</sup> <sup>6820</sup> <sup>6830</sup> <sup>6840</sup> <sup>6850</sup> <sup>6860</sup> <sup>6870</sup> <sup>6880</sup> <sup>6890</sup> <sup>6900</sup> <sup>6910</sup> <sup>6920</sup> <sup>6930</sup> <sup>6940</sup> <sup>6950</sup> <sup>6960</sup> <sup>6970</sup> <sup>6980</sup> <sup>6990</sup> <sup>7000</sup> <sup>7010</sup> <sup>7020</sup> <sup>7030</sup> <sup>7040</sup> <sup>7050</sup> <sup>7060</sup> <sup>7070</sup> <sup>7080</sup> <sup>7090</sup> <sup>7100</sup> <sup>7110</sup> <sup>7120</sup> <sup>7130</sup> <sup>7140</sup> <sup>7150</sup> <sup>7160</sup> <sup>7170</sup> <sup>7180</sup> <sup>7190</sup> <sup>7200</sup> <sup>7210</sup> <sup>7220</sup> <sup>7230</sup> <sup>7240</sup> <sup>7250</sup> <sup>7260</sup> <sup>7270</sup> <sup>7280</sup> <sup>7290</sup> <sup>7300</sup> <sup>7310</sup> <sup>7320</sup> <sup>7330</sup> <sup>7340</sup> <sup>7350</sup> <sup>7360</sup> <sup>7370</sup> <sup>7380</sup> <sup>7390</sup> <sup>7400</sup> <sup>7410</sup> <sup>7420</sup> <sup>7430</sup> <sup>7440</sup> <sup>7450</sup> <sup>7460</sup> <sup>7470</sup> <sup>7480</sup> <sup>7490</sup> <sup>7500</sup> <sup>7510</sup> <sup>7520</sup> <sup>7530</sup> <sup>7540</sup> <sup>7550</sup> <sup>7560</sup> <sup>7570</sup> <sup>7580</sup> <sup>7590</sup> <sup>7600</sup> <sup>7610</sup> <sup>7620</sup> <sup>7630</sup> <sup>7640</sup> <sup>7650</sup> <sup>7660</sup> <sup>7670</sup> <sup>7680</sup> <sup>7690</sup> <sup>7700</sup> <sup>7710</sup> <sup>7720</sup> <sup>7730</sup> <sup>7740</sup> <sup>7750</sup> <sup>7760</sup> <sup>7770</sup> <sup>7780</sup> <sup>7790</sup> <sup>7800</sup> <sup>7810</sup> <sup>7820</sup> <sup>7830</sup> <sup>7840</sup> <sup>7850</sup> <sup>7860</sup> <sup>7870</sup> <sup>7880</sup> <sup>7890</sup> <sup>7900</sup> <sup>7910</sup> <sup>7920</sup> <sup>7930</sup> <sup>7940</sup> <sup>7950</sup> <sup>7960</sup> <sup>7970</sup> <sup>7980</sup> <sup>7990</sup> <sup>8000</sup> <sup>8010</sup> <sup>8020</sup> <sup>8030</sup> <sup>8040</sup> <sup>8050</sup> <sup>8060</sup> <sup>8070</sup> <sup>8080</sup> <sup>8090</sup> <sup>8100</sup> <sup>8110</sup> <sup>8120</sup> <sup>8130</sup> <sup>8140</sup> <sup>8150</sup> <sup>8160</sup> <sup>8170</sup> <sup>8180</sup> <sup>8190</sup> <sup>8200</sup> <sup>8210</sup> <sup>8220</sup> <sup>8230</sup> <sup>8240</sup> <sup>8250</sup> <sup>8260</sup> <sup>8270</sup> <sup>8280</sup> <sup>8290</sup> <sup>8300</sup> <sup>8310</sup> <sup>8320</sup> <sup>8330</sup> <sup>8340</sup> <sup>8350</sup> <sup>8360</sup> <sup>8370</sup> <sup>8380</sup> <sup>8390</sup> <sup>8400</sup> <sup>8410</sup> <sup>8420</sup> <sup>8430</sup> <sup>8440</sup> <sup>8450</sup> <sup>8460</sup> <sup>8470</sup> <sup>8480</sup> <sup>8490</sup> <sup>8500</sup> <sup>8510</sup> <sup>8520</sup> <sup>8530</sup> <sup>8540</sup> <sup>8550</sup> <sup>8560</sup> <sup>8570</sup> <sup>8580</sup> <sup>8590</sup> <sup>8600</sup> <sup>8610</sup> <sup>8620</sup> <sup>8630</sup> <sup>8640</sup> <sup>8650</sup> <sup>8660</sup> <sup>8670</sup> <sup>8680</sup> <sup>8690</sup> <sup>8700</sup> <sup>8710</sup> <sup>8720</sup> <sup>8730</sup> <sup>8740</sup> <sup>8750</sup> <sup>8760</sup> <sup>8770</sup> <sup>8780</sup> <sup>8790</sup> <sup>8800</sup> <sup>8810</sup> <sup>8820</sup> <sup>8830</sup> <sup>8840</sup> <sup>8850</sup> <sup>8860</sup> <sup>8870</sup> <sup>8880</sup> <sup>8890</sup> <sup>8900</sup> <sup>8910</sup> <sup>8920</sup> <sup>8930</sup> <sup>8940</sup> <sup>8950</sup> <sup>8960</sup> <sup>8970</sup> <sup>8980</sup> <sup>8990</sup> <sup>9000</sup> <sup>9010</sup> <sup>9020</sup> <sup>9030</sup> <sup>9040</sup> <sup>9050</sup> <sup>9060</sup> <sup>9070</sup> <sup>9080</sup> <sup>9090</sup> <sup>9100</sup> <sup>9110</sup> <sup>9120</sup> <sup>9130</sup> <sup>9140</sup> <sup>9150</sup> <sup>9160</sup> <sup>9170</sup> <sup>9180</sup> <sup>9190</sup> <sup>9200</sup> <sup>9210</sup> <sup>9220</sup> <sup>9230</sup> <sup>9240</sup> <sup>9250</sup> <sup>9260</sup> <sup>9270</sup> <sup>9280</sup> <sup>9290</sup> <sup>9300</sup> <sup>9310</sup> <sup>9320</sup> <sup>9330</sup> <sup>9340</sup> <sup>9350</sup> <sup>9360</sup> <sup>9370</sup> <sup>9380</sup> <sup>9390</sup> <sup>9400</sup> <sup>9410</sup> <sup>9420</sup> <sup>9430</sup> <sup>9440</sup> <sup>9450</sup> <sup>9460</sup> <sup>9470</sup> <sup>9480</sup> <sup>9490</sup> <sup>9500</sup> <sup>9510</sup> <sup>9520</sup> <sup>9530</sup> <sup>9540</sup> <sup>9550</sup> <sup>9560</sup> <sup>9570</sup> <sup>9580</sup> <sup>9590</sup> <sup>9600</sup> <sup>9610</sup> <sup>9620</sup> <sup>9630</sup> <sup>9640</sup> <sup>9650</sup> <sup>9660</sup> <sup>9670</sup> <sup>9680</sup> <sup>9690</sup> <sup>9700</sup> <sup>9710</sup> <sup>9720</sup> <sup>9730</sup> <sup>9740</sup> <sup>9750</sup> <sup>9760</sup> <sup>9770</sup> <sup>9780</sup> <sup>9790</sup> <sup>9800</sup> <sup>9810</sup> <sup>9820</sup> <sup>9830</sup> <sup>9840</sup> <sup>9850</sup> <sup>9860</sup> <sup>9870</sup> <sup>9880</sup> <sup>9890</sup> <sup>9900</sup> <sup>9910</sup> <sup>9920</sup> <sup>9930</sup> <sup>9940</sup> <sup>9950</sup> <sup>9960</sup> <sup>9970</sup> <sup>9980</sup> <sup>9990</sup> <sup>10000</sup> <sup>10010</sup> <sup>10020</sup> <sup>10030</sup> <sup>10040</sup> <sup>10050</sup> <sup>10060</sup>

1 -CD8 TMレンチウイルスベクターで形質導入した。活性化の2週間後に、CD8 T細胞を、非改変K562細胞、高レベルのHLA-DRを発現するK562細胞（図14を参照されたい）、またはHIV-1 YU2 GP160を発現するK562細胞と1：1の比で6時間、共培養した。細胞内IFN およびMIP-1 発現を、左に示し、細胞内IL-2発現およびCD107a表面移動を、右に示す。

【図11B】図11A～11Cは、CD4 CARが、Env+細胞に対して特異的に応答するが、M HCクラスII+細胞に対しては特異的に応答しないことを実証する、一連のグラフである。  
図11B：CD4 CAR+ CD8 T細胞がMHCクラスII発現標的細胞を殺傷しないことを実証するために、共培養アッセイを設計した。簡潔に言うと、図6A由来のNTDまたはCD4 28z CAR形質導入CD8 T細胞を、HLA-A2およびGFPを発現するK562細胞、ならびにHLA-DR \*0401およびmCherryを発現するK562と1：1：1の比で共培養した。GFPおよびmCherryの発現を測定するフローサイトメトリーを、混合の直後（0時間）および3日の共培養後（72時間）に行った。

【図11C】図11A～11Cは、CD4 CARが、Env+細胞に対して特異的に応答するが、M HCクラスII+細胞に対しては特異的に応答しないことを実証する、一連のグラフである。  
図11C：24、48、および72時間の培養後に、HLA-A2/GFP発現細胞対HLA-DR \*0401/mCherry発現細胞の比を測定した、三連で行った単一の実験の要約データ。エラーバーは、平均値の標準偏差（SEM）を示す。データは、3回の独立した実験を代表する。

【図12】図12A～12Fは、最適化されたCD4 CARを発現するT細胞が、HIV-1複製を制御し、元のCD4 CARよりもずっと高いレベルまでインビボで増大したことを示す、一連のグラフである。7匹のNSG ( NOD-scid IL2Rgnnull ) マウスのコホートに、800万個のCD 4 T細胞および200万個のCD8 T細胞を注入した。CD8 T細胞は、非形質導入（NTD）で放置したか、4-1BBもしくはCD28のいずれかの細胞内共刺激ドメインを含有する最適化された（EF1 -CD8 TM、レンチウイルスベクター）CD4- CAR、または臨床試験の（MMLVベース、PGK-CD4TM）CD4 CARを形質導入し、それぞれ、NTD、BBz、28z、およびCD4zと表した。CD8 T細胞の形質導入効率を、マウス中への注射の前に50%に正規化した。注射の3週間後に、移植植物を測定して、（図12A）ベースラインの末梢CD4 T細胞数および（図12C）CAR+ CD8 T細胞数を決定した。2日後に、尾静脈注射を介して、マウスにHIV-1 BaIを感染させた。感染の22日後に、（図12B）終点の末梢CD4 T細胞数および（図12D）CAR+ CD8 T細胞数を得た。感染の（図12E）7日後および（図12F）18日後に、血漿HIV RNAのコピーを測定した。マン-ホイットニー検定を使用して、統計学的有意性を決定した（p値：ns > 0.05、\* < 0.05、\*\* < 0.01、\*\*\* < 0.0001）。

【図13】図13A～13Cは、CCR5-ZFN改変CD4 CAR CD8 T細胞がインビボで濃縮されることを示す、一連のグラフである。図7に記載されたNSGマウスの実験設計において、CD8 T細胞に、活性化およびCD4 CAR形質導入の48時間前にCCR5 ZFN RNAをエレクトロポレーションしたか、または非形質導入（NTD）で放置した、4種類の追加のコホートを加えた。図13A：HIV感染の22日後に、脾臓CD8 T細胞を、HIV感染マウスから単離して、CCR5破壊頻度について分析した。図13B：HIV感染またはモック感染の22日後に単離した末梢血に対して、ヒトCD4およびCD8について染色し、フローサイトメトリーを行うことによって、CD4 CAR発現CD8 T細胞対非形質導入CD8 T細胞の比を決定した。フローサイトメトープロットを、図15に示す。図13C：感染の18日後に、血漿HIV RNAのコピーを、図12Fにおける通りであるが、組み入れられた4種類のZFN処置群で、HIV感染マウスにおいて測定した。有意性を、マン-ホイットニー検定を用いて検出した（p値：ns > 0.05、\* < 0.05、\*\* < 0.01、\*\*\* < 0.0001）。

【図14】HLA-DR形質導入K562細胞上の高レベルのMHCクラスII発現を示す、グラフである。HLA-DR \*0401形質導入K562細胞上のMHCクラスIIの高発現を確認するために、HLA-DR発現をフローサイトメトリーによって測定した。ゲーティング対照として、HL A-A2を形質導入したK562細胞、およびMHCクラスIIを高発現するRaji B細胞を染色した。3種類の細胞集団を重ね合わせるヒストグラムを示す。

【図15】4-1BB共刺激ドメインが、抗原の非存在下でT細胞のより良い存続を結果とし

10

20

30

40

50

てもたらすことを示す、一連のグラフである。モック感染の22日後に、BBzまたは28zを形質導入し、ZFN処置したマウスコホート由来の末梢血細胞または脾臓細胞を、CD4抗体およびCD8抗体でCAR発現について染色した。上のパネルは末梢血を示し、下のパネルは脾臓細胞を示す。HIV感染マウス由来のすべての場合において、1つの代表的なフロープロットを示す。

【図16】図16A～16Bは、CCR5 ZFN処置が、インビボでCD4 T細胞を保護するか、またはCAR<sup>+</sup> CD8 T細胞数を増大させるCD4 CAR CD8 T細胞の能力を改善しないことを実証する、一連のグラフである。図16A：終点の末梢血CD4 T細胞数を、図12Bに示された通りであるが、今回はCCR5 ZFN改変CD8 T細胞を同様に受けたマウス由来のデータを含み、HIV感染の22日後に収集した。(B)終点の末梢血CAR<sup>+</sup> CD8 T細胞数を、すべてのコホートにおいて感染の22日後に数えた。有意性を、マン-ホイットニー検定を用いて検出した(p値: ns > 0.05、\* < 0.05、\*\* < 0.01、\*\*\* < 0.0001)。

【図17】図17A～17Dは、元の臨床試験ベクターに対して本発明においてなされた改善を要約する、一連の表およびグラフである。図17A：元の臨床試験MMLVベースの構築物を改善するために探索した、改変の完全な一覧を示す表および略図。図17B：図2Cに要約された実験設計を用いて、初代ヒトCD8 T細胞を、CD3/CD28コーティングビーズで活性化し、非形質導入(NTD)で放置したか、PGKプロモーターによって駆動される元のMMLVベースのCD4ベースCAR(臨床試験CAR)を形質導入したか、または、HIVベースのレンチウイルスベクター中に配置した、最適化されたEF1-CD8 TM CARを形質導入した。形質導入効率を、共培養の前に60%に正規化した。HIV BaI感染CD4 T細胞との7日の共培養後に、表面CD4および細胞内Gag p24の発現を、CD8陰性T細胞に対してゲーティングして、フローサイトメトリーによって測定した。図17C：CD8陽性細胞に対するゲーティングを示す。図17D：CD8陰性細胞に対してゲーティングした、三連で行った単一の実験の要約データ。エラーバーは、平均値の標準偏差(SEM)を示す。このデータは、3回の独立した実験を代表する。

【図18】本発明の最適化されたHIV CD4 CARおよびHIV抗体ベースのCAR(SEQ ID N 0: 44～61)のいくつかについての、注釈つきのアミノ酸配列の一覧である。

【図19】本発明の最適化されたHIV CD4 CARおよびHIV抗体ベースのCAR(SEQ ID N 0: 63～79)のいくつかについての、注釈つきの核酸配列の一覧である。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0031】

###### 詳細な説明

###### 定義

別に定める場合を除き、本明細書で用いる技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書中に記載されたものと同様または同等な任意の方法および材料を本発明の試験のために実地に用いることができるが、本明細書では好ましい材料および方法について説明する。本発明の説明および特許請求を行う上では、以下の専門用語を用いる。

##### 【0032】

また、本明細書中で用いる専門用語は、特定の態様を説明することのみを目的とし、限定的であることは意図しないことも理解される必要がある。

##### 【0033】

「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、その冠詞の文法的目的語の1つまたは複数(すなわち、少なくとも1つ)を指して用いられる。一例として、「1つの要素」は、1つの要素または複数の要素を意味する。

##### 【0034】

量、時間的長さなどの測定可能な値に言及する場合に本明細書で用いる「約」は、特定された値からの±20%または±10%、より好ましくは±5%、さらにより好ましくは±1%、なおより好ましくは±0.1%のばらつきを範囲に含むものとするが、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。

10

20

30

40

50

**【 0 0 3 5 】**

「活性化」とは、本明細書で用いる場合、検出可能な細胞増殖を誘導するのに十分刺激されている、T細胞の状態のことを指す。活性化はまた、サイトカイン産生の誘導、および検出可能なエフェクター機能とも関連している。「活性化されたT細胞」という用語は、とりわけ、細胞分裂を起こしているT細胞のことを指す。

**【 0 0 3 6 】**

本明細書で用いる場合、「アダプター分子」という用語は、2種類以上の分子との相互作用を可能にし、ある特定の態様において、細胞傷害性細胞の活性化または不活性化を促進する配列を有するポリペプチドのことを指す。

**【 0 0 3 7 】**

「抗体」という用語は、本明細書で用いる場合、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子のことを指す。抗体は、天然供給源または組換え供給源に由来するインタクトな免疫グロブリンであってもよく、インタクトな免疫グロブリンの免疫応答部分であってもよい。抗体は典型的には、免疫グロブリン分子のテトラマーである。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')<sub>2</sub>、さらには一本鎖抗体(scFv)、およびヒト化抗体を含む、種々の形態で存在しうる(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

**【 0 0 3 8 】**

「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体のある部分のことを指し、インタクトな抗体の抗原決定可変領域のことも指す。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv断片、直鎖状抗体、scFv抗体、および抗体断片から形成される多重特異性抗体が非限定的に含まれる。

**【 0 0 3 9 】**

「抗体重鎖」とは、本明細書で用いる場合、その天然型高次構造にあるすべての抗体分子に存在する2種類のポリペプチドのうち、長い方のことを指す。

**【 0 0 4 0 】**

「抗体軽鎖」とは、本明細書で用いる場合、その天然型高次構造にあるすべての抗体分子に存在する2種類のポリペプチドのうち、短い方のことを指す。軽鎖および軽鎖とは、2種の主要な抗体軽鎖アイソタイプのことを指す。

30

**【 0 0 4 1 】**

「合成抗体」とは、本明細書で用いる場合、組換えDNA技術を用いて作製される抗体、例えば、本明細書に記載されたようなバクテリオファージによって発現される抗体などを意味する。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子の合成によって作製される抗体であつて、そのDNA分子が抗体タンパク質またはその抗体を指定するアミノ酸配列を発現し、そのDNA配列またはアミノ酸配列が、利用可能であつて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るような抗体も意味するとみなされるべきである。

40

**【 0 0 4 2 】**

「抗原」または「Ag」という用語は、本明細書で用いる場合、免疫応答を誘発する分子と定義される。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うる。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の役を果たしうることを理解するであろう。その上、抗原が組換えDNAまたはゲノムDNAに由来してもよい。当業者は、免疫応答を惹起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、それ故に、本明細書中で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。その上、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も理解するであろう。本発明が複数の遺伝子の部分ヌクレオチド配列

50

の使用を非限定期に含むこと、およびこれらのヌクレオチド配列が所望の免疫応答を惹起するさまざまな組み合わせで並べられていることは直ちに明らかである。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が全くないことも理解するであろう。抗原は作製される、合成される、または生物試料に由来することもできることは直ちに明らかである。そのような生物試料には、組織試料、腫瘍試料、細胞または生体液が非限定期に含まれうる。

#### 【0043】

「抗腫瘍効果」という用語は、本明細書で用いる場合、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞の数の減少、転移の数の減少、平均余命の増加、またはがん性状態と関連するさまざまな生理学的症状の回復によって顕在化されうる生物学的效果のことを指す。「抗腫瘍効果」はまた、最初の場所での腫瘍の発生の阻止における、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞、および抗体の能力によっても顕在化されうる。

10

#### 【0044】

「自己抗原」という用語は、本発明に従って、外来性であると免疫系により認識される任意の自己抗原を意味する。自己抗原には、細胞タンパク質、リンタンパク質、細胞表面タンパク質、細胞脂質、核酸、細胞表面受容体を含む糖タンパク質が非限定期に含まれる。

#### 【0045】

「自己免疫疾患」という用語は、本明細書で用いる場合、自己免疫応答に起因する障害として定義される。自己免疫疾患は、自己抗原に対する不適切なかつ過剰な応答の結果である。自己免疫疾患の例には、とりわけ、アジソン病、円形脱毛症、強直性脊椎炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、糖尿病（I型）、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、血管炎、白斑、粘液水腫、悪性貧血、潰瘍性大腸炎が非限定期に含まれる。

20

#### 【0046】

本明細書で用いる場合、「自己由来」という用語は、後にその個体中に再導入される、同じ個体に由来する任意の材料のことを指すものとする。

#### 【0047】

「同種」とは、同じ種の異なる動物に由来する移植片のことを指す。

30

#### 【0048】

「異種」とは、異なる種の動物に由来する移植片のことを指す。

#### 【0049】

「広域中和抗体（bnAb）」という用語は、細胞を特定のウイルスの複数の株から、その効果を中和することによって防御する抗体のことを指す。いくつかの態様において、広域中和HIV-1抗体（bnAb）は、複数のHIV-1ウイルス株を中和する中和抗体である。

#### 【0050】

「がん」という用語は、本明細書で用いる場合、異常細胞の急速かつ制御不能な増殖を特徴とする疾患と定義される。がん細胞は局所的に広がることもある。または血流およびリンパ系を通じて身体の他の部分に広がることもある。さまざまがんの例には、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、大腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がんなどが非限定期に含まれる。

40

#### 【0051】

「CD4」という用語は、本明細書で用いる場合、CD4をコードする核酸配列のコドン最適化を通して作製されているCD4のアミノ酸配列を含む、任意の供給源由来のCD4を特定する任意のアミノ酸配列を意味する。コドン最適化は、アミノ酸配列においてコドンを最適化するように設計された任意の利用可能な技術およびアルゴリズムを用いて達成されてもよい。

#### 【0052】

「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、本明細書で用いる場合、免疫エフェ

50

クター細胞上に発現して、抗原に特異的に結合するように操作されている人工T細胞受容体のことを指す。CARは、養子細胞移入を伴う治療法として使用されてもよい。T細胞を、患者から取り出して、それらが特定形態の抗原に対して特異的な受容体を発現するよう に改変する。いくつかの態様において、CARは、例えば、腫瘍関連抗原に対する特異性を有して発現している。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を含んでもよい。いくつかの局面において、CARは、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインに融合した、モノクローナル抗体由来の一本鎖可変断片 (scFv) の融合物を含む。CAR設計の特異性は、受容体のリガンド（例えば、ペプチド）に由来してもよい。いくつかの態様において、CARは、HIV関連抗原に特異的な CARを発現するT細胞の特異性を再度方向付けることによって、HIV感染細胞を標的とすることができる。

10

#### 【 0 0 5 3 】

「キメラ細胞内シグナル伝達分子」という用語は、1つまたは複数の共刺激分子の1つまたは複数の細胞内ドメインを含む、組換え受容体のことを指す。キメラ細胞内シグナル伝達分子は、細胞外ドメインが実質的に欠如している。いくつかの態様において、キメラ細胞内シグナル伝達分子は、膜貫通ドメイン、検出可能なタグ、およびスペーサードメインなどの、追加的なドメインを含む。

#### 【 0 0 5 4 】

本明細書で用いる場合、「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に有意に影響することもそれを有意に変化させることもないアミノ酸改変を指すことを意図している。そのような保存的改変には、アミノ酸の置換、付加および欠失が含まれる。改変は、当技術分野において公知の標準的な手法、例えば部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介性突然変異誘発などによって、本発明の抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えるもののことである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において明確に定められている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。このため、抗体のCDR領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基によって置き換えることができ、改変された抗体を、本明細書に記載の機能アッセイを用いて、抗原と結合する能力に関して試験することができる。

20

#### 【 0 0 5 5 】

「共刺激リガンド」とは、この用語が本明細書で用いられる場合、T細胞上のコグネイト共刺激分子と特異的に結合し、それにより、例えば、ペプチドが負荷されたMHC分子のT CR / CD3複合体への結合によって与えら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も与えることのできる、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上の分子が含まれる。共刺激リガンドには、CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド (ICOS-L)、細胞内接着分子 (ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンホトキシン 受容体、3 / TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3と特異的に結合するリガンドが非限定的に含まれる。共刺激リガンドはまた、とりわけ、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、ただしこれらに限定されない、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

30

40

50

ガンドも範囲に含む。

**【 0 0 5 6 】**

「共刺激分子」とは、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、増殖などの、ただしこれに限定されない、T細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上のコグネイト結合パートナーのことを指す。共刺激分子には、TCR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD3、CD86、共通FcR、FcR(Fc R1b)、CD79a、CD79b、Fc RIa、DAP10、DAP12、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特異的結合リガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、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、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(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、本明細書に記載の他の共刺激分子、それらの任意の誘導体、バリエント、または断片、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が非限定的に含まれる。

10

20

**【 0 0 5 7 】**

「共刺激シグナル」とは、本明細書で用いる場合、TCR/CD3ライゲーションなどの一次シグナルと組み合わせて、T細胞増殖および/または鍵分子の上方制御もしくは下方制御をもたらすシグナルのことを指す。

**【 0 0 5 8 】**

「細胞傷害性」または「細胞傷害」という用語は、細胞を殺傷または損傷することを指す。1つの態様において、改変細胞の細胞傷害は、例えば、T細胞の細胞溶解活性を増加させて、改善される。

**【 0 0 5 9 】**

「疾患」とは、動物が恒常性を維持できず、疾患が回復されない場合には、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」とは、動物が恒常性を維持することができるが、動物の健康状態が、障害の非存在下で考えられるよりも順調ではない、健康状態である。障害は、無処置で放置しても、必ずしも動物の健康状態のさらなる低下を引き起こさない。

30

**【 0 0 6 0 】**

「有効量」または「治療的有効量」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かまたは治療的もしくは予防的有益性をもたらすために有効な、本明細書に記載するような化合物、製剤、材料または組成物の量のことを指す。そのような結果には、当技術分野における好適な任意の手段によって判定される、抗腫瘍活性が非限定的に含まれる。

40

**【 0 0 6 1 】**

「コードする」とは、所定のヌクレオチド配列(すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA)または所定のアミノ酸配列のいずれか、およびそれに起因する生物学的特性を有する、生物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テンプレートとして働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAなどのポリヌクレオチド中の特定のヌクレオチド配列の固有の特性のことを指す。すなわち、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、そのタンパク質をコードする。mRNA配列と同一であって通常は配列表として提示されるヌクレオチド配列を有するコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のためのテンプレートとして用いられる非コード鎖の両方を、タンパク質、またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードす

50

ると称することができる。

**【 0 0 6 2 】**

本明細書で用いる場合、「内因性」とは、生物体、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產生される、任意の材料のことを指す。

**【 0 0 6 3 】**

本明細書で用いる場合、「外因性」という用語は、生物体、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產生される、任意の材料のことを指す。

**【 0 0 6 4 】**

「増大させる」という用語は、本明細書で用いる場合、T細胞の数の増加のように、数が増加することを指す。1つの態様において、エクスピボで増大するT細胞は、培養に元々存在していた数に比べて数が増加する。もう1つの態様において、エクスピボで増大するT細胞は、培養における他の細胞タイプに比べて数が増加する。「エクスピボ」という用語は、本明細書で用いる場合、生きている生物（例えば、ヒト）から取り出され、生物の外部で（例えば、培養ディッシュ、試験管、またはバイオリアクターにおいて）増殖している細胞のことを指す。

10

**【 0 0 6 5 】**

「発現」という用語は、本明細書で用いる場合、そのプロモーターによって作動す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。

**【 0 0 6 6 】**

「発現ベクター」とは、発現させようとするヌクレオチド配列と機能的に連結した発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターのことを指す。発現ベクターは、発現のために十分なシス作用エレメントを含む；発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、またはインビトロ発現系において供給されうる。発現ベクターには、組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）およびウイルス（例えば、レンチウイルス、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）といった、当技術分野において公知であるすべてのものが含まれる。

20

**【 0 0 6 7 】**

「ヒト免疫不全ウイルス」または「HIV」という用語は、本明細書で用いる場合、HIV-1およびHIV-2を非限定的に含む、当技術分野において公知のまたは以前は知られていなかった任意のHIV株またはバリエントを意味する。

30

**【 0 0 6 8 】**

「相同な」とは、本明細書で用いる場合、2つのポリマー分子の間、例えば、2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子などの2つの核酸分子の間、または2つのポリペプチド分子の間のサブユニット配列同一性のことを指す。2つの分子の両方においてあるサブユニット位置が同じ単量体サブユニットで占められているならば；例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおいてある位置がアデニンによって占められているならば、それはその位置で相同である。2つの配列間の相同性は、一致するかまたは相同な位置の数の直接的な関数である；例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、長さが10サブユニットであるポリマーにおける5つの位置）が相同であるならば、2つの配列は50%相同である；位置の90%（例えば、10のうち9）が一致するかまたは相同であるならば、2つの配列は90%相同である。核酸またはタンパク質に適用した際、「相同」とは、本明細書で用いる場合、約50%の配列同一性を有する配列のことを指す。より好ましくは、相同配列は、約75%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する。

40

**【 0 0 6 9 】**

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそれらの断片（Fv、Fab、Fab'、F(ab')2、または抗体の他の抗原結合性部分配列など）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

50

、親和性、および能力を有する、マウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種（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）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。その上、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、インポートされたCDR配列またはフレームワーク配列のいずれ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精緻化し、最適化するために加えられる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、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と考えられ、ここで、CDR領域のすべてまたは実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべては、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、最適には、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も含むと考えられる。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。

10

#### 【0070】

「完全ヒト」とは、分子全体がヒト起源であるか、またはヒト型の抗体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のことを指す。

#### 【0071】

「同一性」とは、本明細書で用いる場合、2つのポリマー分子の間、特に、2つのポリペプチド分子の間などの2つのアミノ酸分子の間の、サブユニット配列同一性のことを指す。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それそれにおいてある位置がアルギニンによって占められているならば、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ンメントにおいて同じ位置で同じ残基を有する同一性または程度は、しばしばパーセンテージとして表現される。2つのアミノ酸配列間の同一性は、一致するかまたは同一の位置の数の直接的な関数である；例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、長さが10アミノ酸であるポリマーにおける5つの位置）が同一であるならば、2つの配列は50%同一である；位置の90%（例えば、10のうち9）が一致するかまたは同一であるならば、2つのアミノ酸配列は90%同一である。

20

#### 【0072】

「実質的に同一の」とは、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか1つ）または核酸配列（例えば、本明細書に記載の核酸配列のいずれか1つ）に対して少なくとも50%の同一性を呈するポリペプチドまたは核酸分子を意味する。好ましくは、そのような配列は、比較のために使用される配列に対してアミノ酸レベルまたは核酸で、少なくとも60%、より好ましくは80%または85%、およびより好ましくは90%、95%、またはさらに99%同一である。

30

#### 【0073】

ガイド核酸配列は、二本鎖DNA標的部位の1本の鎖（ヌクレオチド配列）に対して相補的であってもよい。ガイド核酸配列と標的配列との間の相補性のパーセンテージは、少なくとも50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、63%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であることができる。ガイド核酸配列は、長さが少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35ヌクレオチド、またはそれより多いヌクレオチドであることができる。いくつかの態様において、ガイド核酸配列は、10～40ヌクレオチドの連続ストレッチを含む。可変ターゲティングドメインは、DNA配列、RNA配列、改变DNA配列、改变RNA配列（例えば、本明細書に記載の改変を参照されたい）、またはそれらの任意の組み合わせから構成されうる。

40

#### 【0074】

50

配列同一性は、典型的に、配列解析ソフトウェア（例えば、Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705のSequence Analysis Software Package、BLAST、BESTFIT、GAP、またはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を用いて測定される。そのようなソフトウェアは、さまざまな置換、欠失、および／または他の改変に対して相同性の程度を割り当てるこによって、同一配列または類似配列を見つける。保存的置換は、典型的に、以下の群内での置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定する例示的なアプローチにおいて、BLASTプログラムを、密接に関連した配列を示すe-3～e-100の間の確率スコアで使用してもよい。

10

#### 【0075】

「免疫グロブリン」または「Ig」という用語は、本明細書で用いる場合、抗体として機能する、タンパク質のクラスとして定義される。B細胞が発現する抗体は、時に、BCR（B細胞受容体）または抗原受容体と称される。このクラスのタンパク質に含まれる5種類のメンバーは、IgA、IgG、IgM、IgD、およびIgEである。IgAは、唾液、涙、母乳、胃腸管分泌物、ならびに、呼吸器管および尿生殖器管の粘液分泌物などの、身体分泌物中に存在する一次抗体である。IgGは、最も一般的な循環抗体である。IgMは、大部分の対象における一次免疫応答において產生される、主要な免疫グロブリンである。それは、凝集反応、補体固定、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、知られていない抗体機能を有するが、抗原受容体として働く可能性がある免疫グロブリンである。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ー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。

20

#### 【0076】

「免疫応答」という用語は、本明細書で用いる場合、リンパ球が抗原性分子を外来として同定し、抗体の形成を誘導し、かつ／または抗原を除去するためにリンパ球を活性化する場合に起こる、抗原に対する細胞性応答として定義される。

#### 【0077】

本明細書で用いる場合、「説明材料（instructional material）」には、本発明の組成物および方法の有用性を伝えるために用いられる、刊行物、記録、略図または他の任意の表現媒体が含まれる。本発明のキットの説明材料は、例えば、本発明の核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物を含む容器に添付してもよく、または核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物を含む容器と一緒に出荷してもよい。または、説明材料および化合物がレシピエンタによって一体として用いられることを意図して、説明材料を容器と別に出荷してもよい。

30

#### 【0078】

「単離された」とは、天然の状態から変更されるかまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きた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、その天然の状態で共存する物質から部分的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もでき、または例えば宿主細胞などの非ネイティブ性環境で存在することもできる。

40

#### 【0079】

「KIR」とは、キラー細胞免疫グロブリン様受容体を意味し、KIRは、ヒトおよび非ヒト靈長類において特徴決定されており、NK細胞およびいくつかのT細胞を含むある特定のサブセットのリンパ球上に存在する、多形性1型膜貫通分子である。KIRは、MHCクラスI分子の1および2ドメインにおける決定基と相互作用することによって、NK細胞の殺傷機能を制御する。この相互作用により、それらは、ウイルス感染細胞または腫瘍細胞を検出することが可能になる。大部分のKIRは阻害性であり、これは、それらのMHCの認識が、それらを発現するNK細胞の細胞傷害活性を抑制することを意味する。限定された数のKIRの

50

みが、細胞を活性化する能力を有する。KIR遺伝子ファミリーは、19番染色体(19q13.4)上に位置する白血球受容体複合体(LRC)の100~200 Kb領域内にコードされる、少なくとも15種類の遺伝子座(KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3)および2種類の偽遺伝子(KIR2DP1およびKIR3DP1)を有する。LRCは、特徴的なIg様細胞外ドメインを有する他の細胞表面分子をコードする遺伝子を含有する、急速に進化する免疫遺伝子の大きな1Mbの高密度のクラスタを構成している。加えて、拡張されたLRCは、膜貫通アダプター分子であるDAP10およびDAP12をコードする遺伝子を含有する。

## 【0080】

10

「レンチウイルス」とは、本明細書で用いる場合、レトロウイルス科の属のことを指す。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染できる点で、レトロウイルスの中でも特有であり；宿主細胞のDNA中に有意な量の遺伝子情報を送達することができ、そのため、それらは、遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法のうちの1つである。HIV、SIV、およびFIVが、レンチウイルスのすべての例である。レンチウイルス由来のベクターは、インビオで有意なレベルの遺伝子移入を達成する手段を提供する。

## 【0081】

「改変された」という用語は、本明細書で用いる場合、本発明の分子または細胞の状態または構造が変化していることを意味する。分子は、化学的、構造的および機能的を含む、多くの方法で改変することができる。細胞は核酸の導入によって改変することができる。

20

## 【0082】

「モジュレートすること」という用語は、本明細書で用いる場合、処置もしくは化合物の非存在下でのその対象における反応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反応のレベルと比較して、対象における反応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、ネイティブ性のシグナルまたは反応を擾乱させるか、および/またはそれに影響を及ぼして、それにより、有益な治療反応を媒介することを範囲に含む。

## 【0083】

本発明に関連して、一般的に存在する核酸塩基に関しては以下の略号を用いる。「A」はアデノシンを指し、「C」はシトシンを指し、「G」はグアノシンを指し、「T」はチミジンを指し、「U」はウリジンを指す。

30

## 【0084】

別に指定する場合を除き、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、相互に縮重型であって、同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチドが含まれる。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には、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が一部の型においてインtronを含みうる限り、インtronも含まれうる。

## 【0085】

40

「機能的に連結した」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す機能的連結のことを指す。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している。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及ぼすならば、プロモーターはコード配列と機能的に連結している。一般に、機能的に連結したDNA配列は連続しており、2つのタンパク質コード領域を連結することが必要な場合には、同一のリーディングフレーム内にある。

## 【0086】

「過剰発現した」腫瘍抗原または腫瘍抗原の「過剰発現」という用語は、患者の特異的な組織または臓器内の固形腫瘍のような疾患区域由来の細胞における腫瘍抗原の発現の、その組織または臓器由来の正常細胞における発現のレベルに比べて異常なレベルを示すことを意図している。腫瘍抗原の過剰発現を特徴とする固形腫瘍または血液学的悪性腫瘍を有

50

する患者は、当技術分野において公知の標準的なアッセイにより決定することができる。

**【 0 0 8 7 】**

免疫原性組成物の「非経口的」投与には、例えば、例えば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)または胸骨内の注射法または注入法が含まれる。

**【 0 0 8 8 】**

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で用いる場合、ヌクレオチドの連鎖と定義される。その上、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書で用い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、それらはモノマー性「ヌクレオチド」に加水分解されうるという一般知識を有する。モノマー性ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解されうる。本明細書で用いるポリヌクレオチドには、組換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCR(商標)などを用いて組換えライブラリーまたは細胞ゲノムから核酸配列をクローニングすること、および合成手段を非限定的に含む、当技術分野で利用可能な任意の手段によって得られる、すべての核酸配列が非限定的に含まれる。

10

**【 0 0 8 9 】**

本明細書で用いる場合、「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したアミノ酸残基で構成される化合物のことを指す。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しう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結合した2つまたはそれ以上の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。本明細書で用いる場合、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称される短鎖、ならびに当技術分野において一般にタンパク質と称される長鎖の両方のことを指し、それらには多くの種類がある。「ポリペプチド」には、いくつか例を挙げると、例えば、生物学的活性断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドのバリエント、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。

20

**【 0 0 9 0 】**

「プロモーター」という用語は、本明細書で用いる場合、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるために必要な、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列と定義される。

30

**【 0 0 9 1 】**

本明細書で用いる場合、「プロモーター／調節配列」という用語は、プロモーター／調節配列と機能的に連結した遺伝子産物の発現のために必要とされる核酸配列を意味する。ある場合には、この配列はコアプロモーター配列であってよく、また別の場合には、この配列が、遺伝子産物の発現に必要とされるエンハンサー配列および他の制御エレメントをも含んでもよい。プロモーター／調節配列は、例えば、組織特異的な様式で遺伝子産物を発現させるものであってもよい。

40

**【 0 0 9 2 】**

「構成性」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、細胞のほとんどまたはすべての生理学的条件下で、その遺伝子産物が細胞内で產生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

**【 0 0 9 3 】**

「誘導性」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、実質的にはそのプロモーターに対応する誘導物質が細胞内に存在する場合にのみ、その遺伝子産物が細胞内で产生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

**【 0 0 9 4 】**

「組織特異的」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレ

50

オチドと機能的に連結された場合に、実質的には細胞がそのプロモーターに対応する組織型の細胞である場合にのみ、その遺伝子産物が細胞内で產生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

【0095】

「免疫抑制に対して抵抗性」という用語は、免疫系の活性または活性化の抑制の欠如または低下した抑制のことを指す。

【0096】

「シグナル伝達経路」とは、細胞の1つの部分から細胞の別の部分へのシグナルの伝達に役割を果たす種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係のことを指す。「細胞表面受容体」という語句は、シグナルを受け取って、細胞の原形質膜をまたいでシグナルを伝達することができる分子および分子の複合体を含む。10

【0097】

「一本鎖抗体」とは、免疫グロブリンの重鎖断片および軽鎖断片が、アミノ酸の操作されたスパンを介して連結されてFv領域となる、組換えDNA手法によって形成される抗体のことを指す。米国特許第4,694,778号；Bird (1988) Science 242:423-442；Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；Ward et al. (1989) Nature 334:54454；Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041に記載されているものを含む、一本鎖抗体を作製するさまざまな方法が、公知である。

【0098】

「特異的に結合する」という用語は、抗体に関して本明細書で用いる場合、特異的な抗原を認識するが、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はまた、1つまたは複数の種由来のその抗原に結合する可能性がある。しかし、そのような種交差反応性自体は、特異的としての抗体の分類を変更しない。もう1つの例において、抗原に特異的に結合する抗体はまた、抗原の異なる対立形質に結合する可能性がある。しかし、そのような交差反応性自体は、特異的としての抗体の分類を変更しない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合すること」という用語は、抗体、タンパク質、またはペプチドの、第2の化学種との相互作用に関して、その相互作用が、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ように使用することができ；例えば、抗体は、一般にタンパク質よりも、特定のタンパク質構造を認識して結合する。抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、エピトープAを含有する分子（または遊離の非標識A）の存在は、標識「A」および抗体を含有する反応において、抗体に結合した標識Aの量を低減させるであろう。2030

【0099】

「刺激」という用語は、刺激分子（例えば、TCR / CD3複合体）がそのコグネイトリガンドと結合して、それにより、TCR / CD3複合体を介するシグナル伝達などの、ただしこれには限定されないシグナル伝達イベントを媒介することによって誘導される、一次応答のことを意味する。刺激は、TGF- $\beta$ の下方制御、および/または細胞骨格構造の再構築などのような、ある種の分子の発現の改変を媒介することができる。

【0100】

「刺激分子」とは、この用語が本明細書で用いられる場合、抗原提示細胞上および/または腫瘍細胞上に存在するコグネイト刺激リガンドに特異的に結合する、T細胞上の分子のことを意味する。

【0101】

「刺激リガンド」は、本明細書で用いる場合、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上または腫瘍細胞上に存在する場合に、T細胞上のコグネイト結合パートナー（本明細書では「刺激分子」と称する）と特異的に結合して、それにより、活性化、免疫応答の開始、増殖などを非限定的に含む、T細胞による一次応答を媒介することができるリガンドのことを意味する。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、4050

およびスーパーアゴニスト抗CD2抗体を範囲に含む。

【0102】

「対象」という用語は、免疫応答を惹起させることができる、生きている生物（例えば、哺乳動物）を含むことを意図している。「対象」または「患者」は、その中で用いる場合、ヒトまたは非ヒト哺乳動物であってよい。非ヒト哺乳動物には、例えば、家畜および愛玩動物、例えばヒツジ、ウシ科動物、ブタ、イヌ科動物、ネコ科動物およびネズミ科の哺乳動物などが含まれる。好ましくは、対象はヒトである。

【0103】

本明細書で用いる場合、「細胞外ドメインが実質的に欠如している」という用語は、細胞外に突出するドメインを本質的に含まない分子のことを指す。1つの態様において、キメラ細胞内シグナル伝達分子は、抗原結合などの細胞外ドメインによって行われる任意の機能が欠如している。もう1つの態様において、キメラ細胞内シグナル伝達分子は、膜貫通ドメインを含むが、機能的な細胞外ドメインが欠如している。

10

【0104】

本明細書で用いる場合、「実質的に精製された」細胞とは、他の細胞型を本質的に含まない細胞のことである。また、実質的に精製された細胞は、その天然の状態に本来付随する他の細胞型から分離された細胞のことも指す。場合によっては、実質的に精製された細胞の集団とは、均一な細胞集団のことを指す。また別の場合には、この用語は、単に、天然の状態において本来付随する細胞から分離された細胞のことを指す。いくつかの態様において、細胞はインビトロで培養される。他の態様において、細胞はインビトロでは培養されない。

20

【0105】

「標的部位」または「標的配列」とは、結合が起こるのに十分な条件下で結合分子が特異的に結合しうる核酸の部分を規定するゲノム核酸配列のことを指す。

【0106】

本明細書で用いる場合、「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、抗原の提示に応答したT細胞の活性化に関する膜タンパク質の複合体のことを指す。TCRは主要組織適合複合体分子と結合した抗原を認識する原因となる。TCRは、アルファ(α)およびベータ(β)鎖のヘテロダイマーで構成されるが、一部の細胞では、TCRはガンマおよびデルタ(γ/δ)鎖からなる。TCRはα/β形態およびγ/δ形態で存在することもあり、これらは構造的に類似しているが、解剖学的な部位および機能は異なる。各鎖は2つの細胞外ドメイン、1つの可変ドメインおよび1つの定常ドメインからなる。いくつかの態様において、TCRは、例えば、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、およびγ/δT細胞を含む、TCRを含む任意の細胞上で改変することができる。

30

【0107】

「治療的」という用語は、本明細書で用いる場合、処置および/または予防を意味する。治療効果は、疾病状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。

【0108】

「トランスフェクトされた」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、本明細書で用いる場合、外因性核酸が宿主細胞内に移入または導入される過程のことを指す。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞とは、外因性核酸によってトランスフェクトされた、形質転換された、または形質導入されたもののことである。この細胞には初代対象細胞およびその子孫が含まれる。

40

【0109】

疾患を「処置する」とは、用語を本明細書で用いる場合、対象が経験す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させることを意味する。

【0110】

「腫瘍」という用語は、本明細書で用いる場合、良性、前がん性、悪性、または転移性でありうる組織の異常な成長のことを指す。

50

**【 0 1 1 1 】**

「転写制御下」または「機能的に連結した」という語句は、本明細書で用いる場合、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するため正しい位置および向きにあることを意味する。

**【 0 1 1 2 】**

「ベクター」とは、単離された核酸を含み、かつその単離された核酸を細胞の内部に送達するために用いられる組成物のことである。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会合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを非限定的に含む数多くのベクターが、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、自律複製性プラスミドまたはウイルスを含む。この用語は、例えばポリリジン化合物、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も含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例には、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などが非限定的に含まれる。

10

**【 0 1 1 3 】**

範囲：本開示の全体を通じて、本発明のさまざまな局面を、範囲形式で提示することができる。範囲形式による記載は、単に便宜上かつ簡潔さのためであって、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定とみなされるべきではないことが理解される必要がある。したがって、ある範囲の記載は、その範囲内におけるすべての可能な部分的範囲とともに、個々の数値も具体的に開示されていると考慮されるべきである。例えば、1～6などの範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの部分的範囲とともに、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も、具体的に開示されていると考慮されるべきである。これは範囲の幅広さとは関係なく適用される。

20

**【 0 1 1 4 】****説明**

本発明は、CD4膜結合型キメラ受容体またはHIV特異的なscFvキメラ抗原受容体（CAR）を用いた、HIV感染症の処置のための組成物および方法を含む。本発明に従って、T細胞は、HIV感染細胞を特異的に認識して結合することができるCD4の断片またはscFvを発現することにより、養子T細胞療法のために改変される。本発明の改変T細胞は、HIV感染細胞に対して特異的であり、HIV感染症に対する改善された細胞傷害および有効性を有する。

30

**【 0 1 1 5 】****HIV特異的なCD4膜結合型キメラ受容体**

本発明は、CD4ドメイン、特に、HIVビリオンまたはHIV感染細胞に特異的に結合するCD4細胞外ドメインを含む、膜結合型キメラ受容体を含む。ある特定の態様において、本発明のCD4膜結合型キメラ受容体は、本明細書において開示されるような特定のアミノ酸配列またはペプチドなどの、特定の構造的特徴を含む。本発明はまた、そのような受容体を作る方法も含む。本発明の膜結合型キメラ受容体は、対象の処置における使用、例えば免疫療法としての使用のために、薬学的組成物中に組み入れることができる。したがって、本発明は、HIV感染症またはHIV関連疾患を処置するための組成物および方法を提供する。

40

**【 0 1 1 6 】**

1つの局面において、本発明は、CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む膜結合型キメラ受容体をコードする単離された核酸配列であって、該CD4細胞外ドメインが、HIV感染細胞を認識して結合することができる単離された核酸配列を含む。もう1つの局面において、本発明は、CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む膜結合型キメラ受容体をコードする単離されたアミノ酸配列であって、該CD4細胞外ドメインが、HIV感染細胞を認識して結合することができる単離されたアミノ酸配列を含む。

**【 0 1 1 7 】**

1つの態様において、CD4細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 3、46、または64を含み、膜貫通ドメインは、CD8 ヒンジ（SEQ ID NO: 4、47、または65）、ならびに、CD8 膜

50

貫通ドメイン (SEQ ID NO: 5、48、または66) およびCD28膜貫通ドメイン (SEQ ID NO: 8、49、または67) からなる群より選択される少なくとも1つのドメインを含む膜貫通ドメインを含む。もう1つの態様において、シグナル伝達ドメインは、CD3 シグナル伝達ドメイン (SEQ ID NO: 6、51、または68) を含む。さらにもう1つの態様において、共刺激シグナル伝達領域は、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、CD83特異的結合リガンドからなる群より選択される共刺激分子の細胞内ドメイン、およびそれらの任意の組み合わせを含む。さらにもう1つの態様において、共刺激シグナル伝達領域CD28 (SEQ ID NO: 9、49、または67) が、構築物中に存在する。さらなる態様において、CD4細胞外ドメインは、HIVエンベロープ (Env) 糖タンパク質に特異的に結合する。

10

#### 【0118】

1つの局面において、本発明は、真核生物伸長因子 (EF1) プロモーター、CD4細胞外ドメイン、CD8 ヒンジ、CD8 膜貫通ドメイン、およびCD3 シグナル伝達ドメインを含むベクターを含む (SEQ ID NO: 1)。もう1つの局面において、本発明は、EF1 プロモーター、CD4細胞外ドメイン、CD8 ヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメイン、およびCD3 シグナル伝達ドメインを含むベクターを含む (SEQ ID NO: 7)。さらにもう1つの局面において、本発明は、CD4細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む膜結合型キメラ受容体を含むベクターであって、該CD4細胞外ドメインが、HIV感染細胞を認識して結合することができるベクターを含み、該ベクターは、SEQ ID NO: 44、45、62、および63からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。

20

#### 【0119】

1つの態様において、膜結合型キメラ受容体は、SEQ ID NO: 30、32、または64の核酸配列によってコードされる。もう1つの態様において、膜結合型キメラ受容体は、SEQ ID NO: 31、33、または46のアミノ酸配列を有する。

#### 【0120】

##### CD4細胞外ドメイン

CD4は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、4つの細胞外免疫グロブリンドメイン (D1～D4) を含む。D1およびD3は、免疫グロブリン可変ドメインに類似しており、D2およびD4は、免疫グロブリン定常ドメインに類似している。D1は、主要組織適合複合体クラスII分子の 2-ミクログロブリンと相互作用するCD4の領域を含む。

30

#### 【0121】

1つの態様において、膜結合型キメラ受容体は、CD4の細胞外ドメインまたはその断片を含む。もう1つの態様において、膜結合型キメラ受容体は、CD4の少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。もう1つの態様において、CD4細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 3または64を含む。

#### 【0122】

本明細書に記載のCD4細胞外ドメイン、例えば、CD4の少なくとも1つの免疫グロブリンドメイン、またはSEQ ID NO: 3もしくは64を含むCD4細胞外ドメインは、本明細書に記載の膜貫通ドメインのいずれか、本明細書に記載のシグナル伝達ドメインのいずれか、または膜結合型キメラ受容体に含まれ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。

40

#### 【0123】

##### 膜貫通ドメイン

1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD4キメラ抗原受容体構築物においてドメインのうちの1つと会合している。場合によっては、膜貫通ドメインを、そのようなドメインの同じかまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに対する結合を回避して、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するために、選択するか、またはアミノ酸置換によって改変することができる。

50

**【 0 1 2 4 】**

膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来しうる。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合型タンパク質または膜貫通タンパク質に由来しうる。特定の用途の膜貫通領域は、T細胞受容体の鎖、鎖、または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来しうる（すなわち、それらの少なくとも膜貫通領域を含む）。場合によっては、ヒトIg（免疫グロブリン）ヒンジを含む種々のヒトヒンジを、同様に使用することができる。1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD8 ヒンジおよび膜貫通ドメインを含む。

**【 0 1 2 5 】**

1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD8 膜貫通ドメイン（SEQ ID NO: 5または66）を含む。もう1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメイン（SEQ ID NO: 8または67）を含む。さらにもう1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD8 ヒンジ（SEQ ID NO: 4または65）などのヒンジドメインを含む。膜貫通ドメインは、任意のヒンジドメインと組み合わせてもよく、および／または、本明細書に記載の1つまたは複数の膜貫通ドメインを含んでもよい。

**【 0 1 2 6 】**

本明細書に記載の膜貫通ドメイン、例えば、T細胞受容体の鎖、鎖、または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、またはCD154の少なくとも膜貫通領域は、本明細書に記載のCD4細胞外ドメインのいずれか、本明細書に記載のシグナル伝達ドメインのいずれか、または膜結合型キメラ受容体に含まれう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。

**【 0 1 2 7 】**

もう1つの態様において、膜貫通ドメインは、合成であってもよく、その場合、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。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが、合成膜貫通ドメインの各末端に存在する。任意で、好ましくは長さが2～10アミノ酸の短いオリゴリンカーまたはポリペプチドリンカーが、膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成しうる。グリシン-セリンダブルレットは、特に適したリンカーを提供する。

**【 0 1 2 8 】**シグナル伝達ドメイン

シグナル伝達ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、CD4キメラ抗原受容体構築物が発現している免疫細胞の正常なエフェクター機能のうちの少なくとも1つの活性化の原因である。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特化した機能のことを指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性でありうる。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」または「シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞が特化した機能を果たすように方向付ける、タンパク質の一部分のことを指す。通常はシグナル伝達ドメイン全体を使用することができるが、多くの場合には、分子全体を用いることが必要ではない。シグナル伝達ドメインの短縮部分が用いられる範囲内において、そのような短縮部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、無傷の鎖の代わりに用いられてもよい。シグナル伝達ドメインという用語は、したがって、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、シグナル伝達ドメインの任意の短縮部分を含むものとする。

**【 0 1 2 9 】**

本発明における使用のためのシグナル伝達ドメインの例には、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するように協力して作用する、T細胞受容体（TCR）および共受容体の細胞質配列、ならびに、これらの配列の任意の誘導体またはバリエント、および同じ機能的能力を有する任意の合成配列が含まれる。

**【 0 1 3 0 】**

10

20

30

40

50

TCRのみを通して生成されたシグナルは、T細胞の完全な活性化には不十分であること、および、二次シグナルまたは共刺激シグナルも必要とされることが公知である。したがって、T細胞活性化は、2つの別個のクラスの細胞質シグナル伝達配列：TCRを通して抗原依存性の一次活性化を開始するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）および抗原非依存性様式で作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供するもの（二次細胞質シグナル伝達配列）によって媒介されると言うことができる。

#### 【0131】

一次細胞質シグナル伝達配列は、刺激性方法または阻害性方法のいずれかで、TCR複合体の一次活性化を制御する。刺激性様式で作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシン活性化モチーフまたはITAMとして公知であるシグナル伝達モチーフを含有する。

10

#### 【0132】

本発明において特に役に立つ、ITAMを含有する一次細胞質シグナル伝達配列の例には、TCR、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d由来のものが含まれる。本発明の免疫受容体における細胞質シグナル伝達分子は、CD3由来の細胞質シグナル伝達配列を含むことが、特に好ましい。

#### 【0133】

好ましい態様において、CD4キメラ抗原受容体構築物のシグナル伝達ドメインは、CD3シグナル伝達ドメインを単独で、または免疫受容体に関連して有用な任意の他の望ましいシグナル伝達ドメインと組み合わせて含むように設計することができる。例えば、免疫受容体のシグナル伝達ドメインは、CD3鎖部分および共刺激シグナル伝達領域を含むことができる。共刺激シグナル伝達領域とは、共刺激分子の細胞内ドメインを含む免疫受容体の一部分のことを指す。共刺激分子とは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答のために必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。そのような分子の例には、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、DAP12、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83特異的結合リガンドなどが含まれる。したがって、本発明においては主としてCD28が共刺激シグナル伝達エレメントとして例証されているが、他の共刺激エレメントも本発明の範囲内である。

20

#### 【0134】

1つの態様において、シグナル伝達ドメインは、CD3シグナル伝達ドメイン（SEQ ID NO: 6、51、または68）を含む。もう1つの態様において、シグナル伝達ドメインは、CD4 CD28（SEQ ID NO: 7または62）を含む。もう1つの態様において、シグナル伝達ドメインは、CD28共刺激ドメイン（SEQ ID NO: 9または67）を含む。さらにもう1つの態様において、シグナル伝達ドメインは、CD4 4-1BB共刺激ドメイン（SEQ ID NO: 63）を含む。さらにもう1つの態様において、シグナル伝達ドメインは、4-1BB（CD137）共刺激ドメイン（SEQ ID NO: 69）を含む。シグナル伝達ドメインは、本明細書に記載の1つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含んでもよい。

30

#### 【0135】

本明細書に記載のシグナル伝達ドメイン、例えば、TCRの鎖、鎖、もしくは鎖、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、もしくはCD66d、または以下に由来する共刺激シグナル伝達領域：CD27、CD28、4-1BB（CD137）、DAP12、OX9、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、もしくはCD83特異的結合リガンドの細胞質シグナル伝達配列は、本明細書に記載のCD4細胞外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、または膜結合型キメラ受容体に含まれ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。

40

#### 【0136】

##### キメラ抗原受容体（CAR）

理論に拘束されることは望まないが、HIVを標的とするCARであって、抗HIV scFvを含む

50

CARの使用は、HIV感染細胞のリザーバー集団を有する対象の処置にとって有益であろうことが理解される。本発明は、そのため、本発明の1つの局面において、そのような使用のためのそのようなCARを含む。

#### 【0137】

したがって、本発明の1つの局面において、T細胞は、その中でCARを発現させることによって作製される。したがって、本発明は、CARおよびCARをコードする核酸構築物を包含し、該CARは、抗原結合ドメイン（例えば、抗HIV抗体をコードするscFv）、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む。

#### 【0138】

1つの局面において、本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）を含む改変細胞を含み、該CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および共刺激分子の細胞内ドメインを含み、かつ該細胞は、標的化されたエフェクター活性を所有するT細胞である。もう1つの局面において、本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含む改変細胞を含み、該核酸配列は、抗原結合ドメインをコードする核酸配列、膜貫通ドメインをコードする核酸配列、および共刺激分子の細胞内ドメインをコードする核酸配列を含み、かつ該細胞は、CARを発現し、標的化されたエフェクター活性（例えば、標的化された細胞性細胞傷害および抗原提示）を所有するT細胞である。1つの態様において、標的化されたエフェクター活性は、CARの抗原結合ドメインに特異的に結合する標的細胞上の抗原に対して方向付けられる。1つの局面において、標的抗原は、HIV特異的な抗原であり、CARは、抗HIV抗体またはその断片を含む、HIV特異的な結合ドメインを含む。

10

20

#### 【0139】

1つの態様において、CARは、SEQ ID NO: 10、14、18、22、26、34、70～73、および74から選択される核酸配列によってコードされる。もう1つの態様において、CARは、SEQ ID NO: 11、15、19、23、27、35、52～55、または56のアミノ酸配列を有する。

#### 【0140】

##### 抗原結合ドメイン

1つの態様において、本発明の抗原結合ドメインは、HIVエンベロープ糖タンパク質（Env）（例えば、gp120）などのHIVビリオン、および／またはHIV感染細胞に結合する、HIV特異的な結合ドメインを含む。抗原として作用しうる他の細胞表面マーカーの例には、ウイルス感染症、細菌感染症、および寄生虫感染症、自己免疫疾患、ならびにがん細胞と関連するものが含まれる。もう1つの態様において、本発明の抗原結合ドメインは、scFv抗体などの、HIVタンパク質に結合する抗体またはその断片を含む。好ましくは、抗原結合ドメインは、HIVタンパク質、例えば、HIV Envに結合するscFv抗体である。有用である特異的scFvは、図4A、図8、図18、および図19に示されるもの（SEQ ID NO: 11、12、16、17、20、21、24、25、28、29、57～61、75～78、または79）である。

30

#### 【0141】

抗原結合ドメインの選択は、標的細胞の表面上に存在する抗原のタイプおよび数に依存する。例えば、抗原結合ドメインは、特定の疾患状態と関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用する抗原を認識するように選択されてもよい。

#### 【0142】

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断片を非限定的に含んでもよい。したがって、1つの態様において、抗原結合ドメイン部分は、哺乳動物抗体またはその断片を含む。もう1つの態様において、CARの抗原結合ドメインは、抗HIV抗体およびその断片からなる群より選択される。

40

#### 【0143】

場合によっては、CARが最終的にその中で使用されることになる同じ種に由来することが、抗原結合ドメインについて有益である。例えば、ヒトにおける使用のためには、本明細書の他所に記載したようなヒト抗体、またはその断片を含むことが、CARの抗原結合ドメインについて有益でありうる。

50

**【 0 1 4 4 】**

抗原結合ドメインが、細胞における発現のために、両方とも本明細書の他所に記載してい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していることもまた、有益である。1つの態様において、抗原結合ドメインをコードする核酸は、膜貫通ドメインをコードする核酸、および細胞内ドメインをコードする核酸に機能的に連結している。

**【 0 1 4 5 】**

本明細書に記載の抗原結合ドメイン、例えば、HIVタンパク質に結合する抗体またはその断片は、本明細書に記載の膜貫通ドメインのいずれか、本明細書に記載の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CARに含まれう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。10

**【 0 1 4 6 】****膜貫通ドメイン**

膜貫通ドメインに関して、CAR（または膜結合型キメラ受容体構築物）は、CARの抗原結合ドメインを細胞内ドメインに接続する膜貫通ドメインを含むように設計することができる。1つの態様において、膜貫通ドメインは、CARにおいてドメインの1つまたは複数と天然で会合している。場合によっては、膜貫通ドメインを、そのようなドメインの同じかまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに対する結合を回避して、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するために、選択するか、またはアミノ酸置換によって改変することができる。20

**【 0 1 4 7 】**

膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来しうる。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合型タンパク質または膜貫通タンパク質に由来しうる。本発明における特定の用途の膜貫通領域は、T細胞受容体の鎖、鎖、または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、Toll様受容体1（TLR1）、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、およびTLR9に由来しうる（すなわち、それらの少なくとも膜貫通領域を含む）。場合によっては、Ig（免疫グロブリン）ヒンジを含む種々のヒンジを、同様に使用することができる。

**【 0 1 4 8 】**

1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD8 膜貫通ドメイン（SEQ ID NO: 5、48、66）を含む。もう1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメイン（SEQ ID NO: 8、49、および67）を含む。さらにもう1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD8 ヒンジ（SEQ ID NO: 4、47、および65）などのヒンジドメインを含む。膜貫通ドメインは、任意のヒンジドメインと組み合わせてもよく、および／または、本明細書に記載の1つまたは複数の膜貫通ドメインを含んでもよい。30

**【 0 1 4 9 】**

本明細書に記載の膜貫通ドメイン、例えば、T細胞受容体の鎖、鎖、または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、Toll様受容体1（TLR1）、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、およびTLR9は、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もしくは細胞質ドメインのいずれか、またはCARに含まれう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ます。40

**【 0 1 5 0 】**

1つの態様において、膜貫通ドメインは、合成であってもよく、その場合、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ことになる。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが、合成膜貫通ドメインの各末端に見出されることになる。

**【 0 1 5 1 】**

10

20

30

40

50

### 細胞内ドメイン

CAR（または膜結合型キメラ受容体構築物）の細胞内ドメインまたはさもなければ細胞質ドメインは、本明細書の他所に記載したキメラ細胞内シグナル伝達分子と類似のまたは同じ細胞内ドメインを含み、CARが発現している細胞の活性化の原因である。

#### 【0152】

1つの態様において、CARの細胞内ドメインは、シグナル活性化および／または伝達の原因であるドメインを含む。

#### 【0153】

本発明における使用のための細胞内ドメインの例には、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アント、および同じ機能的能力を有する任意の合成配列が非限定的に含まれる。

10

#### 【0154】

細胞内ドメインの例には、TCR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD86、共通FcR、FcR（Fc R1b）、CD79a、CD79b、Fc RIIa、DAP10、DAP12、T細胞受容体（TCR）、CD8、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX9、OX40、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特異的結合リガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、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、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（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、本明細書に記載の他の共刺激分子、それらの任意の誘導体、バリアント、または断片、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非限定的に含む、1つまたは複数の分子または受容体由来の断片またはドメインが含まれる。

20

#### 【0155】

1つの態様において、CARの細胞内ドメインは、1つまたは複数の共刺激分子の任意の一部分、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アント、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。

30

#### 【0156】

1つの態様において、細胞内ドメインは、CD3 シグナル伝達ドメイン（SEQ ID NO: 6、51、または68）を含む。もう1つの態様において、細胞内ドメインは、CD4 CD28（SEQ ID NO: 7または62）を含む。もう1つの態様において、細胞内ドメインは、CD28共刺激ドメイン（SEQ ID NO: 9または67）を含む。さらにもう1つの態様において、シグナル伝達ドメインは、CD4 4-1BB共刺激ドメイン（SEQ ID NO: 63）を含む。なおもう1つの態様において、シグナル伝達ドメインは、4-1BB（CD137）共刺激ドメイン（SEQ ID NO: 69）を含む。もう1つの態様において、細胞内ドメインは、DAP12ドメインを含む。さらにもう1つの態様において、細胞内ドメインは、KIRドメインを含む。細胞内ドメインは、本明細書に記載の1つまたは複数の細胞内ドメインを含んでもよい。

40

#### 【0157】

本明細書に記載の細胞内ドメイン、例えば、TCR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD86、共通FcR、FcR（Fc R1b）、CD79a、CD79b、Fc RIIa、DAP10、DAP12、T細胞受容体（TCR）、CD8、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX9、OX40、C

50

D30、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特異的結合リガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、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、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (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、または他の共刺激分子は、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に含まれう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。10

#### 【0158】

CARの抗原結合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は、スペーサードメインが組み入れられてもよい。本明細書で用いる場合、「スペーサードメイン」という用語は、一般に、ポリペプチド鎖において膜貫通ドメインを抗原結合ドメインまたは細胞内ドメインのいずれかに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のことを意味する。1つの態様において、スペーサードメインは、最大で300アミノ酸、好ましくは10~100アミノ酸、および最も好ましくは25~50アミノ酸を含みうる。もう1つの態様において、好ましくは長さが2~10アミノ酸の短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞内ドメインとの間の連結を形成しうる。リンカーの例には、グリシン-セリンダブルエットが含まれる。20

#### 【0159】

##### ヒト抗体

CARの抗原結合ドメインを使用する場合、ヒト抗体またはその断片を用いることが好ましいと考えられる。ヒト対象の治療的処置のためには、完全ヒト抗体が特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いるファージディスプレイ法を、これらの手法の改良法と併せて含む、当技術分野において公知の種々の方法によって作製することができる。また、米国特許第4,444,887号および第4,716,111号；ならびにPCT公開第WO 98/46645号、第WO 98/50433号、第WO 98/24893号、第WO 98/16654号、第WO 96/34096号、第WO 96/33735号、および第WO 91/10741号も参照されたい；これらはそれぞれその全体が参考により本明細書に組み入れられる。30

#### 【0160】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンを発現する能力はないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて産生させることもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体を、無作為に、または相同組換えによって、マウス胚性幹細胞中に導入してもよい。あるいは、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域、および多様性領域を、マウス胚性幹細胞中に導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別々にまたは同時に、非機能性にされうる。例えば、キメラマウスおよび生殖系列突然変異型マウスにおける抗体重鎖連結領域 (JH) 遺伝子のホモ接合性消失は、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。改変された胚性幹細胞を増大させ、胚盤胞に微量注入してキメラマウスを生じさせる。続いて、キメラマウスを交配させて、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を生じさせる。トランスジェニックマウスに対して、通常の様式で、選択された抗原、例えば、本発明のポリ40

ペプチドの全体または一部分による免疫処置を行う。最適な標的に対する抗体を、従来のハイブリドーマ技術を用いて、免疫処置を行ったトランスジェニックマウスから入手することができる。トランスジェニックマウスによって保有されるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の際に再編成され、その後にクラススイッチおよび体細胞突然変異を起こす。したがって、そのような手法を用いて、IgG1(+)1)およびIgG3を非限定的に含む、治療的に有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を産生させることが可能である。ヒト抗体を産生させるためのこの技術の概略については、Lonberg and Huszar (Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)) を参考されたい。<sup>10</sup> ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生させるためのこの技術の詳細な考察、ならびにそのような抗体を産生させるためのプロトコールについては、例えば、PCT公開第WO 98/24893号、第WO 96/34096号、および第WO 96/33735号；ならびに米国特許第5,413,923号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,569,825号；第5,661,016号；第5,545,806号；第5,814,318号；および第5,939,598号を参考されたく、これらはそれぞれその全体が参考により本明細書に組み入れられる。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) およびGenpharm (San Jose, Calif.) などの会社と、上記のものに類似した技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体を提供する契約を結ぶことができる。抗原負荷刺激時にヒト抗体の產生をもたらすことになる、生殖系列突然変異型マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入に関する具体的な考察については、例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)；Brugermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)；およびDuchosal et al., Nature, 355:258 (1992)を参考されたい。<sup>20</sup>

#### 【0161】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから導き出すこともできる (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991)；Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)；Vaughan et al., Nature Biotech., 14:309 (1996))。ファージディスプレイ技術 (McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990)) は、免疫処置を受けていないドナー由来の免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インピトロでヒト抗体および抗体断片を産生させるために用いることができる。この手法によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、M13またはfdなどの糸状バクテリオファージの主要コートタンパク質遺伝子またはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかの中にインフレームでクローニングして、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示させる。糸状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有するため、抗体の機能特性に基づく選択により、それらの特性を呈する抗体をコードする遺伝子の選択ももたらされる。このため、ファージは、B細胞の特性のうちのいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、種々のフォーマットで行うことができる；それらの概説については、例えば、Johnson, Kevin S, and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)を参考されたい。<sup>30</sup> V遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイに用いることができる。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)は、免疫処置を受けていないマウスの脾臓に由来するV遺伝子の小規模なランダムコンビナトリアルライブラリーから、抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。免疫処置を受けていないヒトドナーからV遺伝子のレパートリーを構築することができ、抗原（自己抗原を含む）の多様なアレイに対する抗体を、本質的にはMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)、またはGriffith et al., EMBO J., 12:725-734 (1993)に記載されている手法に従って単離することができる。米国特許第5,565,332号および第5,573,905号も参考されたく、これらはそれぞれその全体が参考により本明細書に組み入れられる。

#### 【0162】

ヒト抗体はまた、インピトロ活性化B細胞によって作製されてもよい（米国特許第5,567,610号および第5,229,275号を参考されたく、これらはそれぞれその全体が参考により本明細書に組み入れられる）。ヒト抗体はまた、Roder et al. (Methods Enzymol., 121:<sup>40</sup>

140-167 (1986)) によって記載されているものなどの、ただしこれに限定されない、ハイブリドーマ手法を用いてインビトロで作製されてもよい。

#### 【0163】

##### ヒト化抗体

あるいは、いくつかの態様において、非ヒト抗体をヒト化することができ、この場合には、抗体の特定の配列または領域を、ヒトにおいて天然に産生される抗体との類似性を高めるように改変する。例えば、本発明において、抗体またはその断片は非ヒト哺乳動物のsc Fvを含みうる。1つの態様において、抗原結合ドメイン部分がヒト化される。

#### 【0164】

ヒト化抗体は、CDRグラフティング（例えば、欧洲特許第EP 239,400号；国際公開公報第WO 91/09967号；ならびに米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、および第5,585,089号を参照されたく、これらはそれぞれその全体が参考により本明細書に組み入れられる）、ペニヤリングまたはリサーフェイシング（例えば、欧洲特許第EP 592,106号および第EP 519,596号；Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498；Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814；ならびにRoguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973を参照されたく、これらはそれぞれその全体が参考により本明細書に組み入れられる）、チェーンシャッフリング（例えば、米国特許第5,565,332号を参照されたく、これはその全体が参考により本明細書に組み入れられる）、ならびに、例えば、米国特許出願公開第US2005/0042664号、米国特許出願公開第US2005/0048617号、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公開公報第WO 9317105号、Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002)、Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000)、Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000)、Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997)、Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996)、Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995)、Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22 (1995)、Sandhu JS, *Gene*, 150(2):409-10 (1994)、およびPedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994)（これらはそれぞれその全体が参考により本明細書に組み入れられる）において開示されている手法を非限定的に含む、当技術分野において公知の種々の手法を用いて產生させることができる。しばしば、フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を変更する、好ましくは改善するために、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換されることになる。これらのフレームワーク置換は、当技術分野において周知の方法によって、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基との相互作用のモデリング、および特定の位置の異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される（例えば、Queen et al., 米国特許第5,585,089号；およびRiechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323を参照されたく、これらはその全体が参考により本明細書に組み入れられる）。

#### 【0165】

ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からその中に導入された、1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と称され、典型的には「インポート」可変ドメインから採られる。したがって、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリン分子由来の1つまたは複数のCDR、およびヒト由来のフレームワーク領域を含む。抗体のヒト化は、当技術分野において周知であり、本質的にはWinterらの方法（Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986)；Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)）に従って、ヒト抗体の対応する配列を齧歯動物のCDRまたはCDR配列へと置換すること、すなわち、CDRグラフティング（EP 239,400号；PCT公開公報第WO 91/09967号；および米国特許第4,816,567号；第6,331,415号；第5,225,539号；第5,530,101号；第5,585,089号；第6,548,640号、これらの内容はその全体が参考により本明細書に組み入れられる）によって行うことができる。そのようなヒト化キメラ抗体では、実質的にインタクトではないヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際

10

20

30

40

50

上、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基およびおそらくはいくつかのフレームワーク(FR)残基が、齧歯動物抗体における類似部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。抗体のヒト化はまた、ベニヤリングもしくはリサーフェイシング(EP 59 2,106号; EP 519,596号; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); およびRoguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994))またはチェーンシャッフリング(米国特許第5,565,332号)によって達成することもでき、こ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。

#### 【0166】

ヒト化抗体を作製する上で用いられる、軽鎖および重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低減させることを目的とする。いわゆる「ベストフィット」法に従って、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。続いて、齧歯動物のものに最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク(FR)として受け入れる(Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)、こ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)。もう1つの方法では、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを用いる。同じフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体に用いることができる(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)、こ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)。

10

#### 【0167】

抗体は、標的抗原に対する高い親和性および他の有利な生物学的特性を保ったままでヒト化することができる。本発明の1つの局面によれば、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いた、親配列およびさまざまな概念上のヒト化産物の分析の過程によって調製される。免疫グロブリンの三次元モデルは、一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列に関して可能性のある三次元立体構造を図示および表示するコンピュータプログラムが、利用可能である。これらの表示の検討により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の考えられる役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンが標的抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、標的抗原に対する親和性の増加などの所望の抗体特性が達成されるように、FR残基を、レシピエント配列およびインポート配列から選択して、組み合わせることができる。一般に、CDR残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接かつ最も実質的に関与している。

20

30

#### 【0168】

ヒト化抗体は、元の抗体と類似の抗原特異性を保っている。しかし、あるヒト化方法を用いると、標的抗原に対する抗体の結合の親和性および/または特異性が、その内容の全体が参照により本明細書に組み入れられる、Wu et al., J. Mol. Biol., 294:151 (1999)により記載されているような「定方向進化」の方法を用いて高められうる。

#### 【0169】

40

##### ベクター

ベクターを使用して、キメラ細胞内シグナル伝達分子またはCARを、本明細書の他所に記載したように、T細胞中に導入してもよい。1つの局面において、本発明は、キメラ細胞内シグナル伝達をコードする核酸配列を含むベクターを含む。もう1つの局面において、本発明は、CARをコードする核酸配列を含むベクターを含む。1つの態様において、ベクターには、プラスミドベクター、ウイルスベクター、レトロトランスポゾン(例えば、piggyback、sleeping beauty)、部位特異的挿入ベクター(例えば、CRISPR、znフィンガーヌクレアーゼ、TALEN)、または自殺発現ベクター、または当技術分野において公知の他のベクターが含まれる。

#### 【0170】

50

上述の構築物のすべては、第3世代のレンチウイルスベクタープラスミド、他のウイルスベクター、またはヒト細胞における使用について承認されているRNAとの使用が可能である。1つの態様において、ベクターは、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターである。もう1つの態様において、ベクターはRNAベクターである。

#### 【0171】

本明細書に記載の分子のいずれかの產生は、シークエンシングによって検証することができる。完全長タンパク質の発現は、免疫プロット、免疫組織化学、フローサイトメトリー、または、当技術分野において周知の、かつ利用可能な他の技術を用いて検証されてもよい。

#### 【0172】

本発明はまた、本発明のDNAがその中に挿入されているベクターも提供する。レンチウイルスなどのレトロウイルス由来のものを含むベクターは、それらが、導入遺伝子の長期の安定な組み込み、および娘細胞におけるその伝播を可能にするため、長期の遺伝子移入を達成するのに適した道具である。レンチウイルスベクターは、それらが肝細胞などの非増殖細胞に形質導入できる点で、マウス白血病ウイルスなどのオノコレトロウイルス由来のベクターを上回る追加的な利点を有する。それらはまた、中に導入される対象において低い免疫原性を結果としてもたらす、追加的な利点も有する。

10

#### 【0173】

天然核酸または合成核酸の発現は、典型的に、核酸またはその一部分をプロモーターに機能的に連結すること、および構築物を発現ベクター中に組み入れることによって達成される。ベクターは、一般に、哺乳動物細胞における複製が可能なベクターであり、かつ／または、哺乳動物の細胞ゲノム中への組込みも可能である。典型的なベクターは、転写および翻訳ターミネーター、開始配列、および所望の核酸配列の発現の制御に有用なプロモーターを含有する。

20

#### 【0174】

核酸は、任意の数の異なるタイプのベクター中にクローニングすることができる。例えば、核酸を、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス、およびコスマミドを非限定的に含むベクター中にクローニングすることができる。特定の関心対象のベクターには、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、およびシークエンシングベクターが含まれる。

30

#### 【0175】

発現ベクターは、ウイルスベクターの形態において細胞に提供されてもよい。ウイルスベクター技術は、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であるウイルスには、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非限定的に含まれる。一般に、適したベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、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可能マーカーを含有する（例えば、第WO 01/96584号；第WO 01/29058号；および米国特許第6,326,193号）。

40

#### 【0176】

追加的なプロモーターエレメント、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。典型的に、これらは、開始部位の30～110 bp上流の領域に位置するが、いくつかのプロモーターは、最近、開始部位の下流に同様に機能的エレメントを含有することが示されている。プロモーターエレメント間の間隔は、エレメントが反転するかまたは互いに対しで移動する場合に、プロモーター機能が保存されるように、往々にして柔軟である。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターにおいて、プロモーターエレメント間の間隔は、活性が減退し始める前に、50 bp離れるまで増加させることができる。プロモーターに応じて、個々のエレメントは、転写を活性化するために協同的にまたは独立的にのいずれかで機能

50

できるように見られる。

【0177】

プロモーターの例は、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに機能的に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる、強い構成性プロモーター配列である。しかし、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)末端反復配列(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、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プロモーター、ならびに、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、ただしこれらに限定されないヒト遺伝子プロモーターを非限定的に含む、他の構成性プロモーター配列がまた、使用されてもよい。さらに、本発明は、構成性プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターもまた、本発明の一部として企図される。誘導性プロモーターの使用は、そのような発現が望ましい場合に、それが機能的に連結されているポリヌクレオチド配列の発現をオンにし、または、発現が望ましくない場合には発現をオフにすることができる、分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例には、メタロチオネインプロモーター、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非限定的に含まれる。

10

【0178】

ポリペプチドまたはその一部分の発現を評価するために、細胞中に導入される発現ベクターはまた、ウイルスペクターを通してトランスフェクトまたは感染させようとした細胞の集団からの発現細胞の同定および選択を容易にするための、選択可能マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子またはその両方のいずれかを含有することもできる。他の局面において、選択可能マーカーは、別々のDNA片上に保有され、コトランスフェクション手順において使用されてもよい。選択可能マーカーおよびレポーター遺伝子は両方とも、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していてもよい。有用な選択可能マーカーには、例えば、neoなどのような抗生物質耐性遺伝子が含まれる。

20

【0179】

潜在的にトランスフェクトされた細胞を同定するため、および調節配列の機能性を評定するために、レポーター遺伝子が使用される。一般に、レポーター遺伝子とは、レシピエント生物または組織中に存在しないか、またはそれらが発現しておらず、かつその発現がいくつかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によって顕在化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中に導入された後の適した時間に評価される。適したレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、-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、分泌型アルカリホスファターゼ、または緑色蛍光タンパク質遺伝子(例えば、Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82)をコードする遺伝子が含まれる。適した発現系は、周知であり、公知の手法を用いて調製されるか、または商業的に入手されうる。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小5'隣接領域を有する構築物が、プロモーターとして同定される。そのようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結され、プロモーターにより駆動される転写をモジュレートする能力について作用物質を評定するために使用されてもよい。

30

【0180】

核酸の導入

キメラ細胞内シグナル伝達分子またはCARなどの遺伝子を、細胞中に導入する方法および発現させる方法は、当技術分野において公知である。発現ベクターに関する限り、ベクターは、当技術分野における任意の方法によって、宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、または昆虫細胞中に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、または生物学的な手段によって宿主細胞中に移入することができる。

40

【0181】

50

宿主細胞にポリヌクレオチド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法、リポフェクション、微粒子銃法、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作製する方法は当技術分野において周知である。例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NYを参照されたい。核酸は、エレクトロポレーション (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) またはGene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany) を含む、市販の方法を用いて、標的細胞に導入することができる。また、核酸を、リポフェクションを用いるカチオン性リポソーム媒介性トランسفェクションを用いて、ポリマークセル封入を用いて、ペプチド媒介性トランسفェクションを用いて、または「遺伝子銃」などのバイオリストイック (biolistic) 粒子送達システムを非限定的に含む市販の方法 (例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8): 861-70 (2001)を参照) を用いて、細胞に導入することもできる。

#### 【0182】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNAベクターおよびRNAベクターの使用が含まれる。RNAベクターは、RNA転写物を生成するためのRNAプロモーターおよび／他の関連するドメインを有するベクターを含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞に遺伝子を挿入するために最も広く使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来しうる。例えば、米国特許第5,350,674号および第5,585,362号を参照されたい。

#### 【0183】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段には、コロイド分散系、例えば高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズなど、ならびに、水中油型エマルション、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質ベースの系が含まれる。インビトロおよびインビボで送達媒体として用いるための例示的なコロイド系の1つは、リポソーム (例えば、人工膜小胞) である。

#### 【0184】

非ウイルス送達システムが利用される場合、例示的な送達媒体はリポソームである。脂質製剤の使用が、宿主細胞中への核酸の導入について企図される (インビトロ、エクスピボ、またはインビボ)。もう1つの局面において、核酸は、脂質と会合させてもよい。脂質と会合した核酸は、リポソームの水性内部にカプセル化してもよく、リポソームの脂質二重層内に散在させてもよく、リポソームおよびオリゴヌクレオチドの両方と会合する連結分子を介してリポソームに付着させてもよく、リポソームに封じ込めてもよく、リポソームと複合体形成させてもよく、脂質を含有する溶液に分散させてもよく、脂質と混合してもよく、脂質と組み合わせてもよく、脂質において懸濁液として含有させてもよく、ミセルと含有させるかもしくは複合体形成させてもよく、または他の様式で脂質と会合させてもよい。脂質、脂質／DNA、または脂質／発現ベクターと会合した組成物は、溶液においていざれかの特定の構造に限定されない。例えば、それらは、ミセルとして、または「崩壊性」構造で、二重層構造に存在してもよい。それらはまた、おそらくサイズまたは形状が均一ではない凝集物を形成して、単純に、溶液に散在してもよい。脂質は、天然に存在する脂質または合成脂質でありうる、脂肪性物質である。例えば、脂質には、細胞質に天然に存在する脂肪小滴、ならびに、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、およびアルデヒドなどの、長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体を含有する化合物のクラスが含まれる。

#### 【0185】

使用に適した脂質は、販売元から入手することができる。例えば、ジミリストルホスファチジルコリン (「DMPC」) はSigma, St. Louis, MOから入手することができ；ジアセ

10

20

30

40

50

チルホスファート（「DCP」）はK & K Laboratories (Plainview, NY) から入手することができ；コレステロール（「Chol」）はCalbiochem-Behringから入手することができ；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) から入手することができる。クロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中にある脂質の貯蔵溶液は、約-20°で保存することができる。クロロホルムはメタノールよりも容易に蒸発するので、それを唯一の溶媒として用いることが好ましい。「リポソーム」とは、閉じた脂質二重層または凝集物の生成によって形成される、種々の単層および多重層の脂質媒体を包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜による小胞構造および内部の水性媒質を有するものとして特徴づけることができる。多重層リポソームは、水性媒質によって隔てられた複数の脂質層を有する。それらはリン脂質を過剰量の水性溶液中に懸濁させると自発的に形成される。脂質成分は自己再配列を起こし、その後に閉鎖構造の形成が起こり、水および溶解溶質を脂質二重層の間に封じ込める (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5:505-10)。しかし、溶液中で通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物も想定している。例えば、脂質がミセル構造をとってもよく、または単に脂質分子の不均一な凝集物として存在してもよい。また、リポフェクタミン-核酸複合体も想定している。

#### 【0186】

宿主細胞における核酸の存在を確かめる目的で、宿主細胞に外因性核酸を導入するため、または他の様式で細胞を本明細書に記載の分子に曝露させるために用いられる方法にかかわらず、種々のアッセイを用いることができる。そのようなアッセイには、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば、サザンプロット法およびノーザンプロット法、RT-PCRおよびPCRなど；「生化学的」アッセイ、例えば、免疫学的手段 (ELISA およびウエスタンプロット) または本発明の範囲内にある作用物質を同定するための本明細書に記載のアッセイによって、特定のペプチドの有無を検出すること、などが含まれる。

#### 【0187】

1つの態様において、本明細書の他所に記載した核酸配列の1つまたは複数は、細胞の集団に形質導入すること、細胞の集団にトランスフェクトすること、および細胞の集団にエレクトロポレーションすることからなる群より選択される方法によって導入される。1つの態様において、細胞の集団は、本明細書に記載の核酸配列の1つまたは複数を含む。

#### 【0188】

1つの態様においては、細胞に導入される核酸はRNAである。もう1つの態様において、このRNAは、インピトロ転写された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) により生成されるテンプレートを用いるインピトロ転写によって生成される。任意の供給源からの関心対象のDNAを、PCRによって、適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを用いるインピトロmRNA合成のためのテンプレート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DNAの他の任意の適切な供給源でありうる。インピトロ転写のための望ましいテンプレートは、キメラの細胞内シグナル伝達分子である。

#### 【0189】

PCRは、トランスフェクションに用いられるmRNAのインピトロ転写のためのテンプレートを作製するために用いられる。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に用いるためのプライマーは、PCRのためのテンプレートとして用いようとするDNAの領域に対して実質的に相補的な領域を有するように設計される。「実質的に相補的な」とは、本明細書で用いる場合、プライマー配列中の塩基の大半もしくはすべてが相補的であるか、または1つもしくは複数の塩基が非相補的もしくはミスマッチ性である、又クレオチドの配列のことを指す。実質的に相補的な配列は、PCRのために用いられるアニーリング条件下で、意図したDNA標的とアニールまたはハイブリダイズすることができる。プライマーは、DNAテンプレートの任意の部分に対して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、プライマーを、5'および3' UTRを含めて、細胞において通常転写される遺伝子の部分（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

10

20

30

40

50

ことができる。また、プライマーを、関心対象の特定のドメインをコードする遺伝子の一部を増幅するように設計することもできる。1つの態様において、プライマーは、5'および3'UTRの全体または部分を含めて、ヒトcDNAのコード領域を増幅するように設計される。PCRのために有用なプライマーは、当技術分野において周知である合成法によって作製される。「順方向プライマー」とは、増幅させようとするDNA配列の上流にある、DNAテンプレート上のヌクレオチドに対して実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーのことである。「上流」とは、本明細書において、コード鎖を基準として、増幅させようとするDNA配列の5'側にある場所(location 5)を指して用いられる。「逆方向プライマー」とは、増幅させようとするDNA配列の下流にある、二本鎖DNAテンプレートに対して実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーのことである。「下流」とは、本明細書において、コード鎖を基準として、増幅させようとするDNA配列の3'側にある場所のことを指す。

#### 【0190】

RNAの安定性および／または翻訳効率を高める能力を有する化学構造を用いることもできる。RNAは5'および3'UTRを有することが好ましい。1つの態様において、5'UTRは長さが0～3000ヌクレオチドである。コード領域に付加される5'および3'UTR配列の長さは、UTRの異なる領域とアニールするPCR用のプライマーを設計することを非限定的に含む、異なる方法によって変化させることができる。このアプローチを用いて、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'および3'UTRの長さを改変することができる。

#### 【0191】

5'および3'UTRは、関心対象の遺伝子の天然の内因性5'および3'UTRであってよい。または、UTR配列を順方向および逆方向プライマーに組み入れることによって、またはテンプレートの他の任意の改変によって、関心対象の遺伝子にとって内因性でないUTR配列を付加することもできる。関心対象の遺伝子にとって内因性でない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な可能性がある。例えば、3'UTR配列中のAUリッチエレメントはmRNAの安定性を低下させうることが知られている。このため、当技術分野において周知であるUTRの特性に基づき、転写されたRNAの安定性が高まるように3'UTRを選択または設計することができる。

#### 【0192】

1つの態様において、5'UTRは内因性遺伝子のKozak配列を含みうる。または、関心対象の遺伝子にとって内因性でない5'UTRを上記のようにPCRによって付加する場合には、5'UTR配列を付加することによってコンセンサスKozak配列を設計し直すこともできる。Kozak配列はある種のRNA転写物の翻訳の効率を高めることができると、すべてのRNAで効率的な翻訳が可能になるのに必要なわけではないように思われる。多くのmRNAに対するKozak配列の必要性は、当技術分野において公知である。他の態様においては、5'UTRを、そのRNAゲノムが細胞内で安定しているRNAウイルスから導き出すことができる。他の態様においては、mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨げるために、さまざまなヌクレオチド類似体を3'または5'UTRに用いることができる。

#### 【0193】

遺伝子クローニングと必要とせずにDNAテンプレートからのRNAの合成を可能にするためには、転写のプロモーターが、転写させようとする配列の上流でDNAテンプレートと結びつく必要がある。RNAポリメラーゼに対するプロモーターとして機能する配列を順方向プライマーの5'末端に付加すると、RNAポリメラーゼプロモーターが、転写させようとするオープンリーディングフレームの上流でPCR産物に組み入れられるようになる。1つの好ましい態様において、本明細書の他所に記載したように、プロモーターは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非限定的に含まれる。T7、T3およびSP6プロモーター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。

#### 【0194】

10

20

30

40

50

1つの態様において、mRNAは5'末端のキャップおよび3'ポリ(A)尾部の両方を有し、それらがリボソーム結合、翻訳の開始および細胞におけるmRNA安定性を決定づける。環状DNAテンプレート、例えばプラスミドDNA上では、RNAポリメラーゼは真核細胞における発現には適さない長いコンカテマー産物を生成させる。3'UTRの末端で線状化されたプラスミドDNAの転写では、転写後にポリアデニル化されたとしても真核生物トランスフェクションには有効でない、正常サイズのmRNAがもたらされる。

#### 【0195】

線状DNAテンプレート上で、ファージT7 RNAポリメラーゼは、転写物の3'末端をテンプレートの最終塩基を越えて伸長させることができる (Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)).

10

#### 【0196】

DNAテンプレートへのポリA/T連鎖の従来の組み込み方法は分子クローニングである。しかし、プラスミドDNAに組み込まれたポリA/T配列はプラスミド不安定性を引き起こす恐れがあり、このことが、細菌細胞から得られたプラスミドDNAテンプレートに欠失および他の異常がしばしば高度に混入する理由となっている。このためにクローニング手順は面倒で時間がかかるだけでなく、往々にして信頼性も損なわれる。これがクローニングを伴わずにポリA/T 3'連鎖を有するDNAテンプレートの構築を可能にする方法が非常に望まれる理由である。

#### 【0197】

転写DNAテンプレートのポリA/Tセグメントは、ポリT尾部、例えば100T尾部など(サイズは50~5000Tでありうる)を含む逆方向プライマーを用いることによってPCR中に、またはDNA連結もしくはインビトロ組換えを非限定的に含む他の任意の方法によってPCRの後に生成させることができる。ポリ(A)尾部はまた、RNAに安定性を与え、それらの分解も低下させる。一般に、ポリ(A)尾部の長さは、転写されたRNAの安定性と正の相関関係にある。1つの態様において、ポリ(A)尾部は100~5000個のアデノシンである。

20

#### 【0198】

RNAのポリ(A)尾部は、インビトロ転写後に、ポリ(A)ポリメラーゼ、例えば大腸菌ポリAポリメラーゼ(E-PAP)などを用いることによって、さらに伸長させることができる。1つの態様においては、ポリ(A)尾部の長さを100ヌクレオチドから300~400ヌクレオチドに増やすことにより、RNAの翻訳効率が約2倍に高くなる。さらに、異なる化学基を3'末端に結びつけることもmRNA安定性を高める可能性がある。そのような付属物(attachment)は、改变/人工ヌクレオチド、アプタマーおよび他の化合物を含みうる。例えば、ポリ(A)ポリメラーゼを用いて、ATP類似体をポリ(A)尾部に組み入れができる。ATP類似体は、RNAの安定性をさらに高めることができる。

30

#### 【0199】

5'キャップもまた、RNA分子に安定性を与える。1つの好ましい態様において、本明細書に開示された方法によって生成された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であって本明細書に記載された手法を用いて付与される (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))。

40

#### 【0200】

本明細書で開示された方法によって生成されたRNAはまた、配列内リボソーム進入部位(IRES)配列も含みうる。IRES配列は、mRNAに対するキャップ非依存的なリボソーム結合を開始させて翻訳開始を助長する、任意のウイルス配列、染色体配列または人工的に設計された配列であってよい。細胞の透過性および生存能力を高める因子、例えば糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化物質および界面活性剤などを含みうる、細胞エレクトロポレーションのために適した任意の溶質を含めることができる。

50

**【0201】**

インビトロ転写のためのテンプレートとして標準化された様式で利用され、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、いくつかのインビトロで転写されたRNA（IVT-RNA）ベクターが文献で公知である。現在、当技術分野で用いられるプロトコールは、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と、それに続いて、3'および／または5'側に非翻訳領域（UTR）が隣接している関心対象の遺伝子、ならびに50～70ヌクレオチドを含む3'ポリアデニルカセット。インビトロ転写の前に、環状プラスミドはII型制限酵素（認識配列は切断部位に対応する）によってポリアデニルカセットの下流で線状化される。したがって、ポリアデニルカセットは転写物における後のポリ（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、線状化の後に酵素切断部位の一部として残存し、伸長するか、または3'末端でポリ（A）配列を覆い隠す。この非生理的な突出部が、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を及ぼすか否かは不明である。

10

**【0202】**

1つの局面において、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号、US 2005 / 0052630A1号、US 2005 / 0070841A1号、US 2004 / 0059285A1号、US 2004 / 0092907A1号に教示されているようないい。任意の既知の細胞型のエレクトロポレーションのために必要な電場強度を含むさまざまなパラメーターは、関連研究文献ならびに当技術分野における数多くの特許および出願において一般に公知である。例えば、米国特許第6,678,556号、米国特許第7,171,264号および米国特許第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適用のための装置は市販されており、これには例えば、MedPulser（商標）DNA Electroporation Therapy System（Inovio / Genetronics, San Diego, Calif）があり、米国特許第6,567,694号；米国特許第6,516,223号、米国特許第5,993,434号、米国特許第6,181,964号、米国特許第6,241,701号および米国特許第6,233,482号などの特許に記載されている；また、エレクトロポレーションを、例えばUS20070128708A1号に記載されたように、インビトロでの細胞のトランスフェクションのために用いることができる。また、エレクトロポレーションを、インビトロで細胞に核酸を送達するために利用することもできる。このように、当業者に公知の多く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へのエレクトロポレーション媒介性投与は、関心対象のRNAを標的細胞に送達するための素晴らしい新たな手段となる。

20

**【0203】**

あるいは、もう1つの局面において、本発明は、キメラ細胞内シグナル伝達分子をコードする核酸配列をT細胞の集団にエレクトロポレーションする段階を含む、改変T細胞を作製するための方法であって、該核酸配列が、共刺激分子の細胞内ドメインの核酸配列を含み、細胞外ドメインが実質的に欠如している方法を含む。1つの態様において、キメラ細胞内シグナル伝達分子をコードする核酸配列が、細胞中にエレクトロポレーションされる。さらにもう1つの態様において、CARまたは膜結合型キメラ受容体をコードする核酸配列が、細胞中にさらにエレクトロポレーションされる。

30

**【0204】****T細胞の供給源**

改変されたT細胞は、任意の供給源のT細胞から作製されうる。1つの態様において、T細胞の供給源は対象から入手される。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。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、臍帯血、および腫瘍を含む、数多くの供給源から入手することができる。ある特定の態様において、任意の数のT細胞株が当技術分野において利用可能であり、使用されうる。ある特定の態様において、T細胞は、フィコール分離などの、当業者に公知である多数の手法を用いて、対象か

40

50

ら収集された血液ユニットから入手することができる。1つの態様において、個体の循環血由来の細胞は、アフェレーシスまたは白血球搬出法によって入手される。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。アフェレーシスによって収集された細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、細胞を適切な緩衝液または培地中に置くことができ、その後の処理段階のために、例えば、リン酸緩衝食塩水（PBS）または洗浄溶液は、カルシウムを含まず、かつマグネシウムを含まなくてもよく、またはすべてではなくても多くの二価カチオンを含まなくてもよい。洗浄後に、細胞を、例えば、Ca非含有、Mg非含有PBSなどの、種々の生体適合性緩衝液中に再懸濁させることができる。あるいは、アフェレーシス試料の望ましくない成分を除去して、細胞を培養培地中に直接再懸濁させることができる。

10

#### 【0205】

もう1つの態様において、赤血球を溶解させ、例えば、PERCOLL（商標）勾配での遠心分離により単球を枯渇化することによって、T細胞を末梢血から単離する。あるいは、T細胞を、臍帯血から単離することができる。いずれの場合にも、T細胞の特定の部分集団を、ポジティブ選択またはネガティブ選択の手法によって、さらに単離することができる。

#### 【0206】

そのように単離された臍帯血単核細胞から、CD34、CD8、CD14、CD19、およびCD56を非限定的に含む、ある特定の抗原を発現する細胞を枯渇化することができる。これらの細胞の枯渇化は、単離された抗体、腹水などの、抗体を含む生体試料、物理的支持体に結合した抗体、および細胞に結合した抗体を用いて実現することができる。

20

#### 【0207】

ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブ選択される細胞に特有の表面マーカーに対する抗体の組み合わせを用いて実現することができる。好ましい方法は、ネガティブ選択される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用いる、ネガティブ磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる細胞ソーティングおよび／または選択である。例えば、ネガティブ選択によってCD4+細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。

#### 【0208】

ポジティブ選択またはネガティブ選択による所望の細胞集団の単離のために、細胞および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変化させることができる。ある特定の態様において、細胞とビーズの最大接触を確実にするために、ビーズおよび細胞が一緒に混合される容積を有意に減少させる（すなわち、細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば、1つの態様において、1 ml当たり細胞20億個の濃度を用いる。1つの態様において、1 ml当たり細胞10億個の濃度を用いる。さらなる態様において、1 ml当たり細胞1億個よりも多くを用いる。さらなる態様において、1 ml当たり細胞1000万個、1500万個、2000万個、2500万個、3000万個、3500万個、4000万個、4500万個、または5000万個の細胞濃度を用いる。さらにもう1つの態様において、1 ml当たり細胞7500万個、8000万個、8500万個、9000万個、9500万個、または1億個からの細胞濃度を用いる。さらなる態様において、1 ml当たり細胞1億2500万個または1億5000万個の濃度を用いることができる。高濃度を用いることにより、増加した細胞収量、細胞活性化、および細胞増大を生じることができる。

30

#### 【0209】

T細胞はまた、洗浄段階後に凍結することもでき、これは、単球除去段階を必要としない。理論に拘束されることは望まないが、凍結およびそれに続く融解の段階は、細胞集団における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後に、細胞を、凍結液中に懸濁させてもよい。多くの凍結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、かつこの状況において有用であるが、非限定的な例において、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、または他の適した細胞凍結培地の使用を伴う。続いて、細胞を

40

50

、1分間に1 の速度で-80 に凍結し、液体窒素貯蔵タンクの気相中に貯蔵する。他の制御された凍結法、および、-20 でまたは液体窒素中で即時の制御されない凍結を用いてもよい。

#### 【0210】

1つの態様において、細胞の集団は、本発明のT細胞を含む。細胞の集団の例には、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、精製されたT細胞集団、およびT細胞株が非限定的に含まれる。もう1つの態様において、末梢血単核細胞は、T細胞の集団を含む。さらにもう1つの態様において、精製されたT細胞は、T細胞の集団を含む。

#### 【0211】

##### T細胞の増大

10

本明細書に記載の任意の方法により作製されたT細胞を、エクスピードで増大させてもよい。1つの態様において、T細胞またはT細胞を含む細胞の集団は、増大のために培養される。一般に、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細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドをそれに付着している表面との接触によって増大する。

#### 【0212】

T細胞を増大させるための方法は、本明細書に記載されている。例えば、T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、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、またはそれより多く、ならびにそれらの間の任意のおよびすべての全体または部分的な整数倍、増大させることができる。1つの態様において、T細胞は、約20倍～約50倍の範囲で増大する。

20

#### 【0213】

T細胞は、培養装置において細胞培地中で、別の培養装置へ細胞を継代する前に、ある期間にわたって、または細胞が最適な継代のためにコンフルエンツもしくは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、インビトロで細胞を培養するために一般的に用いられる任意の培養装置であることができる。好ましくは、別の培養装置へ細胞を継代する前に、コンフルエンスのレベルは70%以上である。より好ましくは、コンフルエンスのレベルは90%以上である。期間は、インビトロでの細胞の培養に適する任意の時間であることができる。T細胞培地は、T細胞の培養中に、任意の時間に交換してもよい。好ましくは、T細胞培地を、約2～3日毎に交換する。次いで、T細胞を培養装置から採取し、その上でT細胞を、直ちに用いるか、または凍結保存して後の使用のために貯蔵することができる。1つの態様において、本発明は、増大したT細胞を凍結保存する段階を含む。凍結保存されたT細胞を、本明細書の他所に記載した分子の1つまたは複数をT細胞中に導入する前に融解する。

30

#### 【0214】

本明細書において記載されるような培養段階（本明細書において記載されるような作用物質との接触）は、極めて短くてもよく、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時間未満などであってよい。本明細書において記載されるような培養段階（本明細書において記載されるような作用物質との接触）は、より長くてもよく、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、またはそれを上回る日数であってよい。

40

#### 【0215】

1つの態様においては、T細胞を数時間（約3時間）～約14日間、またはその間の任意の整数値単位の時間にわたって培養することができる。T細胞の培養に適する条件には、血清（例えば、ウシ胎仔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- $\gamma$ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- $\beta$  およびTNF- $\alpha$ 、または当業者に公知である細胞増殖のための他の添加物を含む、増殖および生存のために必要な

50

因子を含みうる適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640または、X-vivo 15（Lonza））が含まれる。細胞の増殖のための他の添加物には、界面活性剤、プラスマネット、および還元剤、例えば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が非限定的に含まれる。培地には、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た、血清非含有であるか、またはT細胞の増殖および増大のために十分な、適量の血清（または血漿）もしくは規定されたホルモンのセットおよび／もしくは一定量のサイトカインが加えられた、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、-MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20、Optimizerが含まれる。ペニシリンおよびストレプトマイシンなどの抗生物質は実験培養物のみに含められ、対象に注入しようとする細胞の培養物には含められない。標的細胞は、増殖を支えるために必要な条件下、例えば適切な温度（例えば、37<sup>o</sup>C）および雰囲気（例えば、空気+5% CO<sub>2</sub>）の下で維持される。

#### 【0216】

T細胞培養培地は、T細胞を共刺激しうる作用物質を含んでもよい。例えば、CD3を刺激しうる作用物質はCD3に対する抗体であり、CD28を刺激しうる作用物質はCD28に対する抗体である。これこそが、本明細書において開示されるデータによって実証されているように、本明細書において開示される方法によって単離された細胞が、およそ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、またはそれを上回って増大することができる理由である。1つの態様において、T細胞は、エレクトロポレーションを受けた集団を培養することによって、約20倍～約50倍の範囲で、またはそれを上回って増大する。

#### 【0217】

##### 治療法

1つの局面において、本発明は、対象においてHIV感染症と関連する疾患または状態を処置する方法であって、本明細書に記載の改変T細胞を含む薬学的組成物の治療的有効量を該対象に投与する段階を含む方法を含む。

#### 【0218】

本明細書に記載の改変T細胞は、HIV感染症を処置するために、動物、好ましくは哺乳動物、さらにより好ましくはヒトに投与することができる。加えて、本発明の改変T細胞は、免疫応答、特に細胞媒介性免疫応答の減弱化または他の様式での阻害が、疾患を処置または軽減するために望ましい、任意の状態の処置のために使用することができる。

#### 【0219】

本発明の改変T細胞の投与は、当業者に公知である任意の好都合な様式で実施することができる。本発明の改変T細胞は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、植え込みまたは移植によって対象に投与することができる。本明細書に記載の組成物は、患者に対して、経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、結節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内（i.v.）注射または腹腔内に投与することができる。また別の場合には、本発明の改変T細胞は、対象における炎症の部位、対象における局所的疾患部位、リンパ節、臓器、腫瘍などに直接的に注射される。

#### 【0220】

##### 薬学的組成物

本発明の薬学的組成物は、本明細書に記載されたような改変T細胞を、1つまたは複数の薬学的または生理的に許容される担体、希釈剤または添加剤と組み合わせて含みうる。そのような組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液；ブドウ糖、マンノース、ショ糖またはデキストラン、マンニトールなどの糖質；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；酸化防止剤；EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；ならびに保存剤を含有してもよい。本発明の組成物は、静脈内投与用に製剤されることが好ましい。

#### 【0221】

10

20

30

40

50

本発明の薬学的組成物は、治療（または予防）される疾患に適した方法で投与することができる。投与量および投与回数は、患者の状態、並びに患者の疾患の種類および重症度などの因子により決定されるが、適量は臨床試験により決定され得る。

#### 【0222】

「免疫学的有効量」、「抗免疫応答有効量」、「免疫応答阻害有効量」または「治療量」が示されている場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、免疫応答、および状態の個々の違いを考慮して医師によって決定されうる。概して、本明細書に記載のT細胞を含む薬学的組成物は、細胞 $10^4 \sim 10^9$ 個/kg体重、好ましくは細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg体重であって、これらの範囲内のすべての整数值を含む投与量で投与することができると言うことができる。また、T細胞組成物をこれらの用量で複数回投与することもできる。細胞は、免疫療法において一般的に公知である輸注手法を用いることによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照されたい）。個々の患者に関する最適な投与量および治療レジメンは、疾患の徴候に関して患者をモニタリングして、それに応じて治療を調節することによって、医療の当業者によって容易に決定されうる。

10

#### 【0223】

ある特定の態様においては、改変T細胞を対象に投与し、続いてその後に血液を再び採取して（またはアフェレーシスを行って）、それ由来のT細胞を本発明に従って代謝的に増強した上で、これらの改変されたT細胞を患者に再び輸注することが望ましいと考えられる。この過程を数週間毎に複数回行うことができる。ある特定の態様において、T細胞は約10ml～約400mlの採取血から入手することができる。ある特定の態様において、改変T細胞は約20ml、30ml、40ml、50ml、60ml、70ml、80ml、90mlまたは100mlの採取血から入手される。理論に拘束されるわけではないが、この複数回の採血／複数回の再輸注プロトコールを用いることは、T細胞のある特定の集団を選別するために役立つ可能性がある。

20

#### 【0224】

本発明のある特定の態様において、T細胞は本明細書に記載の方法を使用して改変され、かつ、本明細書に記載の方法、またはT細胞が治療レベルまで増大される当技術分野において公知の他の方法を用いて刺激されるか、活性化されるか、または増大させられ、これらは、任意の利用可能な抗HIV療法を非限定的に含む、任意の数の妥当な治療様式とともに（例えば、その前、それと同時、またはその後に）患者に投与される。

30

#### 【0225】

患者に投与される上記の治療の投与量は、治療される状態および治療のレシピエントの厳密な性質と応じて異なると考えられる。本発明において有用であると考えられる方法および組成物は、実施例に示された特定の製剤に限定されないことが理解される必要がある。以下の実施例は、当業者に対して、本発明の細胞、増大および培養の方法、ならびに治療法の作製および使用の行い方の徹底した開示および説明を行う目的で述べられ、本発明者らが自分たちの発明とみなしていることの範囲を限定することを意図するものではない。

#### 【0226】

本発明の実施には、別段の表示がある場合を除き、当技術分野の技能の範囲内にある分子生物学（組換え手法を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来の手法が用いられる。そのような手法は、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", fourth edition (Sambrook, 2012) ; "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984) ; "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010) ; "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997) ; "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987) ; "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002) ; "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011) ; "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002)などの文献中に十分に説明されている。これらの手法は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作製に適用可能であり、そのため、本発明の策定および実施に

40

50

おいて考慮されている。特定の態様のために特に有用な手法について、以下の項において考 察する。

#### 【実施例】

##### 【0227】

###### 実験的実施例

本発明を、以下の実験的実施例を参照することによってさらに詳細に説明する。これらの実施例は例示のみを目的として提供されるものであり、別に指定のある場合を除き、限定的であることは意図していない。したがって、本発明は、以下の実施例に限定されるとは全くみなされるべきではなく、そうではなくて、本明細書において提供される教示の結果として明らかになる任意かつすべての変更も範囲に含むとみなされるべきである。

10

##### 【0228】

それ以上の説明がなくても、当業者は、前記の説明および以下の例示的な実施例を用いて、本発明の化合物を作製して利用し、請求される方法を実施することができると考えられる。以下の実施例は、このため、本発明の好ましい態様を具体的に指摘したものであり、本開示のそれ以外の部分を限定するものとは全くみなされるべきでない。

##### 【0229】

これらの実施例において使用した材料および方法を、次に説明する。

##### 【0230】

###### 一本鎖可変断片 (scFv) ベースのCAR構築物

scFvを、CD137およびCD3 シグナル伝達ドメインを用いて第2世代CARの単一転写物として、またはDAP12を伴うKIR2によって人工NK細胞受容体として、合成した。すべての構築物を、独占所有権のあるコドン適合インデックス (Geneart, Life Techn.) に従つて、1つの転写物としてのヒトにおける発現のためにコドン最適化した。

20

##### 【0231】

以下の構築物を、本発明において作り、試験した：V1/V2グリカンを標的とする「PGDM 1400」(SEQ ID NO: 10～13)、V3/V4グリカンを標的とする「PGT128」(SEQ ID NO: 14～17)、CD4結合部位を標的とする「VRC01」(SEQ ID NO: 18～21および34～35)、CD4結合部位を標的とする「VRC01 c-mut」(HCDR1とHCDR3との間の非標準ジスルフィド結合の変異) (SEQ ID NO: 26～29)、CD4結合部位を標的とする「3B NC60」(SEQ ID NO: 22～25)、およびCD4 Dap12-KIR2 (SEQ ID NO: 30～31)。

30

##### 【0232】

###### ベクター構築

元の臨床試験ベクターのバックボーンであるpRT43.2 GFPを入手し (Liu and Eiden. Retrovirology 9, 51 (2012))、制限部位リンカーを、CMVプロモーター領域を除去する、PstI部位およびSalI部位中に挿入した。PGKプロモーターサークルで発現するCD4 配列を、オリゴ

5'GTATCGATCACGAGACTAGC (SEQ ID NO: 40)

および

5'TTAAACCGGTGTCTGGCCTTGAGTGGTGA (SEQ ID NO: 41)

40

でプラスミドpRRL.PGK.F3から増幅し、pRT43.2内のリンカーにおけるXbaI部位およびApaI部位中に挿入した。pTRPE CD4 を、増幅によって作った。CD4細胞外ドメインを、以下のプライマーで、元の臨床試験CD4-CD3 構築物を含有するpRRL.PGK.F3レトロウイルスバックボーンからPCRによって増幅した。

プライマー-1センス (SEQ ID NO: 36) :

5'-TTAATGGATCCATGAACCGGGAGTCCCTTT-3'

プライマー-2アンチセンス (SEQ ID NO: 37) :

5'-AAGGACTTCCGGATGGCTGCACCGGGGTGGACCATG-3'

50

## 【0233】

PCR産物を、次いで、CD8 細胞外ヒンジおよび膜貫通ドメイン、ならびに4-1BBおよびCD3 の細胞内共刺激ドメイン（ICD）を含有するpELNSレンチウイルスベックボーンにおけるBamHI制限部位およびBspE1制限部位中に挿入した。CD8 ヒンジ-CD8 TM-CD3 を含有するか、またはCD8 ヒンジ-CD28TM-CD28-CD3 ICDを含有するpELNSレンチウイルスベクター入手して、以下のプライマーでヒンジ-TM領域およびICD領域をPCR増幅するための鋳型として使用した。

プライマー-3センス（SEQ ID NO: 38）：

5'-GGGACACTCCGGAACCACGAGGCCAGCGCCGCG-3'

10

プライマー-4アンチセンス（SEQ ID NO: 39）：

5'-GGGACACGTCGACTTAGCGAGGGGGCA-3'

## 【0234】

このPCR鋳型を、次いで、最近作製されたpELNS CD4 4-1BB 構築物におけるBspE1部位およびSall部位中に挿入して、CD8 ヒンジ-4-1BB-CD3 領域を含有する領域を置き換えた。プラスミドを、次いで、大腸菌（*E. coli*）のTop10株中にエレクトロポレーションして、伝播させた。

## 【0235】

HIV p24GagエピトープKAFSPEVIPMF（SEQ ID NO: 42、pTRPE B57-KF11）を認識することができるB57拘束性TCRを発現するレンチウイルスベクターを、TCR およびTCR の遺伝子配列（IDT）を合成することによって作製した。TCR およびTCR の遺伝子配列を、以前に記載されているように（Varela-Rohena et al., Nature medicine 14, 1390-1395 (2008)）、両方のTCR遺伝子の対等の発現を可能にするT2Aによって分離した。VRC01、3BNC60、PGT128、およびPGDM1400 scFv CARを、軽鎖-リンカー-重鎖の配置で、公開されている親抗体配列から作製した。リンカー配列は、以下である。GGSSRSSSSGGGGSGGGG(SEQ ID NO: 43)

20

アミノ酸配列を、コドン最適化して（Geneart）、二本鎖DNA断片として合成し（IDTまたはGeneart）、適した制限部位を隣接させ、次いで、BamHI制限部位およびBspE1制限部位を用いてpTRPE発現プラスミド中にクローニングした。PG9 scFvを、BamHI制限部位およびBspE1制限部位を用いてpTRPE発現プラスミド中にクローニングした。本研究において使用した、最適化されたHIV CARの配列のいくつかを、図18（SEQ ID NO: 44～61、アミノ酸）および図19（SEQ ID NO: 62～79、核酸）に列挙する。

30

## 【0236】

VRC01、VRC01c-、および3BNC60 scFvベースのKIRおよびIgG4-41BB- CARの構築 VRC01、VRC01c-、3BNC60 scFvを、BamHIおよびNheIでの消化後に、第3世代レンチウイルス発現ベクター中の、EF1 プロモーターの制御下にクローニングして、scFvが、その後KIRS2膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインが続く9アミノ酸GSリンカーとインフレームであるようにした。DAP-12は、scFvリーダー配列の5'に位置し、そこからT2Aリボソームスキッピング部位によって分離される。同様の戦略を適用して、scFvコード配列を、その後CD8膜貫通ドメインおよび41BB共刺激ドメインおよびCD3 シグナル伝達ドメインが続くIgG4ヒンジとインフレームでのscFvの発現を可能にする、ベクター中にクローニングした。

40

## 【0237】

VRC01、3BNC60、PGT128、PGDM1400、およびPG9 scFvベースのCD3 CARの構築 VRC01、3BNC60、PGT128、PGDM1400、およびPG9 scFvコード配列を、5'隣接BamHI部位および3'隣接BspE1部位をコードするプライマーでPCR増幅して、消化、ならびに、上述のpELNS CD8 ヒンジ-CD8 TM-CD3 中のリーダー配列とCD8 ヒンジとの間へのクローニングを可能にした。すべての構築物の配列を検証した。

50

【 0 2 3 8 】

(表 1 ) 配列一覧

SEQ ID 番号	説明	
1	CD4 ζ	核酸
2	EF1α プロモーター	核酸
3	CD4 細胞外ドメイン	核酸
4	CD8α 細胞外ヒンジ	核酸
5	CD8α 膜貫通ドメイン	核酸
6	CD3 ζ	核酸
7	CD4 CD28 ζ	核酸
8	CD28 膜貫通ドメイン	核酸
9	CD28 共刺激ドメイン	核酸
10	PGDM1400-KIR	核酸
11	PGDM1400-KIR	アミノ酸
12	PGDM1400 scFv	核酸
13	PGDM1400 scFv	アミノ酸
14	PGT128-KIR	核酸
15	PGT128-KIR	アミノ酸
16	PGT128 scFv	核酸
17	PGT128 scFv	アミノ酸
18	VRC01-KIR	核酸
19	VRC01-KIR	アミノ酸
20	VRC01 scFv	核酸

10

20

30

40

50

21	VRC01 scFv	アミノ酸
22	3BNC60-KIR	核酸
23	3BNC60-KIR	アミノ酸
24	3BNC60 scFv	核酸
25	3BNC60 scFv	アミノ酸
26	VRC01c-KIR	核酸
27	VRC01c-KIR	アミノ酸
28	VRC01-c scFv	核酸
29	VRC01-c scFv	アミノ酸
30	CD4 Dap12-KIRS2	核酸
31	CD4 Dap12-KIRS2	アミノ酸
32	CD4KIR	核酸
33	CD4KIR	アミノ酸
34	VRC01 IgG4 bbz	核酸
35	VRC01 IgG4 bbz	アミノ酸
44	最適化されたCD4-CD28 ζ	アミノ酸
45	最適化されたCD4 4-1BB ζ	アミノ酸
46	最適化されたCD4 細胞外ドメイン	アミノ酸
47	最適化されたCD8α 細胞外ヒンジ	アミノ酸
48	最適化されたCD8α TM	アミノ酸
49	最適化されたCD28 TM および ICD	アミノ酸
50	最適化された4-1BB	アミノ酸
51	最適化されたCD3 ζ	アミノ酸
52	最適化されたPG9 CD3 ζ	アミノ酸
53	最適化されたPGT128 CD3 ζ	アミノ酸
54	最適化されたVRC01 CD3 ζ	アミノ酸
55	最適化された3BNC60 CD3 ζ	アミノ酸
56	最適化されたPGDM1400 CD3 ζ	アミノ酸
57	最適化されたPG9	アミノ酸
58	最適化されたPGT128	アミノ酸
59	最適化されたVRC01	アミノ酸
60	最適化された3BNC60	アミノ酸
61	最適化されたPGDM1400	アミノ酸
62	最適化されたCD4-CD28 ζ	核酸
63	最適化されたCD4 4-1BB ζ	核酸
64	最適化されたCD4 細胞外ドメイン	核酸
65	最適化されたCD8α 細胞外ヒンジ	核酸
66	最適化されたCD8α TM	核酸
67	最適化されたCD28 TM および ICD	核酸
68	最適化された4-1BB	核酸
69	最適化されたCD3 ζ	核酸
70	最適化されたPG9 CD3 ζ	核酸
71	最適化されたPGT128 CD3 ζ	核酸
72	最適化されたVRC01 CD3 ζ	核酸
73	最適化された3BNC60 CD3 ζ	核酸

10

20

30

40

74	最適化されたPGDM1400 CD3 ζ	核酸
75	最適化されたPG9	核酸
76	最適化されたPGT128	核酸
77	最適化されたVRC01	核酸
78	最適化された3BNC60	核酸
79	最適化されたPGDM1400	核酸

【0239】

レンチウイルスの採取、濃縮、および初代CD8 T細胞の形質導入

50

プラスミド調製物を、VSV糖タンパク質、HIV-1 GagおよびPol、ならびにRevを発現する市販のレンチウイルスパッケージングプラスミド（pRSV.REV、pMDLg/p.RRE、pVS V-G）と組み合わせて、Lipofectamine 2000トランスフェクション試薬（Invitrogen, Life Technologies）を用いてpTRPE移入ベクターとともにHEK293T細胞上にトランスフェクトした。同じ過程を、RD114 EnvおよびMMLV gag/polプラスミド（pMSCV RD 114およびpNGLV3g/p）で完了して、レトロウイルスを作製した。30 mlアリコートの上清を、24時間および48時間の時点で収集し、8,500RPM、4°での一晩の超遠心分離によって濃縮した。上清を吸引して、細胞ペレットを1.2 mlの総体積に再懸濁し、ドライアイス上で急速凍結し、貯蔵のために-80°へ移した。

## 【0240】

10

## 細胞培養 実験プロトコール

健常ドナーのCD8 Tリンパ球およびCD4 Tリンパ球入手して、Dynabeadsの CD3/CD28コーティングT-expanderビーズで活性化した。T細胞を、RosetteSep Human CD 4+ T Cell Enrichment CocktailまたはRosetteSep Human CD8+ T Cell Enrichment Cocktailを用いたネガティブ選択により、製造業者のプロトコール（StemCell Technologies）に従って精製した。T細胞を、10%胎児ウシ血清（Seradigm）、1% Penn Strep（Life Technologies）、2 mM GlutaMax（Life Technologies）、および25 mM HEPES緩衝液（Life Technologies）を補給した（ThermoFisher Scientific） RPMI 1640（Life Technologies）において、1mLあたり $1 \times 10^6$ 個で培養した。T細胞を、3:1のビーズ対細胞比の抗CD3/CD28コーティングDynabeads（Life Technologies）、および1ミリリットルあたり100~300国際単位の組換えヒトインターロイキン2で5日間刺激し、次いで、ビーズを除去した。刺激の1日後に、200ulのレンチウイルス上清を $0.5 \times 10^6$ 細胞に添加した。MMLVベクター形質導入を、1 mlのウイルス上清をRetronectin（Takara）コーティングされた24ウェルプレートに添加し、製造業者の説明書に従ってスピノキュレーションして（spinoculated）、3および5日目に行った。培地を、3日目に2倍にして、5日目に完全に交換し、次いで、細胞培養を通して1日おきに、または細胞数に基づいて必要な場合に添加した。

20

## 【0241】

## HIV-1感染

抗CD3/CD28ビーズを除去した2日後に、CD4 T細胞にCCR5指向性HIV株BaIを感染させ、24時間後に、変動するエフェクター対標的（E:T）比でCAR+ CD8 T細胞と共に培養した。CCR5指向性HIV-1 BaIウイルスストック（280ng/ml p24）を、抗CD3/CD28で活性化されたCD4 T細胞から細胞を含まない上清を採取することによって調製した。ビーズを除去した2~3日後に、およそ1 mlの上清を2000万細胞あたりに添加することによって、活性化されたCD4 T細胞を感染させた。次の日に、CD4 T細胞およびCD8 T細胞を変動するE:T比で共培養し、HIVの広がりを、細胞内p24染色によってモニタリングし、KC57抗Gag-RD1抗体（Beckman Coulter）およびInvitrogen Fix and Perm緩衝液で、製造業者の説明書に従って検出した。

30

## 【0242】

40

## インビトロ細胞傷害およびサイトカインアッセイ

HIV-1 gp120/41エンベロープ（YU-2）を発現するK562細胞のインビトロ殺傷を、51Cr放出アッセイで試験した。 $5 \times 10^5$ 個の標的細胞に、50 μCiのNa<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>（Perkin Elmer）を90~120分間負荷し、2回洗浄して、5% FBSを有するフェノールレッドを含まない培地に再懸濁した。CARまたはモックを形質導入したT細胞（最初の活性化の8~10日後）を、さまざまなエフェクター：標的（E:T）比で4時間、負荷された標的細胞とコインキュベートして、上清中へのクロム放出を、MicroBeta2プレートカウンター（Perkin Elmer）で測定した。細胞内サイトカイン産生は、 $5 \times 10^5$  NTD、CD4 CAR、またはscFv CARを形質導入したT細胞を、1:1のE:T比で親K562、HLA-DR\*0401形質導入K562、またはHIV YU2 Env形質導入K562と6時間、共培養した後に測定した。サイトカイン産生は、ラット抗ヒトIL-2 APC（BD biosciences）、マウス抗ヒトMIP-1 PerCP

50

Cy5.5 (BD biosciences)、マウス抗ヒトIFN- $\gamma$  FITC (BD biosciences)、およびマウス抗ヒトCD107a PE (BD biosciences)をInvitrogen Fix and Perm緩衝液とともに用いて、以前に記載されているように(86)検出した。標的細胞による自然放出(エフェクター細胞なし)を、同じ体積において分析し、最大放出を、標的細胞を5%の最終濃度のSDSで処置することによって評価した。特異的溶解のパーセント=[(実験的放出-自然放出)/(最大放出-自然放出)]\*100。すべての実験を、少なくとも3回の繰り返しで行い、初代ヒトT細胞は3人の別個のドナー由来であった。インターフェロン産生は、ELISA(R&D)により製造業者の推奨に従って、400ulにおける $3 \times 10^5$ 個のエフェクター細胞と $10^5$ 個の標的細胞の24時間の共培養後に、二連の培養上清において定量した。

#### 【0243】

##### CCR5 ZFN破壊

以前に記載されたCCR5特異的ZFNを、RNA発現ベクター中にクローニングした(Beatty et al., Cancer immunology research 2, 112-120 (2014))。mMessage mMACHINE T7 Transcription Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific)を利用して、キャップ構造を有するインビトロ転写RNAを作製し、それをその後、RNeasy Mini Kit (Qiagen)で精製して、RNアーゼを含まない水に1 mg/mlで溶出した。正常ドナーCD8 T細胞を、OPTI-MEM培地で3回洗浄し、エレクトロポレーションの前に $1 \times 10^8$ /mlの最終濃度で再懸濁した。0.1ml中の $10^6$ 個のT細胞を、各ZFNをコードする30  $\mu$ gのRNAと混合し、2 mmキュベット(Harvard Apparatus BTX)においてECM830 Electro Square Wave Porator (Harvard Apparatus BTX)を用いてエレクトロポレーションし、CD3/CD28コーティングDynabeads (Life Technologies)での活性化の前に48時間、30度インキュベートした。

#### 【0244】

CCR5 ZFNによるゲノム改変の効率を測定するために、ゲノムDNAを、T細胞から精製して、Illuminaディープシークエンシング(Wang et al., Nucleic Acids Res 44, e30 (2016))用の試料を調製するために使用した。簡潔に言うと、以下の2つのCCR5特異的なプライマーペアでのネステッドPCR法を用いて、CCR5標的領域を増幅し、MiSeqアダプターを付加した。CCR5 Out-Out1プライマー:

CTGTGCTTCAAGGTCTTGTC (SEQ ID NO: 80) および

CTCTGTCTCCTTCTACAGCCAAGC (SEQ ID NO: 81)

CCR5 MiSeqアダプタープライマー:

ACACGACGCTTCCGATCTNNNNNGCCAGGTTGAGCAGGTAGATG (SEQ ID NO: 82)

およびGACGTGTGCTTCCGATCTGCTCTACTCACTGGTGTTCATCTT (SEQ ID NO: 83)

次いで、バーコードプライマーペアを用いて、その後のPCR反応において配列バーコードを付加した。遺伝子改変レベルの分析のために、特別に書かれたコンピュータスクリプトを使用して、ペアエンドの150bp配列をマージし、SeqPrep (John St. John, <https://github.com/jstjohn/SeqPrep>)を介してアダプターをトリミングした。リードを、野生型鑄型配列に対して整列させた。マージしたリードを、以下の基準を用いてフィルターにかけた: 5'末端および3'末端(23bp)は、期待されるアンプリコンと正確に一致しなければならず、リードは、Bowtie2 (Yu et al., Journal of virology 81, 1619-1631 (2007))によりデフォルト設定で決定された場合に標的ゲノム中の異なる遺伝子座に位置してはならず、かつ欠失は、アンプリコンサイズの70%未満または70bp未満の長さでなければならない。整列した配列における欠失挿入(indel)イベントは、長さが1 bpの欠失挿入も、現実のイベントを実際よりも少なく数えることを回避するために真の欠失挿入と考えられること、および、真の欠失挿入は、各パートナーZFNに対する結合部位の(ギャップに近接した)終わりから2番目の塩基間にわたる配列内で起こる欠失を含まなければならぬことを除いて、以前に記載されているように(Gabriel et al., Nat Biotech 29,

10

20

30

40

50

816-823 (2011)) 定義された。

#### 【0245】

##### ヒト化マウスモデル

6週齢のNSG (NOD-scid IL2Rgnull) マウスを、Jackson Laboratory (JAX) から入手し、7週で、PBSと1：1で混合した30mg/kg ブスルファンで処置した。24時間後、マウスに、100ulのPBS中0.5%ヒト血清アルブミンにおける $10 \times 10^6$ 個のヒトリンパ球を、尾静脈を介して注射した。3週間後、マウスに、PBSと1：1で混合した15 ngのHIVのCCR5指向性Bal株を、尾静脈注射を介して感染させた。末梢血を、眼窩後方出血により入手して、BD溶解緩衝液およびBD TruCountチューブを用いて以前に記載されているように (Richardson et al., Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 22, 1084-1095 (2014))、マウス抗ヒトCD45 PerCp Cy5.5 (BD Biosciences)、マウス抗ヒトCD4 BV421 (Biolegend)、およびマウス抗ヒトCD8 BV711 (Biolegend) で染色して、ヒトCD4リンパ球数およびCAR+ CD8リンパ球数を数えた。

10

#### 【0246】

##### HIVウイルス負荷アッセイ

RNAを、Cillo et al., J Clin Microbiol 52, 3944-3951 (2014)に記載されている方法を用いて、利用可能性に応じて10~30  $\mu$ lの血漿から抽出し、15  $\mu$ lの最終体積において再構成した。抽出の前に、均一量の複製能を有するトリ肉腫 (RCAS) ウィルスを各血漿試料中にスパイクし、別々に増幅して、ウイルス / RNAの回収率およびPCR阻害がないことを検証した (Palmer et al., J Clin Microbiol 41, 4531-4536 (2003))。RNAを、ランダムヘキサマーを用いて逆転写し、インビトロ転写RNA標準物を用いて、ABI 7500FASTリアルタイムサーモサイクラー上でLightCycler 480 Probes Master (Roche; Indianapolis, IN) を用いたQ-PCRによって定量した。各試料について、Q-RT-PCR反応を、5  $\mu$ l RNAに対して二連で行い；逆転写酵素なしの反応およびRCAS増幅を、2.5  $\mu$ l RNAを用いて1試料あたり1ウェルについて行った。HIV-1プライマー / プローブは、Cillo et al., J Clin Microbiol 52, 3944-3951 (2014)に記載されているように、pol遺伝子を標的として、すべてのグループMクレードを検出し、RCAS増幅は、Palmer et al., J Clin Microbiol 41, 4531-4536 (2003)に記載されているプライマー / プローブを使用した。HIV-1定量化を、出発血漿の等価体積に対して正規化した。

20

#### 【0247】

実験の結果を、次に説明する。

#### 【0248】

実施例1：レンチウイルスバックボーンは、CD4 CAR発現およびHIV複製の制御を増強する以前の臨床試験において使用されたCD4 CARを試験する前臨床研究により、この構築物を発現するT細胞は、天然に生成されたHIV特異的なT細胞と等価の抗ウイルス活性を有することが示された。これらの臨床試験が長続きする臨床応答を実証できないことの仮説は、これらの臨床試験において使用されたT細胞が、内因性のHIV特異的なT細胞応答よりも強力ではなかったということである。本発明は、T細胞がHIV複製を制御する効力を増強するために、CARの各構成要素を段階的に最適化する。

30

#### 【0249】

初代ヒトCD8 T細胞に、元のマウスレトロウイルスベクター (MMLV) 臨床試験構築物、および、CD4 CAR発現を駆動するためにPGKプロモーターも使用した類似の第3世代のレンチウイルスベクター構築物を形質導入した。初代ヒトCD8 T細胞のレンチウイルス形質導入は、マウスレトロウイルスと比較して、約10倍高いCAR発現の中央蛍光強度 (MFI) を、一貫して結果としてもたらした。

40

#### 【0250】

レンチウイルスベクター、EF1 プロモーター、およびCD8 膜貫通ドメインを有する、本発明の新たな改善されたCD4膜結合型キメラ受容体 (CD4 構築物) は、PGKプロモーターおよびCD4膜貫通ドメインを有する構築物 (1:5および1:10で制御を喪失) よりも

50

ずっとより低いE:T比で（およそ1:100まで）、HIV-1を制御した。レトロウイルスPGK CD4 TM CARと比較したレンチウイルスPGK CD4 TM CARのより高い発現を考慮しても、HIV-1複製の制御に関して小さな有益性が見られた。重要なことに、CD8sがおよそ1:100の比まで非感染のままであったように、EF1-CD8 TM構築物のより高い発現は、より高い感染率を促進せず、他方、PGK CD4 TM操作されたCD8細胞は、より低いE:T比で感染した（図2A～2D）。CD4 CAR形質導入CD8 T細胞をより低いE:T比まで希釈すると、レンチウイルスベクターで形質導入されたT細胞は、レトロウイルスベクターで形質導入されたT細胞と比較してHIV複製の制御に優れていた（図2F～2G）。最終的に、形質導入されたCD8 T細胞のいずれの集団も、1:50のE:T比ではHIVの広がりを制御できなかった。このように、本発明のプロモーターおよび膜貫通の変化は、CD4膜結合型キメラ受容体の有効性を改善し、HIV-1感染症の制御の増加を提供した。

#### 【0251】

CD4 CAR形質導入CD8 T細胞が、細胞を含まないウイルスによる感染を受けやすいという最近の報告（Liu et al., Journal of virology 89, 6685-6694 (2015) ; Zhen et al., Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 23, 1358-1367 (2015)）とは対照的に、本結果は、HIV感染CD4 T細胞を伴う低いE:T比に希釈した後に、CAR CD8 T細胞における細胞内gagの検出を示すだけである（図2E）。非形質導入CD8 T細胞に比べて、高レベルの細胞内gagが、CAR形質導入CD8 T細胞中に存在することが示され、CD4 CARがこれらの細胞を、感染を受けやすくすることが示される（図2E）。重要なことに、レンチウイルス形質導入CD8 T細胞上のCD4のより高い発現は、これらの細胞のより大きな感染のレベル、またはより高いE:T比での感染を促進しなかった。このデータにより、レンチウイルスベクターは、HIVを標的とするためにT細胞を再度方向付ける構築物を導入する好ましい方法であることが実証された。

#### 【0252】

実施例2：EF1 プロモーターおよびCD8 膜貫通ドメインは、CAR発現を改善し、HIV-1を制御する

EF1-CD8TM構築物は、最低のE:T比でHIV-1複製を制御することが示された。EF1プロモーターでCD4 TMの発現を単純に増加させることは（図3A～3B、中央のカラム）、HIV-1複製の制御を改善したが、EF1 プロモーターでの発現の増加とCD8 膜貫通の置換との組み合わせは、最良のHIV-1の制御を生じた。その上、CD8 TMは、特に、EF1 構築物については1:50の比、およびPGK構築物については1:25の比で、CD4膜結合型キメラ受容体CD8細胞の感染を低減させるように見られた（図3A～3B、右のセットのカラム）。

#### 【0253】

CD8 TMドメインの置換は、1:25および1:50のE:T比で、使用したプロモーターにかかわらずCAR+ CD8 T細胞の感染を減少させた（図3B）。しかし、図2A～2Gに見られるように、CAR+ CD8 T細胞は、それらがもはやHIV感染を制御できず、それら自体が感染に屈する点まで希釈することができる。このように、ウイルスベクター、プロモーター、および膜貫通ドメインの変更は、臨床試験のレトロウイルスを上回る50倍の効力の増加を提供し、インピトロで1:50のE:T比でHIV複製の完全な制御を結果としてもたらした（図3C～3D）。

#### 【0254】

このように、CD8 膜貫通の変化は、HIV-1複製の制御を改善する重要な変化であった。

#### 【0255】

実施例3：広域中和抗体ベースのCARはHIV-1を制御することができる

図4A～4Bに見られるように、一本鎖可変断片（scFv）広域中和抗体（bnAb）ベースのCARおよびCD4膜結合型キメラ受容体は両方とも、HIV-1感染を制御することができる。HIV-1結合の幅広さおよび中和効力に範囲があるscFvのパネル（図4Aにおける表を参照されたい）を、CD4膜結合型キメラ受容体と同じEF1-CD8 TM-構築物バックボーン中にクローニングして、HIV-1複製を制御するそれらの能力について評価した。4時間の

10

20

30

40

50

共培養由来のCr51放出殺傷アッセイにより、scFv CARまたはCD4膜結合型キメラ受容体のいずれかを発現するCD8 T細胞は、Env発現標的細胞を溶解したが、非形質導入(NTD)T細胞は溶解しなかったことが示された。これにより、scFv CARは、妥当なフォールディング/コンフォメーションで発現し、Envに結合できたことが示される(図4B)。scFv CARの多くは、一貫して、Env発現標的に応答して高レベルの細胞内サイトカインを産生した。CD4膜結合型キメラ受容体およびscFv CARは両方とも、最大で1:50~1:200のE:T比で、NTD対照に比べてEnv標的細胞の溶解を示し(図4C)、これは、最大で1:25のE:T比で有効性を示した、図1に示されたKF11 TCRの活性よりも優れていた。

#### 【0256】

理論に拘束されることは望まないが、HIVを標的とするCARであって、抗HIV scFvを含むCARの使用は、HIV感染細胞のリザーバー集団を有する対象の処置にとって有益であろうことが理解される。本発明は、そのため、本発明の1つの局面において、そのような使用のためのそのようなCARを含む。

10

#### 【0257】

実施例4: CD4 CARは、インビトロでHIV特異的エリートコントローラーTCRよりも100倍を上回って強力である

エリートコントローラー(EC)は、ARTの非存在下でHIV複製を制御することができる、まれな個体である。HLA-B57などのある特定のHLAアレルが、エリートコントローラーコホートにおいて大きな比率を占めており、T細胞応答が、これらの個体におけるHIV複製の制御において鍵となる役割を果たすことが示唆される(Walker et al., *Nature reviews Immunology* 13, 487-498 (2013))。ECから単離されたHIV特異的なT細胞は、HIV進行者から単離されたHIV特異的なT細胞よりも高い細胞溶解潜在能力を有する(Miguel es et al., *PNAS* 97, 2709-2714 (2000); Saez-Cirion et al., *PNAS* 104, 6776-6781 (2007))。したがって、CD4 CARを発現するT細胞が、患者においてHIV複製のより良好な制御と関連するエリートコントローラーから単離されたHLA-B57拘束性TCRを発現するT細胞よりも良好にHIV複製を制御することができるか否かを判定するために、HLA-B57発現初代ヒトCD8 T細胞に、EF1プロモーター下で同様に発現させたKF11(HIV p 24GagエピトープKAFSPEVIPMF、SEQ ID NO: 42)に特異的なTCRを形質導入して、HIVの広がりを限定するその能力を、同じドナー由来のCD4 T細胞を用いて決定した。KF11 TCRは、患者におけるHIV-1複製のより良好な制御と関連していることが当技術分野において公知であり、HIV-1に対する最も強力な患者由来のTCRの1つである。KF11 TCR形質導入CD8 T細胞は、1:25のE:T比に至るまでHIV複製を低減させたが、HIV複製の完全な制御は決して達成されなかった(図1A~1Bおよび図3A~3D)。対照的に、本発明のCD4 CARは、1:100のE:T比に至るまでほぼ完全にHIVを制御した。これらの結果により、CD4 CARは、HLA-B<sup>\*</sup>57拘束性KF11エリートコントローラーTCRよりも良好にNL4-3 HIV-1複製を制御することが判明した。

20

#### 【0258】

これらのデータにより、本発明のCD4 CARは、内因性HIV T細胞応答よりもずっと大きな効力を有することが示され、最適化されたCD4 CARを発現するT細胞は、養子T細胞療法により達成することができるエフェクター対標的比で、ART除去後にHIV複製を制御できるであろうことが示唆される。

30

#### 【0259】

追加的に、図5A~5Bにより、CD28共刺激は、HIV-1 Balの制御を促進したことが判明する。CD4構築物と同様にまたはそれよりも良好に、一貫してHIV-1を制御したもう1つの膜結合型キメラ受容体構築物は、CD4 CD28構築物であった。

40

#### 【0260】

実施例5: CD28および4-1BBの共刺激は、インビトロでHIV-1複製の制御に対して反対の効果を有する

T細胞は、増殖、エフェクター機能、および長期の生存のために共刺激シグナルを必要とする。CD28および4-1BBなどの追加の共刺激ドメインは、より最近のCAR設計中に組み

50

入れられており、インビボで長続きするCAR T細胞応答を誘導するために必要であるとわかっている (Van der Stegen et al., *Nature reviews. Drug discovery* 14, 499-509 (2015))。CD28、4-1BB、CD28 + 4-1BB、OX40、ICOS、またはCD27を含む、種々の共刺激ドメインを組み入れたCD4 CARのパネルを、CD3- ドメインと併せて作製して、インビトロでHIV感染を制御するそれらの能力を試験した。4-1BB、CD27、またはICO S共刺激ドメインを含有するCARを発現するCD8 T細胞は、CD3 シグナル伝達ドメインのみを含有するCARを発現するT細胞ほど有効にはHIVを制御せず、これらの共刺激経路は、HIV複製のT細胞制御を干渉したことが示唆された (図5A~5B)。OX40またはCD28と4-1BBとの組み合わせを含有するCARは、CD3- のみを含有するCARと同様のレベルまでHIVを制御した。対照的に、CD28は、インビトロで制御を改善して、CD28共刺激がHIV特異的CARにおいて有益であることが示された。

#### 【0261】

実施例5：CD4 CARはEnv+細胞に対して特異的に応答するが、MHCクラスII+細胞に対しては特異的に応答しない

前臨床データにより、臨床試験CD4 CARを発現するT細胞は、高レベルの、CD4の低親和性リガンドであるMHCクラスIIを発現する、Raji細胞を殺傷しなかったことが実証された (Romeo et al., *Cell* 64, 1037-1046 (1991))。しかし、患者におけるCD4 CAR T細胞の長い半減期は、MHCクラスIIとの低親和性の相互作用、またはおそらくウイルスブリップ中のEnvの放出の結果であると推測された (Scholler et al., *Science translational medicine* 4, 132ra153 (2012))。以前に記載されたベクター改変が、MHCクラスIIに対するオフターゲットの反応性を助長したかどうかを判定するために、CD4 CAR+ CD8 T細胞応答を、高レベルのHLA-DR<sup>\*</sup>0401アレルを安定に発現するK562細胞株に対して測定した (図14を参照されたい)。CD8 T細胞に、CD3- 、4-1BB-CD3- 、またはCD28-CD3- 共刺激ドメインを含有する最適化されたCD4 CARを形質導入し、非改変K562標的細胞、HLA-DR<sup>\*</sup>0401+ K562細胞、またはHIV YU2 Env+ K562細胞と培養した。CAR形質導入CD8 T細胞は、HIV Env+標的に応答してIL-2、CD107a、IFN- 、およびMIP-1<sub>α</sub> を產生したが、HLA-DR+ K562または親K562に応答しては產生せず、最も堅牢な產生はCD28含有CAR T細胞においてであった (図11A)。少量のMIP-1<sub>α</sub> シグナルが、多分CAR発現T細胞において観察されたいくらかの構成性の非抗原特異的なシグナル伝達のために、親標的またはHLA-DR発現標的のいずれかと混合した場合にすべてのCARについて観察され、それは非形質導入対照においては観察されなかった。しかし、単独でまたは親K562と培養したCAR T細胞と比較して、追加的なサイトカインまたはCD107aの產生は、MHCII発現細胞に応答して検出されなかった。

#### 【0262】

サイトカイン產生の欠如にもかかわらず、CAR+ CD8 T細胞がMHCクラスII標的を殺傷できるかどうかを判定するために、共培養アッセイを行った。CD28-CD3- 共刺激ドメインを含有するCD4 CARを、HLA-A<sup>\*</sup>02+/GFP+ K562およびHLA-DR<sup>\*</sup>0401+/mCherry+ K562の1:1混合物に添加して、2つのK562細胞タイプの比を経時的に測定した。72時間で上回る長期の培養は、HLA-DR<sup>\*</sup>0401+ K562の割合の低減を結果としてもたらさなかった (図11B~11C)。これらの結果により、再操作されたCD4 CARの使用は、元のCD4 CARベクターと同様にヒトにおける使用に安全であることが示唆される。

#### 【0263】

実施例6：最適化されたCD4 CARを発現するT細胞は、HIV-1複製を制御し、第1世代CD4 CARよりもずっと高いレベルまでインビボで増大する

CD28およびCD3- シグナル伝達ドメインを含有するCD19特異的CARは、4-1BBおよびCD3- シグナル伝達ドメインを含有するものよりも優れたインビトロ活性を有していたが、4-1BB含有CARは、ヒト化マウスマodelにおいて、および最終的にはB細胞白血病を有する患者において優れていることがわかった (Porter et al., *Science translational medicine* 7, 303ra139 (2015) ; Milone et al., *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1453-1464 (2009) ; Brentjens et al.

10

20

30

40

50

., Blood 118, 4817-4828 (2011)）。同じことがHIVターゲティングCARについて真であるか否か、および本発明の最適化されたCD4 CARが臨床において以前に試験された元のCD4 CAR構築物よりもインビボで良好にHIVを制御できるかどうかを判定するため、マウスのコホートに、800万個のCD4 T細胞および200万個のCD8 T細胞から構成される1000万個のヒトT細胞を注入した。異なるCD8エフェクター細胞集団を有する4群のマウスを比較した：非形質導入（NTD）、CD28（28z）または4-1BB共刺激ドメイン（BBz）のいずれかを含有する最適化されたレンチウイルスベクターで形質導入、または臨床試験のMMLVベースのベクター（CD4z）で形質導入。

#### 【0264】

感染前のベースラインのCD4 T細胞数は、NTD、BBz、または28z群の間で有意には異ならず、CD4z処置したマウスについてはより高かった（図12A）。次いで、マウスに、CCR5指向性HIV株BaIを感染させ、感染の22日後に、終点の末梢CD4 T細胞数を数えた。BBzまたは28z構築物を発現するT細胞を注入したマウスは、それぞれ、ヒトCD4 T細胞の数の17倍および177倍の増大を示した（図12B）。対照的に、末梢CD4数は、おそらくHIV媒介性の枯渇のために、非形質導入CD8 T細胞またはCD4z T細胞で処置したマウスにおいて非常に低いままであった（図12B）。異なるマウスコホートにおけるCD4 CAR+ CD8 T細胞の数の検討により、BBz、28z、およびCD4z T細胞においてそれぞれ、389倍、587倍、および2倍の増大が判明した（図12C～12D）。ウイルス負荷を制御するCD4 CAR T細胞の能力もまた、このモデルにおいて検討した。HIV感染の7日後に、BBz CAR T細胞は、ほとんど検出不可能なウイルス負荷の、ウイルス複製の最大の制御を呈し、他方、NTD、28z、およびCD4z処置した動物由来の血漿は、1 μlあたりおよそ1コピーのHIV RNAを含有していた（図12E）。感染の18日後に、HIV RNAの中央コピー数は、NTD T細胞で処置したマウスと比較して、BBzおよび28z処置した動物において10倍より大きく低減した（図12F）。しかし、CD4z処置したマウスは、NTD処置したマウスと比較して、HIV RNAを統計学的には低減させなかった。最適化されたCD4 CARはいずれも、臨床試験CARよりも良好にHIVを制御したが、これらの結果により、異なる共刺激ドメインは、HIV感染において全く異種類の保護的役割を有しており、CD28は、CD4 T細胞を最大の程度まで保護し、4-1BBは、HIV複製の初期の制御を促進することが示される。

#### 【0265】

実施例7：CCR5-ZFN改変CD4 CAR CD8 T細胞はインビボで濃縮される  
インビトロおよびインビボでのHIV複製の制御の増加にもかかわらず、インビトロのデータにより、CD8 T細胞へのHIV特異的CARの形質導入は、それらを、感染を受けやすくしたことが示唆された。これらのCAR T細胞がインビボで感染するか否かを判定するために、感染濃縮に対して抵抗性であるCAR T細胞を、インビボでHIVの存在下で試験した。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用いてCCR5 HIV共受容体を遺伝子編集することによって提供される生存利益が、初代ヒトCD4 T細胞において以前に実証されている（Perez et al., Nat Biotechnol 26, 808-816 (2008); Tebas et al., Nature reviews. Immunology 13, 693-701 (2013)）。しかし、HIV感染の存在下でのCD4 CAR+ CD8 T細胞に対する同様の濃縮分析は、探索されていない。CD4 CAR CD8 T細胞がインビボで感染を受けやすいことを決定する手段として、共受容体編集がCAR+ CD8 T細胞のより良好な濃縮を促進するかどうかを判定するために、4種類の追加の群を、図12A～12Fに記載された実験に含め、そこでは、CD8 T細胞をCCR5 ZFNで処置し、その後、CD4 CAR構築物のそれを形質導入した。

#### 【0266】

CCR5破壊アリルは、CD4 CAR T細胞で処置し、HIVを感染させたマウスにおいて、非形質導入CD8 T細胞に比べて濃縮された（図13A）。非形質導入CD8 T細胞を移植したHIV感染マウスは、0.4%の中央破壊頻度を有していた。これらのCD8 T細胞は、CD4 CARを形質導入されていなかったため、それは、HIVの存在下で濃縮されることが期待されていなかった。BBz、28z、またはCD4z T細胞で処置したマウスは、それぞれ、14.4%、29.6%、および9.5%の中央破壊頻度を有し、HIV抵抗性のCD4 CAR発現CD8 T細胞が、

10

20

30

40

50

HIV感染の存在下で濃縮されることが示された。CCR5破壊濃縮は、図13Bおよび図15に示されるような、HIVの存在下で増大するCAR+ CD8 T細胞の能力によって影響を受け、したがって、28z CAR T細胞のより大きな抗原特異的増大は、図8Aにおいて見られるより大きなCCR5濃縮の原因でありうる。このデータによりまた、BBz操作されたT細胞が、抗原の非存在下で、28z操作されたT細胞よりも良好に存続できることが示され、これは、腫瘍特異的CARを用いた知見と一貫している (Milone et al., Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 17, 1453-1464 (2009); Carpenito et al., PNAS 106, 3360-3365 (2009))。合わせると、このデータにより、HIV特異的なCAR T細胞のHIV感染が起こることが示唆され、これらの細胞をHIV感染から保護する戦略が、HIV感染症の長続きする制御を保証するために必要である可能性が高いであろう。

10

#### 【0267】

CD4 CAR CD8 T細胞をHIV感染に対して抵抗性にすることが、HIV-1感染症を制御するそれらの能力を強化したかどうかもまた、検討した。感染の22日後に、一般には、ZFN処置していないマウスと比較してZFNで処置した28zマウスにおける、より低い終点CD4 T細胞数を除いて、ZFN処置した細胞またはZFN処置していない細胞を与えた感染マウスにおける、末梢血CD4 T細胞数またはCAR+ CD8 T細胞の増大において有意な違いはなかった(図16A～16B)。しかし、ZFN処置したCD4zマウスにおいて、より大きなCD4 T細胞およびCAR+ CD8 T細胞の増大の傾向があった(図16A～16B)。ZFN処置の非存在下で低いウイルス負荷を有していた28zまたはBBzマウスにおいて、ウイルスRNAのさらなる減少は、ZFN処置から結果として生じなかった(図13C)。他方では、血漿ウイルスRNAにおける有意な減少が、BBzまたは28z CARを与えたマウスよりも血漿ウイルスがもはや有意に高くない点まで、ZFN処置したCD4z T細胞を与えたマウスにおいて見られた。ウイルス負荷は、ZFNなしでBBzまたは28z処置したマウスと比較して、ZFNなしでCD4zレトロウイルス処置したマウスにおいておよそ対数倍高かったため、ZFN処置から結果として生じたウイルス複製の制御が不十分な状況において、ウイルス負荷の有意な低減を検出することはより容易である。さらに、実験の短い持続期間のために、特に、最高の抗ウイルス有益性を生じたCD4z処置したマウスにおいて、形質導入CD8 T細胞の検出可能な濃縮を含む、CAR T細胞に対するZFN処置の完全な有益性を見ることが排除された可能性があった。要約すると、ZFN処置の非存在下で、最適化されたCARは、インビボで臨床試験CD4zよりも優れている；しかし、元のCAR構築物を発現するT細胞を、CCR5破壊によって保護できる場合には、HIV複製の制御を、この相対的に短いインビボアッセイ内で達成することができる。

20

#### 【0268】

全体として、本明細書において開示される改善されたHIV複製の制御は、印象的である(図17A～17C)。本発明は、以前に開示されたCD4膜結合型キメラ受容体に対するいくつかの改善を含み、それらは、HIV-1感染細胞を殺傷する能力において50倍の増加を結果としてもたらす。この有効性の増加は、第1世代CD4膜結合型キメラ受容体とは異なり、インビトロアッセイにおいて生理学的に関連するエフェクター：標的(E:T)比を滴定して、これらの改善されたCD4膜結合型キメラ受容体構築物が、患者においてウイルス負荷を低減させるのにより有効である可能性が高いであろうことを示唆する。

30

#### 【0269】

HIV感染症の長期の制御についての大きな課題の1つは、いくつかのウイルス変異体の免疫逃避である。本発明のscFvベースのCAR(scFv-CAR)は、この課題に対処し、HIV感染細胞のリザーバー集団を有する対象の処置について有益であることが示された。scFvベースのCARを発現するT細胞の添加は、操作されたT細胞の能力をさらに増強して、ARTの非存在下でHIV複製の長続きする制御を提供しうる。図9Aおよび図10Aに見られるように、VRC01、VRC01c、および3BNC60-CARは、HIV-1エンベロープgp120/41(YU-2単離株)を発現するK562細胞の特異的溶解を示したが、CD19を発現するK562細胞の特異的溶解は示さず、scFv-CARの細胞傷害が、強力かつ特異的の両方であることが確認された

40

50

。また、scFv-CAR T細胞により放出されるインターフェロン（IFNg）は、細胞の殺傷効力と密接に相関していた（図9Cおよび図10C）。追加的に、scFv-CARの細胞傷害は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）細胞質ドメインを用いることによってさらに増加した。

#### 【0270】

本発明は、改善されたHIV療法について甚大な潜在能力を提供する。HIV患者から単離したT細胞に、scFv-CARおよび/またはCD4膜結合型キメラ受容体を形質導入し、エクスピボで増大させて、対象中に再注入することができる。形質導入されたT細胞は、gp120発現細胞を認識して活性化され、HIVを有する細胞の殺傷を結果としてもたらす。このアプローチは、標的抗原がシフトまたはドリフトし、そのために通常の抗体による免疫監視を逃避する可能性がある（例えば、インフルエンザAの血球凝集素）任意のウイルス媒介性疾患に適用することができる。この治療法は、他の公知の抗体療法、HAARTと組み合わせることも可能である。CAR療法の最中または前にウイルス誘導物質と組み合わされてもよい。

10

#### 【0271】

T細胞は感染CD4細胞を殺傷するはずであり、これがHIVレパートリーの確立を阻止するため、本発明の予防的適用もまた、高いリスクの集団において可能である。

#### 【0272】

他の態様

本明細書中の変数の任意の定義における要素の一覧の詳説には、任意の単一の要素、または列挙された要素の組み合わせ（もしくは部分的組み合わせ）としてのその変数の定義が含まれる。本明細書中の態様の詳説には、任意の単一の態様としての、または任意の他の態様もしくはその一部分との組み合わせでのその態様が含まれる。

20

#### 【0273】

本明細書に引用されたそれぞれのおよびすべての特許、特許出願、および刊行物の開示は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。具体的な態様を参照して本発明を開示してきたが、本発明の真の趣旨および範囲を逸脱することなく、本発明の他の態様および変形物が当業者によって考案されることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、そのような態様および等価の変形物のすべてを含むように解釈されることを意図している。

30

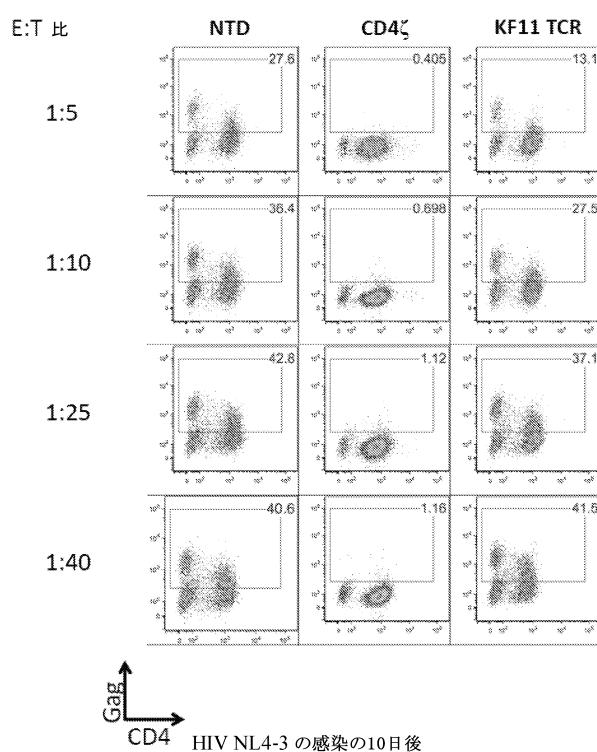
40

50

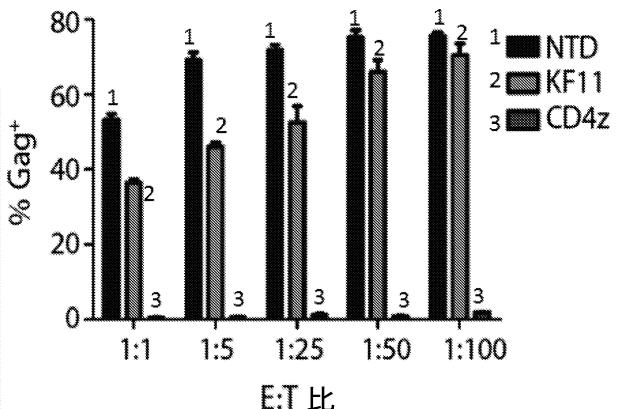
## 【図面】

## 【図 1 A】

CD4膜結合型キメラ受容体はTCRよりも良好にHIV複製を制御する



## 【図 1 B】



10

20

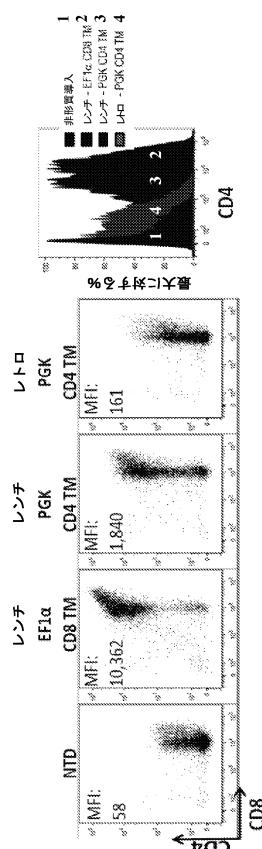
30

40

## 【図 2 A】

EF1 $\alpha$	CD4 EC	CD8 $\alpha$ TM	CD3 $\zeta$
PGK	CD4 EC	CD4 TM	CD3 $\zeta$

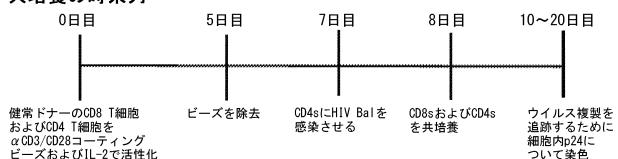
## 【図 2 B】



50

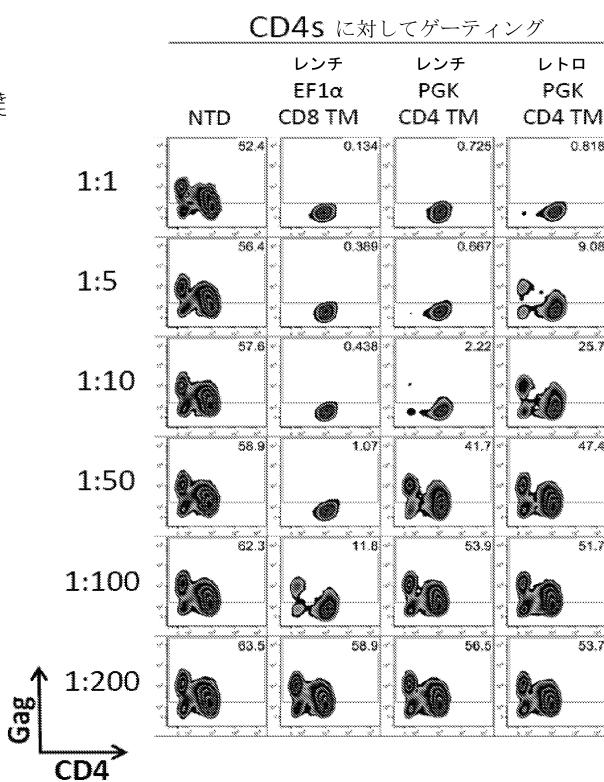
【図 2 C】

共培養の時系列



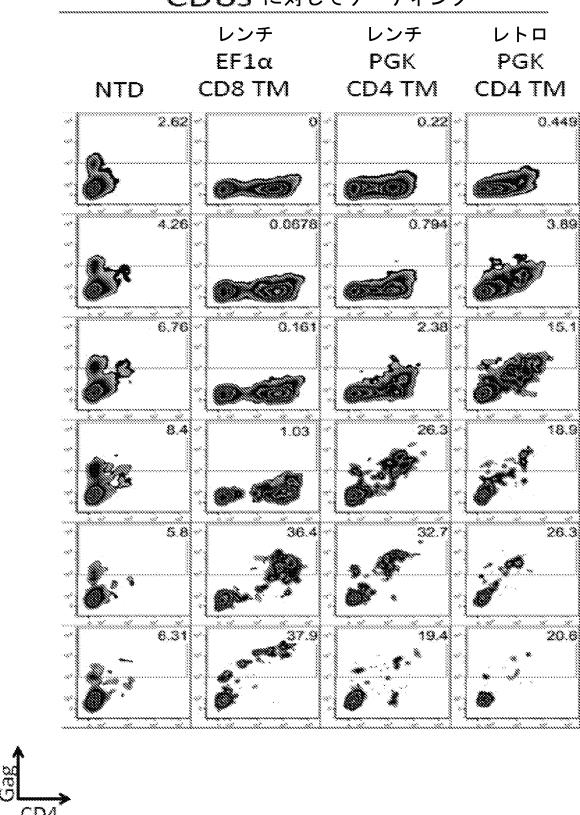
【図 2 D】

改善された活性を有するベクターの構築

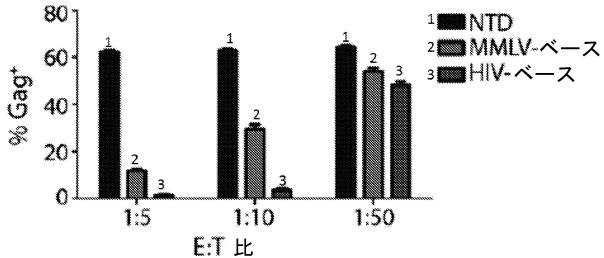


【図 2 E】

CD8s に対してゲーティング



【図 2 F】



10

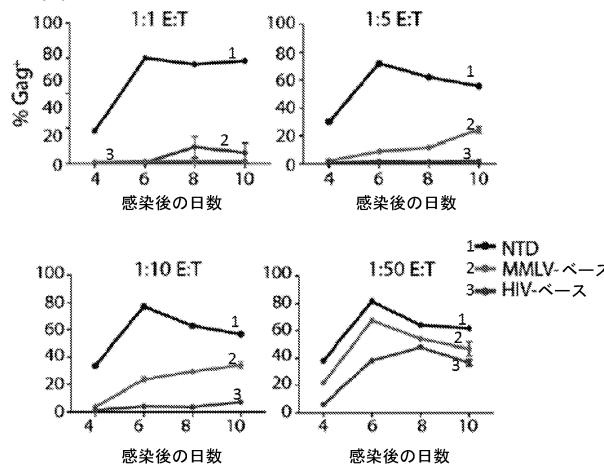
20

30

40

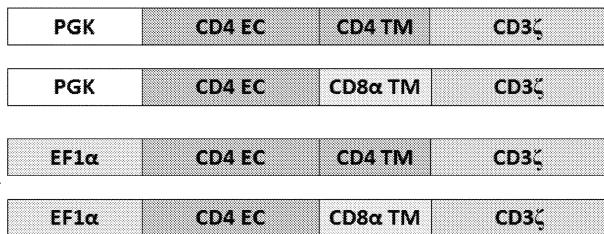
50

【図 2 G】

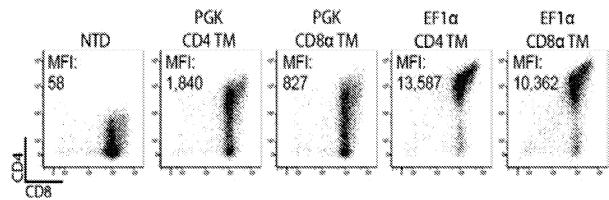


【図 3 A】

EF1 $\alpha$  プロモーターおよびCD8 $\alpha$  TMはHIVの制御を改善する

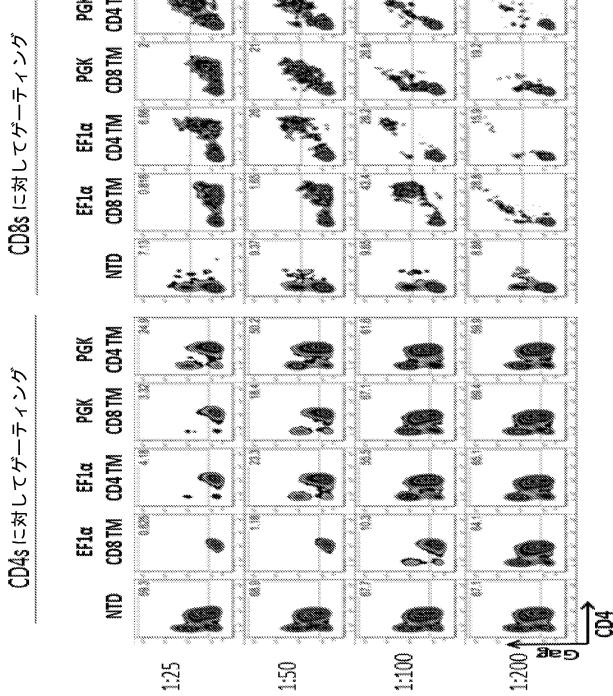


【図 3 B】



【図 3 C】

EF1 $\alpha$  プロモーターおよびCD8 $\alpha$  TMは、HIVの制御を改善し、膜結合型キメラ受容体で操作されたT細胞の感染を低減させる



10

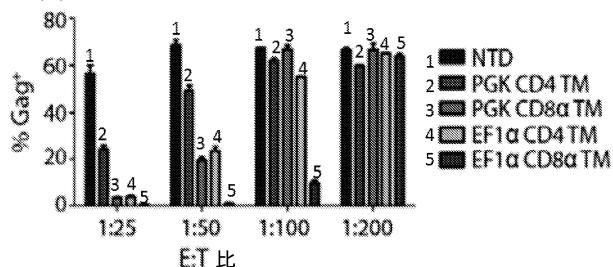
20

30

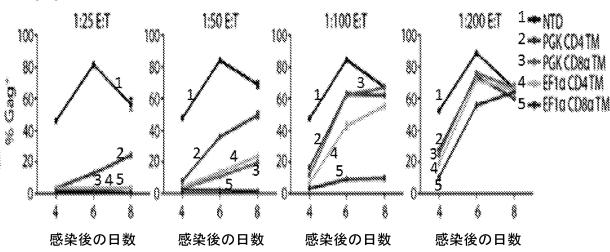
40

50

【図 3 D】



【図 3 E】

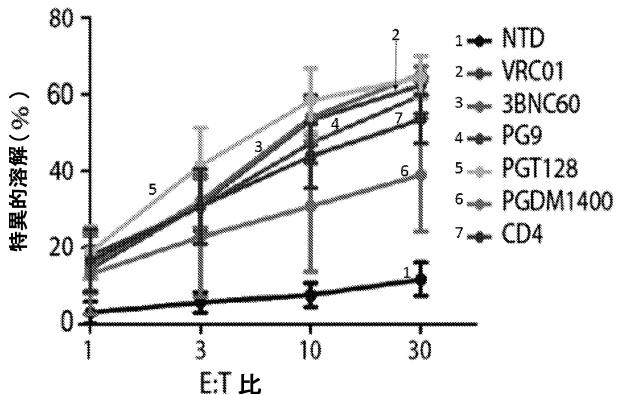


【図 4 A】

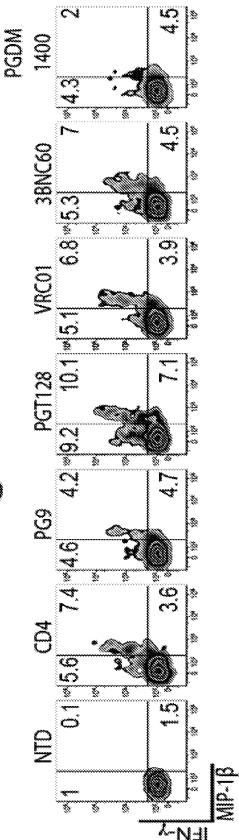
scFvは操作T細胞のHIV-1に対する感受性を抑えることができた

ScFv	エピトープ
VRC01	CD4 結合部位
PG9	V1/V2 ステム
3BNC60	CD4bs ( VRC01 誘導体 )
PGT128	N332グリカシ-V3 ループ
PDGM1400	V1/V2 中の 三量体 頂点 N160 グリカン

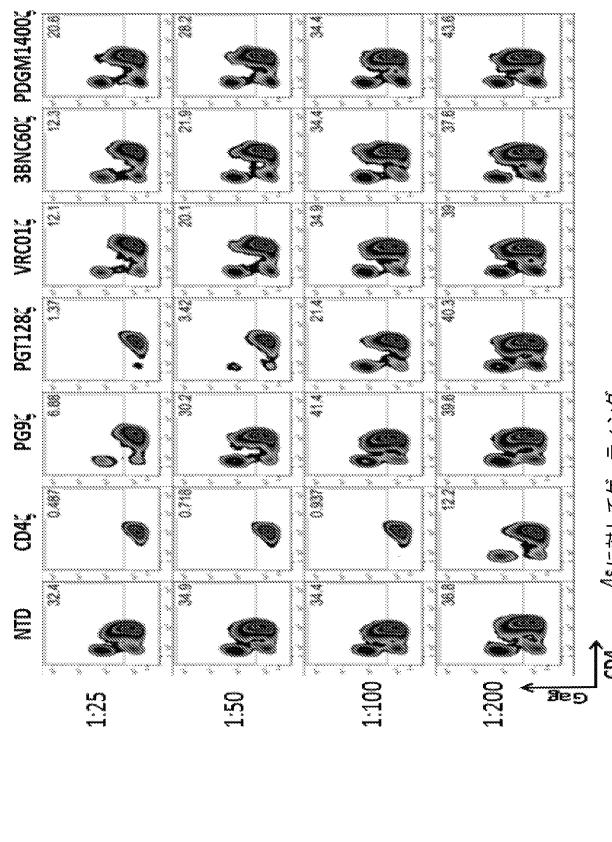
CD4膜結合型キメラ受容体と同様にScFv CARはEnv標的を殺傷する



【図 4 B】

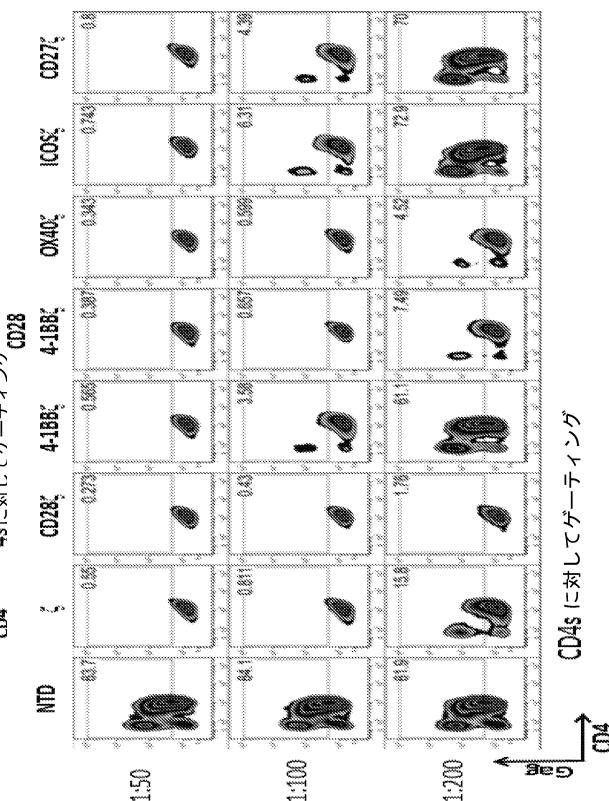


【図4C】

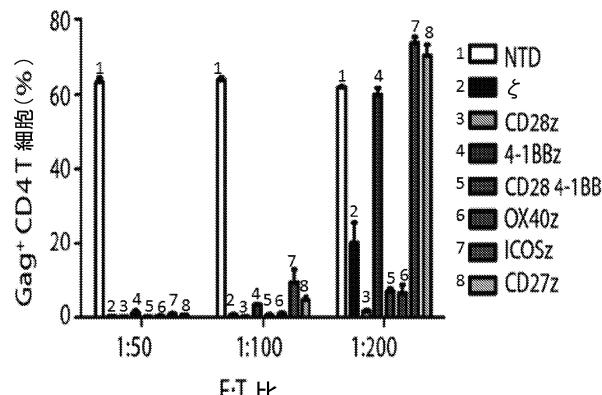


【図5A】

CD28共刺激はHIV-1複製の制御を助ける



【図 5 B】



【図6-1】

### CD4との注釈つきの配列(ベクター全体、SEQ ID NO: 1)

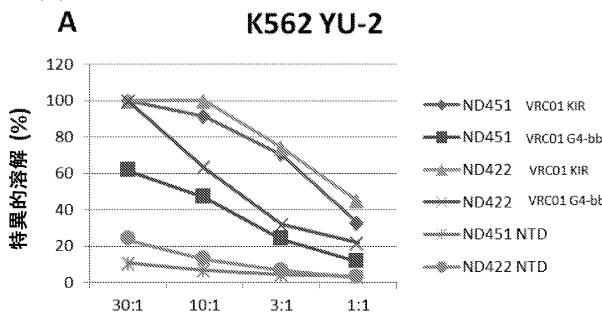
下線 = EF1 $\alpha$  プロモーター  
 薄い灰色 = CD4 細胞外ドメイン  
 濃い灰色 = CD8 $\alpha$  細胞外ヒンジ  
**太字** = CD8 $\alpha$  膜貫通ドメイン  
点線 = CD3 $\zeta$



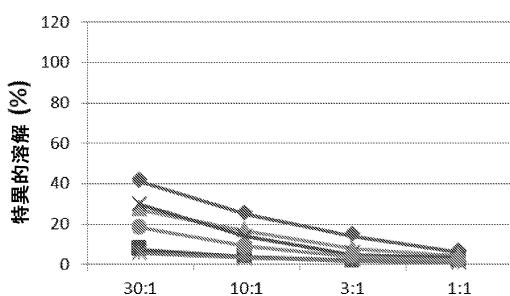




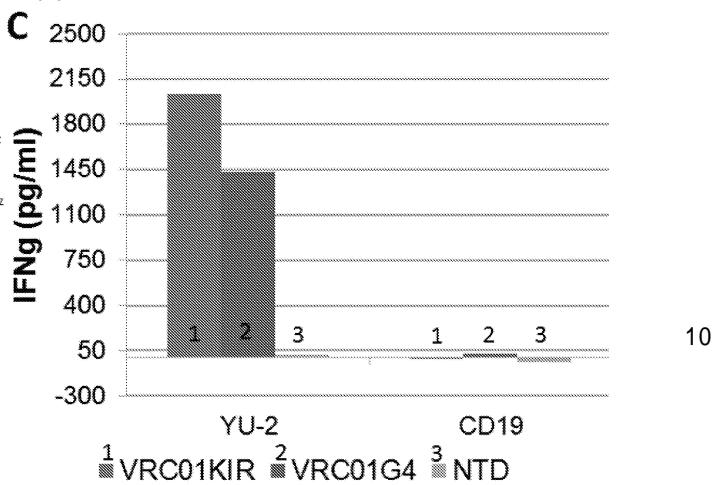
【図 9 - 1】



B K562 CD19

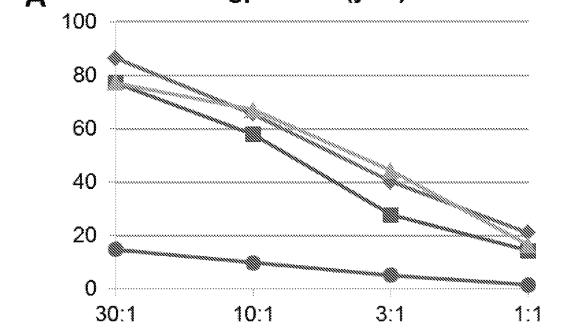


【図 9 - 2】

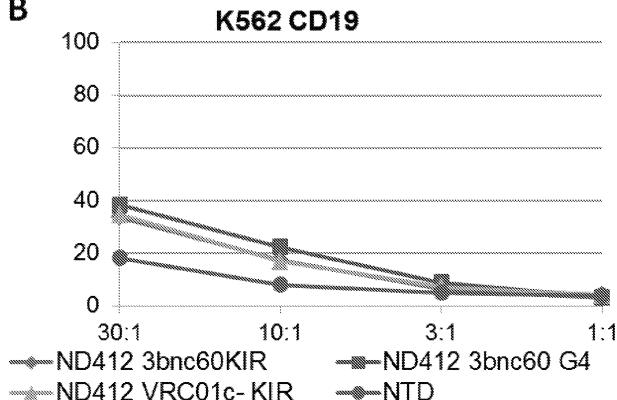


【図 10 - 1】

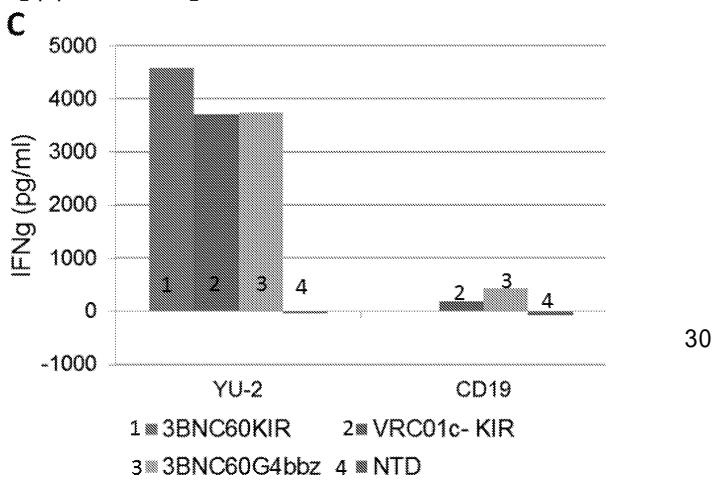
A K562 gp120/41 (yu2)



B



【図 10 - 2】



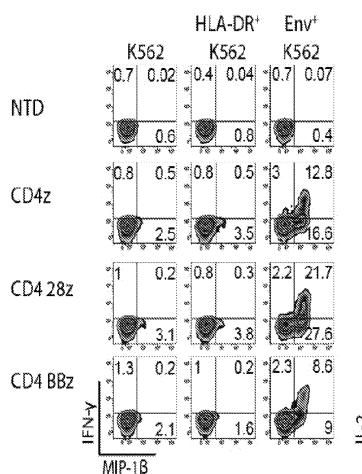
20

30

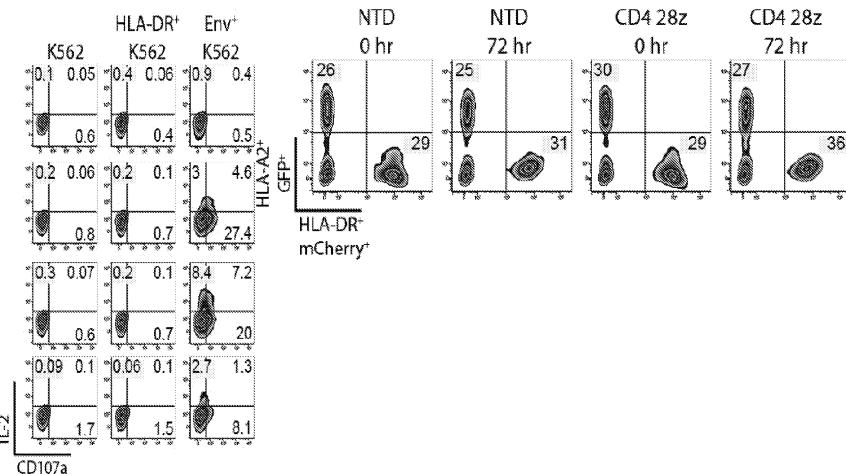
40

50

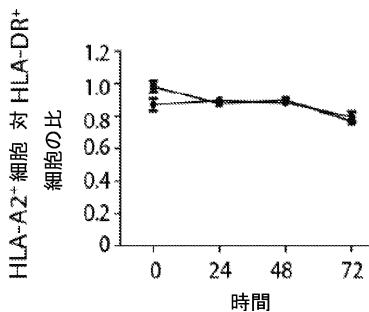
【図 1 1 A】



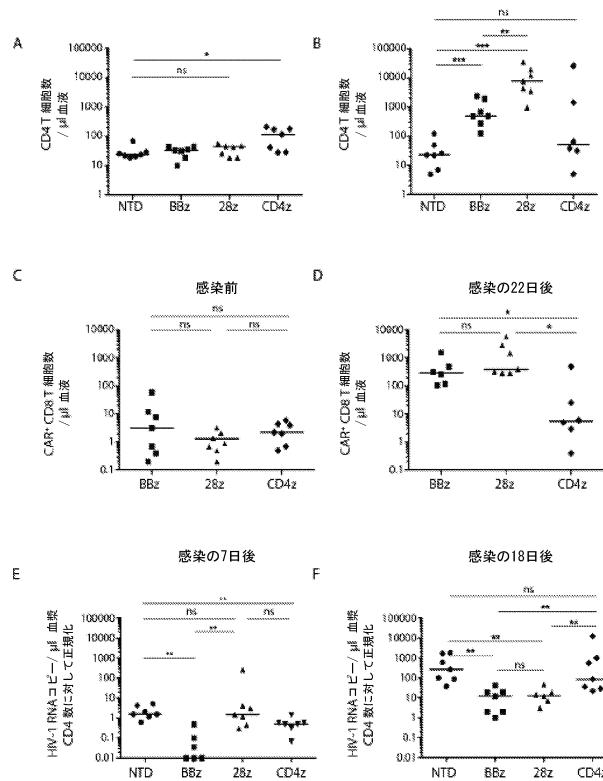
【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



【図 1 2】



10

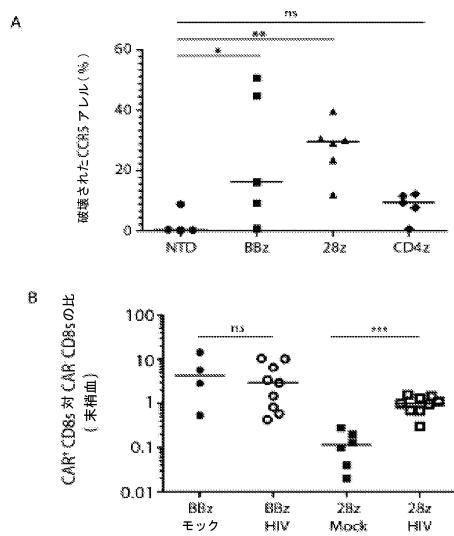
20

30

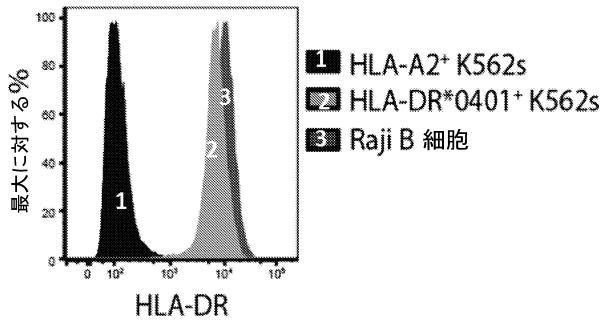
40

50

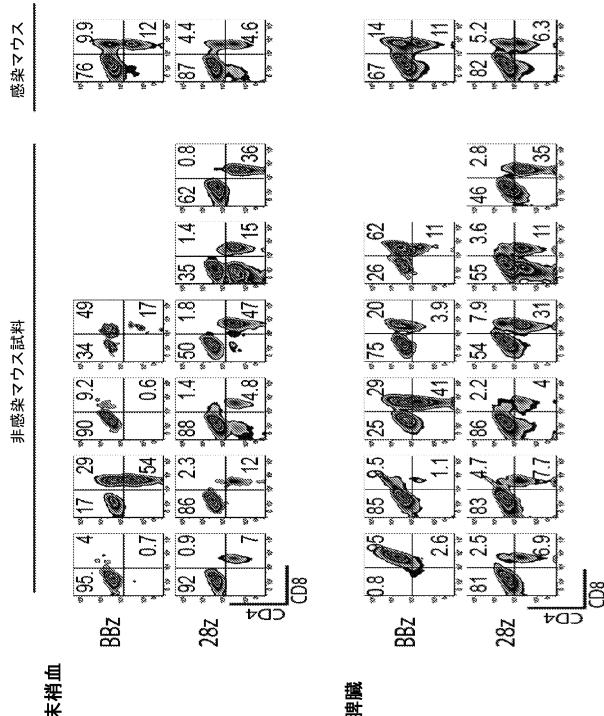
【図 13】



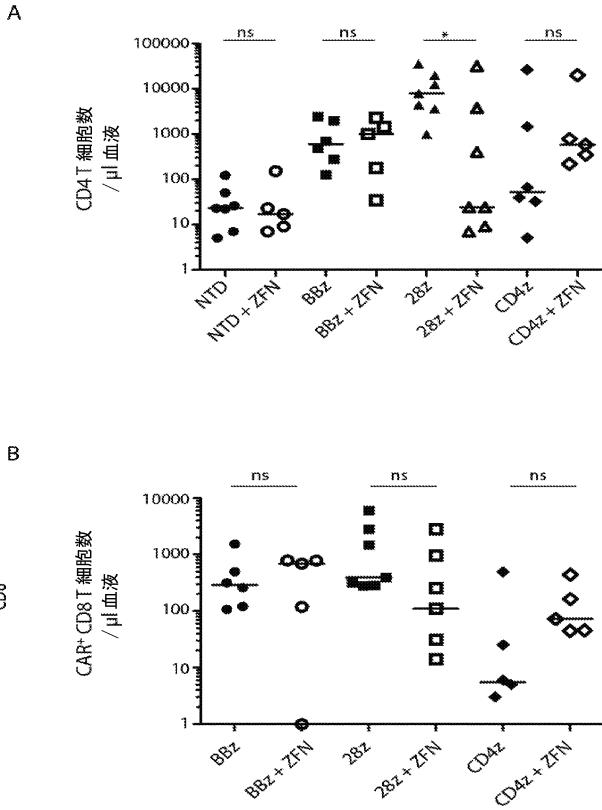
【図 14】



【図 15】



【図 16】



10

20

30

40

50

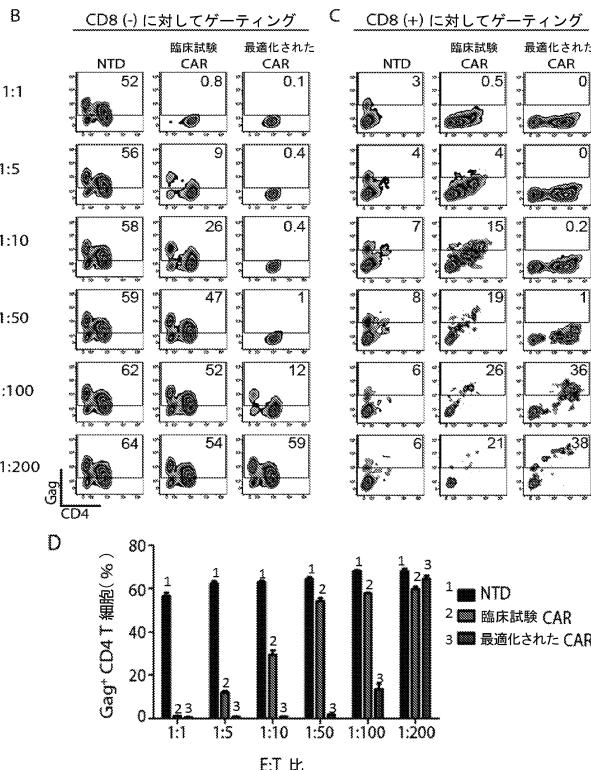
【図 17-1】

構成要素	臨床試験構築物	最適化された構築物	機能的影響
ウイルスベクター	マウスマレトロウイルス(MMLVベース)	レンチウイルス(HIVベース)	安全性、持続性発現、形質導入効率
プロモーター	PGK	EF1 $\alpha$	持続性発現、より高い発現(MFI)
ヒンジ	なし	CD8 $\alpha$	柔軟性
膜貫通ドメイン	CD4	CD8 $\alpha$ またはCD28	感染の阻止、分解の遮断、二量体化
共刺激ドメイン	CD3 $\zeta$	CD28-CD3 $\zeta$ または4-1BB-CD3 $\zeta$	生存、増殖、およびエフェクターモード
細胞外ドメイン	CD4	CD4またはScFv	エピトープ標的化、感染の阻止

PGK	CD4 EC	CD4 TM	CD3- $\zeta$
EF1 $\alpha$	CD4 EC	CD8 $\alpha$ TM	CD3- $\zeta$

A

【図 17-2】



10

20

30

40

【図 18-1】

最適化されたCD4 CARのアミノ酸配列:

1) CD4 CD28 CD3- $\zeta$ 配列 (SEQ ID NO: 44):

MNRGVPFRLHLLVLQLALLPAATQGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQ  
IKILGNQGSFLTKGPSPKLNDRADSRRSLWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQ  
LLVFGLTANSDDTHLQLQGOSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDS  
GTWTCVTLQNQKKVEFKIDIVLAQPKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGEL  
WWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTDQDPKLQMGKKLPLHLLTPQALPQYAGSG  
NLTLALEAKTGKLIQEVNLVVMRATQLOQKNLTCEVGPTSPKLMMSLKLLENKEAKVS  
KREKAVVVLNPNEAGMWQCLLSDSGQVLLIESNIKVLPTWSTPVQPSGTTTAPRPTPAT  
SOPESLRPEACRPAAGGAATIIGGLDADDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITYCKRG  
VRSKRSRLLHSYDMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPDFAAYRSIDRVKFSRSADAPA  
YQOQONQLYNELNLRREEFYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDKMA  
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPL

薄い灰色 = CD4 細胞外ドメイン

太字 = CD8 $\alpha$  膜貫通ドメイン点線 = CD3- $\zeta$ 2) CD4 4-1BB CD3- $\zeta$ 配列 (SEQ ID NO: 45):

MNRGVPFRLHLLVLQLALLPAATQGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQ  
IKILGNQGSFLTKGPSPKLNDRADSRRSLWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQ  
LLVFGLTANSDDTHLQLQGOSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDS  
GTWTCVTLQNQKKVEFKIDIVLAQPKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGEL  
WWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTDQDPKLQMGKKLPLHLLTPQALPQYAGSG  
NLTLALEAKTGKLIQEVNLVVMRATQLOQKNLTCEVGPTSPKLMMSLKLLENKEAKVS  
KREKAVVVLNPNEAGMWQCLLSDSGQVLLIESNIKVLPTWSTPVQPSGTTTAPRPTPAT  
SOPESLRPEACRPAAGGAATIIGGLDADDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITYCKRG  
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQOGQNL  
YNELNLGRREEFYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDKMAFEAYSEIGMK  
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPL

薄い灰色 = CD4 細胞外ドメイン

太字 = CD8 $\alpha$  膜貫通ドメイン

波線 = 4-1BB 共刺激ドメイン

点線 = CD3- $\zeta$ 

【図 18-2】

3) CD4 細胞外ドメイン (SEQ ID NO: 46):

MNRGVPFRLHLLVLQLALLPAATQGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQ  
IKILGNQGSFLTKGPSPKLNDRADSRRSLWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQ  
LLVFGLTANSDDTHLQLQGOSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDS  
GTWTCVTLQNQKKVEFKIDIVLAQPKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGEL  
WWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTDQDPKLQMGKKLPLHLLTPQALPQYAGSG  
NLTLALEAKTGKLIQEVNLVVMRATQLOQKNLTCEVGPTSPKLMMSLKLLENKEAKVS  
KREKAVVVLNPNEAGMWQCLLSDSGQVLLIESNIKVLPTWSTPVQPSGTTTAPRPTPAT

4) CD8 $\alpha$  細胞外ヒンジ (SEQ ID NO: 47):

TTTPAPRPTPAPTIASQLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

6) CD8 $\alpha$  膜貫通ドメイン (SEQ ID NO: 48):

IYTWAPLAGTCGVLLSLVITYLYC

5) CD28 膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン (SEQ ID NO: 49):

FWVLVVVGVLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLLHSYDMNMTPRPGPTRKHYQPYA  
PPRDFAAYRS

7) 4-1BB 共刺激ドメイン (SEQ ID NO: 50):

KRGKRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

8) CD3 $\zeta$  (SEQ ID NO: 51):  
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG  
LYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPL

50

【図 18 - 3】

## 最適化された抗体ベースのCARのアミノ酸配列

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| 1) PG9 CD3-ζ 配列 (SEQ ID NO: 52):    | GRRWGQFELYNTIINLQPEDFATYFCQVYEFIVPGTRLDLKGGSRSSSSSGGGGGGQQ<br>VHLQSQAIAVTKPGASVRSCSEASGYKISDHFIHWWRQAPGQQLQWVGVINPKTGQP<br>NNPRQFQGRVSLTRQASWDFDTYSFVMDLKAVRSDDTAIYFCARQRSDFWDFTDVWGS<br>JGTQVTVSSGCTTAAPIRPTTTAATASQUSLRLPTECRAAGTAACTTGTGTTTAACTTAA<br>DIYIWA<br>PLAGTCGVLLSLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYQQQNOLYNELNLGREEYDVLDKR<br>RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDCKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST<br>ATKDTYDALHMQALPPR   |
| 2) PGT128 CD3-ζ 配列 (SEQ ID NO: 53): | DFVPLQSPHSLSASISCKSSHSILHGDRNNTLYAWVYVQKPGRSPLLITYLASSRAS<br>GVPDRFGSGSDKDFTLKISRVERDVTGTYCMOGRESPWTFEGOTKVDIKGGSSRSSS<br>SGGGGGGGGQAQLVQSGPVEVRKPGTSVKVSCKAPGNLTLYTDLHWVRSVPQGQGLQW<br>MGWISHEDGDKKVIVERFKAKVTDWDRSTNTAYLOSLGLTSGDTAVYYCAGGSKHRLR<br>GGGGGGPQLQESGPTLVEASETLSCTAVGCGSTDAAACNSFWGVWRQPPKGLEWVGSLS<br>HCAWSYNRGWQTYHNPPLSKRLTLALDTPKNLVFLKLNSVTAADTATYCCARFGEVLR<br>YTDWPKPAWVDLWGRTLVTVSSSGCTTAAPIRPTTAAATASQPSLSPRIPRCAAGTAA<br>ATRQGLD<br>DIYIWA<br>PLAGTCGVLLSLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYQQQNOLY<br>ENLNRGRREYEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDCKMAEAYSEIGMKG<br>ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR |
| 3) VRC01 CD3-ζ 配列 (SEQ ID NO: 54):  | EIVLTQSPGTLSSLSPGETAIISCRTS0YGSALWYVQQRPGQAPRVLVIYSGSTRAAGIDRFSG<br>SRWGPFDYNIITISNLESQDFGVVYYCQQYEFFFGQGTKVQVDIKRGSSRSSSSGGGGGGG<br>GOVQLVQSGGOMKPGESMJSICRASGYEFIDTLNWIRLAPCKRPEWMGLKPRGG<br>AVNYVAPLQLQGVTMTRDVSYDTAFELRLSLTVDDTAVYFCTRGKNCNDYNWDFEHWG<br>RGTIVTVSSGCTTAAPIRPTTAAATASQPSLSPRIPRCAAGTAACTTGTGTTTAACTTAA<br>DIYIWA<br>PLAGTCGVLLSLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYQQQNOLY<br>ENLGRREYEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDCKMAEAYSEIGMKG<br>ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  |

薄い灰色 = ScFv 細胞外ドメイン  
濃い灰色 = CD8α 細胞外ヒンジ  
太字 = CD8α 膜貫通ドメイン  
点線 = CD3ε

【 図 1 8 - 5 】



【 図 1 9 - 1 】

## 最適化されたCD4 CARの核酸配列



10

20

30

40

50



【図 19 - 6】

#### 5) PGDM1400 CD3- $\zeta$ 配列 (SEQ ID NO: 74):

薄い灰色 = ScFv ECドメイン  
濃い灰色 = CD8α 細胞外ヒンジ  
太字 = CD8α 膜貫通ドメイン  
点線 = CD3 ζ

【図 19 - 7】

#### 6) PG9 CD3- $\zeta$ ScFv 細胞外ドメイン配列 (SEQ ID NO: 75):

#### 8) VBC01 CD3-ξ ScFv 細胞外ドメイン配列 (SEQ ID NO: 77):

〔図 19 - 8〕

#### 9) 3BNC60 CD3- $\zeta$ 配列 (SEQ ID NO: 78):

10) PGDM1400 CD3- $\zeta$  配列 (SEQ ID NO: 79):

GAACCTGTGTCGACCCAGGCCCTCACGGCTGAGCGACCATGGCCGAGAGGCCGACAGTACGCTGCA  
AAAGCAGCAGCTACTCTTGATCCGGCAGGCCAACAGTACCTCTGGCTTGATCGAGAACGGCCC  
GCAGATCCCCCGAGCTGTGCTGATCTGGCGCAGCACAGCAGGACCGGCGCTGCGGATAGTTCTT  
GGCGACCCGGCAGGCCAAGGGACTCTGATCTGGCGCAGGCCAACAGGACCGGCTGCGGACCT  
ACTACTGTGAGGGAGAGGAGGCCCTGGACCTTGGCCAGGGCACAGGTTGACATCAAGG  
GGCGACCCGGCAGGCCAACAGCTCTGGAGGGCGCAGGAGTGGCCGGCAGGACAGCTGAGCTG  
CAGTCTGGCCAGGAAGCTGGAGGGCGACAGCGTGAAGGGTGTCTGTAAGGCCCTGCTG  
CCCCGAAACAACTACAGGGCTGCATGGTCGAGCGTGCAGGACAGGACCTGAGTGGCTG  
GATCAGCAGCAGGGCAGCAAGAAGTGTGCTGGACAGGCTTAAGGCCAAGTGGCATCTGAGCTG  
GACAGAACGCAACACCGCCCTACCTGCGATGCGCCGCTGACCTCTGGCGATACGCCGCTGTACTA  
CTGGCCCAAGGGCAGCAAGCAGGCCCTGGAGAGGACTACGGCTTGATCGAGCATGCCGCGCTGAC  
TGGCCGCTGTGACTCTGAGCAACCTGGGAATTCTGGGCCAGGACCCGGCTGACCGCTG  
ATCT

【配列表】

0006991131000001.app

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I		
C 0 7 K	16/10 (2006.01)	C 0 7 K	16/10
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
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 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(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 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リリー ジェームズ エル.

アメリカ合衆国 1 9 3 3 5 ペンシルバニア州 ダウニングタウン クリークサイド ドライブ 4 3 5

(72)発明者 リープマン レイチェル

アメリカ合衆国 1 9 1 4 6 ペンシルバニア州 フィラデルフィア マディソン スクエア 2 4 1 7

(72)発明者 ペイン エイミー エス.

アメリカ合衆国 1 9 0 6 6 ペンシルバニア州 メリオン ステーション ハミルトン ロード 5 3 6

(72)発明者 エレブレヒト クリストフ ティー.

アメリカ合衆国 1 9 1 4 7 ペンシルバニア州 フィラデルフィア サウス サーティーンス ストリート 4 1 5

(72)発明者 ミローン マイケル シー.

アメリカ合衆国 0 8 0 0 2 ニュージャージー州 チェリー ヒル サリー ロード 3 1 4

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 5 / 0 7 7 7 8 9 (WO , A 2 )

特表2 0 1 4 - 5 0 7 1 1 8 ( J P , A )

特表2 0 1 5 - 5 1 3 3 9 4 ( J P , A )

Journal of Virology, 2015年7月, Vol.89, No.13, p.6685-6694

Cancer Immunology Res., 2015年4月, Vol.3, No.4, p.356-367

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 6 2

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 3 1 / 1 8

C 0 7 K 1 4 / 7 0 5

C 0 7 K 1 6 / 1 0

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 1 2  
C 1 2 N 1 5 / 1 3  
C 0 7 K 1 6 / 4 6  
C 1 2 N 5 / 0 7 8 3  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
U n i P r o t / G e n e S e q  
P u b M e d