

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7149935号

(P7149935)

(45)発行日 令和4年10月7日(2022.10.7)

(24)登録日 令和4年9月29日(2022.9.29)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 16/14 (2006.01)

C 0 7 K 16/14

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

請求項の数 18 (全253頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-520888(P2019-520888)

(86)(22)出願日 平成29年10月19日(2017.10.19)

(65)公表番号 特表2019-535244(P2019-535244
A)

(43)公表日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/057460

(87)国際公開番号 WO2018/075807

(87)国際公開日 平成30年4月26日(2018.4.26)

審査請求日 令和2年10月9日(2020.10.9)

(31)優先権主張番号 62/410,315

(32)優先日 平成28年10月19日(2016.10.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 501244222

ザ スクリプス リサーチ インスティテ
ュート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2

0 3 7 , ラ ホヤ , ノース トーリー

パインズ ロード 1 0 5 5 5

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト化された標的化部分および/または最適化されたキメラ抗原受容体相互作用ドメイン
を有する、キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチ、ならびにその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインを含むヒト化されたキメラ抗原受容体 (C A R) であって、前記細胞外ドメインが、G S S T G A V T T S N Y A S (配列番号 4 2 5)、G T N N R A P (配列番号 4 2 6)、V L W Y S D H W V (配列番号 4 2 7)、G F L L T D Y G V N (配列番号 4 2 8)、V I W G D G I T D (配列番号 4 2 9) および G L F D Y (配列番号 4 3 0) でそれぞれ表される、軽鎖 C D R 1 ~ 3、および重鎖 C D R 1 ~ 3 を含むヒト化された抗 G C N 4 s c F v を含む、ヒト化されたキメラ抗原受容体 (C A R)。

【請求項 2】

前記 s c F v が、配列番号 3 2 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 3】

前記 s c F v が、配列番号 3 2 2 と、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 4】

前記 C A R が、配列番号 4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 7、4 0 9、4 1 1、4 1 3、および 4 1 5 から選択される配列を含む、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 5】

前記 C A R が、配列番号 4 1 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の C A R。

10

20

【請求項 6】

前記 C A R が、配列番号 4 1 1 の配列と、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 7】

前記細胞外ドメインが、配列番号 9 3 ~ 1 0 3 および 1 6 5 ~ 1 6 8 から選択される配列を含むヒンジドメインを含む、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 8】

前記細胞外ドメインが、アミノ酸配列：E S K Y G P P C P P C P D (配列番号 4 2 4)を含むヒンジドメインを含む、請求項 1 に記載の C A R。

10

【請求項 9】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 3 9 8 および 4 1 7 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 および 7 ~ 8 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 10】

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、(a) C D 3 - ζ ドメイン、ならびに (b) C D 2 8 ドメイン、4 - 1 B B ドメイン、または C D 2 8 ドメインおよび 4 - 1 B B ドメインを含む、請求項 1 および 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 11】

前記 C D 2 8 ドメインが、配列番号 4 1 8 の配列と、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の C A R。

20

【請求項 12】

前記 C D 2 8 ドメインが、配列番号 4 1 8 のアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の C A R。

【請求項 13】

前記 4 - 1 B B ドメインが、配列番号 4 1 9 の配列と、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % と同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 14】

前記 4 - 1 B B ドメインが、配列番号 4 1 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載の C A R。

30

【請求項 15】

前記 C D 3 - ζ ドメインが、配列番号 4 2 0 の配列と、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 16】

前記 C D 3 - ζ ドメインが、配列番号 4 2 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 17】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 4 1 7 の配列と、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 および 7 ~ 16 のいずれか一項に記載の C A R。

40

【請求項 18】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 4 1 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 および 7 ~ 16 のいずれか一項に記載の C A R。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2016年10月19日に出願された米国仮出願第 62 / 410,315 号

50

の優先権を主張し、その出願の全体が参照により本明細書に組込まれる。

【0002】

配列一覧に関する記載

本出願に関連する配列一覧が、ハードコピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書に組込まれる。配列一覧を含むテキストファイルの名称は、C I B R _ 0 1 1 _ 0 1 W O _ S T 2 5 . t x t である。テキストファイルは717KBであり、2017年10月18日に作成され、E F S - W e b を介して電子的に提出されている。

【0003】

政府の権利の記載

本発明は、アメリカ国立衛生研究所より与えられた認可番号1R01CA208398
下で、政府の支援と共に作成された。政府は、本発明の特定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

免疫療法は、化学療法への魅力的な代替法になっており、遺伝子修飾されたT細胞の養子性移行を使用して、免疫システムに悪性腫瘍細胞を認識し、かつ排除するように「再度教える」免疫療法を含む。遺伝子修飾されたT細胞は、キメラ抗原受容体を発現し、一般に、CD3-ζシグナル伝達エンドドメインと、膜貫通ドメインと、受容体に、標的悪性細胞上の腫瘍関連抗原に対する特異性を与えるモノクローナル抗体から誘導される細胞外一本鎖可変性断片(s c F v)とから成る。キメラ抗原受容体を介して腫瘍関連抗原に結合する際、T細胞(CAR-T細胞)を発現するキメラ抗原受容体は、悪性細胞に対して細胞傷害性である免疫応答を開始する。かかる療法は、化学療法耐性を回避することができ、再発/難治性疾患に対して活性であり、慢性リンパ性白血病(CLL)および急性リンパ性白血病(ALL)患者に対して持続的な寛解をもたらすことが示されている。しかしながら、これらの療法は、それらが、サイトカイン放出症候群(CRS)、毒性リンパ球減少症、血液学的標的に対する慢性低ガンマグロブリン血症、固形腫瘍標的に対する腫瘍細胞溶解の致死的な非標的化、脳浮腫、CAR-T細胞を発現する抗CD19抗体の使用を伴う慢性B細胞赤芽球癆、およびいくつかの場合には死などの望まれない効果を引き起こすため、さらなる調査および最適化を必要とする。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、キメラ受容体エフェクター細胞(例えば、キメラ抗原受容体T細胞)を選択的に活性化および非活性化させる組成物および方法を提供し、これらは、療法の制御を提供することで、現在治験で試験されている従来のCAR-T細胞設計よりも安全かつ多用途の免疫療法を提供し得る。

【0006】

本開示は、ヒト化されたスイッチおよびスイッチ可能なキメラ受容体エフェクター細胞を含む、キメラ受容体エフェクター細胞スイッチ(本明細書で「スイッチ」と称される)を提供する。本開示はまた、ヒト化されたスイッチ可能なキメラ受容体を含むキメラ受容体エフェクター細胞を提供する。本開示はまた、1つ以上のヒト化されたキメラ受容体エフェクター細胞スイッチを含むヒト化されたCAR-ECプラットフォームと、ヒト化されたスイッチ可能なキメラ受容体を含む1つ以上のキメラ受容体エフェクター細胞とを提供する。

【0007】

いくつかの実施形態では、本開示は、CAR-EC上のキメラ抗原受容体と相互作用するキメラ抗原受容体相互作用ドメイン(CAR-ID)と、標的細胞上のCD19に結合するヒト化された標的化部分とを含む、ヒト化されたキメラ抗原受容体エフェクター細胞(CAR-EC)スイッチを提供する。

【0008】

標的化部分は、標的細胞上の細胞表面分子に結合し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインを含むヒト化されたキメラ抗原受容体（CAR）を提供し、細胞外ドメインが、配列番号 290 ~ 388、および 423 から選択される配列を含むヒト化された抗 GCN4 scFv を含む。いくつかの実施形態では、scFv は、配列番号 322 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、scFv は、配列番号 322 と、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、図 22 A の構造 A ~ H から選択される構造を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、図 22 A の構造 E に従う構造を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 389 ~ 397、401、403、405、407、409、411、413、および 415 から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 411 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、配列番号 411 の配列と、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、配列番号 93 ~ 103 および 165 ~ 168 から選択される配列を含むヒンジドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、アミノ酸配列：ESKYGP C P P C P D を含むヒンジドメインを含み、いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号 398 および 417 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、(a) CD3- ζ を含むいくつかの実施形態では、CD28 ドメインは、配列番号 418 と、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD28 ドメインは、配列番号 418 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB ドメインは、配列番号 419 の配列と、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB ドメインは、配列番号 419 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD3- ζ ドメインは、配列番号 420 の配列と、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD3- ζ ドメインは、配列番号 420 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号 417 の配列と、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号 417 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインを含む、ヒト化されたキメラ抗原受容体（CAR）を提供し、細胞外ドメインは、

- a . キメラ抗原受容体スイッチと相互作用するヒト化された領域と、
- b . ヒンジドメインとを含む。

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、約 1 ~ 約 20 個のアミノ酸長である。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、約 20 個超のアミノ酸長である。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、ヒンジドメインは、可撓性である。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、剛性である。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、IgG4ヒンジ、IgG4mヒンジ、CD28ヒンジ、およびCD8ヒンジから選択される。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号93～103および165～168から選択される配列を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、配列番号93～103および165～168から選択される配列と、少なくとも50%相同である配列を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、ヒト化された抗GCN4 scFvを含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、ヒト化された52SR4抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化された抗GCN4 scFvは、配列番号290～388、および423から選択される配列を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、ヒト化された抗GCN4 scFvは、配列番号290～388、および423から選択される配列と、少なくとも50%同一である配列を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、ヒト化された抗GCN4 scFvは、配列番号322と、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、CARは、CD8膜貫通ドメインまたはCD28膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号398および417から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、(a)CD3-ζドメイン、および(b)CD28ドメイン、4-1BBドメイン、またはCD28ドメインおよび4-1BBドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD28ドメインは、配列番号418を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、4-1BBドメインは、配列番号419を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、CD3-ζドメインは、配列番号420を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体スイッチと相互作用する領域は、キメラ抗原受容体スイッチのキメラ抗原受容体結合ペプチドと相互作用し、キメラ抗原受容体スイッチは、標的上の細胞表面分子と相互作用する標的化部分をさらに含む。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、配列番号389～397、401、403、405、407、409、411、413、および415から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、配列番号389～397、401、403、405、407、409、411、413、および415から選択される配列から成る。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、配列番号389～397、401、403、405、407、409、411、413、および415から選択される配列と、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、配列番号400、402、404、406、408、410、412、414、および416から選択される配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、配列番号400、402、404、406、408、410、412、414、および416と、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ヒト化された領域のアミノ酸配列は、配列番号322を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、アミノ酸配列：ESKYGP P C P P C P Dを含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号417を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、配列番号420を含むか、またはそれから成るCD3-ζシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメイン

10

20

30

40

50

は、配列番号 4 1 8 または 4 1 9 を含むか、またはそれから成る共刺激ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、配列番号 4 1 8 を含むか、またはそれから成る第 1 の共刺激ドメインと、配列番号 4 1 9 を含むか、またはそれから成る第 2 の共刺激ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、配列番号 4 1 1 のアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、配列番号 4 1 1 の配列と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、本開示は、

a . C A R - E C 上の抗 G C N 4 キメラ抗原受容体と相互作用する G C N 4 誘導体ペプチドを含むキメラ抗原受容体相互作用ドメイン (C A R - I D) と、

b . 標的化部分と、を含む、ヒト化されたキメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチを提供し、

標的化部分は、標的化抗体またはその抗原結合部分であり、配列番号 1 7 ~ 2 5、2 7 ~ 3 5、2 4 7、2 4 9、2 5 1、2 5 3、2 5 5、2 5 7、2 5 9、2 6 1、2 6 3、2 6 5、および 2 6 7 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 2 ~ 1 5、2 4 8、2 5 0、2 5 2、2 5 4、2 5 6、2 5 8、2 6 0、2 6 2、2 6 4、2 6 6、および 2 6 8 のうちのいずれか 1 つから選択される重鎖配列を含む。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、本開示は、

a . C A R - E C 上の抗 G C N 4 キメラ抗原受容体と相互作用する G C N 4 誘導体ペプチドを含む、キメラ抗原受容体相互作用ドメイン (C A R - I D) と、

b . 標的化部分と、を含む、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチを提供し、

標的化部分が、標的化抗体またはその抗原結合部分であり、配列番号 2 ~ 1 5、2 4 8、2 5 0、2 5 2、2 5 4、2 5 6、2 5 8、2 6 0、2 6 2、2 6 4、2 6 6、および 2 6 8 のうちのいずれか 1 つから選択される重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 1 7 ~ 2 5、2 7 ~ 3 5、2 4 7、2 4 9、2 5 1、2 5 3、2 5 5、2 5 7、2 5 9、2 6 1、2 6 3、2 6 5、および 2 6 7 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、s c F v である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号 3 0 の軽鎖配列および配列番号 7 の重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号 7 と、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号 3 0 と、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、(i) 配列番号 3 0 / 配列番号 7、(i i) 配列番号 3 0 / 配列番号 6、(i i i) 配列番号 3 4 / 配列番号 6、および (i v) 配列番号 3 4 / 配列番号 7 から選択される軽鎖 / 重鎖配列対を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号 1 7 ~ 2 5 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖を含み、C A R - E C スイッチは、配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3 および 2 4 5 のうちのいずれか 1 つから選択される G C N 4 ペプチドである C A R - I D を含み、C A R - E C スイッチは、L C N T スイッチである。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、本開示は、C A R - E C 上の抗 G C N 4 キメラ抗原受容体と相互作用する G C N 4 誘導体ペプチドを含むキメラ抗原受容体相互作用ドメイン (C A R - I D) を含む、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチと、標的化部分とを提供する。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、構造 I : X

10

20

30

40

50

1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3 (配列番号 2 6 9) の配列を含み、X 1、X 2、および X 3 は任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、構造 I : X 1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3 (配列番号 2 6 9) の配列から成り、X 1、X 2、および X 3 は任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X 1 は、K であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X 2 は、K、A、および G から選択される。いくつかの実施形態では、X 3 は、L、A、および G から選択される。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9、1 4 5、および 1 5 4 ~ 1 6 3 のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3 および 2 4 5 のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9、1 4 5、および 1 5 4 ~ 1 6 3 のうちのいずれか 1 つから選択される配列から成る。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3 および 2 4 5 のうちのいずれか 1 つから選択される配列から成る。

10

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、標的化ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、標的化ポリペプチドは、標的細胞上の抗原に結合する標的化抗体または抗体断片である。いくつかの実施形態では、標的化抗体またはその抗原結合部分は、ヒト化される。

20

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、細胞表面分子は、C D 1 9 である。いくつかの実施形態では、細胞表面分子は、H e r 2、C L L 1、C D 3 3、C D 1 2 3、E G F R、E G F R v I I I、C D 2 0、C D 2 2、C S 1、B C M A、C E A、またはそれらの断片である。いくつかの特定の実施形態では、標的化部分は、C D 1 9 に特異的に結合する。いくつかの特定の実施形態では、標的化部分は、H e r 2、C L L 1、C D 3 3、C D 1 2 3、E G F R、E G F R v I I I、C D 2 0、C D 2 2、C S 1、B C M A、C E A、またはそれらの断片に特異的に結合する。

【 0 0 1 6 】

いくつかの特定の実施形態では、標的化部分は、抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合部分である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で開示されるヒト化された抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合部分のうちの任意の 1 つ以上) を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された F M C 6 3 抗体、またはヒト化された F M C 6 3 抗体の抗原結合部分を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、抗 C D 2 0 抗体、抗 C D 2 2 抗体、抗 E G F R 抗体、抗 E G F R v I I I 抗体、抗 H e r 2 抗体、抗 C S 1 抗体、抗 B C M A 抗体、抗 C E A 抗体、抗 C L L 1 抗体、抗 C D 1 2 3 抗体、または抗 C D 3 3 抗体を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗 C D 2 0 抗体、ヒト化された抗 C D 2 2 抗体、ヒト化された抗 E G F R 抗体、ヒト化された抗 E G F R v I I I 抗体、ヒト化された抗 H e r 2 抗体、ヒト化された抗 C S 1 抗体、ヒト化された抗 B C M A 抗体、ヒト化された抗 C E A 抗体、ヒト化された抗 C L L 1 抗体、ヒト化された抗 C D 1 2 3 抗体、またはヒト化された抗 C D 3 3 抗体を含むか、またはそれから成る。

30

40

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態では、標的化部分 (例えば、ヒト化された標的化部分) は、免疫グロブリン、F c ヌル免疫グロブリン、および F a b、ならびにそれらの断片から成る群から選択される。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態では、ヒト化された標的化部分は、配列番号 1 6 ~ 2 5 から成る群から選択される軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化された標的化部分は、

50

配列番号 27 ~ 35 から成る群から選択される軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化された標的化部分は、配列番号 1 ~ 15 から成る群から選択される重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化された標的化部分は、配列番号 17 ~ 25、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、および 267 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、標的化抗体またはその抗原結合部分であり、配列番号 2 ~ 15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および 268 のうちのいずれか 1 つから選択される重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、標的化抗体またはその抗原結合部分であり、配列番号 27 ~ 35 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR - EC スイッチは、配列番号 30 の軽鎖配列および配列番号 7 の重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、CAR - EC スイッチ配列番号 30 と、少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または少なくとも 99 % 同一である軽鎖配列と、配列番号 7 と、少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または少なくとも 99 % 同一である重鎖配列と。いくつかの実施形態では、CAR - EC スイッチ (i) 配列番号 30 / 配列番号 6、(i i) 配列番号 34 / 配列番号 6、および (i i i) 配列番号 34 / 配列番号 7 から選択される軽鎖 / 重鎖配列対。

10

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、ヒト化された標的化部分は、配列番号 35 と約 1 ~ 20 個のアミノ酸が異なる軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化された標的化部分は、それが、T7、T8、L15、S22、D41、G42、T43、V44、Y71、S72、N77、E79、Q80、I83、F87、および G100 から成る群から選択される配列番号 35 軽鎖アミノ酸残基のうちの 1 つ以上の置換を含むことを除いて、配列番号 35 と同一である軽鎖配列を含む。

20

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、ヒト化された標的化部分は、配列番号 15 と約 1 ~ 約 30 個のアミノ酸が異なる重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化された標的化部分は、それが、E1、K3、A13、Q16、S17、V20、R42、L48、S61、A62、L67、I70、K71、N73、S76、V78、F79、M82、N83、L85、Q86、T87、D88、I92、K97、および S115 から成る群から選択される配列番号 15 重鎖アミノ酸残基のうちの 1 つ以上の置換を含むことを除いて、配列番号 15 と同一である重鎖配列を含む。

30

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、標的化抗体またはその抗原結合部分を含み、本明細書で開示される軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、本明細書で開示される重鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分である標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、本明細書で開示される軽鎖配列および重鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号 17 ~ 25、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、および 267 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号 2 ~ 15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および 268 のうちのいずれか 1 つから選択される重鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号 27 ~ 35 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、2 ~ 15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および 268 のうちのいずれか 1 つから選択される重鎖配列を含む。

40

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、CAR - ID は、ペプチドを含む。いくつかの実施形態では

50

、CAR-IDは、酵母転写因子GCN4ペプチド、二量体化しないバリエーションGCN4ペプチド、FLAGタグペプチド、非天然発生ペプチド、天然発生ペプチド、合成ペプチドタグ、 α ヘリックス形成ペプチド、K4ペプチド、およびE4ペプチドから選択されるペプチドを含む。いくつかの実施形態では、GCN4ペプチド誘導体は、構造Iの配列：X1NYHLENEVARLKX2X3（配列番号269）を含み、X1、X2、およびX3は任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、GCN4ペプチド誘導体は、構造I：X1NYHLENEVARLKX2X3（配列番号269）の配列から成り、X1、X2、およびX3は任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X1は、Kであるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X2は、K、A、およびGから選択される。いくつかの実施形態では、X3は、L、A、およびGから選択される。いくつかの実施形態では、GCN4ペプチド誘導体は、配列番号26、36、139～163および245のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、GCN4ペプチド誘導体は、配列番号26、36、139～163および245のうちのいずれか1つから選択される配列から成る。

10

【0023】

いくつかの実施形態では、CAR-IDは、小分子を含む。いくつかの実施形態では、小分子は、ハブテンである。いくつかの実施形態では、ハブテンは、FITCである。

【0024】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示されるCAR-ECスイッチと、CAR-EC上で発現される「相補的」キメラ抗原受容体（CAR）とを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、(i) CAR-EC上でキメラ抗原受容体と相互作用するCAR-IDと、標的細胞上のCD19に結合するヒト化された標的化部分とを含むヒト化されたCAR-ECスイッチ、および(ii) CAR-EC上で発現される相補的CARを含む。いくつかの実施形態では、キットは、酵母転写因子GCN4ペプチドまたはその誘導体、二量体化しないバリエーションGCN4ペプチド、FLAGタグペプチド、非天然発生ペプチド、天然発生ペプチド、合成ペプチドタグ、 α ヘリックス形成ペプチド、K4ペプチド、およびE4ペプチドから選択されるCAR-IDを含む。いくつかの実施形態では、CAR-IDは、FITCである。

20

【0025】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示されるCAR-ECスイッチおよび第1のCAR-ECのうちのいずれか1つから選択される第1のヒト化されたCAR-ECスイッチを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、第1のCAR-ECは、ヒト化されたCARを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化されたCARは、本明細書で開示されるヒト化されたCARのうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態では、ヒト化されたCARは、配列番号389～397、401、403、405、407、409、411、413、および415から選択される。いくつかの実施形態では、CAR-ECスイッチは、配列番号17～25、27～35、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、および267のうちのいずれか1つから選択される軽鎖配列および配列番号2～15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および268のうちのいずれか1つから選択される重鎖配列を含む。

30

40

【0026】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i) 抗GCN4細胞外領域（例えば、本明細書で開示される抗GCN4抗体またはそのGCN4-結合部分）を含むCARを発現するCAR-EC、および(ii) CAR-EC上の抗GCN4 CARと相互作用するGCN4誘導体ペプチドを含むCAR-IDと、標的化部分とを含むCAR-ECスイッチを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、GCN4誘導体は、本明細書で開示されるGCN4誘導体のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態では、GCN4誘導体は、二量体化しない。いくつかの実施形態では、標的化部分は、本明細書で開

50

示される標的化部分から選択される標的化部分を含む。いくつかの特定の実施形態では、標的化部分は、抗CD19抗体またはその抗原結合部分である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗CD19抗体またはその抗原結合部分（例えば、本明細書で開示されるヒト化された抗CD19抗体またはその抗原結合部分のうちの任意の1つ以上）を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化されたFMC63抗体またはヒト化されたFMC63抗体の抗原結合部分を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD23抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL1抗体、抗CD123抗体、または抗CD33抗体を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗CD20抗体、ヒト化された抗CD22抗体、ヒト化された抗EGFR抗体、ヒト化された抗EGFRvIII抗体、ヒト化された抗Her2抗体、ヒト化された抗CS1抗体、ヒト化された抗BCMA抗体、ヒト化された抗CEA抗体、ヒト化された抗CLL1抗体、ヒト化された抗CD123抗体、またはヒト化された抗CD33抗体を含むか、またはそれから成る。

10

【0027】

いくつかの実施形態では、キットは、(i) 配列番号16～25から成る群から選択される軽鎖配列、および(ii) 配列番号1～15から成る群から選択される重鎖配列を含むFMC63抗体またはそのCD19結合部分である、標的化部分を含むCAR-ECスイッチを含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、本明細書で開示される軽鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、本明細書で開示される重鎖配列を含む標的化抗体またはその抗原結合部分である、標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、本明細書で開示される軽鎖配列および重鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号17～25、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、および267のうちのいずれか1つから選択される軽鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号2～15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および268のうちのいずれか1つから選択される重鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号27～35のうちのいずれか1つから選択される軽鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、配列番号2～15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および268のうちのいずれか1つから選択される重鎖配列を含む。

20

30

【0028】

いくつかの実施形態では、キットは、治療を必要とする対象を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、対象は、CD19+細胞が病理学と関連付く疾患または状態のためにキットを用いて治療される。いくつかの実施形態では、キットは、異種の腫瘍および血球悪性腫瘍から選択される疾患または状態のために、対象を治療するのに使用される。いくつかの実施形態では、対象は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病から選択される疾患または状態のために治療される。いくつかの実施形態では、対象は、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫(MCL)、バーキットリンパ腫、および有毛細胞白血病(HCL)から選択される疾患または状態のために治療される。いくつかの実施形態では、対象は、CD19+細胞が、相補的CARを発現する抗CD19CAR-ECスイッチおよびCAR-ECを投与することを含む病理学と関連付く、疾患または状態のために治療される。いくつかの実施形態では、キットは、(i) CD20+細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療する、(ii) CD22+細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために

40

50

対象を治療する、(i i i) C D 3 3 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療する、(i v) C E A + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療する、(v) C L L 1 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療する、(v i) B C M A + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療する、(v i i) C S 1 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療する、(v i i i) C D 1 2 3 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療する、H e r 2 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療する、または(i x) 特定の標的抗原（例えば、腫瘍と関連する抗原）が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療するために使用される。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示されるスイッチおよびC A R - E C 上で発現される相補的C A Rを用いて、治療を必要とする対象を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、(i) C A R - E C 上のキメラ抗原受容体と相互作用するC A R - I D と、標的細胞上のC D 1 9 に結合するヒト化された標的化部分とを含むヒト化されたC A R - E C スイッチ、および(i i) C A R - E C 上で発現される相補的C A Rを用いて治療を必要とする対象を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法で使用されるC A R - E C スイッチは、酵母転写因子G C N 4 ペプチドまたはその誘導体、二量体化しないG C N 4 ペプチド、F L A G タグペプチド、非天然発生ペプチド、天然発生ペプチド、合成ペプチドタグ、 α ヘリックス形成ペプチド、K 4 ペプチド、およびE 4 ペプチドから選択されるC A R - I D を含む。いくつかの実施形態では、G C N 4 誘導体は二量体化しない。いくつかの実施形態では、G C N 4 誘導体は、本明細書で開示されるG C N 4 誘導体のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、構造I : X 1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3 (配列番号 2 6 9) の配列を含み、X 1、X 2、およびX 3は任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、構造I : X 1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3 (配列番号 2 6 9) 配列から成り、X 1、X 2、およびX 3は任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X 1は、Kであるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X 2、K、A、およびGから選択される。いくつかの実施形態では、X 3は、L、A、およびGから選択される。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9、1 4 5、および1 5 4 ~ 1 6 3 のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3 および2 4 5 のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、配列番号 2 6、3 6、1 3 9、1 4 5、および1 5 4 ~ 1 6 3 のうちのいずれか1つから選択される配列から成るG C N 4 ペプチド誘導体。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体、配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3 および2 4 5 のうちのいずれか1つから選択される配列から成る。

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、C A R - I D は、F I T C である。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i) 抗G C N 4 細胞外領域（例えば、本明細書で開示される抗G C N 4 抗体またはそのG C N 4 - 結合部分）を含むC A R を発現するC A R - E C、および(i i) C A R - E C 上の抗G C N 4 C A R と相互作用するG C N 4 誘導体ペプチドを含むC A R - I D と、標的化部分とを含むC A R - E C スイッチを用いて、治療を必要とする対象を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、G C N 4 誘導体は、二量体化しない。いくつかの実施形態では、G C N 4 誘導体は、本明細書で開示されるG C N 4 誘導体のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、構造I : X 1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3 (配列番号 2 6 9) の配列を含み、X 1、X 2、およびX 3は任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、構造I :

X 1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3 (配列番号 2 6 9) の配列から成り、X 1、X 2、および X 3 は任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X 1 は、K であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X 2 は、K、A、および G から選択される。いくつかの実施形態では、X 3 は、L、A、および G から選択される。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9、1 4 5、および 1 5 4 ~ 1 6 3 のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3 および 2 4 5 のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含むか、またはそれから成る。

【0032】

いくつかの実施形態では、G C N 4 ペプチド誘導体は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9、1 4 5、および 1 5 4 ~ 1 6 3 のうちのいずれか 1 つから選択される配列から成る。

【0033】

いくつかの実施形態では、治療を必要とする対象を治療する方法で使用される C A R - E C スイッチから成る標的化部分は、本明細書で開示される標的化部分から選択される標的化部分を含む。いくつかの特定の実施形態では、標的化部分は、抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合部分である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で開示されるヒト化された抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合部分任意の 1 つ以上) を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された F M C 6 3 抗体またはヒト化された F M C 6 3 抗体の抗原結合部分を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、抗 C D 2 0 抗体、抗 C D 2 2 抗体、抗 E G F R 抗体、抗 E G F R v I I I 抗体、抗 H e r 2 抗体、抗 C S 1 抗体、抗 B C M A 抗体、抗 C E A 抗体、抗 C L L 1 抗体、抗 C D 1 2 3 抗体、または抗 C D 3 3 抗体を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗 C D 2 0 抗体、ヒト化された抗 C D 2 2 抗体、ヒト化された抗 E G F R 抗体、ヒト化された抗 E G F R v I I I 抗体、ヒト化された抗 H e r 2 抗体、ヒト化された抗 C S 1 抗体、ヒト化された抗 B C M A 抗体、ヒト化された抗 C E A 抗体、ヒト化された抗 C L L 1 抗体、ヒト化された抗 C D 1 2 3 抗体、またはヒト化された抗 C D 3 3 抗体を含むか、またはそれから成る。

【0034】

いくつかの実施形態では、治療を必要とする対象を治療する方法で使用される C A R - E C スイッチから成る標的化部分は、(i) 配列番号 1 6 ~ 2 5 から成る群から選択される軽鎖配列または配列番号 2 7 ~ 3 5 から成る群から選択される軽鎖配列、および、(i i) 配列番号 1 ~ 1 5 から成る群から選択される重鎖配列を含む、F M C 6 3 抗体またはその C D 1 9 結合部分である標的化部分を含む。

【0035】

いくつかの実施形態では、方法は、C D 1 9 + 細胞が、抗 C D 1 9 C A R - E C スイッチおよび相補的 C A R を発現する C A R - E C を投与することを含む病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、a . C D 2 0 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療することを含み、いくつかの実施形態では、方法は、b . C D 2 2 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療することを含み、いくつかの実施形態では、方法は、c . C D 3 3 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療することを含み、いくつかの実施形態では、方法は、d . C E A + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療することを含み、いくつかの実施形態では、方法は、e . C L L 1 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療することを含み、いくつかの実施形態では、方法は、f . B C M A + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療することを含み、いくつかの実施形態では、方法は、g . C S 1 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療することを含み、いくつかの実施形態では、方法は、h . C D 1 2 3 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療

10

20

30

40

50

することを含み、いくつかの実施形態では、方法は、H e r 2 + 細胞が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療すること、あるいは特定の標的抗原（例えば、腫瘍抗原）が病理学と関連付く疾患または状態のために対象を治療することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、a . 異種の腫瘍および血球悪性腫瘍から選択される疾患または状態のために対象を治療することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病から選択される疾患または状態対象を治療することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（N H L）、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（D L B C L）、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（M C L）、パーキットリンパ腫、および有毛細胞白血病（H C L）から選択される疾患または状態のために対象を治療することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書で開示される少なくとも1つのスイッチおよび相補的C A R - E Cを投与することを含む。

10

【0036】

いくつかの実施形態では、本開示は、開示されるC A R - E Cスイッチ、ならびに1つ以上の薬学的に許容される塩、賦形剤および/またはビヒクルを含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、担体、賦形剤、希釈剤、抗酸化剤、保存剤、着色剤、着香希釈剤、乳化剤、懸濁剤、溶媒、注入剤、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、等張化剤、共溶媒、湿潤剤、錯化剤、緩衝薬、抗菌剤、および/または界面活性剤、ならびに本明細書で開示される1つ以上のC A R - E Cスイッチを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも2つのC A R - E Cスイッチを含み、スイッチのうち少なくとも1つは、本明細書で開示されるスイッチ、および1つ以上の薬学的に許容される塩、賦形剤またはビヒクルである。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書で開示される2つ以上のスイッチを含む。

20

【0037】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示されるC A Rのうちのいずれか1つから選択されるC A Rを発現するC A R - E Cを提供する。いくつかの実施形態では、C A Rは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン細胞内シグナル伝達ドメインを含み、細胞外ドメインは、配列番号290 ~ 388、および423から選択される配列を含むヒト化された抗G C N 4 s c F vを含む。いくつかの実施形態では、s c F vは、配列番号322のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、s c F vは、配列番号322と、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C A Rは、図22Aの構造A ~ Hから選択される構造を含む。いくつかの実施形態では、C A Rは、図22Aの構造Eに従う構造を含む。いくつかの実施形態では、C A Rは、配列番号389 ~ 397、401、403、405、407、409、411、413、および415から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、C A Rは、配列番号411のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C A Rは、配列番号411の配列と、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C A R - E Cは、T細胞である。

30

40

【0038】

いくつかの実施形態では、本開示は、対象に、本明細書で開示される第1のC A R - E Cスイッチ、C A R - I Dおよび標的化部分を含む第2のC A R - E Cスイッチ、ならびに第1のC A R - E Cスイッチ上のC A R - I Dおよび第2のC A R - E Cスイッチ上のC A R - I Dに結合するC A R - E Cを投与することを含む、再発癌治療する方法を提供し、第1のC A R - E Cは、対象の再発前に投与され、第2のC A R - E Cスイッチは、対象の再発後に投与される。いくつかの実施形態では、第2のC A R - E Cスイッチは、抗C D 20標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、第1のC A R - E Cスイッチの

50

標的化部分は、配列番号 27～35 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列と、配列番号 2～15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および 268 のうちのいずれか 1 つから選択される重鎖配列とを含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、本開示は、対象に、CAR-ID および標的化部分を含む第 1 の CAR-EC スイッチ、本明細書で開示されるスイッチのうちのいずれか 1 つから選択される第 2 の CAR-EC スイッチ、および第 1 の CAR-EC スイッチ上の CAR-ID および第 2 の CAR-EC スイッチ上の CAR-ID に結合する CAR-EC を投与することを含む、再発癌を治療する方法を提供し、第 1 の CAR-EC は、対象の再発前に投与され、第 2 の CAR-EC スイッチは、対象の再発後に投与される。いくつかの実施形態では、第 2 の CAR-EC スイッチの標的化部分は、標的化抗体またはその抗原結合部分を含み、配列番号 27～35 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列および配列番号 2～15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および 268 のうちのいずれか 1 つから選択される重鎖配列を含む。

10

【0040】

いくつかの実施形態では、本開示は、標的細胞を、本明細書で開示されるヒト化された CAR-EC スイッチと接触させること、かつ CAR-EC スイッチを、相補的 CAR-EC と接触させることを含む、標的細胞を溶解する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、標的細胞を、CAR-EC スイッチと接触させること、かつ CAR-EC スイッチを、本明細書で開示される相補的なヒト化された CAR-EC と接触させることを含む、標的細胞を溶解する方法を提供する。

20

【0041】

いくつかの実施形態では、本開示は、標的細胞を、本明細書で開示されるヒト化された CAR-EC スイッチと接触させること、かつ CAR-EC スイッチを、相補的 CAR-EC を接触させることを含む、標的細胞を死滅させる方法を提供する

【0042】

いくつかの実施形態では、本開示は、標的細胞を、CAR-EC スイッチと接触させること、かつ CAR-EC スイッチを、本明細書で開示される相補的なヒト化された CAR-EC 接触させることを含む、標的細胞を死滅させる方法を提供する。

30

【0043】

いくつかの実施形態では、本開示は、CAR-EC 上で発現される CAR を、請求項 21～68 の CAR-EC スイッチのうちのいずれか 1 つから選択される CAR-EC スイッチと接触させることを含む、CAR-EC を活性化させる方法を提供し、CAR-EC は、CAR-EC スイッチ上の標的化部分が、標的細胞上のその標的および CAR-EC 上の CAR の細胞外ドメインの両方に結合する際に、活性化され、CAR は、CAR-EC スイッチ上の CAR-ID に結合する。

【0044】

いくつかの実施形態では、本開示は、対象への CAR-EC スイッチ投与の投薬レジメンを調節することによって、T 細胞応答の度合を制御する方法を提供する。いくつかの実施形態では、第 1 の投薬レジメンは、CAR-EC スイッチを、第 1 の短期投薬スケジュールで、第 1 の高投薬量で投与することを含み、第 2 の投薬レジメンは、CAR-EC スイッチを、第 1 の投薬スケジュールより長い第 2 の投薬スケジュールで、第 2 の低投薬量で投与することを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の投薬スケジュールは、CAR-EC スイッチを、少なくとも 1 日おきに 1 回投与することを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の投薬スケジュールは、CAR-EC スイッチを、1 日おきに投与することを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の投薬スケジュールは、第 1 の高投薬量の CAR-EC スイッチを、1 日おきに合計 4 回の投与で、投与することを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の投薬スケジュールは、第 1 の高投薬量の CAR-EC スイッチを、1 日おきにまたは約 1 日おきに、合計 4 回の投与または合計約 4 回の投与で、投与することを含む

40

50

。いくつかの実施形態では、第2の投薬スケジュールは、第2の低投薬量で、1日おきに合計12回の投与で、投与することを含む。いくつかの実施形態では、第2の投薬スケジュールは、第2の低投薬量で、1日おきにまたは約1日おきに、合計12回の投与または約12回の投与で、投与することを含む。いくつかの実施形態では、高投薬量は、低投薬量の少なくとも5倍、10倍、または少なくとも15倍である。いくつかの実施形態では、第1の投薬レジメンは、低投薬量で投与される対照のT細胞拡大と比較して、高投薬量で投与される対象のT細胞拡大の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、CAR-ECスイッチは、本明細書で開示されるヒト化されたCAR-ECスイッチである。いくつかの実施形態では、CAR-ECスイッチは、配列番号27～35のうちのいずれか1つから選択される軽鎖配列および配列番号2～15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および268のうちのいずれか1つから選択される重鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態では、T細胞は、本明細書で記載されるCARを含む。いくつかの実施形態では、T細胞は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインを含むヒト化されたCARを含み、細胞外ドメインは、配列番号290～388、および423から選択される配列を含むヒト化された抗GCN4 scFvを含む。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号322のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号322と、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、図22Aの構造A～Hから選択される構造を含む。いくつかの実施形態では、CARは、図22Aの構造Eに従う構造を含む。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号389～397、401、403、405、407、409、411、413、および415から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号411のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号411の配列と、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、配列番号93～103および165～168から選択される配列を含むヒンジドメインを含む。

10

20

30

本発明は一態様において以下を提供する。

[項目1]

細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインを含むヒト化されたキメラ抗原受容体(CAR)であって、前記細胞外ドメインが、配列番号290～388、および423から選択される配列を含むヒト化された抗GCN4 scFvを含む、ヒト化されたキメラ抗原受容体(CAR)。

[項目2]

前記scFvが、配列番号322のアミノ酸配列を含む、項目1に記載のCAR。

[項目3]

前記scFvが、配列番号322と、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む、項目1に記載のCAR。

40

[項目4]

図22Aの構造A～Hから選択される構造を含む、項目1に記載のCAR。

[項目5]

図22Aの構造Eに従う構造を含む、項目1に記載のCAR。

[項目6]

前記CARが、配列番号389～397、401、403、405、407、409、

50

4 1 1、4 1 3、および 4 1 5 から選択される配列を含む、項目 1 に記載の C A R。

[項目 7]

前記 C A R が、配列番号 4 1 1 のアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の C A R。

[項目 8]

前記 C A R が、配列番号 4 1 1 の配列と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の C A R。

[項目 9]

前記細胞外ドメインが、配列番号 9 3 ~ 1 0 3 および 1 6 5 ~ 1 6 8 から選択される配列を含むヒンジドメインを含む、項目 1 に記載の C A R。

10

[項目 1 0]

前記細胞外ドメインが、アミノ酸配列：E S K Y G P P C P P C P D を含むヒンジドメインを含む、項目 1 に記載の C A R。

[項目 1 1]

前記膜貫通ドメインが、配列番号 3 9 8 および 4 1 7 から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 および 9 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の C A R。

[項目 1 2]

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、(a) C D 3 - ζ ドメイン、ならびに (b) C D 2 8 ドメイン、4 - 1 B B ドメイン、または C D 2 8 ドメインおよび 4 - 1 B B ドメインを含む、項目 1 および 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の C A R。

20

[項目 1 3]

前記 C D 2 8 ドメインが、配列番号 4 1 8 の配列と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 2 に記載の C A R。

[項目 1 4]

前記 C D 2 8 ドメインが、配列番号 4 1 8 のアミノ酸配列を含む、項目 1 2 に記載の C A R。

[項目 1 5]

前記 4 - 1 B B ドメインが、配列番号 4 1 9 の配列と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % と同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の C A R。

30

[項目 1 6]

前記 4 - 1 B B ドメインが、配列番号 4 1 9 のアミノ酸配列を含む、項目 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の C A R。

[項目 1 7]

前記 C D 3 - ζ ドメインが、配列番号 4 2 0 の配列と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の C A R。

40

[項目 1 8]

前記 C D 3 - ζ ドメインが、配列番号 4 2 0 のアミノ酸配列を含む、項目 1 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の C A R。

[項目 1 9]

前記膜貫通ドメインが、配列番号 4 1 7 の配列と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少な

50

くとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 および 9 ~ 18 のいずれか一項に記載の CAR。

[項目 20]

前記膜貫通ドメインが、配列番号 417 のアミノ酸配列を含む、項目 1 および 9 ~ 18 のいずれか一項に記載の CAR。

[項目 21]

キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (CAR-EC) スイッチであって、

a. 前記 CAR-EC 上の抗 GCN4 キメラ抗原受容体と相互作用する GCN4 誘導体ペプチドを含む、キメラ抗原受容体相互作用ドメイン (CAR-ID) と、

b. 標的化部分と、を含み、

前記標的化部分が、配列番号 17 ~ 25、27 ~ 35、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、および 267 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列を含む、標的化抗体、またはその抗原結合部分である、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (CAR-EC) スイッチ。

[項目 22]

前記標的化抗体、または前記その抗原結合部分が、配列番号 2 ~ 15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および 268 のうちのいずれか 1 つから選択される重鎖配列を含む、項目 21 に記載の CAR-EC スイッチ。

[項目 23]

キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (CAR-EC) スイッチであって、

a. 前記 CAR-EC 上の抗 GCN4 キメラ抗原受容体と相互作用する GCN4 誘導体ペプチドを含むキメラ抗原受容体相互作用ドメイン (CAR-ID) と、

b. 標的化部分と、を含み、

前記標的化部分が、配列番号 2 ~ 15、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、および 268 のうちのいずれか 1 つから選択される重鎖配列を含む、標的化抗体、またはその抗原結合部分である、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (CAR-EC) スイッチ。

[項目 24]

前記標的化抗体、または前記その抗原結合部分が、配列番号 17 ~ 25、27 ~ 35、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、および 267 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖配列を含む、項目 23 に記載の CAR-EC スイッチ。

[項目 25]

前記標的化部分が、scFv である、項目 21 ~ 24 のいずれか一項に記載の CAR-EC スイッチ。

[項目 26]

配列番号 30 の軽鎖配列および配列番号 7 の重鎖配列を含む、項目 25 に記載の CAR-EC スイッチ。

[項目 27]

配列番号 7 と、少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも 99% 同一である重鎖配列を含む、項目 21 に記載の CAR-EC スイッチ。

[項目 28]

配列番号 30 と、少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも 99% 同一である軽鎖配列を含む、項目 23 に記載の CAR-EC スイッチ。

[項目 29]

(i) 配列番号 30 / 配列番号 7、(ii) 配列番号 30 / 配列番号 6、(iii) 配列番号 34 / 配列番号 6、および (iv) 配列番号 34 / 配列番号 7 から選択される軽鎖 / 重鎖配列対を含む、項目 21 ~ 25 のいずれか一項に記載の CAR-EC スイッチ。

10

20

30

40

50

[項目 3 0]

配列番号 1 7 ~ 2 5 のうちのいずれか 1 つから選択される軽鎖を含み、前記 C A R - E C スイッチが、配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3 および 2 4 5 のうちのいずれか 1 つから選択される G C N 4 ペプチドである C A R - I D を含み、前記 C A R - E C スイッチが、L C N T スイッチである、項目 2 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の C A R - E C スイッチ。

[項目 3 1]

ヒト化されたキメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチであって、
a . 前記 C A R - E C 上のキメラ抗原受容体と相互作用するキメラ抗原受容体相互作用ドメイン (C A R - I D) と、
b . 標的細胞上の C D 1 9 に結合するヒト化された標的化部分と、を含む、ヒト化されたキメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチ。

10

[項目 3 2]

前記ヒト化された標的化部分が、C D 1 9 に結合するヒト化された抗体および C D 1 9 に結合する抗体のヒト化された抗原結合部分から選択される、項目 3 1 に記載のスイッチ。

[項目 3 3]

前記ヒト化された標的化部分が、免疫グロブリン、F c ヌル免疫グロブリン、および F a b、ならびにそれらの断片から成る群から選択される、項目 3 1 または 3 2 に記載のスイッチ。

[項目 3 4]

前記ヒト化された標的化部分が、配列番号 1 6 ~ 2 5 から成る群から選択される軽鎖配列を含む、項目 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のスイッチ。

20

[項目 3 5]

前記ヒト化された標的化部分が、配列番号 2 7 ~ 3 5 から成る群から選択される軽鎖配列を含む、項目 3 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のスイッチ。

[項目 3 6]

前記ヒト化された標的化部分が、配列番号 1 ~ 1 5 から成る群から選択される重鎖配列を含む、項目 3 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のスイッチ。

[項目 3 7]

前記ヒト化された標的化部分が、ヒト化された F M C 6 3 抗体、またはヒト化された F M C 6 3 抗体の抗原結合部分から選択される、項目 3 2 に記載のスイッチ。

30

[項目 3 8]

配列番号 3 5 と約 1 ~ 約 2 0 個のアミノ酸が異なる軽鎖配列を含む、項目 3 7 に記載のスイッチ。

[項目 3 9]

前記軽鎖配列が、それが、T 7、T 8、L 1 5、S 2 2、D 4 1、G 4 2、T 4 3、V 4 4、Y 7 1、S 7 2、N 7 7、E 7 9、Q 8 0、I 8 3、F 8 7、および G 1 0 0 から成る群から選択される配列番号 3 5 の軽鎖アミノ酸残基のうちの 1 つ以上の置換を含むことを除いて、配列番号 3 5 と同一である、項目 3 8 に記載のスイッチ。

[項目 4 0]

配列番号 1 5 と約 1 ~ 約 3 0 個のアミノ酸が異なる重鎖配列を含む、項目 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のスイッチ。

40

[項目 4 1]

前記重鎖配列が、それが、E 1、K 3、A 1 3、Q 1 6、S 1 7、V 2 0、R 4 2、L 4 8、S 6 1、A 6 2、L 6 7、I 7 0、K 7 1、N 7 3、S 7 6、V 7 8、F 7 9、M 8 2、N 8 3、L 8 5、Q 8 6、T 8 7、D 8 8、I 9 2、K 9 7、および S 1 1 5 から成る群から選択される配列番号 1 5 の重鎖アミノ酸残基のうちの 1 つ以上の置換を含むことを除いて、配列番号 1 5 と同一である、項目 4 0 に記載のスイッチ。

[項目 4 2]

前記 C A R - I D がペプチドを含み、前記ペプチドが、任意に酵母転写因子 G C N 4 ペ

50

プチド、二量体化しないバリエーション G C N 4 ペプチド、F L A G タグペプチド、非天然発生ペプチド、天然発生ペプチド、合成ペプチドタグ、 α ヘリックス形成ペプチド、K 4 ペプチド、および E 4 ペプチドから選択される、項目 3 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載のスイッチ。

[項目 4 3]

配列番号 3 0 の軽鎖配列および配列番号 7 の重鎖配列を含む、項目 3 1 に記載のスイッチ。

[項目 4 4]

前記 G C N 4 ペプチドが、構造 I の配列、表 1 0 に列挙される配列、ならびに配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3、および 2 4 5 から選択される配列から選択される、項目 4 2 に記載のスイッチ。

10

[項目 4 5]

前記 C A R - I D が、小分子を含む、項目 3 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載のスイッチ。

[項目 4 6]

前記小分子が、ハブテンである、項目 4 5 に記載のスイッチ。

[項目 4 7]

前記ハブテンが、F I T C である、項目 4 6 に記載のスイッチ。

[項目 4 8]

前記スイッチが、L C N T スイッチである、項目 3 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載のスイッチ。

20

[項目 4 9]

キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチであって、

a. 前記 C A R - E C 上の抗 G C N 4 キメラ抗原受容体と相互作用する G C N 4 誘導体ペプチドを含むキメラ抗原受容体相互作用ドメイン (C A R - I D) と、

b. 標的化部分と、を含む、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチ。

[項目 5 0]

前記 G C N 4 ペプチド誘導体が、構造 I の配列: X 1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3 (配列番号 2 6 9) を含み、X 1、X 2、および X 3 が任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である、項目 4 9 に記載の C A R - E C スイッチ。

30

[項目 5 1]

X 1 が、K であるか、または不在である、項目 5 0 に記載の C A R - E C スイッチ。[項目 5 2]

X 2 が、K、A、および G から選択される、項目 5 0 または 5 1 に記載の C A R - E C スイッチ。

[項目 5 3]

X 3 が、L、A、および G から選択される、項目 5 0 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の C A R - E C スイッチ。

[項目 5 4]

前記 G C N 4 ペプチド誘導体が、配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3、および 2 4 5 のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、項目 5 0 に記載の C A R - E C スイッチ。

40

[項目 5 5]

前記標的化部分が、標的化ポリペプチドである、項目 4 9 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の C A R - E C スイッチ。

[項目 5 6]

前記標的化部分が、標的化抗体またはその抗原結合部分である、項目 2 9 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の C A R - E C スイッチ。

[項目 5 7]

前記標的化部分が、ヒト化された抗体またはその抗原結合部分である、項目 4 9 ~ 5 6

50

のいずれか一項に記載のCAR-ECスイッチ。

[項目58]

前記標的化部分が、CD19、CD20、CD22、CD33、CEA、CLL1、B
CMA、CS1、CD123、およびHer2から選択される細胞表面分子に結合する、
項目49～57のいずれか一項に記載のCAR-ECスイッチ。

[項目59]

前記標的化部分が、本出願で開示される軽鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結
合部分である、項目49～58のいずれか一項に記載のCAR-ECスイッチ。

[項目60]

前記標的化部分が、本出願で開示される重鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結
合部分である、項目49～59のいずれか一項に記載のCAR-ECスイッチ。

10

[項目61]

前記標的化部分が、本出願で開示される軽鎖配列および重鎖配列を含む、標的化抗体ま
たはその抗原結合部分である、項目49～58のいずれか一項に記載のCAR-ECスイ
ッチ。

[項目62]

前記標的化部分が、配列番号17～25、247、249、251、253、255、
257、259、261、263、265、および267のうちのいずれか1つから選択
される軽鎖配列を含む標的化抗体またはその抗原結合部分である、項目49～61のい
ずれか一項に記載のCAR-ECスイッチ。

20

[項目63]

前記標的化部分が、配列番号2～15、248、250、252、254、256、2
58、260、262、264、266、および268のうちのいずれか1つから選択さ
れる重鎖配列を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分である、項目49～62のい
ずれか一項に記載のCAR-ECスイッチ。

[項目64]

前記標的化部分が、配列番号27～35のうちのいずれか1つから選択される軽鎖配列
を含む、標的化抗体またはその抗原結合部分である、項目49～57のいずれか一項に記
載のCAR-ECスイッチ。

[項目65]

2～15、248、250、252、254、256、258、260、262、26
4、266、および268のうちのいずれか1つから選択される重鎖配列を含む、項目6
4に記載のCAR-ECスイッチ。

30

[項目66]

配列番号30の軽鎖配列および配列番号7の重鎖配列を含む、項目49に記載のCAR
-ECスイッチ。

[項目67]

配列番号30と、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、また
は少なくとも99%同一である軽鎖配列、および配列番号7と、少なくとも85%、90
%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%同一である重鎖配列を含
む、項目49に記載のCAR-ECスイッチ。

40

[項目68]

(i) 配列番号30 / 配列番号6、(ii) 配列番号34 / 配列番号6、および(iii)
) 配列番号34 / 配列番号7から選択される軽鎖 / 重鎖配列対を含む、項目49に記載の
CAR-ECスイッチ。

[項目69]

細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインを含むヒト化されたキ
メラ抗原受容体であって、前記細胞外ドメインが、

a. キメラ抗原受容体スイッチと相互作用するヒト化された領域と、

b. ヒンジドメインと、を含む、ヒト化されたキメラ抗原受容体。

50

[項目 7 0]

前記ヒンジドメインが、約 1 ~ 約 2 0 のアミノ酸長である、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 7 1]

前記ヒンジドメインが、約 2 0 超のアミノ酸長である、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 7 2]

前記ヒンジドメインが、可撓性である、項目 6 9 ~ 7 1 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 7 3]

前記ヒンジドメインが、剛性である、項目 6 9 ~ 7 1 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 7 4]

第 1 のキメラ抗原受容体の第 1 のシステインおよび第 2 のキメラ抗原受容体の第 2 のシステインが、ジスルフィド結合を形成し、前記第 1 のキメラ抗原受容体および前記第 2 のキメラ抗原受容体の多量体化をもたらす、項目 6 9 ~ 7 3 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 7 5]

前記ヒンジドメインが、I g G 4 ヒンジ、I g G 4 m ヒンジ、C D 2 8 ヒンジ、および C D 8 ヒンジから選択される、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 7 6]

前記ヒンジドメインが、配列番号 9 3 ~ 1 0 3 および 1 6 5 ~ 1 6 8 から選択される配列を含むか、またはそれから成る、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 7 7]

前記ヒンジドメインが、配列番号 9 3 ~ 1 0 3 および 1 6 5 ~ 1 6 8 から選択される配列と、少なくとも 5 0 % 相同である配列を含むか、またはそれから成る、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 7 8]

前記細胞外ドメインが、ヒト化された抗 G C N 4 s c F v を含む、項目 6 9 ~ 7 7 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 7 9]

前記細胞外ドメインが、ヒト化された 5 2 S R 4 抗体またはその抗原結合部分を含む、項目 6 9 ~ 7 7 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 0]

前記ヒト化された抗 G C N 4 s c F v が、配列番号 2 9 0 ~ 3 8 8、および 4 2 3 から選択される配列を含むか、またはそれから成る、項目 7 8 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 1]

前記ヒト化された抗 G C N 4 s c F v が、配列番号 2 9 0 ~ 3 8 8、および 4 2 3 から選択される配列と少なくとも 5 0 % 同一である配列を含むか、またはそれから成る、項目 7 8 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 2]

前記ヒト化された抗 G C N 4 s c F v が、配列番号 3 2 2 と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である配列を含むか、またはそれから成る、項目 7 8 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 3]

前記 C A R が、C D 8 膜貫通ドメインまたは C D 2 8 膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメインを含む、項目 6 9 ~ 8 2 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 4]

10

20

30

40

50

前記膜貫通ドメインが、配列番号 3 9 8 および 4 1 7 から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る、項目 8 3 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 5]

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、(a) C D 3 - ζドメイン、および(b) C D 2 8 ドメイン、4 - 1 B B ドメイン、またはC D 2 8 ドメインおよび4 - 1 B B ドメインを含む、項目 6 9 ~ 8 4 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 6]

前記 C D 2 8 ドメインが、配列番号 4 1 8 を含むか、またはそれから成る、項目 8 5 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 7]

前記 4 - 1 B B ドメインが、配列番号 4 1 9 を含むか、またはそれから成る、項目 8 5 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 8]

前記 C D 3 - ζドメインが、配列番号 4 2 0 を含むか、またはそれから成る、項目 8 5 ~ 8 7 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 8 9]

キメラ抗原受容体スイッチと相互作用する前記領域が、前記キメラ抗原受容体スイッチのキメラ抗原受容体結合ペプチドと相互作用し、前記キメラ抗原受容体スイッチが、標的上の細胞表面分子と相互作用する標的化部分をさらに含む、項目 6 9 ~ 8 8 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 0]

前記キメラ抗原受容体が、配列番号 3 8 9 ~ 3 9 7、4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 7、4 0 9、4 1 1、4 1 3、および4 1 5 から選択される配列を含む、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 1]

前記キメラ抗原受容体が、配列番号 3 8 9 ~ 3 9 7、4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 7、4 0 9、4 1 1、4 1 3、および4 1 5 から選択される配列から成る、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 2]

前記キメラ抗原受容体が、配列番号 3 8 9 ~ 3 9 7、4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 7、4 0 9、4 1 1、4 1 3、および4 1 5 から選択される配列と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 3]

前記キメラ抗原受容体が、配列番号 4 0 0、4 0 2、4 0 4、4 0 6、4 0 8、4 1 0、4 1 2、4 1 4、および4 1 6 から選択される配列によってコードされる、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 4]

前記キメラ抗原受容体が、配列番号 4 0 0、4 0 2、4 0 4、4 0 6、4 0 8、4 1 0、4 1 2、4 1 4、および4 1 6 と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である配列によってコードされる、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 5]

前記ヒト化された領域のアミノ酸配列が、配列番号 3 2 2 を含むか、またはそれから成る、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 6]

前記ヒンジドメインが、前記アミノ酸配列 E S K Y G P P C P P C P D を含むか、また

10

20

30

40

50

はそれから成る、項目 6 9 または 9 5 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 7]

前記膜貫通ドメインが、配列番号 4 1 7 を含むか、またはそれから成る、項目 6 9、9 5、および 9 6 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 8]

前記細胞内ドメインが、配列番号 4 2 0 を含むか、またはそれから成る C D 3 - ζ シグナル伝達ドメインを含む、項目 6 9 および 9 5 ~ 9 7 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 9 9]

前記細胞内ドメインが、配列番号 4 1 8 または 4 1 9 を含むか、またはそれから成る共刺激ドメインを含む、項目 9 8 に記載のキメラ抗原受容体。

10

[項目 1 0 0]

前記細胞内ドメインが、配列番号 4 1 8 を含むか、またはそれから成る第 1 の共刺激ドメイン、および配列番号 4 1 9 を含むか、またはそれから成る第 2 の共刺激ドメインを含む、項目 9 8 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 1 0 1]

前記キメラ抗原受容体が、配列番号 4 1 1 のアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

[項目 1 0 2]

前記キメラ抗原受容体が、配列番号 4 1 1 の配列と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る、項目 6 9 に記載のキメラ抗原受容体。

20

[項目 1 0 3]

項目 2 1 ~ 6 8 に記載の C A R - E C スイッチのうちのいずれか 1 つから選択される第 1 のヒト化された C A R - E C スイッチと、第 1 の C A R - E C とを含むキット。

[項目 1 0 4]

前記第 1 の C A R - E C が、ヒト化された C A R を含む、項目 1 0 3 に記載のキット。

[項目 1 0 5]

前記ヒト化された C A R が、項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 に記載のヒト化された C A R のうちのいずれか 1 つから選択される、項目 1 0 4 に記載のキット。

30

[項目 1 0 6]

前記ヒト化された C A R が、配列番号 3 8 9 ~ 3 9 7、4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 7、4 0 9、4 1 1、4 1 3、および 4 1 5 から選択される、項目 1 0 4 に記載のキット。

[項目 1 0 7]

項目 3 1 に記載の第 1 のヒト化された C A R - E C スイッチを含むキットであって、前記 C A R - I D が、酵母転写因子 G C N 4 ペプチドまたはその誘導体、二量体化しないバリエーション G C N 4 ペプチド、F L A G タグペプチド、非天然発生ペプチド、天然発生ペプチド、合成ペプチドタグ、αヘリックス形成ペプチド、K 4 ペプチド、および E 4 ペプチドから選択され、前記標的化部分が、ヒト化された F M C 6 3 抗体、またはヒト化された F M C 6 3 抗体の抗原結合部分から選択されるヒト化された標的化部分を含む、キット。

40

[項目 1 0 8]

前記 C A R - I D が G C N 4 ペプチドであり、前記標的化部分が、ヒト化された F M C 6 3 抗体、またはヒト化された F M C 6 3 抗体の抗原結合部分から選択されるヒト化された標的化部分を含む、項目 1 0 7 に記載のキット。

[項目 1 0 9]

前記 C A R - I D が F I T C であり、前記標的化部分が、ヒト化された F M C 6 3 抗体、またはヒト化された F M C 6 3 抗体の抗原結合部分から選択されるヒト化された標的化部分を含む、項目 1 0 7 に記載のキット。

50

[項目 1 1 0]前記 F M C 6 3 抗体またはその C D 1 9 結合部分が、

- a . 配列番号 1 6 ~ 2 5 から成る群から選択される軽鎖配列、または
- b . 配列番号 2 7 ~ 3 5 から成る群から選択される軽鎖配列、および
- c . 配列番号 1 ~ 1 5 から成る群から選択される重鎖配列を含む、項目 1 0 7 ~ 1 0 9 のいずれか一項に記載のキット。

[項目 1 1 1]項目 2 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の第 1 の C A R - E C スイッチおよび第 1 の C A R - E C を用いて、治療を必要とする対象を治療する方法。[項目 1 1 2]前記 C A R - I D が、構造 I の配列：X 1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3 (配列番号 2 6 9) を含み、X 1、X 2、および X 3 が任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である、項目 1 1 1 に記載の方法。[項目 1 1 3](i) X 1 が K であるか、または不在であり、(i i) X 2 が K、A、および G から選択され、(i i i) X 3 が L、A、および G から選択され、(i v) X 1 が K であるか、または不在であり、かつ X 2 が K、A、および G から選択され、(v) X 1 が K であるか、または不在であり、かつ X 3 が L、A、および G から選択され、(v i) X 2 が K、A、および G から選択され、かつ X 3 が L、A、および G から選択され、(v i i) X 1 が K であるか、または不在であり、X 2 が K、A、および G から選択され、かつ X 3 が L、A、および G から選択される、項目 1 1 2 に記載の方法。[項目 1 1 4]前記 C A R - I D が、配列番号 2 6、2 6、1 3 9、1 4 5、および 1 5 4 ~ 1 6 3 のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、項目 1 1 2 に記載の方法。[項目 1 1 5]前記 C A R - I D が、F I T C を含む、項目 1 1 1 に記載の方法。[項目 1 1 6]前記対象が、C D 1 9 + 細胞が病理と関連するとされる疾患または状態のために治療される、項目 1 1 1 ~ 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。[項目 1 1 7]前記対象が、不均一性腫瘍および血球悪性腫瘍から選択される疾患または状態のために治療される、項目 1 1 1 ~ 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。[項目 1 1 8]前記対象が、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病から選択される疾患または状態のために治療される、項目 1 1 1 ~ 1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。[項目 1 1 9]前記対象が、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (N H L)、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (D L B C L)、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫 (M C L)、バーキットリンパ腫、および有毛細胞白血病 (H C L) から選択される疾患または状態のために治療される、項目 1 1 ~ 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。[項目 1 2 0]前記第 1 の C A R - E C が、項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 に記載の C A R のうちのいずれか 1 つから選択される C A R を発現する、項目 1 1 1 ~ 1 1 9 のいずれか一項に記載の方法。[項目 1 2 1]前記 C A R が、配列番号 4 1 1 のアミノ酸配列を含む、項目 1 2 0 に記載の方法。[項目 1 2 2]項目 1 0 3 3 ~ 1 1 0 のいずれか一項に記載のキットを用いて、治療を必要とする対象を治療する方法。

10

20

30

40

50

[項目 1 2 3]

前記対象が、C D 1 9 + 細胞が病理と関連するとされる疾患または状態のために治療される、項目 1 2 2 に記載の方法。

[項目 1 2 4]

前記対象が、異種の腫瘍および血球悪性腫瘍から選択される疾患または状態のために治療される、項目 1 2 2 または 1 2 3 に記載の方法。

[項目 1 2 5]

前記対象が、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病から選択される疾患または状態のために治療される、項目 1 2 2 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

[項目 1 2 6]

前記対象が、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (N H L)、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (D L B C L)、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫 (M C L)、パーキットリンパ腫、および有毛細胞白血病 (H C L) から選択される疾患または状態のために治療される、項目 1 1 1 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 2 7]

前記方法が、(i) C A R - I D およびヒト化された標的化部分を含む第 1 の C A R - E C スイッチと、(i i) C A R - I D およびヒト化された標的化部分を含む第 2 の C A R - E C スイッチと、(i i i) 前記第 1 の C A R - E C スイッチおよび前記第 2 の C A R - E C スイッチのそれぞれに相補的な第 1 の C A R - E C と、を投与することを含み、項目 2 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の前記第 1 および第 2 のスイッチのうち少なくとも 1 つ、項目 1 1 1 ~ 1 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

[項目 1 2 8]

前記方法が、(i) 項目 2 1 ~ 6 8 に記載の C A R - E C スイッチから選択される第 1 の C A R - E C スイッチと、(i i) C A R - I D およびヒト化された標的化部分を含む第 2 の C A R - E C スイッチと、(i i i) 前記第 1 の C A R - E C スイッチに相補的であるが、前記第 2 の C A R - E C スイッチに相補的ではない第 1 の C A R - E C と、(i v) 前記第 2 の C A R - E C スイッチに相補的な第 2 の C A R - E C と、を投与することを含む、項目 1 1 1 ~ 1 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 2 9]

前記第 1 の C A R - E C が、項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 に記載の C A R のうちのいずれか 1 つから選択される C A R を発現する、項目 1 2 7 または 1 2 8 に記載の方法。

30

[項目 1 3 0]

前記第 1 の C A R - E C スイッチおよび前記第 2 の C A R - E C スイッチが、異なる標的化部分に結合する、項目 1 2 7 ~ 1 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 3 1]

前記第 1 の C A R - E C スイッチが、項目 2 1 ~ 6 8 の前記 C A R - E C スイッチから選択される、項目 1 2 7 ~ 1 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 3 2]

前記第 2 の C A R - E C スイッチが、項目 2 1 ~ 6 8 の前記 C A R - E C スイッチから選択される、項目 1 2 7 ~ 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

40

[項目 1 3 3]

(i) 前記第 1 のスイッチの前記標的化部分の、標的細胞への結合、および (i i) 前記第 1 の C A R - E C 上の前記 C A R の前記第 1 の C A R - E C スイッチ上の前記 C A R - I D への結合の両方の結合が、第 1 の C A R - E C 媒介の療法効果を誘導する、項目 1 1 1 ~ 1 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 3 4]

(i) 前記第 2 のスイッチの前記標的化部分の、標的細胞への結合、および (i i) 前記第 1 の C A R - R C または前記第 2 の C A R - E C のいずれか上の前記 C A R の、前記第 2 の C A R - E C スイッチ上の前記 C A R - I D への結合の両方の結合が、前記第 2 の C

50

A R - E C スイッチ上の前記 C A R - I D に結合した前記第 1 または第 2 の C A R - E C によって生成される C A R - E C 媒介の療法効果を誘導する、項目 1 2 7 ~ 1 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 3 5]

前記療法効果が、前記標的細胞の死滅を含む、項目 1 3 3 または 1 3 4 に記載の方法。

[項目 1 3 6]

前記第 1 の C A R - E C が、T 細胞である、項目 1 1 1 ~ 1 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 3 7]

T 細胞である第 2 の C A R - E C を含む、項目 1 1 1 ~ 1 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

[項目 1 3 8]

前記キメラ抗原受容体が発現される前記 C A R - E C が T 細胞である、項目 2 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の C A R - E C スイッチ。

[項目 1 3 9]

項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 の前記 C A R のうちのいずれか 1 つから選択される C A R を発現する C A R - E C。

[項目 1 4 0]

前記 C A R - E C が、T 細胞である、項目 1 3 9 に記載の C A R - E C。

[項目 1 4 1]

前記第 1 の C A R - E C が、T 細胞である、項目 1 0 3 ~ 1 1 0 のいずれか一項に記載のキット。

20

[項目 1 4 2]

T 細胞である第 2 の C A R - E C を含む、項目 1 0 3 3 ~ 1 1 0 および 1 4 1 のいずれか一項に記載のキット。

[項目 1 4 3]

項目 2 1 ~ 6 8 に記載のいずれか一項のスイッチから選択されるスイッチと、1 つ以上の薬学的に許容される塩、賦形剤、またはビヒクルとを含む、医薬組成物。

[項目 1 4 4]

担体、賦形剤、希釈剤、抗酸化剤、保存剤、着色剤、着香希釈剤、乳化剤、懸濁剤、溶媒、注入剤、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、等張化剤、共溶媒、湿潤剤、錯化剤、緩衝薬、抗菌剤、および / または界面活性剤を含む、項目 1 4 3 に記載の医薬組成物。

30

[項目 1 4 5]

少なくとも 2 つの C A R - E C スイッチであって、前記少なくとも 2 つの C A R - E C スイッチのうち少なくとも 1 つが、項目 2 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載されるものから選択される C A R - E C スイッチである、C A R - E C スイッチと、1 つ以上の薬学的に許容される塩、賦形剤またはビヒクルとを含む、医薬組成物。

[項目 1 4 6]

項目 2 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載のものから選択される少なくとも 2 つの C A R - E C スイッチを含む、項目 1 4 5 に記載の医薬組成物。

40

[項目 1 4 7]

前記組成物が、実質的にエンドトキシンフリーである、項目 1 4 3 ~ 1 4 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[項目 1 4 8]

項目 2 1 ~ 6 8 のいずれか一項の前記 C A R - E C スイッチから選択される C A R - E C スイッチをコードする、ポリヌクレオチド。

[項目 1 4 9]

項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 のいずれか一項に記載の C A R をコードする、ポリヌクレオチド。

[項目 1 5 0]

50

項目 1 4 8 または 1 4 9 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[項目 1 5 1]

項目 1 4 8 もしくは 1 4 9 に記載の前記ポリヌクレオチドまたは項目 1 3 0 に記載の前記ベクターを含む、宿主細胞。

[項目 1 5 2]

項目 1 4 9 に記載の前記ポリヌクレオチド、または項目 1 4 9 に記載の前記ポリヌクレオチドを含むベクターを含む、T 細胞。

[項目 1 5 3]

項目 2 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の C A R - E C スイッチから選択される第 1 の C A R - E C スイッチと、項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 のいずれか一項に記載の C A R から選択される C A R を含む第 1 の C A R - E C と、を含む、C A R - E C プラットフォーム。

10

[項目 1 5 4]

項目 1 5 3 に記載の C A R - E C プラットフォームであって、1 つ以上の第 2 の C A R - E C スイッチをさらに含み、それぞれの第 2 の C A R - E C スイッチが、

a . C A R - I D と、

b . 標的細胞上の細胞表面分子に結合する第 2 の標的化部分と、を含み、

それぞれの第 2 の C A R - E C スイッチの前記第 2 の標的化部分が、前記第 1 の C A R - E C スイッチ上に含まれる前記第 1 の標的化部分とは異なり、

前記第 2 の C A R - E C スイッチ上に含まれる前記 C A R - I D が任意に、

20

(i) 前記第 1 の C A R - E C スイッチ上に含まれる前記第 1 の C A R - I D と同じであるか、または

(i i) 前記第 1 の C A R - E C スイッチ上に含まれる前記第 1 の C A R - I D とは異なる第 2 の C A R - I D であるが、

但し、前記第 2 の C A R - E C スイッチが、第 2 の C A R - I D を含む場合、前記 C A R - E C プラットフォームが、前記第 2 の C A R - E C スイッチの前記第 2 の C A R - I D に結合する C A R を含む第 2 の C A R - E C をさらに含むことを条件とする、C A R - E C プラットフォーム。

[項目 1 5 5]

再発癌を治療する方法であって、対象に、

30

a . 項目 2 1 ~ 4 8 の前記スイッチのうちのいずれか 1 つから選択される第 1 の C A R - E C スイッチと、

b . C A R - I D および標的化部分を含む第 2 の C A R - E C スイッチと、

c . 前記第 1 の C A R - E C スイッチ上の前記 C A R - I D および前記第 2 の C A R - E C スイッチ上の前記 C A R - I D に結合する、C A R - E C と、を投与することを含み、前記第 1 の C A R - E C が、前記対象の再発前に投与され、かつ前記第 2 の C A R - E C スイッチが、前記対象の前記再発後に投与される、方法。

[項目 1 5 6]

前記第 2 の C A R - E C スイッチが、抗 C D 2 0 標的化部分を含む、項目 1 5 5 に記載の方法。

40

[項目 1 5 7]

再発癌を治療する方法であって、対象に、

a . C A R - I D および標的化部分を含む第 1 の C A R - E C スイッチと、

b . 項目 1 ~ 2 8 の前記スイッチのいずれか 1 つから選択される第 2 の C A R - E C スイッチと、

c . 前記第 1 の C A R - E C スイッチ上の前記 C A R - I D および前記第 2 の C A R - E C スイッチ上の前記 C A R - I D に結合する、C A R - E C と、を投与することを含み、前記第 1 の C A R - E C が、前記対象の再発前に投与され、かつ前記第 2 の C A R - E C スイッチが、前記対象の前記再発後に投与される、方法。

[項目 1 5 8]

50

前記第 1 の C A R - E C スイッチが、抗 C D 2 0 標的化部分を含む、項目 1 5 7 に記載の方法。

[項目 1 5 9]

前記第 1 の C A R - E C スイッチ上の前記標的化部分が、第 1 の細胞表面分子に結合し、かつ前記第 2 の C A R - E C スイッチ上の前記標的化部分が、前記第 1 の細胞表面分子とは異なる第 2 の細胞表面分子に結合し、前記第 1 の細胞表面分子が、前記再発前に癌細胞上で発現され、かつ前記第 2 の細胞表面分子が、前記再発後に癌細胞上で発現される、項目 1 5 5 ~ 1 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 6 0]

前記第 1 の細胞表面分子が、

- a . 前記再発前と比較して、前記再発後により低いレベルで発現されるか、または
- b . 前記再発後に発現されない、項目 1 5 9 に記載の方法。

[項目 1 6 1]

前記標的細胞を、項目 2 1 ~ 6 8 のいずれか 1 つの前記 C A R - E C スイッチから選択される C A R - E C スイッチと接触させることと、前記 C A R - E C スイッチを相補的 C A R - E C と接触させることとを含む、標的細胞を溶解する方法。

[項目 1 6 2]

前記 C A R - E C が、項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 の前記 C A R のうちのいずれか 1 つから選択される C A R を発現するが、但し、前記 C A R が、前記 C A R - E C 上の前記 C A R - I D を補完する、項目 1 6 1 に記載の方法。

[項目 1 6 3]

前記接触が、インビボで起きる、項目 1 6 1 または 1 6 2 に記載の方法。

[項目 1 6 4]

前記標的細胞を、項目 2 1 ~ 6 8 のいずれか一項の前記 C A R - E C スイッチから選択される C A R - E C スイッチと接触させることと、前記 C A R - E C スイッチを、相補的 C A R - E C と接触させることと、を含む、標的細胞を死滅させる方法。

[項目 1 6 5]

前記 C A R - E C が、項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 の前記 C A R のうちのいずれか 1 つから選択される C A R を発現するが、但し、前記 C A R が、前記 C A R - E C 上の前記 C A R - I D を補完する、項目 1 6 4 に記載の方法。

[項目 1 6 6]

C A R - E C 上で発現された C A R を、項目 2 1 ~ 6 8 の前記 C A R - E C スイッチのうちのいずれか 1 つから選択される C A R - E C スイッチと接触させることとを含み、前記 C A R - E C スイッチ上の前記標的化部分が、前記標的細胞上のその標的と、前記 C A R - E C 上の前記 C A R の前記細胞外ドメインとの両方に結合する際に、前記 C A R - E C が活性化され、前記 C A R が、前記 C A R - E C スイッチ上の前記 C A R - I D に結合する、C A R - E C を活性化させる方法。

[項目 1 6 7]

前記 C A R - E C が、T 細胞である、項目 1 5 5 ~ 1 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 6 8]

前記対象が、癌である疾患または状態のために治療される、項目 1 1 1 ~ 1 1 6、1 2 0 ~ 1 2 3、および 1 2 7 ~ 1 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 6 9]

前記標的化部分が、標的細胞上の細胞表面分子に結合する、項目 1 1 1 ~ 1 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 7 0]

それぞれの標的化部分が、標的細胞上の細胞表面分子に結合する、項目 1 5 5 ~ 1 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 7 1]

前記標的細胞が、癌細胞である、項目 1 6 1 ~ 1 7 0 のいずれか一項に記載の方法。[項

10

20

30

40

50

目 1 7 2]

前記癌細胞が、C D 1 9 陽性細胞、C D 1 9 陽性 B リンパ球、H e r 2 陽性細胞、H e r 2 陽性乳癌細胞、H e r 2 陽性膵臓癌細胞、B C M A 陽性細胞、B C M A 陽性多発性骨髄腫細胞、C S 1 陽性細胞、C S 1 陽性多発性骨髄腫細胞、E G F R v I I I 陽性細胞、E G F R v I I I 陽性神経膠芽細胞腫細胞、C D 2 0 陽性細胞、C D 2 2 陽性細胞、C D 3 3 陽性細胞、C D 3 3 陽性急性骨髄性白血病細胞、C D 1 2 3 陽性細胞、C D 1 2 3 陽性急性骨髄性白血病細胞、C D 1 2 3 陽性細胞、C D 1 2 3 陽性急性リンパ性白血病細胞、C L L 1 陽性細胞、C L L 1 陽性急性骨髄性白血病細胞、ならびに (i) C D 3 3 陽性、(i i) C D 1 2 3 陽性、(i i i) C L L 1 陽性、または (i v) (i)、(i i) および (i i i) のうちの 2 つ以上の組み合わせである、急性骨髄性白血病細胞、から選択される、項目 1 7 1 に記載の方法。

10

[項目 1 7 3]

前記方法が、対象に、前記 C A R - E C および前記 C A R - E C スイッチを投与することを含む、項目 1 1 1 ~ 1 3 7 および 1 6 1 ~ 1 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 7 4]

C D 2 0 に指向された C A R を発現する第 1 の C A R - E C で以前に治療された対象の再発癌を治療する方法であって、前記対象が、前記再発前の C D 2 0 の発現と比較して、前記再発後の前記癌細胞上の C D 2 0 の発現の減少のため、再発癌を有し、前記方法が、前記対象に、項目 1 ~ 4 8 の前記 C A R - E C スイッチのうちのいずれか 1 つから選択される C A R - E C スイッチと、前記 C A R - E C スイッチを補完する C A R を発現する第 2 の C A R - E C と、を投与することを含む、方法。

20

[項目 1 7 5]

前記 C A R が、項目 4 9 ~ 8 2 の前記 C A R のうちのいずれか 1 つから選択される、項目 1 7 4 に記載の方法。

[項目 1 7 6]

前記癌が、急性リンパ性白血病または慢性リンパ性白血病である、項目 1 5 5 ~ 1 5 8 および 1 7 4 ~ 1 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 7 7]

項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 のいずれか一項の前記 C A R のうちのいずれか 1 つを発現する C A R - E C、および標的化部分を含む第 1 の相補的 C A R - E C スイッチ、および C A R - I D を用いて、治療を必要とする対象を治療する方法であって、前記標的化部分が、標的細胞上の細胞表面分子に結合する、方法。

30

[項目 1 7 8]

再発癌を治療する方法であって、対象に、

a . 項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 のいずれか一項の前記 C A R のうちのいずれか 1 つを発現する第 1 の C A R - E C と、

b . 前記第 1 の C A R - I D が、前記第 1 の C A R を補完する、第 1 の C A R - I D および標的化部分を含む第 1 の C A R - E C スイッチと、

c . 前記第 2 の C A R - I D が、前記第 1 の C A R を補完する、第 2 の C A R - I D および標的化部分を含む第 2 の C A R - E C スイッチと、を投与することを含み、

40

前記第 1 の C A R - E C スイッチが、前記対象の再発前に投与され、かつ前記第 2 の C A R - E C スイッチが、前記対象の前記再発後に投与される、方法。

[項目 1 7 9]

前記第 1 の C A R - E C スイッチが、抗 C D 2 0 標的化部分を含む、項目 1 7 8 に記載の方法。

[項目 1 8 0]

前記第 2 の C A R - E C スイッチが、抗 C D 1 9 標的化部分を含む、項目 1 7 8 または 1 7 9 に記載の方法。

[項目 1 8 1]

前記第 1 の C A R - E C スイッチが、抗 C D 1 9 標的化部分を含む、項目 7 8 に記載の

50

方法。

[項目 1 8 2]

前記第 2 の C A R - E C スイッチが、抗 C D 2 0 標的化部分を含む、項目 1 7 8 または 1 8 1 に記載の方法。

[項目 1 8 3]

前記第 1 の細胞表面分子が、

- a . 前記再発前と比較して、前記再発後により低いレベルで発現されるか、または
- b . 再発後に発現されない、項目 1 5 9 に記載の方法。

[項目 1 8 4]

標的細胞を溶解する方法であって、前記標的細胞を、標的化部分および C A R - I D を含む第 1 の C A R - E C スイッチと接触させることと、前記第 1 の C A R - E C スイッチを、相補的 C A R - E C と接触させることとを含み、前記 C A R - E C が、項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 のうちのいずれか一項の前記 C A R のうちのいずれか 1 つから選択される C A R を発現する、方法。

10

[項目 1 8 5]

標的細胞を死滅させる方法であって、前記標的細胞を、標的化部分および C A R - I D を含む C A R - E C スイッチと接触させることと、前記第 1 の C A R - E C スイッチを、相補的 C A R - E C と接触させることと、を含み、前記 C A R - E C が、項目 1 ~ 2 0 および 6 9 ~ 1 0 2 のいずれか一項の前記 C A R のうちのいずれか 1 つから選択される C A R を発現する、方法。

20

[項目 1 8 6]

前記 C A R - E C が、T 細胞である、項目 1 7 7 ~ 1 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 8 7]

前記 C A R - E C スイッチが、項目 2 1 ~ 6 8 および 1 3 8 ~ 1 4 0 のいずれか一項の前記 C A R - E C スイッチのうちのいずれか 1 つから選択される、項目 1 7 7 ~ 1 8 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 8 8]

前記標的細胞が、癌細胞である、項目 1 7 7 ~ 1 8 7 のいずれか一項に記載の方法。[項目 1 8 9]

前記癌細胞が、C D 1 9 陽性細胞、C D 1 9 陽性 B リンパ球、H e r 2 陽性細胞、H e r 2 陽性乳癌細胞、H e r 2 陽性膀胱癌細胞、B C M A 陽性細胞、B C M A 陽性多発性骨髄腫細胞、C S 1 陽性細胞、C S 1 陽性多発性骨髄腫細胞、E G F R v I I I 陽性細胞、E G F R v I I I 陽性神経膠芽細胞腫細胞、C D 2 0 陽性細胞、C D 2 2 陽性細胞、C D 3 3 陽性細胞、C D 3 3 陽性急性骨髄性白血病細胞、C D 1 2 3 陽性細胞、C D 1 2 3 陽性急性骨髄性白血病細胞、C D 1 2 3 陽性細胞、C D 1 2 3 陽性急性リンパ性白血病細胞、C L L 1 陽性細胞、C L L 1 陽性急性骨髄性白血病細胞、ならびに (i) C D 3 3 陽性、(i i) C D 1 2 3 陽性、(i i i) C L L 1 陽性、または (i v) (i)、(i i) および (i i i) のうちの 2 つ以上の組み合わせである急性骨髄性白血病細胞、から選択される、項目 1 8 8 に記載の方法。

30

[項目 1 9 0]

対象への C A R - E C スイッチ投与の投薬レジメンを調節することによって、T 細胞応答の度合を制御する方法。

40

[項目 1 9 1]

第 1 の投薬レジメンが、第 1 の短期投薬スケジュール上で、第 1 の高投薬量で C A R - E C スイッチを投与することを含み、第 2 の投薬レジメンが、前記第 1 の投薬スケジュールより長い第 2 の投薬スケジュール上で、第 2 の低投薬量で C A R - E C スイッチを投与することを含む、項目 1 9 0 に記載の方法。

[項目 1 9 2]

前記第 1 の投薬スケジュールが、前記 C A R - E C スイッチを少なくとも 1 日おきに 1 回投与することを含む、項目 1 9 1 に記載の方法。

50

[項目 1 9 3]

前記第 1 の投薬スケジュールが、前記 C A R - E C スイッチを 1 日おきに投与することを含む、項目 1 9 1 に記載の方法。

[項目 1 9 4]

前記第 1 の投薬スケジュールが、前記第 1 の高投薬量の前記 C A R - E C スイッチを 1 日おきに合計 4 回の投与で投与することを含む、項目 1 9 1 ~ 1 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 9 5]

前記第 1 の投薬スケジュールが、前記第 1 の高投薬量の前記 C A R - E C スイッチを、1 日おきにまたは約 1 日おきに合計 4 回の投与または合計約 4 回の投与で、投与することを含む、項目 1 9 1 ~ 1 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

[項目 1 9 6]

前記第 2 の投薬スケジュールが、前記第 2 の低投薬量を 1 日おきに合計 1 2 回の投与で投与することを含む、項目 1 9 1 ~ 1 9 5 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 9 7]

前記第 2 の投薬スケジュールが、前記第 2 の低投薬量を、1 日おきにまたは約 1 日おきに合計 1 2 回の投与または合計約 1 2 回の投与で、投与することを含む、項目 1 9 1 ~ 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 1 9 8]

前記高投薬量が、低投薬量の少なくとも 5 倍、1 0 倍、または少なくとも 1 5 倍である、項目 1 9 1 ~ 1 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

[項目 1 9 9]

前記第 1 の投薬レジメンが、前記高投薬量で投与された対象での T 細胞拡大において、前記低投薬量で投与された対象での前記 T 細胞拡大と比較した際に、増加をもたらす、項目 1 9 0 ~ 1 9 8 のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】**【 0 0 4 5 】**

【図 1 A】 本開示の C A R - E C スイッチとして使用され得る様々な例示的な h u F M C F a b の重鎖配列の整列を示す。

【図 1 B】 同上。

30

【図 2 A】 本開示の C A R - E C スイッチとして使用され得る様々な例示的な h u F M C F a b の軽鎖配列の整列を示す。

【図 2 B】 同上。

【図 3】 S D S P A G E ゲルを示し、L C N T スイッチ形式で発現される h u F M C C A R - E C スイッチを描写している。ゲルの左側は、減少されていない。ゲルの右側は、D T T で減少されている。

【図 4】 S D S P A G E ゲルを示し、L C N T スイッチ形式で発現される h u F M C C A R - E C スイッチを描写している。ゲルの左側は、減少されていない。ゲルの右側は、D T T で減少されている。

【図 5】 C D 1 9 + R S 4、1 1 細胞上の h u F M C 6 3 F a b のフローサイトメトリー系結合アッセイを示す。n M (ナノモル) で列挙される E C 5 0。

40

【図 6】 C D 1 9 + R S 4、1 1 細胞上の h u F M C 6 3 F a b s のフローサイトメトリー系結合アッセイを示す。n M (ナノモル) で列挙される E C 5 0。

【図 7】 C D 1 9 + R S 4、1 1 細胞上の h u F M C 6 3 F a b のフローサイトメトリー系結合アッセイを示す。F M C 6 3 W T は、キメラ F M C 6 3 F a b (E C 5 0 表で L C、H C として注釈される) を表す。n M (ナノモル) で列挙される E C 5 0。

【図 8】 C D 1 9 + R S 4、1 1 細胞上の h u F M C 6 3 F a b のフローサイトメトリー系結合アッセイを示す。F M C 6 3 w t は、キメラ F M C 6 3 F a b (E C 5 0 表で L C、H C として注釈される) を表す。n M (ナノモル) で列挙される E C 5 0。

【図 9】 C D 1 9 + R S 4、1 1 細胞上の h u F M C 6 3 F a b のフローサイトメトリー

50

一系結合アッセイを示す。F M C 6 3 w t は、キメラ F M C 6 3 F a b (E C 5 0 表で L C、H C として注釈される)を表す。n M (ナノモル)で列挙される E C 5 0。

【図 1 0】C D 1 9 + R S 4、1 1 細胞に対して、スイッチ可能な C A R - T (s C A R - T) 細胞を有する h u F M C 6 3 の系スイッチ細胞毒性を示す。この実験のための E C 5 0 値は、この実験の 3 回の反復に沿って表 8 に列挙される。8 0 % の C A R + は、このアッセイで使用される T 細胞集団の 8 0 % が、スイッチ可能な C A R に対して正であったことを示す。F M C 6 3 L C N T は、軽鎖の G C N 4 ペプチド N 末端を有するキメラ F M C 6 3 F a b を表す。

【図 1 1】C D 1 9 - K 5 6 2 細胞に対して、スイッチ可能な C A R - T 細胞を有する h u F M C 6 3 系スイッチの細胞毒性を示す。非 E C 5 0 値は、見出された低レベルの細胞毒性のため、K 5 6 2 上の細胞毒性から計算された。8 0 % の C A R + は、このアッセイで使用される T 細胞集団の 8 0 % が、スイッチ可能な C A R に対して正であったことを示す。F M C 6 3 L C N T は、軽鎖の N 末端上の G C N 4 ペプチドを有するキメラ F M C 6 3 F a b を表す。

10

【図 1 2】インシリコ分析によって抗体の免疫原性を予測するために使用される多項式回帰を示す。T - 細胞依存性 H A H A 応答を予測するために使用される多項式回帰を成す 2 2 個のライセンス化された抗体。

【図 1 3】総合免疫原性潜在性 h F M C 2 b - L C N T (L C 1 として標識される) / h F M C H 4 c (H C として標識される) 配列を用いた、E p i M a t r i x タンパク質免疫原性スケールを示す。

20

【図 1 4】本明細書で開示されるスイッチ可能なキメラ受容体 T 細胞療法の概観を示す。リンパ球は、対象から分離され、キメラ受容体をコードする発現ベクターはその後、リンパ球に導入され、キメラ受容体エフェクター細胞を産生する。キメラ受容体エフェクター細胞は、スイッチと共に対象に投与される。

【図 1 5】長位 (左) から中位 (中央)、短位 (右) までの様々な長さの免疫シナプス、左から右に増加する活性によって、スイッチ可能な C A R - T 細胞のためのスイッチ最適化を例示する。

【図 1 6】中位 (左) から短位 (中央)、非常に短位 (右) までの様々な長さの免疫、中位シナプスまたは非常に短位のシナプスと共に生成されるスイッチ活性に対して、短位シナプスを有するスイッチ活性最適によって、スイッチ可能な C A R - T 細胞のためのスイッチ最適化を例示する。

30

【図 1 7 A】C A R ヒンジおよび C A R スイッチ最適化を例示する。図 1 7 A は、スイッチ可能な C A R - T 細胞の例、ならびに一価のスイッチおよび一価の C A R からの一価の免疫シナプスの形成を示す。図 1 7 B は、スイッチ可能な C A R - T 細胞の例、ならびに二価のスイッチおよび一価の C A R から二価の免疫シナプスの形成を示す。図 1 7 C は、スイッチ可能な C A R - T 細胞の例、ならびに一価のスイッチおよび二価の C A R から二価の免疫シナプスの形成を示す。図 1 7 D は、スイッチ可能な C A R - T 細胞の例、ならびに二価のスイッチおよび二価の C A R から二価の免疫シナプスの形成を示す。スイッチ可能な C A R - T 細胞の相対的な活性は、以下図 1 7 A ~ D のそれぞれに (+) サインによって示される。

40

【図 1 7 B】同上。

【図 1 7 C】同上。

【図 1 7 D】同上。

【図 1 8】D D D モジュールがキメラ受容体細胞外ドメイン上にあり、A D - モジュールが、スイッチ上にある、ドックおよびロックスイッチ可能なキメラ受容体 T 細胞プラットフォームの例を例証する。

【図 1 9】例 6 と共に参照のための G C N 4 ペプチド誘導体の残基番号付けを示す。標的化のために使用された元のペプチドは、アラニンスクニングの結果によって色付けされて、下部に示される。赤は、アラニン変異 (抗 G C N 4 s c F v 5 2 S R 4 への結合の完全な欠如) に不耐性である残基を示し、橙は、アラニン変異 (抗 G C N 4 s c F v 5

50

2 S R 4 への結合の幾分かの欠如であるが、なお幾分かのレベルの結合)に幾分か耐性のある残基を示し、緑は、アラニン変異(元のペプチド配列と比較して抗 G C N 4 s c F v 5 2 S R 4 への結合の欠如がない)に完全に耐性のある残基を示す。配列への潜在性修飾を、上部に列挙する。残基 1 ~ 4 は、天然の G C N 4 配列の部分であり、以前に報告された 5 2 S R 4 抗体の発達に含まれる。黄色は、C A R - E C の標的として以前に探索されていない、新規の残基を示す。青は、延長された残基およびアラニンスキャニングの両方に基づく好ましい残基の付加または修飾を示す。この模式図は、修飾されたペプチド A ~ O を設計するために使用された。

【図 2 0】G C N 4 ペプチド誘導体 C A R - I D を含む C A R - E C スイッチの、スイッチ可能な C A R - T 細胞 (5 2 S R 4 およびヒト化されたバリエーション C A R) への結合を示す。

10

【図 2 1】C D 1 9 + R S 4、1 1 細胞に対して、スイッチ可能な C A R - T 細胞 (5 2 S R 4 s C A R) と共に、G C N 4 ペプチド誘導体 C A R - I D s を含む F M C 6 3 系 C A R - E C スイッチを使用した、L D H 細胞毒性アッセイを示す。

【図 2 2 A】抗 C D 1 9 スイッチのヒト化を示す。図 2 2 A は、R S 4、1 1 細胞に対してヒト化されたスイッチバリエーションを有する細胞毒性の E C ₅₀ を示す。N = 4、一方向 A N O V A によって測定された有意性。図 2 2 B は、サイトカイン産生、結合親和性、および細胞毒性の E C ₅₀ の間の相関性を示す。図 2 2 C は、N A L M - 6 異種移植片モデルを示す。腫瘍量は、N S G マウス i v に、 0.5×10^6 の N A L M - 6 細胞を注射することによって確立された。6 日後、 20×10^6 の s C A R - T 細胞を注射し、続いて 8 用量のヒト化されたスイッチが、1 日おきに 1 4 日の期間にわたって (実験 1 : 0.5 mg / kg 、実線、実験 2 : 0.05 mg / kg 、破線) 投与された。N = 3。図 2 2 D は、熱安定性 (N = 4)、分析サイズ排除クロマトグラフィー (S E C)、およびマウススイッチおよびヒト化されたスイッチ候補 L 2 b / H 4 c の精製収率 (N = 8 ~ 1 2) を示す。

20

【図 2 2 B】同上。

【図 2 2 C】同上。

【図 2 2 D】同上。

【図 2 3】ヒト化されたフレームワーク領域およびマウス F M C 6 3 配列を有する、ヒト化された候補 L 2 b / H 4 c の重鎖および軽鎖の配列整理を示す。

30

【図 2 4 A】C A R - T 細胞コンストラクトおよび配列を示す。図 2 4 A は、C A R - T 細胞コンストラクトの概略図を示す。図 2 4 B は、例示的な C A R - T 配列を示す。図 2 4 C は、C A R - T 細胞コンストラクトの様々な構成成分の配列番号を示す。

【図 2 4 B】同上。

【図 2 4 C】同上。

【図 2 5 A】異なる共刺激分子の比較を示す。図 2 5 A は、標識された G C N 4 ペプチドに結合するフローサイトメトリーによる、一次ヒト T 細胞上の C A R の発現を示す。図 2 5 B は、R S 4、1 1 に対して抗 C D 1 9 スイッチを有する細胞毒性の E C ₅₀ を示す。C A R + クローン濃縮するために選別され、かつ細胞毒性前 8 ~ 1 2 日に延長されたコンストラクト。N = 5 ~ 6。図 2 5 C および図 2 5 D は、コンストラクトヒンジ、膜貫通ドメイン、および共刺激ドメイン (3 回の依存性ドナーにわたって N = 6) による E C ₅₀ の表および散布図を示す。図 2 5 D の有意性は、対の T 試験によるものである。図 2 5 E は、N A L M - 6 異種移植片モデルを示す。腫瘍量は、N S G マウス i v に、 0.5×10^6 の N A L M - 6 細胞を注射することによって確立される。6 日後、 20×10^6 の s C A R - T または C A R T 1 9 細胞を注射し、続いて 8 用量のスイッチ (0.5 mg / kg) を 1 日おきに投与した。図 2 5 F は、N A L M - 6 モデル内でのスイッチの第 1 の用量の 2 4 時間後に、マウス血清から測定されるサイトカイン、一方向 A N O V A による有意性を示す。図 2 5 G、N A L M - 6 モデル内でのスイッチの最後の用量の 2 4 時間後の s C A R - T 細胞の拡大を示す。一方向 A N O V A による有意性。図 2 5 E、図 2 5 F、および図 2 5 G は、3 回の依存性ドナーからの累積的なデータを示す。

40

50

【図 2 5 B】同上。

【図 2 5 C】同上。

【図 2 5 D】同上。

【図 2 5 E】同上。

【図 2 5 F】同上。

【図 2 5 G】同上。

【図 2 6】図 2 5 D に示される N A L M - 6 モデルからの C D 2 8 ヒンジ系 s C A R - T 細胞のインビボでの有効性を示す。

【図 2 7 A】最良のヒト化されたスイッチ可能な C A R コンストラクトの選択を示す。図 2 7 A は、マウス、生殖系列、およびヒト化された軽鎖および重鎖配列の整列を示す。青い四角形は、軽鎖および重鎖に対する変異 V 1 2 S、L 1 0 9 D、E 6 Q、および A 8 7 および C D R 1、2、および 3 を指す。図 2 7 B は、ヒト化された C A R バリエーションと比較した、インビボでのアッセイでの複数回にわたる長期 (> 5 0 日) 抗腫瘍有効性を示す。赤線は、5 0 日目 < 1 0⁴ の放射輝度を有する少なくとも 1 匹のマウスと共にヒト化されたバリエーションを示す。図 2 7 C の上部ボックスは、軽鎖および重鎖ヒト化されたバリエーションの概略図を示す。図 2 7 下部は、F I G S 2 7 D および 2 7 E 上にプロットされた A ~ G に対応する、ヒト化された C A R のグループ割り当てを示す。図 2 7 D は、C D 1 9 + R S 4 1 1 細胞株内のマウスおよびヒト化された C A R バリエーションの 4 1 B B、C D 2 8 および 3 第目の 2 8 B B 共刺激ドメインにわたる、インビボの用量応答細胞毒性比較を示す。図 2 7 E は、4 1 B B、C D 2 8、およびマウスの 3 代目 2 8 B B 共刺激ドメイン、ならびに C D 1 9 + N a l m 6 異種移植片モデル内のヒト化された C A R バリエーションにわたる、インビボの抗腫瘍有効性比較を示す。

【図 2 7 B】同上。

【図 2 7 C】同上。

【図 2 7 D】同上。

【図 2 7 E】同上。

【図 2 8】マウス (5 2 S R 4) および重鎖可変領域の潜在性ヒト化された配列の整列を示す。

【図 2 9】マウス (5 2 S R 4) および軽鎖可変領域の潜在性ヒト化された配列の整列を示す。

【図 3 0】G C N 4 ペプチド (紺) で複合化された抗 G C N 4 s c F v バリエーション (C 1 1 L 3 4、緑：重鎖、水色：軽鎖) の結晶構造のモデルを示す。ヒト化された残基は、赤で標識される。

【図 3 1】ヒト化されたマウスのスイッチ可能な C A R の実験の結果を示す。上部の 3 つの左のグラフは、4 1 B B、C D 2 8、およびマウスの 3 代目 2 8 B B 共刺激ドメイン、ならびにインビボの有効性異種移植片モデルからのヒト化された C A R バリエーションにわたる C A R - T 細胞拡大の比較を示す。2 1 日目、N a l m 6 注射後、血を収集し、C A R - T のために染色し、フローサイトメトリーによって分析した。上部右のグラフは、インビボアッセイの抗腫瘍有効性の正規化された C A R - T 細胞数を示す。値を、L 5 H 4 コンストラクトに正規化した。有意性は、一方向 A n o v a によるものである。下部パネルは、ランク付けされた、ヒト化された C A R コンストラクトを示す。腫瘍量、頻度、および再発の時間、ならびにインビボモデルからの T 細胞拡大値を、それぞれのコンストラクトに対してランク付けし、適宜平均化した。

【図 3 2】インビボのサイトカイン産生比較を示す。有効性異種移植片モデルからのマウス血清を、C A R - T、およびスイッチ注射、およびサイトカインの定量化の 2 4 時間に収集した。グラフは、L 5 H 4 C A R - T 群に正規化された値を示す。一方向 A n o v a による有意性。

【図 3 3】ヒト化された C A R コンストラクトのインビボの特徴付けを示す。上部パネル：4 1 B B、C D 2 8、および三代目 2 8 B B ヒト化されたコンストラクトにわたる T 細胞拡大比較。下部パネル：経時的な 4 1 B B、C D 2 8、および三代目 2 8 B B ヒト化

10

20

30

40

50

されたCARコンストラクトの形質導入効率。

【図34】経時的なヒト化されたCARコンストラクトのインビトロの細胞毒性を示す。左、中央、および右のカラムは各々、41BB、CD28、および三代目28BB CARコンストラクトを表す。列は、各々上部から下部へ、T細胞形質導入の19、26、および33日後の用量応答細胞毒性を示す。

【図35】経時的なヒト化されたCARコンストラクトのインビトロの細胞毒性を示す。上部列は、T細胞形質導入後の経時的な細胞毒性アッセイからのEC₅₀値を示す。下部列は、T細胞形質導入後の経時的なそれぞれのコンストラクトの最大死滅を示す。

【図36】ヒト化されたスイッチおよびヒト化されたCARの組み合わせを使用した、NALM-6異種移植片モデルを示す。腫瘍量を、NSGマウスivに、 0.5×10^6 のNALM-6細胞を注射することによって確立した。6日後、 5×10^6 のsCAR-TまたはCART19細胞を注射し、続いて8用量のヒト化されたL2b/H4cスイッチを、1日おきに14日の期間投与した(0.5 mg/kg)。N = 6。

【図37A】不均一なRaji CD19+/CD19-異種移植片モデルを示す。腫瘍量を、NSGマウスに、Raji CD19+およびRaji CD19-細胞(1匹のマウス毎に合計 0.5×10^6 の細胞)の混合物を注射することによって確立した。3日後、 10×10^6 のsCAR-TまたはCART19細胞、続いて8用量の抗CD19スイッチ(0.5 mg/kg)を14日の期間にわたってを注射した。8用量の抗CD20スイッチ(0.5 mg/kg)を、平均ROIが 10^5 を超えた際に(CD19-Raji細胞の再発を示す)、投与した。図37Aは、1:1比のCD19+:CD19-Raji細胞を注射し、かつ同時に抗CD19および抗CD20スイッチで治療されたマウスにおける腫瘍の進行を示す。追加の8用量の抗CD20スイッチを、64~78日目の間に1日おきに投与した。N = 3。図37Bは、4:1比のCD19+:CD19-Raji細胞を注射したマウスにおける腫瘍進行を示す。マウスを、8用量の抗CD20スイッチで、1日おきに10~24日目に治療し、追加の8用量の抗CD20スイッチを64~78日目の間に投与した。N = 3。図37Cは、49:1比のCD19+:CD19-Raji細胞を注射したマウスにおける腫瘍進行を示す。マウスを、8用量の抗CD20スイッチで、1日おきに18~32日目に治療した。N = 3~6。

【図37B】同上。

【図37C】同上。

【図38】IgG4短ヒンジ、マウスCD8ヒンジ、またはマウスCD28ヒンジを利用して、異なるヒンジの長さでコンストラクトされたマウスsCARの様々なコンストラクトを描写している概略図を示す。

【図39A】同一遺伝子系を示す。図39Aは、IgG4(SV-319-092)と、mCD8(SV-319-089)ヒンジとの間の、免疫応答性マウス:CAR有効性比較における、sCAR-T細胞による腫瘍増殖の制御を示す。図39Bおよび39Cは、2つの非依存性実験におけるフローサイトメトリーによる表現型を通した、末梢血(絶対数)での細胞動力学を示す。図39Bは、CD45⁺対4-1BB(SV-319-091)/28BB(SV-319-092)sCAR-T細胞を示し、図39Cは、B細胞対28BB SV-319-092 sCAR-T細胞を示す。腫瘍量を、0日目に、C3H免疫応答性マウスに、 1×10^6 の38C13腫瘍細胞を皮下注射することにより確立した。7日後、マウスを、 100 mg/kg のシクロホスファミド(CTX)を用いて腹腔内でプレコンディショニングする(腫瘍は測定可能であり、マウスはランダム化される)。24時間後、 10×10^6 のsCAR-T細胞を静脈内注射し、続いて8用量のスイッチの静脈内への、1日おき、14日の期間にわたる 1 mg/kg の投与を、sCAR-T細胞注射の4時間後に始める。2週間の安静期間後、スイッチ投薬を、36日目および64日目で、1日おきの 1 mg/kg で、別の8用量のために再開した。末梢血からの免疫細胞を、腫瘍移植(N = 5/6)後15、25、35、53、63、81および99日目に分析した。図39Dおよび39Eは、sCAR-T細胞拡大(図39D)および表現型(図39E)上での、異なるスイッチ投薬レジメンの影響を示す。未処理のC3H免疫

応答性マウスを、 100 mg/kg シクロホスファミド (CTX) で腹腔内でプレコンディショニングし (1日目)、24時間後、 10×10^6 のSV-319-092 sCAR-T細胞で静脈内注射し、続いて4、8または12用量のスイッチを、1日おきに6、14または22日の期間にわたって、0.2、1、または 5 mg/kg で静脈内投与し、sCAR-T細胞注射の4時間後に始めた。sCAR-T細胞拡大および表現型を、フローサイトメトリー (N = 5) によるsCAR-T注射後、7、25、35、および53日目に経時的に、末梢血内で監視した。

【図39B】同上。

【図39C】同上。

【図39D】同上。

【図39E】同上。

【発明を実施するための形態】

【0046】

定義：

別様に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術および化学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により通常理解されるものと同様の意味を有する。本明細書で記載されるものと同様または同等のいかなる方法および材料も、本発明の実施または試験で使用され得るにも関わらず、いくつかの潜在的かつ好ましい方法および材料が現在記載されている。本明細書で記述される全ての公開は、開示への参照により本明細書に組込まれ、公開が引用されるものと関連する方法および/または材料を記載する。本開示は、矛盾がある程度まで、組込まれる公開のあらゆる開示に取って代わる (かつ特に、本出願に具体的に記載されるあらゆる用語の定義は、参照により組込まれる公開に開示されるその用語のあらゆる相克的な定義に取って代わる)。

【0047】

本開示を読むにあたり当業者には明らかであるように、本明細書で記載され、例証される個々の実施形態のそれぞれは、他のいくつかの実施形態のいずれかの特徴から容易に分離され、かつそれと組み合わせられる、別々の構成要素および特徴を有する。あらゆる列挙される方法も、列挙される事象のために、あるいはあらゆる他の論理的に可能なもののために実行され得る。

【0048】

本明細書かつ添付の特許請求の範囲で使用される、単数系、「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかに別様に示さない限り、複数の参照対象を含むことに注意されなければならない。したがって、例えば、「細胞」に対する言及は、かかる細胞の複数を含み、かつ「ペプチド」への言及は1つ以上のペプチドおよびその同等物、例えば、当業者に知られるポリペプチドへの言及を含み、以下同様である。

【0049】

本明細書で考察される公開は、本出願の出願日の前に、単にそれらの開示のために提供される。本明細書のいかなるものも、本開発が、先行発明のためにかかる公開に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されない。さらに、提供される公開日は、独立して確認される必要があり得る、実際の公開日とは異なり得る。

【0050】

本明細書で使用される、「抗体断片」および「免疫グロブリン断片」という用語は、全長形態以外の抗体の任意の形態を指すために交換可能に使用される。本明細書の抗体断片は、全長抗体内に存在する、より小さい構成成分である抗体、および操作されている抗体を含む。抗体断片は、Fv、Fc、Fab、および (Fab')₂、一本鎖Fv (scFv)、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、二官能性ハイブリッド抗体、CDR1、CDR2、CDR3、CDRの組み合わせ、可変領域、フレームワーク領域、定常領域、重鎖、軽鎖、代替スキュフォールド非抗体分子、および二重特異性抗体を含むが、これらに限定されない。別様に具体的に記載されない限り、「抗体 (抗体)」または「抗体 (抗体)」という用語を使用する記述および特許請求の範囲は、具体的に「抗体断片

10

20

30

40

50

(抗体 fragment)」および「抗体断片(抗体 fragments)」を含む。抗体または免疫グロブリンを参照して使用される、「抗原結合断片」という用語は、標的(例えば、標的タンパク質、ペプチド、小分子、腫瘍抗原など)への結合親和性を保有するあらゆる抗体断片を意味する。抗体「断片」および抗体「部分」はまた、「抗原結合断片」および「抗原結合部分」という用語として、本明細書で交換可能に使用される。

【0051】

「抗CD19抗体」という用語は、CD19に結合する抗体を指す。「CD分類(Cluster of Differentiation)19」としても知られるCD19は、B細胞の表面上で発現されるタンパク質として当該技術分野では周知である。

【0052】

「キメラ受容体」、「キメラ抗原受容体」、および「CAR」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、好適なエフェクター細胞(例えば、T細胞)上で発現される受容体(本明細書で記載されるCAR-IDに結合することのできるかかる受容体)を指す。

【0053】

「CAR-EC」への参照は、「キメラ抗原受容体エフェクター細胞」を意味し、CAR-ECは、一般に、キメラ受容体(例えば、キメラ抗原受容体など)を発現するエフェクター細胞を指す。しかしながら、いくつかの実施形態では、CAR-ECは単に、キメラ抗原受容体を発現するエフェクター細胞(すなわち、抗体またはその抗原結合断片を発現すること)に限定されないが、用語はまたは、標的(例えば、本明細書で開示されるCAR-ECスイッチ上に含まれる「キメラ抗原受容体相互作用ドメイン」(CAR-ID)に結合することができる他のキメラ受容体を発現するエフェクター細胞を包含し得る。本開示での使用のための好適なエフェクター細胞(例えば、CAR-ECとして)は、未処理のT細胞、メモリー幹細胞T細胞、中央メモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、ヘルパーT細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD8/CD4+T細胞、αβT細胞、γδT細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージから選択されるエフェクター細胞を含む。

【0054】

CARおよびその「相補的」CAR-ECスイッチ(例えば、本明細書で開示される相補的なヒト化された抗CD19CAR-ECスイッチ)への参照、またはCAR-ECスイッチおよびその「相補的CAR」への同様の参照は、特定のCAR-ID、およびその特定のCAR-IDへの結合親和性を含む細胞外ドメインを含むCARを含む、CAR-ECスイッチの一对を意味する。そのため、非限定的な例として、平均的な当業者は、GCN4ペプチドCAR-ID(例えば、配列番号26のアミノ酸配列)を含むCAR-ECスイッチが、そのGCN4ペプチド(例えば、scFvなどの抗GCN4抗体またはその抗原結合部分)への結合親和性を有する抗GCN4細胞外ドメインを含むCARにより、結合されるであろうことを理解するであろう。したがって、かかる抗GCN4 CARおよびGCN4 CAR-IDを含むCAR-ECは、CARが、CAR-ECスイッチに結合するため「相補的」である。同様に、FITC、FLAG、K4、およびE4 CAR-IDを含むスイッチは、各々、FITC、FLAG、K4(例えば、E4ペプチド)、E4(例えば、K4ペプチド)への結合親和性を含むCARに対して相補的である。

【0055】

「エンドトキシンフリー」または「実質的にエンドトキシンフリー」という用語は、一般に、最も微量(例えば、対照への臨床的に生理的悪影響を有さない量)のエンドトキシン、好ましくは検出不可能の量のエンドトキシンを含有する、組成物、溶媒、および/または血管に関する。エンドトキシンは、エンドトキシンがリステリア菌などのグラム陰性バクテリア内に見出されるにも関わらず、バクテリア、典型的にはグラム陰性バクテリアなどのある特定の微生物に関連する毒である。最も流行性のエンドトキシンは、様々なグラム陰性バクテリアの外膜に見出され、かつ疾患を引き起こすこれらのバクテリアの能力の中央病原性特徴を表す、リボ多糖(LPS)またはリボオリゴ糖(LOS)である。人間内の少量のエンドトキシンは、生理的悪影響の中でもとりわけ、熱、血圧の低下、なら

10

20

30

40

50

びに炎症および凝固の活性を生じ得る。

【 0 0 5 6 】

したがって、薬学的生成においては、少量さえ、人間内で悪影響を引き起こすため、たびたび、医薬品および／または医薬容器からほとんどまたは全ての微量のエンドトキシンを除去するのが望ましい。300 °Cを超える温度が典型的にほとんどのエンドトキシンを破壊するために必要されるため、発熱物質除去オープンが、この目的のために使用され得る。例えば、シリンジまたはバイアルなどの一次パッケージング物質に基づいて、250 °Cのガラス温度および30分の保持期間の組み合わせは、たびたび、エンドトキシンレベルの3ログ減少を達成するために十分である。例えば、本明細書に記載され、当該技術分野で知られているクロマトグラフィーおよび濾過方法を含む、エンドトキシンを除去する他の方法が企図される。哺乳動物細胞などの真核生物細胞内にCAR-ECスイッチを生成するか、または

減少させるために真核生物細胞からエンドトキシンを分離するもまた含まれ、もし排除されない場合、エンドトキシンのリスクは本発明の組成物内に存在するままである。無血清細胞内にCAR-ECスイッチを生成し、無血清細胞からエンドトキシンを単離する方法が好ましい。

【 0 0 5 7 】

エンドトキシンは、当該技術分野で知られているルーティン技術を使用して検出され得る。例えば、カプトガニからの血を利用するリムルスアメーバサイトライセートアッセイは、エンドトキシンの存在を検出するための非常に繊細なアッセイである。この試験では、非常に低レベルのLPSは、この反応を増幅する強力な酵素カスケードのため、リムルスライセートの検出可能な凝固を引き起こし得る。エンドトキシンはまた、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって定量化され得る。実質的にエンドトキシンフリーにするためには、エンドトキシンレベルは、約0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.08、0.09、0.1、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、または10 EU/mg以下のタンパク質であり得る。典型的には、1 ngのリポ多糖(LPS)は、約1~10 EUに対応する。

【 0 0 5 8 】

「FMC63」への参照は、元々1991年にH. Zolaおよび同僚(1)によって記載される抗CD19マウスモノクローナル抗体クローン(Carl Juneおよび同僚(2~4)からの最も良く研究される従来のCAR-T細胞で使用され得る)を意味する。これらの参照(以下「参照」セクションに列挙される、1、2、3、および4)は、参照によりその全体が本明細書に組込まれる。「FMC63」、「FMC」、「huFMC」、「およびhFMC」という用語は、本明細書で交換可能に使用される。

【 0 0 5 9 】

「FMC63 VH」への参照は、FMC63抗体の重鎖の可変部分を意味する。

【 0 0 6 0 】

「FMC63 VL」への参照は、FMC63抗体の軽鎖の可変部分を意味する。

【 0 0 6 1 】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化された」形態は、可変ドメインの非ヒト(例えば、マウス)フレームワーク領域が、ヒトフレームワーク領域配列に変化する、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(例えば、Fv、Fab、(Fab)₂、一本鎖Fv(scFv)または抗体の後の他の抗原結合など)である。いくつかの実施形態では、ヒト化された抗体は、ヒト化され、ヒトへの免疫原性を減少させる。いくつかの実施形態では、ヒト化された抗体は、親非ヒト抗体の特異性および／または親和性を保持する。いくつかの実施形態では、ヒト化された抗体は、親非ヒト抗体の実質的に全ての特異性および／または親和性を保持する。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用される、「またはそのヒト化されたバリエーション」という用語は、バリア

10

20

30

40

50

ントが、基準配列と比較してヒト生殖系列配列への増加する同一性を有するバリエーション配列をもたらす、少なくとも1個のアミノ酸変化（すなわち、置換、血管、または付加）を含む基準配列の任意の配列バリエーションを指す。いくつかの実施形態では、「またはそのヒト化されたバリエーション」は、配列を「よりヒト化」する、すなわち配列を、ヒト基準配列とのより大きい同一性を有するようにする、少なくとも1個のアミノ酸変化を含む配列を指す。例えば、F M C 6 3 V HまたはF M C 6 3 V L配列のヒト化されたバリエーションは、各々配列番号15および25として提供される、マウス親F M C 6 3 V HおよびV L配列と比較して、1つ以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、またはそれ以上）変異を含む配列である。実施形態では、基準抗体配列のヒト化されたバリエーションまたはその部分（例えば、F M C 6 3 V HまたはF M C 6 3 V L配列）は、基準抗体の標的への結合親和性を維持する。例えば、いかなる方法でも限定されないが、ヒト化されたF M C 6 3配列は、C D 1 9への結合を維持し得る。

【0063】

「ヒト化された抗C D 1 9スイッチ」という用語は一般に、(i) C D 1 9に結合することができ、かつ(i i)基準C D 1 9抗体のヒト化されたバリエーションである標的化部分を含む、任意のC A R - E Cスイッチを指す。いくつかの実施形態では、ヒト化された抗C D 1 9スイッチは、基準抗体F M C 6 3のヒト化された形態を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化された抗C D 1 9スイッチは、基準抗体F M C 6 3（例えば、(i)ヒト化されたF M C 6 3 V H、(i i)ヒト化されたF M C 6 3 V L、または(i i i)ヒト化されたF M C 6 3 V Hおよびヒト化されたF M C 6 3 V Lのヒト化された部分を含む。

【0064】

「ヒト化されたスイッチ」という用語は一般に、(i)標的に結合することができ、かつ(i i)基準抗体のヒト化されたバリエーションまたはその抗原結合部分である標的化部分を含む、任意のC A R - E Cスイッチを指す。いくつかの実施形態では、ヒト化されたスイッチは、基準抗体のヒト化された形態を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化されたスイッチは、基準抗体（例えば、(i)ヒト化されたV H、(i i)ヒト化されたV L、または(i i i)ヒト化されたV Hおよびヒト化されたV Lのヒト化された部分を含む。

【0065】

少なくとも、例えば、本明細書で開示されるクエリアミノ酸配列と、95%「同一」であるアミノ酸配列を有する対象のポリペプチド配列により、対象のポリペプチドのアミノ酸配列は、対象のポリペプチド配列が、クエリアミノ酸配列のそれぞれの100個のアミノ酸毎に最大5個のアミノ酸変更を含み得ることを除いて、クエリ配列と同一であることが意図される。言い換えると、クエリアミノ酸配列と、少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有する対象のポリペプチドを得るために、対象配列内の最大5%のアミノ酸残基が、挿入、欠失、または別のアミノ酸と置換され得る。基準配列と比較してこれらの変更は、基準アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間の任意の位置で、基準配列内の残基の間で、または基準配列内の1つ以上の近接群内で、個々に分散して、起こり得る。2つ以上の配列（例えば、アミノ酸配列）の同一性は、Johnson M, et al., (2008) N C B I B L A S T : a b e t t e r w e b i n t e r f a c e . N u c l e i c A c i d s R e s . 3 6 : W 5 - W 9（参照によりその全体が明細書に組込まれる）に記載される、B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o lまたは「B L A S T」アルゴリズムを使用して、互いに、または公開された配列と比較され得る。同様に、同一性は、同様の方法で2つのヌクレオチド配列間で決定され得る。したがって、クエリヌクレオチド配列と少なくとも95%同一である、対象のヌクレオチド配列（例えば、RNAまたはDNA配列、cDNA配列など）を得るために、対象配列内の最大5%のヌクレオチド残基が、挿入、欠失、または別のヌクレオチドと置換され得る。

【0066】

「スイッチ」および「C A R - E Cスイッチ」という用語は、本明細書で交換可能に使

用される。

【 0 0 6 7 】

「 V H 」への参照は、抗体または抗体断片の重鎖の可変部分を意味する。

【 0 0 6 8 】

「 V L 」への参照は、抗体または抗体断片の軽鎖の可変部分を意味する。

【 0 0 6 9 】

ポリペプチドまたは他の標的に（例えば、C D 1 9 に）「特異的に結合する」または「優先的に結合する」（本明細書で交換可能に使用される）と記載される、抗体またはその抗原結合部分への参照は、当該技術分野で良く理解される用語であり、かかる特異的な、または優先的な結合を決定する方法もまた、当該技術分野で周知である。分子は、それが特定の細胞または物質と、大体の細胞または物質より頻繁に、より長い期間および/またはより大きな親和性で、反応、または関連する場合、「特異的結合」または「優先的結合」を呈すると記載される。抗体は、それが他の物質に結合するよりも、より大きな親和性、結合活性で、より容易に、および/またはより長い期間結合する場合、標的に「特異的に結合」するか、または「優先的に結合」する。例えば、それが他の非C D 1 9 ポリペプチドに結合するよりも、より大きな親和性、結合活性で、より容易に、および/またはより長い期間C D 1 9 に特異的にまたは優先的に結合する抗体は、C D 1 9 に結合する抗体である。また、この定義を読むことで、例えば、特異的にまたは優先的に第1の標的（例えば、C D 1 9 ）に結合する抗体（またはその抗原結合部分）が、特異的にまたは優先的に第2の標的に結合しても、していなくてもよいことが理解されたい。このようにして、「特異的結合」または「優先的結合」は、必ずしも排他的結合を必要としない（それが含み得るにも関わらず）。一般に、必要ではないが、結合への参照は、優先的結合を意味する。

【 0 0 7 0 】

「実質的に」または「本質的に」は、ほぼ全体的に、または完全に十分な、または相当な量、数、サイズ、例えば、95%以上のいくつかの所与の数を意味する。

【 0 0 7 1 】

「実質的に同様な」配列は、配列（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド配列）内に、互いに少なくとも約90%の同一性、または互いに少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%もしくは約99%超の同一性を含む配列である。

【 0 0 7 2 】

概要：

両方への制御を提供することで、現在臨床試験で試験されている従来のCAR-T細胞設計より安全で、かつより多用途の免疫療法を提供し得る、キメラ受容体エフェクター細胞（例えば、キメラ抗原受容体T細胞）を選択的に活性化および非活性化させる組成物および方法が、本明細書で開示される。

【 0 0 7 3 】

ヒト化されたスイッチおよびヒト化されたCAR-ECを含む、スイッチ可能なキメラ受容体エフェクター細胞（CAR-EC）およびキメラ受容体エフェクター細胞スイッチ（本明細書で「スイッチ」と称される）が、本明細書で開示される。

【 0 0 7 4 】

本明細書で開示される1つ以上のスイッチ（例えば、ヒト化されたスイッチ）および1つ以上のCAR-EC（例えば、ヒト化されたCAR-ECなどの、本明細書で開示されるCAR-EC）を含むプラットフォームが本明細書で開示され、プラットフォームに含まれるCAR-EC上で発現されるCARは、プラットフォームに含まれるスイッチに相補的である。いくつかの実施形態では、プラットフォームは、複数のスイッチを含み、そのそれぞれが異なる標的に結合し（すなわち、それぞれのスイッチが、異なる標的化部分を有し）、かつそのそれぞれがプラットフォームに含まれる単一のCAR-ECに相補的である。いくつかの実施形態では、プラットフォーム、は複数のスイッチを含み、そのそれぞれが異なるに標的に結合し（すなわち、それぞれのスイッチが異なる標的化部分を有

10

20

30

40

50

し)、かつそのそれぞれが、プラットフォームに含まれる複数のCAR-ECのうちの少なくとも1つに相補的である。

【0075】

本明細書で開示されるスイッチは、エフェクター細胞キメラ受容体によって結合される第1の領域、および標的細胞上の細胞表面分子に結合する第2の領域を含む。第1の領域は、本明細書で、キメラ抗原受容体相互作用ドメイン(CAR-ID)と称される。第2の領域は、本明細書で「標的化部分」と称される。標的化部分は、標的化ポリペプチドであり得る。標的化ポリペプチドは、標的細胞上の抗原に結合する標的化抗体または抗体断片であり得る。標的化抗体またはその抗原結合部分は、ヒト化され得る。本明細書で開示されるヒト化されたスイッチは、ヒト化された標的化部分を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞表面分子は、CD19である。いくつかの実施形態では、細胞表面分子は、Her2、CLL1、CD33、CD123、EGFR、EGFRvIII、CD20、CD22、CS1、BCMA、CEAまたはそれらの断片である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、CD19に結合する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、Her2、CLL1、CD33、CD123、EGFR、EGFRvIII、CD20、CD22、CS1、BCMA、CEAまたはそれらの断片に結合する。いくつかの特定の実施形態では、標的化部分は、CD19に特異的に結合する。いくつかの特定の実施形態では、標的化部分は、Her2、CLL1、CD33、CD123、EGFR、EGFRvIII、CD20、CD22、CS1、BCMA、CEAまたはそれらの断片に特異的に結合する。いくつかの特定の実施形態では、標的化部分は、抗CD19抗体またはその抗原結合部分である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗CD19抗体またはその抗原結合部分(例えば、本明細書で開示されるヒト化された抗CD19抗体またはその抗原結合部分のうちの任意の1つ以上)を含むか、またはそれから成る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化されたFMC63抗体またはその抗原結合部分を含むか、またはそれから成る。

10

20

【0076】

スイッチのキメラ受容体結合は、結合された標的細胞に対して細胞傷害性であるエフェクター細胞からの免疫応答を刺激し得る。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、T細胞である。スイッチは、エフェクター細胞活性を誘引する(または増加させる)「オンスイッチ」として作用し得る。スイッチは、エフェクター細胞活性を遮断する(または減少させる)「オフスイッチ」として作用し得る。エフェクター細胞活性は、スイッチの投与を減少させるか、または終えることで「オフになる」。本明細書で開示されるヒト化されたスイッチは、本明細書で開示されるエフェクター細胞、ならびに標的細胞が悪性細胞である、癌などの疾患または状態の治療のための既存のCAR-T細胞と共に使用される。かかる治療は、本明細書で、例示的な概略図概要が、図14で描写される、スイッチ可能な免疫療法と称される。

30

【0077】

方法、キット、および組成物は、エフェクター細胞を、対象内で標的(例えば、腫瘍などの標的細胞)と一緒にするために使用されるCAR-EC細胞、CAR-ECプラットフォーム、およびヒト化されたCAR-ECスイッチを産生するために提供される。これらの方法、キットおよび組成物は、多くの疾患および状態において療法的使用を見出す。例えば、抗CD19標的化部分と共にCAR-ECスイッチを含む、方法、キット、および組成物は、CD19+細胞が病理学と関連付く任意の疾患を治療するのに使用され得る。例えば、いかなる方法でも限定されないが、いくつかの実施形態では、異種の腫瘍および血球悪性腫瘍(例えば、急性リンパ性白血病および慢性リンパ性白血病)は、本明細書で開示されるCAR-EC細胞、CAR-ECスイッチ、および/またはCAR-ECプラットフォームを用いて効果的に治療され得る。いくつかの非限定的な実施形態では、CAR-EC細胞、CAR-ECプラットフォーム、および/またはヒト化されたCAR-ECスイッチは、例えば、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リ

40

50

ンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）、バーキットリンパ腫、および有毛細胞白血病（HCL）から選択される疾患を治療するために使用され得る。

【0078】

同様に、抗Her2標的化部分と共にCAR-ECスイッチを含む方法、キット、および組成物は、Her2⁺細胞が病理学と関連付く任意の疾患を治療するために使用され得、抗CLL1標的化部分と共にCAR-ECスイッチを含む方法、キット、および組成物は、CLL1⁺細胞が病理学と関連付く任意の疾患を治療するために使用され得、かつ同様に、特定の標的抗原（例えば、腫瘍抗原）に対して特異性を有する任意の標的化部分と共にCAR-ECスイッチを含む方法、キット、および組成物は、標的抗原（例えば、腫瘍抗原）が病理学と関連付く任意の疾患を治療するために使用され得る。

10

【0079】

いくつかの実施形態では、長さ、結合価および/またはCAR-ECスイッチ連結ならびにCAR-ECスイッチ細胞標的化部分の配向は、最適化される。異種の腫瘍は、1つ以上の腫瘍抗原を標的化する複数にスイッチを用いて、より効果的に治療され得る。発明の長所および特徴は、以下により完全に記載される組成物および方法の詳細を読む際には、当業者には明らかになるであろう。

【0080】

本発明の好ましい実施形態は、本明細書で示され、かつ記載されるが、かかる実施形態が例としてのみ提供されることが、当業者には明瞭であろう。多数の変形、変更、および置換が、発明から逸脱することなく現在当業者に想到されるであろう。本明細書で記載される本発明の実施形態への様々な代替が、発明を実施するにあたり用いられることが理解されるはずである。続く特許請求の範囲が、発明の範囲を定義し、かつしたがって、これらの特許請求の範囲およびそれらの同等物内の方法および構造が包含されることが意図される。

20

【0081】

I. CAR-ECスイッチ

(i) エフェクター細胞（例えば、キメラ抗原受容体）上のキメラ受容体により結合可能である第1の領域（CAR-ID）と、(ii) 標的細胞上の細胞表面分子に結合する第2の領域（標的化部分）とを含む、キメラ受容体エフェクター細胞スイッチが、本明細書で開示される

30

【0082】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i) 酵母転写因子GCN4ペプチド誘導体（例えば、配列番号139、154～163から選択されるGCN4ペプチド誘導体）を含む第1の領域（CAR-ID）と、(ii) 標的細胞上の細胞表面分子に結合する第2の領域（標的化部分）とを含む、キメラ受容体エフェクター細胞スイッチを提供する（CAR-IDが、エフェクター細胞（例えば、キメラ抗原受容体）上のキメラ受容体により結合可能である）。

【0083】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i) エフェクター細胞（例えば、キメラ抗原受容体）上のキメラ受容体によって結合可能である第1の領域（CAR-ID）と、(ii) 標的化部分がヒト化される、標的細胞上の細胞表面分子に結合する第2の領域（標的化部分）と、を含むヒト化されたキメラ受容体エフェクター細胞スイッチを提供する。

40

【0084】

いくつかの特定の実施形態では、本開示は、(i) エフェクター細胞（例えば、キメラ抗原受容体）上のキメラ受容体によって結合可能である第1の領域（CAR-ID）と、(ii) 標的化部分がヒト化される、標的細胞上のCD19に結合する第2の領域（標的化部分）と、を含む、ヒト化されたキメラ受容体エフェクター細胞スイッチを提供する。

【0085】

いくつかの特定の実施形態では、本開示は、(i) 酵母転写因子GCN4ペプチド誘導体（例えば、配列番号139、154～163から選択されるGCN4ペプチド誘導体）

50

を含む第1の領域(CAR-ID)と、(ii)標的化部分がヒト化される、標的細胞上のCD19に結合する第2の領域(標的化部分)とを含む、ヒト化されたキメラ受容体エフェクター細胞スイッチを提供する。

【0086】

いくつかの実施形態では、第1および第2の領域は、リンカーによって連結される。

【0087】

いくつかの実施形態では、第1の領域および第2の領域は、一緒に融合される。本明細書で使用される、「融合される」という用語は、CAR-IDの末端を、ポリペプチド標的化部分(例えば、ヒト化された抗CD19抗体またはその抗原結合断片)の末端に隣接することを指し得る。いくつかの実施形態では、第1の領域および第2の領域は、リンカーを介して一緒に融合される。

10

【0088】

いくつかの実施形態では、第1の領域は、第2の領域内に移植される。本明細書で使用される、「移植される」という用語は、CAR-IDを、標的化ポリペプチド内(例えば、標的化ポリペプチドの2つのアミノ酸間)に挿入することを指す。いくつかの実施形態では、第2の領域は、第1の領域内に移植される。いくつかの実施形態では、第1の領域は、第1および第2の領域が、少なくとも1つのリンカーによって連結されるように、第2の領域内に移植される。いくつかの実施形態では、第2の領域は、第1および第2の領域が、少なくとも1つのリンカーによって連結されるように、第1の領域内に移植される。

【0089】

いくつかの実施形態では、第1の領域は、第2の領域に結合される。いくつかの実施形態では、第1の領域は、リンカーを介して第2の領域に結合される。リンカーは、CAR-IDに結合され得る。リンカーは、標的化部分に結合され得る。リンカーは、CAR-IDを、標的化部分に結合し得る。1つ以上のリンカーは、1つ以上のCAR-IDを、1つ以上の標的化部分に結合し得る。1つ以上のリンカーは、1つ以上のCAR-IDを、部位特異的方法で、1つ以上の標的化部分に結合し得る。部位特異的方法での結合は、1つ以上のCAR-IDを、1つ以上の標的化部分上の予め決定された部位結合することを含み得る。代替的に、あるいは加えて、部位特異的方法での結合は、1つ以上のCAR-IDを、1つ以上の標的化部分内の非天然のアミノ酸に結合することを含み得る。1つ以上のリンカーは、1つ以上のCAR-IDを、部位非依存的方法で、1つ以上の標的化部分に結合し得る。部位非依存的方法での結合は、1つ以上のCAR-IDを、1つ以上の標的化部分上のランダムな部位に結合することを含み得る。CAR-IDは、部位特異的方法で、1、2、3、4、5、またはそれ以上の標的化部分に結合され得る。CAR-IDは、部位非依存的方法で、1、2、3、4、5またはそれ以上の標的化部分に結合され得る。代替的に、標的化部分は、部位特異的方法で、1、2、3、4、5またはそれ以上のCAR-IDに結合され得る。部位特異的方法での結合は、1つ以上の標的化部分を、1つ以上のCAR-ID上の予め決定された部位結合することを含み得る。標的化部分は、部位非依存的方法で、1、2、3、4、5またはそれ以上のCAR-IDに結合され得る。部位非依存的方法での結合は、1つ以上の標的化部分を、1つ以上のCAR-ID上のランダムな部位に結合することを含み得る。

20

30

40

【0090】

CAR-ECスイッチは、本明細書で開示される任意のスイッチ配列を有し得る。例えば、それは、軽鎖および重鎖を含み得、軽鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ軽鎖配列を含むか、またはそれから成り、重鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ重鎖配列を含むか、またはそれから成る。かかる重鎖および/または軽鎖配列は、ヒト化され得る。いくつかの実施形態では、CAR-ECスイッチは、ヒト化され、かつ配列番号17~24から選択される軽鎖配列、および配列番号2~14から選択される重鎖配列を含み、重鎖および軽鎖のうちの1つまたは両方は、本明細書で開示されるCAR-ID(例えば、GCN4 CAR-ID)を含む。いくつかの実施形態では、CAR-ECスイッチは、ヒト化され、かつ配列番号17~24から選択される配列と、少なくとも80%

50

10

20

20

20

30

20

20

40

40

40

50

T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 7 1 3、P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 6 8 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 4 5 2 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 7、および P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 0 (それぞれはその全体が参照により本明細書に組込まれる) いくつかの特定の実施形態では、本開示は、その標的化部分またはスイッチが、その標的化部分としてヒト化された F M C 6 3 抗体の抗原結合部分を含むため、スイッチが、本明細書で開示されるヒト化された F M C 6 3 抗体を含むことを除いて、以下の出願のうちのいずれか 1 つに開示される任意の 1 つのスイッチと同一である配列を含むか、またはそれから成る C A R - E C スイッチを提供する。P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 7 1 3、P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 6 8 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 4 5 2 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 7、および P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 0 (それぞれはその全体が参照により本明細書に組込まれる) したがって、いくつかの実施形態では、本開示は、以下の出願のうちのいずれか 1 つに開示される C A R - I D のうちのいずれか 1 つに連結されるか、または融合される、ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合部分を含むスイッチを提供する。P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 7 1 3、P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 6 8 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 4 5 2 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 7、および P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 0 P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 6 8 4 および P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 7 が、C A R - I D を「C A R - B P s」と呼称し、かつあらゆるそのような C A R - B P も、本発明の使用のために C A R - I D として好適であることが当業者には明らかになるであろう。同様に、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 4 5 2 4 が、C A R - I D を「キメラ受容体結合パートナー」と呼称し、かつあらゆるそのようなキメラ受容体結合パートナーが、本発明の使用のために C A R - I D として好適である。P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 0 は、C A R - I D を C A R - I D と呼称し、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 0 に開示されるあらゆるそのような C A R - I D が、本発明の C A R - I D としての使用のために好適である。さらに、本出願は、スイッチ上の C A R - I D に結合することが可能なキメラ受容体と、かかるキメラ受容体を発現するエフェクター細胞とを提供する。したがって、それに合うように、出願 (P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 7 1 3、P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 6 8 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 4 5 2 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 7、および P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 0) のうちのいずれか 1 つに開示されるキメラ受容体 (例えば、C A R) のうちのいずれも、本明細書で開示される C A R - E C スイッチと組み合わせて、本発明に従って使用され得る。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示される C A R - E C スイッチ、ならびに P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 7 1 3、P C T / U S 2 0 1 4 / 0 6 0 6 8 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 4 5 2 4、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 7、および P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 7 9 9 0 のうちのいずれか 1 つに開示される C A R を用いて、かかる治療を必要とする患者を治療する方法を提供する。

【0096】

C A R - E C スイッチの第 1 の領域：C A R 相互作用ドメイン。

本明細書で開示されるヒト化された C A R - E C スイッチ上に含まれる C A R 相互作用ドメイン (C A R - I D) は、C A R - I D が、エフェクター細胞 (例えば、T 細胞) 上のキメラ受容体 (例えば、C A R) によって結合可能になるように、本明細書で記載される標的化部分 (例えば、ヒト化された抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合部分) に融合され、共役され、あるいは別様に結合される、あらゆるものであり得る。例えば、非限定的な実施形態では、C A R - I D は、キメラ受容体結合タンパク質 (例えば、C A R 結合タンパク質) であり得る。非限定的な実施形態では、C A R - I D は、キメラ受容体結合ペプチド (例えば、C A R 結合ペプチド) であり得る。非限定的な実施形態では、C A R - I D は、キメラ受容体結合小分子 (例えば、C A R 結合小分子) であり得る。いくつかの実施形態では、C A R のスイッチ上の C A R - I D への結合は、C A R を活性化する。いくつかの実施形態では、スイッチ上の標的化部分もまた、同時にその標的に結合される場合、C A R のスイッチ上の C A R - I D への結合は、C A R のみを活性化する。いくつかの実施形態では、スイッチ上のヒト化された抗 C D 1 9 抗体 (例えば、本明細書で開示さ

10

20

30

40

50

れるヒト化された抗CD19抗体のうちのいずれか1つ)もまた、同時に標的細胞上のCD19に結合される場合、CARのスイッチ上のCAR-IDへの結合は、CARのみを活性化する。かかる実施形態では、CARは、エフェクター細胞上で発現され得る。かかる実施形態では、スイッチ上のヒト化された抗CD19抗体(例えば、本明細書で開示されるヒト化された抗CD19抗体のうちのいずれか1つ)もまた、同時に標的細胞上のCD19に結合されるが、一方、エフェクター細胞上で発現されるCARのスイッチ上のCAR-IDへの結合は標的細胞に細胞毒性をもたらす。

【0097】

キメラ受容体結合タンパク質

いくつかの実施形態では、CAR-IDは、キメラ受容体によって結合されるキメラ受容体結合タンパク質を含むか、またはそれから成る。キメラ受容体結合タンパク質は、一般のタンパク質に対して高タンパク質分解安定性および人間内の低免疫原性を有し得る。キメラ受容体結合タンパク質は、外来性タンパク質またはその部分を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、外来性タンパク質またはその部分を含み得ない。キメラ受容体結合タンパク質は、ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、細胞接着分子、シグナル伝達ペプチド、受容体、細胞表面ペプチドおよびそれらの断片から選択され得る。キメラ受容体結合タンパク質は、リガンドまたはその断片であり得る。リガンドは、ホルモンのリガンドであり得る。キメラ受容体結合タンパク質は、約100個超のアミノ酸、約200個超のアミノ酸、約300個超のアミノ酸、約400個超のアミノ酸、約500個超のアミノ酸、約600個超のアミノ酸、約700個超のアミノ酸、約800個超のアミノ酸、約900個超のアミノ酸、または約1000個超のアミノ酸の長さを有し得る。キメラ受容体結合タンパク質は、約100個のアミノ酸、約200個のアミノ酸、約300個のアミノ酸、約400個のアミノ酸、約500個のアミノ酸、約600個のアミノ酸、約700個のアミノ酸、約800個のアミノ酸、約900個のアミノ酸、または約1000個のアミノ酸の長さを有し得る。キメラ受容体結合タンパク質は、抗原であり得る。

【0098】

キメラ受容体結合タンパク質は、抗体または抗体断片を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、抗体または抗体断片を含み得ない。キメラ受容体結合タンパク質は、抗体または抗体断片の、少なくとも約100個、少なくとも約200個、少なくとも約300個、少なくとも約400個、または少なくとも約500個のアミノ酸を含み得る。抗体または抗体断片は、可変ドメインまたはその部分を含み得る。抗体または抗体断片は、定常ドメインまたはその部分を含み得る。

【0099】

キメラ受容体結合タンパク質は、非天然発生タンパク質を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、合成タンパク質を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、非動物性タンパク質(例えば、動物内で発現されないタンパク質)を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、非哺乳類タンパク質を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、非ヒトタンパク質を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、六界(動物界、植物界、真菌界、原生生物界、古細菌/古細菌バクテリア界、およびバクテリア/真正細菌界)、ウィルス、ならびにプリオンのうちのいずれかからの任意の生物から誘導されるタンパク質を含み得る。

【0100】

キメラ受容体結合タンパク質は、プロテアーゼ切断部位を含み得る。当該技術分野で知られる任意のプロテアーゼ切断部位は、キメラ受容体結合タンパク質に含まれ得る。プロテアーゼ切断部位は、例えば、トロンピン、第Xa因子、TEVプロテアーゼ、ヒトラインウイルス3Cプロテアーゼ(HRV3C)、ユビキチン様特異性プロテアーゼ1(Ulp1)、マトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)またはエンテロキナーゼによって認識され得る。MMPは、MMP8であり得る。MMPは、MMP9であり得る。

【0101】

キメラ受容体結合タンパク質は、天然発生タンパク質に基づくか、またはそれから誘導

10

20

30

40

50

され得る。ペプチドは、ヒトタンパク質に基づくか、またはそれから誘導され得る。キメラ受容体結合タンパク質は、チンパンジー、サル、ラット、マウス、トリ、魚、豚、馬、牛、ヤギ、チキン、ウサギ、およびモルモットから選択される動物内で発現されるタンパク質に基づくか、またはそれから誘導され得る。キメラ受容体結合タンパク質は、哺乳類タンパク質に基づくか、またはそれから誘導され得る。キメラ受容体結合タンパク質は、非哺乳類タンパク質に基づくか、またはそれから誘導され得る。キメラ受容体結合タンパク質は、植物内で発現されるタンパク質に基づくか、またはそれから誘導され得る。キメラ受容体結合タンパク質は、原核生物タンパク質に基づくか、またはそれから誘導され得る。キメラ受容体結合タンパク質は、真核生物タンパク質に基づくか、またはそれから誘導され得る。キメラ受容体結合タンパク質は、酵母菌によって発現されるタンパク質に基づくか、またはそれから誘導され得る。

10

【0102】

したがって、様々な非限定的な実施形態では、キメラ受容体結合タンパク質は、酵素を含み得る。酵素は、ヌクレアーゼであり得る。ヌクレアーゼは、リボヌクレアーゼであり得る。リボヌクレアーゼは、原核生物であり得る。キメラ受容体結合タンパク質は、基質を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、バルスターを含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、バルナーゼを含み得る。いくつかの実施形態では、キメラ受容体結合タンパク質は、繊維状タンパク質、接着分子タンパク質、および膜タンパク質から選択されるタンパク質であり得る。キメラ受容体結合タンパク質は、化膿連鎖球菌ピリンタンパク質を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、化膿連鎖球菌フィブロンネクチン結合タンパク質（スパイキャッチャー）を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、タンパク質、またはシナプトブレビン、SNAP25およびシンタキシン、ならびにそれらの部分（例えば、 α ヘリックス）から選択されるタンパク質の部分を含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、RNAse Iを含み得る。キメラ受容体結合タンパク質は、HuSアダプタータンパク質を含み得る。

20

【0103】

キメラ受容体結合ペプチド

いくつかの実施形態では、CAR-IDは、ペプチド、例えばCAR結合ペプチドを含むか、またはそれから成る。CAR-IDは、キメラ抗原受容体（CAR）によって結合可能であるペプチドであり得る。CAR-IDは、例えば、任意の「ペプチド性抗原」、「ペプチドネオエピトープ（PNE）」、または「キメラ抗原結合ペプチド性抗原（CAR-BP）」であり得、PCT/US2014/060684またはPCT/US2016/027997に開示され、それぞれは全体が参照により本明細書に組込まれる。

30

【0104】

CAR-IDは、一般のペプチドに対して人間内で高タンパク質分解安定性および低免疫原性を有し得る。CAR-IDは、ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、細胞接着分子、シグナル伝達ペプチド、受容体、細胞表面ペプチドおよびそれらの断片から選択され得る。CAR-IDは、ペプチドであり得る。CAR-IDは、ペプチド核酸（PNA）であり得る。CAR-IDは、リガンドまたはその断片であり得る。リガンドは、ホルモンのリガンドであり得る。リガンド、ペプチドリガンドであり得る。CAR-IDは、環状ペプチドであり得る。CAR-IDは、直鎖ペプチドであり得る。

40

【0105】

CAR-IDは、約2～約10個、約10～約20個、約20～約30個、約30～約40個、約40～約50個、約50～約60個、約60～約70個、約70～約80個、および約80～約90個のアミノ酸の長さを有し得る。CAR-IDは、抗原であり得る。CAR-IDは、エピトープであり得る。CAR-IDは、非直鎖エピトープであり得る。CAR-IDは、第2のペプチドをさらに含み得る。

【0106】

CAR-IDは、抗体または抗体断片を含み得ない。CAR-IDは、抗体または抗体断片の10個未満のアミノ酸を含み得る。CAR-IDは、抗体または抗体断片の12個

50

未満のアミノ酸を含み得る。C A R - I D は、抗体または抗体断片の 1 5 個未満のアミノ酸を含み得る。C A R - I D は、抗体または抗体断片の 2 0 個未満のアミノ酸を含み得る。C A R - I D は、抗体または抗体断片の 2 2 個未満のアミノ酸を含み得る。C A R - I D は、抗体または抗体断片の 3 0 個未満のアミノ酸を含み得る。C A R - I D は、抗体または抗体断片のパラトープを含み得ない。

【 0 1 0 7 】

C A R - I D は、非天然発生ペプチドを含み得る。C A R - I D は、合成ペプチドを含み得る。C A R - I D は、非動物性ペプチド（例えば、動物内で発現されないペプチド）を含み得る。C A R - I D は、非哺乳類ペプチドを含み得る。C A R - I D は、非ヒトペプチドを含み得る。ペプチドは、六界（動物界、植物界、真菌界、原生生物界、古細菌 / 古細菌バクテリア、およびバクテリア / 真正細菌）、ウィルス、ならびにプリオンのいずれかからの任意の生物から誘導され得る。したがって、ペプチドは、ヒト、哺乳類、非哺乳類、植物、酵母菌、バクテリア、爬虫類、鳥、虫、真核生物、または原核生物から誘導され、それらから成り、あるいはそれらを含む。特定の生物学上の生命体（例えば、哺乳類、酵母など）「から誘導されるペプチド」という用語は、かかる生物学上の生命体内に存在すると知られている天然のペプチドの配列と実質的に同様（配列が、修飾されている、すなわち、アミノ酸 1 つ以上の付加、欠失、挿入、または置換を含むことを除く）の配列を含むペプチドを記載することを意味する。いくつかの実施形態では、配列は、ヒト化、例えば、人間へのペプチドの免疫原性を減少させることにより修飾される。いくつかの実施形態では、生物学上の生命体（例えば、真核生物、原核生物、哺乳類、ヒト、酵母など）から誘導されるペプチドは、その生物学上の生命体に対して天然であるペプチドと、少なくとも約 8 0 % 同一であるか、あるいは生物学上の生命体に対して天然であるペプチドと、少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 9 9 % を超えて同一である非天然配列を含む。

【 0 1 0 8 】

C A R - I D は、m y c タグを含み得る。C A R - I D は、H i s タグを含み得る。C A R - I D は、H A タグを含み得る。C A R - I D は、ペリジニククロフィルタンパク質複合体を含み得る。C A R - I D は、緑蛍光性タンパク質（G F P）を含み得る。C A R - I D は、赤蛍光性タンパク質（R F P）を含み得る。C A R - I D は、フィコエリトリン（P E）を含み得る。C A R - I D は、ストレプトアビジンを含み得る。C A R - I D は、アビジンを含み得る。C A R - I D は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）を含み得る。C A R - I D は、アルカリホスファターゼを含み得る。C A R - I D は、グルコースオキシダーゼを含み得る。C A R - I D は、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ（G S T）を含み得る。C A R - I D は、マルトース結合タンパク質を含み得る。非限定的な例により、C A R - I D は、c - m y c タグ、ポリヒスチジンタグ、V 5、V S V G、s o f t a g 1、s o f t a g 3、発現タグ、S タグ、パルミトイル化、ニトロシル化、S U M O タグ、チオレドキシン、ポリ（N A N P）、ポリ A r g、カルモジュリン結合タンパク質、P u r F 断片、ケトステロイドイソメラーゼ、P a P 3 . 3 0、T A F 1 2 ヒストンフォールドドメイン、F K B P タグ、S N A P タグ、ハロタグ、R N A s e I からのペプチドであり得る。C A R - I D は、プロテアーゼ切断部位を含み得る。プロテアーゼ切断部位は、トロンピン、第 X a 因子、T E V プロテアーゼまたはエンテロキナーゼによって認識され得る。

【 0 1 0 9 】

C A R - I D は、小直鎖親水性ペプチドであり得る。小直鎖親水性ペプチドは、リンカーを含み得る。小直鎖親水性ペプチドは、親水性標的ペプチド（H T P）であり得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列 G G G G S D Y K D D D D K（配列番号 3 8）を含み得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列 G G G G S D Y K D D D D K P（配列番号 3 9）を含み得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列 G G G G S D Y K D D D D K（配列番号 3 8）から本質的に成り得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列 G G G G S D Y K D D D D K P（配列番号 3 9）から本質的になり得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列番号 3 8 または 3 9 と、

10

20

30

40

50

少なくとも約 50 % 同一であり得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列番号 38 または 39 と、少なくとも約 60 % 同一であり得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列番号 38 または 39 と少なくとも約 70 % 同一であり得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列番号 38 または 39 と少なくとも約 80 % 同一であり得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列番号 38 または 39 と少なくとも約 85 % 同一であり得る。小直鎖親水性ペプチドは、配列番号 38 または 39 と少なくとも約 90 % 同一であり得る。小直鎖親水性ペプチドは、当該技術分野で知られる他のペプチドに対して減少した非特異的結合を有し得る。小直鎖親水性ペプチドは、本明細書で開示される他のペプチドに対して減少した非特異的結合および減少した融合タンパク質不安定性を有し得る。CAR-ID は、FLAG (登録商標) タグ (DYKDDDDK 配列番号 40)、または誘導体、またはそのホモログを含み得る。

10

【0110】

CAR-ID は、天然発生ペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。ペプチドは、ヒトペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。CAR-ID は、内在性ペプチドまたは天然のペプチドとは対照的に非内在性ペプチドまたは非天然のペプチドであり得る。内在性ペプチドは、人間の体内に自然にまたは通常存在するか (例えば、ビオチン、モノクローナル抗体の Fc)、あるいは人間の体が、典型的に遭遇するものであり得る。したがって、非内在性ペプチドは、外来性または人間の体内に自然に存在しないものである。例えば、本明細書で開示されるスイッチは、通常インビボでは遭遇しない、CAR-ID としての GCN4 ペプチドを用いる場合がある。いくつかの実施形態では、かかる非天然ペプチドは、CAR-スイッチ相互作用の直行性を維持する。CAR-ID は、非免疫原性ペプチド (例えば、免疫応答を引き起こさないか、あるいは人間の体内で無視できる免疫応答を引き起こすことで知られるペプチド) であり得る。

20

【0111】

CAR-ID は、チンパンジー、猿、ラット、マウス、鳥、魚、豚、馬、牛、ヤギ、鶏、ウサギ、および、モルモットから選択される動物で発現されるペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。CAR-ID は、哺乳類ペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。CAR-ID は、非哺乳類ペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。CAR-ID は、植物内で発現されるペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。CAR-ID は、細菌内で発現されるペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。CAR-ID は、原核生物ペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。CAR-ID は、真核生物ペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。CAR-ID は、酵母によって発現されるペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。

30

【0112】

CAR-ID は、酵母転写因子 GCN4 ペプチド、またはその誘導体もしくはホモログを含み得る。酵母転写因子 GCN4 ペプチドは、GCN4 (7P14P) ペプチド配列 (Berger et al. FEBS Letters 450 (1999) 149-153 で定義され、参照によりその全体が本明細書に組込まれる) を含み得る。酵母転写因子 GCN4 ペプチドは、配列 RMKQLEPKVEELLPKNYHLENEVARLKKLVGER (配列番号 36) を含み得る。酵母転写因子 GCN4 ペプチドは、配列 NYHLENEVARLKKL (配列番号 26) を含み得る。酵母転写因子 GCN4 ペプチドは、配列 RMKQLEPKVEELLPKNYHLENEVARLKKLVGER (配列番号 36) から成り得る。酵母転写因子 GCN4 ペプチドは、配列 NYHLENEVARLKKL (配列番号 26) から成り得る。酵母転写因子 GCN4 ペプチドは、配列番号 36 の部分を含み得る。配列番号 36 の部分は、少なくとも 4 個のアミノ酸長であり得る。配列番号 36 の部分は、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12 または約 13 アミノ酸長であり得る。酵母転写因子 GCN4 ペプチドは、4 個のアミノ酸長である配列番号 36 の部分、または 5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 個のアミノ酸長である配列番号 36 の部分を含み得る。酵母転写因子 GCN4 ペプチドは、配列 NYHLENEVARLKK (配列番号 245) を含み得る。酵母転写因子 GCN4 ペプチドは、配列 NYHLENEVARLK (配列番号 145) を含み得る。酵母転写

40

50

因子GCN4ペプチドは、配列番号26または36の一方または両方と少なくとも約50%同一であり得る。酵母転写因子GCN4ペプチドは、配列番号26または36の一方または両方と少なくとも約60%同一であり得る。酵母転写因子GCN4ペプチドは、配列番号26または36の一方または両方と少なくとも約70%同一であり得る。酵母転写因子GCN4ペプチドは、配列番号26または36の一方または両方と少なくとも約80%同一であり得る。酵母転写因子GCN4ペプチドは、配列番号26または36の一方または両方と少なくとも約85%同一であり得る。酵母転写因子GCN4ペプチドは、配列番号26または36の一方または両方と少なくとも約90%同一であり得る。CAR-ECスイッチは、酵母GCN4ペプチドおよび1つ以上のリンカーを含み得る。CAR-ECスイッチは、配列番号37を含み得る。酵母転写因子GCN4ペプチドは、抗GCN4抗体に対する最小の結合エピトープを含むか、あるいはそれから成り得る。酵母転写因子GCN4ペプチドは、抗GCN4抗体scFv 52SR4 (Zahnd, C., et al., (2004), Journal of 生物学的 Chemistry 279, 18870-18877 (参照によりその全体が本明細書に組込まれる)に記載される。)に対する結合エピトープ(例えば、最小結合エピトープ)、または1、2、3、4、5、もしくは6の、それらに含まれるCDR配列(CDR1 VL:RSSTGAVTTSNYAS、CDR2 VL:GTNNRAP、CDR3 VL:ALWYSNHWV、CDR1 VH:DYGVN、CDR2 VH:VIWGDGITDYNALKS、CDR3 VH:GLFDY)を含む抗体を含むか、あるいはそれから成り得る。CAR-IDは、構造I: X1NYHLENEVARLKX2X3(配列番号269)の配列を含み得、X1、X2、およびX3は、任意に任意のアミノ酸であるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X1は、Kであるか、または不在である。いくつかの実施形態では、X2は、K、A、およびGから選択される。いくつかの実施形態では、X3は、L、A、およびGから選択される。いくつかの実施形態では、CAR-IDは、配列番号139、154~163のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、またはそれから成る。KNYHLENEVARLKKL(配列番号154)、KNYHLENEVARLKAL(配列番号155)、KNYHLENEVARLKGL(配列番号156)、KNYHLENEVARLKAA(配列番号157)、KNYHLENEVARLKGG(配列番号158)、NYHLENEVARLKKL(配列番号159)、NYHLENEVARLKAL(配列番号160)、NYHLENEVARLKGL(配列番号161)、NYHLENEVARLKAA(配列番号162)、NYHLENEVARLKGG(配列番号163)、およびLLPKNYHLENEVARLKKL(配列番号139)。

【0113】

いくつかの実施形態では、非限定的な例として、CAR-IDは、イソペプタグ(TDKDMTITFTNKKDAE、配列番号41)を含み得る。CAR-IDは、SpyTag(AHIVMVDAYKPTK、配列番号42)を含み得る。CAR-IDは、SNAREを含み得る。CAR-IDは、HuTagを含み得る。キメラ受容体結合パートナーは、第1のαヘリックスおよび第2のαヘリックスが、結合する際にコイルドコイル構造を形成し得るように、第2のαヘリックスペプチドに結合する第1のαヘリックスペプチドを含み得る。CAR-IDは、E4ペプチド(EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK、配列番号44)を含み得る。CAR-IDは、K4ペプチド(KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE、配列番号43)を含み得る。CAR-IDは、修飾されたE4ペプチドを含み得る。CAR-IDは、修飾されたK4ペプチドを含み得る。CAR-IDは、配列番号44の配列を有するペプチドから成り得る。CAR-IDは、配列番号43の配列を有するペプチドから成り得る。CAR-IDは、配列番号43と、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれを超える同一性を有する配列を有するペプチドを含み得る。)CAR-IDは、配列番号44と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれを超える同一性を有する配列を有するペプチドを含み得る。CAR-IDは、以下のK4またはE4ペプチドのうちのいずれか1つと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも

10

20

30

40

50

95%またはそれを超える同一性を有する配列を有するペプチドを含み得る（配列番号45～58）：

【表18】

EVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK	配列番号：	45
KVSALKEKVSALEKEKVSALEKEKVSALEK	配列番号：	46
EIAALEKEIAALEKEIAALEK	配列番号：	47
EIAALEKEIAALEKEIAALEKEIAALEK	配列番号：	48
KIAALKEKIAALKEKIAALKE	配列番号：	49
KIAALKEKIAALKEKIAALKEKIAALKE	配列番号：	50
EISALEKEISALEKEISALEK	配列番号：	51
EISALEKEISALEKEISALEKEISALEK	配列番号：	52
KISALKEKISALKEKISALKE	配列番号：	53
KISALKEKISALKEKISALKEKISALKE	配列番号：	54
EVAALEKEVAALEKEVAALEK	配列番号：	55
KVAALKEKVAALEKEKVAALKE	配列番号：	56
EVSALEKEVSALEKEVSALEK	配列番号：	57
KVSALKEKVSALEKEKVSALEK	配列番号：	58

10

20

CAR-IDは、配列番号45～58のうちのいずれか1つの配列を有するペプチドを含み得る。本明細書で記載される標的化部分を含むスイッチおよび配列番号45、47、48、51、52、55、および57のうちのいずれか1つの配列を有するペプチドを含むCAR-IDは、本発明に従う使用のための配列番号65の配列を有するCARと対を成し得る（例えば、かかるスイッチは、かかるCARを発現して、本明細書で記載される治療に作用するエフェクター細胞と組み合わせて使用され得る）。本明細書で記載される標的化部分を含むスイッチおよび配列番号46、49、50、53、54、56、および58のうちのいずれか1つの配列を有するペプチドを含むCAR-IDは、本発明に従う使用のための配列番号64の配列を有するCARと対を成し得る（例えば、かかるスイッチは、かかるCARを発現して、本明細書で記載される治療に作用するエフェクター細胞と組み合わせて使用され得る）。

30

【0114】

また、非限定的な例として、CAR-IDは、マウスコロニン1Aタンパク質のαヘリックスを含み得る。または、非限定的な例として、CAR-IDは、cAMP依存性タンパク質キナーゼAの二量体化およびドッキングドメイン（DDD）を含み得る。CAR-IDは、Aキナーゼアンカータンパク質（AKAP）のアンカードメイン（AD）を含み得る。CAR-IDは、DDD1（配列番号60）を含み得る。CAR-IDは、AD1（配列番号59）を含み得る。CAR-IDは、DDD2（配列番号62）を含み得る。CAR-IDは、AD2（配列番号61）を含み得る。

【0115】

40

または、非限定的な例として、CAR-IDは、cAMP依存性タンパク質キナーゼ（例えば、DDD1またはDDD2）の二量体化およびドッキングドメインを含み得、DDDは、キメラ受容体上（例えば、非抗体細胞外ドメイン上）のDDDとADパートナーとの間のジスルフィド結合を形成するシステインで修飾されている。CAR-IDは、AD（例えば、AD1またはAD2）を含み得、ADは、キメラ受容体上（例えば、非抗体細胞外ドメイン上）のADとDDDパートナーとの間のジスルフィド結合を形成するシステインで修飾されている。これらのジスルフィド結合は、AD1とDDD1との間の、あるいはAD2とDDD2との間の共有結合性相互作用を形成し得る。これは、CAR-IDのための非抗体ペプチドの親和性を増加するための利点であり得、その逆も同じである。

【0116】

50

キメラ受容体結合小分子

いくつかの実施形態では、CAR-IDは、小分子を含むか、またはそれから成る。小分子は、ペプチドを含み得ない。小分子は、アミド結合によって連結される2個以上のアミノ酸を含み得ない。小分子は、タンパク質またはペプチドにより結合される小分子であり得る。小分子は、タンパク質またはペプチドにより結合される小分子であり得、タンパク質またはペプチドは、キメラ受容体の非抗体細胞外ドメイン内に存在する。小分子は、高親和性を有するタンパク質またはペプチドにより結合される小分子であり得る。小分子は、薬物であり得る。小分子は、無機化合物であり得る。小分子は、有機化合物であり得る。小分子は、自然発生であり得る。小分子は、自然発生ではあり得ない。小分子は、合成であり得る。小分子は、ステロイド、ビタミン、ビタマー、リガンド、受容体アゴニスト、受容体アンタゴニスト、酵素阻害剤、DNAアプタマー、ペプチド核酸(PNA)、PNAアプタマー、ペプチド、基質、基質アナログ、代謝産物、抗生物質、単糖、二糖、脂質、脂肪酸、核酸、アルカロイド、グリコシド、フェナジン、ポリケタイド、テルペンおよびテトラピロール、およびそれらの部分から選択され得る。非限定的な例として、小分子は、DOTA、ジニトロフェノール、キノン、ビオチン、アニリン、アトラジン、アニリン誘導体、o-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、ヒドララジン、ハロタン、ジゴキシゲニン、ベンゼンアルソネート、ラクトース、トリニトロフェノール、ビオチンまたはその誘導体から成る群から選択され得る。

10

【0117】

小分子は、ビタミンまたはその誘導体を含み得る。非限定的な例として、ビタミンは、ビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、およびビタミンKから選択され得る。ビタミンは、ビタミンCであり得る。ビタミンは、ビタミンDであり得る。ビタミンは、葉酸またはその誘導体を含み得る。小分子は、ビタマーを含み得る。小分子は、ビタミン代謝産物またはビタミン前駆体を含み得る。非限定的な例として、ビタマーは、レチノール、レチナール、ベータカロチン、カロテノイド、チアミン、リボフラビン、ナイアシン、ナイアシンアミド、パントテン酸、ピリドキシン、イリドキサミン、ピリドキサル、ビオチン、葉酸、フォリン酸、シアノコバラミン、ヒドロキシコバラミン、メチルコバラミン、アスコルビン酸、コレカルシフェロール、エルゴカルシフェロール、トコフェロール、トコトリエノール、フィロキノン、およびメナキノンまたはその誘導体から選択され得る。小分子は、抗酸化物質またはその誘導体を含み得る。

20

30

【0118】

小分子は、酵素阻害剤であり得る。非限定的な例として、小分子は、シロシンキナーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、増殖因子受容体阻害剤、ホルモン受容体阻害剤、ヤヌスキナーゼ阻害剤、未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)阻害剤、Bcl-2阻害剤、ポリADプリボースポリメラーゼ(PARP)阻害剤、PI3K阻害剤、Braf阻害剤、MAPキナーゼ阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、およびヒートショックタンパク質阻害剤から選択され得る。酵素阻害剤は、アパチニブ、ボルテゾミブ、イマチニブ、イブルチニブ、セリシシリブ、ボスチニブ、カボザンチニブ、クリゾチニブ、ダブラフェニブ、ダサチニブ、ドキシソルピシン、エルロチニブ、エベロリムス、ゲフィチニブ、イマチニブ、イニパリブ、ラパチニブ、LEE011、LGX818、ミロチニブ、オパトクラックス、オラパリブ、パゾパニブ、PD-0332991、ペリフォシン、ボナチニブ、レゴラフェニブ、ルキソリチニブ、サリノマイシン、ソラフェニブ、スニチニブ、タモキシフェン、テムシロリムス、トファシチニブ、トラメチニブ、バンデタニブおよびベムラフェニブ、またはその誘導体から選択され得る。

40

【0119】

小分子は、約1000Da、1100Da、1200Da、1300Da、1400Da、1500Da、1600Da、1700Da、1800Da、1900Da、2000Da、2100Da、2200Da、2300Da、2400Da、2500Da、2600Da、2700Da、2800Da、2900Da未満であり得るか、あるいは約3000Da未満であり得る。スイッチは、約1200Da未満であり得る。スイッチは

50

、約1500Daであり得る。CAR-ECスイッチは、約2000Da未満であり得る。
【0120】

小分子は、約 10^{-8} m、約 10^{-9} m、約 10^{-10} mほどのサイズを有し得る。小分子は、約 10^{-7} m未満のサイズを有し得る。小分子は、約 10^{-8} m未満のサイズを有し得る。小分子は、約 10^{-9} m未満のサイズを有し得る。小分子は、約 10^{-10} m未満のサイズを有し得る。小分子は、約 10^{-11} m未満のサイズを有し得る。小分子は、その最も広い寸法で、約10nm未満、約20nm未満、約30nm未満、約40nm未満、約50nm未満、約60nm未満、約70nm未満、約80nm未満、約90nm未満、約100nm未満、約110nm未満、約120nm未満、約130nm未満、約140nm未満、約150nm未満、約160nm未満、約170nm未満、約180nm未満、約190nm未満、または約200nm未満の幅であり得る。小分子は、その最も広い寸法で、約100nm未満、約200nm未満の幅、約300nm未満、約400nm未満、約500nm未満、約600nm未満、約700nm未満、約800nm未満、約900nm未満、または約1000nm未満の幅であり得る。

10

【0121】

CAR-IDは、ハプテンを含み得る。CAR-IDは、タンパク質、抗体、または抗体断片などのより大きな担体分子に結合する際、免疫応答を含み得る。CAR-IDは、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはその誘導体であり得る。CAR-IDは、ピオチンを含み得る。CAR-IDは、ジニトロフェノールを含み得る。

【0122】

代替的に、CAR-IDは、ハプテンを含まない。CAR-IDは、ステロイド、ビタミン、ピタマー、代謝産物、抗生物質、単糖、二糖、脂質、脂肪酸、核酸、アルカロイド、グリコシド、フェナジン、ポリケタイド、テルペン、およびテトラピロール、ならびにそれらの部分、かつそれらの組み合わせから選択され得る。CAR-IDは、ペニシリン薬物またはその誘導体であり得る。

20

【0123】

CAR-IDは、標的化部分に連結、および/または共役され得る。標的化部分は、標的化抗体または標的化抗体の抗原結合部分であり得、CAR-IDは、標的化抗体または抗体の抗原結合部分のアミノ酸に連結、および/または共役され得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分のアミノ酸は、非天然のアミノ酸であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、本明細書で開示される任意の標的化抗体または抗体の抗原結合部分であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、配列番号17~25から選択される軽鎖を含み得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、配列番号17~25から選択される軽鎖を含み得、非天然のアミノ酸は、表1に示される各々の部位に位置し得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、配列番号2~15から選択される重鎖を含み得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、配列番号2~15から選択される重鎖を含み得、非天然のアミノ酸は、表1に示される各々の部位に位置し得る。

30

【表1】

表1

抗原	クローン	A	B	C	D	E	F
CD19	FMC63	LG68	HS74	LT109	HA121	LS202	HK136

40

L=軽鎖、H=重鎖、S=セリン、G=グリシン、R=アルギニン、T=スレオニン、A=アラニン、およびK=リジン

【0124】

標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、抗CD20抗体または抗CD20抗体断片であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、抗CD22抗体または抗CD22抗

50

体断片であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、抗 C D 3 3 抗体または抗 C D 3 3 抗体断片であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、抗 C D 1 2 3 抗体または抗 C D 1 2 3 抗体断片であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、抗 C L L 1 抗体または抗 C L L 1 抗体断片であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、抗 C E A 抗体または抗 C E A 抗体断片であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、抗 H e r 2 抗体または抗 H e r 2 抗体断片であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、抗 B C M A 抗体または抗 B C M A 抗体断片であり得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、抗 C S 1 抗体または抗 C S 1 抗体断片であり得る。標的化部分は、T 細胞受容体であり得る。標的化部分は、可溶性 T 細胞受容体であり得る。標的化可溶性 T 細胞受容体は、M H C 制限 N Y - E S O - 1 ペプチドに結合し得る。

10

【 0 1 2 5 】

標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、配列番号 2 4 7、2 4 9、2 5 1、2 5 3、2 5 5、2 5 7、2 5 9、2 6 1、2 6 3、2 6 5、および 2 6 7 から選択される軽鎖を含み得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、配列番号 2 4 7、2 4 9、2 5 1、2 5 3、2 5 5、2 5 7、2 5 9、2 6 1、2 6 3、2 6 5、および 2 6 7 から選択される軽鎖を含み得、非天然のアミノ酸は、表 2 に示される各々の部位に位置し得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、配列番号 2 4 8、2 5 0、2 5 2、2 5 4、2 5 6、2 5 8、2 6 0、2 6 2、2 6 4、2 6 6、2 6 8 から選択される重鎖を含み得る。標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、配列番号 2 4 8、2 5 0、2 5 2、2 5 4、2 5 6、2 5 8、2 6 0、2 6 2、2 6 4、2 6 6、2 6 8 から選択される重鎖を含み得、非天然のアミノ酸は、表 2 に示される各々の部位に位置し得る。

20

【 0 1 2 6 】

【表 2】

表 2、

抗原	クローン	A	B	C	D	E	F
CD22	hLL2	LG74	HS75	LT114	HA117	LS207	HK132
	M971	LG68	HS78	LT109	HA125	LS202	HK140
Her2	ハーセプチン	LG68	HS75	LT109	HA121	LS202	HK136
CLL1	1075. 7	LG69	HS75	LA110	HA124	LS203	HK139
CD33	hM195	LG72	HS75	LT113	HA117	LS206	HK132
	Hp67. 6	LG72	HP75	LT113	HA117	LS206	HK132
CD123	26292	LG68	HS75	LT109	HA116	LS202	HK131
	32716	LR72	HS75	LT113	HA119	LS206	HK134

30

L = 軽鎖、H = 重鎖、S = セリン、G = グリシン、R = アルギニン、T = スレオニン、A = アラニン、および K = リジン

40

【 0 1 2 7 】

1 つ以上の非天然のアミノ酸は、20 個の天然のアミノ酸のうちの 1 個に対してコードしないコドンによって、コードされ得る。1 つ以上の非天然のアミノ酸は、ナンセンスコドン（終止コドン）によってコードされ得る。終止コドンは、アンバーコドンであり得る。アンバーコドンは、U A G 配列を含み得る。本明細書では、「U A G」および「T A G」は、アンバーコドンを参照して、交換可能に使用され得る。終止コドンは、オーカーコドンであり得る。オーカーコドンは、U A A 配列を含み得る。終止コドンは、オパールまたはアンバーコドンであり得る。オパールまたはアンバーコドンは、U G A 配列を含み得

50

る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、四塩基コドンによってコードされ得る。

【0128】

1つ以上の非天然のアミノ酸は、p - アセチルフェニルアラニン (p A c F または p A c P h e) であり得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、セレノシステインであり得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、p - フルオロフェニルアラニン (p F P h e) であり得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、(p A z F)、p - アジドメチルフェニルアラニン (p A z C H₂ F)、p - ベンゾイルフェニルアラニン (p B p F)、p - プロパルギルオキシフェニルアラニン (p P r F)、p - ヨードフェニルアラニン (p I F)、p - クロロフェニルアラニン (p C N F)、p - カルボキシメチルフェニルアラニン (p C m F)、3 - (2 - ナフチル) アラニン (N a p A)、p - ボロノフェニルアラニン (p B o F)、o - ニトロフェニルアラニン (o N i F)、(8 - ヒドロキシキノリン - 3 - イル) アラニン (H Q A)、セレノシステイン、および (2, 2' - ビピリジン - 5 - イル) アラニン (B i p y A) を含む群から選択され得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、4 - (6 - メチル - s - テトラジン - 3 - イル) アミノフェニルアラニンであり得る。

10

【0129】

1つ以上の非天然のアミノ酸は、β - アミノ酸 (β 3 および β 2)、ホモアミノ酸、プロリンおよびピルピン酸誘導体、3置換アラニン誘導体、グリシン誘導体、環置換フェニルアラニンおよびチロシン誘導体、直鎖核アミノ酸、ジアミノ酸、D - アミノ酸、N - メチルアミノ酸、またはそれらの組み合わせであり得る。

【0130】

20

非天然のアミノ酸の追加の例は、1) O - メチル - L - チロシン、p - アミノ - L - フェニルアラニン、3 - ニトロ - L - チロシン、p - ニトロ - L - フェニルアラニン、m - メトキシ - L - フェニルアラニンおよび p - イソプロピル - L - フェニルアラニンなどの様々な置換されたチロシンおよびフェニルアラニン類似体、2) 光架橋され得るアリアルアジドおよびベンゾフェノン基を有するアミノ酸、3) アセチル - L - フェニルアラニンおよび m - アセチル - L - フェニルアラニン、O - アリル - L - チロシン、O - (2 - プロピニル) - L - チロシン、p - エチルチオカルボニル - L - フェニルアラニンおよび p - (3 - オキシプロタノイル) - L - フェニルアラニンを含む、特有の化学反応性を有するアミノ酸、4) p - ヨードおよび p - プロモ - L - フェニルアラニンを含む、X線結晶学での位相のための重原子含有アミノ酸、5) 酸化還元活性アミノ酸ジヒドロキシ - L - フェニルアラニン、6) b - N - アセチルグルコサミン - O - セリンおよび a - N - アセチルガラクトサミン - O - スレオニンを含むグリコシル化されたアミノ酸、7) ナフチル、ダンシル、および 7 - アミノクマリン側鎖を有する蛍光性アミノ酸、8) アゾベンゼンおよびニトロベンジル C y s、S e r、および T y r 側鎖を有する光開裂性および光異性化アミノ酸、9) ホスホチロシンミメティック p - カルボキシメチル - L - フェニルアラニン、10) グルタミンホモログホモグルタミン、ならびに 11) 2 - アミノブタン酸を含むが、これらに限定されない。非天然のアミノ酸は、修飾され、化学基を組込み得る。非天然のアミノ酸は、修飾され、ケトン基を組込み得る。

30

【0131】

1つ以上の非天然のアミノ酸は、少なくとも1つのオキシム、カルボニル、ジカルボニル、ヒドロキシアミン基またはそれらの組み合わせを含み得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、少なくとも1つのカルボニル、ジカルボニル、アルコキシアミン、ヒドラジン、環状アルケン、環状アルキン、シクロオクテン、アリル/アルキルアジド、ノルボルネン、シクロプロペン、トランスシクロオクテン、もしくはテトラジン官能基、またはそれらの組み合わせを含み得る。

40

【0132】

1つ以上の非天然のアミノ酸は、当該技術分野で知られる方法によって、標的化部分および/または C A R - I D に組込まれ得る。細胞ベースまたは無細胞系は、標的化部分および/または C A R - I D の遺伝子配列を改変するのに使用され得、したがって1つ以上の非天然のアミノ酸と共に標的化部分および/または C A R - I D を産生する。栄養要求

50

性菌株は、操作された tRNA およびシンターゼの代わりに使用され得る。1 つ以上の非天然のアミノ酸は、1 つ以上の天然のアミノ酸の選択的反応を通して生成され得る。選択的反応は、1 つ以上の酵素によって媒介され得る。1 つの非限定的な例として、酵素 (FGE) を生成するホルミルグリシンとの 1 つ以上のシステインの選択的反応は、1 つ以上のホルミルグリシン (Rabuka et al., Nature Protocols 7: 1052 - 1067 (2012)) を参照され、参照によりその全体が本明細書に組込まれる) を生成し得る。

【0133】

1 つ以上の非天然のアミノ酸は、化学反応に参加し、リンカーを形成し得る。リンカーを形成する化学反応は、生体直交反応であり得る。リンカーを形成する化学反応は、クリックケミストリーであり得る。

10

【0134】

追加の非天然のアミノ酸が、Liu et al. (Annu Rev Biochem, 79: 413 - 44, 2010)、Wang et al. (Angew Chem Int Ed, 44: 34 - 66, 2005) および PCT 出願番号 PCT/US2012/039472、PCT/US2012/039468、PCT/US2007/088009、PCT/US2009/058668、PCT/US2007/089142、PCT/US2007/088011、PCT/US2007/001485、PCT/US2006/049397、PCT/US2006/047822、および PCT/US2006/044682 に開示され、全ては参照によりその全体が本明細書に組込まれる。

20

【0135】

CAR - EC スイッチの第 2 の領域：標的化部分。

CAR - EC スイッチは、CAR - ID および標的化部分を含む。

【0136】

標的化部分は、標的上の細胞表面分子に結合し得る。細胞表面分子は、抗原を含み得る。細胞表面分子は、タンパク質、脂質部分、糖タンパク質、糖脂質、炭水化物、ポリサッカライド、核酸、MHC 結合ペプチド、またはその組み合わせから選択され得る。細胞表面分子は、バクテリア、ウィルス、および他の微生物の部分 (例えば、コート、カプセル、細胞壁、鞭毛、線毛、および毒素) を含み得る。細胞表面分子は、標的細胞によって発現され得る。細胞表面分子は、標的細胞によって発現され得ない。非限定的な例として、細胞表面分子は、標的細胞ではなく、かつ標的細胞または標的細胞の細胞表面分子に結合される細胞によって発現される、リガンドであり得る。また、非限定的な例として、細胞表面分子は、標的細胞の細胞表面または細胞表面受容体に結合されるベトキシン、外来性分子、またはウィルス性タンパク質であり得る。

30

【0137】

標的化部分は、標的化ポリペプチドであり得る。標的化ポリペプチドは、標的化抗体または抗体断片であり得る。抗体断片は、抗体の抗原結合部分であり得る。標的化抗体または抗体断片は、免疫グロブリン (Ig) であり得る。免疫グロブリンは、IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、その断片 (例えば、抗原結合断片または部分)、またはその修飾から選択され得る。免疫グロブリンは、IgG であり得る。IgG は、IgG1 であり得る。IgG は、IgG2 であり得る。IgG は、CAR - EC スイッチに結合する内在性 T 細胞 FcR を調節するための 1 つ以上の Fc 変異を有し得る。IgG は、FcR 陽性細胞の FcR への Fc 結合能力を除去するための 1 つ以上の Fc 変異を有し得る。Fc 結合能力の除去は、CAR - EC の FcR 陽性細胞への架橋の機会を減少し得、CAR - EC の FcR 陽性細胞への架橋は、標的細胞の非存在下で CAR - EC を活性するであろう。そのようにして、CAR - EC スイッチに結合する内在性 T 細胞 FcR を調節することは、非効果的または望まれない免疫応答を減少し得る。1 つ以上の Fc 変異は、グリコシル化部位を除去し得る。1 つ以上の Fc 変異は、E233P、L234V、L235A、de1G236、A327G、A330S、P331S、N297Q、およびそれらの

40

50

任意の組み合わせから選択され得る。1つ以上のFc変異は、IgG1であり得る。IgG1での1つ以上のFc変異は、L234A、L235A、または両方であり得る。代替的に、または加えて、IgG1での1つ以上のFc変異は、L234A、L235E、または両方であり得る。代替的に、または加えて、IgG1での1つ以上のFc変異は、N297Aであり得る。代替的に、または加えて、1つ以上の変異は、IgG2であり得る。IgG2での1つ以上のFc変異は、V234A、V237A、または両方であり得る。

【0138】

標的化抗体または抗体断片は、Fcヌル免疫グロブリンまたはその断片であり得る。

【0139】

標的化抗体または抗体の抗原結合部分は、Fabであり得る。いくつかの実施形態では、本明細書で記載されるsCAR-T細胞の中央テナントは、標的細胞およびsCARとのみ相互作用し、いかなる他の免疫受容体または細胞型とも相互作用しない、CAR-ID移植スイッチの直行性である。直行性の不足は、オフターゲット効果を引き起こす潜在性を有する。したがって、いくつかの実施形態では、Fabsは、Fcドメインのそれらの不足が、Fc受容体媒介のオフターゲット結合の可能性を除去するため所望であり得る。いくつかの実施形態では、それらの小型およびより短い半減期(Fabに対しておよそ1~5時間対IgGに対して10~20日は、臨床翻訳においてより良好な腫瘍浸透、およびsCAR-T細胞活性へのより大きな時間的制御を提供する。加えて、Fabは、結合価、オフレート、または組織分布において、IgGとは異なり得る。

【0140】

標的化抗体断片は、ヒト、完全にヒト、ヒト化され、ヒト操作された、非ヒト、および/またはキメラ抗体であり得る。非ヒト抗体は、ヒト化され、免疫原性をヒトに減少し得るが、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保持する。キメラ抗体は、別個の抗体に対して元々コードされた2つ以上の抗体遺伝子の結合を通して産生される、抗体を指し得る。キメラ抗体は、第1の抗体からの少なくとも1つのアミノ酸と、第2の抗体からの少なくとも1つのアミノ酸とを含み得、第1および第2の抗体は異なる。抗体または抗体断片の少なくとも一部分は、牛種、ヒト種、またはマウス種からであり得る。抗体または抗体断片の少なくとも一部分は、ラット、ヤギ、モルモット、またはウサギからであり得る。抗体または抗体断片の少なくとも一部分は、ヒトからであり得る。抗体または抗体断片の少なくとも一部分は、カニクイザルからであり得る。

【0141】

標的化抗体または抗体断片は、哺乳類、鳥、魚、両生類、または爬虫類からの抗体または抗体断片に基づくか、またはそれから誘導され得る。哺乳類は、肉食動物、げっ歯類、像、有袋類、ウサギ、コウモリ、霊長類、アシカ、アリクイ、クジラ、有蹄類および偶蹄類を含むが、これらに限定されない。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ヤギ、またはブタであり得る。

【0142】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるヒト化されたCAR-ECスイッチ上に含まれる標的化部分は、ヒト化される。いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるヒト化されたCAR-ECスイッチ上に含まれる標的化部分は、ヒト化され、それはCD19に結合する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、特異的にCD19に結合する(すなわち、非実質的なオフターゲット結合が起こるか、または観察可能である)。いくつかの実施形態では、標的化部分は、抗CD19抗体、または抗CD19抗体の抗原結合断片である。特定の実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗CD19抗体、またはヒト化された抗CD19抗体の抗原結合断片(例えば、本明細書で開示される、ヒト化された抗CD19抗体またはその抗原結合断片の超のうちのいずれか1つ)を含むか、またはそれから成る。特定の実施形態では、標的化部分は、抗CD19マウスクローンFMC63抗体のヒト化された形態を含む。例えば、いくつかの実施形態では、標的化部分は、aを含む。

【0143】

標的化抗体または抗体断片は、非限定的な例として、C D 1 9、H e r 2、C L L 1、C D 3 3、C D 1 2 3、E G F R、E G F R v I I I、C D 2 0、C D 2 2、C S 1、B C M A、C E A、またはその断片から選択される抗原を標的とする。抗原は、野生型抗原を含み得る。抗原は、1つ以上の変異を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、B細胞標的化部分であり得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C D 1 9抗体または抗体断片であり得る。抗C D 1 9抗体または抗体断片は、抗体クローンh u B 4（例えば、配列番号2 2 3～2 2 4を参照されたい）、F M C 6 3（例えば、配列番号2～1 5、1 7～2 5、1 8 4～1 8 5を参照されたい）、および1 D 3（例えば、配列番号2 0 7～2 0 8を参照されたい）から選択され得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C L L 1抗体または抗体断片であり得る。抗C L L 1抗体または抗体断片は、抗体クローン1 0 7 5 . 7（例えば、配列番号1 9 3～1 9 4を参照されたい）であり得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C D 1 2 3抗体または抗体断片であり得る。抗C D 1 2 3抗体または抗体断片は、抗体クローン3 2 7 1 6（例えば、配列番号2 3 9～2 4 0を参照されたい）、および2 6 2 9 2（例えば、配列番号2 4 1～2 4 2を参照されたい）から選択され得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C D 2 2抗体または抗体断片であり得る。抗C D 2 2抗体または抗体断片は、抗体クローンm 9 7 2（例えば、配列番号2 1 1～2 1 2を参照されたい）、およびm 9 7 1（例えば、配列番号2 0 9～2 1 0を参照されたい）から選択され得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C D 2 0抗体または抗体断片であり得る。抗C D 2 0抗体または抗体断片は、抗体クローンO F A（例えば、配列番号2 1 9～2 2 0を参照されたい）、R T X（例えば、配列番号2 1 5～2 1 6を参照されたい）、およびG A 1 0 1（例えば、配列番号2 1 7～2 1 8を参照されたい）から選択され得る。標的化抗体または抗体断片は、抗B C M A抗体または抗体断片であり得る。抗B C M A抗体または抗体断片は、抗体クローンB C M A - 9 8（例えば、配列番号2 2 1～2 2 2を参照されたい）であり得る。標的化抗体または抗体断片は、抗H e r 2抗体または抗体断片であり得る。抗H e r 2抗体または抗体断片は、抗体クローントラスツズマブ（例えば、配列番号1 8 7～1 8 8を参照されたい）から選択され得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C S 1抗体または抗体断片であり得る。抗C S 1抗体または抗体断片は、抗体クローンエロツズマブ（例えば、配列番号2 4 3～2 4 4を参照されたい）であり得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C D 3 3抗体または抗体断片であり得る。抗C D 3 3抗体または抗体断片は、抗体クローンh M 1 9 5（例えば、配列番号2 5 9～2 6 0を参照されたい）、およびH P 6 7 . 6（例えば、配列番号2 3 7～2 3 8を参照されたい）から選択され得る。標的化抗体または抗体断片は、抗E G F R抗体または抗体断片であり得る。抗E G F R抗体または抗体断片は、クローンC 2 2 5（例えば、配列番号1 9 1～1 9 2を参照されたい）であり得る。標的化抗体または抗体断片は、抗E G F R v I I I抗体または抗体断片であり得る。抗E G F R v I I I抗体または抗体断片は、クローンH u 8 0 6（例えば、配列番号1 9 9～2 0 0を参照されたい）であり得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C E A抗体または抗体断片であり得る。抗C E A抗体または抗体断片は、抗体クローンA 5 B 7（例えば、配列番号2 2 5～2 2 6を参照されたい）であり得る。それぞれスイッチの発現は、重鎖および軽鎖を必要とする。いくつかの実施形態では、それぞれスイッチの発現は、重鎖および軽鎖遺伝子を1つ以上の発現細胞（例えば、H E K）に共トランスフェクトすることを必要とする。C A R - I Dは、重鎖のみに位置し、一価のスイッチを提供し得る。C A R - I Dは、軽鎖のみに位置し、一価のスイッチを提供し得る。C A R - I Dは、重鎖および軽鎖の両方に位置し、二価のスイッチを提供し得る。C A R - I Dは、重鎖および軽鎖の両方に位置し、多価のスイッチを提供し得る。

【0 1 4 4】

標的化抗体または抗体断片は、抗C D 1 9抗体またはその断片であり得る。標的化ポリペプチドは、抗C D 2 2抗体であり得る。標的化ポリペプチドは、抗B C M A抗体またはその断片であり得る。標的化ポリペプチドは、抗C S 1抗体またはその断片であり得る。標的化ポリペプチドは、抗E G F R v I I I抗体またはその断片であり得る。標的化ポリペプチドは、抗H e r 2抗体またはその断片であり得る。標的化ポリペプチドは、抗C D

10

20

30

40

50

20 抗体または抗体断片を含み得る。標的化ポリペプチドは、リツキシマブを含み得る。標的化ポリペプチドは、抗 E G F R 抗体または抗体断片を含み得る。標的化ポリペプチドは、抗 C E A 抗体または抗体断片を含み得る。標的化ポリペプチドは、抗 C L L 1 抗体または抗体断片を含み得る。標的化ポリペプチドは、抗 C D 1 2 3 抗体または抗体断片を含み得る。標的化ポリペプチドは、抗 C D 3 3 抗体または抗体断片を含み得る。標的化ポリペプチドは、抗 E p C A M 抗体またはその断片を含み得ない。

【0145】

標的化抗体または抗体断片は、任意の市販の抗体から選択され得る。標的化抗体または抗体断片は、アドトラスツズマブエムタンシン、アレムツズマブ、ペバシズマブ、ブレンツキシマブ、ベドチン、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、イビリムマブ、イブリツモマブ、チウセタン、パニツムマブ、セツキシマブ、アービタックス、リツキシマブ、トラスツズマブおよびそれらの断片から選択され得る。

10

【0146】

標的化抗体または抗体断片は、抗 C D 1 9 抗体またはその断片を含み得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C D 1 9 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 C D 1 9 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 1 8 4 に基づくか、またはそれから誘導されるヌクレオチド配列によってコードされ得る。ヌクレオチド配列は、配列番号 1 8 4 と、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C D 1 9 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 C D 1 9 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 1 8 5 に基づくか、またはそれから誘導される配列によってコードされ得る。ヌクレオチド配列は、配列番号 1 8 5 と、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得る。

20

【0147】

抗 C D 1 9 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 2 0 7 および 2 2 3 から選択される配列に基づくか、またはそれから誘導されるヌクレオチド配列によってコードされ得る。軽鎖のヌクレオチド配列は、配列番号 2 0 7 および 2 2 3 から選択される配列と、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C D 1 9 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 C D 1 9 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 2 0 8 および 2 2 4 から選択される配列に基づくか、またはそれから誘導される配列によってコードされ得る。重鎖のヌクレオチド配列は、配列番号 2 0 8 および 2 2 4 から選択される配列と、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得る。

30

40

【0148】

標的化抗体または抗体断片は、抗 C D 1 9 抗体またはその断片を含み得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C D 1 9 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 C D 1 9 抗体または断片の軽鎖は、配列番号 2 5 および 2 0 3 から選択される配列に基づくか、またはそれから誘導されるアミノ酸配列を含み得る。アミノ酸配列は、配列番号 2 5 および 2 0 3 と、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 %

50

または約 2 % 同一であり得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C D 1 9 またはその断片の重鎖を含み得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C D 1 9 I g G の重鎖を含み得る。抗 C D 1 9 I g G の重鎖は、配列番号 1 5 および 2 0 4 から選択される配列に基づくか、またはそれから誘導される配列を含み得る。アミノ酸配列は、配列番号 1 5 および 2 0 4 から選択される配列と、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C D 1 9 F a b の重鎖を含み得る。抗 C D 1 9 F a b の重鎖は、配列番号 2 0 5 に基づくか、またはそれから誘導される配列を含み得る。標的化抗体またはその断片は、配列番号 2 0 5 と、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得るアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る抗 C D 1 9 F a b の重鎖を含み得る。

10

【 0 1 4 9 】

標的化抗体またはその断片は、抗 C L L 1 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 C L L 1 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 1 9 3 によってコードされ得る。抗 C L L 1 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 1 9 3 と、少なくとも約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一である配列によってコードされ得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C L L 1 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 C L L 1 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 1 9 4 によってコードされ得る。抗 C L L 1 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 1 9 4 と、少なくとも約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一である配列によってコードされ得る。

20

【 0 1 5 0 】

標的化抗体またはその断片は、抗 C D 2 2 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 C D 2 2 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 1 0、1 2、および 1 4 から選択される配列によってコードされ得る。抗 C D 2 2 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 1 0、1 2、および 1 4 から選択される配列と、少なくとも約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一である配列によってコードされ得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C D 2 2 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 C D 2 2 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 2 1 1 および 2 1 3 から選択される配列であり得る。抗 C D 2 2 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 2 1 1、2 1 3 から選択される配列と、少なくとも約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一である配列によってコードされ得る。

30

40

【 0 1 5 1 】

標的化抗体またはその断片は、抗 C D 2 0 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 C D 2 0 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 1 8 9、2 1 6、2 1 8、および 2 2 0 から選択される配列によってコードされ得る。抗 C D 2 0 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 1 8 9、2 1 6、2 1 8、および 2 2 0 から選択される配列と、少なくとも約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %

50

%、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。標的化抗体またはその断片は、抗 CD20 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 CD20 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 190、215、217、および 219 から選択される配列であり得る。抗 CD20 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 190、215、217、および 219 から選択される配列と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチは、配列番号 190、215、217、および 219 の重鎖、および配列番号 189、216、218、および 220 の軽鎖、もしくはそれらのホモログ、またはそれらの断片を含み得る。

10

【0152】

標的化抗体またはその断片は、抗 Her2 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 Her2 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 187 によってコードされ得る。抗 Her2 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 187 と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。標的化抗体またはその断片は、抗 Her2 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 Her2 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 188 によってコードされ得る。抗 Her2 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 188 と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチは、配列番号 188 の重鎖、および配列番号 187 の軽鎖、もしくはそれらのホモログ、またはそれらの断片を含み得る。

20

【0153】

標的化抗体またはその断片は、抗 BCMA 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 BCMA 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 222 によってコードされ得る。抗 BCMA 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 222 と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。標的化抗体またはその断片は、抗 BCMA 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 BCMA 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 221 から選択される配列によってコードされ得る。抗 BCMA 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 221 から選択される配列と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチは、配列番号 221 の重鎖、および配列番号 222 の軽鎖、もしくはそれらのホモログ、またはそれらの断片を含み得る。

30

40

【0154】

標的化抗体またはその断片は、抗 CE A 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 CE A 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 226 によってコードされ得る。抗 CE A 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 226 と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %

50

、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C E A 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 C E A 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 225 によってコードされ得る。抗 C E A 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 225 と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチは、配列番号 225 の重鎖、および配列番号 226 の軽鎖、もしくはそれらのホモログ、またはそれらの断片を含み得る。

10

【 0 1 5 5 】

標的化抗体またはその断片は、抗 C S 1 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 C S 1 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 243 によってコードされ得る。抗 C S 1 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 243 と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C S 1 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 C S 1 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 244 によってコードされ得る。抗 C S 1 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 244 と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチは、配列番号 244 の重鎖、および配列番号 243 の軽鎖、もしくはそれらのホモログ、またはそれらの断片を含み得る。

20

【 0 1 5 6 】

標的化抗体またはその断片は、抗 C D 3 3 抗体またはその断片の軽鎖を含み得る。抗 C D 3 3 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 195 によってコードされ得る。抗 C D 3 3 抗体またはその断片の軽鎖は、配列番号 195 と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。標的化抗体またはその断片は、抗 C D 3 3 抗体またはその断片の重鎖を含み得る。抗 C D 3 3 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 196 によってコードされ得る。抗 C D 3 3 抗体またはその断片の重鎖は、配列番号 196 と、少なくとも約 99 %、約 98 %、約 97 %、約 96 %、約 95 %、約 92 %、約 90 %、約 85 %、約 80 %、約 75 %、約 70 %、約 65 %、約 60 %、約 55 %、約 50 %、約 45 %、約 40 %、約 35 %、約 30 %、約 25 %、約 20 %、約 15 %、約 10 %、約 5 %または約 2 %同一である配列によってコードされ得る。キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチは、配列番号 196 の重鎖、および配列番号 195 の軽鎖、もしくはそれらのホモログ、またはそれらの断片を含み得る。

30

40

【 0 1 5 7 】

標的化抗体または抗体断片は、配列番号 184 ~ 196、207 ~ 236 から選択されるヌクレオチド配列を含み得る。標的化ポリペプチドは、配列番号 184 ~ 196、207 ~ 236 から選択されるヌクレオチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。標的化抗体または抗体断片は、配列番号 184 ~ 196、207 ~ 236 から選択されるヌクレオチド配列のヒト化された形態を含み得る。

【 0 1 5 8 】

50

標的化抗体または抗体断片は、配列番号 2 ~ 15、17 ~ 25、27 ~ 35、197 ~ 206、237 ~ 244、246 ~ 266 から選択されるアミノ酸配列を含み得る。標的化ポリペプチドは、配列番号 2 ~ 15、17 ~ 25、27 ~ 35、197 ~ 206、237 ~ 244、246 ~ 266 から選択されるアミノ酸配列に基づくか、またはそれから誘導され得る。標的化抗体または抗体断片は、配列番号 2 ~ 15、17 ~ 25、27 ~ 35、197 ~ 206、237 ~ 244、246 ~ 266 から選択されるアミノ酸配列のヒト化された形態を含み得る。

【0159】

したがって、標的化部分は、例えば、CD19 に結合する免疫グロブリン (Ig) であり得る。免疫グロブリンは、IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、その抗原結合断片、およびそれらの修飾から選択され得る。免疫グロブリンは、IgG であり得る。IgG は、IgG1 であり得る。IgG は、IgG2 であり得る。IgG は、スイッチに結合する内在性 T 細胞 FcR を調節するための 1 つ以上の Fc 変異を有し得る。IgG は、FcR 陽性細胞の FcR への Fc 結合能力を除去するための 1 つ以上の Fc 変異を有し得る。Fc 結合能力の除去は、キメラ受容体 EC を FcR 陽性細胞へ架橋する機会を減少し得る。キメラ受容体 EC の FcR 陽性細胞への架橋は、標的細胞の非存在下でキメラ受容体 EC を活性化するのである。そのようにして、キメラ受容体 EC スwitch に結合する内在性 T 細胞 FcR を調節することは、非効果的または望ましくない免疫応答を減少し得る。1 つ以上の Fc 変異は、グリコシル化部位を除去し得る。1 つ以上の Fc 変異は、E233P、L234V、L235A、d e l G236、A327G、A330S、P331S、N297Q およびそれらの任意の組み合わせから選択され得る。1 つ以上の Fc 変異は、IgG1 であり得る。IgG1 での 1 つ以上の Fc 変異は、L234A、L235A、または両方であり得る。代替的に、または加えて、IgG1 での 1 つ以上の Fc 変異は、L234A、L235E、または両方であり得る。代替的に、または加えて、IgG1 での 1 つ以上の Fc 変異は、N297A であり得る。代替的に、または加えて、1 つ以上の変異は、IgG2 であり得る。IgG2 での 1 つ以上の Fc 変異は、V234A、V237A、または両方であり得る。

【0160】

標的化部分は、CD19、またはその抗原結合断片に結合する Fc ヌル免疫グロブリンであり得る。

【0161】

標的化部分は、ヒト、完全にヒト、ヒト化され、ヒト操作された、非ヒト、および/またはキメラ抗体であり得る。非ヒト抗体は、ヒト化され、免疫原性をヒトに減少し得るが、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保持する。キメラ抗体は、別個の抗体に対して元々コードされた 2 つ以上の抗体遺伝子の結合を通して産生される抗体を指し得る。キメラ抗体は、第 1 の抗体からの少なくとも 1 つのアミノ酸、および第 2 の抗体からの少なくとも 1 つのアミノ酸を含み得、第 1 および第 2 の抗体は、異なる。標的化部分の少なくとも一部分は、ウシ種、ヒト種、またはマウス種からであり得る。標的化部分の少なくとも一部分は、ラット、ヤギ、モルモット、またはラビットからであり得る。標的化部分の少なくとも一部分は、ヒトからであり得る。標的化部分の少なくとも一部分は、カニクイザルからであり得る。標的化部分は、ヒト化された単一のドメイン抗体であり得る。単一のドメイン抗体は、ヒト化されたラクダ科であり得る。

【0162】

標的化部分は、例えば、哺乳類、鳥、魚、両生類、爬虫類からの、抗 CD19 抗体または CD19 結合抗体断片に基づくか、またはそれから誘導され得る。哺乳類は、肉食動物、げっ歯類、像、有袋類、ウサギ、コウモリ、霊長類、アシカ、アライグマ、クジラ、有蹄類および偶蹄類を含むが、これらに限定されない。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ヤギ、またはブタであり得る。

【0163】

標的化部分は、ヒト化された抗 CD19 抗体またはその抗原結合断片を含み得る。標的

10

20

30

40

50

化部分は、ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合断片を含み得る。抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合断片は、抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合断片のヒト化された軽鎖を含み得る。標的化部分は、F M C 6 3 抗体（配列番号 2 5）またはその抗原結合断片のヒト化された軽鎖を含み得る。抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合断片は、F M C 6 3 抗体またはその抗原結合断片のヒト化された軽鎖を含み得る。抗 C D 1 9 抗体または抗原結合断片のヒト化された軽鎖は、配列番号 1 7 ~ 2 5 のうちのいずれか 1 つ、または配列番号 2 7 ~ 3 5 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み得る。抗 C D 1 9 抗体または抗原結合断片のヒト化された軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号 1 7 ~ 2 5 のうちのいずれか 1 つ、または配列番号 2 7 ~ 3 5 のうちのいずれか 1 つと、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得る。標的化部分は、抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合断片のヒト化された重鎖を含み得る。抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合断片は、抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合断片のヒト化された重鎖を含み得る。標的化部分は、F M C 6 3 抗体（配列番号 1 5）またはその抗原結合断片のヒト化された重鎖を含み得る。抗 C D 1 9 抗体またはその抗原結合断片は、F M C 6 3 抗体またはその抗原結合断片のヒト化された重鎖を含み得る。抗 C D 1 9 抗体または抗原結合断片のヒト化された重鎖は、配列番号 2 ~ 1 5 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み得る。抗 C D 1 9 抗体または抗原結合断片のヒト化された重鎖のアミノ酸配列は、配列番号 2 ~ 1 5 のうちのいずれか 1 つと、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得る。標的化部分は、F M C 6 3 抗体（配列番号 1 5）のヒト化された軽鎖およびヒト化された重鎖を含み得る。例えば、標的化部分は、配列番号 1 7 ~ 2 4 のうちの 1 つ、または配列番号 2 7 ~ 3 4 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むか、またはそれから成るヒト化された軽鎖を含み得、標的化部分は、配列番号 2 ~ 1 4 のうちの 1 つのアミノ酸配列を含むか、またはそれから成るヒト化された重鎖を含み得る。

【 0 1 6 4 】

ヒト化

ヒト化のための多数の方法が、当該技術分野で知られ、本明細書で開示される C A R - E C スイッチに含まれるヒト化された抗体（例えば、ヒト化された抗 C D 1 9 抗体もしくは抗原結合断片、またはそれらの部分）を産生するために許容可能である。モノクローナル抗体をヒト化する 4 つの一般工程がある。これらは、（ 1 ）開始抗体軽および重可変ドメインのヌクレオチドおよび予測されるアミノ酸配列を決定することと、（ 2 ）ヒト化された抗体を設計すること、すなわち、ヒト化プロセスの間でどの抗体フレームワーク領域を使用するかを決定することと、（ 3 ）実際のヒト化方法／技術と、（ 4 ）ヒト化された抗体のトランスフェクションおよび発現とである。例えば、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号、同第 5 , 8 0 7 , 7 1 5 号、同第 5 , 8 6 6 , 6 9 2 号、同第 6 , 3 3 1 , 4 1 5 号、同第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号、同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号、および同第 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号を参照されたい。

【 0 1 6 5 】

非ヒト免疫グロブリンから誘導される抗原結合部位を含む、多くの「ヒト化された」抗体分子が記載されており、げっ歯類または修飾されたげっ歯類の V 領域と、ヒト定常ドメインに融合されるそれらの関連する C D R とを有するキメラ抗体を含む。例えば、W i n t e r e t a l . , 1 9 9 1 , N a t u r e 3 4 9 : 2 9 3 - 2 9 9、L o b u g l i o e t a l . , 1 9 8 9 , P r o c . N a t . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 4 2 2 0 - 4 2 2 4、S h a w e t a l . , 1 9 8 7 , J I m m u n o l . 1 3 8 : 4 5 3 4 - 4 5 3 8、および B r o w n e t a l . , 1 9 8 7 , 癌 R e s . 4 7 : 3 5 7 7 - 3 5 8 3 を産生参照されたい。他の参照は、適切なヒト抗体定常ドメインとの融合前

に、フレームワーク領域 (F R) をサポートするヒトに移植されたげっ歯類 C D R を記載する。例えば、R i e c h m a n n e t a l . , 1 9 8 8 , N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7、V e r h o e y e n e t a l . , 1 9 8 8 , S c i e n c e 2 3 9 : 1 5 3 4 - 1 5 3 6、および J o n e s e t a l . , 1 9 8 6 , N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 を参照されたい。別の参照は、組換え的に操作されたげっ歯類フレームワーク領域によってサポートされるげっ歯類 C D R を記載する。例えば、ヨーロッパ特許公開 N o . 0 5 1 9 5 9 6 を参照されたい。これらの「ヒト化された」分子は、ヒト患者におけるそれらの部分の療法適用の期間および効果を限定するげっ歯類抗ヒト抗体分子に対して、望まれない免疫学的応答を最小化するように設計される。例えば、抗体定常領域は、それが免疫学的に不活性 (例えば、補体溶解を誘引しない) になるように操作され得る。例えば、P C T 公開第 W O 9 9 / 5 8 5 7 2 号、英国特許出願第 9 8 0 9 9 5 1 . 8 号を参照されたい。また、利用され得るヒト化抗体の他の方法は、D a u g h e r t y e t a l . , 1 9 9 1 , N u c l . A c i d s R e s . 1 9 : 2 4 7 1 - 2 4 7 6、および米国特許第 6 , 1 8 0 , 3 7 7 号、同第 6 , 0 5 4 , 2 9 7 号、同第 5 , 9 9 7 , 8 6 7 号、同第 5 , 8 6 6 , 6 9 2 号、同第 6 , 2 1 0 , 6 7 1 号、および同第 6 , 3 5 0 , 8 6 1 号、ならびに P C T 公開第 W O 0 1 / 2 7 1 6 0 号によって開示される。

【 0 1 6 6 】

なお別の代替では、完全なヒト抗体は、特異性ヒト免疫グロブリンタンパク質を発現するように操作されている市販のマウスを使用することで、得られ得る。より所望か、またはより頑強な免疫応答を生成するように設計された遺伝子導入動物は、ヒト化された、またはヒト抗体の産生のために使用され得る。かかる技術の例は、A b g e n i x , I n c . (カリフォルニア州、フレモント) からの X e n o m o u s e (商標)、M e d a r e x , I n c . (ニュージャージー州、プリンストン) からの H u M A b - M o u s e (登録商標) および T C M o u s e (商標)、ならびに R e g e n e r o n P h a r m a c e u t i c a l s , I n c . (ニューヨーク州、タリータウン) からの V e l o c I m m u n e (登録商標) マウスである。

【 0 1 6 7 】

代替では、抗体は、組換え的に産生され、かつ当該技術分野で知られる任意の方法を使用して発現され得る。別の代替では、抗体は、ファージディスプレイ技術によって組換え的に産生され得る。例えば、米国特許第 5 , 5 6 5 , 3 3 2 号、同第 5 , 5 8 0 , 7 1 7 号、同第 5 , 7 3 3 , 7 4 3 号、および同第 6 , 2 6 5 , 1 5 0 号、ならびに W i n t e r e t a l . , 1 9 9 4 , A n n u . R e v . I m m u n o l 1 2 : 4 3 3 - 4 5 5 を参照されたい。代替的に、ファージディスプレイ技術 (M c C a f f e r t y e t a l . , 1 9 9 0 , N a t u r e 3 4 8 : 5 5 2 - 5 5 3) は、未免疫のドナーから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ヒト抗体および抗体断片をインビトロで産生するために使用され得る。この技術に従って、抗体 V ドメイン遺伝子は、M 1 3 または f d などの、糸状のバクテリオファージの主要な、またはマイナーなコートタンパク質遺伝子にインフレームでクローン化され、かつファージ粒子の表面上の機能的抗体断片として提示される。糸状の粒子はファージ遺伝子の一本鎖 DNA コピーを含有するため、抗体の機能特性に基づく選択もまた、それらの特性を呈する抗体をコードする遺伝子の選択をもたらす。したがって、ファージは、B 細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、様々な形式で実施され得る (例えば、J o h n s o n , K e v i n S , a n d C h i s w e l l , D a v i d J . , 1 9 9 3 , C u r r e n t O p i n i o n i n 構造的 B i o l o g y 3 : 5 6 4 - 5 7 1 を参照されたい)。V 遺伝子セグメントのいくつかの源は、ファージディスプレイのために使用され得る。C l a c k s o n e t a l . , 1 9 9 1 , N a t u r e 3 5 2 : 6 2 4 - 6 2 8 は、免疫化されたマウスの脾臓から誘導される V 遺伝子の小さなランダムな組み合わせのライブラリからの、多様なアレイの抗オキサゾロン抗体を単離した。未免疫ヒトドナーからの V 遺伝子のレパートリーは、コンストラクトされ得、多様なアレイの抗原 (自己抗原を含む) への抗体は、M a r k e t a l . , 1 9 9 1 , J . M o l . B i o l . 2 2 2 : 5 8 1 - 5 9 7、

10

20

30

40

50

または Griffith et al., 1993, EMBO J. 12: 725 - 734 によって記載される技術に従って本質的に単離され得る。天然の免疫応答では、抗体遺伝子は、高い割合で変異（体細胞超変異）を蓄積する。導入される変化のいくつかは、高親和性を与え、高親和性表面免疫グロブリンを提示する B 細胞は、優先的に複製され、続く抗原課題の間に分化される。この天然プロセスは、「鎖シャフリング」として知られる技術を用いることによって模倣され得る (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10: 779 - 783)。この方法では、ファージディスプレイによって得られる「一次」ヒト抗体の親和性は、重鎖および軽鎖 V 領域遺伝子を、未免疫ドナーから得られる V ドメイン遺伝子の天然発生のバリエーション（レパートリー）のレパートリーと続いて入れ替えることによって改善され得る。この技術は、 $pM \sim nM$ の範囲の親和性を有する抗体および抗体断片の産生を可能にする。非常に大型のファージ抗体レパートリー（マザーオブオールライブラリーとしても知られる）を産生する戦略は、Waterhouse et al., 1993, Nucl. Acids Res. 21: 2265 - 2266 によって記載されている。遺伝子シャフリングもまた、ヒト抗体をげっ歯類抗体から誘導するために使用され得、ヒト抗体は、開始げっ歯類抗体と同様の親和性および特異性を有する。「エピトープインプリンティング」としても呼称されるこの方法に従って、ファージディスプレイ技術によって得られるげっ歯類抗体の重鎖または軽鎖 V ドメイン遺伝子は、げっ歯類ヒトキメラを産生するヒト V ドメイン遺伝子のレパートリーで入れ替えられる。抗原上での選択は、機能的抗原結合部位を回復することができる可変領域の単離をもたらす、すなわちエピトープが、パートナーの選択を支配（インプリント）する。プロセスが、残りのげっ歯類 V ドメインを入れ替えるために反復される際、ヒト抗体が得られる（PCT 公開第 WO 93 / 06213 号を参照されたい）。CDR 移植によるげっ歯類抗体の従来のヒト化とは異なり、この技術は、げっ歯類起源のフレームワークまたは CDR 残基を有さない、完全なヒト抗体を提供する。

【0168】

特定の実施形態では、抗体（例えば、抗 CD19 抗体）は、実施例 1 で、本明細書で記載される方法に従ってヒト化される。手短に、この非限定的な例では、FMC63 アミノ酸配列を、IgBLAST (NCBI) を使用して、マウスおよびヒト生殖系列配列と比較し、かつヒトIGHV4-59 内の VH および VL ドメインと比較した際のマウス FMC63 VH および VL ドメイン間のフレームワーク差異の変異を、FMC63 配列において生成し、配列をヒト生殖系列配列とより同一にした。このプロセスは、いくつかのヒト化された重鎖配列（表 3）および軽鎖配列（表 4）の産生をもたらす、次いで、VL への N 末端融合としての CAR-ID の付加を介して、CAR-EC スイッチへと修飾された。ヒト化された重鎖および軽鎖配列の様々な対を含むヒト化されたスイッチを、各々実施例 3 および 4 に記載されるように、CD19 結合親和性に関して、かつ CD19 発現細胞の細胞毒性を誘発する有効性に関して試験した。

【0169】

リンカー

本明細書で開示されるスイッチは、1 つ以上のリンカーを含み得る。リンカーは、標的細胞上のエフェクター細胞の相互作用または効果を促進するのに最適な、スイッチ柔軟性、長さ、または幾何学を提供し得る。本明細書で開示されるスイッチは、2 つ以上のリンカーを含み得る。本明細書で開示されるスイッチは、3 つ以上のリンカーを含み得る。本明細書で開示されるスイッチは、4 つ以上のリンカーを含み得る。本明細書で開示されるスイッチは、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のリンカーを含み得る。2 つ以上のリンカーは、同じであり得る。3 つ以上のリンカーのうち少なくとも 2 つは、同じであり得る。2 つ以上のリンカーは、異なり得る。3 つ以上のリンカーのうち少なくとも 2 つは、異なり得る。

【0170】

リンカーは、ペプチドを含み得る。リンカーは、剛性ペプチド (E A A A K E A A A K E A A A K A (配列番号 163) など) を含み得る。リンカーは、G G G G S (配列番号

10

20

30

40

50

93、 $n = 1$)などの柔軟性ペプチドを含み得る。リンカーは、配列番号93～103、116～137、および163から選択される配列を含み得る。柔軟性および剛性リンカーは、当業者によって理解され、かつChen et al. (Adv Drug Deliv Rev. 2013 65: 1357-1369、参照によりその全体が本明細書に組込まれる)に記載される。スイッチリンカー設計は、発現収率およびスイッチの効力に対して決定的である。リンカーは、CAR-IDを、融合および移植によって標的化抗体配列に接続し得る。リンカーの設計は、スイッチの安定性(例えば、熱安定性、タンパク分解性安定性)に直接影響し得る。リンカーはさらに、どのようにしてペプチドが、特にスイッチへの距離および相対的配向においてCARに表されるかを説明する。例えば、柔軟性リンカーは、多くの異なる配向を表し得るが、剛性リンカーは、 α ヘリックスを形成し、かつ抗体に対するペプチドエピトープの一配向のみを表し得る。

10

【0171】

リンカーは、少なくとも約1、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、または少なくとも約10個のアミノ酸の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約70、約80、約90または約100個のアミノ酸を含み得る。

【0172】

リンカーは、CAR-ID(例えば、ポリペプチドCAR-ID)のN末端またはC末端に位置し、CAR-IDを標的化部分に移植し得る。第1のリンカーは、CAR-ID(例えば、ポリペプチドCAR-ID)のN末端に融合され得、第2のリンカーは、CAR-IDのC末端に融合され得る。CAR-IDは、CAR-IDの両端上のリンカーと共に、標的化部分の内部部位に移植され得る。

20

【0173】

リンカーは、標的化部分(例えば、抗CD19抗体またはその抗原結合部分)のN末端またはC末端に位置し、標的化部分をCAR-IDに移植し得る。第1のリンカーは、標的化部分のN末端に融合され得、かつ第2のリンカーは、標的化部分のC末端に融合され得る。標的化部分は、標的化部分の両端上のリンカーと共にCAR-IDの内部部位に移植され得る。

【0174】

リンカーは、配列(GGGGS) $_n$ 、(配列番号93)から成り得、 n は、1、2、3、4、5、またはそれ以上であり得る。リンカーは、配列(GGS) $_n$ 、(配列番号95)から成り得、 n は、1、2、3、4、5、またはそれ以上であり得る。リンカーは、配列番号93～103から選択される配列を含み得る。リンカーは、配列GGGGS(配列番号93)を含み得る。

30

【0175】

いくつかの実施形態では、リンカーは、標的化部分に融合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、CAR-IDに融合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、CAR-IDおよび標的化部分に融合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列(GGGGS) $_n$ 、(配列番号93)から成り得、 n は、1、2、3、4、5、またはそれ以上であり得、かつリンカーは、CAR-IDに融合されるか、標的化部分に融合されるか、あるいはCAR-IDおよび標的化部分の両方に融合される。

40

【0176】

リンカーは、二官能性リンカーであり得る。リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーであり得る。リンカーは、ホモ二官能性リンカーであり得る。リンカーは、1つ以上のポリエチレングリコール(PEG)サブユニットをさらに含む。リンカーは、少なくとも4つのPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、少なくとも10のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、少なくとも20のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、少なくとも30のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、一端にアジドを含み得る。リンカーは、一端にアミノオキシを含み得る。リンカーは、アジドPEGアミノオキシリ

50

ンカーであり得る。リンカーは、一端にシクロオクチンを含み得る。リンカーは、PEGシクロオクチンリンカーであり得る。リンカーは、トリアゾールを含み得る。トリアゾールは、1, 2, 3 - トリアゾールまたは1, 2, 4 - トリアゾールであり得る。リンカーは、NHSEステルリンカーであり得る。リンカーは、TriAリンカーであり得る。リンカーは、CAR-IDに結合され得る。リンカーは、オキシム連結によってCAR-IDに結合され得る。

【0177】

リンカーをコンストラクトするいくつかの追加の例示的なリンカーおよび方法は、WO 2014/153002に見出され得、参照によりその全体が本明細書に組込まれる。

【0178】

リンカーは、CAR-IDに結合され得る。リンカーは、標的化部分に結合され得る。リンカーは、CAR-IDを標的化部分に結合し得る。1つ以上のリンカーは、1つ以上のCAR-IDを1つ以上の標的化部分に結合し得る。1つ以上のリンカーは、1つ以上のCAR-IDを、部位特異的方法で1つ以上の標的化部分に結合し得る。部位特異的方法での結合は、1つ以上のCAR-IDを、1つ以上の標的化部分上の予め決定された部位に結合することを含み得る。代替的に、または加えて、部位特異的方法での結合は、1つ以上のCAR-IDを、1つ以上の標的化部分内の非天然のアミノ酸に結合することを含み得る。1つ以上のリンカーは、1つ以上のCAR-IDを、部位非依存的方法で1つ以上の標的化部分に結合し得る。部位非依存的方法での結合は、1つ以上のCAR-IDを、1つ以上の標的化部分上のランダムな部位に結合することを含み得る。CAR-IDは、部位特異的方法で、1、2、3、4、5またはそれ以上の標的化部分に結合され得る。CAR-IDは、部位非依存的方法で、1、2、3、4、5またはそれ以上の標的化部分に結合され得る。代替的に、標的化部分は、部位特異的方法で、1、2、3、4、5またはそれ以上のCAR-IDに結合され得る。部位特異的方法での結合は、1つ以上の標的化部分を、1つ以上のCAR-ID上の予め決定された部位に結合することを含み得る。標的化部分は、部位非依存的方法で、1、2、3、4、5またはそれ以上のCAR-IDに結合され得る。部位非依存的方法での結合は、1つ以上の標的化部分を、1つ以上のCAR-ID上のランダムな部位に結合することを含み得る。

【0179】

1つ以上のリンカーは、CAR-ID、標的化部分、またはそれらの組み合わせに結合され得る。1つ以上のリンカーは、CAR-IDに結合され、式IIA: L1-Xまたは式II: X-L1の1つ以上スイッチ中間体を形成し得、式中、XがCAR-IDであり、かつL1がリンカーである。1つ以上のリンカーは、オキシムによってCAR-IDに結合され得る。1つ以上のリンカーは、シクロオクチン、シクロプロペン、アリアル/アルキルアジド、トランスシクロオクテン、ノルボルネン、テトラジン、またはそれらの組み合わせによってCAR-IDに結合され得る。1つ以上のリンカーは、共有結合性結合、非共有結合性結合、イオン結合、またはそれらの組み合わせによってCAR-IDに結合され得る。1つ以上のリンカーは、標的化部分に結合され、式III A: L1-Yまたは式III: Y-L1の1つ以上スイッチ中間体を形成し得、式中、Yが標的化部分であり、かつL1がリンカーである。1つ以上のリンカーは、オキシムによって標的化部分に結合され得る。1つ以上のリンカーは、シクロオクチン、シクロプロペン、アリアル/アルキルアジド、トランスシクロオクテン、ノルボルネン、テトラジン、またはそれらの組み合わせによって標的化部分に結合され得る。1つ以上のリンカーは、共有結合性結合、非共有結合性結合、イオン結合、またはそれらの組み合わせによって標的化部分に結合され得る。

【0180】

標的化部分は、1個以上のアミノ酸を含み得る。1個以上のアミノ酸は、天然のアミノ酸を含み得る。リンカーは、標的化部分上の1個以上の天然のアミノ酸と結合し得る。1つ以上のアミノ酸は、1個以上の非天然のアミノ酸を含み得る。リンカーは、標的化部分上の1個以上の非天然のアミノ酸と結合し得る。リンカーは、部位特異的変異原性の生成

10

20

30

40

50

物であるアミノ酸と結合し得る。リンカーは、部位特異的変異原性の生成物であるシステインと結合し得る。リンカー（例えば、置換されたマレイミド）は、部位特異的変異原性の生成物であるシステインならびに天然のシステイン残基と結合し得る。2つのリンカーは、それぞれ補完的な反応性官能基と共に、互いに結合し得る。

【0181】

1個以上のリンカーは、切断可能リンカーであり得る。1個以上のリンカーは、非切断可能リンカーであり得る。1個以上のリンカーは、柔軟性リンカーであり得る。1個以上のリンカーは、非柔軟性リンカーであり得る。リンカーは、二官能性リンカーであり得る。二官能性リンカーは、一端に第1の官能基を、かつ第2の末端に第2の官能基を含み得る。二官能性リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーであり得る。ヘテロ二官能性リンカーは、一端に第1の官能基を、かつ第2の末端に第2の官能基を含み得、第1の官能基および第2の官能基は異なる。二官能性リンカーは、ホモ二官能性リンカーであり得る。ホモ二官能性リンカーは、一端に第1の官能基を、かつ第2の末端に第2の官能基を含み得、第1の官能基および第2の官能基は同じである。

10

【0182】

リンカーは、化学結合を含み得る。リンカーは、官能基を含み得る。リンカーは、ポリマーを含み得る。ポリマーは、ポリエチレングリコールであり得る。リンカーは、アミノ酸を含み得る。

【0183】

リンカーは、1個以上の官能基を含み得る。リンカーは、2個以上の官能基を含み得る。リンカーは、3個以上の官能基を含み得る。リンカーは、4個以上の官能基を含み得る。リンカーは、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の官能基を含み得る。リンカーは、二官能性エチレングリコールリンカーであり得る。

20

【0184】

リンカーは、エチレングリコールを含み得る。リンカーは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、もしくはは約20個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。リンカーは、4個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。リンカーは、8個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。リンカーは、10個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。リンカーは、12個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。リンカーは、15個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。リンカーは、20個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。リンカーは、25個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。リンカーは、30個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。リンカーは、35個以上のエチレングリコールサブユニットを含み得る。

30

【0185】

リンカーは、PEGを含み得る。リンカーは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、または約20個以上のポリエチレングリコール(PEG)サブユニットを含み得る。リンカーは、4個以上のポリエチレングリコール(PEG)サブユニットを含み得る。リンカーは、8個以上のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、10個以上のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、12個以上のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、15個以上のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、20個以上のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、25個以上のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、30個以上のPEGサブユニットを含み得る。リンカーは、35個以上のPEGサブユニットを含み得る。

40

【0186】

リンカーは、トリアゾールを含み得る。トリアゾールは、1,2,3-トリアゾールであり得る。トリアゾールは、1,2,4-トリアゾールであり得る。

【0187】

50

リンカーは、アリールまたはヘテロアリールを含み得る。リンカーは、アリールを含み得る。アリールは、フェニルであり得る。フェニルは、二置換され得る。二置換されたフェニルは、1, 4 - 二置換フェニルであり得る。二置換されたフェニルは、1, 3 - 二置換フェニルであり得る。フェニルは、三置換され得る。フェニルは、四置換され得る。置換されたフェニルの置換基のうちの2個は、NO₂であり得る。場合によっては、リンカーは、ベンジル置換基を含まない。

【0188】

リンカーは、1個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、複数のPEGユニットを含み得る。リンカーは、2個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、3個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、4個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、5個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、6個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、7個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、8個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、9個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、10個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、11個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、12個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、13個以上のPEGユニットを含み得る。リンカーは、14個以上のPEGユニットを含み得る。

10

【0189】

リンカーは、一端にアミドを含み得る。リンカーは、一端にアミドを、かつ他方の末端にアミンを含み得る。リンカーは、一端にアミドを、かつ他方の末端にトリアゾールを含み得る。

20

【0190】

1つ以上のリンカーは、1, 4 - ジカルボキシル部分を含み得る。1つ以上のリンカーは、1, 3 - ジニトロ置換フェニル部分を含み得る。

【0191】

1つ以上のリンカーは、1つ以上の反応性官能基を含み得る。反応性官能基は、結合パートナー上で補完的な反応性官能基と反応し得る。結合パートナー上の補完的な反応性官能基への、リンカー上の反応性官能基の反応は、リンカーのCAR - ECスイッチへの組込み前に起こり得る。

【0192】

リンカーは、アルコキシ - アミン、ヒドラジン、アリール / アルキルアジド、アルキン、アルケン、テトラジン、ジクロロトリアジン、トレシレート、スクシンイミジルカルボネート、ベンゾトリアゾールカルボネート、ニトロフェニルカルボネート、トリクロロフェニルカルボネート、カルボニルイミダゾール、スクシンイミジルコハク酸、マレイミド、ビニルスルホン、ハロアセトアミド、およびジスルフィドから選択される少なくとも1つの反応性官能基を含み得る。アルケンは、ノルボルネン、トランスシクロオクテン、およびシクロプロペンから選択され得る。リンカーは、少なくとも1つのアルコキシアミンを含み得る。リンカーは、少なくとも1つのアジドを含み得る。リンカーは、少なくとも1つのシクロオクチンを含み得る。リンカーは、少なくとも1つのテトラジンを含み得る。

30

【0193】

1つ以上のリンカーは、1つ以上の終端に、アルコキシアミン（またはアミノオキシ）基、アジド基、および / またはシクロオクチン基を含み得る。1つ以上のリンカーは、一端にアルコキシアミン、かつ他方の末端にアジド基を含み得る。1つ以上のリンカーは、一端にアルコキシアミン、かつ他方の末端にシクロオクチン基を含み得る。アルコキシアミンは、アミノ酸上のケトン基を有する、安定したオキシムを形成し得る。アルコキシアミンは、非天然のアミノ酸上のケトン基を有する安定したオキシムを形成し得る。ケトン基は、p - アセチルフェニルアラニン（pAcF）上にあり得る。

40

【0194】

1つ以上のリンカーは、標的化部分に結合されるリンカーの補完的な反応性官能基を有するCAR - ID上の反応性官能基の反応によって、形成され得る。1つ以上のリンカー

50

は、アミノ酸、またはCAR-IDに結合されるリンカーの補完的な反応性官能基を有する標的化部分上の別の反応性官能基の反応によって形成され得る。1つ以上のリンカーは、標的化部分に結合される別のリンカーを有するCAR-IDに結合されるリンカーの反応によって、形成され得る。

【0195】

リンカーは、生体直交反応の生成物であり得る。例えば、ケトン、アジド、アルキン、アルケン、およびテトラジン側鎖を有するアミノ酸は、ナンセンスおよびフレームシフトコドンに応答して遺伝子的にコードされ得る。これらの側鎖は、生体直交共役反応のための化学ハンドルとして作用し得る (Kim et al., Curr Opin Chem Bio 17: 412-419 (2013)、参照によりその全体が本明細書に組込まれる)。リンカーは、オキシム、テトラゾール、ディールスアルダー付加物、ヘテロディールスアルダー付加物、芳香族置換反応生成物、求核性置換反応生成物、エステル、アミド、カルバミン酸、エーテル、チオエーテル、またはマイケル反応生成物を含み得る。リンカーは、環化付加生成物、メタセシス反応生成物、金属媒介のクロスカップリング反応生成物、ラジカル重合生成物、酸化的カップリング生成物、アシル転移反応生成物、またはフォトクリック反応生成物であり得る。環化付加は、ヒュスゲン環化付加であり得る。環化付加は、無銅[3+2]ヒュスゲン-環化付加であり得る。環化付加は、ディールスアルダー反応であり得る。環化付加は、ヘテロディールスアルダー反応であり得る。リンカーは、酵素媒介の反応の生成物であり得る。リンカーは、トランスグルタミナーゼ媒介の反応の生成物であり得、非限定的な例は、Lin et al., J. Am. Chem. Soc. 128: 4542-4543 (2006) および WO 2013/093809 に記載される。リンカーは、ポリThericsからのThioBridge (登録商標) 技術などの2個のシステイン残基を接続するジスルフィド架橋を含み得る。リンカーは、2個のアミノ酸残基を接続するマレイミド架橋を含み得る。リンカーは、2個のシステイン残基を接続するマレイミド架橋を含み得る。

【0196】

2個以上のリンカーは、連結され得る。2個以上のリンカーは、1つ以上の無銅反応を通して連結され得る。2個以上のリンカーは、1つ以上の環化付加を通して連結され得る。2個以上のリンカーは、1つ以上のヒュスゲン環化付加を通して連結され得る。2個以上のリンカーは、1つ以上の無銅[3+2]ヒュスゲン環化付加を通して連結され得る。2個以上のリンカーは、1つ以上の銅含有反応を通して連結され得る。2個以上のリンカーは、1つ以上のディールスアルダー反応を通して連結され得る。2個以上のリンカーは、1つ以上のヘテロディールスアルダー反応を通して連結され得る。

【0197】

ヒト化されたCAR-ECスイッチは、PCT/US 2016/027997 および PCT/US 2016/027990 (それぞれは参照によりその全体が本明細書に組込まれる) に開示されるように最適化され得る。例えば、ヒト化されたCAR-ECスイッチは、リンカーの長さを調製することによって最適化され得る。ヒト化されたCAR-ECスイッチは、リンカーの異なる長さを含み得る。リンカーは、相対的に短い場合がある。リンカーは、相対的に長い場合がある。1つ以上のリンカーは、約1オングストローム() ~ 約120 の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約5 ~ 約105 の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約10 ~ 約100 の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約10 ~ 約90 の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約10 ~ 約80 の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約10 ~ 約70 の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約15 ~ 約45 の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、27、30オングストローム以上の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約10 以上の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約15オングストローム以上の であり得る。1つ以上のリンカーは、約20 以上の長さであり得る。1つ以上のリンカーは、約110、100、90、85、80、75、70、65、60

、 5 5、 5 0、 4 5、 4 3、 4 2、 4 1、 4 0、 3 9、 3 8、 3 7、 3 6、 3 5、 3 4、 3 3、 3 2、 3 1、 3 0 以下の長さであり得る。 1 つ以上のリンカーは、約 1 0 0 以下の長さであり得る。 1 つ以上のリンカーは、約 8 0 以下の長さであり得る。 1 つ以上のリンカーは、約 6 0 以下の長さであり得る。 1 つ以上のリンカーは、約 4 0 以下の長さであり得る。

【 0 1 9 8 】

リンカーの全長は、約 1 ~ 約 1 2 0 であり得る。リンカーの全長は、約 5 ~ 約 1 0 5 であり得る。リンカーの全長は、約 1 0 ~ 約 1 0 0 であり得る。リンカーの全長は、約 1 0 ~ 約 9 0 であり得る。リンカーの全長は、約 1 0 ~ 約 8 0 であり得る。リンカーの全長は、約 1 0 ~ 約 7 0 であり得る。リンカーの全長は、約 1 5 ~ 約 4 5 であり得る。リンカーの全長は、約 4、 5、 6、 7、 8、 9、 1 0、 1 1、 1 2、 1 3、 1 4、 1 5、 1 6、 1 7、 1 8、 1 9、 2 0、 2 5、 2 7、 3 0 以上であり得る。リンカーの全長は、約 1 0 以上であり得る。リンカーの全長は、約 1 5 以上であり得る。リンカーの全長は、約 2 0 以上であり得る。リンカーの全長は、約 1 1 0、 1 0 0、 9 0、 8 5、 8 0、 7 5、 7 0、 6 5、 6 0、 5 5、 5 0、 4 5、 4 3、 4 2、 4 1、 4 0、 3 9、 3 8、 3 7、 3 6、 3 5、 3 4、 3 3、 3 2、 3 1、 3 0 以下であり得る。リンカーの全長は、約 1 0 0 以下であり得る。リンカーの全長は、約 8 0 以下であり得る。リンカーの全長は、約 6 0 以下であり得る。リンカーの全長は、約 4 0 以下であり得る。リンカーの全長は、約 2 5 以下であり得る。C A R - I D と標的化部分の間の距離は、約 3 0 であり得る。

【 0 1 9 9 】

移植 / 融合スイッチ

C A R - I D が標的化部分に移植されるか、または融合されるスイッチが、本明細書で開示される。C A R - I D は、非抗体タンパク質または非抗体ペプチドを含み得、標的化部分は、標的上の細胞表面分子に結合し得る。細胞表面分子は、抗原を含み得る。標的化部分は、標的化ポリペプチドであり得る。標的化ポリペプチドは、標的化抗体または抗体断片であり得る。抗体断片は、抗体の抗原結合部分であり得る。標的化抗体または抗体断片は、免疫グロブリン (I g) であり得る。免疫グロブリンは、I g G、I g A、I g D、I g E、I g M、その断片またはそれらの修飾から選択され得る。標的化抗体は、標的細胞の細胞表面上の標的に結合し得る。いくつかの実施形態では、標的は、C D 1 9、H e r 2、C L L 1、C D 3 3、C D 1 2 3、E G F R、E G F R v I I I、C D 2 0、C D 2 2、C S 1、B C M A、および C E A から選択され得る。いくつかの実施形態では、本開示は、C A R - I D で移植されたヒト化された標的化部分を提示する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、そこでは抗 C D 1 9 標的化抗体または C D 1 9 結合断片である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗 C D 1 9 標的化抗体またはその C D 1 9 結合断片である。標的化抗体または抗体断片は、免疫グロブリン、F a b、F a b'、F (a b')₂ および s c F v から選択され得る。標的化抗体または抗体断片は、軽鎖を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、重鎖を含み得る。

【 0 2 0 0 】

C A R - I D は、標的化部分 (例えば、標的化抗体または抗体断片の選択されたアミノ酸間) に移植され得る。C A R - I D は、標的化抗体または抗体断片の末端に融合され得る。代替的に、標的化抗体または抗体断片は、C A R - I D に移植されるか、または融合され得る。

【 0 2 0 1 】

C A R - I D は、標的化抗体または抗体断片の軽鎖の N 末端に融合され得る。C A R - I D は、標的化抗体または抗体断片の軽鎖の C 末端に融合され得る。C A R - I D は、標的化抗体または抗体断片の重鎖の N 末端に融合され得る。C A R - I D は、標的化抗体または抗体断片の重鎖の C 末端に融合され得る。C A R - I D は、標的化抗体または抗体断片の V L ドメインの N 末端に融合され得る。C A R - I D は、標的化抗体または抗体断片の V H ドメインの N 末端に融合され得る。C A R - I D は、標的化抗体または抗体断片の

C LドメインのC末端に融合され得る。C A R - I Dは、標的化抗体または抗体断片のF cドメインのC末端に融合され得る。C A R - I Dは、I g GのV LドメインのN末端に融合され得る。C A R - I Dは、I g GのV HドメインのN末端に融合され得る。C A R - I Dは、I g GのC LドメインのC末端に融合され得る。C A R - I Dは、I g GのF cドメインのC末端に融合され得る。C A R - I Dは、F a bのV LドメインのN末端に融合され得る。C A R - I Dは、F a bのV HドメインのN末端に融合され得る。C A R - I Dは、F a bのC LドメインのC末端に融合され得る。C A R - I Dは、F a bのC H₁ドメインのC末端に融合され得る。

【0202】

C A R - I Dは、標的化部分の内部部位（例えば、抗C D 1 9標的化抗体またはC D 1 9結合抗体断片（例えば、標的化抗体または抗体断片の選択されたアミノ酸間））に移植され得る。C A R - I Dは、標的化抗体または抗体断片の重鎖に移植され得る。C A R - I Dは、標的化抗体または抗体断片の軽鎖に移植され得る。C A R - I Dは、標的化抗体または抗体断片の定常ドメイン／領域に移植され得る。C A R - I Dは、標的化抗体または抗体断片の変域ドメイン／領域に移植され得る。C A R - I Dは、F a bの内部部位に移植され得る。C A R - I Dは、免疫グロブリン（例えば、I g G）の内部部位に移植され得る。C A R - I Dは、C Lドメイン、C H₁ドメイン、C H₂ドメイン、C H₃ドメイン、V Lドメイン、V Hドメイン、およびヒンジドメインから選択される標的化抗体またはその断片のドメインに移植され得る。C A R - I Dは、C Lドメイン、C H₁ドメイン、C H₂ドメイン、C H₃ドメイン、V Lドメイン、V Hドメイン、およびヒンジドメインから選択される抗体またはその断片の2個のドメイン間に移植され得、2個ドメインは隣接している。C A R - I Dは、抗体またはその断片のC Lドメインに移植され得る。C A R - I Dは、抗体またはその断片のC H₁ドメインに移植され得る。C A R - I Dは、抗体またはその断片のヒンジドメインに移植され得る。C A R - I Dは、抗体またはその断片のループに移植され得る。C A R - I Dは、抗体またはその断片のC Lドメインループに移植され得る。

【0203】

C A R - I Dは、標的化部分（例えば、ヒト化された抗C D 1 9標的化抗体またはC D 1 9結合抗体断片）のC末端に移植され得、したがってキメラ受容体と標的の間の距離は、キメラ受容体 - E Cスイッチのサイズ（s c F vに対しておよそ40、F a bに対して70、およびI g Gに対して120）に依存して実質的に異なり得る。より長い距離は、インビトロでの有効性に悪影響を与える場合があり、全長抗体の滞在時間の増加は、インビボで優位であり得る。

【0204】

多価のスイッチ

C A R - I Dおよびヒト化されたC D 1 9結合標的化部分を含むスイッチが、本明細書で例示される。G C N 4ペプチド誘導体および標的化部分（例えば、C D 1 9標的化部分）を含むスイッチもまた、本明細書で例示される。しかしながら、当業者は、本明細書から、本明細書で開示されるスイッチがさらに、追加もしくは代替の天然の標的化部分、および／または追加もしくは代替の天然のC A R - I Dsを含むことを理解するであろう。1つ以上のC A R - I Dは、標的化部分の1つ以上の移植部位に移植され得、その逆も同じである。1つ以上のC A R - I Dは、標的化部分の1つ以上の終端に融合され得、その逆も同じである。1つ以上のC A R - I Dは、標的化部分の1つ以上の終端に共役され得、その逆も同じである。これは、いくつかの移植／融合部位が、C A R - I Dのキメラ受容体への最適な結合を提供すると予測されるため、利点であり得る。例えば、第1のC A R - I Dは、標的化部分の第1のドメインに移植され得、第2のC A R - I Dは、標的化部分の第2のドメインに移植され得る。第1のドメインおよび第2のドメインは同じであり得る。第1のドメインおよび第2のドメインは、異なり得る。非限定的な例として、第1のC A R - I Dは、標的化抗体または抗体断片の軽鎖に移植され得、第2のC A R - I Dは、標的化抗体または抗体断片の重鎖に移植され得る。第1のC A R - I Dは、標的化

10

20

30

40

50

ポリペプチドの第1の末端に融合され得、第2のCAR-IDは、標的化ポリペプチドの第2の末端に融合され得る。非限定的な例として、第1のCAR-IDは、標的化抗体または抗体断片の軽鎖のC末端に融合され得、第2のCAR-IDは、標的化抗体または抗体断片の重鎖のN末端に融合され得る。第1のCAR-IDは、標的化ポリペプチドの末端に融合され得、第2のCAR-IDは、標的化ポリペプチドのドメイン内に移植され得る。第1のCAR-IDおよび第2のCAR-IDは、スイッチが、1つのキメラ受容体を発現するエフェクター細胞と共に使用され得るように、同じであるか、または同様であり得。第1のCAR-IDおよび第2のCAR-IDは、スイッチが、1つ以上のキメラ受容体を発現するエフェクター細胞、または異なるキメラ受容体を発現する複数のエフェクター細胞と共に使用され得るように、異なり得る。

10

【0205】

本明細書で開示されるスイッチは、1つ以上のCAR-IDを含み得る。本明細書で開示されるスイッチは、2つ以上のCAR-IDを含み得る。本明細書で開示されるスイッチは、3つ以上のCAR-IDを含み得る。本明細書で開示されるスイッチは、1、2、3、4、5、6、7またはそれ以上のCAR-IDを含み得る。1つ以上のCAR-IDは、1つ以上のリンカーを介して標的化部分に融合されるか、または移植され得る。したがって、本明細書で開示されるスイッチは、1つ以上のリンカーを含み得る。本明細書で開示されるスイッチは、2個以上のリンカーを含み得る。本明細書で開示されるスイッチは、3つ以上のリンカーを含み得る。本明細書で開示されるスイッチは、1、2、3、4、5、6、7またはそれ以上のリンカーを含み得る。

20

【0206】

II. CAR-ECスイッチ産生方法

ヒト化されたCAR-ECスイッチを産生する方法が、本明細書で開示される。

【0207】

いくつかの実施形態では、方法は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチまたはその部分をコードする1つ以上の配列を有する1つ以上のポリヌクレオチドを含む1つ以上のベクターから、1つ以上のポリペプチドを発現することを含み、キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチは、CAR-IDおよび抗標的標的化部分を含む。

【0208】

いくつかの実施形態では、方法は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチまたはその部分をコードする1つ以上の配列を有する1つ以上のポリヌクレオチドを含む1つ以上のベクターから、1つ以上のポリペプチドを発現することを含み、キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチは、CAR-IDおよびヒト化された抗CD19標的化部分を含む。

30

【0209】

いくつかの実施形態では、方法は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチまたはその部分をコードする1つ以上の配列を有する1つ以上のポリヌクレオチドを含む1つ以上のベクターから、1つ以上のポリペプチドを発現することを含み、キメラ抗原受容体エフェクター細胞スイッチは、本明細書で開示されるGCN4ペプチド誘導体および標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分がヒト化される。いくつかの実施形態では、標的化部分は、CD19を標的とする。いくつかの特定の実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗CD19標的化部分である。

40

【0210】

標的化部分は、標的化ポリペプチド（例えば、ヒト化された抗CD19抗体またはヒト化された抗CD19抗体のCD19結合断片）を含み得る。一般に、かかる方法は、CAR-IDをコードするポリヌクレオチドを、標的化部分（例えば、ヒト化された抗CD19ポリペプチド標的化部分（標的化ポリペプチド））をコードするポリヌクレオチドに融合すること、または移植することを含む。融合すること、または移植することは、当業者には知られる任意の標準クローニング方法によって実行され得る。CAR-ID（例えば、GCN4ペプチド誘導体）および標的化ポリペプチド（例えば、CD19抗体などの抗体

50

またはその抗原結合部分)をコードするポリヌクレオチドを融合すること、または移植することは、ポリヌクレオチドの酵素消化、ポリヌクレオチドの連結、および/またはポリヌクレオチドの増幅を含み得る。

【0211】

CAR-IDは、標的化ポリペプチドのN末端に融合され得る。CAR-IDは、標的化ポリペプチドのC末端に融合され得る。CAR-IDは、標的化ポリペプチド内に移植され得る。標的化ポリペプチドは、標的化抗体または抗体断片を含み得る。CAR-IDは、標的化抗体または抗体断片のN末端に融合され得る。CAR-IDは、標的化抗体または抗体断片のC末端に融合され得る。

【0212】

いくつかの実施形態では、スイッチの設計(例えば、標的化部分上のCAR-IDの移植位置、CAR-IDを標的化部分に接続するリンカーの長さなど)は、ペプチドスイッチ可能CAR-EC細胞の細胞毒性、活性、およびサイトカイン放出に対して決定的である。スイッチ移植位置は、CAR-ECと標的細胞の間の最適な距離および幾何学(免疫シナプス)を見出すために、標的上の抗標的抗体(標的化部分)のエピトープ位置に基づく標的に対して経験的に設計され得る。例えば、いくつかの実施形態では、膜(膜遠位)から離れているCD19エピトープに結合する抗体に対して、抗CD19標的化部分(例えば、本明細書で開示されるヒト化された抗CD19抗体のうちのいずれか1つなどの、抗CD19抗体またはその抗原結合部分)上のCAR-IDのN末端融合の使用を通して総合短免疫シナプスを提供するスイッチ設計は、活性(図15(中央))を改善し得る。C末端融合の使用を通してCAR-ECと標的細胞の間の長すぎる距離を提供する設計は、最適以下の活性(図15(左))をもたらし得る。CARもまた、ヒンジ領域を短くするために修飾され得る。これは、CAR-T細胞および標的細胞と一緒に近づく場合があり(図15(右))、さらに利点である。また、非限定的な例として、膜(膜近位)に近いCD19のエピトープに結合する抗体に対して、形成する免疫シナプスに対して十分な距離(C末端融合の使用を通して)を提供するスイッチ設計は、最適である(図16(中央))。N末端融合の使用を通してCAR-ECと標的細胞の間に十分な距離を提供しない設計は、立体障害のため、最適以下の活性、または非活性をもたらし得る(図16(右))。CAR-ECと標的細胞の間に長すぎる距離を提供する設計(より長いヒンジ領域を通して)は、最適以下の活性をもたらし得る(図16(左))。

【0213】

当業者には明らかであるように、本明細書で開示される配列は、リーダーペプチド(または交換可能に「リーダー配列」)を含み得、それは、発現が、分泌経路を含む細胞内である場合、ポリペプチド発現中に切断されるであろう。リーダーペプチドの位置は、タンパク質のN末端であり、リーダー配列は、容易に当業者に明らかであり、例えば、SignalPサーバー(ワールドワイドウェブアドレス: cbs.dtu.dk/services/SignalP/)で利用可能であり、参照によりその全体が本明細書に組込まれる)を使用して簡単に認識され得る。ある非限定的な実施形態では、リーダーペプチドは、Kリーダー配列(例えば、配列番号246)を含むか、またはそれから成り得る。

【0214】

CAR-IDは、標的化ポリペプチドの任意のアミノ酸を入れ替えるか、または除去することなく、標的化ポリペプチドの末端に融合され得る。CAR-IDを、標的化ポリペプチドの末端に融合することは、標的化ポリペプチドの末端で、アミノ酸を除去するか、または入れ替えることを含み得る。標的化ポリペプチドの末端でアミノ酸を除去するか、または入れ替えることは、標的化ポリペプチドの末端で、約1~約20個のアミノ酸を除去するか、または入れ替えることを含み得る。CAR-IDは、リンカーを介して標的化ポリペプチドの末端に融合され得る。リンカーは、CAR-IDに融合され、CAR-ID-リンカー中間体を産生し得る。リンカーは、CAR-IDのN末端に融合され、CAR-ID-リンカー中間体を産生し得る。リンカーは、CAR-IDのC末端に融合され、CAR-ID-リンカー中間体を産生し得る。CAR-ID-リンカー中間体は、標的

化ポリペプチドに融合され得る。CAR-ID-リンカー中間体は、標的化ポリペプチドのN末端に融合され得る。CAR-ID-リンカー中間体は、標的化ポリペプチドのC末端に融合され得る。第1のCAR-IDリンカー中間体は、標的化ポリペプチドのN末端に融合され得、第2のCAR-IDリンカー中間体は、標的化ポリペプチドのC末端に融合され得る。第1のCAR-IDリンカー中間体のCAR-IDは、第2のCAR-IDリンカー中間体のCAR-IDと同じであるか、または同様であり得る。第1のCAR-IDリンカー中間体のCAR-IDは、第2のCAR-IDリンカー中間体CAR-IDとは異なり得る。

【0215】

本明細書で使用されるように、N末端上での軽鎖移植は、LCNTと称され得る。C末端上での軽鎖移植は、LCCと称され得る。C1ドメイン内での軽鎖移植は、LCC1と称され得る。N末端上での重鎖移植は、HCNTと称され得る。C末端上での重鎖移植は、HCCと称され得る。C1ドメイン内での重鎖移植は、HCC1と称され得る。軽鎖および重鎖上でのN末端移植と共に発現されるスイッチは、NTBVと称され得る。軽鎖および重鎖上でのC末端移植と共に発現されるスイッチは、CTBVと称され得る。軽鎖および重鎖上のC1ドメイン内の移植と共に発現されるスイッチは、C1BVと称され得る。

【0216】

本明細書で使用される、「移植」という用語は、CAR-IDを標的化ポリペプチド（例えば、標的化ポリペプチドの2個のアミノ酸間）内に挿入することを指し得る。CAR-IDは、標的化ポリペプチドの任意のアミノ酸を入れ替えるか、または除去することなく標的化ポリペプチド内に移植され得る。CAR-IDを標的化ポリペプチド内に移植することは、標的化ポリペプチド内でアミノ酸を除去するか、または入れ替えることを含み得る。標的化ポリペプチド内でアミノ酸を除去するか、または入れ替えることは、標的化ポリペプチドで約1～約20個のアミノ酸を除去するか、または入れ替えることを含み得る。CAR-IDは、1個のリンカーを介して標的化ポリペプチド内に移植され得る。CAR-IDは、2個のリンカーを介して標的化ポリペプチド内に移植され得る。リンカーは、CAR-IDのN末端に融合され、CAR-IDリンカー中間体を産生し得る。リンカーは、CAR-IDのC末端に融合され、CAR-IDリンカー中間体を産生し得る。第1のリンカーは、CAR-IDのN末端に融合され得、第2のリンカーは、CAR-IDのC末端に融合され得、CAR-IDリンカー中間体を産生し得る。CAR-IDリンカー中間体は、標的化ポリペプチド内に移植され得る。第1のCAR-IDリンカー中間体は、標的化ポリペプチド内に移植され得、第2のCAR-IDリンカー中間体は、標的化ポリペプチド内に移植され得る。第1のCAR-IDリンカー中間体は、標的化ポリペプチドの第1のドメイン内に移植され得、第2のCAR-IDリンカー中間体は、標的化ポリペプチドの第2のドメイン内に移植され得る。標的化ポリペプチドの第1のドメインは、標的化ポリペプチドの第2のドメインと同じであり得る。標的化ポリペプチドの第1のドメインは、標的化ポリペプチドの第2のドメインとは異なり得る。第1のCAR-IDリンカー中間体のCAR-IDは、第2のCAR-IDリンカー中間体のCAR-IDと同じであるか、または同様であり得る。第1のCAR-IDリンカー中間体のCAR-IDは、第2のCAR-IDリンカー中間体のCAR-IDとは異なり得る。別様に特定されない限り、本明細書で使用される「移植」および「挿入」という用語は、交換可能に使用される。

【0217】

標的化部分は、標的細胞の細胞表面上の標的に結合し得る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ヒト化された抗CD19抗体またはそのするCD19結合断片（例えば、本明細書で開示されるヒト化された抗CD19抗体またはそれらの断片のうち任意の1つ以上）を含み得る。抗体または抗体断片は、重鎖および軽鎖、またはそれらの断片を含み得る。方法は、重鎖を発現することを含み得、CAR-IDは、重鎖の末端に融合される。方法は、重鎖を発現することを含み得、CAR-IDは、重鎖内に移植される。方法は

、軽鎖を発現することを含み得、C A R - I D は、軽鎖の末端に融合される。方法は、軽鎖を発現することを含み得、C A R - I D は、軽鎖内に移植される。

【0218】

方法は、標的化ポリペプチドおよび/またはC A R - I D を発現ベクターにコードする1つ以上のポリヌクレオチドをクローニングすることをさらに含み得る。方法は、標的化ポリペプチドおよび/またはC A R - I D を発現ベクターにコードする1つ以上のポリヌクレオチドの連結をさらに含み得る。発現ベクターは、原核生物発現ベクターであり得る。発現ベクターは、真核生物発現ベクターであり得る。発現ベクターは、哺乳類発現ベクターであり得る。発現ベクターは、ウィルス性発現ベクターであり得る。発現ベクターは、p F U S E ベクターであり得る。方法は、標的化ポリペプチドおよび/またはC A R - I D を、発現ベクターを配列決定すること、ベクターのゲル電気泳動を実行すること、ならびに/またはS D S ペイジゲル上で標的化ポリペプチドおよび/もしくはC A R - I D を見ることを含む発現ベクターにコードする、1つ以上のポリヌクレオチドのクローニングを検証することをさらに含み得る。

10

【0219】

方法は、標的化ポリペプチドおよび/またはC A R - I D をコードするポリヌクレオチドを増幅すること、ならびに標的化ポリペプチドおよび/またはC A R - I D を発現ベクターにクローニングすることをさらに含み得る。標的化ポリペプチドおよび/またはC A R - I D をコードするポリヌクレオチドを増幅することは、遺伝子に対して少なくとも部分的に相補的であるオリゴヌクレオチドを合成することを含み得る。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドにアニールするために、遺伝子に対して十分に相補的であり得る。オリゴヌクレオチドは、リンカー配列を含み得る。多くの好適なリンカーは、当該技術分野で知られており、本発明での使用に対して好適である。いくつかの実施形態では、リンカーは、本明細書で開示されるリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、配列番号93~103、116~137、および164~168から選択され得る。

20

【0220】

方法は、細胞を発現ベクターでトランスフェクトするか、または感染させることを含み得る。方法は、細胞内で標的化ポリペプチドおよび/またはC A R - I D を発現することをさらに含み得る。方法は、無細胞系内で標的化ポリペプチドおよび/またはC A R - I D を発現することをさらに含み得る。方法は、発現ベクターを含むウィルスを産生することをさらに含み得る。方法は、ウィルスを伝播することをさらに含み得る。方法は、発現ベクターを含むウィルスで細胞を感染させることをさらに含み得る。方法は、細胞を伝播することをさらに含み得る。

30

【0221】

スイッチは、2個のベクター（抗体の重鎖のうちの1個および抗体の軽鎖のための1個）として、発現され得る。2個のベクターは、発現細胞に共トランスフェクトされ得る。発現細胞は、原核生物細胞および真核生物細胞から選択され得る。発現細胞は、H E K 細胞およびC H O 細胞から選択され得る。発現は、H E K 細胞内で、7日以上にわたって、培地を回収するルーティンで実行され、目的の抗体スイッチを収集し、かつ単離し得る。発現は、7日未満で実行され得る。スイッチは、同じプラスミドを使用して類似性様式で、C H O 細胞から発現され得る。培地は、間隔を空けて回収されても、またはされなくても良いか、あるいは発現の最後に回収されても良い。間隔を空けて回収することは、スイッチのタンパク質分解を防ぐために好ましい。

40

【0222】

スイッチは、大腸菌で発現され得る。スイッチは、非限定的な例として、p B A D ベクターなどのベクターから大腸菌で発現され得る。p B A D ベクターは、抗体の軽鎖および重鎖の両方を抱える場合がある。これは、1つのプラスミドを有する大腸菌の形質転換を必要とし得る。これは、大腸菌内の発現が一般に、哺乳類細胞（例えば、H E K 細胞）内での発現より安価かつ早いため、利点となり得る。いくつかの実施形態では、大腸菌で発現されるスイッチは、修飾されたC A R - I D および/または修飾された標的化部分を含

50

み得、ジリジンモチーフは、排除され、OmpTプロテアーゼによるペプチドの切断を回避する。いくつかの実施形態では、大腸菌内でスイッチを発現するために、細心の注意が、使用される株の遺伝子型に払われる。いくつかの実施形態では、好ましい遺伝子型は、破壊されるompT遺伝子（発現されるタンパク質をタンパク分解し得る、外膜タンパク質プロテアーゼVII）を有するものを含むが、これらに限定されない。これは、BL21（大腸菌B F - dcm ompT hsdS (rB - mB -) gal [malB +] K - 12 (λS)）、OverExpress (tm) C41 (DE3) (Lucigen) (F - ompT gal dcm hsdSB (rB - mB -) (DE3))、および他のものを含む。発現のために好ましくない株は、DH10B (F - endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara、leu)7697 mcrA Δ(mrr - hsdRMS - mcrBC)λ -)、DH5α (F - endA1 glnV44 thi - 1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA - argF)U169、hsdR17 (rK - mK +)、λ -)またはompTノックアウトを含まない他の株を含む。DH10BおよびDH5αなどの株は、ompT遺伝子の破壊によって好ましく製造され得る。抗体または抗体断片、CAR-IDまたは標的化ペプチドを移植し、CAR-ECスイッチを産生する方法が本明細書で開示される。方法は、CAR-IDを抗体または抗体断片に移植することを含み得る。方法は、CAR-IDを、抗体または抗体断片のN末端、C末端、または内部部位に移植することを含み得る。CAR-IDは、抗体または抗体断片のCLドメインに移植され得る。CAR-IDは、抗体または抗体断片のCLドメインのループに移植され得る。方法は、抗体または抗体断片をCAR-IDに移植することを含み得る。方法は、抗体または抗体断片を、CAR-IDのN末端、C末端、または内部部位に移植することを含み得る。方法は、CAR-IDを標的化ペプチドに移植することを含み得る。方法は、CAR-IDを標的化ペプチドのN末端、C末端、または内部部位に移植することを含み得る。方法は、標的化ペプチドをCAR-IDに移植することを含み得る。方法は、標的化ペプチドをCAR-IDのN末端、C末端、または内部部位に移植することを含み得る。

【0223】

CAR-ID、標的化ペプチド、抗体または抗体断片は、1つ以上のリンカーを含み得、リンカーは、CAR-ID、標的化ペプチド、抗体または抗体断片の、N末端および/またはC末端に位置する。方法は、リンカーを通して、抗体または抗体断片、CAR-IDまたは標的化ペプチドを移植することを含み得る。リンカーは、(GSSSS)_nを含み得る。リンカーは、配列番号93～103、116～137、および164～168から選択される配列を含み得る。リンカーは、配列番号93～103、116～137、および164～168から選択される配列と、少なくとも約50%同一である配列を含み得る。リンカーは、配列番号93～103、116～137、および164～168から選択される配列を含み得る。

【0224】

移植することは、核酸をコードするCAR-ECスイッチを産生することを含み得る。核酸をコードするCAR-ECスイッチを産生することは、1つ以上のポリメラーゼ鎖反応を含み得る。核酸をコードするCAR-ECスイッチを産生することは、1つ以上の核酸酵素消化を含み得る。酵素消化は、部位特異的であり得る。核酸をコードするCAR-ECスイッチ産生することは、1つ以上の連結を含み得る。CAR-ECスイッチを産生する方法は、核酸をコードするCAR-ECスイッチを、CAR-ECスイッチベクターに組込むことを含み得る。ベクターは、発現ベクターであり得る。発現ベクターは、恒常的プロモーター、誘導性プロモーター、および/または条件的プロモーターを含み得る。核酸をコードするCAR-ECスイッチまたはCAR-ECスイッチベクターは、細胞内で発現され得、得られたCAR-ECスイッチは単離され、かつ精製される。細胞は、原核生物細胞であり得る。細胞は、大腸菌であり得る。細胞は、真核生物細胞であり得る。細胞は、哺乳類細胞であり得る。核酸をコードするCAR-ECスイッチまたはCAR-

10

20

30

40

50

ECスイッチベクターは、無細胞系内で発現され得る。代替的にまたは加えて、CAR-ECスイッチは、遊離アミノ酸から合成され得る。

【0225】

いくつかの実施形態では、方法は、CAR-IDを標的化部分に結合することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、CAR-IDおよびリンカーを含むスイッチ中間体を、標的化部分に結合することを含み得る。方法は、標的化部分およびリンカーを含むスイッチ中間体を、CAR-IDに結合することを含み得る。方法は、CAR-IDおよび第1のリンカーを含む第1のスイッチ中間体を、標的化部分および第2のリンカーを含む第2のスイッチに結合することを含み得る。CAR-IDの標的化部分への結合は、部位特異的方法で起こり得る。部位特異的方法での結合は、CAR-IDを、標的化部分上の予め決定された部位に結合することを含み得る。部位特異的方法での結合は、標的化部分をCAR-ID上の予め決定された部位に結合することを含み得る。CAR-IDの標的化部分への結合は、部位非依存的方法で起こり得る。部位非依存的方法での結合は、CAR-IDを、標的化部分上のランダムな部位に結合することを含み得る。部位非依存的方法での結合は、標的化部分を、CAR-ID上のランダムな部位に結合することを含み得る。方法は、1つ以上の追加のCAR-IDを標的化部分に結合することをさらに含み得る。方法は、結合することか、またはCAR-IDへのより追加の標的化部分をさらに含み得る。方法は、標的化部分をCAR-IDに接続するために、1つ以上の追加のリンカーを使用することをさらに含み得る。CAR-IDを標的化部分に結合することは、1つ以上の化学反応を行うことを含み得る。

10

20

【0226】

スイッチを産生する方法は、抗体または抗体断片に基づくか、またはそれから誘導される標的化部分を、CAR-IDを含むCAR-IDまたはスイッチ中間体に連結し、(a)標的化部分、(b)1つ以上のリンカー、および(c)CAR-IDを含むCAR-ECスイッチを産生することを含み得、1つ以上のリンカーは、標的化部分をCAR-IDに連結し得る。標的化部分をCAR-IDに連結することは、部位特異的方法で起こり得る。CAR-IDは、1つ以上のリンカーを介して、標的化部分上の予め決定された部位に結合され得る。標的化部分は、1つ以上のリンカーを介して、CAR-ID上の予め決定された部位に結合され得る。

【0227】

本明細書で開示されるCAR-ECスイッチは、1つ以上の非天然のアミノ酸を含み得る。1つ以上のCAR-IDは、1つ以上の非天然のアミノ酸を含み得る。1つ以上の標的化部分は、1つ以上の非天然のアミノ酸を含み得る。1つ以上のリンカーは、1つ以上の非天然のアミノ酸を含み得る。CAR-IDの標的化部分への結合は、1つ以上の非天然のアミノ酸を介して起こり得る。1つ以上のリンカーは、1つ以上のCAR-IDを、1つ以上の非天然のアミノ酸を通して1つ以上の標的化部分に部位特異的に連結し得る。代替的に、または加えて、1つ以上のリンカーは、1つ以上の標的化部分を、1つ以上の標的化部分に部位特異的に連結し得、非天然のアミノ酸は、1つ以上の標的化部分を1つ以上の標的化部分に連結することを必要としない。標的化部分は、標的化部分上の1、2、3、4、5個またはそれ以上の非天然のアミノ酸に連結され得る。標的化部分は、部位特異的に、標的化部分上の1、2、3、4、5個またはそれ以上の非天然のアミノ酸に連結され得る。代替的に、標的化部分は、標的化部分上の1、2、3、4、5個またはそれ以上の非天然のアミノ酸に連結され得る。標的化部分は、部位特異的に、標的化部分の1、2、3、4、5個またはそれ以上の非天然のアミノ酸に連結され得る。

30

40

【0228】

CAR-IDは、1つ以上の非天然のアミノ酸を含み得る。本明細書で開示されるCAR-IDは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の非天然のアミノ酸を含み得る。標的化部分は、1つ以上の非天然のアミノ酸を含み得る。本明細書で開示される標的化抗体または抗体断片は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の非天然のアミノ酸を含み得る。非天然のアミノ酸は、リンカーと反応し、化

50

学結合を生じ得る。

【0229】

1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分内の2個の天然発生アミノ酸間に挿入され得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分内の1つ以上の天然発生アミノ酸を入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分のN末端で組込まれ得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分のC末端で組込まれ得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分の内部部位で組込まれ得る。非天然のアミノ酸は、標的上の、またはそれからの分子と相互作用する標的化部分の領域の遠位で組込まれ得る。非天然のアミノ酸は、標的上の、またはそれからの分子と相互作用する標的化部分の領域の近位で組込まれ得る。非天然のアミノ酸は、標的上の、またはそれからの分子と相互作用する標的化部分の領域の中間の部位で組込まれ得る。非天然のアミノ酸は、標的上の、またはそれからの分子と相互作用する標的化部分の領域で組込まれ得る。

10

【0230】

1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分内の1つ以上のアミノ酸を入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分内の任意の天然のアミノ酸を入れ替え得る。

【0231】

1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される免疫グロブリンの軽鎖に組込まれ得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される免疫グロブリンの重鎖に組込まれ得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖に組込まれ得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される免疫グロブリンの軽鎖内のアミノ酸を入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される免疫グロブリンの重鎖内のアミノ酸を入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖内のアミノ酸を入れ替え得る。

20

【0232】

1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される、免疫グロブリンの軽鎖のグリシンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される、免疫グロブリンの軽鎖のアルギニンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される、免疫グロブリンの軽鎖のセリンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される、免疫グロブリンの軽鎖のスレオニンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される、免疫グロブリンの軽鎖のアラニンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される、免疫グロブリンの重鎖のアラニンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される、免疫グロブリンの重鎖のセリンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される、免疫グロブリンの重鎖のリジンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導される、免疫グロブリンの重鎖のプロリンを入れ替え得る。

30

40

【0233】

いくつかの実施形態では、1つ以上の非天然のアミノ酸は、標的化部分のアミノ酸を入れ替え得、標的化部分は、ヒト化された抗CD19抗体またはCD19結合その断片である。1つ以上の非天然のアミノ酸は、抗CD19抗体またはその断片の軽鎖のグリシンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、抗CD19抗体またはその断片の軽鎖のスレオニンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、抗CD19抗体またはその断片の軽鎖のセリンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、抗CD19抗体またはその断片の重鎖のセリンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、抗CD1

50

9 抗体またはその断片の重鎖のアラニンを入れ替え得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、抗CD19抗体またはその断片の重鎖のリジンを入れ替え得る。抗体または抗体断片は、抗CD19抗体またはその断片であり得、1つ以上の非天然のアミノ酸は、抗CD19抗体またはその断片の軽鎖の1つ以上のアミノ酸を入れ替え得る。抗CD19抗体またはそのCD19結合部分の軽鎖は、配列番号17～25、27～35のうちの1つを含み得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、配列番号17～25、27～35のうちの1つの1つ以上のアミノ酸を入れ替え得る。いくつかの実施形態では、配列番号17～25、27～35のうちの1つの1つ以上のアミノ酸は、G68およびK107から選択され得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、抗CD19抗体またはその断片の重鎖の1つ以上のアミノ酸を入れ替え得る。抗CD19抗体またはその断片の重鎖は、配列番号2～15のうちの1つを含み得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、配列番号2～15のうちの1つの1つ以上のアミノ酸を入れ替え得る。配列番号2～15のうちの1つの1つ以上のアミノ酸は、S74であり得る。

10

【0234】

式I: X-L1-Yまたは式IA: Y-L1-Xのスイッチを産生する方法が、本明細書で開示され、Xが、CAR-IDであり、Yが、標的化部分であり、かつL1が、リンカーである。Xが、CAR結合小分子であり得、Yが、抗体または抗体断片であり得る。Xが、ペプチドを含まないCAR結合小分子であり得、Yが、抗体または抗体断片を含まないペプチドであり得る。Xが、ペプチドを含まないCAR結合小分子であり得、Yが、ペプチドを含まない標的化小分子であり得る。方法は、1つ以上の反応を実施し、CAR-IDを標的化部分内の予め決定された部位に結合することを含み得る。1つ以上の反応を実施し、CAR-IDを、標的化部分に結合することは、複数のCAR-IDを、複数の標的化部分と混合することを含み得る。方法は、リンカーの一端を、標的化部分に結合すること、続いてリンカーの他方の末端のCAR-IDへの結合を含み得る。方法は、リンカーの一端をCAR-IDに結合すること、続いてリンカーの他方の末端の標的化部分への結合を含み得る。リンカーの標的化部分への結合は、部位特異的方法で起こり得る。リンカーは、標的化部分の予め決定されたアミノ酸に結合され得る。アミノ酸は、非天然のアミノ酸であり得る。リンカーは、アミノ酸と相互作用する官能基を含み得る。リンカーの標的化部分への結合は、部位非依存的方法で起こり得る。リンカーは、標的化部分にランダムに結合され得る。リンカーは、標的化部分内の官能基と反応する官能基を含み得る。リンカーのCAR-IDへの結合は、部位特異的方法で起こり得る。リンカーのCAR-IDへの結合は、部位非依存的方法で起こり得る。リンカーは、CAR-ID内の官能基と反応する官能基を含み得る。1つ以上の反応を実施し、CAR-IDを標的化部分に結合することは、オキシム連結を実施することを含み得る。

20

30

【0235】

代替的に、または加えて、方法は、反応を実施し、リンカーまたはリンカーの前駆体を、CAR-IDに結合し、CAR-IDに共役されたリンカーを含むスイッチ中間体を産生することを含み得る。スイッチ中間体は、式II: X-L1または式IIA: L1-Xを有し得、Xが、CAR-IDであり、L1が、リンカーまたはリンカーの前駆体である。リンカーは、部位特異的方法でCAR-IDに共役され得る。リンカーは、部位非依存的方法でCAR-IDに共役され得る。1つ以上の反応を実施し、CAR-IDを標的化部分に結合することは、スイッチ中間体のリンカー部分を標的化部分に結合することを含み得る。1つ以上の反応を実施し、CAR-IDを標的化部分に結合することは、CAR-IDに共役されたリンカーまたはリンカー前駆体を含む複数のスイッチ中間体を、複数の標的化部分に接触させることを含み得る。スイッチ中間体のリンカー部分の標的化部分への結合は、部位特異的方法で起こり得る。標的化部分は、1つ以上の非天然のアミノ酸を含み得る。スイッチのリンカー部分は、1つ以上の非天然のアミノ酸を介して標的化部分に結合され得る。スイッチ中間体のリンカー部分の結合は、部位非依存的方法で起こり得る。

40

【0236】

50

代替的に、または加えて、方法は、反応を実施し、リンカーまたはリンカーの前駆体を標的化部分に結合し、標的化部分に共役されたリンカーまたはリンカーの前駆体を含むスイッチ中間体を産生することを含み得る。スイッチ中間体は、式 $III: Y-L1$ または式 $IIIA: L1-Y$ であり得、 Y が標的化部分であり、 $L1$ が、リンカーまたはリンカー前駆体である。リンカーは、部位特異的方法で標的化部分に共役され得る。リンカーは、非依存的方法で標的化部分部位に共役され得る。1つ以上の反応を実施し、 $CAR-ID$ を標的化部分に結合することは、スイッチ中間体のリンカー部分を $CAR-ID$ に結合することを含み得る。1つ以上の反応を実施し、 $CAR-ID$ を標的化部分に結合することは、標的化部分に共役されたリンカーまたはリンカー前駆体を含む複数のスイッチ中間体を、複数の $CAR-ID$ に接触させることを含み得る。スイッチ中間体のリンカー部分の $CAR-ID$ への結合は、部位特異的方法で起こり得る。スイッチ中間体のリンカー部分の結合は、部位非依存的方法で起こり得る。

10

【0237】

方法は、1つ以上のリンカーを標的化部分に結合し、式 $III: Y-L1$ または式 $IIIA: L1-Y$ のスイッチ中間体を産生することを含み得、 Y が、標的化部分であり、 $L1$ が、リンカーであり、スイッチ中間体を $CAR-ID$ に共役し、したがって $CAR-EC$ スイッチを産生する。スイッチ中間体は、部位特異的方法で $CAR-ID$ に共役され得る。スイッチ中間体は、部位非依存的方法で $CAR-ID$ に共役され得る。方法は、1つ以上の非天然のアミノ酸を $CAR-ID$ および/または標的化部分に組込むことをさらに含み得る。スイッチ中間体は、非天然のアミノ酸の使用を通して部位特異的方法で $CAR-ID$ に共役され得る。

20

【0238】

方法は、1つ以上のリンカーを $CAR-ID$ に結合し、式 $II: X-L1$ または式 $IIA: L1-X$ のスイッチ中間体を産生することを含み得、 X が、 $CAR-ID$ であり、 $L1$ がリンカーであり、スイッチ中間体を標的化部分に共役し、したがって $CAR-EC$ スイッチを産生する。スイッチ中間体は、部位特異的方法で標的化部分に共役され得る。スイッチ中間体は、非依存的方法で標的化部分部位に共役され得る。方法は、1つ以上の非天然のアミノ酸を $CAR-ID$ および/または標的化部分に組込むことをさらに含み得る。スイッチ中間体は、非天然のアミノ酸の使用を通して部位特異的方法で標的化部分に共役され得る。

30

【0239】

X が、 $CAR-ID$ および $L1$ である、式 $II: X-L1$ または式 $IIA: L1-X$ のスイッチ中間体の標的化部分への共役は、オキシムを形成することを含み得る。 Y が、標的化部分および $L1$ である、式 $III: Y-L1$ または式 $IIIA: L1-Y$ のスイッチ中間体の $CAR-ID$ への共役は、オキシムを形成することを含み得る。オキシムを形成することは、酸性条件下で1つ以上の反応を実施することを含み得る。オキシムを形成することは、わずかな酸性条件下で1つ以上の反応を実施することを含み得る。オキシムを形成することは、わずかな中性条件下で1つ以上の反応を実施することを含み得る。

【0240】

スイッチを産生する方法は、(a) 非天然のアミノ酸を含む標的化部分を産生することと、(b) 第1のリンカーを標的化部分に結合し、標的化部分および第1のリンカーを含む第1のスイッチ中間体を産生することと、(c) $CAR-ID$ および第2のリンカーを含む第2のスイッチ中間体を、第1のスイッチ中間体に結合し、したがってスイッチを産生することとを含み得る。非天然のアミノ酸は、 p -アセチルフェナニン ($pAcF$) であり得る。非天然のアミノ酸は、 p -アジドフェニルアラニン ($pAzF$) であり得る。標的化部分は、抗体または抗体断片に基づくか、またはそれから誘導されるポリペプチドを含み得る。抗体は、抗 $CD19$ 抗体であり得る。標的化部分は、抗体断片を含み得る。抗体は、配列番号 2 ~ 15、17 ~ 25 および 27 ~ 35 のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含み得る。第1のリンカーは、二官能性リンカーであり得る。リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーであり得る。リ

40

50

ンカーは、1つ以上のポリエチレングリコール（PEG）サブユニットを含み得る。第1のリンカーは、シクロオクチンを含み得る。第1のリンカーは、PEGシクロオクチンリンカーであり得る。リンカーは、アジドを含み得る。第1のリンカーは、トリアゾールを含み得る。トリアゾールは、1, 2, 3 - トリアゾールであり得る。トリアゾールは、1, 2, 4 - トリアゾールであり得る。第1のリンカーは、アジドPEGアミノキシリンカーを含み得る。第1のリンカーは、非天然のアミノ酸のケトンに結合され得る。第1のリンカーは、オキシム連結を介して標的化部分に結合され得る。CAR-IDは、小分子を含み得る。CAR-IDは、FITCを含み得る。第2のリンカーは、二官能性リンカーであり得る。リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーであり得る。リンカーは、1つ以上のポリエチレングリコール（PEG）サブユニットを含み得る。第2のリンカーは、シクロオクチンを含み得る。第2のリンカーは、PEGシクロオクチンリンカーであり得る。リンカーは、アジドを含み得る。第2のリンカーは、トリアゾールを含み得る。トリアゾールは、1, 2, 3 - トリアゾールであり得る。トリアゾールは、1, 2, 4 - トリアゾールであり得る。第2のリンカーは、PEGシクロオクチンリンカーであり得る。第2のスイッチ中間体は、クリックケミストリー反応を介して第1のスイッチ中間体に結合され得る。第2のスイッチ中間体は、環化付加反応を通して第1のスイッチ中間体に結合され得る。環化付加反応は、[3 + 2] 環化付加反応であり得る。

10

【0241】

リンカーをCAR-IDに共役し、スイッチを産生することは、リンカーとCAR-IDとの間に1つ以上の結合を形成することを含み得る。リンカーを標的化部分に共役し、スイッチを産生することは、リンカーと標的化部分との間に1つ以上の結合を形成することを含み得る。1つ以上の結合は、イオン結合、共有結合性結合、非共有結合性結合、またはそれらの組み合わせを含み得る。リンカーをCAR-IDおよび標的化部分に共役する追加の方法は、Roberts et al., Advanced Drug Delivery Reviews 54: 459 - 476 (2002) (参照によりその全体が本明細書に含まれる)に記載される通りに実施され得る。

20

【0242】

CAR-IDは、本明細書で開示されるCAR-IDのいずれかを含み得る。例えば、CAR-IDは、小分子を含み得る。CAR-IDは、FITCを含み得る。CAR-IDは、DOTA、ジニトロフェノール、キノン、ピオチン、アニリン、アトラジン、アニリン誘導体、o - アミノ安息香酸、p - アミノ安息香酸、m - アミノ安息香酸、ヒドララジン、ハロタン、ジゴキシゲニン、ベンゼンアルソネート、ラクトース、トリニトロフェノール、ピオチン、およびそれらの誘導体から選択される群から成り得る。

30

【0243】

CAR-IDは、ハプテンを含み得る。CAR-IDは、タンパク質、抗体または抗体断片などのより大きな担体分子に結合される際、免疫応答を含み得る。CAR-IDは、FITCまたはその誘導体であり得る。CAR-IDは、ピオチンを含み得る。CAR-IDは、ジニトロフェノールを含み得る。

【0244】

代替的に、CAR-IDは、ハプテンを含まない。CAR-IDは、ステロイド、ビタミン、ピタマー、代謝産物、抗生物質、単糖、二糖、脂質、脂肪酸、核酸、アルカロイド、グリコシド、フェナジン、ポリケタイド、テルペン、およびテトラピロール、ならびにそれらの部分、かつそれらの組み合わせから選択され得る。CAR-IDは、ペニシリン薬物またはその誘導体であり得る。

40

【0245】

CAR-IDは、標的相互作用ドメインに連結され、および/または共役され得る。標的相互作用ドメインは、標的化抗体または抗体断片であり得、CAR-IDは、標的化抗体または抗体断片のアミノ酸に連結され、および/または共役され得る。標的化抗体または抗体断片のアミノ酸は、非天然のアミノ酸であり得る。標的化抗体または抗体断片は、配列番号10 ~ 31から選択される軽鎖および/または重鎖を含み得、非天然のアミノ酸

50

は、表 1 に示される各々の部位に位置し得る。別様に記載されない限り、アミノ酸は、それぞれ可変領域の N 末端から定常領域の C - 末端までのアミノ酸から数えられる。

【 0 2 4 6 】

標的化部分は、本明細書で開示される標的化部分のいずれかを含み得る。リンカーは、本明細書で開示されるリンカーのいずれかを含み得る。例えば、リンカーは、1 つ以上の終端にアミノオキシ基、アジド基、シクロオクチン基、またはそれらの組み合わせを含み得る。リンカーは、二官能性リンカーであり得る。リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーであり得る。リンカーは、1 つ以上の P E G サブユニットを含み得る。

【 0 2 4 7 】

式 I V : X - L 1 - L 2 - Y のスイッチを産生する方法が本明細書で開示され、X が、C A R - I D であり、L 1 が、第 1 のリンカーであり、L 2 が、第 2 のリンカーであり、Y が、標的化部分である。方法は、(a) L 1 を X に結合し、式 I I : X - L 1 の第 1 のスイッチ中間体を産生することと、(b) L 2 を Y に結合し、式 V : L 2 - Y の第 2 のスイッチ中間体を産生することと、(c) 式 I I の第 1 のスイッチ中間体を、式 V の第 2 のスイッチ中間体に連結し、それにより式 I V のスイッチを産生することとを含み得る。

【 0 2 4 8 】

式 I V A : Y - L 2 - L 1 - X のスイッチを産生する方法が本明細書で開示され、Y が、標的化部分であり、L 1 が、第 1 のリンカーであり、L 2 が、第 2 のリンカーであり、X が、C A R - I D である。方法は、(a) L 1 を X に結合し、式 I I A : L 1 - X の第 1 のスイッチ中間体を産生することと、(b) L 2 を Y に結合し、式 V A : Y - L 2 の第 2 のスイッチ中間体を産生することと、(c) 式 I I A の第 1 の中間体を、式 V A の第 2 の中間体に連結し、それにより式 I V A の C A R - E C スwitch を産生することとを含み得る。

【 0 2 4 9 】

方法は、1 つ以上の非天然のアミノ酸を、X および / または Y に組込むことをさらに含み得る。L 1 は、部位特異的方法で X に結合され得る。L 1 は、1 つ以上の非天然のアミノ酸を通して部位特異的方法で X に結合され得る。L 2 は、部位特異的方法で Y に結合され得る。L 2 は、1 つ以上の非天然のアミノ酸を通して部位特異的方法で Y に結合され得る。方法は、X をコードする核酸を修飾し、X 内の 1 つ以上のアンバーコドンを生産することをさらに含み得る。方法は、Y をコードする核酸を修飾し、Y 内の 1 つ以上のアンバーコドンを生産することをさらに含み得る。

【 0 2 5 0 】

リンカーを C A R - I D に共役し、第 1 のスイッチ中間体を産生することは、リンカーと C A R - I D との間に 1 つ以上の結合を形成することを含み得る。リンカーを標的化部分に共役し、第 2 のスイッチ中間体を産生することは、リンカーと標的化部分との間に 1 つ以上の結合を形成することを含み得る。1 つ以上の結合は、イオン結合、共有結合性結合、非共有結合性結合、またはそれらの組み合わせを含み得る。リンカー C A R - I D および標的化部分を共役する追加の方法は、R o b e r t s e t a l . , A d v a n c e d D r u g D e l i v e r y R e v i e w s 5 4 : 4 5 9 - 4 7 6 (2 0 0 2) (参照によりその全体が本明細書に含まれる) に記載される通りに実施され得る。

【 0 2 5 1 】

第 1 のスイッチ中間体を第 2 のスイッチ中間体に連結することは、ヒュスゲン環化付加、ディールスアルダー反応、ヘテロディールスアルダー反応、または酵素媒介の反応を含み得る。第 1 のスイッチ中間体を第 2 のスイッチ中間体に連結することは、オキシム、テトラゾール、ディールスアルダー付加物、ヘテロディールスアルダー付加物、芳香族置換反応生成物、求核性置換反応生成物、エステル、アミド、カルバミン酸、エーテル、チオエーテル、マイケル反応生成物、環化付加生成物、メタセシス反応生成物、金属媒介のクロスカップリング反応生成物、ラジカル重合生成物、酸化的結合生成物、アシル転移反応生成物、フォトリック反応生成物を生成し得る。第 1 のスイッチ中間体を第 2 のスイッチ中間体に連結することは、ジスルフィド架橋またはマレイミド架橋を生成することを含

み得る。

【0252】

L1および/またはL2は、二官能性リンカー、切断可能リンカー、非切断可能リンカー、エチレングリコールリンカー、二官能性エチレングリコールリンカー、柔軟性リンカー、または非柔軟性リンカーから選択されるリンカーを含み得る。L1および/またはL2は、シクロオクテン、シクロプロペン、アリール/アルキルアジド、トランスシクロオクテン、ノルボルネン、およびテトラジンを含む群から選択されるリンカーを含み得る。L1の末端および/またはL2の末端は、アルコキシアミンを含み得る。L1の末端および/またはL2の末端は、アジドまたはシクロオクテン基を含み得る。Xは、シクロオクテン、シクロプロペン、アリール/アルキルアジド、トランスシクロオクテン、ノルボルネン、およびテトラジンから選択される化学基によるL1に結合され得る。第1のスイッチ中間体(X-L1またはL1-X)および第2のスイッチ中間体(Y-L2またはL2-Y)を連結することは、1つ以上の無銅反応を実施することを含み得る。第1のスイッチ中間体(X-L1またはL1-X)および第2のスイッチ中間体(Y-L2またはL2-Y)を連結することは、1つ以上の銅含有反応を実施することを含み得る。第1のスイッチ中間体(X-L1またはL1-X)および第2のスイッチ中間体(Y-L2またはL2-Y)を連結することは、1つ以上の環化付加を含み得る。第1のスイッチ中間体(X-L1またはL1-X)および第2のスイッチ中間体(Y-L2またはL2-Y)を連結することは、1つ以上のヒュスゲン環化付加を含み得る。第1のスイッチ中間体(X-L1またはL1-X)および第2のスイッチ中間体(Y-L2またはL2-Y)を連結することは、1つ以上のディールスアルダー反応を含み得る。第1のスイッチ中間体(X-L1またはL1-X)および第2のスイッチ中間体(Y-L2またはL2-Y)を連結することは、1つ以上のヘテロディールスアルダー反応を含み得る。

【0253】

方法本明細書で開示されるものは、1つ以上のリンカーを1つ以上の標的相互作用ドメイン、CAR-ID、またはそれらの組み合わせに結合し、1つ以上スイッチ中間体を産生することを含み得る。スイッチ中間体は、リンカーに結合された標的化部分(例えば、標的化部分スイッチ中間体)を含み得る。スイッチ中間体は、リンカーに結合されたCAR-ID(例えば、CAR-IDスイッチ中間体)を含み得る。方法は、第1のリンカーを標的化部分に結合し、標的化部分スイッチ中間体賛成することを含み得る。方法は、リンカーをCAR-IDに結合し、CAR-IDスイッチ中間体を産生することを含み得る。

【0254】

1つ以上のリンカーの標的化部分およびCAR-IDへの結合は、同時に起こり得る。1つ以上のリンカーの標的化部分およびCAR-IDへの結合は、連続的に起こり得る。1つ以上のリンカーの標的化部分およびCAR-IDへの結合は、単一の反応ボリュームで起こり得る。1つ以上のリンカーの標的化部分およびCAR-IDへの結合は、2つ以上の反応ボリュームで起こり得る。

【0255】

1つ以上のリンカーを標的化部分および/またはCAR-IDに結合することは、リンカーと、標的化部分および/またはCAR-IDとの間に、1つ以上のオキシムを形成することを含み得る。1つ以上のリンカーを標的化部分および/またはCAR-IDに結合することは、リンカーと、標的化部分および/またはCAR-IDとの間に、1つ以上の安定した結合を生成することを含み得る。1つ以上のリンカーを標的化部分および/またはCAR-IDに結合することは、リンカーと、標的化部分および/またはCAR-IDとの間に、1つ以上の共有結合性結合を形成することを含み得る。1つ以上のリンカーを標的化部分および/またはCAR-IDに結合することは、リンカーと、標的化部分および/またはCAR-IDとの間に、1つ以上の非共有結合性結合を形成することを含み得る。1つ以上のリンカーを標的化部分および/またはCAR-IDに結合することは、リンカーと、標的化部分および/またはCAR-IDとの間に、1つ以上のイオン結合を形成することを含み得る。

【 0 2 5 6 】

1つ以上のリンカーを標的化部分および/またはC A R - I Dに結合することは、部位特異的に1つ以上のリンカーを標的化部分および/またはC A R - I Dに結合することを含み得る。部位特異的結合は、1つ以上のリンカーを、標的化部分および/またはC A R - I Dの非天然のアミノ酸に連結することを含み得る。1つ以上のリンカーを、標的化部分および/またはC A R - I Dの非天然のアミノ酸に連結することは、オキシムの形成を含み得る。1つ以上のリンカーを、標的化部分および/またはC A R - I Dの非天然のアミノ酸に連結することは、非限定的な例として、1つ以上のリンカーのヒドロキシアミンをアミノ酸のアルデヒドまたはケトンと反応させることを含み得る。アミノ酸は、非天然のアミノ酸であり得る。

10

【 0 2 5 7 】

部位特異的にC A R - I Dを標的化部分に連結し、部位特異的にリンカーまたはリンカーの前駆体をC A R - I Dに結合し、部位特異的にリンカーまたはリンカーの前駆体を標的化部分に結合し、部位特異的にC A R - I Dスイッチ中間体を標的化部分に結合し、部位特異的に標的化部分スイッチ中間体をC A R - I Dに結合するか、あるいは部位特異的に標的化部分スイッチ中間体をC A R - I Dスイッチ中間体に結合する1つ以上の反応を実施することは、無銅反応、環化付加、ヒュスゲン環化付加、無銅[3 + 2]ヒュスゲン環化付加、銅含有反応、ディールスアルダー反応、ヘテロディールスアルダー反応、メタセシス反応、金属媒介のクロスカップリング反応、ラジカル重合、酸化的結合、アシル転移反応、フォトリック反応、酵素媒介の反応、トランスグルタミナーゼ媒介の反応から

20

【 0 2 5 8 】

本明細書で開示されるスイッチは、F I T Cまたはその誘導体を含むC A R - I Dを含み得る。かかるスイッチを産生する方法は、リンカーまたはそれらの前駆体、標的化部分を含むスイッチ中間体（例えば、標的化部分スイッチ中間体）または標的化部分を、C A R - I Dに結合することを含み得る。リンカーまたはその前駆体、標的化部分スイッチ中間体をC A R - I Dに結合することは、F I T Cのイソチオシアネートの、リンカーまたはその前駆体、標的化部分スイッチ中間体または標的化部分への共役を含み得る。標的化部分は、ポリペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。ポリペプチドは、抗体または抗体断片であり得る。標的化部分をC A R - I Dに結合することは、F I T Cのイソチオシアネートを標的化部分のアミノ酸に共役することを含み得る。アミノ酸は、リジンであり得る。方法は、結合すること、または標的化部分へのより多くのC A R - I Dを含み得る。方法は、2つ以上のC A R - I DからのF I T Cを、標的化部分の2つ以上のアミノ酸に共役することを含み得る。2つ以上のアミノ酸は、リジンであり得る。

30

【 0 2 5 9 】

本明細書で開示されるスイッチを産生することは、エステル結合を含み得る。エステル結合は、C A R - I Dと標的化部分との間にアミド結合を形成することを含み得る。エステル結合は、スイッチ中間体と標的化部分との間にアミド結合を形成することを含み得る。スイッチ中間体は、リンカーに結合されたC A R - I Dを含み得る。アミド結合は、スイッチ中間体のリンカーと標的化部分との間に形成され得る。リンカーは、N H Sエステルリンカーであり得る。アミド結合は、スイッチ中間体のリンカーと標的化部分のアミノ酸との間に形成され得る。C A R - I Dは、小分子を含み得る。小分子は、F I T Cであり得る。標的化部分は、ポリペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。ポリペプチドは、抗体または抗体断片であり得る。標的化部分は、小分子を含み得る。

40

【 0 2 6 0 】

本明細書で開示されるスイッチを産生する方法は、(a) (i) C A R - I Dおよび(i i) リンカーを含むスイッチ中間体を得ることと、(b) スイッチ中間体を標的化部分と接触させ、それによってスイッチを産生することとを含み得る。スイッチ中間体を標的化部分と接触させることは、エステル結合反応を実施することを含み得る。リンカーは、N H Sエステルリンカーを含み得る。標的化部分は、1つ以上のアミノ酸を含み得る。エ

50

ステル結合反応を実施することは、スイッチ中間体のNHSEステルリンカーと、標的化部分の1つ以上のアミノ酸との間に、アミド結合を形成することを含み得る。方法は、複数のスイッチを産生することをさらに含み得る。複数のスイッチのうち2つ以上のスイッチは、標的化部分の2つ以上の異なるアミノ酸に結合された2つ以上のスイッチ中間体を含み得る。例えば、第1のスイッチ中間体は、第1の標的化部分のリジン残基に結合され得、第2のスイッチ中間体は、第2の標的化部分のグリシン残基に結合され得る。複数のスイッチのうちの2つ以上のスイッチは、標的化部分の同じアミノ酸に結合された2つ以上のスイッチ中間体を含み得る。例えば、2つ以上のスイッチ中間体は、第1および第2の標的化部分のリジン残基に結合され得る。複数のスイッチのうちの2つ以上のスイッチは、標的化部分内の2つ以上の異なる位置に位置する同じアミノ酸に結合された2つ以上のスイッチ中間体を含み得る。例えば、第1のスイッチ中間体は、第1の標的化部分のリジン10に結合され得、第2のスイッチ中間体は、第2の標的化部分のリジン45に結合され得る。複数のスイッチの2つ以上のスイッチは、標的化部分内の同じ位置に位置する同じアミノ酸に結合された2つ以上のスイッチ中間体を含み得る。例えば、第1のスイッチ中間体は、第1の標的化部分のリジン10に結合され得、第2のスイッチ中間体は、第2の標的化部分のリジン10に結合され得る。

10

【0261】

本明細書で開示されるスイッチを産生する方法は、1つ以上の非天然のアミノ酸を使用することを含み得る。方法は、1つ以上の非天然のアミノ酸をCAR-IDに組込むことを含み得る。CAR-IDは、エフェクター細胞上のCARと相互作用することのできるポリペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。ポリペプチドは、非抗体系ポリペプチドであり得る。一般に、非抗体系ポリペプチドは、抗体または抗体断片を含まないポリペプチドである。非天然のアミノ酸は、非抗体系ポリペプチドに組込まれ得る。非天然のアミノ酸は、非抗体系ポリペプチドのアミノ酸を入れ替え得る。代替的に、または加えて、方法は、1つ以上の非天然のアミノ酸を標的化部分に組込むことを含み得る。標的化部分は、ポリペプチドに基づくか、またはそれから誘導され得る。ポリペプチドは、抗体であり得る。ポリペプチドは、非抗体系ポリペプチドであり得る。非天然のアミノ酸は、ポリペプチドに組込まれ得る。非天然のアミノ酸は、ポリペプチドのアミノ酸を入れ替え得る。

20

【0262】

スイッチを産生する方法は、CAR-IDが基づくか、またはそれから誘導されるポリペプチド内で1つ以上のアミノ酸残基を修飾することをさらに含み得る。スイッチを産生する方法は、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導されるポリペプチド内で1つ以上のアミノ酸残基を修飾することを含み得る。1つ以上のアミノ酸残基を修飾することは、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列内で1つ以上のヌクレオチドを変異させることを含み得る。コードするヌクレオチド配列内で1つ以上のヌクレオチドを変異させることは、アミノ酸をナンセンスコドンにコードするコドンを変更することを含み得る。

30

【0263】

1つ以上の非天然のアミノ酸を、CAR-IDが基づくか、またはそれから誘導されるポリペプチドに組込むことは、ポリペプチド内で1つ以上のアミノ酸残基を修飾し、抗体または抗体断片内の1つ以上のアンバーコドンを産生することを含み得る。1つ以上の非天然のアミノ酸を、標的化部分が、基づくか、またはそれから誘導されるポリペプチドに組込むことは、ポリペプチド内で1つ以上のアミノ酸残基を修飾し、抗体または抗体断片内で1つ以上のアンバーコドンを産生することを含み得る。

40

【0264】

1つ以上の非天然のアミノ酸は、アンバーコドンに応答して、ポリペプチドに組込まれ得る。1つ以上の非天然のアミノ酸は、部位特異的にポリペプチドに組込まれ得る。

【0265】

1つ以上の非天然のアミノ酸を、CAR-IDおよび標的化部分が基づくか、またはそれから誘導されるポリペプチドに組込むことは、部位特異的に抗体、抗体断片、または標

50

的化ペプチドを修飾するための基準の20個のアミノ酸に対して直行性化学反応性を有する、1つ以上の遺伝子的にコードされた非天然のアミノ酸の使用を含み得る。1つ以上の非天然のアミノ酸を組み込むことは、1つ以上のtRNAシンテターゼの使用を含み得る。tRNAシンテターゼは、アミノアシルtRNAシンテターゼであり得る。tRNAシンテターゼは、変異tRNA合成であり得る。1つ以上の非天然のアミノ酸を組み込むことは、tRNA/tRNAシンテターゼの対を含み得る。tRNA/tRNAシンテターゼの対は、tRNA/アミノアシルtRNAシンテターゼの対を含み得る。tRNA/tRNAシンテターゼの対は、tRNA^{Tyr}/チロシルtRNAシンテターゼの対を含み得る。1つ以上の非天然のアミノ酸を組み込むことは、1つ以上のアンバーナンセンスコドンに
10 応答してポリペプチド内の画定された部位で、部位特異的に1つ以上の非天然のアミノ酸を組み込むための、進化したtRNA/アミノアシルtRNAシンテターゼの対の使用を含み得る。

【0266】

非天然のアミノ酸を組み込むための追加の方法は、Chatterjee et al. (A Versatile プラットフォーム for Single- and Multiple-Unnatural Amino Acid Mutagenesis in *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 2013)、Kazane et al. (J Am Chem Soc, 135(1):340-6, 2013)、Kim et al. (J Am Chem Soc, 134(24):9918-21, 2012)、Johnson et al. (Nat Chem Biol, 7(11):779-86, 2011)、およびHutchins et al. (J Mol Biol, 406(4):595-603, 2011)に開示される方法を含むが、これらに限定
20 されない。

【0267】

キメラ抗原受容体エフェクター細胞(CAR-EC)を活性化させるためのスイッチを産生する方法は、(a)非天然のアミノ酸を含む標的化部分を得ることと、(b)キメラ抗原受容体相互作用ドメイン(CAR-ID)を標的化部分に結合し、それによってスイッチを産生することを含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、方法は、CAR-IDを、ヒト化された抗CD19抗体またはそのCD19結合断片である標的化部分に
30 含まれる非天然のアミノ酸に結合することを含む。

【0268】

CAR-IDを標的化部分に結合することは、1つ以上の環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、ヒュスゲン環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、[3+2]環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、[3+2]ヒュスゲン環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、無銅環化付加を含み得る。CAR-IDを標的化部分に結合することは、無銅反応を含み得る。CAR-IDを標的化部分に結合することは、1つ以上の銅含有反応を含み得る。CAR-IDを標的化部分に結合することは、1つ以上のディールスアルダー反応を含み得る。CAR-IDを標的化部分に結合することは、1つ以上のヘテロディールスアルダー反応を含み得る。CAR-IDを標的化部分に結合することは、1つ以上のエステル結合を含み得る。CAR-IDを標的化部分に結合することは、1つ以上のイソチオシアネート結合を含み得る。CAR-IDを標的化部分に結合することは、CAR-IDを標的化部分のアミノ酸に結合することを含み得る。アミノ酸は、非天然のアミノ酸であり得る。CAR-IDを標的化部分に結合することは、1つ以上の生体直交反応を含み得る。CAR-IDは、部位特異的方法で標的化部分に結合され得る。CAR-IDは、標的化部分内の予め決定された部位に結合され得る。CAR-IDは、非
40 依存的方法で標的化部分部位に結合され得る。

【0269】

方法は、第1のリンカーを標的化部分に結合し、第1のスイッチ中間体を産生することをさらに含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、1つ以上の環化付加を含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、無銅反応を含み得る。第1
50

のリンカーを標的化部分に結合することは、1つ以上の銅含有反応を含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、1つ以上のディールスアルダー反応を含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、1つ以上のヘテロディールスアルダー反応を含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、1つ以上のエステル結合を含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、オキシム連結を含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、第1のリンカーと標的化部分との間に1つ以上のオキシムを形成することを含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、第1のリンカーと標的化部分との間に1つ以上の安定した結合を形成することを含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、第1のリンカーと標的化部分との間に1つ以上の共有結合性結合を形成することを含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、第1のリンカーと標的化部分との間に1つ以上の非共有結合性結合を形成することを含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、第1のリンカーと標的化部分との間に1つ以上のイオン結合を形成することを含み得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、リンカーを標的化部分のアミノ酸に結合することを含み得る。アミノ酸は、非天然のアミノ酸であり得る。第1のリンカーを標的化部分に結合することは、1つ以上の生体直交反応を含み得る。

10

【0270】

CAR-IDを標的化部分に結合することは、第1のスイッチ中間体をCAR-IDに結合することを含み得る。第1のスイッチ中間体をCAR-IDに結合することは、1つ以上の環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、ヒュスゲン環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、[3+2]環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、[3+2]ヒュスゲン環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、無銅環化付加を含み得る。第1のスイッチ中間体をCAR-IDに結合することは、無銅反応を含み得る。第1のスイッチ中間体をCAR-IDに結合することは、1つ以上の銅含有反応を含み得る。第1のスイッチ中間体をCAR-IDに結合することは、1つ以上のディールスアルダー反応を含み得る。第1のスイッチ中間体をCAR-IDに結合することは、1つ以上のヘテロディールスアルダー反応を含み得る。第1のスイッチ中間体をCAR-IDに結合することは、1つ以上のエステル結合を含み得る。第1のスイッチ中間体をCAR-IDに結合することは、1つ以上のイソチオシアネート結合を含み得る。

20

【0271】

30

方法は、第2のリンカーをCAR-IDに結合し、第2のスイッチ中間体を產生することをさらに含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、1つ以上の環化付加を含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、無銅反応を含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、1つ以上の銅含有反応を含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、1つ以上のディールスアルダー反応を含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、1つ以上のヘテロディールスアルダー反応を含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、1つ以上のエステル結合を含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、オキシム連結を含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、第2のリンカーとCAR-IDとの間に1つ以上のオキシムを形成することを含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、第2のリンカーとCAR-IDとの間に1つ以上の安定した結合を形成することを含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、第2のリンカーとCAR-IDとの間に1つ以上の共有結合性結合を形成することを含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、第2のリンカーとCAR-IDとの間に1つ以上の非共有結合性結合を形成することを含み得る。第2のリンカーをCAR-IDに結合することは、第2のリンカーとCAR-IDとの間に1つ以上のイオン結合を形成することを含み得る。

40

【0272】

CAR-IDを標的化部分に結合することは、第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することを含み得る。第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することは、1つ以上

50

の環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、ヒュスゲン環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、[3 + 2]環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、[3 + 2]ヒュスゲン環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、無銅環化付加を含み得る。第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することは、無銅反応を含み得る。第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することは、1つ以上の銅含有反応を含み得る。第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することは、1つ以上のディールスアルダー反応を含み得る。第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することは、1つ以上のヘテロディールスアルダー反応を含み得る。第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することは、1つ以上のエステル結合を含み得る。第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することは、1つ以上のイソチオシアネート結合を含み得る。第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することは、リンカーをCAR-IDのアミノ酸に結合することを含み得る。アミノ酸は、非天然のアミノ酸であり得る。第2のスイッチ中間体を標的化部分に結合することは、1つ以上の生体直交反応を含み得る。

10

【0273】

CAR-IDを標的化部分に結合することは、第1のスイッチ中間体を第2のスイッチ中間体に結合することを含み得る。第1のスイッチ中間体を第2のスイッチ中間体に結合することは、1つ以上の環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、ヒュスゲン環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、[3 + 2]環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、[3 + 2]ヒュスゲン環化付加を含み得る。1つ以上の環化付加は、無銅環化付加を含み得る。第1のスイッチ中間体を第2のスイッチ中間体に結合することは、無銅反応を含み得る。第1のスイッチ中間体を第2のスイッチ中間体に結合することは、1つ以上の銅含有反応を含み得る。第1のスイッチ中間体を第2のスイッチ中間体に結合することは、1つ以上のディールスアルダー反応を含み得る。第1のスイッチ中間体を第2のスイッチ中間体に結合することは、1つ以上のヘテロディールスアルダー反応を含み得る。第1のスイッチ中間体を第2のスイッチ中間体に結合することは、1つ以上のエステル結合を含み得る。第1のスイッチ中間体を第2のスイッチ中間体に結合することは、1つ以上のイソチオシアネート結合を含み得る。

20

【0274】

(a) 酵母転写因子ペプチドからのペプチドを含むCAR-IDと、(b) ヒト化されたFMC63抗体またはその抗原結合部分(例えば、本明細書で記載されるヒト化されたFMC63抗体のうちのいずれか1つ)とを含むCAR-ECスイッチが、本明細書で開示される。酵母転写因子ペプチドは、GCN4ペプチドであり得る。ヒト化されたFMC63抗体または抗体断片は、ヒト化されたFMC63抗体の重鎖を含み得る。重鎖配列は、配列番号2~15のうちのいずれか1つを含み得る。ヒト化されたFMC63抗体または抗体断片は、軽鎖ヒト化されたFMC63抗体を含み得る。軽鎖配列は、配列番号17~25のうちのいずれか1つまたは配列番号27~35のうちのいずれか1つを含み得る。ヒト化されたFMC63抗体または抗体断片は、ヒト化されたFMC63抗体のFabを含み得る。ヒト化されたFMC63抗体または抗体断片は、全長のヒト化されたFMC63抗体またはその断片を含み得る。抗GCN4 CARを発現する抗GCN4 CARおよびCAR-ECもまた、本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、(i)(a) 酵母転写因子ペプチドからのペプチド(例えば、本明細書で開示されるGCN4ペプチド)を含むCAR-ID、および(b) ヒト化されたFMC63抗体またはその抗原結合部分(例えば、本明細書で記載されるヒト化されたFMC63抗体のうちのいずれか1つ)を含むCAR-ECスイッチと、(ii) 抗GCN4 CARを発現するCAR-ECとを用いた対象の共治療は、CD19発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす。

30

40

【0275】

(a) Flagペプチドを含むCAR-IDと、(b) ヒト化されたFMC63抗体またはその抗原結合部分(例えば、本明細書で記載されるヒト化されたFMC63抗体のうちのいずれか1つ)とを含むCAR-ECスイッチが本明細書で開示される。Flagペプチドは、以下の配列、DYKDDDDK(配列番号40)およびDYKDDDDKP(配

50

列番号 39) のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の重鎖を含み得る。重鎖配列は、配列番号 2 ~ 15 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、軽鎖ヒト化された F M C 6 3 抗体を含み得る。軽鎖配列は、配列番号 17 ~ 25 のうちのいずれか 1 つまたは配列番号 27 ~ 35 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の F a b を含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、全長のヒト化された F M C 6 3 抗体またはその断片を含み得る。抗 F l a g C A R を発現する抗 F l a g C A R および C A R - E C もまた、本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、(i) (a) F l a g ペプチドを含む C A R - I D、および (b) ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で記載されるヒト化された F M C 6 3 抗体のうちのいずれか 1 つ) を含む C A R - E C スイッチと、(i i) 抗 F l a g C A R を発現する C A R - E C とを用いた対象の共治療は、C D 19 発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす。

10

【0276】

(a) F I T C を含む C A R - I D と、(b) ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で記載されるヒト化された F M C 6 3 抗体のうちのいずれか 1 つ) とを含む C A R - E C スイッチが、本明細書で開示される。F I T C は、ヒト化された F M C 6 3 抗体に非特異的に共役され得る。F I T C は、ヒト化された F M C 6 3 抗体に部位特異的に共役され得る。部位特異的共役は、ヒト化された F M C 6 3 抗体に含まれる人工アミノ酸へのものであり得る。共役は、ヒト化された F M C 6 3 抗体を F I T C に連結するリンカーを介し得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の重鎖を含み得る。重鎖配列は、配列番号 2 ~ 15 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、軽鎖ヒト化された F M C 6 3 抗体を含み得る。軽鎖配列は、配列番号 17 ~ 25 のうちのいずれか 1 つまたは配列番号 27 ~ 35 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の F a b を含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、全長のヒト化された F M C 6 3 抗体またはその断片を含み得る。抗 F I T C C A R、および抗 F I T C C A R を発現する C A R - E C もまた、本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、(i) (a) F I T C を含む C A R - I D、および (b) ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で記載されるヒト化された F M C 6 3 抗体のうちのいずれか 1 つ) を含む C A R - E C スイッチと、(i i) 抗 F I T C C A R を発現する C A R - E C とを用いた対象の共治療は、C D 19 発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす。

20

30

【0277】

(a) K 4 ペプチドまたは E 4 ペプチドを含む C A R - I D と、(b) ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で記載されるヒト化された F M C 6 3 抗体のうちのいずれか 1 つ) を含む C A R - E C スイッチが、本明細書で開示される。K 4 ペプチドは、アミノ酸配列：K V A A L K E K V A A L K E K V A A L K E K V A A L K E (配列番号 43) を含み得る。E 4 ペプチドは、アミノ酸配列：E V A A L E K E V A A L E K E V A A L E K (配列番号 44) を含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体重鎖を含み得る。重鎖配列は、配列番号 2 ~ 15 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、軽鎖ヒト化された F M C 6 3 抗体を含み得る。軽鎖配列は、配列番号 17 ~ 25 のうちのいずれか 1 つまたは配列番号 27 ~ 35 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の F a b を含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、全長のヒト化された F M C 6 3 抗体またはその断片を含み得る。K 4 細胞外ドメインを含む C A R もまた、本明細書で開示される。E 4 細胞外ドメインを含む C A R もまた、本明細書で開示される。K 4 細胞外ドメインを含む C A R を発現する C A R - E C もまた、本明細書で開示される。E 4 細胞外ドメインを含む C A R を発現する C A R - E C もまた、本明細書で開示

40

50

される。

【0278】

いくつかの実施形態では、(i)(a) K4ペプチドを含むCAR-ID、および(b) ヒト化されたFMC63抗体またはその抗原結合部分(例えば、本明細書で記載されるヒト化されたFMC63抗体のうちのいずれか1つ)を含むCAR-ECスイッチと、(ii) E4細胞外ドメインを含むCARを発現するCAR-ECとを用いた対象の共治療は、CD19発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす。いくつかの実施形態では、(i)(a) E4ペプチドを含むCAR-ID、および(b) ヒト化されたFMC63抗体またはその抗原結合部分(例えば、本明細書で記載されるヒト化されたFMC63抗体のうちのいずれか1つ)を含むCAR-ECスイッチと、(ii) K4細胞外ドメインを含むCARを発現するCAR-ECとを用いた共治療は、CD19発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす。

10

【0279】

III. CAR-ECスイッチおよびそれらの部分の精製

本明細書で開示されるヒト化されたCAR-ECスイッチを、CAR-ECスイッチ産生系の構成成分(例えば、細胞デブリ、遊離アミノ酸)から単離することを含む、本明細書で開示されるヒト化されたCAR-ECスイッチを精製する方法が、本明細書で開示される。CAR-ECスイッチを精製することは、1つ以上の濃縮カラム、電気泳動、濾過、遠心分離、クロマトグラフィーまたはそれらの組み合わせの使用を含み得る。クロマトグラフィーは、サイズ排除クロマトグラフィーを含み得る。追加のクロマトグラフィー方法は、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、金属結合、免疫親和性クロマトグラフィー、および高性能液体クロマトグラフィーまたは高圧液体クロマトグラフィーを含むが、これらに限定されない。電気泳動は、変性電気泳動または非変性電気泳動を含み得る。

20

【0280】

ヒト化されたCAR-ECスイッチは、1つ以上のペプチドタグを含み得る。ヒト化されたCAR-ECスイッチを精製する方法は、ヒト化されたCAR-ECスイッチの1つ以上のペプチドタグを、捕獲剤に結合することを含み得る。捕獲剤は、抗体、カラム、ビーズ、およびそれらの組み合わせから選択され得る。1つ以上のタグは、1つ以上のプロテアーゼによって切断され得る。タグの例は、ポリヒスチジン、FLAG(登録商標)タグ、HA、c-myc、V5、キチン結合タンパク質(CBP)、マルトース結合タンパク質(MBP)、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を含むが、これらに限定されない。ペプチドタグは、CAR-IDであり得る。ペプチドタグは、HTPであり得る。ペプチドタグは、酵母転写因子GCN4であり得る。

30

【0281】

方法は、CAR-ID、標的化ポリペプチドおよび/またはヒト化されたCAR-ECスイッチの、凍結乾燥または超遠心分離をさらに含み得る。

【0282】

CAR-ID、標的化ポリペプチド、および/またはヒト化されたCAR-ECスイッチの純度は、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上であり得る。CAR-ID、標的化ポリペプチド、および/またはヒト化されたCAR-ECスイッチの純度は、85%以上であり得る。CAR-ID、標的化ポリペプチド、および/またはヒト化されたCAR-ECスイッチの純度は、90%以上であり得る。CAR-ID、標的化ポリペプチド、および/またはヒト化されたCAR-ECスイッチの純度は、95%以上であり得る。CAR-ID、標的化ポリペプチド、および/またはヒト化されたCAR-ECスイッチの純度は、97%以上であり得る。ヒト化されたCAR-ECスイッチを精製するかかる方法に従って精製されたヒト化されたCAR-ECスイッチは、本明細書で「精製されたCAR-ECスイッチ」または「精製されたヒト化されたCAR-ECスイッチ」と称される。精製されたCAR-ECスイッチは、エンドトキシン

40

50

フリーまたは実質的にエンドトキシンフリーであり得る。

【0283】

本明細書で開示されるヒト化されたCAR-ECスイッチを産生する方法は、構造的に均一であるヒト化されたCAR-ECスイッチを産生することを含み得る。ポリヌクレオチドからCAR-ECスイッチを産生する方法は、同じまたは同様の形態、特徴、結合親和性（例えば、CARまたは標的への）、幾何学および/もしくはサイズを有する、1つ以上のヒト化されたCAR-ECスイッチをもたらし得る。ヒト化されたCAR-ECスイッチの均一性は、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上であり得る。ヒト化されたCAR-ECスイッチの均一性は、85%以上であり得る。均一性ヒト化されたCAR-ECスイッチは、90%以上であり得る。ヒト化されたCAR-ECスイッチの均一性は、95%以上であり得る。ヒト化されたCAR-ECスイッチの均一性は、97%以上であり得る。均一性は、構造的均一性であり得る。均一性は、細胞を対象に投与する前に構造的均一性であり得る。均一性は、細胞活性（メチル化、アセチル化、グリコシル化など）によるCAR-ECスイッチへの修飾前に構造的均一性であり得る。均一性のこれらの高い割合は、CAR-ECスイッチのより予測可能な効果を提供し得る。均一性のこれらの高い割合は、CAR-ECと組み合わせて対象の状態を治療する際に、CAR-ECスイッチのより低いオフターゲット効果を提供し得る。

10

【0284】

IV. 医薬組成物

20

本明細書で開示されるヒト化されたCAR-ECスイッチのうち1つ以上を含む医薬組成物が、本明細書で開示される。CAR-ECスイッチのうちの1つ以上は、精製されたCAR-ECスイッチであり得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書で開示される1つ以上の精製されたヒト化されたCAR-ECスイッチを含む。組成物は、1つ以上の薬学的に許容される塩、賦形剤またはビヒクルをさらに含み得る。医薬組成物は、エンドトキシンフリーまたは実質的にエンドトキシンフリーであり得る。

【0285】

いくつかの実施形態では、本開示は、薬学的に許容される塩、賦形剤、ビヒクル、またはそれらの組み合わせ、ならびに軽鎖および重鎖を含むCAR-ECスイッチを含む、医薬組成物を提供し、軽鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ軽鎖配列を含むか、またはそれから成り、重鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ重鎖配列を含むか、またはそれから成る。かかる重鎖および/または軽鎖配列は、ヒト化され得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物に含まれるCAR-ECスイッチは、ヒト化され、かつ配列番号17~24から選択される軽鎖配列および配列番号2~14から選択される重鎖配列を含み、重鎖および軽鎖の一方または両方は、本明細書で開示されるCAR-ID（例えば、GCN4 CAR-ID）を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物に含まれるCAR-ECスイッチは、ヒト化され、かつ配列番号17~24から選択される配列と、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%同一である軽鎖配列および配列番号2~14から選択される配列と、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%同一である重鎖配列を含み、重鎖および軽鎖の一方または両方は、本明細書で開示されるCAR-ID（例えば、GCN4 CAR-ID）を含む。いくつかの特定の実施形態では、軽鎖配列は、配列番号27~34から選択されるヒト化された配列（N末端GCN4 CAR-IDを含む）および配列番号2~14から選択される重鎖配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、軽鎖配列は、配列番号27~34から選択される配列と、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%同一であるヒト化された配列（N末端GCN4 CAR-IDを含む）および配列番号2~14から選択される配列と、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%同一である重鎖配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、スイッチは、表6または表8に記載されるスイッチであり、本明細書で開示されるスイッチのいくつかに含まれ

30

40

50

る重鎖／軽鎖の組み合わせを提示する。いくつかの実施形態では、スイッチは、スイッチに含まれるCAR-IDが修飾され、構造Iの配列を有することを除いて、表6または表8に記載されるスイッチと同一である。いくつかの実施形態では、構造Iの配列は、配列番号26、36、139、および154～163のうちのいずれか1つから選択される。医薬組成物は、単一のスイッチを含み得る。医薬組成物は、複数のスイッチを含み得る。複数のスイッチはそれぞれ、同じCAR-IDを含み得る。複数のスイッチのうち2つ以上はそれぞれ、異なるCAR-IDを含み得る。複数のスイッチはそれぞれ、CAR-EC上の同じCARによって結合され得る。CAR-IDは、本明細書で開示されるGCN4誘導体であり得る。

【0286】

本医薬組成物での使用のための薬学的に許容される塩、賦形剤、またはビヒクルは、担体、賦形剤、希釈剤、抗酸化剤、保存剤、着色剤、着香希釈剤、乳化剤、懸濁剤、溶媒、注入剤、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、等張化剤、共溶媒、湿潤剤、錯化剤、緩衝薬、抗菌剤、および界面活性剤を含む。

【0287】

血清アルブミンと混合される中性の緩衝食塩水または食塩水は、例示的で好適な担体である。医薬組成物は、アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；単糖、二糖、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；ならびに／またはツイーン、プルロニック、もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含み得る。また、例として、好適な等張化剤は、アルカリ金属ハライド（好ましくはナトリウムまたは塩化カリウム）、マンニトール、ソルビトールなどを含む。好適な保存剤は、塩化ベンザルコニウム、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸などを含む。過酸化水素はまた、保存料として使用され得る。好適な共溶媒は、グリセリン、プロピレングリコール、およびPEGを含む。好適な錯化剤は、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータシクロデキストリンまたはヒドロキシプロピルβシクロデキストリンを含む。好適な界面活性剤または湿潤剤は、ソルビタンエステル、ポリソルベート80などのポリソルベート、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポールなどを含む。緩衝剤は、アセテート、ボラテート、シトレート、ホスフェート、バイカルボネート、またはトリス-HClなどの従来の緩衝剤であり得る。アセテート緩衝剤は、約pH4～5.5であり得、トリス緩衝剤は、約pH7～8.5であり得る。追加の医薬品は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990に記載される。

【0288】

組成物は、液体形態、または凍結乾燥もしくは冷凍乾燥形態であり得、1つ以上の凍結防止剤、賦形剤、界面活性剤、高分子量構造的付加物および／または増量剤（例えば、米国特許第6,685,940号、同第6,566,329号、および同第6,372,716号を参照されたい）を含み得る。一実施形態において、スクロース、ラクトースまたはトレハロースなどの非還元性糖である凍結防止剤が含まれる。一般に含まれる凍結防止剤の量は、高浸透圧性またはわずかに低浸透圧性の製剤もまた好適になり得るにも関わらず、再構成時に、得られる製剤が等張になるような量である。加えて、凍結防止剤の量は、凍結乾燥時のタンパク質の分解および／または凝集の許容されない量を防止するのに十分であるべきである。予め凍結乾燥された製剤内での糖（例えば、スクロース、ラクトース、トレハロース）のための例示的な凍結防止剤の濃度は、約10mM～約400mMである。別の実施形態では、例えば、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20、ポリ

10

20

30

40

50

ソルベート 80) などの非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤; ポロキサマー (例えば、ポロキサマー 188); ポリ(エチレングリコール)フェニルエーテル(例えば、トリトン); ドデシル硫酸ナトリウム(SDS); ラウリル硫酸ナトリウム; オクチルグルコシドナトリウム; ラウリル-, ミリスチル-, リノレイル-, またはステアリール-スルホベタイン; ラウリル-, ミリスチル-, リノレイル-, またはステアリール-サルコシン; リノレイル-, ミリスチル-, またはセチル-ベタイン; ラウロアミドプロピル-, コカミドプロピル-, リノレアミドプロピル-, ミリスタミドプロピル-, パラミドプロピル-, またはイソステアロアミドプロピル-ベタイン(例えば、ラウロアミドプロピル); ミリスタミドプロピル-, パラミドプロピル-, またはイソステアロアミドプロピル-ジメチルアミン; ココイルメチルナトリウム-または

10

メチルオフエイル-タウリン酸二ナトリウム; かつ MONAQUAT (商標) シリーズ (ニュージャージー州、パターソン、Mona Industries, Inc.)、ポリエチレングリコール、ポリプロピルグリコール、ならびにエチレンおよびプロピレングリコールのコポリマー(例えば、Pluronic、PF68など)などの界面活性剤が含まれる。予め凍結乾燥された製剤内に存在し得る界面活性剤の例示的な量は、約 0.001 ~ 0.5% である。高分子量構造的付加物(例えば、注入剤、結合剤)は、例えば、アカシア、アルブミン、アルギン酸、リン酸カルシウム(二塩基性)、セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、微結晶性セルロース、デキストラン、デキストリン、デキストレート、スクロース、チロース、 α デンプン、硫酸カルシウム、アミロース、グリシン、ベントナイト、マルトース、ソルビトール、エチルセルロース、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二ナトリウム、ピロ亜硫酸二ナトリウム、

20

ポリビニルアルコール、ゼラチン、グルコース、グアーガム、液体グルコース、圧縮糖、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、マルトデキストリン、ポリエチレンオキシド、ポリメタクリレート、ポビドン、アルギン酸ナトリウム、トラガカント微結晶セルロース、デンプン、およびゼインを含み得る。高分子量構造的付加物の例示的な濃度は、0.1重量% ~ 10重量% である。他の実施形態では、増量剤(例えば、マンニトール、グリシン)が含まれ得る。

【0289】

30

組成物は、無菌であり得る。組成物は、パイロジェンフリーまたは実質的にパイロジェンフリーであり得る。組成物は、エンドトキシンフリーまたは実質的にエンドトキシンフリーであり得る。組成物は、等張水溶液であり得る。組成物は、薬学的に許容される保存剤を含有し得る。

【0290】

組成物は、非経口的投与に対して好適であり得る。例示的な組成物は、熟練労働者に利用可能な、関節内、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、脳内(実質内)、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、または病巣内経路などの任意の経路によって、動物への注射または注入に対して好適である。非経口的製剤は典型的に、任意に薬学的に許容される保存剤を含有する、無菌、パイロジェンフリーの等張水溶液であろう。

40

【0291】

非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能有機エステルである。水性担体は、水、アルコール/水溶液、乳剤、または食塩水および緩衝培地を含む懸濁液を含む。非経口的ビヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンガー、または固定油を含む。静脈内ビヒクルは、液体および栄養補給剤、リンガーデキストロースに基づくものなどの電解質補充剤を含む。保存剤および他の付加物、例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、不活性ガスなどもまた、存在し得る。一般に、Remington's Pharmaceutical Science, 16th Ed., Mack Eds., 1980 (参照によりその全体が本明細書に

50

組込まれる)を参照されたい。

【0292】

本明細書で記載される医薬組成物は、生成物の局所集中(例えば、急速投与、デポ効果)および/または増加した安定性もしくは特定の局所環境での半減期を提供する方法で、制御されるか、または持続性送達のために製剤され得る。組成物は、スイッチの製剤、ポリペプチド、核酸、またはポリ乳酸、ポリグリコール酸などのポリマー化合物の粒子性調製と共に本明細書で開示されるベクター、ならびに生分解性マトリックスなどの薬剤、注射可能ミクロスフェア、マイクロカプセル粒子、マイクロカプセル、生侵食性粒子ビーズ、リポソーム、および次いでデポ注射として送達され得る活性剤の、制御されるか、または持続性放出を提供する植込み型送達デバイスを含み得る。かかる持続性、または制御された送達手段を製剤するための技術が知られており、種々のポリマーが、開発されており、かつ薬物の制御された放出および送達のために使用されている。かかるポリマーは典型的に、生分解性および生体適合性である。温度またはpH感受性特性を有する、鏡像異性ポリマーまたはポリペプチドセグメント、およびハイドロゲルの複合体形成によって形成されるものを含むポリマーハイドロゲルは、生理活性タンパク質剤(例えば、超長CDR3を含む抗体)の補足に関わる穏やかかつ水性の状態のため、薬物デポ効果を提供するのに望ましい場合がある。例えば、WO93/15722の、医薬組成物の送達に関する制御された放出多孔性ポリマー微小粒子の記載を参照されたい。この目的のための好適な材料は、ポリ乳酸(例えば、米国特許第3,773,919号を参照されたい)、などのポリ(a-ヒドロキシカルボン酸)のポリマー、ポリ-D(-)-3-ヒドロキシブチル酸(EP133,988A)、L-グルタミン酸およびγエチル-L-グルタメート(Sidmet al., Biopolymers, 22:547-556(1983))のコポリマー、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277(1981)、およびLanger, Chem. Tech., 12:98-105(1982))、エチレンビニルアセテート、またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。他の生分解性ポリマーは、ポリ(ラクトン)、ポリ(アセタール)、ポリ(オルトエステル)、およびポリ(オルトカルボネート)を含む。持続性放出組成物もまた、当該技術分野で知られるいくつかの方法(例えば、Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-92(1985))を参照されたい)のいずれかによって調製され得る、リポソームを含み得る。担体自体、またはその分解生成物は、標的組織内で非毒性であるべきであり、かつさらに状態を悪化させるべきではない。これは、標的傷害の動物モデルか、またはかかるモデルが利用不可である場合、通常の動物内でのルーティンスクリーニングによって決定され得る。持続性放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化が、ヒト成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン-(rhIFN-)、インターロイキン-2、およびMN r gp120を用いて無事に実施されている。Johnson et al., Nat. Med., 2:795-799(1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223(1993); Hora et al., Bio/Technology, 8:755-758(1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO97/03692、WO96/40072、WO96/07399; および米国特許第5,654,010号。これらのタンパク質の持続性放出製剤は、生分解性特性のその生体適合性および広範囲のため、ポリ乳酸コグリコール酸(PLGA)ポリマーを使用して開発された。PLGA、乳酸およびグリコール酸の分解生成物は、急速に人間の体内で排除され得る。さらに、このポリマーの分解性は、その分子量および組成に依存し得る。Lewis, "Controlled

10

20

30

40

50

release of bioactive agents from lactide / glycolide polymer, " in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1 - 41. 持続性放出組成物の追加の例は、例えば、EP 58, 481 A、米国特許第 3, 887, 699 号、EP 158, 277 A、カナダ特許第 1 176 565 号、U. Sidman et al., Biopolymers 22, 547 [1983]、R. Langer et al., Chem. Tech. 12, 98 [1982]、Sinha et al., J. Control. Release 90, 261 [2003]、Zhu et al., Nat. Biotechnol. 18, 24 [2000]、および Dai et al., Colloids Surf B Biointerfaces 41, 117 [2005] を含む。

10

【0293】

生体接着性ポリマーもまた、本開示の組成物における、または組成物を用いた使用のために企図される。生体接着性は、生物学的基質に長期間付着可能な合成および天然発生物質である。例えば、カルボポールおよびポリカルボフィルは両方、ポリ(アクリル酸)の合成架橋誘導体である。天然発生物質に基づく生体接着性送達系は、例えばヒアルロン酸としても知られるヒアルロン酸を含む。ヒアルロン酸は、D-グルクロン酸およびN-アセチル-D-グルコサミンの残基から成る天然発生物質ムコポリサッカライドである。ヒアルロン酸は、結合組織を含む脊椎動物の細胞外組織マトリクス内、ならびに滑液内、かつ目の硝子体および房水内に見出される。ヒアルロン酸のエステル化誘導体は、生体適合性および生分解性である送達における使用のためのミクロスフェアを生成するために使用されている(例えば、Cortivo et al., Biomaterials (1991) 12: 727 - 730、EP 517, 565、WO 96/29998、Illum et al., J. Controlled Rel. (1994) 29: 133 - 141 を参照されたい)。

20

【0294】

生分解性および非生分解性ポリマーマトリクスの両方は、本開示の組成物を送達するのに使用され得、かかるポリマーマトリクスは、天然のまたは合成ポリマーを含み得る。生分解性マトリクスが、好まれる。放出が起きる期間は、ポリマーの選択に基づく。典型的には、数時間から3~12か月の範囲の期間にわたる放出が、最も所望される。生分解性送達系を形成するために使用され得る、例示的な合成ポリマーは、乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリアミド、ポリカルボネート、ポリアルキレン、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン、ポリグリコライド、ポリシロキサン、ポリ無水物、ポリウレタンおよびそれらのコポリマー、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、アクリルおよびメタクリルエステルのポリマー、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース、セルロース硫酸ナトリウム、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ビニルアルコール)、酢酸ポリビニル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ならびにポリビニルピロリドンを含む。例示的な天然のポリマーは、アルギ

30

40

50

ネット、およびデキストランセルロースを含む他のポリサッカライド、コラーゲン、それらの化学誘導（置換、化学基の付加、例えば、当業者によりルーティンで行われるアルキル、アルキレン、ヒドロキシ化、酸化、および他の修飾）、アルブミンおよび他の親水性タンパク質、ゼインおよび他のプロラミンおよび疎水性タンパク質、コポリマー、ならびにそれらの混合物を含む。一般に、これらの材料は、酵素加水分解によって、または表面もしくはバルク侵食によるインビボでの水への暴露によって分解する。ポリマーは任意に、水中でその重量の約90%まで吸収でき、さらに任意に多価イオンまたは他のポリマーを用いて架橋される、ヒドロゲルの形態（例えば、WO 04 / 009664、WO 05 / 087201、Sawhney, et al., *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587を参照されたい）である。

10

【0295】

送達系はまた、コレステロール、コレステロールエステルなどのステロール、ならびに脂肪酸またはモノ二およびトリグリセリドなどの中性脂肪を含む脂質、ヒドロゲル放出系、サイラスティック系、ペプチドベース系、ワックスコーティング、従来の結合剤および賦形剤を使用した圧縮錠剤、部分的に融合された移植片などである非ポリマー系を含む。特異的な例は、(A)生成物が、米国特許第4,452,775号、同第4,675,189号、および同第5,736,152号に記載されるものなどのマトリクス内に形態で含有される浸食系、(b)生成物が、米国特許第3,854,480、5,133,974、および5,407,686に記載されるものなどのポリマーから制御された速度で透過する拡散系を含むが、これらに限定されない。生成物を含有するリポソームは、例えば、(DE 3,218,121、Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985)、Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030-4034 (1980)、EP 52,322、EP 36,676、EP 88,046、EP 143,949、EP 142,641、JP 83-118008、米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号、およびEP 102,324)などの方法として知られる方法により調製され得る。

20

【0296】

代替的にまたは加えて、組成物は、本明細書で開示されるスイッチが吸収されているか、またはカプセル化されている、膜、スポンジ、または他の好適な材料の影響される領域への移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、デバイスは、任意の好適な組織または器官に移植され得、スイッチ、核酸、または本明細書で開示されるベクターの送達は、急速投与を介して、または連続的投与を介して、または連続的注入を使用したカテーテルを介して、直接デバイスを通る。

30

【0297】

本明細書で開示されるCAR-ECスイッチを含む医薬組成物（例えば、ヒト化された抗CD19抗体、またはそのCD19結合断片を含むCAR-EC、ならびに/または本明細書で開示されるGCN4誘導体を含むCAR-EC）は、例えば、ドライパウダーなどの吸入のために調剤され得る。吸入溶液もまた、エアロゾル送達のための液化性噴霧剤に調剤され得る。なお別の製剤では、溶液は噴霧され得る。肺投与のための追加の医薬組成物は、例えば、化学的に修飾されたタンパク質の肺送達を開示するWO 94 / 20069に記載されるものを含む。肺送達のために、粒子サイズは、遠位の肺への送達のために好適であるべきである。例えば、粒子サイズは、1 μm ~ 5 μm であり得るが、しかしながら、例えば、それぞれの粒子がかなり多孔性である場合、より大きな粒子が使用され得る。

40

【0298】

本明細書で開示されるCAR-ECスイッチ（例えば、ヒト化された抗CD19 CAR-ECスイッチ）を含有するある特定の製剤は、経口的に投与され得る。この様式で投与される製剤は、タブレットおよびカプセルなどの固体制剤の化合において習慣的に使用されるこれらの担体を用いてか、または用いずに調剤され得る。例えば、カプセルは、消化

50

管内の、バイオアベイラビリティが最大化され、かつプレシステマティック分解が最小化される時点で、製剤の活性部分を放出するように設計され得る。追加の薬剤が、選択的結合剤の吸収を促進するために含まれ得る。希釈剤、風味付け、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた、用いられ得る。

【0299】

別の調製は、タブレットの製造に好適である非毒性賦形剤との混合物内の、本明細書で開示されるCAR-ECスイッチ（例えば、本明細書で開示されるGCN4誘導体を含む、ヒト化された抗CD19CAR-ECおよび/またはCAR-ECなどの抗CD19CAR-EC）の有効量に関与し得る。滅菌水または別の好適なビヒクル内でタブレットを溶解することによって、溶液は、単位服用量で調製され得る。好適な賦形剤は、カルシウムカルボネート、ナトリウムカルボネートもしくは炭酸水素、ラクトース、またはリン酸カルシウムなどの不活性希釈剤、あるいはデンプン、ゼラチン、またはアカシアなどの結合剤、あるいはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクなどの潤滑剤を含むが、これらに限定されない。

10

【0300】

好適および/または好ましい薬学的製剤は、意図される投与経路、送達フォーマット、および望ましい用量に依存して、本開示および製剤技術の一般知識の観点で決定され得る。投与方法に関係なく、有効用量は、患者の体重、体表面積、または器官サイズに従って計算され得る。本明細書で記載される製剤のそれぞれに関与する治療のために好適な用量を決定するための計算のさらなる精製は、当該技術分野のルーティンで行われ、当該技術分野のルーティンで実施されるタスクの範囲内である。好適な用量は、好適な用量応答データの使用を通して確認され得る。

20

【0301】

V. 標的

標的細胞上で細胞表面分子と相互作用するキメラ受容体およびキメラ受容体スイッチが、本明細書で開示される。一般に、エフェクター細胞および標的細胞のスイッチへの結合は、標的細胞を、標的細胞上で効果を有するエフェクター細胞の活性のために十分近いエフェクター細胞の近位に移動させる。

【0302】

いくつかの実施形態では、標的細胞とエフェクター細胞との間の近さは、PCT/US 2016/027997またはPCT/US 2016/027990（それぞれは参照によりその全体が本明細書に組込まれる）に開示される方法に従って、最適化される。

30

【0303】

例えば、いくつかの実施形態では、CAR-IDを標的化部分に結合させる任意のリンカーのサイズは、標的細胞とエフェクター細胞との間の近さを最適化させるために、その長さを増加または減少させることによって修飾され得る。さらに、標的化部分上のCAR-IDの位置は、標的細胞とエフェクター細胞との間の近さを最適化させるために変動し得る。

【0304】

様々な実施形態では、エフェクター細胞（例えば、T細胞）および標的細胞が、スイッチに結合される場合、T細胞は、標的細胞上で細胞傷害性効果を有する免疫応答を生じる。

40

【0305】

スイッチは、CD19を発現する複数の標的細胞と相互作用し得る。標的細胞は、感染した細胞であり得る。標的細胞は、病原的に感染した細胞であり得る。標的細胞は、病気の細胞であり得る。標的細胞は、遺伝子的に修飾された細胞であり得る。標的細胞は、宿主細胞ではあり得ない。非細胞標的上の分子と相互作用するCAR-ECスイッチが、さらに本明細書で開示される。非細胞標的は、ウィルスまたはその部分であり得る。非細胞標的は、細胞の断片であり得る。非細胞標的は、細胞外マトリクス構成成分またはタンパク質であり得る。

【0306】

50

標的細胞は、組織から誘導され得る。組織は、脳、食道、乳房、結腸、肺、グリア、卵巣、子宮、精巣、前立腺、消化管、膀胱、肝臓、胸腺、骨および皮膚から選択され得る。標的細胞は、1つ以上の内分泌腺から誘導され得る。代替的に、または加えて、標的細胞は、1つ以上の内分泌腺から誘導され得る。内分泌腺は、リンパ腺、脳下垂体、甲状腺、副甲状腺、膵臓、生殖腺または松果腺であり得る。

【0307】

標的細胞は、幹細胞、多能性細胞、造血性幹細胞または前駆体細胞から選択され得る。標的細胞は、循環細胞であり得る。標的細胞は、免疫細胞であり得る。

10

【0308】

標的細胞は、癌幹細胞であり得る。標的細胞は、癌細胞であり得る。癌細胞は、組織から誘導され得る。組織は、非限定的な例として、脳、食道、乳房、結腸、肺、グリア、卵巣、子宮、精巣、前立腺、消化管、膀胱、肝臓、甲状腺および皮膚から選択され得る。癌細胞は、骨から誘導され得る。癌細胞は、血から誘導され得る。癌細胞は、B細胞、T細胞、単球、血小板、白血球、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、造血性幹細胞または内皮細胞前駆体から誘導され得る。癌細胞は、CD19陽性Bリンパ球から誘導され得る。癌細胞は、幹細胞から誘導され得る。癌細胞は、多能性細胞から誘導され得る。癌細胞は、1つ以上の内分泌腺から誘導され得る。内分泌腺は、リンパ腺、脳下垂体、甲状腺、副甲状腺、膵臓、生殖腺または松果腺であり得る。

20

【0309】

標的細胞は、幹細胞、多能性細胞、造血性幹細胞または前駆体細胞から選択され得る。標的細胞は、循環細胞であり得る。標的細胞は、免疫細胞であり得る。

【0310】

標的細胞は、癌幹細胞であり得る。標的細胞は、癌細胞であり得る。癌細胞は、組織から誘導され得る。組織は、非限定的な例として、脳、食道、乳房、結腸、肺、グリア、卵巣、子宮、精巣、前立腺、消化管、膀胱、肝臓、甲状腺および皮膚から選択され得る。癌細胞は、骨から誘導され得る。癌細胞は、血から誘導され得る。癌細胞は、B細胞、T細胞、単球、血小板、白血球、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、造血性幹細胞または内皮細胞前駆体から誘導され得る。癌細胞は、CD19陽性Bリンパ球から誘導され得る。癌細胞は、幹細胞から誘導され得る。癌細胞は、多能性細胞から誘導され得る。癌細胞は、1つ以上のから誘導され得る。内分泌腺は、リンパ腺、脳下垂体、甲状腺、副甲状腺、膵臓、生殖腺または松果腺であり得る。

30

【0311】

癌細胞は、CD19陽性細胞であり得る。癌細胞は、CD19陽性Bリンパ球であり得る。癌細胞、Her2陽性細胞であり得る。Her2陽性細胞は、Her2陽性乳癌細胞であり得る。Her2陽性細胞は、Her2陽性膵臓癌細胞であり得る。癌細胞は、BCMA陽性細胞であり得る。癌細胞は、BCMA陽性多発性骨髄腫細胞であり得る。癌細胞は、CS1陽性細胞であり得る。CS1陽性細胞は、多発性骨髄腫細胞であり得る。癌細胞は、EGFRvIII陽性細胞であり得る。EGFRvIII陽性細胞は、神経膠芽細胞腫細胞であり得る。癌細胞は、CD20陽性細胞であり得る。癌細胞は、CD22陽性細胞であり得る。癌細胞は、CD33陽性細胞であり得る。CD33陽性細胞は、急性骨髄性白血病細胞であり得る。癌細胞は、CD123陽性細胞であり得る。CD123陽性細胞は、急性骨髄性白血病細胞であり得る。癌細胞は、CLL1陽性細胞であり得る。CD123陽性細胞は、急性リンパ性白血病細胞であり得る。CLL1陽性細胞は、急性骨髄性白血病細胞であり得る。癌細胞は、(i)CD33陽性、(ii)CD123陽性、(iii)CLL1陽性、または(iv)(i)、(ii)および(iii)のうちの2つ以上の組み合わせである急性骨髄性白血病細胞であり得る。

40

【0312】

細胞表面分子は、抗原であり得る。抗原は、細胞上の表面抗原または細胞表面マーカー

50

の少なくとも一部分であり得る。抗原は、細胞上の受容体または共受容体であり得る。抗原は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）によって結合され、T細胞受容体に提示され得る、分子または分子断片を指し得る。「抗原」という用語はまた、免疫原を指し得る。免疫原は、対照にそれ自体で注射された場合、適応性免疫応答を誘発し得る。免疫原は、それ自体で免疫応答を含み得る。抗原は、スーパー抗原、T依存性抗原またはT - 非依存性抗原であり得る。抗原は、外来性抗原であり得る。外来性抗原は、例えば、吸入、接種、または注射によって、外から体に入る典型的には抗原である。いくつかの抗原は、外来性抗原として始まり得、後に内在性（例えば、細胞内ウイルス）になる。抗原は、内在性抗原であり得る。内在性抗原は、通常の細胞代謝の結果として、または病原性感染（例えば、ウイルス性、細菌性、真菌、寄生虫）のために、細胞内で産生されている抗原であり得る。抗原は、自己抗原であり得る。自己抗原は、特異性自己免疫疾患を罹患している性患者の免疫系によって認識されるタンパク質（および時折DNAまたはRNA）の通常のタンパク質または複合体であり得る。これらの抗原は、通常の条件下で、免疫系の標的であるべきではないが、遺伝子的および/または環境的因子により、かかる抗原に対する通常免疫学的耐性は、これらの患者では呈されない。抗原は、呈されるか、または状態または疾患のために、過剰発現され得る。状態または疾患は、癌または白血病であり得る。状態は、炎症性疾患または状態であり得る。状態または疾患は、代謝疾患であり得る。状態は、遺伝子障害であり得る。

10

【0313】

細胞表面分子は、腫瘍抗原として名づけられている抗原であり得る。腫瘍抗原またはネオ抗原は、腫瘍細胞の表面上のMHC IまたはMHC II分子によって呈される抗原であり得る。これらの抗原は時折、腫瘍細胞によって呈されるが、通常の細胞によっては絶対に呈されない。この場合、それらは腫瘍特異性抗原（TSAs）と呼ばれ、一般に、腫瘍特異性変異から生じる。腫瘍細胞および通常の細胞によって呈される抗原がより一般的であり、それらは腫瘍関連抗原（TAAs）と呼ばれる。これらの抗原を認識する細胞傷害性Tリンパ球は、それらが増殖するか、または転移する前に、腫瘍細胞を破壊し得る。腫瘍抗原は、例えば、それらがB細胞によって認識され得る変異受容体の形態で、腫瘍の表面上にあり得る。別様に明記されない限り、「腫瘍抗原」「腫瘍特異性抗原」および「腫瘍と関連する抗原」という用語は、本明細書で交換可能に使用される。

20

【0314】

細胞表面分子は、受容体であり得る。受容体は、細胞外受容体であり得る。受容体は、細胞表面受容体であり得る。非限定的な例として、受容体は、ホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、増殖因子または細胞認識分子に結合し得る。受容体は、膜貫通受容体であり得る。受容体は、酵素連結受容体であり得る。受容体は、G - タンパク質結合受容体（GPCR）であり得る。受容体は、増殖因子受容体であり得る。非限定的な例として、増殖因子受容体は、上皮性増殖因子受容体、線維芽細胞増殖因子受容体、血小板誘導増殖因子受容体、神経増殖因子受容体、形質転換増殖因子受容体、骨形態形成タンパク質増殖因子受容体、肝細胞増殖因子受容体、血管性内皮増殖因子受容体、幹細胞因子受容体、インスリン増殖因子受容体、ソマトメジン受容体、エリスロポエチン受容体およびホモログ、ならびにそれらの断片から選択され得る。受容体は、ホルモン受容体であり得る。受容体は、インスリン受容体であり得る。非限定的な例として、受容体は、エイコサノイド受容体、プロスタグランジン受容体、エストロゲン受容体、濾胞刺激ホルモン受容体、プロゲステロン受容体、増殖ホルモン受容体、ゴナドトロピン放出ホルモン受容体、それらのホモログおよびそれらの断片から選択され得る。受容体は、アドレナリン性受容体であり得る。受容体は、インテグリンであり得る。受容体は、Eph受容体であり得る。受容体は、黄体化ホルモン受容体であり得る。細胞表面分子は、黄体化ホルモン受容体に少なくとも約50%相同であり得る。受容体は、免疫受容体であり得る。非限定的な例として、免疫受容体は、パターン認識受容体、トール様受容体、NOD様受容体、キラー活性化受容体、キラー阻害剤受容体、Fc受容体、B細胞受容体、補体受容体、ケモカイン受容体およびサイトカイン受容体から選択され得る。非限定的な例として、サイトカイン受容体は

30

40

50

、インターロイキン受容体、インターフェロン受容体、形質転換増殖因子受容体、腫瘍壊死因子受容体、コロナー刺激因子受容体、それらのホモログおよびそれらの断片から選択され得る。受容体は、受容体キナーゼであり得る。受容体キナーゼは、チロシンキナーゼ受容体であり得る。受容体キナーゼは、セリンキナーゼ受容体であり得る。受容体キナーゼは、スレオニンキナーゼ受容体であり得る。非限定的な例として、受容体キナーゼは、R a s、R a f、P I 3 K、タンパク質キナーゼA、タンパク質キナーゼB、タンパク質キナーゼC、A K T、A M P K、ホスホリパーゼ、それらのホモログおよびそれらの断片から選択されるシグナル伝達タンパク質を活性化し得る。受容体キナーゼは、M A P K / E R Kシグナル伝達経路を活性化し得る。受容体キナーゼは、J a k、S t a tまたはS m a dを活性化し得る。

10

【0315】

細胞表面分子は、非受容体細胞表面タンパク質であり得る。細胞表面分子は、分化タンパク質のクラスターであり得る。非限定的な例として、細胞表面分子は、C D 3 4、C D 3 1、C D 1 1 7、C D 4 5、C D 1 1 b、C D 1 5、C D 2 4、C D 1 1 4、C D 1 8 2、C D 1 4、C D 1 1 a、C D 9 1、C D 1 6、C D 3、C D 4、C D 2 5、C D 8、C D 3 8、C D 2 2、C D 6 1、C D 5 6、C D 3 0、C D 1 3、C L L 1、C D 3 3、C D 1 2 3、C D 1 9、C D 2 0、それらの断片、およびそれらのホモログから選択され得る。

【0316】

細胞表面分子は、ペプチドを含まない分子であり得る。細胞表面分子は、脂質を含み得る。細胞表面分子は、脂質部分または脂質群を含み得る。脂質部分は、ステロールを含み得る。脂質部分は、脂肪酸を含み得る。抗原は、糖脂質を含み得る。細胞表面分子は、炭水化物を含み得る。

20

【0317】

(a) 酵母転写因子ペプチドからのペプチドを含むキメラ抗原受容体結合ペプチド性抗原と、(b) 標的化ポリペプチドとを含む、C A R - E Cスイッチが、本明細書で開示される。酵母転写因子ペプチドは、G C N 4ペプチドであり得る。標的化ポリペプチドは、標的化抗体または抗体断片を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗体の重鎖を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗体の軽鎖を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗体のF a bを含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C D 1 9抗体またはその断片を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗H e r 2抗体またはその断片を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C S 1抗体、抗B C M A抗体、抗E G F R v I I I抗体、抗C D 2 0抗体、抗E G F R抗体、抗C E A抗体、抗C L L 1抗体、抗C D 3 3抗体、抗C D 1 2 3抗体、およびそれらの断片から選択され得る。

30

【0318】

(a) 親水性標的ペプチド(H T P) タグを含む領域に結合するC A Rと、(b) 標的化ポリペプチドとを含むC A R - E Cスイッチが、さらに本明細書で開示される標的化ポリペプチドは、標的化抗体または抗体断片を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗体の重鎖を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗体の軽鎖を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗体のF a bを含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C D 1 9抗体またはその断片を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗H e r 2抗体またはその断片を含み得る。標的化抗体または抗体断片は、抗C S 1抗体、抗B C M A抗体、抗E G F R v I I I抗体、抗C D 2 0抗体、抗E G F R抗体、抗C E A抗体、抗C L L 1抗体、抗C D 3 3抗体、および抗C D 1 2 3抗体、およびそれらの断片から選択され得る。

40

【0319】

標的(例えば、C D 1 9)は、標的細胞の細胞表面上で、呈されるか、または過剰発現され得る。標的(例えば、C D 1 9)は、呈されるか、または疾患または状態のために過剰発現され得る。疾患または状態は、癌または白血病であり得る。疾患または状態は、炎症性疾患または状態であり得る。疾患または状態は、代謝疾患であり得る。疾患または状態は、遺伝子傷害であり得る。

50

【 0 3 2 0 】

V I . キメラ受容体

キメラ受容体を発現する細胞の活性調節する、キメラ受容体エフェクター細胞スイッチ (C A R - E C) スイッチが、本明細書で開示される。本明細書で使用される、「キメラ受容体」および「キメラ抗原受容体」 (C A R) という用語は、「キメラ受容体エフェクター細胞」および「キメラ抗原受容体エフェクター細胞」という用語であるように、交換可能に使用される (キメラ「抗原」受容体という用語が、細胞外部分が、抗体またはその抗原結合部分であることを意味している事実にも関わらず) 。キメラ抗原受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み得る。したがって、「キメラ抗原受容体」および「 C A R 」という用語は、いくつかの実施形態では、抗体細胞外ドメインを含まないキメラ受容体を包含し、用語は、いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合部分を含むか、またはそれから成る細胞外ドメインを含むキメラ受容体を包含する。

10

【 0 3 2 1 】

キメラ抗原受容体 (C A R) を発現する細胞の活性を調節する C A R - E C スイッチが、本明細書で開示される。本開示は、キメラ抗原受容体、 C A R - E C スイッチによって調節される活性を提供する。キメラ抗原受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み得る。細胞外ドメインは、 C A R - E C スイッチの C A R - I D (例えば、 G C N 4 、 F l a g 、 K 4 、もしくは E 4 ペプチド、または F I T C などの小分子) に結合し得る。

20

【 0 3 2 2 】

C A R は、免疫原性をヒトに減少するためにヒト化され得る。 C A R は、ヒト化される細胞外ドメインを含み得る。ヒト化は、 C A R の免疫原性を、 C A R - E C スイッチに対する細胞外ドメインの特異性および親和性を保持しながらヒトに減少し得る。 C A R は、表 1 3 に提供される C A R 配列のうちのいずれか 1 つのヒト化されたバージョンであり得るか、または配列番号 2 7 0 ~ 2 8 9 のうちのいずれか 1 つのヒト化されたバージョンであり得る。 C A R は、表 1 3 に提供される C A R 配列のうちのいずれか 1 つと、少なくとも 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または少なくとも 9 9 % 同一であるヒト化された配列を含み得るか、または配列番号 2 7 0 ~ 2 8 9 と、少なくとも 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または少なくとも 9 9 % 同一であるヒト化された配列を含み得る。

30

40

50

【表 1 3 - 1】

表 1 3 :

マウス CAR 配列		
配列	配列番号の番号	名前
MGVPTQLLGLLLLWITDAICDIQMTQSPASLSTSLGETVTIQ CQASEDIYSGLAWYQQKPGKSPQLLIYGASDLQDGVPSRFS GSGSGTQYSLKITSMTQTEDEGVYFCQQGLTYPRTFGGGTKL ELKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVRPGTSVKLSC KVSGDTITFYMHFVKQRPQGQLEWIGRIDPEDESTKYSEK FKNKATLTADTSSNTAYLKLSSLTSEDATYFCIYGGYYFD YWGQGVMTVSSIEFMYPPPYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHT QSSPKLFWALVVVAGVLCYGLLVTVALCVIWTNSRRNRG GQSDYMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPRAKFSR SAETAANLQDPNQLFNELNLGRREEFDVLEKKRARDPEMG GKQQRNRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGK GHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQTLAPR	270.	>1D3__CAR
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVIWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSSI EFMYPYPPPYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWALVV VAGVLCYGLLVTVALCVIWTNSRRNRGGQSDYMNMTPRRP GLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPRAKFSRSAETAANLQDPNQL FNELNLGRREEFDVLEKKRARDPEMGKQQRNRNPQEGVY NALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKD TFDALHMQTLAPR	271.	>IH-1-109
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVIWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS ESKYGPPCPPCFWALVVVAGVLCYGLLVTVALCVIWTNS	272.	>SV-285-064

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

RRNRGGQSDYMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPR AKFSRSAETAANLQDPNQLFNELNLGRREEFDVLEKKRARD PEMGGKQQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGER RRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQTLAPR		
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKLTVLGGGGGSGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYN SALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWQQGTTTLTVSS ESKYGPCCPPCFWALVVVAGVLCYGLLVTVALCVIWTK WIRKKFPHIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPEEEGGGGG YELRAKFSRSAETAANLQDPNQLFNELNLGRREEFDVLEKK RARDPEMGGKQQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGT KGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQTLAPR	273.	>SV-319- 029
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKLTVLGGGGGSGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYN SALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWQQGTTTLTVSS ESKYGPCCPPCFWALVVVAGVLCYGLLVTVALCVIWTNS RRNRGGQSDYMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPR WIRKKFPHIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPEEEGGGGG YELRAKFSRSAETAANLQDPNQLFNELNLGRREEFDVLEKK RARDPEMGGKQQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGT KGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQTLAPR	274.	>SV-319- 028
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKLTVLGGGGGSGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYN SALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWQQGTTTLTVSS ESKYGPCCPPCFWALVVVAGVLCYGLLVTVALCVIWTNS RRNRGGQSDYMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPR AKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRAR	275.	>SV-319- 090

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 3】

DPEMGGKQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR		
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQTTLTVSS ESKYGPCCPPCFWALVVAGVLCYGLLVTVALCVIWT WIRKKFPHIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPEEEGGGGG YELRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEK KRARDPEMGGKQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIG TKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR	276.	>SV-319- 091
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQTTLTVSS ESKYGPCCPPCFWALVVAGVLCYGLLVTVALCVIWTNS RRNRGGQSDYMNMTPRRPLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPK WIRKKFPHIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPEEEGGGGG YELRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEK KRARDPEMGGKQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIG TKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR	277.	>SV-319- 092
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQTTLTVSS TTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC DIYIWAPLAGICVALLSLITLICNSRRNRGGQSDYMNMT RRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPRAKFSRSAETAANLQDP NQLFNELNLGRREEFDVLEKKRARDPEMGGKQRRRNPQE	278.	>SV-319- 162

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

GVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGGHDGLFQGLSTA TKDTFDALHMQTLAPR		
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS TTTKPVL RTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC DIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICKWIRKKFPHIFKQPFKKT GAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYELRAKFSRSAETAANL QDPNQFLNELNLGRREEFDVLEKKRARDPEMGGKQRRRN PQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGGHDGLFQGL STATKDTFDALHMQTLAPR	279.	>SV-1-003
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS TTTKPVL RTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC DIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICNSRRNRGGQSDYMNMT RRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPKWIRKKFPHIFKQPFK TTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYELRAKFSRSAETAA NLQDPNQFLNELNLGRREEFDVLEKKRARDPEMGGKQRR RNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQTLAPR	280.	>SV-319- 163
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS TTTKPVL RTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC DIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICNSRRNRGGQSDYMNMT RRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPKAKFSRSAETAA NLQDPNQFLNELNLGRREEFDVLEKKRARDPEMGGKQRR RNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQTLAPR	281.	>SV-319- 088

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 5】

NQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQRRRN PQ EGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQTLAPR		
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYN SALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS TTTKPVL RTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC DIYIWAPLAGICVALLLSLITLICKWIRKKFPHIFKQPFKKT GAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYELRAKFSRSAETAANL QDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQRRRN NPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQTLAPR	282.	>SV-1-004
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYN SALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS TTTKPVL RTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC DIYIWAPLAGICVALLLSLITLICNSRRNRGGQSDYMNMT RRPGLTRKPYQPYAPARDFAA YRPKWIRKKFPHIFKQPFKK TTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYELRAKFSRSAETAA NLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQQR RRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR	283.	>SV-319- 089
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYN SALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS TTTKPVL RTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC DIYIWAPLAGICVALLLSLITLICNSRRNRGGQSDYMNMT RRPGLTRKPYQPYAPARDFAA YRPKWIRKKFPHIFKQPFKK TTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYELRAKFSRSAETAA NLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQQR RRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR	284.	>SV-319- 164

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 6】

AETAANLQDPNQLFNELNLGRREEFDVLEKKRARDPEMGG KQQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQLAPR		
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS ESKYGPCCPPCIYIWAPLAGICVALLSLIITLICKWIRKKFP HIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYELRAKF SRSAETAANLQDPNQLFNELNLGRREEFDVLEKKRARDPEM GGKQQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRG KGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQLAPR	285.	>SV-1-001
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS ESKYGPCCPPCIYIWAPLAGICVALLSLIITLICNSRRNRGG QSDYMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPKWIRKKF PHIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYELRAK FSRSAETAANLQDPNQLFNELNLGRREEFDVLEKKRARDPE MGGKQQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRR GKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQLAPR	286.	>SV-319- 165
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS ESKYGPCCPPCIYIWAPLAGICVALLSLIITLICNSRRNRGG QSDYMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPRAKFSRS AETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGG	287.	>SV-319- 166

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 7】

KQQRRRNPOEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR		
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGG GGSGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALSALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS ESKYGPCCPPCIYIWAPLAGICVALLSLIITLICKWIRKKFP HIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYELRAKF SRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPE MGGKQQRRRNPOEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR	288.	>SV-1-002
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEK PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGG GGSGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYG VNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALSALKSRLSVTKDN SKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS ESKYGPCCPPCIYIWAPLAGICVALLSLIITLICNSRRNRGG QSDYMNMTPRRPLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPKWIRKKF PHIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYELRAK FSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPE MGGKQQRRRNPOEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR	289.	>SV-319- 167

10

20

30

【 0 3 2 3 】

細胞外ドメインは、CAR-ECスイッチ（CAR-抗体）のCAR-IDに結合する抗体または抗体断片を含み得る。抗体または抗体断片は、ヒト化され得る。CAR抗体は、抗体の少なくとも一部分を含み得る。いくつかの例では、CAR抗体は、全長抗体ではない。CAR抗体は、免疫グロブリンまたはその断片の少なくとも一部分を含み得る。免疫グロブリンまたはその断片は、scFv、di-scFv、bi-scFv、Fab、Fc、F(ab')₂、pFc'、ナノボディ、アフィボディ、DARPin、二重特異性抗体、ラクダ科、操作されたT細胞受容体およびモノボディから成る群から選択され得る。免疫グロブリンは、IgA1、IgA2、IgD、IgM、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から成る群から選択され得る。かかる免疫グロブリンまたはそれらの断片は、ヒト化され得る。CAR抗体は、一本鎖可変断片（scFv）の少なくとも一部分を含み得る。部分は、抗原結合部分であり得る。scFvまたはヒト化されたscFvは、一般構造軽鎖リンカー重鎖を含むか、またはそれから成り得る。scFvまたはヒト化されたscFvは、一般構造重鎖リンカー軽鎖を含むか、またはから成り得る。ヒト化されたscFvは、ヒト免疫グロブリンフレームワークへの非ヒト（例えば、マウス）CDR移植と共に、ヒト化されたVH（可変重鎖）配列を含み得る。フレームワークは、IGHJ4-59であり得る。ヒト化されたVH配列は、野生型IGHJ4-59フレームワークに移植されたマウスCDRを含み得る。ヒト化されたVH配列は、1つ以上のフレームワーク変化（すなわち、置換などのアミノ酸修飾）を含む修飾されたIG

40

50

H J 4 - 5 9 フレームワークへ移植されたマウス C D R を含み得る。フレームワーク変化は、位置 7 1 (K a b a t H 7 1)、位置 7 3 (K a b a t H 7 3)、位置 9 3 (K a b a t H 9 0)、位置 9 4 (K a b a t H 9 1)、またはかかる位置の組み合わせであり得る。ヒト化された s c F V は、加えてまたは代替的に、ヒト免疫グロブリン軽鎖フレームワークに移植された非ヒト（例えば、マウス）C D R を有する、ヒト化された V L （可変軽鎖）配列を含み得る。軽鎖フレームワークは、I G L V 7 - 4 6 フレームワークであり得る。ヒト化された V L 配列は、野生型 I G L V 7 - 4 6 フレームワークへ移植されたマウス C D R を含み得る。ヒト化された V L 配列は、1 つ以上のフレームワーク変化（すなわち、置換などのアミノ酸修飾）を含む修飾された I G L V 7 - 4 6 フレームワークへ移植されたマウス C D R を含み得る。C A R 抗体は、ヒト、完全なヒト、ヒト化され、ヒト操作された、非ヒトおよび／またはキメラ抗体であり得る。

10

【 0 3 2 4 】

C A R の細胞外ドメインは、抗 G C N 4 抗体またはその G C N 4 結合部分を含み得る。細胞外ドメインは、ヒト化された抗 G C N 4 s c F v （例えば、高親和性変異抗 G C N 4 s c F v であり、かつ Z a h n d , C . , e t a l . , (2 0 0 4) , The J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 2 7 9 , 1 8 8 7 0 - 1 8 8 7 7 （参照によりその全体が本明細書に組込まれる）に記載されるクローン 5 2 S R 4 ）を含み得る。ヒト化された抗 G C N 4 s c F V （例えば、クローン 5 2 S R 4 のヒト化されたバージョン）は、ヒト化された軽鎖、ヒト化された重鎖、またはヒト化された軽鎖およびヒト化された重鎖を含み得る。ヒト化された抗 G C N 4 （例えば、クローン 5 2 S R 4 のヒト化されたバージョン）は、ヒト免疫グロブリンフレームワークへ移植された非ヒト（例えば、マウス）C D R を有するヒト化された V H （可変重鎖）配列を含み得る。フレームワークは、I G H J 4 - 5 9 フレームワークであり得る。ヒト化された V H 配列は、野生型 I G H J 4 - 5 9 フレームワークへ移植された抗 G C N 4 抗体からのマウス C D R を含み得る。ヒト化された V H 配列は、野生型 I G H J 4 - 5 9 フレームワークへ移植された 5 2 S R 4 からの C D R を含み得る。ヒト化された V H 配列は、1 つ以上のフレームワーク変化（すなわち、置換、欠失または付加などのアミノ酸修飾）を含む修飾された I G H J 4 - 5 9 フレームワークへ移植された 5 2 S R 4 抗体からの C D R を含み得る。フレームワーク変化は、C D R - H 2 立体構造、C D R - H 3 立体構造に影響し、V H ドメインの内部パッキングを改善し、かつ／あるいは結合親和性を改善し得る。フレームワーク変化は、位置 7 1 (K a b a t H 7 1)、位置 7 3 (K a b a t H 7 3)、位置 9 3 (K a b a t H 9 0)、位置 9 4 (K a b a t H 9 1)、またはかかる位置の組み合わせであり得る。ヒト化された抗 G C N 4 （例えば、クローン 5 2 S R 4 のヒト化されたバージョン）は、加えてまたは代替的に、免疫グロブリン軽鎖フレームワークへ移植された非ヒト（例えば、マウス）C D R を有する、ヒト化された V L （可変軽鎖）配列を含み得る。軽鎖フレームワークは、I G L V 7 - 4 6 フレームワークであり得る。ヒト化された V L 配列は、野生型 I G L V 7 - 4 6 フレームワークへ移植された抗 G C N 4 抗体からのマウス C D R を含み得る。ヒト化された V H 配列は、野生型 I G L V 7 - 4 6 フレームワークへ移植された 5 2 S R 4 抗体からの C D R を含み得る。ヒト化された V H 配列は、1 つ以上のフレームワーク変化（すなわち、置換、欠失または付加などのアミノ酸修飾）を含む修飾された I G L V 7 - 4 6 フレームワークへ移植された 5 2 S R 4 からの C D R を含み得る。フレームワーク変化は、脱アミノへの低傾向を有する配列をもたらし得、C D R 立体構造に影響し、内部パッキングを改善し、かつ／あるいは結合親和性を改善し得る。フレームワーク変化は、本明細書で示される位置を含む任意の位置、またはかかる位置の組み合わせであり得る。ヒト化された抗 G C N 4 s c F V は、配列番号 1 6 9 ~ 1 7 4 から選択されるアミノ酸配列によってコードされ得る。ヒト化された抗 G C N 4 s c F V は、配列番号 1 7 5 ~ 1 8 0 から選択されるポリヌクレオチド配列によってコードされ得る。ヒト化された抗 G C N 4 s c F V は、配列番号 1 6 9 ~ 1 7 4 のうちのいずれか 1 つから選択される配列と、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列によってコードされ得る。ヒ

20

30

40

50

ト化された抗 G C N 4 s c F V は、配列番号 1 7 5 ~ 1 8 0 のうちのいずれか 1 つから選択される配列と、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるポリヌクレオチド配列によってコードされ得る。

【 0 3 2 5 】

C A R の細胞外ドメインは、表 1 4 ~ 1 6 で提供されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つ、または配列番号 2 9 0 ~ 3 8 8、および 4 2 3 から選択されるいずれか 1 つの配列によってコードされた、ヒト化された s c F v を含み得る。C A R の細胞外ドメインは、表 1 4 ~ 1 6 のうちのいずれか 1 つで提供される配列と、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列か、または配列番号 2 9 0 ~ 3 8 8、および 4 2 3 のうちのいずれか 1 つと、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列によってコードされたヒト化された s c F v を含み得る。

10

【 0 3 2 6 】

ある特定の実施形態では、C A R の細胞外ドメインは、配列番号 3 2 2 と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である配列を含む。

【 0 3 2 7 】

ある特定の実施形態では、C A R の細胞外ドメインは、配列番号 3 2 2 と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である配列から成る。

20

【 0 3 2 8 】

ある特定の実施形態では、C A R の細胞外ドメインは、配列番号 3 2 2 を含む。ある特定の実施形態では、C A R の細胞外ドメインは、配列番号 3 2 2 から成る。

【 0 3 2 9 】

C A R は、表 1 7 に提供されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つによってコードされ得る。C A R は、配列番号 3 8 9 ~ 3 9 7 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列によってコードされ得る。C A R は、表 1 7 に提供されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つと、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列によってコードされ得る。C A R は、配列番号 3 8 9 ~ 3 9 7 のうちのいずれか 1 つと、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列によってコードされ得る。

30

【 0 3 3 0 】

特定の実施形態では、C A R は、配列番号 4 1 1 のアミノ酸配列によってコードされ得る。特定の実施形態では、C A R は、配列番号 4 1 2 のポリヌクレオチド配列によってコードされ得る。

40

50

【表 1 4 - 1】

表 1 4

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ TEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLTCTVSGFLLTD YGVNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYN SALKSRVST KDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTL TVSS	290.	>52SR4_LH
QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYASWFQQ KPGQAPRTLIYGTNNRAPWTPARFSGSLGGKAALTLSGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG GSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFL LTDYGVNWIRQPPGKGLEWIGVIWGDGITDYNPSLKSRVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGLFYWGQGTL VTVSS	291.	>L1,H1
QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG GSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFL LTDYGVNWIRQPPGKGLEWIGVIWGDGITDYNPSLKSRVTI SKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGTL VTVSS	292.	>L2,H2
QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG GSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFL LTDYGVNWIRQPPGKGLEWIGVIWGDGITDYNPSLKSRVTI SKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGTL VTVSS	293.	>L2,H2b

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG GSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLT VSKDTSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGT LLTVSS	294.	>L2,H3
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG GSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLT VSKDNSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQG TLLTVSS	295.	>L2,H3b
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG GSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLT VSKDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGT TLTVSS	296.	>L2,H4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG GSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLT VSKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGT TLTVSS	297.	>L2,H4(A87D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLT VSKDNSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQG TLLTVSS	298.	>L2,H5
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFSL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTDYNPSLKSRLT VSKDNSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQG TLLTVSS	299.	>L2,H6
QAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLT VSKDNSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQG TLLTVSS	300.	>L2(G23R),H3 b
QAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLT VSKDNSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQG TLLTVSS	301.	>L2(G23R),H5

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFSL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTDYNPSLKSRLT VSKDTSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQG TLLTVSS	302.	>L2(G23R),H6
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFL LTDYGVNWIRQPPGKGLEWIGVIWGDGITDYNPSLKSRLTI SKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGTL VTVSS	303.	>L3,H2
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLT VSKDTSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGT LLTVSS	304.	>L3,H3
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGQAFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLL TDYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLT VSKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGT TLTVSS	305.	>L3,H4(A87D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 5】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFLLT DYGVNWIRQPPGKGLEWIGVIWGDGITDYNPSLKSRTIS KDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGT TVSS	306.	>L4,H2
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	307.	>L4,H3
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	308.	>L4,H4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	309.	>L4,H4(A87D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 6】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFVGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	310.	>L4(L67I,G69D),H4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFVGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	311.	>L4(G23R,L67I,G69D),H4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFVGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	312.	>L4(G23R),H4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFVGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	313.	>L4(G23R),H4 (E6Q)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 7】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	314.	>L5,H4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	315.	>L5,H4(E6Q)
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	316.	>L5,H4(A87D)
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	317.	>L5,H4(E6Q,A 87D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 8】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKLTVLGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	318.	>L5(V12S),H4
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKLTVLGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	319.	>L5(V12S),H4 (A87D)
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKLTVDGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	320.	>L5(L109D),H 4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKLTVDGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	321.	>L5(L109D),H 4(A87D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 9】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	322.	>L5(L109D),H 4(E6Q,A87D)
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	323.	>L5(V12S,L10 9D),H4(A87D)
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	324.	>L5(V12S,L10 9D),H4(E6Q,A 87D)
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	325.	>L5(V12S,E40 Q,L109D),H4(E6Q,A87D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 0】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWQGTT LTVSS	326.	>L5(V12S,I87 E,L109D),H4(E6Q,A87D)
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWQGTT LTVSS	327.	>L5(V12S,F89 Y,L109D),H4(E6Q,A87D)
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWQGTT LTVSS	328.	>L5(V12S,E40 Q,I87E,L109D) ,H4(E6Q,A87D)
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWQGTT LTVSS	329.	>L5(V12S,E40 Q,F89Y,L109D ,H4(E6Q,A87 D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 1】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTGSSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	330.	>L5(V12S,I87 E,F89Y,L109D ,H4(E6Q,A87 D)
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTGSSSTGAVTTSNYASWVQQ KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	331.	>L5(V12S,E40 Q,I87E,F89Y,L 109D),H4(E6Q ,A87D)
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTD YGVNWVRQSPGKGLEWLGVIWGDGITDYN SALKSRLSVT KDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTT LTVSS	332.	>L5(L109D),m uH_52SR4
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTGSSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVDGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTD YGVNWVRQSPGKGLEWLGVIWGDGITDYN SALKSRLSVT KDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTT LTVSS	333.	>L5(V12S,L10 9D),muH_52S R4

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 2】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPLSTSSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLDGGKAALTISGA QPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	334.	>L5(V12S,L69 D,L109S),H4(A87D)
QAVVTQEPLSTSSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLDGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	335.	>L5(V12S,G23 R),H4
QAVVTQEPLSTSSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLDGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	336.	>L5(V12S,G23 R),H4(A87D)
QAVVTQEPLSTSSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLDGGKAALTISGA QPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	337.	>L5(V12S,L69 D),H4(A87D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 3】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVGGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDY GVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSK DTSKNQVSLKMSSLTAAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTLT VSS	338.	>L5(ΔL109),H 4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVGGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDY GVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSK DTSKNQVSLKMSSLTADTARYYCVTGLFDYWGQGTTLT VSS	339.	>L5(ΔL109),H 4(A87D)
QAVVTQEPSLTSSPGGTIVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLDGGKAALTISGA QPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFLLT DYGVNWVRQSPGKGLEWLGVIWGDGITDYN SALKSRLSV TKDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	340.	>L5(V12S,L69 D,L109S),muH _52SR4
QAVVTQEPSLTSSPGGTIVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGG GGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFLLT YGVNWVRQSPGKGLEWLGVIWGDGITDYN SALKSRLSVT KDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	341.	>L5(V12S),mu H_52SR4

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 4】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTSSPGGTIVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	342.	>L5(V12S),H4 (E6Q)
QAVVTQEPSLTSSPGGTIVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLDGGKAALTISGA QPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVSGGGSGGGG SGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSSLTADTARYYCVTGLFDYWGQGTT LTVSS	343.	>L5(V12S,L69 D,L109S),H4(A87S)
QAVVTQEPSLTSSPGGTIVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVSGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	344.	>L5(V12S,L10 9S),H4
QAVVTQEPSLTSSPGGTIVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	345.	>L5(V12S,L69 D),H4

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 5】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTSSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	346.	>L5(V12S),H4 (A87S)
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	347.	>L5(G23R),H4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFSLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGSTDYNPSLKSRLTVS KDNSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGTL LTVSS	348.	>L5,H6
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFSLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGSTDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGTL TVSS	349.	>L5,H6(N73T)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 6】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVILTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPGQAFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	350.	>L6(P46F),H4
QAVVTQEPSLTVSPGGTVILTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPGQAFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	351.	>L6(P46F),H4(E6Q)
QAVVTQEPSLTVSPGGTVILTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	352.	>L6,H4(A87D)
QAVVTQEPSLTVSPGGTVILTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPGQAFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTV SKDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	353.	>L6(P46F),H4(A87D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 7】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYASWVQE KPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLGGAALTISGA QPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGG SGGGSGGGGSQVQLQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFSLT DYGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGSTDYNPSLKSRLTV SKDNSKNQVSLKMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGTL LTVSS	354.	>L6,H6
DAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQE KPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ TEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTD YGVNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLSVT KDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	355.	>c11
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ TEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	356.	>muL_52SR4, H4(A87D)
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ TEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTDADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	357.	>muL_52SR4, H4(E6Q,A87D)

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 8】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (LH) I		
配列	配列番号 ナンバー	名前
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ TEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTSADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	358.	>muL_52SR4, H4(A87S)
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQE KPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ TEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVS KDTSKNQVSLKMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTL TVSS	359.	>muL_52SR4, H4

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 1】

表 1 5

ヒト化された sCAR scFV 候補 (HL) II		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QVQLQESGPGGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQPP GKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSLK MSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTTLTVSSGGGGSGG GGSGGGGGSGGGGSQAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGS LLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKLT VLG	360.	>H4,L5
QVQLQESGPGGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQPP GKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSLK MSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTTLTVSSGGGGSGG GGSGGGGGSGGGGSQAVVTQEPLTSSPGGTVTTLTCGSSTG AVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGS LLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKLT VLG	423.	>H4,L5(V12S)
QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQP PGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSL KMSSLTSADTARYYCVTGLFDYWGQGTTTLTVSSGGGGSG GGSGGGGGSGGGGSQAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSG SLLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKL TVLG	361.	>H4(E6Q,A87 S),L5
QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQP PGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSL KMSSLTSADTARYYCVTGLFDYWGQGTTTLTVSSGGGGSG GGSGGGGGSGGGGSQAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSST GAVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSG SLLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFEGGGTKL TVLG	362.	>H4(E6Q,A87 S),L5(G23R)

10

20

30

40

50

【表 15 - 2】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (HL) II		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFSLTDYGVNWVRQP PGKLEWLGVWGDGSTDYNPSLKSRLTVSKDNSKNQVS LKMSLTAADTAVYYCVTGLFDYWQGQTLLTVSSGGGGS GGGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTTSNYASWVQQKPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARF SGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGG TKLTVLG	363.	>H6,L2
QVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQPP GKLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDNSKNQVSLK MSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWQGQTLLTVSSGGGGSGG GGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTTSNYASWVQQKPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFSGS LLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGTKL TVLG	364.	>H3b,L2
QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQP PGKLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDNSKNQVSL KMSLTAADTAVYYCVTGLFDYWQGQTLLTVSSGGGGSG GGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTTSNYASWVQQKPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGT KLTVLG	365.	>H5,L2
QVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQPP GKLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSLK MSSLTAADTARYYCVTGLFDYWQGQTLLTVSSGGGGSGG GGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTG AVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGS LLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLT VLG	366.	>H4,L5(G23R)

10

20

30

40

50

【表 15 - 3】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (HL) II		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFSLTDYGVNWVRQP PGKGLEWLGVWGDGSTDYNPSLKSRLTVSKDNSKNQVS LKMSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGTLLTVSSGGGGGS GGGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYASWVQQKPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARF SGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGG TKLTVLG	367.	>H6,L2(G23R)
QVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQPP GKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDNSKNQVSLK MSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGTLLTVSSGGGGGGSG GGGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYASWVQQKPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGGT KLTVL	368.	>H3b,L2(G23R))*
QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQP PGKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDNSKNQVSL KMSSLTAADTAVYYCVTGLFDYWGQGTLLTVSSGGGGGS GGGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYASWVQQKPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPARF SGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCVLWYSDHWVFGGG TKLTVL	369.	>H5,L2(G23R) *
QVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQPP GKGLEWLGVWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSLK MSSLTSADTARYYCVTGLFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGG GGSGGGSGGGGSQAVVTQEPLTSSPGGTVTLCGSSTG AVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSGS LDGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKL TVSG	370.	>H4(A87S),L5 (V12S,L69D,L 109S)

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 4】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (HL) II		
配列	配列番号 ナンバー	名前
QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQP PGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSL KMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSG SLLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKL TVLG	371.	>H4(E6Q),L5
QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQP PGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSL KMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTTSNYASWVQEKPDHLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSG SLLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKL TVDG	372.	>H4(E6Q),L5(L109D)
DVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYGVNWVRQS PGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVFL KMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGGSQAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSST GAVTTSNYASWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSG SLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKL TVLG	373.	>52SR4_HL
QVQLQQSGPGLVKPSETLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQP PGKGLEWLGVIWGDGITDYNPSLKSRLTVSKDTSKNQVSL KMSSLTAADTARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGGSQAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSST GAVTTSNYASWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSG SLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKL TVLG	374.	>H4(E6Q),mu L_52SR4

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 5】

ヒト化された sCAR scFV 候補 (HL) II		
配列	配列番号 ナンバー	名前
DVQLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFLLTDYGVNWVRQS PGKGLEWLGVIWGDGITDYNALKSRLSVTKDNSKSQVFL KMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTTSNYASWVQEKPDLFRGLIGGTNNRAPGVPARFSG SLLGGKAALTISGAQPEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKL TVLG	375.	>muH_52SR4, L5

10

20

30

40

50

【表 16 - 1】

表 16

ヒト化された sCAR scFV 候補 ω) III		
配列	配列番号 ナンバー	名前
DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSTGAVTTSNYASWVQE KPGKLFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQP EDFATYFCALWYSNHWVFGQGTKVELKRGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFSL TDYGVNWVRQAPGRGLEWIGVIWGDGITDYN SALKDRFII SKDNGKNTVYLQMSKVRSDDTALYYCVTGLFDYWGQGT LVTVSS	376.	>λ
DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSTGAVTTSNYASWVQE KPGKLFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQP EDFATYFCALWYSNHWVFGQGTKVELKRGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFSL TDYGVNWVRQAPGRGLEWIGVIWGDGITDYN SALKDRFII SKDDCENTVYLQMSKVRSDDTALYYCVTGLFDYWGQGT LVTVSS	377.	>ω
DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSTGAVTTSNYASWVQE KPGKLFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQP EDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKRGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFSL TDYGVNWVRQAPGRGLEWIGVIWGDGTTDYN SALKDRFI ISKDDCENTVYLQMSKVRSDDTALYYCVTGLFDYWGQGT LVTVSS	378.	>ω_m3
DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSTGAVTTSNYASWVQE KPGKLFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQP EDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKRGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFSL TDYGVNWVRQAPGRGLEWIGVIWGDGTTDYN SALKDRFI ISKDDSENTVYLQMSKVRSDDTALYYCVTGLFDYWGQGT LVTVSS	379.	>ω_m3S

10

20

30

40

50

【表 1 6 - 2】

ヒト化された sCAR scFV 候補 ω) III		
配列	配列番号 ナンバー	名前
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGKAFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGSGSGTDLTISSLQ PEDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKGGGSGGGGS GGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT DYGVNWVRQAPGKGLEWIGVIWGDGTTDYADSLKGRFTI SKDDSKNTVYLLQMNSVRAEDTAVYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	380.	>ω2
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGKAFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQP EDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKGGGSGGGGSG GGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTD YGVNWVRQAPGKGLEWIGVIWGDGTTDYADSLKGRFTIS KDDSKNTVYLLQMNSVRAEDTAVYYCVTGLFDYWGQGT VTVSS	381.	>ω3
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGKAFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLLGKATLTISSLQ PEDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKGGGSGGGGS GGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT DYGVNWVRQAPGKGLEWIGVIWGDGTTDYADSLKGRFTI SKDDSKNTVYLLQMNSVRAEDTAVYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	382.	>ω4
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGKAFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLSGGKATLTISSLQ PEDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKGGGSGGGGS GGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT DYGVNWVRQAPGKGLEWIGVIWGDGTTDYADSLKGRFTI SKDDSKNTVYLLQMNSVRAEDTAVYYCVTGLFDYWGQGT LTVSS	383.	>ω5

10

20

30

40

50

【表 1 6 - 3】

ヒト化された sCAR scFV 候補 ω) III		
配列	配列番号 ナンバー	名前
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGKAFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGSGSGTDLTISSLQ PEDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKGGGSGGGGS GGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT DYGVNWVRQAPGKGLEWLGVIWGDGTTDYADSLKGRFT ISKDNSKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCVTGLFDYWGQGT LLTVSS	384.	>ω6
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGKAFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQ EDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKGGGSGGGSG GGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT YGVNWVRQAPGKGLEWLGVIWGDGTTDYADSLKGRFTIS KDNSKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCVTGLFDYWGQGT LLTVSS	385.	>ω7
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGKAFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLLGKATLTISSLQ PEDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKGGGSGGGGS GGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT DYGVNWVRQAPGKGLEWLGVIWGDGTTDYADSLKGRFT ISKDNSKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCVTGLFDYWGQGT LLTVSS	386.	>ω8
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSTGAVTTSNYASWVQQ KPGKAFKGLIGGTNNRAPGVPSRFSGLSGGKATLTISSLQ PEDFATYYCALWYSNHWVFGQGTKVELKGGGSGGGGS GGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT DYGVNWVRQAPGKGLEWLGVIWGDGTTDYADSLKGRFT ISKDNSKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCVTGLFDYWGQGT LLTVSS	387.	>ω9

10

20

30

【表 1 6 - 4】

ヒト化された sCAR scFV 候補 ω) III		
配列	配列番号 ナンバー	名前
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYGVNWVRQ APGKGLEWVSIVWGDGTTDYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGLFYWGQGTLLTVSSGGG GSGGGGSGGGGSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR SSTGAVTTSNYASWYQQKPGKAPKLLIYGTNNRAPGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCALWYSNHWVFGQ TKVEIK	388.	>ω10(HL)

40

50

【表 1 7 - 1】

表 1 7

第 2&第 3 代目 sCAR コンストラクト		
配列	配列番号ナ ンバー	名前
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQ EKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITG AQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSG FLLTDYGVNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYN SALK SRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDY WGQGTTLTVSSESKYGPPCPPCDIYWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRR EEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	389.	>TSY-2-193
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQ EKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITG AQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSG FLLTDYGVNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYN SALK SRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDY WGQGTTLTVSSESKYGPPCPPCDFWVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL NLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	390.	>MM-02-107

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 2】

DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQ EKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITG AQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSG FLLTDYGVNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALK SRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDY WGQGTTLTVSSESKYGPPCPPDFWVLVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	391.	>MM-02-083
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQ EKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITG AQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSG FLLTDYGVNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALK SRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDY WGQGTTLTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVGGVLACYLVTVAFIIFWVRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	392.	>MM-02-085

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 3】

DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQ EKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITG AQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGG GGSGGGGSGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSG FLLTDYGVNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALK SRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDY WGQGTTLTVSSESKYGPPCPPPDFWVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR	393.	>MM-02-084
DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQ EKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITG AQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLGGGGGSGG GGSGGGGSGGGSDVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSG FLLTDYGVNWVRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALK SRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDY WGQGTTLTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	394.	>MM-02-086

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 4】

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGG GSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQV FLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS VTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	395.	>MM-02-109
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGG GSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQV FLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS VTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	396.	>MM-02-110

10

20

30

【表 1 7 - 5】

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGG GSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQV FLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS VTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	397.	>CART19
---	------	---------

40

【0 3 3 1】

C A R - 抗体は、約 0 . 0 1 p M、約 0 . 0 2 p M、約 0 . 0 3 p M、約 0 . 0 4 p M

50

、0.05 pM、約0.06 pM、約0.07 pM、約0.08 pM、約0.09 pM、約0.1 pM、約0.2 pM、0.3 pM、約0.4 pM、約0.5 pM、約0.6 pM、約0.7 pM、約0.8 pM、約0.9 pMもしくは約1 pM、約2 pM、約3 pM、約4 pM、約5 pM、約6 pM、約7 pM、約8 pM、約9 pM、約10 pM、約0.01 nM、約0.02 nM、約0.03 nM、約0.04 nM、約0.05 nM、約0.06 nM、約0.07 nM、約0.08 nM、約0.09 nM、約0.1 nM、約0.2 nM、約0.3 nM、約0.4 nM、約0.5 nM、約0.6 nM、約0.7 nM、約0.8 nM、約0.9 nM、約1 nM、約2 nM、約2.5 nM、約3 nM、約4 nM、約5 nM、約6 nM、約7 nM、約8 nM、約9 nM、約10 nM、約12 nM、約14 nM、約16 nM、約18 nM、約20 nM、約22 nM、約24 nM、約26 nM、約28 nM、または約30 nM未満のCAR-IDに対する結合親和性を有し得る。

10

【0332】

細胞外ドメインは、抗フルオレセインイソチオシアネート(FITC)抗体またはそのFITC-結合部分を含み得る。抗FITC抗体は、抗FITC scFvであり得る。抗FITC scFvは、4-4-20、4D5Flu、4M5.3およびFITC-E2から選択され得る。抗FITC scFvは、配列番号87~90から選択される配列によってコードされ得る。

【0333】

CAR-抗体は、合成(非天然発生)ペプチドを認識し得る。CAR-抗体は、FLAG(登録商標)タグまたはその断片を認識する抗体または抗体断片を含み得る。CAR-抗体は、酵母転写因子GCN4またはその断片を認識する抗体または抗体断片を含み得る。CAR-抗体は、抗HTP抗体またはその断片を含み得る。

20

【0334】

膜貫通ドメインおよび/または細胞内ドメインは、細胞質シグナル伝達ドメイン少なくとも一部分を含み得る。膜貫通ドメインは、CD8膜貫通配列を含み得る。膜貫通ドメインは、CD28膜貫通配列を含み得る。膜貫通ドメインは、配列番号398または配列番号417と、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%同一である配列を含み得る。細胞内ドメイン、CD3ζ、CD28、および4-1BBを含む群から選択されるシグナル伝達分子の少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、(i)配列番号420のCD3ζ配列、(ii)配列番号418のCD28配列、(iii)配列番号419の4-1BB配列、もしくは(i)および(ii)、(i)および(iii)、(ii)および(iii)の組み合わせ、または(i)~(iii)の全てを含み得る。細胞内ドメインは、配列番号420のCD3ζ配列と、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%同一である配列を含み得る。細胞内ドメインは、配列番号418のCD28配列と、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%同一である配列を含み得る。細胞内ドメインは、配列番号419の4-1BB配列と、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%同一である配列を含み得る。細胞内ドメインは、Fc受容体またはその部分を含み得る。Fc受容体またはその部分は、CD16またはその部分であり得る。シグナル伝達分子は、CD3ζを含み得る。シグナル伝達分子は、CD28を含み得る。シグナル伝達分子は、4-1BBを含み得る。細胞内ドメインは、CD3ζの少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、CD28の少なくとも一部分を含み得、細胞内ドメインは、4-1BBの少なくとも一部分を含み得、細胞内ドメインは、OX-40の少なくとも一部分を含み得、細胞内ドメインは、CD30の少なくとも一部分を含み得、細胞内ドメインは、CD40の少なくとも一部分を含み得、細胞内ドメインは、CD2の少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、CD27の少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、PD-1の少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、ICOSの少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)の少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、CD7の少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメイン

30

40

50

は、リンホトキシン、誘導性発現と同一である少なくとも一部分を含み、ヘルペスウィルス侵入媒介物に対するヘルペスウィルス糖タンパク質 D、Tリンパ球 (LIGHT) 上で発現される受容体と競合し得る。細胞内ドメインは、NK G2C の少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、B7-H3 の少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、1つ以上のシグナル伝達分子からの細胞質シグナル伝達ドメインの少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、2つ以上の細胞質シグナル伝達ドメインの少なくとも一部分を含み得る。2つ以上の細胞質シグナル伝達ドメインは、2つ以上の異なるシグナル伝達分子からであり得る。細胞内ドメインは、3つ以上の細胞質シグナル伝達ドメインの少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、4つ以上の細胞質シグナル伝達ドメインの少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、1つ以上のシグナル伝達分子に結合するリガンドの少なくとも一部分を含み得る。細胞内ドメインは、CD83 に結合するリガンドの少なくとも一部分を含み得る。

10

【0335】

CAR は、ヒンジを含み得る。ヒンジは、膜貫通ドメインと細胞外ドメインとの間に位置し得る。ヒンジは、膜貫通ドメインの部分を含み得る。ヒンジは、細胞外ドメインの部分を含み得る。ヒンジは、長さ、配向、幾何学または柔軟性を、最適な免疫シナプスに必要な CAR に提供し得る。最適な免疫シナプスは、CAR-EC と標的細胞との間に、最適な距離および/または配向を提供し得る。最適な免疫シナプスは、標的細胞に対して最適なおよび/または最大の細胞毒性を提供し得る。PCT/US2016/027990 (参照によりその全体が本明細書に組込まれる) の例 15 に示されるように、FMC63 Fab の境界に結合する抗原の近位に移植された FITC を有する、CD19 標的化スイッチは、C-末端で移植された FITC を有するスイッチより優位である。抗 CD19 抗体 FMC63 のエピトープおよび CD19 抗原の対応する構造が知られていないにも関わらず、これは、標的細胞と sCAR-T 細胞との間の増加した距離のためであり得る。天然の T 細胞受容体 (TCR) によって形成される生理的免疫シナプスでは、細胞を呈する T 細胞と抗原との間の距離は、およそ 150 である。この距離は、シグナル伝達分子を脱リン酸化し、かつ T 細胞活性を下法調節するために作用するシナプスからの CD45 および CD148 などの抑制性ホスファターゼを、立体的に除外するのに決定的である。C 末端スイッチ (Fab の長さ分の N 末端スイッチより 65 長い) によって寄与されるより長いシナプスは、これらの抑制性ホスファターゼを立体的に除外できない可能性が高く、より少ない生産性の sCAR シグナル伝達をもたらす可能性が高い。したがって、本明細書で開示される方法は、スイッチおよび/または CAR 細胞外ドメインの長さを調節することによって、免疫シナプスの距離が約 100、約 150、約 175、または約 200 以下になるように、免疫シナプスの距離を調節することを含み得る。

20

30

【0336】

いくつかの実施形態では、最適な免疫シナプスは、例えば、約 100、約 150、約 175、または約 200 以下であり得る。

【0337】

ヒンジは、CD28 または 4-1BB、または CD3 の構成要素などの T 細胞に対して特異性である内在性膜貫通タンパク質の細胞外ドメインから誘導され得る。ヒンジは、合成的に誘導された配列 (スイッチ設計に関連するリンカーに関して列挙されるものなど) から誘導され得る。ヒンジは、ヒトタンパク質から誘導され得る。ヒンジは、膜貫通ドメインと近接し得る。このヒンジは、scFv) の重鎖定常領域 1 の部分を含み得る。このヒンジは、scFv) の軽鎖定常領域 1 の部分を含み得る。

40

【0338】

ヒンジの長さは、約 1 個のアミノ酸 ~ 約 10 個のアミノ酸であり得る。ヒンジの長さは、1 個のアミノ酸 ~ 約 20 個のアミノ酸であり得る。ヒンジの長さは、約 1 個のアミノ酸 ~ 約 50 個のアミノ酸であり得る。ヒンジの長さは、約 1 個のアミノ酸 ~ 約 100 個のアミノ酸であり得る。ヒンジの長さは、10 個のアミノ酸 ~ 約 50 個のアミノ酸であり得る。ヒンジの長さは、約 12 個のアミノ酸であり得る。ヒンジの長さは、約 45 個のアミノ

50

酸であり得る。

【 0 3 3 9 】

ヒンジは、長いヒンジであり得る。長いヒンジは、約 2 0 ~ 約 2 0 0 個のアミノ酸、約 2 0 ~ 約 1 0 0 個のアミノ酸、約 3 0 ~ 約 1 0 0 個のアミノ酸、約 4 0 ~ 約 1 0 0 個のアミノ酸、または約 4 5 ~ 約 1 0 0 個のアミノ酸の長さを有し得る。

【 0 3 4 0 】

ヒンジは、短いヒンジであり得る。短いヒンジは、約 1 ~ 約 2 0 個のアミノ酸、約 5 ~ 約 2 0 個のアミノ酸、または約 1 0 ~ 約 2 0 個のアミノ酸の長さを有し得る。

【 0 3 4 1 】

ヒンジは、C D 8 タンパク質の部分を含み得る。C D 8 タンパク質の部分は、約 4 個のアミノ酸 ~ 約 1 0 0 個のアミノ酸であり得る。C D 8 タンパク質の部分は、約 4 5 個のアミノ酸であり得る。ヒンジは、免疫グロブリンの部分を含み得る。免疫グロブリンは、I g G であり得る。免疫グロブリンは、I g G 4 であり得る。I g G 4 は、変異され得る（本明細書で I g G 4 m と称される）。免疫グロブリンの部分は、約 1 個のアミノ酸 ~ 約 2 0 個のアミノ酸であり得る。免疫グロブリンの部分は、約 1 2 個のアミノ酸であり得る。

【 0 3 4 2 】

ヒンジは、柔軟性であり得る。ヒンジは、構造化され得る。

【 0 3 4 3 】

ペプチド配列（例えば、本明細書で開示されるヒンジまたはリンカー）への参照で本明細書で使用される、「柔軟性」という用語は、少しまたは全く知られる二次構造を有さないアミノ酸の直鎖配列を含むペプチド配列を意味する。かかる柔軟性配列は、i n w h i c h ねじれ角度またはポリペプチド骨格の結合周りの回転が、多くの異なる配向を占める自由を有する、アミノ酸の直鎖配列を含み得る。いくつかの実施形態では、「柔軟性ヒンジ」への参照は、ヒンジが、様々な結合配向を介して C A R を C A R - I D に結合することを可能にする柔軟性ペプチド配列を含み、したがって、別様に C A R 細胞外ドメインに結合する C A R - I D に対して有害であったであろう立体障害を軽減することを意味する。

【 0 3 4 4 】

ペプチド配列（例えば、本明細書で開示されるヒンジまたはリンカー）への参照で本明細書で使用される、「構造化された」という用語は、画定された二次構造を形成するアミノ酸の直鎖配列を含むペプチド配列を意味する。かかる構造化された配列は、ねじれ角度またはポリペプチド骨格の結合周りの回転が、優先性を画定し、限られた数の配向を占めている、アミノ酸の直鎖配列を含み得る。いくつかの実施形態では、構造化されたヒンジは、免疫シナプスを画定し、かつより生産的な配向を見出すエントロピーコストを減少するペプチド配列を含み得る。言い換えると、構造化されたヒンジは、いくつかの実施形態では、柔軟性でないヒンジである。様々な実施形態では、「剛性」および「構造化された」という用語は、ペプチド配列（例えば、本明細書で開示されるヒンジまたはリンカー）への参照で交換可能に使用される。

【 0 3 4 5 】

ヒンジは、配列番号 9 3 ~ 1 0 3 から選択される配列を含み得る。ヒンジは、配列番号 9 3 ~ 1 0 3 から選択される配列と、少なくとも約 5 0 % 同一である配列を含み得る。ヒンジは、配列番号 1 6 5 ~ 1 6 8 から選択される配列を含み得る。ヒンジは、1 6 5 ~ 1 6 8 から選択される配列と、少なくとも約 5 0 % 同一である配列を含み得る。ヒンジは、配列番号 4 2 1 の配列を含み得る。ヒンジは、配列番号 4 2 1 と、少なくとも 5 0 % 同一である配列を含み得る。ヒンジは、配列番号 1 6 5 ~ 1 6 8、および 4 2 1 から選択されるいずれか 1 つの配列と、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である配列を含み得る。ヒンジ領域を有する C A R は、配列番号 1 8 1 ~ 1 8 3 から選択される配列によってコードされ得る。ヒンジ領域を有する C A R は、配列番号 1 8 1 ~ 1 8 3 から選択される配列と、少なくとも約 5 0 % 同一である配列によってコードされ得る。ヒンジは、配列番号 1 6 5 から成り得る。ヒンジは、配

10

20

30

40

50

列番号 1 6 7 を含むか、またはそれから成り得る。ヒンジは、配列番号 1 6 8 を含むか、またはそれから成り得る。配列番号 1 6 8 のヒンジはさらに、c 末端の D 残基を含み得る。ヒンジは、配列番号 4 2 1 を含むか、またはそれから成り得る。ヒンジは、配列番号 1 6 5、配列番号 1 6 7、配列番号 1 6 8、または配列番号 4 2 1 と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である配列を含むか、またはそれから成り得る。

【 0 3 4 6 】

ヒンジは、配列番号 1 6 5、1 6 7、1 6 8、または 4 2 1 のうちのいずれか 1 つと同一である配列を含み得、かつヒンジは、配列番号 1 6 6 の配列をさらに含み得る。例えば、配列番号 1 6 8 の I g G 4 m ヒンジ配列は、C 末端の D 残基（配列番号 1 6 6）をさらに含み得る。

【 0 3 4 7 】

C A R は、C A R - E C 上で相対的に低レベルで発現され得る。C A R は、C A R - E C 上で相対的に高レベルで発現され得る。C A R は、1 つの細胞につき約 2×10^6 受容体の細胞密度で発現され得る。C A R は、1 つの細胞につき約 0.5×10^6 受容体の細胞密度で発現され得る。C A R は、1 つの細胞につき約 0.05×10^6 超えの細胞密度で発現され得る。C A R は、E F 1 a、I L - 2、C M V、および C A R 発現を増加、または減少するように設計された合成プロモーターから選択されるプロモーターの制御下で発現され得る。プロモーターは、恒常的であり得る。プロモーターは、誘導性であり得る。

【 0 3 4 8 】

いくつかの特定の実施形態では、C A R は、(a) s c F v を含むか、またはそれから成る細胞外ドメイン、(b) ヒンジ、(c) 膜貫通ドメイン、および (d) 細胞内ドメインを含み、

a . s c F v が、

i . 表 1 4 ~ 1 7 で提供されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つによってコードされた s c F v、

I i . 配列番号 2 9 0 ~ 3 8 8、および 4 2 3 のうちのいずれか 1 つによってコードされた s c F v から選択され、

b . ヒンジが、

i . I g G 4 ヒンジ、I g G 4 m ヒンジ、C D 2 8 ヒンジ、および C D 8 ヒンジ、

i i . 配列番号 1 6 5、1 6 7、1 6 8、および 4 2 1 のうちのいずれか 1 つを含むヒンジ、ならびに

I i i . 配列番号 1 6 5、1 6 7、1 6 8、および 4 2 1 のうちのいずれか 1 つから成るヒンジから選択され、

c . 膜貫通ドメインが、

i . C D 8 膜貫通ドメインもしくはその部分または C D 2 8 膜貫通ドメインもしくはその部分、

i i . 配列番号 3 9 8 および 4 1 7 のうちのいずれか 1 つを含む膜貫通ドメイン、

i i i . 配列番号 3 9 8 および 4 1 7 のうちのいずれか 1 つから成る膜貫通ドメインから選択され、

d . 細胞内ドメインが、

I . C D 3 ζ シグナル伝達分子を含む細胞内ドメイン、

I i . C D 3 ζ シグナル伝達分子および C D 2 8 シグナル伝達分子を含む細胞内ドメイン、

I i i . C D 3 ζ シグナル伝達分子および 4 - 1 B B シグナル伝達分子を含む細胞内ドメイン、ならびに

I v . C D 3 ζ シグナル伝達分子、C D 2 8 シグナル伝達分子、および 4 - 1 B B シグナル伝達分子を含む細胞内ドメインから選択される。

【 0 3 4 9 】

いくつかの特定の実施形態では、C A Rは、図 2 4 A のコンストラクト A ~ H から選択される構造を含む。ある特定の実施形態では、C A Rは、図 2 4 A のコンストラクト E に従う構造を含む。ある特定の実施形態では、C A Rは、表 1 1 に記載される C A R から選択される。ある特定の特定の実施形態では、C A Rは、表 1 2 に記載される C A R から選択される。ある特定の特定の実施形態では、C A Rは、配列番号 4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 7、4 0 9、4 1 1、4 1 3、および 4 1 5 のうちのいずれか 1 つの配列を含む。ある特定の特定の実施形態では、C A Rは、配列番号 3 8 9 ~ 3 9 7 のうちのいずれか 1 つの配列を含む。ある特定の特定の実施形態では、C A Rは、配列番号 3 8 9 ~ 3 9 7、4 0 1、4 0 3、4 0 5、4 0 7、4 0 9、4 1 1、4 1 3、および 4 1 5 から選択される配列から成る。ある特定の特定の実施形態では、C A Rは、配列と、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれから成る。ある特定の特定の実施形態では、C A Rは、配列番号 4 0 0、4 0 2、4 0 4、4 0 6、4 0 8、4 1 0、4 1 2、4 1 4、および 4 1 6 から選択される配列によってコードされる。

10

【 0 3 5 0 】

多価の C A R

結合価もまた、C A R ヒンジに操作され得る (図 1 7 C)。非限定的な例として、一価のスイッチは、C A R のヒンジ領域で形成するジスフィルドを通して 2 つの C A R を補充し得る。ヒンジは、一価であると予期されされる C D 8 誘導ヒンジ (配列番号 1 6 5) であり得る。ヒンジは、I g G 分子のヒンジ領域から誘導され得る。I g G 分子は、I g G 1、I g G 4 または I g G 4 m (変異) から選択され得る。I g G 4 ヒンジ (配列番号 1 6 7) は、鎖間ジスルフィドに関与し得ないが、代わりに C A R を二量体化しない鎖内ジスルフィド結合を有する。ヒンジは、機能的に一価であると考えられる。I g G 1 および I g G 4 m ヒンジ (配列番号 1 6 8) は、共有結合性的にヒンジ領域を二量体化する鎖間ジスルフィド結合への関与を可能にする、プロリン変異に対するセリンを含有し得る (図 1 7)。これらのヒンジは、免疫シナプス (長い C D 8 誘導ヒンジ対短い I g G 4 誘導ヒンジを試験することによる) の距離制約、ならびに C A R および / またはスイッチの結合価効果 (短い I g G 4 誘導ヒンジ対 I g G 4 m 誘導 C A R を試験することによって) の両方を研究するために使用され得る。他のヒンジは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 分子 C H 2 および / もしくは C H 3、またはそれらの部分、あるいはそれらの組み合わせを含み得る。ヒンジは、C D 2 8 から誘導され得る。ヒンジは、二量体化し得る。

20

30

【 0 3 5 1 】

共 C A R / i C A R

本明細書で開示されるスイッチ可能な C A R およびスイッチは、特定の細胞 (例えば、疾患細胞) へ免疫応答を標的化し、健康細胞への免疫攻撃を最小化するために、抑制性キメラ抗原受容体 (i C A R) - T 細胞スイッチおよびスイッチ可能な i C A R - T 細胞を包含し得る。本明細書で開示されるスイッチ可能な C A R およびスイッチはまた、標的細胞 (例えば、疾患細胞) への免疫応答を標的化し、これらの細胞への免疫攻撃を最大化するために、スイッチ可能な共 C A R - T 細胞を用いた使用のための共刺激キメラ抗原受容体 (共 C A R) T 細胞スイッチを包含し得る。i C A R - T 細胞スイッチおよび共 C A R - T 細胞スイッチは、C A R 結合ドメインおよび標的結合ドメインを含む。本明細書で開示される組成物は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) を調節するための複数のスイッチを含み得、第 1 の標的細胞上の第 1 の抗原および C A R - E C 上の第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) と相互作用する第 1 のスイッチ、ならびに第 2 の標的細胞上の第 2 の抗原および C A R - E C 上の第 2 のキメラ抗原受容体 (C A R) と相互作用する第 2 のスイッチ。複数のスイッチは、既存の C A R - T 細胞と共に、かつ基準の C A R および / または抑制性 C A R (i C A R) を発現する C A R - E C と共に使用され得る。

40

50

複数のスイッチは、既存のCAR-T細胞と共に、かつ基準のCARおよび/または共刺激CAR（共CAR）を発現するCAR-ECと共に使用され得る。

【0352】

本明細書で開示されるスイッチ可能なCAR-EC細胞は、第1のスイッチ可能なCARおよび第2のスイッチ可能なCARを含み得る。第1のスイッチ可能なCARは、基準のCARであり得、かつ第2のスイッチ可能なCARは、iCARであり得る。第1のスイッチ可能なCARは、基準のCARであり得、かつ第2のスイッチ可能なCARは、共CARであり得る。

【0353】

iCARは、抑制性シグナルをCAR-T細胞に提供するキメラ受容体を含み得る。iCARは、PD-1またはCTLA-4から選択される細胞質ドメインを含み得る。iCARは、基準の（活性化）CARと同じ細胞によって発現され得る。iCARの活性は、基準のCARシグナルおよび/または活性を下げる。iCARの特異性は、CAR-T細胞活性が所望されない組織を保護するために使用され得る。iCAR活性は、スイッチによって制御され得ず、本明細書で「iCARスイッチ」と称される。同様に、基準のCAR活性は、第1および/または第2のスイッチによって制御され、本明細書で「CARスイッチ」と称される。スイッチ可能なiCAR-T細胞は、基準またはCAR-T細胞と共に標的化するのに非安全であり得る抗原の標的化を可能にする。

10

【0354】

免疫応答を開始するために、CARスイッチは、攻撃される標的細胞（例えば、癌細胞）上の正または「A」抗原と、基準のCARの活性を通して標的細胞に対して細胞傷害性活性を刺激する基準のCARとに結合する。通常の組織を保護するために、iCARスイッチは、T細胞によって回避される細胞（例えば、健康細胞）上の負または「B」抗原と、iCARのシグナル伝達を通して免疫活性を阻害するiCARとに結合する。「B」抗原は、遍在的に通常組織上で発現されるが、しかしほとんどの悪性細胞内で下方調節する。「A」抗原は、通常の組織に対して悪性細胞内で過剰発現され得る。B抗原は、タンパク質/細胞接着分子様遺伝子（OPCML）に結合するオピオイドであり得る。B抗原は、大腸癌（DCC）内で欠失されるヒアルロニダーゼ2（HYAL2）、およびSMAR1から選択され得る。

20

【0355】

共CARは、共刺激シグナルをCAR-T細胞に提供するキメラ受容体を含み得る。共CARは、CD137および/またはCD28から選択される細胞質ドメインを含み得る。共CARは、基準の（活性化）CARと同じ細胞によって発現され得る。共CARの活性は、基準のCARシグナルおよび/または活性を、促進および/またはそれと共同し得る。共CARは、基準のCAR-T細胞のみを発現するCAR-T細胞によって生成される標的細胞に向かう細胞毒性と比較して、細胞毒性を標的細胞に向かって増加し得る。共CAR活性は、スイッチによって制御され得、本明細書で「共CARスイッチ」と称される。同様に、基準のCAR活性は、第1および/または第2スイッチによって制御され得、本明細書で「CARスイッチ」と称される。

30

【0356】

非抗体CAR

いくつかの実施形態では、従来のCARとは対照的に、本明細書で開示されるキメラ抗原受容体は、CAR-IDと相互作用する非抗体細胞外ドメインを含み得る。すなわち、細胞外ドメインは、CAR-IDと相互作用する非抗体タンパク質または非抗体ペプチドを含み得る。したがって、キメラ抗原受容体は実際は、抗体または抗原を認識する抗体断片の伝統的な感覚では、標的上の抗原を認識し得ないが、しかし非抗体タンパク質またはペプチドがするであろう方法で標的と相互作用する。これらの場合、キメラ抗原受容体は、より正確には「キメラ受容体」と称され得る。当業者は、この開示全体の多くの例および説明において、キメラ抗原受容体が、キメラ受容体であり得ることを理解するであろう。スイッチのキメラ受容体の結合パートナーは、非抗体タンパク質またはペプチドであり

40

50

得る。したがって、キメラ受容体およびスイッチは、タンパク質 - タンパク質相互作用またはタンパク質 - ペプチド相互作用を有し得る。

【 0 3 5 7 】

タンパク質 - タンパク質相互作用

CARは、非抗体細胞外ドメインを含み得、細胞外ドメインは、非抗体タンパク質を含む。非抗体タンパク質は、キメラ受容体結合パートナーと相互作用し得、キメラ受容体結合パートナーは、タンパク質 - タンパク質相互作用を成すキメラ受容体結合タンパク質を含む。タンパク質 - タンパク質相互作用は、疎性であり得る。疎性相互作用は、キメラ受容体結合パートナーおよび非抗体ペプチドが、約 10 - 4 M、約 10 - 3 M、約 10 - 2 M、約 10 - 1 MのKDで、または約 10 - 1 M超えのKDで結合する相互作用であり得る。タンパク質 - タンパク質相互作用は、密接な相互作用であり得る。密接な相互作用は、キメラ受容体結合パートナーおよび非抗体ペプチドが、約 10 - 5 M、約 10 - 6 M、約 10 - 7 M、約 10 - 8 M、約 10 - 9 M、約 10 - 10 M、約 10 - 11 Mまたは約 10 - 12 MのKDで結合する、相互作用であり得る。タンパク質 - タンパク質相互作用は、共有結合性タンパク質 - タンパク質相互作用を含み得る。タンパク質 - タンパク質相互作用は、非共有結合性タンパク質 - タンパク質相互作用を含み得る。非抗体タンパク質および/またはキメラ受容体結合タンパク質は、酵素を含み得る。酵素は、ヌクレアーゼであり得る。ヌクレアーゼは、リボヌクレアーゼであり得る。リボヌクレアーゼは、原核生物であり得る。非抗体タンパク質および/またはキメラ受容体結合タンパク質は、基質を含み得る。非抗体タンパク質は、バルナーゼを含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、バルスターを含み得る。非抗体タンパク質は、バルスターを含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、バルナーゼを含み得る。バルナーゼは、バチルスアミロリケファシエンスからのアミノ酸リボヌクレアーゼである。バルスターは、バルナーゼの天然の細胞内阻害剤である。バルナーゼは、 10^{-8} s/Mの定率でタンパク質 - タンパク質結合を有することで、高親和性でバルスターと相互作用する (Buckle AM, Schreiber G, Fersht AR; Biochemistry 33(30): 8878 - 8 (August 1994)、参照によりその全体が本明細書に組込まれる)。バルナーゼ、バルスター、およびそれらの相互作用は、Mossakowska DE, Nyberg K, Fersht AR; Biochemistry 28(9): 3843 - 50 (May 1989) (参照によりその全体が本明細書に組込まれる)に記載される

【 0 3 5 8 】

タンパク質 - ペプチド相互作用

非抗体タンパク質は、キメラ受容体結合パートナーと相互作用し得、キメラ受容体結合パートナーは、タンパク質 - ペプチド相互作用を成すCAR-IDを含む。代替的に、非抗体細胞外ドメインは、キメラ受容体結合パートナーと相互作用する非抗体ペプチドを含み得、キメラ受容体結合パートナーは、タンパク質 - ペプチド相互作用を成すキメラ受容体結合タンパク質を含む。タンパク質 - ペプチド相互作用は、疎性相互作用であり得る。疎性相互作用は、キメラ受容体結合パートナーおよび非抗体ペプチドが、約 10 - 4 M、約 10 - 3 M、約 10 - 2 M、約 10 - 1 MのKD、または約 10 - 1 M超のKDで結合する相互作用であり得る。タンパク質 - ペプチド相互作用は、密接な相互作用であり得る。密接な相互作用は、キメラ受容体結合タンパク質および非抗体ペプチド (またはCAR-IDおよび非抗体タンパク質) が、約 10 - 5 M、約 10 - 6 M、約 10 - 7 M、約 10 - 8 M、約 10 - 9 M、約 10 - 10 M、約 10 - 11 Mまたは約 10 - 12 MのKDで結合する相互作用であり得る。非抗体タンパク質および/またはキメラ受容体結合タンパク質は、繊維状タンパク質、接着分子タンパク質、および膜タンパク質から選択され得る。

【 0 3 5 9 】

タンパク質 - ペプチド相互作用は、共有結合性タンパク質 - ペプチド相互作用を含み得る。例えば、非抗体タンパク質は、化膿連鎖球菌ピリンタンパク質を含み得、かつCAR

10

20

30

40

50

- IDは、イソペプタグを含み得る。代替的に、非抗体ペプチドは、イソペプタグを含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、化膿連鎖球菌ピリントンパク質を含み得る。イソペプタグと化膿連鎖球菌ピリントンパク質との間の相互作用は、Kang, H. J., Coulibaly, F., Clow, F., Proft, T., and Baker, E. N. Science 318, 1625 - 1628 (2007) および Zakeri, B. and Howarth, M.; J. Am. Chem. Soc. 132, 4526 - 4527 (2010) (それぞれは参照によりその全体が本明細書に組込まれる) に記載される。イソペプタグ配列は、配列番号 41 である。また、非限定的な例として、非抗体タンパク質は、タンパク質 (Spy Catcher) に結合する化膿連鎖球菌フィブロネクチンを含み得、かつ CAR-ID は、Spy Tag を含み得る。代替的に、非抗体ペプチドは、Spy Tag を含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、タンパク質 (Spy Catcher) に結合する化膿連鎖球菌フィブロネクチンを含み得る。Spy Catcher と Spy Tag との間の共有結合性相互作用は、Zakeri B, Howarth M, JACS, vol. 109 no. 12, (2012) (参照によりその全体が本明細書に組込まれる) に記載される。

【0360】

タンパク質 - ペプチド相互作用は、非共有結合性タンパク質 - ペプチド相互作用を含み得る。例えば、非抗体タンパク質は、シナプトブレビン、SNAP25、およびシンタキシン、ならびにそれらの部分 (例えば、 α ヘリックス) から選択され得、かつ CAR-ID は、SNARE を含み得る。代替的に、非抗体ペプチドは、SNARE を含み得、キメラ受容体結合タンパク質は、シナプトブレビン、SNAP25 およびシンタキシン、ならびにそれらの部分 (例えば、 α ヘリックス) から選択され得る。SNARE とシナプトブレビンと、SNAP25 とシンタキシンとの間の相互作用は、Sollner T, et al., Nature 362: 318 - 324 (1993)、Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT, Nature 395: 347 - 353 (1998)、および Darios, F, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 18197 - 18201 (2010) (それぞれは参照によりその全体が本明細書に組込まれる) に記載される。また、非限定的な例として、非抗体タンパク質は、RNase I を含み得、かつ CAR-ID は、Hu タグを含み得る。代替的に、非抗体ペプチドは、Hu タグを含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、RNase I を含み得る。また、非限定的な例として、非抗体タンパク質は、HuS アダプタータンパク質を含み得、かつ CAR-ID は、Hu タグを含み得る。代替的に、非抗体ペプチドは、Hu タグを含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、HuS アダプタータンパク質を含み得る。Hu タグと、RNase I と、Hu タグと、HuS アダプタータンパク質との間の相互作用は、Backer, M. V., et al., Adapter protein for site-specific conjugation of payloads for targeted drug delivery. Bioconjugate Chem. 15, 1021 - 1029 (2004) (参照によりその全体が本明細書に組込まれる) に記載される。

【0361】

ペプチド - ペプチド相互作用

CAR は、非抗体細胞外ドメインを含み得、細胞外ドメインは、非抗体ペプチドを含む。非抗体ペプチドは、キメラ受容体結合パートナーと相互作用し得、キメラ受容体結合パートナーは、ペプチド - ペプチド相互作用を成す CAR-ID を含む。ペプチド - ペプチド相互作用は、疎性相互作用であり得る。疎性相互作用は、キメラ受容体結合パートナーおよび非抗体ペプチドが、約 10 - 4 M、約 10 - 3 M、約 10 - 2 M、約 10 - 1 M の KD で、または約 10 - 1 M 超の KD で結合する相互作用であり得る。ペプチド - ペプチド相互作用は、密接な相互作用であり得る。密接な相互作用は、CAR-ID および非抗体ペプチド (または CAR-ID および非抗体ペプチド) が、約 10 - 5 M、約 10 - 6 M、約 10 - 7 M、約 10 - 8 M、約 10 - 9 M、約 10 - 10 M、約 10 - 11 M また

10

20

30

40

50

は約 10 - 12 M の K D で結合する相互作用であり得る。非抗体ペプチドおよび / または C A R - I D は、タンパク質の二次構造（例えば、 α ヘリックス、 β シート）、タンパク質ドメイン、酵素ドメイン、二量体化ドメイン、および多量体化ドメインを含み得るから選択される。

【0362】

ペプチド - ペプチド相互作用は、非共有結合性ペプチド - ペプチド相互作用を含み得る。非抗体ペプチドは、タンパク質の第 1 の α ヘリックスを含み得、かつ C A R - I D は、タンパク質の第 2 の α ヘリックスを含み得る。第 1 の α ヘリックスおよび第 2 の α ヘリックスは、コイルドコイル構造を形成し得る。例えば、いかなる方法でも限定されないが、第 1 のペプチドは、Litowski, J. R. (2002) に開示される E / K ペプチドのうちのいずれか 1 つ（例えば、配列番号 46 ~ 44、および 45 ~ 46、47 ~ 58 のうちのいずれか 1 つ）から選択され得、かつ第 2 のペプチドは、第 1 のペプチドを用いて α ヘリックスを形成することが可能な任意のペプチドから選択され得る。第 2 のペプチドは、Litowski (2002) に開示される E / K ペプチド（例えば、配列番号 43 ~ 44、45 ~ 46、47 ~ 58 のうちのいずれか 1 つ）であり得る非抗体タンパク質は、K 4 ペプチド（配列番号 43）を含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、E 4 ペプチド（配列番号 44）を含み得る。非抗体タンパク質は、E 4 ペプチド（配列番号 44）を含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、K 4 ペプチド（配列番号 43）を含み得る。K 4 ペプチドと E 4 ペプチドとの間の相互作用は、Litowski, J. R., and R. S. Hodges. J Biol Chem, 277: 37272 - 9 (2002) および Woolfson, D. N., Adv Protein Chem, 70: 79 - 112 (2005)（それぞれは参照によりその全体が本明細書に組込まれる）に記載される。非抗体タンパク質は、修飾された K 4 ペプチドを含み得、キメラ受容体結合タンパク質は、修飾された E 4 ペプチドを含み得る。非抗体タンパク質は、修飾された E 4 ペプチドを含み得、キメラ受容体結合タンパク質は、修飾された K 4 ペプチドを含み得る。非抗体タンパク質は、修飾された K 4 ペプチドを含み得、キメラ受容体結合タンパク質は、E 4 ペプチド（配列番号 44）を含み得る。非抗体タンパク質は、修飾された E 4 ペプチドを含み得、キメラ受容体結合タンパク質は、K 4 ペプチド（配列番号 43）を含み得る。非抗体タンパク質は、K 4 ペプチド（配列番号 33）を含み得、キメラ受容体結合タンパク質は、修飾された E 4 ペプチドを含み得る。非抗体タンパク質は、E 4 ペプチド（配列番号 44）を含み得、キメラ受容体結合タンパク質は、修飾された K 4 ペプチドを含み得る。非抗体タンパク質は、配列番号 43 の配列を有するペプチドから成るか、またはそれから本質的に成り得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、配列番号 44 の配列を有するペプチドから成るか、またはそれから本質的に成り得る。非抗体タンパク質は、配列番号 44 の配列を有するペプチドから成るか、またはそれから本質的に成り得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、配列番号 43 の配列を有するペプチドから成るか、またはそれから本質的に成り得る。非抗体タンパク質は、配列番号 43 と、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれ以上の同一性である配列を有するペプチドを含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、配列番号 44 と、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれ以上の同一性である配列を有するペプチドを含み得る。非抗体タンパク質は、配列番号 44 と、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれ以上の同一性である配列を有するペプチドを含み得、かつキメラ受容体結合タンパク質は、配列番号 43 と、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれ以上の同一性である配列を有するペプチドを含み得る。

【0363】

また、非限定的な例として、非抗体ペプチドは、マウスコロニン 1 A タンパク質の第 1 の α ヘリックスを含み得、かつ C A R - I D は、マウスコロニン 1 A タンパク質の第 2 の α ヘリックスを含み得る。マウスコロニン 1 A タンパク質のコイルドコイル相互作用は、Kammerer RA, et al., Proc Natl Acad Sci USA

10

20

30

40

50

102:13891-13896(2005)(参照によりその全体が本明細書に組込まれる)に記載される。

【0364】

また、非限定的な例として、非抗体ペプチドは、Aキナーゼアンカータンパク質(AKAP)アンカードメイン(AD)を含み得、かつCAR-IDは、cAMP依存性タンパク質キナーゼAの二量体化およびドッキングドメイン(DDD)を含み得る。DockおよびLock系として知られるDDDとのADの相互作用は、Rossi EA, Goldenberg DM, Chang CH, Bioconj Chem. Mar 21; 23(3):309-23(2012)、Rossi EA, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. May 2; 103(18):6841-6(2006)、およびBacker MV, Patel V, Jehning BT, Backer JM, Bioconj Chem. Jul-Aug; 17(4):912-9(2006)(参照によりその全体が本明細書に組込まれる)に記載されている。

10

【0365】

したがって、非限定的な例として、非抗体ペプチドは、Aキナーゼアンカータンパク質のアンカードメイン(AD1)を含み得、かつCAR-IDは、cAMP依存性タンパク質キナーゼAの二量体化およびドッキングドメイン(DDD1)を含み得る。代替的に、非抗体ペプチドは、DDD1を含み得、かつCAR-IDは、アンカードメイン(AD1)を含み得る。

【0366】

ペプチド-ペプチド相互作用は、共有結合性ペプチド-ペプチド相互作用を含み得る。非限定的な例として、非抗体ペプチドは、Aキナーゼアンカータンパク質のアンカードメイン(AD2)を含み得、かつCAR-IDは、cAMP依存性タンパク質キナーゼAの二量体化およびドッキングドメイン(DDD2)を含み得、AD2およびDDD2は、ADとDDDとの間にジスルフィド結合を形成するシステインで修飾されている。代替的に、非抗体ペプチドは、DDD2を含み得、かつCAR-IDは、AD2を含み得、AD2およびDDD2は、AD2とDDD2との間にジスルフィド結合を形成するシステインで修飾されている。これらのジスルフィド結合は、AD2とDDD2との間に共有結合性相互作用を形成し得る。これは、CAR-IDに対して非抗体ペプチドの親和性を増加する利点であり得、その逆も同じである。

20

30

【0367】

エフェクター細胞は、複数のキメラ受容体を含み得る。複数のキメラ受容体のうち2つ以上は、同じであり得る。複数のキメラ受容体のうち2つ以上は、異なり得る。複数のキメラ受容体のうちの2つ以上はそれぞれ、DDD(例えば、DDD1またはDDD2)を含む細胞外ドメインを含み得る。複数のキメラ受容体のうちの2つ以上のDDDは、自己ホモ多量体化し、多量化されたDDDを産生し得る。DDDは、自己ホモ二量体化し、二量体化したDDDを産生し得る。多量体化された、または二量体化されたDDDは、1つ以上のADに結合し得る。1つ以上のADに結合された多量体化された、または二量体化されたDDDは、1つのDDDを含むか、またはDDDを含まないキメラ受容体と比較して、エフェクター細胞のシグナル形質導入および/または活性を増加し得る。

40

【0368】

キメラ受容体は、細胞外ドメインを含み得、細胞外ドメインは、ADを含む。スイッチは、DDDを含み得る。スイッチは、DDDが、ADとの結合時に自己ホモ二量体化するため、ADに対して二価であり得る(例えば、図17を参照されたい)。ADへの結合時に自己ホモ二量体化するDDDは、標的細胞へのスイッチの結合活性を増加し得、かつ標的に対するスイッチの感受性を改善し得る。これは、細胞表面分子の低表面密度(または発現)を有する標的細胞に関連し得る。

【0369】

スイッチは、ADを含み得、かつキメラ受容体は、DDDを含み得るか(例えば、図18を参照されたい)、あるいはスイッチは、DDDを含み得、かつキメラ受容体は、AD

50

を含み得、D D D / A Dの対をもたらす（例えば、図 1 7を参照されたい）。D D D / A Dの対は、s c F vを含むキメラ抗原受容体と、ペプチドを含むスイッチとからもたらされるs c F c v / ペプチド対より小さくあり得、キメラ受容体結合パートナーに結合するキメラ受容体およびその後のキメラ受容体活性 / シグナル伝達に対して最適であるサイズおよび幾何学をこの対に提供する。

【 0 3 7 0 】

キメラエフェクター受容体細胞は、複数のスイッチの標的細胞上の複数の抗原への架橋の多量体化によって活性化され得る。活性を引き起こすスイッチの最小数は、2 個超であり得る。多量体化された、または二量体化されたD D Dは一般に、それが、基準のキメラ抗原受容体（例えば、二量体化された / 多量体化された細胞外ドメインまたはその部分なし）が活性を達成するよりスイッチとの少ない架橋を必要とするため、シグナル伝達を増強している場合がある。

10

【 0 3 7 1 】

ε C A R

スイッチ上の抗C D 3抗体またはその断片と相互作用する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメイン（膜貫通ドメインの少なくとも一部分、または細胞内ドメインの少なくとも一部分は、C D 3タンパク質に基づかないか、またはそれから誘導されない）を含むキメラ抗原受容体が、さらに本明細書で開示される。細胞外ドメインは、C D 3細胞外ドメインまたはその部分を含み得る。細胞外ドメインは、C D 3 ε細胞外ドメインまたはその部分を含み得る。細胞外ドメインは、C D 3 δ細胞外ドメインまたはその部分を含み得る。細胞外ドメインは、C D 3 γ細胞外ドメインまたはその部分を含み得る。細胞外ドメインは、C D 3 ζ細胞外ドメインまたはその部分を含み得る。細胞外ドメインは、T C R細胞外ドメインまたはその部分のα鎖を含み得る。細胞外ドメインは、T C R細胞外ドメインまたはその部分のβ鎖を含み得る。細胞外ドメインは、T C R細胞外ドメインまたはその部分のβ鎖を含み得る。

20

【 0 3 7 2 】

V I Iキット、ベクターSおよびポリヌクレオチドS

本明細書で開示される1つ以上のC A R - E Cスイッチを含むキットが、本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、本開示は、C A R - I Dを含む、本明細書で開示される抗C D 1 9スイッチを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、C A R - I Dを含む、本明細書で開示されるヒト化された抗C D 1 9スイッチを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示されるG C N 4誘導体を含む、本明細書で開示されるC A R - E Cスイッチを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示されるG C N 4誘導体を含む、本明細書で開示される抗C D 1 9スイッチを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示されるG C N 4誘導体を含む、本明細書で開示されるヒト化された抗C D 1 9スイッチを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、抗C D 1 9抗体、抗C D 2 0抗体、抗C D 2 2抗体、抗E G F R抗体、抗E G F R v I I I抗体、抗H e r 2抗体、抗C S 1抗体、抗B C M A抗体、抗C E A抗体、抗C L L 1抗体、抗C D 3 3抗体、抗C D 1 2 3抗体、上述の抗体の抗原結合部分、および任意に、上述の抗体のヒト化された形態（例えば、本明細書で開示されるヒト化された抗C D 1 9抗体のうちのいずれか1つなど）から選択される標的化部分を含むC A R - E Cスイッチを含む。

30

40

【 0 3 7 3 】

いくつかの実施形態では、キットは、C A R - E Cスイッチまたはかかるスイッチを含む医薬組成物を含み、C A R - E Cスイッチは、軽鎖および重鎖を含み、軽鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ軽鎖配列を含むか、またはそれから成り、重鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ重鎖配列を含むか、またはそれから成る。かかる重鎖および / または軽鎖配列は、ヒト化され得る。いくつかの実施形態では、キット内に含まれるC A R - E Cスイッチは、ヒト化され、かつ配列番号1 7 ~ 2 4から選択される軽鎖配列、および配列番号2 ~ 1 4から選択される重鎖配列を含み、重鎖および軽鎖の一方または

50

両方は、本明細書で開示される C A R - I D を含む（例えば、G C N 4 C A R - I D）。いくつかの特定の実施形態では、軽鎖配列は、配列番号 27 ~ 34 から選択されるヒト化された配列（N 末端 G C N 4 C A R - I D を含む）、および配列番号 2 ~ 14 から選択される重鎖配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、スイッチは、表 6 または表 8 に記載されるスイッチであり、本明細書で開示されるスイッチのいくつかに含まれる重鎖 / 軽鎖の組み合わせを提示する。いくつかの実施形態では、スイッチは、スイッチに含まれる C A R - I D が、修飾され、構造 I の配列を有することを除いて、表 6 または表 8 に記載されるスイッチと同一である。いくつかの実施形態では、構造 I の配列は、配列番号 26、36、139、および 154 ~ 163 のうちのいずれか 1 つから選択される。キットは、単一のスイッチまたは単一のスイッチを含む医薬組成物を含み得る。キットは、複数のスイッチまたは複数のスイッチを含む医薬組成物を含み得る。

10

【0374】

キットは、2 個以上のスイッチを含み得る。キットは、3 個のスイッチを含み得る。キットは、約 3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、24、30、35、48、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、120、150、200、300、384、400、500、600、700、800、900、または 1000 個のスイッチを含み得る。キットは、生物学的調査のために用いられ得る。キットは、疾患または状態の診断のために使用され得る。キットは、疾患または状態を治療するために使用され得る。キットのスイッチは、本明細書で開示されるエフェクター細胞（例えば、C A R - E C）または臨床的に使用されるか、もしくは試験される既存の C A R T 細胞と共に使用され得る。キットは、1 つ以上のエフェクター細胞を含み得る。エフェクター細胞は、C A R - E C であり得る。エフェクター細胞は、T 細胞であり得る。T 細胞は、1 つ以上のキメラ受容体を発現し得る。T 細胞は、C A R - T 細胞であり得る。C A R - E C は、スイッチ上の C A R - I D に結合し得る。C A R - E C は、ペプチド（例えば、本明細書で開示される G C N 4 ペプチド、本明細書で開示される f l a g ペプチド、本明細書で開示される別の α ヘリックスペプチドと共にコイルドコイル構造を形成する α ヘリックスペプチド）であるスイッチ上の C A R - I D に結合し得る。C A R - E C は、小分子（例えば、F I T C）である C A R - I D に結合し得る。C A R - T 細胞は、スイッチ上の C A R - I D に結合し得る。C A R - T 細胞は、ペプチド（例えば、本明細書で開示される G C N 4 ペプチドまたは G C N 4 誘導体、本明細書で開示される f l a g ペプチド、本明細書で開示される別の α ヘリックスペプチドと共にコイルドコイル構造を形成する α ヘリックスペプチド）であるスイッチ上の C A R - I D に結合し得る。C A R - T 細胞は、小分子（例えば、F I T C）である C A R - I D に結合し得る。

20

30

【0375】

キットは、1 つ以上のキメラ受容体（例えば、本明細書で記載される 1 つ以上のキメラ受容体）をコードするポリヌクレオチドを含み得る。キットは、1 つ以上のキメラ抗原受容体（例えば、本明細書で記載される 1 つ以上のキメラ抗原受容体）をコードするポリヌクレオチドを含み得る。キットは、1 つ以上のキメラ受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含み得る。キメラ受容体は、本明細書で開示されるキメラ受容体のいずれかから選択され得る。キメラ受容体は、本明細書で開示されるキメラ抗原受容体のいずれかから選択され得る。キメラ受容体は、本明細書で開示される任意の C A R 配列を有し得る。C A R は、ヒト化され、ヒトへの免疫原性を減少し得る。C A R は、ヒト化される細胞外ドメインを含み得る。ヒト化は、C A R - E C スイッチに対する細胞外ドメインの特異性および親和性を保持しながら、ヒトへの C A R の免疫原性を減少し得る。C A R は、表 13 に提供される C A R 配列のうちのいずれか 1 つのヒト化されたバージョンであり得る。C A R は、配列番号 270 ~ 289 のうちのいずれか 1 つのヒト化されたバージョンであり得る。C A R は、C A R - E C スイッチの C A R - I D に結合する抗体または抗体断片を含む細胞外ドメインを含むヒト化された C A R であり得る。抗体または抗体断片は、ヒト化され得る。抗体断片は、s c F v（例えば、ヒト化された s c F v）であり得る。s c F v またはヒト化された s c F v は、一般の構造軽鎖 - リンカー - 重鎖を含む

40

50

か、またはそれから成り得る。s c F vまたはヒト化されたs c F vは、一般の構造重鎖-リンカー-軽鎖を含むか、またはそれから成り得る。ヒト化されたs c F vは、ヒト免疫グロブリンフレームワークへ移植された非ヒト（例えば、マウス）C D Rを有する、ヒト化されたV H（可変重鎖）配列を含み得る。いくつかの特定の実施形態では、C A Rは、図24AのコンストラクトA～Hから選択される構造を含む。ある特定の実施形態では、C A Rは、図24のコンストラクトA、コンストラクトB、またはコンストラクトCに従う構造を含む。ある特定の実施形態では、C A Rは、表11に記載されるC A Rから選択される。ある特定の特定の実施形態では、C A Rは、表12に記載されるC A Rから選択される。キットは、本明細書で開示されるキメラ受容体E Cスイッチまたはその部分（例えば、抗体、抗体断片、ペプチド）をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含み得る。

10

【0376】

ベクターならびにスイッチ（スイッチは、G C N 4誘導体およびポリペプチド標的化部分（例えば、標的化タンパク質または標的化ペプチド）を含む）およびそれらの部分をコードするポリヌクレオチドが、本明細書で開示される。ベクターならびにヒト化されたスイッチ（スイッチは、C A R - I Dおよびヒト化されたポリペプチド標的化部分（例えば、標的化タンパク質または標的化ペプチド）を含む）およびそれらの部分をコードするポリヌクレオチドが、本明細書で開示される。ベクターならびにスイッチ（スイッチは、C A R - I Dおよびヒト化されたポリペプチド標的化部分（例えば、標的化タンパク質または標的化ペプチド）を含む）（ポリペプチド標的化部分は、標的細胞上のC D 19に結合する）およびそれらの部分をコードするポリヌクレオチドが、本明細書で開示される。ベクターならびにスイッチ（スイッチは、G C N 4誘導体およびヒト化されたポリペプチド標的化部分（例えば、標的化タンパク質または標的化ペプチド）を含む）（ポリペプチド標的化部分は、標的細胞上のC D 19に結合する）およびそれらの部分をコードするポリヌクレオチドが、本明細書で開示される。ポリヌクレオチドは、DNA（例えば、c D N A）であり得る。ポリヌクレオチドは、RNAであり得る。いくつかの実施形態では、標的化ポリペプチドは、ヒト化された抗C D 19抗体またはそのC D 19結合断片であり得る。いくつかの実施形態では、C A R - I Dは、本明細書で開示されるG C N 4ペプチド誘導体である。ベクターは、ヒト化された抗C D 19抗体またはそのC D 19結合断片の重鎖をコードする配列を含み得る。ベクターは、ヒト化された抗C D 19抗体またはそのC D 19結合断片の軽鎖をコードする配列を含み得る。ベクターは、ヒト化された抗C D 19抗体またはそのC D 19結合断片の重鎖をコードする配列と、ヒト化された抗C D 19抗体またはそのC D 19結合断片の軽鎖をコードする配列とを含み得る。軽鎖および重鎖は、同じベクターから発現され得る。軽鎖および重鎖は、2個の別個のベクターから発現され得る。重鎖は、ヒト化された配列を含み得る。軽鎖は、ヒト化された配列を含み得る。重鎖および軽鎖は、ヒト化された配列を含み得る。

20

30

【0377】

いくつかの実施形態では、キットは、ベクターおよびキメラ受容体（例えば、C A R）（C A Rは、C A R - E Cスイッチのペプチドに結合する細胞外ドメインを含む）をコードするポリヌクレオチドを提供する。細胞外ドメインは、抗体または抗体断片を含み得る。抗体または抗体断片は、C A R - E CのC A R - I Dに結合し得る。C A R - I Dは、小分子であり得る。C A R - I Dは、ハプテンであり得る。C A R - I Dは、F I T Cまたはその誘導体であり得る。C A R - I Dは、ペプチドであり得る。C A R - I Dは、G C N 4ペプチドであり得る。C A R - I Dは、二量体化しないG C N 4ペプチドであり得る。C A R - I Dは、本明細書で開示されるG C N 4ペプチドであり得る。C A R - I Dは、G C N 4ペプチド誘導体であり得る。C A R - I Dは、構造Iの配列：X 1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3（配列番号269）を含み得、X 1、X 2、およびX 3は任意に、任意のアミノ酸であるか、または不在である。C A R - I Dは、配列：N Y H L E N E V A R L K（配列番号145）を含み得る。いくつかの実施形態では、C A R - I Dは、配列番号139、154～163のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、

40

50

またはそれから成る。

【 0 3 7 8 】

いくつかの実施形態では、キットは、ベクターおよびキメラ受容体をコードするポリヌクレオチドを提供し、キメラ受容体は、非抗体細胞外ドメインを含む。非抗体細胞外ドメインは、抗体または抗体断片を含み得ない。非抗体細胞外ドメインは、非抗体タンパク質を含み得る。非抗体細胞外ドメインは、非抗体ペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 68 ~ 84、87 ~ 90、104、および 181 ~ 183 から選択される配列を有し得る。

【 0 3 7 9 】

本明細書で開示される、キメラ受容体をコードする配列を含むベクターおよび / またはキメラ受容体エフェクター細胞スイッチならびにそれらの部分は、任意の市販の発現ベクターから選択され得る。発現ベクターは、原核生物発現ベクターであり得る。発現ベクターは、真核生物発現ベクターであり得る。発現ベクターは、哺乳類発現ベクターであり得る。発現ベクターは、ウィルス性発現ベクターであり得る。発現ベクターは、キメラ受容体および / または配列をコードするスイッチの恒常的発現への恒常的プロモーターを有し得る。発現ベクターは、キメラ受容体および / または配列をコードするスイッチの条件的発現への誘導性プロモーターを有し得る。

【 0 3 8 0 】

いくつかの実施形態では、キットは、(i) (a) 酵母転写因子 G C N 4 ペプチドからのペプチドを含む C A R - I D、および (b) ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で記載されるヒト化された F M C 6 3 抗体のうちのいずれか 1 つ) を含む C A R - E C スイッチと、(i i) 抗 G C N 4 C A R を発現する C A R - E C とを含む。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の重鎖を含み得る。重鎖配列は、配列番号 2 ~ 15 のうちのいずれか 1 つを含み得る。G C N 4 は、構造 I の配列 : X₁ N Y H L E N E V A R L K X₂ X₃ (配列番号 269) を含み得、X₁、X₂、および X₃ は全て、任意のアミノ酸であるか、または不在である。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、軽鎖ヒト化された F M C 6 3 抗体を含み得る。軽鎖配列は、配列番号 17 ~ 25 のうちのいずれか 1 つ、または配列番号 27 ~ 35 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の F a b を含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、全長のヒト化された F M C 6 3 抗体またはその断片を含み得る。いくつかの実施形態では、キットの使用は、(i) (a) 酵母転写因子ペプチド (例えば、本明細書で開示される G C N 4 ペプチド) からのペプチドを含む C A R - I D、および (b) ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で記載されるヒト化された F M C 6 3 抗体のうちのいずれか 1 つ) を含む C A R - E C スイッチと、(i i) 抗 G C N 4 C A R を発現する C A R - E C とを用いた対照の共治療を含む (治療が、C D 19 発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす)。

【 0 3 8 1 】

いくつかの実施形態では、キットは、(i) (a) F l a g ペプチドを含む C A R - I D、および (b) ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で記載されるヒト化された F M C 6 3 抗体のうちのいずれか 1 つ) を含む C A R - E C スイッチと、(i i) 抗 F l a g ペプチド C A R を発現する C A R - E C とを含む。F l a g ペプチドは、以下の配列 : D Y K D D D D K および D Y K D D D D K P のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の重鎖を含み得る。重鎖配列は、配列番号 2 ~ 15 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、軽鎖ヒト化された F M C 6 3 抗体を含み得る。軽鎖配列は、配列番号 17 ~ 25 のうちのいずれか 1 つまたは配列番号 27 ~ 35 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の F a b を含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、全長のヒト化された F M C 6 3 抗体またはその断片を含み得る。いくつか

10

20

30

40

50

の実施形態では、キットの使用は、(i)(a) Flag ペプチドを含む CAR - ID、および (b) ヒト化された FMC 63 抗体またはその抗原結合部分（例えば、本明細書で記載されるヒト化された FMC 63 抗体のうちのいずれか 1 つ）を含む CAR - EC スイッチと、(ii) 抗 Flag CAR を発現する CAR - EC とを用いた対照の共治療を含む（治療は、CD 19 発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす）。

【0382】

いくつかの実施形態では、キットは、(i)(a) FITC を含む CAR - ID、および (b) ヒト化された FMC 63 抗体またはその抗原結合部分（例えば、本明細書で記載されるヒト化された FMC 63 抗体のうちのいずれか 1 つ）を含む CAR - EC スイッチと、(ii) 抗 FITC ペプチド CAR を発現する CAR - EC とを含む。FITC は、ヒト化された FMC 63 抗体に非特異的に共役され得る。FITC は、ヒト化された FMC 63 抗体に部位特異的に共役され得る部位特異的共役は、ヒト化された FMC 63 抗体に含まれる人工アミノ酸へであり得る。共役は、ヒト化された FMC 63 抗体を FITC に連結するリンカーを介し得る。ヒト化された FMC 63 抗体または抗体断片は、ヒト化された FMC 63 抗体の重鎖を含み得る。重鎖配列は、配列番号 2 ~ 15 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された FMC 63 抗体または抗体断片は、軽鎖ヒト化された FMC 63 抗体を含み得る。軽鎖配列は、配列番号 17 ~ 25 のうちのいずれか 1 つまたは配列番号 27 ~ 35 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された FMC 63 抗体または抗体断片は、ヒト化された FMC 63 抗体の Fab を含み得る。ヒト化された FMC 63 抗体または抗体断片は、全長のヒト化された FMC 63 抗体またはその断片を含み得る。いくつかの実施形態では、キットの使用は、(i)(a) FITC を含む CAR - ID、および (b) ヒト化された FMC 63 抗体またはその抗原結合部分（例えば、本明細書で記載されるヒト化された FMC 63 抗体のうちのいずれか 1 つ）を含む CAR - EC スイッチと、(ii) 抗 FITC CAR を発現する CAR - EC とを用いた対照の共治療を含む（治療は、CD 19 発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす）。

【0383】

いくつかの実施形態では、キットは、(i)(a) K4 ペプチドを含む CAR - ID、および (b) ヒト化された FMC 63 抗体またはその抗原結合部分（例えば、本明細書で記載されるヒト化された FMC 63 抗体のうちのいずれか 1 つ）を含む CAR - EC スイッチと、(ii) E4 細胞外ドメインを含む CAR とを含む。K4 ペプチドは、アミノ酸配列：KVAALEKEKVAALEKEKVAALEKEKVAALEKE を含み得る。E4 ペプチドは、アミノ酸配列：EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKE を含み得る。ヒト化された FMC 63 抗体または抗体断片は、ヒト化された FMC 63 抗体の重鎖を含み得る。重鎖配列は、配列番号 2 ~ 15 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された FMC 63 抗体または抗体断片は、軽鎖ヒト化された FMC 63 抗体を含み得る。軽鎖配列は、配列番号 17 ~ 25 のうちのいずれか 1 つまたは配列番号 27 ~ 35 のうちのいずれか 1 つを含み得るヒト化された FMC 63 抗体または抗体断片は、ヒト化された FMC 63 抗体の Fab を含み得る。ヒト化された FMC 63 抗体または抗体断片は、全長のヒト化された FMC 63 抗体またはその断片を含み得る。いくつかの実施形態では、キットの使用は、(i)(a) K4 ペプチドを含む CAR - ID、および (b) ヒト化された FMC 63 抗体またはその抗原結合部分（例えば、本明細書で記載されるヒト化された FMC 63 抗体のうちのいずれか 1 つ）を含む CAR - EC スイッチと、(ii) E4 細胞外ドメインを含む CAR を発現する CAR - EC とを用いた対照の共治療を含む（治療は、CD 19 発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす）。

【0384】

いくつかの実施形態では、キットは、(i)(a) E4 ペプチドを含む CAR - ID、および (b) ヒト化された FMC 63 抗体またはその抗原結合部分（例えば、本明細書で記載されるヒト化された FMC 63 抗体のうちのいずれか 1 つ）を含む CAR - EC スイッチと、(ii) K4 細胞外ドメインとを含む。K4 ペプチドは、アミノ酸配列：KVAALEKEKVAALEKEKVAALEKEKVAALEKE を含み得る。E4 ペプチドは、ア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列：E V A A L E K E V A A L E K E V A A L E K E V A A L E K を含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の重鎖を含み得る。重鎖配列は、配列番号 2 ~ 1 5 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、軽鎖ヒト化された F M C 6 3 抗体を含み得る。軽鎖配列は、配列番号 1 7 ~ 2 5 のうちのいずれか 1 つまたは配列番号 2 7 ~ 3 5 のうちのいずれか 1 つを含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、ヒト化された F M C 6 3 抗体の F a b を含み得る。ヒト化された F M C 6 3 抗体または抗体断片は、全長のヒト化された F M C 6 3 抗体またはその断片を含み得る。いくつかの実施形態では、キットの使用は、(i) (a) E 4 ペプチドを含む C A R - I D、および (b) ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその抗原結合部分 (例えば、本明細書で記載されるヒト化された F M C 6 3 抗体のうちのいずれか 1 つ) を含む C A R - E C スイッチと、(i i) K 4 細胞外ドメインを含む C A R を発現する C A R - E C とを用いた対照の共治療を含む (治療は、C D 1 9 発現標的細胞のスイッチ媒介細胞毒性をもたらす)。

10

【 0 3 8 5 】

V I I I 療法使用

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療するための、方法、プラットフォームおよびキットが、本明細書で開示され、方法は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチを対象に投与することを含み、C A R - E C スイッチは、C A R - I D および標的化部分を含む。かかる方法は、C A R - E C スイッチに相補的な C A R を発現する C A R - E C を投与することをさらに含む。C A R - E C スイッチは、ヒト化され得る。C A R は、ヒト化され得る。

20

【 0 3 8 6 】

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療するための方法、プラットフォームおよびキットが、本明細書で開示され、方法は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチを対象に投与することを含み、C A R - E C スイッチは、本明細書で開示される G C N 4 誘導体および標的化部分 (「G C N 4 - スイッチ」) を含む。かかる方法は、G C N 4 スイッチに相補的である C A R を発現する C A R - E C を投与することをさらに含む。C A R - E C スイッチは、ヒト化され得る。C A R は、ヒト化され得る。

【 0 3 8 7 】

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療するための、方法、プラットフォーム、およびキットが、本明細書で開示され、方法は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチを対象に投与することを含み、C A R - E C スイッチは、本明細書で開示される G C N 4 誘導体および抗 C D 1 9 抗体、または C D 1 9 結合その部分 (「抗 C D 1 9 G C N 4 - スイッチ」) を含むか、またはそれから成る標的化部分を含む。抗 C D 1 9 抗体の C D 1 9 結合部分は、s c F v であり得る。抗 C D 1 9 G C N 4 - スイッチは、L C N T スイッチであり得る。抗 C D 1 9 G C N 4 - スイッチは、軽鎖および重鎖を含み得、軽鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ軽鎖配列を含むか、またはそれから成り、重鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ重鎖配列を含むか、またはそれから成る。かかる重鎖および / または軽鎖配列は、ヒト化され得る。

30

【 0 3 8 8 】

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療するための、方法、プラットフォームおよびキットが、本明細書で開示される、方法は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スイッチを対象に投与することを含み、C A R - E C スイッチは、本明細書で開示される G C N 4 誘導体およびヒト化された抗 C D 1 9 抗体またはその C D 1 9 結合部分を含むか、またはそれから成る標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、C A R - E C スイッチは、ヒト化され、かつ配列番号 1 7 ~ 2 4 から選択される軽鎖配列、および配列番号 2 ~ 1 4 から選択される重鎖配列を含み、重鎖および軽鎖の一方または両方は、本明細書で開示される C A R - I D (例えば、G C N 4 C A R - I D) を含む。特定の実施形態では、軽鎖配列は、ヒト化された配列番号 2 7 ~ 3 4 から選択される配列 (N 末端の G C N 4 C A R - I D を含む)、および配列番号 2 ~ 1 4 から選択される重鎖配

40

50

列を含む。特定の実施形態では、スイッチは、表 6 または表 8 に記載されるスイッチであり、本明細書で開示されるスイッチのうちのいくつかに含まれる重鎖 / 軽鎖の組み合わせを呈する。いくつかの実施形態では、スイッチは、スイッチに含まれる C A R - I D が、修飾され、構造 I の配列を有することを除いて、表 6 または表 8 に記載されるスイッチと同一である。いくつかの実施形態では、構造 I の配列は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9、および 1 5 4 ~ 1 6 3 のうちのいずれか 1 つから選択される。かかる方法は、抗 C D 1 9 G C N 4 - スwitch に相補的である C A R を発現する C A R - E C を投与することをさらに含み得る。C A R は、ヒト化され得る。

【 0 3 8 9 】

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療するための、方法、プラットフォーム、およびキットが、本明細書で開示され、方法は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スwitch を対象に投与することを含み、C A R - E C スwitch は、ヒト化された抗 C D 1 9 抗体または C D 1 9 結合その部分 (「抗 C D 1 9 C A R - E C スwitch」) を含むか、またはそれから成る C A R - I D および標的化部分を含む。抗 C D 1 9 抗体の C D 1 9 結合部分は、s c F v であり得る。抗 C D 1 9 C A R - E C スwitch は、N 末端 C A R - I D を含む L C N T スwitch であり得る。抗 C D 1 9 C A R - E C スwitch は、軽鎖および重鎖を含み得、軽鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ軽鎖配列を含むか、またはそれから成り、重鎖は、本明細書で開示される任意のスイッチ重鎖配列を含むか、またはそれから成る。かかる重鎖および / または軽鎖配列は、ヒト化され得る。かかる方法は、抗 C D 1 9 C A R - E C スwitch を補完する C A R を発現する C A R - E C を投与することをさらに含み得る。C A R は、ヒト化され得る。

【 0 3 9 0 】

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療する方法が、本明細書で開示され、方法は、本明細書で開示される C A R - E C スwitch のうちのいずれか 1 つを投与することを含む。治療を必要とする対象の疾患または状態を治療する方法が、本明細書で開示され、方法は、本明細書で開示される C A R - E C スwitch のうちのいずれか 1 つを投与すること、かつ C A R - E C スwitch (すなわち、C A R は、相補的 C A R - E C スwitch 上に含まれる C A R - I D に対する結合親和性を有する細胞外ドメインを含む) を補完する C A R を含む C A R - E C をさらに投与することを含む。

【 0 3 9 1 】

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療する本明細書で開示される方法のいずれかで、C A R は、本明細書で開示される C A R であり得る。C A R は、本明細書で開示される任意の C A R 配列を有し得る。C A R は、ヒト化され、免疫原性をヒトに減少し得る。C A R は、ヒト化される細胞外ドメインを含み得る。ヒト化は、C A R - E C スwitch に対する細胞外ドメインの特異性および親和性を保持しながら、C A R の免疫原性をヒトに減少し得る。C A R は、表 1 3 に提供される C A R 配列のうちのいずれか 1 つのヒト化されたバージョンであり得るか、またはそれは、配列番号 2 7 0 ~ 2 8 9 のうちのいずれか 1 つのヒト化されたバージョンであり得る。C A R は、C A R - E C スwitch の C A R - I D に結合する抗体または抗体断片を含む細胞外ドメインを含むヒト化された C A R であり得る。抗体または抗体断片は、ヒト化され得る。抗体断片は、s c F v (例えば、ヒト化された s c F v) であり得る。s c F v またはヒト化された s c F v は、一般の構造軽鎖 - リンカー - 重鎖を含むか、またはそれから成り得る。s c F v またはヒト化された s c F v は、一般の構造重鎖 - リンカー - 軽鎖を含むか、またはそれから成り得る。ヒト化された s c F v は、ヒト免疫グロブリンフレームワークへ移植された非ヒト (例えば、マウス) C D R を有するヒト化された V H (可変重鎖) 配列を含み得る。ヒト化された s c F v は、ヒト免疫グロブリンフレームワークへ移植された非ヒト (例えば、マウス) C D R を有するヒト化された V L (可変軽鎖) 配列を含み得る。いくつかの特定の実施形態では、C A R は、図 2 4 A のコンストラクト A ~ H から選択される構造を含む。ある特定の実施形態では、C A R は、図 2 4 のコンストラクト A、コンストラクト B、またはコンストラクト C に従う構造を含む。ある特定の実施形態では、C A R は、表 1 1 に記載され

る C A R から選択される。ある特定の特定の形態では、C A R は、表 1 2 に記載される C A R から選択される。ある特定の形態では、C A R の細胞外ドメインは、配列番号 2 9 0 ~ 3 8 8、および 4 2 3 のうちのいずれか 1 つから選択されるヒト化された s c F v 配列を含む。

【0392】

本明細書で開示される治療を必要とする対象の疾患または状態を治療する方法のいずれかで、疾患または状態は、癌であり得る。いくつかの実形態では、ヒト化された抗 C D 1 9 抗体またはその C D 1 9 結合部分は、軽鎖配列および重鎖配列を含む。いくつかの実形態では、ヒト化された抗 C D 1 9 抗体またはその C D 1 9 結合部分は、ヒト化された F M C 6 3 抗体またはその C D 1 9 結合部分を含む。いくつかの実形態では、ヒト化された抗 C D 1 9 抗体またはその C D 1 9 結合部分の軽鎖配列は、配列番号 1 7 ~ 2 5 のうちのいずれか 1 つまたは配列番号 2 7 ~ 3 5 のうちのいずれか 1 つを含み得、代替的にまたは加えて、重鎖配列は、配列番号 2 ~ 1 5 のうちのいずれか 1 つを含み得る。

10

【0393】

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療する、本明細書で開示される方法は、C A R - E C 細胞および 1 つ以上の C A R - E C スイッチを投与することを含み得る。方法は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、24、30、35、48、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、120、150、200、300、384、400、500、600、700、800、900、1000 個またはそれ以上の C A R - E C スイッチを投与することを含み得る。方法は、2 個以上の C A R - E C スイッチを投与することを含み得る。2 個以上の C A R - E C スイッチは、同じ C A R - I D を含み得る。もう 2 個の C A R - E C スイッチは、同じヒト化された抗 C D 1 9 標的化部分を含み得る。2 個以上の C A R - E C スイッチは、1 個以上の異なる C A R - I D を含み得る。もう 2 個の C A R - E C スイッチは、1 個以上の異なるヒト化された抗 C D 1 9 標的化部分を含み得る。方法は、複数の C A R - E C 細胞および 1 個以上の C A R - E C スイッチを投与することを含み得る。C A R - E C 細胞を投与することは、静脈内 C A R - E C 送達を含み得る。C A R - E C 細胞を投与することは、腹腔内 C A R - E C 送達を含み得る。C A R - E C 細胞を投与することは、静脈内 C A R - E C 送達および腹腔内 C A R - E C 送達を含み得る。C A R - E C 細胞を投与することは、一度起こり得る。C A R - E C 細胞を投与することは、一度より多く起こり得る（例えば、反復注射）。C A R - E C は、選別され、C A R - E C の投与前に、C A R - E C のメモリー集団を濃縮し得る。C A R - E C は、反復刺激に供され、枯渇を促進する再帰的刺激とは対照的に、メモリー集団を濃縮し、長命で、持続性の表現型を提供する。この理論的根拠は、課題が除かれた後に起きる 1 ~ 2 週間長の収縮フェーズを通した、濃縮長命メモリー細胞を用いた天然の急性感染に基づく。同様に、養子的に移動された細胞が、以下の刺激を休ませる C A R - T 細胞系は、より近く、T 細胞活性の生理的期間を繰り返す。

20

30

【0394】

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療する、方法が、本明細書で開示され、方法は、キメラ抗原受容体エフェクター細胞（C A R - E C）スイッチを対象に投与することを含み、C A R - E C スイッチは、キメラ抗原受容体相互作用ドメイン（C A R - I D）、および標的上の C D 1 9 に結合するヒト化された標的化部分を含む。C A R - I D は、非限定的な例として、F L A G（登録商標）タグ、酵母転写因子 G C N 4（例えば、7 p 1 4 p G C N 4、親水性標的ペプチド（H T P）、 α ヘリックスを形成するペプチドから選択され得る。標的化部分は、非限定的な例として、本明細書で開示されるヒト化された抗 C D 1 9 抗体のいずれかから選択され得る。

40

【0395】

方法は、1 つ以上キメラ抗原受容体エフェクター細胞を治療を必要とする対象に投与することと、次いで 1 個または複数の C A R - E C スイッチを治療を必要とする対象に投与することを含み得る。C A R - E C スイッチの量または用量は、標的細胞に対するキメラ

50

抗原受容体エフェクター細胞の割合に影響し得、したがってCAR-ECスイッチの量または用量は、所望の効果のために滴定され得る。例えば、腫瘍は、CAR-ECスイッチの滴定によって標的化され、好適な療法指標を達成し得る。応答は、「オン」で滴定され、CRS（サイトカイン放出症候群）およびTLS（腫瘍溶解症候群）事象を回避し、個人化された療法を提供し得る。さらには、スイッチの投与は、有害な事象、CAR-EC細胞活性の制御、オン標的オフ腫瘍反応性またはオフ標的反応性の滴定、腫瘍溶解症候群（TLS）の抑止、またはサイトカイン放出症候群（CRS）の減弱の場合に終了され得る。量または用量は、特定の期間、あるレベルで開始し得、かつ次いで量または用量は、第2の特定の期間、第2のレベルに増加または減少され得る。例えば、CAR-ECスイッチの初期量または用量は、腫瘍を排除するのに必要な最も少ない用量であり得る。CAR-ECスイッチの量または用量は次いで、任意の残りの腫瘍細胞を排除するために、より多い用量に増加され得る。方法は、腫瘍細胞が排除された際、CAR-ECスイッチの投与を終了することを含み得る。方法は、腫瘍細胞が、患者内で再び起こった場合に、または患者が再発した場合に、CAR-ECスイッチを再投与することを含み得る。

10

【0396】

方法は、所望される効果のためにCAR-ECスイッチを滴定することを含み得る。CAR-ECスイッチを滴定することは、抗原密度識別を可能にする。例えば、肺内のHer2発現の低レベルへの、Her2標的化CAR-T細胞に対する致死的なオン標的、オフ腫瘍反応性は、臨床でのCAR-T細胞の固形腫瘍への適用を和らげている。ヒト内でおよそ10時間の半減期を有することが予期されるFab系スイッチの使用は、長命IgG系分子より急速な、活性の増加を可能にする。本明細書で記載される方法は、スイッチを最適なレベルに滴定することを含み得、スイッチ活性は、標的細胞上の標的抗原の密度によって影響され得、したがって健康組織上の標的抗原からの癌細胞上の標的抗原（およびスイッチ活性）を識別するか、またはそれを区別する。臨床では、これは、療法を好適な療法指標に滴定するために使用され得る。加えて、養子的に移動されたsCAR-T細胞が、組織を取り除き、したがって組織への潜在性毒性を軽減した後に、スイッチのみを投与することによって、患者内でsCAR-T細胞の注入を活性から分離することが可能であり得る。例えば、研究は、移動された細胞傷害性T細胞は直ちに、肺内で蓄積するが、蓄積は72時間超で取り除かれることを示している。sCAR-T細胞の1つの利点は、それらが移動され得、かつスイッチ用量が、sCAR-T細胞が不活性な間、sCAR-T細胞が肺を綺麗にするまで遅延され得ることである。一度取り除かれると、スイッチは、投与され、スイッチのCARおよび標的抗原への結合時にsCAR-Tを活性化し得る。当業者は、どのようにしてこの概念が、異なる密度の細胞上で発現されるHer2以外に、他の抗原に適用されるかを容易に理解するであろう。

20

30

【0397】

方法は、1つ以上キメラ抗原受容体エフェクター細胞を投与することを含み得る。方法は、1つ以上のT細胞を投与することを含み得る。1つ以上のエフェクター細胞は、未処理のT細胞、メモリー幹細胞T細胞、中央メモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、helper T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞（細胞傷害性T細胞）、CD8/CD4+T細胞、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ナチュラルキラーT細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージから選択され得る。

40

【0398】

CAR-ECスイッチは、エフェクター細胞を標的細胞の近位に移動させることに少なくとも部分的に依存する療法効果を有し得る。CAR-ECスイッチの意図された徴候上の療法効果は、少なくとも部分的に、エフェクター細胞を標的細胞に補充するCAR-ECスイッチによるものであり得る。CAR-ECスイッチの意図された徴候上の療法効果は、主にエフェクター細胞を標的細胞に補充するCAR-ECスイッチによるものであり得る。CAR-ECスイッチの療法効果は、CAR-EC細胞内の免疫応答を刺激することに少なくとも部分的に依存し得る。

【0399】

50

CAR-ECスイッチを投与することは、エフェクター細胞をさらに投与しないことにはいかなる療法効果も有し得ない。CAR-ECスイッチは、エフェクター細胞をさらに投与しないことには、顕著で、所望および/または意図される療法効果を有し得ない。CAR-ECスイッチは、エフェクター細胞をさらに投与しないことには、CAR-ECプラットフォームの意図された徴候に対していかなる療法効果も有し得ない。CAR-ECスイッチの部分または構成要素（例えば、CAR-IDまたは標的化部分）は、第2の部分またはCAR-ECスイッチの構成要素（例えば、CAR-IDまたは標的化部分）に共役されないことには、CAR-ECスイッチの意図された徴候に対して療法効果を有し得ない。療法効果を提供するためにCAR-ECプラットフォームの部分として投与される場合の、CAR-ECスイッチの部分または構成要素（例えば、CAR-IDまたは標的化部分）の用量は、CAR-ECスイッチの部分または構成要素が、その用量で単独で投与される場合、療法効果を有さない。CAR-ECスイッチの部分または構成要素は、T細胞を標的細胞に補充する他に、あらゆる療法効果を有することも意図され得ない。CAR-ECスイッチ単独の部分または構成要素を投与することは、標的細胞上で療法効果を有し得、療法効果は、CAR-ECスイッチおよびCAR-EC細胞を投与することの療法効果と比較して、無視できる。CAR-ECスイッチの部分または構成要素を投与することは、標的細胞上で療法効果を有し得、療法効果は、CAR-ECスイッチおよびCAR-EC細胞を投与することの療法効果未満である。

10

【0400】

治療を必要とする対象の疾患または状態を治療するための、本明細書で開示されるCAR-ECスイッチの使用が、本明細書で開示される。疾患の治療のための薬物の製造における、本明細書で開示されるCAR-ECスイッチの使用が、さらに本明細書で開示される。

20

【0401】

エフェクター細胞上のCAR(CAR-ID)に結合するペプチド性抗原と、治療を必要とする対象の疾患または状態を治療するための標的上の抗原に結合する標的化ポリペプチドとを含むスイッチの使用が、本明細書で開示される。エフェクター細胞上のCAR(CAR-ID)に結合するペプチド性抗原(CAR-ID)と、疾患の治療のための薬物の製造における、標的上の抗原に結合する標的化ポリペプチドとを含むスイッチの使用が、さらに本明細書で開示される。

30

【0402】

CAR-IDを含むCAR-ECスイッチの使用が、本明細書で開示され、CAR-IDが、低免疫原性ペプチド（例えば、FLAG）またはその誘導体および標的化ポリペプチドを含み、標的化ポリペプチドが、抗CD19抗体またはその断片、CARを含むエフェクター細胞を含み、CARが、抗低免疫原性ペプチド抗体を含み、抗CD19抗体またはその断片が、多発性骨髄腫を治療するためにB細胞上のCD19に結合する。著しく、いかなる以前に報告された抗体系制御系も、インビボで、CD19の報告された標的化を有さない。本明細書で報告される通り、sCAR-T細胞プラットフォームは、従来のCAR-T-19と同等の有効性で、NALM-6Luc/GFPをインビボで排除することができた。有効性は、最適な標的細胞関与に依存した。より具体的には、EC50で一般に10倍未満であったスイッチ/ヒンジ設計のインビトロでの溶解性活性の違いは、インビボでの腫瘍排除に対して決定的であった。

40

【0403】

CAR-IDを含むCAR-ECスイッチの使用が、本明細書で開示され、CAR-IDが、酵母転写因子GCN4またはその誘導体および標的化ポリペプチドを含み、標的化ポリペプチドが、抗CD19抗体またはその断片、およびCARを含むエフェクター細胞を含み、CARが、抗GCN4抗体を含み、抗CD19抗体またはその断片が、リンパ芽球、リンパ球またはB細胞上のCD19に結合し、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病またはB-細胞リンパ腫を治療する。

【0404】

50

疾患または状態は、細胞増殖性障害であり得る。細胞増殖性障害は、固形腫瘍、リンパ腫、白血病および脂肪肉腫から選択され得る。細胞増殖性障害は、急性、慢性、再発性、抵抗性、促進的、寛解、ステージⅠ、ステージⅡ、ステージⅢ、ステージⅣ、若年性または成人型であり得る。細胞増殖性障害は、骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、骨髄の白血病、急性骨髄性白血病、骨髄単球性白血病、好中球白血病、骨髄異形成症候群、B-細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、大型細胞リンパ腫、混合細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、再発性小型リンパ球性リンパ腫、有毛細胞白血病、多発性骨髄腫、好塩基球白血病、好酸球白血病、巨核芽球白血病、単芽球白血病、単球白血病、赤白血病、赤血球白血病および肝細胞性細胞腫から選択され得る。細胞増殖性障害は、血液学的悪性腫瘍を含み得る。血液学的悪性腫瘍は、B細胞悪性腫瘍を含み得る。細胞増殖性障害は、慢性リンパ性白血病を含み得る。細胞増殖性障害は、急性リンパ性白血病を含み得る。細胞増殖性障害は、CD19陽性パーキットリンパ腫を含み得る。

10

【0405】

疾患または状態は、癌、病原性感染、自己免疫疾患、炎症性疾患、または遺伝子障害であり得る。

【0406】

いくつかの例では、1つ以上の疾患は、癌を含む。癌は、再発性および/または難治性癌を含み得る。癌の例は、肉腫、細胞腫、リンパ腫または白血病を含むが、これらに限定されない。

20

【0407】

癌は、神経内分泌癌を含み得る。癌は、膵臓癌を含み得る。癌は、外分泌膵臓癌を含み得る。癌は、甲状腺癌を含み得る。甲状腺癌は、髄質甲状腺癌を含み得る。癌は、前立腺癌を含み得る。

【0408】

癌は、上皮癌を含み得る。癌は、乳癌を含み得る。癌は、子宮内膜癌を含み得る。癌は、卵巣癌を含み得る。卵巣癌は、間質性卵巣癌を含み得る。癌は、頸部癌を含み得る。

【0409】

癌は、皮膚癌を含み得る。皮膚癌は、新血管形成皮膚癌を含み得る。皮膚癌は、メラノーマを含み得る。

30

【0410】

癌は、腎臓癌を含み得る。

【0411】

癌は、肺癌を含み得る。肺癌は、小型細胞肺癌を含み得る。肺癌は、非小型細胞肺癌を含み得る。

【0412】

癌は、大腸癌を含み得る。癌は、胃癌を含み得る。癌は、結腸癌を含み得る。

【0413】

癌は、脳癌を含み得る。脳癌は、脳腫瘍を含み得る。癌は、神経膠芽細胞腫を含み得る。癌は、星状細胞腫を含み得る。

40

【0414】

癌は、血液癌を含み得る。血液癌は、白血病を含み得る。白血病は、骨髄の白血病を含み得る。癌は、リンパ腫を含み得る。リンパ腫は、非ホジキンリンパ腫を含み得る。

【0415】

癌は、肉腫を含み得る。肉腫は、雌ヒツジの肉腫を含み得る。

【0416】

肉腫は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血液血管、または他の接続的または指示的な組織の癌である。肉腫は、骨癌、線維腺腫肉腫、コンドロ肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、両側性前庭シュワン腫、オステオ肉腫、軟性組織肉腫（例えば、歯槽

50

軟部肉腫、血管肉腫、嚢胞肉腫、皮膚線維肉腫、デスモイド腫瘍、類上皮細胞肉腫、骨外性オステオ肉腫、線維腺腫肉腫、血管外皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、リンパ肉腫、悪性線維腺腫組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、および滑膜肉腫)を含むが、これらに限定されない。

【0417】

細胞腫は、体の表面を被覆し、ホルモンを生成し、腺を形成する細胞である、上皮細胞内で始まる癌である。非限定的な例として、細胞腫は、乳癌、膵臓癌、肺癌、結腸癌、大腸癌、直腸癌、腎臓癌、膀胱癌、胃癌、前立腺癌、肝臓癌、卵巣癌、脳癌、腔癌、外陰部癌、子宮癌、口腔癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、皮膚癌、卵管の癌、頭頸部癌、消化器間質性癌、アデノ細胞腫、皮膚または眼内メラノーマ、肛門領域の癌、小腸の癌、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、尿道の癌、腎盂の癌、尿管の癌、子宮内膜の癌、子宮頸管の癌、脳下垂体の癌、中央神経系(CNS)の新生物、一次CNSリンパ腫、脳幹神経膠腫、および脊椎軸腫瘍を含む。いくつかの例では、癌は、基底細胞細胞腫、扁平上皮、メラノーマ、非メラノーマ、または光線性(太陽)角化症などの皮膚癌である。

10

【0418】

いくつかの例では、癌は、肺癌である。肺癌は、肺(気管支)または肺の小さな気嚢(肺胞)に供給するために分岐する気道内で始まり得る。肺癌は、非小型細胞肺細胞腫(NSCLC)、小型細胞肺細胞腫、および中皮腫を含む。NSCLCの例は、扁平上皮細胞細胞腫、アデノ細胞腫、および大型細胞細胞腫を含む。中皮腫は、肺および胸腔(胸膜)の裏層、または腹部(腹膜)の裏層の癌性腫瘍であり得る。中皮腫は、アスベスト暴露によるものであり得る。癌は、神経膠芽細胞腫などの脳癌であり得る。

20

【0419】

代替的に、癌は、中枢神経系(CNS)腫瘍であり得る。CNS腫瘍は、神経膠腫または非神経膠腫として分類される。神経膠腫は、悪性神経膠腫、高級神経膠腫、小児脳幹部神経膠腫であり得る。神経膠腫の例は、星状細胞腫、乏突起神経膠腫(または乏突起神経膠腫と嚢胞腫要素との混合)、および上衣腫を含む。星状細胞腫は、低級星状細胞腫、未分化星状細胞腫、神経膠芽細胞腫多形、毛様細胞性星状細胞腫、多形性黄色芽細胞腫、および上衣下巨細胞星状細胞腫を含むが、これらに限定されない。乏突起膠腫は、低級乏突起膠腫(または、オリゴ星状細胞腫)および未分化乏突起膠腫を含む。非神経膠腫は、髄膜腫、下垂体腺腫、一次CNSリンパ腫、および髄芽腫を含む。いくつかの例では、癌は、髄膜腫である。

30

【0420】

白血病は、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、慢性リンパ性白血病、または慢性骨髄球性白血病であり得る。白血病の追加の種類は、有毛細胞白血病、慢性骨髄単球性白血病、および若年性骨髄単球性白血病を含む。

【0421】

リンパ腫は、リンパ球の癌であり、かつBまたはTリンパ球のいずれかから発達され得る。リンパ腫の2つの主要な種類は、ホジキン疾患、および非ホジキンリンパ腫として以前に知られるホジキンリンパ腫である。ホジキンリンパ腫は、Reed-Sternberg細胞の存在によってマークされる。非ホジキンリンパ腫は全て、ホジキンリンパ腫であるリンパ腫である。非ホジキンリンパ腫は、無痛性リンパ腫および攻撃的なリンパ腫であり得る。非ホジキンリンパ腫は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫(MALT)、小細胞リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、縦隔大細胞型B細胞リンパ腫、ワルデンストロームマクログロブリン血症、結節性周辺領域B細胞リンパ腫(NMZL)、脾臓辺縁帯リンパ腫(SMZL)、節外性周辺帯B細胞リンパ腫、血管内ラージB細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、およびリンパ腫様肉芽腫症を含むが、これらに限定されない。

40

【0422】

50

癌は、固形腫瘍を含み得る。癌は、肉腫を含み得る。癌は、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、肺癌、メラノーマ、骨髄腫、甲状腺癌、膵臓癌、神経膠腫、脳の悪性神経膠腫、神経膠芽細胞腫、卵巣癌、および前立腺癌から成る群から選択され得る。癌は、非均一抗原発現を有し得る。癌は、調節された抗原発現を有し得る。抗原は、標的抗原であり得る。癌は、骨髄腫を含み得ない。癌は、メラノーマを含み得ない。癌は、結腸癌を含み得ない。癌は、急性リンパ性白血病（ALL）であり得る。癌は、再発したALLであり得る。癌は、難治性ALLであり得る。癌は、発現した、難治性ALLであり得る。癌は、慢性リンパ性白血病（CLL）であり得る。癌は、再発したCLLであり得る。癌は、難治性CLLであり得る。癌は、発現した、難治性CLLであり得る。

【0423】

癌は、乳癌を含み得る。乳癌は、三重陽性乳癌（エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体およびHer2陽性）であり得る。乳癌は、三重陰性乳癌（エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体およびHer2陰性）であり得る。乳癌は、エストロゲン受容体陽性であり得る。乳癌は、エストロゲン受容体陰性であり得る。乳癌は、プロゲステロン受容体陽性であり得る。乳癌は、プロゲステロン受容体陰性であり得る。乳癌は、Her2陰性乳癌を含み得る。乳癌は、低発現Her2乳癌を含み得る。乳癌は、Her2陽性乳癌を含み得る。Her2を発現する細胞株は、悪性腫瘍を、0（1個の細胞につき<20,000個のHer2抗原）、1+（1個の細胞につき100,000個のHer2抗原）、2+（1個の細胞につき500,000個のHer2抗原）、および3+（1個の細胞につき>2,000,000個のHer2抗原）として分類する、臨床免疫組織化学特徴付けを反映する抗原密度に対して良く特徴づけられている。本発明は、これらの分類の乳癌を治療する方法を提供する。乳癌は、Her2 0として分類される乳癌を含み得る。乳癌は、Her2 1+として分類される乳癌を含み得る。乳癌は、Her2 2+として分類される乳癌を含み得る。乳癌は、Her2 3+として分類される乳癌を含み得る。

【0424】

疾患または状態は、病原性感染であり得る。病原性感染は、1つ以上の病原体によって引き起こされ得る。いくつかの例では、病原体は、細菌、真菌界、ウイルス、または原虫である。

【0425】

例示的な病原体は、ボルデテラ、ボレリア、ブルセラ、カンピロバクター、クラミジア、クラミドフィラ、クロストリジウム、コリネバクテリウム、腸球菌、大腸菌類、フランシセラ、ヘモフィルス、ヘリコバクター、レジオネラ、レプトスピラ、リステリア、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、ナイセリア、シュードモナス、リケッチア、サルモネラ、赤痢菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、トレポネーマ、ピブリオ、またはエルシニアを含むが、これらに限定されない。いくつかの場合では、病原体によって引き起こされる疾患または状態は、結核であり、かつ不均一な試料は、細菌マイコバクテリウム結核から誘導される外来性分子および対象から誘導される分子を含む。いくつかの例では、細菌によって引き起こされる疾患または状態は、結核、連鎖球菌およびシュードモナスなどのバクテリアによって引き起こされ得る肺炎、赤痢菌、カンピロバクターおよびサルモネラなどのバクテリアによって引き起こされる食中毒、ならびにテタヌス、腸チフス、ジフテリア、梅毒およびハンセン病など感染である。疾患または状態、細菌性膣炎、天然発生バクテリア細菌叢の不均衡によって引き起こされる膣の疾患であり得る。代替的に、疾患または状態は、

細菌性髄膜炎、髄膜のバクテリア炎症（例えば、脳および脊髄を被覆する保護膜）である。バクテリアによって引き起こされる他の疾患または状態は、バクテリア肺炎、尿路感染、バクテリア胃腸炎、およびバクテリア皮膚感染を含むが、これらに限定されない。バクテリア皮膚感染の例は、ブドウ球菌黄色ブドウ球菌または化膿性連鎖球菌によって引き起こされるインペティゴ、リンパ拡散を有する深い表皮の連鎖球菌バクテリア感染によって引き起こされ得る丹毒、および通常の皮膚細菌叢によってか、または外来性バクテリアによって引き起こされ得る蜂巣炎を含むが、これらに限定さ

10

20

30

40

50

れない。

【 0 4 2 6 】

病原体は、カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカス、ヒストプラズマ、ニューモシスチス、およびスタキボトリス属などの菌類であり得る。菌類によって引き起こされる疾患または状態の例は、

痒み、酵母感染、白癬、および水虫を含むが、これらに限定されない。

【 0 4 2 7 】

病原体は、ウイルスであり得る。ウイルスの例は、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、エプスタインバーウイルス、肝炎ウイルス（例えば、肝炎 A、B、および C）、単純ヘルペスウイルス（1 および 2 型）、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、H I V、インフルエンザウイルス、はしかウイルス、おたふく風邪ウイルス、パピローマウイルス、パラインフルエンザウイルス、ポリオウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、風疹ウイルス、および

水痘帯状疱疹ウイルスを含むが、これらに限定されない。ウイルスによって引き起こされる疾患または状態の例は、風邪、インフルエンザ、肝炎、エイズ、水疱、風疹、おたふく風邪、はしか、疣贅、および灰白髄炎を含むが、これらに限定されない。

【 0 4 2 8 】

病原体は、アカントアメーバ（例えば、

A . アストロニクス、A . カステラーニ、A . カルバートソニ、A . ハチェッティ、A . ポリファガ、A . ライソデス、A . ヒーリー、A . ジビオネンシス）、ブラシオラ（例えば、B コンノリ、B . ベシキュラーラム）、クリプトスポリジウム（例えば、C . パルバム）、シクロスポラ（例えば、C . カヤタンシス）、脳炎症（例えば、E . クニクリ、E . ヘレム、E . 腸炎）、アメーバ（例えば、E . ヒストリチカ）、腸内毒素（例えば、E . ビエニューシ）、ジアルジア（例えば、G . ランプリア）、イソスポラ（例えば、I . ベリ）、微胞子虫（例えば、M . アフリカヌム、M . セイロネンシス）、ネグレリア（例えば、N . フォーレリ）、ノセマ（例えば、N . アルゲレ、N . オクララム）、プレისტフォラ、トラチプレისტフォラ（例えば、T . アンソロボスレア、T . ホミニス）、およびヴィタフォルマ（例えば、V . コルネア）などの原虫であり得る。

【 0 4 2 9 】

疾患または状態は、自己免疫疾患または自己免疫関連疾患であり得る。自己免疫障害は、身体にその自信の組織への攻撃を引き起こす身体免疫系の機能不全であり得る。自己免疫疾患および自己免疫関連疾患の例は、アディソン疾患、

円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群（A P S）、

自己免疫性再生不良性貧血、

自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性心筋炎、ベーチェット病、セリアックスブルー、クローン病、皮膚筋炎、好酸球性筋膜炎、

結節性紅斑、巨大細胞動脈炎（側頭動脈炎）、グッドパスチャー症候群、

バセドウ病、橋本病、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、I g A 腎症、

若年性関節炎、糖尿病、若年糖尿病、川崎症候群、ランバート - イートン症候群、狼瘡（S L E）、混合結合組織病（M C T D）、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、結節性多発動脈炎、I、I I、および I I I 型自己免疫性多腺症候群、多発性筋痛リウマチ、多発性筋炎、乾癬、乾癬性関節炎、ライター症候群、再発性多発性軟骨炎、慢性関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、精子および精巣自己免疫、スティフパーソン症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎 / 巨大細胞動脈炎、

潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、血管炎、白斑、およびウエゲナー肉芽腫症を含むが、これらに限定されない。

【 0 4 3 0 】

疾患または状態は、炎症性疾患であり得る。炎症性疾患の例は、肺炎、アミロイドーシス、血管炎、

強直性脊椎炎、無血管性壊死、バセドウ病、ベル麻痺、滑液包炎、手根管症候群、セリア

10

20

30

40

50

ック病、胆管炎、軟骨軟化症の膝蓋骨、慢性活動性肝炎、慢性疲労症候群、コーガン症候群、先天性股関節形成不全、肋軟骨炎、クローン病、嚢胞性線維症、ドゥケルバン腱炎、糖尿病関連関節炎、びまん性特発性骨肥大症、円盤状ループス、エーラーズ - ダンロス症候群、家族性地中海熱、筋膜炎、線維症 / 線維筋痛症、五十肩、神経節嚢胞、巨大細胞動脈炎、痛風、バセドウ病、H I V 関連リウマチ性疾患症候群、副甲状腺機能亢進症関連関節炎、感染性関節炎、炎症性腸症候群 / 過敏性腸症候群、若年性関節リウマチ、ライム病、マルファン症候群、ミクリッツ病、混合結合組織病、多発性硬化症、筋筋膜炎症候群、変形性関節症、骨軟化症、骨粗鬆症およびコルチコステロイド誘因性骨粗鬆症、パジェット病、回帰性リウマチ、パーキンソン病、プラマー病、多発性筋痛リウマチ、多発性筋炎、偽痛風、乾癬性関節炎、レイノー現象 / 症候群、ライター症候群、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、サルコイドーシス、坐骨神経痛（腰椎神経根症）、強皮症、壊血病、鎌状赤血球症関節炎、シェーグレン症候群、脊椎狭窄、脊椎すべり症、スティル病、全身性エリテマトーデス、タカヤス（無脈）病、腱炎、テニス肘 / ゴルフ肘、甲状腺関連関節炎、トリガーフィンガー、潰瘍性大腸炎、ウェゲナー肉芽腫症、およびホイップル病を含むが、これらに限定されない。

10

【 0 4 3 1 】

本明細書で開示される治療方法は、サイトカインレベルによって測定されるオフターゲット活性を含み得る。方法は、他の C A R - E C 療法と比較して、サイトカインレベルによって測定されるオフターゲット活性を減少し得る。方法は、インターフェロン γ レベルによってオフターゲット活性を減少し得る。減少され得る他のオフターゲット活性は、毒性リンパ球減少症、固形腫瘍標的の致死的な細胞溶解、および血液学的標的に対する慢性低ガンマグロブリン血症を含む。本明細書で開示される治療方法および組成物は、C D 1 9 媒介の B 細胞形成不全を含む癌を治療するために使用され得る。方法および組成物は、C D 1 9 媒介の B 細胞形成不全を最小化し得る。方法は、長期 B - 細胞形成不全を回避し得る。

20

【 0 4 3 2 】

本明細書で開示される C A R - E C プラットフォーム、方法および組成物は、治療を必要とする対象の不均一な腫瘍または不均一な血液細胞悪性腫瘍を治療するために使用され得る。「pan - B 細胞」マーカー C D 2 0 は、B 細胞新生物に対して最も優性に標的化された抗原であり、F D A 承認抗体リツキシマブは、多くの白血病およびリンパ腫の治療における重要な構成要素である。しかしながら、C D 2 0 抗原発現の調節に関連する耐性メカニズムは、

30

わずかな数の患者において起きる C D 1 9 または C D 2 0 抗原単独のいずれかを用いた標的化が、治療的療法には不十分であることは明らかである。本明細書で開示される方法は、異なる特異性（例えば、抗 C D 1 9 抗体 C A R - E C スイッチおよび抗 C D 2 0 抗体 C A R - E C スイッチ）を有する 2 つ以上のスイッチの構造および投与を提供する。本明細書で開示される方法は、異なる特異性（例えば、抗 C D 1 9 抗体 C A R - E C スイッチおよび抗 C D 2 2 抗体 C A R - E C スイッチ）を有する 2 つ以上のスイッチの構造および投与を提供する。この方法は、B 細胞の持続的な欠如を回避しながら、臨床で再発への傾向に対して重要な利点を提供し得る。不均一な腫瘍または不均一な血液細胞悪性腫瘍はまた、抗 C D 1 9 抗体 C A R - E C スイッチおよび抗 C D 2 2 抗体 C A R - E C スイッチを用いて治療され得る。1 つ以上 C A R - E C スイッチは、連続的にまたは同時に投与され得る。標的細胞上の第 2 の細胞表面分子を標的とする第 2 のスイッチは、第 1 のスイッチによって標的化される標的細胞上の第 1 の細胞表面分子の下方調節後に、投与され得る。

40

【 0 4 3 3 】

C A R - E C スイッチは、1 つ以上の追加の療法剤と共に投与され得る。1 つ以上の追加の療法剤は、免疫療法、化学療法およびステロイドから成る群から選択され得る。1 つ以上の追加の療法剤は、化学療法薬物であり得る。化学療法薬物は、アルキル化剤、抗代謝産物、アントラサイクリン、

トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤、コルチコステロイドまたは異化剤であり得る

50

。化学療法薬物は、アクチノマイシン - D、ブレオマイシン、アルトレタミン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルボプラチン、カペシタビン、カルムスティン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロファラビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エトポシド、エストラムスチン、フロクスリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン（ジェムザール）、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イリノテック（カンプトサー）、イクサベピロン、L - アスパラギナーゼ、ロムスティン、メクロレタミン、メルファラン、6 - メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン - C、パクリタキセル（タキソール）、ペメトレキセド、ペントスタチン、ストレプトゾシン、テモゾロマイド、テニポシド、チオグアニン、チオテパ、トボテック（ヒカムチン）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビノレルビン、レチノイド、トレチノイン（ATRAまたはAtralin（登録商標））、ベキサロテン（Targretin（登録商標））および三酸化ヒ素（Arsenox（登録商標））から選択され得る。化学療法は、飲み込むためのピルとして、筋肉または脂肪組織への、静脈内、局所的または直接体腔への注射として投与され得る。

10

【0434】

1つ以上の追加の療法剤は、血管新生阻害剤を含み得る。血管新生阻害剤は、ベバシズマブ、イトラコナゾール、カルボキシアミドトリアゾール、TNP - 470、CM101、IFN α 、IL - 12、血小板因子4、スラミン、SU5416、トロンボスポンジン、VEGFRアンタゴニスト、ヘパリンを有する血管新生抑制ステロイド、CAR - ECi11aige誘導血管新生抑制性因子、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤、アンジオスタチン、エンドスタチン、ソラフェニブ、スニチニブ、パゾパニブ、エベロリムス、2 - メトキシエストラジオール、テコガラン、テトラチオモリブデン酸、サリドマイド、プロラクチン、 $\alpha\text{v}\beta_3$ 阻害剤、リノミド、タスキニモド、可溶性VEGFR - 1、可溶性NRP - 1、アンジオポエチン2、バソスタチン、カルレティキュリン、TIMP、CD41、Meth - 1、Meth - 2、インターフェロン - α 、インターフェロン - β 、インターフェロン - γ 、CXCL10、IL - 4、IL - 12、IL - 18、プロトロンビン、抗トロンビンIII断片、プロラクチン、VEGI、SPARC、オステオポンチン、マスピン、カンスタチン、プロリフェリン関連タンパク質およびレスチンから選択され得る。

20

30

【0435】

1つ以上の追加の療法剤は、ホルモン療法を含み得る。ホルモン療法は、抗エストロゲン（例えば、フルベストラント（Faslodex（登録商標））、タモキシフェン、トレミフェン（Fareston（登録商標）））、アロマターゼ阻害剤（例えば、アナストロゾール（Arimidex（登録商標））、エキセメスタン（Aromasin（登録商標））、レトロゾール（Femara（登録商標）））、プロゲスチン（例えば、メゲストロール酢酸（Megace（登録商標）））、エストロゲン、抗アンドロゲン（例えば、ビカルタミド（Casodex（登録商標））、フルタミド（Eulexin（登録商標））、ニルタミド（Nilandron（登録商標）））、ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）または黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニストまたは類似体（例えば、ロイプロリド（Lupron（登録商標））、ゴセレリン（Zoladex（登録商標）））から選択され得る。

40

【0436】

1つ以上の追加の療法剤が、ステロイドを含み得る。ステロイドは、コルチコステロイドであり得る。ステロイドは、コルチゾールまたはその誘導体であり得る。ステロイドは、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン（Solumedrol（登録商標））またはデキサメタゾンから選択され得る。

【0437】

CAR - ECスイッチは、1つ以上の追加の療法を用いて投与され得る。1つ以上の追加の療法は、レーザー治療を含み得る。1つ以上の追加の療法は、放射線療法を含み得る

50

。1つ以上の追加の療法は、手術を含み得る。

【0438】

対象の疾患または状態を治療するためのプラットフォーム、キットおよび方法が、本明細書で開示される。対象は、健康な対象であり得る。対象は、疾患または状態に罹患している場合がある。対象は、複数の疾患または状態に罹患している場合がある。対象は、慢性リンパ性白血病に罹患している場合がある。対象は、急性リンパ性白血病に罹患している場合がある。対象は、動物であり得る。対象は、哺乳類であり得る。哺乳類は、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、サル、ウシ、ウマ、ロバ、ラバ、イヌ、ネコ、ブタ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ラット、ハムスター、モルモットまたはマウスであり得る。対象は、トリまたはチキンであり得る。対象は、ヒトであり得る。対象は、子供であり得る。子供は、急性リンパ性白血病に罹患している場合がある。対象は、6歳未満であり得る。対象は、約1歳、約2歳、約3歳、約4歳、約5歳、約6歳、約7歳、約8歳、約9歳、約10歳、約11歳、約12歳、約13歳、約14歳、約15歳、約18歳、約20歳、約25歳、約30歳、約35歳、約40歳、約45歳、約50歳、約55歳、約60歳、約65歳、約70歳、約75歳、約80歳、約85歳、約90歳、約95歳、約100歳または約105歳であり得る。

10

【0439】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i)本明細書で開示されるヒト化されたCARを含むCAR-ECと、(ii)本明細書で開示される相補的なヒト化されたCAR-ECスイッチとを投与することを含む、本明細書で開示される疾患または状態を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、(i)配列番号63~92、104、115、および181~183から選択される配列を有するCARを含むCAR-ECと、(ii)本明細書で開示される相補的なヒト化されたCAR-ECスイッチとを投与することを含む、本明細書で開示される疾患または状態を治療する方法を提供する。スイッチは、配列番号17~24から選択される軽鎖配列と、本明細書で開示されるCAR-IDとを含み得る。軽鎖配列は、配列番号27~34から選択されるヒト化された配列を含み得る。スイッチは、配列番号2~14から選択される重鎖配列を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示は、(i)配列番号290~388および423のうちのいずれか1つから選択される配列を有するscFvである細胞外ドメインを有するCARを含むCAR-ECと、(ii)本明細書で開示される相補的なヒト化されたCAR-ECスイッチとを投与することを含む、本明細書で開示される疾患または状態を治療する方法を提供する。スイッチは、配列番号17~24から選択される軽鎖配列と、本明細書で開示されるCAR-IDとを含み得る。軽鎖配列は、配列番号27~34から選択されるヒト化された配列を含み得る。スイッチは、配列番号2~14から選択される重鎖配列を含み得る。投与は、任意の順番であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、CAR-EC細胞は、CAR-ECスイッチ投与前に投与され得る。いくつかの実施形態では、CAR-ECスイッチは、CAR-EC細胞投与前に投与され得る。いくつかの実施形態では、CAR-EC細胞は、CAR-ECスイッチ投与と同時に投与され得る。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、CD19+細胞が病理学と関連付く疾患または状態である。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、異種の腫瘍および血球悪性腫瘍から選択される。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、急性リンパ性白血病および慢性リンパ性白血病から選択される。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫(MCL)、バーキットリンパ腫、および有毛細胞白血病(HCL)から選択される。

20

30

40

【0440】

IX. 標的細胞を死滅させるか、または活性化させる方法

本明細書で開示されるキメラ受容体エフェクター細胞を、本明細書で開示されるキメラ受容体エフェクター細胞スイッチと接触させることを含む、標的細胞を死滅させる方法が、さらに本明細書で開示され、キメラ受容体エフェクター細胞は、キメラ受容体エフェク

50

ター細胞スイッチ上のCAR-IDに結合する非抗体細胞外ドメインと共にキメラ受容体を発現し、キメラ受容体エフェクター細胞スイッチは、キメラ受容体の非抗体細胞外ドメインに結合する結合ドメインを含み、かつスイッチは、標的細胞上の抗原に結合する標的化部分を含む。

【0441】

本明細書で開示されるCAR-ECを、本明細書で開示されるCAR-ECスイッチと接触させることを含む標的細胞を死滅させる方法が、さらに本明細書で開示され、CAR-ECは、CAR-ECスイッチ上のCAR-IDに結合する細胞外ドメインと共にCARを発現し、CAR-ECスイッチは、CARの細胞外ドメインに結合するCARを含み、かつスイッチは、標的細胞上の抗原（例えば、腫瘍と関連する抗原）に結合する標的化部分を含む。

10

【0442】

本明細書で開示されるCAR-ECを、本明細書で開示されるCAR-ECスイッチと接触させることを含む、標的細胞を溶解する方法が、さらに本明細書で開示され、CAR-ECは、CAR-ECスイッチ上のCAR-IDに結合する細胞外ドメインと共にCARを発現する、CAR-ECスイッチは、CARの細胞外ドメインに結合するCARを含み、かつスイッチは、標的細胞上の抗原（例えば、腫瘍と関連する抗原）に結合する標的化部分を含む。

【0443】

接触させることは、インビトロで起こり得る。接触させることは、インビボで対象内で起こり得る。対象は、本明細書で開示される対象のいずれかであり得る。対象は、疾患を有し得る。疾患は、本明細書で開示される疾患のうちの任意の1つ以上であり得る。疾患は、癌であり得る。接触させることは、投与を介し、本明細書で記載される方法を介し得る。投与することは、CAR-ECスイッチを、スイッチに結合するキメラ受容体を発現するキメラ受容体エフェクター細胞が既に投与されている対象に投与することを含み得る。投与することは、CAR-ECスイッチを対象に投与することと、CAR-ECスイッチに結合するキメラ受容体を発現するCAR-ECを対象にさらに投与することを含み得る。

20

【0444】

接触させることは、標的化された細胞の溶解を含み得る。接触させることは、標的細胞を死滅させ得る。接触させることは、約1 pM～約100 pMの範囲の死滅のために、EC₅₀を有する標的細胞を死滅させ得る。接触させることは、1 pMより低い死滅のために、EC₅₀を有する標的細胞を死滅させ得る。接触させることは、疾患を有する細胞を死滅させ得る。細胞は、本明細書で開示される任意の疾患を有し得る。疾患は、癌であり得る。

30

【0445】

スイッチは、本明細書で開示される任意のスイッチであり得る。スイッチは、標的化部分に融合され、移植されるか、またはそれに結合されるK4ペプチドを含み得る。スイッチは、標的化部分に融合され、移植されるか、またはそれに結合されるE4を含み得る。スイッチは、標的化部分に融合され、移植されるか、またはそれに結合されるGCN4ペプチドを含み得る。GCN4ペプチドは、構造Iの配列：X₁NYHLENEVARLKX₂X₃（配列番号269）を含み得、X₁、X₂、およびX₃は全て、任意のアミノ酸であるか、または不在である。GCN4ペプチドは、本明細書で開示されるGCN4誘導体（例えば、配列番号139～153および245のうちのいずれか1つ）を含み得る。スイッチは、標的化部分に融合され、移植されるか、またはそれに結合されるFLAGタグを含み得る。スイッチは、標的化部分に結合されるFITCを含み得る。標的化部分は、CD19に結合し得る。標的化部分は、抗CD19抗体またはその抗原結合部分であり得る。標的化部分は、ヒト化された抗CD19抗体またはその抗原結合部分であり得る。標的化部分は、CD20、CD22、EGFR、EGFRvIII、Her2、CS1、BCMA、CEA、CLL1、CD33、またはCD123に結合し得る。標的化部分は、

40

50

抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL1抗体、抗CD123抗体、または抗CD33抗体であり得る。標的化部分は、ヒト化された抗CD20抗体、ヒト化された抗CD22抗体、ヒト化された抗EGFR抗体、ヒト化された抗EGFRvIII抗体、ヒト化された抗Her2抗体、ヒト化された抗CS1抗体、ヒト化された抗BCMA抗体、ヒト化された抗CEA抗体、ヒト化された抗CLL1抗体、ヒト化された抗CD123抗体、またはヒト化された抗CD33抗体であり得る。

【0446】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i)本明細書で開示されるヒト化されたCARを含むCAR-ECと、(ii)本明細書で開示される相補的なヒト化されたCAR-ECスイッチとを投与することを含む標的細胞を死滅させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、(i)配列番号63~92、104、115、および181~183から選択される配列を有するCARを含むCAR-ECと、(ii)本明細書で開示される相補的なヒト化されたCAR-ECスイッチとを投与することを含む標的細胞を死滅させる方法を提供する。スイッチは、配列番号17~24から選択される軽鎖配列と、本明細書で開示されるCAR-IDとを含み得る。軽鎖配列は、配列番号27~34から選択されるヒト化された配列を含み得る。スイッチは、配列番号2~14から選択される重鎖配列を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示は、(i)表11または表12に記載されるCARから選択されるCAR、または配列番号290~388、および423のうちのいずれか1つから選択される配列を有するscFvであるヒト化された細胞外ドメインを有するCARを含むCAR-ECと、(ii)本明細書で開示される相補的なヒト化されたCAR-ECスイッチとを投与することを含む標的細胞を死滅させる方法を提供する。スイッチは、配列番号から選択される軽鎖配列17~24と、本明細書で開示されるCAR-IDとを含み得る。軽鎖配列は、配列番号27~34から選択されるヒト化された配列を含み得る。スイッチは、配列番号2~14から選択される重鎖配列を含み得る。

【0447】

本明細書で開示されるキメラ受容体エフェクター細胞を、本明細書で開示されるキメラ受容体エフェクター細胞スイッチと接触させることを含む、標的細胞を活性化させる方法が、さらに本明細書で開示され、キメラ受容体エフェクター細胞は、接触が、(i)キメラ受容体エフェクター細胞スイッチ上のCAR-IDの、キメラ受容体エフェクター細胞上で発現されるキメラ受容体の非抗体細胞外ドメインへの結合と、(ii)キメラ受容体エフェクター細胞スイッチ上の標的化部分の、その標的抗原への同時結合との両方を含む場合、活性化のみされる。

【0448】

標的細胞を溶解する方法がさらに開示される。いくつかの実施形態では、本開示は、(i)本明細書で開示されるヒト化されたCARを含むCAR-ECと、(ii)本明細書で開示される相補的なヒト化されたCAR-ECスイッチとを投与することを含む標的細胞を溶解する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、(i)配列番号63~92、104、115、および181~183から選択される配列を有するCARを含むCAR-ECと、(ii)本明細書で開示される相補的なヒト化されたCAR-ECスイッチとを投与することを含む標的細胞を溶解する方法を提供する。スイッチは、配列番号17~24から選択される軽鎖配列と、本明細書で開示されるCAR-IDとを含み得る軽鎖配列は、配列番号27~34から選択されるヒト化された配列を含み得る。スイッチは、配列番号2~14から選択される重鎖配列を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示は、(i)表11または表12に記載されるCARから選択されるCAR、または配列番号290~388、および423のうちのいずれか1つから選択される配列を有するscFvであるヒト化された細胞外ドメインを有するCARを含むCAR-ECと、(ii)本明細書で開示される相補的なヒト化されたCAR-ECスイッチとを投与することを含む標的細胞を溶解する方法を提供する。スイッチは、配列番号17~24から選択

10

20

30

40

50

される軽鎖配列と、本明細書で開示される C A R - I D とを含み得る。軽鎖配列は、配列番号 27 ~ 34 から選択されるヒト化された配列を含み得る。スイッチは、配列番号 2 ~ 14 から選択される重鎖配列を含み得る。

【0449】

C A R - E C (例えば、本明細書で開示される C A R - E C)を、本明細書で開示される相補的 C A R - E C スイッチと接触させることを含む、C A R - E C (例えば、本明細書で開示される C A R - E C)を活性化させる方法が、さらに本明細書で開示され、接触が、(i) C A R - E C スイッチ上の C A R - I D の、C A R - E C 上で発現されるキメラ受容体 (例えば、C A R)の細胞外ドメインへの結合と、(i i) C A R - E C スイッチ上の標的化部分の、その標的抗原への同時結合との両方を含む場合、C A R - E C が活性化のみされる。いくつかの実施形態では、本開示は、(i) 本明細書で開示されるヒト化された C A R を含む C A R - E C と、(i i) 本明細書で開示される相補的なヒト化された C A R - E C スイッチとを投与することを含む C A R - E C を活性化させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、(i) 配列番号 63 ~ 92、104、115、および 181 ~ 183 から選択される配列を有する C A R を含む C A R - E C と、(i i) 本明細書で開示される相補的なヒト化された C A R - E C スイッチとを投与することを含む、C A R - E C を活性化させる方法を提供する。スイッチは、配列番号 17 ~ 24 から選択される軽鎖配列と、本明細書で開示される C A R - I D とを含み得る。軽鎖配列は、配列番号 27 ~ 34 から選択されるヒト化された配列を含み得る。スイッチは、配列番号 2 ~ 14 から選択される重鎖配列を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示は、(i) 表 11 または表 12 に記載される C A R から選択される C A R、または配列番号 290 ~ 388、および 423 から選択されるうちのいずれか 1 つの配列を有する s c F v であるヒト化された細胞外ドメインを有する C A R を含む C A R - E C と、(i i) 本明細書で開示される相補的なヒト化された C A R - E C スイッチとを投与することを含む標的細胞を死滅させる方法を提供する。スイッチは、配列番号 17 ~ 24 から選択される軽鎖配列と、本明細書で開示される C A R - I D とを含み得る。軽鎖配列は、配列番号 27 ~ 34 から選択されるヒト化された配列を含み得る。スイッチは、配列番号 2 ~ 14 から選択される重鎖配列を含み得る。

【0450】

接触は、インビトロで起こり得る。接触は、インビボで対象内で起こり得る。対象は、本明細書で開示される対象のいずれかであり得る。対象は、ヒトであり得る。対象は、疾患を有し得る。疾患は、本明細書で開示される疾患のうちの任意の 1 つ以上であり得る。疾患は、癌であり得る。接触は、投与 (または「投与すること」) を介し得る。投与は、本明細書に記載される方法の任意の 1 つ以上を介し得る。投与することは、C A R - E C スイッチを、スイッチ (すなわち、相補的 C A R を発現する C A R - E C) に結合するキメラ受容体を発現する C A R - E C が、既に投与されている対象に投与することを含み得る。投与することは、対象に C A R - E C スイッチを投与すること、対象に、C A R - E C スイッチに結合する C A R を発現する C A R - E C をさらに投与することを含み得る。

【0451】

接触は、標的化された細胞の溶解を誘発し得る。接触は、標的細胞を死滅させる場合がある。接触は、約 1 p M ~ 約 100 p M の範囲の死滅のために E C₅₀ を有する標的細胞を死滅させる場合がある。接触は、約 1 p M より低い死滅のために E C₅₀ を有する標的細胞を死滅させる場合がある。接触は、疾患を有する細胞を死滅させ得る。細胞は、本明細書で開示される任意の疾患を有し得る。疾患は、癌であり得る。

【0452】

スイッチは、本明細書で開示される任意のスイッチであり得る。スイッチは、標的化部分に融合され、移植されるか、またはそれに結合される K4 ペプチドを含み得る。スイッチは、標的化部分に融合され、移植されるか、またはそれに結合される E4 ペプチドを含み得る。スイッチは、標的化部分に融合され、移植されるか、またはそれに結合される G C N4 ペプチドを含み得る。G C N4 ペプチドは、構造 I の配列：X₁ N Y H L E N E V

A R L K X₂ X₃ (配列番号 269) を含み得、X₁、X₂、および X₃ は全て、任意のアミノ酸であるか、または不在である。G C N 4 ペプチドは、本明細書で開示される G C N 4 誘導体 (例えば、配列番号 139 ~ 153 および 245 のうちのいずれか 1 つ) を含み得る。スイッチは、標的化部分に融合され、移植されるか、またはそれに結合される F L A G タグを含み得る。スイッチは、標的化部分に結合された F I T C を含み得る。標的化部分は、C D 19 に結合し得る。標的化部分は、ヒト化された抗 C D 19 抗体またはその抗原結合部分であり得る。

【0453】

C A R - E C スwitchは、(i) 配列番号 16 ~ 25 から成る群から選択される軽鎖配列と、(i i) 配列番号 1 ~ 15 から成る群から選択される重鎖配列とを含む、F M C 6 3 抗体またはその C D 19 結合部分である標的化部分を含み得る。C A R - E C スwitchは、(i) 配列番号 16 ~ 25 から成る群から選択される軽鎖配列と、(i i) 配列番号 1 ~ 15 から成る群から選択される重鎖配列を含む、F M C 6 3 抗体またはその C D 19 結合部分である標的化部分に融合される G C N 4 ペプチドを含み得る。G C N 4 ペプチドは、構造 I の配列：X 1 N Y H L E N E V A R L K X 2 X 3 (配列番号 269) を含み、X 1、X 2、および X 3 は全て、任意のアミノ酸であるか、または不在である。G C N 4 ペプチドは、本明細書で開示される G C N 4 誘導体を含み得る。G C N 4 ペプチドは、配列番号 139 ~ 153 および 245 のうちのいずれか 1 つから選択され得る。)

【0454】

X . C A R - E C プラットフォーム

(i) エフェクター細胞が、キメラ抗原受容体 (C A R) をコードするポリヌクレオチドを含む、エフェクター細胞と、(i i) C A R - E C スwitchが、C A R - I D および標的化部分を含み、C A R - E C スwitchが、標的細胞上の細胞表面分子に結合し、C A R および C A R - E C スwitchのうちの一方または両方が、ヒト化される、キメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) スwitchとを含む、ヒト化されたキメラ抗原受容体エフェクター細胞 (C A R - E C) プラットフォームが、本明細書で開示される。(i) エフェクター細胞が、C A R を発現する、エフェクター細胞と、(i i) C A R - E C スwitchが、C A R - I D および標的化部分を含み、C A R - E C スwitchの標的化部分が、標的細胞上の細胞表面分子に結合し、C A R および C A R - E C スwitchのうちの一方または両方が、ヒト化される C A R - E C スwitchとを含む、ヒト化された C A R - E C プラットフォームも、本明細書で開示される。C A R - E C スwitchは、本明細書で開示される任意の C A R - E C スwitch (例えば、本明細書で開示されるヒト化された C A R - E C スwitch) から選択され得る。本明細書で使用される、「スイッチ可能な C A R プラットフォーム」、「C A R - E C プラットフォーム」、「s C A R - T プラットフォーム」、「s C A R - T 細胞プラットフォーム」、「スイッチ可能なキメラ抗原受容体プラットフォーム」、「キメラ抗原受容体エフェクター細胞プラットフォーム」、「C A R - T スwitchプラットフォーム」、「s C A R プラットフォーム」、「スイッチプラットフォーム」、および「スイッチ可能プラットフォーム」という用語は、交換可能に使用される。

【0455】

C A R - E C プラットフォームは、第 1 の C A R - E C スwitchを含み得る。C A R - E C プラットフォーム第 1 の C A R - E C スwitch および少なくとも 1 つの第 2 の C A R - E C スwitch。いくつかの実施形態では、C A R - E C プラットフォームは、少なくとも 2 つのヒト化された C A R - E C スwitchを含む。C A R - E C プラットフォームは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個またはそれ以上のヒト化された C A R - E C スwitchを含み得る。C A R - E C プラットフォームは、20 超、25 超、30 超、35 超、40 超、45 超または 50 個超のヒト化された C A R - E C スwitchを含み得る。2 個以上のスイッチは、本明細書で開示される 1 つ以上ヒト化された C A R - E C スwitchまたはその組み合わせから選択され得る

10

20

30

40

50

【 0 4 5 6 】

本明細書で開示される C A R - E C プラットフォームは、第 1 の C A R - E C スイッチおよび第 2 の C A R - E C スイッチをさらに含み得、第 1 の C A R - E C スイッチが、第 1 の C A R - I D および第 1 の標的化部分を含み、第 2 の C A R - E C スイッチが、第 2 の C A R - I D および第 2 の標的化部分を含む。第 1 の C A R - I D および第 2 の C A R - I D は、同じであり得る。第 1 の C A R - I D および第 2 の C A R - I D は、異なり得る。第 1 の C A R - I D および第 2 の C A R - I D は、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得る。第 1 の標的化部分および第 2 の標的化部分は、同じであり得る。第 1 の標的化部分および第 2 の標的化部分は、異なり得る。第 1 の標的化部分および第 2 の標的化部分は、約 9 9 %、約 9 8 %、約 9 7 %、約 9 6 %、約 9 5 %、約 9 2 %、約 9 0 %、約 8 5 %、約 8 0 %、約 7 5 %、約 7 0 %、約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 5 %、約 5 0 %、約 4 5 %、約 4 0 %、約 3 5 %、約 3 0 %、約 2 5 %、約 2 0 %、約 1 5 %、約 1 0 %、約 5 % または約 2 % 同一であり得る。

10

【 0 4 5 7 】

C A R - E C スイッチは、配列本明細書で開示される任意のスイッチを有し得る。例えば、それは、軽鎖および重鎖を含み得、軽鎖が、本明細書で開示される任意のスイッチ軽鎖配列を含むか、またはそれから成り、重鎖が、本明細書で開示される任意のスイッチ重鎖配列を含むか、またはそれから成る。かかる重鎖および / または軽鎖配列は、ヒト化され得る。いくつかの実施形態では、C A R - E C スイッチは、ヒト化され、かつ配列番号 1 7 ~ 2 4 から選択される軽鎖配列と、配列番号 2 ~ 1 4 から選択される重鎖配列とを含み、重鎖および軽鎖のうち的一方または両方は、本明細書で開示される C A R - I D (例えば、G C N 4 C A R - I D) を含む。特定の実施形態では、軽鎖配列は、配列番号 2 7 ~ 3 4 から選択されるヒト化された配列 (N 末端の G C N 4 C A R - I D を含む) と、配列番号 2 ~ 1 4 から選択される重鎖配列とを含む。特定の実施形態では、スイッチは、表 6 または表 8 に記載されるスイッチであり、本明細書で開示されるスイッチのうちのいくつかに含まれる重鎖 / 軽鎖の組み合わせを呈する。いくつかの実施形態では、スイッチは、スイッチに含まれる C A R - I D が、修飾され、構造 I の配列を有することを除いて、表 6 または表 8 に記載されるスイッチと同一である。いくつかの実施形態では、構造 I の配列は、配列番号 2 6、3 6、1 3 9 ~ 1 6 3、および 2 4 5 のうちのいずれか 1 つから選択される。

20

30

【 0 4 5 8 】

本明細書で開示される C A R - E C プラットフォームは、第 1 の C A R - E C をさらに含み得る。第 1 の C A R - E C は、第 1 の C A R を含み得る。第 1 の C A R は、ヒト化され得る。第 1 の C A R は、本明細書で開示される C A R であり得る。第 1 の C A R は、本明細書で開示される任意の C A R 配列を有し得る。第 1 の C A R は、ヒト化され、免疫原性をヒトに減少し得る。第 1 の C A R は、ヒト化される細胞外ドメインを含み得る。ヒト化は、C A R - E C スイッチに対する細胞外ドメインの特異性および親和性を保持しながら、C A R の免疫原性をヒトに減少し得る。第 1 の C A R は、表 1 3 に提供される C A R 配列のうちのいずれか 1 つのヒト化されたバージョンであり得、またはそれは、配列番号 2 7 0 ~ 2 8 9 のうちのいずれか 1 つのヒト化されたバージョンであり得る。第 1 の C A R は、C A R - E C スイッチの C A R - I D に結合する抗体または抗体断片を含む、細胞外ドメインを含むヒト化された C A R であり得る。抗体または抗体断片は、ヒト化され得る。抗体断片は、s c F v (例えば、ヒト化された s c F v) であり得る。s c F v またはヒト化された s c F v は、一般の構造軽鎖 - リンカー - 重鎖を含むか、またはそれから成り得る。s c F v またはヒト化された s c F v は、一般の構造重鎖 - リンカー - 軽鎖を含むか、またはそれから成り得る。ヒト化された s c F v は、ヒト免疫グロブリンフレームワークに移植された、非ヒト (例えば、マウス) C D R と共にヒト化された V H (可変

40

50

重鎖）配列を含み得る。ヒト化された s c F v は、ヒト免疫グロブリンフレームワークに移植された非ヒト（例えば、マウス）C D R と共にヒト化された V L （可変軽鎖）配列を含み得る。いくつかの特定の実施形態では、第 1 の C A R は、図 2 4 A のコンストラクト A ~ H から選択される構造を含む。ある特定の実施形態では、第 1 の C A R は、図 2 4 のコンストラクト A、コンストラクト B、またはコンストラクト C に従う構造を含む。ある特定の実施形態では、第 1 の C A R は、表 1 1 に記載される C A R から選択される。ある特定の特定の実施形態では、第 1 の C A R は、表 1 2 に記載される C A R から選択される。ある特定の実施形態では、第 1 の C A R の細胞外ドメインは、配列番号 2 9 0 ~ 3 8 8、および 4 2 3 のうちのいずれか 1 つから選択されるヒト化された s c F v 配列を含む。

【 0 4 5 9 】

10

ある特定の実施形態では、C A R - E C プラットフォームは、

a .

i . 配列番号 2 7 ~ 3 4 から選択されるヒト化された軽鎖配列（N 末端の G C N 4 C A R - I D を含む）、および配列番号 2 ~ 1 4 から選択される重鎖配列を含み、

i i . 表 6 または表 8 に記載される通り、本明細書で開示されるスイッチのいくつかに含まれる重鎖 / 軽鎖の組み合わせを呈するか、または

i i i . スイッチに含まれる C A R - I D が、修飾され、配列番号 2 6、3 6、1 3 9、および 1 5 4 ~ 1 6 3 のうちのいずれか 1 つから選択される配列を有することを除いて、表 6 または表 8 に記載されるスイッチと同一である、第 1 の C A R - E C スイッチと、

20

b . C A R が、

i . 図 2 4 A のコンストラクト A ~ H から選択される構造を含み、

i i . 図 2 4 A のコンストラクト E に従う構造を含み、

i i i . 表 1 1 に記載される C A R から選択され、

i v . 表 1 2 に記載される C A R から選択されるか、または

v . 細胞外ドメインが、配列番号 2 9 0 ~ 3 8 8、および 4 2 3 のうちのいずれか 1 つから選択されるヒト化された s c F v 配列を含む、相補的な第 1 の C A R を発現する第 1 の C A R - E C と、

任意に、

c . 少なくとも 1 個が、第 1 の C A R - E C スイッチ上の標的化部分とは異なる標的に結合する異なる標的化部分を含み、それぞれ第 2 の C A R - E C スイッチ上の C A R - I D は、任意に第 1 の C A R - E C スイッチ上の C A R - I D と同じか、または異なり

30

いくつかの実施形態では、第 1 のスイッチ上の C A R - I D は、第 2 のスイッチ上の C A R - I D とは異なり、第 1 の C A R は、第 2 の C A R - I D に結合し得ず、プラットフォームはまた、第 2 のスイッチ上の C A R - I D に結合する第 2 の C A R - E C を含み得る、1 個以上の第 2 の C A R - E C スイッチとを含む。

40

50

【表 3 - 1】

表 3 : 配列

配列表			
配列	配列番号ナン バー	名前	I D
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIR QPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	1	h4-59_01	アミノ 酸
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARHYYYGGSYAMDYWG QGTLVTVSS	2	hFMCH1	アミノ 酸
QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWLGVWIGSETTYYNPSLKSRITISKDTSK NQVSLKMSSLTAADTAVYYCARHYYYGGSYAMDY WGQGTLLTVSS	3	hFMCH2	アミノ 酸
QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWLGVWIGSETTYYNPSLKSRITISKDNS KNQVSLKMSSLTAADTAVYYCARHYYYGGSYAMDY WGQGTLLTVSS	4	hFMCH3	アミノ 酸
QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWLGVWIGSETTYYNPSLKSRITISKDTSK NQVSLKMSSLTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDY WGQGTLLTVSS	5	hFMCH4a	アミノ 酸
QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWLGVWIGSETTYYNPSLKSRITISKDNS KNQVSLKMSSLTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDY WGQGTLLTVSS	6	hFMCH4b	アミノ 酸
QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWLGVWIGSETTYYNPSLKSRITISKDNS KNQVSLKMSSLTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDY WGQGTLLTVSS	7	hFMCH4c	アミノ 酸
QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWLGVWIGSETTYYNPSLKSRITISKDNS KNQVSLKMSSLTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDY WGQGTLLTVSS	8	hFMCH4z	アミノ 酸

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNPSLKSRTISKDNSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTLVTVSS	9	hFMCH4b-x	アミノ 酸
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNPSLKSRTISKDNSKN NQFSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQTLVTVSS	10	hFMCH4c-x	アミノ 酸
EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPGKGLEWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKN NQVSLKMSSSLTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQTLVTVSS	11	hFMCH4c- 20L-E	アミノ 酸
EVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPGKGLEWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKN NQVSLKMSSSLTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQTLVTVSS	12	hFMCH4b-E	アミノ 酸
EVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPGKGLEWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKN NQVSLKMSSSLTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQTLVTVSS	13	hFMCH4c-E	アミノ 酸
EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPGKGLEWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKN NQVSLKMSSSLTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQTLVTVSS	14	hFMCH4b- 20L-E	アミノ 酸
EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTIKDNSKN SQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQTSVTVSS	15	mFMC63H	アミノ 酸
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQSYSTPP	16	IGKV1-39	アミノ 酸
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISKYLWYQ QKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK	17	hFMCL1	アミノ 酸

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISKYLNWYQ QKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCQQGATLPYTFGQGTKLEIK	18	hFMCL2	アミノ 酸
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISKYLNWYQ QKPGKAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYCQQGATLPYTFGQGTKLEIK	19	hFMCL2a	アミノ 酸
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISKYLNWYQ QKPGKAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYFCQQGATLPYTFGQGTKLEIK	20	hFMCL2b	アミノ 酸
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISKYLNWYQ QKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYFCQQGATLPYTFGQGTKLEIK	21	hFMCL2b-1	アミノ 酸
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISKYLNWYQ QKPGKALKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYFCQQGATLPYTFGQGTKLEIK	22	hFMCL2b(V 44L)	アミノ 酸
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISKYLNWYQ QKPGKAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK	23	hFMCL2b(A 92N)	アミノ 酸
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISKYLNWYQ QKPGKAIKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYFCQQGATLPYTFGQGTKLEIK	24	hFMCL2c	アミノ 酸
DIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN LEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIK	25	mFMC63L	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKL	26	ペプチドに 結合する切 断された酵 母転写因子 GCN4	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKLGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNTL PYTFGQGTKLEIK	27	hFMCL1- LCNT	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKLGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLHS	28	hFMCL2- LCNT	アミノ 酸

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGATL PYTFGQGTKLEIK			
NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAVKLLIYHTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGAT LPYTFGQGTKLEIK	29	hFMCL2a- LCNT	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAVKLLIYHTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGAT LPYTFGQGTKLEIK	30	hFMCL2b- LCNT	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGATL PYTFGQGTKLEIK	31	hFMCL2b-1- LCNT	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKALKLLIYHTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGAT LPYTFGQGTKLEIK	32	hFMCL2b(V 44L)-LCNT	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAVKLLIYHTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNT LPYTFGQGTKLEIK	33	hFMCL2b(A 92N)-LCNT	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAVKLLIYHTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGAT LPYTFGQGTKLEIK	34	hFMCL2c- LCNT	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGTKLEIK	35	mFMC63- LCNT	アミノ 酸
RMKQLEPKVEELLPKNYHLENEVARLKKLVGER	36	酵母転写因 子 GCN4(7P14P)	アミノ 酸
GGGGSNYHLENEVARLKKLGGGGS	37	リンカーを 有するペプ	アミノ 酸

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

		チドに結合 する切断さ れた酵母転 写因子 GCN4	
GGGGS DYKDDDDK	38	親水性標的 ペプチド (HTP)	アミノ 酸
GGGGS DYKDDDDKP	39	親水性標的 ペプチド (HTP)P	アミノ 酸
DYKDDDDK	40	FLAG(登録 商標)	アミノ 酸
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGT ATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTC AATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA CATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCAT TTTGCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGT GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC GAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGT AAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTT CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGC GCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCA ACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTA CGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCT GCCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTT ACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAA CCGCTTTTTTGACAAACATGGGGGATCATGTAATC GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGT AGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAATG GCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAA TAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCA CTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT	63	LV-EF1a- GCN4(52SR4)-BBZ	DNA

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTC AGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTG TCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGAT TTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTG AAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCT TAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTT TTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGAAACAAAAAAA CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGCGCGATCAA GAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTC AGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGT GTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT AGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTT ACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA AGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGC ACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAC GAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTT ATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGC GTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC TATGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGG TTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCT TTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA TTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCA GCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAG GAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCT CCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGC GCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG CACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTA			
---	--	--	--

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACA CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGC GCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGA GCTGCAAGCTTAATGTAGTCTTATGCAATACTCTTG TAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACAT GCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCG ATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATT AGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGAC GAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTAT TTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGGGTCTCTC TGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG CTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCT GTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGC CCGAACAGGGACCTGAAAGCGAAAGGGAAACCAG AGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGT ACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGA GAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGG GGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTA AGGCCAGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAC ATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTC GCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGG CTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCC TTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATAT AATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGG ATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAA GATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACC GCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAG GAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTA TATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGG AGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGC AGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTT GTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTAT GGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCA			
--	--	--	--

10

20

30

40

50

【表 3 - 8】

GACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAAC AATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCC AGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAG GATCAACAGCTCCTGGGGATTGGGGTTGCTCTGGA AAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCT AGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTGGAAT CACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAA CAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGA ATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAA TTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAAT TGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAA TTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTA AGAATAGTTTTTGTGTACTTTCTATAGTGAATAGA GTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACC CACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGA AGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGA GACAGATCCATTCTGATTAGTGAACGGATCTCGACG GTTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGT ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCA ACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAAT TACAAAAATTCAAAATTTTATCGAGCTTTGCAAAGA TGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAG CTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTCG TGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG TCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGC GGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCT CCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAA CGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGT GTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATG GCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGC AGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAA GTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGA GCCCCCTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCT				10
				20
				30
				40

【表 3 - 9】

GGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCA CCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTA GCCATTTAAAAATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTT TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAA GATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCG GGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATG TTCGGCGAGGCGGGCCCTGCGAGCGCGGCCACCGA GAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCT GCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCC CCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCC CTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGC TCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAG GAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATG TGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACC TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGAGTACGTCGTCTTT AGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCA GCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCC CTTTTGTAGTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTC AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAGG TGTCGTGAGGAATTCGGTACCGCGGCCGCCGGGG ATCCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCC GCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACGC CGTTGTGACCCAGGAATCCGCTCTGACCTCTTCTCC AGGCGAAACCGTGACTCTGACTTGCCGTAGTAGCA CCGGGGCTGTGACCACATCTAACTATGCCAGTTGGG TCCAGGAAAAACCGGATCACCTGTTTACTGGCCTGA TTGGCGGCACCAACAATCGCGCACCGGGTGTGCCC GCTCGTTTCAGCGGTTCCCTGATTGGGGACAAGGCA GCACTGACTATCACCGGCGCCCAGACCGAAGATGA GGCGATCTATTTTGCCTCCTGTGGTACAGCGACCA TTGGGTGTTTCGGGGGAGGCACCAAAGTACAGTGC TGGGCGGAGGAGGAGGTTTCAAGAGGAGGAGGTAG CGGGGGAGGCGGTTCCGGGGGAGGCGGTTCTGATG TGCAGCTGCAAGAATCCGGGCCAGGACTGGTTGCG				10
				20
				30
				40

【表 3 - 1 0】

CCTTCTCAGAGTCTGTCAATTACATGTACTGTTAGT GGCTTTCTGCTGACCGACTATGGTGTGAACTGGGTT CGTCAGAGCCCAGGCAAGGGTCTGGAGTGGCTGGG AGTGATTGGGGGGATGGAATCACAGACTACAATA GCGCACTGAAATCTCGGCTGAGTGTTACCAAAGAT AACAGCAAGTCCCAGGTCTTCCTGAAGATGAACAG CCTGCAAAGCGGCGACTCCGCTCGCTATTACTGCGT TACCGGACTGTTTGATTATTGGGGGCAGGGGACAA CTCTGACTGTTTCCTCCACCACGACGCCAGCGCCGC GACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGC GGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACT TCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCCG GGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCA CCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTG TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATT TCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGA GTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA CAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAA AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTAC AATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG GCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGT ACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT GCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAAGTCGACAATCAACC TCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTAT TCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATAC GCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCC GTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTG GTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGT CAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGA CGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTG TCAGTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCT			
--	--	--	--

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 1】

ATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCC CGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA CAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAGCTGACGTCCCT TCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCT CAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCC GGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCT CAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCG CCTGGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGA CTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAA AAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCC CAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGG TCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTC TCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAA TAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC AGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT AGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTATAAC TTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAAC TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGC AATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTT TCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATC AATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGC CCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATCTCCGCCCC ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGCAGAGGCCG AGGCCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCCTCG AGACGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA CGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCT TGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAG CGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGT TGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGCCC TGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGT TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCT AGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTC			
---	--	--	--

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 2】

GCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAT CGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTA CGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGA TGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGT TTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAAT AGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAAC CCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTT TGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGA TTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATAT TAACGTTTACAATTTC			
DIVMTQTPLTSLVTFGQPASISCKSSQSLDSDGQTYL NWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGVYYCWQGFHPWTFGGGKLEIK GGGSGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVKPGASVKLS CTASGFNIKDYMHVWKQRTEQGLEWIGRIDPEDGE TKYAPKFQGKATITADTSSKTAYLQLSSLTSEDYAVY YCARLKGGYWGQGTTLTVSSESKYGPPCPPCPDIYW APLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	67	CAR- FLAG_(IgG4 m_ヒンジ)	アミノ 酸
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCTGCGCTG GCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGACGCCGTT GTGACCCAGGAATCCGCTCTGACCTCTTCTCCAGGC GAAACCGTGACTCTGACTTGCCGTAGTAGCACCGG GGCTGTGACCACATCTAACTATGCCAGTTGGGTCCA GGAAAAACCGGATCACCTGTTTACTGGCCTGATTGG CGGCACCAACAATCGCGCACCGGGTGTGCCCCTC GTTTCAGCGGTTCCCTGATTGGGGACAAGGCAGCA CTGACTATCACCGGCGCCCAGACCGAAGATGAGGC GATCTATTTTTGCGTCCTGTGGTACAGCGACCATG GGTGTTCCGGGGAGGCACCAAAGTACAGTGCTGG GCGGAGGAGGAGGTTGAGGAGGAGGAGGTAGCGG GGGAGGCGGTTCCGGGGGAGGCGGTTCTGATGTGC AGCTGCAAGAATCCGGGCCAGGACTGGTTGCGCCT	68	LV-EF1a- GCN4(52SR4)- BBZ_IgG4(Pr o)	DNA

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 3】

TCTCAGAGTCTGTCAATTACATGTACTGTTAGTGGC TTTCTGCTGACCGACTATGGTGTGAACTGGGTTCGT CAGAGCCCAGGCAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGT GATTTGGGGGGATGGAATCACAGACTACAATAGCG CACTGAAATCTCGGCTGAGTGTTACCAAAGATAAC AGCAAGTCCCAGGTCTTCTGAAGATGAACAGCCT GCAAAGCGGCGACTCCGCTCGCTATTACTGCGTTAC CGGACTGTTTGATTATTGGGGGCAGGGGACAACCTCT GACTGTTTCTCCGAAAGCAAGTATGGCCACCTTG TCCAAGCTGTCCCGATATCTACATCTGGGCGCCCTT GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCTGTCACTGGT TATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAG TACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACT GAGAGTGAAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG CGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCT CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTC ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC				10
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTG GCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACGCCGTT GTGACCCAGGAATCCGCTCTGACCTCTTCTCCAGGC GAAACCGTGACTCTGACTTGCCGTAGTAGCACCGG GGCTGTGACCACATCTAACTATGCCAGTTGGGTCCA GGAAAAACCGGATCACCTGTTTACTGGCCTGATTGG CGGCACCAACAATCGCGCACCGGGTGTGCCCGCTC GTTTCAGCGGTTCCCTGATTGGGGACAAGGCAGCA CTGACTATCACCGGCGCCAGACCGAAGATGAGGC GATCTATTTTTGCGTCCTGTGGTACAGCGACCATTG GGTGTTCTGGGGGAGGCACCAAACCTGACAGTGCTGG	69	LV-EF1a- GCN4(52SR4)- BBZ_IgG4(S er)	DNA	30
				40

【表 3 - 1 4】

GCGGAGGAGGAGGTTTCAGGAGGAGGAGGTAGCGG GGGAGGCGGTTCCGGGGGAGGCGGTTCTGATGTGC AGCTGCAAGAATCCGGGCCAGGACTGGTTGCGCCT TCTCAGAGTCTGTCAATTACATGTACTGTTAGTGGC TTTCTGCTGACCGACTATGGTGTGAACTGGGTTTCGT CAGAGCCCAGGCAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGT GATTTGGGGGGATGGAATCACAGACTACAATAGCG CACTGAAATCTCGGCTGAGTGTTACCAAAGATAAC AGCAAGTCCCAGGTCTTCCTGAAGATGAACAGCCT GCAAAGCGGCGACTCCGCTCGCTATTACTGCGTTAC CGGACTGTTTGATTATTGGGGGCAGGGGACAACTCT GACTGTTTCCTCCGAAAGCAAGTATGGCCCCACCTTG TCCACCTTGTCCTCGATATCTACATCTGGGCGCCCTT GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGT TATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAG TACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACT GAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG CGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCT CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTC ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC			
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTG GCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGAGGCGGT AGTCACCCAGGAGCCAAGTCTACGGTGAGCCCCG GCGGTACCGTCACACTTACATGCGGAAGCTCTACCG GGGCTGTGACCACAAGCAACTACGCATCCTGGGTC CAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGGGGCCTCAT TGGTGGGACAAATAACAGAGCCCCGGGTGTTCCCG CCCGATTTTCTGGCAGTCTTCTGGGAGGAAAGGCCG	70	LV-EF1a- huGCN4- BBZ_L2,H2	DNA

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 5】

CTCTGACAATATCTGGCGCACAGCCCGAAGACGAG GCCGAGTACTATTGCGTGTGTGGTATAGCGACCAC TGGGTATTCGGTGGAGGAACAAAGCTGACAGTGCT CGGCGGTGGAGGGAGTGGTGGCGGTGGCAGCGGAG GGGGCGGATCACAAGTGCAATTGCAGGAGAGTGGA CCTGGACTCGTGAAACCATCTGAAACACTCTCCCTG ACTTGTACGGTTTCAGGGTTCCTGCTGACAGACTAT GGAGTAAACTGGATCAGGCAGCCACCCGGCAAGGG CTTGAGTGGATTGGCGTCATTGGGGCGACGGAA TCACCGACTATAACCCATCACTCAAATCTCGGGTGA CCATTTCCAAGGATACCAGTAAGAATCAGTTCAGCC TGAAACTTTTCATCCGTGACAGCTGCGGACACCGCCG TGTAATACTGTGTGACAGGACTTTTGTACTACTGGG GCCAGGGGACCCTGGTGACAGTTAGCTCCACCACG ACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCAC CATCGCGTCGACGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGC GTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACGA GGGGGTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGG CGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGT CACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGAA AGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGA GACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATG TGAAGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACG CCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGA AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGG CGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCA GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACG CCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC				10
atggccttaccagtaccgccttgcctctgcgctggccttgcctccacgcgcga ggcgcCAGGCGGTAGTCACCCAGGAGCCAAGTCTCAC GGTGAGCCCCGGCGGTACCGTCACACTTACATGCG	71	LV-EF1a- huGCN4- BBZ_L2,H3	DNA	40

【表 3 - 1 6】

GAAGCTCTACCGGGGCTGTGACCACAAGCAACTAC GCATCCTGGGTCCAGCAGAAACCCGGTCAGGCGCC CCGGGGCCTCATTGGTGGGACAAATAACAGAGCCC CGGGTGTTCGCCGCCGATTTTCTGGCAGTCTTCTGG GAGGAAAGGCCGCTCTGACAATATCTGGCGCACAG CCCGAAGACGAGGCCGAGTACTATTGCGTGTGTG GTATAGCGACCACTGGGTATTCGGTGGAGGAACAA AGCTGACAGTGCTCGGCGGTGGAGGGAGTGGTGGC GGTGGCAGCGGAGGGGGCGGATCACAAGTGCAATT GCAGGAGAGTGGACCTGGACTCGTGAAACCATCTG AAACACTCTCCATAACTTGTACGGTTTCAGGGTTCC TGCTGACAGACTATGGAGTAAACTGGGTTAGGCAG CCACCCGGCAAGGGCTTGGAGTGGCTGGGCGTCAT TTGGGGCGACGGAATCACCGACTATAACCCATCAC TCAAATCTCGGCTTACCGTCTCCAAGGATACGAGTA AGAATCAGGTCAGCCTGAAAATGTCATCCCTCACA GCTGCGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGACAGG ACTTTTGTACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGCTCAC AGTTAGCTCCaccacgacgccagcgccgaccaccaacacggcgccc accatcgctcgagcccctgtccctgcgccagagcggtgcggccagcgcgcg ggggcgagtgacacagggggctggaacttcgctgtatctacatctggcg cccttgccgggactgtggggtccttctctgactggttaccctttactgaaa cggggcagaaaagaactctgtatatattcaacaaccattatgagaccagtacaaa ctactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaaggagga tgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgagacgccccgcgtacaagcagg gccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttt ggacaagagacgtggccgggacctgagatgggggaaagccgagaagggaaga accctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctac agtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttt accagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggcc ctgccccctcgc				10
atggccttaaccagtaccgccttgctcctgcgcgtggccttgctgctcacgccgcca ggccgCAGGCGGTAGTCACCCAGGAGCCAAGTCTCAC GGTGAGCCCCGGCGGTACCGTCACACTTACATGCG GAAGCTCTACCGGGGCTGTGACCACAAGCAACTAC GCATCCTGGGTCCAGCAGAAACCCGACAAAGCGTT	72	LV-EF1a- huGCN4- BBZ_L3,H2	D N A	40

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 7】

CCGGGGCCTCATTGGTGGGACAAATAACAGAGCCC CGGGTGTTCGCGCCGATTTTCTGGCAGTCTTCTGG GAGGAAAGGCCGCTCTGACAATATCTGGCGCACAG CCCGAAGACGAGGCCGAGTACTATTGCGTGTGTG GTATAGCGACCACTGGGTATTTCGGTGGAGGAACAA AGCTGACAGTGCTCGGCGGTGGAGGGAGTGGTGGC GGTGGCAGCGGAGGGGGCGGATCACAAGTGCAATT GCAGGAGAGTGGACCTGGACTCGTGAAACCATCTG AAACACTCTCCCTCACTTGTACGGTTTCAGGGTCC TGCTGACAGACTATGGAGTAAACTGGATTAGGCAG CCACCCGGCAAGGGCTTGGAGTGGATCGGCGTCAT TTGGGGCGACGGAATCACCGACTATAACCCATCAC TCAAATCTCGGGTCACCATCTCCAAGGATACAGTA AGAATCAGTTCAGCCTGAAACTGTCATCCGTCACAG CTGCGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGACAGGA CTTTTGTACTACTGGGGCCAGGGGACCTTGGTAACA GTTAGCTCCaccacgacgccagcgccgaccaccaacaccggcgccca ccatcgctcgagccctgtccctgcgccagaggcgccggccagcgccggg ggcgccagtgacacaggggggtgacttcgctgtgatctacatctggcgcc ccttggccgggactgtggggctccttctctgtcactggttatcacccttactgcaaac ggggcagaagaaactcctgtatatattcaacaacatttatgagaccagtacaaact actcaagagggaagatggctgtagctgccgatttcagaagaagaagaaggagatg tgaactgagagtgaagttcagcaggagcgacagcggcccggtacaagcaggggc cagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagaggagtagatgtttg gacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaagccgagaagggaagaa ccctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatggcgaggcctaca gtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttta ccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgccttcacatgcaggccc tgccccctcgc				10
atggccttaccagtgaccgccttgcctcgtccgctggccttgcctcgcacgccgcca ggccgCAGGCGGTAGTCACCCAGGAGCCAAGTCTCAC GGTGAGCCCCGGCGGTACCGTCACACTTACATGCG GAAGCTCTACCGGGGCTGTGACCACAAGCAACTAC GCATCCTGGGTCCAGCAGAAACCCGGTCAGGCATT CCGGGGCCTCATTGGTGGGACAAATAACAGAGCCC CGGGTGTTCGCGCCGATTTTCTGGCAGTCTTCTGG	73	LV-EF1a- huGCN4- BBZ_L3,H3	DNA	40

10

20

30

40

【表 3 - 1 8】

GAGGAAAGGCCGCTCTGACAATATCTGGCGCACAG CCCGAAGACGAGGCCGAGTACTATTGCGTGTGTG GTATAGCGACCACTGGGTATTTCGGTGGAGGAACAA AGCTGACAGTGCTCGGCGGTGGAGGGAGTGGTGGC GGTGGCAGCGGAGGGGGCGGATCACAAGTGCAATT GCAGGAGAGTGGACCTGGACTCGTGAAACCATCTG AAACACTCTCCATAACTTGTACGGTTTCAGGGTTCC TGCTGACAGACTATGGAGTAACTGGGTCAGGCAG CCACCCGGCAAGGGCTTGGAGTGGCTCGGCGTCAT TTGGGGCGACGGAATCACCGACTATAACCCATCAC TCAAATCTCGGTTGACCGTGTCCAAGGATACAGTA AGAATCAGGTCAGCCTGAAAATGTCATCCCTGACA GCTGCGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGACAGG ACTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGTTGAC AGTTAGCTCCaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgccc accatcgcgtcgagccctgtccctgcgccagagcgctgccggccagcgcgcg gggcgcgagtcacacgaggggctggaactgcctgtgatatctacatctggcg cccctggcgggactgtggggtcctctctgtactggttatccctttactcaaa cggggcagaaagaaactctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaa ctactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaagaaggagga tgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgagacgccccgcgtacaagcagg gccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgttt ggacaagagacgtggccgggacccctgagatgggggaaagccgagaaggaga accctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctac agtgagattgggatgaagggcagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttt accaggggtctcagtacagccaccaaggacacctacgaccccttcacatgcaggcc ctgccccctgc				10
atggccttaccagtgaccgccttgcctgcgcgtggccttgcctgcacgcgccca ggccgCAGGCGGTAGTCACCCAGGAGCCAAGTCTCAC GGTGAGCCCCGGCGGTACCGTCACACTTACATGCG GAAGCTCTACCGGGGCTGTGACCACAAGCAACTAC GCATCCTGGGTCCAGCAGAAACCCGATCACCTGTTC CGGGGCCTCATTGGTGGGACAAATAACAGAGCCCC GGGTGTTCGCCCGGATTTTCTGGCAGTCTTCTGGG AGGAAAGGCCGCTCTGACAATATCTGGCGCACAGC CCGAAGACGAGGCCGAGTACTATTGCGTGTGTG	74	LV-EF1a- huGCN4- BBZ_L4,H2	DNA	20
				30
				40

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 9】

TATAGCGACCACTGGGTATTCTGGTGGAGGAACAAA GCTGACAGTGCTCGGCGGTGGAGGGAGTGGTGGCG GTGGCAGCGGAGGGGGCGGATCACAAAGTGCAATTG CAGGAGAGTGGACCTGGACTCGTGAAACCATCTGA AACACTCTCCCTTACTTGTACGGTTTCAGGGTTCCT GCTGACAGACTATGGAGTAAACTGGATCAGGCAGC CACCCGGCAAGGGCTTGGAGTGGATCGGCGTCATT TGGGGCGACGGAATCACCGACTATAACCCATCACT CAAATCTCGGGTCACCATCTCCAAGGATACGAGTA AGAATCAGTTCAGCCTGAAACTCTCATCCGTTACAG CTGCGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGACAGGA CTTTTGGACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTAACA GTTAGCTCCaccacgacgccagcgccgaccaccaacaccggcgccca ccatcgctcgagccccgtccctgcgccagagcggtgccggccagcgccggg ggcgcgagtgacacgagggggctggacttcgctgtgatctacatctggcgcg ccttggccgggactgtgggtccttctctgtactgtttacacctttactcgaac ggggcagaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaact actcaagagggaagatggctgtactgccgatttccagaagaagaagaaggaggatg tgaactgagagtgaaattcagcaggagcgacgacgccccgcgtacaagcagggc cagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttg gacaagagacgtggccgggacctgagatgggggaaagccgagaagggaagaa cctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatggcgagcgctaca gtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttta ccagggtctcagtcagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccc tgccccctcgc				10
atggccttaccagtgcacgcttgcctgcgcgtggcctgtctgctccacgcgcga ggcggCAGGCGGTAGTCACCCAGGAGCCAAGTCTCAC GGTGAGCCCCGGCGGTACCGTCACACTTACATGCG GAAGCTCTACCGGGGCTGTGACCACAAGCAACTAC GCATCCTGGGTCCAGCAGAAACCCGACCATCTGTTT CGGGGCCTCATTGGTGGGACAAATAACAGAGCCCC GGGTGTTCCCGCCCGATTTTCTGGCAGTCTTCTGGG AGGAAAGGCCGCTCTGACAATATCTGGCGCACAGC CCGAAGACGAGGCCGAGTACTATTGCGTGTGTGG TATAGCGACCACTGGGTATTCTGGTGGAGGAACAAA GCTGACAGTGCTCGGCGGTGGAGGGAGTGGTGGCG	75	LV-EF1a- huGCN4- BBZ_L4,H3	DNA	30
				40

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 0】

GTGGCAGCGGAGGGGGCGGATCACAAGTGCAATTG CAGGAGAGTGGACCTGGACTCGTGAAACCATCTGA AACACTCTCCATTACTTGTACGGTTTCAGGGTTCCT GCTGACAGACTATGGAGTAAACTGGGTGAGGCAGC CACCCGGCAAGGGCTTGGAGTGGCTCGGCGTCATTT GGGGCGACGGAATCACCGACTATAACCCATCACTC AAATCTCGGTTGACCGTGTCCAAGGATACCAGTAA GAATCAGGTGAGCCTGAAAATGTCATCCCTGACAG CTGCGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGACAGGA CTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGCTGACA GTTAGCTCCaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgccca ccatcgcgctcgagcccctgtccctgcgcccagaggcgctcgccgagcgggggg gggcgagctgcacacgagggggctggactcgctgtgatatctacatctggcgcg ccttggccgggacttggggctctctctgtcactggttaccaccttactgcaaac ggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaact actcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaaggaggatg tgaactgagagtgaaattcagcagagcgagacgccccgcgtacaagcagggc cagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttg gacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaagggaagaa ccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctaca gtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttta ccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccctcacatgcaggccc tgccccctcgc				10
atggccttaccagtgaccgcttctcctgcgcgtggccttctgctccacgcgcga ggccgGACGCCGTTGTGACCCAGGAATCCGCTCTGAC CTCTTCTCCAGGCGAAACCGTGACTCTGACTTGCCG TAGTAGCACCGGGGCTGTGACCACATCTAACTATGC CAGTTGGGTCCAGGAAAAACCGGATCACCTGTTTA CTGGCCTGATTGGCGGCACCAACAATCGCGCACCG GGGTGCCCCGCTCGTTTCAGCGGTTCCCTGATTGGG GACAAGGCAGCACTGACTATCACCGGCGCCCAGAC CGAAGATGAGGCGATCTATTTTTCGCTCCTGTGGTA CAGCGACCATTGGGTGTTTCGGGGGAGGCACCAAAC TGACAGTGCTGGGCGGAGGAGGAGGTTTCAGGAGGA GGAGGTAGCGGGGGAGGCGGTTCCGGGGGAGGCG GTTCTGATGTGCAGCTGCAAGAATCCGGGCCAGGA	76	LV-EF1a- GCN4(52SR4)-BBZ_CD8 ヒンジ	DNA	30
				40

【表 3 - 2 1】

CTGGTTGCGCCTTCTCAGAGTCTGTCAATTACATGT ACTGTTAGTGGCTTTCTGCTGACCGACTATGGTGTG AACTGGGTTTCGTCAAGAGCCCAGGCAAGGGTCTGGA GTGGCTGGGAGTGATTTGGGGGGATGGAATCACAG ACTACAATAGCGCACTGAAATCTCGGCTGAGTGTTA CCAAAGATAACAGCAAGTCCCAGGTCTTCCTGAAG ATGAACAGCCTGCAAAGCGGCGACTCCGCTCGCTA TTACTGCGTTACCGGACTGTTTGATTATTGGGGGCA GGGGACAACCTCTGACTGTTTCCTCCaccacgacgccagegc cgcgaccaccaacacggcgcccaccatcgcgfcgagccctgtccctgcgcc agagcggtgccggccagcggcggggggcgagtcacacgagggggctggact tcgctgtgatatctacatctggcgcccttggccgggactgtggggtccttctctgt cactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaaactcctgtatatattcaaa caaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggagatggctgtagctgccgat ttcagaagaagaagaaggaggtgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgc agacgcccccggtacaagcaggggcagaaccagctctataacgagctcaatctag gacgaagagaggagtagatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatg gggggaaagccgagaaggagaacacctcagggaaggcctgtacaatgaactgcag aaagataagatggcgaggcctacagtgaattggatgaaaggcgagcgccgga ggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacgccaccaaggacac ctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc			
atggccttaccagtaccgacctgtcctcgtccgctggccttgtgtcaccgcccca ggccgGACGCCGTTGTGACCCAGGAATCCGCTCTGAC CTCTTCTCCAGGCGAAACCGTGACTCTGACTTGCCG TAGTAGCACCGGGGCTGTGACCACATCTAACTATGC CAGTTGGGTCCAGGAAAAACCGGATCACCTGTTTA CTGGCCTGATTGGCGGCACCAACAATCGCGCACCG GGTGTGCCCGCTCGTTTCAGCGGTTCCCTGATTGGG GACAAGGCAGCACTGACTATCACCGGCGCCAGAC CGAAGATGAGGCGATCTATTTTTCGCTCCTGTGGTA CAGCGACCATTGGGTGTTCCGGGGAGGCACCAAAC TGACAGTGCTGGGCGGAGGAGGAGGTTTCAGGAGGA GGAGGTAGCGGGGGAGGCGGTTCCGGGGGAGGCG GTTCTGATGTGCAGCTGCAAGAATCCGGGCCAGGA CTGGTTGCGCCTTCTCAGAGTCTGTCAATTACATGT ACTGTTAGTGGCTTTCTGCTGACCGACTATGGTGTG	77	LV-EF1a- GCN4(52SR4)-BBZ_ヒン ジなし	DNA

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 2】

AACTGGGTTCGTCAGAGCCCAGGCAAGGGTCTGGA GTGGCTGGGAGTGATTGGGGGGATGGAATCACAG ACTACAATAGCGCACTGAAATCTCGGCTGAGTGTTA CCAAAGATAACAGCAAGTCCCAGGTCTTCTGAAAG ATGAACAGCCTGCAAAGCGGCGACTCCGCTCGCTA TTACTGCGTTACCGGACTGTTTGATTATTGGGGGCA GGGGACAACCTCTGACTGTTTCTCTCCgatatctacatctgggcg cccttgccgggactgtggggctctctctctgactggttatccctttactgcaa cggggcagaaagaaactctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaa ctactcaagaggagatggctgtagctgccgattccagaagaagaaggagga tgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccggtacaagcagg gccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgttt ggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaagccgagaagggaaga accctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctac agtgaattgggatgaaaggcgagcgccgggggcaaggggcacgatggccttt accaggggtctcagtacgccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggcc ctgccccctcgc				10
DAVVTQESALTSSPGETVILTCRSSTGAVTTSNYASW VQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTITGAQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLG GGGGSGGGSGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQ SLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQSPGKGLEWLGVWIG DGITDYNALSALKSRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDS ARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSSTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	85	CAR- GCN4(CD8 ヒンジ)	アミノ 酸	20
DAVVTQESALTSSPGETVILTCRSSTGAVTTSNYASW VQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTITGAQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGGGTKLTVLG GGGGSGGGSGGGSGGGGSDVQLQESGPGLVAPSQ SLSITCTVSGFLLTDYGVNWVRQSPGKGLEWLGVWIG DGITDYNALSALKSRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDS	86	CAR- GCN4(IgG4 m ヒンジ)	アミノ 酸	30
				40

【表 3 - 2 3】

ARYYCVTGLFDYWGGTTLTVSSESKYGPPCPPCPDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR			
GGGGS	93	GGGGS リン カー	アミノ 酸
GGGS	94	GGGS リン カー	アミノ 酸
GGS	95	GGS リンカ ー	アミノ 酸
GS	96	GS リンカー	アミノ 酸
(X _m S) _n , n が、少なくとも 1、m が、少なくとも 1、X がアミノ酸である	97	XS リンカー	アミノ 酸
LVGEAAAKEAAAAKA	98	剛性スイッ チ融合/移植 リンカー3	アミノ 酸
AEEAAAKEAAAAKA	99	剛性スイッ チ融合/移植 リンカー4	アミノ 酸
EAAAKEAAAKEAAAAKA	100	剛性スイッ チ融合/移植 リンカー4a	アミノ 酸
EGKSSSGSGSESKST	101	柔軟性スイ ッチ融合/ リンカー プロフェテ イック	アミノ 酸
GSAGSAAGSGEF	102	剛性スイッ チ融合/リ ンカー5	アミノ 酸
APAPAPAPAPAPAP	103	プロピルス イッチ融合 /移植リン	アミノ 酸

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 4】

		カープロ フェイッ ク	
tcgagaagcttgccaccatgggtgtccctaccagctectgggactgctcctgctgtg gatcaccgaagccatctgcGACGCCGTTGTGACCCAGGAATC CGTCTGACCTCTTCTCCAGGCGAAACCGTGACTCT GACTTGCCGTAGTAGCACCGGGGCTGTGACCACAT CTAACTATGCCAGTTGGGTCCAGGAAAAACCGGAT CACCTGTTTACTGGCCTGATTGGCGGCACCAACAAT CGCGCACCGGGTGTGCCCCTCGTTTCAGCGGTTCC CTGATTGGGGACAAGGCAGCACTGACTATCACCGG CGCCAGACCGAAGATGAGGCGATCTATTTTTCGCT CCTGTGGTACAGCGACCATTGGGTGTTTCGGGGGAG GCACCAAAGTACAGTGCTGGGCGGAGGAGGAGGT TCAGGAGGAGGAGGTAGCGGGGAGGCGGTTCCGG GGGAGGCGGTTCTGATGTGCAGCTGCAAGAATCCG GGCCAGGACTGGTTGCGCCTTCTCAGAGTCTGTCAA TTACATGTACTGTTAGTGGCTTTCTGCTGACCGACT ATGGTGTGAACTGGGTTCTGTCAGAGCCCAGGCAAG GGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATTGGGGGGATGG AATCACAGACTACAATAGCGCACTGAAATCTCGGC TGAGTGTTACCAAAGATAACAGCAAGTCCCAGGTC TTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAAAGCGGCGACTC CGCTCGCTATTACTGCGTTACCGGACTGTTTGATTA TTGGGGGCAGGGGACAACTCTGACTGTTTCTCCate gagttcatgtacccccctcctacctggacaacgagagaagcaaggcaccatc cacatcaagaaaaagcacctgtgccacccagagcagcccaagctgttctgggc cctgggtggtggtggccgctgctgttctgttacggcctgctggtcacagtggcctg tgcgtgatctggaccaacagcagaagaacagaggcgccagagcactacatga acatgacccccagaaggccaggcctgaccagaagccctaccagccctacgcccc tgccagagacttcgcccctacagaccagagccaagtcagcagatccgccgaga cagccgccaacctgcaggatcccaaccagctgttcaacgagctgaacctgggcaga cgggagggaattcgacgtgctggaaaagaagagagccagggaccccgagatgggc ggcaagcagcagagaagaagaaccctcaggaaggcgtctacaacgccctgcag aaagacaagatggccgagccctacagcgagatcggcaccaaggcgagagaaga aggggcaaggccacgatggcctgttcagggcctgtccaccgccaccaaggaca	104	GCN4-CD28- CD3z(1-3)	DNA

10

20

30

40

50

cccttcgacgcacctgcacatgcagacctggccccccagatgagtcgacggfaccgcg ggccccgggataccgataaaaaaaagattttatgctccagaaaaaggggggaatg aaagaccccacctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcat ggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaagggttaggaacagagagac agcagaatatgggccaaacaggatatactgtgtgtaagcagttcctgccccggctcagg gccaaagaacagatgggtcccccagatgcgggtcccgcctcagcagtttctagagaacca tcagatgtttccaggggtgccccaaaggacctgaaaaatgacctgtgacctatttgaacta accaatcagttctctctctctctctgttctgctgcgcgttctgctccccagctcaataaaag agcccacaacccctcactcggcgcgccagtcctccgatagactgcgtcggccgggt acctgtgatccaataaaacctctttgcagttgcatecgcacttgttggtctcgctgttctt ggagggtctcctctgagtgattgactaccgctcagcgggggtcttctatgggtaacag ttcttgaagttggagaacaacattctgagggtaggagtcgaatattaagtaatcctgac tcaattagccactgttttgaatccacatactccaatactcctgaaatccatcgatggagtt cattatggacagcgcagaaaagagctgggggagaattgtgaaattgttatccgctcacaa ttccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaagag tgagctaactcacattaattgcgttgcgtcactgcccgctttccagtcgggaaacctgt cgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagagggcggttgcgtattg ggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgtcgtcgtcgttgcgtgcggcg agcgggtatcagctcactcaaggcgggtaatacggttatccacagaatcaggggataa cgcaggaaaaaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaacctgaaaaa ggccgcgttgcgtgcgtttttccataggtctcggccccctgacgagcatcacaaaaat cgacgtcgaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggtt tccccctggaaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgcccgttaccggatacc tgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggtgcgtttctcatagctcacgctgtaggtatct cagttcggtgtaggtcgttcgtcctcaagctgggctgtgtgcacgaaccccccggttcag cccgacctgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacg acttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtag gggggtctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagt atttggatctcgtcgtctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttgtgagctcttg atccggcaaaacaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagatta cgcgcaaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttttacgggggtctgacgct cagtggaacgaaaactcaggttaagggtatttgggtcatgagattatcaaaaaggatctt cacctagatccttttaaaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaa cttgggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatt tcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggt taccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccgggtccag		
--	--	--

40

【表 3 - 2 6】

atttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcgtca actttatccgccctccatccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcg ccagttaatagtttgcgaacgttgtgccattgctacagcctcgttgggtcacgctcg tctgttggatagcttccattcagctccggttcccaacgatcaaggcaggttacatgatcc cccatgttgtgcaaaaaagcgggttagctcttcggtcctccgacgttgcagaagtaa gttggccgcaggttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatg ccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatag tgtatggcggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatacgggataataccgcgcca catagcagaactttaaaagtgtctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaactctc aaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgaaccactcgtgcaccaactgat cttcagcatcttttactttaccagcgttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaat gccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaaattggaatactcactcttcttctt tcaatattattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtat ttgaaaaataaacaataagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccactgac gtctaagaacaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacaggcc ctttctgtctcgcggttctgggtgatgacgtgaaaacctctgacacatgcagctccgg agacgggtcacagcttctgttaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcaggg cgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcgggctggccttaactatgcggcatcagagc agattgtactgagagtcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggga gaaaataaccgcatcagcggccattcggcattcaggctgcgaactgttgggaaggc gatcgggtgcggcctcttctgtattacgccagctggcgaaaaggggatgtctgcaa ggcgattaagtgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgaataacgacggc cagtgccacgctctcccttatgcgactcctgcattagggaagcagccagtagtaggtt gagggcgttgagcaccgccgccgaaggaaatgggtgatgcaaggagatggcgccc aacagtcccccggccacgggctgccaccatacccacgccgaacaagcgtca tgagcccgaagtggcgagcccgatcttcccatcgggtgatgtcggcgatataggcgc cagcaaccgcacctgtggcggcggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagag gcgatttaagacaggatcatcagtggtccaggctctagtgttgaactcaacaatcacc agctgaagcctatagagtacgagccatagataaaataaaagattttattgtctccaga aaaaagggggaatgaaagaccccacctgtagggttggcaagctagcttaagtaacgc cattttgcaaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggtta ggaacagagagacagcagaatatgggccaacagatactgttgtaagcagttcct gccccgctcaggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgcctcagca gttcttagagaaccatcagatgtttccagggtgccccaaaggacctgaaaatgacctg tgccttattgaactaaccaatcagttcgttctcgttctgttcgcgcttctgtctccc gagctcaataaaagagcccacaacccctcactcggcgccagtcctccgatagact			
			10
			20
			30
			40

【表 3 - 27】

gcgtgcccggtaccgtattcccaataaagcctcttctgtttgcatccgaatcgtg gactcgtctgattccttggagggtctctcagattgattgactgccacctcgggggtct ttcatttggagggtccaccgagatttggagacccctgcctaggaccaccgaccccc cgccgggaggtaagctggccagcggctgttctgtctgtctgtctgtctgtctgtt gtgccggcatctaatgttgcgcctgcgtctgtactagttagctaactagctctgtatctg gcggacccgtggtggaactgacgagttcggaaacacccggccgcaacctgggaga cgtcccagggtctcggggcggttttggggcgacctgagtcacaaatcccgat cgtttggactcttgggtgcaccccccttagaggaggatgtggtctggtaggaga cgagaacctaaacagttcccgctccgtctgaattttcttgggttggaccgaag ccgcggcgctcttctgtctgcagcatcgttctgttctgtctgtctgtctgtctgtt ctgtatttctgagaatatggggcggtctgacctgttaccactcccttaagtgtgacct taggtcactgaaagatgtcagcggatcgtcacaaccagtcggtagatgtcaaga agagacgttgggttaccttctgtctgcagaatggccaaccttaacgtcggatggcc gcgagacggcacctttaaccgagacctcatcaccagggttaagatcaaggcttttca cctggcccgcatggacacccagaccagggtccctacatcgtgacctgggaagcctt ggctttgacccccctcctgggtcaagccctttagaccctaaagcctcgcctctct tctctcatcggcccgctctcctccttgaacctcctgttcgaccccgctcgaactc cctttatccagccctcactccttctctagggcgccccatagggcataatgagatcttat ggggcacccccgccccttgaacttccctgacctgacatgacaagattactaaca gccccctctccaagctcacttacaggctctctacttagtcagcacgaagctggaga cctctggcgagcctaccaagaacaactggaccgaccgggtggtacccaccttac cgagtcggcgacacagtggtgggtcccgacaccagactaagaacctagaacctcg ctggaaggaccttacacagtcctgtgaccacccccaccgacctcaagtagacg gcategcagcttggatcacgcgcgccacgtgaaggctgcccaccccggggtgg accatctctagactgc				10
AYHLENEVARLKKL	105	GCN4 エピ トープアラ ニン変異 1	アミノ 酸	20
AAHLENEVARLKKL	106	GCN4 エピ トープアラ ニン変異 2	アミノ 酸	30
AAALENEVARLKKL	107	GCN4 エピ トープアラ ニン変異 3	アミノ 酸	40

【表 3 - 2 8】

AAAAENEVARLKKL	108	GCN4 エピ トープアラ ニン変異 4	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKA	109	GCN4 エピ トープアラ ニン変異 5	アミノ 酸
NYHLENEVARLKAA	110	GCN4 エピ トープアラ ニン変異 6	アミノ 酸
NYHLENEVARLAAA	111	GCN4 エピ トープアラ ニン変異 7	アミノ 酸
NYHLENEVARAAAA	112	GCN4 エピ トープアラ ニン変異 8	アミノ 酸
LLPKNYHLENEVARLKKL	113	GCN4 エピ トープ延長 1	アミノ 酸
DLPQKYHLENEVARLKKL	114	GCN4 エピ トープ延長 2	アミノ 酸
LVGEAAAKEAAKA	116	重鎖リンカ ーHCNT3	アミノ 酸
AEEAAKEAAKA	117	重鎖リンカ ーHCNT4	アミノ 酸
ggcggggcggaagt	118	NT1 Flex	
GGTGGGGGAGGGAGCGGTGGAGGTGGTTCT	119	NT2 Flex2	
AEEAAKEAAKA	120	NT4 剛性	アミノ 酸
GCGGAAGCAGCCGCCAAAGAGGCTGCCGCGAAAGC G	121	NT4 剛性	
GSAGSAAGSGEF	122	NT5:柔軟性	アミノ 酸
GGTCCGCCGGTTCCGCAGCCGGCTCCGGAGAGTTC	123	NT5:柔軟性	
KESGSVSSEQLAQFRSLD	124	NT7:scFv か らの柔軟性	アミノ 酸

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 9】

AAGGAATCCGGGAGCGTGTCTTCCGAACAGCTGGC TCAGTTCCGCAGCCTGGAT	125	NT7:scFv か らの柔軟性	
EGKSSGSGSESKST	126	NT8:scFv か らの柔軟性	アミノ 酸
GAGGGGAAGTCCTCCGGCTCTGGGTCCGAGTCCAA GTCCACA	127	NT8:scFv か らの柔軟性	
APAPAPAPAPAPAP	128	NT9:プロリ ル	
GCTCCCGCCCCCTGCCCCAGCTCCTGCCCCCGCACCC GCACCC	129	NT9:プロリ ル	
GG	130	NT10:短	アミノ 酸
ggcggg	131	NT10:短	
GSTSGSGKPGSGEGSTKG	132	ひょう疽ペ プチドリン カー(scFv)	アミノ 酸
GSTSGSGKPGSGEGSTKG	133	FMC63 CAR 内の銅 LJN(2003)	アミノ 酸
ASTKGPSVFPLAP	134	LL-Heavy	アミノ 酸
TVAAPSVFIFPP	135	LL-Light	アミノ 酸
ASTKGP	136	SS-Heavy	アミノ 酸
TVAAP	137	SS-Light	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKL	138	LCNT1 内の GCN4	アミノ 酸
LLPKNYHLENEVARLKKL	139	LCNT1-A 内 の GCN4	アミノ 酸
DLPKQYHLENEVARLKKL	140	LCNT1-B 内 の GCN4	アミノ 酸
LLPKNYHLENEVARLK	141	LCNT1-C 内 の GCN4	アミノ 酸

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 0】

LPKNYHLENEVARLK	142	LCNT1-D 内 の GCN4	アミノ 酸
PKNYHLENEVARLK	143	LCNT1-E 内 の GCN4	アミノ 酸
KNYHLENEVARLK	144	LCNT1-F 内 の GCN4	アミノ 酸
NYHLENEVARLK	145	LCNT1-G 内 の GCN4	アミノ 酸
NYHLENEVARLKA	146	LCNT1-H 内 の GCN4	アミノ 酸
LLPKNYHLENEVARLKAL	147	LCNT1-I 内 の GCN4	アミノ 酸
KNYHLENEVARLKAL	148	LCNT1-J 内 の GCN4	アミノ 酸
NYHLENEVARLKAL	149	LCNT1-K 内 の GCN4	アミノ 酸
NYHLENEVARLKGL	150	LCNT1-L 内 の GCN4	アミノ 酸
NYHLENEVARLKAA	151	LCNT1-M 内 の GCN4	アミノ 酸
KNYHLENEVARLKGL	152	LCNT1-N 内 の GCN4	アミノ 酸
KNYHLENEVARLKAA	153	LCNT1-O 内 の GCN4	アミノ 酸
KNYHLENEVARLKKL	154	GCN4 バリ アント	アミノ 酸
KNYHLENEVARLKAL	155	GCN4 バリ アント	アミノ 酸
KNYHLENEVARLKGL	156	GCN4 バリ アント	アミノ 酸
KNYHLENEVARLKAA	157	GCN4 バリ アント	アミノ 酸
KNYHLENEVARLKGG	158	GCN4 バリ アント	アミノ 酸
NYHLENEVARLKKL	159	GCN4 バリ アント	アミノ 酸

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 1】

NYHLENEVARLKAL	160	GCN4 バリ アント	アミノ 酸
NYHLENEVARLKGL	161	GCN4 バリ アント	アミノ 酸
NYHLENEVARLKAA	162	GCN4 バリ アント	アミノ 酸
NYHLENEVARLKGG	163	GCN4 バリ アント	アミノ 酸
EAAAKEAAAKEAAKA	164	剛性リンカ ー	アミノ 酸
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD	165	CD8 ヒンジ	アミノ 酸
D	166		アミノ 酸
ESKYGPPCPSCP	167	IgG4 ヒンジ	アミノ 酸
ESKYGPPCPPCP	168	IgG4m ヒン ジ	アミノ 酸
X1NYHLENEVARLKX2X3	269	構造 I	アミノ 酸
IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP	421	CD28 ヒンジ	アミノ 酸

10

20

【実施例】

【0460】

30

実施例 1

ヒト化された CAR - EC スイッチの設計

背景：

抗 CD19 マウスクローン FMC63 を、スイッチ可能な CAR - EC プログラムのためのスイッチとしての選考研究のコンセプトの証拠として使用した。FMC63 クローンは元々、1991 by H. Zola and coworkers (1) に記載され、Carl June and coworkers (2 - 4) からの最も良く研究された従来の CAR - T 細胞で使用される。ヒトへの適用で免疫原性に対する潜在性を減少させるため、FMC63 抗体のマウスフレームワーク領域を、部分的にヒト配列と入れ替えた。

【0461】

40

一般プロセス：

手短に、ヒト化プロセスを以下のように実行した。可変軽鎖 (VL) および可変重鎖 (VH) ドメインに対するマウス FMC63 配列を、ワールドワイドウェブアドレス：ncbi.nlm.nih.gov/igblast/ (参照によりその全体が本明細書に組込まれる) の NCBI ウェブサイトで利用可能な IgBLAST プログラムに提出した (また Ye, et al., Nucleic Acids Res. 2013 Jul; 41 (Web Server issue) も参照されたい (参照によりその全体が本明細書に組込まれる))。それぞれのマウス配列を、マウス生殖系列配列と比較し、次いでヒト生殖系列配列と比較した。

【0462】

50

重鎖分析

マウス F M C 6 3 V H を、ヒト生殖系列 I G H V 4 - 5 9 ヒトと整列させた (表 4) 。無料決定領域 (C D R) は一般に、A b M からの A b Y s i s (ワールドワイドウェブアドレス bioinf.org.uk/abs/) で利用可能、参照によりその全体が本明細書に組込まれる) を使用して定義され、A b M 番号付けは、このレポートで使用されるであろう。マウス F M C V H とヒト I G H V 4 - 5 9 との間の多数のフレームワーク差異において、V H ドメインおよびその C D R の立体構造に影響し得る 9 個を特定し、潜在性影響を調査することを決定した。

【 0 4 6 3 】

設計 h F M C H 2 (表 4) は、7 個の変更 - - 2 0 、 4 8 、 6 7 、 7 1 、 7 8 、 8 2 、および 8 2 c の位置のマウス残基と共に、完全なヒト I G H V 4 - 5 9 (「h 4 - 5 9 _ 0 1」) フレームワークを有する。

10

【 0 4 6 4 】

設計 h F M C H 3 (表 4) は、h F M C H 2 の全ての変更に加えて、マウス A s n 7 3 に変更された T h r 7 3 を有する。

【 0 4 6 5 】

位置 9 4 での追加の変更もまた、調査した。設計 h F M C H 4 a は、h F M C H 2 に含まれる全ての変化に加えて位置 9 4 変更を有し、設計 h F M C H 4 b は、h F M C H 3 に含まれる全ての変更に加えて位置 9 4 変更を有する。

【 0 4 6 6 】

20

加えて、N 末端残基を、p y r o G l n 形成を除去するため、様々なコンストラクトでの G l n の代わりに、G l u に変異させた。様々な例示的なコンストラクトの重鎖配列の整列は、図 1 A および図 1 B に提供される。

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4：重鎖配列（また、図 1 A および図 1 B も参照されたい）

配列 番号 ナン バー	名前	配列
1	h4-59_01	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGL EWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCAR
2	hFMCH1	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWIGVIWGSETTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS
3	hFMCH2	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKMSSLTAADT AVYYCARHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS
4	hFMCH3	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKNQVSLKMSSLTAAD TAVYYCARHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS
5	hFMCH4a	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKMSSLTAADT AVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS
6	hFMCH4b	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKNQVSLKMSSLTAAD TAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS
7	hFMCH4c	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKNQVSLKMSSLTAAD TAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS
8	hFMCH4z	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKNQVSLKMSSLTAAD TAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS
9	hFMCH4b-x	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWIGVIWGSETTYYNPSLKSRTISKDNSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS
10	hFMCH4c-x	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWIGVIWGSETTYYNPSLKSRTISKDNSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

配列 番号 ナン バー	名前	配列
11	hFMCH4c- 20L-E	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTISKDNSKNQVSLKMSSLTAAD TAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
12	hFMCH4b-E	EVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKNQVSLKMSSLTAAD TAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
13	hFMCH4c-E	EVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTISKDNSKNQVSLKMSSLTAAD TAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
14	hFMCH4b- 20L-E	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGL EWLGVIWGSETTYYNPSLKSRLTISKDNSKNQVSLKMSSLTAAD TAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
15	mFMC63H	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDD TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS

10

20

【 0 4 6 7 】

軽鎖分析

マウス F M C V L を、ヒト生殖系列 I G K V 1 - 3 9 と整列させた (表 5)。使用される C D R の定義は、A b M (ワールドワイドウェブアドレス bioinf.org.uk/abs/) で利用可能 (参照によりその全体が本明細書に組込まれる)) からのものである。マウス F M C V L とヒト I G K V 1 - 3 9 との間の差異の多数のフレームワークでは、位置 7 1 のみ、V L ドメインおよびその C D R の立体構造に影響する可能性があるであろう。

30

【 0 4 6 8 】

設計 h F M C L 2 は、P h e 7 1 T y r 変更を含む。

【 0 4 6 9 】

F M C C D R - L 3 は、脱アミノに対して低傾向を有する A s n 残基 (A s n 9 2) を有し、したがってこの残基は、アラニンに変更され得る。軽鎖配列の整列は、図 2 A および図 2 B に提供される。

40

50

【表 5】

表 5：軽鎖配列（また、図 2 A および図 2 B も参照されたい）

配列 番号 ナン バー	名前	配列
16	IGKV1-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYSTPP
17	hFMCL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISKYLNWYQQKPGKAP KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGNTLPYTFGQGTKLEIK
18	hFMCL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISKYLNWYQQKPGKAP KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQ QGATLPYTFGQGTKLEIK
19	hFMCL2a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISKYLNWYQQKPGKA VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQGATLPYTFGQGTKLEIK
20	hFMCL2b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISKYLNWYQQKPGKA VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC QQGATLPYTFGQGTKLEIK
21	hFMCL2b-1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISKYLNWYQQKPGKAP KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQ QGATLPYTFGQGTKLEIK
22	hFMCL2b(V44 L)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISKYLNWYQQKPGKAL KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQ QGATLPYTFGQGTKLEIK
23	hFMCL2b(A92 N)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISKYLNWYQQKPGKA VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTLPYTFGQGTKLEIK
24	hFMCL2c	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISKYLNWYQQKPGKA VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC QQGATLPYTFGQGTKLEIK
25	mFMC63L	DIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTV KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ QGNTLPYTFGGGTKLEIK

【 0 4 7 0 】

スイッチ産生

上記のヒト化された「FMC63 VH」および/または「FMC63 VL」配列を含む CAR-EC スwitch を、GCN4 ペプチドを、Rodgers DT, et al., PNAS, 2016; 113(4): E459-68. doi: 10.1073/pnas.1524155113. PubMed PMID: 26759369; PMCID: PMC4743815 (参照によりその全体が本明細書に組込まれる)に記載される GGGGS リンカーと接続された軽鎖 (LCNT) の N 末端に遺伝子的に融合することで産生した。これらの非限定的な例では、配列 NYHLENEVARLKKL (配列番号 2

6)を含むGCN4ペプチドを使用した。したがって、LCNTコンストラクトは、以下の構造：NYHLENEVARLKKL-[GGGGS]-[FMC63 VL配列またはそのヒト化されたバリエーション]を含んだ。

【0471】

(5)、スイッチを、1つの重鎖および1つの軽鎖（例えば、FMC63 VLまたはGCN4ペプチド融合LCNTバリエーション）と共に発現させ、および実施例2に記載される通り均一に精製した。

【0472】

表6は、ヒト化されたCAR-ECスイッチバリエーションの21個の非限定的な例を示す。これらのスイッチを製造するために使用される重鎖/軽鎖の組み合わせは、表6の列に示される。例えば、組み合わせ2として以下に標識されたCAR-ECスイッチは、FMC63ヒト化された可変重鎖H2（すなわち、図1Aおよび図1Bに示されるhFMCH2）およびヒト化された可変軽鎖L2（すなわち、図2Aおよび図2Bに示されるhFMC L2）を含んだ。上記の通り、この実施例で例示されるCAR-ECスイッチに含まれる軽鎖の全ては、GGGGSリンカーによって連結されるそれらのN-末端にGCN4ペプチド融合をさらに含む。そのため、組み合わせ2は、一般の構造（N-末端からC-末端まで、または省略して「N~C」）NYHLENEVARLKKL-[GGGGS]-[hFMC L2]を有するhFMCH2およびタグ付けされた軽鎖を含み、組み合わせ3は、一般の構造N~CのNYHLENEVARLKKL-[GGGGS]-[hFMC L2]を有するhFMCH3およびタグされた軽鎖を含み、組み合わせ7は、一般の構造NYHLENEVARLKKL-[GGGGS]-[hFMC L2b]を有するhFMCH4bおよびタグされた軽鎖を含み、以下同様であった。これらの軽鎖N末端（LCNT）スイッチ配列は、表7の以下に列挙される。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6：ヒト化された FMC 6 3 バリエーション

HC/LC 組み合わせ	ラウンド 1	重鎖	軽鎖	記述
1	ヒト	H1(N/A)	L1(N/A)	完全なヒトフレームワーク s (発現されず)
2		H2	L2	
3		H3	L2	
4		H4a	L2	
5		H4b	L2	
6	ラウンド 2	H4b	L2a	
7		H4b	L2b	
8		H4b	L2c	
9		H4c	L2a	
10		H4c	L2b	
22		H4c	L2c	
11		H4z	L2	
12		H4c-E	L2b	N-末端の重鎖上の G l n - G l u 変異
13		H4c-K	L2b	K 鎖リーダー配列
14	ラウンド 3	H4c-E	L2b	
15		H4b-E	L2b	
16		H4b-x-E	L2b	
17		H4c-x-E	L2b	
18		H4b-20L-E	L2b	
19		H4c-20L-E	L2b	
20		H4c-E	L2b-44L	
21		H4c-E	L2b-A92N	

表では、「E」は、N末端グルタミンが、グルタミンに変異し、ピログルタミン酸N末端残基の形成を回避したことを記述する。

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 7 : L C N T 軽鎖配列

配列 番号 ナン バー	NAME	配列
27	hFMCL1-LCNT	NYHLENEVARLKKLGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPYTFGQGGTKLEI K
28	hFMCL2-LCNT	NYHLENEVARLKKLGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGATLPYTFGQGGTKLE IK
29	hFMCL2a-LCNT	NYHLENEVARLKKLGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CRASQDISKYLNWYQQKPGKAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGATLPYTFGQGGTKLE IK
30	hFMCL2b-LCNT	NYHLENEVARLKKLGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CRASQDISKYLNWYQQKPGKAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGATLPYTFGQGGTKLEI K
31	hFMCL2b-1-LCNT	NYHLENEVARLKKLGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGATLPYTFGQGGTKLEI K
32	hFMCL2b(V44L)- LCNT	NYHLENEVARLKKLGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CRASQDISKYLNWYQQKPGKALKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGATLPYTFGQGGTKLEI K
33	hFMCL2b(A92N)- LCNT	NYHLENEVARLKKLGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CRASQDISKYLNWYQQKPGKAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPYTFGQGGTKLEI K

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

配列 番号 ナン バー	NAME	配列
34	hFMCL2c-LCNT	NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQDISKYLNWYQQKPGKAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGATLPYTFGGQGTKLEI K
35	mFMC63-LCNT	NYHLENEVARLKKLGGGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVITIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGGTKLEI K

10

【 0 4 7 3 】

実施例 2

ヒト化された C A R - E C スイッチの発現および精製

手短に、ヒト化された C A R - E C スイッチを発現および精製するために、表 6 に示される模式図に従って、表 4 に記載される 1 つの重鎖バリエーションを、表 5 に記載される 1 つの軽鎖バリエーションと対を形成させ、軽鎖は、表 7 に示される通り L C N T 形式で G G G G S リンカーを介して連結された G C N 4 ペプチドを含み、かつ以下のタンパク質発現方法に従って、得られたスイッチを発現および精製した。

20

【 0 4 7 4 】

E x p i 2 9 3 F 細胞 (3 0 m l の培養容積) 内のタンパク質発現

E x p i 2 9 3 F 細胞 (マサチューセッツ州、ウォルサム、T h e r m o F i s h e r 、カタログ番号 A 1 4 5 2 7) のトランスフェクションを、E x p i F e c t アミン 2 9 3 トランスフェクションキット (マサチューセッツ州、ウォルサム、T h e r m o F i s h e r 、カタログ番号 A 1 4 5 2 4) と共に提供される、製造者のプロトコルの修飾されたバージョンを使用して実行した。

30

【 0 4 7 5 】

手短に、トランスフェクションの 2 4 時間前に、E x p i 2 9 3 F 細胞 (マサチューセッツ州、ウォルサム、T h e r m o F i s h e r 、カタログ番号 A 1 4 5 2 7) を、予め温められた E x p i 2 9 3 発現培地 (マサチューセッツ州、ウォルサム、T h e r m o F i s h e r 、カタログ番号 A 1 4 3 5 1 0 1) 内で 1.5×10^6 細胞 / m l で播種した。トランスフェクションの日に、細胞を数え、生存率について調べ、次いで予め温められた E x p i 2 9 3 発現培地内で、 2.9×10^6 細胞 / m l と等しい最終的な密度まで希釈した。フラスコを、最小 1 時間で、 $37^\circ\text{C} / 5\%$ の C O 2 インキュベーターでオービタルシェーカーに戻した。

40

【 0 4 7 6 】

C A R - E C スイッチタンパク質をコードする D N A を用いたトランスフェクションを、1 : 1 の重鎖対軽鎖比 (それぞれの鎖に対して $15 \mu\text{g}$ の D N A) で実施した。D N A を、O p t i M E M I 減少血清培地内で、1 . 5 m l の最終容積に希釈した。8 0 μl の E x p i F e c t a m i n e を、1 . 5 m l の O p t i M E M I 減少血清培地内で希釈し、かつ 5 分間室内温度でインキュベートした。E x p i F e c t a m i n e / O p t i M E M I 混合物を、D N A を含有する管に添加し、次いでピペットで穏やかに混合し、2 0 分間室内温度でインキュベートした。E x p i 2 9 3 F 細胞を、 $37^\circ\text{C} / 5\%$ の C O 2 インキュベーターから除去し、3 m l の D N A / E x p i F e c t a m i n e 混合物を、細胞に添加し、オービタルシェーカー上で、約 1 2 0 r p m、 $37^\circ\text{C} / 5\%$ の C

50

O2インキュベーターでインキュベートした。トランスフェクションの16～18時間後、150μlの促進剤1および1.5mlの促進剤2(Expifectamine293トランスフェクションキットに提供される)をそれぞれのウェルに添加した。最終容積は、およそ30mlであった。最終的に、トランスフェクションの72時間後、細胞を回収し、以下に記載されるプロトコルに従ってスイッチを精製した。

【0477】

タンパク質G精製(0.6mlの定着ベッド容積)

トランスフェクションの72時間後、CAR-ECスイッチを含有する30mlの細胞培養を回収し、細胞/培地を50mlのコニカル管に移動させ、5分間、400×g(約1,000rpm)で回転させ、無菌濾過し、20×タンパク質G結合緩衝剤(1Mのナトリウムアセテート)pH5.2の1/40thの容積(0.75ml)と混合させ、タンパク質Gセファロースへの最適な結合のために粗CAR-ECスイッチ溶液のpHを低下させた。

【0478】

Protein G Fast Flow Sepharose(GE Healthcare、プロダクトコード17-0618-01)の50%のスラリーを、1個のタンパク質G結合緩衝剤で調製し、1.2mlの50%のスラリーを、12ml Poly Prep クロマトグラフィーカラムに添加し、次いで6mlの1個のタンパク質G結合緩衝剤で洗浄した。発現されたCAR-ECスイッチタンパク質を含有する上清を、カラム上に通し、50mlのコニカル管内でフロースルーを収集した。カラムを、12ml(20CV)の1個のタンパク質G結合緩衝剤で洗浄し、次いでCAR-ECスイッチタンパク質を、1.8ml、100mMのグリシンpH2.8内で溶出し、次いで0.2ml、1MのTris-HCl pH8を、溶出物に添加し、pHを中性化した。

【0479】

溶出に続いて、1個のPBS pH7.4を、溶出物断片に添加し、2.5mlと等しい最終容積を生み出した。緩衝剤を、以下の通りにPD10脱塩カラムを使用して、1個のPBS pH7.4に交換した。PD10カラムを、25mlの1個のPBS pH7.4で平衡した。2.5mlの精製されるタンパク質溶液を、PD10カラムに添加した。タンパク質を、3.5mlの1個のPBS pH7.4内でPD10脱塩カラムから溶出し、タンパク質断片を、4ml、10Kのカットオフアミコンスピン濃縮器でおよそ0.200mlに濃縮した。

【0480】

タンパク質濃縮を、NanoDrop(マサチューセッツ州、ウォルサム、Thermo Scientific)で、製造者のプロトコルに従って測定し、次いで2μgのタンパク質を、4～12%のBis-Trisグラジエントゲル上でSDS-PAGEによって可視化した。図3および図4は、それぞれのレーンでロードされ、2つの状態(非還元(左側)および10mMのDTTの付加によって還元された(right side))で分析された2μgタンパク質を有するゲルの写真を示す。

【0481】

ヒト化されたCAR-ECスイッチバリエーションの全ては、良く発現された。

【0482】

実施例3

CAR-ECスイッチ結合効率の決定

ヒト化されたバリエーションの相対結合効率を決定するために、フローサイトメトリー系結合を、以下の通りに実行した。

【0483】

CAR-ECスイッチ結合効率のフローサイトメトリー分析のための細胞の調製

CD19+RS4;11細胞(ATCC(登録商標)CRL-1873(商標))を、回収し、300×g、5分間、4°Cで遠心分離し、次いで細胞を、氷冷FAC緩衝剤(PBS、5%子牛血清、1mMのEDTA)で、 5×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁し

10

20

30

40

50

た。100 μ Lの細胞懸濁液を、96 - ウェルプレートの1つのウェルにつき分注し、次いで細胞を以下の洗浄方法を使用して洗浄した。a) 200 μ LのFACS緩衝剤を、プレートのそれぞれウェルに添加し、b) プレートを、300 $\times$ g、5分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心分離し、c) 上清を、シンクへのフリックモーションによってプレートから除去し、d) 細胞ペレットを、プレートの穏やかなボルテックスにて緩め、かつe) 細胞ペレットを、緩衝剤の好適な容積で再懸濁した（以下に記載される通り）。

【0484】

初期CAR - ECスイッチ結合のために、洗浄方法工程e)からの細胞ペレットをそれぞれ、FACS緩衝剤で希釈された50 μ Lの一次「試験」CAR - ECスイッチタンパク質で再懸濁した。CAR - ECスイッチ濃度の範囲を、結合を試験するために使用し、例えば $10^{-1} \sim 10^3$ pMのCAR - ECスイッチの範囲である。

10

【0485】

細胞をCAR - ECスイッチを用いて、4 $^{\circ}$ C、暗所で、30分間インキュベートし、次いで細胞を3回、上記の洗浄方法を使用して洗浄した。洗浄方法工程e)からのそれぞれの細胞ペレットを、FACS緩衝剤（検知抗体は、PE共役されたヤギ抗ヒトK: Southern Biotech, cat. # 2060 - 09である）内で1/100で希釈された50 μ Lの検知抗体を用いて再懸濁した。細胞を、4 $^{\circ}$ C、暗所で、30分間インキュベートし、3回、上記の洗浄方法を使用して洗浄し、次いで洗浄方法工程e)からの細胞ペレットを、100 μ LのFACS緩衝剤で再懸濁した。

【0486】

20

データを、U底96ウェルプレート、3青1赤のレーザー設定で構成されたフローサイトメトリー上で得た。ゲートを確立し、目的の細胞集団を同定し、単一の細胞およびPE陽性細胞、および30,000の事象を得た。

【0487】

データ分析

フローサイトメトリーデータを、FlowJo Software V10（オレゴン州、アッシュランド、FlowJo, LLC）を使用して分析した。手短に、PEシグナルの平均蛍光強度（MFI）を全ての事象で得たが、しかしPE陽性細胞上でゲートしなかった。XY表を、GraphPad Prism（カリフォルニア州、ラホヤ、GraphPad Software, Inc.）で作成し、およびデータを入力し、PE MFI対CAR - ECスイッチ濃度をプロットした。データを $X = \log$ 関数を使用して形質転換し、次いで「 $\log$ （アゴニスト）対応答（3つのパラメータ）」関数を使用して当てはめた。図5、図6、図7、図8、および図9は、データが、様々な試験されたCAR - ECスイッチをプロットすることを示すEC₅₀値は、プロットの隣に示される。

30

【0488】

実施例4

標的細胞細胞毒性を誘発するためのCAR - ECスイッチ効率の決定

スイッチ可能なCAR - T細胞プラットフォームに対するスイッチとしてのヒト化されたFMC63バリエーションの有効性を決定するために、バリエーションを、上記の実施例1に記載される通りにGGGGSリンカーと接続された軽鎖のN末端（LCNT）上のGCN4ペプチドを用いて発現させ、1つの重鎖および1つの軽鎖LCNTバリエーションを用いてスイッチを発現かつ精製し、上記の実施例1および2に記載される通りに均一に精製した。

40

【0489】

sCAR - T細胞を、Rodgers DT（2016）（上記）に以前に記載される通りにコンストラクト化した。コンストラクトは手短に、抗GCN4 scFv - IgG4mヒンジ - CD8膜貫通ドメイン - CD137（aka 4 - 1BB）共刺激ドメイン - CD3 ζ 活性ドメインとして記載される。

【0490】

細胞毒性アッセイ方法

細胞毒性アッセイを以下の通りに実行した。1日目に、冷たいRPMI - 5内のスイッ

50

チの6点段階希釈を、可膨張性底の96ウェルプレート内で、それぞれのスイッチに対して1カラムを使用して調整した。任意に、スイッチプレートを、4℃で、1週間、またはドライアイス上での急速冷凍で保存し、-80℃の長期で保存した。試料を、2通りまたは3通りで実行した。加えて、以下の制御が、含まれた。

i . 最大死滅 - アッセイの終了前45分で溶解し、最大LDHレベル / 100%細胞毒性のための値を提供する標的細胞のみ。最大死滅はまた、「最大LDH値」としても称される。

ii . 自発性死滅 - 背景標的細胞溶解として作用する標的細胞のみ。

iii . エフェクター細胞のみ - この制御は、アッセイが失敗した際の診断での使用のためのエフェクター細胞の背景LDHシグナルを示す。

iv . エフェクターおよび標的細胞のみ - 共培養細胞の結果の背景細胞毒性を決定するためのスイッチ制御はない。

v . 培地のみ - アッセイが失敗した際の診断の使用、かつ従来のCAR-T細胞の細胞毒性を計算するための培地のための制御。

【0491】

細胞を、300×gで、5分間室内温度で遠心分離し、および予め温められたRPMI-5培地内で、 2×10^6 / mLの濃度で、CARエフェクター細胞に対して、かつ 2×10^5 / mLで標的細胞に対して播種した。標的およびCARエフェクター細胞は、>95%生存率を有し、背景を減少した。基準アッセイのために、100,000個のエフェクター細胞(E)および10,000個の標的細胞(T)を使用し、10:1のE:Tの比を得た。アッセイは、それぞれのウェルにおいて50μLのエフェクター細胞および50μLの標的細胞を使用し、次いでウェルを培地を用いて最高レベルにし、全てのウェル内で等しい容積になることを確実にした。最終的に、2μLのCAR-ECスイッチ溶液を、同等のウェルに添加し、次いでプレートを20~24時間インキュベートした。

【0492】

LDHアッセイ方法：2日目、LDHアッセイの実行：

LDHアッセイをCytotoxic 96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Prω、G1780）を使用して、製造者のプロトコルに従って実行した。このアッセイにおいて以下に列挙される全ての緩衝剤および試薬は、このCytotoxic 96（登録商標）キットの構成要素である。手短に、2日目、アッセイの終了45分前、10μLの10個の溶解緩衝剤を「最大死滅」制御ウェルに添加し、細胞を、複数のピペット動作で手動で溶解した。

【0493】

LDHマスター混合物を、37℃の水浴で解凍した12mLのアッセイ緩衝剤を、1つのバイアルのLDHアッセイ作業試薬に添加することで調整した。溶解緩衝剤を用いた最大死滅制御ウェルの45分のインキュベーション後、プレートを400×gで、5分間遠心分離し、30μLの上清を新しい96ウェルプレート（平底）の同一のウェルに移動した。30μLのLDH作業試薬を、それぞれのウェルに添加し、30分間、室内温度、暗所でインキュベートした。次いで、30μLのStop Solutionを、それぞれのウェルに添加し、吸収をOD495で読み取り、かつデータを.txtまたは.xlsxファイルでエクスポートした。

【0494】

LDHアッセイデータ分析：

未加工のデータを、Microsoft Excelに移動し、アッセイのための100%の細胞毒性値を、以下の式を用いて計算した。OD最大死滅 - OD自発性死滅

【0495】

「エフェクターおよび標的細胞のみ」の値（すなわち、OD495読み取り値）を、全ての試料値から差し引いた。

【0496】

%細胞毒性を、以下の式を使用して計算した。

10

20

30

40

50

100 × (試料OD495 / 最大LDH値)

【0497】

値を、GraphPad Prism内にプロットした。データを、 $X = \log$ 関数を使用して形質転換し、EC₅₀値を「log (アゴニスト) アゴニスト対応答 (3つのパラメータ)」当てはめ関数を使用して計算した。

【0498】

LDH細胞毒性アッセイ結果：

LDH細胞毒性アッセイ結果が、図10～11に示される。特異的に、図10は、CD19陽性である、RS4；11細胞に対するsCAR-EC細胞（例えば、sCAR-T細胞）のLDH細胞毒性を示し、図11は、CD19-陰性である、K562細胞に対するsCAR-EC細胞（例えば、sCAR-T細胞）のLDH細胞毒性を示す。両方の場合において、sCAR-EC細胞（例えば、sCAR-T細胞）は、スイッチ可能なCARの発現に対して80%陽性であり、細胞は、説明文に列举される様々なヒト化されたCAR-ECスイッチバリエーションのうちの1つを用いて治療された。

【0499】

CD19陽性RS4；11細胞細胞毒性の強い用量依存性誘発を、sCAR/ヒト化されたスイッチ組み合わせ（図10、表8）を用いた治療により観察した。表8は、4回のアッセイにわたって調製される様々なヒト化されたスイッチを用いたLDH細胞毒性アッセイに対するEC₅₀値を示す。アッセイは、DTR-5-15（図10に示される）、DTR-5-16、DTR-5-50、DTR-5-51で番号付けされる。細胞が、PBMCで標識されたアッセイは、選別されていないPBMCの形質導入から誘導されるスイッチ可能なCAR-T細胞であり、かつ細胞が、CD4：CD8で標識されたアッセイは、選別されたCD4およびCD8 T細胞から誘導されるスイッチ可能なCAR-T細胞であり、細胞毒性アッセイ内で同等の比で伝達および使用される。muFMC63 L CNTは、マウスFMC63系スイッチを示す。

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8：ヒト化されたスイッチ（4 反復アッセイ）での細胞毒性アッセイに対する EC₅₀ 値

スイッチ	EC ₅₀ (pM)				
	DTR-5-15	DTR-5-16	DTR-5-50	DTR-5-51	平均
hFMCL2c-LCNT/hFMCH4c	4.57	4.61	3.78	5.45	4.60
muFMC63 LCNT(バッチ P00958)		6.81	2.77	5.31	4.96
hFMCL2c-LCNT/hFMCH4b	4.04	3.25	3.78	9.65	5.18
hFMCL2b-LCNT/hFMCH4b	5.17	5.78	3.93	9.96	6.21
hFMCL2a-LCNT/hFMCH4b	10.41	6.03	5.29	5.45	6.80
hFMCL2b(V44L)-LCNT/hFMCH4c(Q1E)	2.04	8.45	7.01	12.32	7.45
hFMCL2a-LCNT/hFMCH4c	4.43	9.32	7.05	17.19	9.50
hFMCL2b-LCNT/hFMCH4c(Q1E)	7.10	9.41	8.25	13.28	9.51
hFMCL2b(A92N)-LCNT/hFMCH4c(Q1E)	8.73	9.19	6.55	15.21	9.92
hFMCL2b-LCNT/hFMCH4b(Q1E-V20L)	9.63	13.12	7.48	9.60	9.96
hFMCL2b-LCNT/hFMCH4c	8.41	8.47	7.54	16.54	10.24
hFMCL2b-LCNT/hFMCH4b(Q1E)	7.15	10.54	6.97	20.72	11.34
muFMC63 LCNT(バッチ 2)	11.75	14.65	6.36	17.28	12.51
hFMCL2b-LCNT/hFMCH4c(Q1E-V20L)	7.52	15.28	14.42	14.83	13.01
hFMCL2-LCNT/hFMCH4b	21.44	7.43	18.73	14.64	15.56
hFMCL2-LCNT/hFMCH4c	16.62	15.97	9.20	30.08	17.97
hFMCL2-LCNT/hFMCH4a	43.20	50.73	28.27	40.68	40.72
hFMCL2b-LCNT/hFMCH4c-x(Q1E)	28.34	81.83	15.14	51.48	44.20
hFMCL2b-LCNT/hFMCH4b-x(Q1E)	29.60	77.64	43.84	63.94	53.76
hFMCL2-LCNT/hFMCH2	141.20	79.00	38.64	78.51	84.34
hFMCL2-LCNT/hFMCH3	139.10	77.09	61.41	72.62	87.56
細胞	PBMC	CD4:CD8	PBMC	CD4:CD8	

【 0 5 0 0 】

s C A R / ヒト化されたスイッチ組み合わせ（図 1 0）を用いた治療によって観察された、C D 1 9 陽性 R S 4 ; 1 1 細胞細胞毒性の強い用量依存性誘発とは対照的に、C D 1 9 - 陰性 K 5 6 2 細胞に対する s C A R - E C 細胞（例えば、s C A R - T 細胞）のほとんどの L D H 細胞毒性が、s C A R / ヒト化されたスイッチの組み合わせを用いた治療によって観察されなかった（図 1 1）。したがって、s C A R / ヒト化されたスイッチ組み合わせで誘発される細胞毒性は、標的抗原（C D 1 9）を発現する細胞に対して特異的であり、細胞毒性の非特異性活性は、スイッチのその s C A R - T 細胞への結合のため、めったに起こらない。

10

20

30

40

50

【0501】

相関性が、結合親和性（フローサイトメトリーによる）と活性（インビトロの細胞毒性による）との間に存在するかを決定するために、親和性を、サイトカイン放出およびそれぞれの候補に対する細胞毒性の EC_{50} に沿ってプロットした（図22Aに示される細胞毒性の淹プロット、図22Bに示される相関性）。直鎖関係を、親和性と EC_{50} との間に、ならびにサイトカイン放出と図に示される r^2 's を用いたインビトロの EC_{50} との間に見出した。高い効力（より低い） EC_{50} 's は、高いサイトカイン放出（0.1 nMのスイッチで測定される）を提供し、高い効力（より低い） EC_{50} 's は、より高い親和性とヒト化された候補とに相関関係を見出した。

【0502】

10

これらの候補がどのようにインビボで機能したかをアッセイするために、NALM-6アッセイを、研究者の基準の状態を使用して実施した（図22C）。第1の実験では、4つの候補、L2b/H4b、L2b/H4c、L2c/H4b、L2c/H4cを、元々の4-1BB系マウス52SR4 CAR-T候補（TSY-2-193）を使用してこのモデル内で試験した。第2の実験では、元々の4-1BB系マウス52SR4 CAR-T候補を反復し、かつ三代目の28BB L5H4候補s CAR-T細胞と比較した。総合的に、ヒト化されたスイッチ候補L2b/H4cは、9匹のマウスのうち5匹で腫瘍を排除した。これは、他の候補より優れている。ヒト化されたフレームワーク領域とこの候補の整列および元々のマウスFMC63配列を、図23で提供する。

【0503】

20

ヒト化されたスイッチ候補L2b/H4cは、高い回復MS、熱安定性を含んだ発達可能性分析を通して、シリコT細胞エピトープ分析（免疫原性）、およびCIC、SIC、HIC、SECクロマトグラフィにおいて、好ましい生物物理学的特性を有した。特異的に、L2b/H4cは、キメラFMC63系スイッチと比較して、改善された熱安定性および産生率を有した（図22D）。分析サイズ排除は、L2b/H4c候補が、モノマーであったことを示した

【0504】

実施例5

クローンHFMC2B-LCNT/HFMCH4Cの免疫原性分析

EpiMatrixシステム（ローアイランド州、プロヴィデンス、EpiVax, Inc）を使用して、軽鎖huFMCL2b-LCNTのアミノ酸配列（いくつかの実施形態では、「hu」「h」は、様々なコンストラクトで交換可能に使用され、例えば、huFMCL2bおよびhFMCL2bは、コンストラクトが少なくとも部分的にヒト化されることを示すことに注意されたい）、および重鎖hFMCH4c配列は、総合および領域免疫原性潜在性の両方に対して、分析される。加えて、研究者は、これらの配列を、MHCI I級エピトープへのジェンバンクの非重複性ヒトタンパク質データベースおよびアレルギーおよび免疫学へのLa Jolla Instituteの免疫エピトープデータベース（ワールドワイドウェブアドレス：iedb.org/にて利用可能（コンテンツは参照によりその全体が本明細書に組込まれる））に対してスクリーニングした。最終的に、研究者は、完全なヒトFMC抗体の免疫原性潜在性を評価するために、重鎖および軽鎖可変ドメインを組み合わせた。

30

40

【0505】

全ての他の因子が等しい条件で、所与のタンパク質に含有されるHLAリガンド（すなわち、EpiMatrix hits）が多い程、タンパク質が免疫応答を誘発する可能性が高い。このコンセプトを捕らえるために、研究者は、EpiMatrix Protein Scoreを使用した。EpiMatrix Protein Scoreは、研究者が所与のサイズのタンパク質内に見出すことを予測するであろう、予測されるT細胞エピトープの数と、EpiMatrixシステムによって予測される推定上のエピトープの数との間の差異である。EpiMatrix Protein Scoreは、観察された免疫原性と相関する。EpiMatrix Protein Scoreは、「正規化さ

50

れ」、標準スケールでプロットされ得る。「平均」タンパク質の E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e は、0 である。0 超の E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e は、過剰の M H C リガンドの存在を示し、免疫原性に対するより高い潜在性を表示するが、ゼロ未満のスコアは、予期されたものより少ない潜在性 M H C リガンドおよび免疫原性に対するより低い潜在性の存在を示す。+ 2 0 超のタンパク質スコアは、顕著な免疫原性潜在性を有することが考慮される。

【 0 5 0 6 】

調節性 T 細胞エピトープの存在のための調製抗体は、それらの可変ドメインのアミノ酸配列（特にそれらの相補性決定領域（C D R s））が、異常な程度まで変動し得る、固有のタンパク質である。それは、抗体に多種多様な抗原を認識させることを可能にする、この変動性である。しかしながら、この柔軟性は、代償を払う。抗体変異を制御する組換えおよび変異事象もまた、新しいまたはネオ T 細胞エピトープを産生し得る。これらのネオエピトープは、循環 T 細胞に対して「外来性」に見える場合がある。抗体配列内のネオエピトープの存在は、ヒト - 抗ヒト抗体応答（いわゆる H A H A 応答）の形成に繋がる。

【 0 5 0 7 】

調節性 T 細胞は、変異され、および / または抗体 C D R などの高い可変配列を含有するものを含む、免疫応答を完全なヒトタンパク質に周辺で抑制するのに、重要な役割を果たす。調節性 T 細胞は、調節性 T 細胞エピトープによって関与および活性化される。研究者は、抗体配列内のネオエピトープの存在に関連する固有のリスクが、天然発生調節性 T 細胞エピトープの存在によってバランスが取られることを信じている。

【 0 5 0 8 】

多くのヒト抗体単離の配列のスクリーニングによって、研究者は、研究者が、調節性潜在性有すると信じるいくつかの高い保存 H L A リガンドを特定した。実験の証拠は、これらのペプチドの多くが、実際に、ほとんどの対象において活性的に免疫寛容原性であることを示唆している。研究者は、これらの高い保存断片を、トレギトープ（トレギトープ）と称する。トレギトープ観察は、B l o o d (D e G r o o t , A S , e t a l . , B l o o d (2 0 0 8) O c t 1 5 ; 1 1 2 (8) : 3 3 0 3 - 1 1 (参照によりその全体が本明細書に組込まれる)) にて公開されており、および多くの候補トレギトープが、特許出願中である。多くの場合、ヒト化された抗体に含有されるネオエピトープの免疫原性潜在性は、顕著な数のトレギトープの存在において効果的に制御され得る。抗体免疫原性分析の目的のために、研究者は、トレギトープ調製され、抗療法抗体応答の予測に対応している E p i M a t r i x S c o r e を開発した。トレギトープ調製された E p i M a t r i x S c o r e を計算するために、研究者は、トレギトープのスコアを、抗体の組み合わせた可変ドメインの E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e から差し引いた。研究者の経験では、トレギトープ調製されたスコアは、観察される臨床免疫応答と良好に相関する。

【 0 5 0 9 】

トレギトープの存在のための調製後、抗体可変ドメインの E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e s は、低くなる傾向がある。2 2 個のライセンス化された抗体の平均のトレギトープ調製された E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e は、- 2 0 . 7 1 である。もちろん、全ての抗体が等しく産生されるわけではない。いくつかは、多くのトレギトープを含有するが、一方他は、少量を含有するか、または全く含有しない。抗療法抗体を、暴露された対象の 5 % 超で誘発すると知られる、1 0 個の抗体の平均トレギトープ調製された E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e は、- 4 . 7 7 である。抗療法抗体を、暴露された対象の 5 % 超で誘発すると知られる、1 2 個の抗体の平均トレギトープ調製された E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e は、- 3 4 . 0 1 である。顕著な数のトレギトープの存在は、低い観察された免疫原性と良好に相関する。研究者の試料内の抗体の全てを考慮して、トレギトープ調製された E p i M a t r i x S c o r e と観察された免疫原性との間の相関性の係数は、0 . 7 6 である（図 1 2 を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【 0 5 1 0 】

免疫原性抗体の相対的に低いトレギトープ調製された平均スコア（ - 4 . 7 7 ）と、観察された抗療法免疫応答の相対的に高い発生率との間の明らかな矛盾を記述することは興味深い。研究者は、抗体の C D R に含有されるネオエピトープが、別様の低いスコア抗体においてさえ、顕著なリスク因子であることを示唆する。上記で示唆される通り、研究者は、抗体 C D R に関連する高リスクはおそらく、ヒト抗体生殖系列内のトレギトープの発達および保持の裏にある進化的ドライバーであることを信じる。

【 0 5 1 1 】

結果 .

提出された重鎖および軽鎖配列の分析において、対立遺伝子による合計 3 , 5 2 0 フレーム評価を実施した。発見の概要が、以下表 9 に提示される。

10

【表 9】

表 9 : h F M C 2 b - L C N T / h F M C H 4 c 配列の総合免疫原性潜在性

タンパク質 標識	長さ	評価	EpiMatrix Hits	EpiMatrix Score	Treg-Adj EpiMatrix Score
huFMC HC	223	1,720	104	6.63	-22.51
huFMC LC1	233	1,800	111	13.98	-15.70

表 9 標識 : h u F M C H C = h F M C H 4 c 、 h u F M C L C 1 = h F M C 2 b - L C N T

20

【 0 5 1 2 】

図 1 3 は、グラフィックスケールでの研究者の結果を示し、また、どのように提出された配列が、基準対象のシリーズに対して評価するかを示す。

【 0 5 1 3 】

h F M C H 4 c は、合計 1 0 4 の E p i M a t r i x h i t s を含有する。そのトレギトープ調製された E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e は、 - 2 2 . 5 1 である。このスコアは、研究者のスケールの低端になり、免疫原性に対する限られた潜在性を示す。h F M C 2 b - L C N T は、合計 1 1 1 の E p i M a t r i x h i t s を含有する。そのトレギトープ調製された E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e は、 - 1 5 . 7 0 である。このスコアは、研究者のスケールの中位の範囲になり、免疫原性に対するわずかに減少された潜在性を示す。組み合わせられた h u F M C 可変ドメインを見ることで、研究者は、 - 1 3 . 7 3 のトレギトープ調製された E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e を計算し、ライセンス化されたモノクローナル抗体産生物のセット内の、観察される臨床免疫原性に対するトレギトープ調製された E p i M a t r i x P r o t e i n S c o r e の退縮に基づいて、5 . 7 % の抗 d r u g 抗体レートを予測する。非免疫原性と知られる他のライセンス化された抗体と比較して、これらのスコアは、わずかに上昇し、抗療法応答に対して少なくともいくつかの潜在性を示す。

30

【 0 5 1 4 】

実施例 6

G C N 4 ペプチドエピトープの修飾

5 2 S R 4 (抗 G C N 4) C A R への結合のための最適なエピトープを決定するために、研究者は、G C N 4 ペプチド配列 (配列番号 1 3 8) を様々な位置で修飾し、したがって G C N 4 ペプチド誘導体を作成した。

40

【 0 5 1 5 】

配列番号 1 3 9 、 G C N 4 エピトープは、N - 末端上の 3 個の残基および C - 末端上の 1 個の残基によって拡大された。

【 0 5 1 6 】

配列番号 1 4 0 では、残基 L 1 は、D に変異され、N 5 は、Q に変異された、これは、

50

G C N 4 ペプチドの第 1 の 5 個の残基が、D L P K Q である文献 (Z a h n d C , e t a l . The J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y , V o l . 2 7 9 , N o . 1 8 , I s s u e o f A p r i l 3 0 , p p . 1 8 8 7 0 - 1 8 8 7 7 , 2 0 0 4) に見出される G C N 4 ペプチドの代替の配列に基づく。

【 0 5 1 7 】

配列番号 1 4 1 では、残基 K および L を、C - 末端から除去し、C - 末端から切断されたエーテルのより短い配列が、なお活性かどうかを決定した

【 0 5 1 8 】

配列番号 1 4 2 では、L 1 を除去し、この残基が、活性に関与しているかどうかを決定した。

【 0 5 1 9 】

配列番号 1 4 3 では、L 1 および L 2 を除去し、これらの残基が活性に関与しているかを決定し、プロリンで始まる配列のための発現の生存率を理解した。

【 0 5 2 0 】

配列番号 1 4 4 では、L 1、L 2 および P 3 を除去し、さらにタンパク質を切断し、活性への影響を決定した。

【 0 5 2 1 】

配列番号 1 4 5 では、L 1、L 2、P 3 および K 4 を除去し、さらにタンパク質を切断し、活性への影響を決定した。

【 0 5 2 2 】

配列番号 1 4 6 では、L 1、L 2、P 3、K 4 および L 1 8 を除去し、K 1 7 を A と入れ替え、ペプチドを C - 末端から延長し (ペプチドから G G G G S リンカーを分離すること)、一方、元々のペプチド配列内のそこに存在する二重リジン (K K) モチーフを排除した。

【 0 5 2 3 】

配列番号 1 4 7 では、K 1 7 を A と入れ替え、元々のペプチド配列内のそこに存在する二重リジン (K K) モチーフを排除した。

【 0 5 2 4 】

配列番号 1 4 8 では、L 1、L 2 および P 3 を除去し、K 1 7 を A と入れ替え、元々のペプチド配列内のそこに存在する二重リジン (K K) モチーフを排除し、これを、A に示される延長されたペプチドモチーフとの組み合わせで試験した。

【 0 5 2 5 】

配列番号 1 4 9 では、L 1、L 2、P 3 および K 4 を除去し、K 1 7 を A と入れ替え、元々のペプチド配列内のそこに存在する二重リジン (K K) モチーフを排除した。

【 0 5 2 6 】

配列番号 1 5 0 では、L 1、L 2、P 3 および K 4 を除去し、K 1 7 を G と入れ替え、元々のペプチド配列内のそこに存在する二重リジン (K K) モチーフを排除した。

【 0 5 2 7 】

配列番号 1 5 1 では、L 1、L 2、P 3 および K 4 を除去し、K 1 7 を A と入れ替え、L 1 8 を A と入れ替え、元々のペプチド配列内のそこに存在する二重リジン (K K) モチーフを排除した。

【 0 5 2 8 】

配列番号 1 5 2 では、L 1、L 2、および P 3 を除去し、K 1 7 を G と入れ替え、元々のペプチド配列内のそこに存在する二重リジン (K K) モチーフを排除した。

【 0 5 2 9 】

配列番号 1 5 3 では、L 1、L 2、および P 3 を除去し、K 1 7 を A と入れ替え、L 1 8 を A と入れ替え、元々のペプチド配列内のそこに存在する二重リジン (K K) モチーフを排除した。

【 0 5 3 0 】

配列番号 2 4 5 では、L 1、L 2、P 3 および K 4 を除去し、エピトープは C - 末端上

10

20

30

40

50

の１個の残基によって延長される。

【０５３１】

表１０に列挙されるペプチドのそれぞれを含有するスイッチを、ＦＡＢ形式のマウスＦＭＣ６３抗ＣＤ１９抗体クローン上のＬＣＮＴ形式のペプチド発現によって産生した。

【０５３２】

修飾されたエピトープスイッチのスイッチ可能なＣＡＲ－Ｔ細胞（５２ＳＲ４－ｓＣＡＲ）への結合を、同じ結合アッセイを使用して試験した（上記の実施例３に記載される）（図２０）。

【０５３３】

修飾されたエピトープスイッチの活性を、上記の実施例４に記載される通りＬＤＨ細胞毒性アッセイで試験し、ＥＣ５０値を、上記に記載される通り決定した（図２１）。

【表１０】

表 １０：ＧＣＮ４エピトープ配列

配列 番号 ナン バー	名前	配列
138	GCN4	NYHLENEVARLKKL
139	GCN4-A	LLPKNYHLENEVARLKKL
140	GCN4-B	DLPKQYHLENEVARLKKL
141	GCN4-C	LLPKNYHLENEVARLK
142	GCN4-D	LPKNYHLENEVARLK
143	GCN4-E	PKNYHLENEVARLK
144	GCN4-F	KNYHLENEVARLK
145	GCN4-G	NYHLENEVARLK
146	GCN4-H	NYHLENEVARLKA
147	GCN4-I	LLPKNYHLENEVARLKAL
148	GCN4-J	KNYHLENEVARLKAL
149	GCN4-K	NYHLENEVARLKAL
150	GCN4-L	NYHLENEVARLKGL
151	GCN4-M	NYHLENEVARLKAA
152	GCN4-N	KNYHLENEVARLKGL
153	GCN4-O	KNYHLENEVARLKAA
245	GCN4-GK	NYHLENEVARLKK

【０５３４】

実施例 7

共刺激分子の比較

共刺激ドメインのｓＣＡＲ－Ｔ細胞活性上での効果を決定するために、抗ＧＣＮ４ペプチドｓＣＡＲ－ｓｃＦｖ（クローン５２ＳＲ４）を、研究者の以前に報告された第２代目４－１ＢＢ系コンストラクト〔Rodgers, D. T. (2016)〕から、第２代目ＣＤ２８共刺激（同時刺激）ドメインまたは第三代目ＣＤ２８／４－１ＢＢ（２８ＢＢ）同時刺激ドメイン〔Zhang (2007); Zhong (2010)〕を抱えるベクターにサブクローニングした。IgG4mヒンジ（配列番号１６８）およびＣＤ８膜貫通（ＴＭ）（IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC、配列番号３９８）ドメインを、研究者の以前の設計と一致するように保持した。これらの構造の健康ドナー誘導Ｔ

細胞への形質導入は、s c F v (データは示されない)の表面発現を実証できなかった。第2代目および第3代目コンストラクトは、どこでも広く使用されており、研究者は、研究者のコンストラクトの失敗が、C D 2 8 同時刺激を有するC D 8 T MまたはI g G 4 m ヒンジ領域の融合における不適合性のためであったと仮定した。この仮定を試験するために、C D 2 8 ヒンジを有するC D 2 8 T MまたはC D 2 8 T Mを使用し、C D 8 T MおよびI g G 4 m ヒンジを入れ替え、s C A R コンストラクトA ~ F を産生した(図2 4 A)。健康ドナー誘導細胞への形質導入は、I g G 4 m ヒンジ / C D 2 8 T M / C D 2 8 共刺激およびC D 2 8 ヒンジ / C D 2 8 T M / C D 2 8 共刺激の両方が、s c F v を細胞の表面に発現したことを実証し、以前のコンストラクトにおけるC D 8 T Mと、C D 2 8 共刺激との不適合性を実証した。C A R コンストラクトに含まれる様々な細胞外、膜貫通、および細胞内ドメインの配列は、図2 4 C に示される。

10

【0 5 3 5】

A l e x a F l u o r 6 4 7 標識G C N 4 ペプチド(抗G C N 4 s c F v を密接に結合かつ標識する)を使用したフロー結合実験は、2 8 B B コンストラクト(E)が、C D 2 8 (C)または4 - 1 B B (A)共刺激分子のみを抱えるコンストラクトと比較して、より低い表面発現を提供したことを実証した(図2 5 A)。インビトロの細胞毒性アッセイは、2 8 B B コンストラクト(E)もまた、元々のコンストラクト(A)と比較して、抗C D 1 9 スイッチのC D 1 9 ⁺ R S 4 ; 1 1 細胞に対する滴定を使用して、細胞毒性のわずかに弱いE C 5 0 を有したことを実証した(図2 5 B ~ 図2 5 D)。抗原陰性細胞に対するいかなる活性も、ヒンジまたは膜貫通変更のいずれとも観察されなく、s C A R - T 細胞の特異性が、変造されなかった(データは示されない)ことを示した。より短い免疫シナプスが、より強力な細胞毒性をもたらす、研究者の以前の仮説と一致して、より短い1 2 個のアミノ酸I g G 4 m ヒンジ(A、B、およびC)を有するコンストラクトは、これらのアッセイにおいて、対応するより長い3 9 個のアミノ酸C D 2 8 ヒンジコンストラクト(DおよびF)よりも強力な細胞毒性を有した(F I G S . 2 5 C および 2 5 D)。この効果は、複数のドナーにわたって一致した。対照的に、細胞毒性のE C 5 0 の差異は、C D 8 (A)とC D 2 8 (B)系膜貫通ドメインとの間に見出されなかった。

20

【0 5 3 6】

コンストラクトを次いで、インビボのN A L M - 6 異種移植片モデル(s C A R - T 細胞(i v)の単一用量が、発達した腫瘍量を有するN S G マウスに提供され、1 日おきに1 4 日間のスイッチ(i v)の投薬およびマウスの再発の監視が続く)で試験した。このモデルは、研究者の以前の報告書[R o d g e r s (2 0 1 6)]よりも半数のC A R - T 細胞を用い、コンストラクト間の差異を強調するためにより課題のあるモデルを産生した。比較の頑強さを増加するために、モデルを、3 つの別個のドナーからのT 細胞と共に実行した。これらの条件下で、元々の4 - 1 B B 系コンストラクト(A)は、疾患の可変排除を提供した。このモデルでは、2 8 B B コンストラクト(E)は、腫瘍(9 匹のマウス中7 匹が投薬後に排除された)を、4 - 1 B B (A)(7 匹のマウス中3 匹が投薬後に排除された)より効果的に排除した(図2 5 E)。C D 2 8 系コンストラクト(C)は、投薬期間中の再発を実証し、いかなるマウスにおいても排除できなかった(8 匹のマウス中0 匹が排除された)。研究者の以前の結果と一致して、I g G 4 m ヒンジは、C D 2 8 ヒンジを、C D 2 8 およびまたはB B 2 8 共刺激ドメインと共に用いたコンストラクト(D)および(F)が、いかなる動物内の腫瘍量も顕著に制御できなかったため、インビボでの活性に必要であった(図2 6)。

30

40

【0 5 3 7】

スイッチの第1の用量の2 4 時間後に測定された急性サイトカイン放出は、4 - 1 B B (A)、C D 2 8 (C)および2 8 B B (E)コンストラクトの間で同様であり、C D 2 8 コンストラクト(C)のみが、元々の4 - 1 B B コンストラクト(A)より低いレベルのI F N g を呈した(図2 5 F)。これは、4 - 1 B B 共刺激ドメインおよびC D 8 T M およびヒンジを用いる、最近受諾されたキムリア(C A R T 1 9)後にモデル化された、従来のC A R - T コンストラクトと比較された。C A R T 1 9 は、これらの条件化で、顕

50

著により大きな I L - 2 および T N F サイトカイン放出を呈した。注目すべきことに、I g G 4 m ヒンジ (E) を有する B B 2 8 コンストラクトは、元々の 4 - 1 B B 系コンストラクト (A) と比較して、投薬期間に直接続いて、C D 4 において 2 4 倍の増加、C D 8 細胞拡大において 5 倍の増加を呈した (図 2 5 G)。この拡大は、それぞれ C A R T 1 9 内の C D 4 および C D 8 よりも、およそ 4 1 倍および 1 5 倍大きかった。4 - 1 B B 共刺激ドメインと比較した C D 8 にわたる C D 4 細胞のより大きな拡大は、C D 2 8 刺激の付加が、C D 4 拡大を増加し得る以前の報告書 [K a g o y a (2 0 1 7)] と一致する。したがって、第三代目 2 8 B B 系コンストラクト (E) は、顕著により大きな T 細胞拡大を産生し、スイッチ可能な C A R - T プラットフォームでより強い有効性をもたらすが、顕著により低いサイトカイン放出を有し得る。

10

【 0 5 3 8 】

実施例 8

S C A R のヒト化

スイッチの P N E ペプチドに対する s C A R の特異性を配向する 5 2 S R 4 s c F v を、マウス抗体ライブラリー [H a n e s (1 9 9 8)、Z a h n d (2 0 0 4)] の配向された進化から誘導した。これらのマウス配列は、潜在性を有し、ヒト内で免疫原性である。操作された T 細胞内の導入遺伝子の免疫原性は、患者内にアナフィラキシーを引き起こしており、患者からの細胞の拒絶に寄与する因子であることが示されている [B e r g e r (2 0 0 6)、J e n s e n (2 0 1 0)、M a u s (2 0 1 3)]。これらの理由のため、研究者は、5 2 S R 4 s c F v をヒト化した。

20

【 0 5 3 9 】

手短に、可変重鎖 (V H) および可変軽鎖 (V L) ドメインのためのマウス 5 2 S R 4 配列を、N C B I ウェブサイト (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) 上の I g B L A S T プログラムに提出した。それぞれマウス配列を、マウス生殖系列配列と比較し、次いでヒト生殖系列配列と比較した。マウス V H 配列は、マウス I G H V 2 - 6 - 7 生殖系列から誘導され、マウス V L 配列は、マウス I G L V 1 生殖系列から誘導される (図 2 7 A)。マウス V H は、ヒト V H 生殖系列 I G H V 4 - 5 9 に最も近く、マウス V L は、ヒト V L K 生殖系列 I G L V 7 - 4 6 に最も近い。

【 0 5 4 0 】

マウス V H 配列を、ヒト I G H J 4 - 5 9 V H と整列させ、C D R 定義が、図 2 7 A に提供される (ワールドワイドウェブアドレス: bioinf.org.uk/abs/)。4 つの異なるヒト化された V H フレームワークを使用し、ヒト化された配列: h 5 2 S R 4 H 1 - H 4 (図 2 8) を生成した。h 5 2 S R 4 H 1 (全体にわたって H 1、2、3、4 ... などと称されるコンストラクト) は、マウス C D R s が、ヒト I G H J 4 - 5 9 フレームワーク (すなわち、いかなるフレームワーク変更も有さない) に移植されている C D R 交換である。h 5 2 S R 4 H 2 は、フレームワーク変更を位置 7 1 (連続番号付け) (C D R - H 2 立体構造に影響する)、および位置 9 3 ~ 9 4 (C D R - H 3 立体構造に影響する) に付加した。h 5 2 S R 4 H 3 は、追加の埋没フレームワーク変更を付加し、V H ドメインの内部パッキングを改善した。h 5 2 S R 4 2 b / 3 b は、A s n 7 3 の付加を試験した。Z a h n d e t a l . [Z a h n d (2 0 0 4)] に基づいて、L e u H 2 8 S e r (H 3 0 i n Z a h n d e t a l . A H o a n t i b o d y n u m b e r i n g) および I l e H 5 6 S e r / T h r (H 6 7 i n Z a h n d e t a l . A H o a n t i b o d y n u m b e r i n g) は、結合親和性を改善した。両方の位置で、疎水性測鎖は、完全に溶媒に暴露された。L e u H 3 0 は、結晶構造 P D B 1 P 4 B 内の標的との直接相互作用を有さないが、I l e H 5 6 は標的との少しの相互作用を有する。

30

40

【 0 5 4 1 】

マウス V L を、ヒト I G L V - 7 - 4 6 と整列させ、C D R 定義が、図 2 7 A に提供される (www.bioinf.org.uk/abs/)。いくつかの異なるヒト化された V L フレームワークを使用して、ヒト化された配列: h 5 2 S R 4 V L 1 - 3 (全体に

50

わたり L 1、2、3 ... などと称されるコンストラクト) を生成した (図 2 9)。C D R - L 1 および C D R - L 2 は、脱アミノに対して低い傾向を有する配列を含む (図 2 A V L)。マウスおよびヒト化された 5 F 1 1 の V H : V L 対のコンピューターグラフィックモデルを、構造かし、ヒト化において役立てた。この整列および分析から、固有のヒト化された s c F v 配列を、元々の第 2 代目 4 - 1 B B 系コンストラクト内のマウス 5 2 S R 4 s c F v の代わりに、構造化およびクローニングした (図 2 4 の A、配列番号 3 8 9)。

【 0 5 4 2 】

共刺激分子を比較した研究者の初期結果に基づいて、C A R 発現またはインビトロの有効性どちらのレベルも、2 8 B B コンストラクトのインビボでの有効性の優性を十分に予測できなかった。さらに、同等のインビトロの有効性を有する従来の C D 1 9 および G D 2 C A R は、緊張性シグナル伝達の差異のため、非常に異なるインビボの抗腫瘍活性を有することが示されている [G a r g e t t (2 0 1 6)]。この理由のため、さらなる調査のためヒト化された候補を特定するために、研究者は、N A L M - 6 異種移植片マウスモデル内でインビボスクリーニングを実行した。

【 0 5 4 3 】

4 - 1 B B ベクター (図 2 4 A のコンストラクト A を参照されたい) 内の 4 5 個のヒト化された候補 (表 1 1) を、個々に健康ヒトドナー誘導 T 細胞に形質導入し、別個の N S G マウス (それぞれ候補に対する最小 N = 3) に静脈内注射した。図 2 4

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 1 1 : 図 2 7 B で使用されるヒト化された C A R バリエーション

	固有のクローン名称	LC および HC
1.	TSY-3-192	L5H4
2.	TSY-3-190	L5H6
3.	TSY-3-191	L2H6
4.	TSY-3-193	L6H6
5.	TSY-4-19	L5H4-E6Q
6.	TSY-4-20	L5H6-73T
7.	TSY-4-23	L5-12S,H4-E6Q
8.	TSY-4-24	L6-46F,H4-E6Q
9.	TSY-4-83	L5-109D,H4
10.	TSY-4-84	L5del109,H4
11.	TSY-4-85	L5H4-A87D
12.	ENH-4-129	L5(12S)H4
13.	ENH-4-130	L5(12S-69D)H4
14.	ENH-4-132	L5(12S-23R)H4
15.	ENH-4-133	L5(12S)H487S)
16.	ENH-4-134	L5(12S)H487D)
17.	ENH-4-135	L5(12S-69D-109S)(H487S)
18.	ENH-4-136	H4L5(12S)
19.	ENH-4-137	H4(87S)L512S-69D-109S)
20.	ENH-4-138	LC H4
21.	ENH-4-140	LC H4(87S)
22.	ENH-4-141	L5(12S-69D-109S)
23.	ENH-4-85	L5 H4-A87D
24.	ENH-5-40	L5-L109D H4-A87D,E6Q
25.	ENH-5-41	L5-V12S,L109D H4-A87D
26.	ENH-5-42	L5-V12S,L109D H4-A87D,E6Q
27.	ENH-5-43	L5-109D,HC
28.	ENH-5-44	L5-12S,109D,HC
29.	ENH-5-45	LC,H4-A87D,E6Q
30.	ENH-5-46	LC,H4-A87D
31.	ENH-5-59	H4(E6Q),L5
32.	ENH-5-47	L2 H4-A87D
33.	ENH-5-48	L3 H4-A87D

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

	固有のクローン名称	LC および HC
34.	ENH-5-49	L4 H4-A87D
35.	ENH-5-50	L5(V12S)H4-A87D
36.	ENH-5-51	L5-V12S H4-A87D
37.	ENH-5-52	L5-dL109 H4-A87D
38.	ENH-5-53	L5-V12S,L69D H4-A87D
39.	ENH-5-54	L5-V12S,G23R H4-A87D
40.	ENH-5-55	L5-V12S,L69D,L109S H4-A87D
41.	ENH-5-56	L6 H4-A87D
42.	ENH-5-57	L6-P46F H4-A87D
43.	ENH-4-86	L5-L109D H4-A87D
44.	ENH-5-141	L5 H4-E6Q、A87D
45.	TSY-4-70	L2 H3

10

【 0 5 4 4 】

スイッチを用いた治療を、1日おきに14日間、研究者の基準プロトコルに従って実行した(図27B)。完全な腫瘍除去を提供するクローン(IVISによる $<10^4$ 放射輝度、このもでるにおける腫瘍の検出のおよその限界、50日目、スイッチの最後の投与の30日後)を、さらになる研究のために選択した(表12)。

20

【表 1 2】

表 1 2 : 図 2 7 B で使用されるヒト化された CAR バリエント

	固有のクローン名称	LC および HC
1.	TSY-4-19	L5H4-E6Q
2.	TSY-4-83	L5-109D,H4
3.	TSY-4-84	L5del109,H4
4.	TSY-4-85	L5H4-A87D
5.	ENH-5-40	L5-L109D H4-A87D,E6Q
6.	ENH-5-42	L5-V12S,L109D H4-A87D,E6Q

30

【 0 5 4 5 】

これらのクローンを、V12SまたはL109Dでの軽鎖およびE6QまたはA87Dでの重鎖内での変異を用いて、ベースクローン軽鎖配列L5および重鎖配列H4から誘導した(図30)。

【 0 5 4 6 】

これらの変異が直接ペプチド結合と相互作用しないにも関わらず、それらは報告されるか、または広範囲の立体構造変異、またはscFv構造および相関的にsCAR-T細胞活性に影響し得るタンパク質フォールディングへの影響を含む、他の効果を有すると仮定されている。さらには、埋没HC E6Q残基の例外と共に、残基は、表面暴露され、それらも、非特異性疎水性相互作用を通して、タンパク質-タンパク質相互作用において役割を果たし得ることを示唆した。これは、暴露された以前のFab可変領域/定常領域境界のある特定の残基を有する、scFvの場合に顕著であり得、Fabsと比較して、scFv分子における疎水性のより高い頻度をもたらし得る[Nieba(1997)]。

40

【 0 5 4 7 】

LC V12S変異を、親C11L34系クローンからの52SR4 scFvのインピ

50

トロの進化より得られた変異として、Zahnd et al. (2004) (AHO番号付けスキームを使用した公開においてLC T13Sとしようされる)において特定した。この変異が、scFvの親和性を増加する可能性があるが、しかしながら、既存のデータに基づいて、研究者は、それが、52SR4クローン内の高親和性の進化におけるパッセンジャーであったことを除外できなかった。LC109残基は、軽鎖の最後から2番目のアミノ酸であり、最後のアミノ酸がグリシンであり、GGGSリンカーが続く。この残基が、以前のインビトロの進化研究を通して特定されていなく、かつヒトおよびマウスフレームワークにわたって保存されているにも関わらず、それは構造から突出し、他の非特異性タンパク質との相互作用を増加し得る疎水性表面を形成している。したがって、LC L109D変異は、表面疎水性を減少させるのに有益であり得る。

10

【0548】

Zahnd et al. (2004)に従って、HC「変異H6 (Glu~Gln)は、クローンC11L34と比較した際、2~20pMまで親和性を改善し」、HCにおけるこの変異の研究を裏付けた。公開において、この変異が、「広範囲の相互作用または「分子シミング」を通して効果を発揮し、ループまたはドメインの配向または柔軟性に影響を与えた」ことが仮定された。他の文献では、この残基は、重鎖のN末端部分の立体構造に影響を与えることが示されている[Honegger (2001)]。したがって、この残基のsCAR-T細胞活性への影響のさらなる調査への良い裏付けとなった。最終的に、表面暴露HC残基87は、4-4-20抗FITC scFvの開発において以前に研究されている[Nieba (1997)]。この研究において、Niebaらは、この残基のD (カバット番号付けにおける84D)への変異が、タンパク質フォールディングにおける凝集を減少させ、一方顕著にはscFvの結合親和性または熱安定性を改変しなかったことを見出した。したがって、これらの変異の研究のための良い裏付けが存在した。

20

【0549】

sCAR-T細胞機能上のこれらの変異の効果を試験するために、7ヒト化されたscFvバリエーションを、上記に記載される変異に沿ってL5H4系クローンから産生した(図27C)。異なる共刺激分子間でそれらの活性を試験するために、CARを、4-1BB、CD28、または28BB系ベクター(図24でそれぞれ、A、C、またはE)にサブクローニングし、合計21個のベクターを産生した。複数の共刺激ドメイン背景における試験への理論的根拠は、Cd28系共刺激ドメインが、緊張性シグナル伝達を悪化させることを示しているの文脈を有するsCARを、圧力試験することであったが、4-1BBは、緊張性シグナル伝達を隠し得る[Long (2015)]。したがって、単一の共刺激ドメインの文脈でsCAR-T細胞活性を試験することは、活性を区別するのに十分ではない場合がある。インビトロの細胞毒性アッセイは、バリエーションが、抗CD19スイッチの滴定を用いて、CD19⁺RS4;11細胞に対する細胞毒性のEC₅₀において顕著でない差異を有したことを実証した(図27D)。

30

【0550】

候補を次いで、インビボでNALM-6腫瘍を排除するそれらの能力について、マウス52SR4 sCARコンストラクトと比較した(図27E)。これらのモデルに対する細胞の拡大中、CAR+T細胞を、親和性カラムによって選別し、scFvバリエーションからもたらされるCAR発現における潜在性差異を基準化した。対応して、これらのモデルにおける腫瘍排除は、図25に示される以前のモデルと比較してわずかに改善したことが見出された。4-1BBまたはCD28系共刺激分子を有するCARベクターは、可変腫瘍排除を有したが、しかしながら選別は、研究者の最初のモデルと比較して、CD28系CARの腫瘍量を制御する能力を改善した。第三代目28BB共刺激ドメインの効力のため、全ての候補およびマウスCARは、投薬期間後に完全に腫瘍を排除した。このモデルを圧力試験するために、さらに、マウスを30日目にNALM-6を用いて再び検証した。いかなる追加のCAR-T細胞も提供されず、基準プロトコルに従って、スイッチ投薬を、検証(36日)の6日後に開始した。36日目、これらの動物内の腫瘍量は、sCAR-T細胞が、スイッチ投薬なしでは腫瘍増殖に効果を有さなかったことを示唆する初期

40

50

検証に匹敵した。第2の投薬期間を、第1、1日おきに14日間実施し、その後腫瘍が全ての群において再び排除された。マウスの多くは、研究の最後まで清潔なままであり、60日目に少数の個々のマウスが明らかに再発していた。

【0551】

これらの実験の全てのsCARは、腫瘍排除の有望なレベルを呈した。ほとんどの有望な候補を区別するために、ヒト化されたscFvのインビボ機能を、複数の共刺激ドメイン形式(CD28+CD3z、4-1BB+CD3zおよびCD28+4-1BB+CD3z)にわたって平均化し、それぞれのコンストラクトのそれぞれのシグナル伝達特徴によって導入されたバイアスを除去した。「CD3z」、「CD3ζ」、および「CD3ζ」という用語は、本明細書で交換可能に使用される。以下のインビボのパラメータを、それぞれCAR-Tコンストラクトにわたって平均化した。(A)腫瘍検証後10、20、31および45日目の腫瘍IVIS値、(B)スイッチ投薬の終了2日後に測定されたT細胞拡大、および(C)腫瘍再発の日(IVIS ROI>104)。それぞれのパラメータシリーズを、疾患関連についてランク付けした。(A)腫瘍排除/再発を表す、低~高とランク付けした、(B)活性を通したT細胞拡大の表示、高~低とランク付けした、(C)初期腫瘍排除のレベルの表示、低~高とランク付けした。したがって、この分析を通して、最良のCARコンストラクトは、強いT細胞拡大(B)およびまれな再発(C)を有する低腫瘍量(A)を有するであろう。それぞれのパラメータを、それぞれ共刺激ドメインコホート内でランク付けし、および次いで平均化し、合計のランクスコアを作成した。ランクの標準偏差を、ランク分散の測定値として計算した。このランクシステムを使用して、sCAR E(L5-L109D、H4-E6Q、A87D)が、最も有望な候補であった(図31)。LC L109D、HC E6Q、およびHC A87Dの、L5H4系クローンへの負荷は、T細胞拡大をインビボで顕著に増加させた。サイトカインは、sCAR候補の間でわずかに異なった(図32)。共刺激分子の比較で以前に見出された通り、24時間目のサイトカイン放出は、インビボで効力を予測しなく、したがってsCAR候補のランク付けに含まれなかった。したがって、28BB CARは、それらの4-1BBの対応する部分より大きなTNFαを放出することが注意されるべきであるが、とはいえ、図25では顕著ではない。同様に、sCAR E候補は、そのインビボでの活性と相関して、他のクローンより大きなTNFαを放出した。

【0552】

研究者はさらに、延長したエキスピボ拡大を使用してこれらの候補を調査した(図33)。手短に、アッセイを、それぞれのCAR候補を有する健康ドナー誘導T細胞を個々に形質導入することで実施した。培養を、CD3/CD28ビーズを用いて0日目に活性化し、IL-2が、培養プロセス全体を通して提供されたが、細胞は、再刺激されなかった。候補を、5日目にCAR+細胞について選別し、培養フラスコ内で33日目に細胞数、形質導入(CAR+細胞)、およびインビボの細胞毒性の週毎の分析と共に拡大した。他の箇所で報告される通り、4-1BB系共刺激分子を有するCAR候補は、選別後10³倍近く拡大したが、CD28および第三代目CARは、顕著により低い拡大を有した(図33)。4-1BB系CARに対する形質導入効率は、一貫したままであったが、CD28系CARは、CAR+細胞の顕著な欠如を有した。これが、CAR発現の欠如によるものか、または細胞培養内のCAR+細胞を追い越すCAR-陰性細胞の拡大によるものかは決定されていない。第三代目28BB系CARは、選別後にいくつかの形質導入効率を欠如したが、50%近く標準化したように見えた。

【0553】

インビボの細胞毒性を、州ごとにそれぞれ候補について試験した(図34および図35)。延長されたエキスピボ拡大アッセイの過程全体を通して、4-1BB系候補は、細胞毒性同様のEC₅₀および細胞毒性の最大レベルを有した(スイッチ分子の飽和量を使用して%溶解標的細胞によって定義される)。同様に、BB-28候補は、時間経過全体を通して、同様のEC₅₀および最大標的細胞溶解を有した。興味深いことに、CD28系候補は、最大標的細胞溶解の増加に沿った細胞毒性のEC₅₀の増加によって呈される

、効力を失った。これは、V 1 2 S 変異を抱えるクローンに関して最も明らかであった。対応して、これらのクローンは、腫瘍量インビボで制御するそれらの能力において最も弱いスコアであった。

【 0 5 5 4 】

実施例 8

ヒト化されたスイッチとヒト化された C A R との組み合わせ

ヒト化された s C A R 候補 L 5 H 4 (図 2 7 C ~ 2 7 E 、 候補 A) 、 L 5 H 4 - A 8 7 D (図 2 7 C ~ 2 7 E 、 候補 B) 、 L 5 H 4 - E 6 Q , A 8 7 D (図 2 7 C ~ 2 7 E 、 候補 C) 、 および L 5 - L 1 0 9 D - H 4 - E 6 Q , A 8 7 D (図 2 7 C ~ 2 7 E 、 候補 E) と共に、ヒト化されたスイッチ候補 L 2 b / H 4 c の有効性を決定するために、N A L M - 6 モデルを、5 0 0 万個の s C A R - T 細胞を、2 0 0 0 0 個の細胞の代わりに使用したことを除いて、以前に記載される通りに実施した(図 3 6)。これらの条件化で、誘発をもたらすが、腫瘍を排除しない C A R - T 細胞効力を検証する。これらの状態はしたがって、ヒト化された C A R 候補間の少しの差異の解決を可能にする。このモデルでは、候補 E は、腫瘍量の最も大きい制御を提供した。L 2 b / H 4 c ヒト化されたスイッチと対を成した際の、この s C A R の活性は従来の C A R T - 1 9 に匹敵した。

【 0 5 5 5 】

E X A M P L E 9

不均一な腫瘍

複数の腫瘍抗原を同時に、または異なる時間に標的化する s C A R - T 細胞の能力を、不均一な R a j i 異種移植片腫瘍モデル内で試験した。R a j i 細胞(C D 1 9 および C D 2 0 に対して自然に陽性)を、C D 1 9 - C D 2 0 + R a j i 細胞株をもたらす C D 1 9 に対する遺伝子の C R I S P R ノックアウトによって修飾した。野生型 R a j i 細胞を、この細胞株とそれぞれ 1 : 1、4 : 1、または 4 9 : 1 の比で混合し、N S G マウスに静脈内注射し、播種性腫瘍を確立した(図 3 7)。細胞株の両方を、I V I S による腫瘍量に従ってルシフェラーゼ化した。3 日後、マウスを、s C A R - T 細胞または C A R T - 1 9 を用いて治療した。1 : 1 の群では、抗 C D 1 9 スイッチと抗 C D 2 0 スイッチとの混合を用いたスイッチ投薬を、3 日目に、s C A R - T 細胞の送達後の 4 時間後に開始した(図 3 7 A)。このモデルでは、C A R T - 1 9 は、腫瘍量適度に遅くしたが、腫瘍を完全に除去できなかった。これは、野生型 R a j i 細胞を、C D 1 9 - 陰性 R a j i 細胞の増殖への有害な効果を有さずに排除する C A R T - 1 9 の能力のためであると仮定される。s C A R - T 細胞群は、抗 C D 1 9 と抗 C D 2 0 スイッチとの混合物を使用して、3 匹のマウス中 3 匹の腫瘍を排除した。腫瘍の再発を観察し、抗 C D 2 0 スイッチで治療した。この後続のスイッチ治療は、3 匹のマウス中 2 匹の腫瘍を排除した。この実験は、いくつかの s C A R - T 細胞が、複数の腫瘍抗原に同時に再指向され得ることを実証した。

【 0 5 5 6 】

野生型 R a j i 細胞対 C D 1 9 陰性 R a j i 細胞の 4 : 1 混合物を使用した第 2 のモデル(図 3 7 B)を、このモデルにおいて、投薬が、抗 C D 1 9 スイッチのみを用いて述べられたことを除いて、同様に 1 : 1 モデルに対して実行した。腫瘍量(C D 1 9 - 陰性集団からと推定される)が、放射輝度 10^5 (平均) まで上昇した際、マウスを、基準の 1 日おき、1 4 日間の投薬レジメンを使用して抗 C D 2 0 スイッチを用いて治療した。これは、全てのマウス内で腫瘍を排除するのに効果的であった。再発を、3 匹のマウス中 1 匹の腫瘍を排除した追加の抗 C D 2 0 スイッチで治療した。C A R T - 1 9 群は、究極的にモデル 1 としての C D 1 9 - 陰性 R a j i 腫瘍量に屈する、細胞と動物との混合に対するわずかな活性を有した。

【 0 5 5 7 】

野生型 R a j i 細胞対 C D 1 9 - 陰性 R a j i 細胞の 4 9 : 1 の混合物を使用した第 3 のモデル(図 3 7 C)を、4 : 1 モデルと同様に実行した。腫瘍量(C D 1 9 - 陰性集団からと推定される)は、放射輝度 10^5 (平均) に上昇し、マウスを、基準の 1 日おき、1 4 日間の投薬レジメンを使用して抗 C D 2 0 スイッチで治療した。この群では、抗 C D

20 スイッチでの投薬を、抗CD19投与終了の1日後に開始した。第1および第2のモデルと同様に、CAR T19細胞は、野生型Raji細胞を排除したが、この群で再発する全ての腫瘍を有するCD19-陰性Raji細胞を排除しなかった。逆に、sCAR T細胞および抗CD19および抗CD20スイッチで治療された6匹のマウス中5匹は、投薬期間後、腫瘍を示さず、モデルの終了に近い1つの再発を有した。一緒に、第2および第3のモデルは、同じsCAR-T細胞は、同時よりむしろ連続して、異なる抗原に再指向され得ることを実証した。

【0558】

実施例10

同一遺伝子系

10

完全なマウス、同一遺伝子スイッチ可能なCAR-T細胞プラットフォームを開発し、免疫応答性動物モデルの文脈でsCAR-T細胞の活性を試験した。これらのモデルで、C3H免疫応答性マウスを、38c13腫瘍細胞株と共に使用した。手短に、マウスを、0日目に腫瘍SCで播種し、腫瘍は、500~1000mm³に確立された。マウスを次いで、シクロホスファミドでプレコンディショニングし、マウスsCAR-T細胞は、sCAR-T細胞の4時間後に始めて、1日おきに14日間継続するスイッチ用量で、24時間後に送達した。sCAR-T細胞の単一の用量のみが、動物に提供された。

【0559】

ヒンジ長さに基づいた差分活性を、ヒトCAR-T細胞に関する研究者の予備的な報告書に見出した。この効果が、マウス系内で観察されるかを決定するために、マウスsCARを、IgG4ショート、二量体ヒンジ(マウスsCAR SV-319-092)を抱えることで、またはマウスCD8ヒンジ(マウスsCAR SV-319-089)を用いてコンストラクト化した。コンストラクトは、図38に記載される)。インビボでのSV-319-092は、腫瘍の完全な排除を提供したが、SV-319-089は、顕著に弱い制御を有し、研究者の先行する結論を裏付けた。より短いヒンジは、より短い免疫シナプスのため、sCAR-T細胞内でより大きな有効性を提供する(図39A)。したがって、マウス系は、生理学的に、研究者のヒト系と同様のプラットフォームであり、sCAR-T細胞活性の研究に良く好適である。

20

【0560】

異なるヒンジコンストラクトを、次いで試験した。手短に、マウスsCAR-T細胞を、CD28(SV-319-090)、4-1BB(SV-391-091)、またはB28(SV-319-092)マウス共刺激分子(図38の群2)でコンストラクト化し、およびC3Hマウス内の38c13モデルで試験した。マウス共刺激ドメインを有するSV-319-090コンストラクトは、35日目現在の疾患に屈する全てのマウスで腫瘍量を制御することができなかった(データは示されず)。SV-391-091およびSV-319-092の両方は、全てのマウスで腫瘍を排除した(データは示されず)。これらの動物における投薬の第2および第3のサイクルは、図39Bの通り腫瘍排除およびsCAR-T細胞集団の周期的測定後に提供された。この実験では、マウスsCAR-T細胞は、SV-391-091 4-1BB系マウスsCAR-T細胞よりわずかに良好に拡大する、SV-319-092 28BB系マウスsCAR-T細胞でのそれぞれの投薬後に拡大した。したがって、この実験は、28BB系共刺激ドメインの拡大潜在性を実証した。マウスCD28系共刺激ドメインsCAR-T細胞を、35日を超えて生存できなかったそれらの失敗のため、この分析から除外した。

30

40

【0561】

SV-319-092 28BB系マウスsCAR-Tは、効率的にB細胞を排除することができた。B細胞とT細胞との両方が測定されるモデル(図39C)では、マウスsCAR-T細胞は、それぞれの投与後に拡大し、逆にB細胞集団に関与した。静止期は、それぞれの投薬期間の間に含まれた。静止期は、B細胞を、図39Cに示される通り、マウスを再配置するのを可能にした。

【0562】

50

スイッチ投薬が、メモリーマウス s C A R - T 細胞モデルへの効果を有するかを決定するために、S V - 3 1 9 - 0 9 2 細胞、腫瘍のないプレコンディショニングマウスに注射した。投薬は次いで、4つの異なるレジメン(図39D):高(5mg/kg)または低(0.2mg/kg)、短い(4用量)または長い(12用量)の投薬期間の間、1日おきに静脈内注射を使用して提供された。これを、1日おきに8用量の既存の投薬レジメンと比較した。これらの投薬期間の後、図39Dに示される静止期が続いた。静止期後、投薬を、なお1日おきの投薬で以前と同じレジメンを受け取るそれぞれの群で再開した。4用量後(合計6日)、T細胞カウントおよび表現型を測定した。著しく、高、短い群は、他の群と比較して 10^3 倍の拡大を実証した。この拡大は、一過性であり、投薬を停止した後に低下した。この発見は、マウス s C A R - T 細胞が、それらの以前の投薬レジメンのメモリーを有したことを実証し、静止期後に再同期される再、そのメモリーは呼び戻され、細胞の大きな拡大を生成する。図39E内の細胞の表現型は、拡大が、35日目で優位にエフェクターメモリーCD8細胞であったことを例証する。投薬を停止した後、53日目に、エフェクターメモリー集団の収縮が観察されたが、中央メモリー集団は、35日目と比較的同様であった。この発見は、スイッチによって提供される s C A R - T 細胞活性にわたる時間的制御の有用性を強調する。

10

参考文献

1. Zola H, et al. Preparation and characterization of a chimeric CD19 monoclonal antibody. *Immunology and cell biology*. 1991; 69 (Pt 6): 411 - 22. Epub 1991/12/01. doi: 10.1038/icb.1991.58. PubMed PMID: 1725979.
2. Porter DL, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *New England journal of medicine*. 2011; 365 (8): 725 - 33. Epub 2011/08/13. doi: 10.1056/NEJMoa1103849. PubMed PMID: 21830940.
3. Grupp SA, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *New England journal of medicine*. 2013; 368 (16): 1509 - 18. Epub 2013/03/27. doi: 10.1056/NEJMoa1215134. PubMed PMID: 23527958.
4. Porter DL, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science translational medicine*. 2015; 7 (303): 303ra139. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5415. PubMed PMID: 26333935.
5. Rodgers DT, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*. 2016; 113 (4): E459 - 68. doi: 10.1073/pnas.1524155113. PubMed PMID: 26759369.
6. Zhang, H., et al., 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8+ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy. *J Immunol*, 2007. 179 (7): p. 4910 - 8.
7. Zhong, X. S., et al., Chimeric antigen rece

20

30

40

50

ptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther*, 2010. 18(2): p. 413-20.

8. Kagoya, Y., et al., Transient stimulation expands superior antitumor T cells for adoptive therapy. *JCI Insight*, 2017. 2(2): p. e89580.

9. Hanes, J., et al., Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(24): p. 14130-5.

10

10. Zahnd, C., et al., Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment(scFv) with low picomolar affinity. *J Biol Chem*, 2004. 279(18): p. 18870-7.

11. Berger, C., et al., Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 2006. 107(6): p. 2294-302.

20

12. Jensen, M.C., et al., Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010. 16(9): p. 1245-56.

30

13. Maus, M.V., et al., T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol Res*, 2013. 1(1): p. 26-31.

14. Gargett, T., et al., GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade. *Mol Ther*, 2016. 24(6): p. 1135-49.

40

15. Nieba, L., et al., Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng*, 1997. 10(4): p. 435-44.

16. Honegger, A. and A. Pluckthun, Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool. *J Mol Biol*, 2001. 309(3): p. 657-7

50

0 .

17. Long, A. H., et al., 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. Nat Med, 2015. 21(6): p. 581-90.

上記に記載される様々な実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。この明細書に参照される、および/または出願データシートに列挙される米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許公開の全ては、参照によりその全体が本明細書に組込まれる。実施形態の態様は、なおさらなる実施形態を提供するために、様々な特許、出願、および公開の概念を用いる必要がある場合は、

10

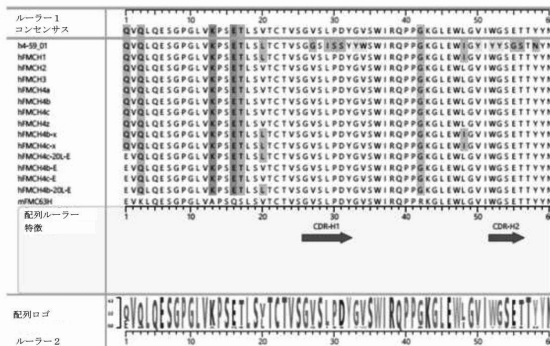
改変することができる。これらおよび他の変更を、上記の詳細の記載の観点から実施形態に行うことができる。一般に、以下の特許請求の範囲では、使用される用語は、特許請求の範囲を、本明細書に開示される具体的な実施形態および特許請求の範囲に限定すると解釈されるべきではないが、かかる特許請求の範囲に権利が与えられる同等物の完全な範囲に沿った、全ての可能な実施形態を含むと解釈されるべきではない。それに合うように特許請求の範囲は本開示によって限定されない。

【図面】

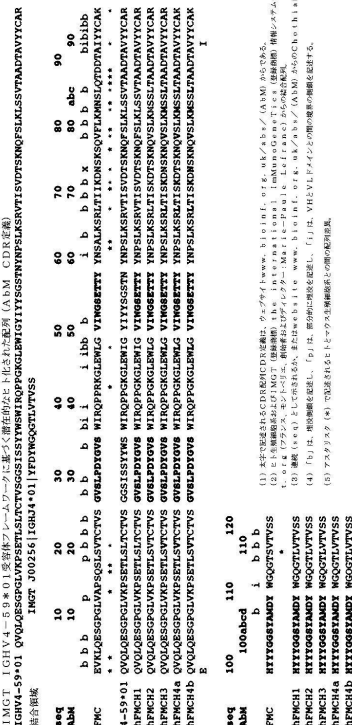
【図1A】

【図1B】

【図1A】



【図1B】



20

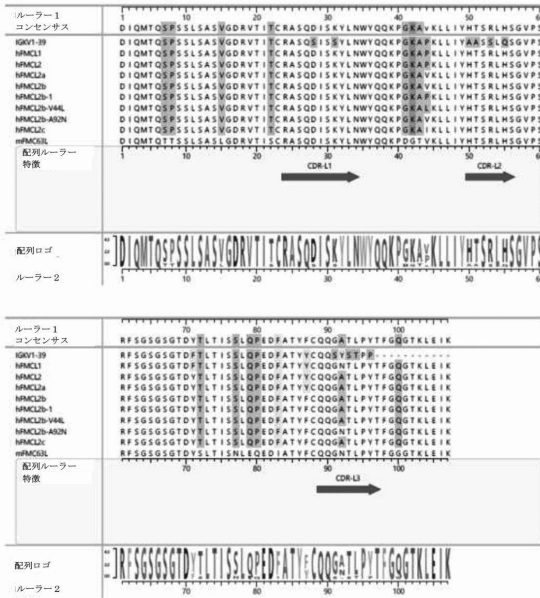
30

40

50

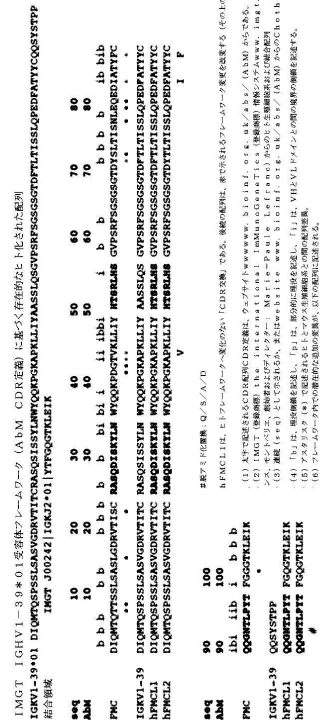
【図 2 A】

【図 2 A】



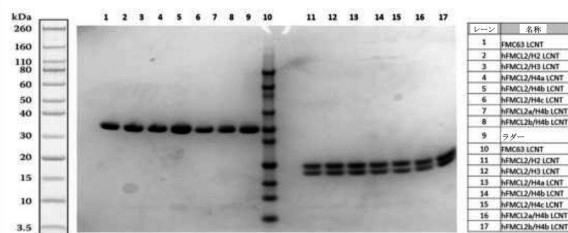
【図 2 B】

【図 2 B】



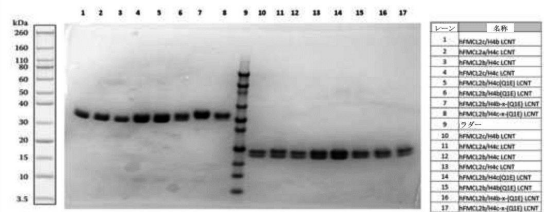
【図 3】

【図 3】



【図 4】

【図 4】



10

20

30

40

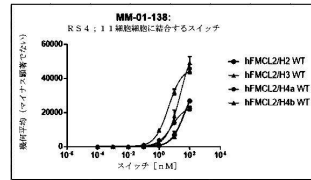
50

【図 5】

【図 5】

MM-1-138
WT スイッチ (すなわち、PNE でな

LC	HC	EC50
L2	H4	45.65
L2	H4	23.94
L2	H4	6.948
L2	H4	4.151

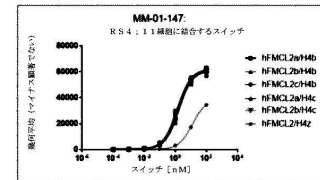


【図 6】

【図 6】

MM-1-147
LC HC EC50

L2a	H4b	1408
L2b	H4b	1279
L2c	H4b	1385
L2a	H4c	1794
L2b	H4c	138
L2	H4z	12.41

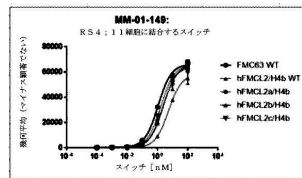


【図 7】

【図 7】

MM-1-149
LC HC EC50

L2	H4	1.107
L2	H4b	5.376
L2a	H4b	2.450
L2b	H4b	2.272
L2c	H4b	1.676

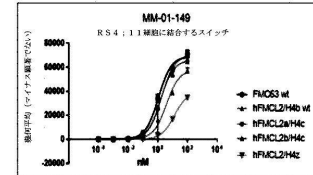


【図 8】

【図 8】

MM-1-149
LC HC EC50

L2	H4	1.154
L2	H4b	3.839
L2a	H4c	1.807
L2b	H4c	1.588
L2	H4z	13.67

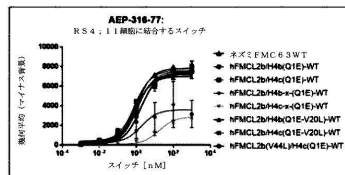


【図 9】

【図 9】

AEP-316-52
8/12/2016
WT スイッチ (すなわち、PNEでない)

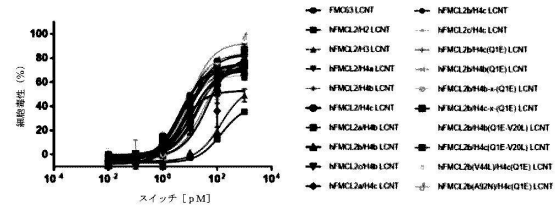
HC	LC
L2b(V44L)	H4c(Q1E)
L2b	H4c(Q1E-V20L)
L2b	H4b(Q1E-V20L)
L2b	H4c-x-(Q1E)
L2b	H4b-x-(Q1E)
L2b	H4b(Q1E)
L2b	H4c(Q1E)
LC	HC



【図 10】

【図 10】

DTR-5-15 ; RS 4 ; 11 細胞に対するヒト化された F
MC 63 スイッチを有する sCAR-T 細胞 (80% CAR⁺)
の LDH 細胞毒性アッセイ



10

20

30

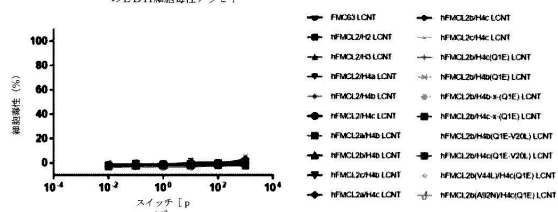
40

50

【 图 1 1 】

【图 1-1】

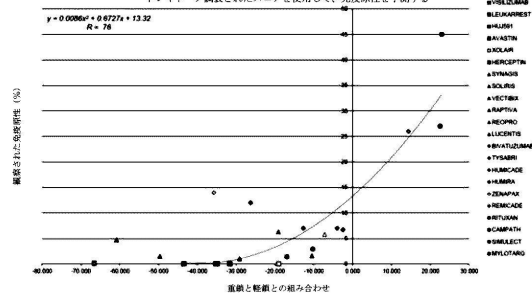
DTR-5-15: K562細胞に対するヒト化されたFM
C63スイッチを有するsCAR-T細胞(80%CAR⁺)
のLDH細胞毒性アッセイ



【 図 1 2 】

【图 1 2】

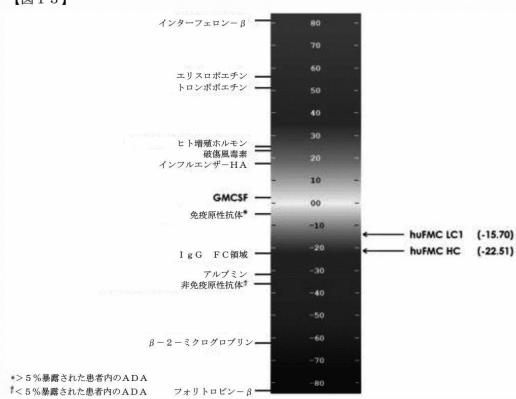
トレグトープ調製されたスコアを使用して、免疫原性を予測する



10

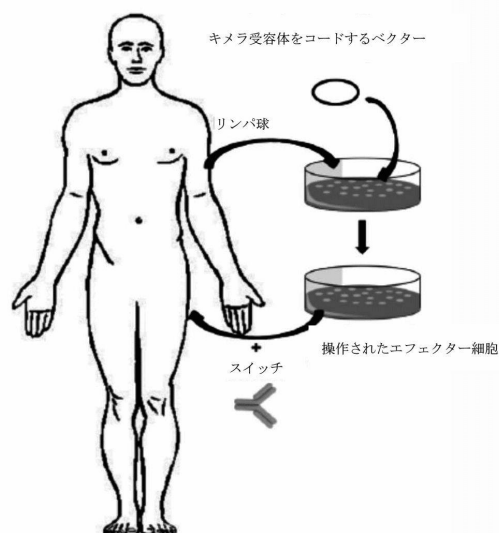
【 圖 1 3 】

【图 13】



【圖 14】

【图 14】



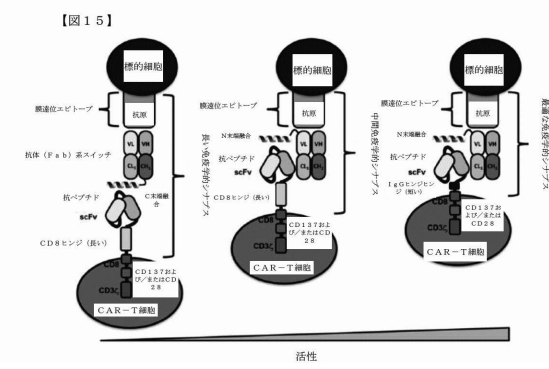
20

30

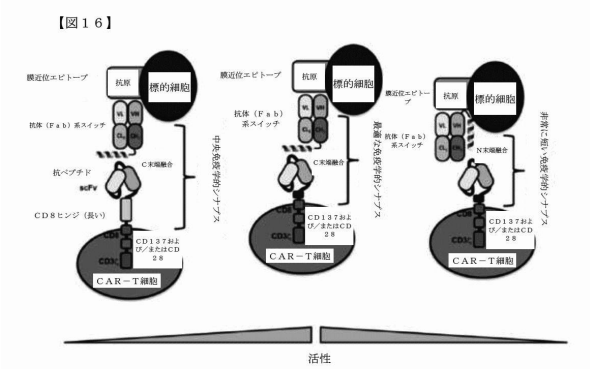
40

50

【図 15】

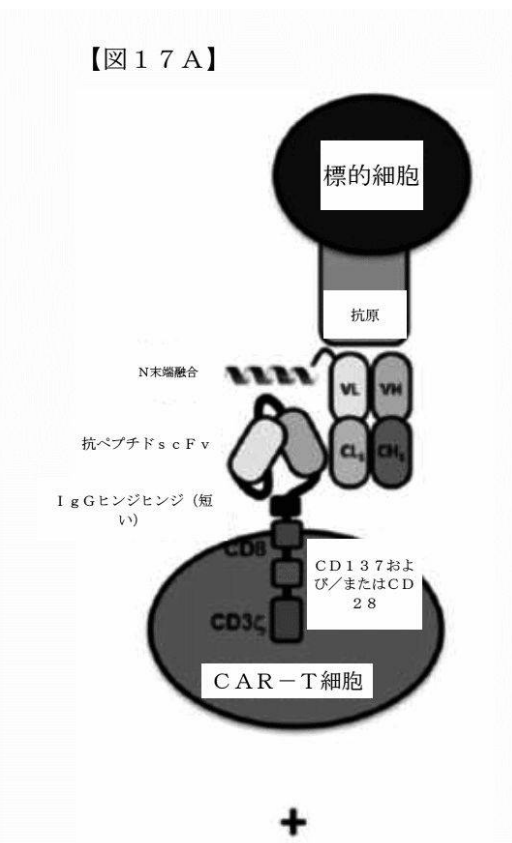


【図 16】

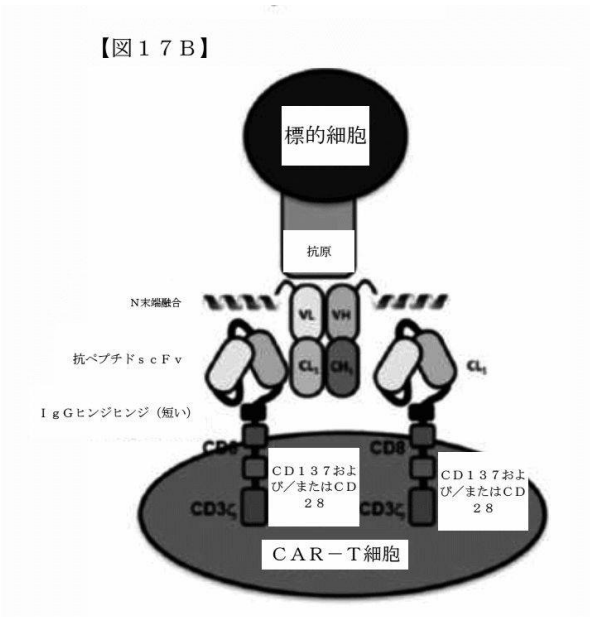


10

【図 17 A】



【図 17 B】



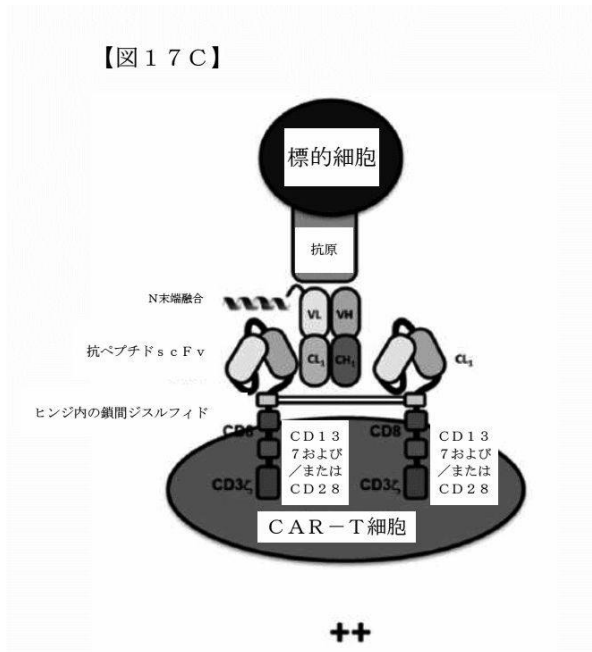
20

30

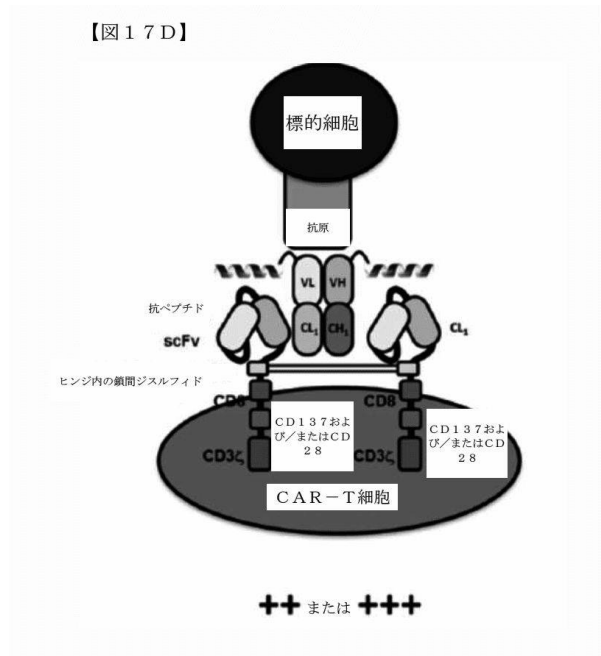
40

50

【図 17 C】



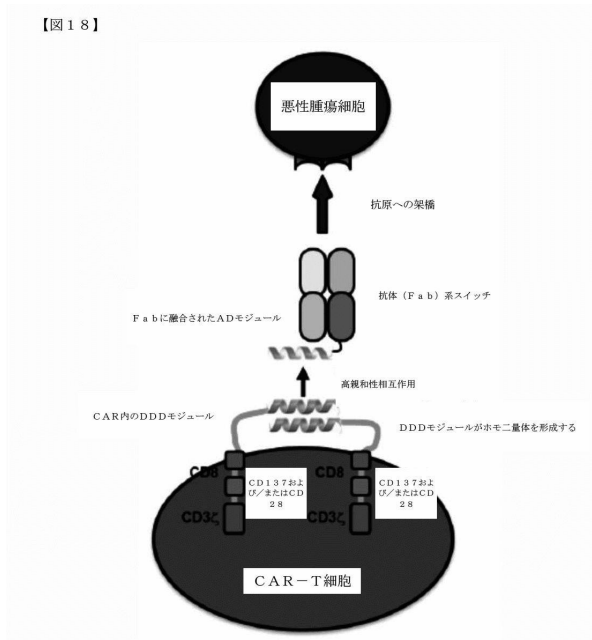
【図 17 D】



10

20

【図 18】



【図 19】

【図 19】

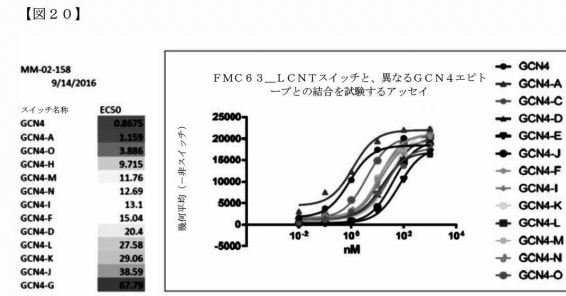
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	L	L	P	K	N	Y	H	L	E	N	E	V	A	R	L	K	K	L
修飾	L	L	P	K														
元々のペプチド					N	Y	H	L	E	N	E	V	A	R	L	K	K	L

30

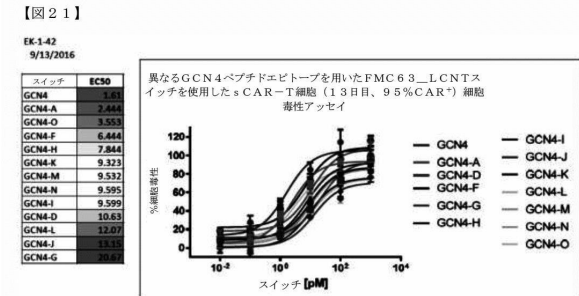
40

50

【図 20】



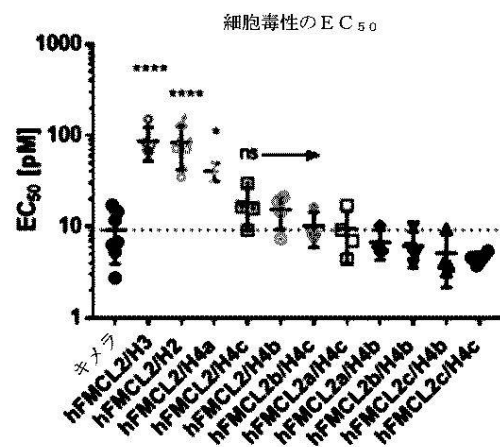
【図 21】



10

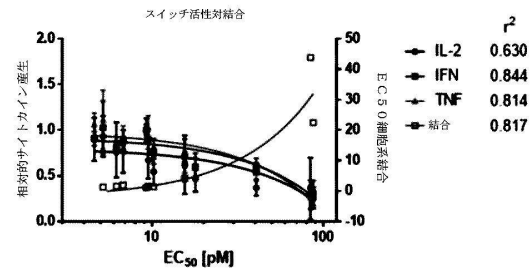
【図 22 A】

【図 22 A】



【図 22 B】

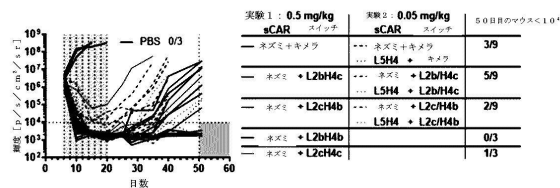
【図 22 B】



20

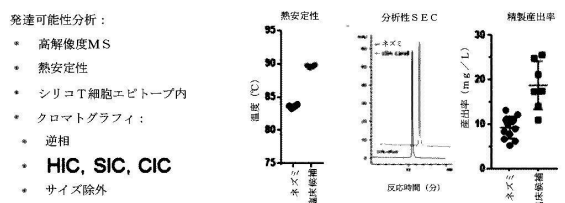
【図 22 C】

【図 22 C】



【図 22 D】

【図 22 D】



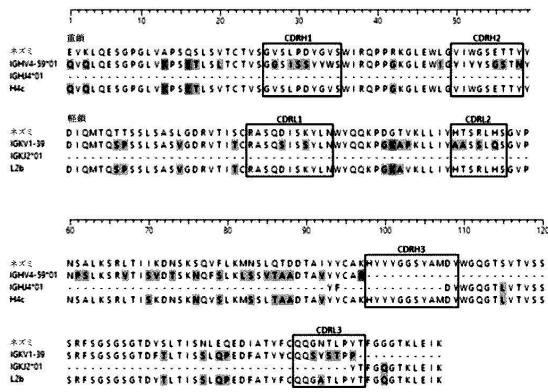
30

40

50

【図 2 3】

【図 2 3】



【図 2 4 A】

【図 2 4 A】

コンストラクト設計

クローン名称	図解	CDH1	CDH2	CDH3
TSY-2-193	A	CDH1	CDH2	CDH3
MM-Q2-107	B	CDH1	CDH2	CDH3
MM-Q2-83	C	CDH1	CDH2	CDH3
MM-Q2-85	D	CDH1	CDH2	CDH3
MM-Q2-84	E	CDH1	CDH2	CDH3
MM-Q2-86	F	CDH1	CDH2	CDH3
CART19	G	CDH1	CDH2	CDH3
MM-Q2-109	H	CDH1	CDH2	CDH3
MM-Q2-110		CDH1	CDH2	CDH3

【図 2 4 B】

【図 2 4 B】



【図 2 4 C】

【図 2 4 C】



10

20

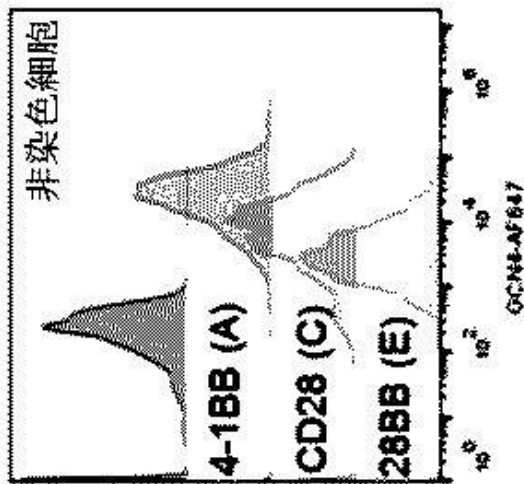
30

40

50

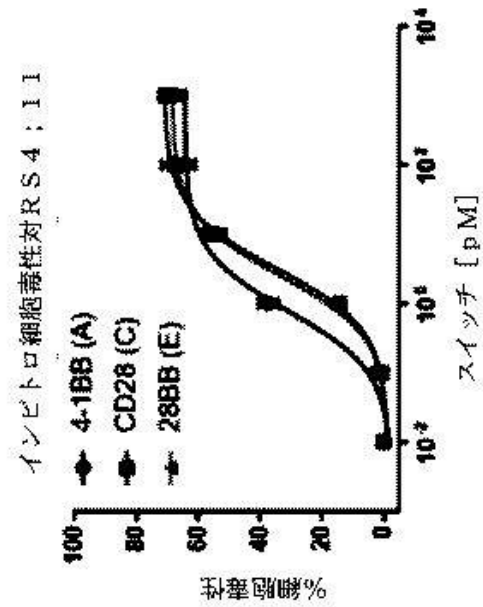
【図 25 A】

【図 25 A】



【図 25 B】

【図 25 B】



【図 25 C】

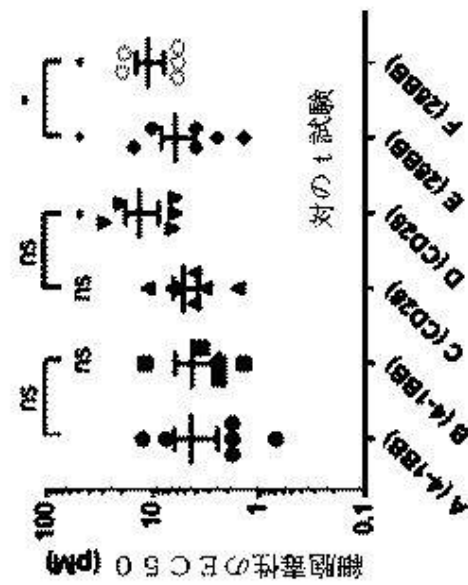
【図 25 C】

コンストラクトによるインビトロ細胞毒性 EC50

	コンストラクト	TM	抗原	EC50	SD
A	4-1BB	CD28	4-1BB	4.4	4.7
B	4-1BB	CD28	4-1BB	4.3	4.3
C	4-1BB	CD28	CD28	5.2	3.5
D	4-1BB	CD28	CD28	13.6	10.4
E	4-1BB	CD28	28BB	6.3	5.4
F	4-1BB	CD28	28BB	11.3	7.1

【図 25 D】

【図 25 D】



10

20

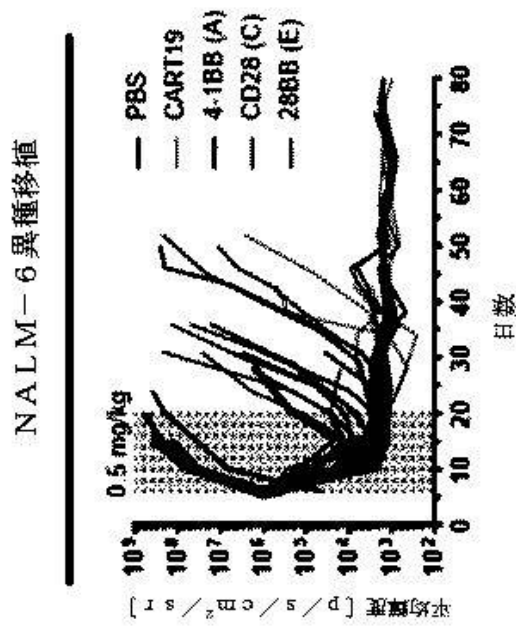
30

40

50

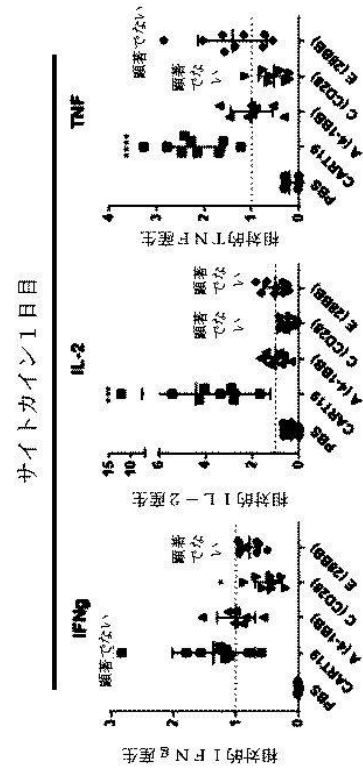
【図25E】

【図25E】



【図25F】

【図25F】

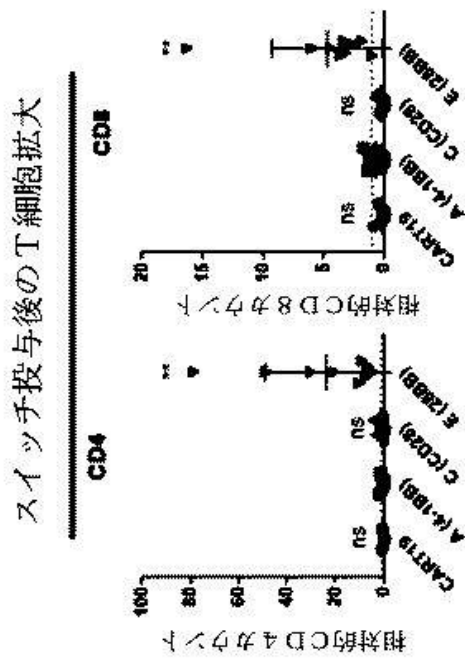


10

20

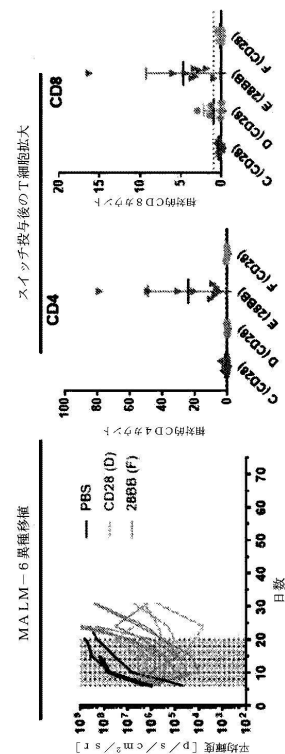
【図25G】

【図25G】



【図26】

【図26】



30

40

50

【図 27 A】

【図 27 A】



【図 27 C】

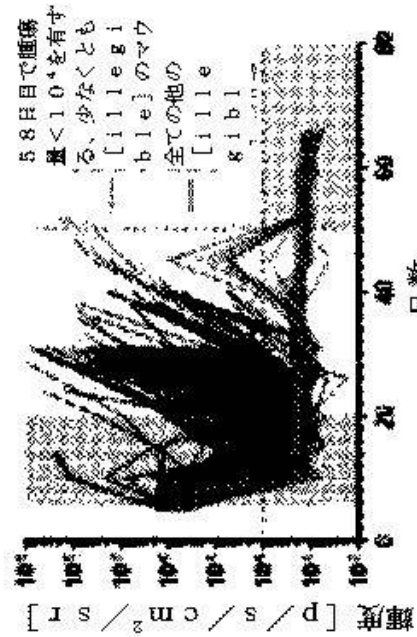
【図 27 C】

細胞バリエーション	細胞バリエーション		V125
	H4	IS	L109D
細胞バリエーション	A87D	B	D
	E6Q	C	E
	A87D		G

A ENH-G-78 (LS H4)
B ENH-G-52 (LS H4-A87D)
C ENH-G-53 (LS H4-A87D, E6Q)
D ENH-G-54 (LS-L109D H4-A87D)
E ENH-G-55 (LS-L109D H4-A87D, E6Q)
F ENH-G-56 (LS-V125, L109D H4-A87D)
G ENH-G-57 (LS-V125, L109D H4-A87D, E6Q)

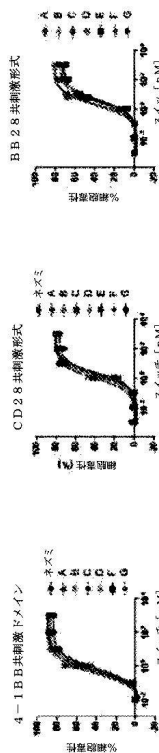
【図 27 B】

【図 27 B】



【図 27 D】

【図 27 D】



10

20

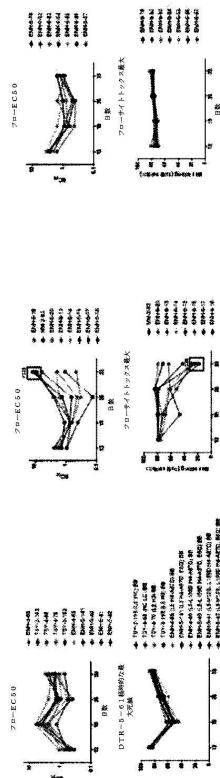
30

40

50

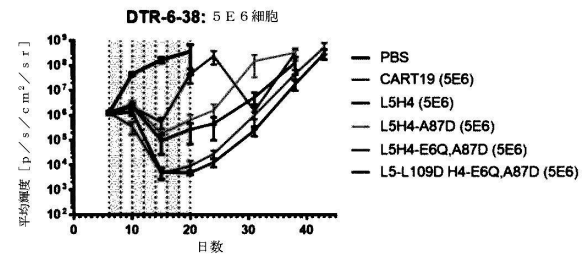
【図 3 5】

【図 3 5】



【図 3 6】

【図 3 6】

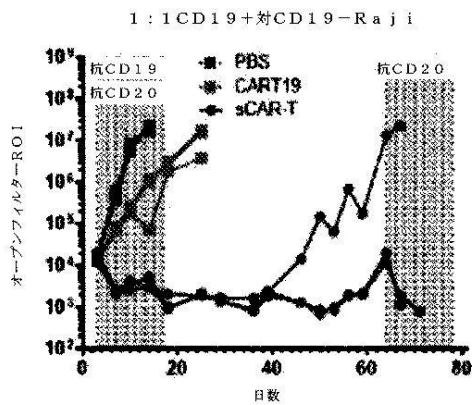


10

20

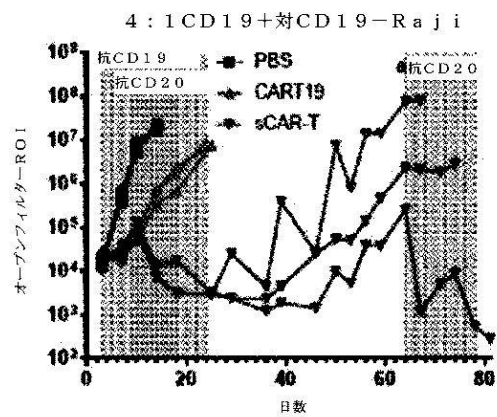
【図 3 7 A】

【図 3 7 A】



【図 3 7 B】

【図 3 7 B】



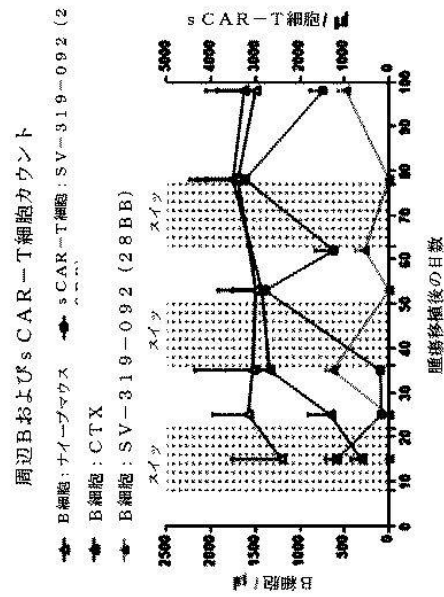
30

40

50

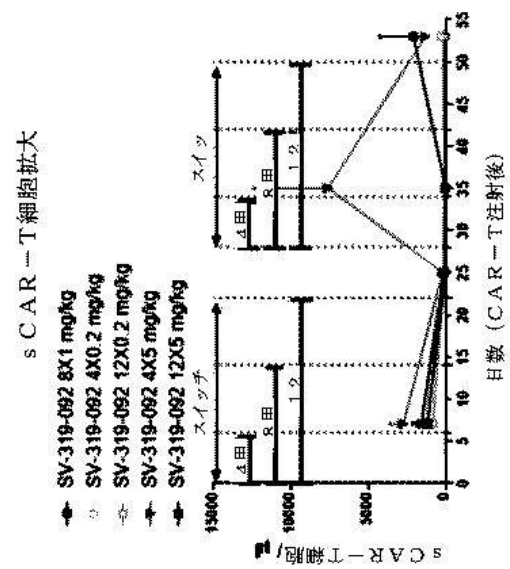
【図39C】

【図39C】



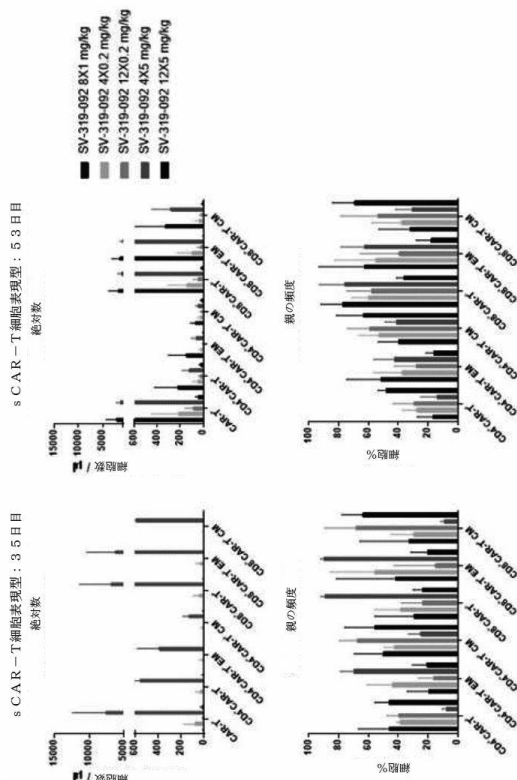
【図39D】

【図39D】



【図39E】

【図39E】



【配列表】

0007149935000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 C 0 7 K 7/08 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 C 0 7 K 7/08

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267

弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100182132

弁理士 河野 隆

(74)代理人 100172683

弁理士 綾 聡平

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ヤング, トラビス エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, ノース トリー パインズ ロード 1 1 1 9, スイート 1 0 0, ザ カリフォルニア インスティテュート フォー バイオメディカル リサーチ 気付

(72)発明者 ブレスタ, レオナルド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, ノース トリー パインズ ロード 1 1 1 9, スイート 1 0 0, ザ カリフォルニア インスティテュート フォー バイオメディカル リサーチ 気付

(72)発明者 ロジャース, デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, ノース トリー パインズ ロード 1 1 1 9, スイート 1 0 0, ザ カリフォルニア インスティテュート フォー バイオメディカル リサーチ 気付

(72)発明者 ハンプトン, エリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, ノース トリー パインズ ロード 1 1 1 9, スイート 1 0 0, ザ カリフォルニア インスティテュート フォー バイオメディカル リサーチ 気付

- (72)発明者 ライト, ティモシー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホーヤ, ノース トリー パインズ ロード 1
1119, スイート 100, ザ カリフォルニア インスティテュート フォー バイオメディカ
ル リサーチ 気付
- (72)発明者 シュルツ, ピーター ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホーヤ, ノース トリー パインズ ロード 1
1119, スイート 100, ザ カリフォルニア インスティテュート フォー バイオメディカ
ル リサーチ 気付
- (72)発明者 ラボーダ, エドゥアルド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホーヤ, ノース トリー パインズ ロード 1
1119, スイート 100, ザ カリフォルニア インスティテュート フォー バイオメディカ
ル リサーチ 気付
- (72)発明者 キアリーヴァ, エルヴィラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホーヤ, ノース トリー パインズ ロード 1
1119, スイート 100, ザ カリフォルニア インスティテュート フォー バイオメディカ
ル リサーチ 気付
- (72)発明者 ヴィオー, ソフィー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホーヤ, ノース トリー パインズ ロード 1
1119, スイート 100, ザ カリフォルニア インスティテュート フォー バイオメディカ
ル リサーチ 気付
- 審査官 大久保 智之
- (56)参考文献 国際公開第2015/057834(WO, A1)
国際公開第2016/168773(WO, A2)
PNAS, 2016年01月12日, Vol. 113, No. 4, pp. E459-468, supplemental information, <http://www.pnas.org/content/113/4/E459>参照
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-90
C07K 16/00-46
C07K 19/00
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
UniProt/GenSeq
SwissProt/GenSeq