

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7648530号
(P7648530)

(45)発行日 令和7年3月18日(2025.3.18)

(24)登録日 令和7年3月10日(2025.3.10)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 40/31 (2025.01)	A 6 1 K 40/31	
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 40/42 (2025.01)	A 6 1 K 40/42	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
請求項の数 14 (全63頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-546259(P2021-546259)	(73)特許権者	516294849 バイオエヌテック セル アンド ジーン セラピーズ ゲーエムペーハー B I O N T E C H C E L L & G E N E T H E R A P I E S G M B H ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ アン デア ゴルトグルーベ 1 2 A n d e r G o l d g r u b e 1 2 5 5 1 3 1 M a i n z G e r m a n y
(86)(22)出願日	令和2年2月6日(2020.2.6)	(74)代理人	100110928 弁理士 速水 進治
(65)公表番号	特表2022-519713(P2022-519713 A)	(72)発明者	サヒン, ウグル ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ アン デル ゴールドグルーベ 1 2 バイ オエヌテック エスエー内
(43)公表日	令和4年3月24日(2022.3.24)		最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/052965		
(87)国際公開番号	WO2020/161224		
(87)国際公開日	令和2年8月13日(2020.8.13)		
審査請求日	令和5年1月30日(2023.1.30)		
(31)優先権主張番号	PCT/EP2019/053144		
(32)優先日	平成31年2月8日(2019.2.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		

(54)【発明の名称】 C A R操作されたT細胞およびサイトカインを含む治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

- a . 抗原を標的とするキメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように遺伝子改変された T 細胞、
- b . I L 2 または I L 2 をコードするポリヌクレオチド、および
- c . さらにサイトカインまたはさらにサイトカインをコードするポリヌクレオチドを含み、前記さらにサイトカインが、 I L 7 および I L 2 1 からなる群より選択される、医薬製剤。

【請求項2】

I L 2 をコードする前記ポリヌクレオチドが R N A である、請求項1に記載の医薬製剤。 10

【請求項3】

前記抗原もしくはその変異体、または前記抗原もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1または2に記載の医薬製剤。

【請求項4】

前記抗原もしくはその変異体をコードする前記ポリヌクレオチドが R N A である、請求項3に記載の医薬製剤。

【請求項5】

キットである、請求項1～4のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項6】

C A R を発現するように遺伝子改変された前記 T 細胞、前記 I L 2 もしくは I L 2 をコ 20

ードする前記ポリヌクレオチド、および前記さらなるサイトカインもしくはさらなるサイトカインをコードする前記ポリヌクレオチドを別々の容器中に含む、請求項 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 7】

医薬組成物である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 8】

IL 2 が延長薬物動態 (PK) IL 2 である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 9】

前記さらなるサイトカインが延長薬物動態 (PK) サイトカインである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

10

【請求項 10】

IL 2 が延長薬物動態 (PK) IL 2 であり、前記延長 PK IL 2 が、IL 2 部分と、血清アルブミン、またはそれらの変異体を含む融合タンパク質を含み、前記血清アルブミンがマウス血清アルブミンまたはヒト血清アルブミンを含み、ならびに / あるいは
前記さらなるサイトカインが延長薬物動態 (PK) サイトカインであり、前記延長 PK サイトカインが、サイトカイン部分と、血清アルブミン、またはそれらの変異体を含む融合タンパク質を含み、前記血清アルブミンがマウス血清アルブミンまたはヒト血清アルブミンを含む、請求項 8 または 9 に記載の医薬製剤。

【請求項 11】

IL 2 が延長薬物動態 (PK) IL 2 であり、前記延長 PK IL 2 が、IL 2 部分と、免疫グロブリン断片、またはそれらの変異体を含む融合タンパク質を含み、前記免疫グロブリン断片が免疫グロブリン Fc ドメインを含み、ならびに / あるいは
前記さらなるサイトカインが延長薬物動態 (PK) サイトカインであり、前記延長 PK サイトカインが、サイトカイン部分と、免疫グロブリン断片、またはそれらの変異体を含む融合タンパク質を含み、前記免疫グロブリン断片が免疫グロブリン Fc ドメインを含む、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

20

【請求項 12】

医薬用途のための、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 13】

前記医薬用途が、疾患または障害の治療的または予防的治療を含む、請求項 12 に記載の医薬製剤。

30

【請求項 14】

前記抗原が腫瘍関連抗原である、対象における癌を治療または予防するための方法で使用するための、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように操作された T 細胞の効果を増強するための方法および薬剤に関する。これらの方法および薬剤は、特に、CAR が向けられる抗原を発現する疾患細胞を特徴とする疾患の治療に有用である。具体的には、本開示は、キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように遺伝子改変された T 細胞を対象に提供すること、および IL 2 または IL 2 をコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含む方法に関する。本開示の方法は、IL 2 または IL 2 をコードするポリヌクレオチド、およびさらなるサイトカインまたはさらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドを投与することを含み得、さらなるサイトカインは IL 7 または IL 21 であり得る。CAR を発現するように遺伝子改変された T 細胞は、CAR を発現するように遺伝子改変された T 細胞を投与することによって、または CAR を発現するように遺伝子改変された T 細胞を対象において生成することによって、対象に提供され得る。本開示の方法は、抗原もしくはその変異体 (variant)、または抗原もしくはその変異体をコードする

40

50

ポリヌクレオチドを対象に投与することをさらに含み得、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は抗原を標的とする。特に好ましい一実施形態では、本開示に従って投与されるポリヌクレオチドはRNAである。

【背景技術】

【0002】

免疫系は、癌、自己免疫、アレルギー、および病原体関連疾患において重要な役割を果たす。T細胞は、ヒトおよび動物の細胞媒介性免疫において中心的な役割を果たす。T細胞による特定の抗原の認識および結合は、T細胞の表面に発現されるT細胞受容体(TCR)によって媒介される。T細胞のTCRは、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子に結合し、標的細胞の表面に提示される免疫原性ペプチド(エピトープ)と相互作用することができる。TCRの特異的結合は、増殖および成熟エフェクタT細胞への分化をもたらすT細胞内のシグナルカスケードを開始させる。

10

【0003】

TCRの多様性は、TCRの様々な構造領域をコードする遺伝子の様々な不連続セグメントの遺伝子再編成によって得られる。TCRは、1つの鎖と1つの鎖、または1つの鎖と1つの鎖で構成される。TCR / 鎖は、抗原認識に参与するN末端の高度に多型の可変領域と不変の定常領域とで構成される。遺伝子レベルでは、これらの鎖はいくつかの領域、すなわち可変(V)領域、多様性(D)領域(鎖と鎖のみ)、結合(J)領域および定常(C)領域に分けられる。T細胞の分化中に、1つのV領域、1つのD領域(鎖と鎖のみ)、1つのJ領域および1つのC領域遺伝子を再編成することによって特定のT細胞受容体遺伝子が作成される。TCRの多様性は、ランダムなヌクレオチドが組換え部位で導入および/または欠失される不正確なV-(D)-J再構成によってさらに増幅される。TCR遺伝子座の再構成はT細胞の成熟中にゲノム内で起こるため、各成熟T細胞は1つの特定の / TCRまたは / TCRのみを発現する。TCRは、TCR 鎖および 鎖のヘテロ二量体複合体、共受容体CD4またはCD8、およびCD3シグナル伝達モジュールを含む複雑なシグナル伝達機構の一部である。CD3鎖は細胞内で活性化シグナルを伝達するが、TCR / ヘテロ二量体は抗原認識のみに参与する。

20

【0004】

養子細胞移入(ACT)に基づく免疫療法は、低い前駆細胞頻度から臨床的に適切な細胞数までエクスピドで増殖させた後に非免疫レシピエントまたは自己宿主に移入される、以前に感作されたT細胞による受動免疫の一形態として広く定義することができる。ACT実験に使用されてきた細胞型は、リンホカイン活性化キラー(LAK)細胞(Mule, J. J. et al. (1984) *Science* 225, 1487-1489; Rosenberg, S. A. et al. (1985) *N. Engl. J. Med.* 313, 1485-1492)、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)(Rosenberg, S. A. et al. (1994) *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 1159-1166)、造血幹細胞移植(HSCT)後のドナーリンパ球および腫瘍特異的T細胞株またはクローン(Dudley, M. E. et al. (2001) *J. Immunother.* 24, 363-373; Yee, C. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16168-16173)である。養子T細胞移入は、CMVなどのヒトウイルス感染に対して治療活性を有することが示された。CMV感染および内因性潜在ウイルスの再活性化は、健康な個体では免疫系によって制御されるが、移植レシピエントまたはAIDS患者などの免疫無防備状態の個体では有意な罹患率および死亡率をもたらす。Riddellと共同研究者たちは、HLA適合CMV血清陽性移植ドナーに由来するCD8+CMV特異的T細胞クローンの移入後の免疫抑制患者における養子T細胞療法によるウイルス免疫の再構成を実証した(Riddell, S. R. (1992) *Science* 257, 238-241)。代替アプローチとして、ポリクローナルドナー由来のCMVまたはEBV特異的T細胞集団を移植レシピエントに移入し、移入されたT細胞の持続性を増加させた(Rooney, C. M. et al.

30

40

50

(1998) *Blood* 92, 1549 - 1555; Peggs, K. S. et al. (2003) *Lancet* 362, 1375 - 1377)。黒色腫の養子免疫療法のために、Rosenbergと共同研究者たちは、骨髄非破壊的リンパ球枯渇化学療法および高用量IL-2と組み合わせ、切除した腫瘍から単離し、インビトロで増殖させた自己腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を持続注入することに基づくACTアプローチを確立した。最近公表された臨床試験では、転移性黒色腫に罹患している治療患者の約50%の客観的奏効率が得られた(Dudley, M. E. et al. (2005) *J. Clin. Oncol.* 23: 2346 - 2357)。

【0005】

代替アプローチは、短時間のエキスピゴ培養中に定義された特異性の腫瘍反応性免疫受容体を発現するように再プログラムされた自己T細胞の養子移入とそれに続く患者への再注入である(Kershaw M. H. et al. (2013) *Nature Reviews Cancer* 13(8): 525 - 41)。この戦略は、腫瘍反応性T細胞が患者に存在しない場合でも、ACTを様々な一般的悪性腫瘍に適用可能にする。T細胞の抗原特異性はTCR鎖および鎖のヘテロ二量体複合体に全面的に依存するので、クローニングされたTCR遺伝子のT細胞への移入は、それらを目的の抗原へと再指向させる可能性を提供する。したがって、TCR遺伝子治療は、治療選択肢として自己リンパ球を用いた抗原特異的免疫療法を開発するための魅力的な戦略を提供する。TCR遺伝子導入の主な利点は、治療量の抗原特異的T細胞を数日以内に生産できること、および患者の内因性TCRレパートリには存在しない特異性を導入できることである。

【0006】

いくつかのグループは、TCR遺伝子導入が初代T細胞の抗原特異性を再指向する魅力的な戦略であることを明らかにした(Morgan, R. A. et al. (2003) *J. Immunol.* 171, 3287 - 3295; Cooper, L. J. et al. (2000) *J. Virol.* 74, 8207 - 8212; Fujio, K. et al. (2000) *J. Immunol.* 165, 528 - 532; Kessels, H. W. et al. (2001) *Nat. Immunol.* 2, 957 - 961; Dembic, Z. et al. (1986) *Nature* 320, 232 - 238)。ヒトにおけるTCR遺伝子療法の実現可能性は、Rosenbergと彼のグループによる悪性黒色腫の治療のための臨床試験で最初に実証された。黒色腫/メラノサイト抗原特異的TCRをレトロウイルスで形質導入した自己リンパ球の養子移入は、治療された黒色腫患者の最大30%で癌の退縮をもたらした(Morgan, R. A. et al. (2006) *Science* 314, 126 - 129; Johnson, L. A. et al. (2009) *Blood* 114, 535 - 546)。一方、TCR遺伝子療法の臨床試験は、多くの異なる腫瘍抗原を標的とする、黒色腫以外の癌にも拡大された(Park, T. S. et al., (2011) *Trends Biotechnol.* 29, 550 - 557)。

【0007】

定義された特異性の抗原標的受容体をT細胞に挿入するための遺伝子工学的アプローチの使用は、ACTの潜在的可能性を大きく拡大した。キメラ抗原受容体(CAR)は、細胞外抗原結合部分、最も一般的にはモノクローナル抗体からの一本鎖可変断片(scFv)に融合した細胞内T細胞シグナル伝達ドメインからなる抗原標的受容体の一種である。CARは、MHC媒介提示とは無関係に、細胞表面抗原を直接認識し、全ての患者で所与の抗原に特異的な単一の受容体構築物の使用を可能にする。最初のCARは、抗原認識ドメインをT細胞受容体(TCR)複合体のCD3活性化鎖に融合させた。その後のCAR反復には、CD28または4-1BB(CD137)およびOX40(CD134)などの様々なTNF受容体ファミリー分子からの細胞内ドメインを含む、CD3と連携した二次共刺激シグナルが含まれている。さらに、第3世代の受容体には、CD3に加えて、最も一般的にはCD28および4-1BBからの2つの共刺激シグナルが含まれる。第2および第3世代CARは、抗腫瘍効果を劇的に改善し、場合によっては進行癌の患者

10

20

30

40

50

において完全寛解を誘導した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】Mule, J. J. et al. (1984) Science 225, 1487 - 1489

【文献】Rosenberg, S. A. et al. (1985) N. Engl. J. Med. 313, 1485 - 1492)

【文献】Rosenberg, S. A. et al. (1994) J. Natl. Cancer Inst. 86, 1159 - 1166

【文献】Dudley, M. E. et al. (2001) J. Immunother. 24, 363 - 373

【文献】Yee, C. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16168 - 16173

【文献】Riddell, S. R. (1992) Science 257, 238 - 241

【文献】Rooney, C. M. et al. (1998) Blood 92, 1549 - 1555

【文献】Peggs, K. S. et al. (2003) Lancet 362, 1375 - 1377

【文献】Dudley, M. E. et al. (2005) J. Clin. Oncol. 23: 2346 - 2357

【文献】Kershaw M. H. et al. (2013) Nature Reviews Cancer 13(8): 525 - 41

【文献】Morgan, R. A. et al. (2003) J. Immunol. 171, 3287 - 3295

【文献】Cooper, L. J. et al. (2000) J. Virol. 74, 8207 - 8212

【文献】Fujio, K. et al. (2000) J. Immunol. 165, 528 - 532

【文献】Kessels, H. W. et al. (2001) Nat. Immunol. 2, 957 - 961

【文献】Dembic, Z. et al. (1986) Nature 320, 232 - 238)

【文献】Morgan, R. A. et al. (2006) Science 314, 126 - 129

【文献】Johnson, L. A. et al. (2009) Blood 114, 535 - 546

【文献】Park, T. S. et al., (2011) Trends Biotechnol. 29, 550 - 557

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

一般に、移入されたT細胞の数は治療応答と相関すると考えられている。しかしながら、養子T細胞移入のために患者に投与することができる細胞の数は限られており、養子T細胞移入のための大量のT細胞の生成は依然として課題である。患者がTILまたは受容体操作T細胞のいずれかの注入前にリンパ球枯渇準備レジメンを受けた場合、細胞持続性の実質的な増加が達成され得る。しかし、大量の操作されたT細胞を空の宿主に移入することは、標的抗原が関連する正常組織で予期せずに発現された場合に重篤な有害事象のリスクももたらす。したがって、安全であることが証明された後に、患者において増殖することができる限られた量の操作されたT細胞を移入することが望ましいであろう。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、任意で I L 7 または I L 2 1 などのさらなるサイトカインをコードする R N A と組み合わせて I L 2 をコードする R N A を投与し、任意で R N A ワクチン接種を使用して C A R - T 細胞刺激のための抗原を提供することによって、対象において C A R - T 細胞を増殖させることが可能であることを見出した。本発明の方法は、少量の C A R 操作 T 細胞のみを患者に提供し、次いで T 細胞をインビボで増殖させることを可能にする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明は、一般に、細胞表面に抗原を発現する疾患細胞、特に細胞表面に腫瘍抗原を発現する癌細胞などの細胞表面に抗原を発現する細胞を標的とすることによる疾患の治療を包含する。この方法は、自らの表面に抗原を発現する細胞の選択的根絶を提供し、それによって抗原を発現しない正常細胞への有害作用を最小限に抑える。抗原への結合を介して細胞を標的とするキメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように遺伝子改変された T 細胞は、T 細胞の投与などによって対象に提供される。I L 2 またはそれをコードする核酸が投与される。一実施形態では、I L 7 もしくは I L 2 1 などのさらなるサイトカインまたはそれをコードする核酸が投与される。一実施形態では、抗原もしくはその変異体またはそれをコードする核酸を投与して、T 細胞の刺激、プライミングおよび / または拡大のための抗原を提供する (任意で適切な標的細胞による核酸の発現後に) 。患者において刺激、プライミングおよび / または拡大された T 細胞は、疾患細胞などの細胞表面に抗原を発現する細胞を認識することができ、疾患細胞の根絶をもたらす。本アプローチは、受動免疫化および能動免疫化を含むと考えることができる。C A R を発現するように遺伝子改変された T 細胞の投与を含む治療は、受動免疫化の一形態と見なすことができる。抗原またはその変異体の投与を含み、それによって標的細胞集団または組織に対する T 細胞媒介免疫応答を刺激する治療は、能動免疫化の一形態と見なすことができる。

【 0 0 1 2 】

本開示による免疫応答は、哺乳動物において抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対するものであり、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように遺伝子改変された T 細胞は抗原を標的とする。本方法は、任意で、抗原またはその変異体の投与も含む。一実施形態では、免疫応答は T 細胞媒介免疫応答である。一実施形態では、免疫応答は抗腫瘍免疫応答であり、標的細胞集団または標的組織は腫瘍細胞または腫瘍組織である。

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載される方法および薬剤は、薬物動態修飾基に結合した I L 2 (以下、「延長薬物動態 (P K) I L 2 」と称する。) をコードする R N A を、任意で薬物動態修飾基に結合した I L 7 または I L 2 1 などのさらなるサイトカイン (以下、「延長薬物動態 (P K) サイトカイン」と称する。) をコードする R N A と組み合わせて投与した場合に特に有効である。本明細書に記載される方法および薬剤は、延長 P K I L 2 をコードする R N A および / または延長 P K サイトカインをコードする R N A が、全身アベイラビリティのために肝臓を標的とする場合に特に有効である。肝細胞は効率的にトランスフェクトすることができ、大量のタンパク質を産生することができる。抗原をコードする R N A は、好ましくは二次リンパ器官を標的とする。

【 0 0 1 4 】

一態様では、本発明は、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、
 a . キメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように遺伝子改変された T 細胞を対象に提供すること、および
 b . I L 2 または I L 2 をコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含む方法を提供する。

【 0 0 1 5 】

一実施形態では、この方法は、I L 2 または I L 2 をコードするポリヌクレオチド、およびさらなるサイトカインまたはさらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドを投与することを含む。一実施形態では、さらなるサイトカインは、I L 7 および I L 2 1

10

20

30

40

50

からなる群より選択される。一実施形態では、この方法は、IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチド、およびIL7またはIL7をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む。一実施形態では、この方法は、IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチド、およびIL21またはIL21をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む。

【0016】

一実施形態では、IL2をコードするポリヌクレオチドはRNAであり、任意で、さらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドはRNAである。

【0017】

一実施形態では、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を投与することによって、またはCARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を対象において生成することによって、対象に提供される。

10

【0018】

一実施形態では、この方法は、抗原もしくはその変異体、または抗原もしくは変異体をコードするポリヌクレオチドを対象に投与することをさらに含み、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は抗原を標的とし、免疫応答は、抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答である。一実施形態では、抗原または変異体をコードするポリヌクレオチドはRNAである。

【0019】

一態様では、本発明は、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、

20

a. キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されたT細胞を対象に提供すること、および

b. IL2をコードするRNAを対象に投与すること

を含む方法を提供する。

【0020】

一実施形態では、この方法は、IL2をコードするRNAおよびさらなるサイトカインをコードするRNAを投与することを含む。一実施形態では、さらなるサイトカインは、IL7およびIL21からなる群より選択される。一実施形態では、この方法は、IL2をコードするRNAおよびIL7をコードするRNAを投与することを含む。一実施形態では、この方法は、IL2をコードするRNAおよびIL21をコードするRNAを投与することを含む。

30

【0021】

一実施形態では、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を投与することによって、またはCARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を対象において生成することによって、対象に提供される。

【0022】

一実施形態では、この方法は、抗原またはその変異体をコードするRNAを対象に投与することをさらに含み、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は抗原を標的とし、免疫応答は、抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答である。

【0023】

全ての態様の一実施形態では、免疫応答はT細胞媒介免疫応答である。

40

【0024】

一態様では、本発明は、抗原の発現または発現上昇に関連する疾患、障害または状態を有する対象を治療するための方法であって、

a. 抗原を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されたT細胞を対象に提供すること、および

b. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドを対象に投与すること

を含む方法を提供する。

【0025】

一実施形態では、この方法は、IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチド、お

50

よびさらなるサイトカインまたはさらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドを投与することを含む。一実施形態では、さらなるサイトカインは、IL7およびIL21からなる群より選択される。一実施形態では、この方法は、IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチド、およびIL7またはIL7をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む。一実施形態では、この方法は、IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチド、およびIL21またはIL21をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む。

【0026】

一実施形態では、IL2をコードするポリヌクレオチドはRNAであり、任意で、さらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドはRNAである。

10

【0027】

一実施形態では、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を投与することによって、またはCARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を対象において生成することによって、対象に提供される。

【0028】

一実施形態では、この方法は、抗原もしくはその変異体、または抗原もしくは変異体をコードするポリヌクレオチドを対象に投与することをさらに含む。一実施形態では、抗原または変異体をコードするポリヌクレオチドはRNAである。

【0029】

一態様では、本発明は、抗原の発現または発現上昇に関連する疾患、障害または状態を有する対象を治療するための方法であって、

20

a. 抗原を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されたT細胞を対象に提供すること、および

b. IL2をコードするRNAを対象に投与することを含む方法を提供する。

【0030】

一実施形態では、この方法は、IL2をコードするRNAおよびさらなるサイトカインをコードするRNAを投与することを含む。一実施形態では、さらなるサイトカインは、IL7およびIL21からなる群より選択される。一実施形態では、この方法は、IL2をコードするRNAおよびIL7をコードするRNAを投与することを含む。一実施形態では、この方法は、IL2をコードするRNAおよびIL21をコードするRNAを投与することを含む。

30

【0031】

一実施形態では、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を投与することによって、またはCARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を対象において生成することによって、対象に提供される。

【0032】

一実施形態では、この方法は、抗原またはその変異体をコードするRNAを対象に投与することをさらに含む。

【0033】

全ての態様の一実施形態では、疾患、障害または状態は癌であり、抗原は腫瘍関連抗原である。

40

【0034】

全ての態様の一実施形態では、IIL2は、延長薬物動態(PK)IL2である。一実施形態では、延長PK IL2は融合タンパク質を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、IL2部分と、血清アルブミン、免疫グロブリン断片、トランスフェリン、Fn3、およびそれらの変異体からなる群より選択される部分とを含む。

【0035】

全ての態様の一実施形態では、さらなるサイトカイン、特にIL7またはIL21は、延長薬物動態(PK)サイトカイン、特に延長PK IL7または延長PK IL21であ

50

る。一実施形態では、延長PKサイトカイン、特に延長PK IL7または延長PK IL21は、融合タンパク質を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、さらなるサイトカインの部分、特にIL7部分またはIL21部分と、血清アルブミン、免疫グロブリン断片、トランスフェリン、Fn3、およびそれらの変異体からなる群より選択される部分とを含む。

【0036】

一実施形態では、血清アルブミンは、マウス血清アルブミンまたはヒト血清アルブミンを含む。一実施形態では、免疫グロブリン断片は、免疫グロブリンFcドメインを含む。

【0037】

全ての態様の一実施形態では、方法は、対象における癌を治療または予防するための方法であり、抗原は腫瘍関連抗原である。

10

【0038】

一態様では、本発明は、

- a. キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されたT細胞、および
 - b. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチド
- を含む医薬製剤を提供する。

【0039】

一実施形態では、医薬製剤は、IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチド、およびさらなるサイトカインまたはさらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、さらなるサイトカインは、IL7およびIL21からなる群より選択される。一実施形態では、医薬製剤は、IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチド、およびIL7またはIL7をコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、医薬製剤は、IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチド、およびIL21またはIL21をコードするポリヌクレオチドを含む。

20

【0040】

一実施形態では、IL2をコードするポリヌクレオチドはRNAであり、任意で、さらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドはRNAである。

【0041】

一実施形態では、医薬製剤は、抗原もしくはその変異体、または抗原もしくは変異体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は抗原を標的とする。一実施形態では、抗原または変異体をコードするポリヌクレオチドはRNAである。

30

【0042】

一実施形態では、医薬製剤はキットである。

【0043】

一実施形態では、医薬製剤は、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞、IL2もしくはIL2をコードするポリヌクレオチド、任意でさらなるサイトカインもしくはさらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチド、および任意で抗原もしくはその変異体または抗原もしくは変異体をコードするポリヌクレオチドを別々の容器中に含む。

【0044】

一実施形態では、医薬製剤は、癌を治療または予防するための医薬製剤の使用説明書をさらに含み、抗原は腫瘍関連抗原である。

40

【0045】

一実施形態では、医薬製剤は医薬組成物である。

【0046】

一実施形態では、医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤および/または賦形剤をさらに含む。

【0047】

一態様では、本発明は、

- a. キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されたT細胞、および

50

b. I L 2 をコードする R N A
を含む医薬製剤を提供する。

【 0 0 4 8 】

一実施形態では、医薬製剤は、I L 2 をコードする R N A およびさらなるサイトカインをコードする R N A を含む。一実施形態では、さらなるサイトカインは、I L 7 および I L 2 1 からなる群より選択される。一実施形態では、医薬製剤は、I L 2 をコードする R N A および I L 7 をコードする R N A を含む。一実施形態では、医薬製剤は、I L 2 をコードする R N A および I L 2 1 をコードする R N A を含む。

【 0 0 4 9 】

一実施形態では、医薬製剤は、抗原またはその変異体をコードする R N A をさらに含み、C A R を発現するように遺伝子改変された T 細胞は抗原を標的とする。

10

【 0 0 5 0 】

一実施形態では、医薬製剤はキットである。

【 0 0 5 1 】

一実施形態では、医薬製剤は、C A R を発現するように遺伝子改変された T 細胞、I L 2 をコードする R N A 、任意でさらなるサイトカインをコードする R N A 、および任意で抗原またはその変異体をコードする R N A を別々の容器中に含む。

【 0 0 5 2 】

一実施形態では、医薬製剤は、癌を治療または予防するための医薬製剤の使用説明書をさらに含み、抗原は腫瘍関連抗原である。

20

【 0 0 5 3 】

一実施形態では、医薬製剤は医薬組成物である。

【 0 0 5 4 】

一実施形態では、医薬組成物は、1 つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤および / または賦形剤をさらに含む。

【 0 0 5 5 】

全ての態様の一実施形態では、I I L 2 は、延長薬物動態 (P K) I L 2 である。一実施形態では、延長 P K I L 2 は融合タンパク質を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、I L 2 部分と、血清アルブミン、免疫グロブリン断片、トランスフェリン、F n 3 、およびそれらの変異体からなる群より選択される部分とを含む。

30

【 0 0 5 6 】

全ての態様の一実施形態では、さらなるサイトカインは、延長薬物動態 (P K) サイトカインである。一実施形態では、延長 P K サイトカインは融合タンパク質を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、サイトカイン部分と、血清アルブミン、免疫グロブリン断片、トランスフェリン、F n 3 、およびそれらの変異体からなる群より選択される部分とを含む。

【 0 0 5 7 】

一実施形態では、血清アルブミンは、マウス血清アルブミンまたはヒト血清アルブミンを含む。

【 0 0 5 8 】

一実施形態では、免疫グロブリン断片は、免疫グロブリン F c ドメインを含む。

40

【 0 0 5 9 】

一態様では、本発明は、医薬用途のための本明細書に記載の医薬製剤を提供する。一実施形態では、医薬用途は、疾患または障害の治療的または予防的治療を含む。

【 0 0 6 0 】

一態様では、本発明は、対象における癌を治療または予防するための方法で使用するための本明細書に記載の医薬製剤を提供し、抗原は腫瘍関連抗原である。

【 0 0 6 1 】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の方法で使用するための本明細書に記載の薬剤および組成物を提供する。

50

【0062】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の方法で使用するための、抗原を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されたT細胞を提供する。

【0063】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の方法で使用するためのIL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0064】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の方法で使用するための、IL7またはIL21などのIL2以外のサイトカインまたはそれをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0065】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の方法で使用するための抗原もしくはその変異体、または抗原もしくはその変異体をコードする核酸を提供する。

【0066】

医薬製剤の一実施形態では、RNAは、液体形態、固体形態、またはそれらの組合せから選択される形態で存在する。一実施形態では、固体形態は、凍結形態または脱水形態である。一実施形態では、脱水形態は、凍結乾燥形態または噴霧乾燥形態である。

【0067】

一実施形態では、本明細書に記載の癌は、黒色腫、白血病、リンパ腫、肺癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、結腸癌、中皮腫、腎細胞癌、および脳の癌からなる群より選択される。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1A B】図1A~図1Dは、mAlb-mIL-2およびmIL-7-mAlbが、プレコンディショニングされたマウスにおいてインビボで遺伝子操作されたCAR T細胞のインサイチュ反復抗原特異的増殖を促進することを示す図である。(A) 2.5 Gy照射した(XRAD320) C57BL/6 BrdCrHsd-Tyr^cマウス(n=2~3匹/群)に、 5×10^6 個のCLDN6-CAR-BBz-Luc-GFP形質導入C57BL/6-Thy1.1⁺T細胞をi.v.移植した。1日後、マウスをhCLDN6またはOvaI(対照RNA)をコードするmRNAリポプレックスワクチン接種(20 μg, i.v.)で処置し、続いてmAlb-mIL-2およびmIL-7-mAlbをコードするヌクレオチド修飾製剤化RNAをi.p.投与した(1 μg/mRNA/マウス)。緩衝液をモック対照として使用した。さらに7日後、処置を繰り返した。ACT後1日目(ベースライン)から15日目までの増殖および持続性を監視するために生物発光イメージング(BLI)を実施した。(B) 養子移入されたマウスCAR形質導入T細胞の導入遺伝子発現を示す図である。細胞を、CD8およびCD4に対する蛍光色素結合抗体、ならびにCLDN6-CARのscFv部分に対するイディオタイプ特異的抗体(抗IMAB206)で染色し、フローサイトメトリによって分析した。左：細胞を単一リンパ球でゲートした；右：細胞をCD8⁺T細胞でゲートした。

【図1C】(C) ACT、および示されているようにアルブミン-サイトカインをコードするmRNAと組み合わせた抗原RNA(LIP)による処置後の、様々な時点での側臥位のマウスの生物発光イメージングを示す図である。オフカラー画像は、グレースケール参照画像に重ね合わせた光の強度(黒色、最も弱い；白色から暗灰色、最も強い)を表す。

【図1D】(D) 1日目のベースラインと比較したACTの4日後および11日後の全光束の算出された増殖指数(平均±s.d.)を示す図である。ACT：養子T細胞移入、TBI：全身照射、BLI：生物発光イメージング、Luc：有効ホタルルシフェラーゼ、mAlb：マウス血清アルブミン、mIL-2：マウスインターロイキン2、mIL-7：マウスインターロイキン7。

【図2A】図2A~図2Cは、mAlb-mIL-2およびmIL-7-mAlbは、免疫適格マウスにおいても、インビボで抗原特異的に増殖したCAR T細胞の持続性を延長することを示す図である。(A) 非照射C57BL/6 BrdCrHsd-Tyr^cマウス(n=2~3匹/群)に、同じ用量のCAR形質導入T細胞を与え、図1A~1Bの

10

20

30

40

50

説明に記載されているように処置した。

【図2B】(B)ACT、および示されているようにアルブミン-サイトカインをコードするmRNAと組み合わせた抗原RNA(LIP)による処置後の様々な時点での側臥位のマウスの生物発光イメージングを示す図である。オフカラー画像は、グレースケール参照画像に重ね合わせた光の強度(黒色、最も弱い;白色から暗灰色、最も強い)を表す。

【図2C】(C)1日目のベースラインと比較したACTの4日後および11日後の全光束の増殖指数(平均±s.d.)を示す図である。ACT:養子T細胞移入、BLI:生物発光イメージング、Luc:有効ホタルルシフェラーゼ、mAlb:マウス血清アルブミン、mIL-2:マウスインターロイキン2、mIL-7:マウスインターロイキン7。

【図3A】図3A~図3Dは、mIL-7-mAlbまたはmIL-2-mAlbのいずれかと組み合わせたmAlb-mIL-2の存在は、インサイチュ反復抗原特異的増殖の蓄積および遺伝子操作されたCAR T細胞のインビボでの持続性の延長をもたらしたことを示す図である。(A)2.5Gy照射したC57BL/6BrdCrHsd-Tyrcマウス(n=2~3匹/群)に、図1Aについて説明しているように、同じ用量のCAR形質導入T細胞、および異なるヌクレオシド修飾製剤化サイトカインと組み合わせたhCLDN6またはOvaI(対照RNA)をコードするmRNAリポプレックスワクチン接種(使用した個々のmRNAにつき1μg/動物)を与えた。

【図3B】(B)処置したマウスの生物発光の相対的増加を3回のワクチン接種ラウンド中に定量化し、計算した(イメージングは通常、示された抗原-RNA(LIP)およびサイトカインRNA処置ラウンドの2~3日後に実施した)。増殖指数を以下のように計算した:それぞれの増殖ラウンドの全光束[p/s]/ACT後1日目のベースラインの全光束[p/s](平均±s.e.m.)。

【図3CD】(C-D)示されているヌクレオシド修飾製剤化サイトカインRNAの存在下でのCLDN6-RNA(LIP)による増殖ラウンド中および増殖ラウンド後の生物発光の定量化(平均±s.e.m.)を示す図である。矢印は、hCLDN6-RNA(LIP)ワクチン接種およびヌクレオシド修飾製剤化サイトカイン(リポサイトカイン)処置を示す。ACT:養子T細胞移入、TBI:全身照射、BLI:生物発光イメージング、Luc:有効なホタルルシフェラーゼ、mAlb:マウス血清アルブミン、mIL-2:マウスインターロイキン2、mIL-7:マウスインターロイキン7。

【発明を実施するための形態】

【0069】

本開示を以下で詳細に説明するが、この開示は本明細書に記載される特定の方法論、プロトコルおよび試薬に限定されず、これらは異なり得ることが理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、本開示の範囲を限定することを意図するものではなく、本開示の範囲は付属の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0070】

好ましくは、本明細書で使用される用語は、"A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H. G. W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kolbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995)に記載されているように定義される。

【0071】

本開示の実施は、特に指示されない限り、当技術分野の文献(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 198

10

20

30

40

50

9 参照)で説明されている化学、生化学、細胞生物学、免疫学、および組換えDNA技術の従来の方法を用いる。

【0072】

以下において、本開示の要素を説明する。これらの要素を具体的な実施形態と共に列挙するが、それらは、さらなる実施形態を創出するために任意の方法および任意の数で組み合わせてもよいことが理解されるべきである。様々に説明される例および実施形態は、本開示を明示的に記載される実施形態のみに限定すると解釈されるべきではない。この説明は、明示的に記載される実施形態を任意の数の開示される要素と組み合わせた実施形態を開示し、包含すると理解されるべきである。さらに、説明される全ての要素の任意の並び替えおよび組合せは、文脈上特に指示されない限り、この説明によって開示されていると見なされるべきである。

10

【0073】

「約」という用語はおよそまたはほぼを意味し、一実施形態では本明細書に記載の数値または範囲の文脈において、列挙または特許請求される数値または範囲の $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または $\pm 3\%$ を意味する。

【0074】

本開示を説明する文脈において(特に特許請求の範囲の文脈において)使用される「1つの」("a" and "an")および「その」("the")という用語ならびに同様の言及は、本明細書で特に指示されない限り、または文脈上明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を包含すると解釈されるべきである。本明細書における値の範囲の列挙は、単に、その範囲内に属するそれぞれ別々の値を個別に言及することの簡略方法として機能することが意図されている。本明細書で特に指示されない限り、各個別の値は、本明細書で個別に列挙されているかのごとくに本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書で特に指示されない限り、または文脈上明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供されるありとあらゆる例または例示的言語(例えば「など」)の使用は、単に本開示をより良く説明することを意図しており、特許請求の範囲に限定を課すものではない。本明細書中のいかなる言語も、本開示の実施に必須の特許請求されていない要素を指示すると解釈されるべきではない。

20

【0075】

特に明記されない限り、「含む」という用語は、「含む」によって導入されたりリストのメンバーに加えて、さらなるメンバーが任意に存在し得ることを示すために本文書の文脈で使用される。しかし、「含む」という用語は、さらなるメンバーが存在しない可能性を包含することが本開示の具体的な実施形態として企図され、すなわち、この実施形態の目的のためには、「含む」は「からなる」の意味を有すると理解されるべきである。

30

【0076】

本明細書の本文全体を通していくつかの資料を引用する。本明細書で引用される各資料(全ての特許、特許出願、科学刊行物、製造者の仕様書、説明書などを含む)は、上記または下記のいずれでも、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書のいかなる内容も、本開示がそのような開示に先行する権利を有さなかったことの承認と解釈されるべきではない。

40

【0077】

以下において、本開示の全ての態様に適用される定義を提供する。以下の用語は、特に指示されない限り、以下の意味を有する。未定義の用語は、それらの技術分野で広く認められている意味を有する。

【0078】

本開示によれば、「ペプチド」という用語は、オリゴペプチドおよびポリペプチドを含み、約2個以上、約3個以上、約4個以上、約6個以上、約8個以上、約10個以上、約13個以上、約16個以上、約20個以上、および最大約50個、約100個または約150個までの、ペプチド結合によって互いに連結された連続するアミノ酸を含む物質を指す。「タンパク質」または「ポリペプチド」という用語は、大きなペプチド、特に少なく

50

とも約151個のアミノ酸を有するペプチドを指すが、「ペプチド」、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書では通常同義語として使用される。

【0079】

「治療用タンパク質」は、治療有効量で対象に提供された場合、対象の状態または病状に対してプラスのまたは有利な効果を及ぼす。一実施形態では、治療用タンパク質は治療的または緩和的特性を有し、疾患または障害の1つ以上の症状を改善する、緩和する、和らげる、逆転させる、発症を遅延させる、または重症度を軽減するために投与され得る。治療用タンパク質は予防特性を有し、疾患の発症を遅延させるため、またはそのような疾患もしくは病的状態の重症度を軽減するために使用され得る。「治療用タンパク質」という用語は、タンパク質またはペプチド全体を含み、治療的に活性なその断片を指すこともできる。それはまた、タンパク質の治療的に活性な変異体を含み得る。治療的に活性なタンパク質の例には、サイトカインが含まれるが、これに限定されない。

10

【0080】

アミノ酸配列（ペプチドまたはタンパク質）に関する「断片」は、アミノ酸配列の一部、すなわちN末端および/またはC末端で短縮されたアミノ酸配列を表す配列に関する。C末端で短縮された断片（N末端断片）は、例えばオープンリーディングフレームの3'末端を欠くトランケートされたオープンリーディングフレームの翻訳によって得られる。N末端で短縮された断片（C末端断片）は、トランケートされたオープンリーディングフレームが翻訳を開始させるように働く開始コドンを含む限り、例えばオープンリーディングフレームの5'末端を欠くトランケートされたオープンリーディングフレームの翻訳によって得られる。アミノ酸配列の断片は、例えばアミノ酸配列からのアミノ酸残基の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%を含む。アミノ酸配列の断片は、好ましくはアミノ酸配列からの少なくとも6個、特に少なくとも8個、少なくとも12個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも50個、または少なくとも100個の連続するアミノ酸を含む。

20

【0081】

本開示の目的のために、アミノ酸配列（ペプチドまたはタンパク質）の「変異体」は、アミノ酸挿入変異体、アミノ酸付加変異体、アミノ酸欠失変異体および/またはアミノ酸置換変異体を含む。「変異体」という用語は、特にアミノ酸配列の断片を含む。

【0082】

アミノ酸挿入変異体は、特定のアミノ酸配列中に1個または2個以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列変異体の場合、1個以上のアミノ酸残基がアミノ酸配列の特定の部位に挿入されるが、結果として生じる産物の適切なスクリーニングを伴うランダム挿入も可能である。アミノ酸付加変異体は、1個以上のアミノ酸、例えば1個、2個、3個、5個、10個、20個、30個、50個、またはそれ以上のアミノ酸のアミノ末端および/またはカルボキシ末端融合を含む。アミノ酸欠失変異体は、配列からの1個以上のアミノ酸の除去、例えば1個、2個、3個、5個、10個、20個、30個、50個、またはそれ以上のアミノ酸の除去を特徴とする。欠失はタンパク質の任意の位置にあってよい。タンパク質のN末端および/またはC末端に欠失を含むアミノ酸欠失変異体は、N末端および/またはC末端切断変異体とも呼ばれる。アミノ酸置換変異体は、配列内の少なくとも1個の残基が除去され、別の残基がその位置に挿入されていることを特徴とする。相同なタンパク質もしくはペプチド間で保存されていないアミノ酸配列の位置にある修飾、および/またはアミノ酸を類似の性質を有する他のアミノ酸で置き換えることが好ましい。好ましくは、ペプチドおよびタンパク質変異体におけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち同様に荷電したアミノ酸または非荷電アミノ酸の置換である。保存的アミノ酸変化には、その側鎖が関連するアミノ酸のファミリーの1つの置換が含まれる。天然に存在するアミノ酸は、一般に、酸性（アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性（リシン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、および非荷電極性（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシ

30

40

50

ン) アミノ酸の4つのファミリーに分けられる。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時に芳香族アミノ酸として一緒に分類されることがある。

【0083】

好ましくは、所与のアミノ酸配列と前記所与のアミノ酸配列の変異体であるアミノ酸配列との間の類似性、好ましくは同一性の程度は、少なくとも約60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%である。類似性または同一性の程度は、好ましくは、参照アミノ酸配列の全長の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または約100%であるアミノ酸領域について与えられる。例えば、参照アミノ酸配列が200個のアミノ酸からなる場合、類似性または同一性の程度は、好ましくは少なくとも約20個、少なくとも約40個、少なくとも約60個、少なくとも約80個、少なくとも約100個、少なくとも約120個、少なくとも約140個、少なくとも約160個、少なくとも約180個、または約200個のアミノ酸、好ましくは連続するアミノ酸について与えられる。好ましい実施形態では、類似性または同一性の程度は、参照アミノ酸配列の全長について与えられる。配列類似性、好ましくは配列同一性を決定するためのアラインメントは、当技術分野で公知のツールを用いて、好ましくは最適な配列アラインメントを使用して、例えばAlignを使用して、標準設定、好ましくはEMBOSS::ニードル、マトリックス: Blosum62、ギャップオープン10.0、ギャップ伸長0.5を使用して行うことができる。

10

20

【0084】

「配列類似性」は、同一であるかまたは保存的アミノ酸置換を表すアミノ酸の割合を示す。2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」は、これらの配列間で同一であるアミノ酸の割合を示す。

【0085】

「同一性パーセント」という用語は、最適なアラインメント後に得られる、比較する2つの配列間で同一であるアミノ酸残基の割合を示すことが意図されており、この割合は純粹に統計的であり、2つの配列間の相違はそれらの全長にわたってランダムに分布している。2つのアミノ酸配列間の配列比較は、従来、これらの配列を最適に整列させた後に比較することによって行われ、前記比較は、配列類似性の局所領域を同定し、比較するためにセグメントごとにまたは「比較ウィンドウ」ごとに行われる。比較のための配列の最適なアラインメントは、手作業に加えて、Smith and Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482の局所相同性アルゴリズムによって、Neddlleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443の局所相同性アルゴリズムによって、Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444の類似性検索法によって、またはこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータプログラム(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.のGAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST NおよびTFASTA)によって作成され得る。

30

40

【0086】

同一性パーセントは、比較する2つの配列間で同一の位置の数を決定し、この数を比較する位置の数で除し、得られた結果に100を乗じて、これら2つの配列間の同一性パーセントを得ることによって計算される。

【0087】

相同なアミノ酸配列は、本開示によれば、アミノ酸残基の少なくとも40%、特に少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性

50

を示す。

【0088】

本明細書に記載のアミノ酸配列変異体は、当業者によって、例えば組換えDNA操作によって容易に調製され得る。置換、付加、挿入または欠失を有するペプチドまたはタンパク質を調製するためのDNA配列の操作は、例えば Sambrook et al. (1989) に詳細に記載されている。さらに、本明細書に記載のペプチドおよびアミノ酸変異体は、例えば、固相合成および類似の方法などによる公知のペプチド合成技術を用いて容易に調製され得る。

【0089】

一実施形態では、アミノ酸配列（ペプチドまたはタンパク質）の断片または変異体は、好ましくは「機能的断片」または「機能的変異体」である。アミノ酸配列の「機能的断片」または「機能的変異体」という用語は、それが由来するアミノ酸配列のものと同一または類似の1つ以上の機能特性を示す任意の断片または変異体に関し、すなわち、それは機能的に等価である。サイトカインに関して、1つの特定の機能は、断片もしくは変異体が由来するアミノ酸配列によって、および/または断片もしくは変異体が由来するアミノ酸配列が結合する受容体（1つまたは複数）への結合によって示される1つ以上の免疫調節活性である。

10

【0090】

指定されたアミノ酸配列（ペプチドまたはタンパク質）に「由来する」アミノ酸配列（ペプチドまたはタンパク質）は、最初のアミノ酸配列の起源を指す。好ましくは、特定のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列は、その特定の配列またはその断片と同一、本質的に同一または相同であるアミノ酸配列を有する。特定のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列は、その特定の配列の変異体またはその断片であり得る。例えば、本明細書での使用に適した抗原およびサイトカイン（例えば、IL2、IL7またはIL21）は、天然配列の望ましい活性を保持しながら、それらが由来する天然に存在するまたは天然の配列とは配列が異なるように改変され得ることが当業者に理解されるであろう。

20

【0091】

T細胞

T細胞は、リンパ球として公知の白血球のグループに属し、細胞性免疫において中心的な役割を果たす。これらは、T細胞受容体（TCR）と呼ばれるこれらの細胞表面上の特別な受容体の存在によって、B細胞およびナチュラルキラー細胞などの他の種類のリンパ球と区別することができる。胸腺は、T細胞の成熟に関与する主要な器官である。それぞれ別個の機能を有する、T細胞のいくつかの異なるサブセットが発見されている。

30

【0092】

T細胞の大部分は、いくつかのタンパク質の複合体として存在するT細胞受容体（TCR）を有する。実際のT細胞受容体は、独立したT細胞受容体アルファおよびベータ（TCR α およびTCR β ）遺伝子から産生され、 α -TCR鎖および β -TCR鎖と呼ばれる2つの別個のペプチド鎖から構成される。T細胞（ガンマデルタT細胞）は、その表面に異なるT細胞受容体（TCR）を有するT細胞の小さなサブセットである。しかし、 $\gamma\delta$ T細胞では、TCRは一本の γ 鎖と一本の δ 鎖で構成される。このグループのT細胞は、 $\alpha\beta$ T細胞よりもはるかにまれである（全T細胞の2%）。

40

【0093】

全てのT細胞は、骨髄の造血幹細胞に由来する。造血幹細胞に由来する造血前駆細胞は胸腺に存在し、細胞分裂によって拡大して未成熟な胸腺細胞の大きな集団を生じる。初期の胸腺細胞はCD4もCD8も発現しないため、二重陰性（CD4 $^-$ CD8 $^-$ ）細胞として分類される。発達が進むにつれて、それらは二重陽性胸腺細胞（CD4 $^+$ CD8 $^+$ ）になり、最終的に単一陽性（CD4 $^+$ CD8 $^-$ またはCD4 $^-$ CD8 $^+$ ）胸腺細胞に成熟して、胸腺から末梢組織に放出される。

【0094】

「T細胞」および「Tリンパ球」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、T

50

ヘルパー細胞（CD4 + T細胞）および細胞溶解性T細胞を含む細胞傷害性T細胞（CTL、CD8 + T細胞）を含む。「抗原特異的T細胞」という用語または同様の用語は、特に抗原提示細胞または癌細胞などの疾患細胞の表面に提示された場合、T細胞が標的とする抗原を認識し、好ましくはT細胞のエフェクタ機能を発揮するT細胞に関する。T細胞が抗原を発現する標的細胞を死滅させる場合、T細胞は抗原に特異的であると見なされる。T細胞の特異性は、様々な標準的技術のいずれかを使用して、例えばクロム放出アッセイまたは増殖アッセイにおいて評価し得る。あるいは、リンホカイン（インターフェロンなど）の合成を測定することができる。

【0095】

Tヘルパー細胞は、数ある機能の中でも特に、B細胞の形質細胞への成熟ならびに細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化を含む免疫学的プロセスにおいて他の白血球を補助する。これらの細胞は、その表面にCD4タンパク質を発現するため、CD4 + T細胞としても公知である。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞（APC）の表面に発現されるMHCクラスII分子によってペプチド抗原と共に提示された場合に活性化される。ひとたび活性化されると、これらは速やかに分裂し、能動免疫応答を調節または補助する、サイトカインと呼ばれる小さなタンパク質を分泌する。

10

【0096】

細胞傷害性T細胞は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、移植片拒絶反応にも関与する。これらの細胞は、その表面にCD8糖タンパク質を発現するため、CD8 + T細胞としても公知である。これらの細胞は、身体のほぼあらゆる細胞の表面に存在する、MHCクラスIに関連する抗原に結合することによってその標的を認識する。

20

【0097】

T細胞媒介エフェクタ機能は、ヘルパーT細胞（CD4 + T細胞）の場合、サイトカインの放出ならびに/またはCD8 + リンパ球（CTL）および/もしくはB細胞の活性化を含み、CTLの場合、例えばアポトーシスまたはパーフォリン媒介細胞溶解を介した、細胞、すなわち抗原の発現を特徴とする細胞の除去、IFN - およびTNF - などのサイトカインの産生、ならびに抗原を発現する標的細胞の特異的細胞溶解死滅を含む。

【0098】

本発明によれば、「T細胞」という用語はまた、適切な刺激でT細胞に成熟することができる細胞を含む。

30

【0099】

T細胞は一般に、標準的な手順を用いて、インビトロまたはエクスピボで調製し得る。例えば、T細胞は、市販の細胞分離システムを使用して、患者などの哺乳動物の骨髄、末梢血または骨髄もしくは末梢血の画分から単離し得る。あるいは、T細胞は、関係のあるもしくは無関係なヒト、非ヒト動物、細胞株または培養物に由来し得る。T細胞を含む試料は、例えば、末梢血単核細胞（PBMC）であり得る。

【0100】

本発明に従って使用されるT細胞は、内因性T細胞受容体を発現してもよく、または内因性T細胞受容体の発現を欠いてもよい。

【0101】

CAR

CARをコードするRNAなどの核酸を、T細胞または溶解能を有する他の細胞、特にリンパ系細胞に導入し得る。

40

【0102】

本開示によれば、CARは、T細胞上に存在する場合、上記のようにT細胞が刺激、プライミングおよび/もしくは拡大されるか、またはエフェクタ機能を発揮するように、抗原提示細胞または癌細胞などの疾患細胞の表面などの抗原を認識する。

【0103】

本発明によれば、「キメラ抗原受容体（CAR）」という用語は、「キメラT細胞受容体」および「人工T細胞受容体」という用語と同義である。

50

【0104】

好ましくは、前記CARは細胞の表面に発現される。

【0105】

本発明によれば、「CAR」（または「キメラ抗原受容体」という用語は、癌細胞などの標的細胞上の標的構造（例えば抗原）を認識し、すなわち結合し（例えば標的細胞の表面に発現される抗原への抗原結合ドメインの結合によって）、細胞表面に前記CARを発現するT細胞などの免疫エフェクタ細胞に特異性を付与し得る、単一分子または分子の複合体を含む人工受容体に関する。そのような細胞は、標的細胞の認識のために抗原のプロセッシングおよび提示を必ずしも必要とせず、むしろ、好ましくは標的細胞上に存在する任意の抗原を特異的に認識し得る。好ましくは、CARによる標的構造の認識は、前記CARを発現する免疫エフェクタ細胞の活性化をもたらす。CARは、本明細書に記載の1つ以上のドメインを含む1つ以上のタンパク質ユニットを含み得る。「CAR」という用語は、T細胞受容体を含まない。

10

【0106】

本発明によれば、CARは一般に、いくつかのドメインを含み得る。本発明の全ての態様の一実施形態では、CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびT細胞シグナル伝達ドメインを含む。

【0107】

結合ドメインは、抗原を認識して結合する。一実施形態では、モノクローナル抗体に由来する一本鎖可変断片（scFv）が結合ドメインとして使用される。同様に使用され得る抗原認識ドメインには、とりわけ、T細胞受容体（TCR）アルファおよびベータ一本鎖が含まれる。実際に、所与の標的に高い親和性で結合するほとんどあらゆるものが抗原認識ドメインとして使用できる。本発明の全ての態様の一実施形態では、CARは抗原結合ドメインを含む。一実施形態では、抗原結合ドメインはCARのエキソドメインで構成される。一実施形態では、抗原結合ドメインは、抗原に対する抗体の一本鎖可変断片（scFv）を含む。一実施形態では、抗原結合ドメインは、抗原（VH（抗原））に対する特異性を有する免疫グロブリンの重鎖の可変領域（VH）と、抗原（VL（抗原））に対する特異性を有する免疫グロブリンの軽鎖の可変領域（VL）とを含む。一実施形態では、前記重鎖可変領域（VH）および対応する軽鎖可変領域（VL）は、ペプチドリンカー、好ましくはアミノ酸配列（GGGGS）3を含むペプチドリンカーによって接続されている。

20

30

【0108】

本発明の全ての態様の一実施形態では、CARは膜貫通ドメインを含む。一実施形態では、膜貫通ドメインは、膜にまたがる疎水性ヘリックスである。一実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインまたはその断片を含む。

【0109】

活性化シグナル伝達ドメイン（またはT細胞シグナル伝達ドメイン）は、CARが抗原に結合すると、細胞傷害性リンパ球を活性化する働きをする。活性化シグナル伝達ドメインの同一性は、CARによる抗原の結合時に選択された細胞傷害性リンパ球の活性化を誘導する能力を有するという点のみに限定される。適切な活性化シグナル伝達ドメインには、T細胞CD3鎖およびFc受容体が含まれる。当業者は、これらの記載された活性化シグナル伝達ドメインの配列変異体が、本発明に悪影響を及ぼすことなく使用でき、変異体がモデルとするドメインと同じまたは類似の活性を有することを理解する。そのような変異体は、それらが由来するドメインのアミノ酸配列と少なくとも約80%の配列同一性を有する。

40

【0110】

一実施形態では、T細胞シグナル伝達ドメインは細胞内に位置する。一実施形態では、T細胞シグナル伝達ドメインは、任意でCD28と組み合わせ、CD3、好ましくはCD3のエンドドメインを含む。

【0111】

50

存在し得るさらなるドメインは、共刺激ドメインである。共刺激ドメインは、CARが標的部分に結合すると、細胞傷害性リンパ球の増殖および生存を増強する働きをする。共刺激ドメインの同一性は、CARによる標的部分の結合時に細胞増殖および生存を増強する能力を有するという点のみに限定される。適切な共刺激ドメインには、CD28、腫瘍壊死因子(TNF)受容体ファミリーのメンバーであるCD137(4-1BB)、TNFRスーパーファミリーの受容体のメンバーであるCD134(OX40)、および活性化T細胞上に発現されるCD28スーパーファミリーの共刺激分子であるCD278(ICOS)が含まれる。当業者は、これらの記載された共刺激ドメインの配列変異体が、本発明に悪影響を及ぼすことなく使用でき、変異体がモデルとするドメインと同じまたは類似の活性を有することを理解する。そのような変異体は、それらが由来するドメインのアミノ酸配列と少なくとも約80%の配列同一性を有する。本発明のいくつかの実施形態では、CAR構築物は2つの共刺激ドメインを含む。特定の組合せには、4つの記載されたドメインの全ての可能な変形が含まれるが、具体的な例にはCD28+CD137(4-1BB)およびCD28+CD134(OX40)が含まれる。

【0112】

本発明のCARは、融合タンパク質の形態で一緒に上記ドメインを含み得る。そのような融合タンパク質は一般に、N末端からC末端の方向に連結された、結合ドメイン、1つ以上の共刺激ドメイン、および活性化シグナル伝達ドメインを含む。しかし、本発明のCARはこの配置に限定されず、他の配置も許容され、結合ドメイン、活性化シグナル伝達ドメイン、および1つ以上の共刺激ドメインを含む。結合ドメインは抗原に自由に結合できなければならないため、融合タンパク質における結合ドメインの配置は一般に、細胞の外側で領域の表示が達成される配置であることが理解されるであろう。同様に、共刺激ドメインおよび活性化シグナル伝達ドメインは細胞傷害性リンパ球の活性および増殖を誘導する働きをするため、融合タンパク質は一般に、細胞の内部でこれら2つのドメインを提示する。CARには、さらなる要素、例えば融合タンパク質の細胞表面への適切な輸送を確実にするシグナルペプチド、融合タンパク質が内在性膜タンパク質として維持されるのを確実にする膜貫通ドメイン、および結合ドメインに柔軟性を与え、抗原への強力な結合を可能にするヒンジドメイン(またはスペーサ領域)などが含まれ得る。

【0113】

本発明の全ての態様の一実施形態では、CARは、新生タンパク質を小胞体に向かわせるシグナルペプチドを含む。一実施形態では、シグナルペプチドは抗原結合ドメインに先行する。

【0114】

本発明の全ての態様の一実施形態では、CARは、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインに連結するスペーサ領域を含む。一実施形態では、スペーサ領域は、抗原認識を容易にするために抗原結合ドメインが異なる方向に配向することを可能にする。一実施形態では、スペーサ領域は、IgG1由来のヒンジ領域を含む。

【0115】

本発明の全ての態様の一実施形態では、CARは、構造：

NH₂-シグナルペプチド-抗原結合ドメイン-スペーサ領域-膜貫通ドメイン-T細胞シグナル伝達ドメイン-COOH
を含む。

【0116】

本発明の全ての態様の一実施形態では、CARは、特に疾患細胞または抗原提示細胞などの細胞の表面に存在する場合、好ましくはそれが標的とする抗原に特異的である。

【0117】

本発明の全ての態様の一実施形態では、CARは、T細胞、好ましくは細胞傷害性T細胞によって発現され得、および/またはT細胞、好ましくは細胞傷害性T細胞の表面に存在し得る。一実施形態では、T細胞は、CARが標的とする抗原と反応性である。

【0118】

10

20

30

40

50

本発明のCARシステムに関連して使用される細胞は、好ましくはT細胞、特に細胞傷害性リンパ球であり、好ましくはT細胞、特に細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびリンホカイン活性化キラー（LAK）細胞から選択される。活性化されると、これらの細胞傷害性リンパ球はそれぞれ標的細胞の破壊を引き起こす。例えば、細胞傷害性T細胞は、以下の手段のいずれかまたは両方によって標的細胞の破壊を引き起こす。まず、活性化されると、T細胞は、パーフォリン、グランザイム、およびグランジュリンなどの細胞毒を放出する。パーフォリンおよびグランジュリンは標的細胞に細孔を作り、グランザイムは細胞に進入し、細胞のアポトーシス（プログラム細胞死）を誘導する細胞質のカパーゼカスケードを引き起こす。第2に、アポトーシスは、T細胞と標的細胞との間のFas-Fasリガンド相互作用を介して誘導され得る。細胞傷害性リンパ球は、好ましくは自家細胞であるが、異種細胞または同種異系細胞を使用することができる。

10

【0119】

キメラ抗原受容体を発現するT細胞を用いた養子細胞移入療法は、CAR改変T細胞を、実質的に任意の腫瘍抗原を標的とするように操作することができるので、有望な抗癌治療法である。例えば、患者のT細胞を、患者の腫瘍細胞上の抗原に特異的に向けられるCARを発現するように遺伝子操作（遺伝子改変）し、その後患者に注入して戻し得る。

【0120】

本発明によれば、CARは、T細胞受容体の機能を置き換えることができ、特に、T細胞などの細胞に細胞溶解活性などの反応性を付与し得る。しかしながら、T細胞受容体の抗原ペプチド-MHC複合体への結合とは対照的に、CARは、特に細胞表面に発現された場合、抗原に結合し得る。

20

【0121】

非ウイルスベースのDNAトランスフェクション、トランスポゾンベースのシステムおよびウイルスベースのシステムを含む様々な方法を使用して、CAR構築物をT細胞に導入し得る。非ウイルスベースのDNAトランスフェクションは、挿入突然変異誘発のリスクが低い。トランスポゾンベースのシステムは、組み込み要素を含まないプラスミドよりも効率的に導入遺伝子を組み込むことができる。ウイルスベースのシステムには、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターの使用が含まれる。レトロウイルスは、T細胞を比較的容易に産生し、効率的かつ永続的に形質導入し、初代ヒトT細胞における組み込みの観点から安全であることが予め証明されている。レンチウイルスベクターも、T細胞を効率的かつ永続的に形質導入するが、製造コストがより高い。これらはまた、潜在的にレトロウイルスベースのシステムよりも安全である。

30

【0122】

本発明の全ての態様の一実施形態では、方法は、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を提供するために、CARをコードする核酸で、エキスピボまたはインピボのいずれかでT細胞またはT細胞前駆体をトランスフェクトすることをさらに含む。

【0123】

CAR T細胞は、T細胞を標的とするナノ粒子を使用して、インピボで、したがってほぼ瞬時に産生され得る。例えば、ポリ（ α -アミノエステル）ベースのナノ粒子を、T細胞上のCD3に結合するために抗CD3 ϵ -f(ab)断片に結合し得る。この目的のために、抗CD3 ϵ -f(ab)断片をポリグルタミン酸（PGA）に共有結合させ得る。PGAは、核酸および過剰のポリ（ α -アミノエステル）（PBAE）ポリマーを含む粒子コアを取り囲み、電荷相互作用によってそれに付着する。T細胞に結合すると、これらのナノ粒子はエンドサイトーシスされる。それらの内容物、例えば抗腫瘍抗原CARをコードするプラスミドDNAは、PBAEポリマーに共有結合した微小管関連配列（MTAS）および核局在化シグナル（NLS）を含むペプチドを含むため、T細胞核に向けられ得る。CAR遺伝子発現カセットに隣接するトランスポゾンおよび高活性トランスポザーゼをコードする別個のプラスミドを含めることにより、CARベクターの染色体への効率的な組み込みが可能になり得る。ナノ粒子注入後のCAR T細胞のインピボ産生を可

40

50

能にするそのようなシステムは、Smith et al. (2017) Nat. Nanotechnol. 12: 813 - 820に記載されている。

【0124】

別の可能性は、CRISPR/Cas9法を使用して、CARコード配列を特定の遺伝子座に意図的に配置することである。例えば、既存のT細胞受容体(TCR)をロックアウトし、一方でCARをロックインし、それを、さもなければTCRの発現を抑える内因性プロモータの動的調節制御下に置くことができる；例えば、Eyquem et al. (2017) Nature 543: 113 - 117参照。

【0125】

本発明の全ての態様の一実施形態では、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は、CARをコードする核酸で安定にまたは一過性にトランスフェクトされる。したがって、CARをコードする核酸は、T細胞のゲノムに組み込まれるか、または組み込まれない。

10

【0126】

本発明の全ての態様の一実施形態では、T細胞またはT細胞前駆体は、治療される対象に由来する。本発明の全ての態様の一実施形態では、T細胞またはT細胞前駆体は、治療される対象とは異なる対象に由来する。

【0127】

本発明の全ての態様の一実施形態では、T細胞は、治療される対象に対して自家、同種異系または同系であり得る。T細胞は、抗原を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)を発現するようにインビトロで遺伝子改変され得る。

20

【0128】

本発明の全ての態様の一実施形態では、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞は、内因性T細胞受容体および/または内因性HLAの発現のために不活性化される。

【0129】

「自家」という用語は、同じ対象に由来するものを表すために使用される。例えば、「自家移植」は、同じ対象に由来する組織または臓器の移植を指す。そのような手順は、さもなければ拒絶反応をもたらす免疫学的障壁を克服するので有利である。

【0130】

「同種異系」という用語は、同じ種の異なる個体に由来するものを表すために使用される。1つ以上の遺伝子座の遺伝子が同一でない場合、2つ以上の個体は互いに同種異系であると言われる。

30

【0131】

「同系」という用語は、同一の遺伝子型を有する個体または組織、すなわち同じ近交系の同一の双生児もしくは動物、またはそれらの組織に由来するものを表すために使用される。

【0132】

「異種」という用語は、複数の異なる要素からなるものを表すために使用される。一例として、ある個体の骨髄を異なる個体に移入することは、異種移植を構成する。異種遺伝子は、対象以外の供給源に由来する遺伝子である。

40

【0133】

RNA

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、組換え生産された分子および化学合成された分子などのDNAおよびRNAを含むことが意図されている。核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。RNAは、インビトロ転写されたRNA(IVT RNA)または合成RNAを含む。本発明によれば、ポリヌクレオチドは、好ましくは単離されている。

【0134】

核酸は、ベクターに含まれ得る。本明細書で使用される「ベクター」という用語は、プラスミドベクター、コスミドベクター、ファージなどのファージベクター、アデノウイ

50

ルスもしくはバキュロウイルスベクターなどのウイルスベクター、または細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）もしくはP1人工染色体（PAC）などの人工染色体ベクターを含む、当業者に公知の任意のベクターを含む。前記ベクターには、発現ベクターおよびクローニングベクターが含まれる。発現ベクターは、プラスミドおよびウイルスベクターを含み、一般に、所望のコード配列および特定の宿主生物（例えば、細菌、酵母、植物、昆虫もしくは哺乳動物）またはインビトロ発現系における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適切なDNA配列を含む。クローニングベクターは一般に、ある所望のDNA断片を操作および増幅するために使用され、所望のDNA断片の発現に必要な機能的配列を欠いていてもよい。

【0135】

本発明の全ての態様の一実施形態では、サイトカインをコードする、または抗原もしくはその変異体をコードする核酸は、サイトカインまたは抗原もしくはその変異体を提供するために、治療される対象の細胞において発現される。本発明の全ての態様の一実施形態では、核酸は、哺乳動物の細胞において一過性に発現される。したがって、一実施形態では、核酸は細胞のゲノムに組み込まれない。本発明の全ての態様の一実施形態では、核酸はRNA、好ましくはインビトロ転写RNAである。本発明の全ての態様の一実施形態では、抗原またはその変異体の発現は細胞表面で起こる。

【0136】

本発明の全ての態様の一実施形態では、抗原またはその変異体をコードする核酸は、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞による結合のための抗原またはその変異体を提供するために、哺乳動物の細胞において発現され、前記結合は、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞の刺激、プライミングおよび/または拡大をもたらす。

【0137】

「発現」という用語は、本発明に従ってその最も一般的な意味で使用され、例えば転写および/または翻訳による、RNAおよび/またはペプチドもしくはタンパク質の産生を含む。発現は一過性または安定であり得る。本発明によれば、発現という用語は、「異所性発現」または「異常発現」も含む。

【0138】

本発明によれば、「核酸がコードする」という用語は、核酸が、細胞内などの適切な環境に存在する場合、それがコードするタンパク質またはペプチドを産生するように発現され得ることを意味する。

【0139】

本明細書に記載の核酸は、組換えおよび/または単離された分子であり得る。

【0140】

本明細書で使用される「単離された分子」は、他の細胞物質などの他の分子を実質的に含まない分子を指すことが意図されている。

【0141】

本発明の文脈における「組換え」という用語は、「遺伝子工学によって作製された」ことを意味する。好ましくは、本発明の文脈における組換え細胞などの「組換え物」は、天然には存在しない。

【0142】

本明細書で使用される「天然に存在する」という用語は、物体が自然界で見出され得るという事実を指す。例えば、生物（ウイルスを含む）中に存在し、自然界の供給源から単離することができ、実験室で人間によって意図的に改変されていないペプチドまたは核酸は、天然に存在する。

【0143】

「トランスフェクション」という用語は、細胞への核酸、特にRNAの導入に関する。本発明の目的のために、「トランスフェクション」という用語はまた、細胞への核酸の導入またはそのような細胞による核酸の取り込みを含み、細胞は、対象、例えば患者に存在し得る。したがって、本発明によれば、本明細書に記載の核酸のトランスフェクションの

10

20

30

40

50

ための細胞は、インビトロまたはインビボで存在することができ、例えば細胞は、患者の器官、組織および/または生物の一部を形成することができる。本発明によれば、トランスフェクションは一過性または安定であり得る。トランスフェクションのいくつかの適用では、トランスフェクトされた遺伝物質が一過性に発現されるだけで十分である。トランスフェクションの過程で導入された核酸は通常、核ゲノムに組み込まれないため、外来核酸は有糸分裂によって希釈されるかまたは分解される。核酸のエピソーム増幅を可能にする細胞は、希釈率を大幅に低下させる。トランスフェクトされた核酸が実際に細胞およびその娘細胞のゲノムに残ることが望ましい場合は、安定なトランスフェクションが起こらなければならない。RNAを細胞にトランスフェクトして、そのコードされたタンパク質を一過性に発現させることができる。

10

【0144】

本発明の全ての態様の一実施形態では、サイトカインをコードする、または抗原もしくはその変異体をコードする核酸は、粒子などの送達ビヒクルに製剤化される。一実施形態では、送達ビヒクルは、少なくとも1つの脂質を含む。一実施形態では、少なくとも1つの脂質は、少なくとも1つのカチオン性脂質を含む。一実施形態では、脂質は、核酸と複合体を形成し、および/または核酸を封入する。一実施形態では、脂質は、核酸を封入する小胞に含まれる。本発明の全ての態様の一実施形態では、核酸はリポソームに製剤化される。

【0145】

本開示では、「RNA」という用語は、リボヌクレオチド残基を含む核酸分子に関する。好ましい実施形態では、RNAは、リボヌクレオチド残基の全てまたは大部分を含む。本明細書で使用される場合、「リボヌクレオチド」は、 β -D-リボフラノシル基の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを指す。RNAは、限定されることなく、二本鎖RNA、一本鎖RNA、部分的に精製されたRNAなどの単離されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換え生産されたRNA、ならびに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または改変によって天然に存在するRNAとは異なる修飾RNAを包含する。そのような改変は、内部RNAヌクレオチドまたはRNAの末端（一方もしくは両方）への非ヌクレオチド物質の付加を指し得る。本明細書ではまた、RNA中のヌクレオチドは、化学的に合成されたヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドであり得ることが企図される。本開示では、これらの改変されたRNAは、天然に存在するRNAの類似体と見なされる。

20

30

【0146】

本開示のある実施形態では、RNAは、ペプチドまたはタンパク質をコードするRNA転写物に関連するメッセンジャーRNA(mRNA)である。当技術分野で確立されているように、mRNAは一般に、5'非翻訳領域(5'-UTR)、ペプチドコード領域および3'非翻訳領域(3'-UTR)を含む。いくつかの実施形態では、RNAは、インビトロ転写または化学合成によって生成される。一実施形態では、mRNAは、DNA鋳型を使用するインビトロ転写によって生成され、DNAは、デオキシリボヌクレオチドを含む核酸を指す。

【0147】

一実施形態では、RNAはインビトロ転写されたRNA(IVT-RNA)であり、適切なDNA鋳型のインビトロ転写によって得られ得る。転写を制御するためのプロモータは、任意のRNAポリメラーゼのための任意のプロモータであり得る。インビトロ転写のためのDNA鋳型は、核酸、特にcDNAをクローニングし、それをインビトロ転写のための適切なベクターに導入することによって得られ得る。cDNAは、RNAの逆転写によって得られ得る。

40

【0148】

一実施形態では、RNAは、修飾されたリボヌクレオチドを有し得る。修飾リボヌクレオチドの例には、限定されることなく、5-メチルシチジン、プソイドウリジンおよび/または1-メチルプソイドウリジンが含まれる。

50

【 0 1 4 9 】

いくつかの実施形態では、本開示によるRNAは5'キャップを含む。一実施形態では、本開示のRNAは、キャップされていない5'-三リン酸を有さない。一実施形態では、RNAは5'キャップ類似体によって修飾され得る。「5'キャップ」という用語は、mRNA分子の5'末端に認められる構造を指し、一般に、5'-5'三リン酸結合によってmRNAに接続されたグアノシンヌクレオチドからなる。一実施形態では、このグアノシンは7位でメチル化されている。RNAに5'キャップまたは5'キャップ類似体を提供することは、5'キャップがRNA鎖に共転写的に発現されるインビトロ転写によって達成され得るか、またはキャッピング酵素を使用して転写後にRNAに結合され得る。

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態では、本開示によるRNAは、5'-UTRおよび/または3'-UTRを含む。「非翻訳領域」または「UTR」という用語は、転写されるがアミノ酸配列に翻訳されないDNA分子内の領域、またはmRNA分子などのRNA分子内の対応する領域に関する。非翻訳領域(UTR)は、オープンリーディングフレームの5'側(上流)(5'-UTR)および/またはオープンリーディングフレームの3'側(下流)(3'-UTR)に存在し得る。5'-UTRは、存在する場合、タンパク質コード領域の開始コドンの上流の、5'末端に位置する。5'-UTRは5'キャップ(存在する場合)の下流にあり、例えば5'キャップに直接隣接している。3'-UTRは、存在する場合、タンパク質コード領域の終止コドンの下流の、3'末端に位置するが、「3'-UTR」という用語は、好ましくはポリ(A)尾部を含まない。したがって、3'-UTRはポリ(A)配列(存在する場合)の上流にあり、例えばポリ(A)配列に直接隣接している。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態では、本開示によるRNAは3'-ポリ(A)配列を含む。「ポリ(A)配列」という用語は、典型的にはRNA分子の3'末端に位置するアデニル(A)残基の配列に関する。本開示によれば、一実施形態では、ポリ(A)配列は、少なくとも約20個、少なくとも約40個、少なくとも約80個、または少なくとも約100個、および最大約500個、最大約400個、最大約300個、最大約200個、または最大約150個までのAヌクレオチド、特に約120個のAヌクレオチドを含む。

【 0 1 5 2 】

本開示の文脈において、「転写」という用語は、DNA配列中の遺伝暗号がRNAに転写されるプロセスに関する。その後、RNAはペプチドまたはタンパク質に翻訳され得る。

【 0 1 5 3 】

RNAに関して、「発現」または「翻訳」という用語は、mRNAの鎖が、ペプチドまたはタンパク質を作製するようにアミノ酸の配列のアセンブリを指示する、細胞のリボソームにおける過程に関する。

【 0 1 5 4 】

本開示によれば、「RNAがコードする」という用語は、RNAが、標的組織の細胞内などの適切な環境に存在する場合、翻訳過程の間にそれがコードするペプチドまたはタンパク質を産生するようにアミノ酸のアセンブリを指示できることを意味する。一実施形態では、RNAは、ペプチドまたはタンパク質の翻訳を可能にする細胞翻訳機構と相互作用することができる。細胞は、コードされたペプチドもしくはタンパク質を細胞内で(例えば細胞質内および/もしくは核内で)産生し得るか、コードされたペプチドもしくはタンパク質を分泌し得るか、またはそれを表面上で産生し得る。

【 0 1 5 5 】

本明細書で使用される場合、「連結された」、「融合された」、または「融合」という用語は、交換可能に使用される。これらの用語は、2つ以上の要素または成分またはドメインの結合を指す。

【 0 1 5 6 】

本明細書で使用される場合、「半減期」は、例えば分解および/または天然の機構によるクリアランスもしくは隔離のために、インビボでペプチドまたはタンパク質の血清また

10

20

30

40

50

は血漿濃度が50%減少するのに要する時間を指す。本明細書での使用に適した延長PKインターロイキン(IL)などの延長PKサイトカインは、インピボで安定化され、その半減期は、例えば血清アルブミン(例えばHSAまたはMSA)への融合によって増加し、分解および/またはクリアランスもしくは隔離に抵抗する。半減期は、薬物動態分析などによる、それ自体公知の任意の方法で決定することができる。適切な技術は当業者に明らかであり、例えば一般に、適切な用量のアミノ酸配列または化合物を対象に適切に投与する工程；前記対象から規則的な間隔で血液試料または他の試料を収集する工程；前記血液試料中のアミノ酸配列または化合物のレベルまたは濃度を決定する工程；およびこのようにして得られたデータ(のプロット)から、アミノ酸配列または化合物のレベルまたは濃度が投与時の初期レベルと比較して50%減少するまでの時間を計算する工程を含み得る。さらなる詳細は、例えばKenneth, A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*などの標準的なハンドブックおよびPeters et al., *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996)に提供されている。Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics*, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982)も参照されたい。

10

【0157】

サイトカイン

サイトカインは、細胞シグナル伝達に重要である小さなタンパク質(約5~20kDa)のカテゴリである。サイトカインの放出は、それらの周りの細胞の挙動に影響を及ぼす。サイトカインは、免疫調節剤として自己分泌シグナル伝達、パラ分泌シグナル伝達および内分泌シグナル伝達に参与する。サイトカインには、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、および腫瘍壊死因子が含まれるが、一般にホルモンまたは成長因子は含まれない(用語が一部重複しているにもかかわらず)。サイトカインは、マクロファージ、Bリンパ球、Tリンパ球およびマスト細胞のような免疫細胞、ならびに内皮細胞、線維芽細胞および様々な間質細胞を含む、幅広い細胞によって産生される。所与のサイトカインは、複数の種類の細胞によって産生され得る。サイトカインは受容体を介して作用し、免疫系において特に重要である；サイトカインは、体液性免疫応答と細胞性免疫応答のバランスを調整し、特定の細胞集団の成熟、成長、および応答性を調節する。一部のサイトカインは、他のサイトカインの作用を複雑な方法で増強または阻害する。

20

30

【0158】

IL2

インターロイキン2(IL2)は、抗原活性化T細胞の増殖を誘導し、ナチュラルキラー(NK)細胞を刺激するサイトカインである。IL2の生物学的活性は、細胞膜にまたがる3つのポリペプチドサブユニットのマルチサブユニットIL2受容体複合体(IL2R)によって媒介される：p55(IL2R、サブユニット、ヒトではCD25としても公知)、p75(IL2R、サブユニット、ヒトではCD122としても公知)およびp64(IL2R、サブユニット、ヒトではCD132としても公知)。IL2に対するT細胞応答は、(1)IL2の濃度；(2)細胞表面のIL2R分子の数；および(3)IL2が占有するIL2Rの数(すなわち、IL2とIL2Rの間の結合相互作用の親和性(Smith, "Cell Growth Signal Transduction is Quantal" In *Receptor Activation by Antigens, Cytokines, Hormones, and Growth Factors* 766:263-271, 1995))を含む様々な因子に依存する。IL2:IL2R複合体はリガンド結合時に内在化され、様々な成分が異なる選別を受ける。静脈内(i.v.)ボラスとして投与された場合、IL2は急速な全身クリアランスを有する(半減期が12.9分の初期クリアランス期、続いて半減期が85分のより緩やかなクリアランス期)(Konrad et al., *Cancer Res.* 50:2009-2017, 1990)。

40

50

【 0 1 5 9 】

癌患者における I L 2 の全身投与の結果は理想からほど遠い。患者の 1 5 ~ 2 0 % は高用量の I L 2 に客観的に応答するが、大多数は応答せず、多くが吐き気、錯乱、低血圧、および敗血症性ショックなどの重篤で生命にかかわる副作用を経験する。高用量の I L 2 治療に関連する重篤な毒性は、主にナチュラルキラー (N K) 細胞の活性に起因する。用量を減らし、投与レジメンを調整することによって血清濃度を低下させる試みが為されており、毒性は低くなるが、そのような治療は有効性も低かった。

【 0 1 6 0 】

本開示によれば、ある実施形態では、 I L 2 は薬物動態修飾基に結合される。以下、「延長薬物動態 (P K) I L 2 」と称する、得られた分子は、遊離 I L 2 と比較して延長された循環半減期を有する。延長 P K I L 2 の延長された循環半減期は、インビボでの血清 I L 2 濃度が治療範囲内に維持されることを可能にし、潜在的に、 T 細胞を含む多くの種類の免疫細胞の活性化の増強につながる。その有利な薬物動態プロファイルのために、延長 P K I L 2 は、非修飾 I L 2 と比較した場合、より少ない頻度でより長期間投与することができる。

10

【 0 1 6 1 】

本開示によれば、 I L 2 (任意で延長 P K I L 2 の一部として) は、天然に存在する I L 2 またはその断片もしくは変異体であり得る。 I L 2 はヒト I L 2 であり得、任意の脊椎動物、特に任意の哺乳動物に由来し得る。一実施形態では、 I L 2 は、配列番号 1 のアミノ酸配列、または配列番号 1 と少なくとも 8 0 % 、 8 1 % 、 8 2 % 、 8 3 % 、 8 4 % 、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 もしくは 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、 I L 2 または I L 2 断片もしくは変異体は、 I L 2 受容体、または I L 2 受容体のサブユニット、例えば サブユニットおよび / もしくは / サブユニットに結合する。

20

【 0 1 6 2 】

ある実施形態では、延長 P K I L 2 の I L 2 部分は、ヒト I L 2 である。他の実施形態では、延長 P K I L 2 の I L 2 部分は、ヒト I L 2 の断片または変異体である。

【 0 1 6 3 】

本明細書に記載のある実施形態では、 I L 2 は異種ポリペプチド (すなわち、 I L 2 ではないポリペプチド) に融合される。異種ポリペプチドは、 I L 2 の循環半減期を増加させることができる。以下でさらに詳細に論じるように、循環半減期を増加させるポリペプチドは、ヒト (例えば配列番号 4) またはマウス (例えば配列番号 8 、 1 1) 血清アルブミンなどの血清アルブミンであり得る。

30

【 0 1 6 4 】

I L 7

I L 7 は、骨髄および胸腺の間質細胞によって分泌される造血成長因子である。これはまた、ケラチノサイト、樹状細胞、肝細胞、ニューロン、および上皮細胞によっても産生されるが、正常なリンパ球によっては産生されない。 I L 7 は、 B 細胞および T 細胞の発生に重要なサイトカインである。 I L 7 サイトカインと肝細胞増殖因子は、プレプロ B 細胞増殖刺激因子として機能するヘテロ二量体を形成する。マウスでのノックアウト試験は、 I L 7 がリンパ系細胞の生存に必須の役割を果たすことを示唆した。

40

【 0 1 6 5 】

I L 7 は、 I L 7 受容体 と共通 鎖受容体からなるヘテロ二量体である I L 7 受容体に結合する。結合は、胸腺内での T 細胞の発生と末梢内での生存に重要なシグナルのカスケードをもたらす。 I L 7 受容体が遺伝的に欠損しているノックアウトマウスは、胸腺萎縮、 T 細胞発生の二重陽性段階での停止、および重度のリンパ球減少症を示す。マウスへの I L 7 の投与は、胸腺移出 T 細胞の増加、 B 細胞および T 細胞の増加、ならびにシクロホスファミド投与後または骨髄移植後の T 細胞の回復の増加をもたらす。

【 0 1 6 6 】

50

本開示によれば、ある実施形態では、IL7は薬物動態修飾基に結合される。以下、「延長薬物動態(PK)IL7」と称する、得られた分子は、遊離IL7と比較して延長された循環半減期を有する。延長PK IL7の延長された循環半減期は、インビボでの血清IL7濃度が治療範囲内に維持されることを可能にし、潜在的に、T細胞を含む多くの種類の免疫細胞の生存の増強につながる。その有利な薬物動態プロファイルのために、延長PK IL7は、非修飾IL7と比較した場合、より少ない頻度でより長期間投与することができる。

【0167】

本開示によれば、IL7(任意で延長PK IL7の一部として)は、天然に存在するIL7またはその断片もしくは変異体であり得る。IL7はヒトIL7であり得、任意の脊椎動物、特に任意の哺乳動物に由来し得る。一実施形態では、IL7は、配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号2と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、IL7またはIL7断片もしくは変異体は、IL7受容体に結合する。

10

【0168】

ある実施形態では、延長PK IL7のIL7部分は、ヒトIL7である。他の実施形態では、延長PK IL7のIL7部分は、ヒトIL7の断片または変異体である。

【0169】

本明細書に記載のある実施形態では、IL7は異種ポリペプチド(すなわち、IL7ではないポリペプチド)に融合される。異種ポリペプチドは、IL7の循環半減期を増加させることができる。以下でさらに詳細に論じるように、循環半減期を増加させるポリペプチドは、ヒト(例えば配列番号4)またはマウス(例えば配列番号8、11)血清アルブミンなどの血清アルブミンであり得る。

20

【0170】

IL21

インターロイキン21(IL21)は、ナチュラルキラー(NK)細胞および細胞傷害性T細胞を含む免疫系の細胞に強力な調節作用を及ぼすサイトカインである。このサイトカインは、その標的細胞において細胞分裂/増殖を誘導する。IL21は、活性化ヒトCD4+T細胞で発現されるが、他のほとんどの組織では発現されない。さらに、IL21発現は、Tヘルパー細胞のTh2およびTh17サブセット、ならびにT濾胞細胞において上方制御される。さらに、IL21は、これらの細胞の機能を調節するNK T細胞で発現される。インターロイキン21は、ホジキンリンパ腫(HL)癌細胞によっても産生される。

30

【0171】

IL21受容体(IL21R)は、T細胞、B細胞およびNK細胞の表面に発現される。IL21Rは、IL2またはIL15のような他のI型サイトカインの受容体と構造が類似しており、IL21に結合するためには共通鎖(c)との二量体化を必要とする。IL21に結合すると、IL21受容体はJak/STAT経路を介して作用し、Jak1およびJak3ならびにSTAT3ホモ二量体を利用してその標的遺伝子を活性化する。

40

【0172】

本開示によれば、ある実施形態では、IL21は薬物動態修飾基に結合される。以下、「延長薬物動態(PK)IL21」と称される、得られた分子は、遊離IL21と比較して延長された循環半減期を有する。延長PK IL21の延長された循環半減期は、インビボでの血清IL21濃度が治療範囲内に維持されることを可能にし、潜在的に、T細胞を含む多くの種類の免疫細胞の活性化の増強につながる。その有利な薬物動態プロファイルのために、延長PK IL21は、非修飾IL21と比較した場合、より少ない頻度でより長期間投与することができる。

【0173】

50

本開示によれば、IL21（任意で延長PK IL21の一部として）は、天然に存在するIL21またはその断片もしくは変異体であり得る。IL21はヒトIL21であり得、任意の脊椎動物、特に任意の哺乳動物に由来し得る。一実施形態では、IL21は、配列番号3のアミノ酸配列、または配列番号3と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、IL21またはIL21断片もしくは変異体は、IL21受容体に結合する。

【0174】

ある実施形態では、延長PK IL21のIL21部分は、ヒトIL21である。他の実施形態では、延長PK IL21のIL21部分は、ヒトIL21の断片または変異体である。

10

【0175】

本明細書に記載されるある実施形態では、IL21は異種ポリペプチド（すなわちIL21ではないポリペプチド）に融合される。異種ポリペプチドは、IL21の循環半減期を増加させることができる。以下でさらに詳細に論じるように、循環半減期を増加させるポリペプチドは、ヒト（例えば配列番号4）またはマウス（例えば配列番号8、11）血清アルブミンなどの血清アルブミンであり得る。

【0176】

延長PK基

20

本明細書に記載のサイトカイン、例えばIL2、IL7またはIL21などのインターロイキンは、循環半減期を増加させる延長PK基に融合され得る。延長PK基の非限定的な例を以下で説明する。サイトカインまたはその変異体の循環半減期を増加させる他のPK基もまた、本開示に適用可能であることが理解されるべきである。ある実施形態では、延長PK基は、血清アルブミンドメイン（例えば、マウス血清アルブミン、ヒト血清アルブミン）である。

【0177】

本明細書で使用される場合、「PK」という用語は、「薬物動態」の頭字語であり、例として、対象による吸収、分布、代謝、および排泄を含む化合物の特性を包含する。本明細書で使用される場合、「延長PK基」は、生物学的に活性な分子に融合されるかまたは一緒に投与された場合、生物学的に活性な分子の循環半減期を増加させるタンパク質、ペプチド、または部分を指す。延長PK基の例には、血清アルブミン（例えばHSA）、FcまたはFc断片およびその変異体、トランスフェリンおよびその変異体、ならびにヒト血清アルブミン（HSA）結合剤（米国特許出願公開第2005/0287153号および同第2007/0003549号に開示されている。）が含まれる。他の例示的な延長PK基は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kontermann et al., Current Opinion in Biotechnology 2011; 22: 868 - 876に開示されている。本明細書で使用される場合、「延長PKサイトカイン」は、延長PK基と組み合わせたサイトカイン部分を指す。一実施形態では、延長PKサイトカインは、サイトカイン部分が延長PK基に連結または融合されている融合タンパク質である。本明細書で使用される場合、「延長PK IL」は、延長PK基と組み合わせたインターロイキン（IL）部分を指す。一実施形態では、延長PK ILは、IL部分が延長PK基に連結または融合されている融合タンパク質である。例示的な融合タンパク質は、IL2部分がHSAと融合されているHSA/IL2融合物である。別の例示的な融合タンパク質は、IL7部分がHSAと融合されているHSA/IL7融合物である。別の例示的な融合タンパク質は、IL21部分がHSAと融合されているHSA/IL21融合物である。

30

40

【0178】

ある実施形態では、延長PKサイトカインの血清半減期は、サイトカイン単独（すなわち、延長PK基に融合されていないサイトカイン）と比較して増加している。ある実施形

50

態では、延長PKサイトカインの血清半減期は、サイトカイン単独の血清半減期と比較して少なくとも20、40、60、80、100、120、150、180、200、400、600、800、または1000%長い。ある実施形態では、延長PKサイトカインの血清半減期は、サイトカイン単独の血清半減期より少なくとも1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、10倍、12倍、13倍、15倍、17倍、20倍、22倍、25倍、27倍、30倍、35倍、40倍、または50倍長い。ある実施形態では、延長PKサイトカインの血清半減期は、少なくとも10時間、15時間、20時間、25時間、30時間、35時間、40時間、50時間、60時間、70時間、80時間、90時間、100時間、110時間、120時間、130時間、135時間、140時間、150時間、160時間、または200時間である。

10

【0179】

ある実施形態では、延長PK基は、血清アルブミン、またはその断片、または血清アルブミンもしくはその断片の変異体（本開示の目的のために、その全てが「アルブミン」という用語に含まれる。）を含む。本明細書に記載のポリペプチドは、アルブミン（またはその断片もしくは変異体）に融合してアルブミン融合タンパク質を形成し得る。そのようなアルブミン融合タンパク質は、米国特許出願公開第20070048282号に記載されている。

【0180】

本明細書で使用される場合、「アルブミン融合タンパク質」は、少なくとも1分子のアルブミン（またはその断片もしくは変異体）と、治療用タンパク質、特にIL2、IL7またはIL21（またはその断片もしくは変異体）などの少なくとも1分子のタンパク質との融合によって形成されるタンパク質を指す。アルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、アルブミンをコードするポリヌクレオチドとインフレームで結合している核酸の翻訳によって生成され得る。治療用タンパク質およびアルブミンは、アルブミン融合タンパク質の一部になると、それぞれ、アルブミン融合タンパク質の「一部」、「領域」または「部分」（例えば、「治療用タンパク質部分」または「アルブミンタンパク質部分」）と称され得る。非常に好ましい実施形態では、アルブミン融合タンパク質は、少なくとも1分子の治療用タンパク質（治療用タンパク質の成熟形態を含むがこれに限定されない）および少なくとも1分子のアルブミン（アルブミンの成熟形態を含むがこれに限定されない）を含む。一実施形態では、アルブミン融合タンパク質は、投与されたRNAの標的器官の細胞、例えば肝細胞などの宿主細胞によってプロセシングされ、循環中に分泌される。RNAの発現に使用される宿主細胞の分泌経路で起こる新生アルブミン融合タンパク質のプロセシングには、シグナルペプチド切断、ジスルフィド結合の形成、適切な折り畳み、炭水化物の付加とプロセシング（例えば、N-結合型およびO-結合型グリコシル化など）、特異的タンパク質分解切断、ならびに/または多量体タンパク質へのアセンブリが含まれ得るが、これらに限定されない。アルブミン融合タンパク質は、好ましくは、特にそのN末端にシグナルペプチドを有するプロセシングされていない形態のRNAによってコードされ、細胞による分泌後は、好ましくは、特にシグナルペプチドが切断されたプロセシングされた形態で存在する。最も好ましい実施形態では、「プロセシングされた形態のアルブミン融合タンパク質」は、本明細書では「成熟アルブミン融合タンパク質」とも称される、N末端シグナルペプチド切断を受けたアルブミン融合タンパク質産物を指す。

20

30

40

【0181】

好ましい実施形態では、治療用タンパク質を含むアルブミン融合タンパク質は、アルブミンに融合されていない場合の同じ治療用タンパク質の血漿安定性と比較して、より高い血漿安定性を有する。血漿安定性は、典型的には、治療用タンパク質がインビボで投与され、血流に運ばれたときから、治療用タンパク質が分解され、血流から腎臓または肝臓などの器官へとクリアランスされ、最終的に治療用タンパク質が体内からクリアランスされるときまでの期間を指す。血漿安定性は、血流中の治療用タンパク質の半減期に関して計算される。血流中の治療用タンパク質の半減期は、当技術分野で公知の一般的なアッセイ

50

によって容易に決定することができる。

【0182】

本明細書で使用される場合、「アルブミン」は、アルブミンの1つ以上の機能的活性（例えば生物学的活性）を有する、アルブミンタンパク質もしくはアミノ酸配列、またはアルブミン断片もしくは変異体を集合的に指す。特に、「アルブミン」は、ヒトアルブミンまたはその断片もしくは変異体、特にヒトアルブミンの成熟形態、または他の脊椎動物由来のアルブミンもしくはその断片、またはこれらの分子の変異体を指す。アルブミンは、任意の脊椎動物、特に任意の哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ヒツジ、またはブタに由来し得る。非哺乳動物アルブミンには、雌鶏およびサケが含まれるが、これらに限定されない。アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、治療用タンパク質部分とは異なる動物に由来し得る。

10

【0183】

ある実施形態では、アルブミンは、ヒト血清アルブミン(HSA)、またはその断片もしくは変異体、例えば米国特許第5,876,969号、国際公開第2011/124718号、国際公開第2013/075066号、および国際公開第2011/0514789号に開示されているものである。

【0184】

ヒト血清アルブミン(HSA)およびヒトアルブミン(HA)という用語は、本明細書では交換可能に使用される。「アルブミンおよび血清アルブミン」という用語はより広義であり、ヒト血清アルブミン(およびその断片と変異体)ならびに他の種由来のアルブミン(およびその断片と変異体)を包含する。

20

【0185】

本明細書で使用される場合、治療用タンパク質の治療活性または血漿安定性を延長するのに十分なアルブミンの断片は、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分の血漿安定性が非融合状態での血漿安定性と比較して延長または拡大されるように、タンパク質の治療活性または血漿安定性を安定化または延長するのに十分な長さまたは構造のアルブミン断片を指す。

【0186】

アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、アルブミン配列の全長を含み得るか、または治療活性もしくは血漿安定性を安定化もしくは延長することができるその1つ以上の断片を含み得る。そのような断片は、10個以上のアミノ酸の長さであり得るか、またはアルブミン配列からの約15個、20個、25個、30個、50個もしくはそれ以上の連続するアミノ酸を含み得るか、またはアルブミンの特定のドメインの一部もしくは全部を含み得る。例えば、最初の2つの免疫グロブリン様ドメインにまたがるHSAの1つ以上の断片を使用し得る。好ましい実施形態では、HSA断片は、HSAの成熟形態である。

30

【0187】

一般的に言えば、アルブミン断片または変異体は、少なくとも100アミノ酸長、好ましくは少なくとも150アミノ酸長である。

【0188】

本開示によれば、アルブミンは、天然に存在するアルブミンまたはその断片もしくは変異体であり得る。アルブミンは、ヒトアルブミンであり得、任意の脊椎動物、特に任意の哺乳動物に由来し得る。一実施形態では、アルブミンは、配列番号4のアミノ酸配列、または配列番号4と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む。

40

【0189】

好ましくは、アルブミン融合タンパク質は、N末端部分としてアルブミンを含み、C末端部分として治療用タンパク質を含む。あるいは、C末端部分としてアルブミンを含み、N末端部分として治療用タンパク質を含むアルブミン融合タンパク質も使用し得る。他の実施形態では、アルブミン融合タンパク質は、アルブミンのN末端とC末端の両方に融合

50

した治療用タンパク質を有する。好ましい実施形態では、N末端およびC末端で融合した治療用タンパク質は、同じ治療用タンパク質である。別の好ましい実施形態では、N末端およびC末端で融合した治療用タンパク質は、異なる治療用タンパク質である。一実施形態では、異なる治療用タンパク質は、同じまたは関連する疾患、障害、または状態を治療または予防するのに有用であり得る。一実施形態では、異なる治療用タンパク質は両方ともサイトカインである。

【0190】

一実施形態では、治療用タンパク質（1つまたは複数）は、ペプチドリンカー（1つまたは複数）を介してアルブミンに結合される。融合部分の間のリンカーペプチドは、部分間のより大きな物理的分離を提供し、したがって、例えばその同族受容体に結合するための治療用タンパク質部分のアクセス可能性を最大化し得る。リンカーペプチドは、それが柔軟であるかまたはより剛性であるようにアミノ酸で構成され得る。リンカー配列は、プロテアーゼによってまたは化学的に切断可能であり得る。

10

【0191】

本明細書で使用される場合、「Fc領域」という用語は、免疫グロブリンの2本の重鎖のそれぞれのFcドメイン（またはFc部分）によって形成される天然免疫グロブリンの部分の指す。本明細書で使用される場合、「Fcドメイン」という用語は、FcドメインがFvドメインを含まない単一の免疫グロブリン（Ig）重鎖の一部または断片を指す。ある実施形態では、Fcドメインは、パライン切断部位のすぐ上流のヒンジ領域で始まり、抗体のC末端で終わる。したがって、完全なFcドメインは、少なくともヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含む。ある実施形態では、Fcドメインは、ヒンジ（例えば、上部、中間および/または下部ヒンジ領域）ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメイン、またはその変異体、部分もしくは断片の少なくとも1つを含む。ある実施形態では、Fcドメインは、完全なFcドメイン（すなわち、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン）を含む。ある実施形態では、Fcドメインは、CH3ドメイン（またはその一部）に融合したヒンジドメイン（またはその一部）を含む。ある実施形態では、Fcドメインは、CH3ドメイン（またはその一部）に融合したCH2ドメイン（またはその一部）を含む。ある実施形態では、Fcドメインは、CH3ドメインまたはその一部からなる。ある実施形態では、Fcドメインは、ヒンジドメイン（またはその一部）およびCH3ドメイン（またはその一部）からなる。ある実施形態では、Fcドメインは、CH2ドメイン（またはその一部）およびCH3ドメインからなる。ある実施形態では、Fcドメインは、ヒンジドメイン（またはその一部）およびCH2ドメイン（またはその一部）からなる。ある実施形態では、Fcドメインは、CH2ドメインの少なくとも一部（例えば、CH2ドメインの全部または一部）を欠く。本明細書におけるFcドメインは、一般に、免疫グロブリン重鎖のFcドメインの全部または一部を含むポリペプチドを指す。これには、CH1、ヒンジ、CH2、および/またはCH3ドメイン全体を含むポリペプチド、ならびに、例えばヒンジ、CH2、およびCH3ドメインのみを含むそのようなペプチドの断片が含まれるが、これらに限定されない。Fcドメインは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体を含むがこれらに限定されない、任意の種および/または任意のサブタイプの免疫グロブリンに由来し得る。Fcドメインは、天然FcおよびFc変異体分子を包含する。本明細書に記載されるように、任意のFcドメインを、アミノ酸配列が天然に存在する免疫グロブリン分子の天然Fcドメインとは異なるように修飾し得ることは、当業者に理解されるであろう。ある実施形態では、Fcドメインは、エフェクタ機能（例えばFcR結合）が低下している。

20

30

40

【0192】

本明細書に記載のポリペプチドのFcドメインは、異なる免疫グロブリン分子に由来し得る。例えば、ポリペプチドのFcドメインは、IgG1分子に由来するCH2および/またはCH3ドメイン、ならびにIgG3分子に由来するヒンジ領域を含み得る。別の例では、Fcドメインは、一部はIgG1分子に由来し、一部はIgG3分子に由来するキ

50

メラヒンジ領域を含むことができる。別の例では、Fcドメインは、一部はIgG1分子に由来し、一部はIgG4分子に由来するキメラヒンジを含むことができる。

【0193】

ある実施形態では、延長PK基は、Fcドメインもしくはその断片、またはFcドメインもしくはその断片の変異体（本開示の目的のために、その全てが「Fcドメイン」という用語に含まれる。）を含む。Fcドメインは、抗原に結合する可変領域を含まない。本開示での使用に適したFcドメインは、いくつかの異なる供給源から入手し得る。ある実施形態では、Fcドメインはヒト免疫グロブリンに由来する。ある実施形態では、FcドメインはヒトIgG1定常領域に由来する。しかしながら、Fcドメインは、例えば、げっ歯動物種（例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット）または非ヒト霊長動物種（例

10

【0194】

さらに、Fcドメイン（またはその断片もしくは変異体）は、IgM、IgG、IgD、IgA、およびIgEを含む任意の免疫グロブリンクラス、ならびにIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含む任意の免疫グロブリンアイソタイプに由来し得る。

【0195】

様々なFcドメイン遺伝子配列（例えば、マウスおよびヒト定常領域遺伝子配列）は、公的にアクセス可能な寄託物の形で入手可能である。特定のエフェクタ機能を欠く、および/または免疫原性を低下させる特定の修飾を有するFcドメイン配列を含む定常領域ドメインを選択することができる。抗体および抗体をコードする遺伝子の多くの配列が公開されており、適切なFcドメイン配列（例えばヒンジ、CH2、および/もしくはCH3配列、またはその断片もしくは変異体）は、当技術分野で広く認められている技術を使用してこれらの配列から得ることができる。

20

【0196】

ある実施形態では、延長PK基は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第2005/0287153号、米国特許出願第2007/0003549号、米国特許出願第2007/0178082号、米国特許出願第2007/0269422号、米国特許出願第2010/0113339号、国際公開第2009/083804号、および国際公開第2009/133208号に記載されているものなどの血清アルブミン結合タンパク質である、ある実施形態では、延長PK基は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,176,278号および米国特許第8,158,579号に開示されているように、トランスフェリンである。ある実施形態では、延長PK基は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第2007/0178082号に開示されているものなどの血清免疫グロブリン結合タンパク質である。ある実施形態では、延長PK基は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第2012/0094909号に開示されているものなどの、血清アルブミンに結合するフィブロネクチン（Fn）ベースの足場ドメインタンパク質である。フィブロネクチンベースの足場ドメインタンパク質を作製する方法もまた、米国特許出願第2012/0094909号に開示されている。Fn3ベースの延長PK基の非限定的な例は、Fn3（HSA）、すなわち、ヒト血清アルブミンに結合するFn3タンパク質である。

30

40

【0197】

ある態様では、本開示による使用に適した、延長PK ILなどの延長PKサイトカインは、1つ以上のペプチドリンカーを使用することができる。本明細書で使用される場合、「ペプチドリンカー」という用語は、ポリペプチド鎖の線状アミノ酸配列中の2つ以上のドメイン（例えば、延長PK部分とIL2、IL7またはIL21などのIL部分）を連結するペプチドまたはポリペプチド配列を指す。例えば、ペプチドリンカーを使用して、IL2部分をHSAドメインに連結し得る。別の実施形態では、ペプチドリンカーを使用して、IL7部分をHSAドメインに連結し得る。別の実施形態では、ペプチドリンカーを使用して、IL21部分をHSAドメインに連結し得る。

50

【 0 1 9 8 】

延長 P K 基を、例えば I L 2、I L 7 または I L 2 1 に融合するのに適したリンカーは当技術分野で周知である。例示的なリンカーには、グリシン - セリンポリペプチドリナー、グリシン - プロリンポリペプチドリナー、およびプロリン - アラニンポリペプチドリナーが含まれる。ある実施形態では、リンカーは、グリシン - セリンポリペプチドリナー、すなわち、グリシン残基とセリン残基からなるペプチドである。

【 0 1 9 9 】

抗原

本開示による使用に適したペプチドおよびタンパク質抗原、すなわち抗原またはその変異体は、典型的には、免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドまたはタンパク質を含む。ペプチドまたはタンパク質またはエピトープは、標的抗原、すなわちそれに対して免疫応答が惹起されるべき抗原に由来し得る。例えば、ペプチドもしくはタンパク質抗原、またはペプチドもしくはタンパク質抗原内に含まれるエピトープは、標的抗原または標的抗原の断片もしくは変異体であり得る。

10

【 0 2 0 0 】

投与される、または投与される核酸、特に R N A によってコードされるペプチドおよびタンパク質抗原、すなわちワクチン抗原は、好ましくは、ペプチドもしくはタンパク質抗原または核酸が投与される対象において、C A R を発現するように遺伝子改変された T 細胞の刺激、プライミングおよび/または拡大をもたらす。前記刺激された、プライミングされたおよび/または拡大された T 細胞は、好ましくは、標的抗原、特に疾患細胞、組織および/または器官によって発現される標的抗原、すなわち疾患関連抗原に対して向けられる。したがって、ワクチン抗原は、疾患関連抗原、またはその断片もしくは変異体を含み得る。一実施形態では、そのような断片または変異体は、疾患関連抗原と免疫学的に等価である。本開示の文脈において、「抗原の断片」または「抗原の変異体」という用語は、C A R 操作された T 細胞の刺激、プライミングおよび/または拡大をもたらす作用物質を意味し、刺激、プライミングおよび/または拡大された T 細胞は、特に疾患細胞、組織および/または器官によって提示された場合、抗原、すなわち疾患関連抗原を標的とする。したがって、ワクチン抗原は、疾患関連抗原に対応し得るかもしくはそれを含み得る、疾患関連抗原の断片に対応し得るかもしくはそれを含み得る、または疾患関連抗原もしくはその断片に相同である抗原に対応し得るかもしくはそれを含み得る。ワクチン抗原が、疾患関連抗原の断片または疾患関連抗原の断片に相同であるアミノ酸配列を含む場合、前記断片またはアミノ酸配列は、C A R 操作された T 細胞の C A R が標的とする疾患関連抗原のエピトープ、または疾患関連抗原のエピトープに相同である配列を含み得る。したがって、本開示によれば、ワクチン抗原は、疾患関連抗原の免疫原性断片、または疾患関連抗原の免疫原性断片に相同であるアミノ酸配列を含み得る。本開示による「抗原の免疫原性断片」は、好ましくは、抗原に結合する C A R を担持する T 細胞または抗原を発現する細胞を刺激、プライミングおよび/または拡大することができる抗原の断片に関する。ワクチン抗原は（疾患関連抗原と同様に）、C A R 操作された T 細胞による結合のための関連するエピトープを提供するために、抗原提示細胞などの細胞の表面に発現されることが好ましい。ワクチン抗原は組換え抗原であり得る。

20

30

40

【 0 2 0 1 】

「免疫学的に等価」という用語は、免疫学的に等価なアミノ酸配列などの免疫学的に等価な分子が、同じもしくは本質的に同じ免疫学的特性を示し、および/または、例えば免疫学的作用の種類に関して、同じもしくは本質的に同じ免疫学的作用を発揮することを意味する。本開示の文脈において、「免疫学的に等価」という用語は、好ましくは、免疫化のために使用される抗原または抗原変異体の免疫学的作用または特性に関して使用される。例えば、アミノ酸配列が、参照アミノ酸配列に結合する T 細胞または参照アミノ酸配列を発現する細胞などの対象の免疫系に暴露されたときに、参照アミノ酸配列と反応する特異性を有する免疫反応を誘導する場合、前記アミノ酸配列は参照アミノ酸配列と免疫学的に等価である。したがって、抗原と免疫学的に等価である分子は、T 細胞の刺激、プライ

50

ミングおよび/または拡大に関して、T細胞が標的とする抗原と同じもしくは本質的に同じ特性を示し、および/または同じもしくは本質的に同じ作用を発揮する。

【0202】

「プライミング」という用語は、T細胞がその特異的抗原と最初に接触し、エフェクタT細胞への分化を引き起こす過程を指す。

【0203】

「クローン拡大」または「拡大」という用語は、特定の实体が増加する過程を指す。本開示の文脈において、この用語は、好ましくは、リンパ球が抗原によって刺激され、増殖し、前記抗原を認識する特定のリンパ球が増幅される免疫学的応答の文脈で使用される。好ましくは、クローン拡大はリンパ球の分化をもたらす。

10

【0204】

「抗原」という用語は、免疫応答を生じさせることができるエピトープを含む作用物質に関する。「抗原」という用語には、特にタンパク質およびペプチドが含まれる。一実施形態では、抗原は、樹状細胞またはマクロファージのような抗原提示細胞などの免疫系の細胞の表面に存在する。T細胞エピトープなどの抗原またはそのプロセッシング産物は、一実施形態では、CAR分子によって結合される。したがって、抗原またはそのプロセッシング産物は、Tリンパ球(T細胞)と特異的に反応し得る。一実施形態では、抗原は、腫瘍抗原、ウイルス抗原、または細菌抗原などの疾患関連抗原であり、エピトープはそのような抗原に由来する。

【0205】

「疾患関連抗原」という用語は、疾患に関連する任意の抗原を指すためにその最も広い意味で使用される。疾患関連抗原は、宿主の免疫系を刺激して疾患に対する細胞性抗原特異的免疫応答および/または体液性抗体応答を生じさせるエピトープを含む分子である。したがって、疾患関連抗原またはそのエピトープは、治療目的に使用され得る。疾患関連抗原は、微生物、典型的には微生物抗原による感染に関連し得るか、または癌、典型的には腫瘍に関連し得る。

20

【0206】

「腫瘍抗原」という用語は、細胞質、細胞表面および細胞核に由来し得る癌細胞の構成要素を指す。特に、この用語は、細胞内でまたは腫瘍細胞上の表面抗原として産生される抗原を指す。腫瘍抗原は、典型的には癌細胞によって選択的に発現され(例えば、非癌細胞上よりも癌細胞においてより高いレベルで発現される。)、場合によっては、癌細胞によってのみ発現される。腫瘍抗原の例には、限定されることなく、p53、ART-4、BAGE、 α -カテニン/m、Bcr-abl、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CDC27/m、CDK4/m、CEA、クローディン6、クローディン18.2およびクローディン12などのクローディンファミリーの細胞表面タンパク質、c-MYC、CT、Cyp-B、DAM、ELF2M、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnT-V、Gap100、HAGE、HER-2/neu、HPV-E7、HPV-E6、HAST-2、hTERT(またはhTRT)、LAGE、LDLR/FUT、MAGE-A、好ましくはMAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、またはMAGE-A12、MAGE-B、MAGE-C、MART-1/メラニンA、MC1R、ミオシン/m、MUC1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NF1、NY-ESO-1、NY-BR-1、p190マイナーBCR-abl、Pml/RAR α 、PRAME、プロテイナーゼ3、PSA、PSM、RAGE、RU1またはRU2、SAGE、SART-1またはSART-3、SCGB3A2、SCP1、SCP2、SCP3、SSX、サイピン、TEL/AML1、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TPTE、WT、およびWT-1が含まれる。

30

40

【0207】

「ウイルス抗原」という用語は、抗原特性を有する、すなわち個体において免疫応答を

50

誘発することができる任意のウイルス成分を指す。ウイルス抗原は、ウイルスリボ核タンパク質またはエンベロープタンパク質であり得る。

【0208】

「細菌抗原」という用語は、抗原特性を有する、すなわち個体において免疫応答を誘発することができる任意の細菌成分を指す。細菌抗原は、細菌の細胞壁または細胞質膜に由来し得る。

【0209】

「エピトープ」という用語は、免疫系によって認識される抗原などの分子の一部または断片を指す。例えば、エピトープは、T細胞、B細胞または抗体によって認識され得る。抗原のエピトープは、抗原の連続部分または不連続部分を含み得、約5～約100、例えば約5～約50、より好ましくは約8～約30、最も好ましくは約10～約25アミノ酸の長さであり得、例えば、エピトープは、好ましくは9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25アミノ酸の長さであり得る。一実施形態では、エピトープは、約10～約25アミノ酸の長さである。「エピトープ」という用語は、T細胞エピトープを含む。

【0210】

「T細胞エピトープ」という用語は、MHC分子に関連して提示された場合にT細胞によって認識されるタンパク質の一部または断片を指す。「主要組織適合遺伝子複合体」という用語および「MHC」という略語は、MHCクラスIおよびMHCクラスII分子を含み、全ての脊椎動物に存在する遺伝子の複合体に関する。MHCタンパク質または分子は、免疫反応におけるリンパ球と抗原提示細胞または疾患細胞との間のシグナル伝達に重要であり、MHCタンパク質または分子はペプチドエピトープに結合し、T細胞上のT細胞受容体による認識のためにそれらを提示する。MHCによってコードされるタンパク質は、細胞の表面に発現され、自己抗原（細胞自体からのペプチド断片）および非自己抗原（例えば、侵入微生物の断片）の両方をT細胞に提示する。クラスI MHC/ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは、典型的には約8～約10アミノ酸長であるが、より長いまたはより短いペプチドも有効であり得る。クラスII MHC/ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは、典型的には約10～約25アミノ酸長であり、特に約13～約18アミノ酸長であるが、より長いおよびより短いペプチドも有効であり得る。

【0211】

一実施形態では、標的抗原は腫瘍抗原であり、ワクチン抗原またはその断片（例えば、エピトープ）は腫瘍抗原に由来する。腫瘍抗原は、様々な癌で発現されることが一般的に公知の「標準」抗原であり得る。腫瘍抗原はまた、個体の腫瘍に特異的であり、それまで免疫系によって認識されていなかった「ネオ抗原」であり得る。ネオ抗原またはネオエピトープは、アミノ酸変化をもたらす癌細胞のゲノムにおける1つ以上の癌特異的変異から生じ得る。腫瘍抗原がネオ抗原である場合、ワクチン抗原は、好ましくは、1つ以上のアミノ酸変化を含む前記ネオ抗原のエピトープまたは断片を含む。

【0212】

ペプチドおよびタンパク質抗原は、例えば5アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸、30アミノ酸、35アミノ酸、40アミノ酸、45アミノ酸、または50アミノ酸の長さを含む、2～100アミノ酸であり得る。いくつかの実施形態では、ペプチドは、50個を超えるアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態では、ペプチドは、100個を超えるアミノ酸であり得る。

【0213】

本発明によれば、抗原またはその変異体は、CARによって認識可能であるべきである。好ましくは、抗原またはその変異体は、CARによって認識される場合、適切な共刺激シグナルの存在下で、抗原またはその変異体を認識するCARを担持するT細胞の、刺激、プライミングおよび/または拡大を誘導することができる。本発明の実施形態の文脈において、抗原またはその変異体は、好ましくは細胞、好ましくは抗原提示細胞の表面に存在する。疾患細胞の表面での抗原の認識は、抗原（または抗原を発現する細胞）に対する

10

20

30

40

50

免疫反応をもたらし得る。

【0214】

本発明の様々な態様によれば、目的は、好ましくは、CLDN6またはCLDN18.2などの腫瘍抗原を発現する癌細胞に対する免疫応答を提供すること、およびCLDN6またはCLDN18.2などの腫瘍抗原を発現する細胞が関与する癌疾患を治療することである。好ましくは、本発明は、CLDN6またはCLDN18.2などの腫瘍抗原を発現する癌細胞を標的とするCAR操作されたT細胞の投与を含む。

【0215】

「細胞表面」は、当技術分野におけるその通常の意味に従って使用され、したがって、タンパク質および他の分子による結合にアクセス可能な細胞の外側を含む。抗原は、それが前記細胞の表面に位置し、例えば細胞に加えられた抗原特異的抗体による結合にアクセス可能である場合、細胞の表面で発現される。一実施形態では、細胞の表面に発現される抗原は、CARによって認識される細胞外部分を有する内在性膜タンパク質である。

10

【0216】

本発明の文脈における「細胞外部分」または「エキソドメイン」という用語は、細胞の細胞外空間に面しており、好ましくは、例えば細胞の外側に位置する抗体などの分子に結合することによって、前記細胞の外側からアクセス可能であるタンパク質などの分子の一部を指す。好ましくは、この用語は、1つ以上の細胞外ループもしくはドメインまたはその断片を指す。

【0217】

本発明の全ての態様の一実施形態では、抗原は、癌細胞などの疾患細胞で発現される。一実施形態では、抗原は、癌細胞などの疾患細胞の表面に発現される。一実施形態では、CARは、抗原またはその変異体の細胞外ドメインまたは細胞外ドメイン内のエピトープに結合する。一実施形態では、CARは、生細胞の表面に存在する抗原またはその変異体の天然エピトープに結合する。一実施形態では、前記抗原はクローディング、特にクローディング6またはクローディング18.2であり、前記CARは前記クローディングの最初の細胞外ループに結合する。一実施形態では、T細胞によって発現されるおよび/またはT細胞上に存在する場合の前記CARの、抗原提示細胞などの細胞上に存在する抗原またはその変異体への結合は、前記T細胞の刺激、プライミングおよび/または拡大をもたらす。一実施形態では、T細胞によって発現されるおよび/またはT細胞上に存在する場合の前記CARの、癌細胞などの疾患細胞上に存在する抗原への結合は、疾患細胞の細胞溶解および/またはアポトーシスをもたらす、前記T細胞は、好ましくは細胞毒性因子、例えばパーフォリンおよびグランザイムを放出する。

20

30

【0218】

免疫チェックポイント阻害剤

ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、本明細書に記載される他の治療剤と組み合わせて使用される。

【0219】

本明細書で使用される場合、「免疫チェックポイント」は、抗原のT細胞受容体認識の大きさおよび質を調節する共刺激および阻害シグナルを指す。ある実施形態では、免疫チェックポイントは阻害シグナルである。ある実施形態では、阻害シグナルは、PD-1とPD-L1との間の相互作用である。ある実施形態では、阻害シグナルは、CD28結合を置き換えるCTLA-4とCD80またはCD86との間の相互作用である。ある実施形態では、阻害シグナルは、LAG3とMHCクラスII分子との間の相互作用である。ある実施形態では、阻害シグナルは、TIM3とガレクチン9との間の相互作用である。

40

【0220】

本明細書で使用される場合、「免疫チェックポイント阻害剤」は、1つ以上のチェックポイントタンパク質を完全にまたは部分的に低減する、阻害する、妨げるまたは調節する分子を指す。ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントに関連する阻害シグナルを防止する。ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は

50

、免疫チェックポイントに関連する阻害シグナル伝達を妨害する抗体またはその断片である。ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、阻害シグナル伝達を妨害する小分子である。ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、チェックポイント遮断タンパク質間の相互作用を妨げる抗体、その断片、または抗体模倣物、例えば、PD-1とPD-L1との間の相互作用を妨げる抗体またはその断片である。ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4とCD80またはCD86との間の相互作用を防げる抗体またはその断片である。ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、LAG3とそのリガンド、またはTIM-3とそのリガンドとの間の相互作用を妨げる抗体またはその断片である。チェックポイント阻害剤はまた、分子（またはその変異体）自体の可溶性形態、例えば、可溶性PD-L1またはPD-L1融合物の形態であり得る。

10

【0221】

「プログラム死1 (PD-1)」受容体は、CD28ファミリーに属する免疫抑制性受容体を指す。PD-1は、インピボで以前に活性化されたT細胞上で主に発現され、PD-L1とPD-L2の2つのリガンドに結合する。本明細書で使用される「PD-1」という用語は、ヒトPD-1 (hPD-1)、hPD-1の変異体、アイソフォーム、および種ホモログ、ならびにhPD-1と少なくとも1つの共通のエピトープを有する類似体を含む。

【0222】

「プログラム死リガンド1 (PD-L1)」は、PD-1に結合するとT細胞の活性化およびサイトカイン分泌を下方制御する、PD-1の2つの細胞表面糖タンパク質リガンドの1つ（もう1つはPD-L2）である。本明細書で使用される「PD-L1」という用語は、ヒトPD-L1 (hPD-L1)、hPD-L1の変異体、アイソフォーム、および種ホモログ、ならびにhPD-L1と少なくとも1つの共通のエピトープを有する類似体を含む。

20

【0223】

「細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA-4)」は、T細胞表面分子であり、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。このタンパク質は、CD80およびCD86に結合することによって免疫系を下方制御する。本明細書で使用される「CTLA-4」という用語は、ヒトCTLA-4 (hCTLA-4)、hCTLA-4の変異体、アイソフォーム、および種ホモログ、ならびにhCTLA-4と少なくとも1つの共通のエピトープを有する類似体を含む。

30

【0224】

「リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)」は、MHCクラスII分子に結合することによるリンパ球活性の阻害に関連する阻害性受容体である。この受容体は、Treg細胞の機能を増強し、CD8+エフェクターT細胞の機能を阻害する。本明細書で使用される「LAG3」という用語は、ヒトLAG3 (hLAG3)、hLAG3の変異体、アイソフォーム、および種ホモログ、ならびに少なくとも1つの共通のエピトープを有する類似体を含む。

【0225】

「T細胞膜タンパク質3 (TIM3)」は、TH1細胞応答の阻害によるリンパ球活性の阻害に関与する阻害性受容体である。そのリガンドは、様々な種類の癌で上方制御されるガレクチン9である。本明細書で使用される「TIM3」という用語は、ヒトTIM3 (hTIM3)、hTIM3の変異体、アイソフォーム、および種ホモログ、ならびに少なくとも1つの共通のエピトープを有する類似体を含む。

40

【0226】

「B7ファミリー」は、未定義の受容体の阻害性リガンドを指す。B7ファミリーはB7-H3およびB7-H4を包含し、どちらも腫瘍細胞および腫瘍浸潤細胞で上方制御される。

【0227】

50

ある実施形態では、本明細書に開示される方法での使用に適した免疫チェックポイント阻害剤は、阻害シグナルのアンタゴニスト、例えば、PD - 1、PD - L 1、CTLA - 4、LAG 3、B 7 - H 3、B 7 - H 4、またはTIM 3を標的とする抗体である。これらのリガンドと受容体は、Pardoll, D., Nature. 12: 252 - 264, 2012で総説されている。

【0228】

ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、阻害性免疫調節因子からのシグナル伝達を妨害または阻害する抗体またはその抗原結合部分である。ある実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、阻害性免疫調節因子からのシグナル伝達を妨害または阻害する小分子である。

10

【0229】

ある実施形態では、阻害性免疫調節因子は、PD - 1 / PD - L 1シグナル伝達経路の成分である。したがって、本開示のある実施形態は、PD - 1受容体とそのリガンドであるPD - L 1との間の相互作用を妨害する抗体またはその抗原結合部分を対象に投与することを提供する。PD - 1に結合し、PD - 1とそのリガンドであるPD - L 1との間の相互作用を妨害する抗体は、当技術分野で公知である。ある実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、PD - 1に特異的に結合する。ある実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、PD - L 1に特異的に結合し、PD - 1とのその相互作用を阻害し、それによって免疫活性を増加させる。

【0230】

20

ある実施形態では、阻害性免疫調節因子は、CTLA 4シグナル伝達経路の成分である。したがって、本開示のある実施形態は、CTLA 4を標的とし、CD 8 0およびCD 8 6とのその相互作用を妨害する抗体またはその抗原結合部分を対象に投与することを提供する。

【0231】

ある実施形態では、阻害性免疫調節因子は、LAG 3（リンパ球活性化遺伝子3）シグナル伝達経路の成分である。したがって、本開示のある実施形態は、LAG 3を標的とし、MHCクラスII分子とのその相互作用を妨害する抗体またはその抗原結合部分を対象に投与することを提供する。

【0232】

30

ある実施形態では、阻害性免疫調節因子は、B 7ファミリーシグナル伝達経路の成分である。ある実施形態では、B 7ファミリーメンバーは、B 7 - H 3およびB 7 - H 4である。したがって、本開示のある実施形態は、B 7 - H 3またはB 7 - H 4を標的とする抗体またはその抗原結合部分を対象に投与することを提供する。B 7ファミリーは定義された受容体を有さないが、これらのリガンドは腫瘍細胞または腫瘍浸潤細胞で上方制御される。前臨床マウスモデルは、これらのリガンドの遮断が抗腫瘍免疫を増強できることを示している。

【0233】

ある実施形態では、阻害性免疫調節因子は、TIM 3（T細胞膜タンパク質3）シグナル伝達経路の成分である。したがって、本開示のある実施形態は、TIM 3を標的とし、ガレクチン9とのその相互作用を妨害する抗体またはその抗原結合部分を対象に投与することを提供する。

40

【0234】

標的化が、例えば、T細胞増殖の増加、T細胞活性化の増強、および/またはサイトカイン産生の増加（例えばIFN - 、IL 2）に反映されるような抗腫瘍免疫応答などの免疫応答の刺激をもたらすことを条件として、他の免疫チェックポイント標的もまた、アンタゴニストまたは抗体によって標的化され得ることが当業者に理解されるであろう。

【0235】

本開示によれば、「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互に接続された少なくとも2本の重（H）鎖および2本の軽（L）鎖を含む糖タンパク質を指す。「抗体

50

」という用語には、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体が含まれる。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略す）と重鎖定常領域で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略す）と軽鎖定常領域で構成される。VHおよびVL領域は、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存された領域が間に組み入れられた、相補性決定領域（CDR）と称される超可変性の領域にさらに細分化することができる。各VHおよびVLは、次の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置された3つのCDRと4つのFRで構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクタ細胞）および古典的補体系の第1成分（C1q）を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

10

【0236】

抗体は、マウス、ラット、ウサギ、モルモットおよびヒトを含むがこれらに限定されない、様々な種に由来し得る。

【0237】

本明細書に記載される抗体には、IgA1またはIgA2などのIgA、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgM、およびIgD抗体が含まれる。様々な実施形態では、抗体は、IgG1抗体、より具体的にはIgG1、カッパもしくはIgG1、ラムダアイソタイプ（すなわちIgG1、 κ 、 λ ）、IgG2a抗体（例えばIgG2a、 κ 、 λ ）、IgG2b抗体（例えばIgG2b、 κ 、 λ ）、IgG3抗体（例えばIgG3、 κ 、 λ ）またはIgG4抗体（例えばIgG4、 κ 、 λ ）である。

20

【0238】

抗体の「抗原結合部分」（もしくは単に「結合部分」）または抗体の「抗原結合断片」（もしくは単に「結合断片」）という用語または同様の用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実施され得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、(i) VL、VH、CLおよびCHドメインからなる一価断片である、Fab断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片である、F(ab')₂断片；(iii) VHドメインとCHドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の一本の腕のVLドメインとVHドメインからなるFv断片；(v) VHドメインからなるdAb断片（Ward et al., (1989) Nature 341: 544 - 546）；(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）、ならびに(vii) 任意で合成リンカーによって連結されていてもよい2つ以上の単離されたCDRの組合せが含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VLとVHは別々の遺伝子によってコードされるが、それらを、VL領域とVH領域が対合して一価分子（一本鎖Fv（scFv））として公知；例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423 - 426；およびHouston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883参照）を形成する単一のタンパク質鎖として作製することを可能にする合成リンカーによって、組換え法を用いて連結することができる。そのような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合断片」という用語に包含されることが意図されている。さらなる例は、(i) 免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに融合した結合ドメインポリペプチド、(ii) ヒンジ領域に融合した免疫グロブリン重鎖CH2定常領域、および(iii) CH2定常領域に融合した免疫グロブリン重鎖CH3定常領域を含む、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である。結合ドメインポリペプチドは、重鎖可変領域または軽鎖可変領域であり得る。結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は、米国特許出願第2003/0118592号および米国特許出願第2003/0133939号にさらに開示されている。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。

30

40

【0239】

50

RNA 標的化

本開示によれば、本明細書に記載のRNAの投与後、RNAの少なくとも一部は標的細胞に送達される。一実施形態では、RNAの少なくとも一部は標的細胞のサイトゾルに送達される。一実施形態では、RNAは標的細胞によって翻訳されて、コードされたペプチドまたはタンパク質を産生する。

【0240】

本開示のいくつかの態様は、本明細書に開示されるRNA（例えば、サイトカインをコードするRNAおよび抗原またはその変異体をコードするRNA）の標的化送達を含む。

【0241】

一実施形態では、本開示は、リンパ系、特に二次リンパ器官、より具体的には脾臓を標的とすることを含む。投与されるRNAが、抗原またはその変異体をコードするRNAである場合、リンパ系、特に二次リンパ器官、より具体的には脾臓を標的とすることが特に好ましい。

10

【0242】

一実施形態では、標的細胞は脾臓細胞である。一実施形態では、標的細胞は、脾臓におけるプロフェッショナル抗原提示細胞などの抗原提示細胞である。一実施形態では、標的細胞は脾臓の樹状細胞である。

【0243】

「リンパ系」は、循環系の一部であり、リンパを運ぶリンパ管のネットワークを含む免疫系の重要な部分である。リンパ系は、リンパ器官、リンパ管の伝導ネットワーク、および循環リンパからなる。一次または中枢リンパ器官は、未成熟な前駆細胞からリンパ球を生成する。胸腺および骨髄は一次リンパ器官を構成する。リンパ節および脾臓を含む二次または末梢リンパ器官は、成熟したナイーブリンパ球を維持し、適応免疫応答を開始する。

20

【0244】

RNAは、RNAがカチオン性脂質および任意でさらなる脂質またはヘルパー脂質を含むリポソームに結合して注射可能なナノ粒子製剤を形成する、いわゆるリポプレックス製剤によって脾臓に送達され得る。リポソームは、エタノール中の脂質の溶液を水または適切な水相に注入することによって得られ得る。RNAリポプレックス粒子は、リポソームをRNAと混合することによって調製され得る。脾臓標的化RNAリポプレックス粒子は、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2013/143683号に記載されている。正味の負電荷を有するRNAリポプレックス粒子を使用して、脾臓組織または脾臓細胞、例えば抗原提示細胞、特に樹状細胞を選択的に標的化し得ることが見出された。したがって、RNAリポプレックス粒子の投与後、脾臓におけるRNA蓄積および/またはRNA発現が起こる。したがって、本開示のRNAリポプレックス粒子は、脾臓においてRNAを発現するために使用され得る。一実施形態では、RNAリポプレックス粒子の投与後、肺および/または肝臓におけるRNA蓄積および/またはRNA発現は、全く起こらないかまたは本質的に起こらない。一実施形態では、RNAリポプレックス粒子の投与後、脾臓内のプロフェッショナル抗原提示細胞などの抗原提示細胞におけるRNA蓄積および/またはRNA発現が起こる。したがって、本開示のRNAリポプレックス粒子は、そのような抗原提示細胞においてRNAを発現するために使用され得る。一実施形態では、抗原提示細胞は、樹状細胞および/またはマクロファージである。

30

40

【0245】

本開示の文脈において、「RNAリポプレックス粒子」という用語は、脂質、特にカチオン性脂質、およびRNAを含む粒子に関する。正に帯電したリポソームと負に帯電したRNAとの間の静電相互作用は、複合体化とRNAリポプレックス粒子の自発的形成をもたらす。正に帯電したリポソームは、一般に、DOTMAなどのカチオン性脂質とDOP Eなどのさらなる脂質を使用して合成し得る。一実施形態では、RNAリポプレックス粒子はナノ粒子である。

【0246】

本明細書で使用される場合、「カチオン性脂質」は、正味の正電荷を有する脂質を指す

50

。カチオン性脂質は、静電相互作用によって負に帯電したRNAを脂質マトリックスに結合する。一般に、カチオン性脂質は、ステロール、アシルまたはジアシル鎖などの親油性部分を有し、脂質の頭部基は、典型的には正電荷を担持する。カチオン性脂質の例には、1, 2 - ジ - O - オクタデセニル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (DOTMA)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDAB)；1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP)；1, 2 - ジオレオイル - 3 - ジメチルアンモニウムプロパン (DODAP)；1, 2 - ジアシルオキシ - 3 - ジメチルアンモニウムプロパン；1, 2 - ジアルキルオキシ - 3 - ジメチルアンモニウムプロパン；ジオクタデシルジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、2, 3 - ジ (テトラデコキシ) プロピル - (2 - ヒドロキシエチル) - ジメチルアザニウム (DMRIE)、1, 2 - ジミリス

10

【0247】

RNAリポブックス粒子の正電荷と負電荷の全体的な比率および物理的安定性を調整するために、さらなる脂質を組み込んでよい。ある実施形態では、さらなる脂質は中性脂質である。本明細書で使用される場合、「中性脂質」は、ゼロの正味電荷を有する脂質を指す。中性脂質の例には、1, 2 - ジ - (9Z - オクタデセノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、およびセレブロシドが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、さらなる脂質は、DOPE、コレステロールおよび/またはDOPCである。

20

【0248】

ある実施形態では、RNAリポブックス粒子は、カチオン性脂質およびさらなる脂質の両方を含む。例示的な実施形態では、カチオン性脂質はDOTMAであり、さらなる脂質はDOPEである。

30

【0249】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカチオン性脂質と少なくとも1つのさらなる脂質とのモル比は、約10 : 0 ~ 約1 : 9、約4 : 1 ~ 約1 : 2、または約3 : 1 ~ 約1 : 1である。特定の実施形態では、モル比は、約3 : 1、約2.75 : 1、約2.5 : 1、約2.25 : 1、約2 : 1、約1.75 : 1、約1.5 : 1、約1.25 : 1、または約1 : 1であり得る。例示的な実施形態では、少なくとも1つのカチオン性脂質と少なくとも1つのさらなる脂質とのモル比は、約2 : 1である。

【0250】

本明細書に記載のRNAリポブックス粒子は、一実施形態では、約200 nm ~ 約1000 nm、約200 nm ~ 約800 nm、約250 nm ~ 約700 nm、約400 nm ~ 約600 nm、約300 nm ~ 約500 nm、または約350 nm ~ 約400 nmの範囲の平均直径を有する。特定の実施形態では、RNAリポブックス粒子は、約200 nm、約225 nm、約250 nm、約275 nm、約300 nm、約325 nm、約350 nm、約375 nm、約400 nm、約425 nm、約450 nm、約475 nm、約500 nm、約525 nm、約550 nm、約575 nm、約600 nm、約625 nm、約650 nm、約700 nm、約725 nm、約750 nm、約775 nm、約800 nm、約825 nm、約850 nm、約875 nm、約900 nm、約925 nm、約950 nm、約975 nm、または約1000 nmの平均直径を有する。一実施形態では、

40

50

RNAリポプレックス粒子は、約250nm～約700nmの範囲の平均直径を有する。別の実施形態では、RNAリポプレックス粒子は、約300nm～約500nmの範囲の平均直径を有する。例示的な実施形態では、RNAリポプレックス粒子は、約400nmの平均直径を有する。

【0251】

本開示のRNAリポプレックス粒子の電荷は、少なくとも1つのカチオン性脂質に存在する電荷とRNAに存在する電荷との合計である。電荷比は、少なくとも1つのカチオン性脂質に存在する正電荷とRNAに存在する負電荷の比である。少なくとも1つのカチオン性脂質に存在する正電荷とRNAに存在する負電荷の電荷比は、以下の式によって計算される：電荷比 = [(カチオン性脂質濃度 (mol)) * (カチオン性脂質中の正電荷の総数)] / [(RNA濃度 (mol)) * (RNA中の負電荷の総数)]。

10

【0252】

生理的pHでの本明細書に記載の脾臓標的化RNAリポプレックス粒子は、好ましくは、正電荷と負電荷の電荷比が約1.9:2～約1:2などの正味の負電荷を有する。特定の実施形態では、生理的pHでのRNAリポプレックス粒子における正電荷と負電荷の電荷比は、約1.9:2.0、約1.8:2.0、約1.7:2.0、約1.6:2.0、約1.5:2.0、約1.4:2.0、約1.3:2.0、約1.2:2.0、約1.1:2.0、または約1:2.0である。

【0253】

延長PKサイトカイン、特に本明細書に記載されるような延長PKインターロイキンなどのサイトカインは、対象における標的器官または標的組織に送達され得、これは、前記標的器官または標的組織へのRNAの選択的送達のための製剤中でサイトカインをコードするRNAを対象に投与することを含む。

20

【0254】

一実施形態では、標的器官はリンパ系、特に二次リンパ系器官、より具体的には脾臓であり、標的組織はリンパ系の組織、特に二次リンパ系器官の組織、より具体的には脾臓組織である。そのような標的組織へのサイトカインの送達は、特に、この器官または組織におけるサイトカインの存在が望ましい(例えば、免疫応答を誘導するために、特にサイトカインがT細胞プライミング中に必要とされる場合、または常在免疫細胞の活性化のために)が、サイトカインが全身的に、特に有意な量で存在することは望ましくない(例えば、サイトカインが全身毒性を有するため)場合に好ましい。適切なサイトカインの特に好ましい例は、T細胞プライミングに関与するサイトカインである。

30

【0255】

対象の標的器官または標的組織へのサイトカインの送達の別の実施形態では、標的器官は肝臓であり、標的組織は肝臓組織である。そのような標的組織へのサイトカインの送達は、特に、この器官もしくは組織におけるサイトカインの存在が望ましい場合、および/または大量のサイトカインを発現することが望ましい場合、および/またはサイトカインの全身的な存在、特に有意な量での存在が望ましいかもしくは必要とされる場合に好ましい。

【0256】

一実施形態では、サイトカインをコードするRNAは、肝臓を標的とするための製剤中で投与される。そのような製剤は本明細書に記載されている。適切なサイトカインの例には、IL2、IL7またはIL21、その断片および変異体、ならびに本明細書に記載されるような延長PKサイトカインなどの、これらのサイトカイン、断片および変異体の融合タンパク質が含まれる。適切なサイトカインの特に好ましい例は、T細胞の増殖および/または維持に関与するサイトカインである。

40

【0257】

RNA送達システムは、肝臓に対する固有の選択性を有する。これは、脂質ベースの粒子、カチオン性および中性ナノ粒子、特にリボソーム、ナノミセルおよびバイオコンジュゲートの親油性リガンドなどの脂質ナノ粒子に関係する。肝臓蓄積は、肝血管系の不連続

50

な性質または脂質代謝（リポソームおよび脂質もしくはコレステロールコンジュゲート）によって引き起こされる。

【0258】

肝臓へのRNAのインビボ送達のために、薬物送達システムを使用して、その分解を防止することによってRNAを肝臓に輸送し得る。例えば、ポリ（エチレングリコール）（PEG）被覆表面とmRNA含有コアからなるポリプレックスナノミセルは、ナノミセルが生理的条件下でRNAの優れたインビボ安定性を提供するため、有用なシステムである。さらに、高密度のPEGパリセードで構成されるポリプレックスナノミセル表面によって提供されるステルス特性は、宿主の免疫防御を有効に回避する。

【0259】

医薬組成物

本明細書に記載の薬剤は、医薬組成物または医薬品で投与され得、任意の適切な医薬組成物の形態で投与され得る。

【0260】

本発明の全ての態様の一実施形態では、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞、サイトカインをコードする核酸、または抗原もしくはその変異体をコードする核酸などの本明細書に記載の成分は、一緒にまたは互いに別々に、薬学的に許容される担体を含み得、任意で1つ以上のアジュバント、安定剤などを含み得る医薬組成物で投与され得る。一実施形態では、医薬組成物は、治療的または予防的治療のため、例えば、本明細書に記載されるような癌疾患などの抗原が関与する疾患の治療または予防に使用するためのものである。

【0261】

「医薬組成物」という用語は、好ましくは薬学的に許容される担体、希釈剤および/または賦形剤と共に、治療上有効な薬剤を含む製剤に関する。前記医薬組成物は、前記医薬組成物を対象に投与することによって疾患または障害を治療する、予防する、またはその重症度を軽減するのに有用である。医薬組成物は、当技術分野では医薬製剤としても公知である。

【0262】

本開示の医薬組成物は、好ましくは1つ以上のアジュバントを含むか、または1つ以上のアジュバントと共に投与され得る。「アジュバント」という用語は、免疫応答を延長、増強または加速する化合物に関する。アジュバントは、油エマルジョン（例えばフロイントアジュバント）、無機化合物（ミョウバンなど）、細菌産物（百日咳菌（*Bordetella pertussis*）毒素など）、または免疫刺激複合体などの不均一な化合物の群を含む。アジュバントの例には、限定されることなく、LPS、GP96、CpGオリゴデオキシヌクレオチド、成長因子、およびモノカイン、リンホカイン、インターロイキン、ケモカインなどのサイトカインが含まれる。ケモカインは、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL12、IFN、IFN、GM-CSF、LT-aであり得る。さらなる公知のアジュバントは、水酸化アルミニウム、フロイントアジュバント、またはMontanide（登録商標）ISA51などの油である。本開示で使用するための他の適切なアジュバントには、Pam3Cysなどのリポペプチドが含まれる。

【0263】

本開示による医薬組成物は、一般に「薬学的に有効な量」および「薬学的に許容される製剤」で適用される。

【0264】

「薬学的に許容される」という用語は、医薬組成物の活性成分の作用と相互作用しない物質の非毒性を指す。

【0265】

「薬学的に有効な量」または「治療有効量」という用語は、単独でまたはさらなる用量と共に、所望の反応または所望の効果を達成する量を指す。特定の疾患の治療の場合、所

10

20

30

40

50

望の反応は、好ましくは疾患の経過の障害に関する。これは、疾患の進行を遅くすること、特に疾患の進行を中断または逆転させることを含む。疾患の治療における所望の反応はまた、前記疾患または前記状態の発症の遅延または発症の予防であり得る。本明細書に記載の組成物の有効量は、治療される状態、疾患の重症度、年齢、生理学的状態、サイズおよび体重を含む患者の個々のパラメータ、治療の期間、付随する治療の種類（存在する場合）、特定の投与経路ならびに同様の因子に依存する。したがって、本明細書に記載の組成物の投与量は、そのような様々なパラメータに依存し得る。患者の反応が初期用量では不十分である場合、より高い用量（または異なる、より局所的な投与経路によって達成される効果的により高い用量）を使用し得る。

【0266】

本開示の医薬組成物は、塩、緩衝剤、防腐剤、および任意で他の治療薬を含み得る。一実施形態では、本開示の医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤および/または賦形剤を含む。

【0267】

本開示の医薬組成物で使用するための適切な防腐剤には、限定されることなく、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベンおよびチメロサルが含まれる。

【0268】

本明細書で使用される「賦形剤」という用語は、本開示の医薬組成物中に存在し得るが、活性成分ではない物質を指す。賦形剤の例には、限定されることなく、担体、結合剤、希釈剤、潤滑剤、増粘剤、界面活性剤、防腐剤、安定剤、乳化剤、緩衝剤、香味剤、または着色剤が含まれる。

【0269】

「希釈剤」という用語は、希釈するおよび/または希薄にする薬剤に関する。さらに、「希釈剤」という用語には、流体、液体もしくは固体の懸濁液および/または混合媒体のいずれか1つ以上が含まれる。適切な希釈剤の例には、エタノール、グリセロールおよび水が含まれる。

【0270】

「担体」という用語は、医薬組成物の投与を容易にする、増強するまたは可能にするために活性成分が組み合わされる、天然、合成、有機、無機であり得る成分を指す。本明細書で使用される担体は、対象への投与に適した1つ以上の適合性の固体もしくは液体充填剤、希釈剤または封入物質であり得る。適切な担体には、限定されることなく、滅菌水、リンゲル液、乳酸リンゲル液、滅菌塩化ナトリウム溶液、等張食塩水、ポリアルキレングリコール、水素化ナフタレンおよび、特に生体適合性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマーまたはポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンコポリマーが含まれる。一実施形態では、本開示の医薬組成物は等張食塩水を含む。

【0271】

治療的使用のための薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤は、製薬分野で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)に記載されている。

【0272】

医薬担体、賦形剤または希釈剤は、意図される投与経路および標準的な薬務に関して選択することができる。

【0273】

一実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、静脈内、動脈内、皮下、皮内または筋肉内に投与され得る。ある実施形態では、医薬組成物は、局所投与または全身投与用に製剤化される。全身投与は、胃腸管を介した吸収を含む経腸投与、または非経口投与を含み得る。本明細書で使用される場合、「非経口投与」は、静脈内注射などによる、胃腸管を介する以外の任意の方法での投与を指す。好ましい実施形態では、医薬組成物は全身投与用に製剤化される。別の好ましい実施形態では、全身投与は静脈内投与によるものであ

10

20

30

40

50

る。

【0274】

本発明の全ての態様の一実施形態では、サイトカインをコードするか、または抗原もしくはその変異体をコードする核酸を全身投与する。本発明の全ての態様の一実施形態では、抗原またはその変異体をコードする核酸の全身投与後、脾臓における抗原またはその変異体の発現が起こる。本発明の全ての態様の一実施形態では、抗原またはその変異体をコードする核酸の全身投与後、抗原提示細胞、好ましくはプロフェッショナル抗原提示細胞における抗原またはその変異体の発現が起こる。一実施形態では、抗原提示細胞は、樹状細胞、マクロファージおよびB細胞からなる群より選択される。本発明の全ての態様の一実施形態では、抗原またはその変異体をコードする核酸の全身投与後、肺および/または肝臓における抗原またはその変異体の発現は、全く起こらないかまたは本質的に起こらない。本発明の全ての態様の一実施形態では、抗原またはその変異体をコードする核酸の全身投与後、脾臓における抗原またはその変異体の発現は、肺における発現量の少なくとも5倍である。

10

【0275】

本明細書で使用される「同時投与」という用語は、異なる化合物または組成物（例えば、インターロイキンをコードするRNAおよび抗原またはその変異体をコードするRNA）を同じ患者に同時に、本質的に同時に、または連続的に投与する方法を意味する。投与が同時に行われる場合、異なる化合物または組成物が同じ組成物内で投与される必要はない。

20

【0276】

治療

本明細書に記載の薬剤、組成物および方法は、疾患、例えば、抗原を発現する疾患細胞の存在を特徴とする疾患を有する対象を治療するために使用することができる。特に好ましい疾患は癌疾患である。例えば、抗原がウイルスに由来する場合、薬剤、組成物および方法は、前記ウイルスによって引き起こされるウイルス性疾患の治療に有用であり得る。抗原が腫瘍抗原である場合、薬剤、組成物および方法は、癌細胞が前記腫瘍抗原を発現する癌疾患の治療に有用であり得る。

【0277】

一実施形態では、本開示は、対象において免疫応答を誘導するための方法に関する。例示的な実施形態では、免疫応答は癌に対するものである。

30

【0278】

「疾患」という用語は、個体の身体に影響を及ぼす異常な状態を指す。疾患はしばしば、特定の症状および徴候に関連する医学的状态として解釈される。疾患は、感染症などの外部からの要因によって引き起こされ得るか、または自己免疫疾患などの内部機能不全によって引き起こされ得る。ヒトでは、「疾患」はしばしば、罹患した個人に疼痛、機能障害、苦痛、社会的な問題、もしくは死を引き起こす、または個人と接触する人々に同様の問題を引き起こす状態を指すためにより広く使用される。このより広い意味では、疾患は時に、損傷、無力、障害、症候群、感染、孤発症状、逸脱した挙動、および構造と機能の非定型の変化を含むが、他の状況および他の目的では、これらは区別可能なカテゴリと見なされ得る。多くの疾患を患い、それと共に生活することは、人生観および人格を変える可能性があるため、疾患は通常、身体的だけでなく感情的にも個体に影響を及ぼす。

40

【0279】

本文脈において、「治療」、「治療する」または「治療的介入」という用語は、疾患または障害などの状態と闘うことを目的とした対象の管理およびケアに関する。この用語は、症状もしくは合併症を緩和するため、疾患、障害もしくは状態の進行を遅らせるため、症状および合併症を緩和もしくは軽減するため、ならびに/または疾患、障害もしくは状態を治癒もしくは除去するため、ならびに状態を予防するための治療上有効な化合物の投与などの、対象が罹患している所与の状態に対するあらゆる範囲の治療を含むことを意図しており、予防は、疾患、状態または障害と闘う目的での個体の管理およびケアとして理

50

解されるべきであり、症状または合併症の発症を防止するための活性化合物の投与を含む。

【0280】

「治療的治療」という用語は、個体の健康状態を改善する、および/または寿命を延長（増加）させる任意の治療に関する。前記治療は、個体における疾患を排除し、個体における疾患の発症を停止もしくは遅延させ、個体における疾患の発症を阻害もしくは遅延させ、個体における症状の頻度もしくは重症度を低下させ、および/または現在疾患を有しているかもしくは以前に有していたことがある個体における再発を減少させ得る。

【0281】

「予防的治療」または「防止的治療」という用語は、個体において疾患が発生するのを防ぐことを目的とした任意の治療に関する。「予防的治療」または「防止的治療」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。

10

【0282】

「個体」および「対象」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。これらは、疾患または障害（例えば癌）に罹患し得るかまたは罹患しやすいが、疾患または障害を有していてもよくまたは有していなくてもよいヒトまたは別の哺乳動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマまたは霊長動物）を指す。多くの実施形態では、個体はヒトである。特に明記されない限り、「個体」および「対象」という用語は特定の年齢を示すものではなく、したがって成人、高齢者、子供、および新生児を包含する。本開示の実施形態では、「個体」または「対象」は「患者」である。

【0283】

「患者」という用語は、治療のための個体または対象、特に罹患した個体または対象を意味する。

20

【0284】

本開示の一実施形態では、目的は、腫瘍抗原を発現する癌細胞などの抗原を発現する疾患細胞に対する免疫応答を提供し、腫瘍抗原などの抗原を発現する細胞が関与する癌疾患などの疾患を治療することである。

【0285】

治療的または部分的もしくは完全に防御的であり得る、抗原に対する免疫応答が誘発され得る。本明細書に記載の医薬組成物は、免疫応答を誘導または増強するために適用可能である。したがって、本明細書に記載の医薬組成物は、抗原が関与する疾患の予防的および/または治療的治療において有用である。

30

【0286】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」は、抗原または抗原を発現する細胞に対する統合された身体応答を指し、細胞性免疫応答および/または体液性免疫応答を指す。細胞性免疫応答には、限定されないが、抗原を発現する細胞に対する細胞性応答が含まれる。そのような細胞は、細胞表面での抗原の発現、またはクラスIもしくはクラスII MHC分子による抗原の提示を特徴とし得る。細胞応答はTリンパ球に関連し、Tリンパ球は、免疫応答を調節することによって中心的な役割を果たすヘルパーT細胞（CD4+T細胞とも称される。）、または感染細胞もしくは癌細胞におけるアポトーシスを誘導するキラー細胞（細胞傷害性T細胞、CD8+T細胞、もしくはCTLとも称される。）として分類され得る。一実施形態では、本開示の医薬組成物を投与することは、1つ以上の腫瘍抗原を発現する癌細胞に対する抗腫瘍CD8+T細胞応答の刺激を含む。

40

【0287】

本開示は、防御的、防止的、予防的および/または治療的であり得る免疫応答を企図する。本明細書で使用される場合、「免疫応答を誘導する（または誘導すること）」は、特定の抗原に対する免疫応答が誘導前に存在しなかったことを示し得るか、または誘導前に特定の抗原に対する基礎レベルの免疫応答があり、これが誘導後に増強されたことを示し得る。したがって、「免疫応答を誘導する（または誘導すること）」には、「免疫応答を増強する（または増強すること）」が含まれる。

【0288】

50

「免疫療法」という用語は、免疫応答を誘導または増強することによる疾患または状態の治療に関する。

【0289】

「ワクチン接種」または「免疫」という用語は、例えば、治療的または予防的理由により、免疫応答を誘導する目的で個体に抗原を投与する工程を表す。

【0290】

一実施形態では、本開示は、本明細書に記載のRNA粒子などのRNA製剤が投与される実施形態を想定する。

【0291】

したがって、本開示は、抗原が関与する疾患、好ましくは癌疾患の予防的および/または治療的治療に使用するための、本明細書に記載のRNAに関する。

10

【0292】

「マクロファージ」という用語は、単球の分化によって産生される食細胞のサブグループを指す。炎症、免疫サイトカインまたは微生物産物によって活性化されるマクロファージは、マクロファージ内に外来病原体を非特異的に飲み込み、病原体の分解をもたらす加水分解および酸化攻撃によって死滅させる。分解されたタンパク質からのペプチドは、T細胞によって認識され得るマクロファージ細胞表面に表示され、B細胞表面の抗体と直接相互作用して、T細胞およびB細胞の活性化と免疫応答のさらなる刺激をもたらすことができる。マクロファージは抗原提示細胞のクラスに属する。一実施形態では、マクロファージは脾臓マクロファージである。

20

【0293】

「樹状細胞」(DC)という用語は、抗原提示細胞のクラスに属する食細胞の別のサブタイプを指す。一実施形態では、樹状細胞は造血骨髄前駆細胞に由来する。これらの前駆細胞は、最初は未成熟な樹状細胞に変化する。これらの未成熟細胞は、高い食作用活性と低いT細胞活性化能を特徴とする。未成熟な樹状細胞は、ウイルスおよび細菌などの病原体の周囲環境を絶えずサンプリングしている。それらは、提示可能な抗原と接触すると、活性化されて成熟した樹状細胞になり、脾臓またはリンパ節に移動し始める。未成熟樹状細胞は病原体を貪食し、それらのタンパク質を小さな断片に分解し、成熟すると、MHC分子を使用してそれらの断片を細胞表面に提示する。同時に、CD80、CD86およびCD40などのT細胞活性化の共受容体として機能する細胞表面受容体を上方制御し、T細胞を活性化するそれらの能力を大幅に増強する。それらはまた、樹状細胞が血流を通過して脾臓に、またはリンパ系を通過してリンパ節に移動するように誘導する走化性受容体であるCCR7を上方制御する。ここで、それらは抗原提示細胞として機能し、非抗原特異的共刺激シグナルと共に、抗原を提示することによってヘルパーT細胞およびキラーT細胞ならびにB細胞を活性化する。したがって、樹状細胞は、T細胞またはB細胞関連の免疫応答を積極的に誘導することができる。一実施形態では、樹状細胞は脾臓樹状細胞である。

30

【0294】

「抗原提示細胞」(APC)という用語は、その細胞表面上に(またはその細胞表面で)少なくとも1つの抗原または抗原性断片を表示、獲得、および/または提示することができる様々な細胞の1つである。抗原提示細胞は、プロフェッショナル抗原提示細胞と非プロフェッショナル抗原提示細胞とに区別することができる。

40

【0295】

「プロフェッショナル抗原提示細胞」という用語は、ナイーブT細胞との相互作用に必要な主要組織適合遺伝子複合体クラスII(MHCクラスII)分子を構成的に発現する抗原提示細胞に関する。T細胞が抗原提示細胞の膜上のMHCクラスII分子複合体と相互作用する場合、抗原提示細胞は、T細胞の活性化を誘導する共刺激分子を産生する。プロフェッショナル抗原提示細胞は、樹状細胞およびマクロファージを含む。

【0296】

「非プロフェッショナル抗原提示細胞」という用語は、MHCクラスII分子を構成的には発現しないが、インターフェロン などのある種のサイトカインによる刺激を受ける

50

と発現する抗原提示細胞に関する。例示的な非プロフェッショナル抗原提示細胞には、線維芽細胞、胸腺上皮細胞、甲状腺上皮細胞、グリア細胞、膵臓ベータ細胞または血管内皮細胞が含まれる。

【0297】

「抗原プロセッシング」は、抗原の、前記抗原の断片であるプロセッシング産物への分解（例えば、タンパク質のペプチドへの分解）、および抗原提示細胞などの細胞による特定のT細胞への提示のためのMHC分子とこれらの断片の1つ以上との会合（例えば結合による。）を指す。

【0298】

「抗原が関与する疾患」、「抗原を発現する細胞が関与する疾患」という用語または同様の用語は、抗原が関係する任意の疾患、例えば抗原の存在を特徴とする疾患を指す。疾患は、感染症、または癌疾患、または単に癌であり得る。上記のように、抗原は、腫瘍関連抗原、ウイルス抗原、または細菌抗原などの疾患関連抗原であり得る。好ましくは、抗原が関与する疾患は、好ましくは細胞表面に抗原を発現する細胞が関与する疾患である。

10

【0299】

「感染症」という用語は、個体から個体へ、または生物から生物へと伝染する可能性があり、微生物因子によって引き起こされる任意の疾患（例えば普通の風邪）を指す。感染症は当技術分野で公知であり、例えば、ウイルス性疾患、細菌性疾患、または寄生虫性疾患が含まれ、これらの疾患は、それぞれウイルス、細菌、および寄生虫によって引き起こされる。これに関して、感染症は、例えば、肝炎、性感染症（例えばクラミジアまたは淋病）、結核、HIV/後天性免疫不全症候群（AIDS）、ジフテリア、B型肝炎、C型肝炎、コレラ、重症急性呼吸器症候群（SARS）、鳥インフルエンザ、およびインフルエンザであり得る。

20

【0300】

「癌疾患」または「癌」という用語は、典型的には無秩序な細胞増殖を特徴とする個体の生理学的状態を指すかまたは表す。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が含まれるが、これらに限定されない。より具体的には、そのような癌の例には、骨癌、血液癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚または眼内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、結腸癌、乳癌、前立腺癌、子宮癌、性器および生殖器の癌、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、膀胱癌、腎臓癌、腎細胞癌、腎盂癌、中枢神経系（CNS）の新生物、神経外胚葉癌、脊髄軸腫瘍、神経膠腫、髄膜腫、および下垂体腺腫が含まれる。本開示による「癌」という用語は、癌転移も含む。

30

【0301】

癌治療における併用戦略は、結果として生じる相乗効果のために望ましい場合があり、これは、単剤療法アプローチの影響よりもかなり強力であり得る。一実施形態では、医薬組成物は免疫療法剤と共に投与される。本明細書で使用される場合、「免疫療法剤」は、特定の免疫応答および/または免疫エフェクタ機能（1つまたは複数）の活性化に関与し得る任意の薬剤に関する。本開示は、免疫療法剤としての抗体の使用を企図する。理論に拘束されることを望むものではないが、抗体は、アポトーシスを誘導する、シグナル伝達経路の成分をブロックする、または腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む、様々な機構を通して癌細胞に対する治療効果を達成することができる。ある実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を介して細胞死を誘導し得るか、または補体タンパク質に結合して、補体依存性細胞傷害（CDC）として公知の直接的な細胞毒性をもたらし得る。本開示と組み合わせで使用し得る抗癌抗体および潜在的な抗体標的（括弧内）の非限定的な例には、アバゴマブ（CA-125）、アプシキシマブ（CD41）、アデカツムマブ（EpCAM）、アフツズマブ（CD20）、アラシズマブペゴル（VEGFR2）、アルツモマブペンテテート（CEA）、アマツキシマブ（MORAb-009）、アナツモマブマフェナトクス（TAG-72）、アポリズマブ（HLA-DR）、アルシツモマブ（CEA）、アテゾリ

40

50

ズマブ (PD-L1)、バビツキシマブ (ホスファチジルセリン)、ベクツモマブ (CD22)、ベリムマブ (BAFF)、ベバシズマブ (VEGF-A)、ビバツズマブメルタンシン (CD44 v6)、ブリナツモマブ (CD19)、ブレンツキシマブベドチン (CD30 TNFRSF8)、カンツズマブメルタンシン (ムチン CanAg)、カンツズマブラブタンシン (MUC1)、カプロマブペンデチド (前立腺癌細胞)、カルルマブ (CNT0888)、カツマキソマブ (EpCAM、CD3)、セツキシマブ (EGFR)、シタツズマブボガトクス (EpCAM)、シクスツムマブ (IGF-1受容体)、クローディキシマブ (クローディン)、クリバツズマブテトラキセタン (MUC1)、コナツムマブ (TRAIL-R2)、ダセツズマブ (CD40)、ダロツズマブ (インスリン様増殖因子I受容体)、デノスマブ (RANKL)、デツモマブ (Bリンパ腫細胞)、ドロジツマブ (DR5)、エクロメキシマブ (GD3ガングリオシド)、エドレコロマブ (EpCAM)、エロツズマブ (SLAMF7)、エナバツズマブ (PDL192)、エンシツキシマブ (NPC-1C)、エブラツズマブ (CD22)、エルツマキソマブ (HER2/neu、CD3)、エタラシズマブ (インテグリン 3)、ファルレツズマブ (葉酸受容体1)、FBTA05 (CD20)、フィクラツズマブ (SCH 900105)、フィギツムマブ (IGF-1受容体)、フランボツマブ (糖タンパク質75)、フレソリムマブ (TGF-)、ガリキシマブ (CD80)、ガニツマブ (IGF-I)、ゲムツズマブオゾガマイシン (CD33)、ゲボキズマブ (IL)、ギレンツキシマブ (炭酸脱水酵素9 (CA-IX))、グレムバツムマブベドチン (GPNMB)、イブリツモマブチウキセタン (CD20)、イクルクマブ (VEGFR-1)、イゴボマ (CA-125)、インダツキシマブラブタンシン (SDC1)、インテツムマブ (CD51)、イノツズマブオゾガマイシン (CD22)、イピリムマブ (CD152)、イラツムマブ (CD30)、ラベツズマブ (CEA)、レクサツムマブ (TRAIL-R2)、リビビルマブ (B型肝炎表面抗原)、リンツズマブ (CD33)、ロルボツズマブメルタンシン (CD56)、ルカツムマブ (CD40)、ルミリキシマブ (CD23)、マパツムマブ (TRAIL-R1)、マツズマブ (EGFR)、メポリズマブ (IL5)、ミラツズマブ (CD74)、ミツモマブ (GD3ガングリオシド)、モガムリズマブ (CCR4)、モキセツモマブパストトクス (CD22)、ナコロマブタフェナトクス (C242抗原)、ナブツモマブエスタフェナトクス (5T4)、ナマツマブ (RON)、ネシツムマブ (EGFR)、ニモツズマブ (EGFR)、ニボルマブ (IgG4)、オフアツムマブ (CD20)、オララツマブ (PDGF-Ra)、オナルツズマブ (ヒト散乱因子受容体キナーゼ)、オボルツズマブモナトクス (EpCAM)、オレゴボマブ (CA-125)、オキセルマブ (OX-40)、パニツムマブ (EGFR)、パトリツマブ (HER3)、ペムツモマ (MUC1)、ペルツズマ (HER2/neu)、ピンツモマブ (腺癌抗原)、プリツムマブ (ビメンチン)、ラコツモマブ (N-グリコリルノイラミン酸)、ラドレツマブ (フィブロネクチンエクストラドメインB)、ラフィビルマブ (狂犬病ウイルス糖タンパク質)、ラムシルマブ (VEGFR2)、リロツムマブ (HGF)、リツキシマブ (CD20)、ロバツムマブ (IGF-1受容体)、サマリズマブ (CD200)、シブロツズマブ (FAP)、シルツキシマブ (IL6)、タバルマブ (BAFF)、タカツズマブテトラキセタン (-フェトプロテイン)、タブリツモマブパプトクス (CD19)、テナツモマブ (テネイシンC)、テプロツムマブ (CD221)、チシリムマブ (CTLA-4)、ティガツズマブ (TRAIL-R2)、TNX-650 (IL13)、トシツモマブ (CD20)、トラスツズマブ (HER2/neu)、TRBS07 (GD2)、トレメリムマブ (CTLA-4)、ツコツズマブセルモロイキン (EpCAM)、ウブリツキシマブ (MS4A1)、ウレルマブ (4-1BB)、ボロシキシマブ (インテグリン 5 1)、ボツムマブ (腫瘍抗原CTAA 16.88)、ザルツムマブ (EGFR)、およびザノリムマブ (CD4) が含まれる。

【0302】

本明細書で参照される文書および試験の引用は、前述のいずれかが関連する先行技術であることの承認を意図するものではない。これらの文書の内容に関する全ての記述は、出

10

20

30

40

50

願人が入手できる情報に基づいており、これらの文書の内容の正確さについての承認を構成するものではない。

【 0 3 0 3 】

以下の説明は、当業者が様々な実施形態を作成および使用することを可能にするために提示される。特定の機器、技術、および用途の説明は、例としてのみ提供される。本明細書に記載される例に対する様々な修正は、当業者には容易に明らかであり、本明細書で定義される一般原理は、様々な実施形態の精神および範囲から逸脱することなく他の例および用途に適用され得る。したがって、様々な実施形態は、本明細書で説明され、示される例に限定されることを意図するものではなく、特許請求の範囲と一致する範囲を与えられるべきである。

10

以下、参考形態の例を付記する。

1. 対象において免疫応答を誘導するための方法であって、

a. キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように遺伝子改変された T 細胞を前記対象に提供すること、および

b. IL2 または IL2 をコードするポリヌクレオチドを前記対象に投与することを含む方法。

2. IL2 または IL2 をコードするポリヌクレオチドおよびさらなるサイトカインまたはさらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、1. に記載の方法。

3. 前記さらなるサイトカインが、IL7 および IL21 からなる群より選択される、2. に記載の方法。

20

4. IL2 または IL2 をコードするポリヌクレオチドおよび IL7 または IL7 をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、1. ~ 3. のいずれか一つに記載の方法。

5. IL2 または IL2 をコードするポリヌクレオチドおよび IL21 または IL21 をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、1. ~ 3. のいずれか一つに記載の方法。

6. IL2 をコードする前記ポリヌクレオチドが RNA であり、任意でさらなるサイトカインをコードする前記ポリヌクレオチドが RNA である、1. ~ 5. のいずれか一つに記載の方法。

30

7. CAR を発現するように遺伝子改変された前記 T 細胞が、CAR を発現するように遺伝子改変された前記 T 細胞を投与することによって、または CAR を発現するように遺伝子改変された前記 T 細胞を前記対象において生成することによって、前記対象に提供される、1. ~ 6. のいずれか一つに記載の方法。

8. 抗原もしくはその変異体、または前記抗原もしくは変異体をコードするポリヌクレオチドを前記対象に投与することをさらに含み、CAR を発現するように遺伝子改変された前記 T 細胞が前記抗原を標的とし、前記免疫応答が、前記抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答である、1. ~ 7. のいずれか一つに記載の方法。

9. 前記抗原または変異体をコードする前記ポリヌクレオチドが RNA である、8. に記載の方法。

40

10. 対象において免疫応答を誘導するための方法であって、

a. キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように遺伝子改変された T 細胞を前記対象に提供すること、および

b. IL2 をコードする RNA を前記対象に投与することを含む方法。

11. IL2 をコードする RNA およびさらなるサイトカインをコードする RNA を投与することを含む、10. に記載の方法。

12. 前記さらなるサイトカインが、IL7 および IL21 からなる群より選択される、11. に記載の方法。

13. IL2 をコードする RNA および IL7 をコードする RNA を投与することを含

50

む、10.~12.のいずれか一つに記載の方法。

14. IL2をコードするRNAおよびIL21をコードするRNAを投与することを
含む、10.~12.のいずれか一つに記載の方法。

15. CARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞が、CARを発現するよう
に遺伝子改変された前記T細胞を投与することによって、またはCARを発現するよう
に遺伝子改変された前記T細胞を前記対象において生成することによって、前記対象に提供
される、10.~14.のいずれか一つに記載の方法。

16. 抗原またはその変異体をコードするRNAを前記対象に投与することをさらに含
み、CARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞が前記抗原を標的とし、前記免
疫応答が前記抗原を発現する標的細胞集団または標的組織に対する免疫応答である、10
.~15.のいずれか一つに記載の方法。

10

17. 前記免疫応答がT細胞媒介免疫応答である、1.~16.のいずれか一つに記載
の方法。

18. 抗原の発現または発現上昇に関連する疾患、障害または状態を有する対象を治療
するための方法であって、

a. 前記抗原を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変さ
れたT細胞を前記対象に提供すること、および

b. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドを前記対象に投与すること
を含む方法。

19. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドおよびさらなるサイトカイン
またはさらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、18
.に記載の方法。

20

20. 前記さらなるサイトカインが、IL7およびIL21からなる群より選択される
、19.に記載の方法。

21. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドおよびIL7またはIL7を
コードするポリヌクレオチドを投与することを含む、18.~20.のいずれか一つに記
載の方法。

22. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドおよびIL21またはIL21
をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、18.~20.のいずれか一つに
記載の方法。

30

23. IL2をコードする前記ポリヌクレオチドがRNAであり、任意でさらなるサイ
トカインをコードする前記ポリヌクレオチドがRNAである、18.~22.のいずれか
一つに記載の方法。

24. CARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞が、CARを発現するよう
に遺伝子改変された前記T細胞を投与することによって、またはCARを発現するよう
に遺伝子改変された前記T細胞を前記対象において生成することによって、前記対象に提供
される、18.~23.のいずれか一つに記載の方法。

25. 前記抗原もしくはその変異体、または前記抗原もしくは変異体をコードするポリ
ヌクレオチドを前記対象に投与することをさらに含む、18.~24.のいずれか一つに
記載の方法。

40

26. 前記抗原または変異体をコードする前記ポリヌクレオチドがRNAである、25
.に記載の方法。

27. 抗原の発現または発現上昇に関連する疾患、障害または状態を有する対象を治療
するための方法であって、

a. 前記抗原を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変さ
れたT細胞を前記対象に提供すること、および

b. IL2をコードするRNAを前記対象に投与すること
を含む方法。

28. IL2をコードするRNAおよびさらなるサイトカインをコードするRNAを投
与することを含む、27.に記載の方法。

50

29. 前記さらなるサイトカインが、IL7およびIL21からなる群より選択される、28.に記載の方法。

30. IL2をコードするRNAおよびIL7をコードするRNAを投与することを含む、27.~29.のいずれか一つに記載の方法。

31. IL2をコードするRNAおよびIL21をコードするRNAを投与することを含む、27.~29.のいずれか一つに記載の方法。

32. CARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞が、CARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞を投与することによって、またはCARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞を前記対象において生成することによって、前記対象に提供される、27.~31.のいずれか一つに記載の方法。

33. 前記抗原またはその変異体をコードするRNAを前記対象に投与することをさらに含む、27.~32.のいずれか一つに記載の方法。

34. 前記疾患、障害または状態が癌であり、前記抗原が腫瘍関連抗原である、18.~33.のいずれか一つに記載の方法。

35. IL2が延長薬物動態(PK)IL2である、1.~34.のいずれか一つに記載の方法。

36. 前記延長PK IL2が融合タンパク質を含む、35.に記載の方法。

37. 前記融合タンパク質が、IL2部分と、血清アルブミン、免疫グロブリン断片、トランスフェリン、Fn3、およびそれらの変異体からなる群より選択される部分とを含む、36.に記載の方法。

38. 前記さらなるサイトカイン、特にIL7またはIL21が、延長薬物動態(PK)サイトカイン、特に延長PK IL7または延長PK IL21である、2.~9.、11.~17.、19.~26.および28.~37.のいずれか一つに記載の方法。

39. 前記延長PKサイトカイン、特に延長PK IL7または延長PK IL21が融合タンパク質を含む、38.に記載の方法。

40. 前記融合タンパク質が、前記さらなるサイトカインの部分、特にIL7部分またはIL21部分と、血清アルブミン、免疫グロブリン断片、トランスフェリン、Fn3、およびそれらの変異体からなる群より選択される部分とを含む、39.に記載の方法。

41. 前記血清アルブミンがマウス血清アルブミンまたはヒト血清アルブミンを含む、37.~40.のいずれか一つに記載の方法。

42. 前記免疫グロブリン断片が免疫グロブリンFcドメインを含む、37.~41.のいずれか一つに記載の方法。

43. 対象における癌を治療または予防するための方法であって、前記抗原が腫瘍関連抗原である、1.~42.のいずれか一つに記載の方法。

44. a. キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されたT細胞、および

b. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドを含む医薬製剤。

45. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドおよびさらなるサイトカインまたはさらなるサイトカインをコードするポリヌクレオチドを含む、44.に記載の医薬製剤。

46. 前記さらなるサイトカインが、IL7およびIL21からなる群より選択される、45.に記載の医薬製剤。

47. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドおよびIL7またはIL7をコードするポリヌクレオチドを含む、44.~46.のいずれか一つに記載の医薬製剤。

48. IL2またはIL2をコードするポリヌクレオチドおよびIL21またはIL21をコードするポリヌクレオチドを含む、44.~46.のいずれか一つに記載の医薬製剤。

49. IL2をコードする前記ポリヌクレオチドがRNAであり、任意でさらなるサイトカインをコードする前記ポリヌクレオチドがRNAである、44.~48.のいずれか

10

20

30

40

50

一つに記載の医薬製剤。

50. 抗原もしくはその変異体、または前記抗原もしくは変異体をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、CARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞が前記抗原を標的とする、44. ~ 49. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

51. 前記抗原または変異体をコードする前記ポリヌクレオチドがRNAである、50. に記載の医薬製剤。

52. キットである、44. ~ 51. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

53. CARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞、前記IL2もしくはIL2をコードする前記ポリヌクレオチド、任意で前記さらなるサイトカインもしくはさらなるサイトカインをコードする前記ポリヌクレオチド、および任意で前記抗原もしくはその変異体、または前記抗原もしくは変異体をコードする前記ポリヌクレオチドを別々の容器中に含む、52. に記載の医薬製剤。

10

54. 癌を治療または予防するための前記医薬製剤の使用説明書をさらに含み、前記抗原が腫瘍関連抗原である、52. または53. に記載の医薬製剤。

55. 医薬組成物である、44. ~ 51. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

56. 前記医薬組成物が、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤および/または賦形剤をさらに含む、55. に記載の医薬製剤。

57. a. キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されたT細胞、および

b. IL2をコードするRNA

を含む医薬製剤。

20

58. IL2をコードするRNAおよびさらなるサイトカインをコードするRNAを含む、57. に記載の医薬製剤。

59. 前記さらなるサイトカインが、IL7およびIL21からなる群より選択される、58. に記載の医薬製剤。

60. IL2をコードするRNAおよびIL7をコードするRNAを含む、57. ~ 59. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

61. IL2をコードするRNAおよびIL21をコードするRNAを含む、57. ~ 60. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

62. 抗原またはその変異体をコードするRNAをさらに含み、CARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞が前記抗原を標的とする、57. ~ 61. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

30

63. キットである、57. ~ 62. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

64. CARを発現するように遺伝子改変された前記T細胞、IL2をコードする前記RNA、任意でさらなるサイトカインをコードする前記RNA、および任意で抗原またはその変異体をコードする前記RNAを別々の容器中に含む、63. に記載の医薬製剤。

65. 癌を治療または予防するための前記医薬製剤の使用説明書をさらに含み、前記抗原が腫瘍関連抗原である、63. または64. に記載の医薬製剤。

66. 医薬組成物である、57. ~ 62. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

67. 前記医薬組成物が、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤および/または賦形剤をさらに含む、66. に記載の医薬製剤。

40

68. IL2が延長薬物動態(PK)IL2である、44. ~ 67. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

69. 前記延長PK IL2が融合タンパク質を含む、68. に記載の医薬製剤。

70. 前記融合タンパク質が、IL2部分と、血清アルブミン、免疫グロブリン断片、トランスフェリン、Fn3、およびそれらの変異体からなる群より選択される部分とを含む、69. に記載の医薬製剤。

71. 前記さらなるサイトカインが延長薬物動態(PK)サイトカインである、45. ~ 56. および58. ~ 70. のいずれか一つに記載の医薬製剤。

72. 前記延長PKサイトカインが融合タンパク質を含む、71. に記載の医薬製剤。

50

73. 前記融合タンパク質が、サイトカイン部分と、血清アルブミン、免疫グロブリン断片、トランスフェリン、Fn3、およびそれらの変異体からなる群より選択される部分とを含む、72.に記載の医薬製剤。

74. 前記血清アルブミンがマウス血清アルブミンまたはヒト血清アルブミンを含む、70.~73.のいずれか一つに記載の医薬製剤。

75. 前記免疫グロブリン断片が免疫グロブリンFcドメインを含む、70.~74.のいずれか一つに記載の医薬製剤。

76. 医薬用途のための、44.~75.のいずれか一つに記載の医薬製剤。

77. 前記医薬用途が、疾患または障害の治療的または予防的治療を含む、76.に記載の医薬製剤。

78. 前記抗原が腫瘍関連抗原である、対象における癌を治療または予防するための方法で使用するための、44.~77.のいずれか一つに記載の医薬製剤。

【実施例】

【0304】

実施例：

方法：

動物

C57BL/6BrdCrHsd-TyrcマウスはEnvigo Labsから購入した。実験全体を通して、年齢(8~10週齢)および性別(雄性または雌性)が一致する動物を使用した。コンジェニックC57BL/6-Thy1.1マウスをBioNTech AG, Germanyの動物施設で飼育した。

【0305】

CAR構築物/CAR T細胞

-レトロウイルス自己不活性化(SIN)ベクターpES.12-6を使用して、内部真核生物プロモータである短いイントロンレス型のヒト伸長因子1-プロモータ(EFS-213/+31)の制御下で、マウスT細胞においてCLDN6-CAR-BBz-T2A-Luc-T2A-GFPを安定に過剰発現させた。ベクター骨格は、5'-および3'-LTRにR領域およびU5領域のMLV野生型配列ならびにパッケージング領域(および+)を含む。3'-LTRのU3領域中のエンハンサエレメントを除去し(CAATボックスを含む)、TATAボックス配列を、転写開始を妨げるように変異させた。望ましくないウイルスタンパク質の発現を防ぐために、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHV)の転写後調節エレメント(PRE)の短縮型を使用する。CLDN6-CAR-BBzは、ヒトIgGのシグナル伝達ペプチド(配列番号12)、重鎖(VH)(配列番号13)と軽鎖(VL)(配列番号15)の間に(G4S)₃リンカー(配列番号14)を有し、VLの46位にシステインからセリンへの置換を有するクローディング特異的抗体IMAB206(Ganymed Pharmaceuticals)の一本鎖Fv断片を含む。ScFv断片をヒトCD8 ヒンジおよび膜貫通領域(配列番号16)に融合し、続いてヒト4-1BB(配列番号17)およびヒトCD3(Q14K)(配列番号18)シグナル伝達部分に融合する。CARを、T2Aリボソームスキップエレメント(配列番号19)を用いて有効なホタルルシフェラーゼ(配列番号20)およびeGFP(配列番号21)に連結し、形質導入したT細胞における示されたタンパク質の等モル産生を可能にする。

【0306】

レトロウイルス遺伝子操作および養子T細胞移入のためのCAR T細胞の調製

ナイーブC57BL/6-Thy1.1⁺の脾細胞を単離し、5ng/mLの組換えヒト(rh)IL-7および5ng/mLのrhIL-15(Miltenyi Biotec)の存在下で、1:1のビーズ対T細胞比のDynabeads(商標)マウスTアクチベータCD3/CD28(Invitrogen)によって予備活性化した。マウス細胞の形質導入のために、MLV-E偽型レトロウイルス上清を、RetroNectin(2μg/cm²)で被覆した非組織培養処理ウェルプレートに製造者の指示(Tak

10

20

30

40

50

ara Bio Inc., Otsu, Japan) に従って負荷し、結合を増加させるためにウイルス負荷および遠心分離 (1, 300 × g、15、15分) のサイクルを3回繰り返した。予備活性化の24時間後、 $0.5 \sim 0.6 \times 10^6$ 細胞/cm² をウイルス粒子被覆ウェル上にスピンドウンした (300 × g、37、1時間)。一晚培養した後、新たにウイルス粒子で被覆したプレートを用いてスピンドウン形質導入を繰り返した。予備活性化の72時間後、Dynabeads (商標) マウスTアクチベータCD3/CD28を培養物から取り出し、5 ng/mLのrh IL-7および5 ng/mLのrh IL-15の存在下で細胞を増殖させた。フィコール洗浄後、細胞をPBSで2回洗浄して血清タンパク質を除去し、次いで、養子細胞移入 (ACT) 用に調製した。コードされたOT1-TCRまたはCLDN6-CARのいずれか、ならびに2Aスプライスエレメント (Szymczak et al. (2004) Nat Biotechnol. 22 (5): 589-94) を使用して別々に発現させた増強ホタルルシフェラーゼ (effLuc; Rabinovich et al. (2008) PNAS 105 (38): 14342-6) およびeGFP (増強緑色蛍光タンパク質) レポータ遺伝子を含むpES12.6ベースのレトロウイルスベクターを形質導入に使用した。

【0307】

インビトロ転写 (IVT) mRNAの作製

サイトカイン-アルブミン融合タンパク質をコードするmRNAのインビトロ転写は、pST4-T7-GG-TEV-MCS-FI-A30LA70プラスミド骨格および派生DNA構築物に基づいた。これらのプラスミド構築物は、タバコエッチウイルス (TEV) の5'リーダ配列、3'FLIエレメント (Fはスプリットのアミノ末端エンハンサの136ヌクレオチド長の3'-UTR断片であるmRNAであり、Iはミトコンドリアにコードされた12S rRNAの142ヌクレオチド長の断片であり、両方ともヒト (Homo sapiens) において同定されている; 国際公開第2017/060314号) および100ヌクレオチドのポリ (A) 尾部と、70ヌクレオチド後にリンカーを含む。サイトカインおよび血清アルブミンコード配列は、ハツカネズミ (Mus musculus) に由来し、得られたアミノ酸配列に変化は導入されなかった (マウス (m) IL-2、配列番号5、mIL-7、配列番号6およびmIL-21、配列番号7)。コード化されるタンパク質は、N末端部分の天然シグナルペプチド (SP) であるN末端シグナルペプチドを備える。N末端部分のSPのみが維持され、さらなる部分については、成熟部分 (SPを含まないタンパク質) のみがコードされた。終止コドンは、ほとんどのC末端部分についてのみ維持された。構築物中のアルブミン部分とサイトカイン部分を、グリシンおよびセリン残基をコードする30ヌクレオチド長のリンカー配列によって分離した。使用したアルブミン-サイトカイン融合タンパク質の配向は次の通りであった: アルブミン-リンカー-mIL2 (N末端からC末端へ連続する配列番号8、9および10)、mIL7-リンカー-アルブミン (N末端からC末端へ連続する配列番号6、9および11) ならびにmIL21-リンカー-アルブミン (N末端からC末端へ連続する配列番号7、9および11の)。抗原をコードするmRNAのインビトロ転写は、pST1-T7-GG-hAg-MCS-2hBg-A30LA70プラスミド骨格および派生DNA構築物に基づいた。これらのプラスミド構築物は、完全長ヒトCLDN6またはニワトリオボアルブミンエピトープSIINFELK (OvaI; Kreiter et al (2008) J Immunol. 180 (1): 309-18に記載されているようにさらに3'Secおよび5'TM1配列と隣接する。) の他に、5'ヒト - グロビン、2つの連続する3'ヒト - グロビンUTRおよび100ヌクレオチドのポリ (A) 尾部と、70ヌクレオチド後にリンカーを含む。Holtkamp S. et al. (2006) Blood 108 (13): 4009-17に記載されているように、抗原およびサイトカインをコードするmRNAをインビトロ転写によって生成した。後者を、通常のヌクレオシドウリジンを1-メチル-プソイドウリジンで置換することによってさらに修飾した。得られたサイトカインmRNAはキャップ1構造を備えており、二本鎖 (dsRNA) 分子をセルロース精製によって枯渇させた。精製したmRNAをH₂Oで溶出し、さらに使用するまで

10

20

30

40

50

- 80 で保存した。記載されている全てのmRNA構築物のインビトロ転写は、BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbHで実施された。

【0308】

リポソーム製剤化抗原をコードするIVT RNA (RNA_(LIP))の生成
 抗原をコードするIVT RNAとリポソームとの複合体化は、以前にKranz et al (2016) Nature 534 (7607) : 396 - 401に記載された。カチオン性DOTMAとRNAの1.3対2の電荷比を使用した。DOTMAに加えて、脂質画分は、DOPEあたり2:1のDOTMAのモル比でヘルパー脂質DOPEを含む。

【0309】

マウス実験

5 × 10⁶個の -レトロウイルス形質導入CARまたはTCRコンジェニックThy1.1⁺T細胞を、免疫適格または中程度に全身照射された(2.5 Gy - X RAD320) C57BL/6 BrdCr Hsd - Tyr^cドナーマウスのいずれかに200 μLで静脈内(i.v.)移入した。その後、ACT後の様々な時点で、マウスに、1.3:2のF12:RNA比の抗原をコードするRNA_(LIP)を静脈内(i.v.)ワクチン接種した。示されている時点で、マウスを、TransIT (Mirrus)または緩衝液のみを用いて製剤化した、1 μgのヌクレオシド修飾マウスアルブミン-サイトカイン融合タンパク質がコードされたmRNAで繰り返し処置した。末梢血提供および全身生物発光イメージングを示された時点で実施した。

【0310】

インビボルシフェラーゼイメージング (BLI)

CARまたはTCR - e f f L u c - G F P形質導入T細胞の増殖および分布を、IVIS Luminaイメージングシステム(Caliper Life Sciences)を使用したインビボ生物発光イメージングによって評価した。簡単に説明すると、形質導入したT細胞の養子移入後の示されている時点で、D-ルシフェリンの水溶液(80 mg/kg体重; Perkin Elmer)をi.p.注射した。5分後、放出された光子を定量化した(積分時間1分、ピニング8)。関心領域(ROI)におけるインビボ生物発光を、IVIS Living Image 4.0ソフトウェアを使用して全光束(光子/秒)として定量化した。動物内のルシフェラーゼ発現細胞に由来する透過光の強度をグレースケール画像として表し、黒色が最も弱く、白色から暗灰色が最も強い生物発光シグナルである。マウスのグレースケール参照画像をLED低照度照明下で取得した。Living Image 4.0ソフトウェアを使用して画像を重ね合わせた。

【0311】

実施例1: 選択した薬物動態延長 鎖サイトカイン(IL-2/7)は、抗原接触時にインビボでCAR T細胞の反復増殖をもたらす。

通常、抗原接触時にT細胞の持続性を維持するために、ある種のサイトカイン環境が存在する必要がある。鎖サイトカイン、例えばIL-2およびIL-7は、T細胞の増殖および生存を増強することが示されている(例えば、Blattman et al. (2003) Nat. Med. 9 (5) : 540 - 7、Fry et al. (2001) Trends Immunol. 22 (10) : 564 - 71、Bradley et al. (2005) Trends Immunol. 26 (3) : 172 - 6、Jiang et al. (2005) Cytokine Growth Factor Rev. 16 (4 - 5) : 513 - 33)。しかしながら、IL-2などの組換えサイトカインの使用は、その短い半減期およびその用量依存性毒性によって制限されてきた(Vial et al. (1992) Drug Saf. 7 (6) : 417 - 33)。養子移入されたT細胞の限られたサイトカイン支持を克服するために、サイトカイン-アルブミン融合タンパク質をコードするmRNA構築物を開発し、実際に、全身投与時にインビボでコードされたサイトカインの血清半減期を有意に増加させることができた。サイトカイン-アルブミン構築物の全身アベイラビリティは、それらがヌクレオシド修飾mRNAにコードされている場合に延長される。

10

20

30

40

50

【0312】

したがって、本発明者らは、二次リンパ器官のAPCを選択的に標的とし、選択されたサイトカインを支持する、リボソームに製剤化されたTAA、例えばCLDN6をコードするRNA(RNA(LIP))の組合せが、インビボでのCAR-T細胞の適切な反復増殖および持続性をもたらすかどうかという問いを投げかけた。

【0313】

この概念を試験するために、 γ -レトロウイルスで形質導入したCLDN6-CAR T細胞を、中程度に照射された(2.5 Gy)マウスまたは免疫適格マウスのいずれかに養子移入した(それぞれ図1および図2)。それらのマウスCLDN6-CAR T細胞のインビボでの増殖および運命を可視化するために、本発明者らは、ウイルスT2A配列によって分離された、同じCLDN6-CARをコードするレトロウイルスベクターでのルシフェラーゼとGFPLレポータの共発現を利用した(図1A)。注目すべきことに、CLDN6-CARの表面発現および抗原特異性は、CAR形質導入マウスT細胞におけるルシフェラーゼとGFPLの共発現によって有意に影響されなかった(データは示していない)。

【0314】

中程度に照射された(XRAD320で2.5 Gy)アルビノC57Bl/6マウスに、 5×10^6 個のCLDN6-CARレポータ形質導入コンジェニックThy1.1⁺マウスバルクT細胞(約 2.5×10^8 細胞/kg体重)を移植した。20 μ gのCLDN6をコードするRNAまたは対照RNAを脾臓標的化リボソームに製剤化し、養子CAR-T移入の1日後にマウスに静脈内注射した。CLDN6 RNA(LIP)ワクチン接種と同時に、マウスに、TransITで製剤化したアルブミン結合マウスIL-2およびマウスIL-7コードmRNA(1 μ g/サイトカインRNA)またはモック対照(緩衝液)を腹腔内に投与した。処置を7日後に繰り返した。その後、示されている時点で、CAR-Tの増殖および生体内分布を、マウスあたり1.66 mgのD-ルシフェリン溶液の腹腔内投与によってインビボで追跡した。ACTの24時間後、ほとんどのCAR-T細胞が既に脾臓で見出された。サイトカインの非存在下(モック)では、CAR-T細胞における約2.1倍の増加(1日目と比較して)が、ACT後4日目の生物発光で検出されたようにCLDN6-RNA(LIP)での処置によってのみ誘導された。CLDN6-RNA(LIP)による2回目のブーストは、11日目に、1日目に測定されたベースライン発光と比較して、依然として15倍高い発光強度をもたらした。TransITで製剤化したアルブミン融合IL-2およびIL-7コードmRNAを同時投与した場合、CAR-T細胞の増殖能が有意に増加した。最初のRNA(LIP)処置後にCAR-T細胞の75倍の増殖を達成することができ、2回目のCLDN6 RNA(LIP)で最大114倍までさらに改善された(図1Cおよび図1D)。この効果は、単独またはサイトカイン-アルブミンをコードするRNAと組み合わせたCLDN6をコードするRNA(LIP)での処置後に、CLDN6-CAR T細胞を投与されたマウスで観察されたが、サイトカイン-アルブミンをコードするRNAの存在下または非存在下のいずれでも、OVAIをコードする対照RNA(LIP)を投与されたそれぞれの対照群では観察されなかった。これらのデータは、CAR-T細胞が、中程度に照射されたマウスにおいて高度に抗原特異的な方法で、インサイチュで成功裏に増殖できることを実証する。

【0315】

CAR T細胞が、中程度に照射されたマウスにおいて、サイトカインをコードするRNAの存在下でそれぞれの抗原をコードするRNA(LIP)を使用してインサイチュで反復増殖できることを実証した後、本発明者らは、この効果が免疫適格宿主でも達成されるかどうかを調べた。しかしながら、リンパ球枯渇は、潜在的な感染症および敗血症などの化学療法に関連する周知の副作用およびリスクを含むいくつかの難点を有する(Brentjens et al. (2010) Mol Ther. 18(4): 666-8およびRobbins et al. (2015) Clin Cancer Res. 21(5): 1019-27)。さらに、オンターゲットおよび/またはオフターゲット毒性の場

10

20

30

40

50

合、養子移入されたCAR-T細胞の急速な増殖は致死的であり得る(Morgan et al. (2010) Mol Ther. 18(4): 843-51)。この目的のために、CLDN6-CAR形質導入マウスThy1.1⁺T細胞を移植した非照射アルビノC57BL/6マウスを上記のように処置した(図2A)。最初の刺激ラウンド中のIL-2およびIL-7の全身的存在は、TransITで製剤化されたサイトカイン-アルブミンをコードするRNAの代わりに緩衝液(モック)を投与された対照群と比較して、CLDN6-RNA(LIP)ワクチン接種後のCLDN6-CAR T細胞の増殖に有意な影響を及ぼさない(4日目:増殖指数:モック192倍およびIL-2/7:223倍)。しかし、IL-2/7サイトカインの非存在下では、CAR T細胞集団は、最初のCLDN6 RNA(LIP)媒介増殖後に強く収縮し、2回目の再増殖はできなかった。IL-2/IL-7-アルブミンをコードするRNAの存在下でのみ、CLDN6-CAR T細胞は免疫適格マウスにおいて繰り返し増殖することができ、数日間にわたって持続する(11日目:増殖指数:モック:0.5倍およびIL-2/7:79倍)(図2Bおよび図2C)。

【0316】

これらのデータは、RNA(LIP)技術を使用して患者における直接の制御されたCAR-T細胞増殖が実現可能であるという考えを強く支持するが、持続性のためには、細胞は、IL-2およびIL-7などの好ましいサイトカイン環境を必要とし、これは、延長薬物動態 鎖サイトカインをコードするRNAの投与によって達成され得る。

【0317】

実施例2:CAR T細胞の反復増殖中のサイトカインアルブミン融合物の最適な組合せ。

いくつかの 鎖サイトカインはT細胞の生存を積極的に支持し、抗原特異的な方法でT細胞の治療効果を支援するので(例えば、Markley et al. (2010) Blood 115(17): 3508-19、He et al. (2006) J Transl Med. 4: 24。)、本発明者らは、反復RNA(LIP)処置時のインビボでのCAR改変T細胞の増殖および持続性の支持効果を促進する観点から、mIL-2、mIL-7、mIL-21、およびIL-2/7とIL-2/21の組合せをコードするヌクレオシド修飾RNAを比較した。

【0318】

実施例1に記載したのと同様の方法で、CLDN6-CARレポータ形質導入T細胞を移植した中程度に照射されたアルビノC57BL/6マウスに、リボソームに製剤化されたhCLDN6または対照をコードするRNAを、TransITで製剤化されたマウスアルブミン結合mIL-2、mIL-7、mIL-21をコードするmRNAをコードするRNA(1μg/サイトカインRNA)またはマウスアルブミンをコードするRNA(Alb対照)の処置と同時にワクチン接種した。抗原/サイトカインカクテルを1週間の間隔で投与した(図3A)。CAR T細胞のインビボ増殖のピーク時(通常、RNAベースの処置の2~3日後に到達)に、生物発光強度を分析した(図3B)。IL-7およびIL-21単独の全身的存在は、アルブミン対照と比較して、反復RNA(LIP)処置時に抗原特異的CAR T増殖能の低下をもたらした。IL-2の同時処置は、ベースラインと比較した場合、最大164倍のCAR T細胞増殖をもたらした。しかしながら、CAR T細胞のインビボ蓄積は、IL-2 RNAをそれぞれIL-7(3回目の増殖後に最大214倍の増加)またはIL-21(3回目の増殖後に最大141倍の増加)と同時投与した場合にのみ達成することができた。インビボでのCAR T細胞の蓄積能力に加えて、養子移入された腫瘍反応性T細胞療法の臨床的成功もまた、インビボでのそれらの細胞の持続性と正の相関がある(Robbins et al. (2004) J Immunol. 173(12): 7125-30、Huang et al. (2005) 28(3): 258-67)。したがって、本発明者らは、単独またはIL-2と組み合わせたIL-7の存在下(図3C)またはIL-21の存在下(図3D)で、生物発光を用いて3回の抗原特異的増殖後のCAR T細胞の収縮を分析した。CAR T細胞集団は、ア

10

20

30

40

50

ルブミン、IL - 2 または IL - 7 のみが存在する場合に、3 回目の CLDN6 RNA (LIP) の直後に収縮した。しかし、IL - 2 と IL - 7 の組合せのみが、抗原除去後の CLDN6 CAR T 細胞の収縮の減速を増強することができる (図 3 C)。この効果は、IL - 2 および IL - 21 - RNA 同時処置マウスにおいてさらにより顕著であった (図 3 D)。

【 0 3 1 9 】

全体として、これらの結果は、IL - 2 をコードし、IL - 7 および IL - 21 と関与するヌクレオシド修飾 RNA の全身投与が、抗原特異的刺激時にインビボで CAR T 細胞の高度に抗原依存性の蓄積および長期持続性を増強できることを示す。

10

20

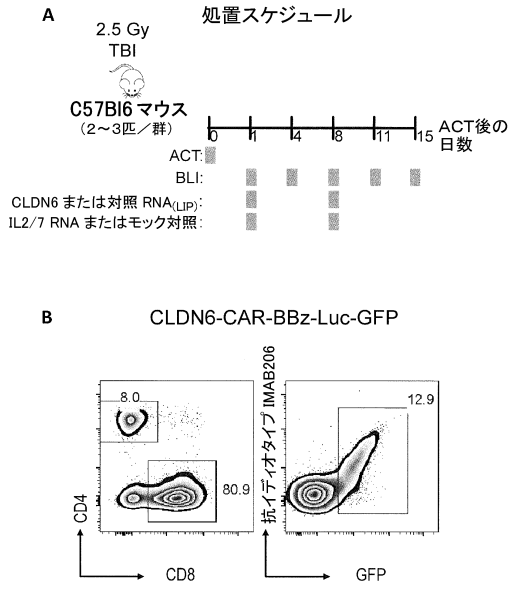
30

40

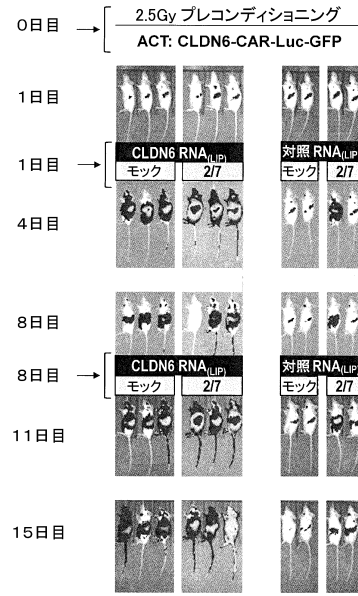
50

【図面】

【図 1 A B】



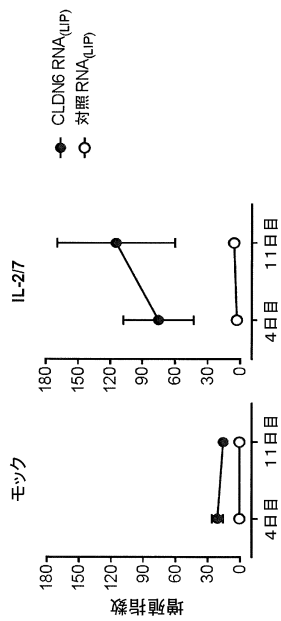
【図 1 C】



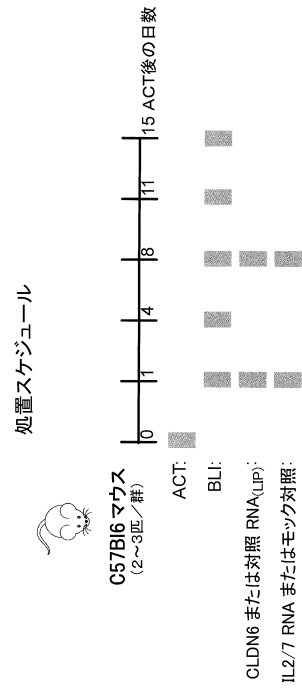
10

20

【図 1 D】



【図 2 A】

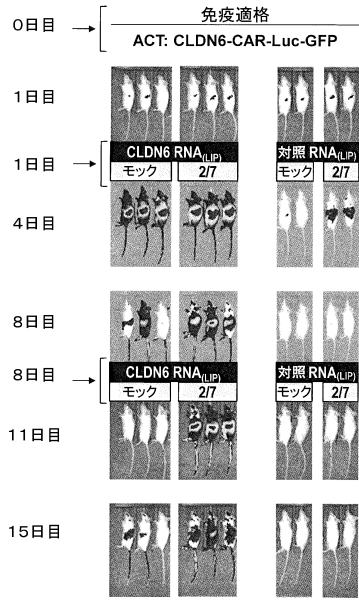


30

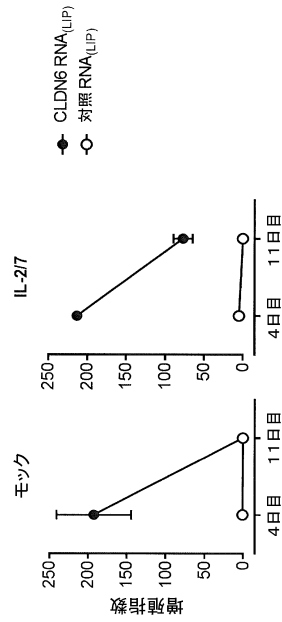
40

50

【 図 2 B 】



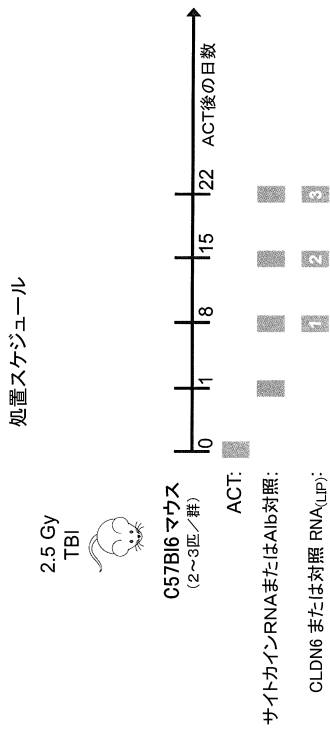
【 図 2 C 】



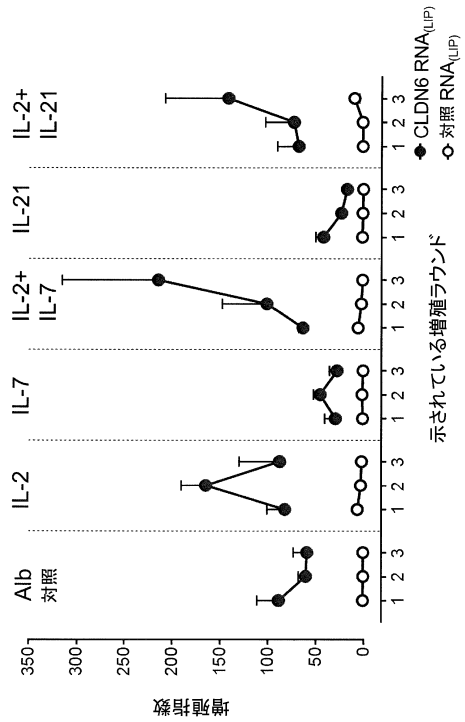
10

20

【 図 3 A 】



【 図 3 B 】

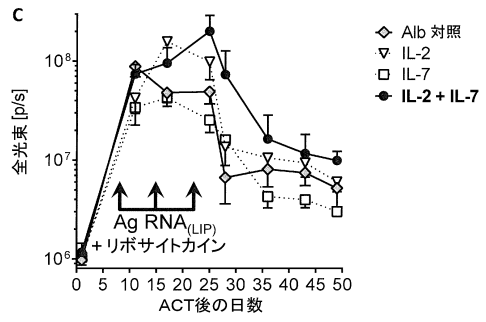


30

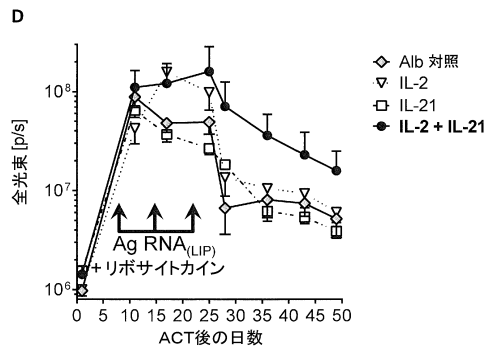
40

50

【図 3 C D】



10



20

【配列表】

[0007648530000001.app](#)

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K	47/68 (2017.01)	F I	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)		A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)		A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)		A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 0 7 K	14/705 (2006.01)		C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)		C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)		C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)		C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)		C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	14/55 (2006.01)		C 0 7 K	14/55	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)		C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)		C 1 2 N	15/62	Z Z N A

- (72)発明者 オーム, ペトラ
ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ アン デル ゴールドグルーベ 1 2 バイオエヌテック
エスエー内
- (72)発明者 レングストル, ベンジャミン
ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ アン デル ゴールドグルーベ 1 2 バイオエヌテック
エスエー内
- (72)発明者 ラインハルト, カタリーナ
ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ アン デル ゴールドグルーベ 1 2 バイオエヌテック
エスエー内

審査官 原 大樹

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 8 0 4 6 7 (W O , A 1)
特表 2 0 1 8 - 5 1 9 8 4 2 (J P , A)
特表 2 0 1 8 - 5 1 7 6 7 4 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 9 / 0 1 0 2 2 2 (W O , A 2)
国際公開第 2 0 1 7 / 1 3 9 5 7 0 (W O , A 1)
Oncotarget, 2016年, Vol.7, No.50, pp.82354-82368

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K
C 1 2 N
C 0 7 K
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)