

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6839074号
(P6839074)

(45) 発行日 令和3年3月3日(2021. 3. 3)

(24) 登録日 令和3年2月16日(2021. 2. 16)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/12 (2006. 01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C O 7 K 14/705 (2006. 01)

C O 7 K 14/705

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 21 (全 273 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-514849 (P2017-514849)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月17日 (2015. 9. 17)
 (65) 公表番号 特表2017-534261 (P2017-534261A)
 (43) 公表日 平成29年11月24日 (2017. 11. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/050715
 (87) 国際公開番号 W02016/044605
 (87) 国際公開日 平成28年3月24日 (2016. 3. 24)
 審査請求日 平成30年9月14日 (2018. 9. 14)
 (31) 優先権主張番号 PCT/CN2014/086694
 (32) 優先日 平成26年9月17日 (2014. 9. 17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)
 (31) 優先権主張番号 PCT/CN2014/090578
 (32) 優先日 平成26年11月7日 (2014. 11. 7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)

(73) 特許権者 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
 35
 (73) 特許権者 500429103
 ザ トラストィーズ オブ ザ ユニバー
 シティ オブ ペンシルバニア
 アメリカ合衆国 19104 ペンシルベ
 ニア州 フィラデルフィア シビック セ
 ンター ブールバード 3600 ナイン
 ス フロア
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 養子免疫療法のためのキメラ受容体での細胞毒性細胞のターゲティング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ナチュラルキラー細胞免疫機能受容体ーキメラ抗原受容体 (NK R-C A R) をコードする単離核酸分子であって、

ここで、コードされるNK R-C A Rが、

(a) メソテリンに結合する抗原結合ドメインであって、抗原結合ドメインが、重鎖相補性決定領域1 (H C C D R 1)、重鎖相補性決定領域2 (H C C D R 2)、重鎖相補性決定領域3 (H C C D R 3)、軽鎖相補性決定領域1 (L C C D R 1)、軽鎖相補性決定領域2 (L C C D R 2) および軽鎖相補性決定領域3 (L C C D R 3) を含み

:

(i) H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 が配列番号 2 3 4 における抗メソテリン重鎖アミノ酸配列のものであり、L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 が配列番号 2 3 4 における抗メソテリン軽鎖アミノ酸配列のものであるか；または

(i i) H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 が配列番号 2 4 0 における抗メソテリン重鎖アミノ酸配列のものであり、L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 が配列番号 2 4 0 における抗メソテリン軽鎖アミノ酸配列のものである、抗原結合ドメイン；

(b) 膜貫通ドメイン；および

(c) 細胞質ドメイン

を含み、

膜貫通ドメインおよび／または細胞質ドメインが、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）および天然細胞毒性受容体（NCR）から選択されるNKR由来であり、さらに、KIRが、KIR2DS2、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1、KIR3DS1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1およびKIR3DP1からなる群から選択される、単離核酸分子。

【請求項2】

（a）メソテリンに結合する抗原結合ドメインであって、抗原結合ドメインが、重鎖相補性決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補性決定領域2（HC CDR2）、重鎖相補性決定領域3（HC CDR3）、軽鎖相補性決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補性決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補性決定領域3（LC CDR3）を含み：

（i）HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3が配列番号234における抗メソテリン重鎖アミノ酸配列のものであり、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3が配列番号234における抗メソテリン軽鎖アミノ酸配列のものであるか；または

（ii）HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3が配列番号240における抗メソテリン重鎖アミノ酸配列のものであり、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3が配列番号240における抗メソテリン軽鎖アミノ酸配列のものである、抗原結合ドメイン；

（b）膜貫通ドメイン；および

（c）細胞質ドメイン、

を含む、単離NKR-CARポリペプチドであって、

膜貫通ドメインおよび／または細胞質ドメインが、KIRおよびNCRから選択されるNKR由来であり、さらに、KIRが、KIR2DS2、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1、KIR3DS1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1およびKIR3DP1からなる群から選択される、単離NKR-CARポリペプチド。

【請求項3】

（a）メソテリンに結合する抗原結合ドメインが、配列番号234または240における抗メソテリン重鎖可変領域のアミノ酸配列、またはそれと95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

および／または配列番号234または240における抗メソテリン軽鎖可変領域のアミノ酸配列、またはそれと95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み；および／または

（b）メソテリンに結合する抗原結合ドメインが、配列番号234または240のアミノ酸配列、またはそれと95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む、

請求項1に記載の単離核酸分子または請求項2に記載の単離NKR-CARポリペプチド。

【請求項4】

NKR-CARが、KIR D0ドメイン、KIR D1ドメインおよび／またはKIR D2ドメインの1以上を含む、請求項1または3に記載の単離核酸分子または請求項2または3に記載の単離NKR-CARポリペプチド。

【請求項5】

（i）NCRが、NKp30、NKp44およびNKp46から選択される；または

（ii）NKR-CARが、NKp46、NKp30およびNKp44からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含むNCR膜貫通ドメインを含む、

請求項 1 または 3 に記載の単離核酸分子または請求項 2 または 3 に記載の単離 N K R - C A R ポリペプチド。

【請求項 6】

(i) 膜貫通ドメインが、配列番号 3 5 7、3 5 8 または 3 5 9 のアミノ酸配列、または配列番号 3 5 7、3 5 8 または 3 5 9 と 9 5 ~ 9 9 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；または

(i i) 膜貫通ドメインをコードする核酸配列が、配列番号 3 4 2 のヌクレオチド 7 7 1 ~ 8 3 0、配列番号 3 4 4 のヌクレオチド 7 7 3 ~ 8 3 2 または配列番号 3 4 6 のヌクレオチド 8 0 3 ~ 8 7 5、またはそれと 9 5 ~ 9 9 % 配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1 または 3 に記載の単離核酸分子または請求項 2 または 3 に記載の単離 N K R - C A R ポリペプチド。

10

【請求項 7】

(i) 細胞質ドメインが、配列番号 3 6 0、3 6 1 または 3 6 2 のアミノ酸配列、または配列番号 3 6 0、3 6 1 または 3 6 2 と 9 5 ~ 9 9 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；または

(i i) 細胞質ドメインをコードする核酸配列が、配列番号 3 4 2 のヌクレオチド 8 3 1 ~ 9 4 7、配列番号 3 4 4 のヌクレオチド 8 3 3 ~ 1 0 6 0 または配列番号 3 4 6 のヌクレオチド 8 7 6 ~ 9 4 9、またはそれと 9 5 ~ 9 9 % 配列同一性を有する核酸配列を含む、

請求項 1、3 または 6 に記載の単離核酸分子または請求項 2、3 または 6 に記載の単離 N K R - C A R ポリペプチド。

20

【請求項 8】

メソテリンに結合する抗原結合ドメインが、ヒンジドメインにより膜貫通ドメインに連結しており、

(a) ヒンジドメインが、K I R ヒンジ、N C R ヒンジ、S L A M F ヒンジ、C D 1 6 ヒンジ、C D 6 4 ヒンジおよび L Y 4 9 ヒンジからなる群から選択され；

(b) ヒンジドメインが、配列番号 3 または 4 のアミノ酸配列、またはそれと 9 5 ~ 9 9 % 同一性を有するアミノ酸配列を含み；

(c) ヒンジドメインが、N K R - C A R を発現する細胞と標的抗原担持細胞との結合を妨害しないように、ヒンジドメインは十分に短いまたは柔軟である；

30

(d) ヒンジドメインが、2 ~ 2 0、5 ~ 1 5、7 ~ 1 2 または 8 ~ 1 0 アミノ酸長である；

(e) ヒンジドメインが、1 0 ~ 3 0 0、1 0 ~ 2 5 0 または 1 0 ~ 2 0 0 アミノ酸長である；

(f) ヒンジドメインが N K R - C A R を発現する細胞から伸びる距離が、ヒンジドメインが標的細胞表面との結合を妨害しないように、十分短い；

(g) ヒンジドメインが、N K R - C A R を発現する細胞毒性細胞表面から 2 0、1 5 または 1 0 ナノメートル未満伸びる；または

(h) N K R - C A R が K I R - C A R であり、ヒンジドメインが、5 0、2 0 または 1 0 アミノ酸長より短い、

40

請求項 1 または 3 ~ 7 のいずれかに記載の単離核酸分子または請求項 2 ~ 7 のいずれかに記載の単離 N K R - C A R ポリペプチド。

【請求項 9】

アダプター分子をコードする核酸配列をさらに含む請求項 1 または 3 ~ 8 のいずれかに記載の単離核酸分子であって、該核酸配列が、

(i) 配列番号 3 3 3 のアミノ酸 1 ~ 1 1 3 または配列番号 3 3 5 のアミノ酸 1 ~ 8 6 のアミノ酸配列を含むアダプター分子をコードする；または

(i i) 配列番号 3 3 2 のヌクレオチド 1 ~ 3 3 9 または配列番号 3 3 4 のヌクレオチド 1 ~ 2 5 8 を含む、

単離核酸分子。

50

【請求項 10】

NK R-CARが、

(i) 活性化KIR (act KIR) 膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含む活性化KIR-CAR (act KIR-CAR) ; または

(ii) 膜貫通ドメインおよび阻害性KIR (inh KIR) 細胞質ドメインを含む阻害性KIR-CAR (inh KIR-CAR)

である、請求項1または3～9のいずれかに記載の単離核酸分子または請求項2～8のいずれかに記載の単離NK R-CARポリペプチド。

【請求項 11】

(a) 単離核酸分子が、T細胞ベースのキメラ抗原受容体 (TCAR) または第二NK R-CARをコードする核酸配列をさらに含む; および/または

(b) 核酸分子が、DNA分子、RNA分子またはこれらの組み合わせである、請求項1または3～10のいずれかに記載の単離核酸分子。

【請求項 12】

(i) 膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインが、集散的に、配列番号333のアミノ酸413～487または配列番号335のアミノ酸386～454のアミノ酸配列; または配列番号333のアミノ酸413～487または配列番号335のアミノ酸386～454と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含むか; または

(ii) 膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインをコードする核酸配列が、配列番号332のヌクレオチド1237～1464または配列番号334のヌクレオチド1156～1365またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む、請求項3(b)、9または11のいずれかに記載の単離核酸分子または請求項3(b)に記載の単離NK R-CARポリペプチド。

【請求項 13】

請求項1または3～12のいずれかに記載の核酸分子を含むベクターであって、ベクターがDNAベクターまたはRNAベクターであり、

(i) ベクターが、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターからなる群から選択される; および/または

(ii) ベクターが、EF-1プロモーターをさらに含む、ベクター。

【請求項 14】

請求項1または3～12のいずれかに記載の核酸分子、請求項2～8、10または12のいずれかに記載のNK R-CARポリペプチドまたは請求項13に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 15】

細胞に、請求項1または3～12のいずれかに記載の核酸分子または請求項13に記載のベクターを導入することを含む、細胞を製造する方法であって:

(i) 該細胞が単離細胞である; または

(ii) 該方法がエキスピボ免疫化の方法である、方法。

【請求項 16】

治療において使用するための、請求項1または3～12のいずれかに記載の核酸分子、請求項2～8、10または12のいずれかに記載のポリペプチドまたは請求項13に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 17】

(i) 哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する; または

(ii) 疾患または障害を有する哺乳動物を処置する、

方法における使用のための、請求項1または3～12のいずれかに記載の核酸分子、請求項2～8、10または12のいずれかに記載のNK R-CARポリペプチドまたは請求項13に記載のベクターを含む、細胞であって、該方法が、哺乳動物に細胞の有効量を投与

10

20

30

40

50

することを含む、細胞。

【請求項 18】

疾患または障害が、中皮腫、悪性胸膜中皮腫、非小細胞性肺癌、小細胞肺癌、扁平上皮細胞肺癌、大細胞肺癌、膵臓癌、膵管腺癌、卵巣癌、結腸直腸癌および膀胱癌またはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 17 に記載の使用のための細胞。

【請求項 19】

(i) 哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する；または
(ii) 疾患または障害を有する哺乳動物を処置する、
ための医薬の製造のための、請求項 1 または 3 ～ 12 のいずれかに記載の核酸分子、請求項 2 ～ 8、10 または 12 のいずれかに記載の N K R - C A R ポリペプチドまたは請求項 13 に記載のベクターを含む、細胞の使用。

10

【請求項 20】

疾患または障害が中皮腫、悪性胸膜中皮腫、非小細胞性肺癌、小細胞肺癌、扁平上皮細胞肺癌、大細胞肺癌、膵臓癌、膵管腺癌、卵巣癌、結腸直腸癌および膀胱癌またはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

1 以上の薬学的にまたは生理学的に許容される担体、希釈剤または添加物と組み合わせた、請求項 14 に記載の細胞を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、P C T 出願 P C T / C N 2 0 1 4 / 0 8 6 6 9 4 号(2014 年 9 月 1 7 日出願)および P C T 出願 P C T / C N 2 0 1 4 / 0 9 0 5 7 8 号(2014 年 1 1 月 7 日出願)に基づく優先権を主張する。これらの出願の内容全体を、引用により本明細書に包含させる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

30

遺伝子導入テクノロジーの使用により、主要組織適合複合体(MHC)により課せられる制約と無関係の特異性を T 細胞に授ける抗体結合ドメインをその表面に安定して発現するように、T 細胞を遺伝子操作できる。キメラ抗原受容体(CAR)は、抗体の抗原認識フラグメント(例えば、s c F v、または一本鎖可変領域フラグメント)と、C D 3 ゼータ鎖の細胞内ドメインを融合する、T 細胞(CAR T 細胞)上に発現される合成タンパク質である。s c F v の同族抗原を発現する標的細胞との相互作用により、T 細胞に発現された C A R は、標的細胞死滅(標的細胞溶解ともいう)を生じる T 細胞活性化を惹起できる。C D 1 3 7 または C D 2 8 の細胞内ドメインのようなさらなる共刺激性シグナルと組み合わせたとき、これらの受容体はまた増殖を生じることにもできる。しかしながら、この増殖のいくぶんかは、正常 T 細胞受容体(TCR)応答と異なり抗原非依存的であるように見える(Mil one et al., 2009, Mol Ther 17(8):1453-64)。人工受容体は、MHC 分子と複合体化した抗原性ペプチドへの天然 T C R 結合により産生される細胞内シグナル伝達を完全には再現しない(Brockner, 2000, Blood 96(5):1999-2001)。シグナル伝達欠損は、高レベルの I L - 2 のようなサイトカイン非存在下での養子移入による C A R T 細胞の長期生存を制限し得る(Lo et al., 2010, Clin Cancer Res 16(10):2769-80)。それらはまたある抗癌適用で有益であり得る制御の改変も有するが(Loskog et al., 2006, Leukemia 20(10):1819-28)、これらの制御性欠損はまた、極低レベルでもその抗原を発現する正常組織に対するその“標的外”活性の制御を障壁とする可能性ももたらす。これらの“標的外”効果は、C A R ベースの治療剤を厳しく制限し、C A R 修飾 T 細胞の初期フェーズ I 評価中の高可能性の死亡の結果となった(Morgan et al., 2010, Mol Ther 18(4):843-51)。

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

それゆえに、現在のCARベースの治療剤の制限を克服する、CAR構築のための代替的アプローチが当分野で必要とされている。本発明は、当分野におけるこの充足されていない要求に取り組む。

【課題を解決するための手段】

【0004】

要約

第一の面において、本発明は、精製されているかまたは天然に存在しない細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、例えば、NK R膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン、例えば、NK R細胞質ドメインの1、2または全てを含む、精製されているかまたは天然に存在しないナチュラルキラー細胞免疫機能受容体-キメラ抗原受容体(NK R-CAR)ポリペプチドに関する。ある態様において、NK R-CARポリペプチドは、細胞外抗原結合ドメイン、および膜貫通ドメイン、例えば、NK R膜貫通ドメイン；または細胞質ドメイン、例えば、NK R細胞質ドメインの一方または両方を含む。ある態様において、該NK R-CARポリペプチドは細胞外抗原結合ドメイン；膜貫通ドメインおよびNK R細胞質ドメインを含む。ある態様において、NK R-CARポリペプチドは細胞外抗原結合ドメイン、NK R膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含む。ある態様において、NK R-CARポリペプチドは細胞外抗原結合ドメイン、NK R膜貫通ドメインおよび細胞質ド

10

20

【0005】

ある態様において、該NK R-CARポリペプチドは、K I R-CAR、例えば、a c t K I R-CARまたはi n h K I R-CAR、N C R-CAR、例えば、a c t N C R-CAR、S L A M F-CAR、例えば、i n h S L A M F-CAR、F c R-CAR、例えば、C D 1 6-CAR、例えば、a c t C D 1 6-CAR、またはC D 6 4-CAR、例えば、a c t C D 6 4-CAR、またはL y 4 9-CAR、例えば、a c t L y 4 9-CARまたはi n h L y 4 9-CARを含む。

【0006】

ある態様において、NK R-CARポリペプチドはキラー細胞免疫グロブリン様受容体キメラ抗原受容体(K I R-CAR)を含み、ここで、K I R-CARはK I Rからの膜貫通ドメイン(K I R膜貫通ドメイン)またはK I Rからの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン(K I R細胞質ドメイン)の一方または両方を含む。ある態様において、K I R膜貫通ドメインは、K I R 2 D S 2、K I R 2 D L 3、K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2、K I R 2 D L 4、K I R 2 D L 5 A、K I R 2 D L 5 B、K I R 2 D S 1、K I R 2 D S 3、K I R 2 D S 4、K I R 2 D S 5、K I R 3 D L 1、K I R 3 D S 1、K I R 3 D L 2、K I R 3 D L 3、K I R 2 D P 1およびK I R 3 D P 1からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、K I R細胞質ドメインは、K I R 2 D S 2、K I R 2 D L 3、K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2、K I R 2 D L 4、K I R 2 D L 5 A、K I R 2 D L 5 B、K I R 2 D S 1、K I R 2 D S 3、K I R 2 D S 4、K I R 2 D S 5、K I R 3 D L 1、K I R 3 D S 1、K I R 3 D L 2、K I R 3 D L 3、K I R 2 D P 1およびK I R 3 D P 1からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、K I R-CARは、さらにK I R D 0ドメイン、K I R D 1ドメインおよび／またはK I R D 2ドメインの1以上を含む。

30

40

【0007】

ある態様において、NK R-CARポリペプチドは天然細胞毒性受容体キメラ抗原受容体(NC R-CAR)を含み、ここで、NC R-CARは、NC Rからの膜貫通ドメイン(NC R膜貫通ドメイン)またはNC Rからの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン(NC R細胞質ドメイン)の一方または両方を含む。ある態様において、NC R膜貫

50

通ドメインは、NK p 4 6、NK p 3 0およびNK p 4 4からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、NCR細胞質ドメインは、NK p 4 6、NK p 3 0およびNK p 4 4からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【0008】

ある態様において、NK R CARポリペプチドはシグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーキメラ抗原受容体(SLAMF-CAR)を含み、ここで、SLAMF-CARは、SLAMFからの膜貫通ドメイン(SLAMF膜貫通ドメイン)またはSLAMFからの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン(SLAMF細胞質ドメイン)の一方または両方を含む。ある態様において、SLAMF膜貫通ドメインは、SLAM、CD 4 8、CD 2 2 9、2 B 4、CD 8 4、NTB-A、CRACC、BLAMEおよびCD 2 F-1 0からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、SLAMF細胞質ドメインは、SLAM、CD 4 8、CD 2 2 9、2 B 4、CD 8 4、NTB-A、CRACC、BLAMEおよびCD 2 F-1 0からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

10

【0009】

ある態様において、NK R CARポリペプチドはFc受容体キメラ抗原受容体(FcR-CAR)を含み、ここで、FcR-CARは、CD 1 6またはCD 6 4から選択されるFcRからの膜貫通ドメインまたはCD 1 6またはCD 6 4から選択されるFcRからの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインの一方または両方を含む。

20

【0010】

ある態様において、NK R CARポリペプチドはLy 4 9受容体キメラ抗原受容体(Ly 4 9-CAR)を含み、ここで、Ly 4 9-CARは、Ly 4 9からの膜貫通ドメイン(Ly 4 9膜貫通ドメイン)またはLy 4 9からの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン(Ly 4 9細胞質ドメイン)の一方または両方を含む。ある態様において、Ly 4 9膜貫通ドメインは、Ly 4 9 A、Ly 4 9 C、Ly 4 9 HおよびLy 4 9 Dからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、Ly 4 9細胞質ドメインは、Ly 4 9 A、Ly 4 9 C、Ly 4 9 HおよびLy 4 9 Dからなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【0011】

ある態様において、NK R-CARポリペプチドの膜貫通ドメインはNK R膜貫通ドメインであり、ここで、NK R膜貫通ドメインは、KIR 2 DS 2、KIR 2 DL 3、NK p 4 6、KIR、NCR、SLAMF、FcRおよびLy 4 9からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、膜貫通ドメインは、i)配列番号3 5 7、3 5 8または3 5 9のアミノ酸配列；ii)配列番号3 5 7、3 5 8または3 5 9のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を含むが、修飾が5を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号3 5 7、3 5 8または3 5 9と9 5～9 9%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0012】

ある態様において、NK R-CARポリペプチドのコードされる膜貫通ドメインは膜貫通ドメイン、例えば、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD 3 ガンマ、CD 3 デルタ、CD 3 イプシロン、CD 5、CD 2 2、CD 7 9 a、CD 7 9 b、CD 2 7 8 (別名“ICOS”)、FcεRI、CD 6 6 d、DAP 1 0、DAP 1 2、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、CD 2 8、CD 3 イプシロン、CD 4 5、CD 4、CD 5、CD 8 (CD 8 アルファまたはCD 8 ベータ)、CD 9、CD 1 6、CD 2 2、CD 3 3、CD 3 7、CD 6 4、CD 8 0、CD 8 6、CD 1 3 4、CD 1 3 7、CD 1 5 4、OX 4 0、CD 2、CD 7、CD 2 7、CD 2 8、CD 3 0、CD 4 0、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD 1 1 a/CD 1 8)、4-1 BB (CD 1 3 7)、B 7-H

40

50

3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKP80(KLRF1)、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドまたはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、ここに記載するようなTCARの膜貫通ドメインである。

【0013】

ある態様において、NKR-CARポリペプチドの細胞質ドメインは、KIR2DS2、KIR2DL3、NKP46、KIR、NCR、SLAMF、FcRおよびLy49からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインの1以上を含むNKR細胞質ドメインである。ある態様において、細胞質ドメインは、i)配列番号360、361または362のアミノ酸配列；ii)配列番号360、361または362のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を含むが、修飾が20、10または5を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号360、361と95～99%配列同一性のアミノ酸配列を含む。

【0014】

ある態様において、NKR-CARポリペプチドの細胞質ドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインまたはアダプター分子、例えば、DAP12を含む。ある態様において、NKR-CARポリペプチドのコードされる細胞質ドメインは、アダプター分子、例えば、DAP12またはFcεRγを含む。ある態様において、細胞質ドメインは、i)配列番号333のアミノ酸1～113または配列番号335のアミノ酸1～86のアミノ酸配列；ii)配列番号333のアミノ酸1～113または配列番号335のアミノ酸1～86に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が20、10、または5を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号333のアミノ酸1～113または配列番号335のアミノ酸1～86と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含むコードされるアダプター分子を含む。ある態様において、NKR-CARは、ここに記載する抗原結合ドメイン、CD8膜貫通ドメインおよびDAP12を含む細胞質ドメインを含む。

【0015】

ある態様において、NKR-CARポリペプチドの細胞質ドメインは、例えば、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(別名“ICOS”)、FcεRI、CD66d、DAP10、DAP12、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8(CD8アルファまたはCD8ベータ)、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)

10

20

30

40

50

、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAЕ、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、P SGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドまたはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインの1以上を含む、ここに記載するようなTCARの細胞質ドメインである。

【0016】

ある態様において、NKRCARポリペプチドは、さらに、例えば、配列番号1のアミノ酸配列を含む、リーダー配列またはシグナル配列を含む。

【0017】

ある態様において、NKRCARは、膜貫通ドメインおよび細胞外抗原結合ドメインを含み、さらに、該膜貫通ドメインと該細胞外抗原結合ドメインの間に位置するヒンジドメインを含む。ある態様において、ヒンジドメインは、GSヒンジ、CD8ヒンジ、IgG4ヒンジ、IgDヒンジ、KIR2DS2ヒンジ、KIRヒンジ、NCRヒンジ、SLAMFヒンジ、CD16ヒンジ、CD64ヒンジおよびLY49ヒンジからなる群から選択される。ある態様において、ヒンジドメインは、i)配列番号5、2、3または4のアミノ酸配列；ii)配列番号5、2、3または4のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が5を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号5、2、3または4のアミノ酸配列と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0018】

ある態様において、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインは、集合的に、i)配列番号333のアミノ酸413～487または配列番号335もしくは配列番号371のアミノ酸386～454のアミノ酸配列；ii)配列番号333のアミノ酸413～487または配列番号335もしくは配列番号371のアミノ酸386～454に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が30、20または10を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号333のアミノ酸413～487または配列番号335もしくは配列番号371のアミノ酸386～454と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0019】

前記態様のいずれかにおいて、NKRCARは活性化NKRCARであり、細胞外抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインである。前記態様のいずれかにおいて、細胞外抗原結合ドメインは、メソテリンに結合する非マウス抗原結合ドメインである。ある態様において、細胞外メソテリンに結合する非マウス抗原結合ドメインは、メソテリンに結合するヒトまたはヒト化抗原結合ドメインを含む。ある態様において、メソテリンに結合するヒトまたはヒト化抗原結合ドメインを表4に示す。

【0020】

ある態様において、メソテリンに結合するヒト抗原結合ドメインは、表4に挙げるヒト抗メソテリン重鎖アミノ酸配列のいずれかの重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)；および／または表4に挙げるヒト抗メソテリン軽鎖アミノ酸配列のいずれかの軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)を含む。ある態様において、メソテリンに結合するヒト抗原結

10

20

30

40

50

合ドメインは、i)表4に挙げるヒト抗メソテリン重鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列；ii)表4に挙げるヒト抗メソテリン重鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が30、20または10を超えないアミノ酸配列；またはiii)表4に挙げるヒト抗メソテリン重鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／またはi)表4に挙げるヒト抗メソテリン軽鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列；ii)表4に挙げるヒト抗メソテリン軽鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が30、20または10を超えないアミノ酸配列；またはiii)表4に挙げるヒト抗メソテリン軽鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、メソテリンに結合するヒト抗原結合ドメインは、i)配列番号230～253のいずれかのアミノ酸配列；ii)配列番号230～253のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が30、20または10を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号230～253のいずれかのアミノ酸配列と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む。このような態様において、NKRCARは、さらに、例えば、集合的に、配列番号371のアミノ酸配列、配列番号371に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号371と少なくとも95～99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含む。

10

【0021】

第一の面において、本発明は、例えば、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、例えば、NKR膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン、例えば、NKR細胞質ドメインの1、2または全てを含む、ここに記載するナチュラルキラー細胞免疫機能受容体ーキメラ抗原受容体(NKRCAR)ポリペプチドをコードする、精製されているかまたは天然に存在しない核酸分子に関する。ある態様において、NKRCARをコードする核酸分子は、細胞外抗原結合ドメインおよび膜貫通ドメイン、例えば、NKR膜貫通ドメイン；または細胞質ドメイン、例えば、NKR細胞質ドメインの一方または両方を含む。ある態様において、NKRCARをコードする核酸分子は細胞外抗原結合ドメイン；膜貫通ドメインおよびNKR細胞質ドメインを含む。ある態様において、NKRCARをコードする核酸分子は細胞外抗原結合ドメイン、NKR膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含む。ある態様において、NKRCARをコードする核酸分子は細胞外抗原結合ドメイン、NKR膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含む。

20

30

【0022】

ある態様において、核酸分子は、KIR-CAR、例えば、actKIR-CARまたはinhKIR-CAR、NCR-CAR、例えば、actNCR-CAR、SLAMF-CAR、例えば、inhSLAMF-CAR、FcR-CAR、例えば、CD16-CAR、例えば、actCD16-CAR、またはCD64-CAR、例えば、actCD64-CAR、またはLy49-CAR、例えば、actLy49-CARまたはinhLy49-CARを含むNKRCARをコードする。

【0023】

ある態様において、コードされたKIR-CARはKIRからの膜貫通ドメイン(KIR膜貫通ドメイン)またはKIRからの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン(KIR細胞質ドメイン)の一方または両方を含む。ある態様において、KIR膜貫通ドメインは、KIR2DS2、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1、KIR3DS1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1およびKIR3DP1からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、KIR細胞質ドメインは、KIR2DS2、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1、KIR3DS1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2

40

50

D P 1 および K I R 3 D P 1 からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、K I R - C A R は、さらに K I R D 0 ドメイン、K I R D 1 ドメインおよび／または K I R D 2 ドメインの 1 以上を含む。

【0024】

ある態様において、コードされた N C R - C A R は、N C R からの膜貫通ドメイン(N C R 膜貫通ドメイン)または N C R からの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン(N C R 細胞質ドメイン)の一方または両方を含む。ある態様において、N C R 膜貫通ドメインは、N K p 4 6、N K p 3 0 および N K p 4 4 からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、N C R 細胞質ドメインは、N K p 4 6、N K p 3 0 および N K p 4 4 からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

10

【0025】

ある態様において、コードされた S L A M F - C A R は、S L A M F からの膜貫通ドメイン(S L A M F 膜貫通ドメイン)または S L A M F からの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン(S L A M F 細胞質ドメイン)の一方または両方を含む。ある態様において、S L A M F 膜貫通ドメインは、S L A M、C D 4 8、C D 2 2 9、2 B 4、C D 8 4、N T B - A、C R A C C、B L A M E および C D 2 F - 1 0 からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、S L A M F 細胞質ドメインは、S L A M、C D 4 8、C D 2 2 9、2 B 4、C D 8 4、N T B - A、C R A C C、B L A M E および C D 2 F - 1 0 からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

20

【0026】

ある態様において、コードされた F c R - C A R は、C D 1 6 または C D 6 4 から選択される F c R からの膜貫通ドメインまたは C D 1 6 または C D 6 4 から選択される F c R からの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインの一方または両方を含む。

【0027】

ある態様において、コードされた L y 4 9 - C A R は、L y 4 9 からの膜貫通ドメイン(L y 4 9 膜貫通ドメイン)または L y 4 9 からの機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン(L y 4 9 細胞質ドメイン)の一方または両方を含む。ある態様において、L y 4 9 膜貫通ドメインは、L y 4 9 A、L y 4 9 C、L y 4 9 H および L y 4 9 D からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、L y 4 9 細胞質ドメインは、L y 4 9 A、L y 4 9 C、L y 4 9 H および L y 4 9 D からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0028】

ある態様において、N K R - C A R のコードされた膜貫通ドメインは N K R 膜貫通ドメインであり、ここで、N K R 膜貫通ドメインは、K I R 2 D S 2、K I R 2 D L 3、N K p 4 6、K I R、N C R、S L A M F、F c R および L y 4 9 からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、N K R - C A R のコードされた膜貫通ドメインは、配列番号 3 5 7、3 5 8 または 3 5 9 のアミノ酸配列；配列番号 3 5 7、3 5 8 または 3 5 9 のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 修飾を含むが、修飾が 5 を超えないアミノ酸配列；または配列番号 3 5 7、3 5 8 または 3 5 9 と 9 5 ~ 9 9 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある態様において、N K R - C A R をコードする核酸分子は配列番号 3 4 7 のヌクレオチド 8 0 3 ~ 8 7 5 を含む核酸配列またはそれと 9 5 ~ 9 9 % 配列同一性を有する核酸配列を含み、これは、膜貫通ドメインをコードする。

40

【0029】

ある態様において、N K R - C A R ポリペプチドのコードされる膜貫通ドメインは、例えば、T C R ゼータ、F c R ガンマ、F c R ベータ、C D 3 ガンマ、C D 3 デルタ、C D 3 イプシロン、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 2 7 8 (別名“ I C O S ”)、F c ε R I、C D 6 6 d、D A P 1 0、D A P 1 2、T 細胞受容体のアルファ、

50

ベータまたはゼータ鎖、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8(CD8アルファまたはCD8ベータ)、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKP80(KLRF1)、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELP LG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドまたはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、ここに記載するようなTCARの膜貫通ドメインである。

【0030】

ある態様において、NKR-CARのコードされる細胞質ドメインはNKR細胞質ドメインであり、ここで、NKR細胞質ドメインは、KIR2DS2、KIR2DL3、NKP46、KIR、NCR、SLAMF、FcRおよびLy49からなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインの1以上を含む。ある態様において、コードされる細胞質ドメインは、i)配列番号360、361または362のアミノ酸配列；ii)配列番号360、361または362のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を含むが、修飾が20、10または5を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号360、361と95～99%配列同一性のアミノ酸配列を含む。ある態様において、NKR-CARをコードする核酸分子は配列番号343のヌクレオチド831～947、配列番号345のヌクレオチド833～1060または配列番号347のヌクレオチド876～949またはそれと95～99%配列同一性を有する核酸配列を含む核酸配列を含み、これは、細胞質ドメインをコードする。

【0031】

ある態様において、NKR-CARポリペプチドのコードされる細胞質ドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインまたはアダプター分子、例えば、DAP12を含む。ある態様において、NKR-CARポリペプチドのコードされる細胞質ドメインは、アダプター分子、例えば、DAP12またはFcεRγを含む。ある態様において、コードされる細胞質ドメインは、i)配列番号333のアミノ酸1～113または配列番号335のアミノ酸1～86のアミノ酸配列；ii)配列番号333のアミノ酸1～113または配列番号335のアミノ酸1～86に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が20、10、または5を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号333のアミノ酸1～113または配列番号335のアミノ酸1～86と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含むコードされるアダプター分子を含む。ある態様において、NKR-CARをコードする核酸分子は、配列番号332のヌクレオチド1～339または配列番号334のヌクレオチド1～258またはそれと95～99%同一性を含む核酸配列を含むヌクレオチドを含む核酸配列を含み、これはアダプター分子をコードする。ある態様において、NKR-C

10

20

30

40

50

ARは、ここに記載する抗原結合ドメイン、CD8膜貫通ドメインおよびDAP12を含む細胞質ドメインを含む。

【0032】

ある態様において、NKR-CARポリペプチドのコードされる細胞質ドメインは、例えば、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(別名“ICOS”)、FcεRI、CD66d、DAP10、DAP12、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8(CD8アルファまたはCD8ベータ)、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELP(LG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドまたはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインの1以上を含む、ここに記載するようなTCARの細胞質ドメインである。

【0033】

ある態様において、NKR-CARをコードする核酸分子は、配列番号1のアミノ酸配列をコードするリーダー配列またはシグナル配列をさらに含む。

【0034】

ある態様において、コードされたNKR-CARは、ヒンジドメインにより膜貫通ドメインに連結された、細胞外抗原結合ドメインを含む。ある態様において、ヒンジドメインは、GSヒンジ、CD8ヒンジ、IgG4ヒンジ、IgDヒンジ、KIR2DS2ヒンジ、KIRヒンジ、NCRヒンジ、SLAMFヒンジ、CD16ヒンジ、CD64ヒンジおよびLY49ヒンジからなる群から選択される。ある態様において、コードされるヒンジドメインは、i)配列番号5、2、3または4のアミノ酸配列；ii)配列番号5、2、3または4のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が5を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号5、2、3または4のアミノ酸配列と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある態様において、NKR-CARをコードする核酸分子は配列番号356、16、13、14または15の核酸配列またはそれと95～99%同一性を有する核酸配列を含む核酸配列を含み、これは、ヒンジドメインをコードする。

【0035】

ある態様において、コードされる膜貫通ドメインおよびコードされる細胞質ドメインは、集合的に、i)配列番号333のアミノ酸413～487または配列番号335もしくは配列番号371のアミノ酸386～454のアミノ酸配列；ii)配列番号333のアミ

ノ酸 4 1 3 ~ 4 8 7 または配列番号 3 3 5 もしくは配列番号 3 7 1 のアミノ酸 3 8 6 ~ 4 5 4 に少なくとも 1、2 または 3 修飾を有するが、修飾が 3 0、2 0 または 1 0 を超えないアミノ酸配列；または iii) 配列番号 3 3 3 のアミノ酸 4 1 3 ~ 4 8 7 または配列番号 3 3 5 もしくは配列番号 3 7 1 のアミノ酸 3 8 6 ~ 4 5 4 と 9 5 ~ 9 9 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある態様において、NK R - C A R をコードする核酸分子は配列番号 3 3 2 のヌクレオチド 1 2 3 7 ~ 1 4 6 4 または配列番号 3 3 4 のヌクレオチド 1 1 5 6 ~ 1 3 6 5 またはそれと 9 5 ~ 9 9 % 同一性を有する配列を含む核酸配列を含み、これは、集合的に膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインをコードする。

【0036】

他の面において、本発明は、ここに記載する NK R - C A R をコードする配列を含む、核酸分子、例えば、精製されたまたは天然に存在しない、核酸、例えば、DNA または RNA を含む核酸、配列、例えば、mRNA に関する。

【0037】

ある態様において、核酸分子は、さらに、該 NK R - C A R と相互作用するアダプター分子または細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む。ある態様において、コードされたアダプター分子は、D A P 1 2 または F c ε R γ の機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、コードされたアダプター分子は、配列番号 3 3 3 のアミノ酸 1 ~ 1 1 3 または配列番号 3 3 5 のアミノ酸 1 ~ 8 6 のアミノ酸配列；配列番号 3 3 3 のアミノ酸 1 ~ 1 1 3 または配列番号 3 3 5 のアミノ酸 1 ~ 8 6 に少なくとも 1、2 または 3 修飾を有するが、修飾が 2 0、1 0、または 5 を超えないアミノ酸配列；または配列番号 3 3 3 のアミノ酸 1 ~ 1 1 3 または配列番号 3 3 5 のアミノ酸 1 ~ 8 6 と 9 5 ~ 9 9 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある態様において、NK R - C A R をコードする核酸分子は配列番号 3 3 2 のヌクレオチド 1 ~ 3 3 9 または配列番号 3 3 4 のヌクレオチド 1 ~ 2 5 8 またはそれと 9 5 ~ 9 9 % 同一性を含む核酸配列を含む核酸配列を含み、これは、アダプター分子をコードする。

【0038】

ある態様において、核酸分子は、さらに、T C A R または第二 NK R - C A R をコードする核酸配列を含む。ある態様において、コードされた T C A R またはコードされる第二 NK R - C A R は、メソテリンではない標的抗原に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0039】

ある態様において、NK R - C A R をコードする核酸分子は、さらに、T 2 A、P 2 A、E 2 A および F 2 A からなる群から選択されるペプチド開裂部位をコードする核酸配列を含み、ここで、ペプチド開裂部位をコードする核酸は、NK R - C A R をコードする核酸配列を第二核酸配列、例えば、アダプター分子をコードする核酸配列に連結する。ある態様において、ペプチド開裂部位をコードする核酸配列は、配列番号 5 7、5 8、5 9 または 6 0 のアミノ酸配列；またはそれと 9 5 ~ 9 9 % 配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。

【0040】

ある態様において、核酸は活性化 NK R - C A R をコードし、コードされる細胞外抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表 4 に、記載する抗原結合ドメインである。前記態様のいずれかにおいて、コードされる細胞外抗原結合ドメインは、メソテリンに結合する非マウス抗原結合ドメインである。ある態様において、コードされる細胞外メソテリンに結合する非マウス抗原結合ドメインは、メソテリンに結合するヒトまたはヒト化抗原結合ドメインを含む。ある態様において、メソテリンに結合するヒトまたはヒト化抗原結合ドメインを表 4 に示す。

【0041】

ある態様において、コードされたメソテリンに結合するヒト抗原結合ドメインは、表 4 に挙げるヒト抗メソテリン重鎖アミノ酸配列のいずれかの重鎖相補性決定領域 1 (H C C D R 1)、重鎖相補性決定領域 2 (H C C D R 2) および重鎖相補性決定領域 3 (H C C D R 3)；および／または表 4 に挙げるヒト抗メソテリン軽鎖アミノ酸配列のいずれか

10

20

30

40

50

の軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)を含む。ある態様において、コードされたメソテリンに結合するヒト抗原結合ドメインは、i)表4に挙げるヒト抗メソテリン重鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列；ii)表4に挙げるヒト抗メソテリン重鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が30、20または10を超えないアミノ酸配列；またはiii)表4に挙げるヒト抗メソテリン重鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／またはi)表4に挙げるヒト抗メソテリン軽鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列；ii)表4に挙げるヒト抗メソテリン軽鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が30、20または10を超えないアミノ酸配列；またはiii)表4に挙げるヒト抗メソテリン軽鎖可変領域のいずれかのアミノ酸配列と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、コードされたメソテリンに結合するヒト抗原結合ドメインは、i)配列番号230～253のいずれかのアミノ酸配列；ii)配列番号230～253のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が30、20または10を超えないアミノ酸配列；またはiii)配列番号230～253のいずれかのアミノ酸配列と95～99%同一性を有するアミノ酸配列を含む。このような態様において、NKRCARは、さらに、例えば、集合的に、配列番号371のアミノ酸配列、配列番号371に少なくとも1、2または3修飾を有するが、修飾が10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号371と少なくとも95～99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含む。

【0042】

他の面において、本発明は、ここに記載するNKRCARをコードする核酸分子を含むベクターに関する。ある態様において、ベクターはDNAベクターまたはRNAベクターである。ある態様において、ベクターは、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターからなる群から選択される。ある態様において、ベクターは、さらに、ここに記載するアダプター分子または細胞内シグナル伝達ドメインを含む核酸配列を含む。ある態様において、ベクターは、さらに、例えば、配列番号11の配列を含む、ここに記載するプロモーター、例えば、EF-1プロモーターを含む。

【0043】

他の面において、本発明は、さらに、ここに記載するNKRCAR、ここに記載するNKRCARをコードする核酸分子、ここに記載するベクターまたはここに記載するNKRCAR複合体を含む、細胞、例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、細胞毒性細胞、例えば、天然に存在するもしくは存在しないT細胞、NK細胞または細胞毒性T細胞またはNK細胞株に関する。

【0044】

ある態様において、細胞毒性細胞は、さらに、該NKRCARと相互作用するアダプター分子または細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0045】

他の面において、本発明は、細胞毒性細胞に、ここに記載するNKRCARをコードする配列を含む核酸、例えば、mRNAを導入することを含む、ここに記載するNKRCARを含む、ここに記載する細胞、例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、細胞毒性細胞、例えば、天然に存在するもしくは存在しないT細胞、NK細胞または細胞毒性T細胞またはNK細胞株を製造する方法に関する。ある態様において、方法は、さらに、細胞毒性細胞においてここに記載するNKRCARを製造することを含む。ある態様において、方法は、ここに記載するNKRCARを含む、ここに記載する細胞の集団、例えば、免疫エフェクター細胞の集団の製造を含む。

【0046】

他の面において、本発明は、有効量のここに記載するNKRCARを含む、ここに記

10

20

30

40

50

載する細胞またはここに記載する細胞の集団、例えば、細胞毒性細胞、例えば、天然に存在するもしくは存在しないT細胞、NK細胞または細胞毒性T細胞またはNK細胞株を哺乳動物に投与することを含む、対象を処置する方法、例えば、哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する方法に関する。

【0047】

他の面において、本発明は、対象に有効量の例えば、ここに記載するような、NK R-CARを含む細胞を投与することを含む、腫瘍抗原、例えば、ここに記載する腫瘍抗原の発現と関係する疾患(例えば、増殖性疾患、前癌状態および腫瘍抗原の発現と関係する非癌徴候)を有する対象を処置する方法に関する。ある態様において、NK R-CARは活性化NK R-CARであり、細胞外抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインである。ある態様において、方法は、さらに、例えば、ここに記載するような、TCARを含む細胞の投与を含む。

10

【0048】

ある態様において、腫瘍抗原の発現と関係する疾患は癌、例えば、ここに記載する癌である。ある態様において、癌は固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍である。

【0049】

ある態様において、疾患または障害はメソテリンの発現と関係し、例えば、中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)、肺癌(例えば、非小細胞性肺癌、小細胞肺癌、扁平上皮細胞肺癌または大細胞肺癌)、膵臓癌(例えば、膵管腺癌)、卵巣癌、結腸直腸癌および膀胱癌またはこれらの任意の組み合わせである。ある態様において、疾患は、例えば、少なくとも一つの前の標準治療で進行している対象における、膵臓癌、例えば、転移膵管腺癌(PDA)である。ある態様において、疾患は、例えば、少なくとも一つの前の標準治療で進行している対象における、中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)である。ある態様において、疾患は、少なくとも一つの前の標準治療のレジメン後進行している対象における、卵巣癌、例えば、漿液性上皮性卵巣癌である。

20

【0050】

前記組成物および方法のさらなる特性および態様は、次の1以上を含む：

他の面において、本発明は、細胞外抗原結合ドメインおよび膜貫通ドメイン、例えば、KIR膜貫通ドメインまたは細胞質ドメイン、例えば、ITIM含有細胞質ドメインまたはKIR細胞質ドメインを含む、精製されているかまたは天然に存在しないKIR-CARに関する。ある態様において、KIR-CARは、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよびITIM含有細胞質ドメインまたはKIR細胞質ドメインを含む。

30

【0051】

ある態様において、該膜貫通ドメインは、DAP12の膜貫通ドメインと、相互作用、例えば、結合できる。ある態様において、該膜貫通ドメインは、正荷電基、例えば、正荷電基、例えば、側鎖を含むアミノ酸残基を含む。ある態様において、該膜貫通ドメインは、KIR膜貫通ドメインを含む。

【0052】

ある態様において、該KIR-CARは、活性化KIR-CARである。ある態様において、該KIR-CARは、KIR膜貫通ドメインを含む。ある態様において、該KIR-CARは、阻害性KIR-CARである。ある態様において、該KIR-CARは、KIR細胞質ドメインを含む。ある態様において、該KIR-CARは、細胞外抗原結合ドメインおよび膜貫通ドメイン、例えば、正荷電基、例えば、正荷電基、例えば、側鎖を含むアミノ酸残基を含む膜貫通ドメインまたはKIR膜貫通ドメインを含む。

40

【0053】

ある態様において、ここに記載するKIR-CARは、scFvを含む抗原結合ドメインを含む。ある態様において、該抗原結合ドメインは、単一VHドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一VHドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一VHドメイン、または非抗体スキュフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子である。ある態様において、該抗原結合ドメインは、

50

ナノボディを含む。ある態様において、該抗原結合ドメインは、ラクダ科VHHドメインを含む。

【0054】

ある態様において、KIR-CARは活性化KIR-CARであり、細胞外抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインである。

【0055】

ある態様において、ここに記載するKIR-CARは、細胞外ヒンジドメインを含む。ある態様において、細胞外ヒンジドメインはKIRヒンジドメイン以外、例えば、KIR2DS2ヒンジドメイン以外である。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは天然分子に由来する。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは、KIR以外の天然分子に由来する。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは、天然に存在しないポリペプチド配列を含む。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは、ヒトCD8アルファからの細胞外ヒンジを含む。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは、合成細胞外ヒンジを含む。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは、50、20または10アミノ酸長より短い。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは、KIR2DS2ヒンジドメインより少ないアミノ酸を有する。

【0056】

ある態様において、ここに記載するKIR-CARは、actKIR-CARである。ある態様において、該actKIR-CARは、正荷電基、例えば、正荷電基、例えば、正荷電側鎖を含むアミノ酸残基を含む膜貫通ドメインまたはactKIR膜貫通ドメインを含む。ある態様において、該actKIR-CARは、ITAM含有ポリペプチドまたはアダプター分子からのシグナル伝達と相互作用し、促進できる。ある態様において、該actKIR-CARは、DAP12ポリペプチドからのシグナル伝達と相互作用し、促進できる。ある態様において、該actKIR-CARは、KIRDドメインを含む。ある態様において、該actKIR-CARは、KIRD1ドメインを含む。ある態様において、該actKIR-CARは、KIRD2ドメインを含む。ある態様において、該actKIR-CARは、KIRDドメインを含まない。ある態様において、該actKIR-CARは、KIR2DS2膜貫通ドメインを含む。ある態様において、該actKIR-CARは、KIR2DS2細胞質ドメインをさらに含む。ある態様において、該actKIR-CARは、KIRDドメインを含まない。

【0057】

ある態様において、ここに記載するKIR-CARの抗原結合ドメインは、標的細胞、例えば、癌細胞に提示される抗原に結合する。ある態様において、該抗原結合ドメインは、非標的細胞、例えば、非癌性細胞、例えば、標的細胞と同じタイプの非癌性細胞よりも、標的細胞、例えば、癌細胞で高度に発現される抗原である。ある態様において、該抗原結合ドメインは、ここに記載する抗原、例えば、ここに記載する腫瘍抗原に結合する。ある態様において、腫瘍抗原は、固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍、例えば、中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)、肺癌(例えば、非小細胞性肺癌、小細胞肺癌、扁平上皮細胞肺癌または大細胞肺癌)、膵臓癌(例えば、膵管腺癌)、卵巣癌、結腸直腸癌および膀胱癌またはこれらの任意の組み合わせで発現される。

【0058】

ある態様において、ここに記載するKIR-CARは、inhKIR-CARである。ある態様において、inhKIR-CARは、inhKIR膜貫通ドメインを含む。ある態様において、inhKIR-CARは、ITIM含有細胞質ドメイン、例えば、inhKIR細胞質ドメイン、例えば、KIR2DLまたはKIR3DL細胞質ドメインを含む。ある態様において、inhKIR-CARは、KIR膜貫通以外の膜貫通、例えば、ILT(CD85)、Siglec、LMIR(CD300)および／またはSLAM遺伝子ファミリーの受容体からのPD-1、CTLA4またはITIM含有受容体からの膜貫通ドメインを含む。ある態様において、inhKIR-CARは、KIR以外の阻害性受容体、例えば、ILT(CD85)、Siglec、LMIR(CD300)および／またはSL

10

20

30

40

50

AM遺伝子ファミリーの受容体からのPD-1、CTLA4またはITIM含有受容体からの細胞質ドメインを含む。ある態様において、*inhKIR-CAR*は、*KIR*以外の阻害性受容体、例えば、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン、独立的に、例えば、*ILT(CD85)*、*Signlec*、*LMIR(CD300)*および／またはSLAM遺伝子ファミリーの受容体からのPD-1、CTLA4またはITIM含有受容体からの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含む。ある態様において、該細胞質ドメインITIMを含む。ある態様において、*inhKIR-CAR*は、*KIR* Dドメインを含む。ある態様において、*inhKIR-CAR*は、*KIR* D0ドメインを含む。ある態様において、*inhKIR-CAR*は、*KIR* D1ドメインを含む。ある態様において、*inhKIR-CAR*は、*KIR* D2ドメインを含む。ある態様において、*inhKIR-CAR*は、*KIR* Dドメインを含まない。

10

【0059】

ある態様において、ここに記載する*inhKIR-CAR*の抗原結合ドメインは、標的細胞、例えば、癌細胞に提示されない抗原に結合する。ある態様において、該抗原結合ドメインは、標的細胞、例えば、癌性細胞、例えば、標的細胞と同じタイプの癌性細胞よりも、非標的細胞、例えば、非癌細胞で高度に発現される抗原と結合する。ある態様において、該抗原結合ドメインは、デスモグレイン1/3(DSG1/3)と結合する。ある態様において、*inhCAR*、例えば、*inhTCAR*または*inhNKR-CAR*、例えば、*inhKIR-CAR*および*actCAR*、例えば、*actTCAR*または*actNKR-CAR*、例えば、*actKIR-CAR*が提供され、ここで、*inhCAR*がデスモグレイン1/3(DSG1/3)を標的とする抗原結合ドメインを含み、*actCAR*がDSG1/3以外の抗原、例えば、EGFRを標的とする抗原結合ドメインを含む。ある態様において、この対を、EGFR発現癌、例えば、肺または結腸の腺癌の処置に使用する。ある態様において、癌細胞は、非癌細胞よりDSG1/3発現が少ない。ある態様において、この組み合わせは、GI管(すなわち口腔粘膜)の皮膚細胞または扁平上皮細胞のCAR介在を最小化できる。ある態様において、該抗原結合ドメインは、エフリン受容体またはクローディンと結合する。

20

【0060】

他の面において、本発明は、(a)*KIR-CAR*、例えば、ここに記載する第一*KIR-CAR*をコードする配列を含む、DNA、またはRNA、配列、例えば、mRNAを含む、核酸、例えば、精製されたまたは天然に存在しない、核酸、例えば、核酸に関する。ある態様において、該*KIR-CAR*、例えば、該第一*KIR-CAR*は、*actKIR-CAR*、例えば、ここに記載する*actKIR-CAR*である。ある態様において、核酸は*actKIR-CAR*をコードし、コードされる細胞外抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインである。ある態様において、該*KIR-CAR*、例えば、該第一*KIR-CAR*は、*inhKIR-CAR*、例えば、ここに記載する*inhKIR-CAR*である。

30

【0061】

ある態様において、該核酸は、DNA配列を含む。ある態様において、該核酸は、RNA配列、例えば、mRNA配列を含む。

40

【0062】

ある態様において、該核酸は、*KIR-CAR*、例えば、*actKIR-CAR*ならびに*inhKIR*細胞質ドメイン；膜貫通ドメイン、例えば、*KIR*膜貫通ドメイン；および阻害剤細胞質ドメイン、例えば、ITIMドメイン、例えば、*inhKIR* ITIMドメインを含む阻害性分子をコードする配列をコードする配列を含む。ある態様において、阻害性分子は、天然に存在する*inhKIR*または天然に存在する*inhKIR*と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%もしくは99%相同性を有するかまたは1残基、2残基、3残基、4残基、5残基、6残基、7残基、8残基、9残基、10残基、15残基もしくは20残基を超えて異ならない配列である。

【0063】

50

ある態様において、該核酸は、K I R-C A R、例えば、a c t K I R-C A Rをコードする配列ならびにS L A Mファミリー細胞質ドメイン；膜貫通ドメイン、例えば、S L A Mファミリー膜貫通ドメイン；および阻害剤細胞質ドメイン、例えば、S L A Mファミリードメイン、例えば、S L A MファミリーI T I Mドメインを含む阻害性分子をコードする配列を含む。ある態様において、阻害性分子は、天然に存在するS L A MファミリーメンバーであるかまたはS L A Mファミリーメンバーと少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%もしくは99%相同性を有するかまたは1残基、2残基、3残基、4残基、5残基、6残基、7残基、8残基、9残基、10残基、15残基もしくは20残基を超えて異なる天然に存在する配列である。

【0064】

ある態様において、ここに記載する該核酸は、さらに(b)ここに記載する第二K I R-C A R、例えば、該第一K I R-C A Rと異なる第二K I R-C A Rをコードする配列を含む。ある態様において、(a)および(b)は、同じ核酸分子、例えば、同じベクター、例えば、同じウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに配置される。ある態様において、(a)および(b)の一方が第一核酸分子、例えば、第一ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに配置され、他方が第二核酸分子、例えば、第二ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに配置される。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rは、a c t K I R-C A Rである。ある態様において、いずれかのa c t K I R-C A R単独の結合が、相当なレベルの活性化を誘発するのに不十分である。ある態様において、第一および第二のa c t K I R-C A R両者の結合が、相加的または相乗的レベルの活性化をもたらす。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rは、i n h K I R-C A Rである。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方はa c t K I R-C A Rであり、他方はi n h K I R-C A Rである。ある態様において、該a c t K I R-C A Rはここに記載するa c t K I R-C A Rである。ある態様において、該i n h K I R-C A Rはここに記載するi n h K I R-C A Rである。ある態様において、ここに記載する核酸は、ここに記載するa c t K I R-C A Rおよびここに記載するi n h K I R-C A Rを含む。

【0065】

ある態様において、核は、さらに(c)活性化シグナルを産生できる細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、アダプター分子をコードする配列を含む。ある態様において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、I T A Mモチーフを含む。ある態様において、該配列は、D A P 1 2細胞内シグナル伝達ドメインを含むD A P 1 2ポリペプチドをコードする。ある態様において、該D A P 1 2ポリペプチドは、さらに膜貫通ドメインを含む。ある態様において、該D A P 1 2ポリペプチドは、さらに細胞外ドメインを含む。ある態様において、(a)、(b)、および(c)の各々は、同じ核酸分子、例えば、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに提示される。ある態様において、(a)、(b)、および(c)の一つは第一核酸分子、例えば、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターでコードされ、(a)、(b)、および(c)の二番目および三番目は、第二核酸分子、例えば、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターでコードされる。ある態様において、(a)は第一核酸分子、例えば、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに提示され、(b)および(c)は第二核酸分子、例えば、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに提示される。他の態様において、(b)は第一核酸分子、例えば、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに提示され、(a)および(c)は第二核酸分子、例えば、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに提示される。ある態様において、(c)は第一核酸分子、例えば、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに提示され、(b)および(a)は第二核酸分子、例えば、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに提示される。ある態様において、(a)、(b)、および(c)

10

20

30

40

50

c)の各々は、異なる核酸分子、例えば、異なるベクター、例えば、ウイルスペクター、例えば、レンチウイルスペクターに提示される。

【0066】

ある態様において、(i)該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインは軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含まないか、(ii)該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はs c F v以外であるか、(iii)細胞表面に提示されるとき、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合するか、(iv)ここで、細胞表面に提示されるとき、該第一K I R-C A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二K I R-C A Rの存在により実質的に低減されないか、(v)該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメイン、または非抗体スキフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンII型抗体様分子を含むか、(vi)該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含むか、(vii)該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はナノボディを含むかまたは(viii)該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はラクダ科V H Hドメインを含む。

【0067】

ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインは軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含まない。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はs c F v以外である。

【0068】

ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合する。ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一K I R-C A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二K I R-C A Rの存在により実質的に低減されない。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンII型抗体様分子を含む。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含む。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はナノボディを含む。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はラクダ科V H Hドメインを含む。

【0069】

ある態様において、核酸は、T C A Rをコードする配列を含む。ある態様において、該T C A Rは、C D 3、例えばC D 3ゼータ鎖、C D 3イプシロン鎖、C D 3ガンマ鎖、C D 3デルタ鎖とのT細胞受容体複合体からの抗原結合ドメインおよび活性化細胞質ドメインを含む。ある態様において、該T C A Rは、共刺激性受容体、例えばC D 2 8、C D 1 3 7、C D 2 7、I C O SまたはO X 4 0からの共刺激性ドメインを含む。

【0070】

ある態様において、(i)該K I R－C A RおよびT C A Rの抗原結合ドメインは軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含まないか、(ii)該K I R－C A RおよびT C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はs c F v以外であるか、(iii)細胞表面に提示されるとき、該K I R－C A RおよびT C A Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合するか、(iv)細胞表面に提示されるとき、該K I R－C A Rのその同族抗原への結合が、該第二T C A Rの存在により実質的に低減されないか、(v)該K I R－C A RおよびT C A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキファールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含むか、(vi)該K I R－C A RおよびT C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキファールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含むか、(vii)該K I R－C A RおよびT C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はナノボディを含むかまたは(viii)ここで、該K I R－C A Rおよび該T C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はラクダ科V H Hドメインを含む。ある態様において、該K I R－C A Rおよび該T C A Rの一方の抗原結合ドメインは軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含まない。

10

20

【0071】

ある態様において、該K I R－C A Rおよび該T C A Rの抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はs c F v以外である。ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該K I R－C A RおよびT C A Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合する。ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該K I R－C A Rのその同族抗原への結合が、該第二T C A Rの存在により実質的に低減されない。ある態様において、該K I R－C A Rおよび該T C A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキファールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含む。ある態様において、該K I R－C A Rおよび該T C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキファールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含む。ある態様において、該K I R－C A Rおよび該T C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はナノボディを含む。ある態様において、該K I R－C A Rおよび該T C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はラクダ科V H Hドメインを含む。

30

【0072】

ある態様において、該K I R－C A Rおよび該T C A Rの一方の抗原結合ドメインはメソテリンに結合し、他方は異なる抗原結合ドメイン、例えば、同じ標的(メソテリン)または異なる標的(例えば、間質細胞上のメソテリン以外の標的、例えば、F A P；前立腺癌細胞上のメソテリン以外の標的、例えば、アンドロゲン受容体、O R 5 1 E 2、P S M A、P S C A、P D G R F－ β 、T A R P、G l o b o H、M A D－C T－1、またはM A D－C T－2；卵巣癌細胞上のメソテリン以外の標的、例えば、T n、P R S S 2 1、C D 1 7 1、ルイスY、葉酸受容体 α 、クローディン6、G l o b o Hまたは精子タンパク質17)に結合する。

40

【0073】

他の面において、本発明は、(a)ここに記載する第一K I R－C A Rを含む、細胞毒性細胞、例えば、天然に存在するもしくは存在しないT細胞、NK細胞または細胞毒性T細胞

50

胞またはNK細胞株細胞、例えば、NK92に関する。ある態様において、該細胞毒性細胞はT細胞である。ある態様において、該細胞毒性細胞はNK細胞である。ある態様において、該細胞毒性細胞はNK細胞株由来、例えば、NK92細胞である。ある態様において、該第一KIR-CARはここに記載するactKIR-CARである。ある態様において、該第一KIR-CARはここに記載するinhKIR-CARである。

【0074】

ある態様において、該細胞毒性細胞は、KIR-CAR、例えば、actKIR-CARおよびinhKIR細胞質ドメイン；膜貫通ドメイン、例えば、KIR膜貫通ドメイン；および阻害剤細胞質ドメイン、例えば、ITIMドメイン、例えば、inhKIR ITIMドメインを含む阻害性分子を含む。ある態様において、阻害性分子は、天然に存在するinhKIRまたは天然に存在するinhKIRと少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%もしくは99%相同性を有するかまたは1残基、2残基、3残基、4残基、5残基、6残基、7残基、8残基、9残基、10残基、15残基もしくは20残基を超えて異なる配列である。

10

【0075】

ある態様において、該細胞毒性細胞は、KIR-CAR、例えば、actKIR-CARおよびSLAMファミリー細胞質ドメイン；膜貫通ドメイン、例えば、SLAMファミリー膜貫通ドメイン；および阻害剤細胞質ドメイン、例えば、SLAMファミリーITIMドメインを含む阻害性分子を含む。ある態様において、阻害性分子は、天然に存在するSLAMファミリーメンバーまたは天然に存在するSLAMファミリーメンバーと少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%もしくは99%相同性を有するかまたは1残基、2残基、3残基、4残基、5残基、6残基、7残基、8残基、9残基、10残基、15残基もしくは20残基を超えて異なる配列である。

20

【0076】

ある態様において、細胞毒性細胞は、さらに、(b)ここに記載する第二KIR-CAR、例えば、該第一KIR-CARと異なる第二KIR-CARを含む。ある態様において、該KIR-CARおよび該第二KIR-CARの一方はactKIR-CARであり、他方はinhKIR-CARである。ある態様において、該actKIR-CARはここに記載するactKIR-CARである。ある態様において、該inhKIR-CARの一方はここに記載するinhKIR-CARである。ある態様において、ここに記載する細胞毒性細胞は、ここに記載するactKIR-CARおよびここに記載するinhKIR-CARを含む。

30

【0077】

ある態様において、細胞毒性細胞は、さらに、例えば、活性化シグナルを産生できる、例えば、該細胞に外来性である、活性化シグナルを産生できる、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、アダプター分子を含む。ある態様において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、ITAMモチーフを含む。ある態様において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP12細胞内シグナル伝達ドメインを含むDAP12ポリペプチドを含む。ある態様において、該DAP12ポリペプチドは、さらに膜貫通ドメインを含む。ある態様において、該DAP12ポリペプチドは、さらに細胞外ドメインを含む。

40

【0078】

ある態様において、細胞毒性細胞は、ここに記載する第一および第二のKIR-CARを含み、ここで、(i)該第一KIR-CARおよび該第二KIR-CARの一方の抗原結合ドメインは軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含まないか、(ii)該第一KIR-CARおよび該第二KIR-CARの一方の抗原結合ドメインはscFvであり、他方はscFv以外であるか、(iii)細胞表面に提示されるとき、該第一KIR-CARおよび該第二KIR-CARの抗原結合ドメインは、両者がscFv抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合するか、(iv)細胞表面に提示されるとき、該第一KIR-CARの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二KIR-CARの存在により実

50

質的に低減されないか、(v)該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキュフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含む、(vi)該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキュフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含むか、(vii)ここで、該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はナノボディを含むかまたは(viii)該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はラクダ科V H Hドメインを含む。

10

【0079】

ある態様において、該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインは軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含まない。ある態様において、該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はs c F v以外である。ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合する。ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一K I R－C A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二K I R－C A Rの存在により実質的に低減されない。ある態様において、該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキュフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含む。ある態様において、該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキュフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含む。ある態様において、該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はナノボディを含む。ある態様において、該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はラクダ科V H Hドメインを含む。

20

30

【0080】

ある態様において、該第一K I R－C A Rおよび該第二K I R－C A Rの一方の抗原結合ドメインはメソテリンに結合し、他方は異なる抗原結合ドメイン、例えば、同じ標的(メソテリン)または異なる標的(例えば、間質細胞上のメソテリン以外の標的、例えば、F A P；前立腺癌細胞上のメソテリン以外の標的、例えば、アンドロゲン受容体、O R 5 1 E 2、P S M A、P S C A、P D G R F－ β 、T A R P、G l o b o H、M A D－C T－1、またはM A D－C T－2；卵巣癌細胞上のメソテリン以外の標的、例えば、T n、P R S S 2 1、C D 1 7 1、ルイスY、葉酸受容体 α 、クローディン6、G l o b o Hまたは精子タンパク質17)に結合する。

40

【0081】

ある態様において、細胞毒性細胞は、ここに記載するようなK I R－C A Rを含み、さらにT C A Rを含む。ある態様において、該T C A Rは、抗原結合ドメインおよび一次刺激ドメインを含む。ある態様において、該T C A Rは、共刺激ドメインを含む。

【0082】

ある態様において、細胞毒性細胞、例えば、天然に存在するもしくは存在しないT細胞、NK細胞または細胞毒性T細胞またはNK細胞株、例えば、NK92細胞は、ここに記載するような核酸；またはここに記載する核酸によりコードされるK I R－C A Rを含む

50

。ある態様において、該細胞毒性細胞はT細胞である。ある態様において、該細胞毒性細胞はNK細胞である。ある態様において、該細胞毒性細胞は、NK細胞株由来、例えば、NK92である。

【0083】

他の面において、本発明は、ここに記載する細胞を製造する方法であって、細胞毒性細胞に、ここに記載する核酸を該細胞に導入することを含む、方法に関する。ある態様において、該方法は、細胞毒性細胞において、ここに記載するKIR-CARを形成することを含む。

【0084】

他の面において、本発明は、哺乳動物に有効量のここに記載する細胞を投与することを含む、対象を処置する方法、例えば、哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する方法に関する。ある態様において、該細胞は自己である。ある態様において、該細胞は同種である。ある態様において、細胞はT細胞、例えば、自己T細胞である。ある態様において、細胞は同種T細胞である。ある態様において、細胞はNK細胞、例えば、自己NK細胞である。ある態様において、細胞は同種NK細胞である。ある態様において、細胞はNK細胞株由来細胞、例えば、NK92である。ある態様において、該哺乳動物はヒトである。ある態様において、方法は、該哺乳動物、例えば、ヒトに対して、該処置の副作用を評価することを含む。ある態様において、該副作用は、急性呼吸促迫症候群、発熱性好中球減少症、低血圧、脳症、肝臓高トランスアミナーゼ血症、発作またはマクロファージ活性化症候群を含む。ある態様において、方法は、副作用を有する該ヒトを、ここに記載する薬剤、例えば、抗サイトカイン剤、例えば、腫瘍壊死因子アンタゴニスト、例えば、TNF-Ig融合体、例えば、エタネルセプト、IL-6アンタゴニスト、例えば、IL-6受容体アンタゴニスト、例えば、抗IL6受容体抗体、例えば、トシリズマブまたはコルチコステロイドで処置することをさらに含む。ある態様において、処置は、該ヒトへの抗IL6受容体抗体の投与を含む。

【0085】

ある態様において、腫瘍抗原の発現と関係する疾患は癌、例えば、ここに記載する癌である。ある態様において、癌は、固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍、例えば、中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)、肺癌(例えば、非小細胞性肺癌、小細胞肺癌、扁平上皮細胞肺癌または大細胞肺癌)、膵臓癌(例えば、膵管腺癌)、卵巣癌、結腸直腸癌および膀胱癌またはこれらの任意の組み合わせである。ある態様において、疾患は、例えば、少なくとも一つの前の標準治療で進行している対象における、膵臓癌、例えば、転移膵管腺癌(PDA)である。ある態様において、疾患は、例えば、少なくとも一つの前の標準治療で進行している対象における、中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)である。ある態様において、疾患は、少なくとも一つの前の標準治療のレジメン後進行している対象における、卵巣癌、例えば、漿液性上皮性卵巣癌である。

【0086】

ある態様において、方法は、メソテリンまたはCD19の発現と関係する疾患を有する哺乳動物、例えば、ヒトの処置を含む。ある態様において、方法は、望まない細胞増殖と関係する障害、例えば、癌を有する哺乳動物、例えば、ヒトの処置を含む。ある態様において、該障害は、膵臓癌、中皮腫、肺癌、卵巣癌、白血病またはリンパ腫である。

【0087】

他の面において、本発明は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、例えば、正荷電基、例えば、正荷電基、例えば、正荷電側鎖を含むアミノ酸残基を含む膜貫通ドメインまたはNCR膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン、例えば、NCR細胞質ドメインを含む、精製されているかまたは天然に存在しないNCR-CAR、例えば、活性化NCR-CARに関する。

【0088】

ある態様において、該NCR-CARは、正荷電基、例えば、正荷電基、例えば、正荷電側鎖を含むアミノ酸残基を含む膜貫通ドメイン、例えば、NCR膜貫通ドメイン、例え

ば、NKp30、NKp44またはNKp46細胞質ドメインを含む。ある態様において、該NCR-CARは、例えば、DAP12、FcRγまたはCD3ζ細胞質ドメインを含む、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子と相互作用できる細胞質ドメインを含む。ある態様において、該NCR-CAR、例えば、NKp30-CARは、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子と相互作用できる膜貫通ドメイン、例えば、DAP12を含む。ある態様において、該NCR-CARは、NKp46-CARを含む。ある態様において、該NKp46-CARは、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子と相互作用できる、正荷電基、例えば、正荷電基、例えば、正荷電側鎖を含むアミノ酸残基を含む膜貫通ドメインまたは例えば、NCR膜貫通ドメイン、例えば、FcRγまたはCD3ζ細胞質ドメインを含むものを含む。ある態様において、ここに記載する該NCR-CARは、該膜貫通ドメインと該細胞外抗原結合ドメインの間に配置されたヒンジドメインをさらに含む。

10

【0089】

ある態様において、NCR-CARは活性化NCR-CARであり、細胞外抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインである。

【0090】

他の面において、本発明は、ここに記載するNCR-CARをコードする配列を含む、核酸、例えば、精製されたまたは天然に存在しない、核酸、例えば、DNAまたはRNAを含む核酸、配列、例えば、mRNAに関する。ある態様において、核酸は、NKp30-CARおよび所望により、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子、例えば、DAP12をコードする配列を含む。ある態様において、該NCR-CAR、例えば、NKp46-CARは、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子、例えば、FcRγまたはCD3ζ分子と相互作用できる正荷電基、例えば、正荷電基、例えば、正荷電側鎖を含むアミノ酸残基を含む膜貫通ドメインまたはNCR膜貫通ドメインを含む。ある態様において、核酸は、さらに、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子をコードする配列を含み、これは、例えば、DAP12、FcRγまたはCD3ζを含む。

20

【0091】

ある態様において、核酸はactNCR-CARをコードし、コードされる細胞外抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインである。

【0092】

他の面において、本発明は、ここに記載するNCR-CARを含む、細胞毒性細胞、例えば、天然に存在するもしくは存在しないT細胞、NK細胞または細胞毒性T細胞またはNK細胞株に関する。ある態様において、細胞毒性細胞は、さらに、例えば、DAP12、FcRγまたはCD3ζ細胞質ドメインを含む、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子を含む。ある態様において、細胞毒性細胞は、NKp30-CARおよび所望により、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子、例えば、DAP12を含む。ある態様において、該NKp46-CARは、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子と相互作用できる膜貫通ドメイン、例えば、FcRγまたはCD3ζ分子を含む。

30

【0093】

他の面において、本発明は、細胞毒性細胞に、ここに記載するNCR-CARをコードする配列を含む核酸を導入することを含む、ここに記載する細胞を製造する方法に関する。ある態様において、方法は、ここに記載するNCR-CARを細胞毒性細胞に形成することを含む。

40

【0094】

他の面において、本発明は、哺乳動物に有効量のここに記載する細胞、例えば、ここに記載するNCR-CARを含む、ここに記載する本発明の細胞を投与することを含む、対象を処置する方法、例えば、哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する方法に関する。

【0095】

他の面において、本発明は、対象に、有効量の例えば、ここに記載するような、NCR-CARを含む細胞を投与することを含む、腫瘍抗原、例えば、ここに記載する腫瘍抗原

50

の発現と関係する疾患(例えば、増殖性疾患、前癌状態および腫瘍抗原の発現と関係する非癌徴候)を有する対象を処置する方法に関する。ある態様において、NCR-CARは活性化NCR-CARであり、細胞外抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインである。

【0096】

ある態様において、腫瘍抗原の発現と関係する疾患は癌、例えば、ここに記載する癌である。ある態様において、癌は、固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍、例えば、中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)、肺癌(例えば、非小細胞性肺癌、小細胞肺癌、扁平上皮細胞肺癌または大細胞肺癌)、膵臓癌(例えば、膵管腺癌)、卵巣癌、結腸直腸癌および膀胱癌またはこれらの任意の組み合わせである。ある態様において、疾患は、例えば、少なくとも一つの前の標準治療で進行している対象における、膵臓癌、例えば、転移膵管腺癌(PDA)である。ある態様において、疾患は、例えば、少なくとも一つの前の標準治療で進行している対象における、中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)である。ある態様において、疾患は、少なくとも一つの前の標準治療のレジメン後進行している対象における、卵巣癌、例えば、漿液性上皮性卵巣癌である。

10

【0097】

他の面において、本発明は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、例えば、正荷電基、例えば、正荷電基、例えば、正荷電側鎖を含むアミノ酸残基を含む膜貫通ドメイン、例えば、SLAMF膜貫通ドメインおよびSLAMF細胞質ドメインを含む、精製されているかまたは天然に存在しないSLAMF-CAR、例えば、阻害性SLAMF-CARに関する。ある態様において、該SLAMF-CARは、SLAMF、CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAMEまたはCD2F-10細胞質ドメインを含む。ある態様において、該SLAMF-CARは、さらに、該膜貫通ドメインと該細胞外抗原結合ドメインの間に配置されたヒンジドメインを含む。

20

【0098】

他の面において、本発明は、ここに記載するSLAMF-CARをコードする配列を含む、核酸、例えば、精製されたまたは天然に存在しない、核酸、例えば、DNAまたはRNAを含む核酸、配列、例えば、mRNAに関する。

【0099】

他の面において、本発明は、ここに記載するSLAMF-CARを含む、細胞毒性細胞、例えば、天然に存在するもしくは存在しないT細胞、NK細胞または細胞毒性T細胞またはNK細胞株に関する。

30

【0100】

他の面において、本発明は、細胞毒性細胞に、ここに記載するSLAMF-CARをコードする配列を含む核酸を導入することを含む、ここに記載するSLAMF-CARを含む細胞毒性細胞を製造する方法に関する。ある態様において、方法は、ここに記載するSLAMF-CARを細胞毒性細胞に形成することを含む。

【0101】

他の面において、本発明は、哺乳動物に、有効量のここに記載するSLAMF-CARを含む細胞を投与することを含む、対象を処置する方法、例えば、哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する方法に関する。

40

【0102】

他の面において、本発明は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよびCD16またはCD64細胞質ドメインを含む、精製されているかまたは天然に存在しないFcR-CAR、例えば、CD16-CAR、例えば、活性化CD16-CARまたはCD64-CAR、例えば、活性化CD64-CARに関する。ある態様において、該FcR-CARはCD16-CARである。ある態様において、該FcR-CARはCD64-CARである。ある態様において、該FcR-CARは、アダプター分子または細胞内シグナル伝達分子、例えば、FcRγまたはCD3ζドメインと、例えば、膜貫通ドメイン、例えば、正荷電基、例えば、正荷電基、例えば、正荷電側鎖を含むアミノ酸残基を含む膜貫

50

通ドメインまたは例えば、CD16またはCD64膜貫通ドメインを介して相互作用できる。ある態様において、該FcR-CARは、さらに、該膜貫通ドメインと該細胞外抗原結合ドメインの間に配置されたヒンジドメインを含む。

【0103】

他の面において、本発明は、ここに記載するFcR-CARをコードする配列を含む、精製されたまたは天然に存在しない、核酸、例えば、DNAまたはRNAを含む核酸、配列、例えば、mRNAに関する。ある態様において、核酸は、さらに、細胞質活性化ドメイン、例えば、FcRγまたはCD3ζ細胞質ドメインを含むアダプター分子または細胞内シグナル伝達分子を含む。ある態様において、該FcR-CARおよび該細胞質活性化ドメインは、別の核酸分子、例えば、別のベクター、例えば、別のウイルスベクター、例えば、別のレンチウイルスベクターに配置される。

10

【0104】

他の面において、本発明は、ここに記載するFcR-CARを含む、細胞毒性細胞、例えば、天然に存在するもしくは存在しないT細胞、NK細胞または細胞毒性T細胞またはNK細胞株に関する。ある態様において、細胞毒性細胞は、さらに、細胞質活性化ドメイン、例えば、FcRγまたはCD3ζ細胞質ドメインを含む。

【0105】

他の面において、本発明は、細胞毒性細胞に、ここに記載するFcR-CARをコードする配列を含む核酸を導入することを含む、ここに記載するFcR-CARを含む細胞を製造する方法に関する。ある態様において、方法は、ここに記載するFcR-CARを細胞毒性細胞に形成することを含む。

20

【0106】

他の面において、本発明は、哺乳動物に、有効量のここに記載するFcR-CARを含む細胞を投与することを含む、対象を処置する方法、例えば、哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する方法に関する。

【0107】

他の面において、本発明は、精製されたまたは天然に存在しない細胞外抗原結合ドメインおよび膜貫通ドメイン、例えば、Ly49膜貫通ドメインまたは細胞質ドメイン、例えば、ITIM含有細胞質ドメイン、例えば、Ly49細胞質ドメインを含むLy49-CARに関する。ある態様において、Ly49-CARは、膜貫通ドメインおよびLy49細胞質ドメインを含む。ある態様において、該Ly49-CARは、活性化Ly49-CAR、例えば、Ly49DまたはLy49Hである。ある態様において、該Ly49-CARは、正荷電膜貫通ドメイン、例えば、正荷電Ly49膜貫通ドメインを含む。ある態様において、該Ly49-CARは、ITAM含有細胞質ドメイン、例えば、DAP12と相互作用できる。ある態様において、該Ly49-CARは、Ly49膜貫通ドメインを含む。ある態様において、該KIR-CARは、阻害性Ly49-CAR、例えば、Ly49AまたはLy49Cである。ある態様において、該Ly49-CARは、ITIM含有細胞質ドメイン、例えば、Ly49細胞質ドメインを含む。ある態様において、該Ly49-CARは、独立的にLy49A-Ly49Wから選択される、Ly49膜貫通ドメインまたはLy49細胞質ドメインを含む。ある態様において、該Ly49-CARは、さらに、該膜貫通ドメインと該細胞外抗原結合ドメインの間に配置されたヒンジドメインを含む。

30

40

【0108】

他の面において、本発明は、ここに記載するLy49-CARをコードする配列を含む、核酸、例えば、精製されたまたは天然に存在しない、核酸、例えば、DNAまたはRNAを含む核酸、配列、例えば、mRNAに関する。ある態様において、核酸は、さらに、細胞質活性化ドメイン、例えば、DAP12細胞質ドメインを含む。ある態様において、該Ly49-CARおよび該細胞質活性化ドメインは、別の核酸分子、例えば、別のベクター、例えば、別のウイルスベクター、例えば、別のレンチウイルスベクターに配置される。

50

【0109】

他の面において、本発明は、ここに記載するL y 4 9－C A Rを含む、細胞毒性細胞、例えば、天然に存在するもしくは存在しないT細胞、NK細胞または細胞毒性T細胞またはNK細胞株に関する。ある態様において、細胞毒性細胞は、さらに、細胞質活性化ドメイン、例えば、D A P 1 2細胞質ドメインを含む。

【0110】

他の面において、本発明は、細胞毒性細胞に、ここに記載するL y 4 9－C A Rをコードする配列を含む核酸を導入することを含む、ここに記載するL y 4 9－C A Rを含む細胞毒性細胞を製造する方法に関する。

【0111】

他の面において、本発明は、ここに記載するL y 4 9－C A Rを細胞毒性細胞に形成することを含む、ここに記載するL y 4 9－C A Rを含む細胞を製造する方法に関する。

【0112】

他の面において、本発明は、哺乳動物に有効量のここに記載する細胞、例えば、ここに記載するL y 4 9－C A Rを含む細胞を投与することを含む、対象を処置する方法、例えば、哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する方法に関する。

【0113】

他の面において、本発明は、抗原結合ドメインを含む第一の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体および抗原結合ドメインを含む第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体を含む、細胞、例えば細胞毒性細胞に関し、ここで、(i)該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインは軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含まないか、(ii)該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はs c F v以外であるか、(iii)細胞表面に提示されるとき、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合するか、(iv)細胞表面に提示されるとき、該第一の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の抗原結合ドメインのその同族抗原への結合が該第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の存在により実質的に低減されないか、(v)該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含む、(vi)該第一および該第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含むか、(vii)該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はナノボディを含むか、そして(viii)該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はラクダ科V H Hドメインを含む。ある態様において、該細胞はT細胞である。ある態様において、該細胞はNK細胞である。ある態様において、該細胞は、NK細胞株由来、例えば、NK 9 2である。ある態様において、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方はT C A Rである。ある態様において、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の両者はT C A Rである。ある態様において、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方はN K R－C A R、例えば、K I R－C A Rである。ある態様において、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の両者はN K R－C A R、例えば、K I R－C A Rである。ある態様において、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインは軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含まない。ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるときより

10

20

30

40

50

少なく互いに結合する。ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の抗原結合ドメインのその同族抗原への結合が該第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の存在により実質的に低減されない。ある態様において、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインは、単一VHドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一VHドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一VHドメインまたは非抗体スキフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含む。ある態様において、該第一該第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方は単一VHドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一VHドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一VHドメインまたは非抗体スキフォールド、例えば、フィブロネクチン、例えば、フィブロネクチンIII型抗体様分子を含む。ある態様において、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はナノボディを含む。ある態様において、該第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体の一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はラクダ科VHHドメインを含む。ある態様において、本発明は、ここに記載する抗原結合ドメインを含む第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体をコードする配列を含む、核酸、例えば、精製されたまたは天然に存在しない、核酸を含む。ある態様において、本発明は、細胞にここに記載する核酸を導入することを含む、ここに記載する細胞を製造する方法を含む。ある態様において、本発明は、ここに記載する第一および第二の天然に存在しないキメラ膜包埋受容体を細胞毒性細胞に形成することを含む、ここに記載する細胞を製造する方法を含む。ある態様において、本発明は、哺乳動物に、有効量のここに記載する細胞を投与することを含む、対象を処置する方法、例えば、哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する方法に関する。

【0114】

他の面において、本発明は、ここに記載する細胞または核酸を含む、キットに関する。

【0115】

他の面において、本発明は、K I R - C A R (キラー細胞免疫グロブリン受容体様キメラ抗原受容体)をコードする単離核酸配列に関し、ここで、単離核酸配列は、抗原結合ドメインおよびK I Rの核酸配列またはそのフラグメントを含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、マウス抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体およびそのフラグメントからなる群から選択される。ある態様において、フラグメントはF a bまたはs c F vである。ある態様において、抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインである。ある態様において、K I Rは、活性化K I R、阻害性K I Rおよびこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある態様において、少なくとも1ヒンジ領域が活性化K I Rから除去されている。

【0116】

他の面において、本発明は、抗原結合ドメインおよびK I Rまたはそのフラグメントを含む、単離K I R - C A R (キラー細胞免疫グロブリン様受容体キメラ抗原受容体)に関する。ある態様において、抗原結合ドメインは、マウス抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体およびそのフラグメントからなる群から選択される。ある態様において、フラグメントはF a bまたはs c F vである。ある態様において、抗原結合ドメインは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインである。ある態様において、K I Rは、活性化K I R、阻害性K I Rおよびこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある態様において、少なくとも1ヒンジ領域が活性化K I Rから除去されている。

【0117】

他の面において、本発明は、少なくとも2 K I R - C A Rを含む組成物に関し、ここで、第一K I R - C A Rは抗原結合ドメインおよび活性化K I Rまたはそのフラグメントを含み、第二K I R - C A Rは抗原結合ドメインおよび阻害性K I Rまたはそのフラグメントを含む。ある態様において、第一K I R - C A Rにおける抗原結合ドメインは、腫瘍に提示される抗原に特異的であり、例えば、ここに、例えば、表4に記載する抗原結合ドメ

インであり、第二K I R－C A Rにおける抗原結合ドメインは、正常細胞に提示される抗原に特異的である。

【0118】

他の面において、本発明は、少なくとも2 K I R－C A Rを含む遺伝子修飾したT細胞に関し、ここで、第一K I R－C A Rは抗原結合ドメインおよび活性化K I Rまたはそのフラグメントを含み、第二K I R－C A Rは抗原結合ドメインおよび阻害性K I Rまたはそのフラグメントを含む。ある態様において、第一K I R－C A Rにおける抗原結合ドメインは、腫瘍に提示される抗原に特異的であり、例えば、ここに、例えば、表4に記載する抗原結合ドメインであり、第二K I R－C A Rにおける抗原結合ドメインは、正常細胞に提示される抗原に特異的である。ある態様において、細胞はT細胞である。

10

【0119】

他の面において、本発明は、哺乳動物に有効量の少なくとも2 K I R－C A Rを含む細胞を投与することを含む、哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する方法に関し、ここで、第一K I R－C A Rは抗原結合ドメインおよび活性化K I Rまたはそのフラグメントを含み、第二K I R－C A Rは抗原結合ドメインおよび阻害性K I Rまたはそのフラグメントを含む。ある態様において、第一K I R－C A Rにおける抗原結合ドメインは、腫瘍に提示される抗原に特異的であり、例えば、ここに、例えば、表4に記載する抗原結合ドメインであり、第二K I R－C A Rにおける抗原結合ドメインは、正常細胞に提示される抗原に特異的であり、それにより、細胞の標的外活性を制御する。ある態様において、細胞はT細胞である。

20

【0120】

他の面において、本発明は、哺乳動物に有効量の少なくとも2 K I R－C A Rを含む細胞を投与することを含む、腫瘍抗原、例えば、ここに記載する腫瘍抗原の発現と関係する疾患(例えば、増殖性疾患、前癌状態および腫瘍抗原の発現と関係する非癌徴候)を有する対象を処置する方法に関し、ここで、第一K I R－C A Rは抗原結合ドメインおよび活性化K I Rまたはそのフラグメントを含み、第二K I R－C A Rは抗原結合ドメインおよび阻害性K I Rまたはそのフラグメントを含む。ある態様において、第一K I R－C A Rは、ここに、例えば、表4に、記載する抗原結合ドメインを含む。

【0121】

ある態様において、腫瘍抗原の発現と関係する疾患は癌、例えば、ここに記載する癌である。ある態様において、癌は、固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍、例えば、中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)、肺癌(例えば、非小細胞性肺癌、小細胞肺癌、扁平上皮細胞肺癌または大細胞肺癌)、膵臓癌(例えば、膵管腺癌)、卵巣癌、結腸直腸癌および膀胱癌またはこれらの任意の組み合わせである。ある態様において、疾患は、例えば、少なくとも一つの前の標準治療で進行している対象における、膵臓癌、例えば、転移膵管腺癌(P D A)である。ある態様において、疾患は、例えば、少なくとも一つの前の標準治療で進行している対象における、中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)である。ある態様において、疾患は、少なくとも一つの前の標準治療のレジメン後進行している対象における、卵巣癌、例えば、漿液性上皮性卵巣癌である。

30

【0122】

特記しない限り、ここで使用する全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者により共通して理解される意味を有する。本発明の実施または試験にここに記載するものに類似するまたは同等な方法および材料を使用できるが、適当な方法および材料を下に記載する。ここに記載するすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体を引用により本明細書に包含させる。加えて材料、方法および実施例は専ら例示を意図するものであり、限定の意図はない。タイトル、サブタイトルまたは番号または文字表記、例えば、(a)、(b)、(i)などは、読みやすくするためのものである。本明細書におけるタイトルまたは番号または文字表記の使用は、当該工程または要素がアルファベット順で実施すべきであることまたは工程もしくは要素が必ず互いに分離していることを必要とするものではない。本発明の他の特性、目的および利点は、明細書お

40

50

よび図面ならびに特許請求の範囲から明らかである。

【0123】

本発明の他の特性、目的および利益は、明細書および図面ならびに特許請求の範囲から明らかである。

【0124】

図面の簡単な説明

好ましい本発明の態様の次の詳細な記載は、添付する図面と組み合わせてみたとき、よりよく理解される。本発明の説明の目的で、現時点で好ましい態様を図に示す。しかしながら、本発明は図面に示す厳密な配置および装置に限定されないことは理解されるべきである。

10

【図面の簡単な説明】

【0125】

【図1】図1Aおよび1Bを含む図1は、天然に存在する阻害性および活性化KIR(図1A)およびscFvベースの活性化KIR-CAR(図1B)の構造を示す、一連の概略図である。

【0126】

【図2】図2は、DAP12シグナル伝達分子と組み合わせて活性化KIRベースのCARの送達に使用するレンチウイルスベクターの概略図である。

【0127】

【図3】図3は、メソテリン特異的actKIR-CARが初代ヒトT細胞の表面に効率的に発現され得ることを示す図である。ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28マイクロビーズで刺激し、記載するCARを形質導入するかまたは偽遺伝子導入し、エクスピボで拡張させた。発現は、ビオチニル化ヤギ抗マウスF(ab)2特異的ポリクローナルIgG(Jackson Immunologics)と続くストレプトアビジン-PEでの染色を使用して検出した。

20

【0128】

【図4】図4は、SS1 actKIR-CARを発現するT細胞が、メソテリンリガンドを発現するように操作した標的K562細胞(KT-meso)に細胞毒性活性を示すことを示す。ヒトT細胞を抗CD3/抗CD28マイクロビーズで刺激し、記載するCARを形質導入するかまたは偽遺伝子導入し、エクスピボで拡張させた。10⁵のメソテリンを発現するCFSE標識K562細胞(KT-meso)または野生型対照K562を、種々の比のCAR発現T細胞と、16時間、37℃、5%CO₂でインキュベートした。K562標的細胞を、次いで、countbrightビーズおよび生存能染色(7AAD)を使用して、フローサイトメトリーにより数えた。溶解したK562細胞のパーセンテージ(溶解パーセント)を、エフェクターT細胞を含まない一夜培養後に残っている生存可能K562数からエフェクターT細胞とのインキュベーション後に残っている生存可能標的細胞数を減じ、次いでエフェクターT細胞を含まない一夜培養後に残っている生存可能K562数で除することにより計算した。

30

【0129】

【図5】図5Aおよび5Bを含む図5は、KIR2DS2ヒンジが除かれた活性化KIR-CAR(KIR2S-CAR)を示す一連の概略図である。図5Aに示すTCR活性化の動態隔離モデルに基づき、メソテリン特異的SS1 KIR-CARは、適切な隔離を可能にするには長すぎるヒンジを有することと考えられる。それゆえに、メソテリン特異的KIR-CARヒンジを短くすることは、機能を改善すると考えられる。図5Bは、ヒンジとしてのKIR2DS2からの2Ig様ドメインを伴わず、SS1 scFvがKIR膜貫通ドメインに融合したことを示す模式図である。

40

【0130】

【図6】図6Aおよび6Bを含む図6は、完全長野生型KIR2DS2へのSS1 scFvの融合により形成したCARと比較して、SS1 scFvベースのKIR2S-CARがメソテリン発現標的細胞に増強された細胞溶解性活性を示す、一連の画像である。初代ヒトT細胞を、CD3/28マイクロビーズで刺激し、続いてSS1-KIR2DS

50

2 活性化K I R－C A R、S S 1－K I R S 2 活性化K I R－C A R、S S 1ゼータC A Rのいずれかでレンチウイルス形質導入した。偽非形質導入T細胞(N T D)を対照として使用した。T細胞を、対数増殖期の最後まで拡張させた。S S 1特異的C A Rの表面発現を、図6 Aに示すように、ビオチニル化ヤギ抗マウスF (a b) 2 特異的ポリクローナル抗体を使用するフローサイトメトリーと、続くストレプトアビジン－P E検出により決定した。図6 Bに示すのは、メソテリン存在下または非存在下かつC F S Eで染色したK 5 6 2 標的細胞を、示すように図6 Aで特徴付けしたエフェクターT細胞と、1 0：1～1：1の範囲の種々のエフェクターT細胞対標的比を使用して、混合した。標的K 5 6 2 細胞溶解を、図4について記載するように、生存可能C F S E＋細胞の％を決定するために、フローサイトメトリーを使用して評価した。示すデータは、エフェクター細胞非存在下の標的細胞と比較した、標的細胞溶解％計算値である。

10

【0 1 3 1】

【図7】図7 Aおよび7 Bを含む図7は、C D 1 9 a c t K I R－C A RとS S 1 i n h K I R－C A Rの共発現を示す一連の画像である。J u r k a t N F A T－G F P レポーター細胞、記載するK I R－C A Rまたは非形質導入(N D T)で形質導入し、記載するように、C D 1 9 およびメソテリン抗原の存在下または非存在下、標的細胞と1：1で混合した。結果は、J u r k a tと標的細胞の混合2 4時間後のG F P発現を示す(図7 A)。図7 Bは、メソテリン－F c 融合タンパク質およびF M C 6 3 抗C D 1 9 s c F v イディオタイプに特異的なモノクローナル抗体での染色により決定して、メソテリンおよびC D 1 9 イディオタイプの表面発現を示す。

20

【0 1 3 2】

【図8】図8 A、8 Bおよび8 Cを含む図8は、メソテリンを標的とする活性化K I RベースのC A RまたはT C RゼータベースのC A Rの両者との野生型P D－1の共発現を示す一連の画像である。初代ヒトT細胞をC D 3／2 8マイクロビーズで刺激し、続いてS S 1－K I R S 2 活性化K I R－C A RまたはS S 1ゼータC A Rでレンチウイルス形質導入した。偽非形質導入細胞(N T D)を陰性対照として使用した。T細胞を9日間拡張させ、表面C A R発現を、メソテリン－F c、続くP Eにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトF c 特異的抗体での染色により決定した(図8 A)。K 5 6 2 細胞株(野生型[w t]、メソテリン発現[m e s o]またはメソテリンおよびP D－L 1 共発現[m e s o－P D L 1])をC A K 1 抗メソテリン特異的モノクローナル抗体で染色して、標的におけるメソテリン発現を確認した(図8 B)。図8 Aに示すように形質導入した初代ヒトT細胞を、B T X E C M 8 3 0 エレクトロポレーター(P D 1＋)または偽遺伝子導入(P D 1－)を使用して1 0 μgの野生型P D 1をコードするインビトロ転写R N Aに電気穿孔した。P D－1の表面発現を、A P Cにコンジュゲートした抗P D 1モノクローナルを使用して発現させた(図8 C)。

30

【0 1 3 3】

【図9】図9は、共発現野生型P D－1と、メソテリンを標的とする活性化K I RベースのC A RおよびT C RゼータベースのC A Rの両者の組み合わせが、メソテリン特異的活性化K I R－C A R細胞毒性のP D－1リガンド1(P D L－1)依存的阻害に至ることを示す図である。初代ヒトT細胞をC D 3／2 8マイクロビーズで刺激し、続いて、S S 1－K I R S 2 活性化K I R－C A R、S S 1ゼータC A Rまたは偽遺伝子導入(N T D)でレンチウイルス形質導入した。T細胞を、9日間拡張させ、続いてB T X E C M 8 3 0 エレクトロポレーター(P D 1＋)または偽遺伝子導入(P D 1－)を使用する1 0 μgの野生型P D 1をコードするインビトロ転写R N Aで 5×10^6 T細胞をエレクトロポレーションした。S S 1特異的C A Rの表面発現およびP D－1を図8に示すように決定した。無メソテリンまたはP D L－1存在下もしくは非存在下でメソテリンを発現するK 5 6 2 標的細胞を、示すように、3 0：1～1：1の種々のエフェクターT細胞対標的比を使用して、示すように異なるT細胞条件で混合した。標的K 5 6 2 細胞溶解を、4時間のインキュベーション後残存する生存可能細胞を定量するためのc a l c e i n A M 色素法を使用して評価した。示すデータは、エフェクター細胞非存在下の標的細胞に対して比較

40

50

した標的細胞溶解%の計算値である。

【0134】

【図10】図10は、共刺激性ドメイン(SS1-z、SS1-28zまたはSS1-BBz)存在下または非存在下、メソテリン特異的活性化KIRベースのCAR(SS1-KIRS2)またはTCRゼータベースのCARを発現するドナーからのT細胞によるインターフェロンガンマ(IFN- γ)およびインターロイキン-2産物を示す画像である。初代ヒトT細胞を刺激し、続いて示す活性化KIR CARまたはTCRゼータベースのCARでレンチウイルス形質導入した。発現後、形質導入T細胞を、2:1比でK562(Kwt)またはK562-メソテリン細胞(Kmeso)と混合した。サイトカイン濃度を、刺激24時間後、複数の非依存的ドナーにおいて示されたサイトカインに対するELISAにより上清において決定した。反復測定ANOVAは、IFN- γ ($p=0.002$)およびIL-2 ($p=0.0156$)の有意なCAR効果を示した。IFN- γ についてSS1-KIRS2/DAP12(SS1KIR)対偽(事後対応のあるt検定、 $p=0.0162$)。IL-2についてSS1-KIR対SS1-28z(事後対応のあるt検定、 $p=0.0408$)。

10

【0135】

【図11】図11は、複合luminesベースの免疫アッセイにより評価した上清におけるサイトカイン濃度のヒートマップである(Cytokine Human 10-Plex Panel, Life Technologies)。各サイトカインに対する最低濃度に対して、ドナーおよび条件を標準化した後の相対的濃度のヒートマップを、R総計ソフトウェアに含まれたヒートマップパッケージを使用して作成した。

20

【0136】

【図12】図12A~12Bを含む図12は、強力な細胞毒性活性を有するメソテリン特異的KIRベースのキメラ抗原受容体(KIR-CAR)操作T細胞の構築を記載する。初代ヒトT細胞をCD3/28マイクロビーズで刺激し、続いてGFPおよびdsRed(対照)またはDAP12およびdsRed(DAP12)を発現するレンチウイルスベクターで形質導入した。細胞を、対数増殖期の最後までエクスピボで拡張させた。各形質導入集団からの 5×10^6 T細胞を、BTX ECM830エレクトロポレーターを使用して10 μ gのSS1-KIRS2をコードするインビトロ転写RNAで電気穿孔した。dsRedおよびSS1-KIRS2の両者の発現を、ビオチニル化ヤギ抗マウスF(ab)2特異的ポリクローナル抗体、続くストレプトアビジン-PEを使用して、検出したSS1-KIRS2を用いるフローサイトメトリーで評価した。図12Aの上部パネルはT細胞発現dsRedの同定のためのゲーティング戦略を示し、これを次いでパネルの株に示すようにSS1-KIRS2発現で分析した。図12Bは、4時間 ^{51}Cr 放出アッセイを使用して評価した、野生型K562細胞(K562-wt)またはメソテリンを発現するK562細胞(K562-メソテリン)に対する細胞毒性に介在する、図12Aで特徴付けた細胞の能力を示す。

30

【0137】

【図13】図13は、内因性TCRの発現がSS1-KIRS2およびDAP12発現に影響されないことを示す。 5×10^6 初代ヒトT細胞を、BTX ECM830エレクトロポレーターを使用して10 μ gのSS1-KIRS2をコードするインビトロ転写RNAまたは偽遺伝子導入で電気穿孔した。一夜インキュベーション後、遺伝子導入T細胞を、ビオチニル化ヤギ抗マウスF(ab)2特異的ポリクローナル抗体、続くストレプトアビジン-PEを使用するSS1-KIRS2の発現について染色した。 $V\beta 13.1$ の発現を、TCRのこの $V\beta$ 鎖に特異的なPEコンジュゲートモノクローナル抗体を使用して評価した。

40

【0138】

【図14】図14は、メソテリン特異的KIRベースのCAR(SS1-KIRS2)がT細胞増殖を刺激する能力は、抗原依存性であるが、さらなるCD28共刺激に非依存的であることを示す。初代ヒトT細胞をCD3/28マイクロビーズで刺激し、続いてSS1

50

ーK I R S 2 およびD A P 1 2 またはメソテリン特異的T C RゼータC A R (S S 1 ゼータ)でレンチウイルス形質導入した。偽非形質導入細胞(N T D)を陰性対照として使用した。無メソテリン(K 5 6 2 w t)またはメソテリンを発現する(K 5 6 2-メソテリン)K 5 6 2 標的細胞を、2 : 1 比のエフェクターT細胞対標的細胞で、示す種々のT細胞条件で混合した。K 5 6 2-メソテリンで刺激したT細胞を、モノクローナル抗C D 2 8 アゴニスト抗体(クローン9.3)無しまたは1 μ g/mL存在下の条件にさらに分けた。生存可能T細胞数を、記載する時点でビーズベースの計数を使用するフローサイトメトリーにより計数し、抗原刺激後倍加する集団数を計算した。

【0139】

【図15】図15A、15B、15C、15Dおよび15Eを含む図15は、メソテリン特異的K I R-C A R 修飾T細胞が、C D 2 8 またはC D 1 3 7 (4-1 B B)共刺激性ドメインを担持する第二世代T C R- ζ ベースのC A Rと比較して、インビボで増強された抗腫瘍活性を示すことを示す。図15Aは、N O D-S C I D- $\gamma_c^{-/-}$ (N S G)マウスに、 2×10^6 メソテリンを発現する中皮腫由来細胞(E M-m e s o細胞)を皮下移植した実験を示す。腫瘍移植20日後、各動物に、抗C D 3 /抗C D 2 8 スティミュレータービーズで刺激し、続いて共刺激性ドメイン(S S 1- ζ 、S S 1-B B ζ およびS S 1-2 8 ζ)存在下または非存在下の一連のC D 3 ζ ベースのC A Rまたはメソテリン特異的K I RベースのC A R、D A P 1 2 を有するS S 1-K I R S 2でレンチウイルス形質導入した、 5×10^6 T細胞を静脈内注射した。偽遺伝子導入T細胞(N T D)を対照として使用した。腫瘍体積を、記載する時間に カリパスで測定した($n=7$ マウス/群)。図15Bは、K I R-C A Rのインビボ活性が、血液、脾臓または腫瘍におけるT細胞生着と非依存的であることを示す。ヒトC D 4 5 + T細胞頻度を、実験終了時フローサイトメトリーにより評価し、データを、血液、脾臓および腫瘍消化における総生存可能細胞パーセンテージとしてあらわす。図15Cは、S S 1-2 8 ζ およびS S 1-K I R S 2 / D A P 1 2 C A R T細胞処置群でC D 3 + T I Lの同等な頻度が観察されることを示す。図15Aに示すのと同じモデルを使用した。30日目(C A R T注入10日後)の腫瘍におけるC D 3 + ヒトリンパ球頻度を、フローサイトメトリーで評価した。図15Dは、D A P 1 2 修飾T細胞が、腫瘍根絶にメソテリン特異的K I RベースのC A Rを必要とすることを示す。図15Aに示すのと同じモデルを使用した。400万T細胞発現D A P 1 2 およびd s R e d (D A P 1 2)、S S 1-2 8 zまたはS S 1-K I R S 2 およびD A P 1 2 (S S 1-K I R S 2)を20日目に静脈内中注射し、腫瘍体積を経時的にカリパス測定により評価した。矢印は、機能的および表現型分析に使用したT I L単離の時間を示す。図15Eは、図15Dに記載するマウスから単離したT I Lの抗原特異的細胞毒性活性を示す。抗原特異的細胞毒性を、ホタルルシフェラーゼ発現E M-m e s o細胞またはE M p細胞(メソテリン発現を欠く親E M細胞)と、記載するE : T比で18時間共培養することにより評価した。

【0140】

【図16】図16Aおよび16Bを含む図16は、C D 1 9 特異性を有するK I RベースのC A Rが、抗原特異的標的細胞毒性を誘発できることを示す。抗C D 3 /抗C D 2 8 ビーズ活性化後、T細胞を、F M C 6 3 由来s c F vが完全長K I R 2 D S 2と融合しているC D 1 9 特異的K I RベースのC A R (C D 1 9-K I R 2 D S 2)またはF M C 6 3 s c F vを、短リンカー[G l y]₄-S e rリンカーを介してK I R 2 D S 2の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインと融合することにより産生したK I RベースのC A R (C D 1 9-K I R S 2)と共に、バイシストロニックレンチウイルスベクター発現D A P 1 2で形質導入した。形質導入T細胞を対数増殖期の最後まで培養し、C D 1 9 特異的K I RベースのC A Rの発現を、ビオチニル化ヤギ抗マウスF (a b) 2 ポリクローナル抗体、続くS A-P Eを使用するフローサイトメトリーにより評価した。C D 1 9 発現をする(K 5 6 2-C D 1 9)またはしない(K 5 6 2-w t) ^{51} C r 標識K 5 6 2 標的細胞を、種々のT細胞対標的細胞(E : T比)比で混合した。細胞毒性を、4時間で上清から放出される ^{51} C r の画分の測定により決定した。偽遺伝子導入(N T D)またはC D 1 9 に特異的

10

20

30

40

50

なCD3 ζ ベースのCARで形質導入した(CD19-z)対照T細胞も、それぞれ、陰性および陽性対照として含ませた。

【0141】

【図17】図17Aおよび17Bを含む図17は、CD19-KIRS2インビボ活性を示す。NOD-SCID- $\gamma_c^{-/-}$ (NSG)マウスに、CD19を発現する白血病細胞株である100万NALm-6 CBG腫瘍細胞を0日目に尾静脈注射により静脈内に移植した。T細胞を抗CD3/抗CD28スティミュレータービーズで刺激し、続いて1日目に共刺激性ドメイン(CD19z、19BBz)存在下または非存在下一連のCD19特異的CD3 ζ ベースのCARまたはCD19特異的KIRベースのCAR、DAP12を有するCD19-KIRS2(19KIRS2)でレンチウイルス形質導入した。偽非形質導入T細胞(NTD)を対照として使用した。T細胞を、対数増殖期の最後までエクスピドで拡張させ、白血病細胞株注射5日後、マウスあたり200万CAR T細胞で静脈内注射した。腫瘍負荷を生物発光造影により評価した。5動物を、各T細胞条件で分析した。図17Aは、個々の動物の5日目(T細胞注射前のベースライン)および白血病細胞移植15日後の個々の生物発光光子束を示す。図17Bは、各処置群の経時的な中央全流束を示す。

10

【0142】

【図18】図18は、メソテリンを有するNKp46ベースのNCR CARが、抗原特異的細胞毒性を特に誘発することを示す。抗CD3/抗CD28ビーズ活性化後、T細胞を、DAP12およびSS1-KIRS2(対照)、またはFc ϵ R γ およびメソテリン特異的NKp46ベースのCAR(SS1-NKp46)またはFc ϵ R γ および天然NKp46細胞外ドメインが切断されているメソテリン特異的NKp46 CAR(SS1-TNKp46)を発現するパイシストロニックレンチウイルスベクターで形質導入した。メソテリン特異的CARの発現を、図18Aに示すように、ビオチニル化ヤギ抗マウスF(ab)₂ポリクローナル抗体、続くSA-PEを使用するフローサイトメトリーにより評価した。T細胞を、種々のエフェクターT細胞対標的K562細胞比(E:T比)でメソテリンを発現する⁵¹Cr標識K562標的細胞と混合した。細胞毒性を、図18Bに示すように、自発的放出と比較した4時間で上清から放出される⁵¹Crの画分の測定により決定した。

20

【0143】

【図19】図19は、図21~23に示す実験で使用する受容体の概略図を示す。

30

【0144】

【図20】図20は、KIR2DL3リガンドHLA-Cwを発現するK562-meso細胞株の産生および特徴づけを示す。K562細胞(K562)またはK562細胞発現メソテリン(K562-meso)をHLA-Cw3アレルで形質導入し、続いて蛍光活性化セルソーティングをして、メソテリンを発現する(K562-meso-HLACw)またはしない(K562-HLACw)K562細胞発現HLA-Cwを得た。HLA-Cw3発現を、HLA-A、BおよびCアレル(クローンW6/32)を認識するAPCコンジュゲートモノクローナル抗体を使用するフローサイトメトリーにより評価した。

【0145】

【図21】図21は、初代ヒトT細胞におけるSS1-KIRS2およびKIR2DL3の共発現を示す。初代ヒトT細胞をCD3/28マイクロビーズで刺激し、続いて野生型KIR2DL3と共にSS1-KIRS2およびDAP12(SS1-KIRS2)または偽遺伝子導入(NTD)でレンチウイルス形質導入した。T細胞を、対数増殖期の最後まで拡張させた。表面メソテリン特異的CARの発現およびKIR2DL3を、メソテリン-Fcで染色し、続いてPEコンジュゲートヤギ抗ヒトFcおよびKIR2DL3外部ドメインに対するモノクローナル抗体により決定した。

40

【0146】

【図22】図22は、KIR CARと共発現させたKIR2DL3が、標的細胞のHLA-Cw存在下、抗原特異的細胞毒性を抑制できることを示す。図21に記載のように産

50

生し、特徴づけしたT細胞を、図22に記載のように産生し、産生した ^{51}Cr 標的標的K562細胞と混合した。細胞毒性を、エフェクター細胞非存在下の標的細胞と比較した、4時間で上清から放出される ^{51}Cr の画分の測定により決定した。

【0147】

【図23】図23は、図24に示す実験に使用する受容体の概略図を示す。

【0148】

【図24】図24は、各受容体各々の結合特異性を維持しながら、T細胞表面上の2scFvベースのキメラ受容体を共発現することができないことを示す。Jurkat T細胞を、SS1-KIR2DL3をコードするレンチウイルスベクターを使用して形質導入した。これらの細胞を、続いて、種々のベクター希釈で、CD19-KIR2DS2をコードする第二レンチウイルスベクターで形質導入した。SS1特異的scFvの発現を、メソテリン-Fc、続くPEコンジュゲートヤギ抗ヒトFcを使用して評価した。CD19特異的scFv発現を、FMC63イディオタイプに特異的なPEコンジュゲートモノクローナル抗体を使用して評価した。

【0149】

【図25】図25は、CD19特異的CARの発現がまたSS1ゼータ-mCherry融合CARを共発現する細胞表面のメソテリン結合部位の発現も減少させることを示す。初代ヒトT細胞をCD3/28マイクロビーズで刺激し、続いてC末端mCherry融合(SS1z-mCh)またはFMC63由来CD19特異的41BBゼータCAR(19bbz)を単独でまたは組み合わせて担持するSS1-scFvゼータCARでレンチウイルス形質導入した。偽遺伝子導入細胞を対照として使用した。T細胞を、対数増殖期の最後まで拡張させた、およびdsRedならびに表面CAR発現を、メソテリン-Fc、続くFITCにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトFc特異的ポリクローナル抗体での染色後、フローサイトメトリーにより決定した。

【0150】

【図26】図26は、SS1-scFvの結合部位の相互排他的発現がFMC63-scFvに独特でないことを示す図である。初代ヒトT細胞をCD3/28マイクロビーズで刺激し、続いてSS1-scFvゼータCARまたは種々のCD19特異的41BBゼータCAR(交互のVHおよびVL配向[H2LおよびL2H]を有する19BBz[FMC63-scFv、214d-scFvまたはBL22-scFv-CAR])でレンチウイルス形質導入した。NTDは、染色対照として使用する偽遺伝子導入細胞をいう。さらに、別のセットのT細胞を、上記のようにSS1-scFvゼータCARおよび異なるCD19特異的CARと共形質導入した。T細胞を対数増殖期の最後まで拡張させ、表面CAR発現を、ビオチニル化タンパク質L(カップ軽鎖認識)、続くストレプトアビジンAPC染色と同時の、メソテリン-Fc、続くPEにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトFc特異的ポリクローナル抗体で決定した。共形質導入細胞は、FMC63ベースのCARで見られる相互排他的発現が他のscFv-CARでも観察される。

【0151】

【図27】図27Aおよび27Bを含む図27は、2scFv分子が細胞表面に発現されたときのscFv結合喪失の推定機構(図27A)およびラクダ科単一VHHドメインベースのCARがscFvベースのCARと組み合わせてT細胞表面に発現されたときのこの相互作用の推定回避を示す。

【0152】

【図28】図28は、ラクダ科単一VHHドメインベースのCARが、明らかな受容体相互作用なしでscFvベースのCARと組み合わせてT細胞表面に発現できることを示す。NFAT依存性プロモーター(NF-GFP)下のJurkat T細胞発現GFPを、メソテリン特異的活性化CAR(SS1-CAR)、CD19特異的活性化(19-CAR)またはEGFRに特異的なラクダ科VHHドメインを使用して産生したCAR(VHH-CAR)で形質導入した。活性化CARで形質導入後、細胞を、CD19(19-PD1)を認識するさらなる阻害性CARで形質導入して、活性化および阻害性CAR(SS1+

10

20

30

40

50

19PD1、19+19PD1またはVHH+19PD1)の両者を共発現する細胞を産生した。形質導入Jurkat T細胞を、1)全標的抗原を欠く(K562)、2)メソテリン(K-meso)、CD19(K-19)またはEGFR(A431)のみを発現する、3)EGFRおよびメソテリン(A431-メソテリン)またはCD19(A431-CD19)の組み合わせを発現するまたは4)CD19およびメソテリンの組み合わせを発現する(K-19/meso)いずれかである種々の細胞株と24時間共培養した。スティミュレーター細胞無し(no stim)または1 μg/mLのOKT3を伴うK562(OKT3)を含むさらなる条件も、それぞれ、NFAT活性化の陰性および陽性対照として包含させた。NFAT活性化のマーカーとしてのGFP発現を、フローサイトメトリーにより評価した。

10

【0153】

【図29】図29は、KIR2DS2配列アノテーションを示す。図29に提供するヌクレオチド配列は、配列番号342と命名する。図29に提供するアミノ酸配列は、配列番号343と命名する。

【0154】

【図30】図30は、KIR2DL3配列アノテーションを示す。図30に提供するヌクレオチド配列は配列番号344と命名する。図30に提供するアミノ酸配列は配列番号345と命名する。

【0155】

【図31】図31は、NKp46配列アノテーションを示す。図31に提供するヌクレオチド配列は配列番号346と命名する。図31に提供するアミノ酸配列は番号347と命名する。

20

【0156】

【図32】図32は、SS1-KIRS2配列アノテーションを示す。図32に提供するヌクレオチド配列は配列番号348と命名する。図32に提供するアミノ酸配列は番号349と命名する。

【0157】

【図33】図33は、SS1-KIR2DS2配列アノテーションを示す。図33に提供するヌクレオチド配列は配列番号350と命名する。図33に提供するアミノ酸配列は番号351と命名する。

30

【0158】

【図34】図34は、SS1-tNKp46配列アノテーションを示す。図34に提供するアミノ酸配列は番号352と命名する。図34に提供するアミノ酸配列は番号353と命名する。

【0159】

【図35】図35は、SS1-KIRL3配列アノテーションを示す。図35に提供するヌクレオチド配列は配列番号354と命名する。図35に提供するアミノ酸配列は番号355と命名する。

【0160】

【図36】図36は、メソテリン特異的CD3ζおよびKIRベースのCARが、メソテリンを発現する中皮腫由来細胞(EM-meso細胞)に対する類似する抗原特異的インビトロ細胞毒性を有することを示す。初代ヒトT細胞を抗CD3/CD28スティミュレータービーズで刺激し、SS1-KIRS2メソテリン特異的CARを発現するレンチウイルスベクターで形質導入した。発現後、T細胞を、記載するエフェクター対標的(E:T)比で⁵1Cr標識K562細胞発現EM-mesoと混合した。％溶解を決定した。

40

【0161】

【図37】図37は、28ζ CART処置マウスからのTILが、メソテリンを発現する中皮腫由来細胞(EM-meso細胞)の刺激でIFNγ分泌を喪失することを示す。NOD-SCID-γc^{-/-}(NSG)マウスに、2×10⁶のEM-meso細胞を皮下注射した。5×10⁶の記載するCARを形質導入した初代ヒトT細胞を、16日にI

50

V注射した。CAR T細胞注入18日後、TILをCD45磁気ビーズで単離し、記載するエフェクター対標的(E:T)比でEM-mesoと混合した。サイトカイン濃度を、ELISAにより上清で決定した。

【0162】

【図38】図38は、SS1-KIRS2/DAP12 T細胞がインビボで強固な抗腫瘍活性を伸介することを示す。NOD-SCID- γ c $^{-/-}$ (NSG)マウスに、 2×10^6 のメソテリンを発現する中皮腫由来細胞(EM-meso細胞)を皮下注射した。 5×10^6 の記載するCARを形質導入した初代ヒトT細胞を20日にIV注射した。腫瘍体積を、記載する時間にカリパスにより測定した。

【0163】

【図39】図39A、39Bおよび39Cを含む図39は、メソテリン特異的CARの構造を示す模式図である。図39Aは、メソテリン特異的多鎖KIR-CARである。図39Bは、DAP12を含むメソテリン特異的単鎖KIR-CARである。図39Cは、CD28およびCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むメソテリン特異的CARである。

【0164】

【図40】図40は、多鎖KIRS/DAP12および単鎖DAP12構築物を含む、メソテリンベースのCAR構築物のインビボ抗腫瘍活性を含む。

【0165】

【図41】図41は、フローサイトメトリー分析で検出した、ヒト初代T細胞のメソテリンベースのKIR-CARの表面発現を示す。

【0166】

【図42】図42Aおよび42Bを含む図42は、メソテリンを発現しない標的細胞(K562)(図42A)またはメソテリンを発現するように操作した標的細胞(K562-meso)(図42B)に対するメソテリンベースのKIR-CARの抗原特異的細胞毒性活性を示す。

【0167】

【図43】図43Aおよび43Bを含む図43は、メソテリン発現標的細胞(K562-meso、黒色棒)またはメソテリンを発現しない対照標的細胞(K562、白抜き棒)存在下培養したときのメソテリンベースのKIR-CARのサイトカイン産生を示す。図43AはIFN γ 産生を示す；図43BはIL-2サイトカイン産生を示す。

【0168】

【図44】図44A、44B、44C、44Dおよび44Eを含む図44は、単一ベクターにおける種々の配置、例えば、U6制御shRNAがEF1アルファ制御CARコード化要素の上流または下流にある場合を示す。図44Aおよび44Bに記載する構築物例において、転写は、同じ方向のU6およびEF1アルファプロモーターにより生じる。図44Cおよび44Dにおける構築物例において、転写は、異なる方向のU6およびEF1アルファプロモーターにより生じる。図44Eにおいて、shRNA(および対応するU6プロモーター)は第一ベクターにあり、CAR(および対応するEF1アルファプロモーター)は第二ベクターにある。

【0169】

【図45】図45は、例示的2RCAR配置の構造を記載する。抗原結合メンバーは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよびスイッチドメインを含む。細胞内結合メンバーはスイッチドメイン、共刺激性シグナル伝達ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む。2配置は、ここに記載する第一および第二のスイッチドメインが、抗原結合メンバーおよび細胞内結合メンバーに対して異なる配向であり得ることを示す。他のRCAR配置を、さらにここに記載する。

【0170】

【図46】図46は、CAR発現、形質導入T細胞の増殖が、細胞培養系における低用量のRADO01の存在により刺激されることを示す。CARTを、種々の濃度のRADO01存在下、NALM-6細胞と共培養した。CAR陽性CD3陽性T細胞数(黒色)およ

10

20

30

40

50

び総T細胞数(灰色)を、共培養4日後に評価した

【0171】

【図47】図47は、RAD001の0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kgおよび10mg/kg(mpk)での連日投薬または媒体投薬でのNALM6-luc細胞の腫瘍増殖測定を示す。丸は媒体を示す；四角は10mg/kg用量のRAD001を示す；三角は3mg/kg用量のRAD001を示し、逆三角は1mg/kg用量のRAD001を示し；菱形は0.3mg/kg用量のRAD001を示す。

【0172】

【図48】図48Aおよび48Bを含む図48は、NALM6腫瘍を有するNSGマウスの血中のRAD001の量を示す薬物動態曲線を示す。図48Aは、第一用量のRAD001後0日目PKを示す。図48Bは、最終RAD001投与後14日目PKを示す。菱形は10mg/kg用量のRAD001を示す；四角は1mg/kg用量のRAD001を示す；三角は3mg/kg用量のRAD001を示す；xは10mg/kg用量のRAD001を示す。

10

【0173】

【図49】図49Aおよび49Bを示す図49は、RAD001投薬存在下および非存在下のヒト化CD19 CAR T細胞のインビボ増殖を示す。低用量のRAD001(0.003mg/kg)連日が、正常レベルのhuCAR19増殖を超える、CAR T細胞増殖の増強に至ることを示す。図49Aは、CD4⁺ CAR T細胞を示す；図49BはCD8⁺ CAR T細胞を示す。丸はPBSを示す；四角はhuCTL019を示す；三角はhuCTL019と3mg/kg RAD001を示す；逆三角はhuCTL019と0.3mg/kg RAD001を示す；菱形はhuCTL019と0.003mg/kg RAD001を示す；丸はhuCTL019と0.003mg/kg RAD001を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0174】

詳細な記載

ある面において、本発明は、T細胞または他の細胞毒性細胞、例えば、NK細胞の特異性および活性を制御するための組成物および方法を提供する。ある態様において、NK細胞受容体(NKR)、例えば、KIR-CAR、NCR-CAR、SLAMF-CAR、FcR-CARまたはLy49-CARに基づくキメラ抗原受容体(CAR)、例えば、NK細胞受容体CAR(NKR-CAR)が提供される。ある態様において、本発明は、あるタイプのキメラ抗原受容体(CAR)を提供し、ここで、CARはNKR、例えば、“KIR-CAR”と呼ばれ、これはナチュラルキラー(NK)細胞に見られる受容体の成分を含むCAR設計である。ある態様において、NK受容体は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)を含むが、これらに限定されない。KIRは、活性化KIRまたは阻害性KIRとして機能できる。

30

【0175】

本発明のNKR-CAR、例えば、KIR-CARの一つの利点は、NKR-CAR、例えば、KIR-CARが、操作T細胞の標的外活性を制御するために、細胞毒性細胞、例えば、T細胞、特異性を制御する方法を提供することである。ある例において、本発明のKIR-CARは、増殖するのに共刺激を必要としない。

40

【0176】

NKR-CARは、アダプタータンパク質、例えば、ITAM含有アダプタータンパク質によりシグナルを送達する。ある態様において、本発明のKIR-CARは活性化KIRを含み、これは、そのシグナルを、免疫チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)含有膜タンパク質、DAP12との相互作用により送達し、これは、これらのタンパク質の膜貫通ドメインの残基が介在する。

【0177】

ある態様において、NKR-CARは、阻害性モチーフにより阻害性シグナルを送達できる。ある態様において、本発明のKIR-CARは、免疫チロシンベースの阻害性モチーフ(ITIM)との相互作用によりそのシグナルを送達する阻害性KIRを含む。ITI

50

Mを含む細胞質ドメインを担持するK I Rは、NK細胞溶解性およびサイトカイン産生活性の阻害に至る活性化シグナルを無効にする。しかしながら、本発明は阻害性K I Rに限定されるべきではない。むしろ、阻害性シグナルと関係する細胞質ドメインを有するあらゆる阻害性タンパク質を、本発明のC A Rの構築に使用できる。

【0178】

したがって、本発明は、N K R-C A R、例えば、K I R-C A Rを含む組成物、それを含むベクター、ウイルス粒子に包装されたN K R-C A R、例えば、K I R-C A Rベクターを含む組成物およびN K R-C A R、例えば、K I R-C A Rを含む組み換えT細胞または他の細胞毒性細胞を提供する。本発明はまたN K R-C A R、例えば、K I R-C A R (K I R-C A R T)を発現する遺伝子修飾したT細胞または他の細胞毒性細胞、例えば、NK細胞、または培養NK細胞、例えば、NK92細胞を製造する方法も含み、ここで、発現されるN K R-C A R、例えば、K I R-C A Rは、N K R、例えば、K I Rからの細胞内シグナル伝達分子を有する特異的抗体の抗原認識ドメインを含む。例えば、ある態様において、細胞内シグナル伝達分子は、K I R I T A M、K I R I T I Mなどを含むが、これらに限定されない。

10

【0179】

したがって、本発明は、N K R-C A R、例えば、K I R-C A Rを発現するように修飾されたT細胞または他の細胞毒性細胞の特異性および活性を制御する組成物および方法を提供する。本発明はまた、複数のタイプのN K R-C A R、例えば、K I R-C A R (例えば活性化N K R-C A R、例えば、K I R-C A Rおよび阻害性N K R-C A R、例えば、K I R-C A R)を含む細胞も提供し、ここで、複数のタイプのN K R-C A R、例えば、K I R-C A Rは、シグナル伝達に参加してT細胞活性化を制御する。この面において、腫瘍細胞を殺すが、正常バイズタンダー細胞に影響しないように、N K R-C A R細胞毒性細胞、例えば、K I R-C A R T細胞を効率的に調節かつ制御することが有利である。それゆえに、ある態様において、本発明はまた、正常非癌性細胞の枯渇を最小化しながら癌性細胞を殺し、それにより、N K R-C A R、例えば、K I R-C A R治療の特異性を改善する方法を提供する。

20

【0180】

ある態様において、N K R-C A R、例えば、K I R-C A Rアプローチは、細胞に発現される複数のタイプのC A Rの物理的分離を含み、ここで、複数のタイプのN K R-C A R、例えば、K I R-C A Rのその標的抗原への結合は、N K R-C A R細胞毒性細胞、例えば、K I R-C A R T細胞、活性化に必要である。例えばK I R-C A Rアプローチにおいて、複数のタイプのK I R-C A Rからの各K I R-C A Rは、異なる細胞内シグナル伝達ドメインを有する。例えば、複数のタイプのK I R-C A RをK I R-C A R T細胞活性化の誘発に使用するとき、第一タイプのK I R-C A Rは、活性化K I Rからの細胞内ドメインのみを含んでよく、第二タイプのC A Rは、阻害性K I Rからの細胞内ドメインのみを含んでよい。この方法で、T細胞の条件的活性化が、活性化K I R-C A R (a c t K I R-C A R)の、目的の悪性細胞上の抗原への結合により産生される。悪性細胞ではなく、正常細胞に存在する抗原を指向する抗原結合ドメインを担持する阻害性K I R-C A R (i n h K I R-C A R)は、T細胞が正常細胞と遭遇したとき、a c t K I R-C A Rからの活性化効果の減衰を提供する。

30

40

【0181】

ある態様において、本発明は、少なくとも2 N K R-C A R、例えば、少なくとも2 K I R-C A Rを発現するように操作したT細胞または他の細胞毒性細胞を提供し、ここで、第一N K R-C A R、例えば、K I R-C A Rはa c t N K R-C A R、例えば、a c t K I R-C A Rであり、第二N K R-C A R、例えば、K I R-C A Rはi n h N K R-C A R、例えば、i n h K I R-C A Rである。ある態様において、本発明はi n h N K R-C A R、例えば、i n h K I R-C A Rを提供し、ここで、i n h N K R-C A R、例えば、i n h K I R-C A Rの正常細胞への結合は、細胞毒性細胞の阻害、例えば、K I R-C A R T細胞活性の阻害をもたらす。ある態様において、i n h N K R-C A

50

R、例えば、i n h K I R－C A Rの非癌性細胞と関係する抗原への結合は、N K R－C A R細胞毒性細胞、例えば、K I R－C A R T細胞の死をもたらす。

【0182】

ある態様において、本発明のi n h N K R－C A R、例えば、a c t K I R－C A Rを、C A Rの活性を制御するために、既存のC A Rと組み合わせて使用できる。C A Rの例は、全体を引用により本明細書に包含させるP C T／U S 1 1／6 4 1 9 1号に記載されている。

【0183】

抗原結合ドメイン(C M E R)を含む複数のキメラ膜包埋受容体を有する細胞において、C M E Rの抗原結合ドメイン間の相互作用が、例えば、相互作用が、抗原結合ドメインの1以上の、その同族抗原へ結合する能力を阻害するかまたは未知同族抗原との新規結合部位を作る可能性のため、望ましくない可能性があることも判明した。したがって、ここに開示されるのは、第一および第二の天然に存在しないC M E Rを有する細胞であって、ここで、抗原結合ドメインは、このような相互作用が最小である。またここに開示されるのは、第一および第二の天然に存在しないこのようなC M E Rをコードする核酸、ならびにこのような細胞および核酸を製造および使用方法である。ある態様において、該第一および該第二の天然に存在しないC M E Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方は、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメイン、またはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキファールドを含む。

【0184】

定義

特記しない限り、ここで使用する全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者により共通して理解される意味を有する。ここに開示するものに類似するまたは等価なあらゆる方法および材料を本発明の実施および／または試験に使用できるが、好ましい材料および方法は、ここに記載される。本発明の記載および請求に際し、次の用語を、定義が提供されるならば、それがどのようにそれが定義されているかにしたがって、使用する。

【0185】

ここで使用する用語は、特定の態様を記載するための目的であり、限定を意図しないことも理解されるべきである。

【0186】

単数表現は、ここでは、文法上の目的が1個以上(すなわち、少なくとも1)をいうために使用する。例として、“要素”は、1個の要素または1を超える要素を意味する。

【0187】

ここで使用する“約”は、量、期間などのような測定可能な値をいうとき、特定した値からの±20%または±10%、ある場合±5%、ある場合±1%、ある場合±0.1%のばらつきを、このようなばらつきが開示された方法の実施において妥当であるとして、包含することを意味する。

【0188】

ここで使用する用語“アダプター分子”は、2以上の分子の相互作用を可能にする配列を有するポリペプチドをいい、ある態様において、細胞毒性細胞の活性化または不活性化を促進する。例えば、D A P 1 2の場合、これは、膜貫通ドメイン内の荷電相互作用による活性化K I Rとの相互作用および細胞質ドメイン内のリン酸化I T A M配列によるZ A P 7 0またはS y kのようなシグナル伝達分子との相互作用を含む。

【0189】

用語“抗原”または“A g”は、免疫応答を惹起する分子をいう。この免疫応答は、抗体産生または特異的免疫適格細胞の活性化または両者が関与し得る。当業者は、実質的に全タンパク質またはペプチドを含むあらゆる巨大分子が抗原として働き得ることを理解する。さらに、抗原は組み換えまたはゲノムD N Aに由来し得る。当業者は、免疫応答を惹

10

20

30

40

50

起するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的ヌクレオチド配列を含むあらゆるDNAが、それゆえに、“抗原”を、当該用語がここで使用される限り、コードすることを理解する。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によってのみコードされる必要がないことを理解する。本発明が、1を超える遺伝子の部分的ヌクレオチド配列の使用を含むが、これらに限定されず、これらのヌクレオチド配列が所望の免疫応答を惹起するポリペプチドをコードするように種々の組み合わせで配置されることが容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原が全く“遺伝子”によりコードされる必要がないことを理解する。抗原を合成により製造できるかまたは生体サンプルに由来し得ることは容易に明らかである。このような生体サンプルは、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞または他の生物学的成分を伴う液体を含み得るが、これらに限定されない。

10

【0190】

ここで使用する用語“抗腫瘍効果”は、腫瘍体積減少、腫瘍細胞数減少、転移数減少、余命延長、腫瘍細胞増殖減少、腫瘍細胞生存減少または癌性状態に付随する種々の生理学的症状改善を含むが、これらに限定されない種々の手段により顕在化され得る生物学的効果をいう。“抗腫瘍効果”はまたそもそも腫瘍の発生の予防における本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および抗体の能力によっても顕在化され得る。

【0191】

ここで使用する用語“アフェレーシス”は、ドナーまたは患者の血液をドナーまたは患者から採り、選択した特定の成分を分ける装置を通し、残りをドナーまたは患者の循環に、例えば、返血により戻す、当分野で認められている体外過程をいう。それゆえに、“アフェレーシスサンプル”の文脈においては、アフェレーシスを使用して得たサンプルをいう。

20

【0192】

用語“自己抗原”は、本発明により、外来であるかのように免疫系により認識される、あらゆる自己抗原をいう。自己抗原は、細胞表面受容体を含む、細胞タンパク質、リンタンパク質、細胞表面タンパク質、細胞脂質、核酸、糖タンパク質を含むが、これらに限定されない。

【0193】

ここで使用する用語“自己免疫性疾患”は、自己免疫性応答に起因する障害として定義する。自己免疫性疾患は、自己抗原への不適切かつ過剰な応答の結果である。自己免疫性疾患の例は、数あるなかで、アジソン病、円形脱毛症、強直性脊椎炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、糖尿病(I型)、ジストロフィー型表皮水疱症、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、リウマチ性関節炎、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、脈管炎、白斑症、粘液水腫、悪性貧血、潰瘍性大腸炎を含むが、これらに限定されない。

30

【0194】

ここで使用する用語“自己”は、後に再導入される個体と同じ個体由来のあらゆる物質をいう。

40

【0195】

ここで使用する用語“同種”は、物質が導入される個体と同じ種の異なる動物に由来する何らかの物質をいう。2以上の個体は、1以上の座位の遺伝子が同一でないとき、互いに同種異系といわれる。ある面において、同じ種の個体由来の同種異系物質は、抗原性に相互作用するのに十分遺伝的に似ていない可能性がある。ある態様において、同種は、同じ種の異なる動物に由来する移植片をいう。

【0196】

ここで使用する用語“キメラ抗原受容体”または“CAR”は、例えば、T細胞またはNK細胞からの、細胞免疫機能受容体またはアダプター分子と構造的および機能的性質を共有する、キメラポリペプチドをいう。CARは、TCARおよびNKRCARを含む

50

。ある態様において、CARは、同族抗原、例えば、ここに記載する腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメインを含む。同族抗原への結合により、CARは、それが配置される細胞毒性細胞を活性化または不活性化できるかまたは細胞の抗腫瘍活性を制御するかまたは他に細胞の免疫応答を制御することができる。

【0197】

ある態様において、CARポリペプチド構築物におけるドメインは、同じポリペプチド鎖にあり、例えば、キメラ融合タンパク質を含む。ある態様において、CARポリペプチド構築物におけるドメインは互いに隣接しておらず、例えば、ここに記載するようなRCARにおいて提供されるように、例えば、異なるポリペプチド鎖にある。

【0198】

ここで使用する用語“ナチュラルキラー細胞免疫機能受容体－キメラ抗原受容体”または“NKRCAR”は、NK細胞からのナチュラルキラー細胞免疫機能受容体(NKR)またはアダプター分子と機能的および構造的性質を共有するCARをいう。ある態様において、NKRCARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、例えば、NKR膜貫通ドメインおよび／または細胞質ドメイン、例えば、NKR細胞質ドメインの2または全てを含む。

【0199】

ここで使用する用語“Fc受容体－キメラ抗原受容体”または“FcRCAR”は、Fc受容体(FcR)と機能的および構造的性質を共有するCARをいう。ここで使用する用語“キラー細胞免疫グロブリン様受容体－キメラ抗原受容体”または“KIRCAR”は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)と機能的および構造的性質を共有するCARをいう。

【0200】

ここで使用する用語“Ly49受容体－キメラ抗原受容体”または“Ly49CAR”は、Ly49受容体(Ly49)と機能的および構造的性質を共有するCARをいう。

【0201】

ここで使用する用語“天然細胞毒性受容体－キメラ抗原受容体”または“NCCAR”は、天然細胞毒性受容体(NCR)と機能的および構造的性質を共有するCARをいう。

【0202】

ここで使用する用語“シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリー－キメラ抗原受容体”または“SLAMCAR”または“SLAMFCAR”は、SLAMまたはSLAMFと機能的および構造的性質を共有するCARをいう。

【0203】

ここで使用する用語“T細胞ベースのキメラ抗原受容体”または“TCAR”は、T細胞からの細胞免疫機能受容体またはアダプター分子と機能的および構造的性質を共有するCARをいう。ある態様において、TCARは、抗原ドメイン、一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび所望により1以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。

【0204】

ここで使用する用語“抗体”は、標的抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子由来のタンパク質、またはポリペプチド配列をいう。抗体は、天然源または組み換え源由来の完全免疫グロブリンであってよく、完全免疫グロブリンの免疫反応性部分であってよい。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル、多鎖または単鎖、または完全免疫グロブリンであってよく、天然源または組み換え源由来であり得る。抗体は、一般に免疫グロブリン分子の四量体である。ここに記載する抗体分子は、例えば、ここに記載するような、例えば、単ドメイン抗体フラグメント(sdAb)、単鎖抗体(scFv)およびヒト化またはヒト抗体を含む、抗体の抗原結合部分が、連続ポリペプチド鎖の一部として発現される、多様な形態で存在し得る。

【0205】

用語“抗体フラグメント”は、完全抗体またはその組み換えバリエーションの少なくとも一

10

20

30

40

50

部をいい、抗原のような標的に対する、抗体フラグメントの認識および特異的結合をあたえるのに十分である、完全抗体の抗原決定可変領域をいう。抗体フラグメントの例は、単鎖ドメイン抗体(s d A b)、F a b、F a b'、F(a b')₂およびF vフラグメント、直線状抗体、s c F v抗体、s c F v抗体フラグメント、直線状抗体、s d A b(V LまたはV Hのいずれか)のような単ドメイン抗体、ラクダ科V H Hドメインおよびヒンジ領域でのジスルフィド架橋により連結した2 F a bフラグメントを含む二価フラグメントのような抗体フラグメントから形成された多特異的抗体および抗体の単離C D Rまたは他のエпитープ結合フラグメントをいう。抗原結合フラグメントはまた単ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、二重特異性抗体、トリアボディ、テトラボディ、v-N A Rおよびビス s c F vに取り込まれ得る(例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005参照)。抗原結合フラグメントは、フィブロネクチンIII型(F n 3)のようなポリペプチドに基づくスキャフォールドに移植もできる(フィブロネクチンポリペプチドミニボディを記載する米国特許6,703,199号参照)。

【0206】

用語“s c F v”は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1抗体フラグメントおよび重鎖の可変領域を含む少なくとも1抗体フラグメントを含む融合タンパク質をいい、ここで、軽鎖および重鎖可変領域は、短可動性ポリペプチドリinkerにより隣接して連結され、単鎖ポリペプチドとして発現されることが可能であり、s c F vはそれが由来する完全抗体の特異性を保持する。特記しない限り、ここで使用するs c F vは、いずれの順序でV LおよびV H可変領域を含んでもよく、例えば、ポリペプチドのN末端およびC末端に関してs c F vはV L—リンカー—V Hを含んでも、V H—リンカー—V Lを含んでもよい。

【0207】

ここで使用する用語“相補性決定領域”または“C D R”は、抗原特異性および結合親和性を与える、抗体可変領域内のアミノ酸の配列をいう。例えば、一般に、各重鎖可変領域に3 C D R(例えば、H C D R 1、H C D R 2およびH C D R 3)および各軽鎖可変領域に3 C D R(L C D R 1、L C D R 2およびL C D R 3)が存在する。あるC D Rの厳密なアミノ酸配列境界は、Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(“K a b a t”番号付けスキーム)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948(“C h o t h i a”番号付けスキーム)またはこれらの組み合わせにより記載のものを含む多くの周知のスキームのいずれかを使用して決定できる。K a b a t 番号付けスキーム下、ある態様において、重鎖可変ドメイン(V H)のC D Rアミノ酸残基は31~35(H C D R 1)、50~65(H C D R 2)および95~102(H C D R 3)と番号付けされ；そして軽鎖可変ドメイン(V L)におけるC D Rアミノ酸残基は24~34(L C D R 1)、50~56(L C D R 2)および89~97(L C D R 3)と番号付けされる。C h o t h i a 番号付けスキーム下、ある態様において、V HにおけるC D Rアミノ酸は26~32(H C D R 1)、52~56(H C D R 2)および95~102(H C D R 3)と番号付けされ；そしてV LにおけるC D Rアミノ酸残基は26~32(L C D R 1)、50~52(L C D R 2)および91~96(L C D R 3)と番号付けされる。複合K a b a t および C h o t h i a 番号付けスキームにおいて、ある態様において、C D Rは、K a b a t C D R、C h o t h i a C D Rまたは両者の一部であるアミノ酸残基に対応する。例えば、ある態様において、C D Rは、V H、例えば、哺乳動物V H、例えば、ヒトV Hにおけるアミノ酸残基26~35(H C D R 1)、50~65(H C D R 2)および95~102(H C D R 3)；およびV L、例えば、哺乳動物V L、例えば、ヒトV Lにおけるアミノ酸残基24~34(L C D R 1)、50~56(L C D R 2)および89~97(L C D R 3)に対応する。

【0208】

本発明のC A R組成物の抗体または抗体そのフラグメントを含む部分は、抗原結合ドメインが、例えば、単ドメイン抗体フラグメント(s d A b)、単鎖抗体(s c F v)および

10

20

30

40

50

ヒト化またはヒト抗体を含む、連続ポリペプチド鎖の一部として発現される、多様な形態で存在し得る(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。ある面において、本発明のCAR組成物の抗原結合ドメインは、抗体フラグメントを含む。さらなる面において、CARは、scFvを含む抗体フラグメントを含む。

【0209】

ここで使用する用語“結合ドメイン”または“抗体分子”(ここでは“抗標的(例えば、メソテリン)結合ドメイン”とも称する)は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む、タンパク質、例えば、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントをいう。用語“結合ドメイン”または“抗体分子”は、抗体および抗体フラグメントを包含する。ある態様において、抗体分子は多特異性抗体分子であり、例えば、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、ここで、複数の中の第一免疫グロブリン可変ドメイン配列は第一エピトープに対する結合特異性を有し、複数の中の第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は第二エピトープに対する結合特性を有する。ある態様において、多特異性抗体分子は二特異性抗体分子である。二特異性抗体は、2以下の抗原に特異性を有する。二特異性抗体分子は、第一エピトープに対する結合特異性を有する第一免疫グロブリン可変ドメイン配列および第二エピトープに対する結合特異性を有する第二免疫グロブリン可変ドメイン配列により特徴付けられる。

【0210】

ここで使用する“抗体重鎖”は、天然に存在する立体構造での全抗体分子に存在する、2タイプのポリペプチド鎖の大きいほうをいう。

【0211】

ここで使用する“抗体軽鎖”は、天然に存在する立体構造での全抗体分子に存在する、2タイプのポリペプチド鎖の小さいほうをいう。κおよびλ軽鎖は、二つの主抗体軽鎖アイソタイプをいう。

【0212】

ここで使用する用語“合成抗体”または“組み換え抗体”は、例えば、ここに記載するようにバクテリオファージにより発現された抗体分子のような、組み換えDNAテクノロジーを使用して産生される、抗体分子を意味する。本用語はまた本用語はまた抗体分子をコードするDNA分子の合成により産生され、そのDNA分子が抗体タンパク質または抗体を特定するアミノ酸配列を発現するものである抗体を意味するとも解釈すべきであり、ここで、DNAまたはアミノ酸配列は、当分野で利用可能であり、周知である合成DNAまたはアミノ酸配列テクノロジーを使用して得られている。

【0213】

ここで使用する用語“癌”は、異常細胞の急速かつ未制御の増殖により特徴付けられる疾患をいう。癌細胞は、局所的にまたは血流およびリンパ系により体の他の部分に拡散できる。種々の癌の例はここに記載され、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎癌、肝癌、脳腫瘍、リンパ腫、白血病、肺癌、神経膠腫などを含むが、これらに限定されない。用語“腫瘍”および“癌”は、ここでは交換可能に使用し、例えば、両用語は固形および液性、例えば、拡散もしくは循環腫瘍を含む。ここで使用する用語“癌”または“腫瘍”は、前悪性、ならびに悪性癌および腫瘍を含む。

【0214】

用語“組み合わせ”は、一投与単位形態の固定された組み合わせまたは本発明の化合物および組み合わせパートナー(例えば“治療剤”または“併用剤”とも称する下記のような他の薬剤)を、独立して同時にまたは一定間隔で、特に組み合わせパートナーが協調的、例えば相乗効果を示すことを可能にする間隔で別々に投与し得る組み合わせ投与をいう。単一成分をキットに包装してもまたは別々でもよい。要素の一方または両方(例えば、粉末または液体)を、投与前に所望の用量に再構成または希釈し得る。ここに使用する用

語“共投与”または“組み合わせ投与”などは、選択した組み合わせパートナーを、それを必要とする一対象(例えば患者)に投与することを包含することを意図し、これら薬剤が必ずしも同じ投与経路でまたは同時に投与されるものではない処置レジメンを包含することを意図する。ここで使用する用語“医薬組み合わせ”は、1個を超える活性成分の混合または組み合わせに由来する産物を意味し、活性成分の固定されたおよび固定されていない組み合わせの両者を含む。用語用語“固定された組み合わせ”は、複数活性成分、例えば本発明の化合物および組み合わせパートナーが、両者とも患者に、同時に一個の物または投与量として投与されることを意味する。用語“固定されていない組み合わせ”は、複数活性成分、例えば本発明の化合物および組み合わせパートナーを、別々の物として、同時に、一緒にまたは別々に具体的時間制限なく患者に投与し、ここで、このような投与が、患者の体内で2化合物の治療的有効レベルを提供することを意味する。後者はまたカクテル療法、例えば3種以上の活性成分の投与にも適用される。

10

【0215】

用語“保存的配列修飾”は、当該アミノ酸配列を含む抗体または抗体フラグメントの結合特性に顕著に影響しないまたは変えないアミノ酸修飾をいう。このような保存的修飾は、アミノ酸置換、付加および欠失を含む。部位特異的変異誘発およびPCR介在変異誘発のような当分野で知られる標準技術により、本発明の抗体または抗体フラグメントに修飾を導入できる。保存的置換は、アミノ酸残基が類似側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。類似側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非電荷極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分枝側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸を含む。それゆえに、本発明のCAR内の1以上のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えてよく、改変したCARのFRβに結合する能力を、ここに記載する機能的アッセイを使用して試験できる。

20

【0216】

“構成的”プロモーターは、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結したとき、細胞内の遺伝子産物の産生を、該細胞の大部分のまたは全ての生理学的条件下で引き起こす、ヌクレオチド配列をいう。

30

【0217】

アダプター分子およびシグナル伝達ドメインについて適用される、細胞質および細胞内は、ここでは相互交換可能に使用する。

【0218】

ここで使用する用語“由来する”は、第一分子と第二分子の関係を示す。一般に第一分子と第二分子の構造的類似性をいい、第二分子に由来する第一分子の過程または源限定を暗示または包含しない。例えば、CD3ゼータ分子に由来する細胞内シグナル伝達ドメインの場合、細胞内シグナル伝達ドメインは、必要な機能、すなわち、適切な条件下でシグナルを産生する能力を有するように、十分なCD3ゼータ構造を保持する。細胞内シグナル伝達ドメインを産生する特定の過程の限定を暗示または包含しない、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインを提供するために、CD3ゼータ配列から出発し、細胞内シグナル伝達ドメインに到達するために望まない配列を削除するかまたは変異させなければならないことを意味しない。

40

【0219】

用語“刺激”は、刺激性分子(例えば、TCR/CD3複合体)とその同族リガンドの結合により誘発され、それによりTCR/CD3複合体によるシグナル伝達のような、しかし、これに限定されない、シグナル伝達事象を介在する、一次応答をいう。刺激は、TGFβの下方制御および/または細胞骨格構造再構築などのような、ある分子の発現改変

50

も仲介する。

【0220】

用語“刺激性分子”は、T細胞シグナル伝達経路の少なくともある面では刺激性方向にTCR複合体の一次活性化を制御する、初代細胞質シグナル伝達配列を提供するT細胞により発現される分子をいう。ある面において、一次シグナルは、例えば、TCR/CD3複合体と、ペプチドを載せたMHC分子の結合により開始され、これは、増殖、活性化、分化などを含むが、これらに限定されないT細胞応答の仲介に至る。刺激性方向に作用する初代細胞質シグナル伝達配列(“一次シグナル伝達ドメイン”とも呼ばれる)は、免疫受容体チロシン活性化モチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。本発明において特に有用であるITAM含有初代細胞質シグナル伝達配列の例は、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(“ICOS”としても知られる)、FcεRIおよびCD66d、DAP10およびDAP12由来のものを含むが、これらに限定されない。本発明の特定のCARにおいて、いずれかの1以上の本発明のCARにおける細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内シグナル伝達配列、例えば、CD3ゼータの一次シグナル伝達配列を含む。本発明の特定のCARにおいて、CD3ゼータの一次シグナル伝達配列は、配列番号9として提供される配列または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基である。本発明の特定のCARにおいて、CD3ゼータの一次シグナル伝達配列は、配列番号10として提供される配列または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基である。

10

20

【0221】

用語“抗原提示細胞”または“APC”は、表面に主要組織適合抗原(MHC)と複合体化した外来抗原を呈示するアクセサリ細胞(例えば、B細胞、樹状細胞など)のような免疫系細胞をいう。T細胞は、そのT細胞受容体(TCR)を使用してこれらの複合体を認識し得る。APCは抗原を処理し、それらをT細胞に提示する。

【0222】

ここで使用する用語“細胞内シグナル伝達ドメイン”は、分子の細胞内部分をいう。細胞内シグナル伝達ドメインは、CAR含有細胞、例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを産生できる。例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞における、免疫エフェクター機能の例は、サイトカインの分泌を含む、細胞溶解性活性およびヘルパー活性を含む。ある態様において、細胞内シグナルドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊化された機能の実施を指示する。細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達の切断された一部を使用する範囲内で、このような切断された一部を、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、完全鎖の代わりに使用してよい。用語細胞内シグナル伝達ドメインは、それゆえに、エフェクター機能シグナルの伝達に十分な細胞内シグナル伝達ドメインのあらゆる切断された一部を含むことを意図する。

30

【0223】

ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは初代細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。初代細胞内シグナル伝達ドメインの例は、一次刺激または抗原依存刺激を担う分子に由来するものを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激性細胞内ドメインを含み得る。共刺激性細胞内シグナル伝達ドメインの例は、共刺激性シグナルまたは抗原非依存的刺激を担う分子に由来するものを含む。例えば、CAR発現免疫エフェクター細胞、例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞の場合、初代細胞内シグナル伝達ドメインはT細胞受容体の細胞質配列を含むことができ、共刺激性細胞内シグナル伝達ドメインは共受容体または共刺激性分子の細胞質配列を含むことができる。

40

【0224】

一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフまたはITAM

50

Mとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。I T A M含有初代細胞質シグナル伝達配列の例は、C D 3ゼータ、F c Rガンマ、F c Rベータ、C D 3ガンマ、C D 3デルタ、C D 3イプシロン、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 2 7 8 (“ I C O S ”)、F c ε R I、C D 6 6 d、D A P 1 0およびD A P 1 2由来のものを含むが、これらに限定されない。

【0225】

用語“ゼータ”または代替的にゼータ鎖”、“C D 3ゼータ”または“T C Rゼータ”は、G e n B a n k受託番号B A G 3 6 6 6 4.1として提供されるタンパク質または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な塩基として定義され、“ゼータ刺激性ドメイン”または代替的に“C D 3ゼータ刺激性ドメイン”または“T C Rゼータ刺激性ドメイン”は、T細胞活性化に必要な初期シグナルを機能的に伝達するのに十分であるゼータ鎖の細胞質ドメイン由来のアミノ酸残基として定義する。ある面において、ゼータの細胞質ドメインは、G e n B a n k受託番号B A G 3 6 6 6 4.1の残基52～164または、その機能的オルソログである非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基を含む。ある面において、“ゼータ刺激性ドメイン”または“C D 3ゼータ刺激性ドメインは、配列番号9。ある面において、“ゼータ刺激性ドメイン”または“C D 3ゼータ刺激性ドメインは配列番号10として提供される配列である。

【0226】

用語“共刺激性分子”は、共刺激性リガンドと特異的に結合するT細胞上の同族結合パートナーをいい、それにより、増殖のような、しかし、それに限定されないT細胞による共刺激性応答が仲介される。共刺激性分子は、効率的免疫応答に必要な抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。共刺激性分子は、M H CクラスI分子、T N F受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ性活性化分子(S L A Mタンパク質)、活性化NK細胞受容体、B T L A、T o l lリガンド受容体、O X 4 0、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D S、I C A M-1、L F A-1(C D 1 1 a/C D 1 8)、4-1 B B(C D 1 3 7)、B 7-H 3、C D S、I C A M-1、I C O S(C D 2 7 8)、G I T R、B A F F R、L I G H T、H V E M(L I G H T R)、K I R D S 2、S L A M F 7、N K p 8 0(K L R F 1)、N K p 4 4、N K p 3 0、N K p 4 6、C D 1 9、C D 4、C D 8アルファ、C D 8ベータ、I L 2 Rベータ、I L 2 Rガンマ、I L 7 Rアルファ、I T G A 4、V L A 1、C D 4 9 a、I T G A 4、I A 4、C D 4 9 D、I T G A 6、V L A-6、C D 4 9 f、I T G A D、C D 1 1 d、I T G A E、C D 1 0 3、I T G A L、C D 1 1 a、L F A-1、I T G A M、C D 1 1 b、I T G A X、C D 1 1 c、I T G B 1、C D 2 9、I T G B 2、C D 1 8、L F A-1、I T G B 7、N K G 2 D、N K G 2 C、T N F R 2、T R A N C E/R A N K L、D N A M 1(C D 2 2 6)、S L A M F 4(C D 2 4 4、2 B 4)、C D 8 4、C D 9 6(T a c t i l e)、C E A C A M 1、C R T A M、L y 9(C D 2 2 9)、C D 1 6 0(B Y 5 5)、P S G L 1、C D 1 0 0(S E M A 4 D)、C D 6 9、S L A M F 6(N T B-A、L y 1 0 8)、S L A M(S L A M F 1、C D 1 5 0、I P O-3)、B L A M E(S L A M F 8)、S E L P L G(C D 1 6 2)、L T B R、L A T、G A D S、S L P-7 6、P A G/C b p、C D 1 9 aおよびC D 8 3と特異的に結合するリガンドを含むが、これらに限定されない。

【0227】

共刺激性細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激性分子の細胞内部分をいう。細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来する分子の細胞内部分全体または天然細胞内シグナル伝達ドメイン全体またはその機能的フラグメントを含み得る。

【0228】

用語“4-1 B B”は、G e n B a n k受託番号A A A 6 2 4 7 8.2として提供されるアミノ酸配列または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基を有するT N F Rスーパーファミリーのメンバーをいう；そして“4-1 B B共刺

10

20

30

40

50

激ドメイン”は、GenBank受託番号A A A 6 2 4 7 8 . 2のアミノ酸残基214～255または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基として定義される。ある面において、“4-1BB共刺激ドメインは、配列番号7として提供される配列または非ヒト種、例えば、マウス、齧歯類、サル、類人猿などからの等価な残基である。

【0229】

ここで使用する用語“免疫エフェクター細胞”は、免疫応答、例えば、免疫エフェクター応答の増強に関与する細胞をいう。免疫エフェクター細胞の例は、T細胞、例えば、アルファ／ベータT細胞およびガンマ／デルタT細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、肥満細胞および骨髄由来貪食細胞を含む。

10

【0230】

ここで使用する用語“免疫エフェクター機能または免疫エフェクター応答”は、標的細胞の免疫攻撃を増強または促進する、例えば、免疫エフェクター細胞の、機能または応答をいう。例えば、免疫エフェクター機能または応答は、標的細胞の死滅を促進するまたは成長もしくは増殖を阻害するT細胞またはNK細胞の特性をいう。T細胞の場合、一次刺激および共刺激は免疫エフェクター機能または応答の例である。

【0231】

用語“エフェクター機能”は、細胞の特殊化された機能をいう。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。

20

【0232】

用語“コードする”は、ヌクレオチドの規定された配列(すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA)またはアミノ酸の規定された配列のいずれかを有する生物学的過程において他のポリマーおよび巨大分子の合成の鋳型として役立つ、遺伝子、cDNAまたはmRNAのようなポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドの特定の配列の固有の特性およびそれ由来の生物学的特性をいう。それゆえに、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が、細胞または他の生物系においてタンパク質を産生するならば、タンパク質をコードする。遺伝子またはcDNAの転写の鋳型として使用される、ヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、通常配列表に提供されるコード鎖および非コード鎖の両者を、タンパク質または該遺伝子またはcDNAの他の産物をコードするとしていうことができる。

30

【0233】

特に断らない限り、“アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列”は、互いの縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードする全ヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列は、イントロンを含み得る。

【0234】

用語“有効量”または“治療有効量”は、ここでは相互交換可能に使用し、特定の生物学的結果を達成するのに有効な、ここに記載するような化合物、製剤、物質または組成物の量をいう。このような結果は、当分野で適当な何らかの手段により決定したウイルス感染の阻害を含むが、これに限定されない。

40

【0235】

ここで使用する用語“内在性”は、生物、細胞、組織または系に由来するまたはそれらの中で産生されるあらゆる物質をいう。

【0236】

ここで使用する用語“外来性”は、生物、細胞、組織または系の外から導入されたまたはそれらの外で産生されるあらゆる物質をいう。

【0237】

ここで使用する用語“発現”は、プロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳として定義する。

【0238】

50

用語“発現”用語“発現”は、プロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳をいう。

【0239】

用語“転移ベクター”は、単離核酸を含み、単離核酸の細胞内部への送達に使用できる組成物をいう。多数のベクターが当分野で知られ、直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と結合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを含むが、これらに限定されない。それゆえに、用語“転移ベクター”は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。本用語はまた、例えば、ポリリシン化合物、リポソームなどのような、核酸の細胞への転移を促進する非プラスミドおよび非ウイルス化合物をさらに含むとも解釈すべきである。ウイルス転移ベクターの例は、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどを含むが、これらに限定されない。

10

【0240】

“発現ベクター”は、発現するヌクレオチド配列に操作可能に連結した発現制御配列を含む組み換えポリヌクレオチドを含む、ベクターをいう。発現ベクターは、発現のための十分なシス作用領域を含み、発現のための他の要素は宿主により細胞またはインビトロ発現系において供給され得る。発現ベクターは、組み換えポリヌクレオチドを取り込むコスミド、プラスミド(例えば、裸のまたはリポソームに含まれた)およびウイルス(例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような、当分野で知られる全てのこのようなものを含む。

20

【0241】

ここで使用する用語“ベクター”は、核酸分子の送達および／または発現に使用できる、あらゆる媒体をいう。それは、ここに記載するような伝達ベクターまたは発現ベクターであり得る。

【0242】

用語“相同”または“同一性”は、2ポリマー分子間、例えば、2核酸分子間、例えば、2DNA分子または2RNA分子間または2ポリペプチド分子間のブユニット配列同一性をいう。2分子の両者におけるサブユニットが同じモノマーサブユニットで占拠されているとき；例えば、2DNAの各々におけるある位置がアデニンで占拠されているならば、それらは、その位置で相同または同一である。2配列間の相同性は、マッチしたまたは相同な位置の数の直接関数である；例えば、2配列の位置の半分(例えば、10サブユニット長ポリマー中5位置)が相同であるならば、2配列は50%相同である；位置の90%(例えば、10中9)がマッチするまたは相同であるならば、2配列は90%相同である。

30

【0243】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の“ヒト化”形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列)である。大部分、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギのような非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基で置換されている、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基で置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも輸入したCDRまたはフレームワーク配列にも見られない残基を含んでよい。これらの修飾は、抗体性能のさらなる調整および最適化のために行う。一般に、ヒト化抗体は、全てまたは実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンに対応し、全てまたは実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列のものに対応する、実質的に全ての、少なくとも1、および一般に2可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、所望によりまた、一般にヒト免疫グロブリンの、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部を含んでよい。さらなる詳細について、Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332:

40

50

323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992を参照のこと。

【0244】

“完全ヒト”は、分子全体がヒト起源または抗体もしくは免疫グロブリンのヒト形態と同一のアミノ酸配列からなる、抗体または抗体フラグメントのような免疫グロブリンをいう。

【0245】

ここで使用する“指示書”は、本発明の組成物および方法の有用性を説明するのに使用できる、刊行物、記録、ダイアグラムまたは他のあらゆる表現媒体である。本発明のキットの指示書は、例えば、本発明の核酸、ペプチドおよび／または組成物を含む容器に添付されてよくまたは核酸、ペプチドおよび／または組成物を含む容器とともに出荷されてよい。あるいは、指示書は、指示書および化合物が受領者により相補的に使用すべきであるとの指示伴って容器と別に出荷してもよい。

10

【0246】

用語“単離”は、自然な状態から変えられたまたは除かれたことを意味する。例えば、生存動物中に天然に存在する核酸またはペプチドは“単離”されていないが、その自然な状態の併存物質から部分的にまたは完全に分離された同じ核酸またはペプチドは、“単離”されている。単離核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在できまたは、例えば、宿主細胞のような、非天然環境で存在できる。

【0247】

本発明の文脈において、一般的に生じる核酸塩基について次の略語を使用する。“A”はアデノシンをいい、“C”はシトシンをいい、“G”はグアノシンをいい、“T”はチミジンをいい、そして“U”はウリジンをいう。

20

【0248】

特に断らない限り、“アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列”は、互いの縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードする全ヌクレオチド配列を含む。用語タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列はまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、あるバージョンにおいてイントロンを含む場合には、イントロンも含み得る。

【0249】

ここで使用する“レンチウイルス”は、レトロウイルス科ファミリーの属をいう。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染できるという点で、レトロウイルスの中でも独特である；それらは、相当量の遺伝情報を宿主細胞のDNAに送達でき、それゆえに、それらは遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の一つである。HIV、SIVおよびFIVは、全てレンチウイルスの例である。レンチウイルス由来のベクターは、インビボでの相当レベルの遺伝子導入を達成する手段を提供する。

30

【0250】

用語“レンチウイルスベクター”は、少なくとも一部レンチウイルスゲノムに由来するベクターをいい、特に、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464(2009)において提供されるような自己不活性化レンチウイルスベクターを含む。臨床で使用し得るレンチウイルスベクターの他の例は、Oxford BioMedicaからのLENTIVECTOR(登録商標)遺伝子送達テクノロジー、LentigenからのLENTIMAXTMを含むが、これらに限定されない。非臨床タイプのレンチウイルスベクターも利用可能であり、当業者に知られる。

40

【0251】

s c F vの文脈においてここで使用する用語“柔軟性ポリペプチドリンカー”または“リンカー”は、可変重鎖領域と可変軽鎖領域と一緒に連結するために、単独でまたは組み合わせで使用されるグリシンおよび／またはセリン残基のようなアミノ酸からなるペプチドリンカーをいう。ある態様において、柔軟性ポリペプチドリンカーはGly/Serリンカーであり、アミノ酸配列(Gly-Gly-Gly-Ser)_n(配列番号38)(ここで、nは1以上の正の整数である)を含む。例えば、n=1、n=2、n=3、n=4、

50

n = 5 および n = 6、n = 7、n = 8、n = 9 および n = 10 である。ある態様において、柔軟性ポリペプチドリンカーは、(G l y₄ S e r)₄ (配列番号 27) または (G l y₄ S e r)₃ (配列番号 28) を含むが、これらに限定されない。他の態様において、リンカーは、(G l y₂ S e r)、(G l y S e r) または (G l y₃ S e r) (配列番号 29) の複数反復を含む。WO 2012/138475 号 (引用により本明細書に包含させる) に記載のリンカーも本発明の範囲内に含まれる。

【0252】

ここで使用する“NK細胞免疫機能受容体”または“NK R”は、NK細胞において発現される内因性の天然に存在する膜貫通タンパク質をいい、これは、抗原提示細胞のリガンドと結合し、NK細胞免疫機能応答を調節でき、例えば、NK細胞の細胞溶解性活性またはサイトカイン分泌を調節できる。NK Rは、活性化(活性化NK R、またはa c t N K R)、または阻害(阻害性NK R、またはi n h N K R)に貢献する。一般に、NK Rは、細胞外リガンド結合ドメイン(E C D)、膜貫通ドメイン(T M)および細胞内細胞質ドメイン(I C D)を含む。NK Rは、K I R 2 D S 2のような受容体のキラー免疫グロブリン様受容体(K I R)ファミリー、N K p 4 6 (N C R 1)のような受容体のNK細胞受容体(N C R)受容体ファミリー、2 B 4のような受容体のシグナル伝達リンパ球活性化受容体(S L A M)ファミリー(S L A M F)およびI g G結合受容体、C D 1 6 (F c γ R I I I)のようなF c結合受容体を含む。NK Rにより調節されるNK細胞免疫機能応答の例は、標的細胞死滅(しばしば細胞毒性または細胞溶解とも呼ばれる)、サイトカイン分泌および／または増殖である。一般に、ここに記載する方法および組成物における使用に適するNK Rは、ヒトNK R(またはh N K R)である。ある態様において、マウスNKおよびT細胞においてK I Rと同じ機能を提供するように、収束進化により現れるマウスにおけるL y 4 9受容体ファミリーも包含される。

【0253】

用語“操作可能に連結”は、制御配列と異種核酸配列の間の、後者の発現を生じる機能的連結をいう。例えば、第一核酸配列は、第一核酸配列が第二核酸配列と機能的関係におかれたとき、操作可能に連結している。例えば、プロモーターは、プロモーターがコーディング配列の転写または発現に影響するならば、コーディング配列に操作可能に連結する。一般に、操作可能に連結したDNA配列は隣接し、そして、2タンパク質コーディング領域を合わせる必要があるとき、同じリーディングフレーム内にある。

【0254】

免疫原性組成物の“非経腸”投与なる用語は、例えば、皮下(s . c .)、静脈内(i . v .)、筋肉内(i . m .)または胸骨内注射または点滴技術を含む。

【0255】

ここで使用する用語“核酸”、“核酸分子”または“ポリヌクレオチド”は相互交換可能に使用し、ヌクレオチドの鎖を定義する。さらに、核酸は、ヌクレオチドのポリマーである。それゆえに、ここで使用する核酸およびポリヌクレオチドは相互交換可能である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、これを単量体“ヌクレオチド”に加水分解できるとの一般的知識を有する。単量体ヌクレオチドをヌクレオシドに加水分解できる。ここで使用するポリヌクレオチドは、通常のクローニングテクノロジーおよびP C RTMなどを使用する、組み換え手段、すなわち、組み換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列クローニングおよび合成手段を含むが、これらに限定されない、任意の当分野で利用可能な手段による全核酸配列をいう。ある態様において、ここでの核酸は、デオキシリボ核酸(D N A)またはリボ核酸(R N A)またはD N AまたはそのR N Aの組み合わせ、およびそのポリマーの単鎖または二本鎖形態のいずれかでの組み合わせを含む。用語“核酸”は、遺伝子、c D N Aまたはm R N Aを含む。ある態様において、核酸分子は合成(例えば、化学合成)または組み換えである。特に限定しない限り、本用語は、対照核酸と類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似する方法で代謝される、天然ヌクレオチドのアナログまたは誘導体を含む核酸を包含する。特に断らない限り、特定の核酸配列はまた、黙示的に保存的に修飾されたそのバリエーション(例えば、縮重コドン置換)、

アレル、オルソログ、SNPおよび相補的配列ならびに明示的に示される配列も包含する。具体的に、縮重コドン置換は、1以上の選択した(または全)コドンの3位が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を産生することにより達成し得る(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); およびRossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

【0256】

ここで使用する用語“ペプチド”、“ポリペプチド”および“タンパク質”は相互交換可能に使用し、ペプチド結合により共有結合したアミノ酸残基からなる化合物をいう。タンパク質またはペプチドは少なくとも2アミノ酸を含まなければならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸数の上限の設定はない。ポリペプチドは、互いにペプチド結合により連結した2以上のアミノ酸を含むあらゆるペプチドまたはタンパク質を含む。ここで使用する本用語は、例えば、ペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとしても一般に呼ばれる短鎖および一般にタンパク質として当分野で呼ばれ、多くのタイプが存在する長鎖の両者をいう。“ポリペプチド”は、とりわけ、例えば、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同ポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導体、アナログ、融合タンパク質を含む。ポリペプチドは、天然ペプチド、組み換えペプチド、合成ペプチドまたはこれらの組み合わせを含む。

【0257】

ここで使用する用語“プロモーター”は、ポリヌクレオチド配列の特定の転写の開始に必要な、細胞の合成装置または導入された合成装置により認識されるDNA配列として定義される。

【0258】

ここで使用する用語“プロモーター/制御性配列”は、該プロモーター/制御配列に操作可能に連結した遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を意味する。ある例において、この配列はコアプロモーター配列であってよく、他の例において、この配列はまた遺伝子産物の発現に必要なエンハンサー配列および他の制御要素も含んでよい。プロモーター/制御配列は、例えば、組織特異的方法で遺伝子産物を発現するものであり得る。

【0259】

用語“誘導性”プロモーターは、遺伝子産物をコードするまたは特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結したとき、実質的に当該細胞中にプロモーターに対応するインデューサーが存在するときのみ細胞において遺伝子産物を産生させる、ヌクレオチド配列である。

【0260】

用語“組織特異的”プロモーターは、遺伝子によりコードされるまたは特定化されるポリヌクレオチドと操作可能に連結したとき、実質的に、当該細胞が組織タイプの細胞であるときにのみ、細胞において遺伝子産物を産生させる、ヌクレオチド配列である。

【0261】

用語“シグナル伝達経路”は、細胞のある部分から細胞の他の部分へのシグナルの伝達に役割を有する多様なシグナル伝達分子間の生化学的關係をいう。用語“細胞表面受容体”は、シグナルを受け、細胞膜を通過してシグナルを伝達できる分子および分子複合体を含む。

【0262】

用語“対象”は、免疫応答が惹起され得る生存生物(例えば、哺乳動物、ヒト)を含むことを意図する。

【0263】

ここで使用する“実質的に精製された”細胞は、他の細胞型を本質的に含まない細胞をいう。実質的に精製された細胞はまた、天然に存在する状態では通常関係している他の細胞型から分離されている細胞もいう。ある例において、実質的に精製された細胞の集団は

10

20

30

40

50

、細胞の均一集団をいう。他の例において、この用語は、単に、その天然の状態で本来関係している細胞から分離されている細胞をいう。ある面において、細胞は、インビトロで培養される。他の面において、細胞は、インビトロで培養されない。

【0264】

ここで使用する5'キャップ(別名RNAキャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップまたはRNA m⁷Gキャップ)は、転写開始直後に真核メッセンジャーRNAの“前面”または5'末端に付加されている修飾グアニンヌクレオチドである。5'キャップは、第一転写ヌクレオチドに連結した末端基からなる。その存在は、リボゾームによる認識およびRNAaseからの保護に重要である。キャップ付加は転写と結びつき、互いに影響し合うように共転写的に生じる。転写開始直後、合成中のmRNAの5'末端は、RNAポリメラーゼと結合したキャップ合成複合体により結合される。この酵素複合体は、mRNAキャッピングに必要な化学反応を触媒する。合成は、多工程生化学反応として進行する。キャッピング部分は、安定性または翻訳効率のようなmRNAの機能性を調節するために修飾できる。

10

【0265】

ここで使用する“インビトロ転写RNA”は、インビトロで合成されている、RNA、好ましくはmRNAをいう。一般に、インビトロ転写RNAは、インビトロ転写ベクターから産生される。インビトロ転写ベクターは、インビトロ転写RNAを産生するために使用する鋳型を含む。

【0266】

20

ここで使用する“ポリ(A)”は、ポリアデニル化によりmRNAに結合した一連のアデノシンである。一過性発現のための構築物の好ましい態様において、ポリAは50~5000(配列番号30)、好ましくは64を超え、より好ましくは100を超え、最も好ましくは300または400を超える。ポリ(A)配列は、局在化、安定性または翻訳効率のようなmRNA機能性を調節するために、化学的にまたは酵素的に修飾できる。

【0267】

ここで使用する“ポリアデニル化”は、メッセンジャーRNA分子への、ポリアデニル部分またはその修飾バリエーションの供給結合をいう。真核生物において、ほとんどのメッセンジャーRNA(mRNA)分子は、3'末端でポリアデニル化されている。3'ポリ(A)テイルは、酵素、ポリアデニル酸ポリメラーゼの作用によりプレmRNAに添加されたアデニンヌクレオチドの長い配列(しばしば数百)である。高等真核生物において、ポリ(A)テイルは、特異的配列、ポリアデニル化シグナルを含む転写物に添加される。ポリ(A)テイルおよびそれに結合したタンパク質は、mRNAをエキソヌクレアーゼによる分解から守るのに役立つ。ポリアデニル化は、転写終結、mRNAの核からの排出および翻訳にも重要である。ポリアデニル化は、核でDNAのRNAへの転写直後だけでなく、さらに、細胞質で後に起こり得る。転写が終結された後、mRNA鎖は、RNAポリメラーゼと結合したエンドヌクレアーゼ複合体の作用により開裂される。開裂部位は、通常、開裂部位近くの塩基配列AAUAAAの存在により特徴付けられる。mRNAが開裂された後、アデノシン残基は、開裂部位の遊離3'末端に付加される。

30

【0268】

40

ここで使用する“一過性”は、数時間、数日または数週間の期間の非統合導入遺伝子の発現をいい、ここで、発現の期間は、宿主細胞におけるゲノムに統合されたときまたは安定プラスミドレプリコン内に含まれるときの遺伝子の発現期間より短い。

【0269】

ここで使用する用語“治療”は、処置および／または予防を意味する。治療効果は、疾患状態の抑制、寛解または根絶により得られる。

【0270】

用語“遺伝子導入”または“形質転換”または“形質導入”は、外来性核酸が宿主細胞に伝達または導入される過程をいう。“遺伝子導入”または“形質転換”または“形質導入”細胞は、外来性核酸が遺伝子導入、形質転換または形質導入されているものである。

50

細胞は、初代対象細胞およびその子孫を含む。

【0271】

ここで使用する用語“処置”および“処置する”は、1以上の治療剤(例えば、本発明のCARのような1以上の治療剤)の投与に起因する、増殖性障害の進行、重症度および／または期間の減少または改善または増殖性障害の1以上の症状(好ましくは、1以上の認識できる症状)の改善をいう。特定の態様において、用語“処置”および“処置する”は、患者により必ずしも認識できるものではない、腫瘍増殖のような増殖性障害の少なくとも一つの測定可能な身体的パラメータの改善をいう。他の態様において、用語“処置”および“処置する”は、身体的な、例えば、認識できる症状の安定化、生理学的な、例えば、身体的パラメータの安定化のいずれかまたは両者の、増殖性障害の進行阻害をいう。他の態様において、用語“処置”および“処置する”は、腫瘍サイズまたは癌性細胞数の減少または安定化をいう。

10

【0272】

ここで使用する用語“予防”は、疾患または疾患状態に対する予防または防御的処置を意味する。

【0273】

ここで使用する用語“腫瘍抗原”は、癌または腫瘍細胞の表面に、完全にまたはフラグメント(例えば、MHC／ペプチド)として発現され、癌または腫瘍細胞への薬剤の優先的なターゲティングに有用である、分子(一般にタンパク質、炭水化物または脂質)である。ある態様において、腫瘍抗原は、正常細胞および癌細胞の両者により発現されるマーカー、例えば、細胞系譜マーカー、例えば、B細胞のCD19またはCD123である。ある態様において、腫瘍抗原は、正常細胞と比較して癌細胞で過発現されている、例えば、正常細胞と比較して1倍過発現、2倍過発現、3倍過発現またはそれ以上過発現されている、細胞表面分子である。ある態様において、腫瘍抗原は、正常細胞で発現される分子と比較して、癌細胞で不適切に合成される細胞表面分子、例えば、欠失、付加または変異を含む分子である。ある態様において、腫瘍抗原は、癌細胞の表面上に、全体的であれフラグメントとしてであれ(例えば、MHC／ペプチド)、排他的に発現され、正常細胞の表面には合成または発現されない。

20

【0274】

ある態様において、本発明のCARは、MHC提示ペプチドに結合する抗原結合ドメイン(例えば、抗体または抗体フラグメント)を含むCARを含む。通常、内在性タンパク質由来のペプチドは主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI分子のポケットを満たし、CD8⁺ Tリンパ球のT細胞受容体(TCR)により認識される。MHCクラスI複合体は、全有核細胞により構成的に発現される。癌において、ウイルス特異的および／または腫瘍特異的ペプチド／MHC複合体は、免疫療法のための細胞表面標的の独特なクラスを表す。ヒト白血球抗原(HLA)－A1またはHLA－A2の状況におけるウイルスまたは腫瘍抗原由来のペプチドを標的とするTCR様抗体は記載されている(例えば、Sastry et al., J Virol. 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther 2001 8(21):1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176):176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100参照)。例えば、TCR様抗体は、ヒトscFvファージ提示ライブラリーのようなライブラリーのスクリーニングにより特定できる。

30

40

【0275】

ここで使用する用語“転写制御下”または“操作可能に連結”は、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる転写およびポリヌクレオチドの発現の開始を制御するのに、ポリヌクレオチドに対して正しい位置および配向にあることを意味する。

【0276】

“ベクター”は、単離核酸を含み、単離核酸を細胞内部に送達するのに使用できる組成物である。多数のベクターが知られ、直線状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と結合するポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを含むが、これらに限定

50

されない。それゆえに、用語“ベクター”は、自律複製プラスミドまたはウイルスを含む。本用語はまた、例えば、ポリリシン化合物、リボソームなどのような、核酸の細胞への移入を促進する非プラスミドおよび非ウイルス化合物も含むと解釈すべきである。ウイルスベクターの例は、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどを含むが、これらに限定されない。

【0277】

ここで使用する用語“特異的に結合”は、サンプルに存在する同族結合パートナータンパク質を認識し、結合する抗体またはリガンドを意味するが、該抗体またはリガンドは、サンプル中の他の分子を実質的に認識または結合しない。

【0278】

用語“刺激”は、刺激性分子とその同族リガンドの結合により誘発され、それにより、適切なNK受容体を介するシグナル伝達のような、しかし、これに限定されない、シグナル伝達事象に介在する、一次応答を意味する。

【0279】

用語“異種”は、異なる種の動物由来の移植片をいう。

【0280】

用語“特異的に結合”は、サンプルに存在する同族結合パートナー(例えば、T細胞に存在する刺激性および／または共刺激性分子)タンパク質を認識し、結合する抗体またはリガンドをいうが、その抗体またはリガンドはサンプルにおける他の分子を実質的に認識または結合しない。

【0281】

ここで使用する用語“制御可能キメラ抗原受容体(RCAR)”は、一連のポリペプチド、一般に最も単純な態様で2ポリペプチドをいい、免疫エフェクター細胞にあるとき、細胞に標的細胞、一般に癌細胞に対する特異性および制御可能な細胞内シグナル産生を与える。ある態様において、RCARは、CAR分子に関連して定義したように、少なくとも細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび刺激性分子由来の機能的シグナル伝達ドメインおよび／または共刺激性分子を含む細胞質シグナル伝達ドメイン(ここでは“細胞内シグナル伝達ドメイン”とも呼ぶ)を含む。ある態様において、RCARにおける一連のポリペプチドは互いに連続しておらず、例えば、異なるポリペプチド鎖中にある。ある態様において、RCARは、二量体化分子の存在下、ポリペプチドを互いに結合できる、例えば、抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインに結合できる、二量体化スイッチを含む。ある態様において、RCARは、ここに記載するような細胞(例えば、免疫エフェクター細胞)、例えば、RCAR発現細胞(ここでは“RCARX細胞”とも呼ぶ)で発現される。ある態様において、RCARX細胞はT細胞であり、RCART細胞と称する。ある態様において、RCARX細胞はNK細胞であり、RCARN細胞と称する。RCARは、RCAR発現細胞に、標的細胞、一般に癌細胞に対する特異性および、RCAR発現細胞の免疫エフェクター特性を最適化できる制御可能細胞内シグナル産生または増殖を提供する。ある態様において、RCAR細胞は、少なくとも一部、抗原結合ドメインにより結合される抗原を含む標的細胞に対する特性を提供するのを抗原結合ドメインに頼る。

【0282】

ここで使用する用語“膜アンカー”または“膜繫留ドメイン”は、細胞外または細胞内ドメインを原形質膜に繫留するのに十分なポリペプチドまたは部分、例えば、ミリスチル基をいう。

【0283】

ここで使用する“スイッチドメイン”は、例えば、RCARをいうとき、二量体化分子の存在下、他のスイッチドメインと結合するもの、一般にポリペプチドベースのものをいう。結合は、第一スイッチドメインに結合、例えば融合した第一のものと、第二スイッチドメインに結合、例えば融合した第二のものの機能的カップリングをもたらす。第一および第二スイッチドメインは、まとめて二量体化スイッチとして呼ばれる。ある態様におい

10

20

30

40

50

て、第一および第二スイッチドメインは互いに同一であり、例えば、同じ一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、集合的にホモ二量体化スイッチと呼ばれる。ある態様において、第一および第二スイッチドメインは互いに異なり、例えば、異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、集合的にヘテロ二量体化スイッチと呼ばれる。ある態様において、スイッチは細胞内である。ある態様において、スイッチは細胞外である。ある態様において、スイッチドメインはポリペプチドベースのもの、例えば、FKBPまたはFRBベースのものであり、二量体化分子は小分子、例えば、ラパログである。ある態様において、スイッチドメインはポリペプチドベースのもの、例えば、mycペプチドに結合するscFvであり、二量体化分子は、1以上のmyc-scFvと結合するポリペプチド、そのフラグメントまたはポリペプチドの多量体、例えば、mycリガンドまたはmycリガンドの多量体である。ある態様において、スイッチドメインはポリペプチドベースのもの、例えば、myc受容体であり、二量体化分子は抗体またはそのフラグメント、例えば、myc抗体である。

10

【0284】

ここで使用する用語“二量体化分子”は、例えば、RCARをいうとき、第一スイッチドメインと第二スイッチドメインの結合を促進する分子をいう。ある態様において、二量体化分子は対象に天然に存在しないかまたは顕著な二量体化をもたらす濃度で生じない。ある態様において、二量体化分子は小分子、例えば、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、RAD001である。

【0285】

20

用語“生物学的同等”は、対照化合物(例えば、RAD001)の対照用量または対照量により産生される効果と同等な効果を産生するのに必要な対照化合物(例えば、RAD001)以外の薬剤の量をいう。ある態様において、効果は、例えば、インビボまたはインビトロアッセイにおいて評価した、例えば、ここに記載するアッセイ、例えば、Boulayアッセイで測定した、例えば、P70-S6キナーゼ阻害により測定した、mTOR阻害のレベルまたはウェスタンブロットによるリン酸化S6レベルの測定である。ある態様において、効果は、細胞選別により測定して、PD-1陽性/PD-1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞比の改変である。ある態様において、mTOR阻害剤の生物学的同等量または用量は、対照化合物の対照用量または対照量と同じレベルのP70-S6キナーゼ阻害を達成する量または用量である。ある態様において、mTOR阻害剤の生物学的同等量または用量は、対照化合物の対照用量または対照量と同じレベルのPD-1陽性/PD-1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞比を達成する量または用量である。

30

【0286】

用語“低い免疫増強用量”はmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001またはラパマイシンまたは触媒的mTOR阻害剤と組み合わせて使用したとき、例えば、P70-S6キナーゼ活性の阻害により測定して、mTOR活性を一部、しかし完全ではなく、阻害するmTOR阻害剤の用量をいう。例えば、P70-S6キナーゼの阻害により、mTOR活性を評価する方法は、ここに記載する。本用量は、完全な免疫抑制を生じるには不十分であるが、免疫応答の増強に十分である。ある態様において、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量は、PD-1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞数減少および/またはPD-1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞数増加またはPD-1陰性T細胞/PD-1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞比増加をもたらす。

40

【0287】

ある態様において、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量は、ナイーブ免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の数の増加をもたらす。ある態様において、mTOR阻害剤の低い免疫増強用量は、次の1以上をもたらす：

1以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；

50

例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；および次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞数の増加：増加したCD62L^高、増加したCD127^高、増加したCD27⁺、減少したKLRG1および増加したBCL2；ここで、上記の何れかの変化は、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に、生じる。

【0288】

ここで使用する“難治性”は、処置に応答しない疾患、例えば、癌をいう。ある態様において、難治性癌は、処置前または開始時点で処置に耐性であり得る。他の態様において、難治性癌は、処置中に耐性になり得る。難治性癌は、耐性癌とも呼ばれる。

10

【0289】

ここで使用する“再発性”または“再発”は、一定期間の改善または応答後、例えば、先の治療、例えば、癌治療の処置後の、疾患(例えば、癌)または癌のような疾患の兆候および症状への逆転またはその再出現をいう。最初の応答期間は、癌細胞のレベルの、ある閾値未満、例えば、20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満への低下を含む。再出現は、癌細胞のレベルの、ある閾値を越える、例えば、20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%または1%を超える増加を含み得る。例えば、B-ALLの状況において、例えば、再出現は、例えば、完全応答後の、血液、骨髓(>5%)または髓外部位のいずれかへの芽細胞の再出現を含み得る。完全応答は、この状況において、<5% BM芽細胞を含み得る。より一般的に、ある態様において、応答(例えば、完全応答または部分応答)は、検出可能なMRD(最小残存疾患)の不在を含み得る。ある態様において、応答の最初の期間は少なくとも1日、2日、3日、4日、5日または6日；少なくとも1週間、2週間、3週間または4週間；少なくとも1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、8ヶ月、10ヶ月または12ヶ月；または少なくとも1年、2年、3年、4年または5年続く。

20

【0290】

ある態様において、CD19阻害剤を含む治療、例えば、CD19 CAR治療は、処置に再発または難治性であり得る。再発または難治性は、CD19喪失(例えば、抗原喪失変異)またはCD19レベルを減少させる他のCD19改変(例えば、CD19陰性クローンのクローン選択による)によりもたらされ得る。このようなCD19喪失または改変を担持する癌は、ここで、“CD19陰性癌”または“CD19陰性再発癌”)と呼ぶ。CD19陰性癌は、CD19を100%喪失する必要がないが、癌が再発しまたは難治性となるようにCD19治療の有効性を減らすのに十分低減していると理解すべきである。ある態様において、CD19陰性癌は、CD19 CAR治療に由来する。

30

【0291】

範囲：本開示をとおして、本発明の種々の面は、範囲形式で示され得る。範囲形式での記載は単に便宜さおよび簡潔さのためであり、本発明の範囲上の確定的な限定として解釈してはならないと理解されるべきである。よって、範囲の記載は、具体的に記載された全ての可能な下位範囲ならびにその範囲内の個々の数値を有すると考慮すべきである。例えば、1~6のような範囲の記載は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などのような具体的に開示された下位範囲、ならびにその範囲内の個々の数値、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を有すると解釈すべきである。他の例として、95~99%同一性のような範囲は、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有する何かを含み、96~99%、96~98%、96~97%、97~99%、97~98%および98~99%同一性のような下位範囲を含む。これは、範囲の広さと無関係に適用される。

40

【0292】

NKRCARS

ここに開示されるのは、例えば、天然に存在しないキメラ抗原受容体(CAR)を有する、細胞毒性細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の特異性および活性を制御する組成物お

50

よび方法である。ある態様において、CARはNKRCARである。NKRCARは、NK細胞免疫機能受容体(またはNKR)と機能のおよび構造的性質を共有するCARである。NKRおよびNKRCARを、ここに、例えば、下に記載する。下記のように、多様なNKRがNKRCARの基礎として作用できる。

【0293】

NK細胞免疫機能受容体(NKRS)およびNK細胞

ここに記載するように、NK細胞免疫機能受容体(またはNKR)は、NK細胞に発現される内因性の天然に存在する膜貫通タンパク質をいい、これは、抗原提示細胞のリガンドと結合し、NK細胞免疫機能応答を調節でき、例えば、NK細胞の細胞溶解性活性またはサイトカイン分泌を調節できる。

10

【0294】

NK細胞は、リンパ系前駆細胞から骨髄で発生する単核細胞であり、形態学的特性および生物学的性質は、一般に表面抗原分類(CD)CD16、CD56および／またはCD57の発現；細胞表面のアルファ／ベータまたはガンマ／デルタTCR複合体の不在；“自己”主要組織適合複合体(MHC)／ヒト白血球抗原(HLA)タンパク質を発現できない標的細胞に結合し、殺す能力；および活性化NK受容体に対するリガンドを発現する、腫瘍細胞または他の疾患細胞を殺す能力を含む。NK細胞は、先に免疫化または活性化する必要はなく、数タイプの腫瘍細胞株と結合し、殺すその能力により特徴付けられる。NK細胞はまた免疫系に制御性効果を発揮する可溶性タンパク質およびサイトカインも遊離できる；そして、複数回の細胞分裂に付し、親細胞と類似する生物学的性質を有する娘細胞を産生できる。インターフェロンおよび／またはサイトカインによる活性化により、NK細胞は、NK細胞と標的細胞の直接の物理的接触を必要とする機構により、腫瘍細胞および細胞内病原体に感染した細胞の溶解に介在する。標的細胞の溶解は、NK細胞から結合標的表面への細胞毒性顆粒および標的原形質膜に浸透し、アポトーシスまたは計画細胞死を誘発する、パーフォリンおよびグランザイムBのようなエフェクタータンパク質の放出を含む。正常な、健常細胞は、NK細胞による溶解から保護される。NK細胞活性は、刺激性および阻害性シグナルの両者を含む複合な機構により制御される。

20

【0295】

要するに、NK細胞の溶解性活性が、標的細胞のリガンドとの相互作用により、正または負の細胞内シグナルを伝達する、種々の細胞表面受容体により制御される。これらの受容体を介して伝達される正および負のシグナルのバランスが、標的細胞がNK細胞により溶解される(殺される)か否かを決定する。NK細胞刺激性シグナルは、NKp30、NKp44、およびNKp46のような天然細胞毒性受容体(NCR)；ならびにNKG2C受容体、NKG2D受容体、ある活性化キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)および他の活性化NK受容体が介在する(Lanier, Annual Review of Immunology 2005; 23:225-74)。NK細胞阻害性シグナルは、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子を認識するLy49、CD94／NKG2Aならびにある阻害性KIRのような受容体により介在され得る(Karre et al., Nature 1986; 319:675-8; Ohlen et al, Science 1989; 246:666-8)。これらの阻害性受容体は、他の細胞に存在するMHCクラスI分子(HLAクラスIを含む)の多型決定基に結合し、NK細胞介在溶解を阻止する。

30

40

【0296】

KIR-CARS

ここに開示されるのは、抗原結合ドメインおよびキラー細胞免疫グロブリン様受容体ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)分子(KIR-CAR)である。ある態様において、本発明のKIR-CARは、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の表面に発現される。

【0297】

KIR-CARベースのNKCAR

キラー細胞免疫グロブリン様受容体と称するKIRは、ヒトおよび非ヒト霊長類で特徴付けされており、多型1型経膜分子が、NK細胞およびあるT細胞を含む、リンパ球のあ

50

るサブセットに存在する。K I Rは、M H Cクラス I 分子のアルファ 1 および 2 ドメインにおける決定基と相互作用し、本明細書の他の箇所に記載するように、K I RがN K細胞に対して刺激性または阻害性であるかにより異なる。

【0298】

ここに記載するN K R - C A Rは、K I Rと機能的および構造的性質を共有するK I R - C A Rを含む。

【0299】

K I Rは、N K細胞に見られる細胞表面タンパク質のファミリーである。それらは、全細胞型に発現されるM H Cクラス I 分子との相互作用により、これらの細胞の死滅機能を制御する。この相互作用により、これらはウイルス感染細胞または腫瘍細胞を検出することが可能となる。大部分のK I Rは阻害性であり、そのM H Cの認識が、それを発現するN K細胞の細胞毒性活性を抑制することを意味する。限られた数のK I Rしか、細胞を活性化する能力を有しない。

【0300】

K I R遺伝子ファミリーは、染色体19(19q13.4)に位置する白血球受容体複合体(L R C)の100~200Kb領域内にコードされる、少なくとも15遺伝子座(K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2 / L 3、K I R 2 D L 4、K I R 2 D L 5 A、K I R 2 D L 5 B、K I R 2 D S 1、K I R 2 D S 2、K I R 2 D S 3、K I R 2 D S 4、K I R 2 D S 5、K I R 3 D L 1 / S 1、K I R 3 D L 2、K I R 3 D L 3および2偽遺伝子、K I R 2 D P 1およびK I R 3 D P 1)を有する。L R Cは、急速に進化している免疫遺伝子の大きな、1Mbの密集からなり、これは、特有のI g様細胞外ドメインを有する他の細胞表面分子をコードする遺伝子を含む。さらに、拡張されたL R Cは、膜貫通アダプター分子D A P 1 0およびD A P 1 2をコードする遺伝子を含む。

【0301】

K I R遺伝子は、4~16Kb(完全ゲノム配列)で長さが変わり、4~9エクソンを含み得る。K I R遺伝子は、構造的特性により3群の一つに属するとして分類される：(1)D 1およびD 2立体構造を有する2細胞外ドメインタンパク質をコードするI型K I R 2 D遺伝子；(2)D 0およびD 2立体構造を有する2細胞外ドメインタンパク質をコードする構造的に多岐のII型K I R 2 D遺伝子；そして最後に(3)3細胞外I g様ドメイン(D 0、D 1およびD 2)を有するタンパク質をコードするK I R 3 D遺伝子。

【0302】

偽遺伝子K I R 2 D P 1ならびにK I R 2 D L 1 - 3およびK I R 2 D S 1 - 5遺伝子を含むI型K I R 2 D遺伝子は、8エクソンならびに偽エクソン3配列を含む。この偽エクソンは、I型K I R 2 Dで不活性化されている。いくつかの例において、これは、そのヌクレオチド配列がK I R 3 Dエクソン3配列と高い程度の同一性を示し、特徴的3塩基欠損を有する場所である、イントロン2-エクソン3スプライス部位に位置するヌクレオチド置換による。他の例では、早発性終止コドンが、エクソン3の差次的スプライシングを開始させる。I型K I R 2 D群の遺伝子内で、K I R 2 D L 1およびK I R 2 D L 2は、これらのエクソンを全ての他のK I Rと区別するエクソン7に共通欠損を共有し、これは、短エクソン7配列に至る。同様に、I型K I R 2 D内で、K I R 2 D L 1 - 3は、エクソン9における領域をコードする細胞質テイルの長さによってのみ、K I R 2 D S 1 - 5と異なる。K I R 2 D P 1偽遺伝子構造は、K I R 2 D L 1 - 3と、前者が一塩基対欠損により短エクソン4配列を有することによって異なる。

【0303】

II型K I R 2 D遺伝子は、K I R 2 D L 4およびK I R 2 D L 5を含む。K I R 3 DおよびI型K I R 2 Dと異なり、II型K I R 2 Dは、特徴的に、全ての他のK I Rにおけるエクソン4に対応する領域が欠失している。さらに、II型K I R 2 D遺伝子は、I型K I R 2 D遺伝子と、前者が翻訳エクソン3を処理するのに対し、I型K I R 2 D遺伝子はその場所で非翻訳偽エクソン3配列を有することにより異なる。II型K I R 2 D遺伝子内で、K I R 2 D L 4は、さらに、K I R 2 D L 5(ならびに他のK I R遺伝子)と、そのエク

ソン1配列の長さにより区別される。K I R 2 D L 4において、エクソン1は、6ヌクレオチド長く、他のK I R遺伝子に存在するものと異なる開始コドンをもつことが判明した。この開始コドンは、他のK I R遺伝子に存在する開始コドンに対応するK I R 2 D L 4における第二潜在的開始コドンよりも、‘コザック転写開始コンセンサス配列’とよく一致する。

【0304】

K I R 3 D遺伝子は9エクソン含み、構造的に関係するK I R 3 D L 1、K I R 3 D S 1、K I R 3 D L 2およびK I R 3 D L 3遺伝子を含む。K I R 3 D L 2ヌクレオチド配列は、全K I R遺伝子で最長であり、完全ゲノム配列で16,256bpおよびcDNAで1,368bpに及ぶ。K I R 3 D群内で、4K I R遺伝子が、エクソン9における細胞質テイルをコードする領域と長さが異なる。K I Rタンパク質の細胞質テイルの長さは、14アミノ酸残基長(あるK I R 3 D S 1アレルにおける)～108アミノ酸残基長(K I R 2 D L 4タンパク質における)で変わり得る。さらに、K I R 3 D S 1は、K I R 3 D L 1またはK I R 3 D L 2と、前者が短エクソン8配列を有することにより異なる。K I R 3 D L 3は、他のK I R配列と、それがエクソン6を完全に欠くことにより異なる。観察された大部分の極端なK I R遺伝子構造差異は、K I R 3 D P 1のものであった。この遺伝子フラグメントは、エクソン6～9を完全に欠き、時にエクソン2も欠く。存在する遺伝子の残存部分(エクソン1、3、4および5)は、他のK I R 3 D配列、特にK I R 3 D L 3配列と高レベルの配列同一性を共有する。

【0305】

K I Rタンパク質は、特徴的I g様ドメインをその細胞外領域に有し、あるK I Rタンパク質において、これは、H L AクラスIリガンド結合に包含される。これらはまたN K細胞に形質導入されるシグナルのタイプを規定する点で、機能的に関係する膜貫通および細胞質領域を有する。K I Rタンパク質は2または3I g様ドメイン(ゆえにK I R 2 DまたはK I R 3 D)ならびに短または長細胞質テイル(K I R 2 D SまたはK I R 2 D Lとして表される)を有し得る。2ドメインK I Rタンパク質を、存在する膜遠位I g様ドメインの起点により2分に細分する。I型K I R 2 Dタンパク質(K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2、K I R 2 D L 3、K I R 2 D S 1、K I R 2 D S 2、K I R 2 D S 3、K I R 2 D S 4およびK I R 2 D S 5)は、K I R 3 D D 1 I g様ドメインの起点に得る維持する膜遠位I g様ドメインを有するが、D 0ドメインを欠く。このD 1 I g様ドメインは、対応するK I R遺伝子の4エクソンにより主にコードされる。II型K I R 2 Dタンパク質、K I R 2 D L 4およびK I R 2 D L 5は、K I R 3 Dタンパク質に存在するD 0ドメインに類似する配列の膜遠位I g様ドメインを有するが、しかしながら、II型K I R 2 DはD 1ドメインを欠く。長細胞質テイルは、通常2免疫チロシンベースの阻害性モチーフ(I T I M)を含み、これは、阻害性シグナルをN K細胞に伝達する。短細胞質テイルは、膜貫通領域に正荷電アミノ酸残基を有し、これにより、活性化シグナルを産生できるD A P 1 2シグナル伝達分子との結合を可能にする。この例外はK I R 2 D L 4であり、これはN末端I T I Mを1つのみ含む。さらに、K I R 2 D L 4はまたその膜貫通ドメインに荷電残基(アルギニン)も有し、阻害性および活性化の両シグナルをこの受容体に誘発させる特徴を示す。K I Rは、潜在的標的細胞の表面のM H CクラスIリガンドの認識により阻害性または活性化シグナルを送達することにより、ヒトN K細胞の応答を制御する。

【0306】

K I Rタンパク質は、306～456アミノ酸残基まで長さが変わる。タンパク質長の差異は、大部分存在するI g様ドメイン数の結果であるが、細胞質領域長多様性も影響を与える因子である。大部分のK I Rタンパク質のリーダーペプチドは21アミノ酸残基長である。しかしながら、異なる開始コドンの存在は、K I R 2 D L 4タンパク質における対応して長いリーダーペプチドを産生する。

【0307】

D 0 I g様ドメインはII型K I R 2 Dタンパク質に存在し、K I R 3 Dタンパク質は

約96アミノ酸残基長である。I型KIR2DおよびKIR3Dタンパク質のD1ドメインは102アミノ酸残基長であるが、全KIRタンパク質のD2ドメインは98アミノ酸残基長である。幹領域の長さは、大部分のKIRタンパク質に存在する24アミノ酸残基から、多岐のKIR3DL3タンパク質におけるわずか7アミノ酸残基で変化する。膜貫通領域は、大部分のKIRタンパク質で20アミノ酸残基長であるが、KIR2DL1およびKIR2DL2タンパク質においてエクソン7における3塩基対欠損の結果、1残基短い。最後に、KIRタンパク質の細胞質領域は、あるKIR3DS1アレルにおける23アミノ酸残基からKIR3DL2タンパク質に存在する96アミノ酸残基までの大きな長さの変動を示す。

【0308】

ヒトKIRポリペプチド(Homo sapiens)のアミノ酸配列は、NCBIデータベースから入手可能であり、例えば、受け入れ番号NP_037421.2(GI:134268644)、NP_703144.2(GI:46488946)、NP_001229796.1(GI:338968852)、NP_001229796.1(GI:338968852)、NP_006728.2(GI:134268642)、NP_065396.1(GI:11968154)、NP_001018091.1(GI:66267727)、NP_001077008.1(GI:134133244)、NP_036444.1(GI:6912472)、NP_055327.1(GI:7657277)、NP_056952.2(GI:71143139)、NP_036446.3(GI:116517309)、NP_001074239.1(GI:124107610)、NP_002246.5(GI:124107606)、NP_001074241.1(GI:124107604)、NP_036445.1(GI:6912474)参照。

【0309】

KIRの命名は、細胞外ドメイン数(KIR2DおよびKIR3Dはそれぞれ2および3細胞外Igドメインを有する)および細胞質テイルが長い(KIR2DLまたはKIR3DL)または短い(KIR2DSまたはKIR3DS)に基づく。あるKIRの存在または不在は、単一個体に存在するNK集団内でNK細胞毎に代わる。ヒトの中で、またKIR遺伝子の比較的高レベルの多型があり、あるKIR遺伝子はある個体に存在するが、全ての個体に存在しない。NK細胞のKIRアレルの発現は確率的に制御されており、ある個体において、個体の遺伝子型によって、あるリンパ球が1、2またはそれ以上のKIRを発現することを意味する。単一個体のNK細胞は、一般にKIRの異なる組み合わせを発現し、MHCクラスI分子に異なる特異性を有するNK細胞のレパートリーを提供する。

【0310】

あるKIR遺伝子産物は、適切なリガンドに結合したとき、リンパ球活性の刺激を引き起こす。活性化KIRは、全て、刺激性シグナルをNK細胞に伝達する免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を有するアダプター分子と結合する、荷電経膜残基を有する短細胞質テイルを有する。対照的に、阻害性KIRは、MHCクラスIリガンドとの結合により、阻害性シグナルをNK細胞に伝達する、免疫受容体抑制性チロシンモチーフ(ITIM)を含む長細胞質テイルを有する。既知阻害性KIRは、KIR2DLおよびKIR3DLサブファミリーのメンバーを含む。2Igドメイン(KIR2DL)を有する阻害性KIRは、HLA-Cアロタイプを含む：KIR2DL2(以前はp58.2と命名)および密接に関係する、アレル遺伝子産物KIR2DL3の両者は、“群1”HLA-Cアロタイプ(HLA-Cw1、-3、-7および-8を含む)を認識し、一方KIR2DL1(p58.1)は、“群2”HLA-Cアロタイプ(例えばHLA-Cw2、-4、-5および-6)を認識する。KIR2DL1による認識は、HLA-Cアレルの80位のLys残基の存在により指示される。KIR2DL2およびKIR2DL3認識は、HLA-Cの80位のAsn残基の存在により指示される。重要なことに、HLA-Cアレルの大部分は、80位にAsn残基またはLys残基のいずれかを有する。それゆえに、KIR2DL1、-2および-3は、集合的に、ヒトに見られるHLA-Cアロタイプの本質的に

10

20

30

40

50

全てを認識する。3 I gドメインを有する一つのK I R、K I R 3 D L 1 (p 7 0)は、H L A-B w 4 アレルにより共有されるエピトープを認識する。最後に、3 I gドメインを有する分子のホモダイマーであるK I R 3 D L 2 (p 1 4 0)は、H L A-A 3 および-A 1 1 を認識する。

【0 3 1 1】

しかしながら、本発明は、I T I Mを含む細胞質テイルを含む阻害性K I Rに限定すべきではない。むしろ、阻害性シグナルと関係する細胞質ドメインを有するあらゆる阻害性タンパク質を、本発明のC A Rの構築に使用できる。阻害性タンパク質の非限定的例は、C T L A-4、P D-1などを含むが、これらに限定されない。これらのタンパク質は、T細胞活性化を阻害することが知られている。

10

【0 3 1 2】

したがって、本発明は、K I Rまたはそのフラグメントに融合した、他に抗原結合ドメインとも称する標的特異的結合要素を含む、細胞外ドメインを含むK I R-C A Rを提供する。ある態様において、K I Rは、刺激性シグナルをN K細胞に伝達する、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(I T A M)を有するアダプター分子と結合した、短細胞質テイルを含む、活性化K I Rを提供する(本明細書の他の箇所ではa c t K I R-C A Rと称する)。ある態様において、K I Rは、阻害性シグナルを伝達する、免疫受容体抑制性チロシンモチーフ(I T I M)を含む、長細胞質テイルを含む、阻害性K I Rに関する(本明細書の他の箇所ではi n h K I R-C A Rと称する)。ある例において、a c t K I R-C A Rを構築するとき、活性化K I Rのためのヒンジ領域を除去することが望ましい。これは、本発明が、一部、K I R 2 S C A Rを産生するためのK I R 2 D S 2 ヒンジが除かれた活性化K I R C A Rの発見に基づき、このK I R S 2 C A Rが、完全長野生型K I R 2 D S 2 を含むa c t K I R-C A Rと比較して、増強された細胞溶解性活性を示すからである。

20

【0 3 1 3】

本発明の所望の分子をコードする核酸配列は、標準法を使用する、例えば遺伝子を発現する細胞からのライブラリーのスクリーニング、それを含むことが知られるベクターからの遺伝子の導出、またはそれを含む細胞および組織からの直接の単離のような、当分野で知られる組み換え方法を使用して得ることができる。あるいは、目的の遺伝子を、クローニングではなく、合成により産生できる。

30

【0 3 1 4】

本発明は、細胞に直接形質導入できるK I R-C A Rを発現するレトロウイルスおよびレンチウイルスベクター構築物を含む。本発明はまた、細胞に直接遺伝子導入できる、R N A構築物も含む。遺伝子導入に使用するためのm R N Aを産生する方法は、一般に5 0 ~ 2 0 0 0 塩基長の、3 'および5 '非翻訳配列(" U T R ")、5 'キャップおよび／または配列内リボソーム進入部位(I R E S)、発現する遺伝子およびポリAテイルを含む構築物を産生するための、特別に設計されたプライマーを有する鋳型のインビトロ転写(I V T)、続くポリA富化を含む。このように産生されたR N Aは、異なる種の細胞に効率的に遺伝子導入され得る。ある態様において、鋳型は、K I R-C A Rの配列を含む。

40

【0 3 1 5】

ある態様において、K I R-C A Rは、抗原結合ドメインおよびK I R膜貫通ドメインを含む。ある態様において、K I R-C A Rは、抗原結合ドメインおよびK I R細胞内ドメイン、例えば、i n h K I R細胞内ドメインを含む。

【0 3 1 6】

ここで使用する用語K I R Dドメインは、K I RのD 0、D 1またはD 2ドメインをいう。

【0 3 1 7】

ここで使用する用語K I R Dドメインは、K I RのDドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドドメインをいう。

【0 3 1 8】

50

ここで使用する用語K I R D 0ドメインは、K I RのD 0ドメインをいう。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 0ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 0ドメインまたはここに記載するK I R D 0ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 0ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 0ドメインまたはここに記載するK I R D 0ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 0ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 0ドメインまたはここに記載するK I R D 0ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 0ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 0ドメインまたはここに記載するK I R D 0ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

10

【0319】

ここで使用する用語K I R D 1ドメインは、K I RのD 1ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドドメインをいう。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 1ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 1ドメインまたはここに記載するK I R D 1ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 1ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 1ドメインまたはここに記載するK I R D 1ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異なる。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 1ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 0ドメインまたはここに記載するK I R D 1ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 1ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 1ドメインまたはここに記載するK I R D 1ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

20

【0320】

ここで使用する用語K I R D 2ドメインは、K I RのD 2ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドドメインをいう。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 2ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 2ドメインまたはここに記載するK I R D 2ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 2ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 2ドメインまたはここに記載するK I R D 2ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異なる。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 2ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 2ドメインまたはここに記載するK I R D 2ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、K I R-C A RのK I R D 2ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R D 2ドメインまたはここに記載するK I R D 2ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

30

40

【0321】

ここで使用する用語K I Rヒンジまたは幹ドメインは、K I Rのヒンジまたは幹ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドドメインをいう。ある態様において、K I R-C A RのK I Rヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I Rヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するK I Rヒンジもしくは幹ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、K I R-C A RのK I Rヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I Rヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するK I Rヒンジもしくは幹ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異なる。ある態様において、K I R-C A RのK I Rヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、

50

例えば、天然に存在するK I Rヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するK I Rヒンジもしくは幹ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、K I R-C A RのK I Rヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I Rヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するK I Rヒンジもしくは幹ドメインと異ならないまたは100%相同性を共有する。

【0322】

ここで使用する用語K I R膜貫通ドメインは、K I Rの膜貫通ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドドメインをいう。ある態様において、K I R-C A RのK I R膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R膜貫通ドメインまたはここに記載するK I R膜貫通ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、K I R-C A RのK I R膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R膜貫通ドメインまたはここに記載するK I R膜貫通ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、K I R-C A RのK I R膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R膜貫通ドメインまたはここに記載するK I R膜貫通ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、K I R-C A RのK I R膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R膜貫通ドメインまたはここに記載するK I R膜貫通ドメインと異ならないまたは100%相同性を共有する。

【0323】

ここで使用するK I R細胞内ドメインは、K I Rの細胞内ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドドメインをいう。K I R細胞内ドメインは、阻害性K I R細胞内ドメイン(ここでは、i n h K I R細胞内ドメインと称する)および活性化K I R細胞内ドメイン(ここではa c t K I R細胞内ドメインと称する)を含む。ある態様において、i n h K I R細胞内ドメインは、I T I M配列を含む。ある態様において、K I R-C A RのK I R細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R細胞内ドメインまたはここに記載するK I R細胞内ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、K I R-C A RのK I R細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R細胞内ドメインまたはここに記載するK I R細胞内ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、K I R-C A RのK I R細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R細胞内ドメインまたはここに記載するK I R細胞内ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、K I R-C A RのK I R細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するK I R細胞内ドメインまたはここに記載するK I R細胞内ドメインと異ならないまたは100%相同性を共有する。

【0324】

N C R

ここに記載するN K R-C A Rは、N C Rと機能的および構造的性質を共有する、N C R-C A Rを含む。

【0325】

ナチュラルキラー(N K)細胞は、腫瘍およびウイルス感染細胞の破壊に特殊化された、細胞毒性リンパ系細胞である。細胞毒性Tリンパ球と異なり、N K細胞は抗原特異的受容体を発現しない。形質転換細胞の認識は、大量の細胞表面受容体と標的細胞の表面マーカーの結合により生じる。N K細胞表面受容体は、N K細胞介在細胞毒性を活性化するかまたは阻害するかにより区別され得る。異なる受容体間の多くの相互作用が、N Kと標的細胞のシナプスの形成に至るように見える。シナプスでの活性化および阻害性シグナルの組み込みが、N K細胞が標的細胞に対する細胞溶解性機能を発揮すべきか否かを支持する。活性化受容体の中で、I g様分子のファミリーは、天然細胞毒性受容体(N C R)と呼ばれる。これらの天然細胞毒性受容体は、N K p 30、N K p 44およびN K p 46分子を含む

。NCRは、腫瘍細胞認識におけるNK細胞のための重要な活性化受容体である。全3NCRが、腫瘍およびウイルス感染細胞両者の排除に参与する。後者において、抗ウイルス活性は、NKp44と、インフルエンザウイルスまたはセンダイウイルスのヘマグルチニンの相互作用により開始される。NKp46は、インフルエンザウイルスヘマグルチニンまたはセンダイウイルスヘマグルチニン-ノイラミニダーゼへの結合によりウイルス感染細胞を標的とする。対照的に、NK細胞介在細胞毒性が、NKp30のヒトサイトメガロウイルスタンパク質pp65への結合により阻害される(例えば、Arnon, et. al., Nat. Immunol. (2005) 6:515-523参照)。

【0326】

ヒトNCRポリペプチドのアミノ酸配列(Homo sapiens)は、NCBIデータベースから入手可能であり、例えば、受け入れ番号NP_004819.2(GI:153945782)、O14931.1(GI:47605770)、O95944.2(GI:251757303)、O76036.1(GI:47605775)、NP_001138939.1(GI:224586865)および/またはNP_001138938.1(GI:224586860)を参照のこと。

【0327】

ある態様において、NCR-CARは、抗原結合ドメインおよびNCR膜貫通ドメインを含む。ある態様において、KIR-CARは、抗原結合ドメインおよびNCR細胞内ドメインを含む。

【0328】

ここで使用するNCR細胞外ドメインは、NCRの細胞外ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、NCR-CARのNCR細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR細胞外ドメインまたはここに記載するNCR細胞外ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、NCR-CARのNCR細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR細胞外ドメインまたはここに記載するNCR細胞外ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、NCR-CARのNCR細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR細胞外ドメインまたはここに記載するNCR細胞外ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

【0329】

ここで使用する用語NCRヒンジまたは幹ドメインは、NCRのヒンジまたは幹ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、NCR-CARのNCRヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCRヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するNCRヒンジもしくは幹ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、NCR-CARのNCRヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCRヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するNCRヒンジもしくは幹ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、NCR-CARのNCRヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCRヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するNCRヒンジもしくは幹ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

【0330】

ここで使用する用語NCR膜貫通ドメインは、NCRの膜貫通ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、NCR-CARのNCR膜

貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR膜貫通ドメインまたはここに記載するNCR膜貫通ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、NCR-CARのNCR膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR膜貫通ドメインまたはここに記載するNCR膜貫通ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、NCR-CARのNCR膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR膜貫通ドメインまたはここに記載するNCR膜貫通ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、NCR-CARのNCR膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR膜貫通ドメインまたはここに記載するNCR膜貫通ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

10

【0331】

ここで使用する用語NCR細胞内ドメインは、NCRの細胞内ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、NCR-CARのNCR細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR細胞内ドメインまたはここに記載するNCR細胞内ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、NCR-CARのNCR細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR細胞内ドメインまたはここに記載するNCR細胞内ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、NCR-CARのNCR細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR細胞内ドメインまたはここに記載するNCR細胞内ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、NCR-CARのNCR細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するNCR細胞内ドメインまたはここに記載するNCR細胞内ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

20

【0332】

SLAM受容体

ここに記載するNKR-CARは、SLAMFと機能的および構造的性質を共有する、SLAMF-CARを含む。

【0333】

免疫細胞受容体のシグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAM)ファミリーは、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーの分子のCD2ファミリーと密接に関係する。SLAMファミリー(SLAMF)は、現在、SLAM、CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAMEおよびCD2F-10と名づけられた9メンバーを含む。一般に、SLAM分子は、2~4細胞外Igドメイン、膜貫通セグメントおよび細胞内チロシン富領域を含む。本分子は、多様な免疫細胞型で種々に発現される。いくつかは自己リガンドであり、SLAMは、ヒト麻疹ウイルス受容体として同定されている。いくつかのSH2含有アダプタータンパク質は、SLAMファミリーメンバーの細胞内ドメインと結合し、SH2D1A(別名SLAM関連タンパク質[SAP])およびSH2D1B(別名EAT2)を含む受容体シグナル伝達を介在することが知られている。例えば、T細胞およびNK細胞において、活性化SLAMファミリー受容体は、チロシンリン酸化され、アダプターSAPおよび続いてSrcキナーゼFynを補充する。後に続くシグナル伝達カスケードは、T細胞-抗原提示細胞およびNK細胞-標的細胞相互作用の結果に影響する。

30

40

【0334】

ヒトSLAM受容体ポリペプチドのアミノ酸配列(Homo sapiens)は、NCBIデータベースから入手可能であり、例えば、受け入れ番号NP_057466.1(GI:7706529)、NP_067004.3(GI:19923572)、NP_003028.1(GI:4506969)、NP_001171808.1(GI:296434285)、NP_001171643.1(GI:296040491)、NP_001769.2(GI:21361571)、NP_254273.2(GI:226342990)、NP_064510.1(GI:9910342)および/またはNP_002339.2(GI:559

50

25578)を参照のこと。

【0335】

ある態様において、SLAMF-CARは、抗原結合ドメインおよびSLAMF膜貫通ドメインを含む。ある態様において、SLAMF-CARは、抗原結合ドメインおよびSLAMF細胞内ドメインを含む。

【0336】

ここで使用する用語SLAMF細胞外ドメインは、SLAMFの細胞外ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMF細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMF細胞外ドメインまたはここに記載するSLAMF細胞外ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMF細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMF細胞外ドメインまたはここに記載するSLAMF細胞外ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMF細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMF細胞外ドメインまたはここに記載するSLAMF細胞外ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMF細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMF細胞外ドメインまたはここに記載するSLAMF細胞外ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

【0337】

ここで使用する用語SLAMFヒンジまたは幹ドメインは、SLAMFのヒンジまたは幹ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMFヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMFヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するSLAMFヒンジもしくは幹ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMFヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMFヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するSLAMFヒンジもしくは幹ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMFヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMFヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するSLAMFヒンジもしくは幹ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

【0338】

ここで使用する用語SLAMF膜貫通ドメインは、SLAMFの膜貫通ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMF膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMF膜貫通ドメインまたはここに記載するSLAMF膜貫通ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMF膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMF膜貫通ドメインまたはここに記載するSLAMF膜貫通ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMF膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMF膜貫通ドメインまたはここに記載するSLAMF膜貫通ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、SLAMF-CARのSLAMF膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するSLAMF膜貫通ドメインまたはここに記載するSLAMF膜貫通ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

【0339】

ここで使用する用語 S L A M F 細胞内ドメインは、S L A M F の細胞内ドメインの構造のおよび機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、S L A M F - C A R の S L A M F 細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在する S L A M F 細胞内ドメインまたはここに記載する S L A M F 細胞内ドメインと少なくとも 70 %、80 %、85 %、90 %、95 % または 99 % 相同性を有する。ある態様において、S L A M F - C A R の S L A M F 細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在する S L A M F 細胞内ドメインまたはここに記載する S L A M F 細胞内ドメインとその残基が 15 %、10 %、5 %、2 % または 1 % を超えて異ならない。ある態様において、S L A M F - C A R の S L A M F 細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在する S L A M F 細胞内ドメインまたはここに記載する S L A M F 細胞内ドメインと 5、4、3、2 または 1 残基を超えて異ならない。ある態様において、S L A M F - C A R の S L A M F 細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在する S L A M F 細胞内ドメインまたはここに記載する S L A M F 細胞内ドメインと異なるまたは 100 % 相同性を共有する。

10

【0340】

F c 結合受容体

ここに記載する N K R - C A R は、C D 1 6 および C D 6 4 と機能的および構造的性質を共有する、F c 受容体、F c R - C A R、例えば、C D 1 6 - C A R および C D 6 4 - C A R に基づく C A R を含む。

【0341】

活性化により、N K 細胞はサイトカインおよびケモカインを豊富に産生し、同時に強力な細胞溶解性活性を発揮する。N K 細胞の活性化は、直接殺腫瘍細胞で見られるような、N K 細胞受容体の標的細胞のリガンドへの直接結合を介してまたは抗原担持細胞に結合した抗体の F c 部分の結合による F c 受容体 (C D 1 6 ; F c γ R I I I) の架橋を介して生じ得る。この C D 1 6 結合 (C D 1 6 架橋) は、C D 1 6 関連アダプター鎖、F c R γ または C D 3 ζ の一方または両方を産生する細胞内シグナルを経る N K 細胞応答を開始する。C D 1 6 の惹起は、γ または ζ 鎖のリン酸化をもたらし、これが続いてチロシンキナーゼ、s y k および Z A P - 7 0 を補充し、迅速かつ強力なエフェクター機能に至るシグナル伝達のカスケードを開始する。最も有名なエフェクター機能は、抗体依存性細胞性細胞毒性の過程を経て近隣標的細胞を殺す毒性タンパク質を運搬する細胞質顆粒の遊離である。C D 1 6 架橋はまたサイトカインおよびケモカインも産生させ、これが、続いて、一連の免疫応答を活性化しかつ組織化する。

20

30

【0342】

しかしながら、T および B リンパ球と異なり、N K 細胞は、生殖系列コード化活性化受容体を使用する標的認識について限られた能力しか有さないと考えられていた (Bottino et al., Curr Top Microbiol Immunol. 298:175-182 (2006); Stewart et al., Curr Top Microbiol Immunol. 298:1-21 (2006))。N K 細胞は、活性化 F c 受容体 C D 1 6 を発現し、これが I g G 被覆標的細胞を認識し、それにより標的認識が拡張される ((Ravetch & Bolland, Annu Rev Immunol. 19:275-290 (2001); Lanier Nat. Immunol. 9(5):495-502 (2008); Bryceson & Long, Curr Opin Immunol. 20(3):344-352 (2008))。数 N K 細胞活性化受容体の発現およびシグナル伝達活性は物理的に結合したアダプターを必要とし、これは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (I T A M) を経てシグナルを伝達する。これらのアダプターの中で、F c R γ および C D 3 ζ 鎖は、ジスルフィド結合ホモダイマーまたはヘテロダイマーとして C D 1 6 および天然細胞毒性受容体 (N C R) と結合でき、これらの鎖は全成熟 N K 細胞により発現されると考えられている。

40

【0343】

C D 1 6 のアミノ酸配列 (Homo sapiens) は N C B I データベースから入手可能であり、例えば、受け入れ番号 N P _ 0 0 0 5 6 0 . 5 (G I : 5 0 7 2 6 9 7 9)、N P _ 0 0 1 2 3 1 6 8 2 . 1 (G I : 3 4 8 0 4 1 2 5 4) を参照のこと。

【0344】

ある態様において、F c R - C A R は、抗原結合ドメインおよび F c R 膜貫通ドメイン

50

を含む。ある態様において、FcR-CARは、抗原結合ドメインおよびFcR細胞内ドメインを含む。

【0345】

ここで使用するCD16細胞外ドメインは、CD16の細胞外ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、CD16-CARのCD16細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16細胞外ドメインまたはここに記載するCD16細胞外ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、CD16-CARのCD16細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16細胞外ドメインまたはここに記載するCD16細胞外ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、CD16-CARのCD16細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16細胞外ドメインまたはここに記載するCD16細胞外ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、CD16-CARのCD16細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16細胞外ドメインまたはここに記載するCD16細胞外ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

10

【0346】

ここで使用する用語CD16ヒンジまたは幹ドメインは、CD16のヒンジまたは幹ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、CD16-CARのCD16ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するCD16ヒンジもしくは幹ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、CD16-CARのCD16ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するCD16ヒンジもしくは幹ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、CD16-CARのCD16ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するCD16ヒンジもしくは幹ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、CD16-CARのCD16ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するCD16ヒンジもしくは幹ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

20

30

【0347】

ここで使用する用語CD16膜貫通ドメインは、CD16の膜貫通ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、CD16-CARのCD16膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16膜貫通ドメインまたはここに記載するCD16膜貫通ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、CD16-CARのCD16膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16膜貫通ドメインまたはここに記載するCD16膜貫通ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、CD16-CARのCD16膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16膜貫通ドメインまたはここに記載するCD16膜貫通ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、CD16-CARのCD16膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16膜貫通ドメインまたはここに記載するCD16膜貫通ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

40

【0348】

ここで使用する用語CD16細胞内ドメインは、CD16の細胞内ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、CD16-CARのCD16細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16細胞内ドメインまたはここに記載するCD16細胞内ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90

50

%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、CD16-CARのCD16細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16細胞内ドメインまたはここに記載するCD16細胞内ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、CD16-CARのCD16細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16細胞内ドメインまたはここに記載するCD16細胞内ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、CD16-CARのCD16細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD16細胞内ドメインまたはここに記載するCD16細胞内ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

【0349】

10

ここで使用する用語CD64細胞外ドメインは、CD64の細胞外ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、CD64-CARのCD64細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64細胞外ドメインまたはここに記載するCD64細胞外ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、CD64-CARのCD64細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64細胞外ドメインまたはここに記載するCD64細胞外ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、CD64-CARのCD64細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64細胞外ドメインまたはここに記載するCD64細胞外ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、CD64-CARのCD64細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64細胞外ドメインまたはここに記載するCD64細胞外ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

20

【0350】

ここで使用する用語CD64ヒンジまたは幹ドメインは、CD64のヒンジまたは幹ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、CD64-CARのCD64ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するCD64ヒンジもしくは幹ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、CD64-CARのCD64ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するCD64ヒンジもしくは幹ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、CD64-CARのCD64ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するCD64ヒンジもしくは幹ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、CD64-CARのCD64ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するCD64ヒンジもしくは幹ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

30

【0351】

ここで使用する用語CD64膜貫通ドメインは、CD64の膜貫通ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、CD64-CARのCD64膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64膜貫通ドメインまたはここに記載するCD64膜貫通ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、CD64-CARのCD64膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64膜貫通ドメインまたはここに記載するCD64膜貫通ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、CD64-CARのCD64膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64膜貫通ドメインまたはここに記載するCD64膜貫通ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、CD64-CARのCD64膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在

40

50

するCD64膜貫通ドメインまたはここに記載するCD64膜貫通ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

【0352】

ここで使用する用語CD64細胞内ドメインは、CD64の細胞内ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、CD64-CARのCD64細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64細胞内ドメインまたはここに記載するCD64細胞内ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、CD64-CARのCD64細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64細胞内ドメインまたはここに記載するCD64細胞内ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、CD64-CARのCD64細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCD64細胞内ドメインまたはここに記載するCD64細胞内ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

10

【0353】

Ly49および関係するキラー細胞レクチン様受容体

ここに記載するNKR-CARは、Ly49と機能的および構造的性質を共有するLy49-CARを含む。

20

【0354】

Ly49受容体は、マウスにおける少なくとも23の同定された遺伝子(Ly49A-W)に由来する。これらの受容体は、構造が異なる(C型レクチンスーパーファミリーのII型膜内在性タンパク質)にも関わらず、ヒトにおけるKIRにより演じられるのと同じ役割を大部分マウスNK細胞およびT細胞において共有し、それらはまたヒトKIRのような相当な程度の遺伝的変異も含む。Ly49とKIR受容体の著しい機能的類似性は、受容体のこれらの群が、NK細胞およびT細胞において同じ生理的機能を実施するように、独立的に、しかし、集中的に進化したことを示唆する。

【0355】

ヒトにおけるKIRと同様、異なるLy49受容体が異なるMHCクラスIアレルを認識し、NK細胞のサブセットで差示的に発現される。元のプロトタイプLy49受容体、Ly49AおよびLy49Cは、KIR2DL3のような阻害性KIRに類似する2免疫チロシンベースの阻害性モチーフ(ITIM)を担持する細胞質ドメインを有する。これらのドメインは、ホスファターゼ、SHP-1を補充し、阻害性KIRのように、NK細胞の活性化およびT細胞の制限に働く。阻害性Ly49分子に加えて、Ly49DおよびLy49Hのような数ファミリーメンバーがITIM含有ドメインの喪失を有し、代わりに、ヒトにおけるKIR2DS2のような活性化KIRに類似して、シグナル伝達アダプター分子、DAP12と相互作用する能力を有する。

30

【0356】

Ly49ファミリーメンバーのアミノ酸配列は、NCBIデータベースから入手可能であり、例えば、受け入れ番号AAF82184.1(GI:9230810)、AAF99547.1(GI:9801837)、NP_034778.2(GI:133922593)、NP_034779.1(GI:6754462)、NP_001095090.1(GI:197333718)、NP_034776.1(GI:21327665)、AAK11559.1(GI:13021834)および／またはNP_038822.3(GI:9256549)を参照のこと。

40

【0357】

ある態様において、Ly49-CARは、抗原結合ドメインおよびLy49膜貫通ドメインを含む。ある態様において、Ly49-CARは、抗原結合ドメインおよびLy49細胞内ドメインを含む。

50

【0358】

ここで使用する用語LY49細胞外ドメインは、LY49の細胞外ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、LY49-CARのLY49細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49細胞外ドメインまたはここに記載するLY49細胞外ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、LY49-CARのLY49細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49細胞外ドメインまたはここに記載するLY49細胞外ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、LY49-CARのLY49細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49細胞外ドメインまたはここに記載するLY49細胞外ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、LY49-CARのLY49細胞外ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49細胞外ドメインまたはここに記載するLY49細胞外ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

10

【0359】

ここで使用する用語LY49ヒンジまたは幹ドメインは、LY49のヒンジまたは幹ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、LY49-CARのLY49ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するLY49ヒンジもしくは幹ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、LY49-CARのLY49ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するLY49ヒンジもしくは幹ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、LY49-CARのLY49ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するLY49ヒンジもしくは幹ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、LY49-CARのLY49ヒンジまたは幹ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49ヒンジもしくは幹ドメインまたはここに記載するLY49ヒンジもしくは幹ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

20

【0360】

ここで使用する用語LY49膜貫通ドメインは、LY49の膜貫通ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、LY49-CARのLY49膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49膜貫通ドメインまたはここに記載するLY49膜貫通ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、LY49-CARのLY49膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49膜貫通ドメインまたはここに記載するLY49膜貫通ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、LY49-CARのLY49膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49膜貫通ドメインまたはここに記載するLY49膜貫通ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、LY49-CARのLY49膜貫通ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49膜貫通ドメインまたはここに記載するLY49膜貫通ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

30

40

【0361】

ここで使用する用語LY49細胞内ドメインは、LY49の細胞内ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、LY49-CARのLY49細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49細胞内ドメインまたはここに記載するLY49細胞内ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、LY49-CARのLY49細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49細胞内ドメインまたは

50

ここに記載するLY49細胞内ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、LY49-CARのLY49細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49細胞内ドメインまたはここに記載するLY49細胞内ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、LY49-CARのLY49細胞内ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するLY49細胞内ドメインまたはここに記載するLY49細胞内ドメインと異ならないまたは100%相同性を共有する。

【0362】

細胞内シグナル伝達ドメインまたはアダプター分子、例えば、DAP12

あるNKR-CARは、他の分子、例えば、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、ITAMを含む分子と相互作用する。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインはDAP12である。

10

【0363】

DAP12は、構造的特性および仮定機能により、そう名づけられる。ある細胞表面受容体は、内因性機能性を欠き、これは、仮説上他のタンパク質パートナーと相互作用でき、12kDタンパク質であることを示唆する。シグナル伝達機構は、ITAMシグナルを含み得る。

【0364】

DAP12は、CD3への仮説上の関係(Olcese, et al. (1997) J. Immunol. 158:5083-5086参照)、ITAM配列の存在(Thomas (1995) J. Exp. Med. 181:1953-1956参照)、あるサイズ予測(Olcese; およびTakase, et al. (1997) J. Immunol. 159:741-747参照)および他の特性に基づき、配列データベースから同定された。特に、膜貫通ドメインは荷電残基を含むと仮説だてられ、これは、塩がその推定受容体パートナー、KIR-CD94タンパク質の対応する膜貫通セグメントおよび恐らく他の類似タンパク質と架橋するのを可能とする。Daeron, et al. (1995) Immunity 3:635-646参照。

20

【0365】

実際、既知KIR、MIR、ILTおよびCD94/NKG2受容体分子の多くは、実際に、機能的受容体複合体の一部であるアクセサリタンパク質と機能し得る。Olcese, et al. (1997) J. Immunol. 158:5083-5086; およびTakase, et al. (1997) J. Immunol. 159:741-747参照。

30

【0366】

ここで使用する用語DAP12ドメインは、DAP12の細胞質ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいい、一般にITAMドメインを含む。ある態様において、KIR-CARのDAP12ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するDAP12またはここに記載するDAP12と少なくともとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、KIR-CARのDAP12ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するDAP12またはここに記載するDAP12とその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異ならない。ある態様において、KIR-CARのDAP12ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するDAP12またはここに記載するDAP12と5、4、3、2または1残基を超えて異ならない。ある態様において、KIR-CARのDAP12ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するDAP12またはここに記載するDAP12と異なるまたは100%相同性を共有する。

40

【0367】

DAP10は、一部、DAP12との相同性および他の特性により同定された。特に、ITAM活性化モチーフを示すDAP12と対照的に、DAP10はITIM阻害性モチーフを示す。MDL-1は、DAP12とのその機能的関係により同定された。

【0368】

例えば、DAP12またはDAP10と、そのアクセサリ受容体との機能的相互作用は、通常、切断受容体方では見られない受容体における構造的組み合わせの使用を可能に

50

し得る。それゆえに、DAP12およびDAP10のようなアクセサリタンパク質を経るシグナル伝達機構は、例えば、KIR、MIR、ILTおよびCD94 NKG2型受容体との、他のKIR様受容体複合体の興味深い操作を可能にする。機能的シグナル伝達複合体を形成するようにDAP12またはDAP10と相互作用する完全受容体の切断型は、構築され得る。

【0369】

DAP12の霊長類ヌクレオチド配列は、配列番号332のヌクレオチド1～339に対応し、アミノ酸配列は、配列番号333のアミノ酸1～113に対応する。シグナル配列は、met(-26)からgln(-1)またはala1まで伸びているように見え、成熟タンパク質はほぼala1(またはgln2)、細胞外ドメイン、ala1からpro14まで伸びており；細胞外ドメインは、7位および9位に2システインを含み、これはさらなる同型または異型アクセサリタンパク質へのジスルフィド結合を可能にする可能性があり；膜貫通領域は、ほぼgly15またはval16からほぼgly39まで伸びており；そしてITAMモチーフはtyr65からleu79(YxxL-6/8x-YxxL)まで伸びる(配列番号341)。LVA03A ESTが同定され、他の重複配列の抽出に使用された。またヒトDAP12の部分であるGenbank Human EST；いくつか、しかし全てではない、包括的Genbank Accession # AA481924；H39980；W60940；N41026；R49793；W60864；W92376；H12338；T52100；AA480109；H12392；W74783；およびT55959も参照のこと。

【0370】

阻害性NKR-CARs

本発明は、ある種のCAR T細胞療法により、非癌性細胞の枯渇を制限するための組成物および方法を提供する。ここに開示するように、ある種のCAR T細胞療法は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)として知られる、NK細胞の活性化および阻害性受容体を含むが、これらに限定されないNK受容体を含む。よって、本発明は、活性化NKR-CAR(activNKR-CAR)、例えば、活性化KIR-CAR(activKIR-CAR)および阻害性NKR-CAR(inhNKR-CAR)、例えば、阻害性KIR-CAR(inhKIR-CAR)を含むが、これらに限定されない、NKR-CAR、例えば、KIR-CARを含む、組成物および使用方法を提供する。

【0371】

ある態様において、inhKIR-CARのKIRは、阻害性シグナル(本明細書の他の箇所ではinhKIR-CARと称する)を伝達する免疫受容体抑制性チロシンモチーフ(ITIM)を含む長細胞質テイルを含む、阻害性KIRを含む。

【0372】

ある態様において、inhKIR-CARは、KIR以外の阻害性分子の細胞質ドメインを含む。これらの阻害性分子は、ある態様において、細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を低減させ得る。阻害性分子の細胞質ドメインを、例えば、融合により、KIRの膜貫通ドメインに結合し得る。阻害性分子の例を表1に示す。

【表 1】

表 1：阻害性分子

PD1	TIGIT	KIR
PD-L1	LAIR1	A2aR
PD-L2	CD160	MHCクラスI
CTLA4	2B4	MHCクラスII
TIM3	CD80	GAL9
CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)	CD86	アデノシン
LAG3	B7-H3(CD276)	TGFR(例えば、TGFRベータ)
VISTA	B7-H4(VTCN1)	
BTLA	HVEM(TNFRSF14またはCD270)	

10

【0373】

20

ある態様において、inhKIR-CARは、PD1細胞質ドメインを含む。ここで使用する用語PD1細胞質ドメインは、PD1の細胞質ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、KIR-CARのPD1細胞質ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するPD1細胞質ドメインまたはここに記載するPD1細胞質ドメイン(配列番号338)と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、KIR-CARのPD1細胞質ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するPD1細胞質ドメインまたはここに記載するPD1細胞質ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異なる。ある態様において、KIR-CARのPD1細胞質ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するPD1細胞質ドメインまたはここに記載するPD1細胞質ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、KIR-CARのPD1細胞質ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するPD1細胞質ドメインまたはここに記載するPD1細胞質ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

30

【0374】

ある態様において、inhKIR-CARは、CTLA-4細胞質ドメインを含む。ここで使用する用語CTLA-4細胞質ドメインは、CTLA-4の細胞質ドメインの構造的および機能的性質を有するポリペプチドをいう。ある態様において、KIR-CARのCTLA-4細胞質ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCTLA-4細胞質ドメインまたはここに記載するCTLA-4細胞質ドメイン(配列番号339)と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または99%相同性を有する。ある態様において、KIR-CARのCTLA-4細胞質ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCTLA-4細胞質ドメインまたはここに記載するCTLA-4細胞質ドメインとその残基が15%、10%、5%、2%または1%を超えて異なる。ある態様において、KIR-CARのCTLA-4細胞質ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCTLA-4細胞質ドメインまたはここに記載するCTLA-4細胞質ドメインと5、4、3、2または1残基を超えて異なる。ある態様において、KIR-CARのCTLA-4細胞質ドメインは、対照配列、例えば、天然に存在するCTLA-4細胞質ドメインまたはここに記載するCTLA-4細胞質ドメインと異なるまたは100%相同性を共有する。

40

50

【0375】

ある態様において、*inhNKRCAR*、例えば、*inhKIRCAR*は、非標的またはバイスタンダー細胞の抗原との結合により、*inhNKRCAR*を含む細胞毒性細胞を不活性化する。下記の大部分は*inhKIRCAR*に関するが、本発明は、他の*inhNKRCAR*の類似する適用も含む。

【0376】

ある態様において、*actKIRCAR*を発現するT細胞は、その標的との結合により抗腫瘍性質を発揮し、一方、*inhKIRCAR*を発現するT細胞は、*inhKIRCAR*がその標的と結合したとき、細胞活性の阻害をもたらす。

【0377】

*KIRCAR*のタイプに関わらず、*KIRCAR*は、細胞質ドメインに融合する抗原結合ドメインを有する細胞外ドメインを含むように、操作する。ある態様において、*KIRCAR*は、T細胞で発現されたとき、抗原特異性に基づく抗原認識を再指示できる。抗原の例はCD19であり、なぜなら、この抗原がB細胞リンパ腫に発現されるからである。しかしながら、CD19はまた正常B細胞でも発現され、ゆえに抗CD19ドメインを含む*CAR*は、正常B細胞の枯渇に至り得る。正常B細胞の枯渇は、B細胞が通常感染制御においてT細胞を助けるため、処置対象を感染に感受性とする。本発明は、*KIRCAR* T細胞療法中の正常組織の枯渇を制限するための組成物および方法を提供する。ある態様において、本発明は、健常バイスタンダー細胞の枯渇を制限しながら、*KIRCAR* T細胞療法を使用する癌および他の障害を処置する方法を提供する。

【0378】

ある態様において、本発明は、*KIRCAR* T細胞活性の調節または制御を含む。ある態様において、本発明は、複数のタイプの*KIRCAR*を発現するように遺伝子修飾したT細胞と関係する組成物および方法を含み、ここで、*KIRCAR* T細胞活性化は、複数のタイプの*KIRCAR*のその標的受容体への結合に依存する。複数のタイプの*KIRCAR*の結合への依存は、*KIRCAR* T細胞の溶解性活性の特異性を改善し、それにより正常健常組織を枯渇する可能性を減らす。

【0379】

他の態様において、本発明は、阻害性*KIRCAR*を有する遺伝子修飾T細胞と関係する組成物および方法を含む。ある態様において、阻害性*KIRCAR*は、正常、非癌性、細胞および阻害性細胞質ドメインと結合する抗原を認識する、細胞外抗原結合ドメインを含む。

【0380】

ある態様において、本発明は、T細胞を*inhKIRCAR*および*actKIRCAR*を発現するように遺伝子修飾したデュアル*KIRCAR*を提供する。ある態様において、*inhKIRCAR*の正常、非癌性細胞への結合は、デュアル*KIRCAR* T細胞の阻害をもたらす。例えば、ある態様において、*inhKIRCAR*の正常、非癌性細胞への結合は、デュアル*KIRCAR* T細胞の死をもたらす。他の態様において、*inhKIRCAR*の正常、非癌性細胞への結合は、*actKIRCAR*のシグナル伝達の阻害をもたらす。さらに他の態様において、*inhKIRCAR*の正常、非癌性細胞への結合は、*actKIRCAR* T細胞が抗腫瘍活性を発揮することを阻止するシグナル伝達シグナルの誘導をもたらす。したがって、本発明の少なくとも1 *inhKIRCAR*および少なくとも1 *actKIRCAR*を含むデュアル*KIRCAR*は、デュアル*KIRCAR* T細胞の活性を制御する機構を提供する。

【0381】

ある態様において、本発明は、正常健常組織の枯渇を最小にしながら、*KIRCAR* T細胞療法を癌および他の障害の処置に使用する方法を提供する。癌は、造血器腫瘍、固形腫瘍、原発または転移腫瘍であり得る。本発明の組成物および方法を使用して処置可能な他の疾患は、ウイルス、細菌および寄生虫感染症ならびに自己免疫性疾患を含む。

【0382】

細胞外ヒンジドメイン

ここで使用する用語細胞外ヒンジドメインは、膜貫通ドメインと抗原結合ドメインの間に位置するNK R-CARのポリペプチド配列をいう。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは、細胞の外表面と抗原結合ドメインの間の十分な距離ならびに細胞と抗原結合ドメインの間の立体障害を最小化する柔軟性を可能とする。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは、NK R-CARを含む細胞と抗原担持細胞、例えば、標的細胞の結合を妨害しないように十分に短いかまたは柔軟である。ある態様において、細胞外ヒンジドメインは、2~20、5~15、7~12または8~10アミノ酸長である。ある態様において、ヒンジドメインは、少なくとも50、20または10残基を含む。ある態様において、ヒンジは10~300、10~250または10~200残基長である。ある態様において、ヒンジが細胞から伸びる距離は、ヒンジが標的細胞表面との結合を妨害しないように、十分短い。ある態様において、ヒンジは、細胞毒性細胞表面から20、15または10ナノメートル未満伸びる。それゆえに、ヒンジの適合性は、ヒンジの直線長、アミノ酸残基数および柔軟性により影響され得る。IgG4ヒンジは200アミノ酸長ほど長い可能性があるが、細胞毒性細胞表面から伸びる距離は、Igドメイン折りたたみにより小さい。約43アミノ酸であるCD8アルファヒンジは、むしろ約8nm長の直線である。対照的に、IgG4 C2およびC3ヒンジは約200アミノ酸長であるが、CD8アルファヒンジと同等な細胞毒性細胞表面からの距離を有する。理論に縛られることを望まないが、伸長の類似性は、柔軟性により影響される。

10

【0383】

20

ある例において、細胞外ヒンジドメインは、例えば、ヒトタンパク質、そのフラグメントまたは短オリゴまたはポリペプチドリンカーからのヒンジである。

【0384】

ある態様において、ヒンジは人工配列である。ある態様において、ヒンジは、グリシン-セリンダブレットを含む短オリゴペプチドリンカーである。

【0385】

ある態様において、ヒンジは天然に存在する配列である。ある態様において、ヒンジは、ヒトIg(免疫グロブリン)ヒンジまたはそのフラグメントであり得る。ある態様において、例えば、ヒンジは、IgG4ヒンジのアミノ酸配列(配列番号3)を含む(例えば、からなる)。ある態様において、例えば、ヒンジは、IgDヒンジのアミノ酸配列(配列番号4)を含む(例えば、からなる)。ある態様において、ヒンジは、ヒトCD8ヒンジまたはそのフラグメントであり得る。ある態様において、例えば、ヒンジは、CD8ヒンジのアミノ酸配列(配列番号2)を含む(例えば、からなる)。ヒンジドメインのさらなる配列例を表5に提供する。

30

【0386】

TCARS

ある態様において、本発明のCAR細胞療法は、TCARと組み合わせたNK R-CARを含む。ある態様において、本発明のCAR細胞療法は、ここに記載するNK R-CAR発現細胞は、さらに、TCARを含む、例えば、発現する。別の態様において、本発明のCAR細胞療法は、ここに記載するNK R-CARを発現する第一細胞およびTCARを発現する第二細胞を含む。

40

【0387】

ある態様において、TCARは、細胞内ドメイン、例えば、細胞質ドメインに融合した抗原結合ドメインを含む。ある態様において、細胞質ドメインは細胞内シグナル伝達ドメインを含み、それが融合している細胞外ドメイン、例えば、抗原結合ドメインがカウンターリガンドに結合したとき、細胞内シグナルを生じる。細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび共刺激性シグナル伝達ドメインを含み得る。ある態様において、TCAR分子は、TCAR分子が免疫細胞と一般に関係しているポリペプチド由来する、ドメイン、例えば、一次細胞内シグナル伝達ドメイン、共刺激性シグナル伝達ドメイン、阻害性ドメインなどを含むように、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞

50

胞またはNK細胞における発現のために構築され得る。例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞での発現のためのTCARは4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含み得る。この場合、4-1BBおよびCD3ゼータドメインの両者は、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞と関係するポリペプチド由来である。他の態様において、TCAR分子は、TCAR分子が、免疫エフェクター細胞と一般に関係しないポリペプチドに由来するドメインを含むように、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞における発現のために構築され得る。あるいは、NK細胞における発現のためのTCARは、T細胞由来の4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含み得る(例えば、引用により本明細書に包含させるWO2013/033626号参照)。

10

【0388】

次の部分は、ここに記載するNKRCARおよびTCARの構築および発現およびその使用方法に関する。

【0389】

抗原結合ドメイン

ここに記載するCAR、例えば、ここに記載するKIR-CARおよびTCARは、細胞外領域に抗原結合ドメインを含む。ここで使用する用語“抗原結合ドメイン”は、標的抗原、一般に標的細胞、例えば、癌細胞上の抗原に親和性を有する分子をいう。抗原結合ドメインの例は、ポリペプチド、例えば、抗体分子(抗体およびその抗原結合フラグメント、例えば、免疫グロブリン、単一ドメイン抗体(sdAb)およびscFvを含む)または非抗体スキャフォールド、例えば、フィブロネクチンなどを含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、単一ポリペプチドである。ある態様において、抗原結合ドメインは、1、2またはそれ以上のポリペプチドを含む。

20

【0390】

抗原結合ドメインの選択は、標的細胞表面を規定するリガンドまたは受容体のタイプおよび数による。例えば、抗原結合ドメインは、特定の疾患状態と関係する標的細胞の細胞表面マーカーとして働く、リガンドまたは受容体を認識するように選択し得る。リガンドまたは受容体として働き得る細胞表面マーカーの例は、特定の疾患状態と関係する細胞表面マーカー、例えば、ウイルス疾患、細菌疾患、寄生虫感染症、自己免疫性疾患および望まない細胞増殖と関係する障害、例えば、癌、例えば、ここに記載する癌の細胞表面マーカーを含む。

30

【0391】

本開示の文脈において、“腫瘍抗原”または“増殖性障害抗原”または“増殖性障害と関係する抗原”は、特定の増殖性障害に共通する抗原をいう。ある面において、本発明の増殖性障害抗原は、原発または転移黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌(例えば、NSCLCまたはSCLC)、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、多発性骨髄腫、神経膠芽腫、神経芽腫、子宮癌、頸部癌、腎臓癌、甲状腺癌、膀胱癌、腎臓癌および乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌、結腸癌のような腺癌などを含むが、これらに限定されない癌由来である。ある態様において、癌は、B細胞急性リンパ系白血病(“BALL”)、T細胞急性リンパ系白血病(“TALL”)、急性リンパ系白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)；慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)を含むが、これらに限定されない1以上の慢性白血病；B細胞前リンパ性白血病、芽細胞性形質細胞様樹状細胞新生物、バーキットリンパ腫、汎発性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞—または大細胞—濾胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性状態、MALTLリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、周辺帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成および骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽細胞性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症を含むが、これらに限定されないさらなる血液癌または血液学的状態を含むが、これらに限定されない。

40

【0392】

ある態様において、腫瘍抗原は、哺乳動物の癌腫瘍に由来する腫瘍浸潤性リンパ球(T

50

IL)により免疫学的に認識される1以上の抗原性癌エピトープを含む。

【0393】

腫瘍抗原は、免疫応答、特にT細胞介在免疫応答を惹起する腫瘍細胞により産生されるタンパク質である。本発明の抗原結合ドメインの選択は、処置する特定のタイプの癌による。腫瘍抗原は当分野で周知であり、例えば、国際出願PCT/US2015/020606号に記載する腫瘍抗原を含む。ある態様において、腫瘍抗原は、神経膠腫関連抗原、癌胎児性抗原(CEA)、EGFRvIII、インターロイキン-11受容体アルファ(IL-11Ra)、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2(IL-13RaまたはCD213A2)、上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)、B7H3(CD276)、K
i
t(CD117)、炭酸脱水酵素(CA-IX)、CS-1(別名CD2サブセット1)、ムチン1、細胞表面関連(MUC1)、BCMA、易切断領域(BCR)およびアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1(ABL)からなる癌遺伝子融合タンパク質bcr-abl、受容体チロシン-タンパク質キナーゼERBB2(HER2/neu)、β-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン(AFP)、未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)、CD19、CD123、サイクリンB1、レクチン反応性AFP、Fos関連抗原1、アドレナリン受容体ベータ3(ADRB3)、サイログロブリン、チロシナーゼ；エフリンA型受容体2(EphA2)、終末糖化産物の受容体(RAGE-1)、腎臓遍在性1(RU1)、腎臓遍在性2(RU2)、滑膜肉腫、Xブレイクポイント2(SSX2)、アキナーゼ係留タンパク質4(AKAP-4)、リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ(LCK)、プロアクロシン結合タンパク質p32(OY-TES1)、ペアドボックスタンパク質Pax-5(PAX5)、T細胞により認識される扁平上皮細胞癌抗原3(SART3)、C型レクチン様分子-1(CLL-1またはCLECL1)、フコシルGM1、g
l
o
b
o
Hグリコセラミドの六糖部分(GloboH)、MN-CA IX、上皮性細胞接着分子(EPCAM)、EVT6-AML、トランスグルタミナーゼ5(TGS5)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、ポリシアル酸、胎盤特異的1(PLAC1)、腸カルボキシルエステラーゼ、ルイスY抗原、シアリルルイス接着分子(sLe)、リンパ球抗原6複合体、座位K 9(LY6K)、ヒートショックタンパク質70-2変異(mut hsp70-2)、M-CSF、v-myc鳥骨髄骨髄除去ウイルス癌遺伝子神経芽腫由来ホモログ(MYCN)、RasホモログファミリーメンバーC(RhoC)、チロシナーゼ関連タンパク質2(TRP-2)、シトクロムP450 1B1(CYP1B1)、CCCTC結合因子(亜鉛フィンガータンパク質)様(BORISまたはBrother of the regulator of imprinted sites)、プロスターゼ、前立腺特異的抗原(PSA)、ペアドボックスタンパク質Pax-3(PAX3)、前立腺酸ホスファターゼ(PAP)、癌/精巣抗原1(NY-ESO-1)、癌/精巣抗原2(LAGE-1a)、LMP2、神経細胞接着分子(NCAM)、腫瘍タンパク質p53(p53)、p53変異体、ラット肉腫(Ras)変異体、糖タンパク質100(gp100)、プロステイン、OR51E2、パネキシン3(PANX3)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、高分子量黒色腫関連抗原(HMWMAA)、A型肝炎ウイルス細胞受容体1(HAVCR1)、血管内皮細胞増殖因子受容体2(VEGFR2)、血小板由来増殖因子受容体ベータ(PDGFR-ベータ)、レグマイン、ヒト乳頭腫ウイルスE6(HPV E6)、ヒト乳頭腫ウイルスE7(HPV E7)、サバイビン、テロメラーゼ、精子タンパク質17(SPA17)、ステージ特異的胚性抗原-4(SSEA-4)、チロシナーゼ、TCRガンマ交互読取枠タンパク質(TARP)、ウィルムス腫瘍タンパク質(WT1)、前立腺-癌腫瘍抗原-1(PCTA-1)、アポトーシスの黒色腫阻害因子(ML-IPAP)、MAGE、黒色腫関連抗原1(MAGE-A1)、黒色腫癌精巣抗原-1(MAD-CT-1)、黒色腫癌精巣抗原-2(MAD-CT-2)、T細胞により認識される黒色腫抗原1(MelanA/MART1)、X抗原ファミリー、メンバー1A(XAGE1)、伸長因子2変異(ELF2M)、ERG(TMPRSS2-ETS融合gene)、N-アセチルグルコサミニルートランスフェラーゼV(NA17)、好中球エラスターゼ、肉腫転座切断点、乳腺分化抗原(NY-BR-1)、エフリンB2、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44

10

20

30

40

50

v6、CD97、CD171、CD179a、アンドロゲン受容体、インスリン増殖因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受容体、ガングリオシドGD2(GD2)、o-アセチル-GD2ガングリオシド(OAcGD2)、ガングリオシドGD3(aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer)、ガングリオシドGM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer)、Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5、メンバーD(GPRC5D)、Gタンパク質共役受容体20(GPR20)、染色体Xオープンリーディングフレーム61(CXORF61)、葉酸受容体(FRa)、葉酸受容体ベータ、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(ROR1)、Fms様チロシンキナーゼ3(Flt3)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG72)、Tn抗原(TN Agまたは(GalNAcα-Ser/Thr))、アンギオポエチン結合細胞表面受容体2(Tie 2)、腫瘍内皮マーカー1(TEM1またはCD248)、腫瘍内皮マーカー7関連(TEM7R)、クローディン6(CLDN6)、甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR)、ウロプラキン2(UPK2)、メソテリン、プロテアーゼセリン21(TestisinまたはPRSS21)、上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ(FAP)、嗅覚受容体51E2(OR51E2)、ETS転座バリエーション遺伝子6、染色体12pに位置(ETV6-AML)、CD79a;CD79b;CD72;白血球関連免疫グロブリン様受容体1(LAIR1);IgA受容体のFcフラグメント(FCARまたはCD89);白血球免疫グロブリン様受容体subファミリーAメンバー2(LILRA2);CD300分子様ファミリーメンバーf(CD300LF);C型レクチンドメインファミリー12メンバーA(CLEC12A);骨髄間質細胞抗原2(BST2);EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2(EMR2);リンパ球抗原75(LY75);グリピカン-3(GPC3);Fc受容体様5(FcRL5);および免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1(IGLL1)から選択される。好ましい態様において、腫瘍抗原は、葉酸受容体(FRa)、メソテリン、EGFRvIII、IL-13Ra、CD123、CD19、CD33、BCMA、GD2、CLL-1、CA-I X、MUC1、HER2およびこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【0394】

ある態様において、腫瘍抗原は、悪性腫瘍と関係する1以上の抗原性癌エピトープを含む。悪性腫瘍は、免疫攻撃のための標的抗原として働き得る多数のタンパク質を発現する。これらの分子は、黒色腫におけるMART-1、チロシナーゼおよびGP 100ならびに前立腺癌における前立腺酸ホスファターゼ(PAP)および前立腺特異的抗原(PSA)のような組織特異的抗原を含むが、これらに限定されない。他の標的抗原は、癌遺伝子HER-2/Neu/Erbb-2のような形質転換関連分子を含む。標的抗原のさらに他の群は、癌胎児性抗原(CEA)のような癌胎児性抗原を含む。B細胞リンパ腫において、腫瘍特異的イディオタイプ免疫グロブリンは、個体の腫瘍に独特な、真の腫瘍特異的免疫グロブリン抗原からなる。CD19、CD20およびCD37のようなB細胞分化抗原は、B細胞リンパ腫における標的抗原の他の候補である。

【0395】

腫瘍抗原の非限定的例は次のものを含む：MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel 17)、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2のような分化抗原およびMAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15のような腫瘍特異的多系列抗原；CEAのような過発現胚性抗原；p53、Ras、HER-2/neuのような過発現癌遺伝子および変異腫瘍抑制遺伝子；BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RARのような染色体転座に起因する独特な腫瘍抗原；およびエプスタイン・バーウイルス抗原EBVAおよびヒト乳頭腫ウイルス(HPV)抗原E6およびE7のようなウイルス抗原。他の大きな、タンパク質ベースの抗原は、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 1

10

20

30

40

50

7.1、NuMa、K-ras、ベータ-Catenin、CDK4、Mum-1、p15、p16、43-9F、5T4、791Tgp72、アルファフェトプロテイン、ベータ-HCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3/CA27.29/BCAA、CA195、CA242、CA-50、CAM43、CD68/P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733/EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90/Mac-2結合タンパク質/シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLPおよびTPSを含む。

【0396】

標的とする所望の抗原によって、本発明のCARは、所望の抗原標的に特異的な適切な抗原結合ドメインを含むように操作され得る。

【0397】

抗体分子由来の抗原結合ドメイン

抗原結合ドメインは、抗体分子、例えば、1以上のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組み換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単ドメイン抗体、例えば、ヒトまたはラクダ科起源の、例えば、重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)および可変ドメイン(VHH)に由来し得る。ある例において、抗原結合ドメインが、CARが最終的に使用されるのと同じ種由来であることが有益であり、例えば、ヒトでの使用のために、CAR、例えば、ここに記載する、例えば、KIR-CARの抗原結合ドメインが、ヒトまたはヒト化抗原結合ドメインを含むことが有益であり得る。抗体は、当分野で知られる技術を使用して得ることができる。

【0398】

ある面において、scFvは、リーダー配列と連続し、同じリーディングフレームにある。ある面において、リーダー配列は、配列番号1として提供するアミノ酸配列である。

【0399】

ある面において、抗原結合ドメインは、フラグメント、例えば、単鎖可変フラグメント(scFv)である。ある面において、抗原結合ドメインは、Fv、Fab、(Fab')2、または二機能性(例えば二特異的)ハイブリッド抗体である(例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105(1987))。ある面において、本発明の抗体およびそのフラグメントは、野生型のまたは増強した親和性で腫瘍抗原タンパク質またはそのフラグメントと結合する。

【0400】

ある例において、scFvsは、当分野で知られる方法により製造できる(例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883参照)。上記および他の箇所に記載のように、ScFv分子は、可動性ポリペプチドリンカーを使用して、VH領域とVL領域と一緒に連結することにより産生できる。scFv分子は、最適長および/またはアミノ酸組成を有するリンカー(例えば、Ser-Glyリンカー)を含む。柔軟ポリペプチドリンカー長は、scFvの可変領域がどのように折りたたまれ、相互作用するかに大きく影響し得る。実際、短ポリペプチドリンカーを用いるならば(例えば、5~10アミノ酸)、鎖内折りたたみは阻止される。鎖内折りたたみは、2可変領域が一体となって機能的エピトープ結合部位を形成させるためにも必要である。リンカー配向およびサイズの例は、例えば、引用により本明細書に包含させるHollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448、米国特許出願公開2005/0100543号、2005/0175606号、2007/0014794号およびPCT公開WO2006/020258号およびWO2007/024715号参照。

【0401】

scFvは、そのVL領域とVH領域の間に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50またはそれ以上のアミノ酸残基のリンカーを含み得る。リ

ンカー配列は、あらゆる天然に存在するアミノ酸を含み得る。ある態様において、s c F v のペプチドリンカーは、可変重鎖および可変軽鎖領域を連結するために、単独でまたは組み合わせて使用される、グリシンおよび／またはセリン残基のようなアミノ酸からなる。ある態様において、柔軟ポリペプチドリンカーはG l y / S e r リンカーであり、例えば、アミノ酸配列(G l y - G l y - G l y - S e r) n (ここで、n は1以上の正の整数である)(配列番号40)を含む。ある態様において、柔軟ポリペプチドリンカーは、(G l y 4 S e r) 4 (配列番号27)または(G l y 4 S e r) 3 (配列番号28)を含むが、これらに限定されない。他の態様において、リンカーは(G l y 2 S e r)、(G l y S e r) または(G l y 3 S e r) (配列番号29)の複数反復を含む。

【0402】

ある態様において、抗原結合ドメインは、単一ドメイン抗原結合(S D A B)分子である。S D A B 分子は、相補的決定領域が単一ドメインポリペプチドの一部である分子を含む。例は、重鎖可変ドメイン、軽鎖を天然に欠く結合分子、慣用の4鎖抗体由来の単一ドメイン、操作されたドメインおよび抗体由来のもの以外の単一ドメインスキフォールドを含むが、これらに限定されない。S D A B 分子は、当分野のまたは将来的な単一ドメイン分子であり得る(例えば、下により詳細に記載)。S D A B 分子は、当分野で知られるあらゆるものまたはあらゆる将来的な単一ドメイン分子であり得る。S D A B 分子は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤツメウナギ、魚類、サメ、ヤギ、ウサギおよびウシを含むが、これらに限定されないいずれかの種由来であり得る。この用語はまたラクダ科およびサメ以外の種由来の天然に存在する単一ドメイン抗体分子も含む。

【0403】

ある面において、S D A B 分子は、例えば、サメの血清に見られる新規抗原受容体(N A R)として知られる免疫グロブリンアイソタイプ由来であるような、魚類で見られる免疫グロブリンの可変領域に由来し得る。N A R (“ I g N A R ”)の可変領域由来の単一ドメイン分子を製造する方法は、W O 0 3 / 0 1 4 1 6 1 号およびStreltsov (2005) Protein Sci. 14:2901-2909に記載されている。

【0404】

他の面によって、S D A B 分子は、軽鎖を欠く重鎖として知られる天然に存在する単一ドメイン抗原結合分子である。このような単一ドメイン分子は、例えば、W O 9 4 0 4 6 7 8 号およびHamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448に記載されている。明確化するために、天然に軽鎖を欠く重鎖分子由来のこの可変ドメインは、ここでは、4鎖免疫グロブリンの慣用のV H と区別するために、V H H またはナノボディとして知られる。このようなV H H 分子は、ラクダ科種、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカおよびグアナコ由来であり得る。ラクダ科以外の他の種は天然に軽鎖を欠く重鎖分子を産生し得、このようなV H H は本発明の範囲内である。

【0405】

ある態様において、S D A B 分子は、1以上の標的抗原に結合する相補性可変ドメインまたは免疫グロブリン定常領域、例えば、F c 領域を欠く、1以上の単一ドメイン分子(例えば、ナノボディ)を含む単鎖融合ポリペプチドである。

【0406】

S D A B 分子は、組み換え、C D R 移植、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化および／またはインビトロ産生され得る(例えば、ファージディスプレイにより選択)。

【0407】

ある態様において、抗原結合ドメイン部分は、ヒト抗体またはそのフラグメントを含む。

【0408】

ある態様において、非ヒト抗体は、抗体の特異的配列または領域が、ヒトで天然に産生される抗体との類似性を高めるように修飾される、ヒト化である。ある態様において、抗原結合ドメインは、ヒト化である。

【0409】

非ヒト抗体を、C D R移植(例えば、各々をその全体を引用により本明細書に包含させる、欧州特許E P 2 3 9, 4 0 0号; 国際公開W O 9 1 / 0 9 9 6 7号; および米国特許5, 2 2 5, 5 3 9号、5, 5 3 0, 1 0 1号および5, 5 8 5, 0 8 9号参照)、ベニアリングまたはリサーフェシング(例えば、各々をその全体を引用により本明細書に包含させる欧州特許E P 5 9 2, 1 0 6号およびE P 5 1 9, 5 9 6号; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; およびRoguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973参照)、鎖シャッフリング(例えば、その全体を引用により本明細書に包含させる米国特許5, 5 6 5, 3 3 2号参照)および、例えば、各々引用によりその全体を本明細書に包含させる米国特許出願公開U S 2 0 0 5 / 0 0 4 2 6 6 4号、米国特許出願公開U S 2 0 0 5 / 0 0 4 8 6 1 7、米国特許6, 4 0 7, 2 1 3号、米国特許5, 7 6 6, 8 8 6号、国際公開W O 9 3 1 7 1 0 5号、Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002), Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994)およびPedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)に記載の技術を含むが、これらに限定されない、当分野で知られる多様な方法を使用してヒト化できる。しばしば、フレームワーク領域におけるフレームワーク残基を、抗原結合を変える、例えば改善するために、C D Rドナー抗体からの対応する残基で置換する。これらのフレームワーク置換は、当分野で周知の方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのC D Rとフレームワーク残基の相互作用のモデリングおよび特定の位置の異常フレームワーク残基を同定するための配列比較により、同定される(例えば、引用により本明細書に包含させるQueen et al., 米国特許5, 5 8 5, 0 8 9号; およびRiechmann et al., 1988, Nature, 332:323参照)。好ましい態様において、ヒト化抗体分子は、ここに記載する配列、例えば、ここに記載する可変軽鎖および／または可変重鎖、例えば、表4に記載するヒト化可変軽鎖および／または可変重鎖を含む。

【0410】

ヒト化抗体は、非ヒトである源から残留している1以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、一般に“インポート”可変ドメインからとられる、“インポート”残基という。それゆえに、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリン分子由来のC D Rおよびヒトからのフレームワーク領域を含む。抗体のヒト化は当分野で知られ、本質的に、Winter and co-workers (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988))の方法に従い、齧歯類C D RまたはC D R配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより、すなわち、C D R移植(内容を引用によりその全体を本明細書に包含させるE P 2 3 9, 4 0 0号; P C T公開W O 9 1 / 0 9 9 6 7号; および米国特許4, 8 1 6, 5 6 7号; 6, 3 3 1, 4 1 5号; 5, 2 2 5, 5 3 9号; 5, 5 3 0, 1 0 1号; 5, 5 8 5, 0 8 9号; 6, 5 4 8, 6 4 0号)により実施できる。このようなヒト化抗体および抗体フラグメントにおいて、非ヒト種からの対応する配列により置換されるのは実質的に完全より少ないヒト可変ドメインである。このようなヒト化キメラ抗体において、実質的に完全ヒト可変ドメイン未満が非ヒト種からの対応する配列で置換されている。実施に際し、ヒト化抗体は、一般にいくらかのC D R残基および恐らくいくつかのフレームワーク(F R)残基が、齧歯類抗体の類似部位からの残基で置換されている、ヒト抗体である。抗体のヒト化は、ベニアリングまたはリサーフェシング(E P 5 9 2, 1 0 6号; E P 5 1 9, 5 9 6号; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); およびRoguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994))または鎖シャッフリング(米国特許5, 5 6 5, 3 3 2号)によっても達成でき、その内容は、引用によりその全体を本明細書に包含させる。

【0411】

ある態様において、本発明の抗体は、さらに、ここに開示するVHおよび／またはVL配列の1以上を有する抗体を出発物質として使用し、修飾抗体を設計することによって製造でき、この修飾抗体は、出発抗体と比較して性質が改変され得る。種々の態様において、抗体は、可変領域の一方または両方(すなわち、VHおよび／またはVL)内、例えば1以上のCDR領域内および／または1以上のフレームワーク領域内の1以上のアミノ酸の修飾により操作される。

【0412】

他の面において、抗原結合ドメインは、T細胞受容体(“TCR”)またはそのフラグメント、例えば、単鎖TCR(scTCR)である。このようなTCRを製造する方法は、当分野で知られる。例えば、Willemsen RA et al, Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004); Aggen et al, Gene Ther. 19(4): 365-74 (2012)参照(文献は、引用によりその全体をここに包含させる)。例えば、リンカー(例えば、柔軟ペプチド)により連結したT細胞クローンから、V α およびV β 遺伝子を含むscTCRが、操作される。このアプローチは、それ自体細胞内であるが、しかしながら、このような抗原(ペプチド)のフラグメントが、MHCにより癌細胞表面に提示されている、癌関連標的に有用である。

10

【0413】

ある態様において、ここに記載するNKRCARまたはTCAR分子は、ここに記載する腫瘍抗原と特異的に結合するscFvを含む抗原結合ドメインを含む。ここに記載する腫瘍抗原と特異的に結合するscFvのアミノ酸配列を表4に提供する。ある態様において、表4に提供するscFv配列のCDRに下線を引く。あるCDRの厳密なアミノ酸配列境界は、KabataまたはChothiaに記載のものまたはKabataおよびChothia番号付けスキームの組み合わせを含む、多数の周知の番号付けスキームのいずれかを使用して、決定できる。

20

【0414】

表4に提供するscFv配列は、scFvの可変重鎖および可変軽鎖を連結するリンカー配列を含む。リンカー配列は、ここに記載するリンカー配列、例えば、表5に提供するリンカー配列のいずれでもよい。

【0415】

表4に提供するscFv配列のいくつかの配列はリーダー配列、例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するが、表4に提供するscFv配列のいくつかは、リーダー配列、例えば、配列番号1のアミノ酸配列を含まないことも注意すべきである。リーダー配列、例えば、配列番号1を伴いまたは伴わずに表4に提供するscFv配列も本発明に包含される。当業者は、リーダー配列、例えば、配列番号1のアミノ酸配列を伴うまたは伴わないCARのscFvまたは抗原結合ドメインを、表4に提供する配列を使用して容易に使用できる。

30

【0416】

【表 2】

表 4：抗原結合ドメイン例

標的抗原	名称	アミノ酸配列	配列番号
CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTRGLH SGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK GLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS	161
CD19	huscFv2	Eivmtqspatlslspsgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlh sgiparfsgsgsgtdytltiisslpqpedfavyfcqqgntlpdyfgggtkleikggg gsgggsgsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppegk glewigviwgsettyyqsslsksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycah yyyggsyamdywgqglvtvss	162
CD19	huscFv3	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppegkglewigviwgse tthyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdyw gggtltvssggggsgggsgggseivmtqspatlslspsgeratlscrasqdis kylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytltiisslpqpedfav yfcqqgntlpdyfgggtkleik	163
CD19	huscFv4	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppegkglewigviwgse tthyqsslsksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdyw gggtltvssggggsgggsgggseivmtqspatlslspsgeratlscrasqdis kylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytltiisslpqpedfav yfcqqgntlpdyfgggtkleik	164
CD19	huscFv5	Eivmtqspatlslspsgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlh sgiparfsgsgsgtdytltiisslpqpedfavyfcqqgntlpdyfgggtkleikggg gsgggsgsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswir qppegkglewigviwgsettyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavy ycakhyyyggsyamdywgqglvtvss	165
CD19	huscFv6	Eivmtqspatlslspsgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlh sgiparfsgsgsgtdytltiisslpqpedfavyfcqqgntlpdyfgggtkleikggg gsgggsgsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswir qppegkglewigviwgsettyqsslsksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavy ycakhyyyggsyamdywgqglvtvss	166
CD19	huscFv7	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppegkglewigviwgse tthyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdyw gggtltvssggggsgggsgggsgggseivmtqspatlslspsgeratlscra	167

10

20

30

40

【 0 4 1 7 】

		sqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik	
CD19	huscFv8	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgse ttyyqsslkstrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdyw gggtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlscra sqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik	168
CD19	huscFv9	Eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlh sgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedefavyfcqqgntlpytfgqgkkleikggg gsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswir qppgkglewigviwgsettyynsslkstrvtiskdnskqvslklssvtaadtavy ycakhyyyggsyamdywgggtlvtvss	169
CD19	Hu scFv10	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgse ttyynsslkstrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdyw gggtlvtvssggggsgggsgggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlscra sqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik	170
CD19	Hu scFv11	Eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlh sgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedefavyfcqqgntlpytfgqgkkleikggg gsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgk glewigviwgsettyynsslkstrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycak yyyggsyamdywgggtlvtvss	171
CD19	Hu scFv12	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgse ttyynsslkstrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdyw gggtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdis kylnwyqqkpgqaprrlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedefav yfcqqgntlpytfgqgkkleik	172
CD19	muCTL 019	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkllyhtsrhlh sgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggkkleitggg gsgggsgggsgggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirpprk glewlgviwgsettyynsalksrliikdnksqvflkmnslqtddtaiyycah yyyggsyamdywgggtsvtvss	173
CD123	Mu1172	<u>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWYQQKPGQ</u> <u>PPKLLIYRASNL</u> <u>ESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQ</u> <u>SNEDPPTFTGAGTKLELKG</u> <u>GGGSGGGGSSGGGSQIQLVQSGPELKKP</u> <u>GETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWMGWINTYTGEST</u>	174

40

【表 4】

		<u>YSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNEDTATYFCARSGGYDPM</u> <u>DYWGQGTSTVTVSS</u>	
CD123	Mu1176	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEPGKTNKLLIYSGS TLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNKYPYTFGGGK LEIKGGGGSGGGSSGGGSQVQLQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTS YWMNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTTLTVSS	175
CD123	huscFv1	Divltqspdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgvpdrfsgsgsrtdftl tisslqaedvavyyccqsnedpptfgqgkcleikgggsgggsgggsgggsgggsggiqlvqsgselkpgasvkv sckasgyiftnygmnnvrqapqglewmgwintygtgestysadfkgrfvsltdsvstaylqinalkaedtavy ycarsggydpmdywgqgttvvss	176
CD123	huscFv2	Divltqspdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgvpdrfsgsgsrtdftl tisslqaedvavyyccqsnedpptfgqgkcleikgggsgggsgggsgggsgggsggiqlvqsgaevkpgasvk vsckasgyiftnygmnnvrqapqglewmgwintygtgestysadfkgrvtitldtsastaymelsslrstedtavy ycarsggydpmdywgqgttvvss	177
CD123	huscFv3	Eivltqspatlsipgeratlsrasesvdnygntfmhwyqqkpgqpprlliyrasnlesgiparfsgsgsrtdftltis slepedvavyyccqsnedpptfgqgkcleikgggsgggsgggsgggsgggsggiqlvqsgselkpgasvkvsc kasgyiftnygmnnvrqapqglewmgwintygtgestysadfkgrfvsltdsvstaylqinalkaedtavyyc arsggydpmdywgqgttvvss	178
CD123	huscFv4	Eivltqspatlsipgeratlsrasesvdnygntfmhwyqqkpgqpprlliyrasnlesgiparfsgsgsrtdftltis slepedvavyyccqsnedpptfgqgkcleikgggsgggsgggsgggsgggsggiqlvqsgaevkpgasvkvs ckasgyiftnygmnnvrqapqglewmgwintygtgestysadfkgrvtitldtsastaymelsslrstedtavyyc arsggydpmdywgqgttvvss	179
CD123	huscFv5	Qiqlvqsgselkpgasvkvscasgyiftnygmnnvrqapqglewmgwintygtgestysadfkgrfvsl dtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvvssgggsgggsgggsgggsgggsgdivltqsp pdsavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgvpdrfsgsgsrtdftltisslqae dvavyyccqsnedpptfgqgkcleik	180
CD123	huscFv6	Qiqlvqsgselkpgasvkvscasgyiftnygmnnvrqapqglewmgwintygtgestysadfkgrfvsl dtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvvssgggsgggsgggsgggsgggsgdivltqsp atlsipgeratlsrasesvdnygntfmhwyqqkpgqpprlliyrasnlesgiparfsgsgsrtdftltisslepedv avyyccqsnedpptfgqgkcleik	181
CD123	huscFv7	Qiqlvqsgaevkpgasvkvscasgyiftnygmnnvrqapqglewmgwintygtgestysadfkgrvtitld tsastaymelsslrstedtavyycarsggydpmdywgqgttvvssgggsgggsgggsgggsgggsgdivltqsp dslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgvpdrfsgsgsrtdftltisslqae vavyyccqsnedpptfgqgkcleik	182

10

20

30

40

【 0 4 1 8 】

CD123	huscFv8	QiqIvqsgaevkpgasvkvscasgyiftnygmnwvrqapqqrlewmgwintygtgestysadfkgrvitiId tsastaymelslrsedtavyycarsggydpmdywgqgtvtvssggggsgggsgggsgggsgggseivltqspa tIsIspgeratlscrasvsdnyngntfmhwyqqkpgqaprrliyrasnlsgiparfsgsgsrtdfilitsslepedva vyyccqqsndpptfgggtkleik	183
CD123	ヒト 123-1	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVWRQA PGQGLEWMGWINPNSSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDMN ILATVPFDIWGQGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS QSISTYLNWYQQKPGKAPNLLIYA ~~AFSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT~~ INSLQPEDFATYY CQQGDSVPLTFGGGTKEIK	184
CD123	ヒト 123-2	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVWRQA PGQGLEWMGWINPNSSGGTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRRLSDDTAVYYCARDMN ILATVPFDIWGQGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ~~ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT~~ VNSLQPEDFATYY CQQGDSVPLTFGGGTREIK	185
CD123	ヒト 123-3	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTGYIHWVRQA PGQGLEWMGWINPNSSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSGRLSDDPAVYYCARDMN ILATVPFDIWGQGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ~~ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT~~ VNSLQPEDFATYY CQQGDSVPLTFGGGTKEIK	186
CD123	ヒト 123-4	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQSGAEVKKSGASVKVSCASGYTFTDYMHVWRQA PGQGLEWMGWINPNSSGDTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRRLSDDTAVYYCARDMN ILATVPFDIWGQGTMTVTSSASGGGSGGRASGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCR ASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ~~ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT~~ ISSLQPEDFAT YYCQQGDSVPLTFGGGTKEIK	187
CD123	hzCAR -1	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNVWRQA PGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTMTVDKSTSTAYMELSSRLSDDTAVYYCARGNW DDYWGQGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASK SISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQHNKYPYTFGGGTKEIK	188
CD123	hzCAR -2	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNVWRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTMTVDKSTSTAYMELSSRLSDDTAVYYCARG NWDDYWGQGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVLTQSPATLSLSPGERATLSLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKEIK	189
CD123	hzCAR -3	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNVWRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVMTMTVDKSTSTAYMELSSRLSDDTAVYYCARG	190

40

【表 6】

		<u>NWDDYWGQGT</u> TTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR <u>ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA</u> <u>TYYCQOHNKYPYTFGGG</u> TKVEIK	
CD123	hzCAR -4	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG <u>NWDDYWGQGT</u> TTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSDVMTQSPDSLAVSLGERATINCR <u>ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVDPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA VYYCQOHNKYPYTFGGGTKVEIK	191
CD123	hzCAR -5	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFATYYCQOHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTTVTVSS	192
CD123	hzCAR -6	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQOHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTTVTVSS	193
CD123	hzCAR -7	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQOHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTTVTVSS	194
CD123	hzCAR -8	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTTVTVSS	195
CD123	hzCAR -9	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG <u>NWDDYWGQGT</u> TTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR <u>ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT</u> ISSLPEDFA <u>TYYCQOHNKYPYTFGGG</u> TKVEIK	196
CD123	hzCAR -10	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG <u>NWDDYWGQGT</u> TTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVLTQSPATLSLSPGERATLSCR	197

10

20

30

40

【表 7】

		ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHKNKYPYTFGGGKVEIK	
CD123	hzCAR -11	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDAA TYCQQHKNKYPYTFGGGKVEIK	198
CD123	hzCAR -12	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDVA VYYCQQHKNKYPYTFGGGKVEIK	199
CD123	hzCAR -13	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQHKNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS	200
CD123	hzCAR -14	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHKNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS	201
CD123	hzCAR -15	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDAAVYYCQQHKNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS	202
CD123	hzCAR -16	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDVAVYYCQQHKNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS	203
CD123	hzCAR -17	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA	204

10

20

30

40

【表 8】

		TYYCQQH NKYPYTFGGG TKVEIK	
CD123	hzCAR -18	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQH NKYPYTFGGG TKVEIK	205
CD123	hzCAR -19	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELEADA TYYCQQH NKYPYTFGGG TKVEIK	206
CD123	hzCAR -20	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSELEADA VYYCQQH NKYPYTFGGG TKVEIK	207
CD123	hzCAR -21	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTSQSPFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFATYYCQQH NKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARGNWDDYWGQGTTVTVSS	208
CD123	hzCAR -22	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTSQSPATLSLSPGERATLSRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQH NKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARGNWDDYWGQGTTVTVSS	209
CD123	hzCAR -23	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELEADAATYYCQQH NKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARGNWDDYWGQGTTVTVSS	210
CD123	hzCAR -24	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSELEADAVYYCQQH NKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARGNWDDYWGQGTTVTVSS	211

10

20

30

40

【表 9】

CD123	hzCAR -25	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRI ~~DPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG~~ NWDDYWGQGT ~~TTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDVQLTQSPSFLSASVGRVTITCR~~ ~~ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA~~ TYYCQQH ~~NKYPYTFGGG~~ TKVEIK	212
CD123	hzCAR -26	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRI ~~DPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG~~ NWDDYWGQGT ~~TTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSEVLTQSPATLSLSPGERATLSCR~~ ~~ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFA~~ VYYCQQH ~~NKYPYTFGGG~~ TKVEIK	213
CD123	hzCAR -27	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRI ~~DPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG~~ NWDDYWGQGT ~~TTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR~~ ~~ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTTFTISLEAEDAA~~ TYYCQQH ~~NKYPYTFGGG~~ TKVEIK	214
CD123	hzCAR -28	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRI ~~DPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG~~ NWDDYWGQGT ~~TTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDVMTQSPDSLAVSLGERATINCR~~ ~~ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVA~~ VYYCQQH ~~NKYPYTFGGG~~ TKVEIK	215
CD123	hzCAR -29	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQH ~~NKYPYTFG~~ GGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRI ~~DPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA~~ VYYCARGNWDDYWGQGT ~~TTVTVSS~~	216
CD123	hzCAR -30	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQH ~~NKYPYTFG~~ GGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRI ~~DPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA~~ VYYCARGNWDDYWGQGT ~~TTVTVSS~~	217
CD123	hzCAR -31	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTTFTISLEAEDAATYYCQQH ~~NKYPYTFG~~ GGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRI ~~DPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA~~ VYYCARGNWDDYWGQGT ~~TTVTVSS~~	218
CD123	hzCAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK	219

【 0 4 2 0 】

10

20

30

40

【表 10】

	32	PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQHKNKPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTITVTVSS	
EGFR vIII	huscFv1	Eiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitad tstntvymelssrsedtavyycfrggyvywgqgtttvssggggsgggsgggsgggsgsdvmtqspdsia vslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavy ycwqgthfpgtfgggtkveik	220
EGFR vIII	huscFv2	Dvmtqspdsilavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdf tltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatv kiscksgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelssrsedtav yycafrggyvywgqgtttvss	221
EGFR vIII	huscFv3	Eiqlvqsgaevkkpgeslrisksgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisad tsintvylqwsslkasdtamyycafrggyvywgqgtttvssggggsgggsgggsgggsgsdvmtqspslp vtlqgpasickssqslldsdgktylnwlqrpqgsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgv yycwqgthfpgtfgggtkveik	222
EGFR vIII	huscFv4	Dvmtqspslpvtlqgpasickssqslldsdgktylnwlqrpqgsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftl kisrveaedvgvyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslr iscksgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasda mmycafrggyvywgqgtttvss	223
EGFR vIII	huscFv5	Eiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitad tstntvymelssrsedtavyycfrggyvywgqgtttvssggggsgggsgggsgggsgsdvmtqspslp vtlqgpasickssqslldsdgktylnwlqrpqgsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgv ycwqgthfpgtfgggtkveik	224
EGFR vIII	huscFv6	Eiqlvqsgaevkkpgeslrisksgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisad tsintvylqwsslkasdtamyycafrggyvywgqgtttvssggggsgggsgggsgggsgsdvmtqspdsia vslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavy ycwqgthfpgtfgggtkveik	225
EGFR vIII	huscFv7	Dvmtqspdsilavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdf tltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslr iscksgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasda mmycafrggyvywgqgtttvss	226
EGFR vIII	huscFv8	Dvmtqspslpvtlqgpasickssqslldsdgktylnwlqrpqgsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftl kisrveaedvgvyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatv kiscksgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelssrsedtav yycafrggyvywgqgtttvss	227

10

20

30

40

【表 1 1】

EGFR vIII	Mu310 C	eiqlqqsgaelvkpgasvklscetgsfniedyyihwvkqrteqglewigridentkygpfqgratitadtssn tvylqlssitsedavvycafrgvywpggtltvssggggsgggsgggshmdvmtqsphtlsvaigqsasis ckssqslldsdgktylnwllqrpqspkrlislvskldsgvpdrftgsgsgtdftlrisrveaedlgiycwqgthfpg tfggggkleik	228
メソチリン	ssI (mu)	Q V Q L Q Q S G P E L E K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y T M N W V K Q S H G K S L E W I G L I T P Y N G A S S Y N Q K F R G K A T L T V D K S S S T A Y M D L L S L T S E D S A V Y F C A R G G Y D G R G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I E L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P G R F S G S G S G N S Y S L T I S S V E A E D D A T Y Y C Q Q W S G Y P L T F G A G T K L E I	229
メソチリン	M5 (ヒト)	QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCASGYTFTDYMHVVRQAPQGLEWMGWINPNS GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASVGRVTITCR ASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK	234
メソチリン	M11 (ヒト)	QVQLQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVVRQAPQGLEWMGWINPNS GGTNYAQNFQGRVTMTRDTSISTAYMELRRLSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIRMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQ SIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK	240
メソチリン	M1 (ヒト)	QVQLQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVVRQAPQGLEW MGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYC ARGRYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSEIVLTQS PATLSLSPGERATISCRASQSVSSNFAWYQQRPGQAPRLLIYDASNRATGIP PRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAAYYCHQRSNWLTYTFGQGTKVDIK	230
メソチリン	M2 (ヒト)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVVRQAPQGLEWMGWINPNS GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDLRRTVVT PRAYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSTLS ASVGRVTITCRASQDISNSLNWYQQKAGKAPKLLIYDASTLETGVPSRFSG SGSGTDFSTFTISSLPEDIATYYCQHDNLPLTFGQGTKVEIK	231
メソチリン	M3	QVQLVQSGAEVKKPGAPVKVSCASGYTFTGYMHVVRQAPQGLEWMGWINPNS	232

10

20

30

40

【 0 4 2 1】

【表 1 2】

	(ヒト)	<u>GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRLSDDTAVYYCARGEWGDSYDYW</u> <u>GQGT</u> <u>LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQTPSSLSASVGDRVTITCRA</u> <u>SQSINTYLNWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLQP</u> <u>EDFATYYCQQSFSP</u> <u>LT</u> <u>FGGGTKLEIK</u>	
メソテリン	M4 (ヒト)	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTFSSYMHVVRQVPGKGLVWVS</u> <u>RINTDG</u> <u>STTTYADSV</u> <u>EGRFTISRDN</u> <u>AKNTLYLQMN</u> <u>SLRDDTAVYYCVGGHWAVWGQ</u> <u>TTV</u> <u>TVSSGGGSGGGGSGGGGSDI</u> <u>QMTQSP</u> <u>STLSASVGDRVTITCRASQ</u> <u>SISD</u> <u>RLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLE</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTEFTLT</u> <u>ISSLQPD</u> <u>FAVY</u> <u>YCQYGHLP</u> <u>MYTF</u> <u>GQGT</u> <u>KVEIK</u>	233
メソテリン	M6 (ヒト)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGI</u> <u>INPSG</u> <u>GSTSYAQKFQGRVTMTRDTS</u> <u>TVMELSSLR</u> <u>SEDTAVYYCARYRLIAVAGD</u> <u>YYY</u> <u>YGM</u> <u>DVWGQ</u> <u>TMVT</u> <u>VSSGGGSGGGGSGGGGSDI</u> <u>QMTQSPSSVSASVGDRV</u> <u>TITCRASQGVGRWLAWYQQKPGTAPKLLIYAAS</u> <u>TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>INN</u> <u>LQPEDFATYYCQ</u> <u>ANSF</u> <u>PLTF</u> <u>GGGTRLEIK</u>	235
メソテリン	M7 (ヒト)	<u>QVQLVQSGGGVVPGRSLRLS</u> <u>CAASGFTFSSYAMHVVRQAPGKGLEWVA</u> <u>ISYDG</u> <u>SNKYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCARW</u> <u>KVSSSPAFDY</u> <u>WGQGT</u> <u>LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERA</u> <u>ILSCR</u> <u>ASQSVYTKYLGWYQQKPGQAPRLLIYDA</u> <u>STRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>INRL</u> <u>EPEDFAVYYCQHYGGS</u> <u>PLIT</u> <u>FGQGT</u> <u>RLEIK</u>	236
メソテリン	M8 (ヒト)	<u>QVQLQQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKTSGYPFTGYSLHWVRQAPGQGLEWMG</u> <u>WINPNS</u> <u>GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRLSDDTAVYYCARDHYG</u> <u>GNLSFYWG</u> <u>QGT</u> <u>LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI</u> <u>QLTQSPSSISASVGDTV</u> <u>SITCRAS</u> <u>QDSGTW</u> <u>LAWYQQKPGKAPNLLMYDASTLEDG</u> <u>VPSRFSGSASGTEFTLT</u> <u>VNRLQPE</u> <u>DSATYYCQQYNSYPLTF</u> <u>GGGTKVDIK</u>	237
メソテリン	M9 (ヒト)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVEV</u> <u>SCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGI</u> <u>INPSG</u> <u>GSTGYAQKFQGRVTMTRDTS</u> <u>TVHME</u> <u>SSLRSEDTAVYYCARGGYSSSSDA</u> <u>FDI</u> <u>WGQGT</u> <u>MVT</u> <u>VSSGGGSGGGGSGGGGSDI</u> <u>QMTQSP</u> <u>PSLSASVGDRVTITCR</u> <u>ASQDISSALAWYQQKPGTPPKLLIYDASSLE</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLQ</u> <u>PEDFATYYCQFESSYPLTF</u> <u>GGGTRLEIK</u>	238
メソテリン	M10 (ヒト)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMG</u> <u>WISAYN</u> <u>GNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRLSDDTAVYYCARVAGGI</u> <u>YYYYGMD</u> <u>VWGQGT</u> <u>TTITVSSGGGSGGGGSGGGGSDI</u> <u>VMTPD</u> <u>SLAVSLGERATISC</u> <u>KSSHSVLYNRNKNYLAWYQQKPGQPPKLLFYWASTR</u> <u>KSGVPDRFSGSGSGTDFT</u> <u>LT</u> <u>ISSLQPEDFATYFCQQTQTFPLTF</u> <u>GQGT</u> <u>RLEIN</u>	239
メソテリン	M12 (ヒト)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMG</u> <u>RINPNS</u> <u>GGTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRLSDDTAVYYCARTT</u> <u>TSYAFDIWGQ</u>	241

10

20

30

40

【表 1 3】

		GTMVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSTLSASVGDRTTITCRASQ SISTWLAWYQQKPGKAPNLLIYKASTLES ~~GVPSRFS~~ SGSGSGTEFTLTITSSLQPD FATYYCQYNTYSPYTFGQGTKLEIK	
メソテリン	M13 (ヒト)	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCEASGFI ~~FSDYYM~~ GWIRQAPGKGLEWVS ~~YIGRSG~~ SSMYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN ~~SLRAEDTAVYYCAASPVVAATEDFQH~~ WGQGT ~~LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQT~~ PATLSLSPGERATLSCR ASQSVTSNYLAWYQQKPGQAPRLL ~~LF~~ GA ~~STRATG~~ IPDRFSGSGSGTDFTLTINRL EPEDFAMYYCQYGSAPVTFGQGTKLEIK	242
メソテリン	M14 (ヒト)	QVQLVQSGAEVRAPGASVKISCKASGFTFRGYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSG GSRAYAQKFQGRVTMT ~~TRDTSTSTV~~ MELSSLRSDDTAMYYCARTASCGGDCYYLD YWQGT ~~LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDI~~ QMTQSPPTLSASVGDRTTITC RASENVNIWLAWYQQKPGKAPKLLIYKSSSLASGVPSRFS ~~SGSGAEFTLT~~ ISSL QPDDFATYYCQYQSYPLTFGGGTKVDIK	243
メソテリン	M15 (ヒト)	QVQLVQSGGGLVQPGSRSLRLS ~~CAASGFTFDDYAM~~ HWRQAPGKGLEWVSGISWNS GSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN ~~SLRAEDTAVYYCAKDGSSSWSGYFD~~ YWQGT ~~LVTVSSGGGGSGGGSGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVR~~ TTCQGDALR SY ~~YASWYQQKPGQAPMLVIY~~ GKNNRPSGIPDRFSGSDSGDTASLTITGAQAEDEA DY ~~YCNSRDSSGYPV~~ FGTGKTVL	244
メソテリン	M16 (ヒト)	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLS ~~CAASGFTFDDYAM~~ HWRQAPGKGLEWVSGISWNS GSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN ~~SLRAEDTALYYCAKDSSSWYGGGSAF~~ DIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGSSSELTQEP ~~AVSVALGQTVRITCQGD~~ SL RSYYASWYQQKPGQAPVLVIFGRSRRPSGIPDRFSGSSSGNTASLIITGAQAEDE ADYYCNSRDNTANHYVFGTGKTVL	245
メソテリン	M17 (ヒト)	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLS ~~CAASGFTFDDYAM~~ HWRQAPGKGLEWVSGISWNS GSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN ~~SLRAEDTALYYCAKDSSSWYGGGSAF~~ DIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD ~~SL~~ RSYYASWYQQKPGQAPVLVIY ~~GKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDE~~ ADYYCNSRGSSGNHYVFGTGKTVL	246
メソテリン	M18 (ヒト)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS ~~CAASGFTFSSYWM~~ HWRQAPGKGLVWVSRINSDG SSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMN ~~SLRAEDTAVYYCVRTGWVGSYYYMD~~ VWGKGT ~~TVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPGTL~~ SLSPGERATLSC RASQSVSSNYLAWYQQKPGQP ~~PRLLIYDV~~ STRATGIPARFSGGGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPPWTFGQGTKVEIK	247
メソテリン	M19 (ヒト)	QVQLVQSGGGVVQPGSRSLRLS ~~CAASGFTFSSYGM~~ HWRQAPGKGLEWVA ~~VISYDG~~ SNKYYADSVKGRFTISRDN ~~SKNTLYLQMN~~ SLRAEDTAVYYCAKGY ~~SRYYYGMDV~~ WGQGT ~~TVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSEIVMTQSPATLSL~~ SPGERAILSCR	248

10

20

30

40

【表 1 4】

		ASQSVYTKYLGWYQQKPGQAPRLLIYDASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTINRL EPEDFAVYYCQHYGGSPILITFGQGTKVDIK	
メソテリン	M20 (ヒト)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKREAAAGHDWYFD LWGRGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIRVTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSIPLTFGQGTKVEIK	249
メソテリン	M21 (ヒト)	QVQLVQSWAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSG GSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSNLRSEDTAVYYCARS PRVTITGYFDYW GQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGDRVITITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQ DDFATYYCQQYSSYPLTFGGGTRLEIK	250
メソテリン	M22 (ヒト)	QVQLVQSGAEVRRPGASVKISCRASGDTSTRHYIHWLRQAPGQGP EWMGVINPTT GPATGSPAYAQMLQGRVTMTTRDTSTRTVYMELSRLRFEDTAVYYCARS VVGRSAP YFDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGISDYSAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISY LQSEDFATYYCQQYSSYPLTFGGGTKVDIK	251
メソテリン	M23 (ヒト)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSG GYTTYAQKFQGR LTMTRDTSTSTVYMELSL RSEDTAVYYCARIRSCGGDCYFD NWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGDRVITITC RASENVNIWLAWYQQKPGKAPKLLIYKSSSLAS GVP SRFSGSGSGAEFTLTISL QPDDFATYYCQQYQSYPLTFGGGTKVDIK	252
メソテリン	M24 (ヒト)	QITLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGVHVGWIRQPPGKALEWLALISW ADDKRYRPSLRSLRDLITRVTSKDVVLSMTNMQPEDTATYYCALQGF DGYEAWNG PGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASAGDRVITITCRAS RGISSALAWYQQKPGKPPKLLIYDASSLES GVP SRFSGSGSGTDFTLTIDSLEPE DFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVDIK	253
CLL-1	139115 (ヒト)	EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSL RSEDTAVYYCARDLEMATIMGGYWGQGT LVTVSSGG GGSGGGSGGGGQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSTLDVVFGGGTKL TVL	254
CLL-1	139116 (ヒト)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSLISGDGGSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARVDSY YMDVWGKGTITVTVSSGGGG SGGGGSGSGGSEIVLTQSPLSLPVTGQPASISCRSSQSLVYTDGNTYLNWFQQRPGQSPR RLIYKVSNRD SGVPDRFSGSGSDTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGTHWSFTFGGTRLEI	255

10

20

30

40

【表 1 5】

		K	
CLL-1	139118 (ヒト)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIROPKGLWIGSIYYSGSTYY NPSLKSRSVISVDTSKNQFSLKLYVTAADTAVYYCATPGTYDFLSGYYPFYWGQGLVT VSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKA PKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPYTFGGQTKL EIK	256
CLL-1	139122 (ヒト)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLWVANINEDGSAFYV DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLRSGRYWGQGLVTVSSGGGGSG GGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGGRATLSCRASQISGSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPTFGLGKLEIK	257
CLL-1	139117 (ヒト)	EVQLQQSGPGLVRPSETLSLTCTVSGGVPVRSRGSHYWNWIROPKGLWIGIYYSGSTNY NPSLENRVTISIDTSNNHFSKLSSVTAADTALYFCARGTATFDWNFPDSDWGQGLVTVS SGGGGGGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASIGDRTITCRASQISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKLEI K	258
CLL-1	139119 (ヒト)	QVQLQESGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGFSGYVSWIROPKGLWVGEINHSGSTNYP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSGLVVYAIRVSGWFDYWGQGLTV TVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISSYLNWYQQKPGK APKLLMYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGT KVDIK	259
CLL-1	139120 (ヒト)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLWVSSISSSSSYIYYA DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDPSSSGSYMEDSYIYGMDVWGQ TTVTVSSGGGGSGGGSGGGSNFMLTQPHSVSESFGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQ RPGSAPTIVIEDNQRPSPVDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEADYCYCQSYDSSNQV VFGGGTKLTVL	260
CLL-1	139121 (ヒト)	QVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLWVSYISSSGSTIYYA DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCAREALGSSWEWGQGTTVTVSSGGGG GGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDA SNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQYDNLPFTFGGGTKLEIK	261
CLL-1	146259 (ヒト)	QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKAPANTFSDHVMHWVRQAPQRFEWMGYIHAANGGTHYS QKFQDRVTITRDTANTVYMDLSSLRSEDVAVYFCARGGYNDAFDIWGQGTMTVTVSSGGG GSGGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDISWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFNGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKE IK	262
CLL-1	146261 (ヒト)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLWVSYISSSSSTIYYA DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLSVRAIDAFDIWGQGTMTVTVSSG	263

10

20

30

40

【0 4 2 3】

【表 16】

		GGSGGGGGGGGGGGGGSDIVLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQKPGK APKLLIYDASNLETGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQAYSTPFTFGPGTK VEIK	
CLL-1	146262 (ヒト)	EVQLVQSGGGVVRSGRSLRLSCAASGFTFNSYGLHWVRQAPGKGLEWVALIEYDGSNKYYG DSVKGRFTISRDKSKSTLYLQMDNLRAEDTAVYYCAREGNEDLAFDIWGQGTILTVSSGGG GSGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQFIKKNLNWYQHKPGKAP KLLIYDASSLQTVPSRFRSGNRSGTTFSTISSLQPEDVATYYCQHNDLPLTFGGGKVE IK	264
CLL-1	146263 (ヒト)	QVQLVSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGPNVSSNYMTWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGATYYGD SVKGRFTVSRDNSKNTVYLQMNRLTAEDTAVYYCARDRLYCGNNCYLYYYGMDVWGQGT LTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWY QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPFL TFGQGTKEIK	265
CLL-1	146264 (ヒト)	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSCASGYPTGYIYQWVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGNTGYA QKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCASDSYGYYYGMDVWGQGTILTVSSGG GGSGGGGGGGGGGGGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQKPGKP PKLLIYDASSLESQVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGFNNYPLTFGGGKTV EIK	266
CLL-1	181268 (ヒト)	EVQLVSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYA DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDPYSSSWHDAFDIWGQGTMTVSS GGGGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPLTFGGGKVDI K	267
BCMA	139103 (ヒト)	QVQLVSGGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLGWVSGISRSAGENTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRDEDTAVYYCARSPAHYGGMDVWGQGTITVTVSSAS GGGGSGGRASGGGGSDIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLAWYQKPGQAPR LLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQYHSSPSWTFGQGTKE IK	268
BCMA	139105 (ヒト)	QVQLVSGGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYYA DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCSVHSFLAYWGQGTILTVTVSSASGGGG GGRASGGGGSDIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHSNGYNYLDWYLQKPGQPQL LIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKEIK	269
BCMA	139111 (ヒト)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNGMSWVRAPGKGLEWVSGIVYSGSTIYYA SVKGRFTISRDNKRNTLYLQMNLSRPEDTAIYYCSAHGGESEVWGQGTITVTVSSASGGGG GGRASGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGPASISCKSSQSLLRNDGKTPLYWYLQKAGQPPQL LIYEVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGAAYCMQNIQFSPFGGKKEIK	270

10

20

30

40

【表 17】

BCMA	139100 (ヒト)	QVQLVQSGAEVRKTGASVKVSCKASGYIFDNFGINWVRQAPGQGLEWMGWINKNNNTNYA QKFQGRVTITADESTNTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFYYSYMDVWGQGTMTVTVSSAS GGGGSGGRASGGGSDIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHSGNYLNWYLQKPG QSPQLLIYLGSKRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLHITRVGAEDVGVIYCMQALQTFYTFGQGT KLEIK	271
BCMA	139101 (ヒト)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTTYAA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKLDSSGYIYARGPRYWGQGTMTVTVS SASGGGGSGGRASGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPGKA PKLLIYGASTLASGVDPDRFSGSGSGTHFTLTINSLQSEDSATYYCQSYKRAFGQGTKE IK	272
BCMA	139102 (ヒト)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYA QKFQGRVTMTNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGFYIYMDVWGKGTMTVTVSSASGG GGSGGRASGGGGSEIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLYSNGYNYVDWYLQKPGQS PQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFKLQISRVEAEDVGIIYCMQGRQFPYSFGQGTKV EIK	273
BCMA	139104 (ヒト)	EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAA SVKGRFTISRDN SRNTLYLQMNSLR PEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTMTVTVSSASGGGGS GGRASGGGGSEIVLTQSPATLSVSPGESATLSCRASQSVSSNLAWYQKPGQAPRLLIYGA STRASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYGSSTLFGGGTKVEIK	274
BCMA	139106 (ヒト)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAA SVKGRFTISRDN SRNTLYLQMNSLR PEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTMTVTVSSASGGGGS GGRASGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSKLAWYQKPGQAPRLIMYGA SIRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCQQYGSSTLFGGGTKVEIK	275
BCMA	139107 (ヒト)	EVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAA SVKGRFTISRDN SRNTLYLQMNSLR PEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTMTVTVSSASGGGGS GGRASGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSTNLAWYQKPGQAPRLIYD ASNRATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTLFGGGTKVEIK	276
BCMA	139108 (ヒト)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYA DSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARESGDGMVWGQGTMTVTVSSASGGG GSGGRASGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTLAFGGQGTKVDIK	277
BCMA	139109 (ヒト)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAA SVKGRFTISRDN SRNTLYLQMNSLR PEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTMTVTVSSASGGGGS GGRASGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGGQGTKVEIK	278
BCMA	139110	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSGNTIYYA	279

【0424】

10

20

30

40

【表 18】

	(ヒト)	<u>DSVKGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTMVREDYWGQGT ~~LVTVSSASGGG~~ GSGGRASGGGSDIVLTQSPSLPVTLGQPASISCKSSSESLVHNSGKTYLNWFHQRPQGSP RRLIYEVSNRD <u>SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u> GTHWPGTFGQGTKLE IK	
BCMA	139112 (ヒト)	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRL</u> SCAVSGFALS ~~NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAA~~ <u>SVKGRFTISRDN</u> SRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT ~~TVTVSSASGGGGS~~ GGRASGGGSDIRLTQSPSPLSASVGDRTITCQASEDINKFLNWHQTPGKAPKLLIYDA STLQGTGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPEDIGTYYCQQYESLPLTFGGGKVEIK	280
BCMA	139113 (ヒト)	<u>EVQLVETGGGLVQPGGSLRL</u> SCAVSGFALS ~~NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAA~~ <u>SVKGRFTISRDN</u> SRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT ~~TVTVSSASGGGGS~~ GGRASGGGSETTLTQSPATLSVSPGERATLS ~~CRASQSVGSNLAWYQQKPGQPRLLIYGA~~ STRATGIPARFSGSGSGTEFTLTITSSIQPEDFAVYYCQQYNDWL ~~PVTFGQGTKVEIK~~	281
BCMA	139114 (ヒト)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRL</u> SCAVSGFALS ~~NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAA~~ <u>SVKGRFTISRDN</u> SRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT ~~TVTVSSASGGGGS~~ GGRASGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLS ~~CRASQSIGSSSLAWYQQKPGQAPRLLMYG~~ ASSRASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSP ~~PFTFGQGTKVEIK~~	282
BCMA	149362 (ヒト)	<u>QVQLQESGPGLVKPS</u> ETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSAYY <u>NPSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARHWQEWPDADFIDWGQGT ~~MVTVSSG~~ GGGSGGGSGGGGSETTLTQSPAFMSATPGDKV ~~IISCKASQDIDDAMN~~ WYQQKPGEARLFI IQSATSPVPGIPPRFSGSGSGTDFTLTINNI ~~ESDAAYYFC~~ LQHDN ~~FLPTFGQGTKLEIK~~	283
BCMA	149363 (ヒト)	<u>VNLRESGPALVKPTQ</u> TLTLCTFSGFSLRTSGMCVSWIRQPPGKALEWLARIDWEDK ~~FYS~~ <u>TSLK</u> TRLTISKDTS ~~DNQVLRMTNMDPADTATYYCARS~~ GAGGTSATAFDIWGPGTMVTVSS GGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIYNN ~~LAWFQLKPGSAPRS~~ LMYAANKS ~~QSGVPSRFSGSASGTDFTLTITSSIQPEDFATYYCQHY~~ YRFY ~~SFGQGTKLEIK~~	284
BCMA	149364 (ヒト)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRL</u> SCAASGFTFSY ~~SMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYA~~ <u>DSVKGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK ~~TIAAVYA~~ FDIWQGT ~~TVTVSSGGG~~ GSGGGSGGGGSEIVLTQSPSLPVTPEEPASISCRSSQSL ~~LHSGNGYNYLDWYLQKPGQSP~~ QLLIYLG ~~SNRASGV~~ DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLE IK	285
BCMA	149365 (ヒト)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRL</u> SCAASGFTFS ~~DYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYA~~ <u>DSVKGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLRGA ~~FDIWQGT~~ MVTVSSGGGGS GGGGSGGGSSYVLTQSPSVSAAPGYTATISCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPLLVIR ~~DDS~~ VRPSKIPGRFSGSNSGNMATLTISGVQAGDEADFYCQVWDS ~~SEHVVF~~ GGGKLT ~~VL~~	286
BCMA	149366 (ヒト)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVK</u> VSCKPSGYTVTSHYIHWVRRAPGQGLEWMGMIN ~~FSGGVTAYS~~ <u>QTLQGRVTMTSDTSS</u> TVYME ~~LSLRSEDTAMYYCAREGSGSGWYFDFWGRGTLVTVSSGG~~ GGSGGGSGGGSSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDGLSKKYVSWYQQKAGQSPVVLIS	287

10

20

30

40

【表 1 9】

		<u>RDKERPSGIPDRFSGSNSADTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDDTTVVFGGGTKLTVL</u>	
BCMA	149367 (ヒト)	<u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY</u> <u>NPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARAGIAARLRGAFDIWGQGTMTVTS</u> <u>SGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRIITCRASQGIRNWLAWYQQKPGKAPN</u> <u>LLIYAASNLSQGVPSRFRSGSGGADFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPFTFGPGTKVDI</u> K	288
BCMA	149368 (ヒト)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYA</u> <u>QKFGQRTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGYQLLRWDVGLLRSAFDIWGG</u> <u>TMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSVLTQPPSVSVAPGQTARITCGNNIGSKSVHWYQQKP</u> <u>GQAPVLVLYGKNNRPSGVPRFSGSRSGTTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSGSDHLRVF</u> GTGTVTVL	289
BCMA	149369 (ヒト)	<u>EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYS</u> <u>FYAISLKSRIIINPDTSKNQFSLQLKSVTPEDTAVYYCARSSPEGLFLYWFDPWGQGTIVT</u> <u>VSSGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTIRITCQGD SLGNYATWYQQKPGQAP</u> <u>VLVIYGTNNRPSGIPDRFSASSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGHHLFLFGTGK</u> VTVL	290
BCMA	EBB-C1 978-A4 (ヒト)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVEGSGSLDIWGQGTIVTVSSGGGG</u> <u>SGGGGSGGGGSEIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSAYLAWYQQKPGQPRLIIS</u> <u>GASTRATGIPDRFGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFN GSSSLFTFGQGTRLE</u> IK	291
BCMA	EBB-C1 978-G1 (ヒト)	<u>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSRYPM SWVRQAPGKGLEWVSGI</u> <u>SDSGVSTYYADSAKGRFTISRDN SKNTLFLQMSSLRDEDTAVYYCVTRAGSE</u> <u>ASDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS</u> <u>CRASQSVSNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAIYYCQQFGTSSGLTFGGGTKLEIK</u>	292
BCMA	EBB-C1 979-C1 (ヒト)	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNLSRAEDTAIYYCARATYKREL RYYYGMDVWGQGTMTV</u> <u>SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPGTVSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQA</u> <u>PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQYHSSPSWTFGQGT</u> RLEIK	293
BCMA	EBB-19 78-C7 (ヒト)	<u>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN TLKAEDTAVYYCARATYKREL RYYYGMDVWGQGTMTV</u> <u>SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSTLSLSPGESATLSCRASQSVSTFLAWYQQKPGQA</u> <u>PRLLIYGSSNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIRLEPEDFAVYYCQYHSSPSWTFGQGT</u> VEIK	294

10

20

30

40

【 0 4 2 5】

【表 20】

BCMA	EBB-19 78-D10	EVQLVETGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYA DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARVGKAVPDVWGQGT TVTVSSGGGGS GGGGSGGGSDIVMTQTPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQSYSTFPYSGQGTREIK	295
BCMA	EBB-19 79-C12 (ヒト)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMHWVRQRPKGLEWVASINWKGNLAYG DSVKGRFAISRDNKNTVFLQMNSLRDEDTAVYYCASHQGVAIYNYAMDVWGRGTLTVSS GGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRATQSIGSSFLAWYQQRPQGAPR LLIYGASQRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEPEDSAVYYCQHYESSPSWTFGQGTKE IK	296
BCMA	EBB-19 80-G4 (ヒト)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVVYRD GMDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGNGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPRFTFGPGTKVDIK	297
BCMA	EBB-19 80-D2 (ヒト)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIPQTGTFDYWGQGT LTVTVSSGGGG SGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQRPQGAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPSWTFGQGTREIK	298
BCMA	EBB-19 78-A10 (ヒト)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTMSRENDKNSVFLQMNSLRVEDTGVIYCARANY KRELRYYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPGTL LSPGESATLSCRASQRVASNYLAWYQHKGPGQAPSLISGASSRATGVPDRFS GSGSGTDFTLAISRLEPEDSAVYYCQHYDSSPSWTFGQGTKEIK	299
BCMA	EBB-19 78-D4	EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKALVGATGAFDIWGQGT LTVTVSSGG GGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLSSNFLAWYQQKPGQAPGLL IYGASNWATGTPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQYYGTSMPYTFGQGTKEIK	300
BCMA	EBB-19 80-A2 (ヒト)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLWFGEGFDPWGQGT LTVTVSSGGGGS GGGGSGGGSDIVLTQSPSLPVTPEGPASISCRSSQSLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAEDVGVYYCMQALQTPFTFGGKTKVDIK	301
BCMA	EBB-19 81-C3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVGYYDSSGYRDIYGMVWGQGT TV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGTSSRATGISDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSPPKFTFGP GTKLEIK	302

10

20

30

40

【表 2 1】

BCMA	EBB-19 78-G4 (ヒト)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMGWSSGYLGAFDIWGQGTITVTVSS GGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVASSFLAWYQQKPGQAPR LLIYGASGRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGGSPRLTFGGGTKVD IK	303
BCMA	ヒト化 huscFv BCMA1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S N Y W M H W V R Q A P G Q G L E W M G A T Y R G H S D T Y Y N Q K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G A I Y N G Y D V L D N W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y T S N L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y R K L P W T F G Q G T K L E I K R	304
BCMA	ヒト化 huscFv BCMA2	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSNLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YRKLPWTFGQ GTKLEIKRGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVK KPGSSVKVSC KASGGTFSNY WMHWVRQAPG QGLEWMGATYRGHSDTYYNQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME LSSLRSEDTA VYVCARGAIYNGYDVLNDNWGQGTLVTVSS	305
CD33	141643 (ヒト)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS DTRY S PSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLGGS LPDYGM DVWGQGTMTVTVSSA SGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPFLSLPVPGEPAISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTLITFGQG TKVDIK	306
CD33	141644 (ヒト)	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCASGYIFTNYYVHWVRQAPGQGLEWMGI ISPSGGSPTYA QRLQGRVTMTLDLSTSTVYMELSSLTSED TAVYFCARESRLRGNRLGLQSSIFDHWGQGT L VTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSDIRMTQSPPSLSASVGDRVTIPCQASQDINNHLN WYQQK PGKAPQLLIYDTSNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQYENLPLTFGG GTKVEIK	307
CD33	141645 (ヒト)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEDTIRGNYYYYGMDVWGQGTVT VSSASGGGGSGGGGSGGGGSETTLTQSPSSVSASVGDRVSI TCRASQDIDTWLAWYQLKPG KAPKLLMYAASNLOGGVPSRFSGSGSGTDFILTISLQPEDFATYYCQQASIFPPTFGGGT KVDIK	308
CD33	141646 (ヒト)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS DTRY S PSFQGGVTTISADKSITAYLQWSSLRASDSAMYYCARGGSDYDYFDFWGGQGT LVTVSSA	309

10

20

30

40

【0 4 2 6】

【表 2 2】

		SGGGSGGGSGGGSGGGSEIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHSGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPFTFGGG TKVEIK	
CD33	141647 (ヒト)	QVQLVQSGGDLAQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVAVIWPDGGQKYIG DSVKGRFTVSRDNPKNLTLYLQMNSLRAEDTAIYYCVRHFNWDYWGQGLTVTVSSASGGGG SGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSSLSAYVGGGRVTITCQASQGISQFLNWFQKPKGKAPKLLISD ASNLEPGVPSRFSGSGSGTDFTFTITNLQPEDIATYYCQQYDDLPLTFGGGKTKVEIK	310
CD33	141648 (ヒト)	QVQLVQSGGGVQPGKSLRLSCAASGFTFSIFAMHWVRQAPGKGLEWVATISYDGSNAFYA DSVEGRFTISRDNKDSLRLQMDLRPEDTAVYYCVKAGDGGYDVFDWQGLTVTVSSAS GGGGSGGGSGGGSGGGSEIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHSGYNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPFTFGPGTK VDIK	311
CD33	141649 (ヒト)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKETDYYGSGTDFDYWGQGLTVTVSSA SGGGSGGGSGGGSGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTVISCRAQIGIYLAHYQQRSGKPPQ LLIHGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFASYWCQQSNFPPTFGQGTKEIK K	312
CD33	141650 (ヒト)	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCASGYMFTDFFIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVTKYA QKFGQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCATWYSSGWYGIANLWQGTMTVTVSSA SGGGSGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCQASHDISNYLHWYQKPKGKAPK LLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLQPEDVAAYYCQQSDDLPHFTFGQGTKVDI K	313
CD33	141651 (ヒト)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYIPGDSSTRYA PSFQGVTVISADKSIISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGFSSWGEFDYWGQGLTVTVSSAS GGGGSGGGSGGGSGGGSDIRLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKTKVDIK	314
CD33	2213 (ヒト 化)	NIMLTQSPSSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIY WASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQSEDLAIYYCHQYLSSRTFGGGTKLE IKRGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWI KQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSSLTSEDSA VYYCAREVRLRYFDVWGAGTTTVTVSS	315
CD33	My96 (ヒト 化)	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIY WASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGGQTKLE IKRGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWI KQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFGKATLTADKSSTTAYMQLSSSLTSEDSA VYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS	316

10

20

30

40

【表 2 3】

クローニン 6	muMA B 64A	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYN GGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARDYGFVLDYWGQG TTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSPSISMSVSPGEKVTITCSASSS VSYMHWFQQKPGTSPKLCIYSTSNLASGVPARFSGRSGTSYSLTISRVAEDAA TYYCQQRSNYPPWTFGGGKLEIK	317
クローニン 6	mAb20 6-LCC	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYN GGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARDYGFVLDYWGQG TTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSPAISASVSPGEKVTITCSASSS VSYLHWFQQKPGTSPKLWVYSTSNLPSPGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEEDAA TYYCQQRSIYPPWTFGGGKLEIK	318
クローニン 6	mAb20 6-SUB G	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYN GGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARDYGFVLDYWGQG TTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSPSISMSVSPGEKVTITCSASSS VSYMHWFQQKPGTSPKLGISTSNLASGVPARFSGRSGTSYSLTISRVAEDAA TYYCQQRSNYPPWTFGGGKLEIK	319
WT1	ESK-1	QAVVTQPPSA SGTGQQRVTI SCSSSSNIG SNTVNWYQQV PGTAPKLLIY SNNQRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLQ SEDEADYYCA AWDDSLNGWV FGGGKLTVL GSRGGGGSGG GSGGGGSL MAQMQLVQSG AEVKEPGESL RISCKGSGYS FTNFWISWVR QMPGKGLEWM	320
WT1	WT1-2	QTVVTQPPSA SGTGQQRVTI SCSSSSNIG SNYVYVYQQL PGTAPKLLIYRSNQRPSGVP DRFSGSKSGT SASLAISGPR SVDEADYYCA AWDDSLNGV FGGGKLTVL GSRGGGGSGG GGSGGGGLEM AQVQLVQSGA EVKKGSSVK VSCKASGGTF SSYALSWVRQ APGQGLEWMG GIPIPIGTAN YAQKFQGRVT ITADESTSTA YMELSSLRSE DTAVYYCARR IPPYYGMDVW GQGTITVTVSS	321
WT1	WT1-3	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQSI SYLNWYQQKPK GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG GTKVDIKRSR GGGSGGGGSG GGGGSLEMAQ VQLQSGPGL VKPSQTLST CAISGDSVSS NSAAWNWIRQ SPSRGLWLG RTYYGSKWYN DYAVSVKSRI TINPDTSKNQ FSLQLNSVTP EDTAVYYCAR GRLGDAFDIW GQGTMTVTVSS	322
WT1	WT1-4	DIQMTQSPST LSASVGDRTV ITCRASQIN KWLAWYQQRK GKAPQLLIYK ASSLESQVPS RFSGSGSGTE YTLTISSLQP DDFATYYCQQ YNSYATFGQG TKVEIKRSR GGGSGGGGSG GGGSLEMAQV QLVQSGAEVK KPGESLKISC KSGYNFSNK WIGWVRQLPG RGLEWIAIIY PGYSDITYSP SFQGRVTISA DTSINTAYLH WHSLKASDTA MYVCVRHTAL AGFDYWGLGT LVTVSS	323
WT1	WT1-5	QSVVTQPPSV SVAPGKTARI TCGRNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFG GGTCLTVLGS RGGGGSGGGG	324

【 0 4 2 7 】

10

20

30

40

【表 2 4】

		SGGSLEMAEV QLVQSGGGVV RPPGSLRLSC AASGFTFDDY GMSWVRQAPG KGLEWVSGIN WNGGSTGYAD SVRGRFTISR DNAKNSLYLQ MNSLRAEDTA LYICARERGY GYHDPHDYWG QGTILVTVSS	
WT1	WT1-6	QSVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGSSSNIG AGYDVHWYQQ LPGTAPKLLI YGNSNRPSGV PDRFSGSKSG TSASLAISGL QSEDEADYYC AAWDDSLNGY VFGTGTCLTV LGSRGGGGSG GGSGGGGSSL EMAEVQLVET GGGLLPQPGS LRLSCAASGF SVSGTYMGWV RQAPGKGLEW VALLYSGGGT YHPASLQGRF IVSRDSSKNM VYLQMNLSKA EDTAVYYCAK GGAGGGHFDS WGQGTILVTS S	325
WT1	WT1-7	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSQ IDPWQGETLY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKLT GRFDYWGQGT LVTVSSGGGG SGGGGGGGGG STDIQMTQSP SLSASVGDV VTITCRASQS ISSYLNWYQQ KPGKAPKLLI YSASQLQSGV PSRFGSGSGG TDFTLTITSL QPEDFATYYC QQGPGRNTIF GQGTKEVEIKR A	326

10

【0 4 2 8】

ある態様において、メソテリンに対する抗原結合ドメインは、表 4 に記載する抗メソテリン結合ドメイン、例えば、s s 1、M 1、M 2、M 3、M 4、M 5、M 6、M 7、M 8、M 9、1 0、M 1 1、M 1 2、M 1 3、M 1 4、M 1 5、M 1 6、M 1 7、M 1 8、M 1 9、M 2 0、M 2 1、M 2 2、M 2 3 または M 2 4、例えば、s s 1、M 5 または M 1 1 の抗原結合部分、例えば、C D R である。ある態様において、メソテリンに対する抗原結合ドメインは、表 4 に記載するヒト抗メソテリン結合ドメイン、例えば、M 1、M 2、M 3、M 4、M 5、M 6、M 7、M 8、M 9、1 0、M 1 1、M 1 2、M 1 3、M 1 4、M 1 5、M 1 6、M 1 7、M 1 8、M 1 9、M 2 0、M 2 1、M 2 2、M 2 3 または M 2 4、例えば、M 5 または M 1 1 のヒト抗原結合部分、例えば、C D R である。ある態様において、メソテリンに結合する抗原結合ドメインは、引用により本明細書に包含する WO 2 0 1 5 / 0 9 0 2 3 0 号の表 2 ~ 3 の抗原結合ドメインである。

20

【0 4 2 9】

ある態様において、メソテリンに結合するヒト抗原結合ドメインは、マウス抗原結合ドメイン S 1 (表 4 に示す) により結合されるエピトープと同じエピトープに結合する。ある態様において、メソテリンに結合するヒト抗原結合ドメインは、マウス抗原結合ドメイン S 1 (表 4 に示す) により結合されるエピトープと異なるエピトープに結合する。引用により本明細書に包含させる WO 2 0 1 5 / 0 9 0 2 3 0 号に記載のように、表 4 に記載する M - 5 および M - 1 1 ヒト抗メソテリン結合ドメインは、S S 1 と異なるエピトープに結合する。

30

【0 4 3 0】

ある態様において、C L L - 1 に対する抗原結合ドメインは、R & D、e b i o s c i e n c e s、A b c a m から入手可能な抗体、例えば、P E - C L L 1 - h u C a t # 3 5 3 6 0 4 (BioLegend) ; および P E - C L L 1 (C L E C 1 2 A) C a t # 5 6 2 5 6 6 (B D) の抗原結合部分、例えば、C D R である。ある態様において、C L L - 1 に対する抗原結合部分は、表 4 に記載する抗 C L L - 1 結合ドメイン、例えば、1 3 9 1 1 5、1 3 9 1 1 6、1 3 9 1 1 7、1 3 9 1 1 8、1 3 9 1 1 9、1 3 9 1 2 0、1 3 9 1 2 1、1 3 9 1 2 1、1 3 9 1 2 2、1 4 6 2 5 9、1 4 6 2 6 1、1 4 6 2 6 2、1 4 6 2 6 3、1 4 6 2 6 4 または 1 8 1 2 8 6 の抗原結合部分、例えば、C D R である。

40

【0 4 3 1】

ある態様において、C D 1 2 3 に対する抗原結合ドメインは、表 4 に記載する抗 C D 1 2 3 結合ドメイン、例えば、C D 1 2 3 - 1、C D 1 2 3 - 2、C D 1 2 3 - 3、C D 1 2 3 - 4 または h z C A R 1 - 3 2 の抗原結合部分、例えば、C D R である。ある態様に

50

において、CD123に対する抗原結合ドメインは、引用により本明細書に包含させるWO 2014/130635号の表1～2の抗原結合ドメインである。ある態様において、CD33に対する抗原結合ドメインは、例えば、Bross et al., Clin Cancer Res 7(6):1490-1496 (2001) (Gemtuzumab Ozogamicin, hP67.6), Caron et al., Cancer Res 52(24):6761-6767 (1992) (Lintuzumab, HuM195), Lapusan et al., Invest New Drugs 30(3):1121-1131 (2012) (AVE9633), Aigner et al., Leukemia 27(5): 1107-1115 (2013) (AMG330, CD33 BiTE), Dutour et al., Adv hematol 2012:683065 (2012), and Pizzitola et al., Leukemia doi:10.1038/Lue.2014.62 (2014)に記載される抗体の抗原結合部分、例えば、CDRである。ある態様において、CD33の抗原結合部分は、表4に記載する抗CD33結合ドメイン、例えば、141643、141644、141645、141646、141647、141648、141649、141650、141651、2213またはMy96の抗原結合部分、例えば、CDRである。

【0432】

ある態様において、GD2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Mujoo et al., Cancer Res. 47(4):1098-1104 (1987); Cheung et al., Cancer Res 45(6):2642-2649 (1985), Cheung et al., J Clin Oncol 5(9):1430-1440 (1987), Cheung et al., J Clin Oncol 16(9):3053-3060 (1998), Handgretinger et al., Cancer Immunol Immunother 35(3):199-204 (1992)に記載する抗体の抗原結合部分、例えば、CDRである。ある態様において、GD2に対する抗原結合ドメインは、mAb 14.18、14G2a、ch14.18、hu14.18、3F8、hu3F8、3G6、8B6、60C3、10B8、ME36.1および8H9から選択される抗体の抗原結合部分であり、例えば、WO2012033885号、WO2013040371号、WO2013192294号、WO2013061273号、WO2013123061号、WO2013074916号およびWO201385552号参照のこと。ある態様において、GD2に対する抗原結合ドメインは、米国公開20100150910号またはPCT公開WO2011160119号に記載の抗体の抗原結合部分である。

【0433】

ある態様において、BCMAに対する抗原結合ドメインは、例えば、WO2012163805号、WO200112812号およびWO2003062401号に記載する抗体の抗原結合部分、例えば、CDRである。ある態様において、bcmaに対する抗原結合ドメインは、表4に記載する抗bcma結合ドメイン、例えば、139100、139101、139102、139103、139104、139105、139106、139107、139108、139109、139110、139111、139112、139113、139114、149362、149363、149364、149365、149366、149367、149368、149369、EB C1978-A4、EB C1978-G1、EBB C1978-C7、EBB C1978-D10、EBB C1978-A10、EBB C1978-D4、EBB C1978-G4、EBB C1979-C1、EBB C1979-C12、EBB C1980-G4、EBB C1980-D2、EBB C1980-A2、EBB C1981-C3、huscFvBCMA1またはhuscFvBCMA2の抗原結合部分、例えば、CDRである。

【0434】

ある態様において、WT1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Dao et al., Sci Transl Med 5(176):176ra33 (2013); またはWO2012/135854号に記載する抗体の抗原結合部分、例えば、CDRである。ある態様において、WT1に対する抗原結合ドメインは、表4に記載する抗WT1結合ドメイン、例えば、ESK1、WT1-2、WT1-3、WT1-4、WT1-5、WT1-6またはWT1-7の抗原結合部分、例えば、CDRである。

【0435】

ある態様において、CLDN6に対する抗原結合ドメインは抗体IMAB027 (Ganym

10

20

30

40

50

ed Pharmaceuticals)の抗原結合部分、例えば、C D Rであり、例えば、clinicaltrial.gov/show/NCT02054351参照のこと。ある態様において、C L D N 6に対する抗原結合ドメインは、表4に記載する抗C L D N 6結合ドメイン、例えば、m u M A B 6 4 A、m A b 2 0 6 - L C Cまたはm A b 2 0 6 - S U B Gの抗原結合部分、例えば、C D Rである。
【0436】

ある態様において、抗原結合ドメインは、上記抗体からの1、2、3(例えば、全3)重鎖C D R、H C C D R 1、H C C D R 2およびH C C D R 3および/または上記抗体からの1、2、3(例えば、全3)軽鎖C D R、L C C D R 1、L C C D R 2およびL C C D R 3を含む。ある態様において、抗原結合ドメインは、上記抗体の重鎖可変領域および/または可変軽鎖領域を含む。

10

【0437】

非抗体スキファールド

ある態様において、抗原結合ドメインは、非抗体スキファールド、例えば、フィブロネクチン、アンキリン、ドメイン抗体、リボカリン、小型モジュラー免疫医薬、マキシボディ、プロテインAまたはアフィリンを含む。非抗体スキファールドは、細胞の標的抗原に結合する能力を有する。ある態様において、抗原結合ドメインは、細胞に発現される天然に存在するタンパク質のポリペプチドまたはそのフラグメントである。ある態様において、抗原結合ドメインは、非抗体スキファールドを含む。多種多様な非抗体スキファールドを、得られたポリペプチドが、標的細胞の標的抗原に特異的に結合する少なくとも1結合領域を含む限り、用いることができる。

20

【0438】

非抗体スキファールドは：フィブロネクチン(Novartis, MA)、アンキリン(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、ドメイン抗体(Domantis, Ltd., Cambridge, MA, およびAblynx nv, Zwijnaarde, Belgium)、リボカリン(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小型モジュラー免疫医薬(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、マキシボディ(Avidia, Inc., Mountain View, CA)、プロテインA(Affibody AG, Sweden)、およびアフィリン(ガンマークリスタリンまたはユビキチン)(Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)を含む。

【0439】

フィブロネクチンスキファールドは、フィブロネクチンIII型ドメイン(例えば、フィブロネクチンIII型の第十モジュール(¹⁰Fn3ドメイン))に基づき得る。フィブロネクチンIII型ドメインは、7個または8個のベータ鎖を有し、これは2個のベータシート間に分散され、これらのシート自体、タンパク質のコアを形成するように互いに包み合い、さらにループを含み(C D Rに類似)、これはベータ鎖を互いに連結し、溶媒暴露されている。ベータシートサンドイッチの各端に少なくとも3種のこのようなループが存在し、該端はベータ鎖の方向に垂直なタンパク質の境界である(U S 6, 8 1 8, 4 1 8号参照)。この構造のため、この非抗体スキファールドは、このような抗体の性質および親和性が似ている、抗原結合特性を模倣する。これらのスキファールドは、インビボの抗体親和性成熟過程に類する、インビトロのループ無作為化およびシャフリング戦略に使用できる。

30

【0440】

アンキリンテクノロジーは、異なる標的への結合のために使用できる、可変領域を担持するためのスキファールドとしてのアンキリン由来反復モジュールを有するタンパク質の使用に基づく。アンキリン反復モジュールは、2個の逆平行α螺旋およびβターンからなる33アミノ酸ポリペプチドである。可変領域の結合は、リボソームディスプレイを使用して、大部分最適化される。

40

【0441】

アビマーは、H E R 3のような天然Aドメイン含有タンパク質由来である。これらのドメインは、タンパク質-タンパク質相互作用のために天然で使用され、ヒトにおいて、250を超えるタンパク質が、構造上Aドメインに基づく。アビマーは、アミノ酸リンカーにより連結された多数の異なる“Aドメイン”モノマー(2~10)からなる。アビマーは

50

、例えば、米国特許出願公開 20040175756 号；20050053973 号；20050053973 号；20050048512 号；および 20060008844 号に記載の方法を使用して、標的抗原に結合できるように製造できる。

【0442】

アフィボディ親和性リガンドは、プロテイン A の I g G 結合ドメインの一つのスキファフォールドを基礎とする 3 重螺旋束からなる、小さい、単純タンパク質である。プロテイン A は、細菌スタフィロコッカス・アウレウスからの表面タンパク質である。このスキファフォールドドメインは 58 アミノ酸からなり、そのうち 13 個は、多数のリガンドバリエーションを含むアフィボディライブラリーの製造のために無作為化される(例えば、US 5,831,012 号参照)。アフィボディ分子は抗体を模倣し、150 kDa である抗体分子量と比較して、6 kDa の分子量を有する。その小さいサイズにもかかわらず、アフィボディ分子の結合部位は抗体のものに類似する。

10

【0443】

タンパク質エピトープ模倣物(P E M)は、タンパク質-タンパク質相互作用に関する主要二次構造である、タンパク質のベータ-ヘアピン二次構造を模倣する中程度のサイズの、環状、ペプチド様分子(MW 1 ~ 2 kDa)である。

【0444】

各々抗原結合ドメイン(C M E R)を含む複数のキメラ膜包埋受容体を有する細胞で、当該 C M E R の抗原結合ドメイン間の相互作用が、例えば、抗原結合ドメインの 1 以上がその同族抗原と結合する能力ことを阻害するため、望ましくないことがあることが判明した。したがって、ここに開示されるのは、同じ細胞で発現されたとき、このような相互作用が最小化された抗原結合ドメインを含む、第一および第二の天然に存在しない C M E R である。ある態様において、複数の C M E R は、2 T C A R を含む。ある態様において、複数の C M E R は T C A R および他の C M E R を含む。ある態様において、複数の C M E R は 2 N K R - C A R を含む。ある態様において、複数の C M E R は N K R - C A R および他の C M E R を含む。ある態様において、複数の C M E R は T C A R および N K R - C A R を含む。

20

【0445】

ある態様において、本願発明は第一および第二の C M E R を含む、ここで、該第一 C M E R および該第二 C M E R の一方の抗原結合ドメインは、可変軽ドメインおよび可変重ドメインを含まない。ある態様において、該第一 C M E R および該第二 C M E R の一方の抗原結合ドメインは s c F v であり、他方は s c F v ではない。ある態様において、該第一 C M E R および該第二 C M E R の一方の抗原結合ドメインは、単一 V H ドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一 V H ドメインまたはヒトまたはマウス配列由来の単一 V H ドメインまたは非抗体スキファフォールドを含む。ある態様において、該第一 C M E R および該第二 C M E R の一方の抗原結合ドメインは、ナノボディを含む。ある態様において、該第一 C M E R および該第二 C M E R の一方の抗原結合ドメインは、ラクダ科 V H H ドメインを含む。

30

【0446】

ある態様において、該第一 C M E R および該第二 C M E R の一方の抗原結合ドメインは s c F v を含み、他方は単一 V H ドメイン、例えば、ラクダ科、サメもしくはヤツメウナギ単一 V H ドメインまたはヒトもしくはマウス配列由来の単一 V H ドメインを含む。ある態様において、該第一 C M E R および該第二 C M E R の一方の抗原結合ドメインは s c F v を含み、他方はナノボディを含む。ある態様において、該第一 C M E R および該第二 C M E R の一方の抗原結合ドメインは s c F v を含み、他方はラクダ科 V H H ドメインを含む。

40

【0447】

ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一 C M E R の抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二 C M E R の存在により実質的に低減されない。ある態様において、該第二 C M E R 存在下の該第一 C M E R の抗原結合ドメインのその同族抗原へ

50

の結合は、該第二C M E R非存在下の該第一C M E Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合の85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%である。

【0448】

ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一C M E Rおよび該第二C M E Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合する。ある態様において、該第一C M E Rおよび該第二C M E Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるより85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%少なく互いに結合する。

【0449】

ある態様において、本願発明は第一および第二のK I R-C A Rを含み、ここで、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインは、可変軽ドメインおよび可変重ドメインを含まない。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はs c F vではない。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメインまたはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキャフォールドを含む。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインは、ナノボディを含む。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインは、ラクダ科V H Hドメインを含む。

【0450】

ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方は単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメもしくはヤツメウナギ単一V Hドメインまたはヒトもしくはマウス配列由来の単一V Hドメインを含む。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はナノボディを含む。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方はラクダ科V H Hドメインを含む。

【0451】

ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一K I R-C A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二K I R-C A Rの存在により実質的に低減されない。ある態様において、該第二K I R-C A R存在下の該第一K I R-C A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二K I R-C A R非存在下の該第一K I R-C A Rの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合の85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%である。

【0452】

ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合する。ある態様において、該第一K I R-C A Rおよび該第二K I R-C A Rの抗原結合ドメインは、両者がs c F v抗原結合ドメインであるより85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%少なく互いに結合する。

【0453】

ある態様において、本願発明は第一および第二のT C A Rを含み、ここで、該第一T C A Rおよび該第二T C A Rの一方の抗原結合ドメインは、可変軽ドメインおよび可変重ドメインを含まない。ある態様において、該第一T C A Rおよび該第二T C A Rの一方の抗原結合ドメインはs c F vであり、他方はs c F vではない。ある態様において、該第一T C A Rおよび該第二T C A Rの一方の抗原結合ドメインは、単一V Hドメイン、例えば、ラクダ科、サメまたはヤツメウナギ単一V Hドメインまたはヒトまたはマウス配列由来の単一V Hドメインまたは非抗体スキャフォールドを含む。ある態様において、該第一T C A Rおよび該第二T C A Rの一方の抗原結合ドメインは、ナノボディを含む。ある態様

において、該第一TCARおよび該第二TCARの一方の抗原結合ドメインは、ラクダ科VHHドメインを含む。

【0454】

ある態様において、該第一TCARおよび該第二TCARの一方の抗原結合ドメインはscFvを含み、他方は単一VHドメイン、例えば、ラクダ科、サメもしくはヤツメウナギ単一VHドメインまたはヒトもしくはマウス配列由来の単一VHドメインを含む。ある態様において、該第一TCARおよび該第二TCARの一方の抗原結合ドメインはscFvを含み、他方はナノボディを含む。ある態様において、該第一TCARおよび該第二TCARの一方の抗原結合ドメインはscFvを含み、他方はラクダ科VHHドメインを含む。

10

【0455】

ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一TCARの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二TCARの存在により実質的に低減されない。ある態様において、該第二TCAR存在下の該第一TCARの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合は、該第二TCAR非存在下の該第一TCARの抗原結合ドメインのその同族抗原への結合の85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%である。

【0456】

ある態様において、細胞表面に提示されるとき、該第一TCARおよび該第二TCARの抗原結合ドメインは、両者がscFv抗原結合ドメインであるときより少なく互いに結合する。ある態様において、該第一TCARおよび該第二TCARの抗原結合ドメインは、両者がscFv抗原結合ドメインであるより85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%少なく互いに結合する。

20

【0457】

二特異的CAR

ある態様において、例えば、ここに記載するNKRCARまたはTCARについて、ここに記載する抗原結合ドメインは、多特異的抗体分子、例えば、二特異的抗体分子を含む。二特異性抗体は、2以下の抗原に特異性を有する。二特異性抗体分子は、第一エピトープに対する結合特異性を有する第一免疫グロブリン可変ドメイン配列および第二エピトープに対する結合特異性を有する第二免疫グロブリン可変ドメイン配列により特徴付けられる。ある態様において、第一および第二エピトープは同じ抗原、例えば、同じタンパク質(または多量体タンパク質のサブユニット)である。ある態様において、第一および第二エピトープは重複する。ある態様において、第一および第二エピトープは重複しない。ある態様において、第一および第二エピトープは、異なる抗原、例えば、異なるタンパク質(または多量体タンパク質の異なるサブユニット)にある。ある態様において、二特異性抗体分子は、第一エピトープに結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列ならびに第二エピトープに結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列を含む。ある態様において、二特異性抗体分子は、第一エピトープに結合特異性を有する半抗体および第二エピトープに結合特異性を有する半抗体を含む。ある態様において、二特異性抗体分子は、第一エピトープに結合特異性を有する半抗体またはそのフラグメントおよび第二エピトープに結合特異性を有する半抗体またはそのフラグメントを含む。ある態様において、二特異性抗体分子は、第一エピトープに結合特異性を有するscFvまたはそのフラグメントおよび第二エピトープに結合特異性を有するscFvまたはそのフラグメントを含む。

30

40

【0458】

ある態様において、抗体分子は、多特異性(例えば、二特異性または三特異性)抗体分子である。二特異性またはヘテロ二量体抗体分子を産生するためのプロトコールは当分野で知られる;例えば、US5731168号に記載の、“ノブ・イン・ア・ホール”アプローチ;例えば、WO09/089004号、WO06/106905号およびWO2010/129304号に記載のような静電的ステアリングFc対形成;例えば、WO07/110205号に記載のような鎖交換操作ドメイン(SEED)ヘテロ二量体形成;例えば

50

、WO08/119353号、WO2011/131746号およびWO2013/060867号に記載のようなFabアーム交換；例えば、US4433059号に記載のような、例えば、アミン反応性基とスルフヒドリル反応性基を有するヘテロ二官能性試薬を使用して二特異性構造を製造するための、抗体架橋結合による、二重抗体コンジュゲート；例えば、US4444878号に記載のような、2重鎖間のジスルフィド結合の還元および酸化のサイクルを経る異なる抗体からの半抗体(重-軽鎖対またはFab)の組み換えにより産生する二特異性抗体決定基；例えば、US5273743号に記載のような、3機能性抗体、スルフヒドリル反応性基により架橋された3Fab'フラグメント；例えば、US5534254号に記載のような、生合成結合タンパク質、例えば、C末端テイル、好ましくはジスルフィドまたはアミン反応性化学架橋結合により架橋されたscFvの対；例えば、US5582996号に記載のような、二機能性抗体、例えば、置換された定常ドメインを有する、ロイシンジッパー(例えば、c-fosおよびc-jun)により二量体化された異なる結合特性を有するFabフラグメント；例えば、US5591828号に記載のような、二特異性およびオリゴ特異性一価およびオリゴ価受容体、例えば、一方の抗体のCH1領域と他方の一般に軽鎖を伴う抗体のVH領域の間のポリペプチドスパーサーを経て連結した2抗体(2Fabフラグメント)のVH-CH1領域；例えば、US5635602号に記載のような、二特異性DNA-抗体コンジュゲート、例えば、二本鎖切片のDNAを経た抗体またはFabフラグメントの架橋；例えば、US5637481号に記載のような、二特異性融合タンパク質、例えば、親水性らせん状ペプチドリンカーを間を含み、完全定常領域を含む、2scFvを含む発現構築物；例えば、US5837242号に記載のような、多価および多特異性結合タンパク質、例えば、Ig重鎖可変領域の結合領域を有する第一ドメインおよびIg軽鎖可変領域の結合領域を有する第二ドメインを有し、一般に二重特異性抗体(二特異性、三特異性、四特異性の分子を作るための高次構造も包含される)と呼ばれるポリペプチドの二量体；例えば、US5837821号に記載のような、二特異性/多価分子を形成するように二量体できる、ペプチドスパーサーでさらに抗体ヒンジ領域およびCH3領域に結合した、連結VL鎖およびVH鎖を有するミニボディ構築物；二特異性二重特異性抗体を形成するように二量体を形成できる、いずれかの配向で短ペプチドリンカー(例えば、5または10アミノ酸)またはによりまたはリンカー無しで連結されたVHおよびVLドメイン；例えば、US5844094号に記載のような、三量体および四量体；例えば、US5864019号に記載のような、一連のFV(またはscFv)を形成するようにさらにVLドメインと結合した、C末端で架橋可能基とのペプチド結合により連結した一連のVHドメイン(またはファミリーメンバーにおけるVLドメイン)；および、例えば、US5869620号に記載のような、scFVまたは二重特異性抗体形態の両者を使用して、例えば、ホモ二価、ヘテロ二価、三価および四価構造を形成するように、非共有または化学架橋により多価構造に合わさっている、ペプチドリンカーにより連結してVHドメインおよびVLドメインの両者を有する一本鎖結合ポリペプチドを、例えば、含むが、これらに限定されない。多特異性および二特異性分子およびそれを製造するためのさらなる例は、例えば、US5910573号、US5932448号、US5959083号、US5989830号、US6005079号、US6239259号、US6294353号、US6333396号、US6476198号、US6511663号、US6670453号、US6743896号、US6809185号、US6833441号、US7129330号、US7183076号、US7521056号、US7527787号、US7534866号、US7612181号、US2002004587A1号、US2002076406A1号、US2002103345A1号、US2003207346A1号、US2003211078A1号、US2004219643A1号、US2004220388A1号、US2004242847A1号、US2005003403A1号、US2005004352A1号、US2005069552A1号、US2005079170A1号、US2005100543A1号、US2005136049A1号、US2005136051A1号、US2005163782A1号、US2005266425A

10

20

30

40

50

1号、US2006083747A1号、US2006120960A1号、US2006204493A1号、US2006263367A1号、US2007004909A1号、US2007087381A1号、US2007128150A1号、US2007141049A1号、US2007154901A1号、US2007274985A1号、US2008050370A1号、US2008069820A1号、US2008152645A1号、US2008171855A1号、US2008241884A1号、US2008254512A1号、US2008260738A1号、US2009130106A1号、US2009148905A1号、US2009155275A1号、US2009162359A1号、US2009162360A1号、US2009175851A1号、US2009175867A1号、US2009232811A1号、US2009234105A1号、US2009263392A1号、US2009274649A1号、EP346087A2号、WO0006605A2号、WO02072635A2号、WO04081051A1号、WO06020258A2号、WO2007044887A2号、WO2007095338A2号、WO2007137760A2号、WO2008119353A1号、WO2009021754A2号、WO2009068630A1号、WO9103493A1号、WO9323537A1号、WO9409131A1号、WO9412625A2号、WO9509917A1号、WO9637621A2号、WO9964460A1号に見ることができる。上に引用した出願の内容は、引用によりその全体を本明細書に包含させる。

【0459】

二特異性抗体分子の各抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)内で、VHは、VLの上流でも下流でもよい。ある態様において、上流抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)は、そのVL(VL₁)の上流のそのVH(VH₁)と共に配置され、下流抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)は、そのVL(VL₂)の上流のそのVH(VH₂)と共に配置され、その結果全体的二特異性抗体分子は、配置VH₁-VL₁-VL₂-VH₂を有する。他の態様において、上流抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)は、そのVH(VH₁)の上流のそのVL(VL₁)と共に配置され、下流抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)は、そのVH(VH₂)の上流のそのVL(VL₂)と共に配置され、その結果、全体的二特異性抗体分子は配置VL₁-VH₁-VH₂-VL₂を有する。場合により、リンカーは、2抗体または抗体フラグメント(例えば、scFv)の間、例えば、構築物がVH₁-VL₁-VL₂-VH₂として配列されるならば、VL₁とVL₂の間または構築物がVL₁-VH₁-VH₂-VL₂として配置されるならばVH₁とVH₂の間に配置される。リンカーは、ここに記載するリンカー、例えば、(Gly₄-Ser)_nリンカー(ここで、nは1、2、3、4、5または6、好ましくは4である)であってよい(配列番号63)。一般に、2scFv間のリンカーは、2scFvのドメイン間の誤対合を避けるのに十分長くなければならない。場合により、リンカーは、第一scFvのVLとVHの間に配置される。場合により、リンカーは、第二scFvのVLとVHの間に配置される。複数リンカーを有する構築物において、リンカーのいずれかの2以上は同一でも異なってもよい。よって、ある態様において、二特異性CARは、ここに記載するような配置で、VL、VHおよび場合により1以上のリンカーを含む。

【0460】

ある面において、二特異的抗体分子は、ここに記載する腫瘍抗原に結合特異性を有する、例えば、ここに記載するような、例えば、表4に記載するような、scFvを含むまたはここに記載するscFvからの軽鎖CDRおよび／または重鎖CDRを含む第一免疫グロブリン可変ドメイン配列、例えば、scFvおよび異なる抗原の第二エпитープに結合特異性を有する第二免疫グロブリン可変ドメイン配列により特徴付けられる。ある面において、第二免疫グロブリン可変ドメイン配列は、腫瘍に発現される抗原、例えば、ここに記載する腫瘍抗原に結合特異性を有する。

【0461】

C A R 配列例

ある態様において、ここに記載するN K R - C A RまたはT C A Rは、表5に提供する1以上の配列を含み得る。

【0462】

【表25】

表5. C A Rの種々の要素の配列(a a - アミノ酸配列、n a - 核酸配列)

配列番号	明細	配列
11	EF-1 プロモーター (na)	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCC GAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGC GCGGGGTAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGG GTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCA ACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCT GGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGC AGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCG AGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCT GGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCT GCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAATTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTT TTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTT CGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGT TCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCC CGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGA TGCGCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTC GGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCT CAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTC GATTAGTTCTCGAGCTTTTGAGTACGTCGTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTT TATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGC TTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGGAGTTGGATCTTGG TTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGT CGTGA
1	リーター-(aa)	MALPVTALLPLALLLHAARP
12	リーター-(na)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCC GCTAGACCC
2	CD8ヒンジ (aa)	TTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
13	CD8ヒンジ(na)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCA GCCCCGTGCTCCGTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGAGTGC ACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
3	Ig4ヒンジ(aa)	ESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL

10

20

30

40

【表 2 6】

		PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGKM	
14	Ig4 ϵ (na)	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGC GGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGC CGGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGGACGTGTCCCAGGAGGACCCGA GGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCAA CAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCC CCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGA CAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGG CCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG	10
4	IgD ϵ (aa)	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEE RETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAG KVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMAL REPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGF APARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	20
15	IgD ϵ (na)	AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCC CCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCA ATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAAC AGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTG GGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCC ACCTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGG GAGGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGC GCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTACCCCTCCGAGATCCC TGTGGAACGCCGGGACCTCTGTACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCC CACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTT AGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTA TGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGAC CAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGCCCCACCCAGCC GGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCACTAG	30 40

【 0 4 6 3 】

【表 27】

		CCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCCT GCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT
6	CD8経膜(aa)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
17	CD8経膜(na)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTG GTTATCACCCCTTACTGC
7	4-1BB細胞内 ドメイン(aa)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
18	4-1BB細胞内 ドメイン(na)	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACC AGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAG AAGAAGGAGGATGTGAACTG
8	CD27 (aa)	QRRKYRSNKGESPEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
19	CD27 (na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG CCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTT CGCAGCCTATCGCTCC
9	CD3 セー ター (aa) (Q/K変異体)	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
20	CD3 セー ター (na) (Q/K変異体)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGA ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA ACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT GGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCA CATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
10	CD3 セー ター (aa) (NCBI対照 配列NM_ 000734.3)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
21	CD3 セー ター (na) (NCBI対照 配列)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA ACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT

10

20

30

40

【表 2 8】

	NM_000734.3)	GGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCA CATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
36	CD28細胞内 ドメイン(アミノ酸 配列)	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
37	CD28細胞内 ドメイン(ヌクレオチド 配列)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG CCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTT CGCAGCCTATCGCTCC
38	ICOS細胞内 ドメイン(アミノ酸 配列)	T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L
39	ICOS細胞内 ドメイン(ヌクレオチド 配列)	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTT CATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA
5	GSヒンジ/リンカー (aa)	GGGGS GGGGS
16	GSヒンジ/リンカー (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
356	GSヒンジ/リンカー (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGGGGTTCC
25	リンカー	GGGGS
26	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)n、ここで、n = 1-6、例えば、GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
27	リンカー	(Gly4 Ser)4
28	リンカー	(Gly4 Ser)3
29	リンカー	(Gly3 Ser)
40	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Ser)n、ここで、nは1以上の正の整数である
41	リンカー	(Gly-Gly-Gly-Ser)n、ここで、n = 1-10、例えば、GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS
42	リンカー	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
30	ポリA	(A) ₅₀₀₀ 本配列は50～50007テオンを含み得る。
31	ポリT	(T) ₁₀₀
32	ポリT	(T) ₅₀₀₀

10

20

30

40

【 0 4 6 4 】

【表 29】

		本配列は50～5000チンを含み得る。
33	ホ [°] リA	(A) ₅₀₀₀ 本配列は100～5000ア [°] ニンを含み得る。
34	ホ [°] リA	(A) ₄₀₀ 本配列は100～400ア [°] ニンを含み得る。
35	ホ [°] リA	(A) ₂₀₀₀ 本配列は50～2000ア [°] ニンを含み得る。
22	PD1 CAR (aa)	<u>pgwfldspdrpwnpptfspallvvtgednatfcsfsntsesfvl</u> <u>nwyrmsspsnqtdklaafpedrsqpqgdcfrvtqlpngr</u> <u>dfhmsvvrarnndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvttt</u> <u>paprptpaptiasqplslr</u> <u>peacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtt</u> <u>qeedgcscrfeeeggc</u> <u>elrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdmaeyseigmkge</u> <u>rrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</u>
23	PD-1 CAR (na) (PD1 ECDは 下線)	<u>atggccctccctgtcactgccctgcttctccctcgcactcctgctccacgccgctagaccacccggatgggttctggactctccgg</u> <u>atcgccctgtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttggttgactgagggcgataatgcaccttcacgtgctcgttccaa</u> <u>cacctccgaatcattcgtgctgaactggtaaccgcatgagcccgtaaaacagaccgacaagctcgccggttccggaagatcggt</u> <u>cgcaaccgggacagagattgtcggttccgctgactcaactgccaatggcagagacttccacatgagcgtggctccgctagggcg</u> <u>aaacgactccgggacactgctgctggagccatctcgtgctggcctaaggcccaaatcaagagagctgagggccgaactgag</u> <u>agtgaccgagcgagagctgaggtccaactgcacatccatcccatcgctcggcctgcggggcagttttagacctgtgtcacg</u> <u>accactccggcgccgcccaccgactccggcccaactatcgcgagccagccctgtcgtgagggccggaagcatgccgcc</u> <u>tgcggccggaggtgctgtgcataccggggatttgacttcgcatcgacatctacatttgggtcctctcgcggaaactgtggcgt</u> <u>gctccttctgtccctggatcatccctgtactgcaagcggggtcggaagaaagcttctgtacatttcaagcagccctcatgagggcc</u> <u>gtgcaaacaccagagagagacgggttgccttgcgggttcccggaagaggaagagaggttgcgagctcgccgtgaagtt</u> <u>ctccggagcgccgacgccccgcctataagcaggccagaaccaagctgtacaacgaactgaacctgggacggcggaagag</u> <u>tacgatgtgctggacaagcggcgccggggaccccgaaatgggcgggaagcctagaagaaagaacctcagggaagcctgt</u> <u>ataacgagctgcagaaggacaagatggccgagccctaccgaaattgggatgaaggagagcgccggaggggaaaggggc</u> <u>acgacggcctgtaccaaggactgtccaccgccaccaaggacacatacgatccctgcacatgcaggcccttccccctcgc</u>
24	シ [°] ナルを伴 う PD-1 CAR (aa) (PD1 ECDは 下線)	<u>Malpvtalllplallhaarp</u> <u>pgwfldspdrpwnpptfspallvvtgednatfcsfsntsesfvl</u> <u>nwyrmsspsnqtdklaafped</u> <u>rsqpqgdcfrvtqlpngrdfhmsvvrarnndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvttt</u> <u>paprptpaptiasqplslr</u> <u>peacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtt</u> <u>qeedgcscrfeeeggc</u> <u>elrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynel</u> <u>qkdmaeyseigmgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</u>

10

20

30

【表 3 0】

338	PD1 の細胞質ドメイン(アミノ酸 192 ~ 288)	CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEP PVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHC SWPL
339	CTLA-4 の細胞質ドメイン(アミノ酸 183 ~ 223)	AVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN
340	ヒト CD8 ヒンジ	TTTPAPRPPT PAPTASQPL SLRPEACRPA AGGAVHTRGL DFA

10

【 0 4 6 5】

N K R - C A R および N K R - C A R の要素の配列の例をさらにここに提供する。

【 0 4 6 6】

メソテリンに結合する抗原結合ドメインおよび K I R 2 D S 2 ドメインを含む細胞質ドメインを含む K I R - C A R の核酸配列を下に提供する。ここに記載する抗原結合ドメインのいずれも、下に提供するメソテリン抗原結合ドメインの代替であり得る。

20

【 0 4 6 7】

S S 1 K I R 2 D S 2 遺伝子配列(配列番号 3 2 7)

gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacacggttaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttcca
atgatgacacttttaaagtctgtatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcgggcaagagcaactcggtcgccg
catacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagag
aattatgcagtgtgccataaccatgagtataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcgaggaccgaaggag
ctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcttgatcggttggaaccggagctgaatgaagccataacc
aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactc
tagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggct
ggctgggttatgtgataaacttgagcgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaa
gccctccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagatag
gtgcctcactgattaaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttcat
taatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactg
agcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgctaactgtctgcttgcaacaa
aaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggctcagc
agagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctac
atacctcgctctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagac
gatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctac
accgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggt
aagcggcagggctcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctgggtatctttatagtcctgtcgggt
ttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcg
gcctttttacgggttccctggccttttgcctgacatgttcttctgcgttatccccctgattctgtggataa
ccgtattaccgcctttgagttagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaag
cggaagagcgcccaatacgcgaaccgccttccccgcgcttgccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttccc
gactggaaagcgggcagtgagcgcacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccacaggctttacactttat
gcttccggctcgatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgattacgcca
agcgcgcaattaacctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaatactctttagt
cttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattgggtggaagta

30

40

50

aggtggtacgatcgtgccttatttaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattg
cagagatatgtattttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctc
tctggctaacttaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgcctcaagtagtgtgtccccgtctgtt
gtgtgactctggtaacttagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtgggcgccgaacaggga
cctgaaagcgaaagggaaccagagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgacaggcaagaggcgaggggc
ggcgactggtagtagcgcacaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgtcagtattaa
cgggggagaattagatcgcatgggaaaaaatcgggttaaggccagggggaagaaaaataaaatataaacatatagt
atgggcaagcaggagctagaacgattcgagtttaacctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgg
gacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctatttgttg
catcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgc
acagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaaatataaa
gtagtaaaatgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgagagagaaaaagagcagtgagg
aataggagctttgttccctgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacagg
ccagacaattattgtctggtatagtcgacgcagacaacatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaa
ctcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggg
gatttggggttgctctggaaaactcatttgccactgctgtgcttggaaatgctagtggagtaataaatctctggaac
agattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaaatacaattacacaagcttaatacacctccttaattgaag
aatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaatagataaatgggcaagtttgtggaattgggttaac
atacaaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggttggttaggtttaagaatagttttgtctgt
actttctatagtagaattagagttaggcagggatatccaccattatcgcttcagaccacctcccaaccccgaggggacccg
acaggcccgaaggaaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacgg
tatcgattagactgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagtatcttggttagcagttca
tgtagccagtggtatataagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaaacagcatacttccctcttaaaattag
caggaagatggccagtaaaaacagtacatacagacaattggcagcaatttcaccagtactacagtttaaggccgctgttg
tggcggggatcaagcaggaatttggcatccctacaatccccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaatt
aaagaaaattataggacaggttaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtacaaatggcagttatcatccacaatt
ttaaagaaaaggggggattggggggtacagtgacggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaa
gaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcggtttattacaggacagcagagatccagtttggtgcatac
gcgtcgtgaggtccggtgcccgtcagtgggcagagcgacatcgccacagtcctccgagaagtggggggaggggtcgg
caattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgactggctccgccttttcccg
aggggtgggggagaaccgtatataagtgacagtagtcgcccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgcccgcagaacacag
gtaagtcccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgctgacctgaattacttccacctg
gctgcagtagctgattcttgatcccagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccc
cttcgctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgcgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgctgt
ctcgtgctttcgataagctctctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgttttttctggcaagatagttct
tgtaaatgcccgcgaagatctgcacactggtatttcgggttttggggccgcggcgagcggggcccgctgcgtcccagc
gcacatgttcggcgagggcggggctgcgagcgcgccaccagagaatcgagcgggggtagttcaagctggccggcctgct
ctggtgcttgccctcgcgccgctgtatcgccccgcccgtggcggaaggctggcccggtcgccaccagttgcgtgagc
ggaaagatggccgcttcccggccctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggggggtgagt
caccacacaaaggaaaaggccttccgctctcagccgtcgttcatgtgactccacggagtaccgggcgcccgtccagg
cacctcgattagttctcgtgcttttgagtagctcgtcttttaggttggggggaggggtttatgcgatggagtttcccc
cactgagtggttgagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaatttgccctttttgagtttg
gatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagaATGGGG
GGACTTGAACCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCAGGC
CCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGC
TCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAG
CGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAG
GCCGTATTACAAAGTCGAGGGCGGCGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCC
CTAGGatggccttaccagtgaccgcttgctcctgccgtggccttgctgctccacgcccaggccgggatccaggta
caactgcagcagctctgggcctgagctggagaagcctggcgcttcagtgagaatatcctgcaaggcttctggttactcatt

cactggctacacatgaactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggacttattactccttacaatg
 gtgcttctagctacaaccagaagttcaggggcaaggccacattaactgtagacaagtcacccagcacagcctacatggac
 ctctctcagctctgacatctgaagactctgcagctctatttctgtgcaaggggggttacgacgggaggggttttgactactg
 gggccaaggaccacggtcaccgtctctcaggtggaggcgggttcaggcggcgggtggctctagcgggtggatcgga
 tgcagctcactcagctctccagcaatcatgtctgcacatccaggggagaaggtcacatgacctgcagtgccagctcaagt
 gtaagt tacatgcactgggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaaagatggatttatgacacatccaaactggcttc
 tggagtcccagggtcgcttcagtggcagtggggtctggaaactcttactctctcacaatcagcagcgtggaggctgaagatg
 atgcaacttattactgccagcagtgaggtaagcacctctcacgtacgggtgctgggacaaagtggaaatcaaagctagc
 ACGCGTgggtggcggagggttctggagggtgggggttccagggggcctggccacatgagggagtcacagaaaaccttccct
 cctggcccaccaggtccctggtgaaatcagaagagacagtcacctgcaatgttggtcagatgtcaggtttgagcact
 tccttctgcacagagaggggaagtataaggacactttgcacctcatggagagcacatgatggggctccaaggccaac
 ttctccatcgggtcccatgatgcaagaccttcagggacctacagatgctacggttctgttactcactccccctatcagtt
 gtcagctcccagtgacctctggacatcgctcatcacagggtctatatgagaaaccttctctctcagcccagccgggccccca
 cggttttggcaggagagagcgtgaccttgtctcgcagctcccggagctcctatgacatgtaccatctatccaggaggggg
 gaggcccatgaacgtagggttctctgcagggcccaaggtcaacggaacattccaggccgacttctcttgggcccctgccac
 ccacggaggaacctacagatgcttcggctctttccgtgactctccctatgagtggtaaaactcgagtgacctactgcttg
 tttctgtcacaggaaaccttcaaatagttggccttcacccactgaaccaagctccaaaaccggtaacccagacacctg
 catgttctgattgggacctcagtggtcaaaatccctttcccatcctcctcttcttctccttcctcgtggtgctccaa
 caaaaaaatgctgctgtaattggaccaagagcctgcagggaaacagaacagtgaaacagcgaggattctgatgaacaagacc
 atcaggagggtgtcatacgcataaGtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgggtattcttaac
 tatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgtattgcttcccgtatggctttcat
 tttctcctccttgtataaatcctgggtgtgctctctttatgaggagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtgggtg
 gcactgtgtttgtgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgcttctc
 cccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttgcccgtgctggacaggggctcggtgttgggactga
 caattccgtgggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttgccacctggattctgcgcggga
 cgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgcggcctgctgcccgtctgcggcctctt
 ccgcttctcgcccttcggccctcagacgagtcggatctccctttgggcgcctccccgcctggaaatcgagctcggtacct
 ttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggacttgaagggtcaattca
 ctcccaacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctg
 gctaactagggaaacctgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgtctcaagtagtgtgtgccgtctgttgtgt
 gactctggtaactagagatccctcagaccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttat
 tattcagttattataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatgggtaca
 aataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgggtttgtccaaactcatc
 aatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgccccctaacctcgcccagttccgcccattctccgccccatggctga
 ctaattttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcgccctctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttttg
 aggcctacgcttttgctgcagacgtacccaatttcgcccctatagtgagtcgtattacgcgcgtcactggccgtcgtttt
 acaacgtcgtgactgggaaaacctggcgttacccaacttaatcgcccttgacagcacatcccccttccgacgtggcgta
 atagcgaagaggccccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgccctgtagc
 ggcgcattaagcgcgggggtgtgggtgttacgcgcagcgtgaccgtacacttgccagcgcccttagcgcccgctccttt
 cgctttcttcccttcccttctcgccacgttcgcccgtttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggttcc
 gatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatgggttcacgttagtgggccatcgccctgatag
 acggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttctttaatagtggtactcttggtccaaacttgaacaacactcaacc
 tatctcggtctattcttttgattataagggttttgccgatctcgccctattgggttaaaaaatgagctgatttaacaaa
 aatttaacgcgaatttttaacaaaatattaacgtttacaatttccaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccc
 ctatttggttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgcttcaataatat
 tgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttatcccttttttgccgcattttgcccttctgtttt
 tgctcaccagaaacgttggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg

【0468】

メソテリンに結合する抗原結合ドメインおよびK I R S 2ドメインを含む細胞質ドメイ
 ンを含むK I R - C A Rの核酸配列を下に提供する。ここに記載する抗原結合ドメインの

10

20

30

40

50

いずれも、下に提供するメソテリン抗原結合ドメインの代替であり得る。

【0469】

SS1 KIRS2 遺伝子配列(配列番号328)

gtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttcca
atgatgagcacttttaaagtctctgtatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcggggaagagcaactcggtcgccg
catacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagag
aattatgcagtgtgccataacatgagtataaactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggag
ctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacc
aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcgaactacttactc
tagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgtcaggaccacttctgcgctcggcccttccggct 10
ggctgggttatgtgataaacttggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaa
gccctcccgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgttgagatag
gtgcctcactgattaaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttt
taatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactg
agcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaactctgtgcttgcgaacaa
aaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagc
agagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctac
atacctcgtctgttaactcctgttaccagtggtcgtgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagac
gatatgtaccggataaggcgcagcggctcgggtgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctac 20
accgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggaagaggcggacaggtatccgggt
aagcggcagggctcggaacaggagagcgcacgaggagcttcagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggt
ttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgccagcaacgcg
gccttttacggttcctggccttttgcctcacatgttctttcctgcgttatccccctgattctgttgataa
ccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagctcagtgagcaggaag
cggaagagcgcccaatacgcgaaccgccttccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttccc
gactggaaagcgggcagtgagcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccaccaggtttacactttat
gcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgat tacgcca
agcgcgcaattaacccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtccttatgcaatactctttagt
cttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattgggtggaagta 30
aggtgggtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcatg
cagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctc
tctggctaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagctgccttgagtgcctcaagtagtggtgcccgtctgtt
gtgtgactctggtaacttagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaaatctctagcagtgggcgccgaacaggga
cctgaaagcgaaagggaaccagagctctctcgacgcaggactcggttgcgtgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggc
ggcgactggtagtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgtcagtttaag
cgggggagaattagatcgcatgggaaaaaatcgggttaaggccagggggaaagaaaaataaaat taaaacataatag
atgggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgg
gacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtg
catcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgc 40
acagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaaatataaa
gtagtaaaaaatgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtgagg
aataggagctttgttcccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacagg
ccagacaattattgtctggtatagtcgacgacgagaacaatttgcgtgagggctattgaggcgcaacagcatctgtgcaa
ctcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggg
gatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttgggaatgctagttaggagtaataaaatctctggaac
agattgggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaatatacaattacacaagcttaatacactccttaattgaag
aatcgcaaaaccagcaagaaagaaatgaacaagaattattggaattagataaaatgggcaagtttgtggaattgggttaac
atacaaaatggctgtggtatataaaatattcataatgtagtaggaggcttggtaggtttaagaatagttttgtctgt
actttctatagtgaaatagagtttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccg 50
acaggcccgaaggaaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaaacggatctcgacgg

tatcgattagactgtagccaggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagtatatcttggttagcagttca
tgtagccagttggatatatagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaacagcatacttctcttaaaattag
caggaagatggccagtaaaaacagtacatacagacaatggcagcaatttcaccagtactacagttaaggccgctgttgg
tggcggggatcaagcaggaatttggcattccctacaatcccaaagtcaaggagtaataagaatctatgaataaagaatt
aaagaaaattataggacaggttaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtaaaatggcagttatcatccacaatt
ttaaagaaaagggggattggggggtacagtgaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaa
gaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacagggacagcagagatccagtttggctgcatac
gcgtcgtgaggtccggtgcccgtcagtgggcagagcgacatcgccacagtccccgagaagttggggggaggggtcgg
caattgaaccggtgcctagagaaggtggcggggtaaacaggaaagtgtgtcgtgtactggctccgccttttcccg
agggtgggggagaaccgtatataagtgtagtgcgttcgcccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgcccagaaacacag
gtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgctgccttgaattacttccacctg
gctgcagtagctgattcttgatcccagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccc
cttcgctcgtgtgttagttgaggcctggcctggggcgtggggccgcccgtgcgaatctggtggcaccttcgcccgtgt
ctcgtcgttttcgataagttcttagccattttaaatttttgatgacctgctgcgacgttttttctggcaagatagttct
tgtaaatcgggccaagatctgcacactggattttcgggttttggggcgcgggcgggcgacggggcccgtgcgtcccagc
gcacatgttcggcgaggcggggctgcgagcgcgccaccgagaatcgagcgggggtagttctcaagctggccggcctgct
ctggtgcctggcctcgcgcgcgctgtatcgccccgcccggggcggaaggctggcccgttcggcaccagttgcgtgagc
ggaaagatggccgcttccggccctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcgcgctcgggagagcgggggggtgagt
caccacacaaaggaaaaggcccttccgctctcagcgtcgttcatgtgactccacggagtagccggcgccgtccagg
cacctcgattagttctcgtgttttggagtacgtcgtcttttaggttggggggaggggttttatgcgatggagtttcccca
cactgagtggttgagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaatttgccctttttgagtttg
gatcttgggttcattctcaagcctcagacagtgggttcaaagttttttcttccatttcagggtgtcgtgagctagaATGGGG
GGACTTGAACCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCAGGC
CCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGC
TCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAG
CGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAG
GCCGTATTACAAAGTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCC
CTAGGatggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgtggccttgctgtctccacgcccaggccgggatcccaggta
caactgcagcagctctgggcctgagctggagaagcctggcgcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctggttactcatt
cactggctacacatgaactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggacttattactccttacaatg
gtgcttctagctacaaccagaagttcaggggcaaggccacattaactgtagacaagtcacccagcacagcctacatggac
ctcctcagttcagatctgaagactctgcagttctttctgtgcaaggggggttacgacgggaggggttttgactactg
gggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggaggcggttcaggcgggcggtggctctagcgggtggtggatcggaca
tcgagctcactcagttccagcaatcatgtctgcattctccaggggagaaggtcacatgacctgcagtgccagctcaagt
gtaagttacatgcactggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggatttatgacacatccaaactggccttc
tgagttcccaggctcgttccagtgagtggtctggaaactcttactctctcacaatcagcagcgtggaggctgaagatg
atgcaacttattactgccagcagtgagtaagcacctctcacgtacggtgctgggacaaagtggaaatcaaagctagc
ggtggcgagggttctggaggtgggggttctcaccactgaaccaagctccaaaaccggttaaccacagacacctgcatgt
tctgattgggacctcagtggtcaaaatccctttaccatctcctctcttttctctctcctcgttggtgtccaacaaaa
aaaatgtgtgtgtaatggaccaagagcctgcagggaacagaacagtgaaacagcaggattctgatgaacaagaccatcag
gaggtgtcatacgcataaGtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgggtattcttaactatgt
tgctccttttacgctatgtggatagctgctttaatgcctttgtatcatgtattgcttcccgtatggcttctatttct
cctccttgataaaatcctgggtgtgtctctttatgaggagttgtggcccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgact
gtgtttgctgacgaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccct
ccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttgcccgtgctggacaggggctcggtgttgggactgacaatt
ccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgccgtgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtcc
ttctgtacgtccttccggcctcaatccagcggaccttcttcccggcgctgctgccggtctgcggcctcttccgcg
tcttcgcttccgctcagacgagtcggatctcctttggggcgccctccccgctggaatcgagctcggtacctttaag
accaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggttaattcactccc
aacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaa

ctaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgcctcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactc
 tggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagtcatgtcatcttattatc
 agtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagttagaggaacttggttattgcagcttataatggttacaaaata
 agcaatagcatcacaatttcacaaaataagcatttttttactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgt
 atcttatcatgtctggctctagctatcccgcccttaactccgcccagttccgcccattctccgcccattggctgactaat
 tttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcgccctctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcc
 tacgcttttgcgtcgagacgtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggccgctcgttttacaac
 gtcgtgactgggaaaacccctggcgttacccaacttaatcgccctgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagc
 gaagaggcccgacccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgcctgtagcggcgc
 attaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgtacacttgccagcgccctagcgcgcctcctttcgtt
 tcttcccttcttctcgcacgctcgccggtttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccccttaggggtccgattt
 agtgccttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtaggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacggt
 ttttcgccccttgacgttgagttccacgttctttaatagtggaactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatct
 cggctctattcttttgatttataagggttttgcgcatctcgccctattgggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatt
 aacgcgaattttaacaaaatatcaacgtttacaatttcccagtggaacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatt
 tgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatatgaaa
 aaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttatcccccttttgcggcattttgccttctgttttgcctc
 acccagaacagctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgg

【0470】

メソテリンに結合する抗原結合ドメインおよびK I R 2 D L 3ドメインを含む細胞質ド
 メインを含むK I R - C A Rの核酸配列を下に提供する。ここに記載する抗原結合ドメイ
 ンのいずれも、下に提供するメソテリン抗原結合ドメインの代替であり得る。

【0471】

S S 1 K I R 2 D L 3 遺伝子配列(配列番号329)

gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttcca
 atgatgagcacttttaaagtctgtctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcgggcaagagcaactcggtcgccg
 catacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagag
 aattatgcagtgtgccataaccatgagtataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcgaggaccgaaggag
 ctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacc
 aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactttaactggcgaactacttactc
 tagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggtataaagtgcaggaccacttctgcgctcgcccttccggt
 ggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaa
 gccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagatag
 gtgcctcactgattaaagcattggtaactgtcagaccaagttactcataatacttttagattgatttaaaacttcat
 taatttaaaaggatctaggtgaagatcccttttataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactg
 agcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcccttttttctgcgcgtaactctgtcgttgcacaa
 aaaaaccacgcgtaccagcgggtggtttgtttgcgggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagc
 agagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctac
 atacctcgctctgctaactctgttaccagtggtgctgcccagtgggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagac
 gatagttaccggataaggcgcagcggtcgggcgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctac
 accgaactgagataacctacagcgtgagctatgagaaagcggccagcttcccgaagggaagaggcggacaggtatccggt
 aagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggagcttccagggggaaacgcctgggtatctttatagtcctgtcgggt
 ttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgccagcaacgcg
 gccttttacgggttcttggccttttgcctcacatgttcttctgcgttatccccctgattctgtggataa
 ccgtattaccgcctttgagttagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaag
 cggaagagcgcaccaatacgcgaacccgcttccccgcgcttgcccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttccc
 gactggaaagcgggcagtgagcgcacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccacaggtttacactttat
 gcttccggctcgatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgattacgcca
 agcgcgcaattaacctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaatactctttagt
 ctgcaacatggtaacgatgagtagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagta

aggtggtacgatcgtgccttatttaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattg
cagagatatgtattttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctc
tctggctaacttagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgcctcaagtagtgtgtccccgtctgtt
gtgtgactcttggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtgggcgccgaacaggga
cctgaaagcgaaagggaaccagagctctctcgacgcaggactcggttgctgaagcgcgacaggcaagaggcgaggggc
ggcgactggtgagtagccaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgtcagtattaa
cgggggagaattagatcgcatgggaaaaattcggttaaggccagggggaagaaaaataaaatataacatatagt
atgggcaagcaggagctagaacgattcgagttatcttgccctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgg
gacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctatttgttg
catcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgc
acagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaaatataaa
gtagtaaaatgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgagagagaaaaagagcagtggg
aataggagctttgttccctgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgagcctcaatgacgctgacggtacagg
ccagacaattattgtctggtatagtcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaa
ctcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaagaatcttgctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggg
gatttggggttgctctggaaaactcatttgccactgctgtgcttggaaatgctagtggagtaataaatctctggaac
agattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaaatacaattacacaagcttaatacacctccttaattgaag
aatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaac
atacaaaattggctgtggtatataaaattattcataatgtagtaggaggttggttaggtttaagaatagttttgtctgt
actttctatagtagaattagagttaggcagggatatccaccattatcgcttcagaccacctcccaaccccgaggggacccg
acaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacgg
tatcgattagactgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagtatacttggttagcagttca
ttagtagccagtggatatatagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaaacagcatacttctcttaaaattag
caggaagatggccagtaaaaacagtagacatacagacaattggcagcaatttcaccagtactacagtttaaggccgctgttg
tggcggggatcaagcaggaatttggcatccctacaatccccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaatt
aaagaaaattataggacaggttaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtacaaatggcagttatcatccacaatt
ttaaagaaaaggggggattggggggtacagtgaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaa
gaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcggtttattacagggacagcagagatccagtttggctgcatac
gcgtcgtgaggtccggtgcccgtcagtgggcagagcgacatcgccacagtcctccgagaagtggggggaggggtcgg
caattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggttaaactgggaaagtgatgtcgtgactggctccgccttttcccg
aggggtgggggagaaccgtatataagtgacagtagtcgcccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgcccgcagaacacag
gtaagtcccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgctgacctgaattacttccacctg
gctgcagtagctgattcttgatcccagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccc
cttcgctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgcgcgtgcgaatctggtggcaccttcgacctgt
ctcgtgctttcgataagctctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgttttttctggcaagatagctc
tgtaaatgcccccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcggcgagcggggcccgtgctcccagc
gcacatgttcggcgagggcggggctgcgagcgcgccaccagagaatcgagcgggggtagctcaagctggccggcctgct
ctggtgacctggcctcgccgcgctgtatcgccccgacctgggcggcaaggctggcccggtcgccaccagttgctgagc
ggaaagatggccgcttcccggccctgctgcaggagctcaaaatggaggacggcgctcgggagagcgggggggtgagt
caccacacaaaggaaaaggccttccgctctcagccgtcgttcatgtgactccacggagtaccgggcgctccagg
cacctcgattagttctcgtgcttttgagtagctcgtctttaggttggggggaggggtttatgcgatggagtttcccc
cactgagtggttgagactgaagttaggccagcttgccacttgatgtaattctccttggaaatttgccctttttgagttg
gatcttggttcattctcaagcctcagacagtgggtcaaagtttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagaATGGGG
GGACTTGAACCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCAGGC
CCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGC
TCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAG
CGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAG
GCCGTATTACAAAGTCGAGGGCGGCGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCC
CTAGGatggccttaccagtgaccgcttgctcctgccgtggccttgctgctccacgcccaggccgggatccaggta
caactgcagcagctctgggcctgagctggagaagcctggcgcttcagtgagaatatcctgaaggcttctggttactcatt

cactggctacaccatgaactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggacttattactccttacaatg
 gtgcttctagctacaaccagaagttcaggggcaaggccacattaactgtagacaagtcacccagcacagcctacatggac
 ctcctcagctctgacatctgaagactctgcagctctatttctgtgcaaggggggttacgacgggaggggttttgactactg
 gggccaaggaccacggtcaccgtctcctcaggtggaggcgggttcaggcggcggtggctctagcgggtggatcgga
 tgcagctcactcagctctccagcaatcatgtctgcactctccaggggagaaggtcacatgacctgcagtgcagctcaagt
 gtaagttacatgcactgggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaaagatggatttatgacacatccaaactggcttc
 tggagtcccagggtcgcttcagtggcagtggtcttgaaactcttactctctcacaatcagcagcgtggaggctgaagatg
 atgcaacttattactgcccagcagtgaggtaagcacctctcacgtacggtgctgggacaaagtggaaatcaaagCTAGC
 ggtggcgagggttctggaggtgggggttccCAGGGGGCCTGGCCACATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGC
 CCACCCAGGTCCCCTGGTGAATCAGAAGAGACAGTCATCTGCAATGTTGGTCAGATGTCAGGTTTCAGCACTTCCTTC
 TGCACAGAGAAGGGAAGTTTAAGGACACTTTGCACCTCATTGGAGAGCACCATGATGGGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCC
 ATCGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACTCACTCCCCCTATCAGTTGTCAGC
 TCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGTCTATATGAGAAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCACGGTTC
 TGGCAGGAGAGAGCGTGACCTTGTCTGCAGCTCCCGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGAGGCC
 CATGAACGTAGGTTCTCTGCAGGGCCCAAGGTCAACGGAACATTCCAGGCCGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGG
 AGGAACCTACAGATGCTTCGGCTCTTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAACCTCGAGTGACCCACTGCTTGTCTG
 TCACAGGAAACCTTCAAATAGTTGGCTTTCACCCACTGAACCAAGCTCCGAAACCGTAACCCAGACACCTGCATGTT
 CTGATTGGGACCTCAGTGGTCATCATCTCTTCATCCTCCTCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGTGCTGCAACAAAAA
 AAATGCTGTTGTAATGGACCAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGGGAGGACTCTGATGAACAAGACCTCAGG
 AGGTGACATATGCACAGTTGAATCACTGCGTTTTACACAGAGAAAAATCACTCACCTTCTCAGAGGCCCAAGACACCC
 CCAACAGATATCATCGTGTACACGGAACCTCCAAATGCTGAGCCCTGAGtcgacaatcaacctctggattacaaaatttg
 tgaagattgactggattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatg
 ctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaaatcctgggttgctgtctctttatgaggagttgtggccc
 gttgtcaggcaacgtggcggtggtgtgcactgtgtttgctgacgaacccccactgggtggggcatggccaccactgtca
 gctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgtgctgga
 caggggctcggtgttgggcactgacaattccgtgggtgttgctggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgctgt
 gttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgcgg
 cctgtgcgggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgcccctcagacgagtcggatctccctttgggcccgcctccc
 cgcctggaattcgagctcggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaa
 aggggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagac
 cagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgttca
 agtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagaccttttagtcagtggtgaaaatctcta
 gcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatattataacttgcaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttg
 ttatttgacgttataatggttataaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttactgcattc
 tagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccggcccctaactccgcccagttc
 cgcccatctccgcccctatggctgactaatttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcgccctctgagctattcc
 agaagtagtgaggaggttttttggaggcctacgtttttgcgtcgagacgtaccaattcgccctatagtgagtcgtatt
 acgcgcgtcactggcgctcgttttacaacgtcgtgactgggaaaacccctggcggtaccaacttaatcgcttgacga
 catccccctttcgccagctggcgtaatagegaagaggcccgaccgatcgcccttcccaacagttgcgagcctgaatgg
 cgaatggcgcgacgcgcctctagcggcgcattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttg
 ccagcgccttagcgcccgtcctttcgctttcttcccttcccttctcgccacgttcgcccgtttccccgtcaagctcta
 aatcgggggctcccttttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaacttgattagggtgatggttc
 acgtatgggcccctcgccctgatagcgggttttccgccccttgacgttgagtcacgttctttaatagtgagctctgt
 tccaaactggaacaacactcaacctatctcggtctattcttttgatttataagggttttgccgatttcggcctattgg
 ttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaaatttaacgtttacaatttcccaggtggcact
 tttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaata
 accctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattccctttt
 ttgcgggcattttgcttccctgtttttgtcaccacagaaacgtggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg

【0472】

C D 1 9 に結合する抗原結合ドメインおよび K I R 2 D S 2 ドメインを含む細胞質ドメ

10

20

30

40

50

インを含む K I R - C A R の核酸配列を下に提供する。

【 0 4 7 3 】

C D 1 9 K I R 2 D S 2 構築物配列(配列番号 3 3 0)

gtgcacgagtggttacatcgaaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttcca
atgatgagcacttttaaagtctctgtatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcggggaagagcaactcggtcgccg
catacactattctcagaatgacttgggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagag
aattatgcagtgtgccataacatgagtataaactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggag
ctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacc
aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactc
tagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgtcaggaccacttctgcgctcggcccttccggct 10
ggctgggttatgtgctgataaacttggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaa
gccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagatag
gtgcctcactgattaaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttt
taatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactg
agcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgctgaatctgtgcttgcgaacaa
aaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagc
agagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctac
atacctcgctctgctaactcctgttaccagtggtgctgcccagtgagcgtatgaatcgtgtcttaccgggttggactcaagac
gatatgtaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctac 20
accgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccacgcttcccgaagggaagaggcggacaggtatccgggt
aagcggcagggctcggaacaggagagcgcacgagggagcttcagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggt
ttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgccagcaacgcg
gcctttttacgggttccctggccttttgcctcacatgttctttcctgcgttatccccctgattctgttgataa
ccgtattaccgcctttgagttagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtgagtgagcaggaag
cggaagagcgcgcaataacgcaaacgccttccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttccc
gactggaaagcgggcagtgagcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccaccaggttttacactttat
gcttccggctcgtagttgtgttggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgattacgcca
agcgcgcaattaacccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtccttatgcaatactctttagt
cttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattgggtggaagta 30
agggtgtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcatgtg
cagagatatgtatttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctc
tctggctaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgttcaagtagtgtgtgccgctctgtt
gtgtgactctggtaacttagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaaatctctagcagtgggcgccgaacaggga
cctgaaagcgaaagggaaccagagctctctcgacgcaggactcggttgcgtgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggc
ggcgactggtagtacgcaaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaag
cgggggagaattagatcgcatgggaaaaaatcgggttaaggccagggggaaagaaaaataaaatataaacatatagtt
atgggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgg
gacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataacagtagcaaccctctattgtgtg
catcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgc 40
acagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaaatataaa
gtagtaaaaaatgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaagagcagtgagg
aataggagctttgttcccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacagg
ccagacaattattgtctggtatagtcgacgacgagaacaatttgcgtgagggctatttaggcgcaacagcatctgttgcaa
ctcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggg
gatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaaatgctagttaggagtaataaaatctctggaac
agattggaaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaatatacaattacacaagcttaatacactccttaattgaag
aatcgcaaaaccagcaagaaagaaatgaacaagaattattggaattagataaaatgggcaagtttgtggaattgggttaac
atacaaaatggctgtggtatataaaatattcataatgtagtaggaggcttggtaggtttaagaatagttttgtctgt
actttctatagtgaaatagagtttaggcagggatattcaccattatcgcttcagaccacctcccaaccccgaggggacccg 50
acaggcccgaaggaaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaaacggatctcgacgg

tatcgattagactgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagtatatcttggttagcagttca
tgtagccagtggtatataagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaacagcatacttctcttaaaattag
caggaagatggccagtaaaaacagtacatacagacaattggcagcaatttcaccagtactacagttaaggccgctgttgg
tggcggggatcaagcaggaatttggcattccctacaatcccaaagtcaaggagtaataagaatctatgaataaagaatt
aaagaaaattataggacaggttaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtaaaatggcagttatcatccacaatt
ttaaagaaaaaggggggattggggggtacagtgccagggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaa
gaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacagggacagcagagatccagtttggctgcatac
gcgtcgtgaggtccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgccacagtccccgagaagttggggggaggggtcgg
caattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccg
agggtgggggagaaccgtatataagtgagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacag 10
gtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgctgccttgaattacttccacctg
gctgcagtagctgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccc
cttcgctcgtgcttgagttgaggcctggcctggggcgctggggccgcgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgctgt
ctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgttttttctggcaagatagttct
tgtaaatgcgggccaagatctgcacactgggtatttcgggttttggggcgcgggcgggcgacggggcccgtgcgtcccagc
gcacatgttcggcgaggcggggctgcgagcgcgccaccgagaatcgagcgggggtagttctcaagctggccggcctgct
ctggtgcctggcctcgcgcccgctgtatcgccccgcccggggcggaaggctggcccggctggcaccagttgcgtgagc
ggaaagatggccgcttccggccctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggggggtgagt
cacccacacaaaggaaaagggccttccgctctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtagccggcgccgtccagg
cacctcgattagttctcgtgcttttgagtagctcgtcttttaggttggggggaggggttttatgcgatggagtttcccca 20
cactgagtggttgagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaatttgcctttttgagtttg
gatcttgggttcattctcaagcctcagacagtgggttcaaagtttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagaATGGGG
GGACTTGAACCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCAGGC
CCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGC
TCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAG
CGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAG
GCCGTATTACAAAGTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCC
CTAGGatggccttaccagtgaccgccttgcctcctgccgtggccttgcctgcctccacgcgccaggccgggatccGACATC
CAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACAT
TAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACT 30
CAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGAT
ATTGCCACTTACTTTTGCCAAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGTGG
CGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGC
CCTCAGAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTGCCAGCCT
CCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTGAGCTCTCAAATCCAGACT
GACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTACT
ACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
gctagcACGCGTggtggcgaggttctggaggtgggggttcccagggggcctggccacatgaggaggtccacagaaaacc
tccctcctggcccaccaggtcccttggtgaaatcagaagagacagtcacctgcaatgttggtcagatgtcaggtttg
agcacttcttctgcacagagagggaagtataaggacatttgcacctcatggagagcacctgatgggggttccaag 40
gccaacttctccatcggttccatgatgcaagaccttgcagggaacctacagatgctacggttctgttacttactcccccta
tcagttgtcagctcccagtgacctctggacatcgtcatcacaggtctatatgagaaaccttctctctcagcccagccgg
gccccacggttttggcaggagagagcgtgaccttgcctgcagctcccggagctcctatgacatgtaccatctatccagg
gagggggaggcccatgaacgtaggttctctgcaggggcccaaggtcaacggaacattccaggccgacttctcttggggccc
tgccaccacggaggaacctacagatgcttcggctcttccgtgactctccctatgagtgggtcaaacctcagtgaccac
tgcttgcttctgtcaggaacaccttcaaatagttggccttccccactgaaccaagctccaaaacgggtaacccaga
cacctgcatgttctgattgggacctcagtggtcaaaatcccttccaccatcctccttcttcttctccttcatcgctgggtg
ctccaacaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcagggaaacagaacagtgaaacagcaggagttctgtgaac
aagacctcaggaggtgtcatacgcataaGtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgggtatt
cttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggc 50

tttcattttctcctccttgtataaatcctgggttgctgtctctttatgaggagtgtggcccggtgtcaggcaacgtggcg
 tgggtgtgactgtgtttgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttc
 gctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttgcccgctgctggacaggggctcggtgttggg
 cactgacaattccgtgggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgctgtgttggcacctggattctgc
 gcgggacgtcctttctgtacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctccccgcgccctgtcgccgctctcgcg
 cctttccgctgttccgcttcgcccctcagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgctggaattcgagctcg
 gtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaaaggggggactggaagggt
 aattcactcccaacgaagacaagatctgcttttggctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagc
 tctctgggtaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgttcaagtagtgtgtgccgctctg
 ttgtgtgactctggtaactagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtca
 tcttattattcagttttataacttgcaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttggttattgcagcttataatg
 gttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttactgcatcttagttgtggtttgtccaaa
 ctcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatccccgccctaacctccgcccagtccgcccattctccgccc
 ggctgactaattttttttttatgtcagaggccgaggccgctcgccctctgagctattccagaagtagtgaggaggctt
 ttttggaggcctacgtttttgctcgagacgtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggccgt
 cgttttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcgttacccaacttaatcgccctgcagcacatcccccttcgccagct
 ggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgcc
 tgtagcggcgcattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcgccg
 tcctttcgctttcttcccttcccttctcgccacgttcgcccgtttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttag
 ggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatgggtcacgtagtgggcatcgccc
 tgatagacgggttttcgccccttgacgttggagtcacgttctttaatagtgagctctgttccaaactggaacaacact
 caaccctatctcggtctattcttttgatttataagggttttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgattt
 aacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaaatattaacgtttacaatttcccaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcg
 gaaccctatttggtttattttctaaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgtctcaa
 taatattgaaaaaggaagagtatgagtttaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcc
 tgtttttgctcaccagaaacgtgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg

【0474】

C D 1 9 に結合する抗原結合ドメインおよび P D 1 ドメインを含む細胞質ドメインを含
 む阻害性 C A R の核酸配列を下に提供する。

【0475】

C D 1 9 - P D 1 キメラ C A R 配列 (配列番号 3 3 1)

TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGAT
 GCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGC
 TTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGACAGGTTTTACCGTTCATCACCGAAACGCGGAGACGAA
 AGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCATTTCGG
 GGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTG
 ATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGG
 CATTTTGCTTCTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTG
 GGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC
 TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGGCATACACTATT
 CTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTACACAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCAGT
 GCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTT
 TTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGC
 GTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGG
 CAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTAT
 TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA
 TCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTG
 ATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAG
 GATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACC
 CCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCACCG

10

20

30

40

50

CTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT
 ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGACCGCCTACATACCTCGCTC
 TGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCG
 GATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
 ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCCAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGG
 TCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGGGTTTCGCCACCTC
 TGAAGTTCAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
 GTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCG
 CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
 CCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGC
 GGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTC
 GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATAC
 GACTCACTATAGGGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGTTCGACATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGC
 CTTGCTGCTCCACGCGCCAGGCCGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAG
 TCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGATGGAAGCTGTTAAA
 CTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC
 TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTTCG
 GAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGATCTGAGGTGAAA
 CTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACC
 CGACTATGGTGTAAAGCTGGATTGCCAGCCTCCACGAAAGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAACCA
 CATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAAC
 AGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTG
 GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAgctagcACGCGTggtggcggaggttctggaggtgggggttccaccctgg
 tgggttggtgtcgtgggcccctgtgggcagcctggtgtgtgttagtctgggtcctggccgtcatctgtctccgggcccga
 cgagggacaataggagccaggcgaccggccagccccctgaaggaggaccctcagccgtgcctgtgttctctgtggacta
 tggggagctggatttccagtggcgagagaagacccccggagccccccgtgcccgtgttccctgagcagacggagtatgcca
 ccattgtcttctctagcggaatgggcacctcatccccgcccgcaggggctcagctgacggccctcggagtgccagcca
 ctgaggcctgaggatggacactgtctcttggeccctctgaGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTAGTGGCGCC

10

20

【0476】

30

本発明はまた、ここに記載するNKR-CAR、例えば、KIR-CARを含み、さら
 に、CAR発現細胞を活性化するために、例えば、CAR発現細胞の増殖または細胞毒性
 活性を高めるために、シグナル伝達を促進するための、NKR-CARと相互作用するア
 ダプター分子を含む核酸分子およびコード化アミノ酸配列も提供する。ここに記載する抗
 原結合ドメインのいずれも、下に提供するNKR-CAR構築物における抗原結合ドメイ
 ンの代替であり得る。

【0477】

DAP12の核酸配列は次のとおりである。

ATGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGTTCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCTGTCCAGGT
 CCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGTCTGA
 CAGTGCTCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGCGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGG
 AAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACAC
 ACAGAGGCCGTATTACAAATGA

40

(配列番号367)

DAP12のアミノ酸配列は次のとおりである。

MGGLEPCSRFLLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALA
 VYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK

(配列番号368)

【0478】

FceRgの核酸配列は次のとおりである。

50

ATGATTCCAGCAGTGGTCTTGCTCTTACTCCTTTTGGTTGAACAAGCAGCGGCCCTGGGAGAGCCTCAGCTCTGCTATAT
CCTGGATGCCATCCTGTTTCTGTATGGAATTGTCCTCACCTCCTCTACTGCCGACTGAAGATCCAAGTGCAGAAAGGCAG
CTATAACCAGCTATGAGAAATCAGATGGTGTTTACACGGGCCTGAGCACCAGGAACCAGGAGACTTACGAGACTCTGAAG
CATGAGAAACCACCACAGTAG

(配列番号 369)

F c e R g のアミノ酸配列は次のとおりである。

MIPAVVLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEK
SDGVYTLSTRNQETYEtlKHEKPPQ

(配列番号 370)

【0479】

N K R - C A R およびアダプター分子を含む多鎖 N K R - C A R の核酸配列もここに提供
する。このような構築物において、N K R - C A R およびアダプター分子の核酸配列は
、ペプチド開裂部位、例えば、T 2 A をコードする核酸配列により連結される。これらの
核酸分子は開裂前に単鎖ポリペプチドとして翻訳され、単鎖ポリペプチドのアミノ酸配列
もここに提供する。

【0480】

ペプチド開裂部位 T 2 A により連結された、メソテリンに結合する抗原結合ドメイン、
例えば、S S 1、および K I R S 2 細胞質ドメインを含む N K R - C A R ならびに D A P
1 2 アダプター分子を含む核酸およびアミノ酸配列を下に提供する。

D A P 1 2 - T 2 A - S S 1 - K I R S 2 (配列番号 332)

1464 bp DNA

【表 31】

特性	位置
D A P 1 2	1..339
T 2 A 配列	352..408
S S 1 - s c F v	481..1200
G S - リンカー	1207..1236
K I R 2 D S 2 由来配列	1237..1464

【0481】

ATGGGGGAC TTGAACCTG CAGCAGGTTT CTGCTCCTGC CTCTCCTGCT GGCTGTAAGT
GGTCTCCGTC CTGTCCAGGT CCAGGCCAG AGCGATTGCA GTTGCTCTAC GGTGAGCCCCG
GGCGTGCTGG CAGGGATCGT GATGGGAGAC CTGGTGCTGA CAGTGCTCAT TGCCCTGGCC
GTGTACTTCC TGGGCCGGCT GGTCCCTCGG GGGCGAGGGG CTGCGGAGGC AGCGACCCGG
AAACAGCGTA TCACTGAGAC CGAGTCGCCT TATCAGGAGC TCCAGGGTCA GAGGTCGGAT
GTCTACAGCG ACCTCAACAC ACAGAGGCCG TATTACAAAG TCGAGGGCGG CGGAGAGGGC
AGAGGAAAGTC TTCTAACATG CGGTGACGTG GAGGAGAATC CCGGCCCTAG GATGGCCTTA
CCAGTGACCG CCTTGCTCCT GCCGCTGGCC TTGCTGCTCC ACGCCGCCAG GCCGGGATCC
CAGGTACAAC TGCAGCAGTC TGGGCCTGAG CTGGAGAAGC CTGGCGCTTC AGTGAAGATA
TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA CTCATTCACT GGCTACACCA TGAAGTGGGT GAAGCAGAGC
CATGGAAGA GCCTTGAGTG GATTGGAATT ATTACTCCTT ACAATGGTGC TTCTAGCTAC
AACCAGAAAGT TCAGGGGCAA GGCCACATTA ACTGTAGACA AGTCATCCAG CACAGCCTAC
ATGGACCTCC TCAGTCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCAGTCT ATTTCTGTGC AAGGGGGGGT
TACGACGGGA GGGGTTTTGA CTAAGGGGCA CAAGGGACCA CGGTCACCGT CTCCTCAGGT
GGAGGCGGTT CAGGCGGCGG TGGCTCTAGC GGTGGTGGAT CGGACATCGA GCTCACTCAG
TCTCCAGCAA TCATGTCTGC ATCTCCAGGG GAGAAGGTCA CCATGACCTG CAGTGCCAGC
TCAAGTGTA GTTACATGCA CTGGTACCAG CAGAAGTCAG GCACCTCCCC CAAAAGATGG
ATTTATGACA CATCCAAACT GGCTTCTGGA GTCCCAGGTC GCTTCAGTGG CAGTGGGTCT
GGAAACTCTT ACTCTCTCAC AATCAGCAGC GTGGAGGCTG AAGATGATGC AACTTATTAC

10

20

30

40

50

TGCCAGCAGT GGAGTAAGCA CCCTCTCACG TACGGTGCTG GGACAAAGTT GGAAATCAAA
 GCTAGCGGTG GCGGAGGTTC TGGAGGTGGG GGTTCCTCAC CCACTGAACC AAGCTCCAAA
 ACCGGTAACC CCAGACACCT GCATGTTCTG ATTGGGACCT CAGTGGTCAA AATCCCTTTC
 ACCATCCTCC TCTTCTTTCT CCTTCATCGC TGGTGCTCCA AAAAAAAAAA TGCTGCTGTA
 ATGGACCAAG AGCCTGCAGG GAACAGAACA GTGAACAGCG AGGATTCTGA TGAACAAGAC
 CATCAGGAGG TGTCATACGC ATAA

【0482】

DAP12-T2A-SS1-KIRS2 (配列番号333)

488 aaタンパク質

【表32】

10

特性	位置
DAP12	1..113
T2A配列	118..136
CD8アルファからのシグナルペプチド	138..158
SS1-scFv	161..400
GS-リンカー	403..412
KIR2DS2由来配列	413..487

【0483】

20

配列

MGGLEPCSRF LLLPLLLAVS GLRPVQVQAQ SDCSCSTVSP GVLGIVMGD LVLTVLIALA
 VYFLGRLVPR GRGAAEAATR KQRITETESP YQELQGQRSD VYSDLNTQRP YYKVEGGGEG
 RGSLLTCGDV EENPGPRMAL PVTALLPLA LLLHAARPGS QVQLQSGPE LEKPGASVKI
 SCKASGYSFT GYTMNWVKQS HGKSLEWIGL ITPYNGASSY NQKFRGKATL TVDKSSSTAY
 MDLLSLTSED SAVYFCARGG YDGRGFDYWQ QGTTVTVSSG GGGSGGGSS GGGSDIELTQ
 SPAIMSASPG EKVTMTCSAS SSVSYMHWYQ QKSGTSPKRW IYDTSKLASG VPGRFSGSGS
 GNSYSLTISS VEAEDDATYY CQQWSKHPLT YGAGTKLEIK ASGGGGSGGG GSSPTEPSSK
 TGNPRHLHVL IGTSVVKIPF TILLFFLLHR WCSNKKNAAV MDQEPAGNRT VNSEDSDSEQD
 HQEVSYA

30

【0484】

ペプチド開裂部位T2Aにより連結した、メソテリンに結合する抗原結合ドメイン、例えば、SS1、およびTNKp46細胞質ドメインを含むNKR-CAR、ならびにFcεRγアダプター分子を含む核酸およびアミノ酸配列を下に提供する。

FCERG-T2A-SS1-TNKp46 (配列番号334)

1365bp DNA

【表33】

特性	位置
FCERG	1..258
T2A	271..327
CD8アルファからのシグナルペプチド	331..393
SS1-scFv	400..1119
GS-リンカー	1126..1155
NKp46由来配列	1156..1365

40

【0485】

配列

ATGATTCCAG CAGTGGTCTT GCTCTTACTC CTTTTGGTTG AACAAAGCAGC GGCCCTGGGA
 GAGCCTCAGC TCTGCTATAT CCTGGATGCC ATCCTGTTTC TGTATGGAAT TGTCCTCACC

50

CTCCTCTACT GCCGACTGAA GATCCAAGTG CGAAAGGCAG CTATAACCAG CTATGAGAAA
 TCAGATGGTG TTTACACGGG CCTGAGCACC AGGAACCAGG AGACTTACGA GACTCTGAAG
 CATGAGAAAC CACCACAGTC CGGAGGCGGC GGAGAGGGCA GAGGAAGTCT TCTAACATGC
 GGTGACGTGG AGGAGAATCC CGGCCCTAGG ATGGCCTTAC CAGTGACCGC CTTGCTCCTG
 CCGCTGGCCT TGCTGCTCCA CGCCGCCAGG CCGGGATCCC AGGTACAAC GCAGCAGTCT
 GGGCCTGAGC TGGAGAAGCC TGGCGCTTCA GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAC
 TCATTCACTG GCTACACCAT GAACTGGGTG AAGCAGAGCC ATGGAAAGAG CCTTGAGTGG
 ATTGGACTTA TTA CTCTTA CAATGGTGCT TCTAGCTACA ACCAGAAGTT CAGGGGCAAG
 GCCACATTAA CTGTAGACAA GTCATCCAGC ACAGCCTACA TGGACCTCCT CAGTCTGACA
 TCTGAAGACT CTGCAGTCTA TTTCTGTGCA AGGGGGGGTT ACGACGGGAG GGGTTTTGAC
 TACTGGGGCC AAGGGACCAC GGTCACCGTC TCCTCAGGTG GAGGCGGTTT AGGCGGCGGT
 GGCTCTAGCG GTGGTGGATC GGACATCGAG CTCCTCAGT CTCCAGCAAT CATGTCTGCA
 TCTCCAGGGG AGAAGGTCAC CATGACCTGC AGTGCCAGCT CAAGTGTAAG TTACATGCAC
 TGGTACCAGC AGAAGTCAGG CACCTCCCC AAAAGATGGA TTTATGACAC ATCCAAACTG
 GCTTCTGGAG TCCCAGGTCG CTTCAGTGGC AGTGGGTCTG GAAACTCTTA CTCTCTCACA
 ATCAGCAGCG TGGAGGCTGA AGATGATGCA ACTTATTACT GCCAGCAGTG GAGTAAGCAC
 CCTCTCACGT ACGGTGCTGG GACAAAGTTG GAAATCAAAG CTAGCGGTGG CGGAGGTTCT
 GGAGTG GGG GTTCTTAAC CACAGAGACG GGA CTCCAGA AAGACCATGC CCTCTGGGAT
 CACACTGCC AGAATCTCCT TCGGATGGG CTGGCCTTTC TAGTCCTGGT GGCTCTAGTG
 TGGTTCTTGG TTGAAGACTG GCTCAGCAGG AAGAGGACTA GAGAGCGAGC CAGCAGAGCT
 TCCACTTGGG AAGGCAGGAG AAGGCTGAAC ACACAGACTC TTTGA

10

20

【0486】

FCERG-T2A-SS1-TNK p46 (配列番号335)

【表34】

455aa

タンパク質

特性

位置

FCERG

1..86

T2A

91..109

CD8アルファからのシグナルペプチド

111..131

SS1-scFv

134..373

GS-リンカー

376..385

NK p46由来配列

386..454

30

【0487】

配列

MIPAVLLLLL LLVEQAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV RKAITSYEK
 SDGVYTLST RNQETYETLK HEKPPQSGGG GEGRGSLLTC GDVEENPGPR MALPVTALLL
 PLALLLHAAR PGSQVQLQGS GPELEKPGAS VKISCKASGY SFTGYTMNWV KQSHGKSLEW
 IGLITPYNGA SSYNQKFRGK ATLTVDKSSS TAYMDLLSLT SEDSAVYFCA RGGYDGRGFD
 YWQGQTTTVT SSGGGGSGGG GSSGGGSDIE LTQSPAIMSA SPGEKVTMTC SASSSVSYM
 WYQQKSGTSP KRWIYDTSKL ASGVPGRFSG SGSGNSYSLT ISSVEAEDDA TYCQQWSKH
 PLTYGAGTKL EIKASGGGGS GGGGSLTTET GLQKDHALLWD HTAQNLRLMG LAFLVLVALV
 WFLVEDWLSR KRTRERASRA STWEGRRRLN TQTL

40

【0488】

ペプチド開裂部位T2Aにより連結した、CD19に結合する抗原結合ドメインおよび
 KIRS2細胞質ドメインを含むNK R-CARならびにDAP12アダプター分子を含
 む核酸およびアミノ酸配列を下に提供する。

DAP12-T2A-CD19-KIRS2 (配列番号336)

1470bp DNA

50

【表 3 5】

特性	位置
DAP12	1..339
T2A配列	352..408
CD19-s c F v	481..481
GS-リンカー	1213..1242
KIR2DS2由来配列	1243..1470

【0489】

10

配列

ATGGGGGGAC TTGAACCCTG CAGCAGGTTC CTGCTCCTGC CTCTCCTGCT GGCTGTAAGT
 GGTCTCCGTC CTGTCCAGGT CCAGGCCAG AGCGATTGCA GTTGCTCTAC GGTGAGCCCG
 GGCCTGCTGG CAGGGATCGT GATGGGAGAC CTGGTGCTGA CAGTGCTCAT TGCCCTGGCC
 GTGTACTTCC TGGGCCGGCT GGTCCCTCGG GGGCGAGGGG CTGCGGAGGC AGCGACCCGG
 AAACAGCGTA TCACTGAGAC CGAGTCGCCT TATCAGGAGC TCCAGGTCA GAGGTCGGAT
 GTCTACAGCG ACCTCAACAC ACAGAGGCCG TATTACAAAG TCGAGGGCGG CGGAGAGGGC
 AGAGGAAGTC TTCTAACATG CGGTGACGTG GAGGAGAATC CCGGCCCTAG GATGGCCTTA
 CCAGTGACCG CCTTGCTCCT GCCGCTGGCC TTGCTGCTCC ACGCCGCCAG GCCGGGATCC
 GACATCCAGA TGACACAGAC TACATCCTCC CTGTCTGCCT CTCTGGGAGA CAGAGTCACC
 ATCAGTTGCA GGGCAAGTCA GGACATTAGT AAATATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GATGGAAGTC TTAAACTCCT GATCTACCAT ACATCAAGAT TACTCTCAGG AGTCCCATCA
 AGGTTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGAAACAGAT TATTCTCTCA CCATTAGCAA CCTGGAGCAA
 GAAGATATTG CCACTTACTT TTGCCAACAG GGTAATACGC TTCCGTACAC GTTCGGAGGG
 GGGACTAAGT TGGAATAAAC AGGTGGCGGT GGCTCGGGCG GTGGTGGGTC GGGTGGCGGC
 GGATCTGAGG TGAAACTGCA GGAGTCAGGA CCTGGCCTGG TGGCGCCCTC ACAGAGCCTG
 TCCGTCACAT GCACTGTCTC AGGGGTCTCA TTACCCGACT ATGGTGTAAG CTGGATTGCG
 CAGCCTCCAC GAAAGGGTCT GGAGTGCTG GGAGTAATAT GGGGTAGTGA AACCACATAC
 TATAATTGAG CTCTCAAATC CAGACTGACC ATCATCAAGG ACAACTCCAA GAGCCAAGTT
 TTCTTAAAAA TGAACAGTCT GCAAACTGAT GACACAGCCA TTTACTACTG TGCCAAACAT
 TATTACTACG GTGGTAGCTA TGCTATGGAC TACTGGGGTC AAGGAACCTC AGTCACCGTC
 TCCTCAGCTA GCGGTGGCGG AGGTTCTGGA GGTGGGGGTT CCTCACCAC TGAACCAAGC
 TCCAAAACCG GTAACCCAG ACACCTGCAT GTTCTGATTG GGACCTCAGT GGTCAAAATC
 CCTTTCACCA TCCTCCTCTT CTTTCTCCTT CATCGCTGGT GCTCCAACAA AAAAAATGCT
 GCTGTAATGG ACCAAGAGCC TGCAGGGAAC AGAACAGTGA ACAGCGAGGA TTCTGATGAA
 CAAGACCATC AGGAGGTGTC ATACGCATAA

20

30

【0490】

DAP12-T2A-CD19-KIR2S2 (配列番号337)

489 aa タンパク質

【表 3 6】

40

特性	位置
DAP12	1..113
T2A配列	118..136
CD8アルファからのシグナルペプチド	138..158
CD19-s c F v	161..402
GS-リンカー	405..414
KIR2DS2由来配列	415..489

【0491】

50

配列

MGGLEPCSRF LLLPLLLAVS GLRPVQVQAQ SDCSCSTVSP GVLGIVMGD LVLTVLIALA
 VYFLGRLVPR GRGAAEAATR KQRITETESP YQELQGQRSD VYSDLNTQRP YYKVEGGGEG
 RGSLLTCGDV EENPGPRMAL PVTALLPLA LLLHAARPGS DIQMTQTTSS LSASLGDRVT
 ISCRASQDIS KYLNWYQKP DGTVKLLIYH TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ
 EDIATYFCQQ GNTLPYTFGG GTKLEITGGG GSGGGGSGGG GSEVKLQESG PGLVAPSQSL
 SVTCTVSGVS LPDYGVSWIR QPPRKGLEWL GVIWGSETTY YNSALKSRLT I IKDNSKSQV
 FLKMNSLQTD DTAIYYCAKH YYYGGSYAMD YWGQGTSTV SSASGGGGSG GGGSSPTEPS
 SKTG NPRHLH VLIGTSVVKI PFTILLFLL HRWC SNKNA AVMDQEPAGN RTVNSEDSDE
 QDHQEVSYA*

10

【0492】

ある態様において、膜貫通ドメインはK I R 2 D S 2膜貫通ドメインである。K I R 2 D S 2膜貫通ドメインのアミノ酸配列は次のとおりである。

VLIGTSVVKIPFTILLFLL(配列番号357)

【0493】

ある態様において、膜貫通ドメインはK I R 2 D L 3膜貫通ドメインである。K I R 2 D L 3膜貫通ドメインのアミノ酸配列は次のとおりである。

VLIGTSVVIILFILLFLL(配列番号358)

【0494】

ある態様において、膜貫通ドメインはN K p 4 6膜貫通ドメインである。N K p 4 6膜貫通ドメインのアミノ酸配列は次のとおりである。

20

LLRMGLAFLVLVALVWFLVEDWLS(配列番号359)

【0495】

ある態様において、細胞質ドメインは、K I R 2 D S 2、例えば、図29に示すような天然に存在するK I R S 2 D S 2由来である。K I R S 2ドメインとも称するK I R 2 D S 2由来細胞質ドメインのアミノ酸配列は次のとおりである。

HRWC SNKNA AVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA(配列番号360)

【0496】

ある態様において、細胞質ドメインは、K I R 2 D L 3、例えば、図30に示すような天然に存在するK I R 2 D L 3由来である。K I R L 3ドメインとも称するK I R 2 D L 3由来細胞質ドメインのアミノ酸配列は次のとおりである。

30

HRWC CNKNA AVMDQEPAGNRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLNHCVFTQRKITHPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAEP(配列番号361)

【0497】

ある態様において、細胞質ドメインは、N K p 4 6、例えば、図31に示すような天然に存在するN K p 4 6由来である。t N K p 4 6またはT N K p 4 6ドメインとも称するN K p 4 6由来細胞質ドメインのアミノ酸配列は次のとおりである。

RKRTREASRASTWEGRRRLNTQTL(配列番号362)

【0498】

ある態様において、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインは、集合的に、下に提供するアミノ酸配列を有する。

40

VLIGTSVVKIPFTILLFLLHRWC SNKNA AVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA(配列番号371)

【0499】

メソテリンに結合するヒト抗原結合ドメインを含むK I R - C A Rの核酸およびアミノ酸配列もここに提供する。例えば、リーダー配列、ヒトメソテリン特異的抗原結合ドメインM5およびK I R S 2細胞質ドメインを含むK I R - C A Rの核酸配列を下に提供する。下線を引いた配列は、任意の他の抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載するヒト抗メソテリンc F vと容易に相互交換できる、M5 s c F vの配列を示す。

Atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgcccaggccgggatcccaagtccaact
 cgttcaatcaggcgcagaagtcgaaaagcccgagcatcagtcaggctctcttgaaggcttccggctacaccttcacgg

50

actactacatgcactgggtgcgccaggctccaggccagggaactggagtggatgggatggatcaaccggaattccggggga
 actaactacgcccagaagtttcaggccgggtgactatgactcgcgatacctcgatctcgactgcgtacatggagctcag
 ccgcctccggctcggacgataccgccgtgtactattgtgcgtcgggatgggacttcgactactgggggcagggcactctgg
 tcactgtgtcaagcggaggaggtggatcagggtggaggtggaagcgggggaggaggttccggcggcggaggatcagatatc
 gtgatgacgcaatcgcttctcgttgtccgcatccgtgggagacagggtgaccattacttgcagagcgtcccagtcctat
 tcggtactacctgtcgttggtaccagcagaagccggggaaagcccaaaactgcttatctatactgcctcgatcctccaaa
 acggcgtgccatcaagattcagcgggttcgggcagcgggaccgactttaccctgactatcagcagcctgcagccggaagat
 ttgccacgtactactgcctgcaaacctacaccaccccggaacttcggacctggaaccaaggtggagatcaaggctagcgg
 tggcggagggttctggaggtgggggttctcaccactgaaccaagctccaaaaccggtaacccagacacctgcattgttc
 tgattgggacctcagtggtcaaaatccctttcaccatcctcctctcttcttctcttctccttcacgtggtgtccaacaaaaa
 aatgctgctgtaatggaccaagagcctgcagggaacagaacagtgaacagcaggattctgatgaacaagaccatcagga
 ggtgtcatacgcataa

(配列番号 3 6 3)

【0500】

リーダー配列、ヒトメソテリン特異的抗原結合ドメインM5およびK I R S 2細胞質ドメインを含むK I R - C A Rのアミノ酸配列を下に提供する。下線を引いた配列は、任意の他の抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載するヒト抗メソテリンc F vと容易に相互交換できる、M5 s c F vの配列を示す。

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCASGYTFTDYMHVVRQAPQGLEWMGWINPNSGG
 TNYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGWDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDI
 VMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI RYYLSWYQQKPKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
 FATYYCLQYTTTPDFGPGTKVEIKASGGGGSGGGSSPTEPSSKGTGNPRHLHVLIGTSVVKIPFTILLFLLHRWCNKK
 NAAVMDQEPAGNRTVNSDSDEQDHQEVSYA

(配列番号 3 6 4)

【0501】

他の例において、リーダー配列、ヒトメソテリン特異的抗原結合ドメインM5およびK I R S 2細胞質ドメインを含み、さらにペプチド開裂部位およびアダプター分子D A P 1 2配列を含む多鎖K I R - C A Rの核酸配列を下に提供する。下線を引いた配列は、任意の他の抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載するヒト抗メソテリンc F vと容易に相互交換できる、M5 s c F vの配列を示す。太字配列はD A P 1 2配列を示し、斜体配列はペプチド開裂部位T 2 Aを示す。

10

20

30

【化 1】

ATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGTTCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCG
TCCTGTCCAGGTCCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGA
TCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTC
CCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCCTTA
TCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAT
ccggaggcagcggagagggcagaggaagtcttctaacaatgcggtgacgtggaggagaatcccgccCT
AGGatggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgtggccttgctgctccacgccgccaggccggG
ATCCcaagtccaactcggttcaatcaggcgcagaagtcgaaaagcccgagcatcagtc aaagtctctt
gcaaggcttccggctacaccttcacggactactacatgcactgggtgcgccaggctccaggccaggga
ctggagtggatggatggatcaacccgaattccgggggaactaactacgccccagaagtttcagggccg
ggtgactatgactcgcgatacctcgatctcgactgcgtacatggagctcagccgcctccggtcggacg
ataccgccgtgtactattgtgcgtcgggatgggacttcgactactgggggcagggcactctggtcact
gtgtcaagcggaggaggtggatcaggtggaggtggaagcgggggaggaggttccggcgccggaggatc
agatatcgtgatgacgcaatcgcttctcgttgctccgcacccgtgggagacagggtgaccattactt
gcagagcgtcccagtcatttcggtactacctgtcgtggtaccagcagaagccgggggaaagccccaaaa
ctgcttatctatactgcctcgatcctccaaaacggcgtgccatcaagattcagcgggttcgggcagcgg
gaccgactttaccctgactatcagcagcctgcagccggaagatttcgccacgtactactgcctgcaaa
cctacaccacccccgacttcggacctggaaccaaggtggagatcaagGctagcgggtggcggaggttct
ggaggtgggggttctcaccactgaaccaagctccaaaaccggt aaccccagacacctgcatGTTCT
GATTGGGACCTCAGTGGTCAAAATCCCTTTACCATCCTCCTCTTCTTTCTCCTTcatcgctggtgct
ccaacaaaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcagggaaacagaacagtgaacagcgaggat
tctgatgaacaagaccatcaggaggtgtcatacgcataa

10

20

(配列番号 3 6 5)

30

【0 5 0 2】

リーダー配列、ヒトメソテリン特異的抗原結合ドメインM5およびK I R S 2細胞質ドメインを含み、さらにペプチド開裂部位およびアダプター分子D A P 1 2配列を含む多鎖K I R - C A Rのアミノ酸配列を下に提供する。下線を引いた配列は、任意の他の抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載するヒト抗メソテリンc F vと容易に相互交換できる、M5 s c F vの配列を示す。太字配列はD A P 1 2配列を示し、斜体配列はペプチド開裂部位T 2 Aを示す。

【化 2】

MGGLEPCSRFLLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLV
PRGRGAEEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKSGSGEGRGSLLT CGDVEENPGP
RMALPVTALLPLALLLHAARPGSQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTF TDYYMHVWRQAPGQG
LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTIMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCASGWD F DYWGQGT LVT
VSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI RYYLSWYQQKPKAPK
LLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKASGGGGS
GGGSSPTEPSSKTGNPRHLHVLIGTSVVKIPFTILLFFLLHRWCSNKKNAAVMDQE PAGNRTVNSD
SDEQDHQEVSYA

40

(配列番号 3 6 6)

【0 5 0 3】

50

細胞質ドメイン

ここに記載するCAR、例えば、NKRCARまたはTCARの細胞質ドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが導入されている免疫エフェクター細胞の正常エフェクター機能の少なくとも一つを活性化できる。

【0504】

本発明のCARにおいて使用するための細胞内シグナル伝達ドメインの例は、T細胞受容体(TCR)および抗原受容体結合後にシグナル伝達の開始に協調して働く共受容体の細胞質配列、ならびに同じ機能的能力を有するこれらの配列のあらゆる誘導体またはバリエーションおよびあらゆる組み換え配列を含む。

【0505】

10

TCR単独により産生されたシグナルが、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の完全活性化に不十分であり、二次的および／または共刺激性シグナルも必要であることが知られている。それゆえに、免疫エフェクター細胞活性化、例えば、T細胞活性化またはNK細胞活性化は、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列が介在するということができる：TCRを介する抗原依存性一次活性化を開始するもの(一次細胞内シグナル伝達ドメイン)および二次的または共刺激性シグナルを提供するために抗原非依存的方法で働くもの(二次的細胞質ドメイン、例えば、共刺激性ドメイン)。

【0506】

一次細胞内シグナル伝達ドメイン

ある態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、融合している細胞外ドメイン、例えば、抗原結合ドメインが同族抗原に結合したとき、細胞内シグナルを産生する。これは、一次刺激性分子由来であり、例えば、一次刺激性分子の細胞内配列を含む。これは、例えば、融合している抗原結合ドメインが同族抗原と結合したとき、細胞内シグナルを産生するのに十分な一次刺激性分子配列を含む。

20

【0507】

一次刺激性分子は、同族リガンドとの結合により、例えば、それが発現される細胞で免疫エフェクター応答を介在する分子である。一般に、抗原を含む同族リガンドとの結合に依存する、細胞内シグナルを産生する。TCR/CD3複合体は、例示的一次刺激性分子であり、ペプチドと共に充填された同族リガンド、例えば、MHC分子への結合により、細胞内シグナルを産生する。一般に、例えば、TCR/CD3一次刺激性分子の場合、一次細胞内シグナル伝達ドメインによる細胞内シグナルの産生は、一次刺激性分子の抗原への刺激による。

30

【0508】

一次刺激は、TGF- β の下方制御および／または細胞骨格構造の再編成などのような、ある分子の発現の改変を仲介し得る。刺激は、例えば、共刺激存在下であってよく、T細胞の免疫エフェクター機能の最適化、例えば、増加をもたらす。例えば、T細胞の状況における、刺激は、T細胞応答、例えば、増殖、活性化、分化などを仲介できる。

【0509】

ある態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、シグナル伝達モチーフ、例えば、免疫受容体チロシン活性化モチーフまたはITAMを含む。一次細胞内シグナル伝達ドメインは、TCRゼータ(CD3ゼータ)、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(別名“ICOS”)、Fc ϵ RI、DAP10、DAP12、およびCD66dからのITAM含有細胞質シグナル伝達配列を含み得る。

40

【0510】

ITAM含有一次細胞内シグナル伝達ドメインの例を表2に提供する。

【表 3 7】

表 2：一次細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、I T A M 含有ドメイン)

CD 3 ゼータ	CD 5
F c R ガンマ	CD 2 2
F c R ベータ	CD 2 7 8(“I C O S”)
CD 3 ガンマ	F c イプシロン R I(F c ε R I)
CD 3 デルタ	CD 6 6 d
CD 3 イプシロン	D A P 1 0
CD 7 9 a	D A P 1 2
CD 7 9 b	

10

【0 5 1 1】

ある態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、天然 I T A M ドメインと比較して、改変された(例えば、増加または減少した)活性を有する、修飾 I T A M ドメイン、例えば、変異 I T A M ドメインを含む。ある態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、修飾 I T A M 含有一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、最適化および／または切断 I T A M 含有一次細胞内シグナル伝達ドメインを吹く。ある態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、1、2、3、4 またはそれ以上の I T A M モチーフを含む。

20

【0 5 1 2】

一次細胞内シグナル伝達ドメインは一次刺激性分子の機能的フラグメントまたはアナログを含む(例えば、C D 3 ゼータ — GenBank Acc. No. BAG36664.1)。細胞内領域全体または融合したもしくは二量体化スイッチにより連結された抗原結合ドメインが同族抗原に結合したとき、細胞内シグナルの産生に十分である細胞内領域のフラグメントを含み得る。ある態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、天然に存在する一次刺激性分子、例えば、表 2 に開示する一次刺激性分子、例えば、ヒト(GenBank Acc. No. BAG36664.1)または他の哺乳動物、例えば、非ヒト種、例えば、齧歯類、サル、霊長類またはマウス細胞内一次刺激性分子と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% または 99% 配列同一性を有する。ある態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 9 または配列番号 10 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% または 99% 配列同一性を有する。

30

【0 5 1 3】

ある態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、天然に存在するヒト一次刺激性分子、例えば、ここに開示する天然に存在するヒト一次刺激性分子と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一性を有するかまたはその対応する残基と 30、25、20、15、10、5、4、3、2 または 1 アミノ酸残基を超えて異なる。

【0 5 1 4】

T C A R の細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを、それ自体で含んでよくまたはそれを T C A R の状況で有用な任意の他の所望の細胞内シグナル伝達ドメインと組み合わせてよい。例えば、T C A R の細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、C D 3 ゼータ鎖部分および 1 以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含み得る。共刺激性シグナル伝達ドメインの例を下に提供する。

40

【0 5 1 5】

共刺激性シグナル伝達ドメイン

ある態様において、共刺激性シグナル伝達ドメインは、融合しているかもしくは二量体化スイッチにより連結された抗原結合ドメインが同族リガンドに結合したとき、細胞内シグナルを生じる。それは共刺激性分子由来である。それは、例えば、融合しているかもし

50

くは二量体化スイッチにより連結された抗原結合ドメインが同族リガンドに結合したとき、細胞内シグナルを生じるのに十分な一次共刺激性分子配列を含む。

【0516】

共刺激性分子は、免疫エフェクター応答を促進する、抗原受容体またはそのカウンターリガンド以外の細胞表面分子である。いくつかの例において、それらは、効率的なまたは増強された免疫応答に必要である。一般に、共刺激性分子は、ある態様において、抗原、例えば、T細胞の抗原結合ドメインにより認識される抗原以外である、同族リガンドへの結合に依存する細胞内シグナルを産生する。一般に、一次刺激性分子および共刺激性分子からのシグナル伝達は、免疫エフェクター応答に貢献し、いくつかの例において両者は、免疫エフェクター応答の効率的なまたは増強された賛成に必要である。

10

【0517】

共刺激性シグナル伝達ドメインは、共刺激性分子(例えば、4-1BB、CD28、CD27、およびICOS)の機能的フラグメントまたはアナログを含む。それは、細胞内領域全体または、例えば、融合しているかもしくは二量体化スイッチにより連結された抗原結合ドメインが、同族抗原と結合したとき、細胞内シグナルの産生に十分な共刺激性分子の細胞内領域のフラグメントを含み得る。ある態様において、共刺激性シグナル伝達ドメインは、ここに記載する天然に存在する共刺激性分子、例えば、ヒトまたは他の哺乳動物、例えば、非ヒト種、例えば、齧歯類、サル、霊長類またはマウス細胞内共刺激性分子と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%配列同一性を有する。ある態様において、共刺激性ドメインは、配列番号7、配列番号8、配列番号36または配列番号38と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%配列同一性を有する。

20

【0518】

共刺激性シグナル伝達ドメイン(細胞内シグナル伝達ドメイン)の例を、表3に提供する。

【表 3 8】

表 3：共刺激性シグナル伝達ドメイン(由来する共刺激性分子により同定)

CD 2 7	MHCクラス I 分子	S L A M F 7	I T G A 4	CD 1 1 c
CD 2 8	TNF受容体 タンパク質	NK p 8 0(K L R F 1)	I A 4	I T G B 1
4-1 BB(C D 1 3 7)	免疫グロブリン 様タンパク 質	NK p 4 4	CD 4 9 D	CD 2 9
O X 4 0	サイトカイン 受容体	NK p 3 0	I T G A 6	I T G B 2
CD 3 0	インテグリン	NK p 4 6	V L A-6	CD 1 8
CD 4 0	シグナル伝達 リンパ性活性 化分子(S L A Mタンパク質)	CD 1 9	CD 4 9 f	I T G B 7
I C O S(CD 2 7 8)	活性化NK細胞 受容体	CD 4	I T G A D	NK G 2 D
I C A M-1	T o l l リガ ンド受容体	CD 8 アルフ ァ	CD 1 1 d	TNFR 2
L F A-1(C D 1 1 a/C D 1 8)	B T L A	CD 8 ベータ	I T G A E	TRANCE /RANKL
CD 2	C D S	I L 2 R ベー タ	CD 1 0 3	D N A M 1(C D 2 2 6)
CD 7	I C A M-1	I L 2 R ガン マ	I T G A L	S L A M F 4(CD 2 4 4、2 B 4)
L I G H T	G I T R	I L 7 R アル ファ	CD 1 1 a	CD 8 4
NK G 2 C	B A F F R	I T G A 4	I T G A M	CD 9 6(T a c t i l e)
B 7-H 3	H V E M(L I G H T R)	V L A 1	CD 1 1 b	C E A C A M 1
CD 8 3 と特 異的に結合す るリガンド	K I R D S 2	CD 4 9 a	I T G A X	C R T A M
L y 9(CD 2 2 9)	CD 1 6 0(B Y 5 5)	P S G L 1	CD 1 0 0(S E M A 4 D)	CD 6 9
S L A M F 6(N T B-A、L y 1 0 8)	S L A M(S L A M F 1、CD 1 5 0、I P O -3)	B L A M E(S L A M F 8)	S E L P L G(CD 1 6 2)	L T B R

【0 5 1 9】

ある態様において、共刺激性シグナル伝達ドメインは、天然に存在するヒト一次刺激性分子、例えば、ここに開示する、例えば、表 3 に提供する、天然に存在するヒト共刺激性分子と少なくとも 7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 %

10

20

30

40

50

同一性を有するかまたはその対応する残基と30、25、20、15、10、5、4、3、2または1アミノ酸残基を超えて異なる。

【0520】

T C A Rの細胞質ドメイン内の細胞内シグナル伝達配列は、互いに、無作為のまたは特定の順番で連結され得る。所望により、短オリゴまたはポリペプチドリンカー、例えば、2〜10アミノ酸(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸)長が、細胞内シグナル伝達配列の愛暖オ結合を形成し得る。ある態様において、グリシンーセリンダブレットを適当なリンカーとして使用できる。ある態様において、単アミノ酸、例えば、アラニン、グリシンを適当なリンカーとして使用できる。

【0521】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインを2以上の、例えば、2、3、4、5またはそれ以上の、共刺激性シグナル伝達ドメインを含むように設計できる。ある態様において、2以上の、例えば、2、3、4、5またはそれ以上の、共刺激性シグナル伝達ドメインが、リンカー分子、例えば、ここに記載するリンカー分子により離される。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、2共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、リンカー分子はグリシン残基である。ある態様において、リンカーはアラニン残基である。

【0522】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインを、C D 3ゼータのシグナル伝達ドメインおよび4-1 B Bのシグナル伝達ドメインを含むように設計する。ある面において、4-1 B Bのシグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列を含むシグナル伝達ドメインである。ある面において、4-1 B Bのシグナル伝達ドメインは、配列番号18の核酸配列によりコードされる。ある面において、C D 3ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号9(変異体C D 3ゼータ)または配列番号10(野生型ヒトC D 3ゼータ)のアミノ酸配列を含むシグナル伝達ドメインである。

【0523】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3ゼータのシグナル伝達ドメインおよびC D 27のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、C D 27のシグナル伝達ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。ある面において、C D 27のシグナル伝達ドメインは、配列番号19の核酸配列によりコードされる。ある面において、C D 3ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号9(変異体C D 3ゼータ)または配列番号10(野生型ヒトC D 3ゼータ)のアミノ酸配列を含むシグナル伝達ドメインである。

【0524】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3ゼータのシグナル伝達ドメインおよびC D 28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、C D 28のシグナル伝達ドメインは、配列番号36のアミノ酸配列を含む。ある面において、C D 28のシグナル伝達ドメインは、配列番号37の核酸配列によりコードされる。ある面において、C D 3ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号9(変異体C D 3ゼータ)または配列番号10(野生型ヒトC D 3ゼータ)のアミノ酸配列を含むシグナル伝達ドメインである。

【0525】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3ゼータのシグナル伝達ドメインおよびI C O Sのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、I C O Sのシグナル伝達ドメインは、配列番号38のアミノ酸配列を含む。ある面において、I C O Sのシグナル伝達ドメインは、配列番号39の核酸配列によりコードされる。ある面において、C D 3ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号9(変異体C D 3ゼータ)または配列番号10(野生型ヒトC D 3ゼータ)のアミノ酸配列を含むシグナル伝達ドメインである。

【0526】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、種々の態様において、CARは、CARの細胞外ドメインに結合する膜貫通ドメインを含むように設計できる。先に記載のように、ここに記載するNK R-CARの膜貫通ドメインは、NK Rの膜貫通ドメイン、例えば、K I R膜貫通ドメイン、N C R膜貫通ドメイン、S L A M F膜貫通ドメイン、F c R膜貫通ドメイン、例えば、C D 1 6膜貫通ドメインまたはC D 6 4膜貫通ドメインまたはL y 4 9膜貫通ドメインであり得る。あるいは、ここに記載するNK R-CARまたはT C A Rの膜貫通ドメインは、下記の膜貫通ドメインのいずれか一つであり得る。

【0527】

膜貫通ドメインは、天然由来でも組み換え源由来でもよい。源が天然であるとき、ドメインは、あらゆる膜結合または膜貫通タンパク質由来であり得る。ある面において、膜貫通ドメインは、CARが標的に結合したときは常に細胞内ドメインにシグナル伝達できる。本発明において特に有用な膜貫通ドメインは、例えば、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖またはゼータ鎖、C D 2 8、C D 3 イブシロン、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8 (例えば、C D 8 アルファ、C D 8 ベータ)、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C D 1 5 4の少なくとも膜貫通領域を含み得る。ある態様において、膜貫通ドメインは、例えば、K I R D S 2、O X 4 0、C D 2、C D 2 7、L F A-1 (C D 1 1 a、C D 1 8)、I C O S (C D 2 7 8)、4-1 B B (C D 1 3 7)、G I T R、C D 4 0、B A F F R、H V E M (L I G H T R)、S L A M F 7、N K p 8 0 (K L R F 1)、N K p 4 4、N K p 3 0、N K p 4 6、C D 1 6 0、C D 1 9、I L 2 R ベータ、I L 2 R ガンマ、I L 7 R α、I T G A 1、V L A 1、C D 4 9 a、I T G A 4、I A 4、C D 4 9 D、I T G A 6、V L A-6、C D 4 9 f、I T G A D、C D 1 1 d、I T G A E、C D 1 0 3、I T G A L、C D 1 1 a、L F A-1、I T G A M、C D 1 1 b、I T G A X、C D 1 1 c、I T G B 1、C D 2 9、I T G B 2、C D 1 8、L F A-1、I T G B 7、T N F R 2、D N A M 1 (C D 2 2 6)、S L A M F 4 (C D 2 4 4、2 B 4)、C D 8 4、C D 9 6 (T a c t i l e)、C E A C A M 1、C R T A M、L y 9 (C D 2 2 9)、C D 1 6 0 (B Y 5 5)、P S G L 1、C D 1 0 0 (S E M A 4 D)、S L A M F 6 (N T B-A、L y 1 0 8)、S L A M (S L A M F 1、C D 1 5 0、I P O-3)、B L A M E (S L A M F 8)、S E L P L G (C D 1 6 2)、L T B R、P A G/Cbp、N K G 2 D、N K G 2 C および C D 1 9 の少なくとも膜貫通領域を含み得る。

【0528】

膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接する1以上のさらなるアミノ酸、例えば、膜貫通が由来したタンパク質の細胞外領域と関係する1以上のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10から最大15アミノ酸の細胞外領域)および/または膜貫通タンパク質が由来したタンパク質の細胞内領域と関係する1以上のさらなるアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10から最大15アミノ酸の細胞内領域)を含み得る。ある面において、膜貫通ドメインは、使用するCARの他方のドメインの一つと結合するものである。ある例において、膜貫通ドメインは、同一または異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのこのようなドメインの結合を避けるために、例えば、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するために、選択またはアミノ酸置換により修飾され得る。ある面において、膜貫通ドメインは、CAR発現細胞、例えば、C A R T細胞、細胞表面の他のCARとホモ二量体化できる。異なる面において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同じCAR発現細胞、例えば、C A R T細胞に存在する天然結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小化するために修飾または置換され得る。

【0529】

ある例において、膜貫通ドメインは、ヒンジ、例えば、ヒトタンパク質からのヒンジを介して、CARの細胞外領域、例えば、CARの抗原結合ドメインに結合できる。例えば、ある態様において、ヒンジは、ヒトI g (免疫グロブリン)ヒンジ、例えば、I g G 4 ヒンジまたはC D 8 a ヒンジであり得る。ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、

配列番号2のアミノ酸配列を含む(例えば、それからなる)。ある面において、膜貫通ドメインは、配列番号6の膜貫通ドメインを含む(例えば、それからなる)。

【0530】

ある面において、ヒンジまたはスペーサーは、IgG4ヒンジを含む。例えば、ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、配列番号3のアミノ酸配列のヒンジを含む。ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、配列番号14のヌクレオチド配列によりコードされるヒンジを含む。

【0531】

ある面において、ヒンジまたはスペーサーは、IgDヒンジを含む。例えば、ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、配列番号4のアミノ酸配列のヒンジを含む。ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、配列番号15のヌクレオチド配列によりコードされるヒンジを含む。

10

【0532】

ある面において、膜貫通ドメインは組み換えであってよく、この場合、優勢にロイシンおよびバリンのような疎水性残基を含む。ある面において、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットを、組み換え膜貫通ドメインの各末端に見ることができる。

【0533】

所望により、2〜10アミノ酸長の短オリゴまたはポリペプチドリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質領域の間の結合を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適当なリンカーを提供する。例えば、ある面において、リンカーは、配列番号5のアミノ酸配列を含む。ある態様において、リンカーは、配列番号16のヌクレオチド配列によりコードされる。

20

【0534】

ある面において、ヒンジまたはスペーサーは、KIR2DS2ヒンジを含む。

【0535】

キメラTCR

ある面において、ここに記載する抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載する、例えば、表4に提供するような、抗体または抗体フラグメントを、T細胞受容体(“TCR”)鎖の定常ドメインの1以上、例えば、TCRアルファまたはTCRベータ鎖に移植して、所望の腫瘍抗原に特異的に結合するキメラTCRを作ることができる。理論に縛られることを望まないが、キメラTCRは、抗原結合によるTCR複合体によりシグナル伝達すると考えられる。このようなキメラTCRは、当分野で知られる方法により製造できる(例えば、Willemsen RA et al, Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al, Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al, Gene Ther. 2012 Apr;19(4):365-74))。

30

【0536】

ある態様において、ここに記載するNKR-CAR発現細胞、例えば、ここに記載するKIR-CAR発現細胞は、さらに、キメラTCRを含む。別の態様において、ここに記載するNKR-CAR発現細胞を、キメラTCRを発現する細胞と組み合わせて投与する。このような態様において、キメラTCRの抗原結合ドメインは、ここに記載するNKR-CAR、例えば、KIR-CARと同じ腫瘍抗原に結合しても、ここに記載するNKR-CAR、例えば、KIR-CARと異なる腫瘍抗原に結合してもよい。

40

【0537】

スプリットCAR

ある態様において、CAR発現細胞は、スプリットCARを使用する。スプリットCARアプローチは、引用により本明細書に包含させる刊行物WO2014/055442号およびWO2014/055657号により詳細に記載されている。簡潔にいうと、スプリットCARシステムは、第一抗原結合ドメインおよび共刺激性ドメイン(例えば、4-1BB)を有する第一CARを発現する細胞を含み、該細胞はまた第二抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3ゼータ)を有する第二CARも発現す

50

る。細胞が第一抗原と遭遇したとき、共刺激性ドメインが活性化され、細胞が増殖する。細胞が第二抗原に遭遇したとき、細胞内シグナル伝達ドメインが活性化され、細胞死滅活性が開始される。それゆえに、CAR発現細胞は、両抗原の存在下でのみ完全に活性化される。ある態様において、第一抗原結合ドメインはここに記載する腫瘍抗原を認識し、第二抗原結合ドメイン異なるここに記載する腫瘍抗原を認識する。

【0538】

キメラ抗原受容体を制御するための戦略

CAR活性が制御され得る多くの方法がある。ある態様において、CAR活性が制御できる制御可能CARは、CAR治療の安全性および有効性を最適化するために望ましい。例えば、例えば、二量体化ドメインに融合した、カスパーゼを使用するアポトーシスの誘導(例えば、Di et al., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3; 365(18):1673-1683参照)を、本発明のCAR治療における安全スイッチとして使用できる。他の例において、CAR発現細胞はまた誘導性カスパーゼ9(iCaspase-9)分子も発現でき、これは、二量体化因子薬物(例えば、rimiducid(AP1903(Bellicum Pharmaceuticals)またはAP20187(Ariad)とも呼ばれる)の投与により、細胞のカスパーゼ9活性化およびアポトーシスに至る。iCaspase-9分子は、二量体化(CID)結合ドメインの化学誘導因子を含み、これは、CID存在下で二量体化に介在する。これは、CAR発現細胞の誘導的および選択的枯渇に至る。ある場合、iCaspase-9分子は、CARコードベクターと別の核酸分子によりコードされる。ある場合、iCaspase-9分子は、CARコードベクターと同じ核酸分子によりコードされる。iCaspase-9は、CAR発現細胞の何らかの毒性を避けるための安全スイッチを提供できる。例えば、Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963; およびDi Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673-83参照。

【0539】

本発明のCAR治療を制御するための代替的戦略は、例えば、抗体依存性細胞傷害(ADCC)の誘発により、例えば、CAR発現細胞を消失させることにより、CAR活性の脱活性化または遮断する小分子または抗体の利用を含む。例えば、ここに記載するCAR発現細胞は、細胞死、例えば、ADCCまたは補体誘導性細胞死を誘発できる分子により認識される抗原も発現し得る。例えば、ここに記載するCAR発現細胞はまた抗体または抗体フラグメントにより標的化され得る受容体も発現し得る。このような受容体の例は、EPCAM、VEGFR、インテグリン(例えば、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha I 3 / 4 \beta 3$ 、 $\alpha 4 \beta 7$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 αv)、TNF受容体スーパーファミリーのメンバー(例えば、TRAIL-R1、TRAIL-R2)、PDGF受容体、インターフェロン受容体、葉酸受容体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受容体、5T4、GD2、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IGIE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/ペイシジン、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7およびEGFRおよびその切断バージョン(例えば、1以上の細胞外エピトープを保持するが、細胞質ドメイン内の1以上の領域を欠くバージョン)を含む。

【0540】

例えば、ここに記載するCAR発現細胞は、シグナル伝達能力を欠くが、ADCCを誘発できる分子、例えば、セツキシマブ(アービタックス(登録商標))により認識されるエピトープを保持する切断型上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)も発現し、その結果、セツキシマブの投与がADCCおよび続くCAR発現細胞の枯渇を誘発する(例えば、WO2011/056894号およびJonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860参照)。他の戦略は、例えば、ADCCによりCAR発現細胞の選択的枯渇をもたらす、リツキシマブに結合する、ここに記載するCAR発現細胞におけるCD32およびCD20抗

原両者からの標的エピトープをあわせる、高度に小型のマーカー／自殺遺伝子の発現を含む(例えば、Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287参照)。ここに記載するCAR発現細胞を枯渇させる他の方法は、例えば、ADCC誘発により、破壊するために、成熟リンパ球、例えば、CAR発現細胞に選択的に結合し、標的とするモノクローナル抗CD52抗体であるキャンパスの投与を含む。他の態様において、CAR発現細胞は、CARリガンド、例えば、抗イディオタイプ抗体を使用して選択的に標的化され得る。ある態様において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えば、ADCCまたはADC活性を引き起こし、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。他の態様において、CARリガンド、例えば、抗イディオタイプ抗体は、細胞致死を誘発する薬剤、例えば、トキシシンに結合させ、それによりCAR発現細胞数を減らすことができる。あるいは、CAR分子自体、下記のように、活性が制御され得る、例えば、活性化または遮断され得るように配置できる。

10

【0541】

他の態様において、ここに記載するCAR発現細胞は、T細胞枯渇剤により認識される標的タンパク質も発現し得る。ある態様において、標的タンパク質はCD20であり、T細胞枯渇剤は抗CD20抗体、例えば、リツキシマブである。このような態様において、T細胞枯渇剤を、例えば、CAR誘発毒性を軽減するために、CAR発現細胞の減少または除去が望まれるとき、投与する。他の態様において、T細胞枯渇剤は、ここでの実施例に記載するような、抗CD52抗体、例えば、アレムツズマブである。

【0542】

20

他の態様において、制御可能CAR(RCAR)は、ここに記載する標準的CARの要素、例えば、抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインが、別々のポリペプチドまたはメンバーに配置された、一連の、一般に最も単純な態様において2つの、ポリペプチドを含む。ある態様において、一連のポリペプチドは、二量体化分子存在下、互いにポリペプチドを結合できる、例えば、抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインに結合できる、二量体化スイッチを含む。このような制御可能CARのさらなる記載および例示定期配置は、ここにおよび、引用により本明細書にその全体を包含させる国際公開WO 2015/090229号に提供される。

【0543】

ある面において、RCARは、2ポリペプチドまたはメンバーを含む：1)例えば、ここに記載する初代細胞内シグナル伝達ドメインおよび第一スイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン2)例えば、ここに記載のような腫瘍抗原と特異的に結合する抗原結合ドメインおよび第二スイッチドメインを含む抗原結合メンバー。場合により、RCARは、ここに記載する膜貫通ドメインを含む。ある態様において、膜貫通ドメインは、細胞内シグナル伝達メンバー上、抗原結合メンバー上または両者の上に配置できる。(特に断らない限り、RCARのメンバーまたは要素がここに記載されるものであるとき、順序は記載したとおりであり得るが、他の順序も同様に含まれる。換言すると、ある態様において、順序は本書に記載のとおりであるが、他の態様において、順序は異なり得る。例えば、膜貫通領域の一端の要素の順序は例と異なってよく、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインに対するスイッチドメインの配置は異なって、例えば逆でよい)。

30

40

【0544】

ある態様において、第一および第二スイッチドメインは、細胞内または細胞外二量体化スイッチを形成できる。ある態様において、二量体化スイッチは、例えば、第一および第二スイッチドメインが同一であるホモ二量体化スイッチでも、例えば、第一および第二スイッチドメインが互いに異なるヘテロ二量体化スイッチでもよい。

【0545】

ある態様において、RCARは、“多スイッチ”を含み得る。多スイッチは、ヘテロ二量体化スイッチドメインまたはホモ二量体化スイッチドメインを含み得る。多スイッチは、複数の、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10のスイッチドメインを、独立して、第一メンバー、例えば、抗原結合メンバーおよび第二メンバー、例えば、細胞

50

内シグナル伝達メンバー上に含む。ある態様において、第一メンバーは複数の第一スイッチドメイン、例えば、FKBPベースのスイッチドメインを含んでよく、第二メンバーは複数の第二スイッチドメイン、例えば、FRBベースのスイッチドメインを含んでよい。ある態様において、第一メンバーは第一および第二スイッチドメイン、例えば、FKBPベースのスイッチドメインおよびFRBベースのスイッチドメインを含んでよく、第二メンバーは第一および第二スイッチドメイン、例えば、FKBPベースのスイッチドメインおよびFRBベースのスイッチドメインを含んでよい。

【0546】

ある態様において、細胞内シグナル伝達メンバーは、1以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、初代細胞内シグナル伝達ドメインおよび1以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。

10

【0547】

ある態様において、抗原結合メンバーは、1以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、1以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含み得る。ある態様において、抗原結合メンバーは、複数の、例えば、2または3の、例えば、4-1BB、CD28、CD27、ICOSおよびOX40から選択される、ここに記載する共刺激性シグナル伝達ドメインを含み、ある態様において、初代細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。ある態様において、抗原結合メンバーは、細胞外から細胞内方向で、次の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む：4-1BB-CD27；41BB-CD27；CD27-4-1BB；4-1BB-CD28；CD28-4-1BB；OX40-CD28；CD28-OX40；CD28-4-1BB；または4-1BB-CD28。このような態様において、細胞内結合メンバーはCD3ゼータドメインを含む。このような態様において、RCARは、(1)抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび2共刺激ドメインおよび第一スイッチドメインを含む抗原結合メンバー；および(2)膜貫通ドメインまたは膜繫留ドメインおよび少なくとも一つの初代細胞内シグナル伝達ドメインおよび第二スイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

20

【0548】

ある態様は、抗原結合メンバーがCAR細胞表面に繫留されていないRCARを提供する。これは、細胞内シグナル伝達メンバーを有する細胞が、該細胞を、抗原結合メンバーをコードする配列で形質転換する必要はなく、1以上の抗原結合ドメインと好都合に対処することを可能とする。このような態様において、RCARは1)第一スイッチドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、初代細胞内シグナル伝達ドメインおよび第一スイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；および2)抗原結合ドメインおよび第二スイッチドメインを含む抗原結合メンバーを含み、ここで、抗原結合メンバーは膜貫通ドメインまたは膜繫留ドメインを含まず、場合により細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。ある態様において、RCARは、3)第二抗原結合ドメイン、例えば、抗原結合ドメインにより結合されるのとは異なる抗原に結合する第二抗原結合ドメイン；および第二スイッチドメインを含む第二抗原結合メンバーをさらに含み得る。

30

【0549】

またここで提供されるのは、抗原結合メンバーが二特異性活性化およびターゲティング能を含む、RCARである。この態様において、抗原結合メンバーは、複数の、例えば、2、3、4または5抗原結合ドメイン、例えば、scFvを含んでよく、ここで、各抗原結合ドメインは、標的抗原、例えば異なる抗原または同じ抗原、例えば、同じ抗原の同一または異なるエピトープに結合する。ある態様において、複数の抗原結合ドメインはタンデムであり、場合により、リンカーまたはヒンジ領域が抗原結合ドメインの各々の間に配置される。適当なリンカーおよびヒンジ領域は、ここに記載される。

40

【0550】

ある態様は、増殖のスイッチングが可能な配置を有するRCARを提供する。この態様において、RCARは1)場合により、膜貫通ドメインまたは膜繫留ドメイン；例えば、4-1BB、CD28、CD27、ICOSおよびOX40およびスイッチドメインから

50

選択される 1 以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；および 2) 抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび初代細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ゼータドメインを含む抗原結合メンバーを含み、ここで、抗原結合メンバーはスイッチドドメインを含まないまたは細胞内シグナル伝達メンバー上のスイッチドドメインと二量体化するスイッチドドメインを含まない。ある態様において、抗原結合メンバーは、共刺激性シグナル伝達ドメインを含まない。ある態様において、細胞内シグナル伝達メンバーは、ホモ二量体化スイッチからのスイッチドドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達メンバーは、ヘテロ二量体化スイッチの第一スイッチドドメインを含み、RCARは、ヘテロ二量体化スイッチの第二スイッチドドメインを含む第二細胞内シグナル伝達メンバーを含む。このような態様において、第二細胞内シグナル伝達メンバーは、細胞内シグナル伝達メンバーと同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、二量体化スイッチは細胞内である。ある態様において、二量体化スイッチは細胞外である。

10

【0551】

ここに記載するRCAR配置のいずれかにおいて、第一および第二スイッチドドメインは、ここに記載するようなFKBP-FRBベースのスイッチを含む

【0552】

またここで提供されるのは、ここに記載するRCARを含む細胞である。RCARを発現するように操作したあらゆる細胞を、RCARX細胞として使用できる。ある態様において、RCARX細胞はT細胞であり、RCART細胞と称する。ある態様において、RCARX細胞はNK細胞であり、RCARN細胞と称する。

20

【0553】

またここで提供されるのは、RCARコード化配列を含む核酸およびベクターである。RCARの種々の要素をコードする配列は、同じ核酸分子、例えば、同じプラスミドまたはベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに配置できる。ある態様において、(i)抗原結合メンバーをコードする配列および(ii)細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列は、同じ核酸、例えば、ベクターに存在できる。対応するタンパク質の産生は、例えば、別々のプロモーターの使用によりまたはバイシストロニック転写産物(これは、単一翻訳産物の開裂または2つの別々のタンパク質産物の翻訳により2タンパク質の産生を生じ得る)の使用により、達成できる。ある態様において、開裂可能ペプチドをコードする配列、例えば、P2AまたはF2A配列を、(i)と(ii)の間に配置する。ある態様において、IRES、例えば、EMCVまたはEV71 IRESをコードする配列を、(i)と(ii)の間に配置する。これらの態様において、(i)および(ii)は、単一RNAとして転写される。ある態様において、(i)および(ii)が別々のmRNAとして転写されるように、第一プロモーターは(i)に操作可能に連結し、第二プロモーターは(ii)に操作可能に連結する。

30

【0554】

あるいは、RCARの種々の要素をコードする配列を、種々の核酸分子、例えば、異なるプラスミドまたはベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターに配置できる。例えば、(i)抗原結合メンバーをコードする配列を第一核酸、例えば、第一ベクターに配置でき、(ii)細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列は、第二核酸、例えば、第二ベクターに存在できる。

40

【0555】

二量体化スイッチ

二量体化スイッチは非共有でも共有でもよい。非共有二量体化スイッチにおいて、二量体化分子は、スイッチドドメイン間の非共有相互作用を促進する。共有二量体化スイッチにおいて、二量体化分子は、スイッチドドメイン間の共有相互作用を促進する。

【0556】

ある態様において、RCARは、FKBP/FRAPまたはFKBP/FRBベースの二量体化スイッチを含む。FKBP12(FKBPまたはFK506結合タンパク質)は、

50

天然産物免疫抑制剤、ラパマイシンのための最初の細胞内標的として働く、豊富な細胞質タンパク質である。ラパマイシンは、FKBPおよび大PI3KホモログFRAP(RAFFT、mTOR)に結合する。FRBは、FKBP-ラパマイシン複合体の結合のために十分であるFRAPの93アミノ酸部分である(Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J. & Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4947-51.)。

【0557】

ある態様において、FKBP/FRAP、例えば、FKBP/FRBベースのスイッチは、二量体化分子、例えば、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログを使用できる。

10

【0558】

FKBPのアミノ酸配列は次のとおりである。

D V P D Y A S L G G P S S P K K K R K V S R G V Q V E T I S P G D G R T F P K R
G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G
W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V
F D V E L L K L E T S Y(配列番号43)

【0559】

ある態様において、FKBPスイッチドメインは、ラパマイシンまたはラパログの存在下、FRBまたはそのフラグメントもしくはアナログと結合する能力を有するFKBPのフラグメント、例えば、配列番号43の下線を引いた部分であり、それは次のとおりである。

20

V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D
R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A
Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E T S(配列番号44)

【0560】

FRBのアミノ酸配列は次のとおりである。

I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S G N
V K D L T Q A W D L Y Y H V F R R I S K(配列番号45)

【0561】

ここで使用する用語“FKBP/FRAP、例えば、FKBP/FRBベースのスイッチ”は、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、RAD001の存在下、FRBまたはそのフラグメントまたはアナログと結合する能力を有するFKBPフラグメントまたはそのアナログを含み、配列番号54または55のFKBP配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有するかまたは30、25、20、15、10、5、4、3、2または1アミノ酸残基を超えて異なる第一スイッチドメイン；およびラパマイシンまたはラパログの存在下に、FRBまたはそのフラグメントまたはアナログと結合する能力を有するFRBフラグメントまたはそのアナログを含み、配列番号45のFRB配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有するかまたは30、25、20、15、10、5、4、3、2または1アミノ酸残基を超えて異なる第二スイッチドメインを含む、二量体化スイッチをいう。ある態様において、ここに記載するRCARは、配列番号43(または配列番号44)に開示するアミノ酸残基を含む1スイッチドメインおよび配列番号45に開示するアミノ酸残基を含む1スイッチドメインを含む。

30

40

【0562】

ある態様において、FKBP/FRB二量体化スイッチは、FRBベースのスイッチドメイン、例えば、修飾FRBスイッチドメイン、FKBPベースのスイッチドメインおよび二量体化分子、例えば、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、RAD001の間の複合体形成が変えられた、例えば、増強された、修飾FRBスイッチドメインを含む。ある態様において、修飾FRBスイッチドメインは、アミノ酸位置L2031、E2032、

50

S 2 0 3 5、R 2 0 3 6、F 2 0 3 9、G 2 0 4 0、T 2 0 9 8、W 2 1 0 1、D 2 1 0 2、Y 2 1 0 5およびF 2 1 0 8から選択される、1以上の、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の変異を含み、ここで、野生型アミノ酸は、いずれかの他の天然に存在するアミノ酸への変異されている。ある態様において、変異体F R BはE 2 0 3 2に変異を含み、ここで、E 2 0 3 2は、フェニルアラニン(E 2 0 3 2 F)、メチオニン(E 2 0 3 2 M)、アルギニン(E 2 0 3 2 R)、バリン(E 2 0 3 2 V)、チロシン(E 2 0 3 2 Y)、イソロイシン(E 2 0 3 2 I)、例えば、配列番号46またはロイシン(E 2 0 3 2 L)、例えば、配列番号47に変異されている。ある態様において、変異体F R BはT 2 0 9 8に変異を含み、ここで、T 2 0 9 8は、フェニルアラニン(T 2 0 9 8 F)またはロイシン(T 2 0 9 8 L)、例えば、配列番号48に変異されている。ある態様において、変異体F R BはE 2 0 3 2およびT 2 0 9 8に変異を含み、ここで、E 2 0 3 2はいずれかのアミノ酸に変異され、T 2 0 9 8はいずれかのアミノ酸に変異され、例えば、配列番号49である。ある態様において、変異体F R BはE 2 0 3 2 IおよびT 2 0 9 8 L変異を含み、例えば、配列番号50である。ある態様において、変異体F R BはE 2 0 3 2 LおよびT 2 0 9 8 L変異を含み、例えば、配列番号51である。

【0563】

【表39】

表6. 二量体化分子に対する親和性が増加した変異体F R Bの例

F R B変異体	アミノ酸配列	配列番号
E2032I 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	46
E2032L 変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	47
T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	48
E2032, T2098 変異体	ILWHEMWHEGLX ~~E~~ ASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLX ~~Q~~ AWDLYYHVFRISKTS	49
E2032I, T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	50
E2032L, T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	51

【0564】

他の適当な二量体化スイッチは、G y r B－G y r Bベースの二量体化スイッチ、ジベレリンベースの二量体化スイッチ、タグ／バインダー二量体化スイッチおよびハロタグ／s n a pタグ二量体化スイッチを含む。ここに提供する手引きに従い、このようなスイッチおよび関連する二量体化分子は、当業者に明らかである。

【0565】

二量体化分子

スイッチドメイン間の結合は、二量体化分子により促進される。二量体化分子存在下、スイッチドメイン間の相互作用または結合は、第一スイッチドメインに結合、例えば融合しているポリペプチドと、第二スイッチドメインに結合、例えば融合しているポリペプチドの間のシグナル伝達を可能にする。非律速レベルの二量体化分子存在下、シグナル伝達は、例えば、ここに記載する系で測定して、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、5倍、10倍、50倍、100倍増加する。

【0566】

ラパマイシンおよびラパマイシンアナログ(ラパログと呼ぶこともある)、例えば、RAD001は、ここに記載するFKBP/FRBベースの二量体化スイッチにおける二量体化分子として使用できる。ある態様において、二量体化分子は、ラパマイシン(シロリムス)、RAD001(エベロリムス)、ゾタロリムス、テムシロリムス、AP-23573(リダフォロリムス)、バイオリムスおよびAP21967から選択できる。FKBP/FRBベースの二量体化スイッチで使用するのに適するさらなるラパマイシンアナログは、“組み合わせ治療”なる表題の部分または“低用量のmTOR阻害剤との組み合わせ”なる表題の小部分にさらに記載する。

【0567】

CARのケモカイン受容体との共発現

10

ある態様において、CAR発現細胞、例えば、NKR-CAR発現細胞、例えば、ここに記載するKIR-CAR発現細胞は、さらに、ケモカイン受容体分子を含む。T細胞におけるケモカイン受容体CCR2bまたはCXCR2のトランスジェニック発現は、黒色腫および神経芽腫を含むCCL2-またはCXCL1分泌固形腫瘍への輸送を増強する(Craddock et al., J Immunother. 2010 Oct; 33(8):780-8およびKershaw et al., Hum Gene Ther. 2002 Nov 1; 13(16):1971-80)。それゆえに、理論に縛られることを望まないが、腫瘍、例えば、固形腫瘍により分泌されるケモカインを認識するCAR発現細胞で発現されるケモカイン受容体は、CAR発現細胞の腫瘍への帰巢を改善し、CAR発現細胞の腫瘍への浸潤を促進し、そしてCAR発現細胞の抗腫瘍効果を増強すると考えられる。ケモカイン受容体分子は、天然に存在するまたは組み換えケモカイン受容体またはそのケモカイン結合フラグメントを含む。ここに記載するCAR発現細胞における発現に適するケモカイン受容体分子は、CXCケモカイン受容体(例えば、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6またはCXCR7)、CCケモカイン受容体(例えば、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10またはCCR11)、CX3Cケモカイン受容体(例えば、CX3CR1)、XCケモカイン受容体(例えば、XCR1)またはそのケモカイン結合フラグメントを含む。ある態様において、ここに記載するCARと共に発現するケモカイン受容体分子は、腫瘍により発現されるケモカインに基づき選択する。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞は、さらに、CCR2b受容体またはCXCR2受容体を含む、例えば、発現する。ある態様において、ここに記載するCARおよびケモカイン受容体分子は、同じベクターにあるまたは2つの異なるベクターにある。ここに記載するCARおよびケモカイン受容体分子が同じベクターにある態様において、CARおよびケモカイン受容体分子は、各々、2つの異なるプロモーターの制御下にあるかまたは同じプロモーターの制御下にある。

20

30

【0568】

CARをコードする核酸構築物

本発明はまたここに記載する1以上のCAR構築物をコードする核酸分子を提供する。ある面において、核酸分子は、メッセンジャーRNA転写物として提供される。ある面において、核酸分子は、DNA構築物として提供される。

【0569】

40

ある態様において、ここに記載するNKR-CARをコードする核酸分子は、さらに、細胞内シグナル伝達ドメインまたはアダプター分子をコードする核酸を含む。

【0570】

本発明はまた本発明のDNAが挿入されているベクターも提供する。レンチウイルスのようなレトロウイルス由来のベクターは、それらが導入遺伝子の長期の安定した組み込みおよび娘細胞への伝播を可能にするため、長期遺伝子導入を達成するのに適するツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞のような非増殖細胞を形質導入できる点で、マウス白血病ウイルスのようなオンコレトロウイルス由来のベクターを超えるさらなる利点を有する。さらに低免疫原性であるという付加的利点も有する。レトロウイルスベクターは、例えば、ガンマレトロウイルスベクターでもあり得る。ガンマレトロウイルスベク

50

ターは、例えば、プロモーター、パッケージングシグナル(ψ)、プライマー結合部位(PBS)、1以上の(例えば、2)末端反復配列(LTR)および目的の導入遺伝子、例えば、CARをコードする遺伝子を含み得る。ガンマレトロウイルスベクターは、gag、polおよびenvのようなウイルス構造的遺伝子を欠き得る。ガンマレトロウイルスベクターの例は、マウス白血病ウイルス(MLV)、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)および骨髄増殖性肉腫ウイルス(MPSV)およびそれら由来のベクターを含む。他のガンマレトロウイルスベクターは、例えば、Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713に記載される。

【0571】

他の態様において、所望の本発明のCARをコードする核酸を含むベクターは、アデノウイルスベクター(A5/35)である。他の態様において、CARをコードする核酸の発現は、sleeping beauty、crisper、CAS9および亜鉛フィンガーヌクレアーゼのようなトランスポゾンを使用して達成できる。引用により本明細書に包含する、下記June et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716参照。

【0572】

概説すると、CARをコードする天然または合成核酸の発現は、一般に、CARポリペプチドをコードする核酸またはその一部をプロモーターに操作可能に連結させ、当該構築物を発現ベクターに取り込むことにより達成される。ベクターは、真核生物での複製および組込みに適し得る。典型的クローニングベクターは、所望の核酸配列の発現の制御に有用な転写および翻訳ターミネーター、開始配列およびプロモーターを含む。

【0573】

本発明の構築物の発現はまた、標準遺伝子送達プロトコルを使用する、核酸免疫化および遺伝子治療にも使用し得る。遺伝子送達のための方法が当分野で知られる。例えば、引用によりその全体を本明細書に包含させる、米国特許5,399,346号、5,580,859号、5,589,466号参照。他の態様において、本発明は、遺伝子治療ベクターを提供する。

【0574】

核酸は、多数のタイプのベクターにクローン化できる。例えば、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルスおよびコスミドを含むが、これらに限定されないベクターにクローン化できる。特に興味深いベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プローブ産生ベクターおよびシークエンシングベクターを含む。

【0575】

さらに、発現ベクターは、ウイルスベクターの形で細胞に提供され得る。ウイルスベクターテクノロジーは当分野で周知であり、例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NYおよび他のウイルス学および分子生物学マニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスおよびレンチウイルスを含むが、これらに限定されない。一般に、適当なベクターは、少なくとも1生物で機能的な複製起点、プロモーター配列、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位および1以上の選択可能マーカーを含む(例えば、WO 01/96584号; WO 01/29058号; および米国特許6,326,193号)。

【0576】

多数のウイルスベースの系が、哺乳動物細胞への遺伝子移入のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための簡便なプラットフォームを提供する。選択した遺伝子を、当分野で知られる技術を使用して、ベクターに挿入し、レトロウイルス粒子に包装できる。次いで、組み換えウイルスが単離され、対象の細胞にインピボまたはエキスピボで送達され得る。多数のレトロウイルス系が当分野で知られる。ある態様において、アデノウイルスベクターを使用する。多数のアデノウイルスベクターが当分野で知られる。ある態様において、レンチウイルスベクターを使用する。

【0577】

さらなるプロモーター要素、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を制御する。一般に、これらは、開始部位の上流30～110bpの領域に位置するが、多数のプロモーターが、最近、同様に開始部位の下流に機能的要素を含むことが示されている。プロモーター要素間の空間はしばしば可動性であり、それゆえに、要素が互いに逆になったり移動したときにプロモーター機能が保持される。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターにおいて、プロモーター要素間の空間は、活性が落ち始める前、50bp離れるまで増加し得る。プロモーターによって、個々の要素は、転写を活性化するために協調的または独立的に機能できるように見える。プロモーターの例は、CMV IE遺伝子、EF-1 α 、ユビキチンCまたはホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターを含む。

10

【0578】

哺乳動物T細胞においてCAR導入遺伝子の発現ができるプロモーターの例は、EF1 α プロモーターである。天然EF1 α プロモーターは、アミノアシルtRNAのリボソームへの酵素送達を担う、伸長因子-1複合体のアルファサブユニットの発現を駆動する。EF1 α プロモーターは哺乳動物発現プラスミドで広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローン化された導入遺伝子からCAR発現を駆動するのに有効であることが示されている。例えば、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464(2009)参照。ある面において、EF1 α プロモーターは、配列番号11として提供される配列を含む。

【0579】

プロモーターの他の例は、最初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに操作可能に連結したあらゆるポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動できる、強い構成的プロモーター配列である。しかしながら、サルウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)末端反復配列(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、伸長因子-1 α プロモーターを含むが、これらに限定されない他の構成的プロモーター配列ならびにアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーターおよびクレアチンキナーゼプロモーターのような、しかしこれらに限定されないヒト遺伝子プロモーターも使用し得る。さらに、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定すべきではない。誘導性プロモーターも本発明の一部であるとして意図される。誘導性プロモーターの使用は、操作可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現を、発現が望まれるときに発現を活性化し、発現が望まれないときに発現を遮断することができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例は、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーターおよびテトラサイクリンプロモーターを含むが、これらに限定されない。

20

30

【0580】

ある態様において、ベクターはレンチウイルスベクターである。ある態様において、ベクターは、さらにプロモーターを含む。ある態様において、プロモーターは、EF-1 α プロモーターである。

【0581】

40

ある態様において、ベクターは、インビトロ転写ベクター、例えば、ここに記載する核酸分子のRNAを転写するベクターである。ある態様において、ベクターにおける核酸配列は、さらに、例えば、約150アデノシン塩基を含む、ポリ(A)テイル、例えば、ここに記載するポリAテイルを含む。ある態様において、ベクターにおける核酸配列は、さらに、3'UTRを含む。

【0582】

プロモーターの他の例は、ホスホグリセラートキナーゼ(PGK)プロモーターである。ある態様において、切断PGKプロモーター(例えば、野生型PGKプロモーター配列と比較したとき、1以上の、例えば、1、2、5、10、100、200、300または400ヌクレオチド欠失を有するPGKプロモーター)が望ましいことがある。PGKプロ

50

モーター例のヌクレオチド配列を下に提供する

【0583】

WT P G K プロモーター

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCTTGAAGGGCTGAATC
CCCGCTCGTCCTTCGACGCGGCCCCCGGGTGTTCCTATCGCCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCT
TACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCTTGGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCC
GACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT

(配列番号 52)

【0584】

切断 P G K プロモーター例：

P G K 100：

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTG

(配列番号 53)

P G K 200：

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGGACGGTAACG

(配列番号 54)

P G K 300：

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCTTGAAGGGCTGAATC
CCCG

(配列番号 55)

P G K 400：

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCTTGAAGGGCTGAATC
CCCGCTCGTCCTTCGACGCGGCCCCCGGGTGTTCCTATCGCCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCT
TACACGCTCTGGGTCCCAGCCG

(配列番号 56)

【0585】

ベクターは、例えば、分泌を促進するためのシグナル配列、ポリアデニル化シグナルおよび転写ターミネーター(例えば、ウシ成長ホルモン(BGH)遺伝子から)、エピソーム複製および原核生物における複製を可能にする要素(例えばSV40起源およびColE1または当分野で知られるその他)および／または選択を可能にする要素(例えば、アンピシリン耐性遺伝子および／またはゼオシンマーカー)も含み得る。

【0586】

CARポリペプチドまたはその一部の発現を評価するために、細胞に導入する発現ベクター遺伝子導入またはウイルスベクターによる感染が探求される細胞の集団から発現細胞から発現細胞の同定および選択を容易にするために、選択可能マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子または両者も含んでよい。他の面において、選択可能マーカーは、DNAの別の断面に担持され、共遺伝子導入法において使用される。選択可能マーカーおよびレポーター遺伝子のいずれも、宿主細胞における発現が可能であるように、適切な制御配列が

10

20

30

40

50

隣接し得る。有用な選択可能マーカーは、例えば、neoなどの、抗生物質耐性遺伝子を含む。

【0587】

レポーター遺伝子は、恐らく遺伝子導入されている細胞を同定し、制御配列の機能性を評価するために使用される。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物または組織に存在または発現されず、発現がある容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性により顕在化されるポリペプチドをコードする、遺伝子である。レポーター遺伝子の発現を、DNAがレシピエント細胞に導入されてから適当な時間後にアッセイする。適当なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼまたは緑色蛍光タンパク質遺伝子をコードする遺伝子を含み得る(例えば、Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82)。適当な発現系は周知であり、既知技術により製造できまたは商業的に入手できる。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小5'フランキング領域を有する構築物を、プロモーターとして同定する。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子により連結でき、薬剤のプロモーター駆動転写を調節する能力についての評価に使用できる。

10

【0588】

ある態様において、ベクターは、さらに、第二CAR、例えば、第二NKR-CAR、TCARまたは阻害性CARをコードする核酸を含み得る。ある態様において、第二CARは、標的抗原、例えば、ここに記載する腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメインを含む。ある態様において、第一CARにより結合される抗原は、第二CARにより結合されるのと同じ抗原である。あるいは、第一CARにより結合される抗原は、第二CARにより結合されるのとは異なる抗原である。例えば、第一CARはメソテリンに結合し、第二CARは異なる腫瘍抗原または正常細胞に提示される抗原に結合する。

20

【0589】

ある態様において、ベクターは、ここに記載するNKR-CARをコードする核酸およびTCARをコードする核酸を含む。ある態様において、TCARは、腫瘍抗原、例えば、NKR-CARにより結合されるのとは異なる腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメインを含む。ある態様において、TCARは抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含み、ここで、細胞内シグナル伝達ドメインはここに記載する一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ゼータまたは表2により提供されるものおよび所望により、1以上のここに記載する共刺激性シグナル伝達ドメイン、例えば、4-1BB、CD28、CD27、ICOSまたは表3を含む。

30

【0590】

ある態様において、ベクターは、ここに記載するNKR-CARをコードする核酸および阻害性CARをコードする核酸を含む。ある態様において、阻害性CARは、正常細胞、例えば、NKR-CARにより認識される抗原も発現する正常細胞に見られるが、癌細胞に見られない抗原と結合する抗原結合ドメインを含む。ある態様において、阻害性CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび阻害性分子の細胞内ドメインを含む。例えば、阻害性CARの細胞内ドメインは、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシン、およびTGFRベータの細胞内ドメインであり得る。

40

【0591】

ある態様において、ベクターは、CAR、例えば、ここに記載するNKR-CARおよび第一NKR-CARにより認識される抗原以外の抗原と特異的に結合する第二CAR、例えば、第二NKR-CAR、阻害性CARまたはTCARをコードする2以上の核酸配

50

列を含み得る。このような態様において、C A Rをコードする2以上の核酸配列は、同じフレームの単一核酸分子および単一ポリペプチド鎖としてコードされる。この面において、2以上のC A Rは、例えば、1以上のペプチド開裂部位により離され得る(例えば、自己開裂部位または細胞内プロテアーゼの基質)。

【0592】

ある態様において、ここに記載するN K R-C A Rをコードする核酸配列を含むベクターは、さらに、アダプター分子をコードする核酸配列を含む。このような態様において、2以上の核酸配列は、同じフレームの単一核酸分子および単一ポリペプチド鎖としてコードされる。この態様において、N K R-C A Rおよびアダプター分子1以上のペプチド開裂部位により離されてよく(例えば、自己開裂部位または細胞内プロテアーゼの基質)、ここで、N K R-C A R、アダプター分子およびペプチド開裂部位は同じフレームにあり、単一ポリペプチド鎖としてコードされる。

10

【0593】

ペプチド開裂部位の例は次のものを含み、ここで、G S G残基は任意である。

T 2 A : (GSG) E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号57)

P 2 A : (GSG) A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号58)

E 2 A : (GSG) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号59)

F 2 A : (GSG) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号60)

【0594】

細胞に遺伝子を導入し、発現させる方法は当分野で知られる。発現ベクターの状況において、ベクターは、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母または昆虫細胞に、当分野のいずれかの方法により容易に導入できる。例えば、例えば、発現ベクターは、物理的、化学的または生物学的手段により、宿主細胞に移入される。

20

【0595】

ポリヌクレオチドを、多くの種々の方法のいずれか、例えば、エレクトロポレーション(Amaxa Nucleofector II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830(BTX)(Harvard Instruments, Boston, Mass.)またはGene Pulser II(BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator(Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを使用するカチオンリポソーム介在遺伝子導入、ポリマーカプセル封入、ペプチド介在遺伝子導入または“遺伝子銃”のような微粒子銃粒子送達システム(例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)参照)を含むが、これらに限定されない、商業的に入手可能な方法を使用して、標的細胞に導入できる。

30

【0596】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、微量注入、エレクトロポレーションなどを含む。ベクターおよび/または外来性核酸を含む細胞を産生する方法は、当分野で周知である。例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY参照)。

【0597】

宿主細胞に目的のポリヌクレオチドを導入するための生物学的方法は、DNAおよびRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞への遺伝子挿入に最も広く使用される方法となってきた。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許5,350,674号および5,585,362号参照。

40

【0598】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための化学的手段は、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズおよび水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質ベースの系のようなコロイド分散体系を含む。インビトロおよびインビボで送達媒体として使用するための代表的コロイド系は、リポソーム(例えば、

50

人工膜小胞)である。標的化ナノ粒子または他の適当なサブミクロンサイズの送達系を用いるポリヌクレオチドの送達のような、最新式の核酸の標的化送達の他の方法が利用可能である。

【0599】

非ウイルス送達系を利用する場合、代表的送達媒体はリポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞への核酸の導入のために意図される(インビトロ、エクスピボまたはインビボ)。他の面において、核酸は、脂質と結合され得る。脂質と結合した核酸は、リポソームの水性内部への被包、リポソームの脂質二重層内への分散、リポソームとオリゴヌクレオチドの両者と結合する連結分子を介するリポソームへの結合、リポソームへの封入、リポソームとの複合体化、脂質含有溶液への分散、脂質との混合、脂質との組み合わせ、脂質中の懸濁液としての包含、ミセル内への包含または複合体化または他の方法で脂質と結合する。脂質、脂質/DNAまたは脂質/発現ベクター結合組成物は、溶液中の何らかの特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重層構造において、ミセルとしてまたは“崩壊”構造を有して存在し得る。それらはまた単に溶液に分散され、恐らく、サイズまたは形が均一ではない凝集体を形成し得る。脂質は、天然に存在するまたは合成脂質であり得る脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質に天然に生じる脂肪滴ならびに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドのような長鎖脂肪族炭化水素を含む化合物群およびその誘導体を含む。

【0600】

使用に適する脂質は、商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(“DMPC”)は、Sigma, St. Louis, MOから得ることができ、リン酸ジセチル(“DCP”)はK & K Laboratories(Plainview, NY)から得ることができ；コレステロール(“Choi”)はCalbiochem-Behringから得ることができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール(“DMPG”)および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.(Birmingham, AL.)から得ることができる。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質の原液を、約-20℃で保存できる。クロロホルムを、メタノールよりも容易に揮発するために、唯一の溶媒として使用する。“リポソーム”は、封入された脂質二重層または凝集体の産生により形成される多様な単および多層状脂質媒体を包含する一般的用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部水性媒体を伴う小胞構造を有することにより特徴付けられる。多層状リポソームは、水性媒体により分離された、複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁されたときに自然に形成される。脂質要素は、閉構造形成前に自己凝集し、水および溶解した溶質を脂質二重層の間に封入する(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10)。しかしながら、通常の小胞構造と異なる構造を溶液で有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造であるかまたは単に脂質分子の不均一凝集体として存在すると考えられ得る。リポフェクタミン-核酸複合体もまた考慮される。

【0601】

外来性核酸を宿主細胞に導入するまたはそうでなければ細胞を本発明の阻害剤に曝す方法に関係なく、宿主細胞における組み換えDNA配列の存在を確認するために、多様なアッセイを行い得る。このようなアッセイは、例えば、サザンおよびノーザンブロットイング、RT-PCRおよびPCRのような当業者に周知の“分子生物学的”アッセイ、薬剤の同定に使用するための、例えば、免疫学的手段(ELISAおよびウェスタンブロット)により、特定のペプチドの存在または不在を検出するような“生化学的”アッセイまたは本発明の範囲内に入るここに記載するアッセイを含む。

【0602】

本発明は、さらに、核酸分子をコードするCARを含むベクターを提供する。ある面において、CARベクターを、細胞、例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞に直接形質導入できる。ある面において、ベクターはクローニングまたは発現ベクター、例えば、1以上のプラスミド(例えば、発現プラスミド、クローニングベクター、ミニサークル、ミニベクター、二重分染色体)、レトロウイルスおよびレンチウイルス

スペクター構築物を含むが、これらに限定されない、ベクターである。ある面において、ベクターは、哺乳動物免疫エフェクター細胞、例えば、哺乳動物T細胞または哺乳動物NK細胞でCAR構築物を発現できる。ある面において、哺乳動物T細胞はヒトT細胞である。

【0603】

RNA遺伝子導入

ここに開示するのは、インビトロ転写RNA CAR、例えば、RNA NK R-CARを産生する方法である。本発明はまた、細胞に直接遺伝子導入できるRNA構築物をコードするNK R-CARも含む。ある態様において、RNA構築物をコードするNK R-CARは、さらに、ここに記載するTCARをコードする核酸配列を含む。遺伝子導入に使用するmRNAを使用するための方法は、一般に50～2000塩基長(配列番号35)を産生するための、特異的に設計したプライマーを用いる鋳型のインビトロ転写(IVT)、続くポリA付加を含み、3'および5'非翻訳配列(“UTR”)、5'キャップおよび/または配列内リボソーム進入部位(IRES)、発現させる核酸およびポリAテイルを含む構築物を含む。このように産生したRNAは、異なる種類の細胞を効率的に遺伝子導入できる。ある面において、鋳型は、NK R-CARの配列を含む。

10

【0604】

ある面において、NK R-CARは、メッセンジャーRNA(mRNA)により転写される。ある面において、NK R-CARをコードするmRNAは、NK R-CAR細胞の産生のためにT細胞に導入される。ある面において、NK R-CARをコードするmRNAは、NK R-CAR細胞の産生のためにNK細胞に導入される。

20

【0605】

ある態様において、インビトロ転写RNA NK R-CARを、一過性遺伝子導入の形で細胞に導入できる。RNAを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産生鋳型を使用するインビトロ転写により産生する。任意の源からの目的のDNAを、適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを使用するインビトロmRNA合成のための鋳型に、PCRにより著幾節変換できる。DNAの源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列または任意の他の適切なDNAの源であり得る。ある態様において、インビトロ転写のための所望の鋳型は、本発明のNK R-CARである。例えば、RNA NK R-CARの鋳型は、抗腫瘍抗体の単鎖可変ドメインを含む細胞外領域；ヒンジ領域、膜貫通ドメイン(例えば、KIRの膜貫通ドメイン)を含む。ある態様において、インビトロ転写の所望の鋳型は、別々の鋳型にKIR-CARおよびDAP12を含む。ある態様において、インビトロ転写の所望の鋳型は、同じ鋳型にKIR-CARおよびDAP12を含む。DAP12の鋳型は、膜貫通ドメインおよび細胞内領域を含む。

30

【0606】

ある態様において、PCRに使用するDNAはオープンリーディングフレームを含む。DNAは、生物のゲノムからの天然に存在するDNA配列由来であり得る。ある態様において、核酸は、5'および/または3'非翻訳領域(UTR)のいくぶんかまたは全てを含み得る。核酸はエクソンおよびイントロンを含み得る。ある態様において、PCRに使用するDNAはヒト核酸配列である。他の態様において、PCRに使用するDNAは、5'および3'UTRを含むヒト核酸配列である。DNAは、あるいは、天然に存在する生物で通常発現されない人工DNA配列であり得る。人工DNA配列の例は、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成するようにライゲートされた遺伝子の部分を含むものである。ライゲートされたDNAの部分は、単一生物由来でも1を超える生物由来でもよい。

40

【0607】

PCRを使用して、遺伝子導入に使用するmRNAのインビトロ転写のための鋳型を産生する。PCRを実施する方法は、当分野で周知である。PCRにおいて使用するプライマーは、PCRのための鋳型として使用するDNAの領域に実質的に相補的である領域を有するように設計する。ここで使用する“実質的に相補的”は、プライマー配列の残基の

50

大部分または全てが相補的であるまたは1以上の塩基が非相補的またはミスマッチである、ヌクレオチドの配列をいう。実質的に相補的配列は、PCRに使用するアニーリング条件下で、DNA標的とアニールまたはハイブリダイズできる。プライマーは、DNA鋳型のいずれかの部分と実質的に相補的であるように設計できる。例えば、プライマーは、5'および3' UTRを含む、細胞において通常転写される(オープンリーディングフレーム)核酸の部分を増幅するように設計できる。プライマーは、目的の特定のドメインをコードする核酸の部分を増幅するようにも設計できる。ある態様において、プライマーは、5'および3' UTRの全てまたは一部を含む、ヒトcDNAのコーディング領域を増幅するように設計する。PCRに有用なプライマーは、当分野で周知である合成法により産生できる。“順方向プライマー”は、増幅するDNA配列の上流であるDNA鋳型上にヌクレオチドに対して実質的に相補的であるヌクレオチドの領域を含むプライマーである。“上流”は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する5位をいうためにここで使用する。“逆方向プライマー”は、増幅するDNA配列の下流である、二本鎖DNA鋳型に対して実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーである。“下流”は、コード鎖に対して、増幅するDNA配列に対する3位をいうためにここで使用する。

10

【0608】

PCRに有用なあらゆるDNAポリメラーゼをここに開示する方法で可以使用できる。試薬およびポリメラーゼは、多数の業者から市販されている。

【0609】

安定性および／または翻訳効率を促進する能力を有する化学構造も使用し得る。RNAは、好ましくは5'および3' UTRを有する。ある態様において、5' UTRは、1～3000ヌクレオチド長である。コーディング領域に付加する5'および3' UTR配列の長さは、UTRの異なる領域をアニールするPCRのためのプライマーの設計を含むが、これに限定されない、異なる方法により変わり得る。この試みを使用して、当業者は、転写RNAの遺伝子導入後、最適翻訳効率を達成するのに必要な5'および3' UTR長を修飾できる。

20

【0610】

5'および3' UTRは、目的の核酸のための天然に存在する、内在性5'および3' UTRであり得る。あるいは、目的の核酸に対して内在性ではないUTR配列を、順方向および逆方向プライマーへのUTR配列の取り込みによりまたは鋳型のいずれかの他の修飾により付加できる。目的の核酸に対して内在性ではないUTR配列の使用は、RNAの安定性および／または翻訳効率の修飾のために有用であり得る。例えば、3' UTR配列のAUリッチ要素は、mRNAの安定性を低下させることが知られる。それゆえに、3' UTRを、当分野で周知であるUTRの特性に基づき、転写されたRNAの安定性を増加するように選択および設計できる。

30

【0611】

ある態様において、5' UTRは、内在性核酸のKozak配列を含み得る。あるいは、目的の核酸に対して内在性ではない5' UTRを上記のようにPCRにより付加するとき、コンセンサスKozak配列を、5' UTR配列の付加により再設計できる。Kozak配列は、あるRNA転写物の翻訳効率を上げることはできるが、効率的翻訳を可能とするために全RNAで必要であるようには見えない。多くのmRNAについてのKozak配列に対する必要性は、当分野で知られる。他の態様において、5' UTRは、RNAゲノムが細胞で安定であるRNAウイルスの5' UTRであり得る。他の態様において、種々のヌクレオチドアナログを、mRNAのエクソヌクレアーゼ分解を妨害するために、3'または5' UTRにおいて使用できる。

40

【0612】

遺伝子クローニングの必要性なしにDNA鋳型からのRNAの合成を可能にするために、転写のプロモーターは、転写する配列の上流のDNA鋳型に結合すべきである。RNAポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列が順方向プライマーの5'末端に結合されたとき、RNAポリメラーゼプロモーターは、転写されるオープンリーディングフレーム

50

の上流のPCR産物に取り込まれる。ある好ましい態様において、プロモーターは、本明細書の他の箇所に記載するような、T7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターは、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターを含むが、これらに限定されない。T7、T3およびSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列が当分野で知られる。

【0613】

好ましい態様において、mRNAは、リボソーム結合、翻訳開始および細胞におけるmRNAの安定性を決定する、5'末端および3'ポリ(A)テイルの両者にキャップを有する。環状DNA鋳型、例えば、プラスミドDNA上で、RNAポリメラーゼは真核細胞における発現に適しない長いコンカテマー産物を産生する。3'UTRの末端で直線化されたプラスミドDNAの転写は、転写後ポリアデニル化されても、真核遺伝子導入に有効ではない正常サイズのmRNAを生じる。

10

【0614】

直鎖状DNA鋳型で、ファージT7 RNAポリメラーゼは鋳型の最後の塩基を越えて転写物の3'末端を伸長できる(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003))。

【0615】

DNA鋳型に伸びるポリA/Tの組込みの慣用法は分子クローニングである。しかしながらプラスミドDNAに統合されたポリA/T配列は、プラスミド不安定性を生じ得て、これが、なぜ細菌細胞から得たプラスミドDNA鋳型がしばしば欠失および他の異常で高度に汚染されているかの理由である。これによりクローニング工程が骨がおれ、時間かかるだけでなく、しばしば信頼できないものとなる。これが、クローニングを伴わないポリA/T 3'ストレッチを有するDNA鋳型の産生を可能にする方法が非常に望まれているかの理由である。

20

【0616】

転写DNA鋳型のポリA/Tセグメントは、100TテイルのようなポリTテイルを含む逆方向プライマーを使用するPCR中(配列番号31)(サイズは50~5000Tであり得る(配列番号32))またはDNAライゲーションまたはインビトロ組み換えを含むが、これらに限定されないいずれかの他の方法によりPCR後に産生できる。ポリ(A)テイルはまたRNAに安定性を提供し、その分解を減らす。一般に、ポリ(A)テイルの長さは、転写されたRNAの安定性と正に相関する。ある態様において、ポリ(A)テイルは、100~5000アデノシンである(配列番号33)。

30

【0617】

RNAのポリ(A)テイルは、大腸菌ポリAポリメラーゼ(E-PAP)のようなポリ(A)ポリメラーゼの使用により、インビトロ転写後さらに伸長できる。ある態様において、ポリ(A)テイルの100ヌクレオチドから300~400ヌクレオチドへの長さの延長(配列番号34)は、RNAの翻訳効率の約2倍増加を生じる。さらに、3'末端への異なる化学基の付加は、mRNA安定性を増加させ得る。このような結合は、修飾/人工ヌクレオチド、アダプターおよび他の化合物を含み得る。例えば、ATPアナログは、ポリ(A)ポリメラーゼを使用してポリ(A)テイルに取り込まれ得る。ATPアナログは、RNAの安定性をさらに高め得る。

40

【0618】

5'キャップもRNA分子に安定性を提供する。好ましい態様において、ここに開示する方法により産生されたRNAは、5'キャップを含む。5'キャップは当分野で知られ、ここに記載する技術を使用して提供される(Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005))。

【0619】

ここに開示する方法により産生されたRNAは配列内リボソーム進入部位(IRES)配列も含み得る。IRES配列は、mRNAへのキャップ非依存のリボソーム結合を開始し

50

、翻訳開始を促進する、あらゆるウイルス、染色体または人工設計配列であり得る。糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤および界面活性剤のような細胞透過性および生存能を促進する因子を含み得る、細胞電気穿孔法に適するいずれかの溶質を包含できる。

【0620】

RNAを、多数の異なる方法、例えば、商業的に利用可能な方法のいずれかを使用して、標的細胞に導入でき、これは、電気穿孔法(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)またはGene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを使用するカチオン性リポソーム介在遺伝子導入、ポリマー封入、ペプチド介在遺伝子導入または“遺伝子銃”のような微粒子銃粒子送達系(例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)参照)を含むが、これらに限定されない。

10

【0621】

所望の分子をコードする核酸配列は、標準技術を使用する、例えば遺伝子を発現する細胞からのライブラリーのスクリーニング、それを含むことが知られるベクターからの遺伝子の導出またはそれを含む細胞および組織からの直接の単離のような、当分野で知られる組み換え方法を使用して得ることができる。あるいは、目的の遺伝子を、クローン化ではなく、合成により産生できる。

【0622】

非ウイルス送達方法

20

ある面において、非ウイルス方法を使用して、細胞または組織または対照に、ここに記載するCAR、例えば、NKRCARまたはTCARをコードする核酸を送達できる。

【0623】

ある態様において、非ウイルス方法は、トランスポゾン(転位因子とも呼ばれる)の使用を含む。ある態様において、トランスポゾンは、ゲノムの位置にそれ自体挿入できるDNAの断片、例えば、自己複製性であり、そのコピーをゲノムに挿入することができるDNAの断片または長い核酸の外にスプライシングされ、ゲノムの他の場所に挿入されることができるDNAの断片である。例えば、トランスポゾンは、転位のための逆位反復フランキング遺伝子からなるDNA配列を含む

【0624】

30

トランスポゾンを使用する核酸送達法の例は、Sleeping Beautyトランスポゾン系(SBTs)およびpiggyBac(PB)トランスポゾン系を含む。例えば、Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20.R1 (2011):R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang et al. Mol. Ther. 16(2008):580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al. Blood. 122.21 (2013):166; Williams. Molecular Therapy 16.9 (2008):1515-16; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65; およびDing et al. Cell. 122.3 (2005):473-83(これらは全て引用により本明細書に包含させる)を参照のこと。

【0625】

SBTsは2要素を含む: 1)導入遺伝子を含むトランスポゾンおよび2)トランスポサターゼ酵素の源。トランスポサターゼは、担体プラスミド(または他のドナーDNA)から、宿主細胞染色体/ゲノムのような標的DNAにトランスポゾンを転位できる。例えば、トランスポサターゼは、担体プラスミド/ドナーDNAに結合し、トランスポゾン(導入遺伝子含有)をプラスミドの外に切り出し、宿主細胞のゲノムに入れる。例えば、Aronovich et al. supra参照。

40

【0626】

トランスポゾンの例は、pT2ベースのトランスポゾンを含む。例えば、その全てを引用により本明細書に包含させるGrabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47; およびSingh et al. Cancer Res. 68.8(2008): 2961-2971参照。トランスポサターゼの例は、Tc1/mariner型トランスポサターゼ、例えば、SB10トランスポサター

50

ゼまたはS B 1 1 トランスポサアーゼを含む(例えば、サイトメガロウイルスプロモーターから発現できる、機能亢進トランスポサアーゼ)。例えば、全て引用により本明細書に包含させるAronovich et al.; Kebriaei et al.; およびGrabundzija et al.参照。

【0627】

S B T Sの使用は、導入遺伝子、ここに記載するC A Rをコードする核酸の効率的組込みおよび発現を可能にする。ここに提供されるのは、例えば、S B T Sのようなトランスポゾン系を使用する、ここに記載するC A Rを安定に発現する細胞、例えば、T細胞またはNK細胞を産生する方法である。

【0628】

ここに記載する方法によって、ある態様において、S B T S要素を含む1以上の核酸、例えば、プラスミドが細胞に送達される(例えば、T細胞またはNK細胞)。例えば、核酸は、核酸(例えば、プラスミドDNA)送達の標準法、例えば、ここに記載する方法、例えば、電気穿孔法、遺伝子導入またはリポフェクションにより送達される。ある態様において、核酸は、導入遺伝子、例えば、ここに記載するC A Rをコードする核酸を含むトランスポゾンを含む。ある態様において、核酸は、導入遺伝子(例えば、ここに記載するC A Rをコードする核酸)を含むトランスポゾンならびにトランスポサアーゼ酵素をコードする核酸配列を含む。他の態様において、例えば、デュアルプラスミド系、例えば、第一プラスミドが導入遺伝子を含むトランスポゾンを含み、第二プラスミドがトランスポサアーゼ酵素をコードする核酸配列を含む、2核酸の系が提供される。例えば、第一および第二核酸は、宿主細胞に共送達される。

【0629】

ある態様において、ここに記載するC A Rを発現する細胞、例えば、T細胞またはNK細胞が、ヌクレアーゼ(例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(Z F N)、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(T A L E N)、C R I S P R/C a s系または操作されたメガヌクレアーゼ再操作ホーミングエンドヌクレアーゼ)を使用する、S B T Sおよび遺伝子編集の遺伝子挿入の組合せを使用して産生される。

【0630】

ある態様において、非ウイルス送達方法の使用は、細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の再プログラミングおよび対照への細胞の直接注入を可能にする。非ウイルスベクターの利点は、患者集団に見合うために必要な十分量の産生が容易かつ比較的安価であること、保存中の安定性および免疫原性の欠如を含むが、これらに限定されない。

【0631】

他の態様において、非ウイルス送達システムを使用するとき、送達媒体例は、リポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞への核酸の導入に企図される(インビトロ、エクスピボまたはインスピボ)。他の面において、核酸は、脂質と結合され得る。脂質と結合した核酸は、リポソームの水性内部への被包、リポソームの脂質二重層内への分散、リポソームとオリゴヌクレオチドの両者と結合する連結分子を介するリポソームへの結合、リポソームへの封入、リポソームとの複合体化、脂質含有溶液への分散、脂質との混合、脂質との組み合わせ、脂質中の懸濁液としての包含、ミセル内への包含または複合体化または他の方法で脂質と結合する。脂質、脂質/DNAまたは脂質/発現ベクター結合組成物は、溶液中の何らかの特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重層構造において、ミセルとしてまたは“崩壊”構造を有して存在し得る。それらはまた単に溶液に分散され、恐らく、サイズまたは形が均一ではない凝集体を形成し得る。脂質は、天然に存在するまたは合成脂質であり得る脂肪物質である。例えば、例えば、脂質は、細胞質に天然に生じる脂肪滴ならびに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドのような長鎖脂肪族炭化水素を含む化合物群およびその誘導体を含む。

【0632】

使用に適する脂質は、商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(“D M P C”)は、Sigma, St. Louis, MOから得ることができ、リン酸ジセチル(“D C P”)はK & K Laboratories(Plainview, NY)から得ることができ；コレ

10

20

30

40

50

ステロール(“Choi”)はCalbiochem-Behringから得ることができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール(“DMPG”)および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.(Birmingham, AL.)から得ることができる。クロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中の脂質の原液を、約−20℃で保存できる。クロロホルムを、メタノールよりも容易に揮発するために、唯一の溶媒として使用する。“リポソーム”は、封入された脂質二重層または凝集体の産生により形成される多様な単および多層状脂質媒体を包含する一般的用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部水性媒体を伴う小胞構造を有することにより特徴付けられる。多層状リポソームは、水性媒体により分離された、複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁されたときに自然に形成される。脂質要素は、閉構造形成前に自己凝集し、水および溶解した溶質を脂質二重層の間に封入する(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10)。しかしながら、通常の小胞構造と異なる構造を溶液で有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造であるかまたは単に脂質分子の不均一凝集体として存在すると考えられ得る。リポフェクタミン-核酸複合体もまた考慮される。

10

【0633】

細胞の供給源

増殖および遺伝的修飾または他の修飾の前に、細胞(例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞)の供給源を、対象から得ることができる。用語“対象”は、免疫応答が惹起できる生存生物(例えば、哺乳動物)を含むことを意図する。対象の例は、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラットおよびそれらのトランスジェニック種を含む。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織および腫瘍を含む、多数の供給源から得ることができる。

20

【0634】

本発明のある態様において、当分野で利用可能ないずれかの数の免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)系を使用し得る。本発明のある態様において、T細胞を、FicollTM分離のような、当業者に知られるあらゆる技術を使用して、対象から採取した血液の単位から得ることができる。ある好ましい態様において、個体の循環血液からの細胞をアフエーシスにより得る。アフエーシス産物は、一般にT細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含む、リンパ球、赤血球および血小板を含む。ある態様において、アフエーシスにより採取した細胞は血漿画分を除去するために洗浄し、細胞を続くプロセッシング過程のために適切な緩衝液または媒体に入れる。本発明のある態様において、細胞を、リン酸緩衝化食塩水(PBS)で洗浄する。別の態様において、洗浄溶液はカルシウムを欠き、マグネシウムを欠いてよくまたは全てではないにしても多くの二価カチオンを欠いてよい。カルシウム非存在下の初期活性化過程は、活性化の増強に至る。当業者には容易に認識されるように、洗浄工程は、製造業者の指示に従う、半自動化“フロースルー”遠心分離(例えば、Cobe 2991 cell processor、Baxter CytoMateまたはHemonetics Cell Saver 5)により達成され得る。洗浄後、細胞を、例えば、無Ca、無MgPBS、PlasmaLyte Aまたは他の緩衝剤を含むまたは含まない食塩水溶液のような、多様な生体適合性緩衝液に再懸濁し得る。あるいは、アフエーシスサンプルの望ましくない要素を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁し得る。

30

40

【0635】

本出願の方法は、5%以下、例えば2%の、ヒトAB血清を含む培養培地条件を利用でき、既知培養培地条件および組成物、例えばSmith et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement” Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31に記載のものをを用いることができることは認識される。

【0636】

他の態様において、T細胞は、赤血球を溶解し、例えば、PERCOLLTM勾配による遠心分離または対向流遠心溶出法により単球を枯渇させることにより、末梢血リンパ球から単離する。CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺およびCD

50

45RO⁺T細胞のようなT細胞の特異的下位集団を、陽性または陰性選択技術によりさらに単離し得る。例えば、ある態様において、T細胞を、所望のT細胞の陽性選択に十分な時間、DYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 Tのような抗CD3/抗CD28(例えば、3x28)コンジュゲートビーズとインキュベーションすることにより単離する。ある態様において、時間は約30分である。さらなる態様において、時間は30分〜36時間またはそれより長い範囲およびその間のいずれかの整数値である。さらなる態様において、時間は少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間または6時間である。さらに他の好ましい態様において、時間は10〜24時間である。ある好ましい態様において、インキュベーション時間は24時間である。白血病を有する患者からのT細胞の単離について、24時間のような長いインキュベーション時間が細胞終了を増加させ得る。腫瘍組織または免疫不全状態個体から腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)を単離するような、他の細胞型と比較してT細胞が少ないあらゆる状況において、T細胞を単離するために長いインキュベーション時間が使用され得る。さらに、長いインキュベーション時間の使用は、CD8⁺T細胞の捕獲効率を高め得る。それゆえに、単にT細胞をCD3/CD28ビーズと結合させる時間を短くするまたは長くするおよび/またはビーズ対T細胞比を増加または減少させる(さらにここに記載するとおり)ことにより、T細胞の亜集団が、培養開始時または工程中の他の時点で優先的に選択される。さらに、ビーズまたは他の表面上の抗CD3および/または抗CD28抗体比を増加または減少させることにより、T細胞の亜集団が、培養開始時または工程中の他の時点で優先的に選択される。複数回の選択も本発明で使用できることを当業者は認識する。ある態様において、選択過程を実施し、“未選択”細胞を活性化および増殖過程で使用する事が望ましいことがある。“未選択”細胞もさらなる選択に付し得る。

10

20

【0637】

陰性選択によるT細胞集団富化は、陰性に選択される細胞に独特な表面マーカーを指向する抗体の組み合わせにより達成できる。一つの方法は、陰性に選択される細胞に存在する細胞表面マーカーを指向するモノクローナル抗体のカクテルを使用する陰性磁気免疫粘着またはフローサイトメトリーによる細胞選別および/または選択である。例えば、陰性選択によりCD4⁺細胞を富化するために、モノクローナル抗体カクテルは、一般にCD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DRおよびCD8に対する抗体を含む。ある態様において、一般にCD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺およびFoxP3⁺を発現する制御性T細胞について富化または陽性選択することが望ましいことがある。あるいは、ある態様において、T制御性細胞を、抗CD25コンジュゲートビーズまたは他の類似選択法により枯渇させる。

30

【0638】

ここに記載する方法は、例えば、ここに記載する、例えば、陰性選択技術を使用する、例えば、T制御性細胞枯渇集団、CD25⁺枯渇細胞である、免疫エフェクター細胞の特異的亜集団、例えば、T細胞の選択を含み得る。好ましくは、T制御性枯渇細胞の集団は30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満のCD25⁺細胞を含む。

【0639】

ある態様において、T制御性細胞、例えば、CD25⁺T細胞を、抗CD25抗体またはそのフラグメントまたはCD25結合リガンド、IL-2を使用して集団から除去する。ある態様において、抗CD25抗体またはそのフラグメントまたはCD25結合リガンドを、基質、例えば、ビーズにコンジュゲートするかまたは他に基質、例えば、ビーズ上に被覆させる。ある態様において、抗CD25抗体またはそのフラグメントを、ここに記載の基質にコンジュゲートさせる。

40

【0640】

ある態様において、T制御性細胞、例えば、CD25⁺T細胞を、Miltenyi TMからのCD25枯渇剤を使用して集団から除去する。ある態様において、細胞対CD25枯渇剤の比は1e7細胞対20μLまたは1e7細胞対15μLまたは1e7細胞対10μLま

50

たは 1×10^7 細胞対 $5 \mu\text{L}$ または 1×10^7 細胞対 $2.5 \mu\text{L}$ または 1×10^7 細胞対 $1.25 \mu\text{L}$ である。ある態様において、例えば、T 制御性細胞、例えば、 $\text{CD}25^+$ 枯渴のために、5 億細胞/ ml を使用する。さらなる面において、6 億、7 億、8 億または 9 億細胞/ ml の細胞濃度を使用する。

【0641】

ある態様において、枯渴すべき免疫エフェクター細胞の集団は、約 6×10^9 $\text{CD}25^+$ T 細胞を含む。他の面において、枯渴すべき免疫エフェクター細胞の集団は、約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ (およびその間のいずれかの整数値) $\text{CD}25^+$ T 細胞を含む。ある態様において、得られた T 制御性枯渴細胞集団は、 2×10^9 T 制御性細胞、例えば、 $\text{CD}25^+$ 細胞またはそれ以下 (例えば、 1×10^9 、 5×10^8 、 1×10^8 、 5×10^7 、 1×10^7 またはそれ以下の $\text{CD}25^+$ 細胞) を含む。

10

【0642】

ある態様において、T 制御性細胞、例えば、 $\text{CD}25^+$ 細胞を、例えば、チュービング 162-01 のような、枯渴チュービングセットと共に Clin iMAC 系を使用して集団から除去する。ある態様において、Clin iMAC 系を、例えば、DEPLETION 2.1 のような、枯渴設定において動かす。

【0643】

特定の理論に縛られることを望まないが、アフエレーシス前または CAR 発現細胞産物の製造中の対象における免疫細胞の負のレギュレーターレベルの減少 (例えば、望まない免疫細胞、例えば、 T_{REG} 細胞の数の減少) は、対象の再発リスクを減らし得る。例えば、 T_{REG} 細胞を枯渴する方法は当分野で知られる。例えば、 T_{REG} 細胞を減少させる方法は、シクロホスファミド、抗 GITR 抗体 (抗 GITR ここに記載する抗体)、 $\text{CD}25$ 枯渴およびそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

20

【0644】

ある態様において、製造法は、CAR 発現細胞製造前の T_{REG} 細胞の数の減少 (例えば、枯渴) を含む。例えば、製造法は、例えば、サンプル、例えば、アフエレーシスサンプルと抗 GITR 抗体および/または抗 $\text{CD}25$ 抗体 (またはそのフラグメントまたは $\text{CD}25$ 結合リガンド) を接触させ、CAR 発現細胞 (例えば、T 細胞、NK 細胞) 産物の製造前に T_{REG} 細胞を枯渴させることを含む。

【0645】

ある態様において、対象は、CAR 発現細胞産物製造のための細胞採取前に T_{REG} 細胞を減らす 1 以上の治療で前処置されており、それにより対象が CAR 発現細胞処置を再び必要とするリスクを軽減する。ある態様において、ある態様において、 T_{REG} 細胞を低減する方法は、対象へのシクロホスファミド、抗 GITR 抗体、 $\text{CD}25$ 枯渴またはこれらの組み合わせの 1 以上の投与を含むが、これらに限定されない。シクロホスファミド、抗 GITR 抗体、 $\text{CD}25$ 枯渴またはこれらの組み合わせの 1 以上の投与は、CAR 発現細胞産物注入前、注入中または注入後に行い得る。

30

【0646】

ある態様において、対象は、CAR 発現細胞産物製造のための細胞の採取前にシクロホスファミドで前処置され、それにより対象が CAR 発現細胞処置を再発するリスクを軽減する。ある態様において、対象は、CAR 発現細胞産物製造のための細胞の採取前に抗 GITR 抗体で前処置され、それにより対象が CAR 発現細胞処置を再発するリスクを軽減する。

40

【0647】

ある態様において、除去すべき細胞の集団は、制御性 T 細胞または腫瘍細胞ではなく、CAR T 細胞の増殖および/または機能に他に負に影響する細胞、例えば $\text{CD}14$ 、 $\text{CD}11b$ 、 $\text{CD}33$ 、 $\text{CD}15$ または潜在的免疫抑制性細胞により発現される他のマーカーを発現する細胞である。ある態様において、このような細胞は、制御性 T 細胞および/または腫瘍細胞と同時にまたは該枯渴後にまたは他の順序で除去することが意図される。

【0648】

50

ここに記載する方法は、1を超える選択工程、例えば、1を超える枯渇工程を含み得る。陰性選択によるT細胞集団の富化は、例えば、陰性に選択される細胞に独特な表面マーカーを指向する抗体の組み合わせにより達成できる。一つの方法は、陰性に選択される細胞に存在する細胞表面マーカーを指向するモノクローナル抗体のカクテルを使用する、陰性磁気免疫付着またはフローサイトメトリーを経る細胞選別および／または選択である。例えば、陰性選択によりCD4⁺細胞を富化するために、モノクローナル抗体カクテルはCD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DRおよびCD8に対する抗体を含み得る。

【0649】

ここに記載する方法は、さらに腫瘍抗原、例えば、CD25を含まない腫瘍抗原、例えば、CD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14またはCD11bを発現する細胞の集団からの除去を含み、それによりCAR、例えば、ここに記載するCARの発現に適するT制御性枯渇、例えば、CD25⁺枯渇および腫瘍抗原枯渇細胞の集団を提供する。ある態様において、腫瘍抗原発現細胞は、T制御性、例えば、CD25⁺細胞と同時に除去される。例えば、抗CD25抗体またはそのフラグメントおよび抗腫瘍抗原抗体またはそのフラグメントを同じ基質、例えば、ビーズに結合でき、これを、細胞の除去に使用できまたは抗CD25抗体またはそのフラグメントおよび抗腫瘍抗原抗体またはそのフラグメントを別のビーズに結合でき、その混合物を細胞の除去に使用できる。他の態様において、T制御性細胞、例えば、CD25⁺細胞の除去および腫瘍抗原発現細胞の除去は逐次的であり、例えば、いずれの順序で生じてよい。

【0650】

チェックポイント阻害剤、例えば、ここに記載するチェックポイント阻害剤を発現する細胞、例えば、PD1⁺細胞、LAG3⁺細胞およびTIM3⁺細胞の1以上の集団からの除去を含み、それによりT制御性枯渇、例えば、CD25⁺枯渇細胞およびチェックポイント阻害剤枯渇細胞、例えば、PD1⁺、LAG3⁺および／またはTIM3⁺枯渇細胞の集団を提供する方法も提供される。チェックポイント阻害剤例は、B7-H1、B7-1、CD160、P1H、2B4、PD1、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5)、LAG3、TIGIT、CTLA-4、BTLAおよびLAIR1を含む。ある態様において、チェックポイント阻害剤発現細胞は、T制御性、例えば、CD25⁺細胞と同時に除去される。例えば、抗CD25抗体またはそのフラグメントおよび抗チェックポイント阻害剤抗体またはそのフラグメントを同じビーズに結合でき、それを細胞の除去に使用できまたは抗CD25抗体またはそのフラグメントおよび抗チェックポイント阻害剤抗体またはそのフラグメントを別のビーズに結合でき、その混合物を細胞の除去に使用できる。他の態様において、T制御性細胞、例えば、CD25⁺細胞の除去およびチェックポイント阻害剤発現細胞の除去は逐次的であり、例えば、いずれ順序の順序で生じてよい。

【0651】

ある態様において、T細胞IFN- γ 、TNF α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムBおよびパーフォリンまたは他の適切な分子、例えば、他のサイトカインの1以上を発現するT細胞集団を選択できる。細胞発現についてスクリーニングする方法は、例えば、PCT公開WO2013/126712号に記載する方法により決定できる。

【0652】

陽性または陰性選択により所望の細胞の集団を単離するために、細胞および表面(例えば、ビーズのような粒子)の濃度は変わり得る。ある態様において、細胞とビーズの最大接触を確実にするために、ビーズと細胞と一緒に混合する体積を顕著に低下させる(例えば、細胞濃度を増加させる)ことが望まれ得る。例えば、ある態様において、20億細胞/mlの濃度を使用する。ある態様において、10億細胞/mlの濃度を使用する。さらなる態様において、1億細胞/ml超を使用する。さらなる態様において、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万また

は5000万細胞/mlの細胞濃度を使用する。さらなる態様において、細胞の7500万、8000万、8500万、9000万、9500万または1億細胞/mlの濃度を使用する。さらなる態様において、1億2500万または1億5000万細胞/mlの濃度を使用できる。高濃度を使用して、細胞収率、細胞活性化および細胞増殖を増加できる。さらに、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞のような目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞のまたは多くの腫瘍細胞が存在するサンプル(すなわち、白血病性血液、腫瘍組織など)からのより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞集団は、治療的価値を有しており、取得することが望ましい。例えば、高濃度細胞の使用は、通常CD28発現が弱いCD8⁺ T細胞のより効率的な選択を可能にする。

【0653】

10

関連する態様において、低濃度の細胞を使用することが望ましいことがある。T細胞と表面(例えば、ビーズのような粒子)の混合物を顕著に希釈することにより、粒子と細胞の相互作用が最小化される。これは、粒子に結合する所望の抗原を高量で発現する細胞で選択する。例えば、CD4⁺ T細胞は、高レベルのCD28を発現し、希釈濃度でCD8⁺ T細胞より効率的に捕獲される。ある態様において、使用する細胞の濃度は 5×10^6 /mlである。他の態様において、使用する濃度は約 1×10^5 /ml~ 1×10^6 /mlおよびその間のいずれかの整数値であり得る。

【0654】

他の態様において、細胞を、種々の長さの時間、種々の速度で、2~10℃または室温でローテータでインキュベートし得る。

20

【0655】

刺激のためのT細胞はまた洗浄工程後凍結させ得る。理論に縛られることを望まないが、凍結と続く解凍工程は、細胞集団から顆粒球およびある程度単球を除去することにより、より均一な産物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄工程後、細胞を凍結溶液に懸濁し得る。多くの凍結溶液およびパラメータが当分野で知られ、この状況において有用であるが、ある方法は、20%DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含むPBSまたは10%Dextran 40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミンおよび7.5%DMSOまたは31.25%Plasmalyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45%NaCl、10%Dextran 40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミンおよび7.5%DMSOを含む培養培地または例えば、HespanおよびPlasmaLyte Aを含む他の適当な細胞凍結媒体を使用し、次いで細胞を1°/分の速度で-80℃に凍結し、気相の液体窒素貯蔵タンクに保存する制御凍結の他の方法ならびに直ぐに-20℃または液体窒素の非制御凍結も使用できる。

30

【0656】

ある態様において、凍結保存細胞をここに記載するように解凍し、洗浄し、本発明の方法を使用する活性化の前に室温で1時間休息させる。

【0657】

本発明の状況でさらに企図されるのは、血液サンプルまたはアフエレシス産物の対象からの採取を、ここに記載した拡大させた細胞が必要となる前の時点で行うことである。つまり、拡大させる細胞の源を必要なあらゆる時点で採取し、T細胞のような所望の細胞を、例えば、T細胞療法のために、そのようなT細胞療法から利益を得るであろう様々な疾患または状態のためにその後使用するために、単離および凍結できる。ある態様において、血液サンプルまたはアフエレシスを、一般に健常な対象から採る。ある態様において、血液サンプルまたはアフエレシスを、疾患を発症するリスクがあるが、疾患をまだ発症していない一般に健常な対象から採り、興味ある細胞をその後の使用のために単離し、凍結する。ある態様において、T細胞を増殖させ、凍結し、後に使用し得る。ある態様において、サンプルを、ここに記載する特定の疾患と診断された直ぐ後に、しかし処置前に患者から単離する。さらなる態様において、細胞を、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法剤、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミ

40

50

コフェノール酸およびFK506のような免疫抑制性剤、抗体または他のキャンパス、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228および照射のような他の免疫除去剤のような手段での処置を含むが、これらに限定されない、任意の数の適切な処置モダリティの前に、対象からの血液サンプルまたはアフレススから単離する。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリン(シクロスポリンおよびFK506)を阻害するかまたは増殖因子誘発シグナル伝達(ラパマイシン)に重要なp70S6キナーゼを阻害する(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)。さらなる態様において、細胞を患者から単離し、骨髄または幹細胞移植、フルダラビンのような化学療法剤、外部ビーム放射線療法(XRT)、シクロホスファミドまたはOKT3またはキャンパスのような抗体を使用するT細胞除去療法と組み合わせた(例えば、前、同時または後)その後の使用のために凍結する。ある態様において細胞を前もって単離し、その後の、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサンのようなB細胞除去療法後の処置のために凍結できる。

10

【0658】

本発明のさらなる態様において、T細胞を、対象に機能的T細胞を残す処置の後、患者から直接得る。ある癌処置、特に免疫系を損傷させる薬物での処置後、処置の直後、患者が通常該処置から回復するまでの間、得られるT細胞の品質がエキスピボで増殖する能力について最適であるまたは改善されていることが観察されている。同様に、ここに記載する方法を使用するエキスピボ操作後、これらの細胞は、生着およびインビボ増殖について好ましい状態であり得る。それゆえに、本発明の状況において、T細胞、樹状細胞または造血細胞系譜の他の細胞を含む血液細胞をこの回復期に採取することが企図される。さらに、ある態様において、可動化(例えば、GM-CSFでの可動化)およびコンディショニングレジメンを使用して、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生および／または増殖に好都合である条件を、特に、治療後の定められた時間枠中に、対象に形成できる。細胞型の例には、T細胞、B細胞、樹状細胞および免疫系の他の細胞を含む。

20

【0659】

ある態様において、免疫エフェクターCAR分子を発現する細胞、例えば、ここに記載するCAR分子は、低い、免疫増強用量のmTOR阻害剤を受けた対象から得る。ある態様において、CARを発現するように操作される免疫エフェクター細胞の集団、例えば、T細胞を、対象または対象から採取したPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞のレベルまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比が少なくとも一過性に増加するように、低い、免疫増強用量のmTOR阻害剤の投薬から十分な時間後または十分な用量の後に、採取する。

30

【0660】

他の態様において、CARを発現するように操作されているまたは操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の集団を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の数を増やすまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞／PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞の比を増やす量のmTOR阻害剤と接触させることにより、エキスピボで処理できる。

40

【0661】

ある態様において、T細胞集団は、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)欠損である。DGK欠損細胞は、DGK RNAまたはタンパク質を発現しないかまたはDGK活性が低下したまたは阻害された細胞である。DGK欠損細胞は、DGK発現を低減または阻止するための遺伝的方法、例えば、RNA干渉剤、例えば、siRNA、shRNA、miRNAの投与により産生できる。あるいは、DGK欠損細胞は、ここに記載するDGK阻害剤での処置により産生できる。

【0662】

ある態様において、T細胞集団は、イカロス欠損である。イカロス欠損細胞は、イカロ

50

スRNAまたはタンパク質を発現しないかまたはイカロス活性が低下したまたは阻害された細胞を含み、イカロス欠損細胞は、イカロス発現を低減または阻止するための遺伝的方法、例えば、RNA干渉剤、例えば、siRNA、shRNA、miRNAの投与により産生できる。あるいは、イカロス欠損細胞は、イカロス阻害剤、例えば、レナリドマイドでの処置により産生できる。

【0663】

ある態様において、T細胞集団は、DGK欠損およびイカロス欠損であり、例えば、DGKおよびイカロスを発現せずまたはDGKおよびイカロス活性が低下または阻害されている。このようなDGKおよびイカロス欠損細胞は、ここに記載する方法のいずれかにより産生できる。

10

【0664】

ある態様において、NK細胞を対象から得る。他の態様において、NK細胞は、NK細胞株、例えば、NK-92細胞株(Conkwest)である。

【0665】

同種CAR免疫エフェクター細胞

ここに記載するある態様において、免疫エフェクター細胞は、同種免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞であり得る。例えば、細胞は、同種T細胞、例えば、機能的T細胞受容体(TCR)および／またはヒト白血球抗原(HLA)、例えば、HLAクラスIおよび／またはHLAクラスIIの発現を欠く同種T細胞である。

【0666】

20

機能的TCRを欠くT細胞は、例えば、その表面に何ら機能的TCRを発現しないように操作され、機能的TCRを含む1以上のサブユニットを発現しないように操作され(例えば、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、TCRデルタ、TCRイプシロンおよび／またはTCRゼータの発現がない(または発現の減少を示す)ように操作される)またはその表面に微量の機能的TCRを産生するように操作され得る。あるいは、T細胞は、例えば、TCRのサブユニットの1以上の変異したまたは切断型の発現により、実質的に障害されたTCRを発現する。用語“実質的に障害されたTCR”は、このTCRが、宿主で有害な免疫反応を惹起しないことを意味する。

【0667】

ここに記載するT細胞は、例えば、その表面に機能的HLAを発現しないように操作され得る。例えば、ここに記載するT細胞は、細胞表面発現HLA、例えば、HLAクラスIおよび／またはHLAクラスIIが下方制御されるように操作され得る。ある面において、HLAの下方制御は、ベーター2ミクログロブリン(B2M)の発現の減少または排除を伴い得る。

30

【0668】

ある態様において、T細胞は、機能的TCRおよび機能的HLA、例えば、HLAクラスIおよび／またはHLAクラスIIを欠き得る。

【0669】

機能的TCRおよび／またはHLAの発現を欠く修飾T細胞は、TCRまたはHLAの1以上のサブユニットのノックアウトまたはノックダウンを含む、いずれかの適当な手段により得ることができる。例えば、T細胞は、siRNA、shRNA、群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)または亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を使用して、TCRおよび／またはHLAのノックダウンを含み得る。

40

【0670】

ある態様において、同種細胞は、例えば、ここに記載する方法で、阻害性分子を発現しないまたは低レベルで発現する細胞である。例えば、細胞は、例えば、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を低下できる、阻害分子を発現しないまたは阻害分子を低レベルで発現する細胞であり得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM

50

ー3および／またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータを含む。DNA、RNAまたはタンパク質レベルでの阻害による、阻害分子の阻害はCAR発現細胞性能を最適化できる。ある態様において、例えば、ここに記載する、阻害性核酸、例えば、阻害性核酸、例えば、dsRNA、例えば、siRNAまたはshRNA、群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)または亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を使用できる。

【0671】

10

TCRまたはHLAを阻害するためのsiRNAおよびshRNA

ある態様において、TCR発現および／またはHLA発現を、細胞におけるTCRおよび／またはHLAおよび／またはここに記載する阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータ)をコードする核酸を標的とするsiRNAまたはshRNAを使用して、阻害できる。

20

【0672】

T細胞におけるsiRNAおよびshRNAの発現は、例えば、レンチウイルス発現系のような、いずれかの慣用の発現系を使用して達成できる。

【0673】

TCRの要素の発現を下方制御する代表的shRNAは、例えば、米国公開2012/0321667号に開示されている。HLAクラスIおよび／またはHLAクラスII遺伝子の発現を下方制御する代表的siRNAおよびshRNAは、例えば、米国公開US2007/0036773号に開示されている。

【0674】

TCRまたはHLAを阻害するためのCRISPR

30

ここで使用する“CRISPR”または“TCRおよび／またはHLAに対するCRISPR”または“TCRおよび／またはHLAを阻害するためのCRISPR”は、一連の群生性等間隔短回文反復配列またはこのような一連の反復を含む系をいう。ここで使用する“Cas”は、CRISPR関連タンパク質をいう。“CRISPR/Cas”系は、TCRおよび／またはHLA遺伝子および／またはここに記載する阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータ)の発現抑制または変異に使用できる、CRISPRおよびCas由来の系をいう。

40

【0675】

天然に存在するCRISPR/Cas系は、配列決定された真正細菌ゲノムの約40%および配列決定された古細菌の90%に見られる。Grissa et al. (2007) BMC Bioinformatics 8: 172. この系は、プラスミドおよびファージのような外来遺伝的要素に対する抵抗性を付与する1種の原核生物免疫系であり、後天性免疫の形態を提供する。Barrangou et al. (2007) Science 315: 1709-1712; Marragini et al. (2008) Science 322: 1843-1845。

【0676】

50

CRISPR/Cas系は、マウスまたは霊長類のような真核生物における遺伝子エディティング(特定の遺伝子のサイレンシング、増強または変更)に使用するために修飾されている。Wiedenheft et al. (2012) Nature 482: 331-8。これは、真核細胞に、特別に設計したCRISPRおよび1以上の適切なCasを含むプラスミドを導入することにより達成される。

【0677】

CRISPR座位と呼ばれることもあるCRISPR配列は、交互の反復およびスペーサーを含む。天然に存在するCRISPRにおいて、スペーサーは、通常細菌に対して外来であるプラスミドまたはファージ配列のような配列を含み、TCRおよび/またはHLA CRISPR/Cas系において、スペーサーはTCRまたはHLA遺伝子配列に由来する。

10

【0678】

CRISPR座位からのRNAは構成的に発現され、Casタンパク質により小RNAに加工される。これらは、反復配列が隣接したスペーサーを含む。RNAは、他のCasタンパク質を、RNAまたはDNAレベルで外来性遺伝的要素に対して発現抑制するように導く。Horvath et al. (2010) Science 327: 167-170; Makarova et al. (2006) Biology Direct 1: 7。スペーサーは、それゆえに、siRNAに類似して、RNA分子の鋳型として働く。Pennisi (2013) Science 341: 833-836。

【0679】

多くの異なるタイプの細菌で自然に生じるように、CRISPRの正確な配置および構造、Cas遺伝子の機能および数およびそれらの産物は種毎にいくぶん異なる。Haft et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1: e60; Kunin et al. (2007) Genome Biol. 8: R61; Mojica et al. (2005) J. Mol. Evol. 60: 174-182; Bolotin et al. (2005) Microbiol. 151: 2551-2561; Pourcel et al. (2005) Microbiol. 151: 653-663; and Stern et al. (2010) Trends. Genet. 28: 335-340。例えば、Cse(Casサブタイプ、大腸菌)タンパク質(例えば、CasA)は、機能的複合体、カスケードを形成し、これは、CRISPR RNA転写物を、カスケードが保持するスペーサー反復単位に加工する。Brouns et al. (2008) Science 321: 960-964。他の原核生物において、Cas6は、CRISPR RNA転写物を加工する。大腸菌におけるCRISPRベースのファージ不活性化はカスケードおよびCas3を必要とするが、Cas1またはCas2を必要としない。パイロコッカス・フリオサスおよび他の原核生物におけるCmr(Cas RAMPモジュール)タンパク質は、小CRISPR RNAと機能的複合体を形成し、これは相補的標的RNAを認識し、開裂する。より単純なCRISPR系は、二重らせんの各鎖のための2活性切断部位を有するヌクレアーゼであるタンパク質Cas9を頼る。Cas9と修飾CRISPR座位RNAの組み合わせを、遺伝子エディティングのための系に使用できる。Pennisi (2013) Science 341: 833-836。

20

30

【0680】

CRISPR/Cas系を使用して、TCRおよび/またはHLA遺伝子を編集でき(塩基対の付加または欠失)または未成熟終止を導入でき、これは、そうしてTCRおよび/またはHLAの発現を減少させる。あるいはCRISPR/Cas系を、RNA干渉のように使用し、TCRおよび/またはHLA遺伝子を可逆性形式でオフにできる。哺乳動物細胞において、例えば、RNAは、Casタンパク質をTCRおよび/またはHLAプロモーターに導くことができ、RNAポリメラーゼを立体的に遮断する。

40

【0681】

当分野で知られるテクノロジー、例えば、米国公開20140068797号およびCong (2013) Science 339: 819-823に記載のものを使用して、TCRおよび/またはHLAを阻害する人工CRISPR/Cas系を産生できる。例えば、Tsai (2014) Nature Biotechnol., 32:6 569-576、米国特許8,871,445号; 8,865,406号; 8,795,965号; 8,771,945号; および8,697,359号に記載されるもののような、TCRおよび/またはHLAを阻害する当分野で知られる他の人工CRISPR/C

50

as系も産生できる。

【0682】

TCRおよび／またはHLAを阻害するためのTALEN

“TALEN”または“HLAおよび／またはTCRに対するTALEN”または“HLAおよび／またはTCRを阻害するためのTALEN”は、HLAおよび／またはTCR遺伝子および／またはここに記載する阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2a 10
R、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータ)の編集に使用できる人工ヌクレアーゼである、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼをいう。

【0683】

TALENは、TALEフェクターDNA結合ドメインとDNA開裂ドメインを融合することにより人工的に産生される。転写アクティベーター様効果(TALE)は、HLAまたはTCR遺伝子の部分を含む、いずれかの所望のDNA配列に結合するように操作できる。操作されたTALEとDNA開裂ドメインを合わせることで、HLAまたはTCR配列を含む、いずれかの所望のDNA配列に特異的な、制限酵素を産生できる。次いで、これらを細胞に導入でき、そこで、それらはゲノムエディティングのために使用される。Boch (2011) Nature Biotech. 29: 135-6;およびBoch et al. (2009) Science 326: 1509-12; Moscou et al. (2009) Science 326: 3501。 20

【0684】

TALEは、ザントモナス細菌により分泌されるタンパク質である。DNA結合ドメインは、12番目および13番目のアミノ酸以外、反復した、高度に保存的33～34アミノ酸配列を含む。これらの2箇所は高度に可変であり、特定のヌクレオチド認識と強い相関を示す。それらは、それゆえに、所望のDNA配列と結合するように操作され得る。

【0685】

TALENを産生するために、TALEタンパク質を、野生型または変異FokIエンドヌクレアーゼであるヌクレアーゼ(N)と融合する。TALENにおいて使用するために、FokIについていくつかの変異が行われており、これらは、例えば、開裂特異性または活性の改善を含む。Cermak et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39: e82; Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011) Nature Biotech. 29: 731-734; Wood et al. (2011) Science 333: 307; Doyon et al. (2010) Nature Methods 8: 74-79; Szczepek et al. (2007) Nature Biotech. 25: 786-793;およびGuo et al. (2010) J. Mol. Biol. 200: 96。 30

【0686】

FokIドメインは、二量体として機能し、適切な配向および間隔を有する標的ゲノムにおける部位のための独特なDNA結合ドメインを有する2つの構築物を必要とする。TALE DNA結合ドメインとFokI開裂ドメインの間のアミノ酸残基数および2の個々のTALEN結合部位の間の塩基数の両者が、高レベルの活性を達成するために重要なパラメータであると考えられる。Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8。 40

【0687】

HLAまたはTCR TALENを細胞内で使用して、二重鎖切断(DSB)を産生できる。変異は、修復機構が切断を非相同末端結合により不適切に修復するならば、切断部位に導入できる。例えば、不適切な修復は、フレームシフト変異を導入し得る。あるいは、外来DNAを、TALENと共に細胞に導入でき、外来DNAの配列および染色体配列により、この方法はHLAまたはTCR遺伝子における欠損の補正またはwt HLAまたはTCR遺伝子におけるこのような欠損の導入に使用でき、そうして、HLAまたはTCRの発現を減少させる。 50

【0688】

H L AまたはT C Rにおける配列に特異的なT A L E Nは、モジュラー要素を使用する多様なスキームを含む、当分野で知られるいずれかの方法を使用して構築できる。Zhang et al. (2011) Nature Biotech. 29: 149-53; Geibler et al. (2011) PLoS ONE 6: e19509。

【0689】

H L Aおよび／またはT C Rを阻害するための亜鉛フィンゲースクレアーゼ

“Z F N”または“亜鉛フィンゲースクレアーゼ”または“H L Aおよび／またはT C Rに対するZ F N”または“H L Aおよび／またはT C Rを阻害するためのZ F N”は、H L Aおよび／またはT C R遺伝子および／またはここに記載する阻害分子(例えば、P D 1、P D-L 1、P D-L 2、C T L A 4、T I M 3、C E A C A M(例えば、C E A C A M-1、C E A C A M-3および／またはC E A C A M-5)、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7-H 3(C D 2 7 6)、B 7-H 4(V T C N 1)、H V E M(T N F R S F 1 4またはC D 2 7 0)、K I R、A 2 a R、M H CクラスI、M H CクラスII、G A L 9、アデノシンおよびT G F R ベータ)の編集に使用できる人工ヌクレアーゼである、亜鉛フィンゲースクレアーゼをいう。

10

【0690】

T A L E Nと同様、Z F Nは、D N A結合ドメインに融合したF o k Iヌクレアーゼドメイン(またはその誘導体)を含む。Z F Nの場合、D N A結合ドメインは、1以上の亜鉛フィンガーを含む。Carroll et al. (2011) Genetics Society of America 188: 773-782;およびKim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1156-1160。

20

【0691】

亜鉛フィンガーは、1以上の亜鉛イオンにより安定化される小タンパク質構造モチーフである。亜鉛フィンガーは、例えば、C y s 2 H i s 2を含むことができ、約3 bp配列を認識できる。既知特異性の多様な亜鉛フィンガーを合わせて、約6 bp、9 bp、12 bp、15 bpまたは18 bp配列を認識する多フィンガーポリペプチドを産生できる。ファージディスプレイ、酵母ワンハイブリッド系、細菌ワンハイブリッドおよびツーハイブリッド系および哺乳動物細胞を含む、特異的配列を認識する亜鉛フィンガー(およびそれらの組み合わせ)を産生するための多様な選択およびモジュラーアセンブリー技術が利用可能である。

30

【0692】

T A L E Nと同様、Z F Nは、D N Aを開裂するために二量体化しなければならない。それゆえに、Z F Nの対が、非パリンドロームD N A部位を標的とすることが必要である。2つのそれぞれのZ F Nは、そのヌクレアーゼが適切に離れて、D N Aの逆の鎖に結合しなければならない。Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10570-5。

【0693】

またT A L E Nと同様、Z F Nは、D N Aに二重鎖切断を創製でき、これは、不適切に修復されたならばフレームシフト変異を創製でき、細胞におけるH L Aおよび／またはT C Rの発現および量の減少に至る。Z F Nはまた、H L AまたはT C R遺伝子における変異のために相同組換えと使用もできる。

40

【0694】

H L Aおよび／またはT C Rにおける配列に特異的なZ F Nは、当分野で知られるいずれかの方法を使用して構築できる。Cathomen et al. (2008) Mol. Ther. 16: 1200-7; Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400: 96; 米国特許公開2011/0158957号; および米国特許公開2012/0060230号。

【0695】

テロメラーゼ発現

何らかの特定の理論に縛られることを望まないが、ある態様において、治療的T細胞は

50

、T細胞における短縮されたテロメアのために、患者における残留性が短く、したがって、テロメラーゼ遺伝子を用いる遺伝子導入は、T細胞のテロメアを延長し、患者におけるT細胞の残留性を改善し得る。Carl June, “Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic”, Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007)参照。それゆえに、ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞、異所性にテロメラーゼサブユニットを、例えば、テロメラーゼの触媒的サブユニット、例えば、TERT、例えば、hTERT発現する。ある面において、本開示は、細胞とテロメラーゼサブユニット、例えば、テロメラーゼの触媒的サブユニット、例えば、TERT、例えば、hTERTをコードする核酸を接触させることを含む、CAR発現細胞を産生する方法を提供する。細胞を、CARをコードする構築物と接触させる前に、同時にまたは後に核酸と接触させ得る。

10

【0696】

ある面において、本開示は、免疫エフェクター細胞の集団(例えば、T細胞、NK細胞)を製造する方法に関する。ある態様において、本方法は、免疫エフェクター細胞の集団(例えば、T細胞またはNK細胞)を提供し、免疫エフェクター細胞の集団とCARをコードする核酸を接触させ、そして、免疫エフェクター細胞の集団とテロメラーゼサブユニット、例えば、hTERTをコードする核酸を、CARおよびテロメラーゼ発現を可能とする条件下に接触させることを含む。

【0697】

ある態様において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸はDNAである。ある態様において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、テロメラーゼサブユニットの発現を駆動できるプロモーターを含む。

20

【0698】

ある態様において、hTERTは、GenBank Protein ID AAC51724.1のアミノ酸配列を有し(Meyerson et al., “hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization” Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795)、次のとおりである。

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCSKEL
VARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFV
LVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSSASRSLPLPKRPRR
GAAPERPPTVVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTP
CPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWWPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNH
AQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQGSVAAPPEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRLVPPGLWGS
RHNNRRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRGCAWLRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSF
FYVTETTFQKNRLFFYRKSVMWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDDYVV
GARTFRREKRAERLTSRVKALFVNLNERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTI
PQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVIEQSSSLNE
ASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHA
KTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKRTVVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTF
NRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTA
SLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSRLTAQTQLSRKLP GTTTLTALEAAAN
PALPSDFKTILD(配列番号61)

30

40

【0699】

ある態様において、hTERTは、配列番号157の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一の配列を有する。ある態様において、hTERTは、配列番号157の配列を有する。ある態様において、hTERTは、N末端、C末端または両方に欠失(例えば、5、10、15、20または30アミノ酸を超えない)を含む。ある態様において、hTERTは、N末端、C末端または両方にトランスジェニックアミノ酸配列(例えば、5、10、15、20または30アミノ酸を超えない)を含む。

50

【0700】

ある態様において、h T E R Tは、GenBank Accession No. AF018167の核酸配列によりコードされる(Meyerson et al., “hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization” Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795)。

1	caggcagcgt	ggctctgctg	cgcacgtggg	aagccctggc	cccggccacc	cccgcgatgc	
61	cgcgcgctcc	ccgctgccga	gccgtgcgct	ccctgctgcg	cagccactac	cgcgaggtgc	
121	tgccgctggc	cagtttcgtg	cggcgccctg	ggccccaggg	ctggcggctg	gtgcagcgcg	
181	gggacccggc	ggctttccgc	gcgctggtgg	cccagtgctt	ggtgtgcgtg	ccctgggacg	
241	cacggccgcc	ccccgccgcc	ccctccttcc	gccaggtgtc	ctgcctgaag	gagctggttg	10
301	cccgagtgtc	gcagaggctg	tgcgagcgcg	gcgcgaagaa	cgtgctggcc	ttcggcttcg	
361	cgtgctgga	cggggcccg	gggggcccc	ccgaggcctt	caccaccagc	gtgcgcagct	
421	acctgcccc	cacggtgacc	gacgcactgc	gggggagcgg	ggcgtggggg	ctgctgttgc	
481	gccgcgtggg	cgacgacgtg	ctggttcacc	tgctggcacg	ctgcgcgctc	tttgtgctgg	
541	tggtccccag	ctgcgcctac	cagggtgtgc	ggccgccgct	gtaccagctc	ggcgtgcca	
601	ctcaggcccg	gccccgccca	cacgctagt	gacccgaag	gcgtctggga	tgcgaacggg	
661	cctggaacca	tagcgtcagg	gaggccgggg	tccccctggg	cctgccagcc	cggggtgcga	
721	ggaggcgcg	gggcagtgcc	agccgaagtc	tgccgttgcc	caagaggccc	aggcgtggcg	
781	ctgcccctga	gccggagcgg	acgcccgttg	ggcaggggtc	ctgggcccac	cggggcagga	
841	cgcgtggacc	gagtgaccgt	ggtttctgtg	tggtgtcacc	tgccagaccc	gccgaagaag	20
901	ccacctcttt	ggagggtg	ctctctggca	cgcgccactc	ccacccatcc	gtgggcccgc	
961	agcaccacgc	gggcccccca	tccacatcgc	ggccaccacg	tccctgggac	acgccttgtc	
1021	ccccggtgta	cgccgagacc	aagcacttcc	tctactcctc	aggcgacaag	gagcagctgc	
1081	ggccctcctt	cctactcagc	tctctgaggg	ccagcctgac	tggcgctcgg	aggctcgtgg	
1141	agaccatctt	tctgggttcc	aggccctgga	tgccagggac	tccccgcagg	ttgccccgcc	
1201	tgccccagcg	ctactggcaa	atgcggcccc	tggttctgga	gctgcttggg	aaccacgcgc	
1261	agtgccccta	cggggtgctc	ctcaagacgc	actgcccgtt	gcgagctgcg	gtcaccaccag	
1321	cagccggtgt	ctgtgcccgg	gagaagcccc	agggtcttgt	ggcggcccc	gaggaggagg	
1381	acacagaccc	ccgtcgccgt	gtgcagctgc	tccgccagca	cagcagcccc	tggcaggtgt	
1441	acggcttcgt	gcgggcccgc	ctgcgccggc	tggtgcccc	aggcctctgg	ggctccaggc	30
1501	acaacgaacg	ccgttctctc	aggaacacca	agaagtccat	ctccctgggg	aagcatgcca	
1561	agctctcgct	gcaggagctg	acgtggaaga	tgagcgtgcg	gggctgcgct	tggtgcgca	
1621	ggagcccagg	ggttggtgtg	gttccggccg	cagagcaccg	tctgcgtgag	gagatcctgg	
1681	ccaagtctct	gactggctgt	atgagtgtgt	acgtcgctga	gctgctcagg	cttttctttt	
1741	atgtcacgga	gaccacgttt	caaaagaaca	ggctcttttt	ctaccggaag	agtgtctgga	
1801	gcaagtgtga	aagcattgga	atcagacacg	acttgaagag	ggtgcagctg	cgggagctgt	
1861	cgaagcaga	ggtcaggcag	catcggaag	ccaggccccg	cctgctgacg	tccagactcc	
1921	gttctatccc	caagcctgac	gggctgcggc	cgaattgtgaa	catggactac	gtcgtgggag	
1981	ccagaacgtt	ccgcagagaa	aagagggccg	agcgtctcac	ctcgagggtg	aaggcactgt	
2041	tcagcgtgct	caactacgag	cgggcgcggc	gccccgcctt	cctgggcgcc	tctgtgctgg	40
2101	gcctggacga	tatccacagg	gcctggcgca	ccttcgtgct	gcgtgtgcgg	gcccaggacc	
2161	cgcgcctga	gctgtacttt	gtcaaggtgg	atgtgacggg	cgcgtacgac	accatcccc	
2221	aggacaggct	cacggaggtc	atcgccagca	tcatcaaacc	ccagaacacg	tactgcgtgc	
2281	gtcggtatgc	cgtggtccag	aaggccgccc	atgggcacgt	ccgcaaggcc	ttcaagagcc	
2341	acgtctctac	cttgacagac	ctccagccgt	acatgcgaca	gttcgtggct	cacctgcagg	
2401	agaccagccc	gctgagggat	gccgtcgtca	tcgagcagag	ctcctccctg	aatgaggcca	
2461	gcagtggcct	cttcgacgtc	ttcctacgtt	tcatgtgcca	ccacgccgtg	cgcatacagg	
2521	gcaagtcccta	cgtccagtgc	caggggatcc	cgcagggtct	catcctctcc	acgtgtctct	
2581	gcagcctgtg	ctacggcgac	atggagaaca	agctgtttgc	ggggattcgg	cgggacgggc	
2641	tgctcctg	tttggtggat	gatttcttgt	tggtgacacc	tcacctcacc	cacgcgaaaa	50

2701 ccttcctcag gaccctggtc cgagggtgtc ctgagtatgg ctgcgtgggtg aacttgcgga
 2761 agacagtggg gaacttcctt gtagaagacg aggccttggg tggcacggct tttgttcaga
 2821 tgccggccca cggcctattc ccctgggtgc gcctgtgtgt ggatacccg accctggagg
 2881 tgcagagcga ctactccagc tatgcccggg cctccatcag agccagtctc accttcaacc
 2941 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tgggggtctt cggtgaagt
 3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcagggtga acagcctcca gacgggtgtgc accaaccatct
 3061 acaagatcct cctgtgtcag gcgtacaggt ttacgcgatg tgtgtgtcag ctcccatctt
 3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tcctgcgctg catctctgac acggcctccc
 3181 tctgtacttc catcctgaaa gccaaagacg cagggtatgtc gctggggggc aaggcgccg
 3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgtctaacg
 3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctgggggtc actcaggaca gcccagacgc
 3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaaaccgg
 3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgcccac agccaggccg
 3481 agagcagaca ccagcagccc tgctacgccc ggctctacgt cccaggaggagg gaggggcggc
 3541 ccacaccagc gcccgaccg ctgggagctt gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct
 3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc
 3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc
 3721 agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga atagtccatc
 3781 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgccctcctt tgccttccac ccccaccatc
 3841 cagggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaagggtg
 3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaatgggg
 3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa
 4021 aaaaaa(配列番号 6 2)

10

20

【0701】

ある態様において、h T E R Tは、配列番号158の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である配列を有する核酸によりコードされる。ある態様において、h T E R Tは、配列番号158の核酸によりコードされる。

【0702】

細胞の活性化および増殖

30

細胞は、例えば、米国特許6,352,694号；6,534,055号；6,905,680号；6,692,964号；5,858,358号；6,887,466号；6,905,681号；7,144,575号；7,067,318号；7,172,869号；7,232,566号；7,175,843号；5,883,223号；6,905,874号；6,797,514号；6,867,041号；および米国特許出願公開20060121005号に記載する方法を使用して、一般的に活性化および増殖できる。

【0703】

一般に、本発明のT細胞を、CD3/TCR複合体結合シグナルを刺激する薬剤が結合したその表面とT細胞の表面上の共刺激性分子を刺激するリガンドを接触させることにより増殖させる。特に、T細胞集団は、表面上に固定された抗CD3抗体または抗原結合そのフラグメントまたは抗CD2抗体との接触またはカルシウムイオノフォアと組み合わせたタンパク質キナーゼCアクティベーター(例えば、ブリオスタチン)との接触により、ここに記載するように刺激し得る。T細胞表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子と結合するリガンドを使用する。例えば、T細胞の集団を、T細胞の増殖刺激に適する条件下、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させ得る。CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞の増殖を刺激するために、抗CD3抗体および抗CD28抗体を使用できる。抗CD28抗体の例は9.3、B-T3、XR-CD28を含み(Diaclo ne, Besancon, France)、当分野で一般に知られる他の方法のように使用できる(Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9): 1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。

40

50

【0704】

ある態様において、T細胞のための一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、異なるプロトコールにより提供し得る。例えば、例えば、各シグナルを提供する薬剤は溶液中でも、表面と結合してよい。表面に結合しているとき、薬剤は同じ表面(すなわち、“cis”形態)または別の表面(すなわち、“trans”形態)に結合し得る。あるいは、あるいは、一方の薬剤が表面に結合し、他方が溶液にあってよい。ある態様において、共刺激シグナルを提供する薬剤は細胞表面に結合し、一次活性化シグナルを提供する薬剤は溶液中であるかまたは表面と結合する。ある態様において、両剤は溶液中にあり得る。ある態様において、薬剤は不溶性形態であり、Fc受容体または抗体または薬剤と結合する他の結合剤を発現する細胞のような表面に架橋され得る。この点に関して、例えば、本発明におけるT細胞の活性化および増殖のために意図される人工抗原提示細胞(aAPC)について、米国特許出願公開20040101519号および20060034810号を参照のこと。

10

【0705】

ある態様において、2剤は、ビーズに、同じビーズ、すなわち、“cis”または別のビーズ、すなわち、“trans”で固定化される。例として、一次活性化シグナルを提供する薬剤は抗CD3抗体または抗原結合そのフラグメントであり、共刺激シグナルを提供する薬剤は抗CD28抗体または抗原結合そのフラグメントであり、両剤が、等価な分子量で同じビーズに共固定化される。ある態様において、CD4⁺ T細胞増殖およびT細胞増殖のためのビーズに結合した1:1比の各抗体を使用する。本発明のある態様において、1:1比を使用して観察された増殖と比較して、T細胞増殖の増殖が観察されるように、ビーズに結合した抗CD3:CD28抗体の比を使用する。ある特定の態様において、1:1比を使用して観察された増殖と比較して、約1~約3倍増加が観察される。ある態様において、ビーズに結合したCD3:CD28抗体比は100:1~1:100およびその間の全ての整数値の範囲である。本発明のある態様において、抗CD3抗体より多くの抗CD28抗体が粒子に結合している、すなわち、CD3:CD28比が1未満である。本発明のある態様において、ビーズに結合した抗CD28抗体対抗CD3抗体比は2:1より大きい。ある特定の態様において、ビーズに結合した1:100 CD3:CD28比の抗体を使用する。ある態様において、ビーズに結合した1:75 CD3:CD28比の抗体を使用する。さらなる態様において、ビーズに結合した1:50 CD3:CD28比の抗体を使用する。ある態様において、ビーズに結合した1:30 CD3:CD28比の抗体を使用する。ある好ましい態様において、ビーズに結合した1:10 CD3:CD28比の抗体を使用する。ある態様において、ビーズに結合した1:3 CD3:CD28比の抗体を使用する。さらなる態様において、ビーズに結合した3:1 CD3:CD28比の抗体を使用する。

20

30

【0706】

1:500~500:1およびその間のいずれかの整数値の粒子対細胞比を、T細胞または他の標的細胞の刺激のために使用し得る。当業者には容易に認識され得るように、粒子対細胞比は、標的細胞に対する粒子径による。例えば、小さいサイズのビーズは少ない細胞しか結合できず、大きなビーズはたくさん結合できる。ある態様において、細胞対粒子比は、1:100~100:1およびその間のいずれかの整数値の範囲であり、さらなる態様において1:9~9:1およびその間のいずれかの整数値からなる比をT細胞刺激に使用し得る。T細胞刺激をもたらす抗CD3および抗CD28結合粒子対T細胞の比は、上記のように変わりうるが、しかしながらある好ましい値は1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1および15:1を含み、一つの好ましい比は少なくとも1:1粒子対T細胞である。ある態様において、1:1以下の粒子対細胞比を使用する。ある特定の態様において、好ましい粒子:細胞比は1:5である。さらなる態様において、粒子対細胞比は、刺激の日により変わり得る。例えば、ある態様において、粒子対細胞比は、1

40

50

日目は1:1~10:1であり、さらなる粒子をその後10日目まで連日または隔日で細胞に添加し、最終比1:1~1:10である(添加の比の細胞数に基づく)。ある特定の態様において、粒子対細胞比は刺激1日目に1:1であり、刺激3日目および5日目に1:5に調節する。ある態様において、粒子を、1日目の1:1および刺激3日目および5日目の1:5の最終比に基づき、連日または隔日で添加する。ある態様において、粒子対細胞比は、刺激1日目は2:1であり、刺激3日目および5日目に1:10に調節する。ある態様において、粒子を、1日目の1:1および3日目および5日目の1:10の最終比に基づき、連日または隔日で添加する。当業者は、多様な他の比が本発明における使用に適し得ることを認識する。特に、比は、粒子径ならびに細胞サイズおよびタイプによる。ある態様において、使用するための最も典型的な比は、1日目の1:1、2:1および3:1付近である。

10

【0707】

本発明のさらなる態様において、T細胞のような細胞を、薬剤被覆ビーズと組み合わせ、ビーズおよび細胞をその後分離し、次いで細胞を培養する。異なる態様において、培養前に、薬剤被覆ビーズおよび細胞を分離するが、一緒に培養する。さらなる態様において、ビーズおよび細胞を、磁気力のような力の適用によりまず濃縮し、細胞表面マーカーのライゲーションを増加させ、それにより細胞刺激を誘導する。

【0708】

例として、細胞表面タンパク質を、抗CD3および抗CD28が結合した常磁性ビーズ(3x28ビーズ)とT細胞を接触させることにより、ライゲートし得る。ある態様において、細胞(例えば、 $10^4 \sim 10^9$ T細胞)およびビーズ(例えば、DYNAビーズS(登録商標)M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズを1:1比)を、緩衝液、例えばPBS(カルシウムおよびマグネシウムのような二価カチオン不含)中で合わせる。再び、いずれかの細胞濃度を使用し得ることは当業者には容易に認識され得る。例えば、標的細胞は、サンプル中に極めて稀であり、サンプルの0.01%しか含まれないかまたはサンプル全体(すなわち、100%)が目的の標的細胞で構成され得る。したがって、あらゆる細胞数が本発明の状況と一体となる。ある態様において、細胞と粒子の最大接触を確実にするために、粒子および細胞を混合する体積を顕著に減少させる(すなわち、細胞の濃度を高める)ことが望ましいことがある。例えば、ある態様において、約20億細胞/mlの濃度を使用する。他の態様において、10億細胞/ml超を使用する。さらなる態様において、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万または5000万細胞/mlの細胞濃度を使用する。さらなる態様において、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万または1億細胞/mlの細胞濃度を使用する。さらなる態様において、1億2500万または1億5000万細胞/mlの濃度を使用できる。高濃度を使用して、細胞収率、細胞活性化および細胞増殖を増加できる。さらに、高細胞濃度の使用はCD28陰性T細胞のような目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞のより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞の集団は、治療的価値を有し得て、得ることが望まれる。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常CD28発現が弱いCD8⁺ T細胞のより効率的な選択を可能にする

20

30

【0709】

ある態様において、CAR、例えば、ここに記載するNKRCARをコードする核酸が形質導入された細胞を、例えば、ここに記載する方法により増殖する。ある態様において、細胞を、数時間(例えば、約2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、15時間、18時間、21時間)~約14日(例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日または14日)の期間の培養により増殖する。ある態様において、細胞は、4~9日の期間増殖される。ある態様において、細胞は、8日以下、例えば、7日、6日または5日の期間増殖される。ある態様において、細胞、例えば、ここに記載するNKRCAR細胞は、5日の培養により増殖され、得られた細胞は、同じ培養条件で、9日間培養で増殖された同じ細胞よりも強力である。効力は、例えば、多様なT細胞機能、例えば増殖、標的細胞

40

50

死、サイトカイン産生、活性化、遊走またはそれらの組み合わせにより規定され得る。ある態様において、5日増殖された細胞、例えば、ここに記載するNK R-C A R細胞は、同じ培養条件下に9日間培養で増殖された同じ細胞と比較して、抗原刺激による細胞倍加の少なくとも1倍、2倍、3倍または4倍増加を示す。ある態様において、細胞、例えば、ここに記載するNK R-C A Rを発現する細胞は、5日の培養により増殖され、得られた細胞は、同じ培養条件下に9日間培養で増殖された同じ細胞と比較して、高い炎症誘発性サイトカイン産生、例えば、I F N- γ および/またはGM-C S Fレベルを示す。ある態様において、5日増殖された細胞、例えば、ここに記載するNK R-C A R細胞は、同じ培養条件下に9日間培養で増殖された同じ細胞と比較して、炎症誘発性サイトカイン産生、例えば、I F N- γ および/またはGM-C S Fレベルのpg/mlで、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍またはそれ以上増加する。

10

【0710】

本発明のある態様において、混合物を、数時間(約3時間)~約14日またはその間のいずれかの時間的整数値、培養してよい。ある態様において、混合物を21日培養し得る。本発明のある態様において、ビーズおよびT細胞を一緒に約8日培養する。ある態様において、ビーズおよびT細胞を一緒に2~3日培養する。T細胞の培養期間が60日以上となるような、数サイクルの刺激も望まれ得る。T細胞培養に適する条件は、血清(例えば、胎児ウシまたはヒト血清)、インターロイキン-2(I L-2)、インスリン、I F N- γ 、I L-4、I L-7、GM-C S F、I L-10、I L-12、I L-15、T G F β およびT N F- α または当業者に知られる細胞増殖のためのいずれかの他の添加剤を含む、増殖および生存能に必要な因子を含み得る、適切な培地(例えば、最小必須培地またはR P M I 培地1640またはX-v i v o 15(Lonza))を含む。細胞の増殖のための他の添加剤は、界面活性剤、プラスマネートおよびN-アセチル-L-システインおよび2-メルカプトエタノールのような還元剤を含むが、これらに限定されない。培地は、無血清または適切な量の血清(または血漿)が添加されたまたは規定されたセットのホルモンおよび/またはT細胞の増殖および拡大に十分な量のサイトカインが添加されたR P M I 1640、A I M-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-V i v o 15およびX-V i v o 20、O p t i m i z e rを含み得る。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは実験的培養においてのみ包含され、対象に注入すべき細胞の培養には含まれない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件、例えば、適切な温度(例えば、37℃)および雰囲気(例えば、空気+5%CO₂)で維持される。

20

30

【0711】

ある態様において、細胞は、例えば、フローサイトメトリーのようなここに記載する方法により測定して、14日の増殖期間にわたり、細胞の少なくとも200倍(例えば、200倍、250倍、300倍、350倍)増加をもたらす1以上のインターロイキンを含む、適切な培地(例えば、ここに記載する培地)で増殖させる。ある態様において、細胞は、I L-15および/またはI L-7(例えば、I L-15およびI L-7)の存在下増殖させる。

【0712】

ある態様において、ここに記載する方法、例えば、C A R発現細胞製造法は、T制御性細胞、例えば、C D 2 5⁺ T細胞を、例えば、抗C D 2 5抗体またはそのフラグメントまたはC D 2 5結合リガンド、I L-2を使用して、細胞集団から除去することを含む。細胞集団からT制御性細胞、例えば、C D 2 5⁺ T細胞を除去する方法は、ここに記載される。ある態様において、方法、例えば、製造法は、さらに細胞集団(例えば、C D 2 5⁺ T細胞のようなT制御性細胞が枯渇されている細胞集団；または抗C D 2 5抗体、そのフラグメントまたはC D 2 5結合リガンドと前に接触された細胞集団)とI L-15および/またはI L-7の接触を含む。例えば、細胞集団(例えば、抗C D 2 5抗体、そのフラグメントまたはC D 2 5結合リガンドと先に接触されている)を、I L-15および/またはI L-7の存在下で増殖させる。

40

【0713】

50

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、インターロイキン-15(IL-15)ポリペプチド、インターロイキン-15受容体アルファ(IL-15Ra)ポリペプチドまたはIL-15ポリペプチドとIL-15Raポリペプチドの組み合わせ、例えば、hetIL-15を含む組成物を、CAR発現細胞の製造中、例えば、エキスビボで接触させることを含む。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造中、例えば、エキスビボで、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造中、例えば、エキスビボで、IL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチドの両者の組合せを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造中、例えば、エキスビボで、hetIL-15を含む組成物と接触させる。

10

【0714】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、エキスビボ増殖中、hetIL-15を含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、エキスビボ増殖中、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、エキスビボ増殖中、IL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチドの両者を含む組成物と接触させる。ある態様において、接触は、リンパ球亜集団、例えば、CD8⁺ T細胞の生存および増殖をもたらす。

【0715】

種々の刺激時間に曝されているT細胞は、異なる特徴を示し得る。例えば、典型的な血液またはアフエーシスした末梢血単核細胞産物は、細胞毒性またはサプレッサーT細胞集団(TC、CD8⁺)より大きいヘルパーT細胞集団(TH、CD4⁺)を有する。CD3およびCD28受容体での刺激によるT細胞のエキスビボ増殖は、約8〜9日目まで主にTH細胞からなるT細胞の集団を産生するが、約8〜9日目後、T細胞の集団は、徐々に大きくなるTC細胞の集団を含む。したがって、処置の目的によって、対象に、主にTH細胞を含むT細胞集団を注入することは有利であり得る。同様に、TC細胞の抗原特異的サブセットが単離されているならば、このサブセットを大きな程度まで増殖させることが有利であり得る。

20

【0716】

さらに、CD4およびCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーは、細胞増殖過程の経過中に、顕著に、しかし大部分、再現性よく変化する。そうして、このような再現性は、特定の目的のために活性化T細胞産物をあつらえる能力を可能とする。

30

【0717】

ここに開示する方法の代わりにまたはこれと組み合わせて、CARリガンドの使用を含む、CAR発現細胞(例えば、インビトロまたはインビボ(例えば、臨床モニタリング))、免疫細胞増殖および／または活性化および／またはCAR特異的選択の1以上の検出および／または定量的ための方法および組成物が開示される。一つの例示的態様において、CARリガンドは、CAR分子に結合する、例えば、CARの細胞外抗原結合ドメインに結合する抗体である(例えば、抗原結合ドメインに結合する抗体、例えば、抗イディオタイプ抗体；または細胞外結合ドメインの定常領域に結合する抗体)。他の態様において、CARリガンドは、CAR抗原分子である(例えば、ここに記載のような)。

40

【0718】

ある面において、CAR発現細胞を検出および／または定量する方法が開示される。例えば、CARリガンドは、インビトロまたはインビボでCAR発現細胞の検出および／または定量に使用できる(例えば、患者におけるCAR発現細胞の臨床モニタリングまたは患者への投薬)。方法は、

CARリガンド(場合により、標識CARリガンド、例えば、タグ、ビーズ、放射性または蛍光標識を含むCARリガンド)を提供し；
CAR発現細胞を獲得し(例えば、製造サンプルまたは臨床サンプルのようなCAR発現細胞含有サンプルの獲得)；

50

CAR発現細胞とCARリガンドを、結合が生じる条件下で接触させ、それにより、存在するCAR発現細胞のレベル(例えば、量)を検出することを含む。CAR発現細胞とCARリガンドの結合は、FACS、ELISAなどのような標準技術を使用して検出できる。

【0719】

他の面において、増殖および／または活性化細胞(例えば、免疫エフェクター細胞)を増殖する方法が開示される。方法は、

CAR発現細胞(例えば、第一CAR発現細胞または一過性に発現されるCAR細胞)を提供し；

該CAR発現細胞とCARリガンド、例えば、ここに記載するようなCARリガンドを、免疫細胞拡張および／または増殖が生じる条件下で接触させ、それにより、活性化および／または増殖集団を産生することを含む。

【0720】

ある態様において、CARリガンドは存在する(例えば、基質、例えば、天然に存在しない基質に固定化または結合される)。ある態様において、基質は、非細胞基質である。非細胞基質は、例えば、プレート(例えば、マイクロタイタプレート)、膜(例えば、ニトロセルロース膜)、マトリックス、チップまたはビーズから選択される固体支持体であり得る。ある態様において、CARリガンドは、基質に存在する(例えば、基質表面上)。CARリガンドを、基質に共有非共有(例えば、架橋)により固定、結合または会合させ得る。ある態様において、CARリガンドは、ビーズに結合(例えば、共有結合)する。前記態様において、免疫細胞集団をインビトロまたはエクスピボで増殖できる。方法は、さらに、例えば、ここに記載する方法のいずれかを使用して、CAR分子のリガンド存在下、免疫細胞の集団を培養することをさらに含む。

【0721】

他の態様において、細胞を増殖および／または活性化する方法は、さらに第二刺激性分子、例えば、CD28の添加を含む。例えば、CARリガンドおよび第二刺激性分子を基質、例えば、1以上のビーズに固定し、それにより細胞増殖および／または活性化を増加させ得る。

【0722】

さらに他の面において、CAR発現細胞を選択または富化する方法を提供する。方法は、CAR発現細胞とここに記載のようなCARリガンドを接触させ、CARリガンドの結合に基づき細胞を選択することを含む。

【0723】

さらに他の態様において、CAR発現細胞を枯渇、減少および／または死滅する方法が提供される。方法は、CAR発現細胞とここに記載するようなCARリガンドを接触させ；そして細胞を、CARリガンドの結合に基づきターゲティングし、それによりCAR発現細胞の数を減らすおよび／または殺すことを含む。ある態様において、CARリガンドは、毒性剤と結合する(例えば、トキシンまたは細胞除去剤)。他の態様において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えば、ADCCまたはADC活性を生じ得る。

【0724】

ここに開示する方法において使用できる抗CAR抗体の例は、例えば、WO2014/190273号およびJena et al., “Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials”, PLOS March 2013 8:3 e57838に記載され、その内容を引用により本明細書に包含させる。ある態様において、抗イディオタイプ抗体分子は、抗CD19抗体分子、例えば、抗CD19 scFvを認識する。例えば、抗イディオタイプ抗体分子は、Jena et al., PLOS March 2013 8:3 e57838に記載のCD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1と結合について競合でき；CD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1と同じCDR(例えば、Kabata定義、Chothia定義またはKabataおよびChoth

10

20

30

40

50

i a 定義の組合せを使用して1以上の、例えば、全ての、VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3)を有し得て；CD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1のような1以上の(例えば、2)可変領域を有し得るかまたはCD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1を含み得る。ある態様において、抗イディオタイプ抗体は、Jena et al.に記載の方法により製造した。他の態様において、抗イディオタイプ抗体分子は、WO2014/190273号に記載の抗イディオタイプ抗体分子である。ある態様において、抗イディオタイプ抗体分子は、136.20.1のようなWO2014/190273号に記載の抗体分子と同じCDR(例えば、1以上の、例えば、全ての、VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3)を有し；WO2014/190273号の抗体分子の1以上の(例えば、2)可変領域を有してよくまたは136.20.1のようなWO2014/190273号に記載の抗体分子を含み得る。他の態様において、抗CAR抗体は、例えば、WO2014/190273号に記載のようなCAR分子の細胞外結合ドメインの定常領域に結合する。ある態様において、抗CAR抗体は、CAR分子の細胞外結合ドメインの定常領域、例えば、重鎖定常領域(例えば、CH₂-CH3ヒンジ領域)または軽鎖定常領域に結合する。例えば、ある態様において、抗CAR抗体は、WO2014/190273号に記載の2D3モノクローナル抗体と結合について競合し、2D3と同じCDR(例えば、1以上の、例えば、全ての、VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3)を有しまたは2D3の1以上の(例えば、2)可変領域を有しまたはWO2014/190273に記載のような2D3を含む。

10

20

【0725】

ある面および態様において、ここでの組成物および方法は、例えば、その全体を引用により本明細書に包含させる、2014年7月31日出願の米国特許出願号に記載のような、T細胞の特定のサブセットのために最適化される。ある態様において、T細胞の最適化サブセットは、対照T細胞、例えば、同じ構築物を発現する異なるタイプ(例えば、CD8⁺またはCD4⁺)のT細胞と比較して、残留性の増強を示す。

【0726】

ある態様において、CD4⁺ T細胞は、ここに記載するCARを含み、当該CARは、CD4⁺ T細胞に適する(例えば、最適化、例えば、残留性の増強に至る)細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、ICOSドメインを含む。ある態様において、CD8⁺ T細胞は、ここに記載するCARを含み、当該CARは、CD8⁺ T細胞に適する(例えば、最適化、例えば、残留性の増強に至る)細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、4-1BBドメイン、CD28ドメインまたはICOSドメイン以外の共刺激ドメインを含む。ある態様において、ここに記載するCARは、ここに記載する抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載する腫瘍抗原と特異的に結合する抗原結合ドメインを含むCARを含む。

30

【0727】

ある面において、ここに記載するのは、対象を処置する方法、例えば、癌を有する対象を処置する方法である。方法は、該対象に、有効量の次のものを投与することを含む：

1)

40

抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載する抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載する腫瘍抗原に特異的に結合する抗原結合ドメイン；

膜貫通ドメイン；および

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、第一共刺激性ドメイン、例えば、ICOSドメイン

を含むCAR(CAR^{CD4+})を含むCD4⁺ T細胞；および

2)

抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載する抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載する腫瘍抗原に特異的に結合する抗原結合ドメイン；

膜貫通ドメイン；および

50

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、第二共刺激性ドメイン、例えば、4-1BBドメイン、CD28ドメインまたはICOSドメイン以外の他の共刺激性ドメインを含むCAR(CAR^{CD8+})を含むCD8⁺ T細胞；
ここで、CAR^{CD4+}とCAR^{CD8+}は互いに異なる。

【0728】

所望により、方法は、さらに、次のものを投与することを含む：

3)

抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載する抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載する腫瘍抗原に特異的に結合する抗原結合ドメイン；

膜貫通ドメイン；および

細胞内シグナル伝達ドメイン

を含むCAR(第二CAR^{CD8+})を含む、第二CD8⁺ T細胞

ここで、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、共刺激性シグナル伝達ドメインを含む第二CAR^{CD8+}は、CAR^{CD8+}に提示されず、所望により、ICOSシグナル伝達ドメインを含まない。

【0729】

CAR活性のアッセイ

CAR、例えば、ここに記載するNKRCARが構築されたら、適切なインビトロおよび動物モデルにおける抗原刺激後にT細胞を増殖させる能力、再刺激の非存在下でのT細胞増殖の持続および抗癌活性のような、しかしこれらに限定されない分子の活性を評価するために、種々のアッセイが使用され得る。NKRCARの効果を評価するためのアッセイは、下にさらに詳細に記載する。

【0730】

初代T細胞におけるNKRCAR発現のウェスタンブロット分析を、単量体および二量体の存在を検出するために使用できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。極めて簡潔には、CARを発現するT細胞(CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の1:1混合物)をインビトロで10日超増殖させ、続いて溶解および還元条件下のSDS-PAGEを行う。CARを、CARの成分、例えば、NKRC成分、例えば、KIR成分に特異的な抗体を使用するウェスタンブロッティングにより検出する。同じT細胞サブセットを、共有結合性二量体形成の評価を可能とするために非還元条件下のSDS-PAGE分析に使用する。

【0731】

抗原刺激後のCAR⁺ T細胞のインビトロ増殖を、フローサイトメトリーにより測定できる。例えば、CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の混合物をαCD3/αCD28 aAPCで刺激し、続いて分析すべきプロモーターの制御下に、GFPを発現するレンチウイルスベクターで形質導入する。プロモーター例は、CMV IE遺伝子、EF-1α、ユビキチンCまたはホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターを含む。GFP蛍光を、CD4⁺および/またはCD8⁺ T細胞サブセットの培養6日目に、フローサイトメトリーにより評価する。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。あるいは、CD4⁺とCD8⁺ T細胞の混合物を、0日目にαCD3/αCD28被覆磁気ビーズで刺激し、2Aリボソームスキッピング配列を使用するCARとeGFPを発現するパイシストロニックレンチウイルスベクターを使用して、1日目にCARを形質導入する。培養物を、腫瘍抗原発現K562細胞、野生型K562細胞(K562野生型)または腫瘍抗原を発現しない陰性対照細胞で、再刺激する。外来性IL-2を、100 IU/mlを隔日で培養物に添加する。GFP⁺ T細胞を、ビーズベースの計数を使用するフローサイトメトリーにより数える。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。

【0732】

再刺激非存在下の持続するCAR⁺ T細胞増殖も測定できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。簡潔には、平均T細胞体積(fl)

10

20

30

40

50

を、0日目の α CD3/ α CD28被覆磁気ビーズでの刺激および1日目の記載するCARの形質導入後、培養8日目にCoulter Multisizer III粒子カウンター、Nexcelom Cellometer VisionまたはMillipore Scepterを使用して測定する。

【0733】

動物モデルも、CAR発現細胞の測定に使用できる。例えば、免疫欠損マウスにおける、メソテリンを発現する初代ヒト癌、例えば、中皮腫または卵巣癌を処置するための、ヒトメソテリン特異的KIR-CAR⁺T細胞を使用する異種移植モデルを使用できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。極めて簡潔には、腫瘍確立後、マウスを処置群に無作為化する。種々の数のCAR発現T細胞を投与する。CAR-発現および増殖/CAR発現細胞の持続を種々の時点でモニターできる。動物を、週一間隔で、腫瘍進行についてモニターする。群の生存曲線を、ログランク検定で比較する。用量依存的CAR処置応答を評価できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。

【0734】

CAR発現細胞の細胞増殖およびサイトカイン産生の評価は、先に、例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)に記載されている。簡潔には、CAR介在増殖の評価を、洗浄したT細胞と、CD19(K19)またはCD32およびCD137(KT32-BBL)を発現するK562細胞と、最終T細胞：K562比2：1で混合することによりマイクロタイタープレートにおいて実施する。K562細胞を、使用前にガンマ線で照射する。抗CD3(クローンOKT3)および抗CD28(クローン9.3)モノクローナル抗体を、これらのシグナルがエキスポでの長期CD8⁺T細胞増殖を支持するため、刺激T細胞増殖について陽性対照として役立つKT32-BBL細胞の培養物に添加する。T細胞を、製造者による記載のとおり、CountbrightTM蛍光ビーズ(Invitrogen, Carlsbad, CA)およびフローサイトメトリーを使用して、培養において数える。CAR⁺T細胞を、eGFP-2A連結CAR発現レンチウイルスベクターで操作されたT細胞を使用するGFP発現により同定する。GFPを発現しないCAR⁺T細胞について、CAR⁺T細胞を、ビオチニル化組み換え腫瘍抗原タンパク質および二次アビジン-PEコンジュゲートにより検出する。T細胞のCD4⁺およびCD8⁺発現も、特異的モノクローナル抗体(BD Biosciences)を使用して同時に検出する。サイトカイン測定を、製造業者の指示に従いヒトTH1/TH2サイトカイン細胞数測定ビーズアレイキット(BD Biosciences, San Diego, CA)を使用して再刺激24時間後に回収した上清でまたはLuminex 30-plexキット(Invitrogen)を使用して実施する。蛍光をBD Fortessaフローサイトメーターを使用して評価し、データを製造業者の指示に従い分析する。類似の実験をCD123 CAR Tで実施できる。

【0735】

細胞毒性を、標準的⁵¹Cr放出アッセイにより評価できる。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)参照。簡潔には、標的細胞(K562 lines 発現the腫瘍抗原および一次腫瘍細胞)に、⁵¹Cr(NaCrO₄として、New England Nuclear, Boston, MA)を、37℃で2時間、頻繁に攪拌しながら充填し、完全RPMIで2回洗浄し、マイクロタイタープレートに播種する。エフェクターT細胞を、ウェル中で完全RPMI中、標的細胞と種々のエフェクター細胞：標的細胞(E:T)比で混合する。さらなる培地のみ(自発的放出、SR)またはtritron-X 100洗剤1%溶液(全放出、TR)を含むウェルも調製する。37℃で4時間のインキュベーション後、各ウェルから上清を回収する。放出された⁵¹Crを、次いでガンマ粒子カウンター(Packard Instrument Co., Waltham, MA)を使用して測定する。各条件を少なくとも3回行い、溶解のパーセントを式：溶解%=(ER-SR)/(TR-SR)(式中、ERは各実験条件で放出された平均⁵¹Crを示す)を使用して計算する。

【0736】

造影テクノロジーを使用して、腫瘍担持動物モデルにおけるCARの特異的輸送および増殖を評価できる。このようなアッセイは、例えば、Barrett et al., Human Gene Thera

10

20

30

40

50

py 22:1575-1586 (2011)に記載されている。簡潔には、NOD／SCID／ γ c^{-/-}(NSG)マウスに、Na1m-6細胞をIV注射し、7日後CAR構築物でエレクトロポレーション4時間後T細胞を注射する。T細胞は、ホタルルシフェラーゼを発現するようにレンチウイルス構築物で安定にトランスフェクトされ、マウスをバイオルミネセンスについて造影する。あるいは、Na1m-6異種移植モデルにおけるCAR⁺T細胞の単回注射の治療有効性および特異性を、次のように測定できる。NSGマウスに、ホタルルシフェラーゼを安定に発現するように形質導入したNa1m-6を注射し、続いて7日後にCARで電気穿孔したT細胞を1回尾静脈注射する。動物を、注射後種々の時点で造影する。例えば、5日目(処置2日前)および8日目(CAR⁺PBL後24時間)に、代表的マウスにおけるホタルルシフェラーゼ陽性白血病の光子密度ヒートマップを作成できる。

10

【0737】

ここでの実施例部分に記載のものならびに当分野で知られるものを含む、他のアッセイも、本発明のCAR構築物の評価に使用できる。

【0738】

治療適用

本発明は、NKR-CAR、例えば、KIR-CARまたは複数のタイプのNKR-CAR、例えば、KIR-CARを発現するために修飾した細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)を含み、ここで、各NKR-CAR、例えば、KIR-CARは、特異的抗体の抗原認識ドメインとNKRの成分、例えば、KIRを組み合わせる。

20

【0739】

ある態様において、本発明のKIR-CARは、シグナル免疫チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)含有膜タンパク質、DAP12との相互作用により伝達する活性化KIRを含み、これは、これらのタンパク質の膜貫通ドメイン内の残基が介在する。

【0740】

ある態様において、本発明のKIR-CARは、タンパク質のSHP-1、SHP-2およびVavファミリーのような細胞質シグナル伝達タンパク質との直接的または間接的相互作用する1以上の免疫チロシンベースの阻害性モチーフ(ITIM)により、シグナルを伝達する阻害性KIを含む。(ITIM)を含む細胞質ドメインを担持するKIRは活性化シグナルを抑制し、NK細胞溶解性およびサイトカイン産生活性の阻害に至る。ある例において、本発明のKIR-CARを発現する修飾T細胞は、KIR-CAR介在T細胞応答を誘発できる。ある態様において、1タイプを超える抗原への結合の依存は、修飾T細胞が、正常バースタンダー細胞より腫瘍細胞の結合により応答を惹起する増強された特異性を示す。

30

【0741】

本発明は、初代T細胞の特異性を腫瘍抗原に再指向させるための複数のタイプのKIR-CARの使用を提供する。それゆえに、本発明はまた、複数のタイプのKIR-CARを発現するT細胞を哺乳動物に投与する過程を含む、哺乳動物における標的細胞集団または組織に対するT細胞介在免疫応答を刺激する方法も提供し、ここで、各タイプのKIR-CARは、予定された標的と特異的に相互作用する結合部分を含む。ある態様において、細胞は、活性化KIRを含む第一KIR-CAR(activating KIR-CAR)、および阻害性KIRを含む第二KIR-CAR(inhibitory KIR-CAR)を含む。

40

【0742】

何らかの特定の理論に縛られることを望まないが、KIR-CAR修飾T細胞により誘発される抗腫瘍免疫応答は、能動的または受動的免疫応答であり得る。さらに、KIR-CAR介在免疫応答は、KIR-CAR修飾T細胞が、KIR-CARにおける抗原結合ドメインに特異的な免疫応答を誘発する、養子免疫療法アプローチの一部であり得る。

【0743】

処置され得る癌は、血管形成されていないまたはまだ実質的に血管形成されていないならびに血管形成された腫瘍である腫瘍を含む。癌は、非固形腫瘍(例えば血液学的腫瘍、

50

例えば、白血病およびリンパ腫)を含んでも固形腫瘍を含んでもよい。本発明のCARで処置される癌のタイプは、癌腫、芽腫および肉腫およびある種の白血病またはリンパ系悪性腫瘍、良性および悪性腫瘍および悪性腫瘍例えば、肉腫、癌腫および黒色腫を含むが、これらに限定されない。成人腫瘍／癌および小児腫瘍／癌も包含される。ある態様において、処置する癌は、固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍である。

【0744】

血液癌は、血液または骨髄の癌である。血液学的(または血行性)癌の例は、急性白血病(例えば急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病および骨髄芽細胞性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病および赤白血病)、慢性白血病(例えば慢性骨髄球性(顆粒球性)白血病、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病)を含む白血病、真性多血症、リンパ腫、ホジキン疾患、非ホジキンリンパ腫(低悪性度および高悪性度形態)、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、重鎖疾患、骨髄異形成症候群、ヘアリー細胞白血病および骨髄異形成を含む。

【0745】

固形腫瘍は、通常嚢胞または液体領域を含まない組織の異常塊である。固形腫瘍は良性または悪性であり得る。種々のタイプの固形腫瘍が、それを形成する細胞のタイプにより名づけられる(例えば肉腫、癌腫、およびリンパ腫)。肉腫および癌のような固形腫瘍の例は、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、および他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ系悪性腫瘍、膵臓癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、髄様甲状腺癌、乳頭甲状腺癌、褐色細胞腫皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎臓細胞癌、肝細胞腫、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、精上皮腫、膀胱癌、黒色腫、およびCNS腫瘍(例えば神経膠腫(例えば脳幹神経膠腫および混合型神経膠腫)、神経膠芽腫(別名多形神経膠芽腫)、星状細胞腫、CNSリンパ腫、胚細胞腫、髄芽腫、シュワン腫頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、神経芽腫、網膜芽細胞腫および脳転移)を含む。

【0746】

ある態様において、開示するのは、CD19 CAR、例えば、ここに記載する抗CD19結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はCD19を発現する。ある態様において、処置する癌はALL(急性リンパ芽球性白血病)、CLL(慢性リンパ性白血病)、DLBCL(汎発性大B細胞リンパ腫)、MCL(マントル細胞リンパ腫またはMM(多発性骨髄腫))である。

【0747】

ある態様において、開示するのは、EGFRvIII CAR、例えば、ここに記載する抗EGFRvIII結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はEGFRvIIIを発現する。ある態様において、処置する癌は神経膠芽腫である。

【0748】

ある態様において、開示するのは、メソテリンCAR、例えば、ここに記載する抗メソテリン結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はメソテリンを発現する。ある態様において、処置する癌は固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍、例えば、中皮腫、膵臓癌、肺癌または卵巣癌である。

【0749】

ある態様において、開示するのは、CD123 CAR、例えば、ここに記載する抗CD123結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はCD123を発現する。ある態様において、処置する癌はAMLである。

【0750】

ある態様において、開示するのは、CLL-1 CAR、例えば、ここに記載する抗 CLL-1 結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はCLL-1を発現する。ある態様において、処置する癌はAMLである。

【0751】

ある態様において、開示するのは、CD33 CAR、例えば、ここに記載する抗CD33 結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はCD33を発現する。ある態様において、処置する癌はAMLである。

10

【0752】

ある態様において、開示するのは、GD2 CAR、例えば、ここに記載する抗GD2 結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はGD2を発現する。ある態様において、処置する癌は神経芽腫である。

【0753】

ある態様において、開示するのは、オースチル-GD2 CARを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はオースチル-GD2を発現する。ある態様において、処置する癌は神経芽腫または黒色腫である。

20

【0754】

ある態様において、開示するのは、BCMA CAR、例えば、ここに記載する抗BCMA 結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はBCMAを発現する。ある態様において、処置する癌は多発性骨髄腫である。

【0755】

ある態様において、開示するのは、CLDN6 CAR、例えば、ここに記載する抗CLDN6 結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はCLDN6を発現する。ある態様において、処置する癌は固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍、例えば、卵巣癌、肺癌または乳癌である。

30

【0756】

ある態様において、開示するのは、WT1 CAR、例えば、ここに記載する抗WT1 結合ドメインを発現するように操作した免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、処置を必要とする提供することを含む、癌の処置方法であって、ここで、癌細胞はWT1を発現する。

【0757】

ある態様において、本発明のKIR-CAR細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の抗原結合ドメインは、特定の癌を処置するように設計される。ある態様において、本発明のKIR-CAR細胞、例えば、T細胞またはNK細胞は、第一抗原を標的とする第一actKIR-CARおよび第二抗原を標的とする第二inhKIR-CARを発現するように修飾され、ここで、第一抗原は特定の腫瘍または癌に発言され、第二抗原は特定の腫瘍または癌に発現されない。この方法で、T細胞の条件的活性化が、actKIR-CAR(または目的の悪性細胞の抗原に対するscFvを担持する標準TCRゼータCAR)および、KIR-CAR T細胞が正常細胞と遭遇したとき、actKIR-CARからの活性化シグナルの阻害を提供する例えば正常組織に提示されるが、悪性組織に提示されない抗原に対するscFvを担持するinhKIR-CARにより提供される。阻害性CARに対する有用な標的として働く抗原の例は、エフリン受容体(Pasquale, 2010, Nat Rev Cancer 10(3):165-80)およびクローディン(Singh et al., 2010, J Oncol, 2010:541957)を含み、これらは、正常組織の上皮性細胞で発現されるが、しばしば、癌(例えばEPH

40

50

A 7)により選択的に喪失される。

【0758】

メソテリン発現疾患および障害に対する治療適用

本発明は、メソテリンの発現と関係する疾患および障害を処置するための組成物および方法を提供する。メソテリン発現と関係する疾患または障害の例は、中皮腫(例えば、胸膜中皮腫、腹膜中皮腫、心膜中皮腫)、膵臓癌または卵巣癌を含む。メソテリン発現と関係する疾患または障害は、ここに記載する固形腫瘍である。

【0759】

悪性中皮腫は、中皮として知られる体内臓器を裏打ちする細胞の薄層に生じるタイプの癌である。認識される3タイプの中皮腫がある。胸膜中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫またはMPM)は該疾患の最も一般的な形態で、症例の約70%を占め、胸膜として知られる肺の裏層に始まる。腹膜中皮腫は、腹膜として知られる腹腔の裏層に生じる。心膜中皮腫は、心臓を裏打ちする心膜に始まる。

10

【0760】

対象は、アスベストに長期に曝されたならば、中皮腫を発症するリスクがあり得る。アスベストへの暴露およびアスベスト粒子の吸入は中皮腫を引き起こし得る。大部分の場合、中皮腫症状は、暴露後長年経過するまで、アスベストに曝されている対象では生じない。

【0761】

胸膜中皮腫の症状は、例えば、腰痛または側胸痛および息切れを含む。他の症状は、嚥下困難、咳嗽の持続、発熱、体重減少または疲労を含む。患者のいくらかが経験するさらなる症状は、筋肉弱化、感覚能力の喪失、咯血、顔面および腕部腫脹および嗄声である。ステージ1中皮腫のような疾患の初期段階では、症状は穏やかであり得る。患者は、通常胸の一部の治まりそうにない疼痛、体重減少および発熱を報告する。

20

【0762】

腹膜中皮腫は、腹部に端を発し、その結果、症状はしばしば腹痛、体重減少、悪心および嘔吐を含む。水分蓄積が腹部にそして癌の結果生じる。腹膜中皮腫は腹部に端を発し、しばしば肝臓、脾臓または腸を含む領域における他の臓器に広がる。重度の腹痛が、患者が最初に経験する最も一般的な訴えである。腹部の水分蓄積による不快感レベルも同様に存在し得る。腹膜中皮腫の他の症状は、排便困難、悪心および嘔吐、発熱および足のむくみを含み得る。

30

【0763】

心膜中皮腫は、中皮腫の最も少ない形態である。心膜中皮腫は、名前が示すとおり、心臓が関係する。この稀なタイプの中皮腫癌は、心臓を囲む嚢である心膜を侵す。癌が進行するに連れて、心臓は、体に酸素を効率的に運搬することができなくなり、さらにいっそう加速しながら健康を悪化させる。心膜中皮腫と最も一般的に関係する症状は心臓発作のものによく似ており、悪心、胸痛および息切れである。

【0764】

本発明の処置により利益を受ける対象は、中皮腫を有する対象または、例えば、ここに記載する症状の1つ以上の存在および／またはアスベストへの暴露を証拠として、中皮腫を有することが疑われる対象である。具体的な態様において、中皮腫は胸膜中皮腫(例えば、悪性胸膜中皮腫)である。他の面において、例えば、胸膜プラーク、良性中皮腫または中皮過形成のような前癌状態を有する対象を処置し得る。

40

【0765】

メソテリンと関係する疾患または障害の他の例は膵臓癌である。ここに記載する方法で処置できる膵臓癌は、膵外分泌癌および膵内分泌癌を含むが、これらに限定されない。膵外分泌癌は、腺癌、腺房細胞癌、腺扁平上皮癌、膠質癌、破骨細胞様巨細胞を伴う未分化癌、肝様癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍、粘液性嚢胞腫瘍、膵芽腫、漿液性嚢胞腺腫、印環細胞癌、充実性偽乳頭腫瘍、膵管癌および未分化癌を含むが、これらに限定されない。ある態様において、膵外分泌癌は膵管癌である。膵内分泌癌は、インスリノーマおよびグルカ

50

ゴノーマを含むが、これらに限定されない。

【0766】

ある態様において、膵臓癌は、あらゆる初期膵臓癌、非転移膵臓癌、原発性膵臓癌、摘出膵臓癌、進行膵臓癌、局所進行膵臓癌、転移膵臓癌、切除不能膵臓癌、寛解状態膵臓癌、再発性膵臓癌、補助療法における膵臓癌または新補助療法における膵臓癌を含む。ある態様において、膵臓癌は局所進行膵臓癌、切除不能膵臓癌または転移膵管癌である。ある態様において、膵臓癌はゲムシタビンベースの療法に耐性である。ある態様において、膵臓癌はゲムシタビンベースの療法に難治性である。

【0767】

他の面において、メソテリン発現と関係する障害は卵巣癌である。卵巣癌は、腫瘍組織学により分類される。卵巣上皮性癌としても知られる表面上皮性間質腫瘍は、卵巣癌の最も一般的タイプである。漿液性腫瘍(漿液性乳頭状嚢腺癌を含む)、類内膜腫瘍および粘液性嚢胞腺腫を含む。

【0768】

ここに記載する方法を使用して、多様なステージ、例えば、ステージI、ステージII、ステージIIIまたはステージIVの卵巣癌を処置できる。ステージ分類は、例えば、卵巣癌を摘出するとき行う。卵巣癌は次のとおりステージ分類される。

ステージI癌は、一方または両方の卵巣に限局する。卵巣の一方または両方が関与し、子宮および／またはファロピウス管または骨盤内の他の部位に広がっているとき、癌はステージIIである。卵巣の一方または両方が関与し、リンパ節または、腸管のように骨盤の外であるがまだ腹腔にある他の部位または肝臓表面に広がっているとき、癌はステージIII癌である。一方または両方の卵巣が関与し、癌が腹部の外または肝臓内部に広がっているとき、癌はステージIV癌である。

【0769】

ある態様において、卵巣癌は1個以上の化学療法剤に耐性である。ある態様において、卵巣癌は1個以上の化学療法剤に難治性である。

【0770】

ここに記載するCAR組成物で処置できる他の癌は、例えば、脳癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌(例えば、肺腺癌)、黒色腫、転移黒色腫、中皮腫、神経芽腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌およびこれらの任意の組み合わせを含む。

【0771】

本発明は、メソテリン発現細胞集団の増殖を阻止するかまたは減少させる方法を提供し、該方法は、該メソテリン発現細胞を含む細胞の集団と、該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリンCAR発現細胞を接触させることを含む。具体的態様において、本発明は、メソテリンを発現する癌細胞の集団の増殖を阻止するかまたは減少させる方法を提供し、該方法は、該メソテリン発現癌細胞集団と、該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリンCAR発現細胞を接触させることを含む。他の態様において、本発明は、メソテリンを発現する癌細胞の集団の増殖を阻止するかまたは減少させる方法を提供し、該方法は、該メソテリン発現癌細胞集団と、該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリンCAR発現細胞を接触させることを含む。ある態様において、本発明のメソテリンCAR発現細胞は、細胞および／または癌細胞の数量、数、量またはパーセンテージを、中皮腫またはメソテリン発現細胞と関係する他の癌を有する対象またはその動物モデルにおいて、陰性対照と比較して少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%減少させる。ある面において、対象はヒトである。

【0772】

本発明はまたメソテリン発現細胞と関係する障害(例えば、中皮腫)を予防、処置および／または管理する方法を提供し、該方法は、それを必要とする対象に該メソテリン発現細胞

10

20

30

40

50

胞と結合する本発明の中皮腫 C A R 発現細胞を投与することを含む。一つの面において、対象はヒトである。

【0773】

本発明は、メソテリン発現細胞と関係する癌の再発を予防する方法を提供し、該方法は、それを必要とする対象に該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリン C A R 発現細胞を投与することを含む。他の態様において、該方法は、それを必要とする対象に、有効量の該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリン C A R 発現細胞を有効量の他の治療剤と組み合わせて投与することを含む。

【0774】

一つの面において、本発明は、哺乳動物免疫エフェクター細胞における発現のためのプロモーターに操作可能に結合したメソテリン C A R をコードする配列を含むベクターに関する。一つの面において、本発明は、メソテリン発現腫瘍の処置に使用するためのメソテリン C A R を発現する組み換え免疫エフェクター細胞を提供する。一つの面において、本発明のメソテリン C A R 発現細胞は、メソテリン C A R 発現細胞が抗原に応答して活性化され、C A R 発現細胞が癌細胞を標的とし、癌の増殖が阻害されるように、腫瘍細胞と、その表面に発現される本発明のメソテリン C A R の少なくとも 1 つを接触させる。

10

【0775】

ある面において、本発明は、C A R 発現細胞が抗原に応答して活性化され、癌細胞を標的とし、癌の増殖が阻害されるように腫瘍細胞とメソテリン C A R 発現細胞を接触させることを含む、メソテリン発現癌細胞の増殖を阻止する方法を提供する。ある面において、活性化 C A R T は癌細胞を標的とし、殺す。

20

【0776】

ある面において、本発明は、対象における癌の処置法を提供する。該方法は、対象に、癌が対象で処置されるように、メソテリン C A R 発現細胞を投与することを含む。本発明のメソテリン C A R 発現細胞で処置可能な癌の例は、メソテリンの発現と関係する癌である。一つの面において、メソテリンの発現と関係する癌は、中皮腫、膵臓癌、卵巣癌および肺癌から選択される。

【0777】

本発明は、免疫エフェクター細胞、例えば、T 細胞または N K 細胞が、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように遺伝的に修飾され、C A R 発現細胞が、それを必要とするレシピエントに注入される、ある種の細胞治療を提供する。注入された細胞はレシピエントの腫瘍細胞を死滅させ得る。抗体治療と異なり、C A R 修飾免疫エフェクター細胞はインビボで複製でき、持続した腫瘍制御に至り得る長期残留性を生じる。種々の面において、患者に投与された細胞またはその子孫は、患者への細胞投与後、患者に少なくとも 4 ヶ月、5 ヶ月、6 ヶ月、7 ヶ月、8 ヶ月、9 ヶ月、10 ヶ月、11 ヶ月、12 ヶ月、13 ヶ月、14 ヶ月、15 ヶ月、16 ヶ月、17 ヶ月、18 ヶ月、19 ヶ月、20 ヶ月、21 ヶ月、22 ヶ月、23 ヶ月、2 年、3 年、4 年または 5 年残留する。

30

【0778】

本発明はまた、キメラ抗原受容体 (C A R) を一過性に発現するように、例えば、インビトロで転写された R N A により免疫エフェクター細胞が修飾され、該 C A R 発現細胞が、それを必要とするレシピエントに注入される、ある種の細胞治療も含む。注入された細胞は、レシピエントにおける癌細胞を死滅させ得る。それゆえに、種々の面において、患者に投与された細胞は、患者への細胞投与後 1 ヶ月未満、例えば 3 週間、2 週間、1 週間存在する。

40

【0779】

何らかの特定の理論に縛られることを望まないが、C A R 修飾免疫エフェクター細胞により惹起される抗癌免疫応答は、受動的または能動的免疫応答であってよく、あるいはまた直接的対間接的免疫応答によるものであり得る。一つの面において、C A R 形質導入 T 細胞は、メソテリンを発現するヒト癌細胞に応答して特定の炎症誘発性サイトカイン分泌および強力な細胞溶解性活性を示し、バイスタンダー死滅を仲介し、確立されたヒト腫瘍

50

の退縮を仲介する。例えば、メソテリン発現腫瘍の不均一な領域内の抗原が少ない腫瘍細胞は、隣接する抗原陽性癌細胞に対して以前は反応していたメソテリン再指向T細胞による間接的破壊に感受性であり得る。

【0780】

一つの面において、本発明のCAR修飾免疫エフェクター細胞を担持する完全ヒトscFvは、哺乳動物におけるエキスピボ免疫化および／またはインビボ治療のためのある種のワクチンであり得る。一つの面において、哺乳動物はヒトである。

【0781】

エキスピボ免疫化に関して、哺乳動物に細胞を投与する前に、インビトロで次のi)細胞の増殖、ii)CARをコードする核酸の細胞への導入またはiii)細胞の凍結保存の少なくとも1つが起こる。

10

【0782】

エキスピボ手順は当分野で周知であり、下により詳細に記載する。概説すると、細胞を哺乳動物(例えば、ヒト)から単離し、ここに開示されるKIR-CARを発現するベクターで遺伝的に修飾(すなわち、インビトロ形質導入または遺伝子導入)する。KIR-CAR修飾細胞を、哺乳動物レシピエントに投与して、治療効果を提供できる。哺乳動物レシピエントはヒトであってよく、KIR-CAR修飾細胞は、レシピエントに関して自己であり得る。あるいは、細胞は、レシピエントに関して同種、同系または異種であり得る。

【0783】

引用により本明細書に包含させる米国特許5,199,942号に記載する造血幹細胞および前駆細胞のエキスピボ増殖のための方法を、本発明の細胞に適用できる。他の適当な方法は当分野で知られ、それゆえに本発明は、細胞のエキスピボ増殖の特定の方法に制限されない。簡潔には、T細胞のエキスピボ培養および増殖は、(1)哺乳動物からの採取した末梢血または骨髓外植体からのCD34⁺造血幹細胞および前駆細胞回収；および(2)エキスピボでのこのような細胞の増殖を含む。米国特許5,199,942号に記載される細胞増殖因子に加えて、flt3L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドのような他の因子を細胞の培養および増殖に使用できる。

20

【0784】

エキスピボ免疫化の点で細胞ベースのワクチンを使用するのに加えて、本発明はまた患者における抗原に対する免疫応答を惹起するための、インビボ免疫化のための組成物および方法も提供する。

30

【0785】

一般に、ここに記載するように活性化および拡張された細胞を、免疫不全状態である個体で生じる疾患の処置および予防に使用できる。特に、本発明のKIR-CAR修飾T細胞を癌の処置に使用する。ある態様において、本発明の細胞を、癌を発症するリスクのある患者の処置に使用する。それゆえに、本発明は、処置を必要とする対象に本発明のKIR-CAR修飾T細胞の治療有効量を投与することを含む、癌を処置または予防する方法を提供する。

【0786】

本発明のKIR-CAR修飾T細胞を単独でまたは希釈剤および／またはIL-2または他のサイトカインまたは細胞集団のような他の成分と組み合わせて医薬組成物として投与し得る。簡潔にいうと、本発明の医薬組成物は、1以上の薬学的にまたは生理学的に許容される担体、希釈剤または添加物と組み合わせた、ここに記載する標的細胞集団を含み得る。このような組成物は、中性緩衝化食塩水、リン酸緩衝化食塩水などのような緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールのような炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンのようなアミノ酸；抗酸化剤；EDTAまたはグルタチオンのようなキレート剤；アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム)；および防腐剤を含み得る。本発明の組成物は、好ましくは静脈内投与用に製剤される。

40

【0787】

本発明は、メソテリン発現細胞集団の増殖を阻止するかまたは減少させる方法を提供し

50

、該方法は、該メソテリン発現細胞を含む細胞の集団と、該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリンCAR発現細胞を接触させることを含む。具体的態様において、本発明は、メソテリンを発現する癌細胞の集団の増殖を阻止するかまたは減少させる方法を提供し、該方法は、該メソテリン発現癌細胞集団と、該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリンCAR発現細胞を接触させることを含む。他の態様において、本発明は、メソテリンを発現する癌細胞の集団の増殖を阻止するかまたは減少させる方法を提供し、該方法は、該メソテリン発現癌細胞集団と、該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリンCAR発現細胞を接触させることを含む。ある態様において、本発明のメソテリンCAR発現細胞は、細胞および／または癌細胞の数量、数、量またはパーセンテージを、中皮腫またはメソテリン発現細胞と関係する他の癌を有する対象またはその動物モデルにおいて、陰性対照と比較して少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%減少させる。ある面において、対象はヒトである。

10

【0788】

本発明はまたメソテリン発現細胞と関係する障害(例えば、中皮腫)を予防、処置および／または管理する方法を提供し、該方法は、それを必要とする対象に該メソテリン発現細胞と結合する本発明の中皮腫CAR発現細胞を投与することを含む。一つの面において、対象はヒトである。

【0789】

本発明は、メソテリン発現細胞と関係する癌の再発を予防する方法を提供し、該方法は、それを必要とする対象に該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリンCAR発現細胞を投与することを含む。他の態様において、該方法は、それを必要とする対象に、有効量の該メソテリン発現細胞と結合する本発明のメソテリンCAR発現細胞を有効量の他の治療剤と組み合わせて投与することを含む。

20

【0790】

組み合わせ治療

ここに記載するCAR発現細胞を、他の既知薬剤および治療と組み合わせて使用し得る。ここで使用する“組み合わせて”投与するは2(またはそれ以上)の異なる処置を、対象が障害に苦しんでいる過程の間に対象に送達することを意味し、例えば、2以上の処置を、対象が障害と診断された後にかつ障害が治癒または撲滅される前にまたは処置が他の理由で中止される前に送達される。ある態様において、投与期間の重複があるように、一方の処置の送達は、第二の処置の送達開始時にまだ行われている。これは、ここでは“同時の”または“一緒にの送達”ということがある。他の態様において、他の態様において、一方の処置の送達は、他の処置の送達が始まる前に終わる。いずれかの場合のある態様において、処置は、組み合わせ投与のためにより有効である。例えば、第二処置剤はより有効である、例えば、等しい効果が少ない第二処置剤で見られるまたは第二処置剤が、第二処置剤を第一処置剤非存在下で投与したときに見られるよりも大きな程度で症状を軽減するまたは第一処置剤で同様な状況が見られる。ある態様において、送達、障害と関係する症状または他のパラメータの減少が、他方の処置剤の非存在下で一方の処置剤の送達で観察されるより大きい。2処置の効果は一部相加的、完全相加的または相加的より大きいものであり得る。送達は、送達した第一処置の効果が、第二剤の送達時になお検出可能であるようなものであり得る。

30

40

【0791】

ここに記載するCAR発現細胞および少なくとも一つのさらなる治療剤を同時に、同じまたは別の組成物でまたは逐次的に投与できる。逐次投与について、ここに記載するCAR発現細胞をまず投与してよく、さらなる薬剤を次に投与してよくまたは投与の順序は逆でよい。

【0792】

CAR治療および／または他の治療剤、方法またはモダリティを、活動性障害の期間または寛解または低活動性疾患の期間に投与できる。CAR治療を、他の処置の処置前、

50

処置と同時、処置後または障害の寛解中に投与できる。

【0793】

組み合わせて投与するとき、CAR治療およびさらなる薬剤(例えば、第二または第三の薬剤)または全てを、個々に、例えば、単剤療法として使用する各薬剤の量または投与より高い、低いまたは同じ量または用量で投与できる。ある態様において、CAR治療、さらなる薬剤(例えば、第二または第三薬剤)または全ての投与される量または用量は、個々に、例えば、単剤療法として使用する各薬剤の量または用量より低い(例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%)。他の態様において、所望の効果(例えば、癌の処置)を生じるCAR治療、さらなる薬剤(例えば、第二または第三薬剤)または全ての投与される量または用量は、同じ治療効果を達成するのに必要な、個々に、例えば、単剤療法として使用する各薬剤の量または用量より低い(例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%低い)。

10

【0794】

さらなる面において、ここに記載するCAR発現細胞を、手術、サイトカイン、放射線またはシトキサン、フルダラビン、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、脱メチル化剤または Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971に記載のようなペプチドワクチンのような化学療法と組み合わせた処置レジメンで使用し得る。

【0795】

ある例において、本発明の化合物を、他の抗癌剤、抗アレルギー剤、制吐剤(または鎮吐剤)、鎮痛剤、細胞保護剤およびこれらの組み合わせのような他の治療剤と組み合わせる。

20

【0796】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、化学療法剤と組み合わせ使用できる。化学療法剤の例は、アントラサイクリン(例えば、ドキソルビシン(例えば、リポソームドキソルビシン))、ビンカアルカロイド(例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン)、アルキル化剤(例えば、シクロホスファミド、ダカルバジン、メルファラン、イホスファミド、テモゾロミド)、免疫細胞抗体(例えば、アレムツズマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブ、トシツモマブ、ブレンツキシマブ)、代謝拮抗剤(例えば、葉酸アンタゴニスト、ピリミジンアナログ、プリンアナログおよびアデノシンデアミナーゼ阻害剤(例えば、フルダラビン))、mTOR阻害剤、TNFRグルココルチコイド誘発TNFR関連タンパク質(GITR)アゴニスト、プロテアソーム阻害剤(例えば、アクラシノマイシンA、グリオトキシシンまたはボルテゾミブ)、サリドマイドまたはサリドマイド誘導体(例えば、レナリドマイド)のような免疫調節剤を含む。

30

【0797】

組み合わせ治療における使用が企図される一般的化学療法剤は、アナストロゾール(アリミデックス(登録商標))、ビカルタミド(カソデックス(登録商標))、硫酸ブレオマイシン(Blenoxane(登録商標))、ブスルファン(マイレラン(登録商標))、ブスルファン注(ブスルフェクス(登録商標))、カペシタビン(ゼローダ(登録商標))、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシー-5-フルオロシチジン、カルボプラチン(パラプラチン(登録商標))、カルムスチン(BiCNU(登録商標))、クロラムブシル(リューケラン(登録商標))、シスプラチン(Platinol(登録商標))、クラドリビン(ロイスタチン(登録商標))、シクロホスファミド(シトキサン(登録商標)またはNeosar(登録商標))、シタラビン、シトシンアラビノシド(Cytosar-U(登録商標))、シタラビンリポソーム注射(DepoCyt(登録商標))、ダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))、ダクチノマイシン(アクチノマイシンD、Cosmegen)、塩酸ダウノルビシン(Cerubidine(登録商標))、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射(DaunoXome(登録商標))、デキサメサゾン、ドセタキセル(タキソテール(登録商標))、塩酸ドキソルビシン(アドリアマイシン(登録商標))、RubeX(登録商標))、エトポシド(ペプシド(登録商標))、リン酸フルダラビン(フルダラ(登録商標))、5-フルオロウラシル(アドルシル(登録

40

50

商標)、エフデックス(登録商標)、フルタミド(E u l e x i n(登録商標)、テザシチビン、ゲムシタビン(ジフルオロデオキシシチジン)、ヒドロキシ尿素(ハイドレア(登録商標))、イダルビシン(イダマイシン(登録商標))、イホスファミド(I F E X(登録商標))、イリノテカン(C a m p t o s a r(登録商標))、L-アスパラギナーゼ(E L S P A R(登録商標))、ロイコボリンカルシウム、メルファラン(アルケラン(登録商標))、6-メルカプトプリン(ピュリネソール(登録商標))、メトトレキサート(F o l e x(登録商標))、ミトキサントロン(ノバントロン(登録商標))、マイロタグ、パクリタキセル(タキソール(登録商標))、p h o e n i x(イットリウム90/MX-D T P A)、ペントスタチン、ポリフェプロザン20とカルムスチンインプラント(グリアデル(登録商標))、クエン酸タモキシフェン(ノルバデックス(登録商標))、テニポシド(V u m o n(登録商標))、6-チオグアニン、チオテパ、チラパザミン(T i r a z o n e(登録商標))、注射用塩酸トポテカン(ハイカムチン(登録商標))、ビンブラスチン(V e l b a n(登録商標))、ビンクリスチン(オンコビン(登録商標))およびビノレルビン(ナベルビン(登録商標))を含む。

10

【0798】

本発明の化合物と組み合わせるための特に興味深い抗癌剤は、アントラサイクリン；アルキル化剤；代謝拮抗剤；カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンまたはp70S6キナーゼF K 5 0 6)を阻害するまたはp70S6キナーゼを阻害する薬剤；mT O R阻害剤；免疫調節剤；アントラサイクリン；ビンカアルカロイド；プロテオソーム阻害剤；G I T Rアゴニストタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；C D K 4キナーゼ阻害剤；B T K阻害剤；M K Nキナーゼ阻害剤；D G Kキナーゼ阻害剤；または腫瘍溶解性ウイルスを含む。

20

【0799】

代謝拮抗剤の例は、ピリミジンアナログ、プリンアナログおよびアデノシンデアミナーゼ阻害剤)：メトトレキサート(リウマトレックス(登録商標)、T r e x a l l(登録商標))、5-フルオロウラシル(A d r u c i l(登録商標)、エフデックス(登録商標)、フルオロプレクス(登録商標))、フロクスウリジン(F U D F(登録商標))、シタラビン(C y t o s a r - U(登録商標)、T a r a b i n e P F S)、6-メルカプトプリン(プリントール(登録商標))、6-チオグアニン(チオグアニンT a b l o i d(登録商標))、リン酸フルダラビン(フルダラ(登録商標))、ペントスタチン(N i p e n t(登録商標))、ペメトレキセド(アリムタ(登録商標))、ラルチトレキセド(トムデックス(登録商標))、クラドリビン(ロイスタチン(登録商標))、クロファラビン(C l o f a r e x(登録商標)、クロラール(登録商標))、アザシチジン(ビダーザ(登録商標))、デシタビンおよびゲムシタビン(ジェムザール(登録商標))を含むが、これらに限定されない。好ましい代謝拮抗剤は、シタラビン、クロファラビンおよびフルダラビンを含む。

30

【0800】

アルキル化剤の例は、窒素マスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネート、ニトロソウレア類およびトリアゼン)：ウラシルマスタード(アミノウラシルマスタード(登録商標)、C h l o r e t h a m i n a c i l(登録商標)、D e m e t h y l d o p a n(登録商標)、D e s m e t h y l d o p a n(登録商標)、H a e m a n t h a m i n e(登録商標)、N o r d o p a n(登録商標)、U r a c i l n i t r o g e n m u s t a r d(登録商標)、U r a c i l l o s t(登録商標)、U r a c i l m o s t a z a(登録商標)、ウラムスチン(登録商標)、ウラムスチン(登録商標))、クロルメチン(M u s t a r g e n(登録商標))、シクロホスファミド(シトキサン(登録商標)、N e o s a r(登録商標)、C l a f e n(登録商標)、エンドキサン(登録商標)、P r o c y t o x(登録商標)、R e v i m m u n e ^{T M})、イホスファミド(M i t o x a n a(登録商標))、メルファラン(アルケラン(登録商標))、クロラムブシル(リュウケラン(登録商標))、ピポブロマン(A m e d e l(登録商標)、V e r c y t e(登録商標))、トリエチレンメラミン(ヘメル(登録商標)、H e x a l e n(登録商標)、H e x a s t a t(登録商標))、トリエチレンチオホスホロアミン、テモゾロミド(テモダール(登録商標))、チオテパ(T h i o p l e x(登録商標))、ブスルファン(B u s i l v e x(登録商標)、マイレラン(登録商標))

40

50

、カルムスチン(B i C N U (登録商標))、ロムスチン(C e e N U (登録商標))、ストレプト
トゾシン(Z a n o s a r (登録商標))およびダカルバジン(D T I C - D o m e (登録商標
)を含むが、これらに限定されないロムスチン(C e e N U (登録商標))、ストレプトトゾシ
ン(Z a n o s a r (登録商標))およびダカルバジン(D T I C - D o m e (登録商標))。アル
キル化剤のさらなる例は、オキサリプラチン(エロキサチン(登録商標))；テモゾロミド
(テモダール(登録商標)およびテモダール(登録商標))；ダクチノマイシン(別名アクチノ
マイシン-D、C o s m e g e n (登録商標))；メルファラン(別名L - P A M、L - サル
コリシンおよびフェニルアラニンマスタード、アルケラン(登録商標))；アルトレタミン(
別名ヘキサメチルメラミン(HMM)、H e x a l e n (登録商標))；カルムスチン(B i C
N U (登録商標))；ベンダムスチン(T r e a n d a (登録商標))；ブスルファン(ブスルフ
ェクス(登録商標)およびマイレラン(登録商標))；カルボプラチン(パラプラチン(登録商
標))；ロムスチン(別名C C N U、C e e N U (登録商標))；シスプラチン(別名C D D P
、P l a t i n o l (登録商標)およびP l a t i n o l (登録商標)-A Q)；クロラムブ
シル(リューケラン(登録商標))；シクロホスファミド(シトキサン(登録商標)およびN e
o s a r (登録商標))；ダカルバジン(別名D T I C、D I C およびイミダゾールカルボキ
サミド、D T I C - D o m e (登録商標))；アルトレタミン(別名ヘキサメチルメラミン(
HMM)、H e x a l e n (登録商標))；イホスファミド(I f e x (登録商標))；P r e d
n u m u s t i n e；プロカルバジン(M a t u l a n e (登録商標))；メクロレタミン(
別名窒素マスタード、ムスチンおよび塩酸メクロロエタミン、M u s t a r g e n (登録
商標))；ストレプトトゾシン(Z a n o s a r (登録商標))；チオテパ(別名チオホスホアミ
ド、T E S P A および T S P A、T h i o p l e x (登録商標))；シクロホスファミド(エ
ンドキサン(登録商標)、シトキサン(登録商標)、N e o s a r (登録商標)、P r o c y t
o x (登録商標)、R e v i m m u n e (登録商標))；およびベンダムスチンH C l (T r e
a n d a (登録商標))を含むが、これらに限定されない。

【0801】

ある態様において、ここに記載するC A R 発現細胞を、フルダラビン、シクロホスファ
ミドおよび／またはリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、こ
こに記載するC A R 発現細胞を、フルダラビン、シクロホスファミドおよびリツキシマブ
(F C R)と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、対象はC L L を有する。例
えば、対象は、染色体17の短腕に欠失を有する(例えば、白血病性細胞におけるd e l (1
7 p))。他の例において、対象は、d e l (1 7 p) を有しない。ある態様において、対
象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(I g V_H)遺伝子に変異を含む白血病性細胞を含む。
他の態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(I g V_H)に変異を含む白血病
性細胞を含まない。ある態様において、フルダラビンを、約10～50mg/m²(例えば
、約10～15mg/m²、15～20mg/m²、20～25mg/m²、25～30mg/m²
、30～35mg/m²、35～40mg/m²、40～45mg/m²または45～50mg
/m²)の用量で、例えば、静脈内に投与する。ある態様において、シクロホスファミド
を、約200～300mg/m²(例えば、約200～225mg/m²、225～250mg
/m²、250～275mg/m²または275～300mg/m²)の用量で、例えば、静
脈内に投与する。ある態様において、リツキシマブを、約400～600mg/m²(例え
ば、400～450mg/m²、450～500mg/m²、500～550mg/m²または
550～600mg/m²)の用量で、例えば、静脈内に投与する。

【0802】

ある態様において、ここに記載するC A R 発現細胞を、ベンダムスチンおよびリツキシ
マブと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、対象はC L L を有する。例えば
、対象は、染色体17の短腕に欠失を有する(例えば、白血病性細胞におけるd e l (1
7 p))。他の例において、対象は、d e l (1 7 p) を有しない。ある態様において、対象は
、免疫グロブリン重鎖可変領域(I g V_H)遺伝子に変異を含む白血病性細胞を含む。他の
態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(I g V_H)に変異を含む白血病性細
胞を含まない。ある態様において、ベンダムスチンを、約70～110mg/m²(例えば

10

20

30

40

50

、70～80mg/m²、80～90mg/m²、90～100mg/m²または100～110mg/m²の用量で、例えば、静脈内に投与する。ある態様において、リツキシマブを、約400～600mg/m²(例えば、400～450mg/m²、450～500mg/m²、500～550mg/m²または550～600mg/m²)の用量で、例えば、静脈内に投与する。

【0803】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよび／またはコルチコステロイド(例えば、プレドニゾン)と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン(R-CHOP)と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、対象は、びまん性大B細胞リンパ腫(DLBCL)を有する。ある態様において、対象は、巨大腫瘍がない限局したステージのDLBCL(例えば、7cm未満のサイズ／直径の腫瘍を含む)を有する。ある態様において、対象は、R-CHOPと組み合わせて放射線で処置される。例えば、対象に、R-CHOP(例えば、1～6サイクル、例えば、1、2、3、4、5または6サイクルのR-CHOP)、続いて放射線を投与する。ある場合、対象に、放射線後R-CHOP(例えば、1～6サイクル、例えば、1、2、3、4、5または6サイクルのR-CHOP)を投与する。

【0804】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、エトポシド、プレドニゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、ドキソルビシンおよび／またはリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、エトポシド、プレドニゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、ドキソルビシンおよびリツキシマブ(EPOCH-R)と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、用量調節EPOCH-R(DA-EPOCH-R)と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、対象は、B細胞リンパ腫、例えば、Myc再配列侵襲性B細胞リンパ腫を有する。

【0805】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、リツキシマブおよび／またはレナリドマイドと組み合わせて対象に投与する。レナリドマイド((RS)-3-(4-アミノ-1-オキソ-1,3-ジヒドロ-2H-イソインドール-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオン)は、免疫調節剤である。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、リツキシマブおよびレナリドマイドと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、対象は濾胞性リンパ腫(FL)またはマントル細胞リンパ腫(MCL)を有する。ある態様において、対象はFLを有し、癌治療剤で先に処置されていない。ある態様において、レナリドマイドを、約10～20mg(例えば、10～15mgまたは15～20mg)、例えば、連日投与する。ある態様において、リツキシマブを、約350～550mg/m²(例えば、350～375、375～400、400～425、425～450、450～475または475～500mg/m²)の用量で、例えば、静脈内に投与する。

【0806】

mTOR阻害剤の例は、例えば、テムシロリムス；リダフォロリムス(以前はデフェロリムスとして既知、(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンター-16,24,26,28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネート、AP23573およびMK8669としても知られ、PCT公開WO03/064383に記載)；エベロリムス(アフィニトール(登録商標)またはRAD001)；ラパマイシン(AY22989、シロリムス(登録商標))；セマピモド(CAS 164301-51-3)；エ

10

20

30

40

50

ムシロリムス、(5-{2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル)メタノール(AZD8055); 2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF04691502、CAS 1013101-36-4); および N^2 -[1,4-ジオキソ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル]-L-アルギニルグリシル-L- α -アスパルチル-L-セリン-(配列番号64)、分子内塩(SF1126、CAS 936487-67-1)およびXL765を含む。

【0807】

免疫調節剤の例は、例えば、アフツズマブ(Roche(登録商標)から入手可能); ペグフィルグラスチム(Neulasta(登録商標)); レナリドマイド(CC-5013、レブリミド(登録商標)); サリドマイド(サロミド(登録商標))、actimid(CC4047); およびIRX-2(インターロイキン1、インターロイキン2およびインターフェロ γ を含むヒトサイトカイン混合物、CAS 951209-71-5、IRX Therapeuticsから入手可能)を含む。

【0808】

アントラサイクリンの例は、例えば、ドキシソルビシン(アドリアマイシン(登録商標)およびRubeX(登録商標)); プレオマイシン(lenoxane(登録商標)); ダウノルビシン(塩酸ダウノルビシン、ダウノマイシンおよび塩酸ルビドマイシン、Cerubidine(登録商標)); ダウノルビシンリポソーム(クエン酸ダウノルビシンリポソーム、DaunoXome(登録商標)); ミトキサントロン(DHAD、ノバントロン(登録商標)); エピルビシン(EllenceTM); イダルビシン(イダマイシン(登録商標)、イダマイシンPFS(登録商標)); マイトマイシンC(ムタマイシン(登録商標)); ゲルダナマイシン; ハービマイシン; ラビドマイシン; およびデスアセチルラビドマイシンを含む。

【0809】

ビンカアルカロイドの例は、例えば、酒石酸ビンORELビン(ナベルビン(登録商標))、ビンクリスチン(オンコビン(登録商標))およびビンデシン(Eldisine(登録商標)); ; ビンブラスチン(別名硫酸ビンブラスチン、ビンカロイコブラスチンおよびVLB、Alkaban-AQ(登録商標)およびVelban(登録商標)); およびビンORELビン(ナベルビン(登録商標))を含む。

【0810】

プロテオソーム阻害剤の例は、ボルテゾミブ(ベルケイド(登録商標)); カーフィルゾミブ(PX-171-007、(S)-4-メチル-N-(((S)-1-(((S)-4-メチル-1-((R)-2-メチルオキシラン-2-イル)-1-オキソペンタン-2-イル)アミノ)-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル)-2-((S)-2-(2-モルホリノアセトアミド)-4-フェニルブタンアミド)-ペンタンアミド); マリゾミブ(NPI-0052); イキサゾミブクエン酸エステル(MLN-9708); デランゾミブ(CEP-18770); およびO-メチル-N-[(2-メチル-5-チアゾリル)カルボニル]-L-セリル-O-メチル-N-[(1S)-2-[(2R)-2-メチル-2-オキシラニル]-2-オキソ-1-(フェニルメチル)エチル]-L-セリンアミド(ONX-0912)を含む。

【0811】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、ブレンツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ブレンツキシマブは、抗CD30抗体およびモノメチルオーリスタチンEの抗体-薬物コンジュゲートである。ある態様において、対象は、ホジキンリンパ腫(HL)、例えば、再発性または難治性HLを有する。ある態様において、対象はCD30⁺HLを含む。ある態様において、対象は、自己幹細胞移植(ASCT)を受けている。ある態様において、対象は、ASCTを受けていない。ある態様において、ブレンツキシマブを、約1~3mg/kg(例えば、約1~1.5mg/kg、1.5~2mg/kg、2~2.5mg/kgまたは2.5~3mg/kg)を、例えば、静脈内に、例えば、3週間毎に投与する。

10

20

30

40

50

【0812】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、ブレンツキシマブおよびダカルバジンまたはブレンツキシマブとベンダムスチンの組合せと組み合わせて対象に投与する。ダカルバジンは、化学名を5-(3,3-ジメチル-1-トリアゼニル)イミダゾール-4-カルボキサミド有するアルキル化剤である。ベンダムスチンは、化学名4-[5-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]-1-メチルベンズイミダゾール-2-イル]ブタン酸を有するアルキル化剤である。ある態様において、対象はホジキンリンパ腫(HL)を有する。ある態様において、対象は、癌治療剤で先に処置されていない。ある態様において、対象は少なくとも60歳、例えば、60歳、65歳、70歳、75歳、80歳、85歳またはそれ以上である。ある態様において、ダカルバジンを、約300~450mg/m²(例えば、約300~325mg/m²、325~350mg/m²、350~375mg/m²、375~400mg/m²、400~425mg/m²または425~450mg/m²)の用量で、例えば、静脈内に投与する。ある態様において、ベンダムスチンを、約75~125mg/m²(例えば、75~100mg/m²または100~125mg/m²、例えば、約90mg/m²)の用量で、例えば、静脈内に投与する。ある態様において、ブレンツキシマブを、約1~3mg/kg(例えば、約1~1.5mg/kg、1.5~2mg/kg、2~2.5mg/kgまたは2.5~3mg/kg)を、例えば、静脈内に、例えば、3週間毎に投与する。

10

【0813】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、対象にCD20阻害剤、例えば、抗CD20抗体(例えば、抗CD20単一または二重特異的抗体)またはそのフラグメントと組み合わせて投与する。抗CD20抗体の例は、リツキシマブ、オフアツマブ、オクレリズマブ、ベルツズマブ、オビヌツズマブ、TRU-015(Trubion Pharmaceuticals)、オカラツズマブおよびPro131921(Genentech)を含むが、これらに限定されない。例えば、Lim et al. Haematologica. 95.1(2010):135-43参照。

20

【0814】

ある態様において、抗CD20抗体は、リツキシマブを含む。リツキシマブは、例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s53111bl.pdfに記載のように、CD20に結合し、CD20発現細胞の細胞溶解を起こすキメラマウス/ヒトモノクローナル抗体IgG1カッパである。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、リツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、対象はCLLまたはSLLを有する。

30

【0815】

ある態様において、リツキシマブを、静脈内に、例えば、静脈内点滴として投与する。例えば、各点滴は、約500~2000mg(例えば、約500~550mg、550~600mg、600~650mg、650~700mg、700~750mg、750~800mg、800~850mg、850~900mg、900~950mg、950~1000mg、1000~1100mg、1100~1200mg、1200~1300mg、1300~1400mg、1400~1500mg、1500~1600mg、1600~1700mg、1700~1800mg、1800~1900mgまたは1900~2000mg)のリツキシマブを提供する。ある態様において、リツキシマブを、150mg/m²~750mg/m²、例えば、約150~175mg/m²、175~200mg/m²、200~225mg/m²、225~250mg/m²、250~300mg/m²、300~325mg/m²、325~350mg/m²、350~375mg/m²、375~400mg/m²、400~425mg/m²、425~450mg/m²、450~475mg/m²、475~500mg/m²、500~525mg/m²、525~550mg/m²、550~575mg/m²、575~600mg/m²、600~625mg/m²、625~650mg/m²、650~675mg/m²または675~700mg/m²の用量で投与し、ここで、m²は対象の体表面積を示す。ある態様において、リツキシマブを、少なくとも4日、例えば、4日、7日、14日、21日、28日、35日またはそれ以上の投薬間隔で投与する。例えば、リツキシマブを、少なくとも0.5週間、例えば、0.5週間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週

40

50

間、7週間、8週間またはそれ以上の投薬間隔で投与する。ある態様において、リツキシマブを、一定期間、例えば、少なくとも2週間、例えば、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間またはそれより長く、ここに記載する用量および投薬間隔で投与する。例えば、リツキシマブを、ここに記載する用量および投薬間隔で、処置サイクルあたり計少なくとも4投与で投与する(例えば、処置サイクルあたり少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16またはそれ以上の投与)。

【0816】

ある態様において、抗CD20抗体はオフアツムマブを含む。オフアツムマブは、分子量約149kDaを有する抗CD20 IgG1κヒトモノクローナル抗体である。例えば、オフアツムマブはトランスジェニックマウスおよびハイブリドーマテクノロジーを使用して産生し、組み換えマウス細胞株(NS0)から発現および精製する。例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/1253261bl.pdf; およびClinical Trial Identifier number NCT01363128、NCT01515176、NCT01626352およびNCT01397591参照。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、オフアツムマブと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、対象はCLLまたはSLLを有する。

【0817】

ある態様において、オフアツムマブを、静脈内点滴として投与する。例えば、各点滴は、約150～3000mg(例えば、約150～200mg、200～250mg、250～300mg、300～350mg、350～400mg、400～450mg、450～500mg、500～550mg、550～600mg、600～650mg、650～700mg、700～750mg、750～800mg、800～850mg、850～900mg、900～950mg、950～1000mg、1000～1200mg、1200～1400mg、1400～1600mg、1600～1800mg、1800～2000mg、2000～2200mg、2200～2400mg、2400～2600mg、2600～2800mgまたは2800～3000mg)のオフアツムマブを投与する。ある態様において、オフアツムマブを約300mgの出発用量、続いて2000mg、例えば、約11用量、例えば、24週間投与する。ある態様において、オフアツムマブを、少なくとも4日、例えば、4日、7日、14日、21日、28日、35日またはそれ以上の投薬間隔で投与する。例えば、オフアツムマブを、少なくとも1週間、例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、24週間、26週間、28週間、20週間、22週間、24週間、26週間、28週間、30週間またはそれ以上の投薬間隔で投与する。ある態様において、オフアツムマブを、一定期間、例えば、少なくとも1週間、例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間、22週間、24週間、26週間、28週間、30週間、40週間、50週間、60週間またはそれ以上または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月またはそれ以上または1年、2年、3年、4年、5年またはそれ以上、ここに記載する用量および投薬間隔で投与する。例えば、オフアツムマブを、処置サイクルあたり計少なくとも2用量で、ここに記載する用量および投薬間隔で投与する(例えば、処置サイクルあたり少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20またはそれ以上の用量)。

【0818】

ある場合、抗CD20抗体は、オクレリズマブを含む。オクレリズマブは、例えば、Clinical Trials Identifier Nos. NCT00077870、NCT01412333、NCT00779220、NCT00673920、NCT01194570およびKappos et al. Lancet. 19.378(2011):1779-87に記載のような、ヒト化抗CD20モノクローナル抗体である。

【0819】

10

20

30

40

50

ある場合、抗CD20抗体は、ベルツズマブを含む。ベルツズマブは、CD20に対するヒト化モノクローナル抗体である。例えば、Clinical Trial Identifier No. NCT00547066、NCT00546793、NCT01101581およびGoldenberg et al. Leuk Lymphoma. 51(5)(2010): 747-55参照。

【0820】

ある場合、抗CD20抗体は、GA101を含む。GA101(オビヌツズマブまたはRO5072759とも称する)は、ヒト化および糖鎖改変抗CD20モノクローナル抗体である。例えば、Robak. Curr. Opin. Investig. Drugs. 10.6(2009):588-96; Clinical Trial Identifier Numbers: NCT01995669、NCT01889797、NCT02229422およびNCT01414205; and www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s0001b1.pdf参照。

10

【0821】

ある場合、抗CD20抗体は、AME-133vを含む。AME-133v(LY2469298またはオカラツズマブとも称する)は、リツキシマブと比較してFcγRIIIa受容体に対する親和性が増加し、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性が増強された、CD20に対するヒト化IgG1モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25; and Forero-Torres et al. Clin Cancer Res. 18.5(2012):1395-403参照。

【0822】

ある場合、抗CD20抗体は、PRO131921を含む。PRO131921は、リツキシマブと比較してFcγRIIIaへの結合が良好であり、ADCCが増強されるように操作された、ヒト化抗CD20モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25; およびCasulo et al. Clin Immunol. 154.1(2014):37-46; およびClinical Trial Identifier No. NCT00452127参照。

20

【0823】

ある場合、抗CD20抗体は、TRU-015を含む。TRU-015は、CD20に対する抗体のドメイン由来の抗CD20融合タンパク質である。TRU-015はモノクローナル抗体より小さいが、Fc介在エフェクター機能を保持する。例えば、Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25参照。TRU-015は、ヒトIgG1ヒンジ、CH₂およびCH3ドメインに連結した抗CD20一本鎖可変フラグメント(scFv)を含むが、CH1およびCLドメインを欠く。

30

【0824】

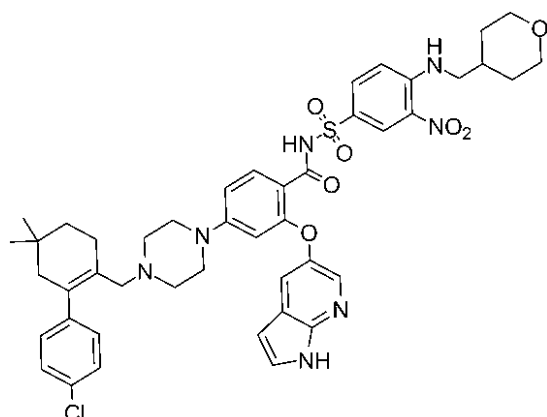
ある態様において、ここに記載する抗CD20抗体を、治療剤、例えば、ここに記載する化学療法剤(例えば、シトキサン、フルダラビン、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、デメチル化剤、ペプチドワクチン、抗腫瘍抗生物質、チロシンキナーゼ阻害剤、アルキル化剤、抗微小管または有糸分裂阻害剤)、抗アレルギー剤、制吐剤(または鎮吐剤)、鎮痛剤または細胞保護的薬剤にコンジュゲートまたは他の方法で結合する。

【0825】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、B細胞リンパ腫2(BCL-2)阻害剤(例えば、ABT-199またはGDC-0199とも称されるベネトクラクス)および/またはリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、ベネトクラクスおよびリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ベネトクラクスは、抗アポトーシスタンパク質、BCL-2を阻害する小分子である。ベネトクラクス(4-(4-{[2-(4-クロロフェニル)-4,4-ジメチルシクロhex-1-エン-1-イル]メチル}ピペラジン-1-イル)-N-({3-ニトロ-4-[(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルメチル)アミノ]フェニル}スルホニル)-2-(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-5-イルオキシ)ベンズアミド)の構造を下に示す。

40

【化 3】



10

【 0 8 2 6 】

ある態様において、対象はC L Lを有する。ある態様において、対象は再発したC L Lを有し、例えば、対象は、先に癌治療を投与されている。ある態様において、ペネトクラクスを、約15～600mg(例えば、15～20mg、20～50mg、50～75mg、75～100mg、100～200mg、200～300mg、300～400mg、400～500mgまたは500～600mg)、例えば、連日投与する。ある態様において、リツキシマブを、約350～550mg/m²(例えば、350～375mg/m²、375～400mg/m²、400～425mg/m²、425～450mg/m²、450～475mg/m²または475～500mg/m²)を、例えば、静脈内で、例えば、毎月投与する。

20

【 0 8 2 7 】

ある態様において、ここに記載するC A R発現細胞を、腫瘍溶解性ウイルスと組み合わせ、
 せて投与する。ある態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞内で選択的に複製し、
 その死を誘発するかまたは増殖を遅延することができる。ある場合、腫瘍溶解性ウイルス
 は、非癌細胞に効果を有しないか効果が最小である。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍溶解性
 アデノウイルス、腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス、腫瘍溶解性レトロウイルス、腫瘍溶
 解性パルボウイルス、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、腫瘍溶解性シンドビスウイルス、
 腫瘍溶解性インフルエンザウイルスまたは腫瘍溶解性RNAウイルス(例えば、腫瘍溶解
 性レオウイルス、腫瘍溶解性ニューカッスル病ウイルス(N D V)、腫瘍溶解性麻疹ウイル
 スまたは腫瘍溶解性水疱性口内炎ウイルス(V S V))を含むが、これらに限定されない。

30

【 0 8 2 8 】

ある態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、その全体を引用により本明細書に包含させるUS2010/0178684A1号に記載のウイルス、例えば、組み換え腫瘍溶解性ウイルスである。ある態様において、組み換え腫瘍溶解性ウイルスは、例えば、その全体を引用により本明細書に包含させるUS2010/0178684A1号に記載のような、免疫または炎症性応答の阻害剤をコードする核酸配列(例えば、異種核酸配列)を含む。ある態様において、組み換え腫瘍溶解性ウイルス、例えば、腫瘍溶解性NDVは、アポトーシス促進性タンパク質(例えば、アポプチン)、サイトカイン(例えば、GM-CSF、インターフェロン-ガンマ、インターロイキン-2(IL-2)、腫瘍壊死因子-アルファ)、免疫グロブリン(例えば、ED-Bフィブロネクチンに対する抗体)、腫瘍関連抗原、二特異性アダプタータンパク質(例えば、NDV HNタンパク質およびCD3またはCD28のようなT細胞共刺激性受容体に対する二特異性抗体または抗体フラグメント；またはヒトIL-2およびNDV HNタンパク質に対する一本鎖抗体の融合タンパク質)を含む。例えば、引用によりその全体を本明細書に包含させるZamarin et al. Future Microbiol. 7.3(2012):347-67参照。ある態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、各々引用によりその全体を本明細書に包含させるUS8591881B2号、US2012/0122185A1号またはUS2014/0271677A1号に記載のキメラ腫瘍溶解性NDVである。

40

【 0 8 2 9 】

50

ある態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、排他的に癌細胞において複製するよう設計された、条件的複製アデノウイルス(CRAV)である。例えば、Alemany et al. Nature Biotechnol. 18(2000):723-27参照。ある態様において、腫瘍溶解性アデノウイルスは、その全体を引用により本明細書に包含させるAlemany et al.の725頁の表1に記載のものを含む。

【0830】

腫瘍溶解性ウイルスの例は、次のものを含むが、これらに限定されない。

B群腫瘍溶解性アデノウイルス(ColoAd1)(PsiOxus Therapeutics Ltd.)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT02053220参照)；

顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むアデノウイルスであるONCOS-102(以前はCGTG-102と呼ばれた)(Oncos Therapeutics)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01598129参照)；

ヒトPH20ヒアルロニダーゼをコードする遺伝的に修飾された腫瘍溶解性ヒトアデノウイルスであるVCN-01(VCN Biosciences, S.L.)(例えば、Clinical Trial Identifiers: NCT02045602およびNCT02045589参照)；

網膜芽細胞腫/E2F経路の脱制御を伴い癌細胞で選択的に複製するように修飾されている野生型ヒトアデノウイルス血清型5(Had5)由来のウイルスである条件的複製アデノウイルスICOVIR-5(Institut Catala d'Oncologia)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01864759参照)；

ICOVIR5、腫瘍溶解性アデノウイルスで感染させた骨髄由来自己間葉性幹細胞(MSC)を含むCelyvir(Hospital Infantil Universitario Nino Jesus, Madrid, Spain/Ramon Alemany)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01844661参照)；

ヒトE2F-1プロモーターが必須E1aウイルス遺伝子の発現を駆動し、それによりRb経路欠損腫瘍細胞ウイルス複製および細胞毒性を制限する、条件複製腫瘍溶解性血清型5アデノウイルス(Ad5)であるCG0070胞に対する(Cold Genesys, Inc.)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT02143804参照)；または

路網膜芽細胞腫(Rb)経路欠損細胞で選択的に複製し、ある種のRGD結合インテグリンをより効率的に発現する細胞に感染するように操作されているアデノウイルスであるDNX-2401(以前の名前デルター24-RGD)(Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNAtrix, Inc.)(例えば、Clinical Trial Identifier: NCT01956734参照)。

【0831】

ある態様において、ここに記載する腫瘍溶解性ウイルスを、注射、例えば、皮下、動脈内、静脈内、筋肉内、髄腔内または腹腔内注射により投与する。ある態様において、ここに記載する腫瘍溶解性ウイルスを、腫瘍内、経皮、経粘膜、経口、鼻腔内または肺投与により投与する。

【0832】

ある態様において、ここに記載するCARを発現する細胞を、T_{reg}細胞集団を減少させる分子と組み合わせて対象に投与する。T_{reg}細胞数を減らす(例えば、枯渇させる)方法は当分野で知られ、例えば、CD25枯渇、シクロホスファミド投与、GITR機能修飾を含む。理論に縛られることを望まないが、アフェレーシス前またはここに記載するCAR発現細胞投与前に対象におけるT_{reg}細胞数を減らすことは、腫瘍微小環境における望まない免疫細胞(例えば、T_{reg})の数を減らし、対象の再発のリスクを減らすと考えられる。

【0833】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、対象に、制御性T細胞(T_{reg})を枯渇させるGITRアゴニストおよび／またはGITR抗体のようなGITRを標的とするおよび／またはGITR機能を調節する分子と組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載するCARを発現する細胞を、対象にシクロホスファミドと組み合わせて投与する。ある態様において、GITR結合分子および／またはGITR機能を調

節する分子(例えば、G I T Rアゴニストおよび／またはT_re_g 枯渴G I T R抗体)を、C A R発現細胞の前に投与する。例えば、ある態様において、G I T Rアゴニストを、細胞のアフェレーシス前に投与できる。ある態様において、シクロホスファミドを、対象にC A R発現細胞の投与(例えば、注入または再注入)前または細胞のアフェレーシス前に投与する。ある態様において、シクロホスファミドおよび抗G I T R抗体を、対象にC A R発現細胞の投与(例えば、注入または再注入)前または細胞のアフェレーシス前に投与する。ある態様において、対象は癌(例えば、固形癌またはA L LまたはC L Lのような血液癌)を有する。ある態様において、対象はC L Lを有する。ある態様において、対象はA L Lを有する。ある態様において、対象は固形癌、例えば、ここに記載する固形癌を有する。G I T Rアゴニストの例は、例えば、米国特許6,111,090号、欧州特許090505B1号、米国特許8,586,023号、P C T公開WO2010/003118号および2011/090754号に記載のG I T R融合タンパク質または、例えば、米国特許7,025,962号、欧州特許1947183B1号、米国特許7,812,135号、米国特許8,388,967号、米国特許8,591,886号、欧州特許E P1866339号、P C T公開WO2011/028683号、P C T公開WO2013/039954号、P C T公開WO2005/007190号、P C T公開WO2007/133822号、P C T公開WO2005/055808号、P C T公開WO99/40196号、P C T公開WO2001/03720号、P C T公開WO99/20758号、P C T公開WO2006/083289号、P C T公開WO2005/115451号、米国特許7,618,632号およびP C T公開WO2011/051726号に記載のような抗G I T R抗体のような、例えば、G I T R融合タンパク質および抗G I T R抗体(例えば、二価抗G I T R抗体)を含む。

【0834】

ある態様において、ここに記載するC A R発現細胞を、G I T Rアゴニスト、例えば、ここに記載するG I T Rアゴニストと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、G I T Rアゴニストを、C A R発現細胞の前に投与する。例えば、ある態様において、G I T Rアゴニストを、細胞のアフェレーシス前に投与できる。

【0835】

ある態様において、ここに記載するC A R発現細胞を、m T O R阻害剤、例えば、ここに記載するm T O R阻害剤、例えば、エベロリムスのようなラパログと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、m T O R阻害剤を、C A R発現細胞の前に投与する。例えば、ある態様において、m T O R阻害剤を、細胞のアフェレーシス前に投与できる。

【0836】

ある態様において、ここに記載するC A R発現細胞を、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、例えば、ここに記載するタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、S H P-1阻害剤、例えば、スチボグルコン酸ナトリウムのような、例えば、ここに記載するS H P-1阻害剤である。ある態様において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤はS H P-2阻害剤である。

【0837】

ある態様において、ここに記載するC A R発現細胞を、キナーゼ阻害剤と組み合わせて使用できる。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、C D K 4阻害剤、例えば、ここに記載するC D K 4阻害剤、例えば、6-アセチル-8-シクロペンチル-5-メチル-2-(5-ピペラジン-1-イル-ピリジン-2-イルアミノ)-8H-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-オン、ヒドロクロライド(パルボシクリブまたはP D 0 3 3 2 9 9 1とも呼ばれる)のような、例えば、C D 4/6阻害剤である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、B T K阻害剤、例えば、イブルチニブのような、例えば、ここに記載するB T K阻害剤である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、m T O R阻害剤、例えば、ラパマイシン、ラパマイシンアナログ、O S I-027のような、例えば、ここに記載するm T O R阻害剤である。m T O R阻害剤は、例えば、m T O R C 1阻害剤および／またはm T

ORC2阻害剤、例えば、ここに記載するmTORC1阻害剤および／またはmTORC2阻害剤であり得る。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、MNK阻害剤、例えば、4-アミノ-5-(4-フルオロアニリノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンのような、例えば、ここに記載するMNK阻害剤である。MNK阻害剤は、例えば、MNK1a、MNK1b、MNK2aおよび／またはMNK2b阻害剤であり得る。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、DGK阻害剤、例えば、DGKinh1(D5919)またはDGKinh2(D5794)のような、例えば、ここに記載するDGK阻害剤である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、アロイシンA；フラボピリドールまたはHMR-1275、2-(2-クロロフェニル)-5,7-ジヒドロキシ-8-[(3S,4R)-3-ヒドロキシ-1-メチル-4-ピペリジニル]-4-クロメノン；クリゾチニブ(PF-02341066；2-(2-クロロフェニル)-5,7-ジヒドロキシ-8-[(2R,3S)-2-(ヒドロキシメチル)-1-メチル-3-ピロリジニル]-4H-1-ベンゾピラン-4-オン、ヒドロクロライド(P276-00)；1-メチル-5-[[2-[5-(トリフルオロメチル)-1H-イミダゾール-2-イル]-4-ピリジニル]オキシ]-N-[4-(トリフルオロメチル)フェニル]-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン(RAF265)；インジスラム(E7070)；ロスコピチン(CYC202)；パルボシクリブ(PD0332991)；ジナシクリブ(SCH727965)；N-[5-[[5-tert-ブチルオキサゾール-2-イル)メチル]チオ]チアゾール-2-イル]ピペリジン-4-カルボキサミド(BMS387032)；4-[[9-クロロ-7-(2,6-ジフルオロフェニル)-5H-ピリミド[5,4-d][2]ベンズアゼピン-2-イル]アミノ]-安息香酸(MLN8054)；5-[3-(4,6-ジフルオロ-1H-ベンズイミダゾール-2-イル)-1H-インダゾール-5-イル]-N-エチル-4-メチル-3-ピリジンメタンアミン(AG-024322)；4-(2,6-ジクロロベンゾイルアミノ)-1H-ピラゾール-3-カルボン酸N-(ピペリジン-4-イル)アミド(AT7519)；4-[2-メチル-1-(1-メチルエチル)-1H-イミダゾール-5-イル]-N-[4-(メチルスルホニル)フェニル]-2-ピリミジンアミン(AZD5438)；およびXL281(BMS908662)から選択されるCDK4阻害剤である。

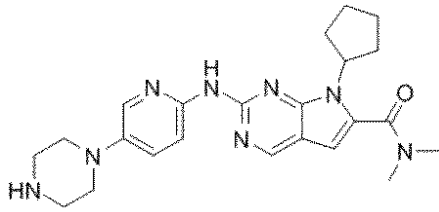
【0838】

ある態様において、キナーゼ阻害剤はCDK4阻害剤、例えば、パルボシクリブ(PD0332991)であり、パルボシクリブを、一定期間、1日約50mg、60mg、70mg、75mg、80mg、90mg、100mg、105mg、110mg、115mg、120mg、125mg、130mg、135mg(例えば、75mg、100mgまたは125mg)の用量で、例えば、28日サイクルの14～21日間連日または21日サイクルの7～12日間連日投与する。ある態様において、1サイクル、2サイクル、3サイクル、4サイクル、5サイクル、6サイクル、7サイクル、8サイクル、9サイクル、10サイクル、11サイクル、12サイクルまたはそれ以上のパルボシクリブを投与する。

【0839】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)4または6阻害剤、例えば、ここに記載するCDK4阻害剤またはCDK6阻害剤と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、CDK4/6阻害剤(例えば、CDK4およびCDK6の両者を標的とする阻害剤)、例えば、ここに記載するCDK4/6阻害剤と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、対象は、MCLを有する。MCLは、現在利用可能な治療にはほとんど応答しない、すなわち、本質的に不治の侵襲性癌である。MCLの多くの症例で、サイクリンD1(CDK4/6のレギュレーター)が、MCL細胞で発現される(例えば、免疫グロブリンおよびサイクリンD1遺伝子が関与する染色体転座のため)。それゆえに、理論に縛られないが、MCL細胞は、高特異性(すなわち、正常免疫細胞に対する最小限の影響)でCDK4/6阻害に高度に感受性であると考えられる。CDK4/6阻害剤単独で、MCLの処置にいくぶん有効性を有しているが、部分的寛解しか達成されず、高再発率である。CDK4/6阻害剤の例はLEE011(リボシクリブ)であり、その構造を下に示す。

【化 4】



【0840】

理論に縛られないが、ここに記載するCAR発現細胞とCDK4/6阻害剤(例えば、LEE011または他のここに記載するCDK4/6阻害剤)の投与は、例えば、CDK4/6阻害剤単独と比較して、高い応答性、例えば、高い寛解率および/または低い再発率を達成すると考えられる。

10

【0841】

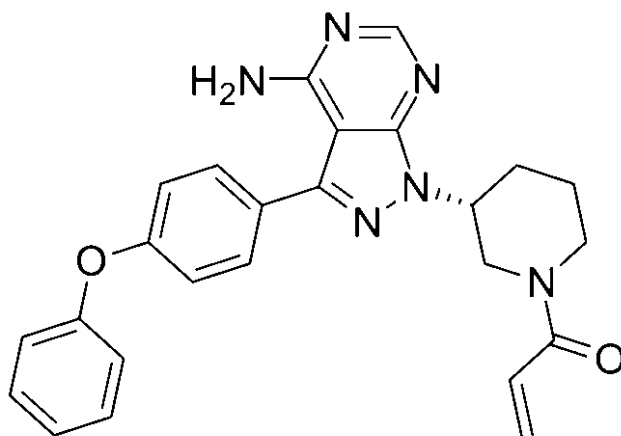
ある態様において、キナーゼ阻害剤は、イブルチニブ(PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; およびLFM-A13から選択されるBTK阻害剤である。好ましい態様において、BTK阻害剤はインターロイキン-2誘導性キナーゼ(ITK)のキナーゼ活性を低減または阻害せず、GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; およびLFM-A13から選択される。

20

【0842】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、BTK阻害剤、例えば、イブルチニブ(PCI-32765)である。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、BTK阻害剤(例えば、イブルチニブ)と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、イブルチニブ(PCI-32765とも称す)と組み合わせて対象に投与する。イブルチニブ(1-[(3R)-3-[4-アミノ-3-(4-フェノキシフェニル)-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-1-イル]ピペリジン-1-イル]プロプ-2-エン-1-オン)の構造を下に示す。

【化 5】



30

40

【0843】

ある態様において、対象はCLL、マンツル細胞リンパ腫(MCL)または小リンパ球性リンパ腫(SLL)を有する。例えば、対象は、染色体17の短腕に欠失を有する(例えば、白血病性細胞におけるdel(17p))。他の例において、対象は、del(17p)を有しない。ある態様において、対象は再発したCLLまたはSLLを有し、例えば、対象は、先に癌治療を投与されている(例えば、先に1、2、3または4癌治療を投与されている)。ある態様において、対象は、難治性CLLまたはSLLを有する。他の態様において、対象は、濾胞性リンパ腫、例えば、再発性または難治性濾胞性リンパ腫を有する。ある態様において、イブルチニブを、約300~600mg/日(例えば、約300~35

50

0、350～400、400～450、450～500、500～550または550～600mg/日、例えば、約420mg/日または約560mg/日)、例えば、経口。ある態様において、イブルチニブを、約250mg、300mg、350mg、400mg、420mg、440mg、460mg、480mg、500mg、520mg、540mg、560mg、580mg、600mg(例えば、250mg、420mgまたは560mg)の用量で、連日一定期間、例えば、21日サイクルで連日または28日サイクルで連日投与する。ある態様において、1サイクル、2サイクル、3サイクル、4サイクル、5サイクル、6サイクル、7サイクル、8サイクル、9サイクル、10サイクル、11サイクル、12サイクルまたはそれ以上のイブルチニブを投与する。

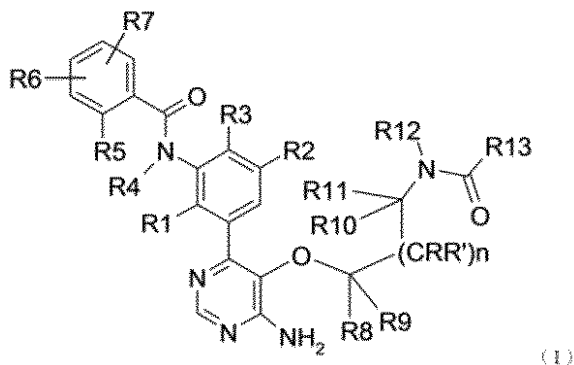
【0844】

ある態様において、イブルチニブを、リツキシマブと組み合わせて投与する。例えば、Burger et al. (2013) Ibrutinib In Combination With Rituximab (iR) Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): New, Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients, Abstract 675 presented at 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA 7-10 Dec参照。理論に縛られないが、イブルチニブの添加はT細胞増殖性応答を増強し、T細胞をTーヘルパーー2 (Th 2) からTーヘルパーー1 (Th 1) 表現型にシフトさせると考えられる。Th 1およびTh 2は、ヘルパーT細胞の表現型であり、Th 1とTh 2で異なる免疫応答経路を指向する。Th 1表現型は、例えば、細胞内病原体/ウイルスまたは癌性細胞のような細胞を殺すための、炎症誘発性応答または自己免疫性応答永続化と関係する。Th 2表現型は、好酸球蓄積および抗炎症性応答と関係する。

【0845】

ここでの方法、使用および組成物のある態様において、BTK阻害剤は、引用によりその全体を本明細書に包含させる国際出願WO/2015/079417号に記載のBTK阻害剤である。例えば、ある態様において、BTK阻害剤は、式(I)の化合物またはその薬学的に許容される塩である。

【化6】



〔式中、

- R 1 は水素、場合によりヒドロキシで置換されていてよいC₁ - C₆ アルキルであり；
- R 2 は水素またはハロゲンであり；
- R 3 は水素またはハロゲンであり；
- R 4 は水素であり、
- R 5 は水素またはハロゲンであり；
- またはR 4 とR 5 は互いに結合し、結合、-CH₂ -、-CH₂ - CH₂ -、-CH = CH -、-CH = CH - CH₂ -；-CH₂ - CH = CH -；または-CH₂ - CH₂ - CH₂ -を意味し；
- R 6 およびR 7 は互いに独立してH、場合によりヒドロキシで置換されていてよいC₁ - C₆ アルキル、場合によりハロゲンまたはヒドロキシまたはハロゲンで置換されていてよいC₃ - C₆ シクロアルキルであり；
- R 8、R 9、R、R'、R 10 およびR 11 は互いに独立してHまたは場合によりC₁ -

C₆ アルコキシで置換されていてよい C₁ - C₆ アルキルであり；または R₈、R₉、R、R'、R₁₀ および R₁₁ のいずれかの 2 個は、それらが結合している炭素原子と一体となって 3～6 員飽和炭素環式環を形成してよく；

R₁₂ は水素または場合によりハロゲンもしくは C₁ - C₆ アルコキシで置換されていてよい C₁ - C₆ アルキルであり；

または R₁₂ と R₈、R₉、R、R'、R₁₀ または R₁₁ のいずれか一つは、それらが結合している原子と一体となって、4 員、5 員、6 員または 7 員アザシクロ環を形成してよく、該環は場合によりハロゲン、シアノ、ヒドロキシル、C₁ - C₆ アルキルまたは C₁ - C₆ アルコキシで置換されていてよく；

n は 0 または 1 であり；

R₁₃ は場合により C₁ - C₆ アルキルで置換されていてよい C₂ - C₆ アルケニル、C₁ - C₆ アルコキシまたは場合により C₁ - C₆ アルキルもしくは C₁ - C₆ アルコキシで置換されていてよい N,N-ジ- C₁ - C₆ アルキルアミノ C₂ - C₆ アルキニル；または場合により C₁ - C₆ アルキルで置換されていてよい C₂ - C₆ アルキレニルオキシドである。】。

【0846】

ある態様において、式 I の BTK 阻害剤は、N-(3-(5-((1-アクリロイルアゼチジン-3-イル)オキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(E)-N-(3-(6-アミノ-5-((1-(ブト-2-エノイル)アゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-((1-プロピオロイルアゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-((1-(ブト-2-イノイル)アゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(5-((1-アクリロイルピペリジン-4-イル)オキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルアクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(E)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブト-2-エンアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルプロピオ1アミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(E)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(4-メトキシ-N-メチルブト-2-エンアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブト-2-インアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(2-((4-アミノ-6-(3-(4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルオキシラン-2-カルボキサミド；N-(2-((4-アミノ-6-(3-(6-シクロプロピル-8-フルオロ-1-オキシイソキノリン-2(1H)-イル)フェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルアクリルアミド；N-(3-(5-(2-アクリルアミドエトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-エチルアクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-(2-フルオロエチル)アクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-

10

20

30

40

50

フルオロベンズアミド；N-(3-(5-((1-アクリルアミドシクロプロピル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(5-(2-アクリルアミドプロポキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(ブト-2-インアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルアクリルアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブト-2-インアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(3-(N-メチルアクリルアミド)プロポキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(5-((1-アクリロイルピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(6-アミノ-5-((1-(ブト-2-イノイル)ピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-2-(3-(5-((1-アクリロイルピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)-6-シクロプロピル-3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オンN-(2-((4-アミノ-6-(3-(6-シクロプロピル-1-オキソ-3,4-ジヒドロイソキノリン-2(1H)-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルアクリルアミド；N-(3-(5-(((2S,4R)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(((2S,4R)-1-(ブト-2-イノイル)-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；2-(3-(5-(((2S,4R)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)-6-シクロプロピル-3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オンN-(3-(5-(((2S,4S)-1-アクリロイル-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(((2S,4S)-1-(ブト-2-イノイル)-4-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(5-(((2S,4R)-1-アクリロイル-4-フルオロピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(((2S,4R)-1-(ブト-2-イノイル)-4-フルオロピロリジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(5-((1-アクリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(6-アミノ-5-((1-プロピオイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-2-(3-(5-((1-アクリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)フェニル)-6-シクロプロピル-3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オン；(R)-N-(3-(5-((1-ア

10

20

30

40

50

クリロイルアゼチジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド;(R)-N-(3-(5-((1-アクリロイルピペリジン-3-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド;N-(3-(5-((2R,3S)-1-アクリロイル-3-メトキシピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド;N-(3-(5-(((2S,4R)-1-アクリロイル-4-シアノピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド;またはN-(3-(5-(((2S,4S)-1-アクリロイル-4-シアノピロリジン-2-イル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミドから選択される。

10

【0847】

特に断らない限り、上記式IのBTK阻害剤で使用した化学的用語は、引用によりその全体を本明細書に包含させる国際出願WO/2015/079417号に示す意味に従い使用する。

【0848】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、テムシロリムス;リダフォロリムス(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシー19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンター16,24,26,28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネート、AP23573およびMK8669としても知られる;エベロリムス(RAD001);ラパマイシン(AY22989);セマピモド;(5-{2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル)メタノール(AZD8055);2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF04691502);およびN²-[1,4-ジオキソ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル]-L-アルギニルグリシル-L-α-アスパルチル-L-セリン-(配列番号64)、分子内塩(SF1126);およびXL765から選択されるmTOR阻害剤である。

20

30

【0849】

ある態様において、キナーゼ阻害剤はmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンであり、ラパマイシンを、約3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg(例えば、6mg)の用量で連日、一定期間、例えば、21日サイクルで連日または28日サイクルで連日投与する。ある態様において、1サイクル、2サイクル、3サイクル、4サイクル、5サイクル、6サイクル、7サイクル、8サイクル、9サイクル、10サイクル、11サイクル、12サイクルまたはそれ以上のラパマイシンを投与する。ある態様において、キナーゼ阻害剤はmTOR阻害剤、例えば、エベロリムスであり、エベロリムスを、一定期間、1日約2mg、2.5mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg(例えば、10mg)の用量で、例えば、28日サイクルで連日投与する。ある態様において、1サイクル、2サイクル、3サイクル、4サイクル、5サイクル、6サイクル、7サイクル、8サイクル、9サイクル、10サイクル、11サイクル、12サイクルまたはそれ以上のエベロリムスを投与する。

40

【0850】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、CGP052088;4-アミノ-3-(p-フルオロフェニルアミノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(CGP57380);セルコ

50

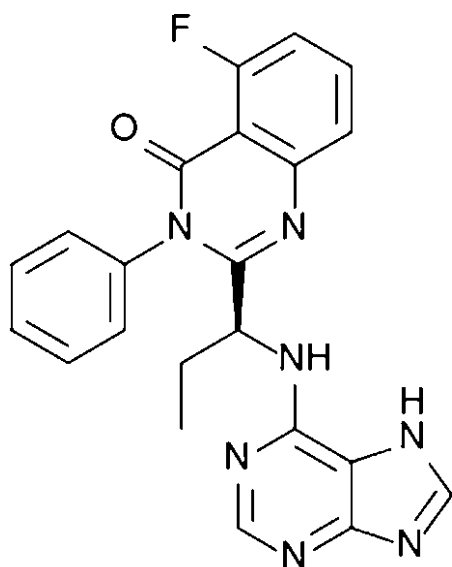
スポラミド；ETC-1780445～2；および4-アミノ-5-(4-フルオロアニリノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンから選択されるMNK阻害剤である。

【0851】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、ホスホイノシチド3-キナーゼ(P13K)阻害剤(例えば、ここに記載するP13K阻害剤、例えば、イデラリシブまたはドゥベリシブ)および／またはリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、イデラリシブおよびリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、ドゥベリシブおよびリツキシマブと組み合わせて対象に投与する。イデラリシブ(GS-1101またはCAL-101とも呼ばれる；Gilead)は、P13Kのデルタアイソフォームを遮断する小分子である。イデラリシブ(5-フルオロ-3-フェニル-2-[(1S)-1-(7H-プリン-6-イルアミノ)プロピル]-4(3H)-キナゾリノン)の構造を下に示す。

10

【化7】



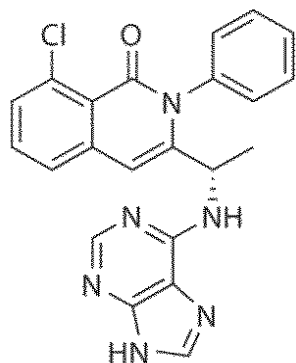
20

30

【0852】

ドゥベリシブ(IPI-145とも呼ばれる；Infinity PharmaceuticalsおよびAbbvie)は、P13K- δ , γ を遮断する小分子である。ドゥベリシブ(8-クロロ-2-フェニル-3-[(1S)-1-(9H-プリン-6-イルアミノ)エチル]-1(2H)-イソキノリン)の構造を下に示す。

【化8】



40

【0853】

ある態様において、対象はCLLを有する。ある態様において、対象は再発したCLLを有し、例えば、対象は、先に癌治療を投与されている(例えば、先に抗CD20抗体を

50

投与されているかまたは先にイブルチニブを投与されている)。例えば、対象は、染色体 17 の短腕に欠失を有する(例えば、白血病性細胞における $del(17p)$)。他の例において、対象は、 $del(17p)$ を有しない。ある態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)遺伝子に変異を含む白血病性細胞を含む。他の態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)に変異を含む白血病性細胞を含まない。ある態様において、対象は、染色体 11 の長腕に欠失を有する($del(11q)$)。他の態様において、対象は $del(11q)$ を有しない。ある態様において、イデラリシブを、約 100～400mg(例えば、100～125mg、125～150mg、150～175mg、175～200mg、200～225mg、225～250mg、250～275mg、275～300mg、325～350mg、350～375mg または 375～400mg)、例えば、BI 10 D 投与する。ある態様において、ドゥベリシブを、約 15～100mg(例えば、約 15～25、25～50、50～75 または 75～100mg)、例えば、1 日 2 回投与する。ある態様において、リツキシマブを、約 350～550mg/m² (例えば、350～375mg/m²、375～400mg/m²、400～425mg/m²、425～450mg/m²、450～475mg/m² または 475～500mg/m²) の用量で、例えば、静脈内に投与する。

【0854】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチルピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF-04691502); N-[4-[[4-(ジメチルアミノ)-1-ピペリジニル]カルボニル]フェニル]-N'-[4-(4,6-ジ-4-モルホリニル-1,3,5-トリアジン-2-イル)フェニル]尿素(PF-05212384、PKI-587); 2-メチル-2-{4-[3-メチル-2-オキソ-8-(キノリン-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]フェニル}プロパンニトリル(BEZ-235); アピトリシブ(GDC-0980、RG7422); 2,4-ジフルオロ-N-{2-(メチルオキシ)-5-[4-(4-ピリダジニル)-6-キノリニル]-3-ピリジニル}ベンゼンスルホンアミド(GSK2126458); 8-(6-メトキシピリジン-3-イル)-3-メチル-1-(4-(ピペラジン-1-イル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-2(3H)-オンマレイン酸(NVP-BGT226); 3-[4-(4-モルホリニルピリド[3',2':4,5]フロ[3,2-d]ピリミジン-2-イル]フェノール(PI-103); 5-(9-イソプロピル-8-メチル-2-モルホリノ-9H-プリン-6-イル)ピリミジン-2-アミン(VS-5584、SB2343); および N-[2-[(3,5-ジメトキシフェニル)アミノ]キノキサリン-3-イル]-4-[(4-メチル-3-メトキシフェニル)カルボニル]アミノフェニルスルホンアミド(XL765)から選択されるデュアルホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(PI3K)および mTOR 阻害剤である。

【0855】

ある態様において、ここに記載する CAR 発現細胞を、未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)阻害剤と組み合わせて対象に投与する。ALK キナーゼの例は、クリゾチニブ(Pfizer)、セリチニブ(Novartis)、アレクチニブ(中外)、ブリガチニブ(AP26113とも呼ばれる; Ariad)、エントレクチニブ(Ignyta)、PF-06463922(Pfizer)、TSR-011(Tesaro)(例えば、Clinical Trial Identifier No. NCT02048488 参照)、CEP-37440(Teva)および X-396(Xcovery)を含む。ある態様において、対象は固形癌、例えば、ここに記載する固形癌、例えば、肺癌を有する。

【0856】

クリゾチニブの化学名は 3-[(1R)-1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イルピラゾール-4-イル)ピリジン-2-アミンである。セリチニブの化学名は 5-クロロ-N²-[2-イソプロポキシ-5-メチル-4-(4-ピペリジニル)フェニル]-N⁴-[2-(イソプロピルスルホニル)フェニル]-2,4-ピリミジンジアミンである。アレクチニブの化学名は 9-エチル-6,6-ジメ

10

20

30

40

50

チル-8-(4-モルホリノピペリジン-1-イル)-11-オキソ-6,11-ジヒドロ-5H-ベンゾ[b]カルバゾール-3-カルボニトリルである。ブリガチニブの化学名は5-クロロ-N²-{4-[4-(ジメチルアミノ)-1-ピペリジニル]-2-メトキシフェニル}-N⁴-[2-(ジメチルホスホリル)フェニル]-2,4-ピリミジンジアミンである。エントレクチニブの化学名はN-(5-(3,5-ジフルオロベンジル)-1H-インダゾール-3-イル)-4-(4-メチルピペラジン-1-イル)-2-((テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アミノ)ベンズアミドである。PF-06463922の化学名は(10R)-7-アミノ-12-フルオロ-2,10,16-トリメチル-15-オキソ-10,15,16,17-テトラヒドロ-2H-8,4-(メテノ)ピラゾロ[4,3-h][2,5,11]-ベンゾオキサジアザシクロテトラデシン-3-カルボニトリルである。CEP-37440の化学名は(S)-2-((5-クロロ-2-((6-(4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル)-1-メトキシ-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾ[7]アヌレン-2-イル)アミノ)ピリミジン-4-イル)アミノ)-N-メチルベンズアミドである。X-396の化学名は(R)-6-アミノ-5-(1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エトキシ)-N-(4-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)フェニル)ピリダジン-3-カルボキサミドである。

【0857】

カルシウム依存的ホスファターゼカルシニューリンを阻害する(シクロスポリンおよびFK506)または増殖因子誘発シグナル伝達に重要であるp70S6キナーゼを阻害する薬物(ラパマイシン)(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)も使用できる。さらなる面において、本発明の細胞組成物を、患者に骨髄移植、フルダラビンのような化学療法剤、体外照射療法(XRT)、シクロホスファミドおよび/またはOKT3またはキャンパスのような抗体を使用するT細胞除去療法と組み合わせて(例えば、前に、同時にまたは後に)投与し得る。ある面において、本発明の細胞組成物を、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサンのようなB細胞除去療法後に投与する。例えば、ある態様において、対象を、高用量化学療法剤と続く末梢血幹細胞移植の標準的処置に付す。ある態様において、移植後、対象は、本発明の増殖した免疫細胞の注入を受ける。さらなる態様において、増殖細胞を手術の前または後に投与する。

【0858】

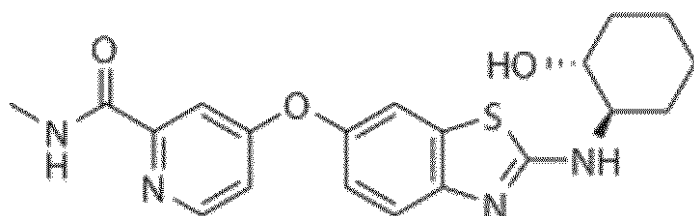
ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害剤と組み合わせて対象に投与する。IDOは、アミノ酸、L-トリプトファンのキヌレニンへの分解を触媒する酵素である。多くの癌、例えば、前立腺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、子宮頸癌、胃癌、卵巣癌、頭部癌および肺癌がIDOを過発現する。pDC、マクロファージおよび樹状細胞(DC)がIDOを発現できる。理論に縛られないが、L-トリプトファンの減少(例えば、IDOによる触媒)が、T細胞アネルギーおよびアポトーシスの誘発による免疫抑制性環境をもたらすと考えられる。それゆえに、理論に縛られないが、IDO阻害剤が、例えば、CAR発現免疫細胞の抑制または死を減少させることによりここに記載するCAR発現細胞の効果を增強できると考えられる。ある態様において、対象は、固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍、例えば、前立腺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、子宮頸癌、胃癌、卵巣癌、頭部癌または肺癌を有する。IDO阻害剤の例は、1-メチルトリプトファン、インドキシモド(NewLink Genetics)(例えば、Clinical Trial Identifier Nos. NCT01191216; NCT01792050参照)およびINCBO24360(Incyte Corp.)(例えば、Clinical Trial Identifier Nos. NCT01604889; NCT01685255参照)を含むが、これらに限定されない。

【0859】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)のモジュレーターと組み合わせて対象に投与する。MDSCは、末梢および多くの固形腫瘍の腫瘍部位に蓄積する。これらの細胞はT細胞応答を抑制し、それによりCAR発現細胞療法の効果を障害する。理論に縛られないが、MDSCモジュレーター投与は

、ここに記載するCAR発現細胞の効果を増強すると考えられる。ある態様において、対象は、固形腫瘍、例えば、ここに記載する固形腫瘍、例えば、神経膠芽腫を有する。MDSのモジュレーターの場合は、MCS110およびBLZ945を含むが、これらに限定されない。MCS110は、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)に対するモノクローナル抗体(mAb)である。例えば、Clinical Trial Identifier No. NCT00757757参照。BLZ945は、コロニー刺激因子1受容体(CSF1R)の小分子阻害剤である。例えば、Pyonteck et al. Nat. Med. 19(2013):1264-72参照。BLZ945の構造を下に示す。

【化9】



【0860】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、免疫抑制性形質細胞の活性を阻止または低減する薬剤と組み合わせて対象に投与する。免疫抑制性形質細胞は、オキサリプラチンのようなT細胞依存性免疫原性化学療法を妨害することが示されている(Shalapur et al., Nature 2015, 521:94-101)。ある態様において、免疫抑制性形質細胞は、IgA、インターロイキン(IL)-10およびPD-L1の1以上を発言できる。ある態様において、薬剤はCD19 CAR発現細胞またはBCMA CAR発現細胞である。

【0861】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、インターロイキン-15(IL-15)ポリペプチド、インターロイキン-15受容体アルファ(IL-15Ra)ポリペプチドまたは両者の組み合わせ、例えば、hetIL-15(Admune Therapeutics, LLC)と組み合わせて対象に投与する。hetIL-15は、IL-15およびIL-15Raのヘテロ二量体非共有複合体である。hetIL-15は、例えば、引用により本明細書に包含させる米国8,124,084、米国2012/0177598号、米国2009/0082299号、米国2012/0141413号および米国2011/0081311号に記載されている。ある態様において、hetIL-15を皮下投与する。ある態様において、対象は、癌、例えば、固形癌、例えば、黒色腫または結腸癌を有する。ある態様において、対象は、転移癌を有する。

【0862】

ある態様において、ここに記載する疾患、例えば、血液学的障害、例えば、AMLまたはMDSを有する対象に、ここに記載するCAR発現細胞を、薬剤、例えば、細胞毒性または化学療法剤、生物学的治療(例えば、抗体、例えば、モノクローナル抗体または細胞療法)または阻害剤(例えば、キナーゼ阻害剤)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、ここに記載するCAR発現細胞を、細胞毒性剤、例えば、CPX-351(Celator Pharmaceuticals)、シタラビン、ダウノルビシン、ボサロキシシン(Sunesis Pharmaceuticals)、サパシタビン(Cyclacel Pharmaceuticals)、イダルビシンまたはミトキサントロンと組み合わせて投与される。CPX-351は、シタラビンおよびダウノルビシンを5:1モル比で含むリポソーム製剤である。ある態様において、対象に、ここに記載するCAR発現細胞を、低メチル化剤、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、例えば、アザシチジンまたはデシタビンと組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載するCAR発現細胞を、生物学的治療、例えば、抗体または細胞療法、例えば、225Ac-リンツズマブ(Actima b-A; Actinium Pharmaceuticals)、IPH2102(Innate Pharma/Bristol Myers Squibb)、SGN-CD33A(Seattle Genetics)またはゲムツズマブオゾガマイシン(マイロターゲット; Pfizer)と組み合わせて投

10

20

30

40

50

与する。SGN-CD33Aは、抗CD33抗体に結合するピロロベンゾジアゼピン二量体を含む抗体-薬物コンジュゲート(ADC)である。Actimab-Aは、アクチニウムで標識された抗CD33抗体(リンツズマブ)である。IPH2102は、キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)を標的とするモノクローナル抗体である。ある態様において、対象に、ここに記載するCAR発現細胞を、FLT3阻害剤、例えば、ソラフェニブ(Bayer)、ミドスタウリン(Novartis)、キザルチニブ(第一三共)、クレノラニブ(Arog Pharmaceuticals)、PLX3397(第一三共)、AKN-028(Akinion Pharmaceuticals)またはASP2215(アステラス)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載するCAR発現細胞を、イソシトレートデヒドロゲナーゼ(IDH)阻害剤、例えば、AG-221(Celgene/Agios)またはAG-120(Agios/Celgene)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載するCAR発現細胞を、細胞サイクルレギュレーター、例えば、ボロ様キナーゼ1(Plk1)阻害剤、例えば、ボラセルチブ(Boehringer Ingelheim)；またはサイクリン依存性キナーゼ9(Cdk9)阻害剤、例えば、アルボシジブ(Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載するCAR発現細胞を、B細胞受容体シグナル伝達ネットワーク阻害剤、例えば、B細胞リンパ腫2(Bcl-2)阻害剤、例えば、ベネトクラクス(Abbvie/Roche)；またはブルトン型チロシンキナーゼ(Btk)阻害剤、例えば、イブルチニブ(Pharmacoclics/Johnson & Johnson Janssen Pharmaceutical)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載するCAR発現細胞を、M1アミノペプチダーゼ阻害剤、例えば、トセドスタット(CTI BioPharma/Vernalis)；ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤、例えば、pracinostat(MEI Pharma)；多キナーゼ阻害剤、例えば、リゴサチブ(Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio)；またはペプチド性CXCR4逆アゴニスト、例えば、BL-8040(BioLineRx)と組み合わせて投与する。

【0863】

他の態様において、対象は、細胞の移植、例えば、同種幹細胞移植前に、本発明のCAR発現細胞組成物の注入を受けている。好ましい態様において、CAR発現細胞は、例えば、NKR-CAR、例えば、KIR-CARをコードするmRNAのエレクトロポレーションにより一過性にNKR-CAR、例えば、KIR-CARを発現しており、それにより、腫瘍抗原の発現が、移植失敗を避けるためにドナー幹細胞の注入前に停止される。

【0864】

投与中または後に本発明の化合物および/または他の抗癌剤に対するアレルギー反応を経験する患者がいるかもしれない；それゆえに、抗アレルギー剤を、アレルギー反応のリスクを最小化するためにしばしば投与する。適当な抗アレルギー剤はデキサメサゾン(例えば、デカドロン(登録商標))、ベクロメタゾン(例えば、Beclovent(登録商標))、ヒドロコルチゾン(コルチゾン、ヒドロコルチゾンナトリウムスクシネート、ヒドロコルチゾンナトリウムホスフェートとしても知られ、商品名Ala-Cort(登録商標)、ヒドロコルチゾンホスフェート、Solu-Cortef(登録商標)、Hydrocort Acetate(登録商標)およびLanacort(登録商標)として販売)、プレドニゾロン(商品名Delta-Cortel(登録商標)、Orapred(登録商標)、Prediapred(登録商標)およびPrelone(登録商標)として販売)、プレドニゾン(商品名Deltasone(登録商標)、Liquid Red(登録商標)、Meticorten(登録商標)およびOrasone(登録商標)として販売)、メチルプレドニゾロン(6-メチルプレドニゾロン、メチルプレドニゾロンアセテート、メチルプレドニゾロンナトリウムスクシネートとしても知られ、商品名Duralone(登録商標)、Medralone(登録商標)、Medrol(登録商標)、M-Prednisol(登録商標)およびSolu-Medrol(登録商標)として販売)のようなコルチコステロイド；ジフェンヒドラミン(例えば、Benadryl(登録商標))、ヒドロキシジンおよびシプロヘプタジンのような抗ヒスタミン剤；およびベーターアドレナリン受容体アゴニスト、アルブテロール(例えば、Proventil(登録商標))およびテルブタリン(Brethine(登録商標))のような気管支拡張剤を含む。

10

20

30

40

50

【0865】

本発明の化合物および／または他の抗癌剤の投与中および後に悪心を経験する患者がいるかもしれない；それゆえに、鎮吐剤を、悪心(胃上部)および嘔吐の予防に使用する。適当な鎮吐剤は、アプレピタント(Emend(登録商標))、オンダンセトロン(Zofran(登録商標))、グラニセトロンHCl(Kytrel(登録商標))、ロラゼパム(Ativan(登録商標))、デキサメサゾン(デカドロン(登録商標))、プロクロルペラジン(Compazine(登録商標))、カソピタント(Rezonic(登録商標))およびZunrisa(登録商標))およびこれらの組み合わせを含む。

【0866】

処置中に経験する疼痛を軽減する投薬も、患者がより快適になるようにしばしば処方される。タイレノール(登録商標)のような、一般的非処方鎮痛剤がしばしば使用される。しかしながら、ヒドロコドン／パラセタモールまたはヒドロコドン／アセトアミノフェン(例えば、Vicodin(登録商標))、モルヒネ(例えば、Astramorph(登録商標)またはAvinza(登録商標))、オキシコドン(例えば、OxyContin(登録商標)またはPercocet(登録商標))、塩酸オキシモルホン(Opana(登録商標))およびフェンタニル(例えば、Duragesic(登録商標))のようなオピオイド鎮痛剤も、軽度または重度疼痛に有用である。

10

【0867】

正常細胞を処置毒性から保護するおよび臓器毒性を制限する試みの中で、細胞保護剤(例えば神経保護剤、フリーラジカルスカベンジャー、心保護剤、アントラサイクリン溢血中和剤、栄養素など)を補助剤治療として使用し得る。適当な細胞保護剤は、アミホスチン(Ethyol(登録商標))、グルタミン、ジメスナ(Tavocept(登録商標))、メスナ(Mesnex(登録商標))、デクスラゾキサナ(Zinecard(登録商標))またはTotect(登録商標))、キサリプロデン(Xapri(登録商標))およびロイコボリン(カルシウムロイコボリン、シトロボラム因子およびフォリン酸としても既知)を含む。

20

【0868】

コード番号、一般名または商品名により同定した活性化合物の構造は、標準参考書“The Merck Index”の現行版またはデータベース、例えばPatents International(例えばIMS World Publications)から取り得る。

30

【0869】

本発明の化合物と組み合わせて使用できる上記化合物を、上に引用した文献に記載のような、当分野で記載されるように製造し、投与できる。

【0870】

ある態様において、本発明は、少なくとも一つの本発明の化合物(例えば、本発明の化合物)またはその薬学的に許容される塩を、ヒトまたは動物対象の投与に適する薬学的に許容される適当な担体と共に、単独でまたは他の抗癌剤と組み合わせて含む、医薬組成物を提供する。

【0871】

ある態様において、本発明は、癌のような細胞増殖性疾患を有するヒトまたは動物対象を処置する方法を提供する。本発明は、治療有効量の本発明の化合物(例えば、本発明の化合物)またはその薬学的に許容される塩を、単独でまたは他の抗癌剤と組み合わせて対象に投与することを含む、処置を必要とするヒトまたは動物対象を処置する方法を提供する。

40

【0872】

特に、組成物は、組み合わせ治療として製剤してもまたは別々に投与してもよい。

【0873】

組み合わせ治療において、本発明の化合物および他の抗癌剤を、同時に、一緒にまたは逐次的に特定の時間制限なく投与してよく、ここで、このような投与が、患者体内で2化合物の治療的有効なレベルを提供する。

50

【0874】

好ましい態様において、本発明の化合物および他の抗癌剤を、一般にいずれかの順序で注入または経口により逐次的に投与する。投薬レジメンは、疾患ステージ、患者の体力、個々の薬物の安全性プロファイルおよび個々の薬物の耐容性、ならびに組み合わせを投与する処置医および医療従事者には周知の他の基準により代わり得る。本発明の化合物および他の抗癌剤を、処置に使用する特定のサイクルにより、互いに数分、数時間、数日または数週間離れて投与する。加えて、サイクルは、処置サイクル中、一方の薬剤の他方より多い投与および薬物投与あたりの異なる用量を含む。

【0875】

本発明の他の面において、ここに開示されるような1以上の本発明の化合物および組み合わせパートナーを含むキットが提供される。代表的キットは、本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩、(b)例えば、上記のような少なくとも一つの組み合わせパートナーを含み、それによってこのようなキットは、投与指示を含む添付文書または他のラベリングを含み得る。

【0876】

本発明の化合物はまた既知治療法、例えば、ホルモン投与または特に放射線と組み合わせても遊離に使用し得る。本発明の化合物は、特に放射線療法に低感受性を示す腫瘍の処置のために、特に、放射線増感剤として使用され得る。

【0877】

ある態様において、対象は、CAR発現細胞の投与に関連する副作用を低減または緩和する薬剤を投与することができる。CAR発現細胞の投与に付随する副作用は、CRSおよびマクロファージ活性化症候群(MAS)とも呼ばれる血液貪食リンパ組織球増多症(HLH)を含むが、これらに限定されない。CRSの症状は、高熱、悪心、一過性低血圧、低酸素症などを含む。CRSは、発熱、疲労、食欲不振、筋肉痛、関節痛(arthralgias)、悪心、嘔吐、頭痛などの臨床的体質的徴候および症状を含み得る。CRSは、発疹などの臨床皮膚徴候および症状を含み得る。CRSは、悪心、嘔吐および下痢のような臨床的消化器徴候および症状を含み得る。CRSは、頻呼吸および低酸素血症のような臨床的呼吸器徴候および症状を含み得る。CRSは、頻脈、脈圧の増大、低血圧、心拍出量の増加(早期)および心拍出量の低下(後期)などの臨床的心血管徴候および症状を含み得る。CRSは、凝固兆候およびd-二量体増加、出血の有無にかかわらず低フィブリノーゲン血などの症状を含み得る。CRSは、高窒素血症などの臨床腎徴候および症状を含み得る。CRSは、高トランスアミナーゼ血症および高ビリルビン血症などの臨床肝徴候および症状を含み得る。CRSは、頭痛、精神状態の変化、混乱、せん妄、言語発見障害またはフラック失語、幻覚、振戦、ジメトリア、異常歩行、発作などの臨床的神経徴候および症状を含み得る。

【0878】

よって、ここに記載する方法は、対象にここに記載するCAR発現細胞を投与し、さらに、CAR発現細胞処置に由来する可溶性因子のレベル増加を管理する1以上の薬剤の投与を含み得る。ある態様において、対象で増加し得る可溶性因子は、IFN- γ 、TNF α 、IL-2およびIL-6の1以上である。ある態様において、対象において増加する因子は、IL-1、GM-CSF、IL-10、IL-8、IL-5およびフラクタルカインの1以上である。それゆえに、これらの副作用を処置するために投与する薬剤は、これらの可溶性因子の1以上を中和する薬剤であり得る。ある態様において、これらの可溶性形態の1以上を中和する薬剤は、抗体またはその抗原結合フラグメントである、このような薬剤の例は、ステロイド(例えば、コルチコステロイド)、TNF α 阻害剤およびIL-6阻害剤を含むが、これらに限定されない。TNF α 阻害剤の例は、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴールおよびゴリムマブのような抗TNF α 抗体分子である。TNF α 阻害剤の他の例は、エタネルセプトのような融合タンパク質である。小分子TNF α 阻害剤は、キササンチン誘導体(例えばペントキシフィリン)およびブプロピオンを含むが、これらに限定されない。IL-6阻害剤の例は、トシリズマブ(toc)、サ

10

20

30

40

50

リルマブ、エルシリモマブ、CNTO 328、ALD518/BMS-945429、CNTO 136、CPSI-2364、CDP6038、VX30、ARGX-109、FE301およびFM101のような抗IL-6抗体分子である。ある態様において、抗IL-6抗体分子は、トシリズマブである。IL-1Rベースの阻害剤の例は、アナキンラである。

【0879】

ある態様において、対象に、とりわけ、例えば、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾンのような、コルチコステロイドを投与する。

【0880】

ある態様において、対象に、例えば、ノルエピネフリン、ドーパミン、フェニレフリン、エピネフリン、パソプレシンまたはこれらの組み合わせのような、昇圧剤を投与する。

【0881】

ある態様において、対象に解熱剤を投与できる。ある態様において、対象に鎮痛剤を投与できる。

【0882】

ある態様において、対象を、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤と投与できる。例えば、ある態様において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であり得る、例えば、薬剤は、チェックポイント阻害剤である。阻害分子、例えば、プログラム細胞死1(PD1)は、CAR発現細胞が免疫エフェクター応答を開始する能力を減少させ得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4およびTGFRベータを含む。DNA、RNAまたはタンパク質レベルでの阻害による、阻害分子の阻害はCAR発現細胞性能を最適化できる。ある態様において、例えば、ここに記載のような、阻害性核酸、例えば、阻害性核酸、例えば、dsRNA、例えば、siRNAまたはshRNA、群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)、転写-アクティベータ様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)または亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を使用して、CAR発現細胞の阻害分子の発現を阻害できる。ある態様において、阻害剤はshRNAである。ある態様において、阻害分子はCAR発現細胞内で阻害される。これらの態様において、阻害分子の発現を阻害するdsRNA分子を、CARの要素、例えば、要素全部をコードする核酸と連結する。

【0883】

ある態様において、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子を、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子が、発現、例えば、CAR発現細胞内で発現されるようにプロモーター、例えば、H1またはU6駆動プロモーターに操作可能に連結する。例えば、Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA," Chapter 3, in Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann and Rossi)参照。Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) Science 296: 550-553; Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500。ある態様において、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの成分、例えば、要素の全てをコードする核酸分子を含む、同じベクター、例えば、レンチウイルスベクター上に存在する。このような態様において、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの成分、例えば、要素の全てをコードする核酸に5'または3'に位置するベクター、例えば、レンチウイルスベクターに位置する。T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの成分、例えば、要素の全てをコードする核酸と同一または異なる方向で転写され得る。

【0884】

ある態様において、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害す

10

20

30

40

50

る d s R N A 分子をコードする核酸分子は、C A R の成分、例えば、要素の全てをコードする核酸分子を含むベクター以外のベクターに存在する。ある態様において、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する d s R N A 分子をコードする核酸分子は、C A R 発現細胞内で一過性に発現される。ある態様において、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する d s R N A 分子をコードする核酸分子は、C A R 発現細胞のゲノムに安定に統合される。図 4 4 A ~ 4 4 E は、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現を阻害する d s R N A 分子を有する C A R の成分、例えば、全要素を発現するベクターの例を記載する。

【0885】

T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子の発現の阻害に有用な d s R N A 分子の例であって、ここで、T細胞機能を調節または制御、例えば阻害する分子が P D - 1 であるものを下に提供する。

【0886】

下記表 7 に、D N A 配列を表す配列番号 2 1 6 ~ 2 6 3 と共に、P D C D 1 (P D 1) R N A i 剤の名称(マウス P D C D 1 遺伝子 NM_008798.2 におけるそれらの位置由来)を提供する。センス(S)およびアンチセンス(A S)配列の両者を、本表では 1 9 m e r および 2 1 m e r 配列として提供する。位置(P o S、例えば、1 7 6)は、マウス P D C D 1 遺伝子 NM_008798.2 における位置番号由来であることに注意すべきである。配列番号を、“センス 1 9”配列番号 6 5 ~ 7 6 ; “センス 2 1”配列番号 7 7 ~ 8 8 ; “アセンス 2 1”配列番号 8 9 ~ 1 0 0 ; “アセンス 1 9”配列番号 1 0 1 ~ 1 1 2 に対応する 1 2 群で示す。

【0887】

【表 4 0】

表 7. マウス P D C D 1 (P D 1) s h R N A 配列

NM_008798. 2での位置	標的領域	センス19	センス21	アセンス21	アセンス19
176	CDS	GGAGGTCC CTCACCTTC TA(配列番号65)	CTGGAGGTC CCTCACCTT CTA(配列番号77)	TAGAAGGTG AGGGACCTC CAG(配列番号89)	TAGAAGGTG AGGGACCTC C(配列番号101)
260	CDS	CGGAGGATC TTATGCTGA A(配列番号66)	GTCGGAGGA TCTTATGCT GAA(配列番号78)	TTCAGCATA AGATCCTCC GAC(配列番号90)	TTCAGCATA AGATCCTCC G(配列番号102)
359	CDS	CCCGCTTCC AGATCATAC A(配列番号67)	TGCCCCGCTT CCAGATCAT ACA(配列番号79)	TGTATGATC TGGAAGCGG GCA(配列番号91)	TGTATGATC TGGAAGCGG G(配列番号103)
528	CDS	GGAGACCTC AACAAGATA T(配列番号68)	CTGGAGACC TCAACAAGA TAT(配列番号80)	ATATCTTGT TGAGGTCTC CAG(配列番号92)	ATATCTTGT TGAGGTCTC C(配列番号104)
581	CDS	AAGGCATGG TCATTGGTA T(配列番号69)	TCAAGGCAT GGTCATTGG TAT(配列番号81)	ATACCAATG ACCATGCCT TGA(配列番号93)	ATACCAATG ACCATGCCT T(配列番号105)

【表 4 1】

584	CDS	GCATGGTCA TTGGTATCA T(配列番号70)	AGGCATGGT CATTGGTAT CAT(配列番号82)	ATGATACCA ATGACCATG CCT(配列番号94)	ATGATACCA ATGACCATG C(配列番号106)
588	CDS	GGTCATTGG TATCATGAG T(配列番号71)	ATGGTCATT GGTATCATG AGT(配列番号83)	ATGGTCATT GGTATCATG AGT(配列番号95)	ATGGTCATT GGTATCATG A(配列番号107)
609	CDS	CCTAGTGGG TATCCCTGT A(配列番号72)	GCCCTAGTG GGTATCCCT GTA(配列番号84)	GCCCTAGTG GGTATCCCT GTA(配列番号96)	GCCCTAGTG GGTATCCCT G(配列番号108)
919	CDS	GAGGATGGA CATTGTTCT T(配列番号73)	ATGAGGATG GACATTGTT CTT(配列番号85)	ATGAGGATG GACATTGTT CTT(配列番号97)	ATGAGGATG GACATTGTT C(配列番号109)
1021	3' UTR	GCATGCAGG CTACAGTTC A(配列番号74)	GAGCATGCA GGCTACAGT TCA(配列番号86)	GAGCATGCA GGCTACAGT TCA(配列番号98)	GAGCATGCA GGCTACAGT T(配列番号110)
1097	3' UTR	CCAGCACAT GCACTGTTG A(配列番号75)	TTCCAGCAC ATGCACTGT TGA(配列番号87)	TTCCAGCAC ATGCACTGT TGA(配列番号99)	TTCCAGCAC ATGCACTGT T(配列番号111)
1101	3' UTR	CACATGCAC TGTTGAGTG A(配列番号76)	AGCACATGC ACTGTTGAG TGA(配列番号88)	AGCACATGC ACTGTTGAG TGA(配列番号100)	AGCACATGC ACTGTTGAG T(配列番号112)

10

20

30

【0888】

下記表 8 に、DNA 配列を表す配列番号 264～311 と共に、PDCD1(PD1)RNAi 剤(ヒト PDCD1 遺伝子におけるそれらの位置由来)を提供する。センス(S)およびアンチセンス(AS)配列の両者を、本表では 19mer および 21mer 配列として提供する。配列番号を、“センス 19”配列番号 113～124；“センス 21”配列番号 125～136；“アセンス 21”配列番号 137～148；“アセンス 19”配列番号 149～160 に対応する 12 群で示す。

【0889】

40

【表 4 2】

表 8. ヒト PDCD1 (PD1) s h RNA 配列

NM_005018 .2での位置	標的 領域	センス19	アセンス19	センス21	アセンス21
145	CDS	GGCCAGGAT GGTTCTTAG A(配列番号113)	TCTAAGAAC CATCCTGGC C(配列番号125)	GCGGCCAGG ATGGTTCTT AGA(配列番号 137)	TCTAAGAAC CATCCTGGC CGC(配列番号 149)
271	CDS	GCTTCGTGC TAAACTGGT A(配列番号114)	TACCAGTTT AGCACGAAG C(配列番号126)	GAGCTTCGT GCTAAACTG GTA(配列番号 138)	TACCAGTTT AGCACGAAG CTC(配列番号 150)
393	CDS	GGGCGTGAC TTCCACATG A(配列番号115)	TCATGTGGA AGTCACGCC C(配列番号127)	ACGGGCGTG ACTTCCACA TGA(配列番号 139)	TCATGTGGA AGTCACGCC CGT(配列番号 151)
1497	3' UT R	CAGGCCTAG AGAAGTTTC A(配列番号116)	TGAAACTTC TCTAGGCCT G(配列番号12 8)	TGCAGGCCT AGAGAAGTT TCA(配列番号 140)	TGAAACTTC TCTAGGCCT GCA(配列番号 152)
1863	3' UT R	CTTGGAACC CATTCCTGA A(配列番号117)	TTCAGGAAT GGGTTCCAA G(配列番号12 9)	TCCTTGGA CCCATTCCT GAA(配列番号 141)	TTCAGGAAT GGGTTCCAA GGA(配列番号 153)

10

20

【表 4 3】

1866	3' UT R	GGAACCCAT TCCTGAAAT T(配列番号118)	AATTTTCAGG AATGGGTTC C(配列番号130)	TTGGAACCC ATTCCTGAA ATT(配列番号 142)	AATTTTCAGG AATGGGTTC CAA(配列番号 154)
1867	3' UT R	GAACCCATT CCTGAAATT A(配列番号119)	TAATTTTCAG GAATGGGTTC C(配列番号131)	TGGAACCCA TTCCTGAAA TTA(配列番号 143)	TAATTTTCAG GAATGGGTTC CCA(配列番号 155)
1868	3' UT R	AACCCATTC CTGAAATTA T(配列番号120)	ATAATTTCA GGAATGGGT T(配列番号132)	GGAACCCAT TCCTGAAAT TAT(配列番号 144)	ATAATTTCA GGAATGGGT TCC(配列番号 156)
1869	3' UT R	ACCCATTCC TGAAATTATT (配列番号121)	AATAATTTTC AGGAATGGG T(配列番号133)	GAACCCATT CCTGAAATT ATT(配列番号 145)	AATAATTTTC AGGAATGGG TTC(配列番号 157)
1870	3' UT R	CCCATTCCT GAAATTATTT (配列番号122)	AAATAATTT CAGGAATGG G(配列番号134)	AACCCATTC CTGAAATTA TTT(配列番号 146)	AAATAATTT CAGGAATGG GTT(配列番号 158)
2079	3' UT R	CTGTGGTTC TATTATATTA (配列番号123)	TAATATAATA GAACCACAG (配列番号135)	CCCTGTGGT TCTATTATAT TA(配列番号147)	TAATATAATA GAACCACAG GG(配列番号159)
2109	3' UT R	AAATATGAG AGCATGCTA A(配列番号124)	TTAGCATGC TCTCATATTT (配列番号136)	TTAAATATG AGAGCATGC TAA(配列番号 148)	TTAGCATGC TCTCATATTT AA(配列番号160)

10

20

30

【0890】

ある態様において、阻害シグナルの阻害剤は、例えば、阻害分子と結合する抗体または抗体フラグメントであり得る。例えば、薬剤は、PD1、PD-L1、PD-L2またはCTLA4に結合する抗体または抗体フラグメントであり得る(例えば、イピリムマブ(MDX-010およびMDX-101とも称し、ヤーボイ(登録商標)として市販; Bristol-Myers Squibb; トレメリムマブ(Pfizerから入手可能なIgG2モノクローナル抗体、以前はチシリムマブ、CP-675,206として既知。))。ある態様において、ある態様において、薬剤は、TIM3に結合する抗体または抗体フラグメントである。ある態様において、薬剤は、LAG3に結合する抗体または抗体フラグメントである。ある態様において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤、例えば、阻害分子の阻害剤を、同種異系CAR、例えば、同種異系ここに記載するCARと組み合わせ投与する(例えば、ここでの同種異系CARにおいて記載)。

40

【0891】

PD1は、CD28、CTLA-4、ICOSおよびBTLAも含む受容体のCD28ファミリーの阻害性メンバーである。PD1は、活性化B細胞、T細胞および骨髄細胞に発現される(Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75)。PD1に対する2リガンド、PD-L1およびPD-L2は、PD1への結合によりT細胞活性化を下方制御することが示されている(Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 N

50

at Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1は、ヒト癌において豊富である(Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制は、PD1とPD-L1の局所相互作用の阻害により逆転できる。

【0892】

抗体、抗体フラグメントおよびPD-1、PD-L1およびPD-L2の他の阻害剤は当分野で入手可能であり、ここに記載する本発明のcarと組み合わせて使用し得る。例えば、ニボルマブ(別名BMS-936558またはMDX1106; Bristol-Myers Squibb)は、PD-1を特異的に遮断する完全ヒトIgG4モノクローナル抗体である。ニボルマブ(クローン5C4)およびPD-1に特異的に阻害する他のヒトモノクローナル抗体は、US8,008,449号およびWO2006/121168号に開示されている。ピディリズマブ(CT-011; Cure Tech)は、PD1に結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体である。ピディリズマブおよび他のヒト化抗PD1モノクローナル抗体は、WO2009/101611号に開示されている。ランブロリズマブ(MK03475とも称す; Merck)は、PD1に結合するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。ランブロリズマブおよび他のヒト化抗PD1抗体は、US8,354,509号およびWO2009/114335号に開示される。MDPL3280A(Genentech/Roche)は、PD-L1に結合するヒトFc最適化IgG1モノクローナル抗体である。PD-L1に対するMDPL3280Aおよび他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許7,943,743号およびUS公開20120039906号に記載されている。他の抗PD-L1結合剤は、YW243.55.S70(重鎖および軽鎖可変領域は、WO2010/077634号の配列番号20および21に示される)およびMDX-1105(別名BMS-936559および例えば、WO2007/005874号に開示される抗PD-L1結合剤)である。AMP-224(B7-DCIg; Amplimmune; 例えば、WO2010/027827号およびWO2011/066342号に開示)は、PD1とB7-H1の相互作用を遮断するPD-L2 Fc融合可溶性受容体である。他の抗PD1抗体は、とりわけ、AMP514(Amplimmune)、例えば、US8,609,089号、US2010028330号および/またはUS20120114649号に開示の抗PD1抗体を含む。

【0893】

ある態様において、抗PD-1抗体またはそのフラグメントは、その全体を引用により本明細書に包含させる“PD-1に対する抗体分子およびその使用”なる表題のUS2015/0210769号に記載するような抗PD-1抗体分子である。ある態様において、抗PD-1抗体分子は、BAP049-hum01、BAP049-hum02、BAP049-hum03、BAP049-hum04、BAP049-hum05、BAP049-hum06、BAP049-hum07、BAP049-hum08、BAP049-hum09、BAP049-hum10、BAP049-hum11、BAP049-hum12、BAP049-hum13、BAP049-hum14、BAP049-hum15、BAP049-hum16、BAP049-Clone-A、BAP049-Clone-B、BAP049-Clone-C、BAP049-Clone-DまたはBAP049-Clone-E; またはUS2015/0210769号の表1に記載するようなまたは表1におけるヌクレオチド配列によりコードされるまたは前記配列のいずれかと実質的に同一(例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%またはそれ以上同一)である配列のいずれかから選択される抗体の重鎖および軽鎖可変領域からの少なくとも1、2、3、4、5または6CDR(または集合的にCDRのすべて); または密接に関係するCDR、例えば、同一であるかまたは少なくとも1アミノ酸改変を有するが、改変(例えば、置換、欠失または挿入、例えば、保存的置換)が2、3または4を超えないCDRを含む。

【0894】

さらに他の態様において、抗PD-1抗体分子は、ここに記載する抗体からの少なくとも1、2、3または4可変領域、例えば、BAP049-hum01、BAP049-h

10

20

30

40

50

um02、BAP049-hum03、BAP049-hum04、BAP049-hum05、BAP049-hum06、BAP049-hum07、BAP049-hum08、BAP049-hum09、BAP049-hum10、BAP049-hum11、BAP049-hum12、BAP049-hum13、BAP049-hum14、BAP049-hum15、BAP049-hum16、BAP049-Clone-A、BAP049-Clone-B、BAP049-Clone-C、BAP049-Clone-DまたはBAP049-Clone-Eのいずれかから選択される抗体；またはUS2015/0210769号の表1に記載するようなまたは表1におけるヌクレオチド配列によりコードされる；または前記配列のいずれかと実質的に同一(例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%またはそれより高い同一性)配列を含む。

10

【0895】

TIM3(T細胞免疫グロブリン-3)も、特にIFN- γ 分泌CD4⁺ Tヘルパー1およびCD8⁺ T細胞毒性1細胞において、T細胞機能を負に制御し、T細胞枯渇に重要な役割を有する。TIM3とそのリガンド、例えば、ガレクチン-9(Gal9)、ホスファチジルセリン(PS)およびHMGB1の相互作用の阻害は免疫応答を高め得る。TIM3およびそのリガンドの抗体、抗体フラグメントおよび他の阻害剤は当分野で利用可能であり、ここに記載するCD19 CARと組み合わせて使用し得る。例えば、TIM3を標的とする抗体、抗体フラグメント、小分子またはペプチド阻害剤は、そのリガンドとの相互作用を阻害するためにTIM3のIgVドメインに結合する。TIM3を阻害する抗体およびペプチドは、WO2013/006490号およびUS20100247521号に開示されている。他の抗TIM3抗体は、RMT3-23のヒト化バージョン(Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551に開示)およびクローン8B.2C12(Monnay et al., 2002, Nature, 415:536-541に開示)を含む。TIM3およびPD-1を阻害する二特異性抗体はUS20130156774号に開示されている。

20

【0896】

ある態様において、抗TIM3抗体またはそのフラグメントは、その全体を引用により本明細書に包含させる“TIM3に対する抗体分子およびその使用”なる表題のUS2015/0218274号に記載のような抗TIM3抗体分子である。ある態様において、抗TIM3抗体分子は、ABTIM3、ABTIM3-hum01、ABTIM3-hum02、ABTIM3-hum03、ABTIM3-hum04、ABTIM3-hum05、ABTIM3-hum06、ABTIM3-hum07、ABTIM3-hum08、ABTIM3-hum09、ABTIM3-hum10、ABTIM3-hum11、ABTIM3-hum12、ABTIM3-hum13、ABTIM3-hum14、ABTIM3-hum15、ABTIM3-hum16、ABTIM3-hum17、ABTIM3-hum18、ABTIM3-hum19、ABTIM3-hum20、ABTIM3-hum21、ABTIM3-hum22、ABTIM3-hum23；またはUS2015/0218274号の表1~4に記載するような；または表1~4に記載するヌクレオチド配列ヌクレオチド配列によりコードされる；または前記配列のいずれかと実質的に同一(例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%またはそれ以上同一)である配列のいずれかから選択される抗体の重鎖および軽鎖可変領域からの少なくとも1、2、3、4、5または6CDR(または集合的にCDRのすべて)；または密接に関係するCDR、例えば、同一であるかまたは少なくとも1アミノ酸改変を有するが、改変(例えば、置換、欠失または挿入、例えば、保存的置換)が2、3または4を超えないCDRを含む。

30

40

【0897】

さらに他の態様において、抗TIM3抗体分子は、ここに記載する抗体からの少なくとも1、2、3または4可変領域、例えば、ABTIM3、ABTIM3-hum01、ABTIM3-hum02、ABTIM3-hum03、ABTIM3-hum04、ABTIM3-hum05、ABTIM3-hum06、ABTIM3-hum07、ABT

50

I M 3 - h u m 0 8、A B T I M 3 - h u m 0 9、A B T I M 3 - h u m 1 0、A B T I M 3 - h u m 1 1、A B T I M 3 - h u m 1 2、A B T I M 3 - h u m 1 3、A B T I M 3 - h u m 1 4、A B T I M 3 - h u m 1 5、A B T I M 3 - h u m 1 6、A B T I M 3 - h u m 1 7、A B T I M 3 - h u m 1 8、A B T I M 3 - h u m 1 9、A B T I M 3 - h u m 2 0、A B T I M 3 - h u m 2 1、A B T I M 3 - h u m 2 2、A B T I M 3 - h u m 2 3のいずれかから選択される抗体；またはU S 2 0 1 5 / 0 2 1 8 2 7 4号の表1～4に記載されるような；または表1～4におけるヌクレオチド配列によりコードされるような；または前記配列のいずれかと実質的に同一(例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%またはそれより高い同一性)配列を含む。

10

【0898】

他の態様において、C A R発現細胞の活性を増強する薬剤は、C E A C A M阻害剤(例えば、C E A C A M-1、C E A C A M-3および／またはC E A C A M-5阻害剤)である。ある態様において、C E A C A Mの阻害剤は、抗C E A C A M抗体分子である。抗C E A C A M-1抗体の例は、W O 2 0 1 0 / 1 2 5 5 7 1号、W O 2 0 1 3 / 0 8 2 3 6 6号、W O 2 0 1 4 / 0 5 9 2 5 1およびW O 2 0 1 4 / 0 2 2 3 3 2号に開示され、例えば、モノクローナル抗体3 4 B 1、2 6 H 7および5 F 4；または例えば、U S 2 0 0 4 / 0 0 4 7 8 5 8号、U S 7,132,255号およびW O 9 9 / 0 5 2 5 5 2号に開示のようなその組み換え形態である。他の態様において、抗C E A C A M抗体は、例えば、Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146)に記載のようにC E A C A M-5と結合するかまたは例えば、W O 2 0 1 3 / 0 5 4 3 3 1号およびU S 2 0 1 4 / 0 2 7 1 6 1 8号に記載のようにC E A C A M-1およびC E A C A M-5と交差反応する。

20

【0899】

理論に縛られることを望まないが、C E A C A M-1およびC E A C A M-5のような癌胎児性抗原細胞接着分子(C E A C A M)は、少なくとも一部、抗腫瘍免疫応答の阻害を仲介すると考えられる(例えば、Markel et al. J Immunol. 2002 Mar 15;168(6):2803-10; Markel et al. J Immunol. 2006 Nov 1;177(9):6062-71; Markel et al. Immunology. 2009 Feb;126(2):186-200; Markel et al. Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb;59(2):215-30; Ortenberg et al. Mol Cancer Ther. 2012 Jun;11(6):1300-10; Stern et al. J Immunol. 2005 Jun 1;174(11):6692-701; Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529参照)。例えば、C E A C A M-1は、T I M-3のヘテロ親和性リガンドとして、そしてT I M-3介在T細胞耐容性および枯渇に役割を有するとして記載されている(例えば、W O 2 0 1 4 / 0 2 2 3 3 2号; Huang, et al. (2014) Nature doi:10.1038/nature13848)。ある態様において、C E A C A M-1およびT I M-3の共遮断が、異種移植結腸直腸癌モデルにおいて抗腫瘍免疫応答を増強することが示されている(例えば、W O 2 0 1 4 / 0 2 2 3 3 2号; Huang, et al. (2014), supra参照)。他の態様において、C E A C A M-1およびP D-1の共遮断は、例えば、W O 2 0 1 4 / 0 5 9 2 5 1号に記載されるようにT細胞耐容性を減少させる。それゆえに、C E A C A M阻害剤を、ここに記載する他の免疫調節剤(例えば、抗P D-1および／または抗T I M-3阻害剤)と使用して、癌、例えば、黒色腫、肺癌(例えば、N S C L C)、膀胱癌、結腸癌、卵巣癌およびここに記載の他の癌に対する免疫応答を増強させ得る。

30

40

【0900】

L A G-3(リンパ球活性化遺伝子-3またはC D 2 2 3)は、C D 8⁺ T細胞枯渇に役割を有することが示されている、活性化T細胞およびB細胞に発現される細胞表面分子である。L A G-3およびそのリガンドの抗体、抗体フラグメントおよび他の阻害剤は当分野で入手可能であり、ここに記載するC D 1 9 C A Rと組み合わせて使用し得る。例えば、B M S-9 8 6 0 1 6(Bristol-Myers Squibb)は、L A G 3を標的とするモノクローナル抗体である。I M P 7 0 1(Immutep)は、アンタゴニストL A G-3抗体であり、I M P 7 3 1(ImmutepおよびGlaxoSmithKline)は枯渇性L A G-3抗体である。他のL A

50

G-3阻害剤は、LAG3の可溶性部分とMHCクラスII分子のIgの組み換え融合タンパク質であり、抗原提示細胞(APC)を活性化するIMP321(Immutep)である。他の抗体は、例えば、WO2010/019570号に開示されている。

【0901】

ある態様において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、例えば、第一ドメインおよび第二ドメインを含む融合タンパク質であってよく、ここで、第一ドメインは阻害分子またはそのフラグメントであり、第二ドメインは陽性シグナルと関係するポリペプチド、例えば、ここに記載の細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドである。ある態様において、陽性シグナルと結合するポリペプチドは、CD28、CD27、ICOSの共刺激ドメイン、例えば、CD28、CD27および／またはICOSの細胞内シグナル伝達ドメインおよび／または例えば、ここに記載する、例えば、CD3ゼータの一次シグナル伝達ドメインを含み得る。ある態様において、融合タンパク質は、CARを発現するのと同じ細胞により発現される。他の態様において、融合タンパク質は、CARを発現しない細胞、例えば、T細胞により発現される。

10

【0902】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞の活性を増強する薬剤はmiR-17-92である。

【0903】

ある態様において、ここに記載するCARの活性を増強する薬剤はサイトカインである。サイトカインは、T細胞増殖、分化、生存および恒常性に関連する重要な機能を有する。ここに記載するCAR発現細胞を受ける対象に投与できるサイトカインは、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-18およびIL-21またはこれらの組み合わせを含む。好ましい態様において、投与するサイトカインはIL-7、IL-15またはIL-21またはこれらの組み合わせである。サイトカインを、1日1回または1日1回以上、例えば、1日2回、1日3回または1日4回投与できる。サイトカインを、1日以上投与でき、例えば、サイトカインを2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間または4週間投与する。例えば、サイトカインを1日1回、7日間投与する。

20

【0904】

ある態様において、サイトカインをCAR発現T細胞と組み合わせて投与する。サイトカインを、CAR発現T細胞と同時にまたは一緒に投与でき、例えば、同じ日に投与する。サイトカインをCAR発現T細胞と同じ医薬組成物に製剤しても、別の医薬組成物に製剤してもよい。あるいは、サイトカインを、CAR発現T細胞の投与後間もなく、例えば、CAR発現T細胞投与1日、2日、3日、4日、5日、6日または7日後に投与してよい。サイトカインを1日を超える投薬レジメンで投与する態様において、サイトカイン投薬レジメンの1日目はCAR発現T細胞の投与と同じ日でよくまたはサイトカイン投薬レジメンの1日目は、CAR発現T細胞の投与1日、2日、3日、4日、5日、6日または7日後であってよい。ある態様において、1日目に、CAR発現T細胞を対象に投与し、2日目に、サイトカインを1日1回、翌7日間投与する。好ましい態様において、CAR発現T細胞と組み合わせて投与するサイトカインはIL-7、IL-15またはIL-21である。

30

40

【0905】

他の態様において、サイトカインを、CAR発現細胞の投与から一定期間後、例えば、CAR発現細胞の投与から少なくとも2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月または1年またはそれ以上の後に投与する。ある態様において、サイトカインを、CAR発現細胞に対する対象の応答の評価後に投与する。例えば、対象にここに記載する用量およびレジメンに従い、CAR発現細胞を投与する。CAR発現細胞療法に対する対象の応答を、腫瘍増殖阻止、循環腫瘍細胞減少または腫瘍退縮を含む、ここに記載する方法のいずれかを使用して、CAR発現細胞の投与2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、1

50

0 週間、1 2 週間、4 ヶ月、5 ヶ月、6 ヶ月、7 ヶ月、8 ヶ月、9 ヶ月、1 0 ヶ月、1 1 ヶ月または1 年またはそれ以上後に評価する。C A R 発現細胞療法に対して十分な応答を示さない対象にサイトカインを投与し得る。C A R 発現細胞療法に対して応答が最適以下である対象へのサイトカインの投与は、C A R 発現細胞有効性または抗癌活性を改善する。好ましい態様において、C A R 発現細胞の投与後に投与するサイトカインは I L - 7 である。

【0 9 0 6】

C D 1 9 阻害剤との組み合わせ

ここに開示する方法および組成物を、C D 1 9 阻害剤と組み合わせで使用できる。ある態様において、ここに記載する C A R 含有細胞、例えば、N K R - C A R 含有細胞および C D 1 9 阻害剤(例えば、C D 1 9 と結合する C A R 分子を発現する 1 以上の細胞、例えば、ここに記載する C D 1 9 と結合する C A R 分子)を、同時にもしくは一緒にまたは逐次的に投与する。

10

【0 9 0 7】

ある態様において、ここに記載する C A R 含有細胞および C D 1 9 阻害剤を、対象に同時にまたは一緒に注入し、例えば、同じ注入容積に混合する。例えば、C A R 含有細胞および C D 1 9 C A R 含有細胞の集団と一緒に混合する。あるいは、ここに記載する C A R および C D 1 9 C A R を共発現する細胞集団を投与する。他の態様において、同時投与は、例えば、予定した間隔(例えば、互いに 1 5 分、3 0 分または 4 5 分以内)の、C A R 含有細胞および C D 1 9 阻害剤の別々の投与を含む。

20

【0 9 0 8】

ある態様において、C A R 含有細胞の開始および C D 1 9 阻害剤の開始は、互いに 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間、1 2 時間、1 8 時間または 2 4 時間以内または互いに 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、1 0 日、1 5 日、2 0 日、2 5 日、3 0 日、3 5 日、4 0 日、6 0 日、8 0 日または 1 0 0 日以内である。ある態様において、C A R 含有細胞送達の終了および C D 1 9 阻害剤送達の終了は互いに 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間、1 2 時間、1 8 時間または 2 4 時間以内または互いに 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、1 0 日、1 5 日、2 0 日、2 5 日、3 0 日、3 5 日、4 0 日、6 0 日、8 0 日または 1 0 0 日以内である。ある態様において、C A R 含有細胞送達(例えば、注入)および C D 1 9 阻害剤送達(例えば、注入)終了の期間の重複は、少なくとも 1 分、2 分、3 分、4 分、5 分、1 0 分、1 5 分、2 0 分、2 5 分、3 0 分である。ある態様において、C D 1 9 阻害剤を、C A R 含有細胞の前に投与する。他の態様において、C A R 含有細胞を、C D 1 9 阻害剤の前に投与する。

30

【0 9 0 9】

ある態様において、C A R 含有細胞を、C D 1 9 阻害剤(例えば、C D 1 9 C A R 分子を発現する 1 以上の細胞)が対象に存在する(例えば、拡張を受けている細胞)間に投与する。他の態様において、C D 1 9 阻害剤(例えば、C D 1 9 C A R 分子を発現する 1 以上の細胞)を、C A R 含有細胞が対象に存在する(例えば、拡張を受けている細胞)間に投与する。

【0 9 1 0】

C D 1 9 阻害剤は、C D 1 9 C A R 発現細胞、例えば、C D 1 9 C A R T 細胞または抗 C D 1 9 抗体(例えば、抗 C D 1 9 単または二特異的抗体)またはそのフラグメントまたはコンジュゲートを含むが、これらに限定されない。

40

【0 9 1 1】

ある態様において、ここに記載する C A R 発現細胞を、C D 1 9 C A R 細胞(例えば、C A R T 細胞)と組み合わせで対象に投与する(例えば、引用により本明細書に包含させる、W O 2 0 1 2 / 0 7 9 0 0 0 号に記載のような、例えば、C T L 0 1 9)。

【0 9 1 2】

他の態様において、ここに記載する C A R 発現細胞を、引用により本明細書に包含させる W O 2 0 1 4 / 1 5 3 2 7 0 号(例えば、W O 2 0 1 4 / 1 5 3 2 7 0 号の表 3)に記載

50

するような、ヒト化抗原結合ドメインを含むCD19 CAR細胞(例えば、CAR T細胞)と組み合わせて対象に投与する。

【0913】

CD19阻害剤(例えば、第一CD19 CAR発現細胞)および第二CAR発現細胞は、同一細胞型または異なる細胞型により発現され得る。例えば、ある態様において、CD19 CARを発現する細胞はCD4+ T細胞であり、ここに記載するCARを発現する細胞はCD8+ T細胞であるかまたはCD19 CARを発現する細胞はCD8+ T細胞であり、ここに記載するCARを発現する細胞はCD4+ T細胞である。他の態様において、CD19 CARを発現する細胞はT細胞であり、ここに記載するCARを発現する細胞はNK細胞であるかまたはCD19 CARを発現する細胞はNK細胞であり、ここに記載するCARを発現する細胞はT細胞である。他の態様において、CD19

10

CARを発現する細胞およびここに記載するCARを発現する細胞は両者ともNK細胞であるかまたは両者ともT細胞であり、例えば、両者ともCD4+ T細胞または両者ともCD8+ T細胞である。さらに他の態様において、単一細胞がCD19 CARおよびここに記載するCARを発現し、この細胞は、例えば、NK細胞またはCD4+ T細胞またはCD8+ T細胞のようなT細胞である。

【0914】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、CD19 CAR T細胞(例えば、引用により本明細書に包含するWO2012/079000号に記載のような、例えば、CTL019)と組み合わせて対象に投与する。ある態様において、対象は急性骨髄性白血病(AML)、例えば、CD19陽性AMLまたはCD19陰性AMLを有する。ある態様において、対象は、CD19+リンパ腫、例えば、CD19+非ホジキンリンパ腫(NHL)、CD19+ FLまたはCD19+ DLBCLを有する。ある態様において、対象は再発性または難治性CD19+リンパ腫を有する。ある態様において、リンパ球枯渇性化学療法剤を、CD19 CAR T細胞の投与前、同時または後に投与(例えば、注入)する。一例において、リンパ球枯渇性化学療法剤を、CD19 CAR T細胞の投与前に対象に投与する。例えば、リンパ球枯渇性化学療法剤は、CD19 CAR T細胞注入1~4日(例えば1日、2日、3日または4日)前に終わる。ある態様において、複数用量のCD19 CAR T細胞を、例えば、ここに記載するように、投与する。例えば、単一用量は、約 5×10^8 CD19 CAR T細胞を含む。ある態様において、リンパ球枯渇性化学療法剤を、ここに記載するCAR発現細胞、例えば、非CD19 CAR発現細胞の投与(例えば、注入)前、同時または後に対象に投与する。ある態様において、CD19 CAR Tを、非CD19 CAR発現細胞、例えば、ここに記載する非CD19 CAR発現細胞の投与(例えば、注入)前、同時または後に対象に投与する。

20

30

【0915】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞を、ここに記載する腫瘍抗原の発現と関係する疾患、例えば、ここに記載する癌の処置のために、CD19 CAR発現細胞、例えば、引用により本明細書に包含させる、WO2012/079000号に記載のような、例えば、CTL019と組み合わせて対象に投与する。理論に縛られることを望まないが、CD19 CAR発現細胞をCAR発現細胞と組み合わせて投与することは、初期細胞系譜癌細胞、例えば、癌幹細胞のターゲティング、免疫応答調節、制御性B細胞枯渇および/または腫瘍微小環境改善により、ここに記載するCAR発現細胞の効力を改善すると考えられる。例えば、CD19 CAR発現細胞は、初期細胞系譜マーカー、例えば、癌幹細胞およびCD19発現細胞を発現する癌細胞を標的とし、一方ここに記載するCAR発現細胞は、後期細胞系譜マーカー、例えば、CD123を発現する癌細胞を標的とする。このプレコンディショニングアプローチは、ここに記載するCAR発現細胞の効果を改善できる。このような態様において、CD19 CAR発現細胞を、ここに記載するCAR発現細胞の投与(例えば、注入)の前に、同時にまたは後に投与する。

40

【0916】

ある態様において、ここに記載するCAR発現細胞は、CD19を標的とするCAR、

50

例えば、CD19 CARも発現する。ある態様において、ここに記載するCARを発現する細胞およびCD19 CARを、ここに記載する癌、例えば、AMLの処置のために対象に投与する。ある態様において、一方または両方のCAR分子の配置は、初代細胞内シグナル伝達ドメインおよび共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。他の態様において、一方または両方のCAR分子の配置は、初代細胞内シグナル伝達ドメインおよび2以上、例えば、2、3、4または5またはそれ以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。このような態様において、ここに記載するCAR分子およびCD19 CARは、同一または異なる初代細胞内シグナル伝達ドメイン、同一または異なる共刺激性シグナル伝達ドメインまたは同数または異なる数の共刺激性シグナル伝達ドメインを有し得る。あるいは、ここに記載するCARおよびCD19 CARは、スプリットCARとして配置され、そこで、CAR分子の一方は抗原結合ドメインおよび共刺激ドメイン(例えば、4-1BB)を含み、他のCAR分子は抗原結合ドメインおよび初代細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3ゼータ)を含む。

10

【0917】

ある態様において、ここに記載するCARおよび第二CAR、例えば、CD19 CARは同じベクターにあるか2の異なるベクターにある。ここに記載するCARおよび第二CAR、例えば、CD19 CARが同じベクターにある態様において、ここに記載するCARおよび第二CAR、例えば、CD19 CARをコードする核酸配列は同じフレームにあり、1以上のペプチド開裂部位、例えば、P2Aにより離されている。

20

【0918】

他の態様において、ここに開示するCAR発現細胞を、抗CD19抗体阻害剤と組み合わせて投与する。ある態様において、抗CD19抗体は、引用により本明細書に包含させる、WO2014/153270号(例えば、WO2014/153270号の表3)に記載のヒト化抗原結合ドメインまたはそのコンジュゲートである。他の例示的抗CD19抗体またはフラグメントまたはそのコンジュゲートは、ブリナツモマブ、SAR3419(Sanofi)、MEDI-551(MedImmune LLC)、Combotox、DT2219ARL(Masonic Cancer Center)、MOR-208(別名XmAb-5574; MorphoSys)、XmAb-5871(Xencor)、MDX-1342(Bristol-Myers Squibb)、SGN-CD19A(eattle Genetics)およびAFM11(Affimed Therapeutics)を含む。例えば、Hammer, M. Abs. 4.5(2012): 571-77参照。ブリナツモマブは、2scFvからなる二特異的抗体である。CD19に結合するものおよびCD3に結合するもの。ブリナツモマブは、癌細胞を攻撃するようT細胞に指示する。例えば、Hammer et al.; Clinical Trial Identifier No. NCT00274742およびNCT01209286参照。MEDI-551は、抗体依存性細胞介在細胞毒性(ADCC)を増強するようFc操作されたヒト化抗CD19抗体である。例えば、Hammer et al.; and Clinical Trial Identifier No. NCT01957579参照。Combotoxは、CD19およびCD22に結合する免疫毒素の混合物である。免疫毒素は、脱グリコシル化リシンA鎖に融合したscFv抗体フラグメントからなる。例えば、Hammer et al.; and Herrera et al. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 31.12(2009):936-41; Schindler et al. Br. J. Haematol. 154.4(2011):471-6参照。DT2219ARLは、CD19およびCD22を標的化し、2scFvsおよび切断型ジフテリア毒素を含む、二重特異性免疫毒素である。例えば、Hammer et al.; and Clinical Trial Identifier No. NCT00889408参照。SGN-CD19Aは、合成細胞毒性細胞致死剤、モノメチルオーリスチンF(MMAF)と連結した抗CD19ヒト化モノクローナル抗体からなる抗体-薬物コンジュゲート(ADC)である。例えば、Hammer et al.; and Clinical Trial Identifier Nos. NCT01786096 and NCT01786135参照。SAR3419は、開裂可能リンカーによりメイタンシン誘導体にコンジュゲートした抗CD19ヒト化モノクローナル抗体を含む抗CD19抗体-薬物コンジュゲート(ADC)である。例えば、Younes et al. J. Clin. Oncol. 30.2(2012): 2776-82; Hammer et al.; Clinical Trial Identifier No. NCT00549185; and Blanc et al. Clin Cancer Res. 2011;17:6448-58参照。XmAb-5871は、Fc操作、ヒト化抗CD19抗体である。例えば、Hammer et al.参照。MDX-13

30

40

50

42は、ADCCが増強されたヒトFc操作抗CD19抗体である。例えば、Hammer et al.参照。ある態様において、抗体分子は二特異的抗CD19および抗CD3分子である。例えば、AFM11は、CD19およびCD3を標的とする二特異的抗体である。例えば、Hammer et al.; and Clinical Trial Identifier No. NCT02106091参照。ある態様において、ここに記載する抗CD19抗体を、治療剤、例えば、化学療法剤、ペプチドワクチン(例えばIzumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971に記載のもの)、免疫抑制剤または免疫除去剤、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸、FK506、CAMPATH、抗CD3抗体、cytoxin、フルダラビン、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228またはサイトカインとコンジュゲートまたは他の方法で結合させる。

10

【0919】

低い免疫増強用量のmTOR阻害剤との組み合わせ

ここに記載する方法は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、RAD001のようなラパログを含むアロステリックmTOR阻害剤を使用する。低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与(例えば、それ自体、免疫系を完全に抑制するには不十分であるが、免疫機能の改善に十分である用量)は、対象における免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはCAR発現細胞の性能を最適化できる。mTOR阻害を測定する方法、用量、処置レジメンおよび適当な医薬組成物は、引用により本明細書に包含させる米国特許出願2015/01240036号に記載される。

【0920】

20

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、次の1以上をもたらし得る。

- i) PD-1陽性免疫エフェクター細胞の数の減少；
 - ii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞の数の増加；
 - iii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞／PD-1陽性免疫エフェクター細胞比の増加；
 - iv) ナイーブT細胞の数の増加；
 - v) 1以上の次のマーカーの発現の増加：例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、CD62L^高、CD127^高、CD27⁺およびBCL2；
 - vi) 例えば、記憶T細胞、例えば、記憶T細胞前駆体の、KLRG1の発現減少；または
 - vii) 次の特徴のいずれか一つまたは組み合わせを有する記憶T細胞前駆体、例えば、細胞の数の増加：増加したCD62L^高、増加したCD127^高、増加したCD27⁺、減少したKLRG1および増加したBCL2；
- ここで、前記、例えば、i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi)またはvii)のいずれかは、例えば、非処置対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に生じる。

30

【0921】

他の態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、非処置CAR発現細胞または非処置対象と比較して、例えば、培養または対象において、CAR発現細胞の増殖増加または延長をもたらす。ある態様において、増殖増加は、CAR発現細胞の数の増加と関係する。増殖の増加または延長を測定する方法は実施例9および10に記載する。他の態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、非処置CAR発現細胞または非処置対象と比較して、例えば、培養または対象において、CAR発現細胞による癌細胞死の増加をもたらす。ある態様において、癌細胞死の増加は、腫瘍体積減少と関係する。癌細胞死増加を測定する方法は、実施例2に記載する。

40

【0922】

ある態様において、CAR分子、例えば、ここに記載するCAR分子を発現する細胞を、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリックmTOR阻害剤、例えば、RAD001または触媒的mTOR阻害剤と組み合わせ投与する。例えば、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、ここに記載するCAR発現細胞の投与前に解しでき；ここに記載するCAR発現細胞の投与前に終了でき；ここに記載するCAR発現細胞の投与と同時に介しでき；ここに記載するCAR発現細胞の投与と重複でき；またはここに

50

記載するCAR発現細胞の投与後継続できる。

【0923】

これとは別にまたはこれに加えて、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、ここに記載するCAR分子を発現するよう操作した免疫エフェクター細胞を最適化できる。このような態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒的阻害剤の投与を、ここに記載するCAR分子を発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の対象からの採取前に開始または完了する。

【0924】

他の態様において、ここに記載するCAR分子を発現するように操作する免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞は、例えば、対象から採取後またはCAR発現免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の、例えば、対象への投与前、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤存在下で培養できる。

【0925】

ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、週に1回、例えば、即時放出剤形で、0.1～20mg、0.5～10mg、2.5～7.5mg、3～6mgまたは約5mgのRAD001またはそれと生物学的同等用量で投与することを含む。ある態様において、対象への低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投与は、例えば、週に1回、例えば、持続放出性剤形で、0.3～60mg、1.5～30mg、7.5～22.5mg、9～18mgまたは約15mgのRAD001またはそれと生物学的同等用量の投与を含む。

【0926】

ある態様において、mTOR阻害剤の用量は、少なくとも5%であるが、90%を超えない、少なくとも10%であるが、90%を超えない、少なくとも15%であるが、90%を超えない、少なくとも20%であるが、90%を超えない、少なくとも30%であるが、90%を超えない、少なくとも40%であるが、90%を超えない、少なくとも少なくとも50%であるが、90%を超えない、少なくとも60%であるが、90%を超えない、少なくとも少なくとも70%であるが、90%を超えない、少なくとも5%であるが、80%を超えない、少なくとも10%であるが、80%を超えない、少なくとも15%であるが、80%を超えない、少なくとも20%であるが、80%を超えない、少なくとも30%であるが、80%を超えない、少なくとも40%であるが、80%を超えない、少なくとも50%であるが、80%を超えない、少なくとも5%であるが、70%を超えない、少なくとも10%であるが、70%を超えない、少なくとも15%であるが、70%を超えない、少なくとも20%であるが、70%を超えない、少なくとも30%であるが、70%を超えない、少なくとも40%であるが、70%を超えない、少なくとも50%であるが、70%を超えない、少なくとも5%であるが、60%を超えない、少なくとも10%であるが、60%を超えない、少なくとも15%であるが、60%を超えない、少なくとも20%であるが、60%を超えない、少なくとも30%であるが、60%を超えない、少なくとも40%であるが、60%を超えない、少なくとも5%であるが、50%を超えない、少なくとも10%であるが、50%を超えない、少なくとも15%であるが、50%を超えない、少なくとも20%であるが、50%を超えない、少なくとも30%であるが、50%を超えない、少なくとも40%であるが、50%を超えない、少なくとも5%であるが、40%を超えない、少なくとも10%であるが、40%を超えない、少なくとも15%であるが、40%を超えない、少なくとも20%であるが、40%を超えない、少なくとも30%であるが、40%を超えない、少なくとも35%であるが、40%を超えない、少なくとも5%であるが、30%を超えない、少なくとも10%であるが、30%を超えない、少なくとも15%であるが、30%を超えない、少なくとも20%であるが、30%を超えないまたは少なくとも25%であるが、30%を超えないmTOR阻害と関係するまたは提供する。

【0927】

mTOR阻害の程度は、P70 S6キナーゼ阻害の程度により伝達または対応されえて、例えば、mTOR阻害の程度は、P70 S6キナーゼ活性における低下レベルにより、例えば、P70 S6キナーゼ基質のリン酸化の減少により決定できる。mTOR阻害のレベルは、引用により本明細書に包含させる米国特許出願2015/0124003号にまたは引用により本明細書に包含させる米国特許7,727,950号に記載のようなBoulayアッセイによるP70 S6キナーゼ活性の測定；ウェスタンブロットによるリン酸化S6レベルの測定；またはPD1陰性免疫エフェクター細胞対PD1陽性免疫エフェクター細胞比の変化の評価のような種々の方法により評価できる。

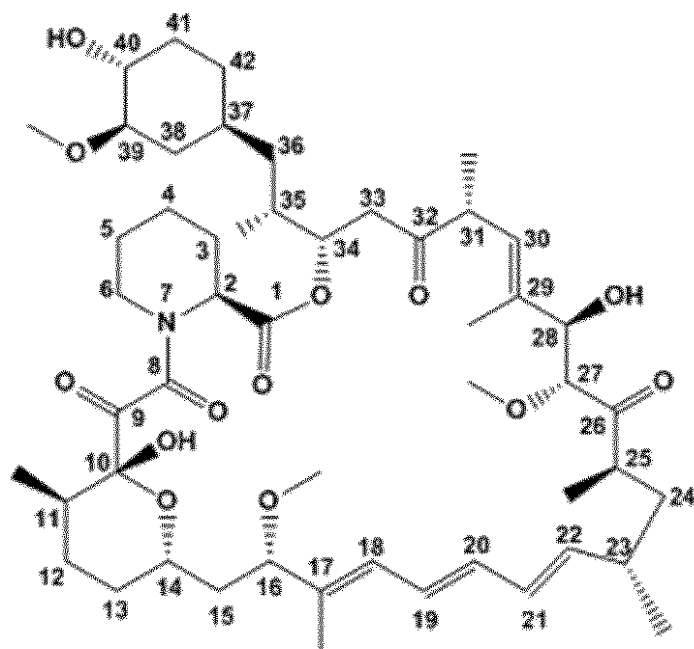
【0928】

ここで使用する用語“mTOR阻害剤”は、細胞におけるmTORキナーゼを阻害する、化合物またはリガンドまたはその薬学的に許容される塩をいう。ある態様において、mTOR阻害剤は、アロステリック阻害剤である。アロステリックmTOR阻害剤は、中性三環式化合物ラパマイシン(シロリムス)、例えば、ラパマイシン誘導体、ラパマイシンアナログ(ラパログとも称する)およびmTOR活性を阻害する他のマクロライド化合物を含む、ラパマイシンと構造的および機能的類似性を有する化合物であるラパマイシン関連化合物を含む。ある態様において、mTOR阻害剤は、触媒的阻害剤である。

【0929】

ラパマイシンは、式Aに示す構造を有する、ストレプトミセス・ハイグロスコピクスにより産生されるマクロライド抗生物質である。

【化10】



(A)

【0930】

例えば、McAlpine, J.B., et al., J. Antibiotics (1991) 44: 688; Schreiber, S.L., et al., J. Am. Chem. Soc. (1991) 113: 7433; 米国特許3,929,992号参照。ラパマイシンについて種々のナンバリングスキームが提唱されている。混乱を避けるため、特定のラパマイシンアナログをここで命名するとき、名称は、式Aのナンバリングスキームを使用したラパマイシンを参照して付与する。

【0931】

本発明において有用なラパマイシンアナログは、例えば、本発明において有用なラパマイシンアナログは、例えば、ラパマイシンのシクロヘキシル環上のヒドロキシ基がOR₁ (ここで、R₁はヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルコキシアルキル、アシルアミノアルキルまたはアミノアルキルである)で置き換えられているO-置換アナログ；例えば引

用により本明細書に包含させる、US 5,665,772号およびWO 94/09010号に記載のような、エペロリムスとして知られるRAD001である。他の適当なラパマイシンアナログは、26位または28位が置換されたものを含む。ラパマイシンアナログは、例えば、内容を引用により本明細書に包含させるUS 6,015,815号、WO 95/14023号およびWO 99/15530号に記載のような、上記アナログのエピマー、特に40位、28位または26位が置換され、場合によりさらに水素化されていてよいアナログのエピマーであってよく、例えばゾタロリムスとしても知られるABT 578またはその内容を引用により本明細書に包含させるUS 7,091,213号、WO 98/02441号およびWO 01/14387号に記載のラパマイシンアナログ、例えばリダフォロリムスとしても知られるAP 23573である。

10

【0932】

US 5,665,772号からの、本発明における使用に適するラパマイシンアナログの例は、40-O-ベンジル-ラパマイシン、40-O-(4'-ヒドロキシメチル)ベンジル-ラパマイシン、40-O-[4'-(1,2-ジヒドロキシエチル)]ベンジル-ラパマイシン、40-O-アリル-ラパマイシン、40-O-[3'-(2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4(S)-イル)-プロプ-2'-エン-1'-イル]-ラパマイシン、(2'E,4'S)-40-O-(4',5'-ジヒドロキシペン-2'-エン-1'-イル)-ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシ)エトキシカルボニルメチル-ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-(3-ヒドロキシ)プロピル-ラパマイシン、40-O-(6-ヒドロキシ)ヘキシル-ラパマイシン、40-O-
[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-[(3S)-2,2-ジメチルジオキサラン-3-イル]メチル-ラパマイシン、40-O-[(2S)-2,3-ジヒドロキシプロプ-1-イル]-ラパマイシン、40-O-(2-アセトキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-(2-ニコチノイルオキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-
[2-(N-モルホリノ)アセトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-(2-N-イミダゾリルアセトキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-[2-(N-メチル-N'-ピペラジニル)アセトキシ]エチル-ラパマイシン、39-O-デスメチル-39,40-O, O-エチレン-ラパマイシン、(26R)-26-ジヒドロ-40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-(2-アミノエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-アセトアミノエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-ニコチンアミドエチル)-ラパマイ
シン、40-O-(2-(N-メチル-イミダゾ-2'-イルカルベトキサミド)エチル)-ラパマイシン、40-O-(2-エトキシカルボニルアミノエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-トリルスルホンアミドエチル)-ラパマイシンおよび40-O-[2-(4',5'-ジカルボエトキシ-1',2',3'-トリアゾール-1'-イル)-エチル]-ラパ
マイシンを含むが、これらに限定されない。

20

30

【0933】

本発明において有用な他のラパマイシンアナログは、ラパマイシンのシクロヘキシル環上のヒドロキシ基および/または28位のヒドロキシ基がヒドロキシエステル基で置き換えられたアナログが知られ、例えば、US RE 44,768号に見られるラパマイシンアナログ、例えばテムシロリムスである。

40

【0934】

本発明において有用な他のラパマイシンアナログは、16位のメトキシ基が他の置換基、好ましくは(場合によりヒドロキシ置換)アルキニルオキシ、ベンジル、オルトメトキシベンジルまたはクロロベンジルにより置き換えられているおよび/または39位のメトキシ基が39炭素と共に除去され、ラパマイシンのシクロヘキシル環が39位のメトキシ基を欠くシクロペンチル環になるものを含む；例えばその内容を引用により本明細書に包含するWO 95/16691号およびWO 96/41807号に記載のような。アナログは、ラパマイシンの40位のヒドロキシがアルキル化されおよび/または32-カルボニルが還元されるようにさらに修飾され得る。

【0935】

50

WO 95/16691号からのラパマイシンアナログは、16-デメトキシ-16-(ペント-2-イニル)オキシ-ラパマイシン、16-デメトキシ-16-(ブト-2-イニル)オキシ-ラパマイシン、16-デメトキシ-16-(プロパルギル)オキシ-ラパマイシン、16-デメトキシ-16-(4-ヒドロキシ-ブト-2-イニル)オキシ-ラパマイシン、16-デメトキシ-16-ベンジルオキシ-40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン、16-デメトキシ-16-ベンジルオキシ-ラパマイシン、16-デメトキシ-16-オルト-メトキシベンジル-ラパマイシン、16-デメトキシ-40-O-(2-メトキシエチル)-16-ペント-2-イニル)オキシ-ラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-ホルミル-42-ノル-ラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-ヒドロキシメチル-42-ノル-ラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-カルボキシ-42-ノル-ラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)カルボニル-42-ノル-ラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-(モルホリン-4-イル)カルボニル-42-ノル-ラパマイシン、39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-[N-メチル、N-(2-ピリジン-2-イル-エチル)]カルバモイル-42-ノル-ラパマイシンおよび39-デメトキシ-40-デスオキシ-39-(p-トルエンスルホニルヒドラゾノメチル)-42-ノル-ラパマイシンを含むが、これらに限定されない。

【0936】

WO 96/41807号からのラパマイシンアナログは、32-デオキソ-ラパマイシン、16-O-ペント-2-イニル-32-デオキソ-ラパマイシン、16-O-ペント-2-イニル-32-デオキソ-40-O-(2-ヒドロキシ-エチル)-ラパマイシン、16-O-ペント-2-イニル-32-(S)-ジヒドロ-40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン、32(S)-ジヒドロ-40-O-(2-メトキシ)エチル-ラパマイシンおよび32(S)-ジヒドロ-40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシンを含むが、これらに限定されない。

【0937】

他の適当なラパマイシンアナログは、その内容を引用により本明細書に包含させるUS 2005/0101624号に記載のようなウミロリムスである。

【0938】

エベロリムス(アフィニール(登録商標))としても知られるRAD001は、化学名(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-12-{(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチルエチル}-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-11,36-ジオキサ-4-アザ-トリシクロ[3.0.3.1.0^{4,9}.9]ヘキサトリアコンタ-16,24,26,28-テトラエン-2,3,10,14,20-ペンタオンを有する。

【0939】

アロステリックmTOR阻害剤のさらなる例は、シロリムス(ラパマイシン、AY-22989)、40-[3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロパノエト]-ラパマイシン(テムシロリムスまたはCCI-779とも呼ばれる)およびリダフォロリムス(AP-23573/MK-8669)を含む。アロステリックmTOR阻害剤のさらなる例は、ゾタロリムス(ABT578)およびウミロリムスを含む。

【0940】

これとは別にまたはこれに加えて、触媒的、ATP競合的mTOR阻害剤が、mTORキナーゼドメインを直接標的とし、かつmTORC1およびmTORC2の両者を標的とすることが判明している。これらはまた、4EBP1-T37/46リン酸化およびキャップ依存性翻訳のようなラパマイシン耐性mTORC1アウトプットを調節するために、ラパマイシンのようなアロステリックmTOR阻害剤よりもmTORC1の効果的な阻害剤である。

【0941】

触媒的阻害剤は、BEZ235または2-メチル-2-[4-(3-メチル-2-オキソ-8-キノリン-3-イル)-2,3-ジヒドロイミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]-フェニル]-プロピオニトリルまたはモノトシル酸塩形態(BEZ235の合成はWO2006/122806号に記載);CCG168(AZD-8055としても知られる、Chresta, C.M., et al., Cancer Res, 2010, 70(1), 288-298)であり、これは、化学名{5-[2,4-ビス-((S)-3-メチル-モルホリン-4-イル)-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル]-2-メトキシ-フェニル}-メタノール;3-[2,4-ビス[(3S)-3-メチル-モルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル]-N-メチルベンズアミド(WO09104019号);3-(2-アミノベンゾ[d]オキサゾール-5-イル)-1-イソプロピル-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-アミン(WO10051043号およびWO2013023184号);N-(3-(N-(3-((3,5-ジメトキシフェニル)アミノ)キノキサリン-2-イル)スルファモイル)フェニル)-3-メトキシ-4-メチルベンズアミド(WO07044729号およびWO12006552号);PKI-587(Venkatesan, A.M., J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645)であり、これは、化学名1-[4-[4-(ジメチルアミノ)ピペリジン-1-カルボニル]フェニル]-3-[4-(4,6-ジモルホリノ-1,3,5-トリアジン-2-イル)フェニル]尿素;GSK-2126458(ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43)であり、これは、化学名2,4-ジフルオロ-N-{2-メトキシ-5-[4-(4-ピリダジニル)-6-キノリニル]-3-ピリジニル}ベンゼンスルホンアミド;5-(9-イソプロピル-8-メチル-2-モルホリノ-9H-プリン-6-イル)ピリミジン-2-アミン(WO10114484号);(E)-N-(8-(6-アミノ-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-イル)-1-(6-(2-シアノプロパン-2-イル)ピリジン-3-イル)-3-メチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-2(3H)-イリデン)シアナミド(WO12007926号)を含む。

10

20

【0942】

触媒的mTOR阻害剤のさらなる例は、8-(6-メトキシ-ピリジン-3-イル)-3-メチル-1-(4-ピペラジン-1-イル-3-トリフルオロメチル-フェニル)-1,3-ジヒドロイミダゾ[4,5-c]キノリン-2-オン(WO2006/122806号)およびKu-0063794(Garcia-Martinez JM, et al., Biochem J., 2009, 421(1), 29-42)を含む。Ku-0063794は、哺乳動物ラパマイシンの標的(mTOR)の特異的阻害剤である。WYE-354は、触媒的mTOR阻害剤の他の例である(Yu K, et al. (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15): 6232-6240)。

30

【0943】

本発明によって有用なmTOR阻害剤はまた、前記のいずれかのプロドラッグ、誘導体、薬学的に許容される塩そのアナログも含む。

【0944】

RAD001のようなmTOR阻害剤は、ここに記載する特定の用量に基づき、当分野で十分に確立された方法に基づき送達用に製剤され得る。特に、US特許6,004,973号(引用により本明細書に包含させる)は、ここに記載するmTOR阻害剤で使用する製剤例を提供する。

40

【0945】

医薬組成物および処置

本発明の医薬組成物は、ここに記載のように、CAR発現細胞、例えば、複数のCAR発現細胞を、1以上の薬学的にまたは生理学的に許容される担体、希釈剤または添加物と組み合わせて含む。このような組成物は、中性緩衝化食塩水、リン酸緩衝化食塩水などのような緩衝液;グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールのような炭水化物;タンパク質;グリシンのようなポリペプチドまたはアミノ酸;抗酸化

50

剤；EDTAまたはグルタチオンのようなキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および防腐剤を含み得る。本発明の組成物は、一つの面において静脈内投与用に製剤される。

【0946】

本発明の医薬組成物を、処置する（または予防する）疾患に適する方法で投与し得る。投与の量および頻度は、患者の状態および患者の疾患のタイプおよび重症度のような因子により決定されるが、適切な用量は、臨床試験により決定され得る。

【0947】

ある態様において、医薬組成物は、例えば、エンドトキシン、マイコプラズマ、複製可能レンチウイルス(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留抗CD3／抗CD28被覆ビーズ、マウス抗体、貯留ヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地要素、ベクターパッケージング細胞またはプラスミド成分、細菌および真菌からなる群から選択される汚染物が実質的にない、例えば、検出可能なレベルで存在しない。ある態様において、細菌は、アルガリゲネス・フェカリス、カンジダ・アルビカンズ、エシェリキア・コリ、ヘモフィルス・インフルエンザエ、ナイセリア・メニンギティディス、シュドモナス・エルジノーサ、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ニューモニエおよびストレプトコッカス・ピオゲネスA群からなる群から選択される少なくとも1つである。

【0948】

“免疫学的に有効量”、“抗腫瘍有効量”、“腫瘍阻害有効量”または“治療量”が示されるとき、本発明の組成物の投与すべき正確な量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染の程度または転移および患者(対象)の状態の個体差を考慮して医師が決定できる。ここに記載する免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を含む医薬組成物を、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg体重、好ましくは $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重の範囲の用量で、これらの範囲内の全整数値を含み、投与し得ると一般に述べることができる。T細胞組成物を、また、この用量で複数回投与し得る。細胞を、免疫療法において一般に知られる注入技術を使用して投与できる(例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988 参照)。特定の患者についての最適用量および処置レジメンは、疾患の兆候についての患者のモニタリングにより当業者により容易に決定でき、それに応じて処置を調節する。

【0949】

ある態様において、CAR細胞(例えば、NKR-CAR細胞、例えば、KIR-CAR細胞)の用量は、約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 または 5×10^8 細胞/kgを含む。ある態様において、CAR細胞(例えば、NKR-CAR細胞、例えば、KIR-CAR細胞)の用量は、少なくとも約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 または 5×10^8 細胞/kgである。ある態様において、CAR細胞(例えば、NKR-CAR細胞、例えば、KIR-CAR細胞)の用量は、約 $1.1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^7$ 細胞/kgを含む。ある態様において、CAR細胞(例えば、NKR-CAR細胞、例えば、KIR-CAR細胞)の用量は、約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 または 5×10^9 細胞を含む。ある態様において、CAR細胞(例えば、NKR-CAR細胞、例えば、KIR-CAR細胞)の用量は、少なくとも約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 または 5×10^9 細胞を含む。ある態様において、CAR細胞(例えば、NKR-CAR細胞、例えば、KIR-CAR細胞)の用量は、最大約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 $2 \times$

10^9 または 5×10^9 細胞を含む。

【0950】

細胞を、免疫療法で一般的に知られる注入技術を使用して投与できる(例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988参照)。

【0951】

ある態様において、活性化CAR発現細胞を対象に投与し、次いで血液を再採血し(またはアフレスシスを実施し)、本発明により細胞を活性化し、これらの活性化および拡張細胞を患者に再注入することが望ましいことがある。この工程を、数週間毎に複数回実施できる。ある態様において、T細胞を、10cc~400ccの採血した血液から活性化できる。ある態様において、T細胞を、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90ccまたは100ccの採血した血液から活性化する。理論に縛られないが、この複数採血/複数再注入プロトコルの使用は、T細胞のある集団の選抜に役立ち得る。

【0952】

対象組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、留置または移植を含む、任意の簡便な方法により実施し得る。ここに記載する組成物を、患者に経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内(i.v.)注射によりまたは腹腔内に投与し得る。ある態様において、本発明のCAR発現細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)組成物を、患者に皮内または皮下注射により投与する。他の態様において、本発明のCAR発現細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)組成物を、好ましくはi.v.注射により投与する。CAR発現細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の組成物を、腫瘍、リンパ節または感染部位に直接注射し得る。

【0953】

本発明のある態様において、ここに記載する方法またはT細胞が治療レベルに拡張される当分野で知られる他の方法を使用して活性化および拡張した細胞を、患者に、抗ウイルス治療、シドフォビルおよびインターロイキン-2、MS患者のためのシタラビン(別名ARA-C)またはナタリズマブ処置または乾癬患者のためのエファリズマブ処置またはPML患者のための他の処置を含むが、これらに限定されない、任意の数の関連する処置モダリティと組み合わせて(例えば、前に、同時にまたは後に)投与する。さらなる態様において、本発明のT細胞を、化学療法、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸およびFK506のような免疫抑制性剤、抗体またはキャンパス、抗CD3抗体または他の抗体治療剤のような他の免疫除去剤、cytotoxicin、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および照射と組み合わせて使用し得る。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンを阻害するか(シクロスポリンおよびFK506)または増殖因子誘発シグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する(ラパマイシン)(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)。さらなる態様において、本発明の細胞組成物を、骨髄移植、フルダラビンのような化学療法剤、外部ビーム放射線療法(XRT)、シクロホスファミドまたはOKT3またはキャンパスのような抗体を使用するT細胞除去療法と組み合わせて(例えば、前に、同時にまたは後に)、患者に投与する。他の態様において、本発明の細胞組成物を、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサンのようなB細胞除去療法の後に投与する。例えば、ある態様において、対象を、高用量の化学療法と続く末梢血幹細胞移植の標準処置に付し得る。ある態様において、移植後、対象は、拡張された本発明の免疫細胞の注入を受ける。さらなる態様において、拡張された細胞を手術の前または後に投与する。

【0954】

特定の例示的面において、対象は、白血球を採取し、エクスピボで富化または枯渇させて、目的の細胞、例えば、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)を選択および/または単離する、白血球除去を受け得る。これらの免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)単離体を、当分野で知られる方法により増殖させ、1以上の

10

20

30

40

50

本発明のCAR構築物が導入され、それにより1以上の本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)が創製されるように処理し得る。処置を必要とする対象を、その後高用量の化学療法剤と続く末梢血幹細胞移植の標準的処置に付し得る。ある面において、移植後または移植と同時に、対象は、増殖させた本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の注入を受ける。さらなる面において、増殖細胞を手術の前または後に投与する。

【0955】

患者に投与すべき上記処置の用量は、処置する状態の正確な性質および処置の受け手により変わる。ヒト投与のためのスケージングは、当分野で認識されている習慣に従い実施できる。CAR T細胞用量およびスケジューリングの戦略は、記載されている(Ertl et al, 2011, Cancer Res, 71:3175-81; Junghans, 2010, Journal of Translational Medicine, 8:55)。

10

【0956】

ある態様において、CARを、例えば、インビトロ転写を使用して免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)に導入し、対象(例えば、ヒト)は、本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の初期投与と、その後の本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の1回以上の投与を受け、ここで、その後の1回以上の投与は、先の投与の後、15日、例えば、14日、13日、12日、11日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日または2日以内に行う。ある態様において、本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の1回を超える投与を、対象(例えば、ヒト)に1週間当たりに行い、例えば、本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の2、3または4投与を週あたりに投与する。ある態様において、対象(例えば、ヒト対象)は、CAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の週あたり1回を超える投与を受け(例えば、1週間当たり2回、3回または4回投与)(ここではサイクルとも呼ぶ)、続いて1週間、CAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)投与されず、その後さらにCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の1回以上のさらなる投与(例えば、週あたりCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の1回を超える投与)を対象に投与する。他の態様において、対象(例えば、ヒト対象)は、CAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の1回を超えるサイクルの投与を受け、各サイクル間の期間は10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日または3日より短い。ある態様において、CAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)を、隔日で1週間3回投与する。ある態様において、本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)を、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間またはそれ以上投与する。

20

30

【0957】

ある面において、CD123 CAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)を、レンチウイルスのようなレンチウイルスベクターを使用して賛成する。この方法で産生したCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)は、安定なCAR発現を有する。

40

【0958】

ある面において、CAR発現細胞、例えば、CAR TまたはCAR発現NK細胞を、ガンマレトロウイルスベクター、例えば、ここに記載するガンマレトロウイルスベクターのようなウイルスベクターを使用して産生する。これらのベクターを使用して産生したCAR発現細胞、例えば、CAR TまたはCAR発現NK細胞は、安定なCAR発現を有する。

【0959】

ある面において、CAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)は、形質導入4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、

50

14日、15日後、CARベクターを一過性に発現する。CARの一過性発現は、RNA CARベクター送達により行われ得る。ある面において、CAR RNAを、エレクトロポレーションにより、細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)に形質導入する。

【0960】

一過性にCARを発現する細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)(特にマウス scFv CARで)を使用して処置される患者で生じ得る可能性のある問題は、複数処置後のアナフィラキシーである。

【0961】

この理論に縛られることを望まないが、このようなアナフィラキシー応答は、液性CAR応答を発達させる患者、すなわち、抗IgEアイソタイプを有する抗CAR抗体が原因であると考えられる。細胞を産生する患者の抗体が、抗原への暴露の10～14日の中断があるとき、IgGアイソタイプ(これはアナフィラキシーを生じない)からIgEアイソタイプへのクラススイッチを受けると考えられる。

【0962】

患者が一過性CAR治療(例えばRNA形質導入により完成されたもののような)中に抗CAR抗体応答を産生する高リスクにあるならば、CAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)注入中断は10～14日を超えて継続してはならない。

【実施例】

【0963】

実施例

本発明を、次の実験的实施例を参照してさらに詳細に記載する。これらの実施例は、説明のみを目的として提供し、特に断らない限り限定を意図しない。そうして、本発明は、決して次の実施例に限定されると解釈してはならず、むしろ、ここに提供する教示の結果として明らかとなるいずれかかつ全ての異形を含むと解釈すべきである。

【0964】

さらに記載せずとも、当業者は、前の記載および次の説明的実施例を使用して、本発明の化合物を製造および利用し、本願発明方法を実施できると考える。次の作業実施例は、本発明の好ましい態様を特に示し、本開示の残りをいかなる方法でも限定すると解釈してはならない。

【0965】

実施例1：キメラNK受容体

ここに提示する結果は、現在のCAR設計と比較して、より精密に制御され得る、T細胞のためのCARを構築する代替的アプローチを示す。実験を、少なくとも2または3キメラ融合タンパク質を含む新規、制御CARシステムの開発のために設計した。初代T細胞活性化シグナルおよび阻害性シグナルは、キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)として知られる、NK細胞の天然に存在する活性化および阻害性受容体に基づいた。

【0966】

KIRは、受容体の細胞内ドメインにより、活性化および阻害性形態の両方で存在する。活性化KIRは、そのシグナルを、これらのタンパク質の膜貫通ドメイン内の残基により補充される、免疫チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)含有膜タンパク質、DAP12との相互作用により伝達する。阻害性KIRは、NK細胞溶解性およびサイトカイン産生活性阻害に至る、活性化シグナルを無効にする免疫チロシンベースの阻害性モチーフ(ITIM)を含む細胞質ドメインを担持する。TCRに類似して、KIRは、タンパク質受容体の免疫グロブリンファミリーに属し、大部分が不変MHCおよびMHC様リガンドに結合する。何らかの特定の理論に縛られることを望まないが、これらの相互作用が、正常細胞(通常高密度MHCクラスI発現)と、悪性またはウイルス感染細胞(しばしばMHCクラスIが低いまたはない)を自然に区別するのに利用されると考えられる。

【0967】

KIR様キメラ抗原受容体(KIR-CAR)は、図1のような目的の標的抗原に対するscfvと、活性化および阻害性KIRの融合により構築されている。T細胞の条件的活

10

20

30

40

50

性化は、目的の悪性細胞の抗原への、s c f vを担持する、活性化K I R - C A R (a c t K I R - C A R)または標準T C RゼータC A Rの結合により産生される。正常組織に存在するが、悪性組織に存在しない抗原を指向するs c f vを担持する阻害性C A R (i n h C A R)は、T細胞が正常細胞に遭遇したとき、活性化C A R一次シグナルの減衰を提供する。阻害性C A Rの有用な標的として働く抗原の例は、エフリン受容体(Pasquale, 2010, Nat Rev Cancer 10(3):165-80)およびクローディン(Singh et al., 2010, J Onco l, 2010:541957)を含み、これらは、正常組織の上皮性細胞で発現されるが、しばしば、癌(例えばE P H A 7)により選択的に失われる。

【0968】

実施例2：活性化K I R - C A R構築および活性

実験を、現在治験中である、T C Rゼータ細胞質ドメインに基づき、C A Rに先に取り込まれた、抗C D 1 9または抗メソテリンc F v (S S - 1)の有効に基づき、活性化K I R - C A Rを構築するために設計した。ヒトK I R 2 D S 2 活性化K I R受容体を、a c t K I R - C A Rの最初のベース受容体として選択した。活性化シグナルを送達するために、a c t K I R - C A Rは、通常T細胞で発現されないD A P 1 2の共発現を必要とした。それゆえに、2 Aリボソームスキップペプチドに基づく“バイシストロニック”遺伝子カセットを使用する、a c t K I R - C A RとヒトD A P 1 2の両者を発現するレンチウイルスベクターを構築した。レンチウイルスベクターのダイアグラムを図2に記載する。最初の試験は、a c t K I R - C A Rが初代ヒトT細胞およびメソテリンに結合したS S 1 a c t K I R - C A Rが効率的に発現されたことを示した(図3)。先に開発され、公開されたS S 1 s c F v C D 3ゼータ(S S 1 - ζ) C A R(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106(9):3360-5)に類似して、S S 1 a c t K I R - C A Rを発現するT細胞は、図4に示すように、メソテリンリガンドを発現するように操作した標的K 5 6 2細胞(K T - m e s o)に細胞毒性活性を示した。メソテリン標的を欠く野生型K 5 6 2を殺す受容体は示されなかった。

【0969】

メソテリン陽性標的細胞に対するS S 1 K I R C A Rの細胞毒性活性が同等なC A R表面発現を有する同抗原をターゲティングする標準T C RゼータベースのC A Rより低かったため、メソテリンC A Rは、その長さのためにC D 4 5から偏折するのに最適ではない細胞外ヒンジ(野生型K I R 2 D S 2に基づく)を有し得ると考えられた。C D 4 5からの活性化I T A Mベースの受容体の動態隔離は、T C R活性化の重要な機構であり、T細胞と標的細胞膜の間の約1 4 ~ 1 5 nmの規模の長さに依存する(Choudhuri et al., 2005, Nature 436(7050):578-82)。K I R 2 D S 2ベースのS S 1 K I R - C A Rは、メソテリンの部分的結晶構造に基づき2 0 nmより長い規模を有すると推定され、S S 1 エピトープが、標的細胞膜から約1 0 nm距離であり(Ma et al., 2012, J Biol Chem 287(40):33123-31)および約1 0 nmと概算されるC A Rの可能性を示し、s c F vに加えて各I g様ドメインがK I R 2 D S 2ヒンジにおいて約3.5 nmであると推定される。それゆえに、図5に模式的に示すようなK I R 2 D S 2ヒンジが除かれた活性化K I R C A R(K I R S 2 C A R)を構築した。S S 1 s c F vベースのK I R S 2 C A Rが、完全長野生型K I R 2 D S 2へのS S 1 s c F vの融合により形成したC A Rと比較して、メソテリン発現標的細胞に対する増強された細胞溶解性活性を示した(図6)。この最適化K I R S 2 C A RはまたC D 8 アルファ細胞外ヒンジを有するS S 1 s c F vベースのT C RゼータC A Rを超える増強された活性も示した。

【0970】

実施例3：I n h K I R - C A R構築および活性

阻害性K I R - C A Rを、阻害性K I R 2 D L 3 受容体ベースへの抗メソテリンS 1 s c F vの融合に基づき構築した。初期の試験は、i n h K I R - C A Rが初代ヒトT細胞で効率的に発現されることを示した。C D 1 9 a c t K I R - C A R、S S 1 a c t K I R - C A RおよびS S 1 i n h K I R - C A R単独または組み合わせを、N F A T駆動プロモーター制御下にd s G F Pレポーター担持J u r k a t T細胞に導入し、

10

20

30

40

50

この重要なT細胞シグナル伝達経路の活性化をモニターした。CD19 act KIR-CARまたはSS1 act KIR-CAR単独を発現するJurkat T細胞は、CD19およびメソテリン(KT-meso/CD19)の両者を発現するK562により効率的に発現されたが、CD19 act KIR-CARおよびSS1 inh KIR-CARを共発現するJurkat T細胞は、同KT-meso/CD19標的細胞による活性化の著しい減少を示した(図7A)；しかしながら、イディオタイプ特異的試薬を使用するCD19およびメソテリンcFv結合の表面発現の分析は、驚くべきことに、異なるscFv標的特異性の発現が相互排他的であることを示した(図7B)。

【0971】

実施例4：天然阻害性受容体システムに対する活性化KIR-CAR設計の感受性

2scFv CARの共発現が限定的であるため、PD-1受容体由来の阻害性シグナルに対するKIRベースの活性化CARの感受性を評価する戦略を進めた。PD-1は、TCRシグナル伝達を負に制御するホスファターゼを集めるために、阻害性KIRと同様に細胞質ドメインにおいてITIMを使用するT細胞における天然受容体である。略図を図19に示す。ここに提示する結果は、野生型PD-1がメソテリンをターゲティングする活性化KIRベースのCARおよびTCRゼータベースのCARの両者で過発現することを示す(図8Aおよび8C)。結果はまた、この組み合わせが、メソテリン特異的活性化KIR-CAR細胞毒性のPD-1リガンド1(PDL-1)依存性阻害に至ることを示す(図9)。T細胞(すなわちPD-1遺伝子導入していないT細胞)により発現される正常PD-1の状況で、KIR-CARは、TCRゼータベースのCARと比較して、PD-1 20
1過発現標的細胞に遭遇したとき、低阻害を示した。何らかの特定の理論に縛られることを望まないが、これは、一般に阻害性受容体リガンドを発現する腫瘍に遭遇したとき、KIR-CARの利点となり得ると考えられる。

【0972】

実施例5：KIR CARの共刺激依存的活性化

実験を、Kloss et al. (Kloss et al., 2013, Nat Biotechnol 31(1):71-5)による標準CARについての記載と比較して、KIR-CARシステムにおけるキメラ共刺激性受容体(CCR)の効果を測定するように設計した。実験はまたアゴニスト抗体、クローン9.3を使用する、T細胞における内因性CD28受容体の結合による、KIRについての共刺激性依存性活性化要求を評価するためにも設計した。図14に示すように、KIRS2 30
CARは、CD28共刺激非存在下で、メソテリン陽性標的に応答して強固な増殖を示した。この増殖は、共刺激が増殖に重要であることを示した、TCRゼータCARでの観察より優れた。このデータは、KIRベースのCARが、抗原特異的増殖についてTCRゼータCARと同じ共刺激要求を有しない可能性があり(Milone et al., 2009, Mol Ther 17(8):1453-64; Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106(9):3360-5)、この共刺激独立性は、現在のTCRゼータベースのCARに対するKIRベースのCARの顕著な利点であり得ることを示唆する。実験を、インビボ前臨床設定にける共刺激性ドメイン存在下および非存在下のCARに対するKIRベースのCARを試験するために、ヒト化マウスにおけるKIRベースのCARを評価するために設計した(実施例5におけるデータおよび実験を実施例6にも示す)。

【0973】

実施例6：キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)ベースのキメラ抗原受容体(CAR)は、固形腫瘍における強固な細胞毒性活性を誘発する

CD3-ζおよび共刺激性受容体の細胞質ドメインにcisで連結した抗原結合ドメインを担持するキメラ抗原受容体(CAR)は、T細胞毒性を腫瘍に向ける操作のために強力な方法を提供する(Grupp et al., The New England journal of medicine, 368(16):1509-18, 2013; Brentjens et al., Science translational medicine, 5(177):177ra38, 2013; Porter et al., The New England journal of medicine, 365(8):725-33, 2011)。メソテリンをターゲティングする単鎖可変フラグメント(scFv)(SS1)が、ナチュラルキラー(NK)細胞において正常に発現される刺激性キラー免疫グロブリン様受容体(KI 50

R)であるK I R 2 D S 2の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに連結した代替的キメラ受容体をここに記載する。このS S 1-K I R S 2 K I RベースのC A Rは、アダプター分子D A P 1 2と組み合わせてヒトT細胞に導入されたとき、インビトロ強固な抗原特異的細胞毒性活性およびサイトカイン分泌および増殖のようなエフェクター機能を誘発する。K I R-C A RおよびD A P 1 2を発現するように修飾したT細胞は、標準C D 3 ζベースのC A Rを形質導入したT細胞と比較して、抵抗性腫瘍異種移植モデルにおいて顕著に増強された抗腫瘍活性を示し、K I RベースのC A Rが、第二および第三世代C D 3 ζベースのC A Rを制限する腫瘍内の阻害性シグナルに打ち勝つことができることを示す。ここに提供するデータは、さらに、固形腫瘍を含む癌におけるK I RベースのC A Rの臨床的評価を支持する。

10

【0974】

“第一世代”C A Rは、特異的抗原ターゲティングのための抗体からの単鎖可変フラグメント(s c F v)を使用する、単一キメラ受容体への免疫チロシンベースの活性化モチーフ(I T A M)含有細胞質ドメインの取り込みにより設計された(Sadelain et al., Cancer discovery, 3(4):388-98, 2013)。C D 2 8、I C O S、4-1 B BおよびO X-4 0のような共刺激性受容体からの多数の異なるさらなるシグナル伝達ドメインを、T細胞の増殖、生存および機能を増強するためにこれらの受容体にタンデムで取り込んだ(Finney HM et al. J Immunol. 1998;161:2791-2797; Maher J. et al. Nat Biotech 2002; 20:70-75; Finney HM et al. J Immunol. 2004; 18:676-684; Milone et al., 2009, Mol Ther 17(8):1453-64; Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106(9):3360-5)。これらの“第二世代”(1共刺激性ドメイン)および“第三世代”(2共刺激性ドメイン)C A Rは、癌の前臨床動物モデルで機能の増強を示し、数共刺激増強C A Rが、現在、癌の初期相ヒト臨床試験にある(Barrett DM et al. Ann Rev Med 2014; 65:333-347にレビュー)。

20

【0975】

一本鎖C A Rが強固な抗原特異的細胞毒性活性を誘発するが、高度に保存されたI T A Mドメインを利用する天然受容体を、一般にT細胞受容体(T C R)-C D 3複合体、B細胞受容体(B C R)-I g α/β複合体およびF c受容体(F c R)複合体のような、別々のリガンド結合およびI T A M含有シグナル伝達鎖からなる、多鎖複合体に構築する。多鎖免疫受容体複合体の潜在的利益は、リガンド結合とシグナル伝達分子の間の多相互作用を経て利用可能なシグナルの大きな多様性およびリガンド結合鎖の内在化と分離可能な持続性I T A Mシグナル伝達を含んで多様である点である(Sigalov et al., Advances in experimental medicineおよびbiology, 640:ix-xi, 2008)。通常異種受容体に見られる数受容体の要素のC A Rへの組み合わせの結果は、十分には解明されていない；しかしながら、アネルギーおよび抗原非依存的シグナル伝達がある設計で観察されている(Brocker, Blood, 96(5):1999-2001, 2000; Brocker et al., The Journal of experimental medicine. 181(5):1653-9, 1995; Milone et al., Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 17(8):1453-64, 2009)。

30

【0976】

ここに請求する本発明は、受容体複体内のサブユニットと免疫細胞内の他の受容体の天然に選択された相互作用により、T細胞活性化に大きな効力を有する、より“天然”多鎖免疫受容体設計により構築されたC A Rである。キラー免疫グロブリン様受容体(K I R)およびD A P 1 2多鎖免疫受容体複合体はC A Rの基礎として選択された(Thielens et al., Current opinion in immunology, 24(2):239-45, 2012)。天然細胞毒性に寄与する場所であるナチュラルキラー細胞により発現されるが、K I R発現はまたC D 4+およびC D 8+ T細胞でも見られる(Moretta et al., Immunological reviews, 155:105-17, 1997; Falk et al., Human immunology; 61(12):1219-32, 2000; Remtoula et al., Journal of immunology, 180(5):2767-71, 2008)。K I R 2 D S 2のような活性化K I Rは、内在性シグナル伝達活性が知られていない短細胞質ドメインを有する。しかしながら、K I Rは、NK細胞において、D A P 1 2、S y kおよびZ a p 7 0キナーゼの結合がで

40

50

きる I T A M 含有アダプター分子の二量体と非共有結合複合体を形成する (Lanier et al., Nature, 391(6668):703-7, 1998)。リガンド結合による細胞毒性刺激に加えて、K I R はまた D A P 1 2 非存在下で T 細胞内で共刺激性効果を示すことも示され、これらの分子が T 細胞における一次誘起活性および共刺激の両者を提供できることを示唆する (Snyder et al., Journal of immunology, 173(6):3725-31, 2004)。

【0977】

図 1 に模式的に示すように、メソテリン特異的 S S 1 - s c F v を活性化 K I R、K I R 2 D S 2 (S S 1 - K I R S 2) の膜貫通および短い細胞質ドメインにスプライシングすることにより、K I R ベースの C A R を構築した (Hassan et al., Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 8(11):3520-6, 2002)。I T A M 含有アダプター分子、D A P 1 2 は、ナチュラルキラー (N K) 細胞において構成的に発現されるが、ヒト T 細胞のサブセットにおいてのみ発現される (Moretta et al.)。それゆえに、両方の分子の同時発現を達成するために、テッサザイニアウイルス 2 A (T 2 A) 配列によって分離されたメソテリン特異的 K I R ベースの C A R (S S 1 - K I R S 2) および D A P 1 2 分子の両方をコードするバイシストロニックレンチウイルスベクターを作製した (図 2)。抗 C D 3 および抗 C D 2 8 活性化後の S S 1 - K I R S 2 および D A P 1 2 バイシストロニックレンチウイルスによる初代ヒト T 細胞の形質導入は、C D 3 ζ ベースの S S 1 ζ C A R に匹敵する S S 1 - K I R S 2 の強固な表面発現を示した (図 6)。偽遺伝子導入 T 細胞または T 細胞形質導入 C D 3 ζ 細胞質ドメインを含むメソテリン特異的 C A R で形質導入された T 細胞で観察された動態と同等の動態で、ポリクローナル抗 C D 3 / 抗 C D 2 8 刺激後に S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 共形質導入 T 細胞が拡大した (データは示さず)。K I R ベース対 C D 3 ζ (S S 1 - z) C A R T 細胞の細胞毒性活性を比較した。S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 形質導入 T 細胞は、S S 1 ζ 構築物と同程度の強度で、ヒトメソテリン (K - m e s o) を発現する K 5 6 2 細胞に強力な細胞毒性活性を示した。操作 T 細胞のいずれも、野生型 K 5 6 2 (K w t) に溶解性活性を示さず、同族メソテリン標的抗原による S S 1 - K I R S 2 受容体の特異的活性化を支持する (図 6)。

【0978】

K I R 2 D S 2 の発現が、検出可能な D A P 1 2 発現の非存在下での T 細胞において記載されているため、D A P 1 2 共送達の存在下または非存在下の S S 1 - K I R S 2 受容体の発現および機能を評価した。D A P 1 2 を赤色蛍光タンパク質、d s R e d (D A P 1 2 - d s R e d) または d s R e d 発現対照ベクター (d s R e d) と共発現するレンチウイルスベクターを使用して、T 細胞をレンチウイルス D A P 1 2 または対照ベクターで形質導入、続いて S S 1 - K I R S 2 を発現するインビトロ転写 RNA で遺伝子導入した。S S 1 - K I R S 2 は、D A P 1 2 の添加なしで、T 細胞表面に発現された；しかしながら、S S 1 - K I R S 2 の表面発現は、D A P 1 2 添加で、約 1 log 増加した (図 1 2 A)。S S 1 - K I R S 2 の発現にも関わらず、D A P 1 2 無しの T 細胞は、メソテリン発現標的細胞を溶解せず、S S 1 - K I R S 2 惹起 T 細胞毒性活性における D A P 1 2 の必要性を示す (図 1 2 B)。これらのデータは、キメラ K I R が T 細胞クローンの天然 K I R 2 D S 2 受容体について以前に報告されているような D A P 1 2 とのその関連性とは独立してシグナルを提供する可能性を排除するものではない (Snyder et al.)。

【0979】

天然 K I R 2 D S 2 と D A P 1 2 の非共有結合は、K I R 膜貫通 (T M) ドメインのアスパラギン酸残基と D A P 1 2 T M ドメインのリジン残基との間の静電相互作用に依存する (Feng et al., PLoS biology, 4(5):e142, 2006)。T C R および C D 3 サブユニットの T M ドメインにおけるこれらのイオン化可能なアミノ酸残基の配置は、相互作用にある特異性を提供する K I R および D A P 1 2 とは異なると考えられるが、S S 1 - K I R S 2 が共送達 D A P 1 2 の代わりに C D 3 複合体の成分との相互作用する可能性を検討した。C D 3 複合体と T C R 鎖との結合は細胞表面上の T C R 発現に必要であるため、C D 3 成分に対する K I R の競合は、以前にクローン化された T C R の発現で観察された正常な T

C R 発現を妨げると予想される。異所性 V β 鎖の T 細胞への導入は、複合体アセンブリ中の競合のために、内因性内因性 T C R V β の表面発現を減少させることが示されている (Varela-Rohena et al., Nature medicine, 14(12):1390-5, 2008)。偽形質導入対照 T 細胞と比較した、K I R S 2 形質導入ポリクローナル T 細胞における T C R V β 1 3 . 1 + の同様の頻度および強度は、S S 1 - K I R S 2 と内因性 C D 3 複合体のメンバーとの間の有意な相互作用の不在を支持する (図 1 3)。

【0980】

細胞傷害活性は、T 細胞のインビボ抗腫瘍活性にとって重要なエフェクター機能であるが、サイトカイン分泌および T 細胞増殖を誘発する抗原受容体の能力も、一般にインビボでの強力な抗腫瘍活性と相関する重要な特徴である。それゆえに、共刺激性ドメインなしまたは C D 2 8 もしくは 4 - 1 B B 共刺激性ドメイン (それぞれ S S 1 - 2 8 ζ および S S 1 - B B ζ) を伴う C D 3 ζ ベースの C A R を担持する T 細胞 (S S 1 - ζ) に対する、S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 修飾 T 細胞による抗原惹起インターフェロン- γ (I F N - γ) およびインターロイキン-2 (I L - 2) 分泌を比較した。S S 1 - ζ 構築物は、I F N - γ および I L - 2 の両者の最低の分泌を刺激した (図 1 0、1 1)。インターフェロン- γ 産物は増加し、T 細胞発現 S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 または S S 1 - B B ζ で同等であったが、S S 1 - 2 8 ζ C A R を発現する T 細胞は、顕著に多い I L - 2 および I F N - γ 産物を示した (図 1 0)。サイトカインおよびケモカインのより大きなパネルの分析は、S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 は S S 1 - ζ および S S 1 - B B ζ C A R に匹敵する匹敵する抗原誘発サイトカインおよびケモカイン分泌の大きさを有する C D 3 ζ ベースの C A R 全体で質的に類似した発現パターンを刺激することを示す (図 1 1)。

【0981】

S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 受容体も、同族抗原に応答して T 細胞増殖の強力なステミュレーターであった (図 1 4)。S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 T 細胞は、強力な増殖のための追加の補助刺激シグナルに依存する標準 S S 1 - ζ C A R とは異なり、抗 C D 2 8 アゴニスト抗体の添加により S S 1 ζ に匹敵する増殖を示す。D A P 1 2 の非存在下での S S 1 - K I R 2 により提供される共刺激の機構は、他のアダプター分子との K I R 相互作用に関連する (Synder et al.)。T 細胞によって天然に発現されるさらなる受容体は、T 細胞の活性化および増殖にさらに寄与する共送達 D A P 1 2 を利用することもできる。特に、インテグリンは T 細胞に共刺激シグナルを提供することができる (Brunmark et al. (1996) PNAS USA 93(25):14736-41; Zuckerman et al. (1998) J. Immunol. 160(7):3259-68)。D A P 1 2 は、マクロファージおよび好中球におけるインテグリンによる裏返しシグナル伝達に重要であるように見え (Jakus et al. (2007) Trends in Cell Biol. 17(10):493-501; Mocsai et al. (2006) Nature Immunol. 7(12):1326-33)、S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 活性に貢献する T 細胞における L F A - 1 および他のインテグリンへの独特なシグナル伝達活性に貢献し得る。

【0982】

C D 2 8 および 4 - 1 B B は、インビボでの C A R T 細胞活性のために C A R に導入されている (Carpenito et al. (2009) PNAS USA 106(9):3360-65); しかしながら、共刺激は、常に免疫抑制性腫瘍微小環境に打ち勝つわけではない。最近、E M - m e s o 細胞 (悪性中皮腫を有する患者の胸膜浸出液由来の細胞株) の異種移植片を担持する免疫欠損 N O D - S C I D - $\gamma_c^-/-$ (N S G) マウスに注射された S S 1 - B B ζ C A R T 細胞が、インビボで拡張するが、腫瘍微小環境内で、腫瘍浄化の失敗と相関する機能低下となることが報告された (Moon et al. (2014) Clinical Cancer Res. 20:4262-4273)。S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 修飾 T 細胞細胞の活性は、この中皮腫の高耐性モデルにおいて評価された。共刺激を伴うまたは伴わない S S 1 - K I R S 2 / D A P 1 2 および C D 3 ζ ベースの C A R は、インビトロで E M - m e s o 細胞を同等の有効性で溶解することができる。偽遺伝子導入および D A P 1 2 - d s R e d 形質導入 T 細胞は、E M - m e s o 細胞に対する最小の溶解活性を示す (図 3 6)。偽、S S 1 ζ および S S 1 B B ζ 形質導

10

20

30

40

50

入T細胞の単回静脈内注射は、確立されたEM-メソ異種移植片に対して観察可能な抗腫瘍効果を有さなかった(図15A)。腫瘍増殖は、SS1-28細胞CAR T細胞によって顕著に遅延した；しかしながら、SS1-KIRS2/DAP12修飾T細胞のみが、52日目にEM-メソ腫瘍増殖を有意に抑制した腫瘍の退縮を誘導した($p < 0.001$ 、事後Scheffé F検定を伴うANOVA)。SSS1-KIRS2/DAP12をDAP12単独またはSS1-28と操作T細胞と比較する第2の実験は、SS1-KIRS2/DAP12 T細胞の同様の増強された抗腫瘍活性を示した(図38)。KIRベースのCARの強力な活性は、メソテリン特異性に独特のものではない。CD19特異的KIRベースのCARもまた、第二世代CD3とCARに匹敵するインビトロ活性で構築された(図16B)。NALM-6白血病異種移植モデルにおける試験はまた、第一世代のCARより優れており、-1BB共刺激性ドメインを有する第二世代CARに匹敵するKIR-CARの有効性を示した。

【0983】

EM-メソ異種移植モデルにおけるSS1-KIRS2/DAP12 T細胞の増強された抗腫瘍活性の機序を探索するために、T細胞生着および腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)の分析を行った。SS1-BBとCAR T細胞を受けたマウスのみが、血液および脾臓において検出可能なヒトCD45(hCD45)陽性細胞を有し、インビボCAR+ T細胞の持続性に対する4-1BB補助刺激ドメインの以前に観察された効果と一致した(Milone et al.)。hCD45+腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)は、偽又はまたはSS1と処置マウスにおいてほとんど検出されなかった。対照的に、SS1-KIRS2/DAP12、SS1-28とおよびSS1-41BBとCAR T細胞で処置した腫瘍は、各群で同等な頻度で、総生存可能細胞の2~4%を構成するhCD45+ TILを有した(図15B)。免疫組織化学染色は、SS1-KIRS2/DAP12、SS1-28とおよびSS1-41BBとCAR T細胞処置マウスの腫瘍内のCD8+およびCD4+ TIL(データは示していない)を示し、フローサイトメトリー分析を確認する。SS1-KIRS2/DAP12 T細胞の増加した効力は、それゆえに、腫瘍増殖の後期の腫瘍内のTIL頻度と無関係である。TILの比較が、後の時点の腫瘍体積の大きな差異により制限されるため、T細胞注射後の早期時点の評価した。T細胞注射後10日目、hCD45+ TILの同等な結果がSS1-28とおよびSS1-KIRS2/DAP12 CAR T細胞処置群で観察されたが、SS1-BBとCAR T細胞群にはほとんどCD45+ TILが存在しなかった(図15B)。これらの単離TILの制限された分析は、SS1-KIRS2/DAP12 CAR T細胞のみが、EM-meso細胞に対するインビトロ溶解性活性が可能であったことを示す(データは示していない)。これらの結果は、腫瘍誘発低機能とともに、腫瘍へのSS1-BBとT細胞の遅延蓄積が、腫瘍発達部位での高い頻度にも関わらず、これらの細胞の乏しい抗腫瘍活性の根底となることを示す。反復実験を実施し、T細胞注射後18日目に単離したTILを有するSS1-28とおよびSS1-KIRS2/DAP12 CAR T細胞を比較し、表現型および機能的分析のための多数のTILを得た。単離SS1-28とTILは、処置に使用した凍結保存T細胞と比較して、有意に現象した細胞毒性活性および抗原特異的IFN- γ 産物を示した。対照的に、SS1-KIRS2/DAP12 CAR T細胞処置腫瘍からのTILは、凍結保存細胞と同等のインビトロ細胞毒性およびIFN- γ 産物を示した(図15Eおよび図37)。TILおよび凍結保存細胞からのCARタンパク質についてのタンパク質用怪物の免疫ブロッティングは、CAR発現の喪失を示す(データは示していない)。TILへのCARの不在は、腫瘍微小環境内の非形質導入T細胞に対する、SS1-28とCAR T細胞の発現下方制御または乏しい生存によるものであろう。

【0984】

結論として、ここに提供するデータは、KIRベースのCARおよびDAP12の組み合わせが、T細胞に対する人工抗原特異性を付与するための非常に有効な抗原特異的受容体システムを提供することを示す。ほぼ同等なインビトロ活性にもかかわらず、さらに、このKIRベースのCARが、ここで使用するモデル腫瘍システムにおいて、1以上の共

10

20

30

40

50

刺激性ドメインとCD3ζに基づくCARと比較して、恐らく、不活性化に対する耐性の増加による、改善はるかに改善された抗腫瘍効果を有することを示した。この増加した有効性およびのDAP12関連リガンド結合受容体ならびにFcRγのようなさらなる天然ITAM含有受容体システムに基づくキメラ受容体設計の機構へのさらなる調査を進める。

【0985】

実施例7：KIRベースのCARは、標的細胞のHLA発現による調節を可能にする天然阻害性KIRと共発現させることができる

KIR2DL3リガンドHLA-Cwを発現するK562-meso細胞株の産生および特徴づけ

材料および方法：野生型K562細胞または予めメソテリンを発現するように操作したK562株(K562-meso)に、HLA-Cw3アレルをコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。細胞は、蛍光活性化細胞ソーティングによってメソテリンおよびHLA-Cw3の様な発現について選別した。HLA-Cw3発現は、APCにコンジュゲートしたW6/32抗HLA A、B、C抗体で染色した後、フローサイトメトリーによって確認した。

【0986】

結果：メソテリンまたはHLA-Cw3単独または組み合わせで発現するK562細胞株を産生できる(図20)。

【0987】

初代ヒトT細胞におけるSS1-KIRS2およびKIR2DL3の共発現

材料および方法：初代ヒトT細胞を、抗CD3/28マイクロビーズで刺激し、活性化後1日目にDAP12およびSS1-KIRS2単独またはKIR2DL3を発現するレンチウイルスベクターと組み合わせて発現するバイシストロニックレンチウイルスベクターのいずれかでの形質導入にした。SS1-KIRS2 CARの発現を、ビオチニル化ヤギ抗マウスF(ab)2ポリクローナル抗体と続くSA-APCを使用するフローサイトメトリーにより評価した。KIR2DL3発現を、KIR2D特異的モノクローナル抗体により評価した。

【0988】

結果：メソテリン特異的KIRベースのCARとDAP12(KIRS2)単独、KIR2DL3単独または2受容体の組み合わせを発現する初代ヒトT細胞を産生できた(図21)。

【0989】

KIR CARと共発現させたKIR2DL3は、標的細胞のHLA-Cw存在下、抗原特異的細胞毒性を抑制できる

材料および方法：初代ヒトT細胞を抗CD3/28マイクロビーズで刺激し、DAP12およびSS1-KIRS2を発現するバイシストロニックレンチウイルスベクターで形質導入した。5μgのインビトロ転写mRNAコード化KIR2DL3を、エクスピボ拡大10日後、レンチウイルス形質導入T細胞にエレクトロポレーションにより導入した。これらのT細胞集団を、記載するように種々のエフェクターT細胞対標的K562細胞比(E:T比)で⁵¹Cr標識K562標的細胞(K562、K562-meso、K562-HLACwおよびK562-meso/HLACw)に添加した。細胞毒性を、4時間で上清から放出される⁵¹Crの画分の測定により決定した。

【0990】

結果：SS1-KIRS2/DAP12発現T細胞は、HLA-Cw3発現と関係なく、メソテリンを発現するK562細胞を死滅できた。対照的に、SS1-KIRS2/DAP12受容体複合体および阻害性KIR、KIR2DL3を共発現するT細胞は、HLA-Cw3とともにメソテリンを発現するK562に対して強固な細胞毒性を示さなかった；しかしながら、これらの細胞は、SS1-KIRS2/DAP12修飾T細胞に匹敵するメソテリンのみを発現するK562細胞に対する細胞毒性活性を示した。これらの結果

10

20

30

40

50

は、阻害性KIR受容体が活性化KIRベースのCARの機能活性を調節する能力を示す(図22)。

【0991】

実施例8：CD19特異性を有するKIRベースのCARは、インビトロおよびインビボで抗原特異的標的細胞毒性を誘発できる

CD19特異性を有するKIRベースのCARは、インビトロで抗原特異的標的細胞毒性を誘発できる

材料および方法：抗CD3／抗CD28ビーズ活性化後、T細胞を、DAP12のみを発現するバシストロニックレンチウイルスベクターを、FMC63由来scFvが完全長KIR2DS2に融合しているCD19特異的KIRベースのCAR(CD19-KIR2DS2)または短リンカー[Gly]₄-Serリンカーを経てFMC63 scFvの膜貫通ドメインとKIR2DS2の細胞質ドメインを融合することにより産生したKIRベースのCAR(CD19-KIRS2)のいずれかと形質導入した。形質導入T細胞を対数増殖期の最後まで培養し、CD19特異的KIRベースのCARの発現を、ビオチニル化ヤギ抗マウスF(ab)₂ポリクローナル抗体、続くSA-PEを使用するフローサイトメトリーにより評価した。CD19発現を有する(K562-CD19)または有しない(K562-wt)⁵¹Cr標識K562標的細胞を、種々のT細胞対標的細胞比(E:T比)で混合した。細胞毒性を、4時間で上清から放出される⁵¹Crの画分の測定により決定した。偽遺伝子導入(NTD)またはCD19に特異的なCD3ζベースのCARで形質導入した(CD19-z)対照T細胞も、それぞれ、陰性および陽性対照として含ませた。

【0992】

結果：フローサイトメトリー分析は、CD19-KIR2DS2、CD19-KIRS2およびCD19-zで形質導入したT細胞の表面のCD19特異的scFvの発現を示す(図16A)。CD19-KIR2DS2またはCD19-KIRS2とDAP12を発現するrUT細胞は、抗原特異の様式で標的細胞を死滅させることができた(図16B)。KIRベースのCAR修飾T細胞により示される細胞毒性は、CD19特異的CD3ζベースのCARを発現するT細胞と同等であるか、高かった。

【0993】

CD19-KIRS2／DAP12でのT細胞形質導入は、ヒト白血病異種移植における腫瘍退縮を誘発する

材料および方法：NOD-SCID-γ_c^{-/-}(NSG)マウスに、100万NALM-6 CBG腫瘍細胞、CD19を発現する白血病細胞株を0日目に尾静脈から静脈内移植した。本実験において、T細胞を抗CD3／抗CD28スティミュレータービーズで刺激し、続いて、図に示すように、共刺激性ドメイン(CD19-z、CD19-BBz)またはCD19特異的KIRベースのCAR、DAP12を有するCD19-KIRS2を伴うまたは伴わない一連のCD3ベースのCARで1日目にレンチウイルス形質導入した。偽遺伝子導入T細胞(NTD)を対照として使用した。T細胞を、対数増殖期の最後までエクスピボで拡張させ、白血病細胞株注射5日後、マウスあたり200万CAR⁺T細胞で静脈内注射した。腫瘍負荷を生物発光造影により評価した。5動物を、各T細胞条件で分析した(図17)。

【0994】

結果：示すインビボ実験において(図17)、NTD⁺T細胞は腫瘍増殖に影響を有さず、CD19z、CD19BBzおよびCD19-KIRS2形質導入T細胞は種々の抗腫瘍効果を示した。CD19z⁺T細胞を注入したマウスは、腫瘍負荷のわずかな減少を示したが、検出可能レベルの蛍光を維持した。対照的に、CD19BBzまたはCD19KIRS2⁺T細胞を注入したマウスにおける腫瘍細胞蛍光は、T細胞注射わずか7日後、検出の加減まで低下し(図17B、点線)、T細胞接近不可能な歯根における白血病細胞の小さな貯留槽の外側で完全なクリアランスを示した。15日までに、偽T細胞群の腫瘍負荷はエンドポイント(2×10¹⁰光子/秒)を超え、殺し、CD19BBzおよびCD19KIRS2群の蛍光は、検出限界下限のままであった。

【0995】

実施例9：ラクダ科単一VHHドメインベースのCARは、明らかな受容体相互作用なしに、scFvベースのCARと組み合わせてT細胞表面に発現され得る

材料および方法：NFAT依存性プロモーター(NF-GFP)下にGFPを発現するJurkat T細胞を、メソテリン特異的活性化CAR(SS1-CAR)、CD19特異的活性化(19-CAR)またはEGFRに特異的なラクダ科VHHドメインを使用して産生したCAR(VHH-CAR)で形質導入した。活性化CARで形質導入後、細胞を、CD19を認識するさらなる阻害性CARCD19(19-PD1)で形質導入し、活性化および阻害性CARの両者を共発現する細胞を産生した(SS1+19PD1、19+19PD1またはVHH+19PD1)。形質導入Jurkat T細胞を、1)全標的抗原を欠く(K562)、2)メソテリン(K-meso)、CD19(K-19)またはEGFR(A431)のみを発現する、3)EGFRおよびメソテリン(A431-メソテリン)またはCD19(A431-CD19)の組み合わせを発現するまたは4)CD19およびメソテリンの組み合わせを発現する(K-19/meso)いずれかである種々の細胞株と24時間共培養した。スティミュレーター細胞無し(no stim)またはK562と1μg/mLのOKT3(OKT3)を含むさらなる条件も、それぞれ、NFAT活性化の陰性および陽性対照として包含させた。NFAT活性化のマーカーとしてのGFP発現を、フローサイトメトリーにより評価した。

10

【0996】

結果：ラクダ科および関係する種(例えばラマ)は、単一重鎖様可変ドメインを有する抗体を天然に産生する。ラクダ科VHHドメインとして知られるこのドメインは、軽鎖可変ドメインと対合せずに存在するように進化している。図27Aは、2つの異種scFv分子が、受容体共発現中の同族リガンドへのscFv結合の観察された破壊によって示されるように、細胞の表面に提示されたときに互いに解離して再会合する可能性を概略的に示す(図25および図26)。図27Bは、VHHドメインベースのCARと組み合わせた細胞の表面上に提示されたscFv-CARの間の予想される減少した相互作用の概略図を示す。図28は、Jurkatの表面上の2scFvベースのCAR(SS1-z活性化CARおよびCD19-PD1阻害性CAR)の共発現が、活性化CAR(SS1-z)が、阻害性受容体リガンドの不在にも関わらず、そのCARに対するその同族リガンドを認識し、T細胞の活性化を引き起こすことを不可能とすることを示す。これは、観察された表面のリガンド結合の減少と一致する(図25)。対照的に、同じ阻害性CAR(CD19-PD1)とラクダ科VHHベースの活性化CAR(VHH-z)の共発現は、VHHベースの活性化CARが同族EGFRリガンドを認識する能力に影響を及ぼさない。これらのデータは、VHHベースの活性化CARが、scFvとVHHドメインとの相互作用の低下した能力に起因して受容体間の有意な相互作用なしにscFvベースのCARで発現され得る、図27Bに示されるモデルを支持する。

20

30

【0997】

実施例10：メソテリン特異性を有するNKp46ベースのNCR CARは、抗原特異的細胞毒性を誘発する

材料および方法：抗CD3/抗CD28ビーズ活性化後、T細胞を、DAP12およびSS1-KIRS2(対照)、またはFcεRγおよびメソテリン特異的NKp46ベースのCAR(SS1-NKp46)またはFcεRγおよび天然NKp46細胞外ドメインが切断されているメソテリン特異的NKp46 CAR(SS1-TNKp46)を発現するバイシストロニックレンチウイルスベクターで形質導入した。メソテリン特異的CARの発現を、ビオチニル化ヤギ抗マウスFab2ポリクローナル抗体、続くSA-PEを使用するフローサイトメトリーにより評価した(図18)。T細胞を、種々のエフェクターT細胞対標的K562細胞比(E:T比)でメソテリンを発現する⁵¹Cr標識K562標的細胞と混合した。細胞毒性を、自然発生的放出と比較した、4時間で上清から放出される⁵¹Crの画分の測定により決定した。

40

【0998】

50

結果：SS1-NKp46およびSS1-NKp46受容体両者は、T細胞表面発現を示す。SS1-NKp46形質導入T細胞は、KIRベースのSS1-KIR2DL3 CARと同等な強固な標的細胞溶解を示す。SS1-NKp46は、抗エフェクター対標的細胞比でのみ明らかであった弱い細胞毒性活性を示した(図18)。これらのデータは、T細胞細胞溶解性活性の再指向に使用するための抗原特異的キメラ免疫受容体を、KIRベースのCARの創製に使用したのと同じ設計を使用して、天然細胞毒性受容体(NCR)から産生できることを示す。

【0999】

実施例11：scFvドメインの相互作用

材料および方法：図24において、Jurkat T細胞を、メソテリン特異的阻害性KIRベースのCAR(SS1-KIR2DL3)をコードするレンチウイルスベクターで形質導入した。これらの形質導入細胞を、次いで、CD19特異的活性化KIRベースのCAR(CD19-KIR2DS2)をコードするレンチウイルスベクターの種々の希釈で形質導入した。これらのKIR-CARを図23に模式的に示す。両CARでの形質導入後、標的リガンドと結合できる完全scFvを有するCARの表面発現を有する細胞の頻度を、メソテリン-Fc融合タンパク質、続くPEで標識した二次的抗Fc抗体およびAPCで標識した抗CD19特異的(クローンFMC63)抗イディオタイプモノクローナル抗体の両者での染色後、フローサイトメトリーにより評価した。図25において、抗CD3/28-活性化初代ヒトT細胞をC末端に融合したmCherryを担持するメソテリン特異的CD3zベースのCAR(SS1z-mCh)、CD3zおよび4-1BB細胞質ドメインを有するCD19特異的CAR(19bbz)またはSS1z-mChおよび19bbz両者の組み合わせをコードする種々のレンチウイルスベクターで形質導入した。mCherryおよび機能的SS1-scFvの発現を、メソテリン-Fc融合タンパク質での染色と続くFITC標識二次的抗Fc抗体での染色後、フローサイトメトリーにより評価した。図26において、抗CD3/28-活性化初代ヒトT細胞を、メソテリン特異的CD3zベースのCAR(SS1z)、FMC63-scFvを担持するCD19特異的CAR(19bbz)または21d4-scFvを担持するCD19特異的CAR(21d4bbz)またはBL22-scFvを担持するCD19特異的CAR(BL22bbz)のいずれかをコードする種々のレンチウイルスベクターで形質導入し、ここで、scFvは、scFv(H2L)における軽鎖可変ドメイン(VL)に5'の重鎖可変ドメイン(VH)またはVH(L2H)に5'に位置するVLからなった。各CD19特異的CARでの形質導入後、T細胞を次いでSS1zと共形質導入した。メソテリンへのSS1z結合および抗CD19-scFvの表面発現を、メソテリン-Fc融合タンパク質と、続くFITCまたはビオチニル化タンパク質Lで標識した二次的抗Fc抗体と続くストレプトアビジンコンジュゲートAPCでの染色後、フローサイトメトリーで評価した。

【1000】

結果：図24は、細胞表面への2完全、リガンド結合scFvベースのCAR(SS1-KIR2DL3およびCD19-KIR2DS2)の共発現が相互排他的であることを示す。図26は、リガンド結合の喪失が、SS1z-mChおよび19bbzと共形質導入された細胞におけるメソテリン結合の減少を有するmCherry発現細胞の存在により説明されるように、細胞におけるCARの発現と無関係に起こることを示す。図26は、scFv結合機能喪失に至るscFv間の相互作用が、異なるscFvベースのCARを使用して観察できることを示し、この効果の普遍性を支持する。これらの観察は、scFvの一方の可変ドメインが、異種scFvベースのキメラ受容体との分子間ペアリングを受けることができ、単一CAR内のscFvによる結合の喪失に至る、図27パネルAに記載したモデルと一致する。

【1001】

実施例12：キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)に基づくキメラ抗原受容体(CAR)は、固形腫瘍における細胞毒性活性を誘発する

CD3ζおよび共刺激性受容体CD28または4-1BBの細胞質ドメインにcisで

10

20

30

40

50

連結した抗原結合ドメインを担持する単一キメラ分子に基づくキメラ抗原受容体(CAR)は、腫瘍に対するT細胞毒性を操作する強力な方法を提供する。ナチュラルキラー(NK)細胞およびT細胞に通常発現されるキラー免疫グロブリン様受容体(KIR)に基づくキメラ多鎖受容体を使用した。単鎖可変フラグメント(scFv)のKIRの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインへの融合により構築し、これは、メソテリン(SS1-KIR)をターゲティングするKIRベースのCARが、さらなる共刺激に非依存的である抗原誘発増殖を有するCD3ζベースのCARと同等の抗原特異的細胞毒性活性およびサイトカイン産生を誘発することを示した。T細胞免疫療法に耐性の中皮腫の異種移植モデルを使用して、メソテリンをターゲティングするKIRベースのCARが、共刺激を有するメソテリン特異的CD3ζベースのCARを担持するT細胞と比較して、後者のCAR修飾T細胞のインビボ持続性にも関わらず、より強力な抗腫瘍活性を示すことをさらに示した。腫瘍浸潤性リンパ球の評価は、KIRベースのCAR+ T細胞が、共刺激性受容体ドメインを有するCD3ζベースのCARと比較して、腫瘍微小環境内で機能低下の獲得に対する抵抗性を示すことを示す。KIRベースのCARが、第二世代CD3ζベースのCARが限られた活性を示す腫瘍の退縮を誘発する効果は、さらに、中皮腫および他の腫瘍、例えば、他の固形腫瘍におけるKIRベースのCARの臨床的評価を支持する。

【1002】

実施例13：メソテリン特異的CARのインビボ抗腫瘍活性

実施例6に記載する異種移植実施例に類似して、一連のメソテリンベースのCAR構築物を、インビボ抗腫瘍活性を評価するために中皮腫のモデルで評価した。3メソテリン特異的CAR構築物を試験した(図39に示す)：SS1抗原結合ドメインおよびCD28を含む細胞質ドメインおよびCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含む第二世代CAR構築物(SS1-28ζ、図39C)、1鎖にSS1抗原結合ドメインおよびKIR2DS2細胞質ドメインを、他鎖にアダプター分子DAP12を含む多鎖KIR-CAR(SS1-KIRS2/DAP12、図39A)およびSS1抗原結合ドメインおよびDAP12を含む細胞質ドメインを含む単鎖KIR-CAR(SS1-DAP12、図39B)。使用したSS1-DAP12構築物の膜貫通ドメインはCD8膜貫通ドメインであった。

【1003】

成体NSGマウスに、 2×10^6 EM-meso細胞を先におよび実施例6に記載のように皮下注射した。初代ヒトT細胞を、SS1-28ζ、SS1-KIRS2/DAP12、SS1-DAP12で形質導入し、90%形質導入効率を達成するかまたは偽遺伝子導入した。 4.3×10^6 のCAR形質導入または偽遺伝子導入初代ヒトT細胞を、腫瘍インプラント後20日目に静脈内注射した。腫瘍体積を、示す時点で、式 $(\pi/6) \times (\text{長さ}) \times (\text{幅})^2$ を使用してカリパスで測定した($n=5$ マウス/群)。腫瘍体積を、40日目(腫瘍退縮の直前)および52日目(実験の終了時)にCAR T細胞処置群にわたって測定し、一元配置ANOVA($p<0.001$)で比較し、群間比較を、事後Scheffé F検定で実施した。*は、両時点で偽対照と統計的に異なることを示す($p<0.001$)。

【1004】

図40に示すように、SS1-DAP12は抗腫瘍活性を示し、偽遺伝子導入および無T細胞対照と比較して、腫瘍体積を減少させた。SS1-KIRS2/DAP12は、実施例6に記載する結果に類似して、SS1-28ζ構築物により達成されるのと同様な強固な抗腫瘍活性を示した。

【1005】

実施例14：メソテリンと結合するヒト抗原結合ドメイン含有NKR-CARのインビトロ活性

メソテリンに結合するヒト抗原結合ドメイン含有NKR-CARを産生した。表4に提供するようなメソテリン、M-5、M-11、M-12、M-14、M-16、M-17、M-21およびM-23に結合するヒトscFv配列を、KIR2DS2由来の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインと融合させ、以後、huMeso-KIRS2と証する。

レンチウイルス構築物を、先の実施例に記載のように、例えば、ペプチド開裂部位 T2A により NK R-CAR に連結した DAP12 をさらに含む バイシストロニック レンチウイルスベクターで産生した。種々の インビトロ アッセイを実施して、ヒト抗メソテリン cFv 含有メソテリン特異的 NK R-CAR の CAR 活性を評価した。

【1006】

表面発現

初代ヒト T 細胞における huMe s o-K I R S 2 構築物の表面発現を決定するために、アッセイを実施した。初代ヒト T 細胞を抗 CD3 / 抗 CD28 T 細胞アクティベータービーズ (Dynabeads (登録商標) CD3 / CD28 C T STM, Life Technologies) で刺激した。刺激 24 時間後、T 細胞を、huMe s o-K I R S 2 CAR : M-5、M-11、M-12、M-14、M-16、M-17、M-21、および M23 または対照 SS1-PL EN S および SS1-P T R P E をコードする レンチウイルスベクターで形質導入した。細胞を 7~8 日拡張させ、可溶性メソテリン-V5-H i s x 12、続く V5 エピトープへの F I T C コンジュゲート抗体またはビオチニル化ヤギ抗ヒト抗体、続く P E コンジュゲート S A を使用して、記載する CAR の発現をフローサイトメトリーにより分析した。huMe s o-K I R S 2 構築物の表面発現を、図 41 に示すように、フローサイトメトリー分析で定量した。huMe s o-K I R S 2 構築物は、初代ヒト T 細胞表面の発現を示した。

【1007】

細胞毒性

CAR 細胞発現 huMe s o-K I R S 2 の標的特異的細胞毒性活性もアッセイした。初代ヒト T 細胞発現 huMe s o-K I R S 2 を ⁵¹Cr 標識メソテリン発現標的細胞 (メソテリンを発現するように操作した K562 細胞、K562-me s o) またはメソテリンを発現しない対照標的細胞 (K562 細胞、K562) と、種々のエフェクター T 細胞対標的細胞比で混合した (0:1、10:1、20:1 および 30:1)。細胞毒性を、4 時間後上清に放出される ⁵¹Cr の画分の測定により決定した。メソテリン (K562) を発現しない対照細胞での対照実験から予測されるとおり、全ての CAR 発現細胞は、相当量の細胞毒性を示さなかった。図 42 B において、非形質導入 (NTD) 細胞は、抗原特異的細胞毒性を示さなかった。M-23 および M-12 s c F v 含有 HuMe s o-K I R S 2 は、わずかな抗原特異的細胞毒性を示した。しかしながら、M-5、M-11、M-16、M-17 および M-21 含有 huMe s o-K I R S 2 は、SS1 含有対照と類似レベルで、相当な抗原特異的細胞毒性を示した。

【1008】

サイトカイン産生

huMe s o-K I R S 2 発現 CAR 細胞のサイトカイン産生も評価した。先に記載のように、初代ヒト T 細胞を刺激し、huMe s o-K I R S 2 で形質導入し、拡張した。発現後、形質導入 T 細胞を K562 (メソテリン陰性細胞、白抜き棒) またはメソテリンを発現するように操作した K562 細胞 (黒色棒) と 2:1 比で混合した。サイトカイン濃度 (I F N γ および I L - 2) を、刺激 24 時間後上清で、記載するサイトカインについての E L I S A により決定した。図 43 A に示すように、M-5、M-11、M-14、M-16、M-17 および M-23 含有 huMe s o-K I R S 2 発現 CAR 細胞は I F N γ を産生した。図 43 B に示すように、M-5、M-11、M16 および M17 含有 huMe s o-K I R S 2 発現細胞は I L - 2 を産生した。

【1009】

実施例 15：低用量 RAD001 は、細胞培養モデルにおける CART 増殖を刺激する

インビトロでの CAR T 細胞増殖に対する RAD001 の低用量の効果を、CART 発現細胞と標的細胞を種々の濃度の RAD001 存在下で共培養することにより評価した。

【1010】

材料および方法

CAR形質導入T細胞の産生

ヒト化、抗ヒトCD19 CAR(hu CART19)レンチウイルス転移ベクターを、VSVg偽型レンチウイルス粒子に封入されたゲノム材料を産生するために使用した。ヒト化抗ヒトCD19 CAR(hu CART19)のアミノ酸およびヌクレオチド配列は、2014年3月15日に出願されたPCT出願、WO2014/153270号に記載されたCAR 1、ID 104875であり、そこで配列番号85および31とされている。

【1011】

レンチウイルス転移ベクターDNAを、3パッケージング要素VSVg env、gag/polおよびrevと、リポフェクタミン試薬と組み合わせて混合し、レンチX293T細胞をトランスフェクトする。培地をその後24時間および30時間に交換し、ウイルス含有培地を採取し、濾過し、-80℃で保存する。CARTを、健常ドナー血液またはleukopakの陰性磁気選択により得た新鮮または凍結ナイーブT細胞の形質導入により産生する。T細胞を、抗CD3/抗CD28ビーズと24時間インキュベーションすることにより活性化し、ウイルス上清または濃縮ウイルス(それぞれ、MOI=2または10)を培養に添加する。修飾T細胞を約10日増殖させる。細胞形質導入のパーセンテージ(細胞表面のCARを発現)およびCAR発現レベル(相対蛍光強度、Geo Mean)を、7~9日目にフローサイトメトリー分析で決定する。増殖速度遅延および約350fLに近づくT細胞サイズの組み合わせが、T細胞をその後の分析のために凍結保存する状態を決定する。

【1012】

CART増殖評価

CARTの機能性を評価するために、T細胞を融解し、計数し、生存能をCellometerで評価する。各培養における多数のCAR陽性細胞を、非形質導入T細胞(UTD)を使用して標準化する。CARTに対するRAD001の影響を、50nMから開始してRAD001のタイトレーションにより試験した。全共培養実験において使用する標的細胞株は、CD19を発現し、ルシフェラーゼを発現するように形質導入されたヒト前B細胞急性リンパ芽球性白血病(ALL)細胞株、NALM-6である。

【1013】

CARTの増殖を測定するために、T細胞を標的細胞と1:1比で培養する。アッセイを4日行い、細胞をCD3、CD4、CD8およびCAR発現について染色する。多数のT細胞を、対照としてカウンティングビーズを使用するフローサイトメトリーにより評価する。

【1014】

結果

CART細胞の増殖能力を、4日共培養アッセイで試験した。多数のCAR陽性CD3陽性T細胞(濃色棒)および総CD3陽性T細胞(薄色棒)を、CAR形質導入および非形質導入T細胞とNALM-6の培養後評価した(図39)。huCART19細胞は、0.016nM未満のRAD001の存在下で培養したとき増殖し、化合物が高濃度ではそれより少なく増殖した。重要なことに、0.0032および0.016nM RAD001両者で、増殖はRAD001非添加で観察されるより高かった。非形質導入T細胞(UTD)は検出可能な増殖を示さなかった。

【1015】

実施例16:低用量RAD001はインビボでCART増殖を刺激する

本実施例は、huCAR19細胞が種々の濃度のRAD001存在下でインビボで増殖する能力を評価する。

【1016】

材料および方法:

NALM6-luc細胞: NALM6ヒト急性リンパ芽球性白血病(ALL)細胞株は、再発ALL患者の末梢血から展開された。その後、細胞はホタルルシフェラーゼでタグ付け

10

20

30

40

50

された。これらの懸濁細胞を、10%熱不活性化ウシ胎児血清添加RPMIで増殖させた。

【1017】

マウス：6週齢NSG(NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ)マウスを、Jackson Laboratory(stock number 005557)から得た。

【1018】

腫瘍インプラント：NALM6-1uc細胞を、インビトロで10%熱不活性化ウシ胎児血清添加RPMIで増殖および拡張した。次いで、細胞を15mlコニカルチューブに移し、2回冷滅菌PBSで洗浄した。NALM6-1uc細胞を、次いで、計数し、PBS1ミリリットルあたり 10×10^6 細胞濃度で再懸濁した。細胞を氷上に置き、直ぐに(1時間以内に)マウスにインプラントした。NALM6-1uc細胞を、100 μ l体積で、合計マウスあたり 1×10^6 細胞で尾静脈に静脈注射した。

10

【1019】

CAR T細胞投与：マウスに、腫瘍インプラント7日後 5×10^6 CAR T細胞を投与した。細胞を、37℃水浴で一部溶かし、その後、1mlの冷滅菌PBSを細胞を含むチューブに添加しながら完全に融解した。融解細胞を15mlファルコンチューブに移し、PBSで最終体積10mlに合わせた。細胞を、各1000rpmで10分、2回洗浄し、次いで、血球計数器で計数した。T細胞を、次いで、冷PBS1mlあたり 50×10^6 CAR T細胞濃度で懸濁し、マウスに投与するまで氷上に維持した。マウスに、100 μ lのCAR T細胞を、マウスあたり 5×10^6 CAR T細胞の用量で、尾静脈から静脈注射した。群あたり8マウスが、100 μ lのPBS単独(PBS)またはヒト化CD19 CAR T細胞で処置された。

20

【1020】

RAD001投与：1mg RAD001に相当する50mg濃縮マイクロエマルジョンを製剤し、投与時にD5W(デキストロース5%水溶液)に再懸濁した。マウスに、200 μ lの所望の用量のRAD001を連日経口投与(強制喫食)した。

【1021】

PK分析：マウスに、腫瘍インプラント7日後から開始して、連日RAD001を投与した。投与群は次のとおりであった：0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kgおよび10mg/kg。マウスは最初のおよび最後のRAD001投与0日目および14日後、PK分析のために次の時点で採血した：15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間および24時間。

30

【1022】

結果：

RAD001の増殖および薬物動態を、NALM6-1uc腫瘍担持NSGマウスで試験した。RAD001単独の連日経口投与は、NALM6-1uc腫瘍増殖に影響を有しなかった(図40)。RAD001の薬物動態分析は、腫瘍担持マウスの血中でかなり安定であることを示した(図41Aおよび41B)。0日目および14日目両者のPK分析は、血中のRAD001濃度が、試験した最低用量(0.3mg/kg)の投与の24時間後でも10nm以上であることを示す。

40

【1023】

これらの用量に基づき、huCAR19 CAR T細胞を、これらの細胞の増殖能を決定するために、RAD001を伴いまたは伴わずに投与した。使用した最高用量は、投与24時間後の血中のRAD001のレベルに基づき、3mg/kgであった。最後のRAD001の投与の24時間後RAD001濃度が10nmを超えていたため、いくつかのRAD001の低用量を、CAR T細胞でのインビボ研究に使用した。CAR T細胞を、連日経口RAD001投与開始1日前にIV投与した。マウスを、T細胞増殖についてFACSでモニターした。

【1024】

最低用量のRAD001は、CAR T細胞の増殖増加を示す(図42)。この増殖増加

50

は、 $CD8^{+}$ CAR T細胞よりも $CD4^{+}$ CAR T細胞でより明白であり、長い。しかしながら、 $CD8^{+}$ CAR T細胞で、増殖増加は、CAR T細胞投与後最初の時点でしか見ることができない。ある態様において、RNA CAR T細胞を、チェックポイント阻害剤と組み合わせても使用できる。

【1025】

ここに引用する各および全ての特許、特許出願および刊行物の開示を、その全体を、引用により本明細書に包含させる。本発明は、特定の態様を参照して開示しているが、本発明の他の態様およびバリエーションが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく他の当業者により考案され得ることは明らかである。点分お請求項は、全てのこのような態様および同等なバリエーションを含むことを意図する。

10

【図1】

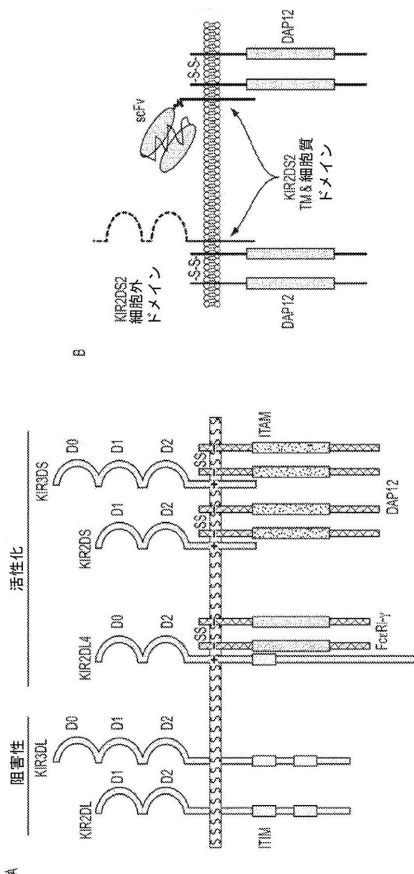


FIG. 1

【図2】

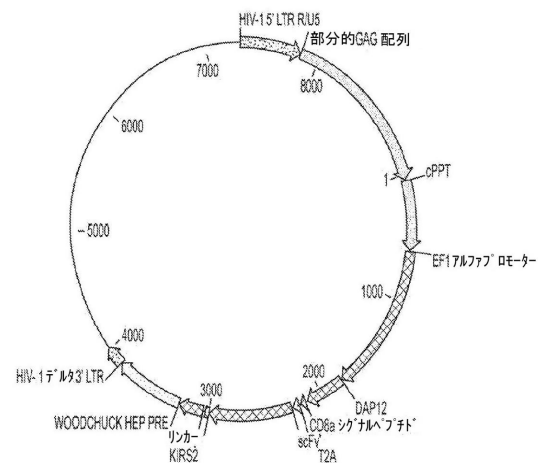


FIG. 2

【図 3】

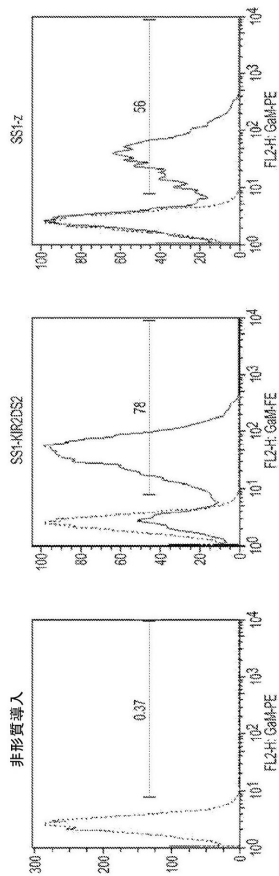


FIG. 3

【図 4】

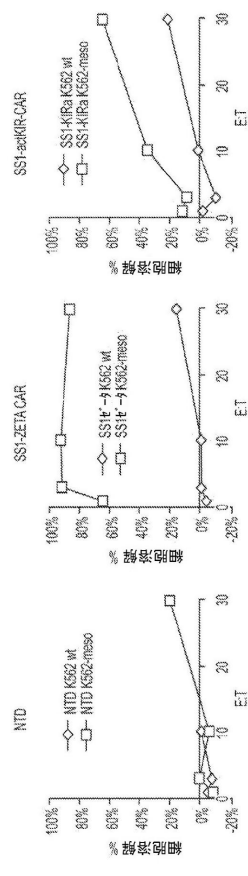


FIG. 4

【図 5】

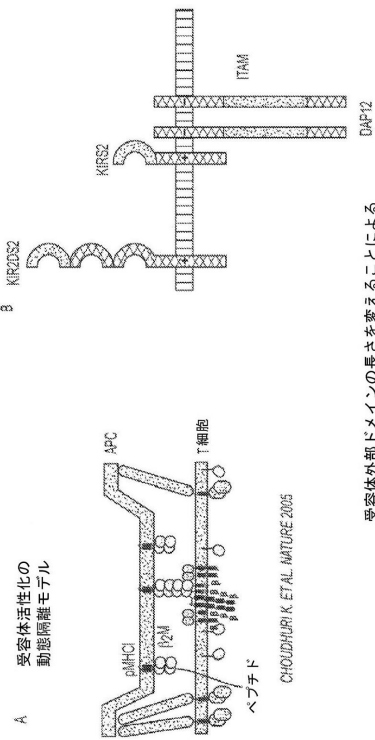


FIG. 5

受容体外部ドメインの長さを変えることによる
メソテリン特異的 KIR-CAP の最適化

【図 6】

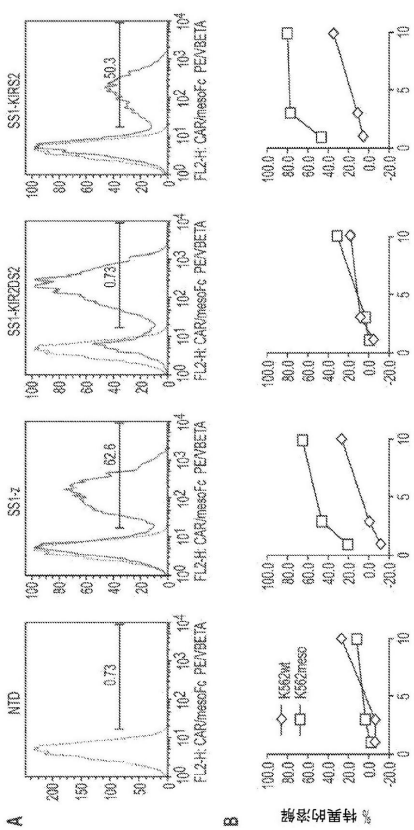


FIG. 6

【図 7】

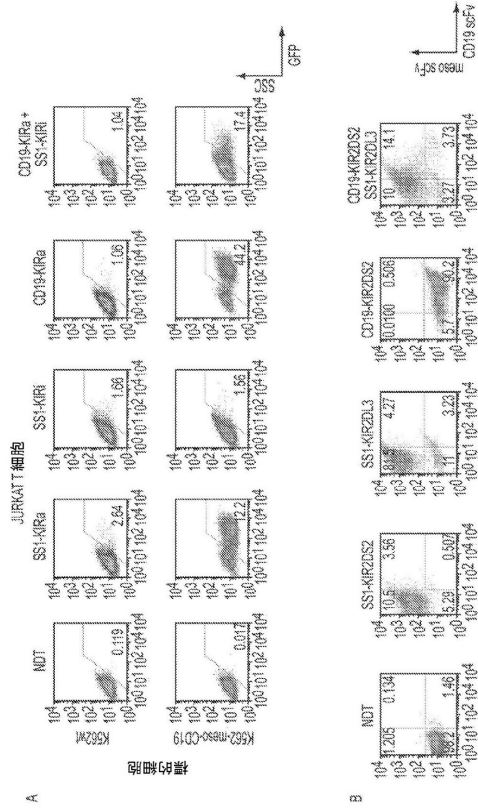


FIG. 7

【図 8】

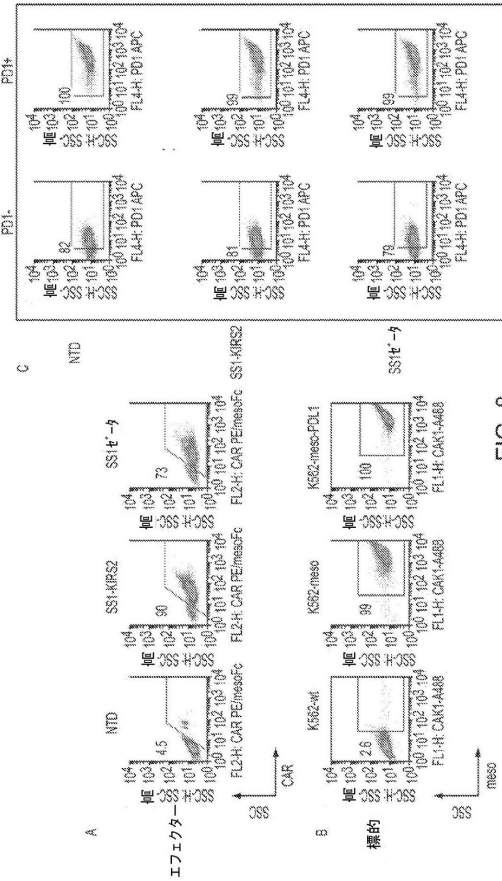


FIG. 8

【図 9】

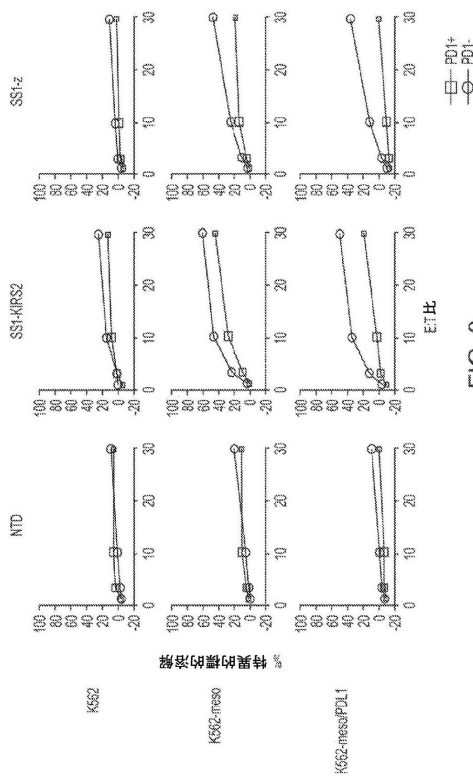


FIG. 9

【図 10】

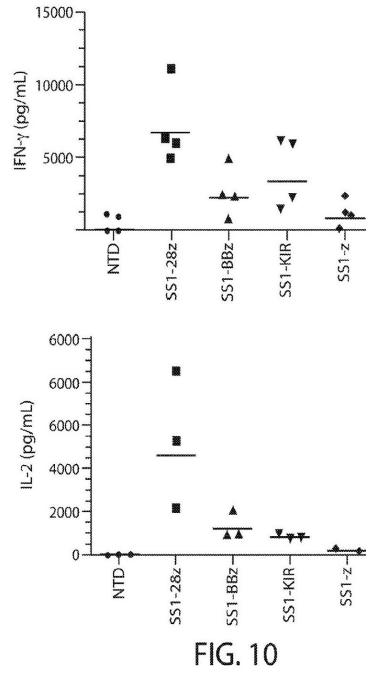


FIG. 10

【図 1 1】

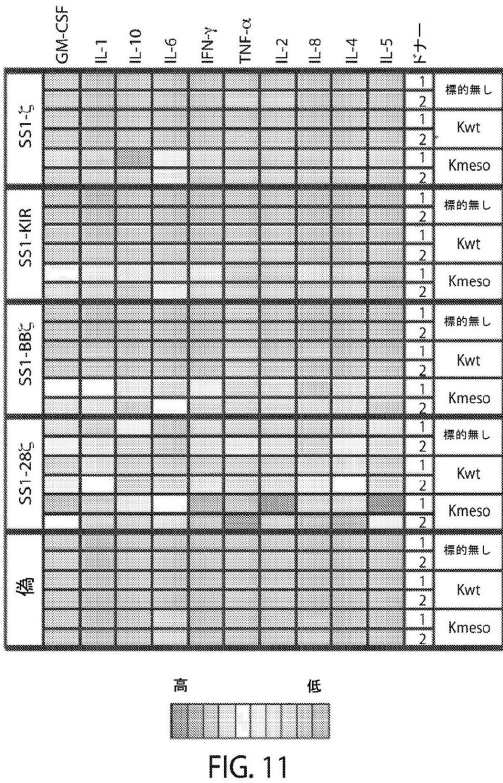


FIG. 11

【図 1 3】

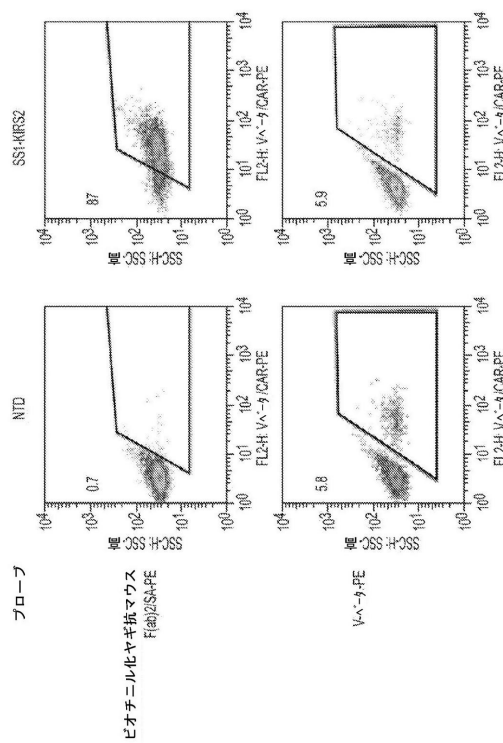


FIG. 13

【図 1 2】

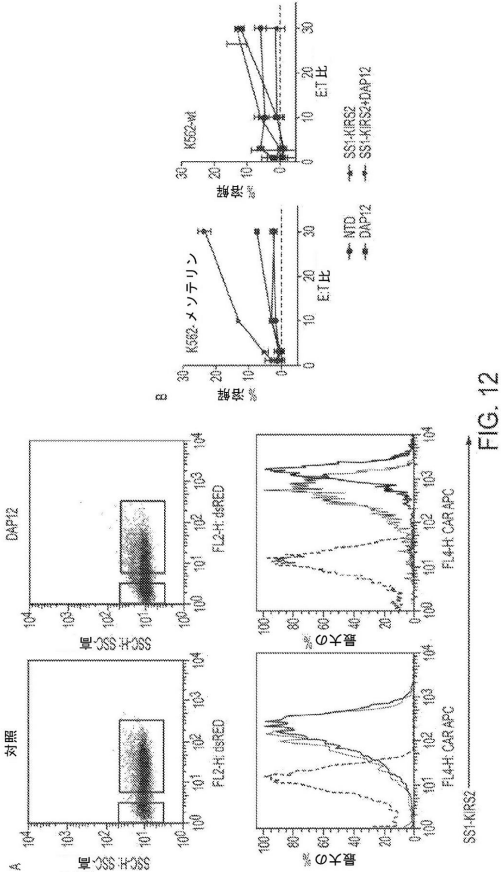


FIG. 12

【図 1 4】

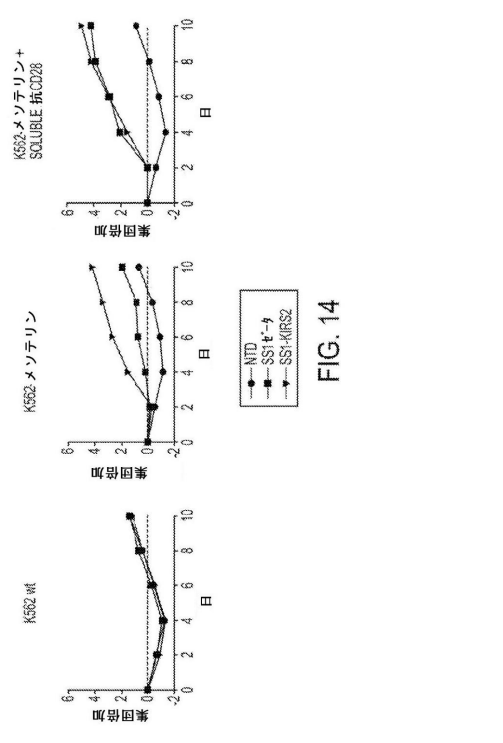


FIG. 14

【図 15】

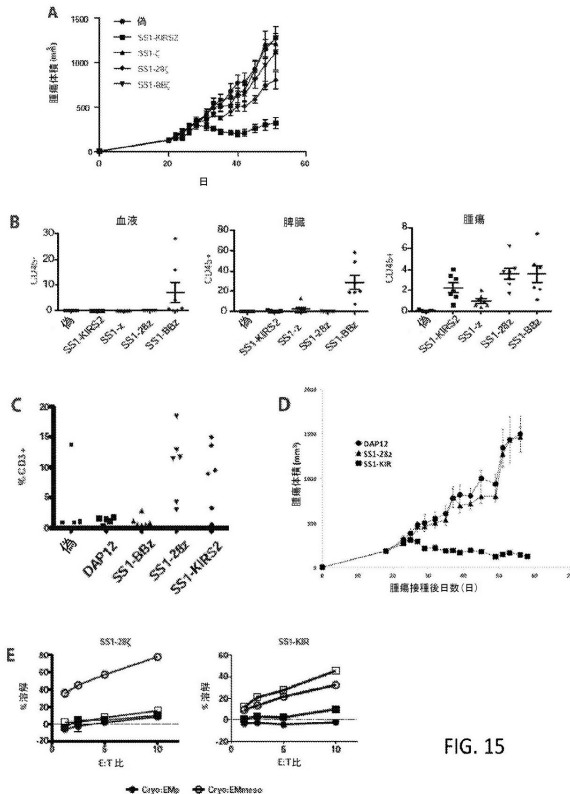


FIG. 15

【図 16】

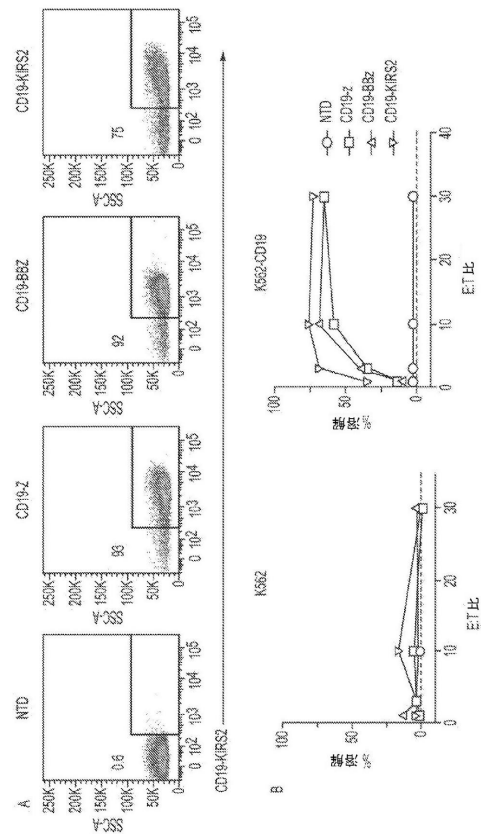


FIG. 16

【図 17】

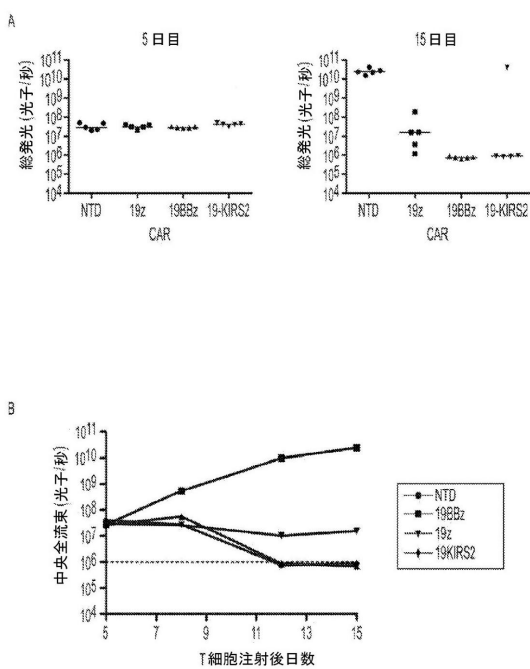


FIG. 17

【図 18】

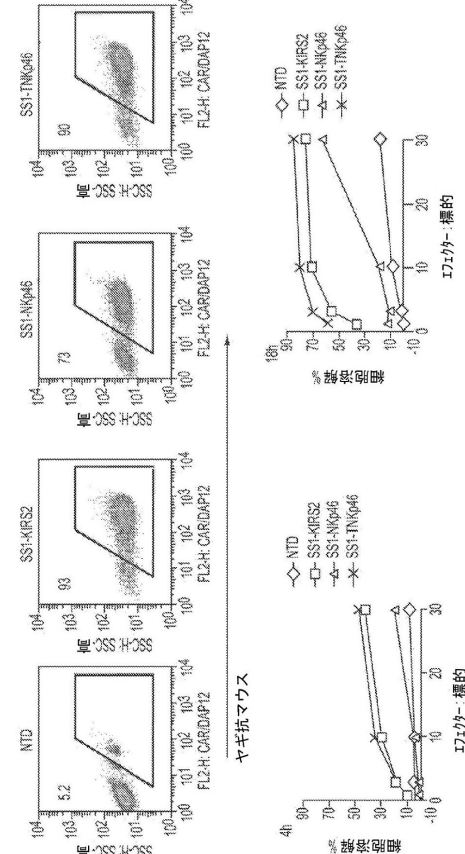


FIG. 18

【図 19】

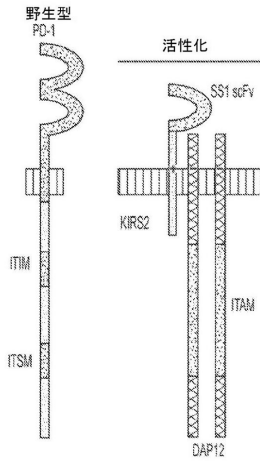


FIG. 19

【図 21】

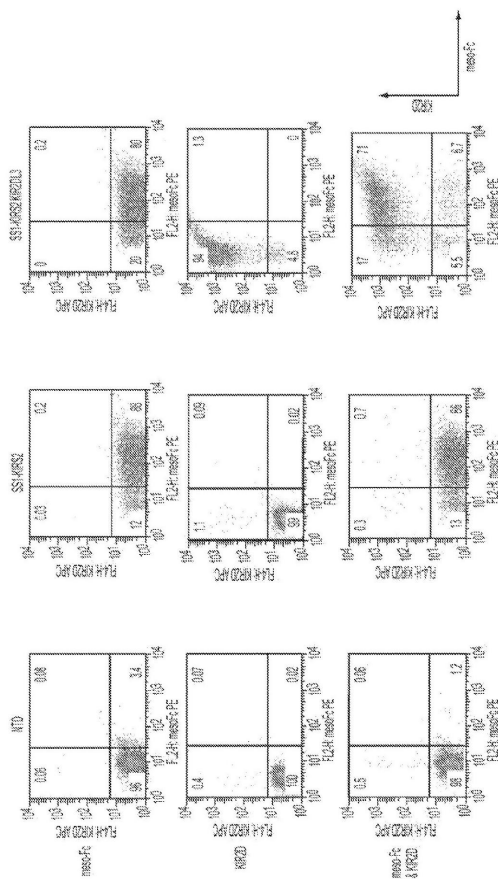


FIG. 21

【図 20】

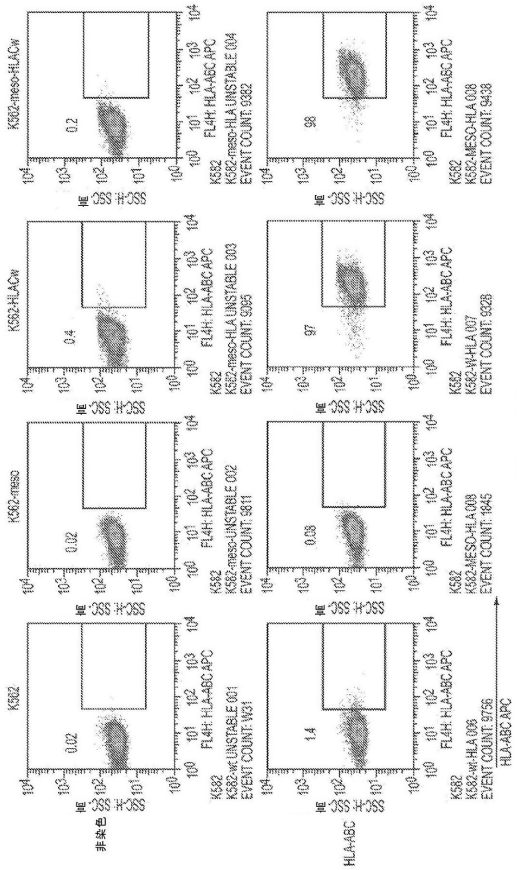


FIG. 20

【図 22】

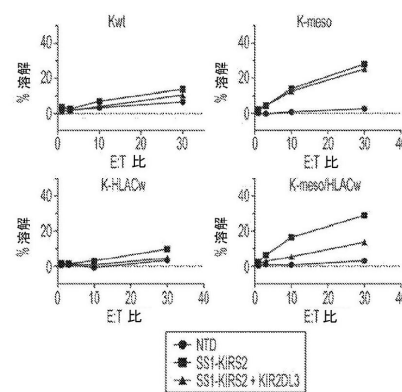


FIG. 22

【図 2 3】

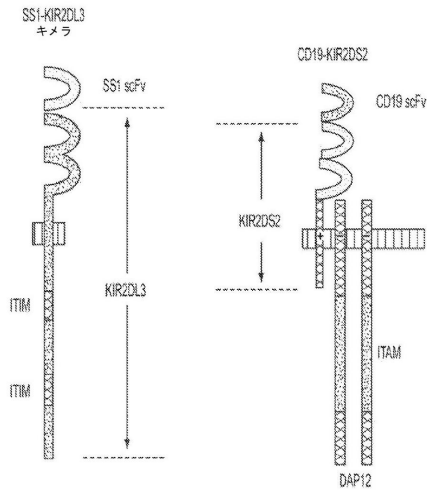


FIG. 23

【図 2 4】

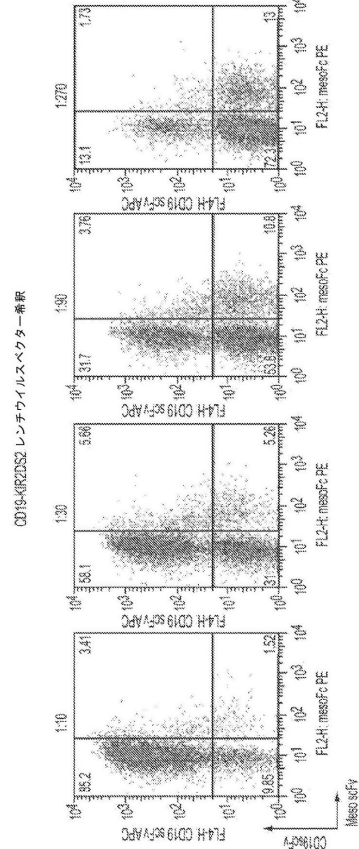


FIG. 24

【図 2 5】

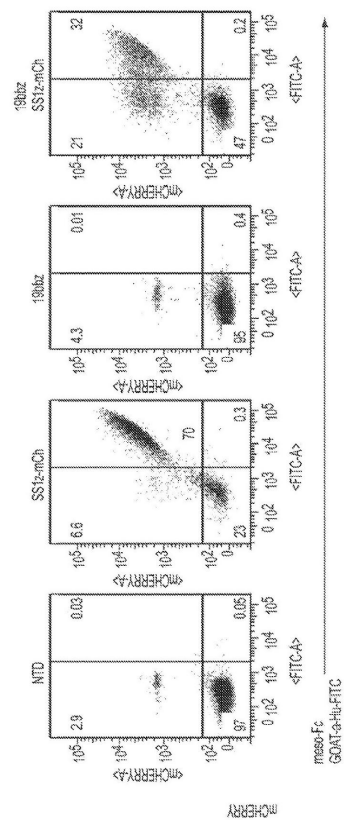


FIG. 25

【图 2 6】

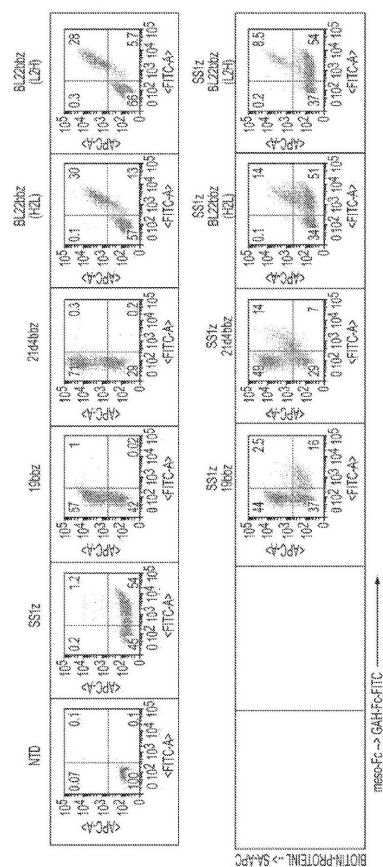


FIG. 26

【図 27】

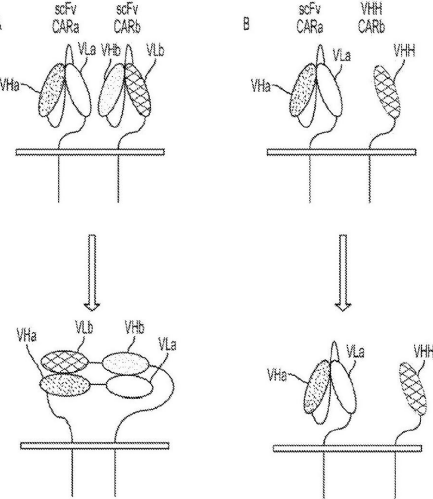


FIG. 27

【図 28】

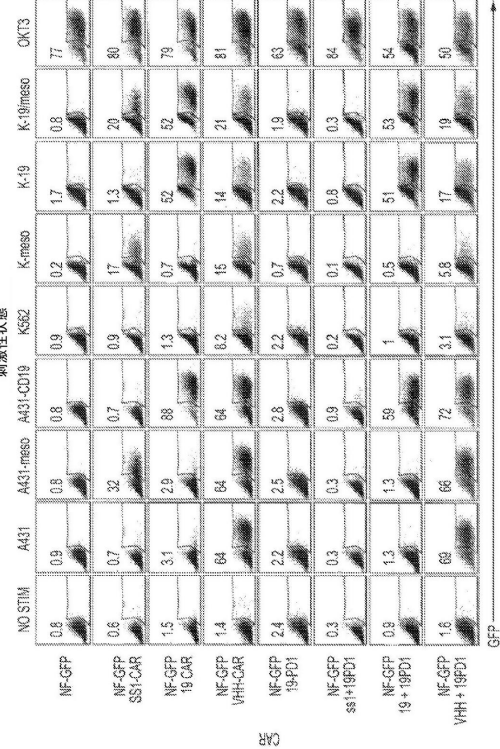


FIG. 28

【図 29 - 1】

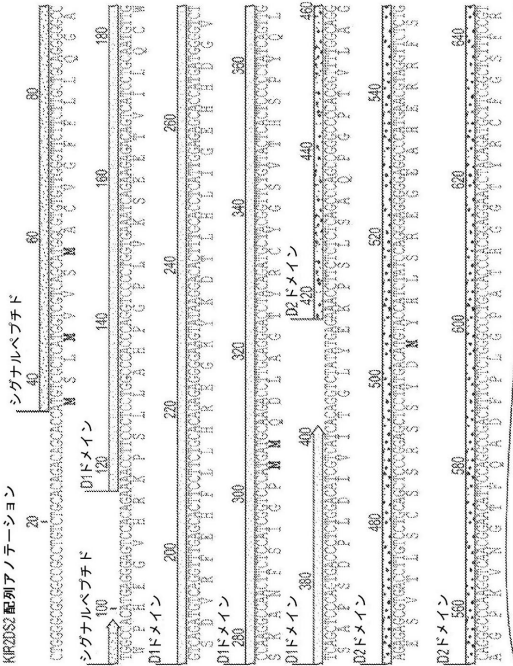


FIG. 29

【図 29 - 2】

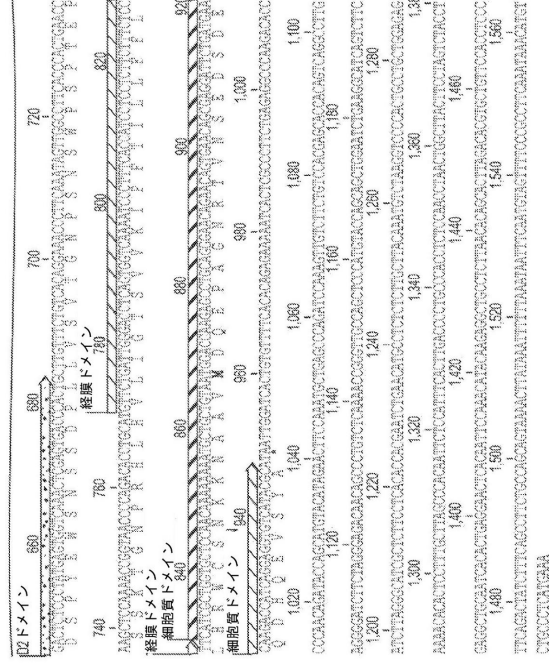


FIG. 29
続き

【図 30-1】

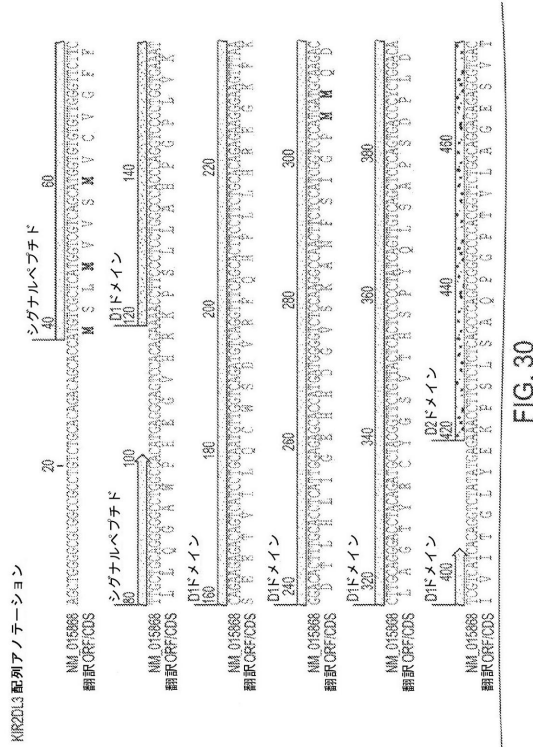
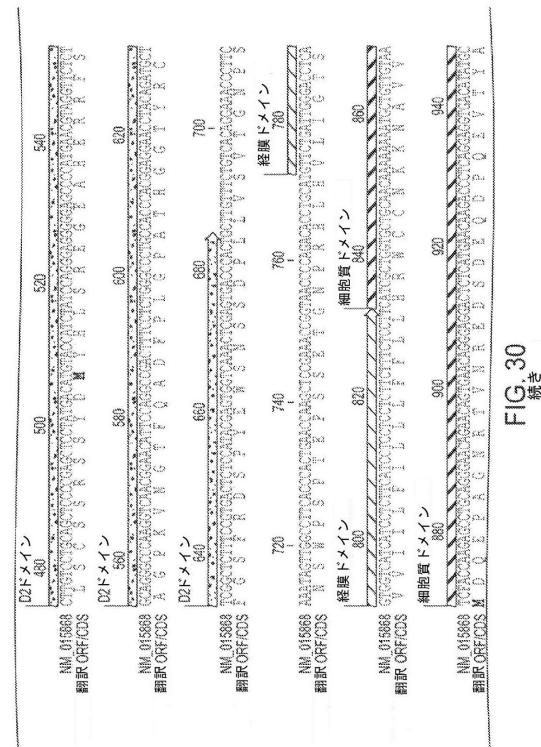
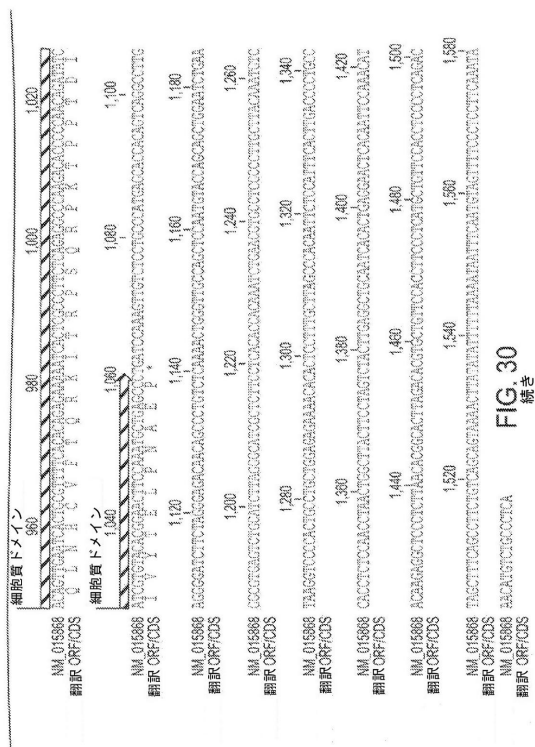


FIG. 30

【図 30-2】

FIG. 30
続き

【図 30-3】

FIG. 30
続き

【図 31-1】

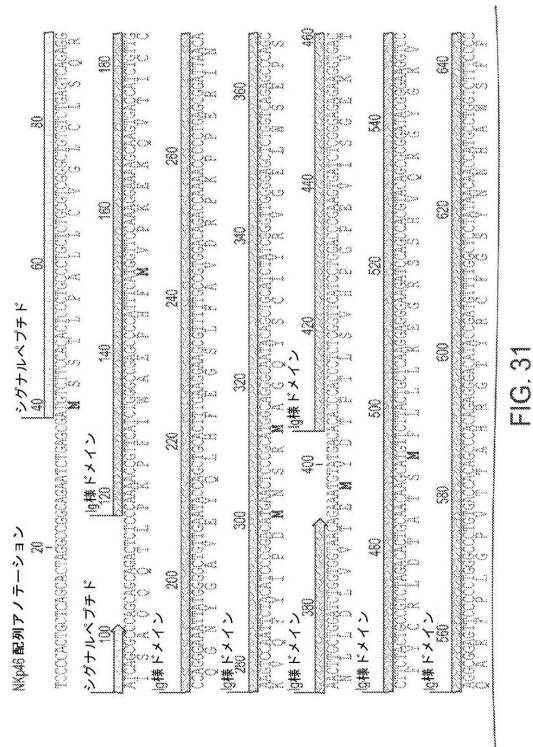


FIG. 31

【図 3 1 - 2】

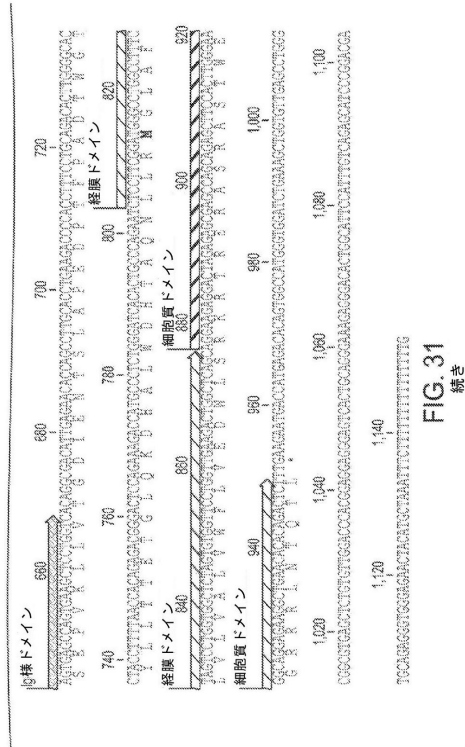


FIG. 31
続き

【図 3 2 - 1】

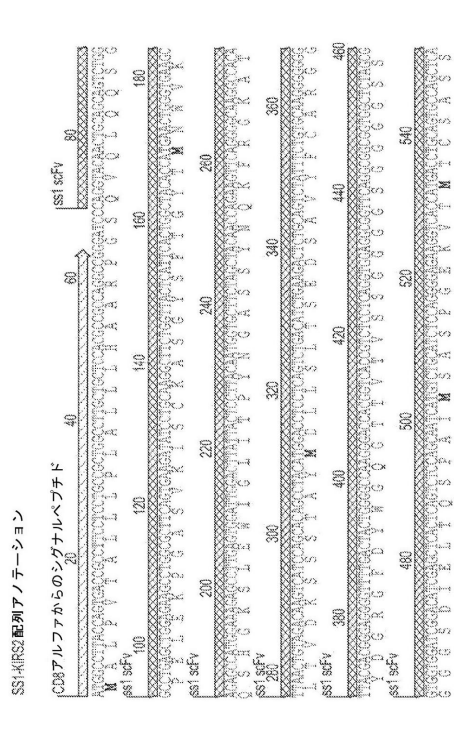


FIG. 32

【図 3 2 - 2】

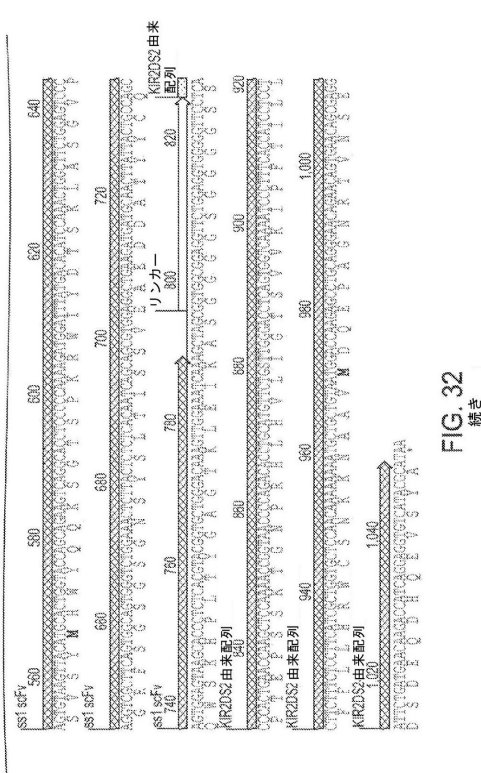


FIG. 32
続き

【図 3 3 - 1】

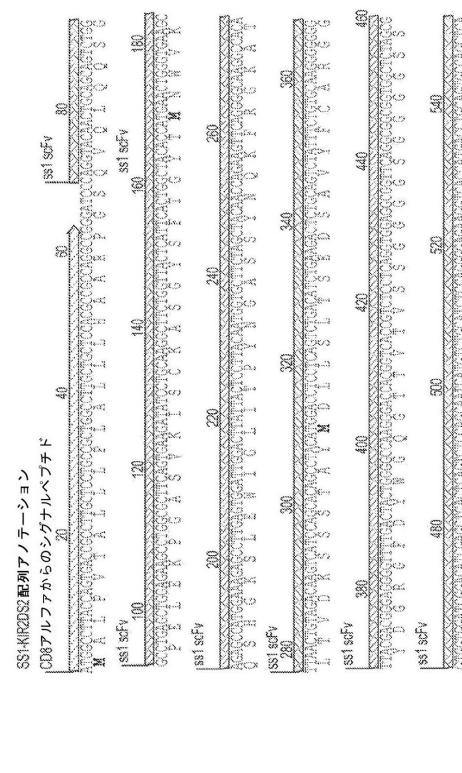


FIG. 33

【図 3 3 - 2】

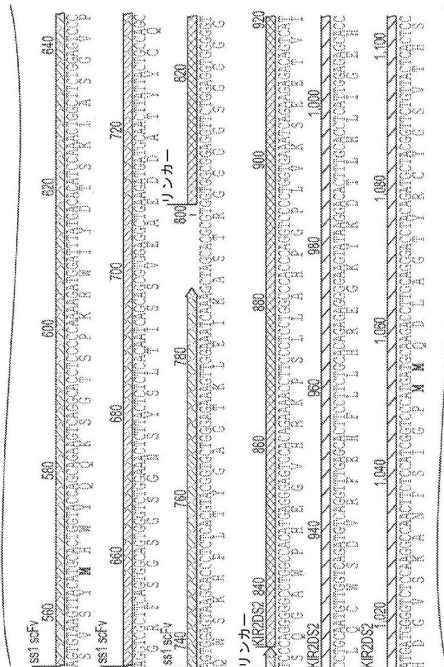
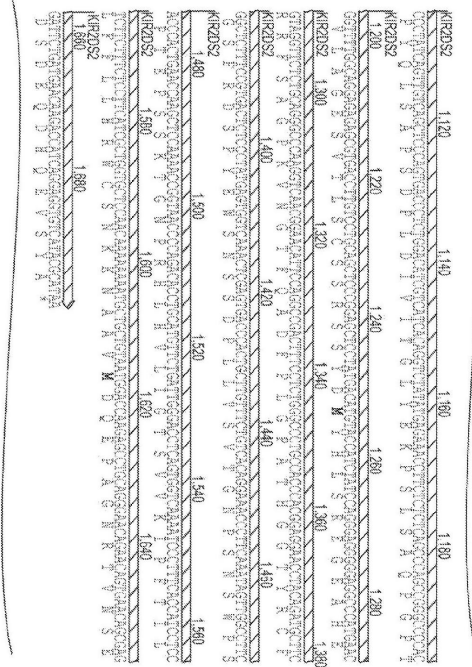


FIG. 33 続

【图 3 3-3】



33 EG 光

【図 3 4 - 1】

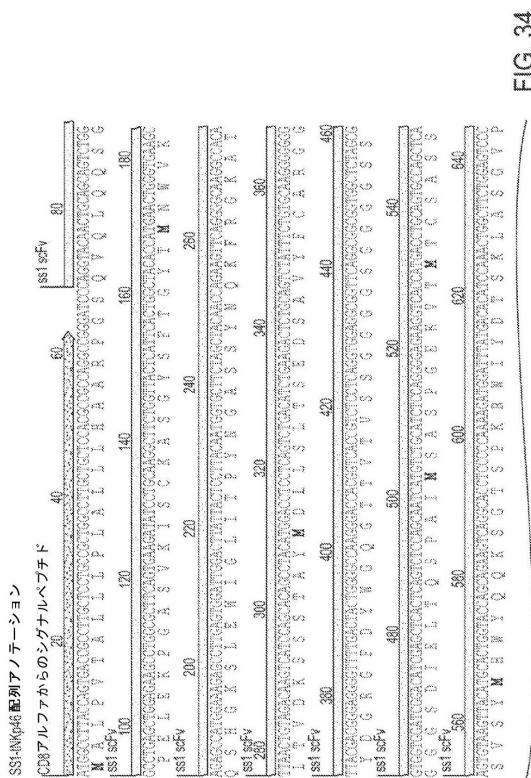


FIG. 34

【図 3 4 - 2】

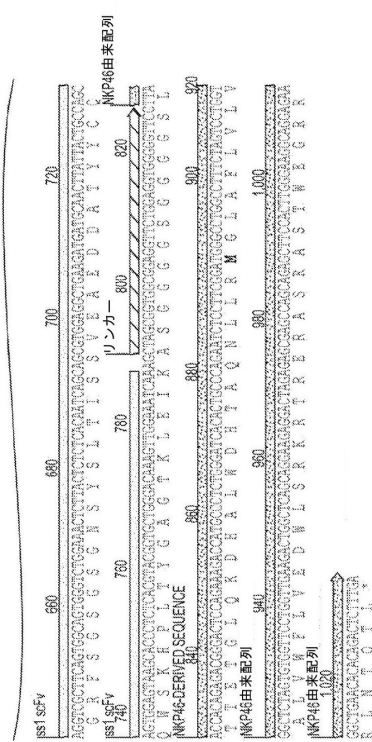


FIG. 34 続老

【図 3 5 - 1】

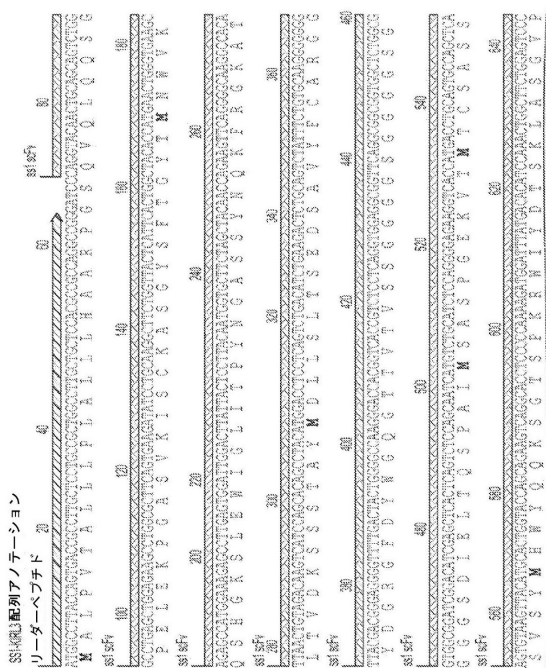


FIG. 35

【図 3 5 - 2】

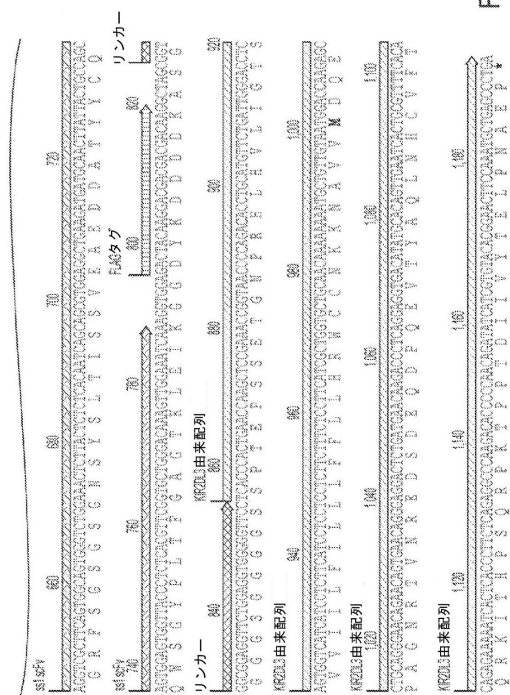


FIG. 35
続き

【図 3 6】

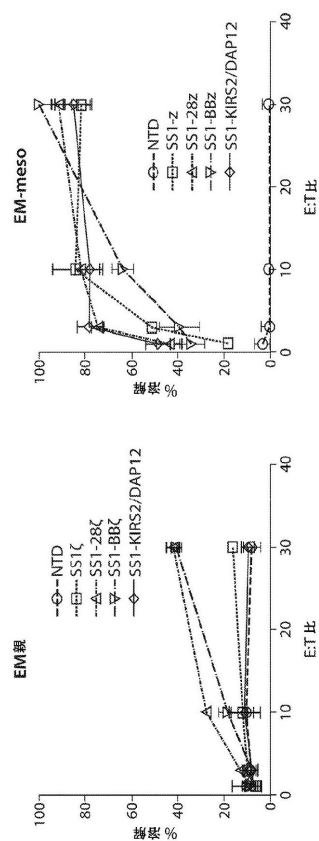


FIG. 36

【図 3 7】

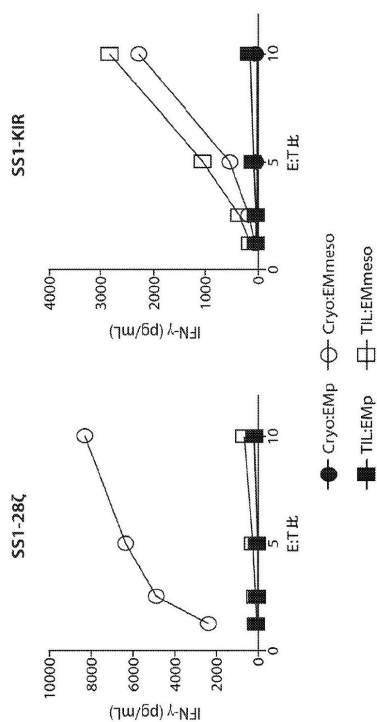


FIG. 37

【図 38】

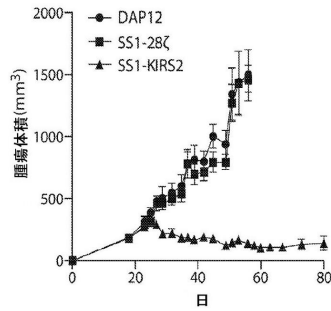


FIG. 38

【図 40】

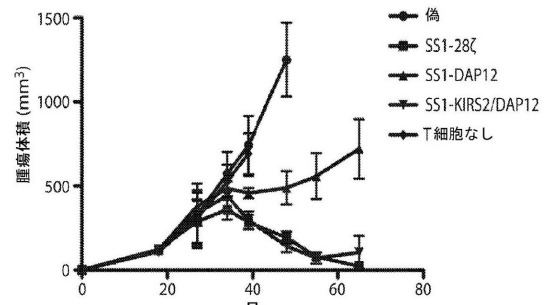


FIG. 40

【図 39】

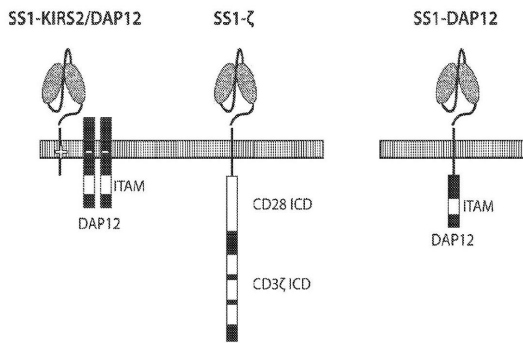


FIG. 39

【図 41-1】

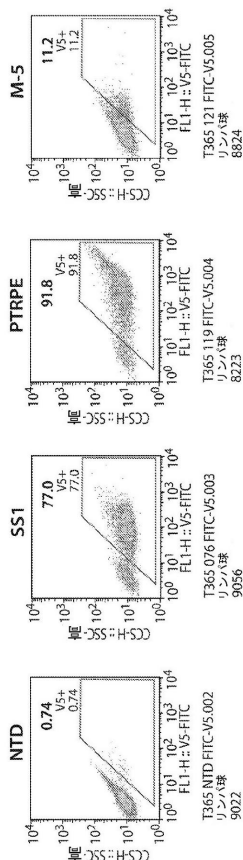


FIG. 41-1

【図 41-2】

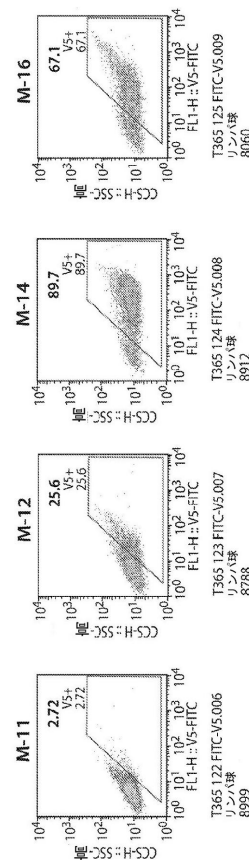


FIG. 41-2

【図 4 1 - 3】

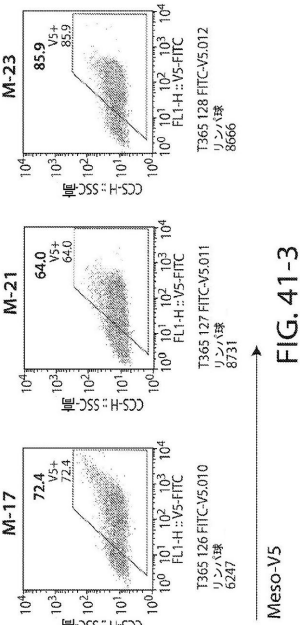


FIG. 41-3

【図 4 1 - 4】

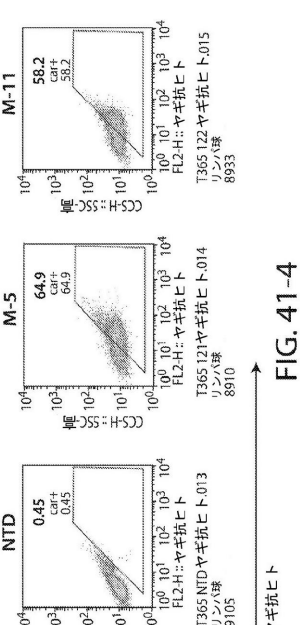


FIG. 41-4

【図 4 1 - 5】

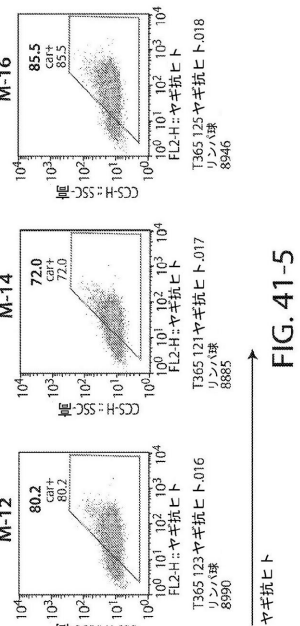


FIG. 41-5

【図 4 1 - 6】

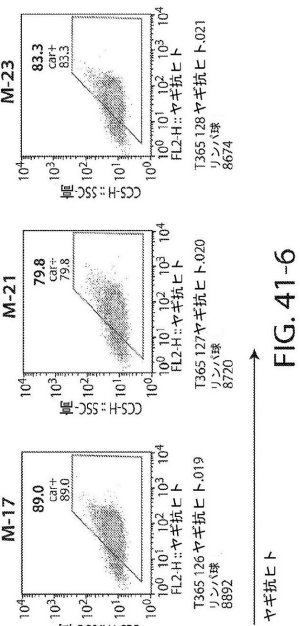


FIG. 41-6

【図 4 2】

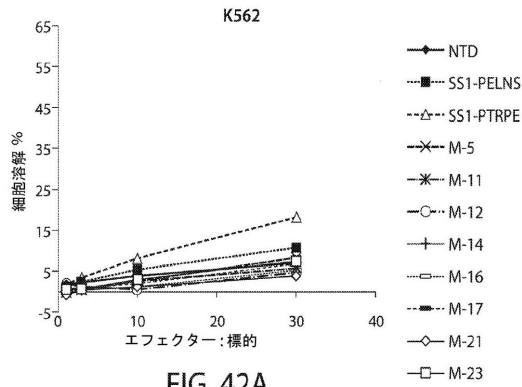


FIG. 42A

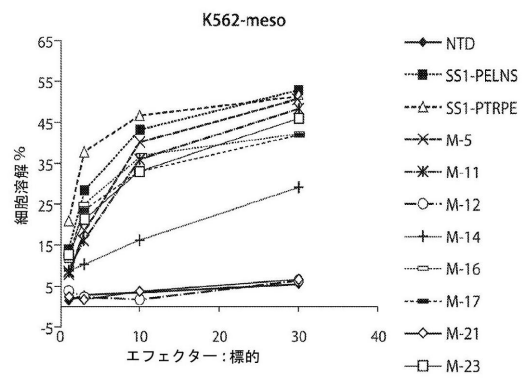


FIG. 42B

【図 4 3 A】

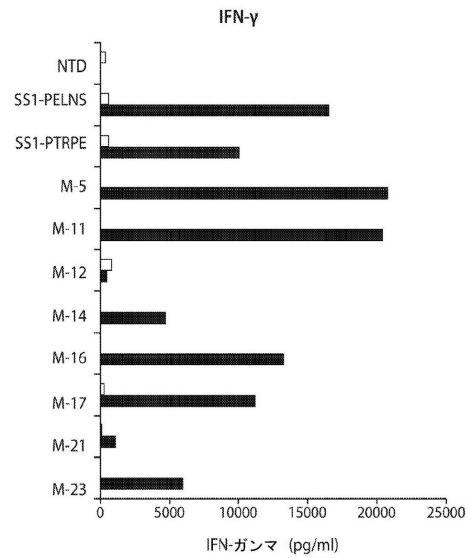


FIG. 43A

【図 4 3 B】

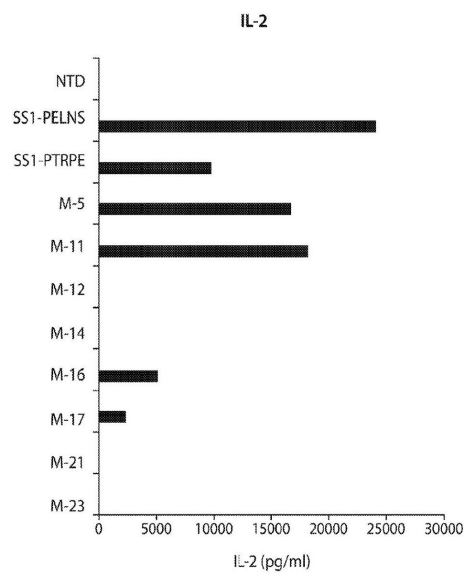
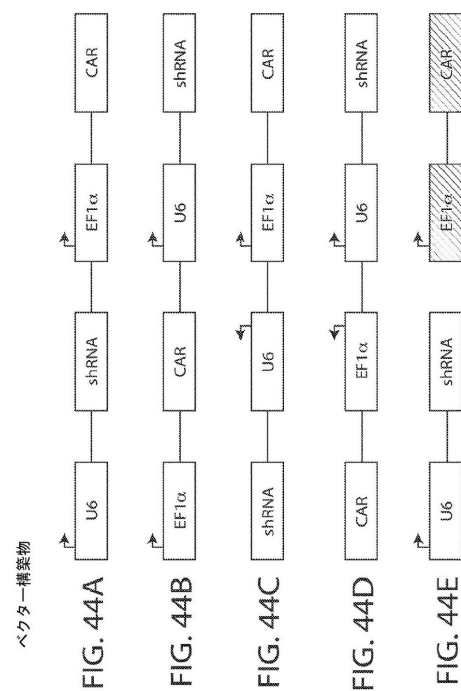


FIG. 43B

【図 4 4】



【図 45】

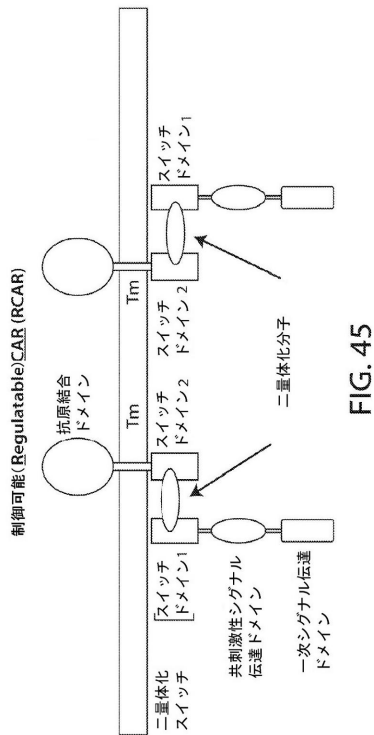


FIG. 45

【図 46】

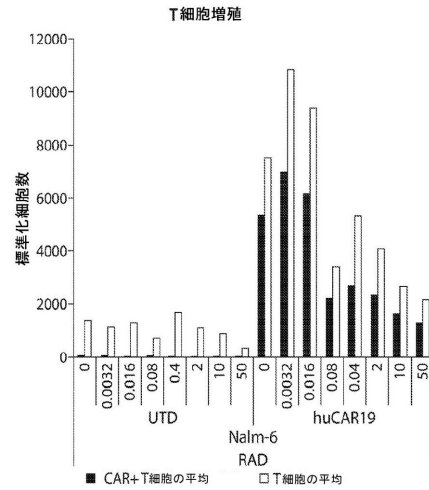


FIG. 46

【図 47】

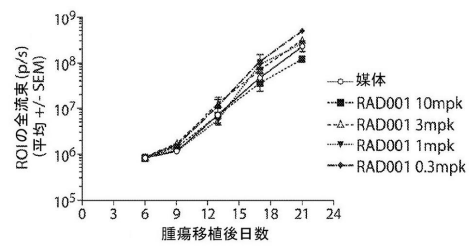


FIG. 47

【図 48】

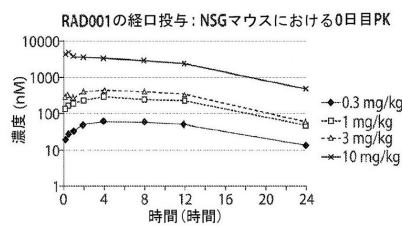


FIG. 48A

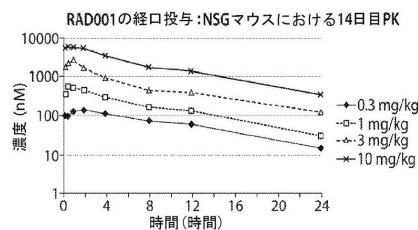


FIG. 48B

【図 49】

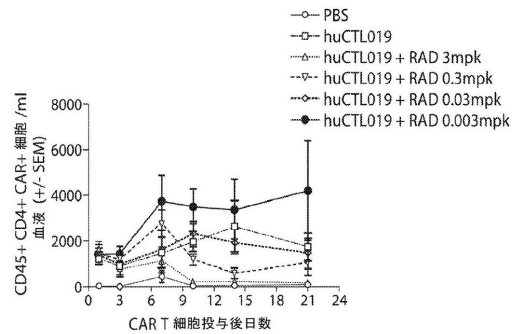


FIG. 49A

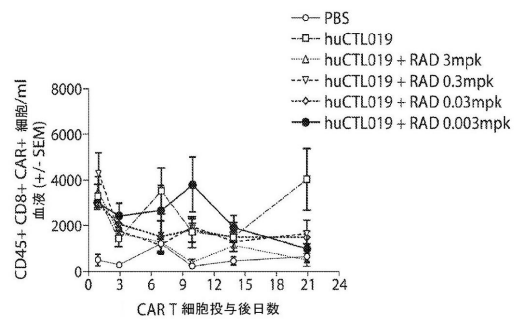


FIG. 49B

【配列表】

0006839074000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
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 0 5

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 グレゴリー・ビーティ

アメリカ合衆国 1 9 1 0 6 ペンシルベニア州フィラデルフィア、スプリング・ストリート 6 2 1 番

(72)発明者 ボリス・エンヘルス

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ニーラジャ・イダマカント

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 カール・エイチ・ジューン

アメリカ合衆国 1 9 0 6 6 ペンシルベニア州メリオン・ステーション、ベアード・ロード 4 0 9 番

(72)発明者 アンドレアス・レーザ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5 0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 マイケル・シー・ミローン

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

(72)発明者 ソン・ホイジュエン

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 シャンハイ、チャンジアン・ハイテク・パーク、ハレイ・ロード、レイン 8 9 8、ナンバー 8 ビルディング、チャイナ・ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ

(72)発明者 エンシウ・ワン

アメリカ合衆国 1 9 0 8 2 ペンシルベニア州アッパー・ダービー、ギャレット・ロード 1 6 0 0 番

(72)発明者 チャーロン・ウー

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 シャンハイ、チャンジアン・ハイテク・パーク、ハレイ・ロード、レイン 8 9 8、ナンバー 8 ビルディング、チャイナ・ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 特表 2 0 1 7 - 5 0 0 8 6 9 (JP, A)

特表 2 0 1 4 - 5 0 7 1 1 8 (JP, A)

国際公開第 2 0 1 4 / 1 3 0 6 5 7 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 3 / 1 4 2 0 3 4 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 4 2 6 6 1 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 4 / 1 2 7 2 6 1 (WO, A 1)

特表 2 0 0 1 - 5 1 2 0 1 7 (JP, A)

国際公開第2013/051718 (WO, A1)

The Journal of Immunology, 2004年, Vol.172, pp.899-906

MOLECULAR THERAPY, 2014年 5月 1日, Vol.22, No.SUPPL.1, p.S57, #152

Current Opinion in Immunology, 2012年, Vol.24, pp.239-245

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/12

A61K 35/12

A61P 35/00

A61P 37/04

A61P 43/00

C07K 14/705

C12N 1/15

C12N 1/19

C12N 1/21

C12N 5/0783

C12N 5/10

WPI

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)