

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6980659号
(P6980659)

(45) 発行日 令和3年12月15日(2021.12.15)

(24) 登録日 令和3年11月19日(2021.11.19)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 C 0 7 K 14/705 (2006.01)
 C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/12
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 P 35/00
 C 0 7 K 14/705
 C 0 7 K 19/00

請求項の数 13 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-530657 (P2018-530657)
 (86) (22) 出願日 平成28年8月30日(2016.8.30)
 (65) 公表番号 特表2018-526028 (P2018-526028A)
 (43) 公表日 平成30年9月13日(2018.9.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/049493
 (87) 国際公開番号 W02017/040529
 (87) 国際公開日 平成29年3月9日(2017.3.9)
 審査請求日 令和1年8月29日(2019.8.29)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0122727
 (32) 優先日 平成27年8月31日(2015.8.31)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 62/317,950
 (32) 優先日 平成28年4月4日(2016.4.4)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 518069438
 ヘリックスミス カンパニー, リミテッ
 ド
 大韓民国 07794 ソウル, カンソ
 ーグ, マゴクチュンアン 8ーロ 7ーギ
 ル, 21
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗シアリルT Nキメラ抗原受容体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体 (CAR) であって、

a) 糖タンパク質上に発現する S T n 抗原の 1 つ以上のエピトープに結合する、抗シアリル T n (S T n) 抗体またはその抗原結合断片を含む細胞外ドメインであって、前記抗 S T n 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 9 ~ 11 に記載の C D R L 1 - C D R L 3 配列を含む可変軽鎖配列と、配列番号 12 ~ 14 に記載の C D R H 1 - C D R H 3 配列を含む可変重鎖配列と、を含む、細胞外ドメインと、

b) C D 8 および C D 2 8 からなる群から選択される膜貫通ドメインと、

c) C D 2 8、C D 1 3 4 (O X 4 0) および C D 1 3 7 (4 - 1 B B) からなる群から選択される 1 つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、

d) C D 3 一次シグナル伝達ドメインと、を含む、キメラ抗原受容体。

【請求項 2】

前記 S T n 抗原が、

(a) ムチンまたはムチン様糖タンパク質からなる群から選択される糖タンパク質上に発現する；

(b) ムチン 1 及びムチン 16 からなる群から選択されるムチン上に発現する；

(c) ムチン様タンパク質上に発現する；または

(d) 腫瘍関連糖タンパク質 72 (T A G - 72) 上に発現する、請求項 1 に記載の C A R。

10

20

【請求項 3】

前記抗 S T n 抗体または抗原結合断片が、

(a) ラクダ I g、I g N A R、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b) ' 2 断片、F (a b) ' 3 断片、F v、一本鎖 F v 抗体 (「 s c F v 」)、b i s - s c F v、(s c F v) 2、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化 F v タンパク質 (「 d s F v 」)、及び単ドメイン抗体 (s d A b、ナノボディ) からなる群から選択される；または

(b) s c F v である、請求項 1 または請求項 2 に記載の C A R。

【請求項 4】

前記抗 S T n 抗体またはその抗原結合断片が、

(a) 配列番号 1 5 に記載の可変軽鎖配列、及び / または配列番号 1 6 に記載の可変重鎖配列；あるいは

(b) 配列番号 2 3 に記載の可変軽鎖配列、及び / または配列番号 2 4 に記載の可変重鎖配列

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 5】

前記 C A R が、

(a) ヒンジ領域ポリペプチド；

(b) スペーサー領域；または

(c) シグナルペプチド

をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 6】

前記 C A R が、配列番号 2 6 または 2 7 に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の C A R からなるポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の C A R をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 10】

前記ベクターが、発現ベクター、エピソームベクター、ウイルスペクター、レトロウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターである、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 11】

請求項 9 または請求項 10 に記載のベクターを含む免疫エフェクター細胞。

【請求項 12】

前記免疫エフェクター細胞が、T リンパ球、ナチュラルキラー T リンパ球 (N K T) 細胞、及びナチュラルキラー (N K) 細胞からなる群から選択される、請求項 11 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 13】

請求項 11 または請求項 12 に記載の免疫エフェクター細胞と、生理学的に許容される賦形剤と、を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) の下で、2016 年 4 月 4 日出願の米国仮出願第 62 / 317,950 号の利益を主張し、米国特許法第 119 条 (a) ~ (d) の下で、2015 年 8 月 31 日出願の韓国特許出願第 10 - 2015 - 0122727 号の利益を主張するものであり、これらの出願の各々は、参照することによってその全体が本明細

10

20

30

40

50

書に組み込まれる。

【0002】

配列表に関する記載

本出願に関連する配列表は、ハードコピーの代わりにテキスト形式で提供され、ここに参照することによって本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は B L B D _ 0 6 6 _ 0 2 W O _ S T 2 5 . t x t である。このテキストファイルは 3 8 K B であり、2016年8月30日に作成され、本明細書の出願と同時に E F S - W e b を介して電子的に提出される。

【0003】

背景

10

技術分野

本発明は、がんを治療するための改善された組成物及び方法に関する。より具体的には、本発明は、抗 S T n 抗体またはその抗原結合断片を含む改善されたキメラ抗原受容体 (C A R)、これらの C A R を発現するように遺伝子改変された免疫エフェクター細胞、及び S T n を発現するがんを効果的に治療するためのこれらの組成物の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

関連技術の説明

シアリル - T n 抗原 (S T n) は、 G a l N A c - O - S e r / T h r に 2 , 6 結合したシアリ酸残基を含む短い O - グリカンである。 S T n の生合成は、 S T 6 G a l N A c I と呼ばれる特異的なシアリルトランスフェラーゼによって媒介され、 S T 6 G a l N A c I は、 O - グリカンを伸長するグリコシルトランスフェラーゼと競合し、がん細胞がより長い O - グリカンを示すことを防止する。 S T n 抗原の様々なエピトープは、ムチン及びムチン様タンパク質、例えばムチン 1 (M U C 1)、ムチン 1 6 (M U C 1 6)、及び腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G - 7 2) を含む糖タンパク質で発現する。

20

【0005】

S T n は、胎生組織及び正常な成体組織で弱く発現するが、ヒト癌腫の 8 0 % 超でも発現する。 S T n の検出は一般に、有害事象及びがん患者の全体的な生存率の減少に関連する。有害事象に関連するその汎癌腫 (p a n - c a r c i n o m a) 発現のため、 T h e r a t o p e と名付けられた抗がんワクチンが、 S T n 抗原に対して設計された。この免疫療法には多大な熱意が寄せられたものの、 T h e r a t o p e は第 I I I 相臨床試験に失敗した。

30

【0006】

S T n を発現するがんの治療に関する臨床試験の別の失敗例は、キメラ抗原受容体 (C A R) で操作された T 細胞を使用したものであった。 C e l l G e n e s y s の科学者は、転移性結腸がん患者の糖タンパク質 T A G - 7 2 で発現した S T n 抗原に結合する抗 S T n C A R T 細胞を使用した。患者は、抗 S T n C A R T 細胞の静脈内または肝内注入を与えられた。抗 S T n C A R は、抗腫瘍活性を全く誘導しなかった。

【0007】

したがって、 S T n を標的とする効率的な免疫療法の方略の潜在性は未だ実現されていない。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は概して、 T 細胞療法をもたらすための改善されたベクター及びその使用方法を提供する。より具体的には、本発明は、抗シアリル T n 抗原 (s T n) C A R 分子、及び s T n 発現糖タンパク質を発現するがんの治療、防止、または寛解におけるそれらの使用に関する。

【0009】

様々な実施形態において、細胞外ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって

50

、該細胞外ドメインが、a) S T n 抗原の1つ以上のエピトープまたは糖タンパク質で発現するS T n 抗原に結合する、抗S T n 抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号1~3、9~11、または17~19に記載のCDRL1 - CDRL3配列を含む可変軽鎖配列と、配列番号4~6、12~14、または20~22に記載のCDRH1 - CDRH3配列を含む可変重鎖配列と、を含む、抗S T n 抗体またはその抗原結合断片と；b) 膜貫通ドメインと；c) 1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと；d) 一次シグナル伝達ドメインと、を含む、キメラ抗原受容体を提供される。

【0010】

様々な実施形態において、S T n 抗原は、ムチンまたはムチン様糖タンパク質からなる群から選択される糖タンパク質で発現する。

10

【0011】

特定の実施形態において、S T n 抗原は、ムチン1及びムチン16からなる群から選択されるムチンで発現する。

【0012】

ある特定の実施形態において、S T n 抗原は、ムチン様タンパク質で発現する。

【0013】

様々な実施形態において、ムチン様タンパク質は、TAG - 72である。

【0014】

特定の実施形態において、S T n 抗原に結合する抗S T n 抗体または抗原結合断片は、ラクダIg、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'2断片、F(ab)'3断片、Fv、一本鎖Fv抗体('scFv)、bis-scFv、(scFv)2、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質('dsFv)、及び単一ドメイン抗体(sdAb、ナノボディ)からなる群から選択される。

20

【0015】

ある特定の実施形態において、S T n 抗原に結合する抗S T n 抗体または抗原結合断片は、scFvである。

【0016】

特定の実施形態において、抗S T n 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号1~3のいずれか1つに記載の1つ以上の軽鎖CDR、及び/または配列番号4~6のいずれか1つに記載の1つ以上の重鎖CDRを含む。

30

【0017】

いくつかの実施形態では、抗S T n 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号9~11のいずれか1つに記載の1つ以上の軽鎖CDR、及び/または配列番号12~14のいずれか1つに記載の1つ以上の重鎖CDRを含む。

【0018】

付加的な実施形態では、抗S T n 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号17~19のいずれか1つに記載の1つ以上の軽鎖CDR、及び/または配列番号20~22のいずれか1つに記載の1つ以上の重鎖CDRを含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、抗S T n 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号7、15、もしくは23のいずれか1つに記載の可変軽鎖配列、及び/または配列番号8、16、もしくは24のいずれか1つに記載の可変重鎖配列を含む。

40

【0020】

ある特定の実施形態において、抗S T n 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号7に記載の可変軽鎖配列、及び/または配列番号8に記載の可変重鎖配列を含む。

【0021】

さらなる実施形態では、抗S T n 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号15に記載の可変軽鎖配列、及び/または配列番号16に記載の可変重鎖配列を含む。

【0022】

50

特定の実施形態において、抗STn抗体またはその抗原結合断片は、配列番号23に記載の可変軽鎖配列、及び/または配列番号24に記載の可変重鎖配列を含む。

【0023】

さらなる実施形態では、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CD、CD3、CD、CD3、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、及びPD1からなる群から選択されるポリペプチドに由来する。

【0024】

付加的な実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8、CD4、CD45、PD1、及びCD152からなる群から選択されるポリペプチドに由来する。

10

【0025】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8に由来する。

【0026】

さらなる実施形態では、膜貫通ドメインは、PD1に由来する。

【0027】

特定の実施形態において、膜貫通ドメインは、CD152に由来する。

【0028】

さらなる実施形態では、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインは、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、及びZAP70からなる群から選択される共刺激分子に由来する。

20

【0029】

ある特定の実施形態において、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、CD134、及びCD137からなる群から選択される共刺激分子に由来する。

【0030】

いくつかの実施形態では、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28に由来する。

30

【0031】

いくつかの実施形態では、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインは、CD134に由来する。

【0032】

いくつかの実施形態では、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインは、CD137に由来する。

【0033】

特定の実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD22、CD79a、CD79b、及びCD66dからなる群から選択されるポリペプチドから単離される。

40

【0034】

特定の実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、CD3から単離される。

【0035】

付加的な実施形態では、CARは、ヒンジ領域ポリペプチドをさらに含む。

【0036】

ある特定の実施形態において、ヒンジ領域ポリペプチドは、CD8のヒンジ領域を含む。

【0037】

さらなる実施形態では、ヒンジ領域ポリペプチドは、PD1のヒンジ領域を含む。

【0038】

50

特定の実施形態において、ヒンジ領域ポリペプチドは、C D 1 5 2 のヒンジ領域を含む。

【 0 0 3 9 】

付加的な実施形態では、C A R は、スペーサー領域をさらに含む。

【 0 0 4 0 】

さらなる実施形態では、スペーサー領域ポリペプチドは、I g G 1、I g G 4、または I g D の C H 2 及び C H 3 領域を含む。

【 0 0 4 1 】

さらなる実施形態では、C A R は、シグナルペプチドをさらに含む。

【 0 0 4 2 】

特定の実施形態において、シグナルペプチドは、I g G 1 重鎖シグナルポリペプチド、C D 8 シグナルポリペプチド、またはヒト G M - C S F 受容体アルファシグナルポリペプチドを含む。

【 0 0 4 3 】

特定の実施形態において、C A R は、配列番号 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 4 】

特定の実施形態において、C A R は、配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 5 】

特定の実施形態において、C A R は、配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 6 】

特定の実施形態において、C A R は、配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 7 】

様々な実施形態において、本明細書において想定される C A R のアミノ酸配列を含むポリペプチドが提供される。

【 0 0 4 8 】

様々な実施形態において、本明細書において想定される C A R をコードするポリヌクレオチドが提供される。

【 0 0 4 9 】

様々な実施形態において、本明細書において想定される C A R をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【 0 0 5 0 】

ある特定の実施形態において、ベクターは、発現ベクターである。

【 0 0 5 1 】

特定の実施形態において、ベクターは、エピソームベクターである。

【 0 0 5 2 】

さらなる実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。

【 0 0 5 3 】

さらなる実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクターである。

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態において、ベクターは、レンチウイルスベクターである。

【 0 0 5 5 】

さらなる実施形態では、レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス 1 (H I V - 1)、ヒト免疫不全ウイルス 2 (H I V - 2)、ヒスナ - マエディウイルス (V M V) ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (C A E V)、ウマ伝染性貧血ウイルス (E I A V)、ネコ免疫不全ウイルス (F I V)、ウシ免疫不全ウイルス (B I V)、及びサル免疫不全ウイルス (S I V) から本質的になる群から選択される。

【 0 0 5 6 】

特定の実施形態において、ベクターは、左 (5 ') レトロウイルス L T R、プサイ () パッケージングシグナル、セントラルポリプリントラクト / D N A フラップ (c P P T

10

20

30

40

50

/FLAP)、レトロウイルス排出エレメント、ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター、及び右(3')レトロウイルスLTRを含む。

【0057】

さらなる実施形態では、ベクターは、異種ポリアデニル化配列をさらに含む。

【0058】

特定の実施形態において、ベクターは、B型肝炎ウイルス転写後調節エレメント(HPRE)またはウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)をさらに含む。

【0059】

付加的な実施形態では、5'LTRのプロモーターは、異種プロモーターに置き換えられている。

10

【0060】

さらなる実施形態では、異種プロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、またはサルウイルス40(SV40)プロモーターである。

【0061】

いくつかの実施形態では、5'LTRまたは3'LTRは、レンチウイルスLTRである。

【0062】

ある特定の実施形態において、3'LTRは、1つ以上の改変を含む。

【0063】

20

ある特定の実施形態において、3'LTRは、1つ以上の欠失を含む。

【0064】

特定の実施形態において、3'LTRは、自己不活性化型(SIN)LTRである。

【0065】

特定の実施形態において、ポリアデニル化配列は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化またはシグナルウサギ - グロビンポリアデニル化配列である。

【0066】

付加的な実施形態では、ポリヌクレオチドは、最適化されたコザック配列を含む。

【0067】

付加的な実施形態では、ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターは、サイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター(CMV)、伸長因子1アルファプロモーター(EF1)、ホスホグリセリン酸キナーゼ1プロモーター(PGK)、ユビキチンCプロモーター(UBQ-C)、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリベータアクチンプロモーター(CAG)、ポリオーマエンハンサー/単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(MC1)、ベータアクチンプロモーター(-ACT)、サルウイルス40プロモーター(SV40)、及び骨髓増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失d1587revプライマー結合部位置換(MND)プロモーターからなる群から選択される。

30

【0068】

様々な実施形態において、本明細書において想定されるCARをコードするベクターを含む免疫エフェクター細胞が提供される。

40

【0069】

特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、Tリンパ球、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、及びナチュラルキラー(NK)細胞からなる群から選択される。

【0070】

いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、本明細書において想定されるベクターを形質導入され、PI3K経路の阻害剤の存在下で活性化及び刺激され、それにより、形質導入免疫エフェクター細胞の増殖が、PI3K経路の阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された形質導入免疫エフェクター細胞の増殖と比較して維持される。

【0071】

50

特定の実施形態において、P I 3 K 経路の阻害剤の存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞では、i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 1 9 7、及びC D 3 8 からの群から選択される1つ以上のマーカー、またはi i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 1 9 7、及びC D 3 8 のマーカーの全ての発現が、P I 3 K 経路の阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞と比較して増加する。

【 0 0 7 2 】

特定の実施形態において、P I 3 K 経路の阻害剤の存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞では、i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 2 7、及びC D 8 からの群から選択される1つ以上のマーカー、またはi i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 2 7、及びC D 8 のマーカーの全ての発現が、P I 3 K 経路の阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞と比較して増加する。

10

【 0 0 7 3 】

一実施形態において、P I 3 K 阻害剤は、Z S T K 4 7 4 である。

【 0 0 7 4 】

様々な実施形態において、本明細書において想定される免疫エフェクター細胞と、生理学的に許容される賦形剤と、を含む組成物が提供される。

【 0 0 7 5 】

様々な実施形態において、本明細書において想定されるC A R をコードするベクターを免疫エフェクター細胞に導入することを含む、本明細書において想定されるC A R を含む免疫エフェクター細胞を生成する方法が提供される。

20

【 0 0 7 6 】

特定の実施形態において、本方法は、免疫エフェクター細胞を刺激し、C D 3 に結合する抗体及びC D 2 8 に結合する抗体に該細胞を接触させることによって該細胞の増殖を誘導し、それによって免疫エフェクター細胞の集団を生成することをさらに含む。

【 0 0 7 7 】

ある特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、ベクターを導入する前に刺激され、増殖を誘導される。

【 0 0 7 8 】

付加的な実施形態では、免疫エフェクター細胞は、T リンパ球を含む。

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、T リンパ球は、ナチュラルキラーT (N K T) 細胞を含む。

30

【 0 0 8 0 】

いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、N K 細胞を含む。

【 0 0 8 1 】

特定の実施形態において、該細胞は、P I 3 K 経路の阻害剤の存在下で活性化及び刺激され、それにより、形質導入免疫エフェクター細胞の増殖が、P I 3 K 経路の阻害剤の非存在下で活性化及び刺激される免疫エフェクター細胞の増殖と比較して維持される。

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態では、P I 3 K 経路の阻害剤の存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞では、i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 1 9 7、及びC D 3 8 からの群から選択される1つ以上のマーカー、またはi i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 1 9 7、及びC D 3 8 のマーカーの全ての発現が、P I 3 K 経路の阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞と比較して増加する。

40

【 0 0 8 3 】

特定の実施形態において、P I 3 K 経路の阻害剤の存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞では、i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 2 7、及びC D 8 からの群から選択される1つ以上のマーカー、またはi i) C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 2 7、及びC D 8 のマーカーの全ての発現が、P I 3 K 経路の阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞と比較して増加する。

【 0 0 8 4 】

50

－実施形態において、P I 3 K 阻害剤は、Z S T K 4 7 4 である。

【 0 0 8 5 】

様々な実施形態において、対象において糖タンパク質で S T n を発現するがん細胞における細胞傷害性を増加させるための方法であって、S T n を発現するがん細胞における細胞傷害性を、S T n を発現するがん細胞における投与前の細胞傷害性と比較して増加させるのに十分な量で、本明細書において想定される組成物を対象に投与することを含む、方法が提供される。

【 0 0 8 6 】

様々な実施形態において、対象において糖タンパク質で S T n を発現するがん細胞の数を減少させるための方法であって、S T n を発現するがん細胞の数を、S T n を発現するがん細胞の投与前の数と比較して減少させるのに十分な量で、本明細書において想定される組成物を対象に投与することを含む、方法が提供される。

10

【 0 0 8 7 】

様々な実施形態において、本明細書において想定される組成物を治療有効量で対象に投与することを含む、がんの治療を必要とする対象にそれを行う方法が提供される。

【 0 0 8 8 】

特定の実施形態において、がんは、固形がんである。

【 0 0 8 9 】

さらなる実施形態では、がんは、食道がん、膀胱がん、腎がん、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、膵がん、胆管癌、胃がん、結腸がん、または乳がんである。

20

【 0 0 9 0 】

－実施形態において、がんは、食道がんである。

【 0 0 9 1 】

－実施形態において、がんは、膀胱がんである。

【 0 0 9 2 】

－実施形態において、がんは、腎がんである。

【 0 0 9 3 】

－実施形態において、がんは、肺がんである。

【 0 0 9 4 】

－実施形態において、がんは、卵巣がんである。

30

【 0 0 9 5 】

－実施形態において、がんは、子宮頸がんである。

【 0 0 9 6 】

－実施形態において、がんは、膵がんである。

【 0 0 9 7 】

－実施形態において、がんは、胆管癌である。

【 0 0 9 8 】

－実施形態において、がんは、胃がんである。

【 0 0 9 9 】

－実施形態において、がんは、結腸がんである。

40

【 0 1 0 0 】

－実施形態において、がんは、乳がんである。

【 0 1 0 1 】

特定の実施形態において、がんは、液性がんである。

【 0 1 0 2 】

－実施形態において、液性がんは、血液学的悪性腫瘍である。

【 0 1 0 3 】

－実施形態において、血液学的悪性腫瘍は、急性リンパ球性白血病 (A L L)、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、有毛細胞白血病 (H C L)、多発性骨髄腫 (M M)、急性骨髄性白血病 (A M L)、または慢性骨髄性白血病 (C M L) からなる群から選択される。

50

【 0 1 0 4 】

－実施形態において、血液学的悪性腫瘍は、C L Lである。

【 0 1 0 5 】

様々な実施形態において、対象において糖タンパク質でS T nを発現するがんに関連する少なくとも1つ以上の症状を寛解させるための方法であって、S T nを発現するがん細胞に関連する少なくとも1つの症状を寛解させるのに十分な量で、本明細書において想定される組成物を対象に投与することを含む、方法が提供される。

【 0 1 0 6 】

特定の実施形態において、寛解される1つ以上の症状は、脱力感、疲労、息切れ、易挫傷性及び易出血性、頻繁な感染症、リンパ節腫大、腹部の膨張または痛み、骨痛または関節痛、骨折、計画外の体重減少、食欲不振、寝汗、持続的微熱、ならびに排尿減少からなる群から選択される。

【 0 1 0 7 】

先行する実施形態のいずれかにおいて、S T n抗原は、糖タンパク質のT A G - 7 2で発現する。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

細胞外ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、前記細胞外ドメインが、

a) 糖タンパク質で発現するS T n抗原の1つ以上のエピトープに結合する、抗シアリルT n (S T n) 抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号1 ~ 3、9 ~ 1 1、または1 7 ~ 1 9に記載のC D R L 1 - C D R L 3配列を含む可変軽鎖配列と、配列番号4 ~ 6、1 2 ~ 1 4、または2 0 ~ 2 2に記載のC D R H 1 - C D R H 3配列を含む可変重鎖配列と、を含む、抗S T n抗体またはその抗原結合断片と、

b) 膜貫通ドメインと、

c) 1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと、

d) 一次シグナル伝達ドメインと、を含む、キメラ抗原受容体。

(項目 2)

前記S T n抗原が、ムチンまたはムチン様糖タンパク質からなる群から選択される糖タンパク質で発現する、項目1に記載のC A R。

(項目 3)

前記S T n抗原が、ムチン1及びムチン1 6からなる群から選択されるムチンで発現する、項目1または項目2に記載のC A R。

(項目 4)

前記S T n抗原が、ムチン様タンパク質で発現する、項目1に記載のC A R。

(項目 5)

前記S T n抗原が、腫瘍関連糖タンパク質7 2 (T A G - 7 2) で発現する、項目1に記載のC A R。

(項目 6)

前記抗S T n抗体または抗原結合断片が、ラクダI g、I g N A R、F a b断片、F a b '断片、F (a b) ' 2断片、F (a b) ' 3断片、F v、一本鎖F v抗体 (「s c F v」)、b i s - s c F v、(s c F v) 2、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化F vタンパク質 (「d s F v」)、及び単一ドメイン抗体 (s d A b、ナノボディ) からなる群から選択される、項目1 ~ 5のいずれか1項に記載のC A R。

(項目 7)

前記抗S T n抗体または抗原結合断片が、s c F vである、項目1 ~ 6のいずれか1項に記載のC A R。

(項目 8)

前記抗S T n抗体またはその抗原結合断片が、配列番号1 ~ 3のいずれか1つに記載の1つ以上の軽鎖C D R、及び/または配列番号4 ~ 6のいずれか1つに記載の1つ以上の

10

20

30

40

50

重鎖 C D R を含む、項目 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 9)

前記抗 S T n 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 9 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の 1 つ以上の軽鎖 C D R、及び / または配列番号 1 2 ～ 1 4 のいずれか 1 つに記載の 1 つ以上の重鎖 C D R を含む、項目 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 0)

前記抗 S T n 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 1 7 ～ 1 9 のいずれか 1 つに記載の 1 つ以上の軽鎖 C D R、及び / または配列番号 2 0 ～ 2 2 のいずれか 1 つに記載の 1 つ以上の重鎖 C D R を含む、項目 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 1)

前記抗 S T n 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 7 に記載の可変軽鎖配列、及び / または配列番号 8 に記載の可変重鎖配列を含む、項目 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 2)

前記抗 S T n 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 1 5 に記載の可変軽鎖配列、及び / または配列番号 1 6 に記載の可変重鎖配列を含む、項目 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 3)

前記抗 S T n 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 2 3 に記載の可変軽鎖配列、及び / または配列番号 2 4 に記載の可変重鎖配列を含む、項目 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 4)

前記膜貫通ドメインが、T 細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、C D 、C D 3 、C D 、C D 3 、C D 4、C D 5、C D 8 、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 3、C D 3 7、C D 4 5、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 2、C D 1 5 4、及び P D 1 からなる群から選択されるポリペプチドから単離される、項目 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 5)

前記膜貫通ドメインが、C D 8 、C D 4、C D 4 5、P D 1、及び C D 1 5 2 からなる群から選択されるポリペプチドから単離される、項目 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 6)

前記膜貫通ドメインが、C D 8 から単離される、項目 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 7)

前記膜貫通ドメインが、P D 1 から単離される、項目 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 8)

前記膜貫通ドメインが、C D 1 5 2 から単離される、項目 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 1 9)

前記 1 つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインが、T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 1 0、C A R D 1 1、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 5 4 (I C A M)、C D 8 3、C D 1 3 4 (O X 4 0)、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 2 7 8 (I C O S)、D A P 1 0、L A T、N K D 2 C、S L P 7 6、T R I M、及び Z A P 7 0 からなる群から選択される共刺激分子から単離される、項目 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 2 0)

前記 1 つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインが、C D 2 8、C D 1 3 4、及び C D 1 3

10

20

30

40

50

7 からなる群から選択される共刺激分子から単離される、項目 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 21)

前記 1 つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインが、C D 28 から単離される、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 22)

前記 1 つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインが、C D 134 から単離される、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 23)

前記 1 つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインが、C D 137 から単離される、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の C A R。

10

(項目 24)

前記一次シグナル伝達ドメインが、F c R 、 F c R 、 C D 3 、 C D 3 、 C D 3 、 C D 3 、 C D 22、C D 79 a、C D 79 b、及び C D 66 d からなる群から選択されるポリペプチドから単離される、項目 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 25)

前記一次シグナル伝達ドメインが、C D 3 から単離される、項目 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 26)

ヒンジ領域ポリペプチドをさらに含む、項目 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の C A R。

20

(項目 27)

前記ヒンジ領域ポリペプチドが、C D 8 のヒンジ領域を含む、項目 26 に記載の C A R。

(項目 28)

前記ヒンジ領域ポリペプチドが、P D 1 のヒンジ領域を含む、項目 26 に記載の C A R。

(項目 29)

前記ヒンジ領域ポリペプチドが、C D 152 のヒンジ領域を含む、項目 26 に記載の C A R。

(項目 30)

スパーサー領域をさらに含む、項目 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の C A R。

30

(項目 31)

前記スパーサー領域ポリペプチドが、I g G 1、I g G 4、または I g D の C H 2 及び C H 3 領域を含む、項目 30 に記載の C A R。

(項目 32)

シグナルペプチドをさらに含む、項目 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 33)

前記シグナルペプチドが、I g G 1 重鎖シグナルポリペプチド、C D 8 シグナルポリペプチド、またはヒト G M - C S F 受容体アルファシグナルポリペプチドを含む、項目 32 に記載の C A R。

40

(項目 34)

前記 C A R が、配列番号 25 ~ 27 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 35)

項目 1 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の C A R のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(項目 36)

項目 1 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の C A R をコードするポリヌクレオチド。

(項目 37)

項目 36 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(項目 38)

50

<p><u>前記ベクターが、発現ベクターである、項目 37 に記載のベクター。</u></p> <p><u>(項目 39)</u></p> <p><u>前記ベクターが、エピソームベクターである、項目 37 または項目 38 に記載のベクター。</u></p>	
<p><u>(項目 40)</u></p> <p><u>前記ベクターが、ウイルスベクターである、項目 37 ~ 39 のいずれか 1 項に記載のベクター。</u></p>	
<p><u>(項目 41)</u></p> <p><u>前記ベクターが、レトロウイルスベクターである、項目 37 ~ 40 のいずれか 1 項に記載のベクター。</u></p>	10
<p><u>(項目 42)</u></p> <p><u>前記ベクターが、レンチウイルスベクターである、項目 37 ~ 41 のいずれか 1 項に記載のベクター。</u></p>	
<p><u>(項目 43)</u></p> <p><u>前記レンチウイルスベクターが、ヒト免疫不全ウイルス 1 (HIV - 1)、ヒト免疫不全ウイルス 2 (HIV - 2)、ピスナ - マエディウイルス (VMV) ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、及びサル免疫不全ウイルス (SIV) から本質的になる群から選択される、項目 42 に記載のベクター。</u></p>	20
<p><u>(項目 44)</u></p> <p><u>左 (5') レトロウイルスLTR、プサイ () パッケージングシグナル、セントラルポリプリントラクト / DNA フラップ (cPPT / FLAP)、レトロウイルス排出エレメント、項目 64 に記載のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター、及び右 (3') レトロウイルスLTRを含む、項目 40 ~ 43 のいずれか 1 項に記載のベクター。</u></p>	20
<p><u>(項目 45)</u></p> <p><u>異種ポリアデニル化配列をさらに含む、項目 40 ~ 44 のいずれか 1 項に記載のベクター。</u></p>	
<p><u>(項目 46)</u></p> <p><u>前記異種ポリアデニル化配列が、ウシ成長ホルモンポリアデニル化またはシグナルウサギ - グロビンポリアデニル化配列である、項目 45 に記載のベクター。</u></p>	30
<p><u>(項目 47)</u></p> <p><u>B 型肝炎ウイルス転写後調節エレメント (HPRE) またはウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE) をさらに含む、項目 40 ~ 46 のいずれか 1 項に記載のベクター。</u></p>	
<p><u>(項目 48)</u></p> <p><u>前記 5' LTR のプロモーターが、異種プロモーターに置き換えられている、項目 40 ~ 47 のいずれか 1 項に記載のベクター。</u></p>	
<p><u>(項目 49)</u></p> <p><u>前記異種プロモーターが、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、またはサルウイルス 40 (SV40) プロモーターである、項目 48 に記載のベクター。</u></p>	40
<p><u>(項目 50)</u></p> <p><u>前記 5' LTR または 3' LTR が、レンチウイルスLTRである、項目 40 ~ 49 のいずれか 1 項に記載のベクター。</u></p>	
<p><u>(項目 51)</u></p> <p><u>前記 3' LTR が、1 つ以上の改変を含む、項目 40 ~ 50 のいずれか 1 項に記載のベクター。</u></p>	
<p><u>(項目 52)</u></p> <p><u>前記 3' LTR が、1 つ以上の欠失を含む、項目 40 ~ 51 のいずれか 1 項に記載のベ</u></p>	50

クター。

(項目53)

前記3'LTRが、自己不活性化型(SIN)LTRである、項目40～52のいずれか1項に記載のベクター。

(項目54)

項目64に記載のポリヌクレオチドが、最適化されたコザック配列を含む、項目40～53のいずれか1項に記載のベクター。

(項目55)

項目36に記載のポリヌクレオチドに作動可能に連結された前記プロモーターが、サイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター(CMV)、伸長因子1アルファプロモーター(EF1-)、ホスホグリセリン酸キナーゼ1プロモーター(PGK)、ユビキチンCプロモーター(UBQ-C)、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリベータアクチンプロモーター(CAG)、ポリオーマエンハンサー/単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(MC1)、ベータアクチンプロモーター(-ACT)、サルウイルス40プロモーター(SV40)、及び骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失d1587revプライマー結合部位置換(MND)プロモーターからなる群から選択される、項目40～54のいずれか1項に記載のベクター。

(項目56)

項目40～55のいずれか1項に記載のベクターを含む免疫エフェクター細胞。

(項目57)

前記免疫エフェクター細胞が、Tリンパ球、ナチュラルキラーTリンパ球(NKT)細胞、及びナチュラルキラー(NK)細胞からなる群から選択される、項目56に記載の免疫エフェクター細胞。

(項目58)

前記免疫エフェクター細胞が、項目37～55のいずれか1項に記載のベクターを形質導入され、PI3K経路の阻害剤の存在下で活性化及び刺激され、それにより、前記形質導入免疫エフェクター細胞の増殖が、PI3K経路の前記阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された形質導入免疫エフェクター細胞の増殖と比較して維持される、項目56または57に記載の免疫エフェクター細胞。

(項目59)

PI3K経路の前記阻害剤の存在下で活性化及び刺激された前記免疫エフェクター細胞が、i)CD62L、CD127、CD197、及びCD38からなる群から選択される1つ以上のマーカー、またはii)CD62L、CD127、CD197、及びCD38の全てのマーカーの発現が、PI3K経路の前記阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞と比較して増加する、項目58に記載の免疫エフェクター細胞。

(項目60)

PI3K経路の前記阻害剤の存在下で活性化及び刺激された前記免疫エフェクター細胞が、i)CD62L、CD127、CD27、及びCD8からなる群から選択される1つ以上のマーカー、またはii)CD62L、CD127、CD27、及びCD8の全てのマーカーの発現が、PI3K経路の前記阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞と比較して増加する、項目58に記載の免疫エフェクター細胞。

(項目61)

前記PI3K阻害剤が、ZSTK474である、項目58～60のいずれか1項に記載の免疫エフェクター細胞。

(項目62)

項目56～61のいずれか1項に記載の免疫エフェクター細胞と、生理学的に許容される賦形剤と、を含む組成物。

(項目63)

項目40～55のいずれか1項に記載のベクターを免疫エフェクター細胞に導入することを含む、項目1～34のいずれか1項に記載のCARを含む免疫エフェクター細胞を生

10

20

30

40

50

成する方法。

(項目64)

前記免疫エフェクター細胞を刺激し、CD3に結合する抗体及びCD28に結合する抗体に前記細胞を接触させることによって前記細胞の増殖を誘導し、それによって免疫エフェクター細胞の集団を生成することをさらに含む、項目63に記載の方法。

(項目65)

前記免疫エフェクター細胞が、前記ペクターを導入する前に刺激され、増殖を誘導される、項目64に記載の方法。

(項目66)

前記免疫エフェクター細胞が、Tリンパ球を含む、項目65に記載の方法。

10

(項目67)

前記免疫エフェクター細胞が、NK細胞を含む、項目65に記載の方法。

(項目68)

前記免疫エフェクター細胞が、PI3K経路の前記阻害剤の存在下で活性化及び刺激され、i) CD62L、CD127、CD197、及びCD38からなる群から選択される1つ以上のマーカー、またはii) CD62L、CD127、CD197、及びCD38の全てのマーカーの発現が、PI3K経路の前記阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞と比較して増加する、項目63～67のいずれか1項に記載の方法。

(項目69)

20

前記免疫エフェクター細胞が、PI3K経路の前記阻害剤の存在下で活性化及び刺激され、i) CD62L、CD127、CD27、及びCD8からなる群から選択される1つ以上のマーカー、またはii) CD62L、CD127、CD27、及びCD8の全てのマーカーの発現が、PI3K経路の前記阻害剤の非存在下で活性化及び刺激された免疫エフェクター細胞と比較して増加する、項目63～67のいずれか1項に記載の方法。

(項目70)

前記PI3K阻害剤が、ZSTK474である、項目63～69のいずれか1項に記載の方法。

(項目71)

対象において糖タンパク質で発現するSTn抗原を発現するがん細胞における細胞傷害性を増加させるための方法であって、STnを発現するがん細胞における細胞傷害性を、STnを発現する前記がん細胞における投与前の細胞傷害性と比較して増加させるのに十分な量で、項目62に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

30

(項目72)

対象において糖タンパク質で発現するSTn抗原を発現するがん細胞の数を減少させるための方法であって、STnを発現するがん細胞の数を、STnを発現する前記がん細胞の投与前の数と比較して減少させるのに十分な量で、項目62に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目73)

項目62に記載の組成物を治療有効量で対象に投与することを含む、がんの治療を必要とする対象にそれを行う方法。

40

(項目74)

前記STn抗原が、ムチンまたはムチン様糖タンパク質からなる群から選択される糖タンパク質上で発現する、項目71～73のいずれか1項に記載の方法。

(項目75)

前記STn抗原が、ムチン1及びムチン16からなる群から選択されるムチン上で発現する、項目71～73のいずれか1項に記載の方法。

(項目76)

前記STn抗原が、ムチン様タンパク質上で発現する、項目71～73のいずれか1項に記載の方法。

50

(項目 7 7)

前記 S T n 抗原が、腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G - 7 2) 上で発現する、項目 7 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 8)

前記がんが、固形がんである、項目 7 1 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 9)

前記がんが、食道がん、膀胱がん、腎がん、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、膵がん、胆管癌、胃がん、結腸がん、または乳がんである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

前記がんが、食道がんである、項目 7 8 に記載の方法。

10

(項目 8 1)

前記がんが、膀胱がんである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 2)

前記がんが、腎がんである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記がんが、肺がんである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 4)

前記がんが、卵巣がんである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記がんが、子宮頸がんである、項目 7 8 に記載の方法。

20

(項目 8 6)

前記がんが、膵がんである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記がんが、胆管癌である、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記がんが、胃がんである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記がんが、結腸がんである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記がんが、乳がんである、項目 7 8 に記載の方法。

30

(項目 9 1)

前記がんが、液性がんである、項目 7 1 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9 2)

前記液性がんが、血液学的悪性腫瘍である、項目 9 1 に記載の方法。

(項目 9 3)

前記血液学的悪性腫瘍が、急性リンパ球性白血病 (A L L)、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、有毛細胞白血病 (H C L)、多発性骨髄腫 (M M)、急性骨髄性白血病 (A M L)、または慢性骨髄性白血病 (C M L) からなる群から選択される、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4)

前記血液学的悪性腫瘍が、C L L である、項目 9 3 に記載の方法。

40

(項目 9 5)

対象において糖タンパク質で S T n を発現するがんに関連する 1 つ以上の症状を寛解させるための方法であって、がん細胞に関連する少なくとも 1 つの症状を寛解させるのに十分な量で、項目 6 2 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 9 6)

寛解される前記 1 つ以上の症状が、脱力感、疲労、息切れ、易挫傷性及び易出血性、頻繁な感染症、リンパ節腫大、腹部の膨張または痛み、骨痛または関節痛、骨折、計画外の体重減少、食欲不振、寝汗、持続的微熱、ならびに排尿減少からなる群から選択される、項目 9 5 に記載の方法。

50

【図面の簡単な説明】

【0108】

【図1】抗STn CAR構築物の模式図を示す。

【図2】様々なE:T比での共培養において、抗STn CAR T細胞(E)はSTn発現LS174T細胞(T)を殺滅するが、非形質導入対照T細胞はSTn発現LS174T細胞(T)を殺滅しないことを示す。

【図3A】抗STn CARをコードするレンチウイルスベクターを形質導入したT細胞におけるベクターコピー数(VCN)を示す。

【図3B】抗STn CARをコードするレンチウイルスベクターを形質導入したT細胞における抗STn CARの細胞表面発現を示す。

10

【図4A】図4は、例示的な抗STn CARの抗がん活性を示す。図4A：抗STn CAR T細胞は、TAG72でSTnを発現するJurkat細胞株及びLS174T細胞株と共培養するとIFNを分泌する。図4B：共培養において、抗STn CAR T細胞はLS174T細胞株を殺滅するが、非形質導入T細胞はLS174T細胞株を殺滅しない。図4C：抗STn CAR T細胞(E)は、LS174T細胞(T)と様々なE:T比で共培養すると用量依存性細胞傷害性を示す。

【図4B】図4は、例示的な抗STn CARの抗がん活性を示す。図4A：抗STn CAR T細胞は、TAG72でSTnを発現するJurkat細胞株及びLS174T細胞株と共培養するとIFNを分泌する。図4B：共培養において、抗STn CAR T細胞はLS174T細胞株を殺滅するが、非形質導入T細胞はLS174T細胞株を殺滅しない。図4C：抗STn CAR T細胞(E)は、LS174T細胞(T)と様々なE:T比で共培養すると用量依存性細胞傷害性を示す。

20

【図4C】図4は、例示的な抗STn CARの抗がん活性を示す。図4A：抗STn CAR T細胞は、TAG72でSTnを発現するJurkat細胞株及びLS174T細胞株と共培養するとIFNを分泌する。図4B：共培養において、抗STn CAR T細胞はLS174T細胞株を殺滅するが、非形質導入T細胞はLS174T細胞株を殺滅しない。図4C：抗STn CAR T細胞(E)は、LS174T細胞(T)と様々なE:T比で共培養すると用量依存性細胞傷害性を示す。

【図5】抗STn CAR T細胞の投与が、皮下結腸腺癌細胞(LS174T)を受けたNOD scidガンマ(NSG)マウスにおいて腫瘍の増殖を遅延させることを示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0109】

配列識別子の簡単な説明

配列番号1～24は、本明細書において想定される抗STn CARの、例示的な軽鎖CDR配列、重鎖CDR配列、可変ドメイン軽鎖、及び可変ドメイン重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【0110】

配列番号25～27は、例示的な抗STn CARのアミノ酸配列を記載する。

【0111】

配列番号28～38は、様々なリンカーのアミノ酸配列を記載する。

40

【0112】

配列番号39～51は、プロテアーゼ切断部位及び自己切断型ポリペプチド切断部位のアミノ酸配列を記載する。

【0113】

配列番号52は、ヒト腫瘍関連糖タンパク質(TAG-72)のアミノ酸配列を記載する。

【0114】

配列番号53は、CDR-L3を決定するための例示的な規則のアミノ酸配列を記載する。

50

【 0 1 1 5 】

配列番号 5 4 は、C D R - H 1 を決定するための例示的な規則のアミノ酸配列を記載する。

【 0 1 1 6 】

配列番号 5 5 は、C D R - H 2 を決定するための例示的な規則のアミノ酸配列を記載する。

【 0 1 1 7 】

配列番号 5 6 は、C D R - H 3 を決定するための例示的な規則のアミノ酸配列を記載する。

【 0 1 1 8 】

配列番号 5 7 は、コンセンサスコザック配列のヌクレオチド配列を記載する。

【 0 1 1 9 】

詳細な説明

A . 概要

本発明は概して、糖タンパク質で S T n 抗原を発現するがんの防止もしくは治療、または S T n を発現するがんに関連する少なくとも 1 つの症状の防止、治療、もしくは寛解を行うための、改善された組成物及び方法に関する。特定の実施形態において、本発明は、遺伝子改変免疫エフェクター細胞を使用した、糖タンパク質で S T n 抗原を発現するがんの改善された養子細胞療法に関する。遺伝子的手法は、免疫認識及びがん細胞の排除を増強するための手段の可能性を提示する。有望な方略の 1 つは、細胞傷害性をがん細胞に再指向させるキメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように免疫エフェクター細胞を遺伝子操作することである。

【 0 1 2 0 】

本明細書において想定される養子細胞療法の改善された組成物及び方法は、容易に増幅し、インビボで長期持続性を示し、かつ糖タンパク質でシアリル T n 抗原 (S T n) を発現する細胞に対して抗原依存性細胞傷害性を示すことのできる、遺伝子改変免疫エフェクター細胞を提供する。

【 0 1 2 1 】

S T n (N e u 5 A c 2 - 6 G a l N A c - O - S e r / T h r は、C D 1 7 5 s としても知られ、最も単純なシアリル化ムチン型 O - グリカンである。S T n は、N - アセチル - ガラクトサミン (G a l N A c) の 1 つの残基がセリンまたはスレオニン残基にアルファ - O 結合し、炭素 6 においてシアル酸 (ヒトにおける N e u 5 A c) で置換されたものから形成された二糖である。このシアリル化は、さもなければムチン型 O - グリカンに見出される様々なコア構造の形成を妨げる。

【 0 1 2 2 】

S T n は、両方の性別の胎児の食道、胃、脾臓、結腸 (杯細胞)、肺、乳腺、及び性腺組織といった胎生組織において発現する。しかしながら、胚発生中の S T n の生物学的役割についてはあまり知られていない。

【 0 1 2 3 】

正常組織における S T n 発現は稀であり、かつ / またはがん組織と比較して低いことを報告する、様々な研究が行われてきた。免疫組織化学的検査は、対応する健常な細胞と比較したがん細胞における S T n の過剰発現を示した。したがって、S T n は癌胎児性抗原と説明された。S T n の新発現 (n e o - e x p r e s s i o n) または過剰発現は多くの上皮がんでは報告され、脾臓がん、膀胱がん、肺がん、結腸直腸がん、及び卵巣がんにおいて最も頻度が高かった。発癌の早期では、S T n は、がんの潜在的な前駆体とみなされるいくつかの上皮性良性病変、例えば食道扁平上皮の異形成、胃腸形成異常、結腸の中等度異形成、肺異型腺腫様過形成 (l u n g a t y p i c a l a d e m a t o u s h y p e r p l a s i a)、乳管過形成、及びアポクリン化生において過剰発現すると報告された。S T n の発現は、健常な状態では S T n の発現がない 2 つの組織である脾臓及び卵巣における良性病変内でも報告された。

10

20

30

40

50

【0124】

STnの発現を胃の炎症性疾患（胃炎）または結腸の炎症性疾患（潰瘍性大腸炎及び結腸クローン病）と関連付ける報告も存在する。胃炎では、症例の50～100%でSTnが検出された。潰瘍性大腸炎では、脱O-アセチル化STnは、異形成癌腫配列の独立したマーカーであることが示された。脱O-アセチル化STnは、結腸がんリスクに関連する別の炎症性疾患である結腸クローン病の症例の44%でも検出された。

【0125】

様々な実施形態において、抗STn抗体配列を含むCARは、高度に有効であり、インビボで堅実に増幅し、糖タンパク質でSTnを発現するがん細胞を認識し、STnを発現するがん細胞に対して細胞傷害活性を示す。STn抗原は、食道がん、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、膵がん、胆管癌、胃がん、結腸がん、及び乳がんを含むがそれらに限定されない多様な固形腫瘍で高度に発現する。

10

【0126】

一実施形態において、抗STn抗体または抗原結合断片、膜貫通ドメイン、及び1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含むCARが提供される。

【0127】

一実施形態において、免疫エフェクター細胞が、CARを発現するように遺伝子改変される。CARを発現するT細胞は、本明細書において、CAR T細胞またはCAR改変T細胞と称される。

【0128】

20

様々な実施形態において、遺伝子改変免疫エフェクター細胞は、固形腫瘍及び血液学的悪性腫瘍を含むがそれらに限定されない、糖タンパク質でSTnを発現するがん細胞を有する患者に投与される。

【0129】

別段の指示が具体的にない限り、特定の実施形態の実践には、当該技術分野の技能の範囲内である化学、生化学、有機化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、遺伝学、免疫学、及び細胞生物学の従来法が用いられ、これらの多くは、例証の目的で以下に記載される。そのような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001)、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989)、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, 2008年7月更新)、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience、Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I&II (IRL Press, Oxford, 1985)、Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992)、Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984)、Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)、Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevac

30

40

50

h and W. Strobe r , eds . , 1991)、Annual Review of Immunology、ならびにAdvances in Immunologyなどの学術誌中の研究論文を参照されたい。

【0130】

B. 定義

別様に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語及び科学用語は全て、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。特定の実施形態の実践及び試験には、本明細書に記載されるものと同様または同等の任意の方法及び材料が使用され得るが、好ましい実施形態の組成物、方法、及び材料を本明細書に記載する。本開示において、以下の用語は、以下の定義の通りである。

10

【0131】

「a」、「an」、及び「the」という冠詞は、本明細書において、その冠詞の文法上の目的語の1つ、または1つより多く（すなわち、少なくとも1つ、または1つ以上）を指すように使用される。例として、「an element（ある要素）」は、1つの要素または1つ以上の要素を意味する。

【0132】

代替物（例えば、「or（または）」）の使用は、代替物のうちの1つ、両方、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味するよう理解されるものとする。

【0133】

「及び/または」という用語は、代替物のうちの1つまたは両方のいずれかを意味するよう理解されるものとする。

20

【0134】

本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」という用語は、基準の分量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%ほど異なる分量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量、または長さを指す。一実施形態において、「約」または「およそ」という用語は、基準の分量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量、または長さについて±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、または±1%の範囲の分量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量、または長さを指す。

30

【0135】

本明細書全体を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「comprise（含む）」、「comprises」、及び「comprising」という言葉は、記載されるステップもしくは要素またはステップもしくは要素の一群の包含を暗示するが、いかなる他のステップもしくは要素またはステップもしくは要素の一群の除外を暗示するものではないと理解される。「からなる」とは、「からなる」という表現に続くもの全てを含み、それらに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という表現は、列記される要素が必要または必須であり、他の要素が存在し得ないことを示す。「から本質的になる」とは、この表現の後に列記されるあらゆる要素を含み、列記される要素の開示内容において指定される活性または作用に干渉も寄与もしない他の要素に限定されることを意味する。したがって、「から本質的になる」という表現は、列記される要素が必要または必須であるが、列記される要素の活性または作用に物質的に影響する他の要素が存在しないことを示す。

40

【0136】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「ある実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「ある特定の実施形態」、「付加的な実施形態」、もしくは「さらなる実施形態」、またはそれらの組み合わせへの言及は、その実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造、または特性が、少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体を通じた様々な箇所に前述の表現が存在しても、必ずしも全てが同じ実施形態に言及しているとは限らない。さらに、特定の特徵、構造、または

50

特性は、1つ以上の実施形態において、任意の好適な様式で組み合わせられてもよい。また、一実施形態においてある特徴が明白に記述されていることが、特定の実施形態においてその特徴を除外する根拠となることが理解される。

【0137】

STn (Neu5Ac₂₋₆GalNAc-O-Ser/Thrは、CD175sとしても知られ、最も単純なシアリル化ムチン型O-グリカンである。STnは、N-アセチル-ガラクトサミン (GalNAc) の1つの残基がセリンまたはスレオニン残基にアルファ-O結合し、炭素6においてシアリ酸 (ヒトにおけるNeu5Ac) で置換されたものから形成された二糖である。このシアリル化は、さもなければムチン型O-グリカンに見出される様々なコア構造の形成を妨げる。

10

【0138】

様々な実施形態において、STn抗原は、ムチンまたはムチン様糖タンパク質からなる群から選択される糖タンパク質で発現する。

【0139】

特定の実施形態において、STn抗原は、ムチン1及びムチン16からなる群から選択されるムチンで発現する。

【0140】

ある特定の実施形態において、STn抗原は、ムチン様タンパク質で発現する。

【0141】

様々な実施形態において、ムチン様タンパク質は、TAG-72である。

20

【0142】

C. キメラ抗原受容体

様々な実施形態において、がん細胞STn抗原に免疫エフェクター細胞の細胞傷害性を再指向させる遺伝子操作された受容体が提供される。これらの遺伝子操作された受容体は、本明細書において、キメラ抗原受容体 (CAR) と称される。CARは、特異的な抗STnの細胞免疫活性を示すキメラタンパク質を生成するために、所望の抗原 (例えば、糖タンパク質で発現するSTn) に対する抗体ベースの特異性をT細胞受容体活性化細胞内ドメインと組み合わせる分子である。本明細書で使用される場合、「キメラ (chimeric)」という用語は、異なる起源の異なるタンパク質またはDNAの部分から構成されていることを説明するものである。

30

【0143】

特定の実施形態において、CARは、STnに結合する細胞外ドメイン (結合ドメインまたは抗原特異的結合ドメインとも称される)、膜貫通ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む。CARの抗STn抗原結合ドメインと、標的細胞の表面上のSTn結合糖タンパク質、例えばTAG-72との会合は、CARのクラスター化をもたらし、CAR含有細胞に活性化刺激を送達する。CARの主な特性は、免疫エフェクター細胞の特異性を再指向させ、それにより、モノクローナル抗体、可溶性リガンド、または細胞特異的共受容体の細胞特異的標的化能力を利用して、主要組織適合性 (MHC) 依存様式で標的抗原発現細胞の細胞死を媒介することのできる分子の増殖、サイトカイン産生、食作用、または産生を誘発するそれらの能力である。

40

【0144】

様々な実施形態において、CARは、STn特異的結合ドメインを含む細胞外結合ドメイン、膜貫通ドメイン、1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、及び一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0145】

特定の実施形態において、CARは、抗STn抗体またはその抗原結合断片を含む細胞外結合ドメイン、1つ以上のヒンジドメインまたはスペーサドメイン、1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含む膜貫通ドメイン、及び一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0146】

50

1. 結合ドメイン

特定の実施形態において、CARは、標的細胞、例えばがん細胞で発現するヒトSTn結合糖タンパク質に特異的に結合する、抗STn抗体またはその抗原結合断片を含む、細胞外結合ドメインを含む。本明細書で使用される場合、「結合ドメイン」、「細胞外ドメイン」、「細胞外結合ドメイン」、「抗原特異的結合ドメイン」、及び「細胞外抗原特異的結合ドメイン」という用語は、互換的に使用され、目的の標的抗原、例えばSTnに特異的に結合する能力を有するCARを提示する。結合ドメインは、天然、合成、半合成、または組換えの起源のいずれに由来してもよい。

【0147】

本明細書で使用される「特異的結合親和性」、または「特異的に結合する」、または「特異的に結合している」、または「特異的結合」、または「特異的に標的化する」という用語は、抗STn抗体またはその抗原結合断片（またはそれらを含むCAR）が、バックグラウンド結合よりも高い結合親和性でSTnに結合することを説明するものである。結合ドメイン（または結合ドメインを含むCARもしくは結合ドメインを含む融合タンパク質）は、例えば、約 10^5 M^{-1} 以上の親和性または K_d （すなわち、 $1/\text{M}$ の単位での特定の結合相互作用の平衡会合定数）でSTnと結合もしくは会合する場合に、STn結合糖タンパク質、例えばTAG-72に「特異的に結合する」。ある特定の実施形態において、結合ドメイン（またはその融合タンパク質）は、約 10^6 M^{-1} 、 10^7 M^{-1} 、 10^8 M^{-1} 、 10^9 M^{-1} 、 10^{10} M^{-1} 、 10^{11} M^{-1} 、 10^{12} M^{-1} 、または 10^{13} M^{-1} 以上の K_d で標的に結合する。「高親和性」結合ドメイン（またはその一本鎖融合タンパク質）とは、少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも 10^{12} M^{-1} 、少なくとも 10^{13} M^{-1} 、またはそれ以上の K_d を有する結合ドメインを指す。

【0148】

あるいは、親和性は、Mの単位での特定の結合相互作用（例えば、 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、またはそれ以下）の平衡解離定数（ K_d ）と定義される場合がある。本開示による結合ドメインポリペプチド及びCARタンパク質の親和性は、従来技術を使用して、例えば、競合ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）によって、または結合会合（binding association）、もしくは標識リガンドを使用した置換アッセイ（displacement assay）によって、あるいは、Biacore, Inc.（Piscataway, NJ）から入手可能であるBiacore T100などの表面プラズモン共鳴デバイス、またはそれぞれCorning及びPerkin Elmerから入手可能なEPICシステムもしくはEnSpireなどの光学バイオセンサ技術を使用して、容易に定量することができる（例えば、Scatchard et al.（1949）Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660、及び米国特許第5,283,173号、同第5,468,614号、またはその均等物も参照されたい）。

【0149】

一実施形態において、特異的結合の親和性は、バックグラウンド結合より約2倍高いか、バックグラウンド結合より約5倍高いか、バックグラウンド結合より約10倍高いか、バックグラウンド結合より約20倍高いか、バックグラウンド結合より約50倍高いか、バックグラウンド結合より約100倍高いか、またはバックグラウンド結合より約1000倍以上高い。

【0150】

特定の実施形態において、CARの細胞外結合ドメインは、抗体またはその抗原結合断片を含む。「抗体」とは、免疫細胞により認識されるものなどの抗原決定基を含む脂質、炭水化物、多糖、糖タンパク質、ペプチド、または核酸といった抗原のエピトープを特異的に認識し、それに結合する、少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドである結合剤を指す。

【0151】

10

20

30

40

50

「抗原 (A g)」とは、動物において抗体の産生またはT細胞応答を刺激することのできる化合物、組成物、または物質を指し、動物に注射または吸収される組成物 (例えば、がん特異的タンパク質を含むものなど) を含む。例示的な抗原としては、脂質、炭水化物、多糖、糖タンパク質、ペプチド、または核酸が挙げられるが、それらに限定されない。抗原は、開示される抗原などの異種抗原により誘導されるものを含む特定の体液性免疫または細胞性免疫の産物と反応する。特定の実施形態において、標的抗原は、S T n 抗原である。

【0152】

「エпитープ」または「抗原決定基」は、結合剤が結合する抗原の領域を指す。

【0153】

抗体には、その抗原結合断片、例えばラクダIg、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fvタンパク質 (「scFv」)、bis-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質 (「dsFv」)、及び単ドメイン抗体 (sdAb、ナノボディ)、ならびに抗原結合に関与する全長抗体の一部などが含まれる。この用語には、キメラ抗体 (例えば、ヒト化マウス抗体)、ヘテロ接合抗体 (例えば二重特異性抗体など)、及びそれらの抗原結合断片といった、遺伝子操作された形態も含まれる。Pierce Catalog and Handbook, 1994 - 1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

【0154】

当業者には理解されるように、また本明細書の他の箇所に記載されるように、完全抗体は、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む。各重鎖は、1つの可変領域と、第1、第2、及び第3の定常領域とからなり、一方で各軽鎖は、1つの可変領域と1つの定常領域とからなる。哺乳動物の重鎖は、 γ 、 δ 、 ϵ 、及び μ に分類される。哺乳動物の軽鎖は、 κ または λ に分類される。 κ 、 δ 、 ϵ 、及び μ の重鎖を含む免疫グロブリンは、免疫グロブリン (Ig) A、Ig D、Ig E、Ig G、及びIg Mに分類される。完全抗体は「Y」形状を形成する。Yのステムは、一緒に結合した2本の重鎖の第2及び第3の定常領域 (そしてIg E及びIg Mに関しては第4の定常領域) からなり、ジスルフィド結合 (鎖間) がヒンジに形成される。重鎖 γ 、 δ 、及び ϵ は、3つのタンデム (一列) のIgドメインと柔軟性を高めるためのヒンジ領域とから構成された定常領域を有し、重鎖 μ 及び λ は、4つの免疫グロブリンドメインから構成された定常領域を有する。第2及び第3の定常領域は、それぞれ「CH2ドメイン」及び「CH3ドメイン」と称される。Yの各アームは、単一の軽鎖の可変領域及び定常領域に結合した単一の重鎖の可変領域及び第1の定常領域を含む。軽鎖及び重鎖の可変領域は、抗原結合に関与する。

【0155】

軽鎖及び重鎖の可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる3つの超可変領域によって中断されている「フレームワーク」を含む。CDRは、従来の方法によって、例えばKabataらによる配列 (Wu, T T and Kabat, E. A., J Exp Med. 132 (2): 211 - 50, (1970)、Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84: 2440 - 2443 (1987) (参照により本明細書に組み込まれるKabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照されたい)、またはChothiaらによる構造 (Chothia, C. and Lesk, A. M., J Mol. Biol., 196 (4): 901 - 917 (1987)、Chothia, C. et al, Nature, 342: 877 - 883 (1989)) などによって、定義または特定することができる。

【0156】

10

20

30

40

50

軽鎖 C D R を予測するための規則の例証となる例としては、次のものが挙げられる：C D R - L 1 は、約残基 2 4 で開始し、C y s が先行し、約 1 0 ~ 1 7 残基であり、T r p が続く（通常は T r p - T y r - G l n だが、T r p - L e u - G l n、T r p - P h e - G l n、T r p - T y r - L e u も続く）；C D R - L 2 は、C D R - L 1 の端部の後の約 1 6 残基で開始し、概して I l e - T y r が先行するが、V a l - T y r、I l e - L y s、I l e - P h e も先行し、7 残基である；そして C D R - L 3 は、C D R - L 2 の端部の後の約 3 3 残基で開始し、C y s が先行し、7 ~ 1 1 残基であり、P h e - G l y - X X X - G l y が続く（X X X は任意のアミノ酸である、配列番号 5 3）。

【 0 1 5 7 】

重鎖 C D R を予測するための規則の例証となる例としては、次のものが挙げられる：C D R - H 1 は、約残基 2 6 で開始し、C y s - X X X - X X X - X X X（配列番号 5 4）が先行し、1 0 ~ 1 2 残基であり、T r p が続く（通常は T r p - V a l だが、T r p - I l e、T r p - A l a も続く）；C D R - H 2 は、C D R - H 1 の端部の後の約 1 5 残基で開始し、概して L e u - G l u - T r p - I l e - G l y（配列番号 5 5）またはいくつかの変形形態が先行し、1 6 ~ 1 9 残基であり、L y s / A r g - L e u / I l e / V a l / P h e / T h r / A l a - T h r / S e r / I l e / A l a が続く；そして C D R - H 3 は、C D R - H 2 の端部の後の約 3 3 残基で開始し、C y s - X X X - X X X（通常は C y s - A l a - A r g）が先行し、3 ~ 2 5 残基であり、T r p - G l y - X X X - G l y（配列番号 5 6）が続く。

【 0 1 5 8 】

一実施形態において、軽鎖 C D R 及び重鎖 C D R は、K a b a t 法に従って決定される。

【 0 1 5 9 】

一実施形態において、軽鎖 C D R ならびに重鎖 C D R 2 及び C D R 3 は、K a b a t 法に従って決定され、重鎖 C D R 1 は、A b M 法に従って決定され、これは、K a b a t 法と C l o t h i a 法との間の含むである。例えば、W h i t e l e g g N & R e e s A R, P r o t e i n E n g. 2 0 0 0 D e c ; 1 3 (1 2) : 8 1 9 - 2 4 及び M e t h o d s M o l B i o l. 2 0 0 4 ; 2 4 8 : 5 1 - 9 1 を参照されたい。例えば A b Y s i s (www.bioinf.org.uk/abysis/) などの、C D R を予測するためのプログラムが公的に利用可能である。

【 0 1 6 0 】

異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、ヒトなどの種内で比較的保存されている。構成物である軽鎖及び重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、三次元空間における C D R の位置決定及びアライメントに役立つ。C D R は主に、抗原のエピトープへの結合に関与する。各鎖の C D R は通常、N 末端から開始して順次付番されて C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 と称され、また通常は、特定の C D R が位置する鎖によって特定される。したがって、抗体の重鎖の可変ドメインに位置する C D R は、C D R H 1、C D R H 2、及び C D R H 3 と称され、一方で、抗体の軽鎖の可変ドメインに位置する C D R は、C D R L 1、C D R L 2、及び C D R L 3 と称される。異なる特異性（すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位）を有する抗体は、異なる C D R を有する。抗体間で異なるのは C D R であるが、C D R 内の限定された数のアミノ酸位置しか、抗原結合に直接関与しない。C D R 内のこれらの位置は、特異性決定残基（S D R）と呼ばれる。本明細書において想定される抗 S T n C A R を構築するのに好適な軽鎖 C D R の例証となる例としては、配列番号 1 ~ 3、9 ~ 1 1、及び 1 7 ~ 1 9 に記載の C D R 配列が挙げられるが、それらに限定されない。本明細書において想定される抗 S T n C A R を構築するのに好適な重鎖 C D R の例証となる例としては、配列番号 4 ~ 6、1 2 ~ 1 4、及び 2 0 ~ 2 2 に記載の C D R 配列が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 1 6 1 】

「V L」または「V L」への言及は、抗体、F v、s c F v、d s F v、F a b、また

10

20

30

40

50

は本明細書に開示される他の抗体断片のものを含めた、免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指す。本明細書において想定される抗S T n C A Rを構築するのに好適な軽鎖可変領域の例証となる例としては、配列番号7、15、及び23に記載の軽鎖可変領域配列が挙げられるが、それらに限定されない。

【0162】

「V H」または「V H」への言及は、抗体、F v、s c F v、d s F v、F a b、または本明細書に開示される他の抗体断片のものを含めた、免疫グロブリン重鎖の可変領域を指す。本明細書において想定される抗S T n C A Rを構築するのに好適な重鎖可変領域の例証となる例としては、配列番号8、16、及び24に記載の重鎖可変領域配列が挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0163】

「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単一クローンによって、または単一抗体の軽鎖及び重鎖の遺伝子が形質導入されている細胞によって産生される抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に知られる方法によって、例えば骨髓腫細胞と免疫脾臓細胞との融合からハイブリッド抗体を形成する細胞を作製することによって産生される。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

【0164】

「キメラ抗体」は、ヒトなどの1つの種に由来するフレームワーク残基、及びマウスなどの別の種に由来するC D R（これが一般的に抗原結合をもたらす）を有する。特定の好ましい実施形態では、C A Rは、キメラ抗体またはその抗原結合断片である抗原特異的結合ドメインを含む。

20

【0165】

好ましい実施形態では、抗体は、ヒトS T n発現糖タンパク質に特異的に結合するヒト抗体（例えばヒトモノクローナル抗体など）またはその断片である。ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリから選択されるF vクローン可変ドメイン配列（複数可）を、上述のような既知のヒト定常ドメイン配列（複数可）と組み合わせることによって構築することができる。あるいは、ヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法によって作製されてもよい。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫の細胞株が、例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、及びBoerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)によって説明されている。加えて、トランスジェニック動物（例えば、マウス）を使用して、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができる。例えば、Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993)、Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993)、Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993)を参照されたい。ヒト抗体が、起点となる非ヒト抗体と同様の親和性及び特異性を有する場合、遺伝子シャフリングを使用して、非ヒト、例えば齧歯類の抗体からヒト抗体を得ることもできる。（1993年4月1日公開のPCT WO 93/06213を参照されたい）。C D Rグラフティングによる非ヒト抗体の従来のヒト化とは異なり、この技術は、非ヒト起源のF RまたはC D R残基を有しない完全ヒト抗体をもたらす。

30

40

【0166】

一実施形態において、C A Rは、「ヒト化」抗体を含む。ヒト化抗体は、ヒトフレームワーク領域と、非ヒト（例えばマウス、ラット、または合成）の免疫グロブリンに由来する1つ以上のC D Rとを含む、免疫グロブリンである。C D Rをもたらす非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークをもたらすヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。一実施形態において、全てのC D Rが、ヒト化免疫グロブリン

50

におけるドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域が存在する必要はないが、存在する場合、それらは、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85～90%、例えば約95%以上同一でなければならない。したがって、場合によりCDRを除くヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。ヒト化抗体または他のモノクローナル抗体は、抗原結合または他の免疫グロブリン機能に実質的に影響を及ぼさない、付加的な保存的アミノ酸置換を有し得る。ヒト化抗体は、遺伝子操作の手段によって構築することができる（例えば、米国特許第5,585,089号を参照されたい）。

【0167】

特定の実施形態において、抗STn抗体またはその抗原結合断片は、ラクダIg（ラクダ科抗体（VHH））、IgNAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fv抗体（「scFv」）、bis-scFv、（scFv）₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）、及び単一ドメイン抗体（sdAb、ナノボディ）を含むが、それらに限定されない。

【0168】

本明細書で使用される「ラクダIg」または「ラクダ科VHH」は、重鎖抗体の最小の既知の抗原結合単位を指す（Koch-Nolte, et al, FASEB J., 21:3490-3498（2007））。「重鎖抗体」または「ラクダ科抗体」は、2つのVHドメインを含み、軽鎖を含まない抗体を指す（Riechmann L, et al, J. Immunol. Methods 231:25-38（1999））、WO94/04678、WO94/25591、米国特許第6,005,079号）。

【0169】

「免疫グロブリン新抗原受容体」の「IgNAR」は、1つの可変新抗原受容体（VNAR）ドメインと、5つの定常新抗原受容体（CNAR）ドメインとのホモ二量体からなる、サメ免疫レパートリー由来の抗体のクラスを指す。IgNARは、最も小さい既知の免疫グロブリンベースのタンパク質の足場の一部であり、高度に安定であり、効率的な結合特性を有する。この本質的な安定性は、（i）マウス抗体に見られる従来の抗体のVH及びVLドメインと比較して相当数の荷電した親水性の表面露出残基を提示する、基礎となるIg足場と、（ii）ループ間ジスルフィド架橋、及びループ内水素結合のパターンを含む、相補性決定領域（CDR）ループ内の安定化構造特徴との両方に起因し得る。

【0170】

抗体のパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる、各々が単一の抗原結合部位を有する2つの同一の抗原結合断片と、容易に結晶化する能力を反映した名称である残りの「Fc」断片とを産生する。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有しながらも抗原に架橋結合することのできるF(ab')₂断片をもたらす。

【0171】

「Fv」は、完全な抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。一実施形態において、二本鎖Fv種は、密接な非共有性会合状態にある、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなる。一本鎖Fv（scFv）種において、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインは、軽鎖及び重鎖が二本鎖Fv種のもものと類似した「二量体」構造で会合することができるよう、可動性ペプチドリンカーによって共有結合していてもよい。各可変ドメインの3つの超可変領域（HVR）がVH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を画定するように相互作用するのは、この構成においてである。集合的に、6つのHVRは、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的な3つのHVRのみを含むFvの半分）でさえ、結合部位全体よりも低い親和性であるにせよ、抗原を認識しそれに結合する能力を有する。

【0172】

Fab断片は、重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含み、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）も含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上の

10

20

30

40

50

システインを含む重鎖 C H 1 ドメインのカルボキシ末端におけるいくつかの残基の付加により、F a b 断片とは異なる。F a b ' - S H は、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有する F a b ' に対する、本明細書における名称である。F (a b ') 2 抗体断片は、元々、ヒンジシステインを間に有する F a b ' 断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

【 0 1 7 3 】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する抗体断片を指し、この断片は、同じポリペプチド鎖内で重鎖可変ドメイン（V H）が軽鎖可変ドメイン（V L）に接続したもの（V H - V L）を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、これらのドメインは別の鎖の相補的ドメインと対合させられ、2つの抗原結合部位を作り出す。ダイアボディは、二価または二重特異性であり得る。ダイアボディは、例えば、E P 4 0 4 , 0 9 7、W O 1 9 9 3 / 0 1 1 6 1、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003)、及び Hollinger et al., PNAS USA 90: 6444 - 6448 (1993) に、より詳細に記載されている。トリアボディ及びテトラボディもまた、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003) に記載されている。

10

【 0 1 7 4 】

「単ドメイン抗体」すなわち「s d A b」または「ナノボディ」は、抗体重鎖の可変領域（V H ドメイン）または抗体軽鎖の可変領域（V L ドメイン）からなる抗体断片を指す（Holt, L., et al., Trends in Biotechnology, 21(11): 484 - 490）。

20

【 0 1 7 5 】

「一本鎖 F v」または「s c F v」抗体断片は、抗体の V H 及び V L ドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に、いずれかの配向（例えば、V L - V H または V H - V L）で存在する。一般に、s c F v ポリペプチドは、s c F v が抗原結合に望ましい構造を形成することを可能にする、V H ドメインと V L ドメインとの間のポリペプチドリンカーをさらに含む。s c F v の概説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269 - 315 を参照されたい。

30

【 0 1 7 6 】

好ましい実施形態では、C A R は、s c F v であり、かつマウス、ヒト、またはヒト化型の s c F v であってもよい、抗原特異的結合ドメインを含む。一本鎖抗体は、所望の標的に特異的なハイブリドーマの V 領域遺伝子からクローニングされ得る。このようなハイブリドーマの産生は日常的となっている。可変領域重鎖（V H）及び可変領域軽鎖（V L）のクローニングに使用することのできる技術は、例えば、Orlandi et al., PNAS, 1989; 86: 3833 - 3837 に記載されている。

【 0 1 7 7 】

特定の実施形態において、S T n を発現するヒト糖タンパク質に結合する s c F v である抗原特異的結合ドメイン。

40

【 0 1 7 8 】

本明細書において想定される抗 S T n C A R を構築するのに好適な可変軽鎖の例証となる例としては、配列番号 7、15、及び 23 に記載のアミノ酸配列が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 1 7 9 】

本明細書において想定される抗 S T n C A R を構築するのに好適な可変重鎖の例証となる例としては、配列番号 8、16、及び 24 に記載のアミノ酸配列が挙げられるが、それらに限定されない。

50

【0180】

例示的なSTn特異的結合ドメインは、少なくとも1つのヒトフレームワーク領域を含む、STnに特異的な免疫グロブリン可変領域である。「ヒトフレームワーク領域」は、ヒト免疫グロブリン可変領域の野生型（すなわち、天然起源）のフレームワーク領域、その領域内のアミノ酸の約50%未満（例えば、好ましくは約45%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、もしくは1%未満）が欠失しているか、もしくは（例えば、対応する位置における非ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域の1つ以上のアミノ酸残基で）置換されている、ヒト免疫グロブリン可変領域の変更されたフレームワーク領域、または、一実施形態では、免疫原性が低減するように、その領域内のアミノ酸の約50%未満（例えば、45%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、もしくは5%未満）が欠失しているか、もしくは（例えば、露出残基の位置で、かつ/もしくは対応する位置におけるヒト免疫グロブリンフレームワーク領域の1つ以上のアミノ酸で）置換されている、非ヒト免疫グロブリン可変領域の変更されたフレームワーク領域を指す。

10

【0181】

ある特定の実施形態において、ヒトフレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリン可変領域の野生型フレームワーク領域である。ある他の実施形態では、ヒトフレームワーク領域は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上の位置にアミノ酸欠失または置換を有する、ヒト免疫グロブリン可変領域の変更されたフレームワーク領域である。他の実施形態では、ヒトフレームワーク領域は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上の位置にアミノ酸欠失または置換を有する、非ヒト免疫グロブリン可変領域の変更されたフレームワーク領域である。

20

【0182】

特定の実施形態において、STn特異的結合ドメインは、ヒト軽鎖FR1、ヒト重鎖FR1、ヒト軽鎖FR2、ヒト重鎖FR2、ヒト軽鎖FR3、ヒト重鎖FR3、ヒト軽鎖FR4、及びヒト重鎖FR4から選択される、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのヒトフレームワーク領域（FR）を含む。

【0183】

STn特異的結合ドメイン内に存在し得るヒトFRとしては、例示的なFRの1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のアミノ酸が置換されているかもしくは欠失している、本明細書に提供される例示的なFRのバリエーションも挙げられる。

30

【0184】

ある特定の実施形態において、STn特異的結合ドメインは、（a）ヒト軽鎖FR1、ヒト軽鎖FR2、ヒト軽鎖FR3、及びヒト軽鎖FR4を含むヒト化軽鎖可変領域、ならびに（b）ヒト重鎖FR1、ヒト重鎖FR2、ヒト重鎖FR3、及びヒト重鎖FR4を含むヒト化重鎖可変領域を含む。

【0185】

本明細書に提供されるSTn特異的結合ドメインは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRも含む。そのようなCDRは、軽鎖のCDRL1、CDRL2、及びCDRL3、ならびに重鎖的CDRH1、CDRH2、及びCDRH3から選択される、非ヒトCDRまたは変更された非ヒトCDRであり得る。ある特定の実施形態において、STn特異的結合ドメインは、（a）軽鎖CDRL1、軽鎖CDRL2、及び軽鎖CDRL3を含む軽鎖可変領域、ならびに（b）重鎖CDRH1、重鎖CDRH2、及び重鎖CDRH3を含む重鎖可変領域を含む。

40

【0186】

一実施形態において、STn特異的結合ドメインは、配列番号1～3、9～11、または17～19に記載の軽鎖CDR配列を含む。特定の実施形態では、STn特異的結合ドメインは、配列番号1～3、9～11、または17～19に記載の軽鎖CDR配列に対し

50

て少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% のアミノ酸同一性を有する軽鎖 CDR 配列を含む。

【0187】

一実施形態において、STn 特異的結合ドメインは、配列番号 4 ~ 6、12 ~ 14、または 20 ~ 22 に記載の重鎖 CDR 配列を含む。特定の実施形態では、STn 特異的結合ドメインは、配列番号 4 ~ 6、12 ~ 14、または 20 ~ 22 に記載の重鎖 CDR 配列に対して少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% のアミノ酸同一性を有する重鎖 CDR 配列を含む。

10

【0188】

「VL」または「VL」への言及は、抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab、または本明細書に開示される他の抗体断片のものを含めた、免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指す。本明細書において想定される抗STn CAR を構築するのに好適な軽鎖可変領域の例証となる例としては、配列番号 7、15、または 23 に記載の軽鎖可変領域配列が挙げられるが、それらに限定されない。

【0189】

「VH」または「VH」への言及は、抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab、または本明細書に開示される他の抗体断片のものを含めた、免疫グロブリン重鎖の可変領域を指す。本明細書において想定される抗STn CAR を構築するのに好適な重鎖可変領域の例証となる例としては、配列番号 8、16、または 24 に記載の重鎖可変領域配列が挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0190】

2. リンカー

ある特定の実施形態において、CAR は、様々なドメイン間に、例えば、V_H ドメインと V_L ドメインとの間に、分子の適切な空間配置及び立体構造のために付加されたリンカー残基を含む。特定の実施形態において、リンカーは、可変領域連結配列である。「可変領域連結配列」とは、得られるポリペプチドが、同じ軽鎖及び重鎖の可変領域を含む抗体と同じ標的分子に対して特異的結合親和性を保持するように、V_H ドメインと V_L ドメインとを接続し、2つのサブ結合ドメインの相互作用と適合性のあるスパーサー機能を提供するアミノ酸配列である。特定の実施形態において、リンカーは、1つ以上の重鎖もしくは軽鎖の可変ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び/または一次シグナル伝達ドメインを分離する。CAR は、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ以上のリンカーを含む。特定の実施形態において、リンカーの長さは、約 1 ~ 約 25 アミノ酸、約 5 ~ 約 20 アミノ酸、もしくは約 10 ~ 約 20 アミノ酸、またはその間の任意のアミノ酸長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはそれ以上のアミノ酸長である。

30

【0191】

リンカーの例証となる例としては、グリシンポリマー (G)_n、グリシン-セリンポリマー (G₁₋₅S₁₋₅)_n (ここで、n は少なくとも 1、2、3、4、または 5 の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当該技術分野で知られる他の可動性リンカーが挙げられる。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは比較的構造不定であり、したがって、本明細書に記載の CAR などの融合タンパク質のドメイン間の中性のテザーとして機能することができる場合がある。グリシンは、アラニンよりも有意にファイ-プサイ空間にアクセスし、より長い側鎖を有する残基よりも大幅に制限が少ない (Schera ga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)) を参照されたい)。特定の実施形態における CAR の設計が全体的または部分的に可動性であるリンカーを含み得、その結果リンカーが、所望の CAR 構造をもたらすように可動性リンカーならびに可動性の低い構造を付与する 1つ以上

40

50

の部分を含み得ることは、当業者であれば認識するであろう。

【0192】

他の例示的なリンカーとしては、次のアミノ酸配列が挙げられるが、それらに限定されない：GGG；DGGGS（配列番号28）；TGEKP（配列番号29）（例えば、Liu et al., PNAS 5525-5530（1997）を参照されたい）；GGRR（配列番号30）（Pomerantz et al., 1995、上記）；(GGGS)_n（式中、1、2、3、4、または5である）（配列番号31）（Kim et al., PNAS 93, 1156-1160（1996））；EGKSSGSGSESKVD（配列番号32）（Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070）；KESGSSVSSSEQLAQFRSLD（配列番号33）（Bird et al., 1988, Science 242:423-426）、GGRRGGGS（配列番号34）；LRQRDGERP（配列番号35）；LRQKDGSGSERP（配列番号36）；LRQKD(GGG)₂ERP（配列番号37）。あるいは、可動性リンカーは、DNA結合部位とペプチド自体との両方をモデリングすることのできるコンピュータプログラムを使用して（Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260（1993）, PNAS 91:11099-11103（1994））、またはファージディスプレイ法により、合理的に設計することができる。一実施形態において、リンカーは、次のアミノ酸配列：GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号38）を含む（Cooper et al., Blood, 101(4):1637-1644（2003））。

10

20

【0193】

3. スペーサードメイン

特定の実施形態において、CARの結合ドメインには1つ以上の「スペーサードメイン」が続き、これは、適切な細胞/細胞接触、抗原結合、及び活性化が可能となるように抗原結合ドメインをエフェクター細胞の表面から離して移動させる領域を指す（Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6:412-419）。スペーサードメインは、天然、合成、半合成、または組換えの起源のいずれに由来してもよい。ある特定の実施形態において、スペーサードメインは、1つ以上の重鎖定常領域、例えば、CH2及びCH3を含むがそれらに限定されない、免疫グロブリンの一部である。スペーサードメインは、天然起源の免疫グロブリンヒンジ領域または変更された免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含み得る。

30

【0194】

一実施形態において、スペーサードメインは、IgG1、IgG4、またはIgDのCH2ドメイン及びCH3ドメインを含む。

【0195】

4. ヒンジドメイン

CARの結合ドメインには、概して、1つ以上の「ヒンジドメイン」が続き、これは、適切な細胞/細胞接触、抗原結合、及び活性化が可能となるように、抗原結合ドメインをエフェクター細胞表面から離して位置付ける機能を果たす。CARは概して、結合ドメインと膜貫通ドメイン（TM）との間に1つ以上のヒンジドメインを含む。ヒンジドメインは、天然、合成、半合成、または組換えの起源のいずれに由来してもよい。ヒンジドメインは、天然起源の免疫グロブリンヒンジ領域または変更された免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含み得る。

40

【0196】

「変更されたヒンジ領域」とは、(a)最大30%のアミノ酸変化（例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換もしくは欠失）を有する天然起源のヒンジ領域、(b)最大30%のアミノ酸変化（例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換もしくは欠失）を有する、少なくとも10アミノ酸長（例えば、少なくとも12、13、14、または15アミノ酸長）の天然起源のヒン

50

ジ領域の一部分、または(c)(4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15、または少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸長であり得る)コアヒンジ領域を含む天然起源のヒンジ領域の一部分を指す。ある特定の実施形態において、天然起源の免疫グロブリンヒンジ領域内の1つ以上のシステイン残基は、1つ以上の他のアミノ酸残基(例えば、1つ以上のセリン残基)で置換されていてもよい。変更された免疫グロブリンヒンジ領域では、代替的または付加的に、野生型免疫グロブリンヒンジ領域のプロリン残基が別のアミノ酸残基(例えば、セリン残基)で置換されていてもよい。

【0197】

本明細書に記載のCARで使用するのに好適な例証となるヒンジドメインとしては、CD8 及びCD4などの1型膜タンパク質の細胞外領域に由来するヒンジ領域が挙げられ、これは、これらの分子の野生型ヒンジ領域であってもよいし、変更されていてもよい。別の実施形態では、ヒンジドメインは、CD8 ヒンジ領域を含む。

【0198】

一実施形態において、ヒンジは、PD-1ヒンジまたはCD152ヒンジである。

【0199】

5. 膜貫通(TM)ドメイン

「膜貫通ドメイン」とは、細胞外結合部分と細胞内シグナル伝達ドメインとを融合させ、CARを免疫エフェクター細胞の形質膜に固着させる、CARの一部分である。TMドメインは、天然、合成、半合成、または組換えの起源のいずれに由来してもよい。TMドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CD、CD3、CD、CD3、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、及びPD1に由来し得る(すなわち、少なくともこれらの膜貫通領域(複数可)を含み得る)。特定の実施形態において、TMドメインは合成的であり、ロイシン及びバリンなどの疎水性残基を主に含む。

【0200】

一実施形態において、CARは、PD1、CD152、またはCD8 に由来するTMドメインを含む。別の実施形態では、CARは、PD1、CD152、もしくはCD8 に由来するTMドメインと、CARのTMドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを連結させる、好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の間のアミノ酸長の短いオリゴペプチドまたはポリペプチドリンカーとを含む。グリシン-セリンベースのリンカーは、特に好適なリンカーを提供する。

【0201】

6. 細胞内シグナル伝達ドメイン

特定の実施形態において、CAR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」とは、ヒトTAG-72ポリペプチドに対する抗STn CARの効果的な結合のメッセージを、免疫エフェクター細胞の内部に伝達して、エフェクター細胞機能、例えば、活性化、サイトカイン産生、増殖、及びCAR結合標的細胞に対する細胞傷害因子の放出を含む細胞傷害活性、または細胞外CARドメインに対する抗原結合により誘発される他の細胞応答を誘発することに関与する、CARの部分の指す。

【0202】

「エフェクター機能」という用語は、免疫エフェクター細胞の特殊機能を指す。例えばT細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含む補助もしくは活性であり得る。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊機能を行わせる、タンパク質の一部分を指す。通常、細胞内シグナル伝達ドメインの全体を用いてもよいが、多くの場合、ドメイン全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮化部分が使用される範囲内では、そのような短縮化部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、ドメイン全体の代わりに使用され得る。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェク

10

20

30

40

50

ター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインのいかなる短縮化部分をも含むよう意図される。

【0203】

T C Rによって生成されたシグナル単独ではT細胞の完全な活性化に不十分であり、二次的すなわち共刺激性のシグナルも必要であることが知られている。したがって、T細胞活性化は、2つの明確に異なるクラスの細胞内シグナル伝達ドメイン、すなわち、T C R（例えば、T C R / C D 3複合体）によって抗原依存性一次活性化を開始する一次シグナル伝達ドメインと、抗原依存様式で作用して二次的すなわち共刺激性のシグナルを提供する共刺激シグナル伝達ドメインとによって媒介されることができる。好ましい実施形態では、C A Rは、1つ以上の「共刺激シグナル伝達ドメイン」及び「一次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を含む。

10

【0204】

一次シグナル伝達ドメインは、刺激方法または阻害方法のいずれかでT C R複合体の一次活性化を調節する。刺激様式で作用する一次シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフすなわちI T A Mとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。

【0205】

特定の実施形態で使用するのに好適なI T A Mを含む一次シグナル伝達ドメインの例証となる例としては、F c R、F c R、C D 3、C D 3、C D 3、C D 3、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、及びC D 6 6 dに由来するものが挙げられる。特定の好ましい実施形態では、C A Rは、C D 3 一次シグナル伝達ドメイン及び1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。細胞内一次シグナル伝達ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメインのカルボキシル末端に、任意の順序でタンデムに連結してよい。

20

【0206】

特定の実施形態において、C A Rは、C A R受容体を発現するT細胞の有効性及び増幅を増強するために、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。本明細書で使用される場合、「共刺激シグナル伝達ドメイン」または「共刺激ドメイン」という用語は、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインを指す。共刺激分子は、抗原に結合するとTリンパ球の効率的な活性化及び機能に必要とされる第2のシグナルを提供する、抗原受容体またはF c受容体以外の細胞表面分子である。そのような共刺激分子の例証となる例としては、T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 1 0、C A R D 1 1、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 5 4 (I C A M)、C D 8 3、C D 1 3 4 (O X 4 0)、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 2 7 8 (I C O S)、D A P 1 0、L A T、N K D 2 C、S L P 7 6、T R I M、及びZ A P 7 0が挙げられる。一実施形態において、C A Rは、C D 2 8、C D 1 3 7、及びC D 1 3 4からなる群から選択される1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびにC D 3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0207】

別の実施形態では、C A Rは、C D 2 8及びC D 1 3 7共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびにC D 3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

40

【0208】

なおも別の実施形態では、C A Rは、C D 2 8及びC D 1 3 4共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびにC D 3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0209】

一実施形態において、C A Rは、C D 1 3 7及びC D 1 3 4共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびにC D 3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0210】

一実施形態において、C A Rは、C D 1 3 7共刺激シグナル伝達ドメイン、及びC D 3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

50

【0211】

一実施形態において、CARは、CD134共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD3一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0212】

一実施形態において、CARは、CD28共刺激シグナル伝達ドメイン、及びCD3一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0213】

特定の実施形態において、CARは、がん細胞でSTnを発現する糖タンパク質に特異的に結合する抗STn抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0214】

一実施形態において、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CD、CD3、CD、CD3、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、及びPD1からなる群から選択されるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン；ならびにTLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、及びZAP70からなる群から選択される共刺激分子に由来する1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにFcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD22、CD79a、CD79b、及びCD66dに由来する一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0215】

一実施形態において、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；IgG1ヒンジ/CH2/CH3、IgG4ヒンジ/CH2/CH3、PD1ヒンジ、CD152ヒンジ、及びCD8ヒンジからなる群から選択されるヒンジドメイン；T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CD、CD3、CD、CD3、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、及びPD1からなる群から選択されるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン；ならびにTLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、及びZAP70からなる群から選択される共刺激分子に由来する1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにFcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD22、CD79a、CD79b、及びCD66dに由来する一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0216】

一実施形態において、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；IgG1ヒンジ/CH2/CH3、IgG4ヒンジ/CH2/CH3、PD1ヒンジ、CD152ヒンジ、及びCD8ヒンジからなる群から選択されるヒンジドメイン；T細胞受容体のアルファ鎖またはベータ鎖、CD、CD3、CD、CD3、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、及びPD1からなる群から選択されるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン；TMドメインをCARの細胞内シグナル伝達ドメインに連結させる、好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の間のアミノ酸長の短いオリゴペプチドまたはポリペプチドリinker；ならびにTLR1、TLR2、TLR3、TLR

10

20

30

40

50

4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、及びZAP70からなる群から選択される共刺激分子に由来する1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにFcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD22、CD79a、CD79b、及びCD66dに由来する一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0217】

特定の実施形態では、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；IgG1ヒンジ/CH2/CH3ポリペプチド及びCD8 ポリペプチドを含むヒンジドメイン；約3～約10アミノ酸のポリペプチドリinkerを含むCD8 膜貫通ドメイン；CD137細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；及びCD3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

10

【0218】

特定の実施形態では、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；CD8 ポリペプチドを含むヒンジドメイン；約3～約10アミノ酸のポリペプチドリinkerを含むCD8 膜貫通ドメイン；CD134細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；及びCD3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0219】

特定の実施形態では、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；CD8 ポリペプチドを含むヒンジドメイン；約3～約10アミノ酸のポリペプチドリinkerを含むCD8 膜貫通ドメイン；CD28細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；及びCD3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

20

【0220】

特定の実施形態では、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；PD1ヒンジポリペプチドを含むヒンジドメイン；約3～約10アミノ酸のポリペプチドリinkerを含むPD1またはCD152膜貫通ドメイン；CD137細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；及びCD3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0221】

特定の実施形態では、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；PD1ヒンジポリペプチドを含むヒンジドメイン；約3～約10アミノ酸のポリペプチドリinkerを含むPD1またはCD152膜貫通ドメイン；CD134細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；及びCD3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0222】

特定の実施形態では、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；PD1ヒンジポリペプチドを含むヒンジドメイン；約3～約10アミノ酸のポリペプチドリinkerを含むPD1またはCD152膜貫通ドメイン；CD28細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；及びCD3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0223】

特定の実施形態では、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；CD152ヒンジポリペプチドを含むヒンジドメイン；約3～約10アミノ酸のポリペプチドリinkerを含むPD1またはCD152膜貫通ドメイン；CD137細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；及びCD3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

40

【0224】

特定の実施形態では、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn scFv；CD152ヒンジポリペプチドを含むヒンジドメイン；約3～約10アミノ酸のポリペプチドリinkerを含むPD1またはCD152膜貫通ドメイン；CD134細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；及びCD3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0225】

特定の実施形態では、CARは、糖タンパク質で発現するSTnに結合する抗STn

50

s c F v ; C D 1 5 2 ヒンジポリペプチドを含むヒンジドメイン ; 約 3 ~ 約 1 0 アミノ酸のポリペプチドリンカーを含む P D 1 または C D 1 5 2 膜貫通ドメイン ; C D 2 8 細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン ; 及び C D 3 一次シグナル伝達ドメインを含む。

【 0 2 2 6 】

さらに、本明細書において想定される C A R の設計は、未改変の T 細胞または他の C A R を発現するように改変された T 細胞と比較して、本 C A R を発現する T 細胞の増幅、長期持続性、及び細胞傷害特性の改善を可能にする。

【 0 2 2 7 】

D . ポリペプチド

C A R ポリペプチド及びその断片、それらを含む細胞及び組成物、ならびにポリペプチドを発現するベクターを含むがそれらに限定されない、様々なポリペプチドが本明細書において想定される。好ましい実施形態では、1つ以上の C A R を含むポリペプチドが提供される。特定の実施形態において、C A R は、配列番号 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む抗 S T n C A R である。

【 0 2 2 8 】

「ポリペプチド」、「ポリペプチド断片」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、別段の規定がない限り、従来の意味に従って、すなわち、アミノ酸の配列として互換的に使用される。ポリペプチドは、合成されても組換え産生されてもよい。ポリペプチドは特定の長さ限定されず、例えば、それらは、全長タンパク質配列または全長タンパク質の断片を含み得、かつ、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに当該技術分野で知られる天然起源と非天然起源との両方の他の修飾を含み得る。様々な実施形態において、C A R ポリペプチドは、タンパク質の移動を同時翻訳によってか翻訳後かに指向するシグナル（またはリーダー）配列を、タンパク質の N 末端に含む。本明細書において想定される C A R において有用な好適なシグナル配列の例証となる例としては、I g G 1 重鎖シグナルポリペプチド、C D 8 シグナルポリペプチド、またはヒト G M - C S F 受容体アルファシグナルポリペプチドが挙げられるが、それらに限定されない。ポリペプチドは、種々の周知の組換え技術及び/または合成技術のうちのいずれを使用して調製されてもよい。本明細書において想定されるポリペプチドは、本開示の C A R 、または本明細書において想定される C A R の 1 つ以上のアミノ酸の欠失、付加、及び/もしくは置換を有する配列を明確に包含する。

【 0 2 2 9 】

本明細書で使用される「単離されたペプチド」または「単離されたポリペプチド」などは、細胞環境から、また細胞の他の成分との会合から、ペプチドもしくはポリペプチド分子をインビトロで単離及び/または精製することを指す（すなわち、それは、インビボの物質と著しく会合していない）。同様に、「単離された細胞」とは、インビボ組織または器官から得られ、細胞外基質を実質的に含まない細胞を指す。

【 0 2 3 0 】

ポリペプチドは、「ポリペプチドバリエーション」を含む。ポリペプチドバリエーションは、1つ以上の置換、欠失、付加、及び/または挿入において天然起源のポリペプチドと異なり得る。そのようなバリエーションは、天然起源であっても、または、例えば、上記のポリペプチド配列のうちの 1 つ以上を改変することによって合成的に生成されてもよい。例えば、特定の実施形態において、1つ以上の置換、欠失、付加、及び/または挿入を、C A R ポリペプチドの結合ドメイン、ヒンジ、T M ドメイン、共刺激シグナル伝達ドメイン、または一次シグナル伝達ドメインに導入することによって、C A R の結合親和性及び/または他の生物学的特性を改善させることが望ましい場合がある。特定の実施形態において、ポリペプチドは、典型的にはバリエーションが参照配列の少なくとも 1 つの生物活性を維持する場合、本明細書において想定される参照配列のいずれかに対して少なくとも約 6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、8

10

20

30

40

50

6 %、97 %、98 %、または99 %のアミノ酸同一性を有するポリペプチドを含む。

【0231】

ポリペプチドは、「ポリペプチド断片」を含む。ポリペプチド断片は、天然起源または組換え産生のポリペプチドのアミノ末端欠失、カルボキシル末端欠失、及び/または内部欠失もしくは置換を有する、単量体であっても多量体であってもよいポリペプチドを指す。ある特定の実施形態において、ポリペプチド断片は、少なくとも5～約500アミノ酸長のアミノ酸鎖を含み得る。ある特定の実施形態において、断片が、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400、または450アミノ酸長であることは理解されよう。特に有用なポリペプチド断片は、抗体の抗原結合ドメインまたは断片を含む機能性ドメインを含む。抗STn抗体の場合、有用な断片としては、CDR領域、重鎖または軽鎖のCDR3領域、重鎖または軽鎖の可変領域、2つのCDRを含む抗体鎖または可変領域の一部分などが挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0232】

ポリペプチドは、ポリペプチド(例えば、ポリ-His)の合成、精製、もしくは特定を容易にするため、または固体担体へのポリペプチドの結合を増強するために、インフレームで融合されるか、またはリンカーもしくは他の配列に接合されてもよい。

20

【0233】

上述のように、ポリペプチドは、アミノ酸置換、欠失、短縮化、及び挿入を含む様々な方法で変更され得る。そのような操作の方法は、当該技術分野で一般的に知られている。例えば、参照ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションは、DNAの変異によって調製され得る。変異誘発及びヌクレオチド配列変更のための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Kunkel(1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:488-492)、Kunkel et al., (1987, Methods in Enzymol, 154:367-382)、米国特許第4,873,192号、Watson, J.D. et al., (Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987)、及びこれらの文献中に引用される参考文献を参照されたい。目的のタンパク質の生物活性に影響しない適切なアミノ酸置換に関する指針は、Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)のモデルに見出すことができる。

30

【0234】

ある特定の実施形態において、ポリペプチド変異体は、1つ以上の保存的置換を含む。「保存的置換」とは、ポリペプチドの二次構造及び疎水性/親水性(hydrophobic nature)が実質的に変化しないことをペプチド化学分野における当業者が予想するような、アミノ酸が同様の特性を有する別のアミノ酸に置換されるものである。特定の実施形態で想定されるポリヌクレオチド及びポリペプチドの構造に改変を行いながらも、望ましい特性を有するバリエーションまたは誘導体のポリペプチドをコードする機能分子を得ることができる。同等の、またはさらには改善されたバリエーションポリペプチドを作り出すために、ポリペプチドのアミノ酸配列を変更することが所望される場合、当業者は、例として、例えば表1によるコードDNA配列のコドンのうちの1つ以上を変化させることができる。

40

【表 1】

表1ーアミノ酸コドン

アミノ酸	1文字 コード	3文字コ ード	コドン				
アラニン	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU	
システイン	C	Cys	UGC	UGU			
アスパラギン 酸	D	Asp	GAC	GAU			
グルタミン酸	E	Glu	GAA	GAG			
フェニルアラニ ン	F	Phe	UUC	UUU			
グリシン	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU	
ヒスチジン	H	His	CAC	CAU			
イソロイシン	I	Iso	AUA	AUC	AUU		
リジン	K	Lys	AAA	AAG			
ロイシン	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG
メチオニン	M	Met	AUG				
アスパラギン	N	Asn	AAC	AAU			
プロリン	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU	
グルタミン	Q	Gln	CAA	CAG			
アルギニン	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG
セリン	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG
スレオニン	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU	
バリン	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU	
トリプトファン	W	Trp	UGG				
チロシン	Y	Tyr	UAC	UAU			

【 0 2 3 5 】

生物活性を消失することなく置換、挿入、または欠失させることのできるアミノ酸残基がどれかを決定する指針は、当該技術分野で周知のコンピュータプログラム、例えばDNA STAR、DNA Strider、Geneious、Mac Vector、またはVector NTIソフトウェアなどを使用して見出すことができる。好ましくは、本明細書に開示されるタンパク質バリエーションのアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち、同様に荷電したアミノ酸または非荷電のアミノ酸の置換である。保存的アミノ酸変化は、側鎖が関連しているアミノ酸のファミリーのうちの1つの置換を伴う。天然起源のアミノ酸は一般に、酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性アミノ酸（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、及び非荷電極性アミノ酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン）の4つのファミリーに分類される。フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンは、一緒に芳香族アミノ酸として分類されることがある。ペプチドまたはタンパク質において、アミノ酸の好適な保存的置換は当業者に知られており、一般に、得られる分子の生物活性を変更することなく作製することができる。概して、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換が生物活性を実質的に変更しないことを、当業者

は認識している（例えば、Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224を参照されたい）。

【0236】

そのような変更を行う際、アミノ酸の疎水性親水性指標が考慮される場合がある。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与するアミノ酸の疎水性親水性指標の重要性は、当該技術分野において一般的に理解されている（参照により本明細書に組み込まれる Kyte and Doolittle, 1982）。各アミノ酸には、その疎水性及び電荷特性に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられている（Kyte and Doolittle, 1982）。それらの値は、イソロイシン（+4.5）、バリン（+4.2）、ロイシン（+3.8）、フェニルアラニン（+2.8）、システイン/システイン（+2.5）、メチオニン（+1.9）、アラニン（+1.8）、グリシン（-0.4）、スレオニン（-0.7）、セリン（-0.8）、トリプトファン（-0.9）、チロシン（-1.3）、プロリン（-1.6）、ヒスチジン（-3.2）、グルタミン酸（-3.5）、グルタミン（-3.5）、アスパラギン酸（-3.5）、アスパラギン（-3.5）、リジン（-3.9）、及びアルギニン（-4.5）である。

10

【0237】

ある特定のアミノ酸を同様の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸で置き換え、依然として同様の生物活性を有するタンパク質をもたらすこと、すなわち、依然として生物学機能的に同等のタンパク質を得ることができることは、当該技術分野で知られている。そのような変更を行う際、疎水性親水性指標が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、±0.5以内であるものがさらにより特に好ましい。親水性に基づいて同様のアミノ酸の置換が効果的に行われ得ることも、当該技術分野では理解されている。

20

【0238】

米国特許第4,554,101号に詳述されているように、次の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）、リジン（+3.0）、アスパラギン酸（+3.0±1）、グルタミン酸（+3.0±1）、セリン（+0.3）、アスパラギン（+0.2）、グルタミン（+0.2）、グリシン（0）、スレオニン（-0.4）、プロリン（-0.5±1）、アラニン（-0.5）、ヒスチジン（-0.5）、システイン（-1.0）、メチオニン（-1.3）、バリン（-1.5）、ロイシン（-1.8）、イソロイシン（-1.8）、チロシン（-2.3）、フェニルアラニン（-2.5）、トリプトファン（-3.4）。アミノ酸を同様の親水性値を有する別のものに置換し、依然として生物学的に同等な、特に免疫学的に同等なタンパク質を得ることができることが理解されている。そのような変化において、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、±0.5以内であるものがさらにより特に好ましい。

30

【0239】

上記に概説したように、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズに基づいてもよい。

40

【0240】

ポリペプチドバリエーションは、グリコシル化形態、他の分子との凝集接合体、及び無関係の化学部分との共有結合接合体（例えば、PEG化分子）をさらに含む。共有結合バリエーションは、当該技術分野で知られているように、アミノ酸鎖内またはN末端もしくはC末端の残基に見出される基に官能基を連結することによって調製することができる。バリエーションには、対立遺伝子バリエーション、種バリエーション、及びムテインも含まれる。タンパク質の機能活性に影響しない領域の短縮化または欠失もまたバリエーションである。

【0241】

一実施形態において、2つ以上のポリペプチドの発現が所望される場合、それらをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書の他の箇所で詳解されるように、IRES配列

50

によって分離され得る。別の実施形態では、2つ以上のポリペプチドが、1つ以上の自己切断型ポリペプチド配列を含む融合タンパク質として発現し得る。

【0242】

特定の実施形態で想定されるポリペプチドは、融合ポリペプチドを含む。好ましい実施形態では、融合ポリペプチド、及び融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば、CARが提供される。融合ポリペプチド及び融合タンパク質とは、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のポリペプチドセグメントを有するポリペプチドを指す。融合ポリペプチドは通常C末端とN末端で連結しているが、それらは、C末端とC末端、N末端とN末端、またはN末端とC末端で連結していてもよい。融合タンパク質のポリペプチドは、任意の順序であっても指定の順序であってよい。融合ポリペプチドまたは融合タンパク質は、融合ポリペプチドの所望の転写活性が保存される限り、保存的に改変されたバリエーション、多形性バリエーション、対立遺伝子、変異体、サブ配列、及び種間相同体も含み得る。融合ポリペプチドは、化学合成法もしくは2つの部分間の化学結合によって産生されてもよいし、概して他の標準的技術を使用して調製されてもよい。融合ポリペプチドを含む連結されたDNA配列は、本明細書の他の箇所で詳解される好適な転写または翻訳の制御エレメントに作動可能に連結される。

10

【0243】

一実施形態において、融合パートナーは、未変性組換えタンパク質よりも高い収率でのタンパク質の発現を補助する配列（発現エンハンサー）を含む。他の融合パートナーが、タンパク質の溶解度を増加させるように、タンパク質を所望の細胞内区画に標的化することを可能にするように、または細胞膜を通した融合タンパク質の輸送を促進するように選択されてもよい。

20

【0244】

融合ポリペプチドは、本明細書に記載されるポリペプチドドメインの各々の間にポリペプチド切断シグナルをさらに含んでもよい。加えて、ポリペプチド切断部位は、任意のリンカーペプチド配列に入れることができる。例示的なポリペプチド切断シグナルとしては、プロテアーゼ切断部位、ヌクレアーゼ切断部位（例えば、稀な制限酵素認識部位、自己切断型リボザイム認識部位）、及び自己切断型ウイルスオリゴペプチドなどのポリペプチド切断認識部位が挙げられる（de Felipe and Ryan, 2004. Traffic, 5(8); 616-26を参照されたい）。

30

【0245】

好適なプロテアーゼ切断部位及び自己切断型ペプチドは当業者に知られている（例えば、Ryan et al., 1997. J. Gener. Virol. 78, 699-722、Scymczak et al. (2004) Nature Biotech. 5, 589-594を参照されたい）。例示的なプロテアーゼ切断部位としては、ポティウイルスNIaプロテアーゼ、（例えば、タバコエッチウイルスプロテアーゼ）、ポティウイルスHCプロテアーゼ、ポティウイルスP1(P35)プロテアーゼ、ピオウイルス(byo virus) NIaプロテアーゼ、ピオウイルスRNA-2コードプロテアーゼ、アフトウイルスLプロテアーゼ、エンテロウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス2Aプロテアーゼ、ピコルナ3Cプロテアーゼ、コモウイルス24Kプロテアーゼ、ネボウイルス24Kプロテアーゼ、RTSV（インテグロ球状ウイルス）3C様プロテアーゼ、PYVF（パースニップ黄斑ウイルス）3C様プロテアーゼ、ヘパリン、トロンビン、第Xa因子、及びエンテロキナーゼの切断部位が挙げられるが、それらに限定されない。その高い切断厳密性により、TEV（タバコエッチウイルス）プロテアーゼ切断部位、例えば、EXXYXQ(G/S)（配列番号39）、例えば、ENLYFQG（配列番号40）及びENLYFQS（配列番号41）（ここで、Xは、任意のアミノ酸を表す）（TEVによる切断はQとGとの間またはQとSとの間で生じる）が一実施形態において好ましい。

40

【0246】

特定の実施形態において、自己切断型ペプチドは、ポティウイルス及びカルジオウイル

50

ス2Aペプチド、FMDV（口蹄疫ウイルス）、ウマ鼻炎Aウイルス、Thosea asignaウイルス、ならびにブタテッシュウイルスから得られるポリペプチド配列を含む。

【0247】

ある特定の実施形態において、自己切断型ポリペプチド部位は、2Aもしくは2A様の部位、配列、またはドメインを含む（Donnelly et al., 2001, J. Gen. Virol. 82: 1027-1041）。例示的な2A部位を表2に示す。

【表2】

表2:

配列番号42	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号43	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号44	LLKLAGDVESNPGP
配列番号45	NFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号46	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号47	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号48	VTELLYRMKRAETCYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
配列番号49	LNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号50	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
配列番号51	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

10

20

【0248】

好ましい実施形態では、ポリペプチドは、CARポリペプチドを含む。

【0249】

E. ポリヌクレオチド

好ましい実施形態では、1つ以上のCARポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、メッセンジャーRNA（mRNA）、RNA、ゲノムRNA（gRNA）、プラス鎖RNA（RNA（+））、マイナス鎖RNA（RNA（-））、ゲノムDNA（gDNA）、相補DNA（cDNA）、または組換えDNAを指す。ポリヌクレオチドは、一本鎖及び二本鎖のポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書において想定される参照配列のいずれかに対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、86%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリヌクレオチドまたはバリエーションを含む。様々な例証となる実施形態において、ポリヌクレオチドは、発現ベクター、ウイルスベクター、及び移入プラスミド、ならびにそれらを含む組成物及び細胞を含む。様々な例証となる実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号1～51に記載のポリペプチド配列を含むがそれらに限定されない本明細書において想定されるポリペプチドをコードする。

30

40

【0250】

特定の実施形態において、ポリペプチドの少なくとも約5個、10個、25個、50個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、500個、1000個、1250個、1500個、1750個、もしくは2000個、またはそれ以上、ならびに全ての中間の長さの隣接アミノ酸残基をコードするポリヌクレオチドが提供される。この文脈における「中間の長さ」が、引用された値の間の任意の長さ、例えば6、7、8、9など、101、102、103など、151、152、153など、20

50

1、202、203などを意味することは、容易に理解されるであろう。

【0251】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチドバリエーション」及び「バリエーション」などの用語は、参照ポリヌクレオチド配列と実質的な配列同一性を示すポリヌクレオチド、または下文に定義されるストリンジェントな条件下で参照配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドを指す。これらの用語には、参照ポリヌクレオチドと比較して、1つ以上のヌクレオチドが付加されているか、もしくは欠失しているか、または異なるヌクレオチドに置き換えられているポリヌクレオチドが含まれる。この点において、変更されたポリヌクレオチドが参照ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性を保持するような、変異、付加、欠失、及び置換を含むある特定の変更を参照ポリヌクレオチドに行うことができることは、当該技術分野で十分に理解されている。

10

【0252】

本明細書で使用される「配列同一性」または例えば「に対して50%同一の配列」を含む記述は、配列が比較枠にわたってヌクレオチド単位基準またはアミノ酸単位基準で同一である程度を指す。したがって、「配列同一性の割合」は、比較枠にわたって2つの最適にアライメントされた配列を比較し、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、及びMet）が両方の配列で生じる位置数を決定して対応位置数を得、対応位置数を比較枠内の位置の総数（すなわち、枠のサイズ）で除し、その結果に100を乗じて配列同一性の割合を得ることによって計算され得る。典型的にはポリペプチドバリエーションが参照ポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を維持する場合、本明細書に記載される参照配列のいずれかに対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、86%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するヌクレオチド及びポリペプチドが含まれる。

20

【0253】

2つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の配列関係を説明するために使用される用語は、「参照配列」、「比較枠」、「配列同一性」、「配列同一性の割合」、及び「実質的な同一性」を含む。「参照配列」は、ヌクレオチド及びアミノ酸残基を含めて、長さが少なくとも12だがしばしば15~18であり、多くの場合少なくとも25の単量体単位である。2つのポリヌクレオチドは各々、(1)2つのポリヌクレオチド間で類似する配列（すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部分のみ）、及び(2)2つのポリヌクレオチド間で相違する配列を含み得るため、2つ（またはそれ以上）のポリヌクレオチド間の配列比較は通常、2つのポリヌクレオチドの配列を「比較枠」にわたって比較して、配列類似性のある局所的な領域を特定し比較することによって行われる。「比較枠」は、2つの配列が最適にアライメントされた後に、ある配列が、同数の隣接位置をもつ参照配列と比較される、少なくとも6個、一般的には約50~約100個、より一般的には約100~約150個の隣接位置の概念的なセグメントを指す。比較枠は、2つの配列の最適なアライメントのために参照配列（これは付加または欠失を含まない）と比較した場合に約20%以下の付加または欠失（すなわちギャップ）を含み得る。比較枠をアライメントするための配列の最適なアライメントは、コンピュータ化されたアルゴリズムの実装（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0のGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA、Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA）によって、または検査及び選択された様々な方法のいずれかにより生成された最良のアライメント（すなわち、比較枠にわたって最高率の相同性をもたらすもの）によって実施され得る。例えば、Altschul et al., 19

30

40

50

97, *Nucleic Acids Res.* 25:3389によって開示されるBLASTファミリーのプログラムも参照することができる。配列分析の詳細な説明は、Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15のユニット19.3に見出すことができる。

【0254】

本明細書で使用される場合、「単離されたポリヌクレオチド」は、天然起源の状態でそれに隣接する配列から精製されたポリヌクレオチド、例えば、断片に通常隣接する配列から取り除かれたDNA断片を指す。「単離されたポリヌクレオチド」は、相補DNA (cDNA)、組換えDNA、または自然界に存在せず、人の手によって作製された他のポリヌクレオチドも指す。

10

【0255】

ポリヌクレオチドの配向を説明する用語は、5' (通常、遊離リン酸基を有するポリヌクレオチドの末端) 及び3' (通常、遊離ヒドロキシル(OH)基を有するポリヌクレオチドの末端) を含む。ポリヌクレオチド配列は、5' から3' への配向または3' から5' への配向と注記され得る。DNA及びmRNAについては、5' から3' の鎖は、その配列がプレメッセンジャー (pre-mRNA) の配列と同一であるため [DNAのチミン(T)の代わりにRNAのウラシル(U)を除く]、「センス」鎖、「プラス」鎖、または「コード」鎖と呼称される。DNA及びmRNAでは、RNAポリメラーゼにより転写される鎖である相補的な3' から5' の鎖は、「鋳型」鎖、「アンチセンス」鎖、「マイナス」鎖、または「非コード」鎖と呼称される。本明細書で使用される場合、「逆配向」という用語は、5' から3' の配列が3' から5' の配向で書かれたもの、または3' から5' の配列が5' から3' の配向で書かれたものを指す。

20

【0256】

「相補的」及び「相補性」という用語は、塩基対合規則によって関係が表されるポリヌクレオチド (すなわち、ヌクレオチドの配列) を指す。例えば、DNA配列5' AGTCATG 3' の相補鎖は、3' TCAGTAC 5' である。後者の配列は、左側に5' 末端、そして右側に3' 末端の逆相補体、すなわち5' CATGACT 3' として書かれることが多い。その逆相補体と等しい配列は、パリンδροーム配列と言われる。相補性は、核酸の塩基の一部のみが塩基対合規則に従って一致する「部分的」なものであり得る。または、核酸間で「完全」相補性もしくは「全」相補性が存在し得る。

30

【0257】

さらに、本明細書に記載されるように、遺伝コードの縮重の結果として、ポリペプチドまたはそのバリエーションの断片をコードする多くのヌクレオチド配列が存在することは、当業者には理解されよう。これらのポリヌクレオチドのいくつかは、いずれの未変性遺伝子のヌクレオチド配列に対しても最小の相同性を有する。とはいえ、コドン利用の差により異なるポリヌクレオチド、例えばヒト及び/または霊長類のコドン選択のために最適化されるポリヌクレオチドは、特定の実施形態において特に想定される。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、発現及び/または安定性のためにコドン最適化されている。さらに、本明細書に提供されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子も使用され得る。対立遺伝子は、ヌクレオチドの欠失、付加、及び/または置換などの1つ以上の変異の結果として変更されている内在性遺伝子である。

40

【0258】

本明細書で使用される「核酸カセット」という用語は、RNA、そして後にタンパク質を発現することのできるベクター内の遺伝子配列を指す。核酸カセットは、目的の遺伝子、例えばCARを含む。核酸カセットは、カセット内の核酸がRNAに転写され、必要に応じてタンパク質またはポリペプチドに翻訳され、形質転換細胞における活性に必要とされる適切な翻訳後修飾を受け、適切な細胞内区画への標的化または細胞外区画への分泌によって生物活性のために適切な区画に転位され得るように、ベクター内に位置的かつ順次的に配向される。好ましくは、カセットは、その3' 末端及び5' 末端が、ベクターに

50

容易に挿入できるように適合されており、例えば、各末端に制限エンドヌクレアーゼ部位を有する。好ましい実施形態では、核酸カセットは、S T n 結合糖タンパク質、例えば T A G - 7 2 を発現するがん細胞の細胞傷害性を増加させるために使用されるキメラ抗原受容体の配列を含む。カセットは、除去され、単一単位としてプラスミドまたはウイルスベクターに挿入され得る。

【 0 2 5 9 】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの目的のポリヌクレオチドを含む。本明細書で使用される場合、「目的のポリヌクレオチド」という用語は、発現が所望される発現ベクターに挿入された、ポリペプチド（すなわち、目的のポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドを指す。ベクターは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の目的のポリヌクレオチドを含み得る。ある特定の実施形態において、目的のポリヌクレオチドは、疾患もしくは障害の治療または防止において治療効果をもたらすポリペプチドをコードする。目的のポリヌクレオチド及びそれからコードされるポリペプチドは、野生型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにその機能的バリエーション及び断片の両方を含む。特定の実施形態において、機能的バリエーションは、対応する野生型参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の同一性を有する。ある特定の実施形態において、機能的バリエーションまたは断片は、対応する野生型ポリペプチドの少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%の生物活性を有する。

【 0 2 6 0 】

一実施形態において、目的のポリヌクレオチドは、miRNA、siRNAもしくはshRNA、リボザイム、または他の阻害性RNAを転写するための鋳型である。様々な他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、CARをコードする目的のポリヌクレオチド、ならびに、siRNA、miRNA、shRNA、及びリボザイムを含むがそれらに限定されない阻害性核酸配列を含むがそれに限定されない、1つ以上の付加的な目的のポリヌクレオチドを含む。

【 0 2 6 1 】

本明細書で使用される場合、「siRNA」または「低分子干渉RNA (short interfering RNA)」という用語は、動物における配列特異的転写後遺伝子サイレンシング、翻訳阻害、転写阻害、またはエピジェネティックRNAiのプロセスを媒介する短いポリヌクレオチド配列を指す (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Fire et al., 1998, Nature, 391, 806; Hamilton et al., 1999, Science, 286, 950-951; Lin et al., 1999, Nature, 402, 128-129; Sharp, 1999, Genes & Dev., 13, 139-141; 及び Strauss, 1999, Science, 286, 886)。ある特定の実施形態において、siRNAは、同じ数のヌクレオチドを有する第1の鎖及び第2の鎖を含むが、第1及び第2の鎖は、第1及び第2の鎖上の2つの末端ヌクレオチドが相補鎖上の残基と対合しないようにオフセットである。ある特定の事例において、対合しない2つのヌクレオチドは、チミン残基である。siRNAは、siRNAまたはその断片が標的遺伝子の下方制御を媒介し得るように、標的遺伝子に対して十分な相同性のある領域を含み、かつヌクレオチド単位で十分な長さであるべきである。したがって、siRNAは、標的RNAに対して少なくとも部分的に相補的である領域を含む。siRNAと標的との間に完全な相補性が存在する必要はないが、その対応関係は、siRNAまたはその切断産物が標的RNAのRNAi切断などにより配列特異的サイレンシングを指向できるように、十分である必要がある。標的鎖との相補性すなわち相同性の程度は、アンチセンス鎖で最も重要である。完全な相補性は特にアンチセンス鎖において所望されるが、いくつかの実施形態は、標的RNAに対して、1個以上だが好ましくは10個、8個、6個、5個、4個、3個、2個、またはそれ以下のミスマッチを含む。ミスマッチは末端領域において最も

許容され、存在する場合、例えば5'末端及び/もしくは3'末端の6、5、4、または3ヌクレオチド以内の末端領域(複数可)にあることが好ましい。センス鎖は、分子の全体的な二本鎖の特徴を維持するのに十分にアンチセンス鎖と相補的であれば十分である。

【0262】

加えて、siRNAは、改変されても、またはヌクレオシド類似体を含んでもよい。siRNAの一本鎖領域は、改変されても、またはヌクレオシド類似体を含んでもよく、例えば、ヘアピン構造の不對領域(複数可)、例えば、2つの相補領域を連結する領域は、改変またはヌクレオシド類似体を有し得る。siRNAの1つ以上の3'末端もしくは5'末端を、例えばエキソヌクレアーゼに対して安定化させるため、またはRISCに侵入するようにアンチセンスsiRNA剤を優先するための改変も有用である。改変は、C3(またはC6、C7、C12)アミノリンカー、チオールリンカー、カルボキシルリンカー、非ヌクレオチドスパーサー(C3、C6、C9、C12、脱塩基、トリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール)、特殊なビオチン、または、ホスホラミダイトをもたらす、かつ別のDMT保護されたヒドロキシル基を有し、RNA合成中に複数のカップリングを可能にするフルオレセイン試薬を含み得る。siRNAの各鎖は、30、25、24、23、22、21、または20ヌクレオチド長以下であり得る。この鎖は、好ましくは少なくとも19ヌクレオチド長である。例えば、各鎖は、21~25ヌクレオチド長であり得る。好ましいsiRNAは、17個、18個、19個、29個、21個、22個、23個、24個、または25個のヌクレオチド対の二本鎖領域、及び2~3ヌクレオチドの1つ以上のオーバーハング、好ましくは2~3ヌクレオチドの1つまたは2つの3'オーバーハングを有する。

【0263】

本明細書で使用される場合、「miRNA」または「マイクロRNA」という用語は、通常はpre-miRNAとして知られる約70ヌクレオチドのフォールドバック(fold back)RNA前駆体構造から切除された、20~22ヌクレオチドの小さな非コードRNAを指す。miRNAは、miRNAと標的との間の相補性の程度に応じて、2つの方法のうちの1つでそれらの標的を負に調節する。第1に、タンパク質コードmRNA配列に完全またはほぼ完全な相補性で結合するmiRNAは、RNA媒介干渉(RNAi)経路を誘導する。mRNA標的の3'非翻訳領域(UTR)内の不完全相補部位に結合することによって調節作用を及ぼすmiRNAは、RNAi経路に使用されるものと同様または場合により同一であるRISC複合体を通して、転写後に、見かけ上は翻訳のレベルで、標的遺伝子発現を抑制する。翻訳制御と一致して、この機序を使用するmiRNAは、それらの標的遺伝子のタンパク質レベルを低下させるが、これらの遺伝子のmRNAレベルは、最小限の影響しか受けない。miRNAは、天然起源のmiRNA、ならびに任意のmRNA配列を特異的に標的化し得る人工的に設計されたmiRNAの両方を包含する。例えば、一実施形態において、当業者は、ヒトmiRNA(例えば、miR-30またはmiR-21)一次転写物として発現する短いヘアピンRNA構築物を設計することができる。この設計は、ヘアピン構築物にドロージャプロセシング部位を付加するのであり、ノックダウン効率を大幅に増加させることが示されている(Pusch et al., 2004)。このヘアピンのステムは、22-ntのdsRNA(例えば、アンチセンスは所望の標的に対して完全な相補性を有する)及びヒトmiR由来の15-19-ntのループからなる。ヘアピンの片側または両側にmiRループ及びmiR30フランキンク配列を付加すると、発現したヘアピンのドロージャ及びダイサープロセシングにおいて、マイクロRNAを含まない従来のshRNA設計と比較したときに10倍超の増加がもたらされる。ドロージャ及びダイサープロセシングの増加は、siRNA/miRNA産生の増加、及び発現したヘアピンの効力の増加につながる。

【0264】

本明細書で使用される場合、「shRNA」または「短いヘアピンRNA」という用語は、単一の自己相補的RNA鎖によって形成される二本鎖構造を指す。標的遺伝子のコード配列または非コード配列のいずれかの一部分と同一のヌクレオチド配列を含むshRN

A構築物は、阻害のために好ましい。標的配列に対して挿入、欠失、及び一点変異を有するRNA配列も、阻害に有効であることが見出されている。阻害性RNAと標的遺伝子の一部分との間で90%超の配列同一性、またはさらには100%の配列同一性が好ましい。ある特定の好ましい実施形態では、shRNAの二本鎖形成部分の長さは、例えば、ダイサー依存切断により産生されたRNA産物と相当するサイズの、少なくとも20、21、または22ヌクレオチド長である。ある特定の実施形態において、shRNA構築物は、少なくとも25、50、100、200、300または400塩基長である。ある特定の実施形態において、shRNA構築物は、400～800塩基長である。shRNA構築物は、ループ配列及びループサイズの変化に対する耐性が高い。

【0265】

本明細書で使用される場合、「リボザイム」という用語は、標的mRNAの部位特異的切断が可能な触媒的に活性なRNA分子を指す。例えば、ハンマーヘッド型及びヘアピン型のリボザイムといった、いくつかのサブタイプが説明されている。リボザイムの触媒活性及び安定性は、非触媒性塩基でデオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドに置換することによって改善させることができる。部位特異的認識配列でmRNAを切断するリボザイムを使用して特定のmRNAを破壊することができるが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的塩基対を形成するフランキング領域によって決められた位置でmRNAを切断する。唯一の要件は、2つの塩基の配列：5'-UG-3'を標的mRNAが有することである。ハンマーヘッド型リボザイムの構築及び産生は、当該技術分野で周知である。

【0266】

siRNA、miRNA、shRNA、またはリボザイムを含む目的のポリヌクレオチドの好ましい送達方法は、例えば、本明細書の他の箇所に記載される、強力な構成的pol III、例えば、ヒトU6 snRNAプロモーター、マウスU6 snRNAプロモーター、ヒト及びマウスH1 RNAプロモーター、ならびにヒトtRNA-valプロモーター、または強力な構成的pol IIプロモーターといった、1つ以上の調節配列を含む。

【0267】

本明細書において想定されるポリヌクレオチドは、コード配列自体の長さにかかわらず、本明細書の他の箇所に開示されるか当該技術分野で知られている、プロモーター及び/またはエンハンサー、非翻訳領域(UTR)、シグナル配列、コザック配列、ポリアデニル化シグナル、付加的な制限酵素部位、多重クロニング部位、内部リボソーム侵入部位(IRES)、リコンビナーゼ認識部位(例えば、LoxP、FRT、及びAtt部位)、終止コドン、転写終結シグナル、及び自己切断型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、エピトープタグなどの他のDNA配列と組み合わせられてもよく、その結果、それらの全体的な長さが大幅に変動してもよい。したがって、ほぼあらゆる長さのポリヌクレオチド断片が用いられ得ることが想定され、その全長は、好ましくは、意図される組換えDNAプロトコルにおける調製及び使用の容易さにより限定される。

【0268】

ポリヌクレオチドは、当該技術分野で知られており利用可能である十分に確立された種々の技術のいずれを使用して、調製、操作、かつ/または発現してもよい。所望のポリペプチドを発現するために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を適切なベクターに挿入してもよい。

【0269】

ベクターの例は、プラスミド、自己複製配列、及び転位因子である。付加的な例示的なベクターとしては、限定されないが、プラスミド、ファージミド、コスミド、トランスポゾン、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、またはP1由来人工染色体(PAC)などの人工染色体、ラムダファージまたはM13ファージなどのバクテリオファージ、及び動物ウイルスが挙げられる。ベクターとして有用な動物ウイルスのカテゴリーの例としては、限定されないが、レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、アデノ

10

20

30

40

50

ウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、及びパポバウイルス（例えば、SV40）が挙げられる。発現ベクターの例は、哺乳動物細胞における発現のためのpC1neoベクター（Promega）、哺乳動物細胞におけるレンチウイルス媒介性遺伝子移入及び発現のためのpLenti4/V5-DEST（商標）、pLenti6/V5-DEST（商標）、及びpLenti6.2/V5-GW/lacZ（Invitrogen）である。特定の実施形態において、本明細書に開示されるキメラタンパク質のコード配列が、哺乳動物細胞におけるキメラタンパク質の発現のために、このような発現ベクターに連結され得る。

【0270】

特定の実施形態において、ベクターは、エピソームベクターまたは染色体外で維持されるベクターを含むがそれらに限定されない非組み込みベクターである。本明細書で使用される場合、「エピソーム」という用語は、宿主の染色体DNAに組み込まれることなく、かつ分裂する宿主細胞から徐々に失われることなく複製することのできるベクターを指し、また、該ベクターが染色体外またはエピソームで複製することも意味する。ベクターは、リンパ増殖性ヘルペスウイルスもしくはガンマヘルペスウイルス、アデノウイルス、SV40、ウシパピローマウイルス、または酵母由来のDNA複製起源、特にEBVのoriPに対応するリンパ増殖性ヘルペスウイルスまたはガンマヘルペスウイルスの複製起源をコードする配列すなわち「ori」を保有するように操作される。特定の実施形態では、リンパ増殖性ヘルペスウイルスは、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、カポジ肉腫ヘルペスウイルス（KSHV）、ヘルペスウイルスサイミリ（HS）、またはマレック病ウイルス（MDV）であり得る。エプスタイン・バーウイルス（EBV）及びカポジ肉腫ヘルペスウイルス（KSHV）は、ガンマヘルペスウイルスの例でもある。通常、宿主細胞は、複製を活性化するウイルス複製トランス活性化因子タンパク質を含む。

【0271】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、トランスポゾンベクター系を使用して標的または宿主細胞に導入される。ある特定の実施形態において、トランスポゾンベクター系は、本明細書において想定される転位因子及びポリヌクレオチドを含むベクター、ならびにトランスポサゼを含む。一実施形態において、トランスポゾンベクター系は、単一トランスポサゼベクター系である。例えば、国際出願第PCT/US07/18922号を参照されたい。例示的なトランスポサゼとしては、piggyBac、Sleeping Beauty、Mos1、Tc1/マリナー、Tol2、mini-Tol2、Tc3、MuA、Himar I、Frog Prince、及びそれらの誘導体が挙げられるが、それらに限定されない。piggyBacトランスポゾン及びトランスポサゼは、例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,962,810号に記載されている。Sleeping Beautyトランスポゾン及びトランスポサゼは、例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれるIzsvak et al., J. Mol. Biol. 302: 93-102 (2000)に記載されている。メダカ（Oryzias latipes）から最初に単離され、トランスポゾンのhATファミリーに属するTol2トランスポゾンは、Kawakami et al. (2000)に記載されている。Mini-Tol2は、Tol2のバリエーションであり、Balcunas et al. (2006)に記載されている。Tol2及びMini-Tol2トランスポゾンは、Tol2トランスポサゼと同時作用（co-act）するとき、生物のゲノムへの導入遺伝子の組み込みを促進する。Frog Princeトランスポゾン及びトランスポサゼは、例えば、Miskey et al., Nucleic Acids Res. 31: 6873-6881 (2003)に記載されている。

【0272】

発現ベクター内に存在する「制御エレメント」または「調節配列」は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写及び翻訳を行う、ベクター複製起源の非翻訳領域、選択カセット、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル（シャイン・ダルガーノ配列またはコ

10

20

30

40

50

ザック配列)イントロン、ポリアデニル化配列、5'及び3'非翻訳領域である。そのようなエレメントは、それらの強度及び特異性が異なり得る。用いられるベクター系及び宿主に応じて、遍在性プロモーター及び誘導性プロモーターを含めた任意の数の好適な転写エレメント及び翻訳エレメントを使用することができる。

【0273】

特定の実施形態において、ベクターは発現ベクターを含むがそれに限定されず、ウイルスベクターは、プロモーター及び/またはエンハンサーなどの外因性、内因性、もしくは異種の制御配列を含む。「内因性」制御配列は、ゲノム内の所与の遺伝子と自然に連結しているものである。「外因性」制御配列は、遺伝子操作の手段(すなわち、分子生物学的技術)によってある遺伝子と並立に配置され、その遺伝子の転写が連結されたエンハンサー/プロモーターによって指向されるようなものである。「異種」制御配列は、遺伝子操作されている細胞とは異なる種に由来する外因性配列である。

10

【0274】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、RNAポリメラーゼが結合するポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)の認識部位を指す。RNAポリメラーゼは、プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを開始及び転写する。特定の実施形態において、哺乳動物細胞において作動可能なプロモーターは、転写が開始される部位からおよそ25~30塩基上流に位置するATリッチ領域、及び/または、転写の開始から70~80塩基上流に見出される別の配列、CNCAAT領域(ここで、Nは任意のヌクレオチドであり得る)を含む。

20

【0275】

「エンハンサー」という用語は、転写を増強することができ、いくつかの事例では別の制御配列に対するそれらの配向に関係なく機能することができる配列を含むDNAのセグメントを指す。エンハンサーは、プロモーター及び/または他のエンハンサーエレメントと協働的または相加的に機能することができる。「プロモーター/エンハンサー」という用語は、プロモーター機能とエンハンサー機能との両方を提供することのできる配列を含むDNAのセグメントを指す。

【0276】

「作動可能に連結される」という用語は、説明されている成分がそれらの意図される様式で機能することを可能にする関係にある並立を指す。一実施形態において、この用語は、核酸発現制御配列(例えばプロモーター及び/またはエンハンサーなど)と第2のポリヌクレオチド配列、例えば目的のポリヌクレオチドとの間の機能的連結を指し、ここでこの発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写を指向する。

30

【0277】

本明細書で使用される場合、「構成的発現制御配列」という用語は、作動可能に連結された配列の転写を構成的もしくは連続的に可能にするプロモーター、エンハンサー、またはプロモーター/エンハンサーを指す。構成的発現制御配列は、それぞれ、多様な細胞型及び組織型における発現を可能にする「遍在性」プロモーター、エンハンサー、もしくはプロモーター/エンハンサー、または、制限された種類の細胞型及び組織型における発現を可能にする「細胞特異的」、「細胞型特異的」、「細胞系列特異的」、もしくは「組織特異的」なプロモーター、エンハンサー、もしくはプロモーター/エンハンサーであり得る。

40

【0278】

特定の実施形態で使用するのに好適な例証となる遍在性発現制御配列としては、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、ウイルス性サルウイルス40(SV40)(例えば、初期または後期)、モロニーマウス白血病ウイルス(MoMLV)LTRプロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)LTR、単純ヘルペスウイルス(HSV)(チミジンキナーゼ)プロモーター、ワクシニアウイルス由来のH5、P7.5、及びP11プロモーター、伸長因子1アルファ(EF1a)プロモーター、初期増殖応答1(EGR1)、フェリチンH(FerH)、フェリチンL(FerL)、グリセルアルデヒド3

50

リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、真核細胞翻訳開始因子4A1 (EIF4A1)、熱ショック70kDaタンパク質5 (HSPA5)、熱ショックタンパク質90kDaベータメンバー1 (HSP90B1)、熱ショックタンパク質70kDa (HSP70)、 γ -キネシン (γ -KIN)、ヒトROSA 26遺伝子座 (Irions et al., Nature Biotechnology 25, 1477-1482 (2007))、ユビキチンCプロモーター (UBC)、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1 (PGK)プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ β -アクチン (CAG)プロモーター、 β -アクチンプロモーター、及び骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失dl587revプライマー結合部位置換 (MND)プロモーター (Challita et al., J Virol. 69 (2): 748-55 (1995))が挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0279】

一実施形態において、ベクターは、MNDプロモーターを含む。

【0280】

一実施形態において、ベクターは、ヒトEF1a遺伝子の第1イントロンを含むEF1aプロモーターを含む。

【0281】

一実施形態において、ベクターは、ヒトEF1a遺伝子の第1イントロンを欠いているEF1aプロモーターを含む。

【0282】

20

特定の実施形態において、T細胞特異的プロモーターからCARを含むポリヌクレオチドを発現することが望ましい場合がある。

【0283】

本明細書で使用される場合、「条件付き発現」は、誘導性発現、抑制性発現、特定の生理学的状態、生物学的状態、または疾患状態を有する細胞または組織における発現などを含むがそれらに限定されない、あらゆる種類の条件付き発現を指し得る。この定義は、細胞型または組織特異的な発現を除外することを意図しない。ある特定の実施形態は、目的のポリヌクレオチドの条件付き発現をもたらす。例えば、ポリヌクレオチドを発現させる処理または条件、あるいは目的のポリヌクレオチドによりコードされるポリヌクレオチドの発現を増加もしくは減少させる処理または条件に、細胞、組織、生物などを供することによって、発現が制御される。

30

【0284】

誘導性プロモーター/系の例証となる例としては、グルココルチコイドもしくはエストロゲン受容体をコードする遺伝子のプロモーターなどのステロイド誘導性プロモーター (対応するホルモンでの処理によって誘導可能)、メタロチオニン (metallothionein) プロモーター (様々な重金属での処理によって誘導可能)、MX-1プロモーター (インターフェロンによって誘導可能)、「Gene Switch」ミフェプリストン調節可能な系 (Sirin et al., 2003, Gene, 323: 67)、クミン酸誘導性遺伝子スイッチ (WO 2002/088346)、テトラサイクリン依存性調節系などが挙げられるが、それらに限定されない。

40

【0285】

条件付き発現は、部位特異的DNAリコンビナーゼを使用することによって達成することもできる。ある特定の実施形態によると、ベクターは、部位特異的リコンビナーゼにより媒介される組換えのための少なくとも1つ (典型的には2つ) の部位 (複数可) を含む。本明細書で使用される場合、「リコンビナーゼ」または「部位特異的リコンビナーゼ」という用語は、野生型タンパク質であり得る1つ以上の組換え部位 (例えば、2、3、4、5、7、10、12、15、20、30、50など) を伴う組換え反応に関与する、切除性 (excisive) もしくは組み込み (integrative) のタンパク質、酵素、補助因子、または関連するタンパク質 (Landy, Current Opinion in Biotechnology 3: 699-707 (1993)) を参照され

50

たい)、またはそれらの変異体、誘導体(例えば、組換えタンパク質配列またはその断片を含む融合タンパク質)、断片、及びバリエーションを含む。特定の実施形態で使用するのに好適なリコンビナーゼの例証となる例としては、Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、C31、Cin、Tn3リゾルパーゼ、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1、及びParAが挙げられるが、それらに限定されない。

【0286】

ベクターは、多様な部位特異的リコンビナーゼのいずれかに対して1つ以上の組換え部位を含み得る。部位特異的リコンビナーゼのための標的部位は、ベクター、例えばレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターの組み込みに必要とされる任意の部位(複数可)に加えてのものであることを理解されたい。本明細書で使用される場合、「組換え配列」、「組換え部位」、または「部位特異的組換え部位」という用語は、リコンビナーゼが認識し結合する特定の核酸配列を指す。

【0287】

例えば、Creリコンビナーゼの組換え部位の1つはloxPであり、これは、8塩基対コア配列に隣接する2つの13塩基対逆方向反復(リコンビナーゼ結合部位として機能する)を含む34塩基対配列である(Sauer, B., Current Opinion in Biotechnology 5:521-527(1994)の図1を参照されたい)。他の例示的なloxP部位としては、lox511(Hoess et al., 1996、Bethke and Sauer, 1997)、lox5171(Lee and Saito, 1998)、lox2272(Lee and Saito, 1998)、m2(Langer et al., 2002)、lox71(Albert et al., 1995)、及びlox66(Albert et al., 1995)が挙げられるが、それらに限定されない。

【0288】

FLPリコンビナーゼの好適な認識部位としては、FRT(McLeod, et al., 1996)、F₁、F₂、F₃(Schlake and Bode, 1994)、F₄、F₅(Schlake and Bode, 1994)、FRT(LE)(Senecoff et al., 1988)、FRT(RE)(Senecoff et al., 1988)が挙げられるが、それらに限定されない。

【0289】

認識配列の他の例は、リコンビナーゼ酵素 インテグラーゼ、例えばphi-c31により認識される、attB、attP、attL、及びattR配列である。C31 SSRは、ヘテロタイプ部位attB(長さ34bp)とattP(長さ39bp)との間の組換えのみを媒介する(Groth et al., 2000)。それぞれファージインテグラーゼの細菌ゲノム及びファージゲノム上の結合部位にちなんで名付けられたattB及びattPは、両方とも、C31ホモ二量体によって結合されている可能性が高い不完全な逆方向反復を含む(Groth et al., 2000)。産物部位であるattL及びattRは、C31媒介性組換えを進めるために効率的に不活性であり(Belteki et al., 2003)、反応を不可逆にする。挿入の触媒では、attBを保有するDNAが、attP部位をゲノムattB部位に挿入するよりも容易にゲノムattP部位に挿入されることが見出されている(Thyagarajan et al., 2001、Belteki et al., 2003)。したがって、典型的な方略では、attPを保有する「ドッキング部位」を相同組換えによって定義された遺伝子座に位置付け、これを次に、挿入のためにattB保有入来配列(incoming sequence)と組み合わせる。

【0290】

本明細書で使用される場合、「内部リボソーム侵入部位」すなわち「IRES」は、シストロン(タンパク質コード領域)のATGなどの開始コドンへの直接的な内部リボソーム侵入を促進し、それによって遺伝子のキャップ非依存性翻訳をもたらすエレメントを指

10

20

30

40

50

す。例えば、Jackson et al., 1990. Trends Biochem Sci 15(12): 477-83) 及び Jackson and Kaminski, 1995. RNA 1(10): 985-1000 を参照されたい。特定の実施形態において、ベクターは、1つ以上のポリペプチドをコードする1つ以上の目的のポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、複数のポリペプチドの各々の効率的な翻訳を達成するために、1つ以上のIRES配列または自己切断型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列によって、ポリヌクレオチド配列を分離することができる。

【0291】

本明細書で使用される場合、「コザック配列」という用語は、リボソームの小さなサブユニットに対するmRNAの初期結合を大幅に促進し、翻訳を増加させる、短いヌクレオチド配列を指す。コンセンサスコザック配列は、(GCC)RCCATGG (配列番号57) であり、ここでRは、プリン(AまたはG)である(Kozak, 1986. Cell 44(2): 283-92、及びKozak, 1987. Nucleic Acid Res. 15(20): 8125-48)。特定の実施形態において、ベクターは、コンセンサスコザック配列を有し、かつ所望のポリペプチド、例えばCARをコードする、ポリヌクレオチドを含む。

【0292】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを保有する細胞は、直接的な毒性及び/または未制御の増殖のリスクを低減させるために、誘導性自殺遺伝子を含む自殺遺伝子を用いる。特定の実施形態において、自殺遺伝子は、ポリヌクレオチドを保有する宿主または細胞に対して免疫原性ではない。使用され得る自殺遺伝子のある特定の例は、カスパーゼ9もしくはカスパーゼ8、またはシトシンデアミナーゼである。カスパーゼ9は、特定の化学的二量体化誘導物質(chemical inducer of dimerization、CID)を使用して活性化することができる。

【0293】

ある特定の実施形態において、ベクターは、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に、インビボで負の選択を受けやすくさせる遺伝子セグメントを含む。「負の選択」とは、注入された細胞が、個々のインビボ条件の変化の結果として排除され得ることを意味する。負の選択可能な表現型は、投与される薬剤、例えば化合物に対する感受性を付与する遺伝子の挿入から生じ得る。負の選択可能な遺伝子は当該技術分野で知られており、とりわけ、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ(HSV-I TK) 遺伝子(Wigler et al., Cell 11: 223, 1977)、細胞性ヒボキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT) 遺伝子、細胞性アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(APRT) 遺伝子、及び細菌性シトシンデアミナーゼを含む(Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 33(1992))。

【0294】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたT細胞などの免疫エフェクター細胞は、負の選択可能な表現型の細胞のインビトロでの選択を可能にする正のマーカーをさらに含むポリヌクレオチドを含む。正の選択マーカーは、宿主細胞に導入されると、その遺伝子を有する細胞の正の選択を可能にする優性表現型を発現する遺伝子であり得る。この種類の遺伝子は当該技術分野で知られており、とりわけ、ハイグロマイシンBに対する耐性を付与するハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子(hph)、抗生物質G418に対する耐性をコードするTn5由来のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neoまたはaph)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR) 遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子(ADA)、及び多剤耐性(MDR) 遺伝子を含む。

【0295】

正の選択マーカー及び負の選択可能エレメントは、負の選択可能エレメントの損失が正の選択マーカーの損失も必然的に伴うように連結されていることが好ましい。正の選択マーカー及び負の選択マーカーは、一方の損失が他方の損失に義務的につながるように融合

10

20

30

40

50

していることが、さらにより好ましい。上述される所望の正負両方の選択の特徴を付与するポリペプチドを発現産物としてもたらす融合ポリヌクレオチドの例は、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼチミジンキナーゼ融合遺伝子 (HyTK) である。この遺伝子の発現は、インビトロの正の選択ではハイグロマイシンB耐性を、そしてインビボの負の選択ではガンシクロビル感受性を付与するポリペプチドをもたらす。Lupton S. D., et al, Mol. and Cell. Biology 11:3374-3378, 1991を参照されたい。加えて、好ましい実施形態では、キメラ受容体をコードするポリヌクレオチドは、融合遺伝子、特に、インビトロの正の選択ではハイグロマイシンB耐性を、そしてインビボの負の選択ではガンシクロビル感受性を付与するものを含むレトロウイルスベクター、例えばLupton, S. D. et al. (1991) (上記) に記載されるHyTKレトロウイルスベクターに存在する。ドミナントポジティブな選択マーカーを負の選択マーカーと融合することから得られる二機能性選択可能融合遺伝子の使用を記載する、S. D. LuptonによるPCT US91/08442及びPCT/US94/05601の公開文献も参照されたい。

【0296】

好ましい正の選択マーカーは、hph、neo、及びgptからなる群から選択される遺伝子に由来し、好ましい負の選択マーカーは、シトシンデアミナーゼ、HSV-I TK、VZV TK、HPRT、APRT、及びgptからなる群から選択される遺伝子に由来する。特に好ましいマーカーは、正の選択マーカーがhphまたはneoに由来し、負の選択マーカーがシトシンデアミナーゼまたはTK遺伝子もしくは選択マーカーに由来する、二機能性選択可能融合遺伝子である。

【0297】

様々な実施形態において、ポリヌクレオチドは、所望のポリペプチドを一過性に発現するために細胞に導入されるmRNAである。本明細書で使用される場合、「一過性」とは、時間単位、日単位、または週単位の期間にわたる非組み込み導入遺伝子の発現を指し、この発現の期間は、ゲノムに組み込まれた場合または細胞内の安定なベクターまたはプラスミド内に含まれた場合のポリヌクレオチドの発現の期間未満である。

【0298】

特定の実施形態において、ポリペプチドをコードするmRNAは、インビトロ転写mRNAである。本明細書で使用される場合、「インビトロ転写RNA」は、インビトロで合成されたRNA、好ましくはmRNAを指す。概して、インビトロ転写RNAは、インビトロ転写ベクターから生成される。インビトロ転写ベクターは、インビトロ転写RNAを生成するために使用される鋳型を含む。

【0299】

特定の実施形態において、mRNAは、5'キャップもしくは改変された5'キャップ、及び/またはポリ(A)配列をさらに含む。本明細書で使用される場合、5'キャップ(RNAキャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップ、またはRNA m⁷Gキャップとも称される)とは、転写の開始の直後に真核生物のメッセンジャーRNAの「前面」すなわち5'末端に付加される改変されたグアニンヌクレオチドである。5'キャップは、第1の転写されたヌクレオチドに連結され、リボソームによって認識され、RNAアーゼから保護される末端基を含む。キャッピング部分を改変すると、mRNAの機能性、例えばその安定性または翻訳効率などを調節することができる。特定の実施形態において、mRNAは、約50~約5000アデニンのポリ(A)配列を含む。一実施形態において、mRNAは、約100~約1000塩基、約200~約500塩基、または約300~約400塩基のポリ(A)配列を含む。一実施形態において、mRNAは、約65塩基、約100塩基、約200塩基、約300塩基、約400塩基、約500塩基、約600塩基、約700塩基、約800塩基、約900塩基、または約1000塩基以上のポリ(A)配列を含む。ポリ(A)配列は、局在化、安定性、または翻訳効率などのmRNA機能を調節するように、化学的または酵素的に改変されてもよい。

【0300】

F. ウイルスベクター

特定の実施形態において、細胞（例えば、免疫エフェクター細胞）は、CARをコードするレトロウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターを形質導入される。例えば、免疫エフェクター細胞は、CD3、CD28、4-1BB、OX40、またはそれらの任意の組み合わせの細胞内シグナル伝達ドメインを有する、STn発現糖タンパク質、例えばTAG-72に結合する抗STn抗体またはその抗原結合断片を含むCARをコードするベクターを形質導入される。したがって、これらの形質導入細胞は、CAR媒介性細胞傷害応答を誘発することができる。

【0301】

レトロウイルスは、遺伝子送達の標準的なツールである（Miller, 2000, Nature. 357: 455-460）。特定の実施形態では、レトロウイルスが、キメラ抗原受容体（CAR）をコードするポリヌクレオチドを細胞に送達するために使用される。本明細書で使用される場合、「レトロウイルス」という用語は、そのゲノムRNAを直鎖状二本鎖DNAのコピーに逆転写し、その後そのゲノムDNAを宿主ゲノムに共有結合的に組み込むRNAウイルスを指す。ウイルスが宿主ゲノムに組み込まれたら、それは「プロウイルス」と称される。プロウイルスは、RNAポリメラーゼIIの鋳型として機能し、新しいウイルス粒子を産生するために必要な構造タンパク質及び酵素をコードするRNA分子の発現を指向する。

【0302】

特定の実施形態で使用するのに好適な例証となるレトロウイルスとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス（M-MuLV）、モロニー Maus 肉腫ウイルス（MoMSV）、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳癌ウイルス（MuMTV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、ネコ白血病ウイルス（FLV）、スプーマウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）、及びラウス肉腫ウイルス（RSV）、ならびにレンチウイルスが挙げられるが、それらに限定されない。

【0303】

本明細書で使用される場合、「レンチウイルス」という用語は、複合レトロウイルスの群（または族）を指す。例証となるレンチウイルスとしては、HIV（ヒト免疫不全ウイルス；HIV1型及びHIV2型を含む）、ビスナ-マエディウイルス（VMV）ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）、及びサル免疫不全ウイルス（SIV）が挙げられるが、それらに限定されない。一実施形態において、HIVベースのベクター骨格（すなわち、HIVシス作用性配列エレメント）が好ましい。特定の実施形態では、レンチウイルスが、CARを含むポリヌクレオチドを細胞に送達するために使用される。

【0304】

レトロウイルスベクター、より具体的にはレンチウイルスベクターを、特定の実施形態の実施において使用してもよい。したがって、本明細書で使用される「レトロウイルス」または「レトロウイルスベクター」という用語は、それぞれ「レンチウイルス」及び「レンチウイルスベクター」を含むよう意図される。

【0305】

「ベクター」という用語は、本明細書において、別の核酸分子を移入または輸送することのできる核酸分子を指すように使用される。移入された核酸は概して、ベクター核酸分子に連結、例えば挿入される。ベクターは、細胞における自律複製を指向する配列を含んでもよいし、宿主細胞DNAへの組み込みを可能にするのに十分な配列を含んでもよい。有用なベクターとしては、例えば、プラスミド（例えば、DNAプラスミドまたはRNAプラスミド）、トランスポゾン、コスミド、細菌人工染色体、及びウイルスベクターが挙げられる。有用なウイルスベクターとしては、例えば、複製欠損レトロウイルス及びレンチウイルスが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0306】

当業者には明らかであるように、「ウイルスベクター」という用語は、典型的には核酸分子の移入もしくは細胞のゲノムへの組み込みを促進するウイルス由来の核酸エレメントを含む核酸分子（例えば、移入プラスミド）、または核酸移入を媒介するウイルス粒子のいずれかを指すように広く使用されている。ウイルス粒子は、通常、様々なウイルス成分、そして場合により核酸（複数可）に加えて宿主細胞の成分も含む。

【0307】

ウイルスベクターという用語は、核酸を細胞に移入することのできるウイルスもしくはウイルス粒子、または移入される核酸自体のいずれかを指す場合がある。ウイルスベクター及び移入プラスミドは、主にウイルスに由来する構造的及び／または機能的な遺伝子エレメントを含む。「レトロウイルスベクター」という用語は、主にレトロウイルスに由来する構造的及び機能的な遺伝子エレメントもしくはそれらの一部を含むウイルスベクターまたはプラスミドを指す。「レンチウイルスベクター」という用語は、主にレンチウイルスに由来するLTRを含めた構造的及び機能的な遺伝子エレメントもしくはそれらの一部を含むウイルスベクターまたはプラスミドを指す。「ハイブリッドベクター」という用語は、レトロウイルス配列、例えばレンチウイルス配列と、非レンチウイルスのウイルス配列との両方を含む、ベクター、LTR、または他の核酸を指す。一実施形態において、ハイブリッドベクターは、逆転写、複製、組み込み、及び／もしくはパッケージングのためのレトロウイルス配列、例えばレンチウイルス配列を含む、ベクターまたは移入プラスミドを指す。

【0308】

特定の実施形態において、「レンチウイルスベクター」、「レンチウイルス発現ベクター」という用語は、レンチウイルス移入プラスミド及び／または感染性レンチウイルス粒子を指すように使用される場合がある。本明細書において、クローニング部位、プロモーター、調節エレメント、異種核酸などのエレメントが参照される場合、これらのエレメントの配列がRNA形態でレンチウイルス粒子内に存在し、DNA形態でDNAプラスミド内に存在することを理解されたい。

【0309】

プロウイルスの各末端には、「末端反復配列（long terminal repeat）」すなわち「LTR」と呼ばれる構造が存在する。「末端反復配列（LTR）」という用語は、天然の配列構成において直列反復配列であり、U3、R、及びU5領域を含む、レトロウイルスDNAの両端に位置する塩基対のドメインを指す。LTRは概して、レトロウイルス遺伝子の発現（例えば、遺伝子転写の促進、開始、及びポリアダニル化）及びウイルス複製に必須である機能を提供する。LTRは、転写制御エレメント、ポリアダニル化シグナル、ならびにウイルスゲノムの複製及び組み込みに必要な配列を含めた、多数の調節シグナルを含む。ウイルスLTRは、U3、R、及びU5と呼ばれる3つの領域に分割される。U3領域は、エンハンサー及びプロモーターエレメントを含む。U5領域は、プライマー結合部位とR領域との間の配列であり、ポリアダニル化配列を含む。R（反復）領域には、U3及びU5領域が隣接している。LTRは、U3、R、及びU5領域で構成され、ウイルスゲノムの5'及び3'の両端に存在する。5'LTRには、ゲノムの逆転写に必要な配列（tRNAプライマー結合部位）、及びウイルスRNAを粒子に効率的にパッケージングするために必要な配列（プサイ部位）が隣接している。

【0310】

本明細書で使用される場合、「パッケージングシグナル」または「パッケージング配列」という用語は、ウイルスRNAをウイルスカプシドまたは粒子に挿入するのに必要とされる、レトロウイルスゲノム内に位置する配列を指す。例えば、Clever et al., 1995, J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109を参照されたい。いくつかのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのカプシド形成に必要とされる最小限のパッケージングシグナル（プサイ[]配列とも称される）を使用する。したがって、本明細書で使用される場合、「パッケージング配列」

、「パッケージングシグナル」、「プサイ」という用語、及び「 Ψ 」の記号は、ウイルス粒子形成中にレトロウイルスRNA鎖のカプシド形成に必要とされる非コード配列に関して使用される。

【0311】

様々な実施形態において、ベクターは、改変された5'LTR及び/または3'LTRを含む。LTRの一方または両方が、1つ以上の欠失、挿入、または置換を含むがそれらに限定されない、1つ以上の改変を含んでもよい。3'LTRの改変は、多くの場合、ウイルスを複製欠損にすることによって、レンチウイルス系またはレトロウイルス系の安全性を改善するために行われる。本明細書で使用される場合、「複製欠損」という用語は、感染性ビリオンが産生されないように完全で有効な複製ができないウイルス（例えば、複製欠損レンチウイルス子孫）を指す。「複製可能」という用語は、ウイルスのウイルス複製が感染性ビリオンを産生することができるように、複製が可能な野生型ウイルスまたは変異ウイルス（例えば、複製可能レンチウイルス子孫）を指す。

10

【0312】

「自己不活性化型」(SIN)ベクターとは、U3領域として知られる右(3')LTRエンハンサー・プロモーター領域が1回目のウイルス複製以降のウイルス転写を防止するように（例えば欠失または置換によって）改変されている、複製欠損ベクター、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを指す。これは、右(3')LTRのU3領域がウイルス複製中に左(5')LTRのU3領域のための鋳型として使用され、したがってウイルス転写物がU3エンハンサー・プロモーターなしに作製され得ないためである。さらなる実施形態において、3'LTRは、U5領域が例えば理想的なポリ(A)配列に置き換えられるように改変される。LTRへの改変、例えば3'LTR、5'LTR、または3'及び5'両方のLTRへの改変なども含まれることに留意されたい。

20

【0313】

5'LTRのU3領域を異種プロモーターに置き換えてウイルス粒子の産生中のウイルスゲノムの転写を推進することによって、さらなる安全性の増強がもたらされる。使用することのできる異種プロモーターの例としては、例えば、ウイルス性サルウイルス40(SV40)（例えば、初期または後期）、サイトメガロウイルス(CMV)（例えば、最初期）、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、及び単純ヘルペスウイルス(HSV)（チミジンキナーゼ）プロモーターが挙げられる。典型的なプロモーターは、Tat依存様式で高レベルの転写を推進することができる。ウイルス産生系に完全なU3配列が存在しないため、この置き換えは、組換えにより複製可能ウイルスが生成される可能性を低減させる。ある特定の実施形態において、異種プロモーターは、ウイルスゲノムが転写される様式の制御において付加的な利点を有する。例えば、異種プロモーターは、誘発因子が存在するときのみウイルスゲノムの全てまたは一部の転写が起こるように誘導性であり得る。誘発因子としては、1つ以上の化学化合物、または宿主細胞が培養される温度もしくはpHなどの生理的条件が挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0314】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、TARエレメントを含む。「TAR」という用語は、レンチウイルス（例えばHIV）LTRのR領域に位置する「トランス活性化応答」遺伝子エレメントを指す。このエレメントは、レンチウイルストランス活性化因子(tat)遺伝子エレメントと相互作用してウイルス複製を増強する。しかしながら、このエレメントは、5'LTRのU3領域が異種プロモーターに置き換えられる実施形態では必要とされない。

40

【0315】

「R領域」は、キャッピング基の始点（すなわち、転写の始点）で始まり、ポリ(A)トラクトの始点直前で終わる、レトロウイルスLTR内の領域を指す。R領域は、U3領域及びU5領域が隣接しているものとも定義される。R領域は、逆転写中に、新生DNA

50

をゲノムの一端からもう一端に移動させる役割を果たす。

【0316】

本明細書で使用される場合、「FLAPエレメント」という用語は、レトロウイルス、例えばHIV-1またはHIV-2のセントラルポリプリントラクト及び中央終止配列(cPPT及びCTS)が配列に含まれる核酸を指す。いくつかの実施形態では、「FLAPエレメント」及び「cPPT/FLAP」という用語は、前述のFLAPエレメントを指すように互換的に使用される。好適なFLAPエレメントは、米国特許第6,682,907号及びZenou, et al., 2000, Cell, 101:173に記載されている。HIV-1逆転写中、セントラルポリプリントラクト(cPPT)でのプラス鎖DNAの中央開始、及び中央終止配列(CTS)での中央終止は、三本鎖DNA構造：HIV-1中央DNA FLAPの形成をもたらす。いずれかの理論に束縛されることを望むものではないが、DNA FLAPは、レンチウイルスゲノム核内移行のシス活性決定基として機能し得、かつ/またはウイルスの力価を増加させ得る。特定の実施形態において、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターの骨格は、ベクター内の目的の異種遺伝子の上流または下流に、1つ以上のFLAPエレメントを含む。例えば、特定の実施形態において、移入プラスミドはFLAPエレメントを含む。一実施形態において、ベクターは、HIV-1から単離されたFLAPエレメントを含む。

10

【0317】

一実施形態において、レトロウイルスまたはレンチウイルスの移入ベクターは、1つ以上の排出エレメントを含む。「排出エレメント」という用語は、細胞の核から細胞質へのRNA転写物の輸送を調節するシス作用性転写後調節エレメントを指す。RNA排出エレメントの例としては、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) rev応答エレメント(RRE) (例えば、Cullen et al., 1991, J. Virol. 65:1053、及びCullen et al., 1991, Cell 58:423を参照されたい)、及びB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント(HPRE)が挙げられるが、それらに限定されない。概して、RNA排出エレメントは、遺伝子の3' UTR内に配置され、1つまたは複数のコピーとして挿入され得る。

20

【0318】

特定の実施形態において、ウイルスベクターにおける異種配列の発現は、転写後調節エレメント、効率的なポリアデニル化部位、そして任意選択により転写終止シグナルをベクターに組み込むことによって増加する。例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE; Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73:2886)、B型肝炎ウイルスに存在する転写後調節エレメント(HPRE) (Huang et al., Mol. Cell. Biol., 5:3864)、及び同類のもの(Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766)など、種々の転写後調節エレメントが、タンパク質における異種核酸の発現を増加させることができる。特定の実施形態において、ベクターは、WPREまたはHPREなどの転写後調節エレメントを含む。

30

【0319】

特定の実施形態において、ベクターはWPREまたはHPREなどの転写後調節エレメントを欠いている、すなわちそれらを含まないが、これは、いくつかの事例において、これらのエレメントが細胞形質転換のリスクを増加させ、かつ/あるいはmRNA転写物の量を実質的もしくは有意に増加させない、またはmRNA安定性を増加させないためである。しかしながら、いくつかの実施形態では、所与のベクターにWPREを含めることの効果が予測不可能である場合がある。したがって、いくつかの実施形態では、ベクターは、WPREまたはHPREを欠いている、すなわちそれらを含まない。

40

【0320】

効率的な終止及び異種核酸転写物のポリアデニル化を指向するエレメントは、異種遺伝子の発現を増加させる。転写終止シグナルは一般に、ポリアデニル化シグナルの下流に見出される。

50

【0321】

特定の実施形態において、ベクターは、発現すべきポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのポリアデニル化配列 3' を含む。本明細書で使用される「ポリ(A)部位」または「ポリ(A)配列」という用語は、終止とRNAポリメラーゼIIによる新生RNA転写物のポリアデニル化との両方を指向するDNA配列を意味する。ポリアデニル化配列は、コード配列の3'末端へのポリ(A)テイルの付加によってmRNA安定性を促進し、ひいては翻訳効率の増加に寄与し得る。切断及びポリアデニル化は、RNA内のポリ(A)配列によって指向される。哺乳動物のpre-mRNAのコアなポリ(A)配列は、切断・ポリアデニル化部位に隣接する2つの認識エレメントを有する。典型的には、ほぼ不変のAAUAAA六量体が、U残基またはGU残基に富んだより可変のエレメントの20～50ヌクレオチド上流に位置する。新生転写物の切断がこれら2つのエレメント間で起こり、5'切断産物への最大250個のアデノシンの付加に連関する。特定の実施形態において、コアなポリ(A)配列は、理想的なポリ(A)配列(例えば、AATAAA、ATTAA、AGTAA)である。特定の実施例において、ポリ(A)配列は、SV40ポリ(A)配列、ウシ成長ホルモンポリ(A)配列(BGHpA)、ウサギ - グロビンポリ(A)配列(rgpA)、または当該技術分野で知られる別の好適な異種もしくは内因性ポリ(A)配列である。

10

【0322】

ある特定の実施形態において、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターは、1つ以上のインスレーターエレメントをさらに含む。インスレーターエレメントは、ゲノムDNA内に存在するシス作用性エレメントによって媒介され、移入された配列の発現の調節解除を引き起こし得る組み込み部位作用(すなわち、位置作用;例えば、Burgess - Beusse et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:16433、及びZhan et al., 2001, Hum. Gene t., 109:471を参照されたい)から、レンチウイルス発現配列、例えば治療用ポリペプチドを保護するのに寄与し得る。いくつかの実施形態では、移入ベクターは、1つ以上のインスレーターエレメントを3'LTRに含み、プロウイルスが宿主ゲノムに組み込まれると、プロウイルスは、3'LTRを複製することによって、5'LTRまたは3'LTRの両方に1つ以上のインスレーターを含む。特定の実施形態で使用するのに好適なインスレーターとしては、ニワトリ - グロビンインスレーター(参照により本明細書に組み込まれる、Chung et al., 1993, Cell 74:505, Chung et al., 1997, PNAS 94:575、及びBell et al., 1999, Cell 98:387を参照されたい)が挙げられるが、それに限定されない。インスレーターエレメントの例としては、ニワトリHS4などの - グロビン遺伝子座由来のインスレーターが挙げられるが、それに限定されない。

20

30

【0323】

ある特定の具体的な実施形態によると、ウイルスベクター骨格配列の大部分または全てが、レンチウイルス、例えばHIV-1に由来する。しかしながら、レトロウイルス及び/またはレンチウイルスの多くの異なる配列源を使用することまたは組み合わせることができ、レンチウイルス配列のうちある特定のものにおいて、本明細書に記載の機能を行う移入ベクターの能力を損なうことなく多数の置換及び変更が適応され得ることを理解されたい。さらに、種々のレンチウイルスベクターが当該技術分野で知られており(Naldini et al., (1996a、1996b、及び1998)、Zufferey et al., (1997)、Dull et al., 1998、米国特許第6,013,516号、及び同第5,994,136号を参照されたい)、それらの多くが、ウイルスベクターまたは移入プラスミドを産生するように適合され得る。

40

【0324】

様々な実施形態において、ベクターは、CARポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。ベクターは、いずれかのLTRが1つ以上の改変、例えば1つ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を含む、1つ以上の

50

L T Rを有し得る。ベクターは、形質導入効率を増加させるためのさらなるアクセサリーエレメント（例えば、c P P T / F L A P）、ウイルスパッケージング（例えば、プサイ（ ）パッケージングシグナル、R R E）、及び/または治療用遺伝子発現を増加させる他のエレメント（例えば、ポリ（ A ）配列）のうちの1つをさらに含んでもよく、任意選択により、W P R EまたはH P R Eを含んでもよい。

【 0 3 2 5 】

特定の実施形態において、移入ベクターは、左（ 5 ' ）レトロウイルス L T R；セントラルポリプリントラクト / D N Aフラップ（ c P P T / F L A P）；レトロウイルス排出エレメント；本明細書において想定される C A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された、 T細胞において活性なプロモーター；及び右（ 3 ' ）レトロウイルス L T R；そして任意選択により W P R Eまたは H P R Eを含む。

10

【 0 3 2 6 】

特定の実施形態において、移入ベクターは、左（ 5 ' ）レトロウイルス L T R；レトロウイルス排出エレメント；本明細書において想定される C A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された、 T細胞において活性なプロモーター；右（ 3 ' ）レトロウイルス L T R；及びポリ（ A ）配列；そして任意選択により W P R Eまたは H P R Eを含む。別の特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、左（ 5 ' ） L T R； c P P T / F L A P； R R E；本明細書において想定される C A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された、 T細胞において活性なプロモーター；右（ 3 ' ） L T R；及びポリアデニル化配列；そして任意選択により W P R Eまたは H P R Eを含む。

20

【 0 3 2 7 】

ある特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、左（ 5 ' ） H I V - 1 L T R；プサイ（ ）パッケージングシグナル； c P P T / F L A P； R R E；本明細書において想定される C A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された、 T細胞において活性なプロモーター；右（ 3 ' ）自己不活性化型（ S I N） H I V - 1 L T R；及びウサギ - グロビンポリアデニル化配列；そして任意選択により W P R Eまたは H P R Eを含む。

【 0 3 2 8 】

別の実施形態では、ベクターは、少なくとも1つの L T R；セントラルポリプリントラクト / D N Aフラップ（ c P P T / F L A P）；レトロウイルス排出エレメント；及び本明細書において想定される C A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された、 T細胞において活性なプロモーター；そして任意選択により W P R Eまたは H P R Eを含む。

30

【 0 3 2 9 】

特定の実施形態において、ベクターは、少なくとも1つの L T R； c P P T / F L A P； R R E；本明細書において想定される C A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された、 T細胞において活性なプロモーター；及びポリアデニル化配列；そして任意選択により W P R Eまたは H P R Eを含む。

【 0 3 3 0 】

ある特定の実施形態では、ベクターは、少なくとも1つの S I N H I V - 1 L T R；プサイ（ ）パッケージングシグナル； c P P T / F L A P； R R E；本明細書において想定される C A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された、 T細胞において活性なプロモーター；及びウサギ - グロビンポリアデニル化配列；そして任意選択により W P R Eまたは H P R Eを含む。

40

【 0 3 3 1 】

「宿主細胞」は、インビボ、エクスピボ、もしくはインビトロで、組換えベクターまたはポリヌクレオチドを電気穿孔、トランスフェクト、感染、もしくは形質導入された細胞を含む。宿主細胞は、パッケージング細胞、プロデューサー細胞、及びウイルスベクターに感染した細胞を含み得る。特定の実施形態において、ウイルスベクターに感染した宿主

50

細胞は、治療法を必要とする対象に投与される。ある特定の実施形態において、「標的細胞」という用語は、宿主細胞と互換的に使用され、所望の細胞型のトランスフェクト細胞、感染細胞、または形質導入細胞を指す。好ましい実施形態では、標的細胞はT細胞である。

【0332】

妥当なウイルス力価を達成するためには、大規模なウイルス粒子産生が必要であることが多い。ウイルス粒子は、ウイルス構造遺伝子及び/またはアクセサリー遺伝子、例えば、gag、pol、env、tat、rev、vif、vpr、vpu、vpx、もしくはnef遺伝子、または他のレトロウイルス遺伝子を含むパッケージング細胞株に移入ベクターをトランスフェクトすることによって産生される。

10

【0333】

本明細書で使用される場合、「パッケージングベクター」という用語は、パッケージングシグナルを欠いており、1つ、2つ、3つ、4つ、もしくはそれ以上のウイルス構造遺伝子及び/またはアクセサリー遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクターまたはウイルスベクターを指す。通常、パッケージングベクターは、パッケージング細胞に含まれ、トランスフェクション、形質導入、または感染によって細胞に導入される。トランスフェクション、形質導入、または感染の方法は、当業者に周知である。特定の実施形態において、レトロウイルス/レンチウイルス移入ベクターは、プロデューサー細胞または細胞株を生成するために、トランスフェクション、形質導入、または感染によってパッケージング細胞株に導入される。特定の実施形態において、パッケージングベクターは、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクション、または電気穿孔を含む標準的方法によって、ヒト細胞または細胞株に導入される。いくつかの実施形態では、パッケージングベクターは、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジン、ゼオシン、チミジンキナーゼ、DHFR、Glnシンセターゼ、またはADAなどの優性選択マーカーと一緒に細胞に導入され、続いて、適切な薬物の存在下での選択、及びクローンの単離が行われる。選択マーカー遺伝子は、パッケージングベクター、例えば、IRESまたは自己切断型ウイルスペプチドによってコードされる遺伝子に物理的に連結され得る。

20

【0334】

ウイルスエンベロープタンパク質(env)は、細胞株から生成された組換えレトロウイルスに最終的に感染し形質転換し得る宿主細胞の範囲を決定する。HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、及びEIVなどのレンチウイルスの場合、envタンパク質は、gp41及びgp120を含む。好ましくは、パッケージング細胞により発現するウイルスenvタンパク質は、これまでに説明されているように、ウイルスのgag及びpol遺伝子からの別々のベクターでコードされる。

30

【0335】

特定の実施形態で用いることのできるレトロウイルス由来env遺伝子の例証となる例としては、MLVエンベロープ、10A1エンベロープ、BAEV、FeLV-B、RD114、SSAV、エボラ、センダイ、FPV(家禽ペストウイルス)、及びインフルエンザウイルスエンベロープが挙げられるが、それらに限定されない。同様に、RNAウイルス(例えば、ピコルナウイルス科、カルシウイルス科(Calciviridae)、アストロウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、レトロウイルス科のRNAウイルスファミリー)、ならびにDNAウイルス(ヘパドナウイルス科、サーコウイルス科、パルボウイルス科、パポバウイルス科、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、及びイリドウイルス科のファミリー)由来のエンベロープをコードする遺伝子を用いてもよい。これらのウイルスの代表例としては、FeLV、VEE、HFVW、WDSV、SFV、狂犬病、ALV、BIV、BLV、EBV、CAEV、SNV、ChTLV、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FuSV、MH2、A

40

50

E V、A M V、C T 1 0、及びE I A Vが挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 3 3 6 】

他の実施形態では、ウイルスをシュードタイプ化するためのエンベロープタンパク質は、限定されないが、H 1 N 1、H 1 N 2、H 3 N 2、及びH 5 N 1（トリインフルエンザ）などのインフルエンザA、インフルエンザB、インフルエンザCウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ロタウイルス、ノーウォークウイルス群のいずれかのウイルス、腸内アデノウイルス、パルボウイルス、デング熱ウイルス、サル痘、モノネガウイルス目のリッサウイルス（狂犬病ウイルス、ラゴスコウモリウイルス、モコラウイルス、ドゥベンヘイジウイルス、ヨーロッパコウモリウイルス1 & 2、及びオーストラリアコウモリウイルスなど）、エフェメロウイルス、ベジクロウイルス、水疱性口内炎ウイルス（V S V）、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス1型及び2型、水痘帯状疱疹、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス（E B V）、ヒトヘルペスウイルス（H H V）、ヒトヘルペス6型及び8型、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、パピローマウイルス、マウスガンマヘルペスウイルスなど）、アレナウイルス（アルゼンチン出血熱ウイルス、ボリビア出血熱ウイルス、サビア関連出血熱ウイルス、ベネズエラ出血熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、マチュポウイルスなど）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（L C M V）、ブニヤウイルス科（クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ハンタウイルス、腎症候群原因ウイルスを伴う出血熱、リフトバレー熱ウイルスなど）、フィロウイルス科（フィロウイルス）（エボラ出血熱及びマールブルグ出血熱を含む）、フラビウイルス科（キャサヌール森林病ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、ダニ媒介脳炎原因ウイルスなど）、及びパラミクソウイルス科（ヘンドラウイルス及びニパウイルスなど）、大痘瘡及び小痘瘡（天然痘）、アルファウイルス（ベネズエラウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、S A R S 関連コロナウイルス（S A R S - C o V）、ウエストナイルウイルス、任意の脳炎原因ウイルスなど）のウイルスのいずれかを含む。

【 0 3 3 7 】

一実施形態において、パッケージング細胞は、V S V - G糖タンパク質でシュードタイプ化された組換えレトロウイルス、例えばレンチウイルスを産生する。

【 0 3 3 8 】

本明細書で使用される「シュードタイプ」または「シュードタイプ化」という用語は、ウイルスエンベロープタンパク質が好ましい特性を有する別のウイルスのもので置換されているウイルスを指す。例えば、H I Vエンベロープタンパク質（e n v 遺伝子によりコードされるもの）は通常ウイルスの標的をC D 4 + 提示細胞に定めるため、H I Vは、水疱性口内炎ウイルスGタンパク質（V S V - G）エンベロープタンパク質でシュードタイプ化することができ、これにより、H I Vがより広範囲の細胞に感染することが可能になる。好ましい実施形態では、レンチウイルスエンベロープタンパク質は、V S V - Gでシュードタイプ化される。一実施形態において、パッケージング細胞は、V S V - Gエンベロープ糖タンパク質でシュードタイプ化された組換えレトロウイルス、例えばレンチウイルスを産生する。

【 0 3 3 9 】

本明細書で使用される場合、「パッケージング細胞株」という用語は、パッケージングシグナルを含まないが、ウイルス粒子の正しいパッケージングに必要なウイルス構造タンパク質及び複製酵素（例えば、g a g、p o l、及びe n v）を安定的または一過的に発現する細胞株に関して使用される。任意の好適な細胞株を用いてパッケージング細胞を調製することができる。概して、この細胞は哺乳動物細胞である。特定の実施形態において、パッケージング細胞株を産生するために使用される細胞は、ヒト細胞である。使用され得る好適な細胞株としては、例えば、C H O細胞、B H K細胞、M D C K細胞、C 3 H 1 0 T 1 / 2細胞、F L Y細胞、P s i - 2細胞、B O S C 2 3細胞、P A 3 1 7細胞、W E H I細胞、C O S細胞、B S C 1細胞、B S C 4 0細胞、B M T 1 0細胞、V E R O細胞、W 1 3 8細胞、M R C 5細胞、A 5 4 9細胞、H T 1 0 8 0細胞、2 9 3

細胞、293T細胞、B-50細胞、3T3細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、Saos-2細胞、Huh7細胞、HeLa細胞、W163細胞、211細胞、及び211A細胞が挙げられる。好ましい実施形態では、パッケージング細胞は、293細胞、293T細胞、またはA549細胞である。別の好ましい実施形態では、この細胞はA549細胞である。

【0340】

本明細書で使用される場合、「プロデューサー細胞株」という用語は、パッケージング細胞株とパッケージングシグナルを含む移入ベクター構築物とを含む、組換えレトロウイルス粒子を産生することのできる細胞株を指す。感染性ウイルス粒子及びウイルス原液の生成は、従来の技術を使用して行うことができる。ウイルス原液の調製方法は当該技術分野で知られており、例えば、Y. Soneoka et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 628-633、及びN. R. Landau et al. (1992) *J. Virol.* 66: 5110-5113によって例証されている。感染性ウイルス粒子は、従来の技術を使用してパッケージング細胞から収集することができる。例えば、感染性粒子は、当該技術分野で知られているように、細胞溶解、または細胞培養物の上清の収集によって収集することができる。所望される場合、任意選択により、収集されたウイルス粒子を精製してもよい。好適な精製技術は当業者に周知である。

【0341】

トランスフェクションではなくウイルス感染の手段によるレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターを使用した遺伝子（複数可）または他のポリヌクレオチド配列の送達は、「形質導入」と称される。一実施形態において、レトロウイルスベクターは、感染及びプロウイルスの組み込みによって細胞に形質導入される。ある特定の実施形態において、標的細胞、例えばT細胞は、ウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターを使用した感染によって細胞に送達された遺伝子または他のポリヌクレオチド配列を含む場合、「形質導入される」。特定の実施形態において、形質導入細胞は、その細胞ゲノム内にレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターによって送達された1つ以上の遺伝子または他のポリヌクレオチド配列を含む。

【0342】

特定の実施形態において、1つ以上のポリペプチドを発現するウイルスベクターを形質導入した宿主細胞が、B細胞悪性腫瘍を治療及び/または防止するために対象に投与される。ある特定の実施形態に従って用いられ得る、遺伝子療法におけるウイルスベクターの使用に関する他の方法は、例えば、Kay, M. A. (1997) *Chest* 111 (6 Supp.): 138S-142S、Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9: 1975-81、Shiratory, Y. et al. (1999) *Liver* 19: 265-74、Oka, K. et al. (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 179-86、Thule, P. M. and Liu, J. M. (2000) *Gene Ther.* 7: 1744-52、Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 335-56、Alt, M. (1995) *J. Hepatol.* 23: 746-58、Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716: 90-101、Strayer, D. S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8: 2159-2172、Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3: 43-49、及びLee, H. C. et al. (2000) *Nature* 408: 483-8に見出すことができる。

【0343】

G. 遺伝子改変細胞

様々な実施形態において、がんの治療において使用するための、本明細書において想定されるCARを発現するように遺伝子改変された細胞が提供される。本明細書で使用される場合、「遺伝子操作された」または「遺伝子改変された」という用語は、細胞内の全遺

10

20

30

40

50

伝子材料にDNAまたはRNAの形態における追加の遺伝子材料を付加することを指す。「遺伝子改変細胞」、「改変細胞」、及び「再指向された細胞」という用語は、互換的に使用される。本明細書で使用される場合、「遺伝子療法」という用語は、遺伝子の発現を回復、修正、もしくは改変する、または治療用ポリペプチド、例えばCARを発現する目的で、細胞内の全遺伝子材料にDNAまたはRNAの形態における追加の遺伝子材料を導入することを指す。

【0344】

特定の実施形態において、本明細書において想定されるCARは、目的の標的抗原、例えばSTn発現糖タンパク質にそれらの特異性を再指向させるために、免疫エフェクター細胞に導入され、発現する。「免疫エフェクター細胞」とは、1つ以上のエフェクター機能（例えば、細胞傷害性細胞殺滅活性、サイトカインの分泌、ADCC及び/またはCDCの誘導）を有する免疫系の任意の細胞である。本明細書において想定される例証となる免疫エフェクター細胞は、Tリンパ球、特に細胞傷害性T細胞（CTL；CD8+T細胞）、TIL、及びヘルパーT細胞（HTL；CD4+T細胞である。一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞を含む。一実施形態において、免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラーT（NKT）細胞を含む。

10

【0345】

免疫エフェクター細胞は、自家性/自律性（「自己」）であっても、非自家性（「非自己」、例えば、同種、同系、または異種）であってもよい。

【0346】

本明細書で使用される「自家性」とは、同じ対象に由来する細胞を指す。

20

【0347】

本明細書で使用される「同種」とは、比較される細胞と遺伝的に異なる同じ種の細胞を指す。

【0348】

本明細書で使用される「同系」とは、比較される細胞と遺伝的に同一である異なる対象の細胞を指す。

【0349】

本明細書で使用される「異種」とは、比較される細胞と異なる種の細胞を指す。好ましい実施形態では、細胞は同種である。

30

【0350】

本明細書において想定されるCARと共に使用される例証となる免疫エフェクター細胞は、Tリンパ球を含む。「T細胞」または「Tリンパ球」という用語は、当該技術分野において認識されており、未成熟Tリンパ球、成熟Tリンパ球、休止Tリンパ球、または活性化Tリンパ球を含むよう意図される。T細胞は、Tヘルパー（Th）細胞、例えばTヘルパー1（Th1）またはTヘルパー2（Th2）細胞とすることができる。T細胞は、ヘルパーT細胞（HTL；CD4+T細胞）CD4+T細胞、細胞傷害性T細胞（CTL；CD8+T細胞）、CD4+CD8+T細胞、CD4-CD8-T細胞、またはT細胞の任意の他のサブセットであってもよい。特定の実施形態で使用するのに好適な他の例証となるT細胞集団は、ナイーブT細胞及びメモリーT細胞を含む。

40

【0351】

当業者には理解されるように、他の細胞を免疫エフェクター細胞として本明細書に記載のCARと共に使用してもよい。特に、免疫エフェクター細胞は、NK細胞、NKT細胞、好中球、及びマクロファージも含む。免疫エフェクター細胞にはエフェクター細胞の前駆細胞も含まれ、そのような前駆細胞は、インビボまたはインビトロで免疫エフェクター細胞に分化するよう誘導され得る。したがって、特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、臍帯血、骨髄、または動員末梢血に由来する細胞のCD34+集団に含まれる造血幹細胞（HSC）などの免疫エフェクター細胞の前駆細胞を含み、これは、対象に投与されると成熟免疫エフェクター細胞に分化するか、または成熟免疫エフェクター細胞に分化するようにインビトロで誘導され得る。

50

【0352】

本明細書で使用される場合、S T n 特異的 C A R を含むように遺伝子操作された免疫エフェクター細胞は、「S T n 特異的な再指向された免疫エフェクター細胞」と称され得る。

本明細書で使用される「C D 3 4 ⁺ 細胞」という用語は、その細胞表面上で C D 3 4 タンパク質を発現する細胞を指す。本明細書で使用される「C D 3 4」は、多くの場合、細胞-細胞接着因子として作用し、かつリンパ節への T 細胞進入に関与する、細胞表面糖タンパク質（例えば、シアロムチンタンパク質）を指す。C D 3 4 ⁺ 細胞集団には、患者に投与されると分化し、T 細胞、N K 細胞、N K T 細胞、好中球、及び単球/マクロファージ系列の細胞を含む全ての造血系に寄与する、造血幹細胞（H S C）が含まれる。

10

【0353】

本明細書において想定される C A R を発現する免疫エフェクター細胞を作製するための方法が、特定の実施形態に提供される。一実施形態において、本方法は、免疫エフェクター細胞が本明細書に記載される 1 つ以上の C A R を発現するように、個体から単離された免疫エフェクター細胞にトランスフェクションまたは形質導入を行うことを含む。ある特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、インビトロで個体から単離され、さらなる操作を行うことなく遺伝子改変される。このような細胞は次に、個体に直接再投与され得る。さらなる実施形態では、免疫エフェクター細胞は、C A R を発現するように遺伝子改変される前に、まずインビトロで増殖するよう活性化され刺激される。この点において、免疫エフェクター細胞は、遺伝子改変される（すなわち、本明細書において想定される C A R を発現するように形質導入またはトランスフェクトされる）前及び/または後に培養されてもよい。

20

【0354】

特定の実施形態において、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞のインビトロでの操作または遺伝子改変の前に、細胞源が対象から得られる。特定の実施形態において、C A R 改変免疫エフェクター細胞は、T 細胞を含む。

【0355】

特定の実施形態において、P B M C は、本明細書において想定される方法を使用して、C A R を発現するように直接遺伝子改変され得る。ある特定の実施形態では、P B M C の単離後、T リンパ球がさらに単離され、ある特定の実施形態では、細胞傷害性 T リンパ球とヘルパー T リンパ球との両方が、遺伝子改変及び/もしくは増幅の前あるいは後に、ナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞、及びエフェクター T 細胞の亜集団に分別され得る。

30

【0356】

T 細胞などの免疫エフェクター細胞は、公知の方法を使用して単離した後に遺伝子改変されてもよいし、免疫エフェクター細胞は、遺伝子改変される前にインビトロで活性化及び増幅（または前駆細胞の場合は分化）されてもよい。特定の実施形態において、T 細胞などの免疫エフェクター細胞は、本明細書において想定されるキメラ抗原受容体で遺伝子改変され（例えば、C A R をコードする核酸を含むウイルスベクターを形質導入され）、次にインビトロで活性化及び増幅される。様々な実施形態において、T 細胞は、C A R を発現するための遺伝子改変の前または後に、例えば、米国特許第 6,352,694 号、同第 6,534,055 号、同第 6,905,680 号、同第 6,692,964 号、同第 5,858,358 号、同第 6,887,466 号、同第 6,905,681 号、同第 7,144,575 号、同第 7,067,318 号、同第 7,172,869 号、同第 7,232,566 号、同第 7,175,843 号、同第 5,883,223 号、同第 6,905,874 号、同第 6,797,514 号、同第 6,867,041 号、及び米国特許出願公開第 20060121005 号に記載の方法を使用して活性化及び増幅され得る。

40

【0357】

一実施形態において、C D 3 4 ⁺ 細胞は、本明細書において想定される核酸構築物を形質導入される。ある特定の実施形態において、形質導入された C D 3 4 ⁺ 細胞は、対象、

50

概して細胞が最初に単離された対象への投与後に、インビボで成熟免疫エフェクター細胞に分化する。別の実施形態では、 $CD34^+$ 細胞は、本明細書に記載のCARへの曝露前、またはそれで遺伝子改変された後に、次のサイトカイン： $Flt-3$ リガンド（ $FLT3$ ）、幹細胞因子（ SCF ）、巨核球増殖分化因子（ TPO ）、 $IL-3$ 、及び $IL-6$ のうちの1つ以上により、これまでに説明されている方法に従ってインビトロで刺激され得る（Ashauer et al., 2004、Imren, et al., 2004）。

【0358】

特定の実施形態において、がんの治療のために改変された免疫エフェクター細胞の集団は、本明細書に開示されるCARを含む。例えば、改変された免疫エフェクター細胞の集団は、本明細書に記載のB細胞悪性腫瘍と診断された患者（自家性ドナー）から得られた末梢血単核細胞（PBMC）から調製される。PBMCは、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、または $CD4^+$ 、及び $CD8^+$ であり得るTリンパ球の不均一集団を形成する。

【0359】

PBMCは、NK細胞またはNKT細胞といった他の細胞傷害性リンパ球も含み得る。本明細書において想定されるCARのコード配列を有する発現ベクターは、ヒトドナーT細胞、NK細胞、またはNKT細胞の集団に導入され得る。特定の実施形態では、フローサイトメトリを使用し、正常に形質導入された発現ベクターを有するT細胞を分別して、 $CD3$ 陽性T細胞を単離し、次に、抗 $CD3$ 抗体及びもしくは抗 $CD28$ 抗体ならびに $IL-2$ 、または本明細書の他の箇所に記載される当該技術分野で知られる任意の他の方法を使用した細胞活性化に加えて、これらのCARタンパク質発現T細胞の数を増加させるためにさらに繁殖させることができる。貯蔵及び／またはヒト対象に使用するための調製のために、CARタンパク質T細胞を発現するT細胞の凍結保存の標準的な手順が使用される。一実施形態において、T細胞のインビトロ形質導入、培養、及び／または増幅は、ウシ胎児血清及びウシ胎仔血清などの非ヒト動物由来産物の非存在下で行われる。PBMCの不均一集団が遺伝子改変されるため、得られる形質導入細胞は、本明細書において想定されるSTn発現糖タンパク質を標的とするCARを含む改変細胞の不均一集団である。

【0360】

さらなる実施形態では、例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の異なる発現ベクターの混合物を、免疫エフェクター細胞のドナー集団の遺伝子改変に使用することができ、ここで各ベクターは、本明細書において想定される異なるキメラ抗原受容体タンパク質をコードする。得られる改変された免疫エフェクター細胞は、ある割合の改変細胞が2つ以上の異なるCARタンパク質を発現する、改変細胞の混合集団を形成する。

【0361】

H. T細胞の製造方法

様々な実施形態において、遺伝子改変T細胞は、 $CD3$ TCR複合体関連シグナルを刺激する薬剤と、T細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドとの接触により増幅される。

【0362】

特定の実施形態において、PBMCまたは単離されたT細胞は、 $IL-2$ 、 $IL-7$ 、及び／または $IL-15$ などの適切なサイトカインを含む培養培地において、刺激剤及び共刺激剤、例えば可溶性の抗 $CD3$ 抗体及び抗 $CD28$ 抗体、またはビーズもしくは他の表面に結合した抗体と接触させられる。

【0363】

特定の実施形態において、PBMCまたは単離されたT細胞は、 $IL-2$ 、 $IL-7$ 、及び／または $IL-15$ などの適切なサイトカインを含む培養培地において、刺激剤及び共刺激剤、例えば可溶性の抗 $CD3$ 抗体及び抗 $CD28$ 抗体、またはビーズもしくは他の表面に結合した抗体、ならびに／またはPI3K/Akt/mTOR細胞シグナル伝達経

10

20

30

40

50

路を調節する1つ以上の薬剤と接触させられる。

【0364】

好ましい実施形態では、本明細書において想定される方法によって製造されたT細胞は、改善された養子免疫療法組成物を提供する。いずれかの特定の理論に束縛されることを望むものではないが、本明細書において想定される特定の実施形態の方法によって製造されたT細胞組成物は、生存率の増加、分化が比較的少ない増幅、及びインビボでの持続性を含む、優れた特性を有していると考えられる。一実施形態において、T細胞を製造する方法は、PI3K細胞シグナル伝達経路を調節する1つ以上の薬剤と細胞を接触させることを含む。一実施形態において、T細胞を製造する方法は、PI3K/Akt/mTOR細胞シグナル伝達経路を調節する1つ以上の薬剤と細胞を接触させることを含む。様々な実施形態において、T細胞は、任意の供給源から得られ、製造プロセスの活性化及び/または増幅段階中に薬剤と接触させられてよい。得られるT細胞組成物は、次のバイオマーカー：CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197、CD38、及びCD8のうちの1つ以上を増殖及び発現する能力を有する発達の強力なT細胞が濃縮されている。一実施形態において、1つ以上のPI3K阻害剤で処理されているT細胞を含む細胞集団は、次のバイオマーカー：CD62L、CD127、CD197、及びCD38のうちの1つ以上または全てを共発現するCD8⁺T細胞の集団が濃縮されている。

10

【0365】

一実施形態において、1つ以上のPI3K阻害剤で処理されているT細胞を含む細胞集団は、次のバイオマーカー：CD62L、CD127、CD27、及びCD8のうちの1つ以上または全てを共発現するCD8⁺T細胞の集団が濃縮されている。

20

【0366】

一実施形態では、維持されたレベルの増殖及び低減された分化を含む、改変されたT細胞が製造される。特定の実施形態において、T細胞は、1つ以上の刺激シグナル及びPI3K細胞シグナル伝達経路の阻害剤である薬剤の存在下で、活性化し増殖するようにT細胞を刺激することによって製造される。

【0367】

T細胞は次に、抗STnCARRを発現するように改変され得る。一実施形態において、T細胞は、本明細書において想定される抗STnCARRを含むウイルスベクターをT細胞に形質導入することによって改変される。ある特定の実施形態では、T細胞は、PI3K細胞シグナル伝達経路の阻害剤の存在下での刺激及び活性化の前に改変される。別の実施形態では、T細胞は、PI3K細胞シグナル伝達経路の阻害剤の存在下での刺激及び活性化の後に改変される。特定の実施形態において、T細胞は、PI3K細胞シグナル伝達経路の阻害剤の存在下での刺激及び活性化の12時間、24時間、36時間、または48時間以内に改変される。

30

【0368】

T細胞が活性化された後、細胞は増殖のために培養される。T細胞は、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回以上増幅しながら、少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日、少なくとも2週間、少なくとも1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、または6か月以上にわたって培養され得る。

40

【0369】

様々な実施形態において、T細胞組成物は、PI3K/Akt/mTOR細胞シグナル伝達経路の1つ以上の阻害剤の存在下で製造される。阻害剤は、この経路における1つ以上の活性または単一の活性を標的化し得る。いずれかの特定の理論に束縛されることを望むものではないが、製造プロセスの刺激、活性化、及び/または増幅段階中の処理、またはPI3K経路の1つ以上の阻害剤とT細胞の接触が、若いT細胞を優先的に増加させ、それによって優れた治療用T細胞組成物が生成されることが想定される。

【0370】

特定の実施形態において、操作されたT細胞受容体を発現するT細胞の増殖を増加させ

50

るための方法が提供される。かかる方法は、例えば、対象からT細胞源を採取すること、P I 3 K経路の1つ以上の阻害剤の存在下でT細胞を刺激及び活性化すること、抗S T n C A Rを発現するようにT細胞を改変すること、及び培養物中でT細胞を増幅させることを含み得る。

【0371】

ある特定の実施形態では、次のバイオマーカー：C D 6 2 L、C C R 7、C D 2 8、C D 2 7、C D 1 2 2、C D 1 2 7、C D 1 9 7、C D 3 8、及びC D 8のうちの1つ以上の発現のために濃縮されたT細胞の集団を産生するための方法が想定される。一実施形態において、若いT細胞は、次の生物学的マーカー：C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 1 9 7、及びC D 3 8のうちの1つ以上または全てを含む。

10

【0372】

一実施形態において、若いT細胞は、次の生物学的マーカー：C D 6 2 L、C D 1 2 7、C D 2 7、及びC D 8のうちの1つ以上または全てを含む。

【0373】

一実施形態において、C D 5 7、C D 2 4 4、C D 1 6 0、P D - 1、C T L A 4、T I M 3、及びL A G 3の発現を欠いている若いT細胞が提供される。本明細書の他の箇所で詳解されるように、発現レベル若いT細胞バイオマーカーは、より分化したT細胞または免疫エフェクター細胞集団におけるかかるマーカーの発現レベルと相対的なものである。

【0374】

20

一実施形態では、末梢血単核細胞(P B M C)が、本明細書において想定されるT細胞の製造方法におけるT細胞源として使用される。P B M Cは、C D 4⁺、C D 8⁺、またはC D 4⁺、及びC D 8⁺であり得るTリンパ球の不均一集団を形成し、単球、B細胞、N K細胞、及びN K T細胞といった他の単核細胞を含み得る。本明細書において想定される操作されたT C RまたはC A Rをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、ヒトドナーT細胞、N K細胞、またはN K T細胞の集団に導入され得る。特定の実施形態では、フローサイトメトリを使用し、正常に形質導入された発現ベクターを有するT細胞を分別して、C D 3陽性T細胞を単離し、次に、抗C D 3抗体及びもしくは抗C D 2 8抗体、ならびにI L - 2、I L - 7、及び/またはI L - 1 5を使用した細胞活性化に加えて、改変されたT細胞の数を増加させるためにさらに繁殖させることができる。

30

【0375】

本明細書において想定される製造方法は、貯蔵及び/またはヒト対象に使用するための調製のための、改変されたT細胞の凍結保存をさらに含み得る。一実施形態では、解凍に際し細胞が生存可能なままであるように免疫エフェクター細胞を凍結保存することを含む、S T n発現糖タンパク質を標的化する、遺伝子改変されたマウス、ヒト、またはヒト化C A Rタンパク質を発現する免疫エフェクター細胞を貯蔵するための方法が提供される。C A Rタンパク質を発現する免疫エフェクター細胞の画分を、当該技術分野で知られる方法によって凍結保存すると、がん細胞で発現するS T n発現糖タンパク質に苦しむ患者の将来の治療のための、かかる細胞の永続的な供給源を提供することができる。T細胞は、解凍に際し細胞が生存可能なままであるように凍結保存される。必要に応じて、凍結保存された形質転換免疫エフェクター細胞は、かかる細胞をさらに得るために、解凍、増殖、及び増幅され得る。本明細書で使用される場合、「凍結保存」とは、(典型的には)77 Kまたは-196 (液体窒素の沸点)などの氷点下温度に冷却することによる細胞の保存を指す。凍結保護剤は、多くの場合、保存される細胞が低温での凍結または室温への加温により損傷するのを防ぐために、氷点下温度で使用される。凍結保存剤及び最適な冷却速度は、細胞の損傷を防ぐことができる。使用され得る凍結保護剤としては、ジメチルスルホキシド(D M S O)(L o v e l o c k a n d B i s h o p, N a t u r e, 1959; 183: 1394-1395、A s h w o o d - S m i t h, N a t u r e, 1961; 190: 1204-1205)、グリセロール、ポリビニルピロリドン(R i n f r e t, A n n. N. Y. A c a d. S c i., 1960; 85: 576)、及びポリ

40

50

エチレングリコール (Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48) が挙げられるが、それらに限定されない。好ましい冷却速度は、1 ~ 3 /分である。少なくとも2時間後、T細胞は - 80 の温度に達し、長期低温貯蔵槽などにおける永続的な貯蔵のために液体窒素 (- 196) に直接入れることができる。

【0376】

1. T細胞

改善されたCAR T細胞組成物の製造が、特定の実施形態で提供される。CAR T細胞産生に使用されるT細胞は、自家性/自律性(「自己」)であっても、非自家性(「非自己」、例えば、同種、同系、または異種)であってもよい。好ましい実施形態では、T細胞は、哺乳動物対象から得られる。より好ましい実施形態では、T細胞は、霊長類対象から得られる。最も好ましい実施形態では、T細胞は、ヒト対象から得られる。

【0377】

T細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺腫、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含むがそれらに限定されない、いくつかの供給源から得ることができる。ある特定の実施形態において、T細胞は、当業者に知られる任意の数の技術、例えば遠心沈降、例えばFICOLL(商標)分離などを使用して、対象から収集された血液単位から得ることができる。一実施形態において、個体の循環血液からの細胞が、アフエーシスによって得られる。アフエーシス産物は、通常、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球細胞、赤血球細胞、及び血小板を含めたリンパ球を含む。一実施形態では、アフエーシスにより収集された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、細胞を後続処理のために適切な緩衝液または培地に入れてもよい。これらの細胞は、PBS、またはカルシウム、マグネシウム、そして全てではないがほとんどの他の二価カチオンを含まない別の好適な溶液で洗浄することができる。当業者には理解されるように、洗浄ステップは、当業者に知られる方法、例えば半自動フロースルー遠心分離機の使用などによって達成され得る。例えば、Cobe 2991細胞プロセッサ、Baxter Cytomateなどである。洗浄後、これらの細胞は、種々の生体適合性緩衝液、または緩衝液ありもしくはなしの他の食塩水溶液に再懸濁させてもよい。ある特定の実施形態において、アフエーシス試料の望まれない成分は、この細胞を直接再懸濁させた培養培地中で除去することができる。

【0378】

特定の実施形態において、T細胞、例えば、PBMCを含む細胞集団が、本明細書において想定される製造方法で使用される。他の実施形態では、単離または精製されたT細胞集団が、本明細書において想定される製造方法で使用される。細胞は、赤血球細胞を溶解し、例えば、PERCOLL(商標)グラジエントによる遠心分離によって単球を枯渇させることによって、末梢血単核細胞(PBMC)から単離することができる。いくつかの実施形態では、PBMCの単離後、細胞傷害性Tリンパ球とヘルパーTリンパ球との両方が、活性化、増幅、及び/もしくは遺伝子改変の前あるいは後に、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及びエフェクターT細胞の亜集団に分別され得る。

【0379】

特定の実施形態において、T細胞、例えば、PBMCを含む細胞集団が、本明細書において想定される製造方法で使用される。他の実施形態では、単離または精製されたT細胞集団が、本明細書において想定される製造方法で使用される。細胞は、赤血球細胞を溶解し、例えば、PERCOLL(商標)グラジエントによる遠心分離によって単球を枯渇させることによって、末梢血単核細胞(PBMC)から単離することができる。いくつかの実施形態では、PBMCの単離後、細胞傷害性Tリンパ球とヘルパーTリンパ球との両方が、活性化、増幅、及び/もしくは遺伝子改変の前あるいは後に、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及びエフェクターT細胞の亜集団に分別され得る。

【0380】

特定の実施形態において、本明細書において想定される方法を使用してCARを発現す

るように遺伝子改変されているが正または負の選択を受けていないP B M C から、免疫エフェクター細胞の集団が製造される。ある特定の実施形態では、P B M C の単離後、Tリンパ球がさらに単離され、ある特定の実施形態では、細胞傷害性Tリンパ球とヘルパーTリンパ球との両方が、遺伝子改変及び/もしくは増幅の前あるいは後に、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及びエフェクターT細胞の亜集団に分別され得る。

【0381】

ある特定の実施形態において、次のマーカー：CD3、CD4、CD8、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62、CD127、及びHLA-DRのうちの1つ以上を発現するT細胞の特定の亜集団が、正または負の選択技術によってさらに単離され得る。一実施形態において、i) CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197、ii) CD62L、CD127、CD197、及びCD38、またはiii) CD62L、CD127、CD27、及びCD8からなる群から選択されるマーカーのうちの1つ以上を発現するT細胞の特定の亜集団が、正または負の選択技術によってさらに単離される。様々な実施形態において、製造されたT細胞組成物は、次のマーカー：CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3、及びLAG3のうちの1つ以上を発現しないか、または実質的に発現しない。

10

【0382】

一実施形態において、i) CD62L、CD127、CD197、及びCD38、またはii) CD62L、CD127、CD27、及びCD8からなる群から選択されるマーカーのうちの1つ以上の発現は、PI3K阻害剤なしで活性化及び増幅させたT細胞集団と比較して、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、またはそれ以上増加する。一実施形態において、T細胞は、CD8⁺T細胞を含む。

20

【0383】

一実施形態において、CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3、及びLAG3からなる群から選択されるマーカーのうちの1つ以上の発現は、PI3K阻害剤ありで活性化及び増幅させたT細胞集団と比較して、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、またはそれ以上減少する。一実施形態において、T細胞は、CD8⁺T細胞を含む。

30

【0384】

一実施形態において、本明細書において想定される製造方法は、ナイーブT細胞または発達の強力なT細胞の1つ以上のマーカーを含むCAR T細胞の数を増加させる。いずれかの特定の理論に束縛されることを望むものではないが、本発明者らは、T細胞を含む細胞集団を1つ以上のPI3K阻害剤で処理すると、発達の強力なT細胞の増幅が増加し、既存のCAR T細胞両方と比較してより堅実かつ有効な養子性CAR T細胞免疫療法がもたらされると考える。

【0385】

本明細書において想定される方法を使用して製造されたT細胞で増加する、ナイーブT細胞または発達の強力なT細胞のマーカーの例証となる例としては、i) CD62L、CD127、CD197、及びCD38、またはii) CD62L、CD127、CD27、及びCD8が挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態において、ナイーブT細胞は、次のマーカー：CD57、CD244、CD160、PD-1、BTLA、CD45RA、CTLA4、TIM3、及びLAG3のうちの1つ以上を発現しないか、または実質的に発現しない。

40

【0386】

T細胞に関して、本明細書において想定される様々な増幅方法から生じるT細胞集団は、用いられる条件に応じて種々の特定の表現型特性を有し得る。様々な実施形態において、増幅されたT細胞集団は、次の表現型マーカー：CD62L、CD27、CD127、

50

CD197、CD38、CD8、及びHLA-DRのうちの1つ以上を含む。

【0387】

一実施形態において、そのような表現型マーカーは、CD62L、CD127、CD197、及びCD38のうちの1つ以上または全ての発現の増強を含む。特定の実施形態において、CD62L、CD127、CD197、及びCD38を含むナイーブT細胞の表現型マーカーの発現を特徴とするCD8⁺Tリンパ球が増幅する。

【0388】

一実施形態において、そのような表現型マーカーは、CD62L、CD127、CD27、及びCD8のうちの1つ以上または全ての発現の増強を含む。特定の実施形態において、CD62L、CD127、CD27、及びCD8を含むナイーブT細胞の表現型マーカーの発現を特徴とするCD8⁺Tリンパ球が増幅する。

10

【0389】

特定の実施形態において、CD45RO、CD62L、CD127、CD197、及びCD38を含む中枢メモリーT細胞の表現型マーカーの発現を特徴とし、かつグランザイムBに陰性のT細胞が増幅する。いくつかの実施形態では、中枢メモリーT細胞は、CD45RO⁺、CD62L⁺、CD8⁺T細胞である。

【0390】

ある特定の実施形態において、CD62Lを含むナイーブCD4⁺細胞の表現型マーカーの発現を特徴とし、かつCD45RA及び/またはCD45ROの発現が陰性のCD4⁺Tリンパ球が増幅する。いくつかの実施形態では、CD62L及びCD45RO陽性を含む中枢メモリーCD4⁺細胞の表現型マーカーの発現を特徴とするCD4⁺細胞。いくつかの実施形態では、エフェクターCD4⁺細胞は、CD62L陽性及びCD45RO陰性である。

20

【0391】

ある特定の実施形態において、T細胞は、抗STnCARRを発現するように遺伝子改変される前に、個体から単離され、インビトロで増殖するよう活性化され刺激される。この点において、T細胞は、遺伝子改変される（すなわち、本明細書において想定される抗STnCARRを発現するように形質導入またはトランスフェクトされる）前及び/または後に培養されてもよい。

【0392】

30

2. 活性化及び増幅

T細胞組成物の十分な治療用量を達成するために、T細胞は多くの場合、1回以上の刺激、活性化、及び/または増幅を受ける。T細胞は概して、例えば、米国特許第6,352,694号、同第6,534,055号、同第6,905,680号、同第6,692,964号、同第5,858,358号、同第6,887,466号、同第6,905,681号、同第7,144,575号、同第7,067,318号、同第7,172,869号、同第7,232,566号、同第7,175,843号、同第5,883,223号、同第6,905,874号、同第6,797,514号、及び同第6,867,041号（これらの各々は参照により全体が本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して活性化及び増幅され得る。抗STnCARRを発現するように改変されるT細胞は、T細胞が改変される前及び/または後に活性化及び増幅され得る。加えて、T細胞は、活性化及び/もしくは増幅の前、その間、ならびに/またはその後に、PI3K/Akt/mTOR細胞シグナル伝達経路を調節する1つ以上の薬剤と接触させられてもよい。一実施形態において、本明細書において想定される方法によって製造されたT細胞は、1回、2回、3回、4回、または5回以上の活性化及び増幅を受け、これらの各々は、PI3K/Akt/mTOR細胞シグナル伝達経路を調節する1つ以上の薬剤を含み得る。

40

【0393】

人工抗原提示細胞（aAPC）は、天然のAPCの使用とは対照的に、外因性サイトカインの付加を必要とすることなく、機能性ヒトCD8⁺T細胞のエキスビボ増殖及び長期増幅を支持する。特定の実施形態において、PBMCMまたは単離されたT細胞は、IL-

50

2、IL-7、及び/またはIL-15などの適切なサイトカインを含む培養培地において、概してピーズまたは他の表面に結合した抗CD3抗体及び抗CD28抗体などの刺激剤及び共刺激剤と接触させられる。

【0394】

他の実施形態では、種々の共刺激分子及びサイトカインの安定した発現ならびに分泌を指向するようにK562、U937、721.221、T2、及びC1R細胞を操作することにより作製された人工APC(aAPC)。特定の実施形態において、aAPC細胞表面上での1つ以上の抗体ベースの刺激分子の提示を指向するために、K32またはU32 aAPCが使用される。T細胞集団は、CD137L(4-1BBL)、CD134L(OX40L)、及び/またはCD80もしくはCD86を含むがそれらに限定されない、種々の共刺激分子を発現するaAPCによって増幅させることができる。aAPCは、遺伝子改変T細胞を増幅させ、CD8⁺T細胞でのCD28発現を維持するのに効率的なプラットフォームを提供する。WO 03/057171及びUS2003/0147869に提供されるaAPCは、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0395】

一実施形態において、共刺激リガンドが、T細胞上の同族の共刺激分子に特異的に結合する抗原提示細胞(例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など)で提示され、それにより、例えばTCR/CD3複合体の結合によりもたらされる一次シグナルに加えて、所望のT細胞応答を媒介するシグナルが提供される。好適な共刺激リガンドとしては、CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド(ICOS-L)、細胞間接着分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンフォトキシンベータ受容体、ILT3、ILT4、Tollリガンド受容体に結合する作動薬または抗体、及びB7-H3と特異的に結合するリガンドが挙げられるが、それらに限定されない。

【0396】

特定の実施形態において、共刺激リガンドは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、リンパ球機能関連抗原1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、及びCD83と特異的に結合するリガンドを含むがそれらに限定されない、T細胞上に存在する共刺激分子に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0397】

好適な共刺激リガンドは、標的抗原をさらに含み、これは、可溶形態で提供されても、または改変T細胞で発現する操作されたTCRもしくはCARに結合するAPCもしくはaAPCで発現してもよい。

【0398】

様々な実施形態において、本明細書において想定されるT細胞を製造するための方法は、T細胞を含む細胞集団を活性化させること、及びT細胞集団を増幅させることを含む。T細胞活性化は、T細胞TCR/CD3複合体によって、またはCD2表面タンパク質の刺激を介して一次的な刺激シグナルを提供すること、及びアクセサリー分子、例えばCD28によって二次的な共刺激シグナルを提供することによって達成され得る。

【0399】

TCR/CD3複合体は、好適なCD3結合剤、例えばCD3リガンドまたは抗CD3モノクローナル抗体とT細胞を接触させることによって刺激され得る。CD3抗体の例証となる例としては、OKT3、G19-4、BC3、及び64.1が挙げられるが、それらに限定されない。

【0400】

別の実施形態では、CD2結合剤が、一次刺激シグナルをT細胞に提供するために使用され得る。CD2結合剤の例証となる例としては、CD2リガンド及び抗CD2抗体、例えば、T11.1またはT11.2抗体と組み合わせたT11.3抗体(Meuer, S. C. et al. (1984) Cell 36:897-906)、及び9-1抗体と

組み合わせた 9 . 6 抗体 (これは T I 1 . 1 と同じエピトープを認識する) (Yang, S. Y. et al. (1986) J. Immunol. 137: 1097 - 1100) が挙げられるが、それらに限定されない。上述の抗体のいずれかと同じエピトープに結合する他の抗体も使用することができる。本明細書の他の箇所に開示される標準的技術によって、付加的な抗体、または抗体の組み合わせを調製及び特定することができる。

【0401】

T C R / C D 3 複合体によって、または C D 2 を介して提供される一次刺激シグナルに加えて、T 細胞応答の誘導は、第 2 の共刺激シグナルを必要とする。特定の実施形態において、C D 2 8 結合剤が、共刺激シグナルを提供するために使用され得る。C D 2 8 結合剤の例証となる例としては、天然の C D 2 8 リガンド、例えば、C D 2 8 の天然リガンド (例えば、B 7 - 1 (C D 8 0) 及び B 7 - 2 (C D 8 6 などのタンパク質の B 7 ファミリーのメンバー)、ならびに C D 2 8 分子に架橋結合することのできる抗 C D 2 8 モノクローナル抗体またはその断片、例えば、モノクローナル抗体 9 . 3、B - T 3、X R - C D 2 8、K O L T - 2、1 5 E 8、2 4 8 . 2 3 . 2、及び E X 5 . 3 D 1 0 が挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0402】

一実施形態において、一次刺激シグナルを提供する分子、例えば、T C R / C D 3 複合体または C D 2 によって刺激を提供する分子、及び共刺激分子は、同じ表面に結合する。

【0403】

ある特定の実施形態において、刺激シグナル及び共刺激シグナルを提供する結合剤は、細胞の表面上に局在化される。これは、細胞表面でのその発現に好適な形態における結合剤をコードする核酸を細胞にトランスフェクトもしくは形質導入することによって、あるいは結合剤を細胞表面に結合させることによって達成することができる。

20

【0404】

別の実施形態では、一次刺激シグナルを提供する分子、例えば、T C R / C D 3 複合体または C D 2 によって刺激を提供する分子、及び共刺激分子は、抗原提示細胞で提示される。

【0405】

一実施形態において、一次刺激シグナルを提供する分子、例えば、T C R / C D 3 複合体または C D 2 によって刺激を提供する分子、及び共刺激分子は、別々の表面上に提供される。

30

【0406】

ある特定の実施形態では、刺激シグナル及び共刺激シグナルを提供する結合剤のうちの 1 つは、可溶性であり (溶液で提供され)、他の薬剤 (複数可) は、1 つ以上の表面上に提供される。

【0407】

特定の実施形態において、刺激シグナル及び共刺激シグナルを提供する結合剤は、両方とも可溶形態で提供される (溶液で提供される)。

【0408】

様々な実施形態において、本明細書において想定される T 細胞を製造するための方法は、抗 C D 3 抗体及び抗 C D 2 8 抗体で T 細胞を活性化させることを含む。

40

【0409】

本明細書において想定される方法によって製造された T 細胞組成物は、P I 3 K 細胞シグナル伝達経路を阻害する 1 つ以上の薬剤の存在下で活性化及び / または増幅された T 細胞を含む。抗 S T n C A R を発現するように改変される T 細胞は、T 細胞が改変される前及び / または後に活性化及び増幅され得る。特定の実施形態において、T 細胞集団は、活性化され、抗 S T n C A R を発現するように改変され、次に増幅のために培養される。

【0410】

一実施形態において、本明細書において想定される方法によって製造された T 細胞は、

50

高い増殖の可能性及び自己再生能力を示すマーカーを発現するが、T細胞分化のマーカーを発現しないか、またはその発現が実質的に検出不可能である、増加した数のT細胞を含む。これらのT細胞は、堅実な様式で繰り返し活性化及び増幅され、それにより改善された治療用T細胞組成物が提供され得る。

【0411】

一実施形態において、PI3K細胞シグナル伝達経路を阻害する1つ以上の薬剤の存在下で活性化及び増幅されたT細胞集団は、PI3K阻害剤なしで活性化及び増幅されたT細胞集団と比較して、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、またはそれ以上増幅される。

10

【0412】

一実施形態において、PI3K細胞シグナル伝達経路を阻害する1つ以上の薬剤の存在下で活性化及び増幅された若いT細胞であるマーカーの発現を特徴とするT細胞集団は、PI3K阻害剤なしで活性化及び増幅されたT細胞集団と比較して、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、またはそれ以上増幅される。

20

【0413】

一実施形態において、本明細書において想定される方法によって活性化されたT細胞の増幅は、T細胞を含む細胞集団を、数時間（約3時間）から約7日間～約28日間、またはそれらの間の任意の時間単位の整数値にわたって培養することをさらに含む。別の実施形態では、T細胞組成物は、14日間培養され得る。特定の実施形態において、T細胞は、約21日間培養される。別の実施形態では、T細胞組成物は、約2～3日間培養される。T細胞の培養時間が60日以上になり得るように、数サイクルの刺激/活性化/増幅が所望される場合もある。

【0414】

特定の実施形態において、T細胞培養に適切な条件としては、適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI Media 1640もしくはX-vivo 15 (Lonza)）、ならびに、血清（例えば、ウシ胎仔血清またはヒト血清）、インターロイキン-2 (IL-2)、インスリン、IFN-、IL-4、IL-7、IL-21、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF-、及びTNF-、または当業者に知られる細胞の増殖に好適な任意の他の添加剤を含むがそれらに限定されない、増殖及び生存能に必要な1つ以上の要素が挙げられる。

30

【0415】

細胞培養培地のさらなる例証となる例としては、アミノ酸、ビルビン酸ナトリウム、及びビタミンが添加され、血清不含であるか、あるいは適切な量の血清（もしくは血漿）または定義されたホルモニー式、ならびに/またはT細胞の増殖及び増幅に十分な量のサイトカイン（複数可）が補充された、RPMI 1640、Clicks、AIM-V、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 15、及びX-Vivo 20、Optimizerが挙げられるが、それらに限定されない。

40

【0416】

T細胞増幅のための他の添加剤の例証となる例としては、界面活性剤、ピアスマネート (piasmanate)、HEPESなどのpH緩衝剤、ならびにN-アセチル-システイン及び2-メルカプトエタノールなどの還元剤が挙げられるが、それらに限定されない。

【0417】

抗生物質、例えば、ペニシリン及びストレプトマイシンは、実験用培養物にのみ含まれ

50

、対象に注入される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、増殖の支持に必要な条件下、例えば、適切な温度（例えば、37）及び雰囲気（例えば、空気 + 5% CO₂）に維持される。

【0418】

3. 薬剤

様々な実施形態において、細胞のPI3K経路を調節する薬剤とT細胞を接触させることを含む、未分化または発達の強力なT細胞を増幅させる、T細胞を製造するための方法が提供される。様々な実施形態において、細胞のPI3K/AKT/mTOR経路を調節する薬剤とT細胞を接触させることを含む、未分化または発達の強力なT細胞を増幅させる、T細胞を製造するための方法が提供される。細胞は、活性化ならびに増幅の前、その間、及び/またはその後に接触させられ得る。T細胞組成物は、それらが分化の実質的增加を伴わずに複数回の増幅を受けることができるように、十分なT細胞の効力を保持する。

10

【0419】

本明細書で使用される場合、「調節する」、「調節因子」、もしくは「調節剤」という用語、または比較可能な用語は、細胞シグナル伝達経路の変化を誘発する薬剤の能力を指す。調節因子は、経路成分の量、活性を増加または減少させるか、あるいは細胞シグナル伝達経路の所望の効果もしくは出力を増加または減少させることができる。一実施形態において、調節因子は阻害剤である。別の実施形態では、調節因子は活性化因子である。

【0420】

20

「薬剤」は、PI3K/AKT/mTOR経路の調節に使用される化合物、小分子、例えば、有機小分子、核酸、ポリペプチド、またはそれらの断片、アイソフォーム、バリエーション、類似体、もしくは誘導体を指す。

【0421】

「小分子」は、約5 kD未満、約4 kD未満、約3 kD未満、約2 kD未満、約1 kD未満、または約0.5 kD未満の分子量を有する組成物を指す。小分子は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣薬、ペプチド、炭水化物、脂質、それらの成分、または他の有機分子もしくは無機分子を含み得る。真菌、細菌、または藻類の抽出物などの化学的及び/または生物学的混合物のライブラリは、当該技術分野で知られており、アッセイのいずれかをを用いてスクリーニングされ得る。分子ライブラリの合成方法の例は、(Carell et al., 1994a, Carell et al., 1994b, Ho et al., 1993, DeWitt et al., 1993, Gallop et al., 1994, Zuckermann et al., 1994)に見出すことができる。

30

【0422】

「類似体」は、ある化合物、ヌクレオチド、タンパク質、もしくはポリペプチド、または所望の活性を有する化合物と同様もしくは同一の活性または機能（複数可）を有するが、必ずしも好ましい実施形態の配列または構造と同様もしくは同一の配列または構造を含む必要はない、小有機化合物、ヌクレオチド、タンパク質、またはポリペプチドを指す。

【0423】

40

「誘導体」は、アミノ酸残基の置換、欠失、もしくは付加の導入によって変更されている親タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列を含む化合物、タンパク質、またはポリペプチドか、あるいは、ヌクレオチドの置換もしくは欠失、付加または変異の導入のいずれかによって改変されている核酸またはヌクレオチドのいずれかを指す。誘導体である核酸、ヌクレオチド、タンパク質、またはポリペプチドは、親ポリペプチドと同様または同一の機能を有する。

【0424】

様々な実施形態において、PI3K経路を調節する薬剤は、経路の成分を活性化させる。「活性化因子」または「作動薬」は、PI3Kの1つ以上の活性を活性化させる分子を含むがそれに限定されない、PI3K/AKT/mTOR経路における分子の1つ以上の

50

活性を促進、増加、または誘導する薬剤を指す。

【0425】

様々な実施形態において、PI3K経路を調節する薬剤は、経路の成分を阻害する。「阻害剤」または「拮抗薬」は、PI3Kの1つ以上の活性を阻害する分子を含むがそれに限定されない、PI3K/AKT/mTOR経路における分子の1つ以上の活性を阻害、減少、または低減する薬剤を指す。一実施形態において、阻害剤は、二重分子阻害剤である。特定の実施形態では、阻害剤は、同じまたは実質的に同様の活性を有するクラスの分子を阻害し得る（汎阻害剤）か、または分子の活性を特異的に阻害し得る（選択的または特異的阻害剤）。阻害は、不可逆的であっても可逆的であってもよい。

【0426】

一実施形態において、阻害剤は、少なくとも1 nM、少なくとも2 nM、少なくとも5 nM、少なくとも10 nM、少なくとも50 nM、少なくとも100 nM、少なくとも200 nM、少なくとも500 nM、少なくとも1 μM、少なくとも10 μM、少なくとも50 μM、または少なくとも100 μMのIC50を有する。IC50の決定は、当該技術分野で知られる任意の従来技術を使用して達成することができる。例えば、IC50は、ある範囲の濃度の研究中の阻害剤の存在下で所与の酵素の活性を測定することによって決定することができる。次に、実験で得られた酵素活性値を、使用した阻害剤濃度に対してプロットする。50%の酵素活性（あらゆる阻害剤の非存在下での活性と比較して）を示す阻害剤の濃度を「IC50」値とする。類似的に、活性の適切な定量によって他の阻害剤濃度を定義することができる。

【0427】

様々な実施形態において、T細胞は、少なくとも1 nM、少なくとも2 nM、少なくとも5 nM、少なくとも10 nM、少なくとも50 nM、少なくとも100 nM、少なくとも200 nM、少なくとも500 nM、少なくとも1 μM、少なくとも10 μM、少なくとも50 μM、少なくとも100 μM、または少なくとも1 Mの濃度で、PI3K/AKT/mTOR経路の1つ以上の調節因子と接触させられるか、またはそれで処理されるか、またはそれと共に培養される。

【0428】

特定の実施形態において、T細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回以上増幅しながら、少なくとも12時間、18時間、少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日、少なくとも2週間、少なくとも1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、または6か月以上にわたって、PI3K/AKT/mTOR経路の1つ以上の調節因子と接触させられるか、またはそれで処理されるか、またはそれと共に培養されてもよい。

【0429】

ホスファチジル - イノシトール - 3キナーゼ/Akt/哺乳類ラパマイシン標的 (mammalian target of rapamycin) 経路は、成長因子シグナル伝達を細胞の増殖、分化、代謝、及び生存と統合する導管として機能する。PI3Kは、高度に保存された細胞内脂質キナーゼのファミリーである。クラスIAのPI3Kは、直接的に、あるいはアダプター分子のインスリン受容体基質ファミリーとの相互作用を介して、成長因子受容体チロシンキナーゼ(RTK)によって活性化される。この活性は、セリン/スレオニンキナーゼAktの制御因子であるホスファチジル - イノシトール - 3, 4, 5 - トリスホスフェート (trisphosphate) (PIP3) の産生をもたらす。mTORは、明確に異なる活性を付与する異なる結合パートナーを各々が特徴とする2つの明確に異なる複合体を介して、正準な (canonical) PI3K経路を通じて作用する。mTORC1 (PRAS40、raptor、及びmLST8/Gblと複合したmTOR) は、PI3K/Aktシグナル伝達の下流エフェクターとして作用し、成長因子シグナルをタンパク質翻訳、細胞成長、増殖、及び生存に関連付ける。mTORC2 (riCTOR、mSIN1、protor、及びmLST8と複合したmTOR) は、Aktの上流活性化因子として作用する。

【0430】

PI3Kが成長因子受容体を媒介して活性化されると、Aktがそのプレクストリン相同ドメインのPIP3との相互作用によって膜に動員され、したがってその活性化ループが露出し、構成的活性型のホスホイノシチド依存性タンパク質キナーゼ1(PDK1)によるスレオニン308(Thr308)におけるリン酸化が可能になる。最大の活性化のために、Aktは、そのC末端側の疎水性モチーフのセリン473(Ser473)において、mTORC2によってもリン酸化される。DNA-PK及びHSPもまた、Akt活性の調節において重要であることが示されている。Aktは、TSC1と共に、mTORC1の正の制御因子であるRheb-GTPアーゼを阻害することによってmTORC1を負に調節する、TSC2の阻害性リン酸化によってmTORC1を活性化する。mTORC1は、2つの明確に定義された基質、p70S6K(以後S6K1と称す)及び4E-BP1を有し、これらは両方ともタンパク質合成を決定的に調節する。したがって、mTORC1は、成長因子シグナル伝達をタンパク質翻訳及び細胞増殖と関連付けるPI3Kの重要な下流エフェクターである。

10

【0431】

a. PI3K阻害剤

本明細書で使用される場合、「PI3K阻害剤」という用語は、PI3Kに結合し、その少なくとも1つの活性を阻害する核酸、ペプチド、化合物、または有機小分子を指す。PI3Kタンパク質は、クラス1のPI3K、クラス2のPI3K、及びクラス3のPI3Kという3つのクラスに分類することができる。クラス1のPI3Kは、4つのp110触媒サブユニット(p110、p110、p110、及びp110)のうちの1つ、及び制御サブユニットの2つのファミリーのうちの1つからなるヘテロ二量体として存在する。特定の実施形態において、PI3K阻害剤は、クラス1のPI3K阻害剤を標的化するのが好ましい。一実施形態において、PI3K阻害剤は、クラス1のPI3K阻害剤の1つ以上のアイソフォームに対する選択性(すなわち、p110、p110、p110、及びp110、またはp110、p110、p110、及びp110のうちの1つ以上に対する選択性)を提示する。別の実施形態では、PI3K阻害剤はアイソフォーム選択性を提示せず、「汎PI3K阻害剤」とみなされる。一実施形態において、PI3K阻害剤は、PI3K触媒ドメインとの結合に関してATPと競合する。

20

30

【0432】

ある特定の実施形態において、PI3K阻害剤は、例えば、PI3K-AKT-mTOR経路においてPI3Kならびに付加的なタンパク質を標的化し得る。特定の実施形態において、mTORとPI3Kとの両方を標的化するPI3K阻害剤は、mTOR阻害剤あるいはPI3K阻害剤と称される場合がある。PI3Kのみを標的とするPI3K阻害剤は、選択的PI3K阻害剤と称され得る。一実施形態において、選択的PI3K阻害剤は、経路におけるmTOR及び/または他のタンパク質に対する阻害剤のIC50よりも少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、またはそれ以上低いPI3Kに対する50%阻害濃度を示す薬剤を指すものと理解することができる。

40

【0433】

特定の実施形態において、例示的なPI3K阻害剤は、約200nM以下、好ましくは約100nM以下、さらにより好ましくは約60nM以下、約25nM、約10nM、約5nM、約1nM、100μM、50μM、25μM、10μM、1μM以下のIC50(活性の50%を阻害する濃度)でPI3Kを阻害する。一実施形態において、PI3K阻害剤は、約2nM~約100nM、より好ましくは約2nM~約50nM、さらにより好ましくは約2nM~約15nMのIC50でPI3Kを阻害する。

【0434】

本明細書において想定されるT細胞製造方法で使用するのに好適なPI3K阻害剤の例証となる例としては、BKM120(クラス1のPI3K阻害剤、Novartis)、

50

X L 1 4 7 (クラス 1 の P I 3 K 阻害剤、E x e l i x i s)、(汎 P I 3 K 阻害剤、G l a x o S m i t h K l i n e)、及び P X - 8 6 6 (クラス 1 の P I 3 K 阻害剤；p 1 1 0、p 1 1 0、及び p 1 1 0 アイソフォーム、O n c o t h y r e o n) が挙げられるが、それに限定されない。

【 0 4 3 5 】

選択的 P I 3 K 阻害剤の他の例証となる例としては、B Y L 7 1 9、G S K 2 6 3 6 7 7 1、T G X - 2 2 1、A S 2 5 2 4 2、C A L - 1 0 1、Z S T K 4 7 4、及び I P I - 1 4 5 が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 4 3 6 】

汎 P I 3 K 阻害剤のさらなる例証となる例としては、B E Z 2 3 5、L Y 2 9 4 0 0 2、G S K 1 0 5 9 6 1 5、T G 1 0 0 7 1 3、及び G D C - 0 9 4 1 が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 4 3 7 】

好ましい実施形態において、P I 3 K 阻害剤は、Z S T K 4 7 4 である。

【 0 4 3 8 】

b . A K T 阻害剤

本明細書で使用される場合、「A K T 阻害剤」という用語は、A K T の少なくとも 1 つの活性を阻害する核酸、ペプチド、化合物、または有機小分子を指す。A K T 阻害剤は、脂質系阻害剤 (例えば、A K T が形質膜に局在化することを防ぐ A K T のプレクストリン相同ドメインを標的とする阻害剤)、A T P 競合阻害剤、及びアロステリック阻害剤を含むいくつかのクラスにグループ分けすることができる。一実施形態において、A K T 阻害剤は、A K T 触媒部位に結合することによって作用する。特定の実施形態において、A k t 阻害剤は、m T O R などの下流 A K T 標的のリン酸化を阻害することによって作用する。別の実施形態では、A K T 活性は、例えば、A K T の D N A - P K 活性化、A K T の P D K - 1 活性化、及び / または A k t の m T O R C 2 活性化を阻害することにより、A k t を活性化させる入力シグナルを阻害することによって阻害される。

【 0 4 3 9 】

A K T 阻害剤は、A K T 1、A K T 2、A K T 3 の 3 つ全ての A K T アイソフォームを標的としてもよく、またはアイソフォーム選択性であり A K T アイソフォームのうちの 1 つまたは 2 つのみを標的としてもよい。一実施形態において、A K T 阻害剤は、P I 3 K - A K T - m T O R 経路において A K T ならびに付加的なタンパク質を標的化し得る。A K T のみを標的とする A K T 阻害剤は、選択的 A K T 阻害剤と称され得る。一実施形態において、選択的 A K T 阻害剤は、経路における他のタンパク質に対する阻害剤の I C 5 0 よりも少なくとも 1 0 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 5 0 倍、少なくとも 1 0 0 倍、少なくとも 1 0 0 0 倍、またはそれ以上低い A K T に対する 5 0 % 阻害濃度を示す薬剤を指すものと理解することができる。

【 0 4 4 0 】

特定の実施形態では、例示的な A K T 阻害剤は、約 2 0 0 n M 以下、好ましくは約 1 0 0 n M 以下、さらにより好ましくは約 6 0 n M 以下、約 2 5 n M、約 1 0 n M、約 5 n M、約 1 n M、1 0 0 μ M、5 0 μ M、2 5 μ M、1 0 μ M、1 μ M 以下の I C 5 0 (活性の 5 0 % を阻害する濃度) で A K T を阻害する。一実施形態において、A K T は、約 2 n M ~ 約 1 0 0 n M、より好ましくは約 2 n M ~ 約 5 0 n M、さらにより好ましくは約 2 n M ~ 約 1 5 n M の I C 5 0 で A K T を阻害する。

【 0 4 4 1 】

オーリスタチン系抗体 - 薬物接合体と組み合わせて使用するための A K T 阻害剤の例証となる例としては、例えば、ペリフォシン (K e r y x)、M K 2 2 0 6 (M e r c k)、V Q D - 0 0 2 (V i o Q u e s t)、X L 4 1 8 (E x e l i x i s)、G S K 6 9 0 6 9 3、G D C - 0 0 6 8、及び P X 3 1 6 (P R O L X P h a r m a c e u t i c a l s) が挙げられる。

【 0 4 4 2 】

10

20

30

40

50

選択的 A k t 1 阻害剤の例証となる非限定的な例は A - 6 7 4 5 6 3 である。

【 0 4 4 3 】

選択的 A k t 2 阻害剤の例証となる非限定的な例は C C T 1 2 8 9 3 0 である。

【 0 4 4 4 】

特定の実施形態において、A k t 阻害剤 A k t の D N A - P K 活性化、A k t の P D K - 1 活性化、A k t の m T O R C 2 活性化、または A k t の H S P 活性化。

【 0 4 4 5 】

D N A - P K 阻害剤の例証となる例としては、N U 7 4 4 1、P I - 1 0 3、N U 7 0 2 6、P I K - 7 5、及び P P - 1 2 1 が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 4 4 6 】

c . m T O R 阻害剤

「m T O R 阻害剤」または「m T O R を阻害する抗原」という用語は、m T O R タンパク質の少なくとも 1 つの活性、例えば、その基質（例えば、p 7 0 S 6 キナーゼ 1、4 E - B P 1、A K T / P K B、及び e E F 2）のうちの少なくとも 1 つに対するセリン / スレオニンタンパク質キナーゼ活性などを阻害する、核酸、ペプチド、化合物、または有機小分子を指す。m T O R 阻害剤は、m T O R C 1、m T O R C 2、または m T O R C 1 と m T O R C 2 との両方に直接結合し、それらを阻害することができる。

【 0 4 4 7 】

m T O R C 1 及び / または m T O R C 2 活性の阻害は、P I 3 K / A k t / m T O R 経路のシグナル伝達の低減によって定量することができる。多様な読み出し情報を用いて、そのようなシグナル伝達経路の出力の低減を立証することができる。いくつかの非限定的な例示的読み出し情報としては、(1) 5 4 7 3 及び T 3 0 8 を含むがそれらに限定されない残基における A k t のリン酸化の減少；(2) 例えば、F o x 0 1 / O 3 a T 2 4 / 3 2、G S K 3 a / 、S 2 1 / 9、及び T S C 2 T 1 4 6 2 を含むがそれらに限定されない A k t 基質のリン酸化の低減によって証明される A k t の活性化の減少；(3) リボソーム S 6 S 2 4 0 / 2 4 4、7 0 S 6 K T 3 8 9、及び 4 E B P 1 T 3 7 / 4 6 を含むがそれらに限定されない m T O R の下流のシグナル伝達分子のリン酸化の減少；ならびに (4) がん性細胞の増殖の阻害が挙げられる。

【 0 4 4 8 】

一実施形態において、m T O R 阻害剤は、活性部位阻害剤である。これらは、m T O R の A T P 結合部位（A T P 結合ポケットとも称される）に結合し、m T O R C 1 と m T O R C 2 との両方の触媒活性を阻害する m T O R 阻害剤である。本明細書において想定される T 細胞製造方法で使用するのに好適な 1 つのクラスの活性部位阻害剤は、P I 3 K と m T O R との両方を標的とし直接阻害する二重特異性阻害剤である。二重特異性阻害剤は、m T O R 及び P I 3 K の A T P 結合部位の両方に結合する。そのような阻害剤の例証となる例としては、イミダゾキナゾリン、ワートマニン、L Y 2 9 4 0 0 2、P I - 1 0 3 (C a y m a n C h e m i c a l)、S F 1 1 2 6 (S e m a f o r e)、B G T 2 2 6 (N o v a r t i s)、X L 7 6 5 (E x e l i x i s)、及び N V P - B E Z 2 3 5 (N o v a r t i s) が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 4 4 9 】

本明細書において想定される方法で使用するのに好適な別のクラスの m T O R 活性部位阻害剤は、1 つ以上の I 型ホファチジルイノシトール (p h o p h a t i d y l i n o s i t o l) 3 - キナーゼ、例えば、P I 3 キナーゼ、または に対して、m T O R C 1 及び m T O R C 2 活性を選択的に阻害する。これらの活性部位阻害剤は、m T O R の活性部位には結合するが、P I 3 K の活性部位には結合しない。そのような阻害剤の例証となる例としては、ピラゾロピリミジン、T o r i n 1 (G u e r t i n a n d S a b a t i n i)、P P 2 4 2 (2 - (4 - アミノ - 1 - イソプロピル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン - 3 - イル) - 1 H - インドール - 5 - オール)、P P 3 0、K u - 0 0 6 3 7 9 4、W A Y - 6 0 0 (W y e t h)、W A Y - 6 8 7 (W y e t h)、W A Y - 3 5 4 (W y e t h)、及び A Z D 8 0 5 5 (L i u e t a l . , N a

10

20

30

40

50

ture Review, 8, 627-644, 2009) が挙げられるが、それらに限定されない。I

【0450】

一実施形態において、選択的mTOR阻害剤とは、1つ、2つ、3つ、もしくはそれ以上のI型PI3キナーゼ、またはI型PI3キナーゼの全てに対する阻害剤のIC50よりも少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、またはそれ以上低い、mTORC1及び/またはmTORC2に対する50%阻害濃度(IC50)を示す薬剤を指す。

【0451】

特定の実施形態で使用するための別のクラスのmTOR阻害剤は、本明細書において「ラパログ」と称される。本明細書で使用される「ラパログ」という用語は、mTORFRBドメイン(FKBPラパマイシン結合ドメイン)に選択的に結合し、ラパマイシンと構造的に関連しており、mTOR阻害特性を保持する化合物を指す。ラパログという用語は、ラパマイシンを除外する。ラパログには、ラパマイシンのエステル、エーテル、オキシム、ヒドラゾン、及びヒドロキシルアミン、ならびにラパマイシンのコア構造上の官能基が例えば還元または酸化により修飾されている化合物が含まれる。そのような化合物の薬学的に許容される塩もラパマイシン誘導体とみなされる。本明細書において想定される方法で使用するのに好適なラパログの例証となる例としては、限定されないが、テムシロリムス(CC1779)、エベロリムス(RAD001)、デフォロリムス(AP23573)、AZD8055(Astrazeneca)、及びOSI-027(OSI)が挙げられる。

【0452】

一実施形態において、薬剤は、mTOR阻害剤ラパマイシン(シロリムス)である。

【0453】

特定の実施形態において、例示的なmTOR阻害剤は、約200nM以下、好ましくは約100nM以下、さらにより好ましくは約60nM以下、約25nM、約10nM、約5nM、約1nM、100μM、50μM、25μM、10μM、1μM以下のIC50(活性の50%を阻害する濃度)で、mTORC1、mTORC2、あるいはmTORC1とmTORC2との両方を阻害する。一実施形態では、mTOR阻害剤は、約2nM～約100nM、より好ましくは約2nM～約50nM、さらにより好ましくは約2nM～約15nMのIC50で、mTORC1、mTORC2、あるいはmTORC1とmTORC2との両方を阻害する。

【0454】

一実施形態において、例示的なmTOR阻害剤は、約200nM以下、好ましくは約100nM以下、さらにより好ましくは約60nM以下、約25nM、約10nM、約5nM、約1nM、100μM、50μM、25μM、10μM、1μM以下のIC50(活性の50%を阻害する濃度)で、PI3K及びmTORC1またはmTORC2、あるいはmTORC1とmTORC2との両方及びPI3Kを阻害する。一実施形態では、mTOR阻害剤は、約2nM～約100nM、より好ましくは約2nM～約50nM、さらにより好ましくは約2nM～約15nMのIC50で、PI3K及びmTORC1またはmTORC2、あるいはmTORC1とmTORC2との両方及びPI3Kを阻害する。

【0455】

特定の実施形態で使用するのに好適なmTOR阻害剤のさらなる例証となる例としては、AZD8055、INK128、ラパマイシン、PF-04691502、及びエベロリムスが挙げられるが、それらに限定されない。

【0456】

mTORは、ウェスタンブロッティングにおいてリン光体特異的抗体により測定された場合に、生理学的基質タンパク質p70S6リボソームタンパク質キナーゼI(p70S6K1)及びeIF4E結合タンパク質1(4EBP1)に対して堅実かつ特異的な触媒活性を示すことが示されている。

【 0 4 5 7 】

一実施形態において、P I 3 K / A K T / m T O R 経路の阻害剤は、B I - D 1 8 7 0、H 8 9、P F - 4 7 0 8 6 7 1、F M K、及びA T 7 8 6 7 からなる群から選択される s 6 キナーゼ阻害剤である。

【 0 4 5 8 】

I . 組成物及び製剤

本明細書において想定される組成物は、本明細書において想定される、1つ以上のポリペプチド、ポリヌクレオチド、それらを含むベクター、遺伝子改変免疫エフェクター細胞などを含み得る。組成物は、薬学的組成物を含むが、これに限定されない。「薬学的組成物」は、単独で、あるいは1つ以上の他の治療様式と組み合わせて細胞もしくは動物に投与するための、薬学的に許容される溶液または生理学的に許容される溶液において製剤化される組成物を指す。また、所望される場合、組成物が、例えばサイトカイン、成長因子、ホルモン、小分子、化学療法薬、プロドラッグ、薬物、抗体、または他の様々な薬学的活性剤といった他の薬剤と組み合わせて投与されてもよいことは理解されよう。付加的な薬剤が意図される療法を提供する組成物の能力に有害に作用しない限り、組成物中に含まれてもよい他の成分に実質的な制限はない。

10

【 0 4 5 9 】

「薬学的に許容される」という表現は、本明細書において、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激作用、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わずにヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに好適な、妥当な利益/リスク比に見合った化合物、材料、組成物、及び/または剤形を指すために用いられる。

20

【 0 4 6 0 】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤」は、限定されないが、ヒトまたは飼育動物に使用するのに許容可能なものとして米国食品医薬品局によって承認されている任意のアジュバント、担体、賦形剤、滑剤、甘味剤、希釈剤、防腐剤、染料/着色剤、風味増強剤、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、安定剤、等張剤、溶媒、界面活性剤、または乳化剤を含む。例示的な薬学的に許容される担体としては、ラクトース、グルコース、及びスクロースなどの糖類；トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプンなどのデンプン類；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロースなどのセルロース及びその誘導体；トラガカント；モルト；ゼラチン；タルク；カカオバター、ワックス、動物脂及び植物油、パラフィン、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、酸化亜鉛；落花生油、綿実油、紅花油、胡麻油、オリーブ油、トウモロコシ油、及び大豆油などの油類；プロピレングリコールなどのグリコール類；グリセリン、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコールなどのポリオール類；オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル類；寒天；水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；パイロジェンフリー水；等張食塩水；リンゲル溶液；エチルアルコール；リン酸緩衝溶液、ならびに薬学的製剤において用いられる任意の他の適合性物質が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 4 6 1 】

特定の実施形態において、組成物は、本明細書において想定される、ある量のC A R 発現免疫エフェクター細胞を含む。本明細書で使用される場合、「量」という用語は、遺伝子改変された治療用細胞、例えばT細胞が、有益なもしくは所望される臨床結果を含めた予防的結果または治療的結果を達成するのに「有効な量」または「有効量」を指す。

40

【 0 4 6 2 】

「予防有効量」は、所望の予防的結果を達成するのに有効な遺伝子改変された治療用細胞の量を指す。必ずしもそうではないが典型的には、予防的用量は疾患の発生前または初期段階で対象に使用されるため、予防有効量は、治療有効量未満である。

【 0 4 6 3 】

遺伝子改変された治療用細胞の「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する幹細胞及び前駆細胞の能力などの要因

50

によって異なり得る。治療有効量はまた、ウイルスまたは形質導入された治療用細胞のいかなる毒性もしくは有害な作用をも治療上有益な効果が上回るものである。「治療有効量」という用語は、対象（例えば患者）を「治療」するのに有効な量を含む。治療量が示される場合、投与されるべき組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染もしくは転移の範囲、及び状態の個々の差を考慮して医師により決定され得る。本明細書に記載のT細胞を含む薬学的組成物は、体重1 kg当たり $10^2 \sim 10^{10}$ 個の細胞、好ましくは体重1 kg当たり $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞の投薬量（これらの範囲内の全ての整数値を含む）で投与され得ると概説することができる。細胞数は、組成物中に含まれる細胞型と同様に、組成物の意図される最終的な用途に依存する。本明細書に提供される用途において、細胞は、概して1リットル以下の容量であり、500 mL以下、さらには250 mLまたは100 mL以下であってもよい。したがって、所望の細胞の密度は、典型的には 10^6 細胞/mL超であり、概して 10^7 細胞/mL超、概して 10^8 細胞/mL以上である。臨床的に関連する免疫細胞数は、累積的に 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、または 10^{12} 細胞と等しいかまたはそれを超える複数回の注入に分配され得る。いくつかの実施形態では、特に、注入された細胞の全てが特定の標的抗原に再指向されるため、 10^6 /キログラム（患者当たり $10^6 \sim 10^{11}$ ）の範囲内の低い細胞数が投与され得る。CAR発現細胞組成物は、これらの範囲内の投薬量で複数回投与され得る。細胞は、療法を受ける患者に対して同種、同系、異種、または自家性であってもよい。所望される場合、治療は、免疫応答の誘導を増強するために、本明細書に記載されるマイトジェン（例えばPHA）またはリンホカイン、サイトカイン、及び/もしくはケモカイン（例えば、IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18、及びTNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 など）の投与を含んでもよい。

【0464】

概して、本明細書に記載されるように活性化及び増幅された細胞を含む組成物は、免疫不全の個体において生じる疾患の治療及び防止に用いられ得る。特に、本明細書において想定されるCAR改変T細胞を含む組成物は、がんの治療に使用される。特定の実施形態において、CAR改変T細胞は、単独投与されてもよく、あるいは担体、希釈剤、賦形剤、及び/またはIL-2もしくは他のサイトカインもしくは細胞集団などの他の成分と組み合わせた薬学的組成物として投与されてもよい。特定の実施形態において、薬学的組成物は、1つ以上の薬学的もしくは生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせた、ある量の遺伝子改変T細胞を含む。

【0465】

T細胞などのCAR発現免疫エフェクター細胞集団を含む薬学的組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース、またはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；及び防腐剤を含み得る。特定の実施形態において、組成物は、好ましくは、非経口投与、例えば、血管内（静脈内または動脈内）、腹腔内または筋肉内投与のために製剤化される。

【0466】

液体薬学的組成物は、それらが溶液であるか、懸濁液であるか、または他の同様の形態であるかにかかわらず、注射用水、食塩水溶液、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張食塩水などの無菌希釈剤、溶媒もしくは懸濁媒として機能し得る合成モノグリセリドもしくはジグリセリドなどの固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；アセテート、シトレート、またはホスフェートなどの緩衝液、及び塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性を調整するための薬剤のうちの1つ以上を含み得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラスもしくはプラスチ

ック製の多用量バイアルに封入され得る。注射用の薬学的組成物は、無菌であることが好ましい。

【0467】

一実施形態において、本明細書において想定されるT細胞組成物は、薬学的に許容される細胞培養培地において製剤化される。そのような組成物は、ヒト対象への投与に好適である。特定の実施形態において、薬学的に許容される細胞培養培地は、血清不含培地である。

【0468】

血清不含培地は、簡素かつより明確に定義された組成、低い程度の混入物、感染因子源の可能性の排除、及びコストの低下を含め、血清含有培地に比べていくつかの利点を有する。様々な実施形態において、血清不含培地は動物質不含であり、任意選択によりタンパク質不含であってもよい。任意選択により、培地は生物薬剤学的に許容される組換えタンパク質を含んでもよい。「動物質不含」培地とは、成分が非動物源に由来する培地を指す。動物質不含培地では、組換えタンパク質が天然の動物タンパク質に取って代わり、栄養素は合成源、植物源、または微生物源から得られる。対照的に、「タンパク質不含」培地は、タンパク質を実質的に含まないものと定義される。

10

【0469】

特定の組成物に使用される血清不含培地の例証となる例としては、QBSF-60 (Quality Biological, Inc.)、StemPro-34 (Life Technologies)、及びX-VIVO 10が挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0470】

好ましい一実施形態では、本明細書において想定されるT細胞を含む組成物は、PlasmaLyte Aを含む溶液において製剤化される。

【0471】

別の好ましい実施形態では、本明細書において想定されるT細胞を含む組成物は、凍結保存培地を含む溶液において製剤化される。例えば、凍結保存剤を含む凍結保存培地を使用して、解凍後の高い細胞生存成績を維持することができる。特定の組成物に使用される凍結保存培地の例証となる例としては、CryoStor CS10、CryoStor CS5、及びCryoStor CS2が挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0472】

より好ましい実施形態では、本明細書において想定されるT細胞を含む組成物は、50:50のPlasmaLyte AとCryoStor CS10を含む溶液において製剤化される。

【0473】

特定の実施形態において、組成物は、有効量のCAR発現免疫エフェクター細胞を、単独で、または1つ以上の治療剤との組み合わせで含む。したがって、CAR発現免疫エフェクター細胞組成物は、単独で投与されても、または他の公知のがん治療、例えば放射線療法、化学療法、移植、免疫療法、ホルモン療法、光線力学的療法などと組み合わせて投与されてもよい。組成物はまた、抗生物質と組み合わせて投与されてもよい。そのような治療剤は、本明細書に記載される特定の疾患状態、例えば特定のがんなどの標準的治療として、当該技術分野で認められている場合がある。想定される例示的な治療剤としては、サイトカイン、成長因子、ステロイド、NSAID、DMARD、抗炎症薬、化学療法薬、放射線療法薬、治療用抗体、または他の活性剤及び補助剤が挙げられる。

40

【0474】

ある特定の実施形態において、本明細書に開示されるCAR発現免疫エフェクター細胞を含む組成物は、任意の数の化学療法剤と併せて投与されてもよい。化学療法剤の例証となる例としては、チオテパ及びシクロホスファミド (CYTOXAN (商標)) などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、及びピボスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、及びウレドパなどのアジリジン；アル

50

トレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホス
 ホラミド、及びトリメチロロメラミンレジューム (trimethylololomelamine resume) を含むエチレンイミンならびにメチルアメラミン；クロラムブ
 シル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メ
 クロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネス
 テリン、ブレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジ
 ェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチ
 ン、ラニムスチンなどのニトロソウレア；アクラシロマイシン、アクチノマイシン、オー
 スラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カ
 ラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、
 ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソ
 ルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシ
 ン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロ
 マイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ス
 レプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなどの抗生物
 質；メトトレキサート及び5 - フルオロウラシル (5 - F U) などの代謝拮抗剤；デノブ
 テリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フ
 ルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；
 アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキ
 シウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5 - F U などのピリ
 ミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メ
 ピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、ト
 リロスタンなどの抗副腎剤；フロリン酸などの葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホス
 ファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；
 エダトラキサート；デホファミン；デメコルシン；ジアジコン；エフォルミチン；酢酸エ
 リブチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミ
 ン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；
 フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン
 ；P S K (登録商標) ；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸
 ；トリアジコン；2 , 2 ' , 2 " - トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン
 ；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；
 ガシトシン；アラビノシド (「 A r a - C 」) ；シクロホスファミド；チオテパ；タキシ
 イド、例えば、パクリタキセル (T A X O L (登録商標) 、 B r i s t o l - M y e r s
 S q u i b b O n c o l o g y , P r i n c e t o n , N . J .) 及びドセタキセル
 (T A X O T E R E (登録商標) 、 R h n e - P o u l e n c R o r e r , A n t o n y , F r a n c e) ；クロランブシル；ゲムシタビン；6 - チオグアニン；メルカプトブ
 リン；メトトレキサート；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金類似体；ピンブラ
 スチン；白金；エトボシド (V P - 1 6) ；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキ
 サントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニボシド；
 ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロナート；C P T - 1 1 ；トポイ
 ソメラーゼ阻害剤 R F S 2 0 0 0 ；ジフルオロメチルオミチン (D M F O) ；T a r g r e t i n (商標) (ペキサロテン) 、 P a n r e t i n (商標) (アリトレチノイン) な
 どのレチノイン酸誘導体；O N T A K (商標) (デニロイキンジフチトクス) ；エスペラ
 ミシン；カペシタビン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘
 導体が挙げられる。この定義には、がんに対するホルモン作用を調節または阻害するよう
 に作用する抗ホルモン剤、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4
 (5) - イミダゾール、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフ
 ェン、L Y 1 1 7 0 1 8 、オナプリストン、及びトレミフェン (F a r e s t o n) を含
 む抗エストロゲン薬など；ならびにフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、リユープロ
 リド、及びゴセレリンなどの抗アンドロゲン薬；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容

10

20

30

40

50

される塩、酸、または誘導体も含まれる。

【0475】

種々の他の治療剤が、本明細書に記載の組成物と併せて使用され得る。一実施形態において、CAR発現免疫エフェクター細胞を含む組成物は、抗炎症剤と共に投与される。抗炎症剤または抗炎症薬としては、ステロイド及びグルココルチコイド（ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロンを含む）、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗TNF薬物、シクロホスファミド、及びミコフェノレートを含む非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）が挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0476】

他の例示的なNSAIDは、イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、VIOXX（登録商標）（ロフェコキシブ）及びCELEBREX（登録商標）（セレコキシブ）などのCox-2阻害剤、ならびにシアリレート（sialylate）からなる群から選ばれる。例示的な鎮痛薬は、アセトアミノフェン、オキシコドン、プロボルキシフェン（proporxyphene）塩酸塩のトラマドールからなる群から選ばれる。例示的なグルココルチコイドは、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、またはプレドニゾンからなる群から選ばれる。例示的な生体応答修飾物質としては、細胞表面マーカー（例えば、CD4、CD5など）に対して指向される分子、TNF拮抗薬（例えば、エタネルセプト（ENBREL（登録商標））、アダリムマブ（HUMIRA（登録商標））、及びインフリキシマブ（REMICADE（登録商標））などのサイトカイン阻害剤、ケモカイン阻害剤、ならびに接着分子阻害剤が挙げられる。生体応答修飾物質は、モノクローナル抗体ならびに組換え形態の分子を含む。例示的なDMARDとしては、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシリラミン、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、金（経口（オーラノフィン）及び筋肉内）、及びミノサイクリンが挙げられる。

20

【0477】

本明細書において想定されるCAR改変T細胞との組み合わせに好適な治療用抗体の例証となる例としては、バビツキシマブ、ベバシズマブ（アバスタチン）、ビバツズマブ、ブリナツモマブ、コナツムマブ、ダラツムマブ、ドゥリゴツマブ、ダセツズマブ、ダロツズマブ、エロツズマブ（HuLuc63）、ゲムツズマブ、イブリツモマブ、インダツキシマブ、イノツズマブ、ロルボツズマブ、ルカツムマブ、ミラツズマブ、モキセツモマブ、オカラツズマブ、オフアツムマブ、リツキシマブ、シルツキシマブ、テプロツムマブ、及びウブリツキシマブが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0478】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の組成物は、サイトカインと併せて投与される。本明細書で使用される「サイトカイン」とは、1つの細胞集団によって放出され、細胞間の介在物質として別の細胞に作用するタンパク質の総称を意味する。そのようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインの中には、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体ホルモン（LH）などの糖タンパク質ホルモン；肝臓成長因子；線維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子-アルファ及び-ベータ；ミューラー管抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF-ベータなどの神経成長因子；血小板成長因子；TGF-アルファ及びTGF-ベータなどの形質転換成長因子（TGF）；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン-アルファ、ベータ、及び-ガンマなどのイン

40

50

ターフェロン；マクロファージ - C S F (M - C S F) などのコロニー刺激因子 (C S F) ；顆粒球 - マクロファージ - C S F (G M - C S F) ；ならびに顆粒球 - C S F (G - C S F) ； I L - 1、 I L - 1 アルファ、 I L - 2、 I L - 3、 I L - 4、 I L - 5、 I L - 6、 I L - 7、 I L - 8、 I L - 9、 I L - 10、 I L - 11、 I L - 12、 I L - 15 などのインターロイキン (I L)、 T N F - アルファまたは T N F - ベータなどの腫瘍壊死因子；ならびに L I F 及びキットリガンド (K L) を含む他のポリペプチド因子が含まれる。本明細書で使用される場合、サイトカインという用語は、天然源由来または組換え細胞培養物由来のタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な同等物を含む。

【 0 4 7 9 】

10

特定の実施形態において、組成物は、本明細書に開示される P I 3 K 阻害剤の存在下で培養され、かつ次のマーカー： C D 3、 C D 4、 C D 8、 C D 2 7、 C D 2 8、 C D 4 5 R A、 C D 4 5 R O、 C D 6 2 L、 C D 1 2 7、及び H L A - D R のうちの 1 つ以上を発現し、正または負の選択技術によってさらに単離され得る、本明細書において想定される C A R T 細胞を含む。一実施形態において、組成物は、 i) C D 6 2 L、 C C R 7、 C D 2 8、 C D 2 7、 C D 1 2 2、 C D 1 2 7、 C D 1 9 7、 i i) C D 6 2 L、 C D 1 2 7、 C D 1 9 7、 C D 3 8、ならびに i i i) C D 6 2 L、 C D 2 7、 C D 1 2 7、及び C D 8 からなる群から選択されるマーカーのうちの 1 つ以上を発現する T 細胞の特定の亜集団を含み、正または負の選択技術によってさらに単離される。様々な実施形態において、組成物は、次のマーカー： C D 5 7、 C D 2 4 4、 C D 1 6 0、 P D - 1、 C T L A 4、 T I M 3、及び L A G 3 のうちの 1 つ以上を発現しないか、または実質的に発現しない。

20

【 0 4 8 0 】

一実施形態において、 C D 6 2 L、 C D 1 2 7、 C D 1 9 7、及び C D 3 8 からなる群から選択されるマーカーのうちの 1 つ以上の発現は、 P I 3 K 阻害剤なしで活性化及び増幅させた T 細胞集団と比較して、少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 2.5 倍、またはそれ以上増加する。

【 0 4 8 1 】

一実施形態において、 C D 6 2 L、 C D 1 2 7、 C D 2 7、及び C D 8 からなる群から選択されるマーカーのうちの 1 つ以上の発現は、 P I 3 K 阻害剤なしで活性化及び増幅させた T 細胞集団と比較して、少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 2.5 倍、またはそれ以上増加する。

30

【 0 4 8 2 】

一実施形態において、 C D 5 7、 C D 2 4 4、 C D 1 6 0、 P D - 1、 C T L A 4、 T I M 3、及び L A G 3 からなる群から選択されるマーカーのうちの 1 つ以上の発現は、 P I 3 K 阻害剤ありで活性化及び増幅させた T 細胞集団と比較して、少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 2.5 倍、またはそれ以上減少する。

40

【 0 4 8 3 】

J . 標的細胞及び抗原

標的細胞、例えばがん細胞に再指向され、標的細胞の S T n 発現糖タンパク質、例えば T A G - 7 2 に結合する結合ドメインを有する C A R を含む、遺伝子改変免疫エフェクター細胞。

【 0 4 8 4 】

本明細書で使用される場合、「がん」という用語は、概して、異常細胞が制御されずに分裂し、近くの組織に浸潤し得る疾患または状態のクラスに関する。

【 0 4 8 5 】

50

本明細書で使用される場合、「悪性」という用語は、腫瘍細胞の一群が未制御の増殖（すなわち、正常の限界を超えた分裂）、浸潤（すなわち、周囲組織への侵入及びその破壊）、及び転移（すなわち、リンパまたは血液を介した体内の他の位置への拡散）のうちの1つ以上を提示するがんを指す。本明細書で使用される場合、「転移する」という用語は、身体の一部から別の部分へとがんが拡散することを指す。拡散した細胞により形成された腫瘍は「転移性腫瘍」または「転移」と呼ばれる。転移性腫瘍は、元々（原発）の腫瘍の細胞と同様の細胞を含む。

【0486】

本明細書で使用される場合、「良性」または「非悪性」という用語は、大きく成長し得るが身体の一部に拡散しない腫瘍を指す。良性腫瘍は自己限定的であり、通常は浸潤または転移しない。

10

【0487】

「がん細胞」は、がん性腫瘍または組織の個々の細胞を指す。がん細胞は、固形がんと液性がんとの両方を含む。「腫瘍」または「腫瘍細胞」とは、概して、良性、前悪性、または悪性であり得る細胞の異常増殖により形成された腫脹または病変を指す。ほとんどのがんは腫瘍を形成するが、液性がん、例えば白血病は、必ずしも腫瘍を形成するわけではない。腫瘍を形成するがんに関しては、がん（細胞）及び腫瘍（細胞）という用語は互換的に使用される。個体における腫瘍の量は、腫瘍の数、体積、または重量として測定され得る「腫瘍負荷」である。

【0488】

20

一実施形態において、標的細胞は、他の正常な（所望の）細胞の表面上には実質的に見出されない抗原、例えば標的抗原を発現する。

【0489】

一実施形態において、標的細胞は、骨の細胞（bone cell）、骨細胞（osteocyte）、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、軟骨芽細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、筋芽細胞、筋細胞、平滑筋細胞、膀胱細胞、骨髄細胞、中枢神経系（CNS）細胞、末梢神経系（PNS）細胞、グリア細胞、アストロサイト細胞、ニューロン、色素細胞、上皮細胞、皮膚細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、乳房細胞、結腸細胞、食道細胞、胃腸管細胞、胃細胞、結腸細胞、頭部細胞、頸部細胞、歯肉細胞、舌細胞、腎細胞、肝細胞、肺細胞、上咽頭細胞、卵巣細胞、濾胞細胞、子宮頸部細胞、膣細胞、子宮細胞、腭細胞、腭実質細胞、腭管細胞、腭島細胞、前立腺細胞、陰茎細胞、生殖腺細胞、睾丸細胞、造血細胞、リンパ球系細胞、または骨髄系細胞である。

30

【0490】

一実施形態において、標的細胞は、STn発現糖タンパク質を発現する。一実施形態において、標的細胞は、造血細胞、食道細胞、肺細胞、卵巣細胞、子宮頸部細胞、膵臓細胞、胆嚢もしくは胆管の細胞、胃細胞、結腸細胞、乳房細胞、杯細胞、腸細胞、幹細胞、内皮細胞、上皮細胞、または、糖エピトープ、例えばST6GALNAC1を発現する任意の細胞である。

【0491】

ある特定の実施形態において、標的細胞は、腸（例えば、食道、胃、結腸）の内膜、乳房組織、肺組織、結腸組織、膵臓組織、胆嚢もしくは胆管組織、卵巣組織、子宮頸部組織、膀胱組織、腎臓組織、または上皮組織の一部である。

40

【0492】

特定の実施形態では、標的細胞は、STn発現糖タンパク質を発現するがん細胞またはがん幹細胞である。

【0493】

一実施形態において、標的細胞は、STn発現糖タンパク質を発現する固形がん細胞である。

【0494】

特定の実施形態で想定される組成物及び方法によって標的化することのできる細胞の例

50

証となる例としては、次の固形がん：副腎がん、副腎皮質癌、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、非定型奇形腫／ラブドイド腫瘍、基底細胞癌、胆管がん、膀胱がん、骨がん、脳／CNSがん、乳がん、気管支腫瘍、心臓腫瘍、子宮頸癌、胆管細胞癌、軟骨肉腫、脊索腫、結腸がん、結腸直腸がん、頭蓋咽頭腫、乳管内上皮内癌（DCIS）子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、感覚神経芽腫、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、眼がん、卵管がん、線維組織腫（fibrous histiocytoma）、線維肉腫、胆嚢がん、胃がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、胚細胞腫瘍、神経膠腫、神経膠芽腫、頭頸部がん、血管芽腫、肝細胞がん、下咽頭がん、眼球内黒色腫、カポジ肉腫、腎がん、喉頭がん、平滑筋肉腫、口唇がん、脂肪肉腫、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺癌、肺カルチノイド腫瘍、悪性中皮腫、髄様癌、髄芽腫、髄膜腫（menangioma）、黒色腫、メルケル細胞癌、正中管癌（midline tract carcinoma）、口がん、粘液肉腫、骨髓異形成症候群、骨髓増殖性腫瘍、鼻腔及び副鼻腔がん、上咽頭がん、神経芽細胞腫、乏突起神経膠腫、口頭がん、口腔がん、中咽頭がん、骨肉腫、卵巣がん、膵がん、膵島細胞腫瘍、乳頭癌、傍神経節腫、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体腫、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性腹膜がん、前立腺がん、直腸がん、網膜芽細胞腫、腎細胞癌、腎盂腎及び尿管がん、横紋筋肉腫、唾液腺がん、皮脂腺癌、皮膚がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、小細胞肺癌、小腸がん、胃のがん、汗腺癌、滑膜腫、精巣がん、咽喉がん、胸腺がん、甲状腺がん、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膣がん、血管がん、外陰がん、ならびにウィルムス腫瘍のものが挙げられるが、それらに限定されない。

10

20

【0495】

別の実施形態において、細胞は、STn発現糖タンパク質を発現する固形がん細胞である。本組成物を用いて防止、治療、もしくは寛解され得る例示的なSTn発現固形がん細胞としては、食道がん、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、膵がん、胆管癌、胃がん、結腸がん、膀胱がん、腎がん、及び乳がんが挙げられるが、それらに限定されない。

【0496】

特定の実施形態では、標的細胞は、STn発現糖タンパク質を発現する液性がんまたは血液がん細胞である。

【0497】

特定の実施形態で想定される組成物を用いて防止、治療、もしくは寛解され得る液性がんまたは血液がんの例証となる例としては、白血病、リンパ腫、及び多発性骨髄腫が挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0498】

特定の実施形態で想定される抗STN CARによって標的化され得る細胞の例証となる例としては、次の白血病：急性リンパ球性白血病（ALL）、T細胞急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病、有毛細胞白血病（HCL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、及び慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、ならびに真性多血症のものが挙げられるが、それらに限定されない。

【0499】

40

特定の実施形態で想定される組成物及び方法によって標的化され得る細胞の例証となる例としては、次のリンパ腫：ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、ならびに、B細胞非ホジキンリンパ腫：バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫；及びT細胞非ホジキンリンパ腫：菌状息肉症、未分化大細胞リンパ腫、セザリー症候群、及び前駆Tリンパ芽球性リンパ腫を含むがそれらに限定されない非ホジキンリンパ腫のものが挙げられるが、それらに限定されない。

【0500】

特定の実施形態で想定される組成物及び方法によって標的化され得る細胞の例証となる

50

例としては、次の多発性骨髄腫：顕性多発性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、非分泌型骨髄腫、I g D 骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、及び髄外性形質細胞腫のものが挙げられるが、それらに限定されない。

【0501】

特定の実施形態では、標的細胞は、S T n 発現糖タンパク質を発現するがん細胞またはがん幹細胞である。

【0502】

別の特定の実施形態では、標的細胞は、がん患者の細胞などのがん細胞である。

【0503】

K. 治療方法

本明細書において想定される遺伝子改変免疫エフェクター細胞は、S T n 発現糖タンパク質、例えばT A G - 7 2 を発現するがんの防止、治療、及び寛解に使用するための、またはS T n 発現がんに関連する少なくとも1つの症状を防止、治療、もしくは寛解するための、改善された養子免疫療法の方法を提供する。

【0504】

様々な実施形態において、本明細書において想定される遺伝子改変免疫エフェクター細胞は、対象においてS T n 発現糖タンパク質を発現するがん細胞における細胞傷害性を増加させるのに使用するための、または対象においてS T n を発現するがん細胞の数を減少させるのに使用するための、改善された養子免疫療法の方法を提供する。

【0505】

特定の実施形態において、一次免疫エフェクター細胞の特異性は、本明細書において想定されるC A R で一次免疫エフェクター細胞を遺伝子改変することにより、S T n 発現糖タンパク質を発現する細胞、例えばがん細胞に再指向される。様々な実施形態では、糖タンパク質で発現するS T n に結合する抗S T n 抗原結合ドメイン；ヒンジドメイン；膜貫通(T M)ドメイン、T MドメインをC A R の細胞内シグナル伝達ドメインに連結させる短いオリゴペプチドまたはポリペプチドリinker；及び1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびに一次シグナル伝達ドメインを含むC A R をコードする特定のポリヌクレオチドで免疫エフェクター細胞を遺伝子改変するために、ウイルスベクターが使用される。

【0506】

一実施形態において、がん細胞で発現するS T n 発現糖タンパク質を標的とするC A R を発現するようにT細胞が遺伝子改変され、C A R T細胞がそれを必要とする受容者に注入される、ある種の細胞療法が提供される。注入された細胞は、受容者の病原細胞を殺滅することができる。抗体療法とは異なり、C A R T細胞は、インビボで複製することができ、がん療法の持続につながり得る長期持続性をもたらす。

【0507】

一実施形態において、C A R T細胞は、堅実なインビボT細胞増幅を受けることができ、長時間にわたって持続することができる。別の実施形態では、C A R T細胞は、さらなる腫瘍形成または成長を阻害するように再活性化させることのできる特異的メモリーT細胞に進化する。

【0508】

特定の実施形態において、本明細書において想定されるC A Rを含む免疫エフェクター細胞を含む組成物が、S T n 発現糖タンパク質を発現するがん細胞またはがん幹細胞に関連する状態の治療に使用される。

【0509】

本明細書において想定されるC A Rを含む免疫エフェクター細胞を使用して治療、防止、または寛解することのできる状態の例証となる例としては、血液がん、食道がん、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、膵がん、胆管癌、胃がん、結腸がん、膀胱がん、腎がん、及び乳がんが挙げられるが、それらに限定されない。

【0510】

特定の実施形態において、本明細書において想定されるCAR改変T細胞を含む組成物は、固形がんの治療に使用される。ある特定の実施形態において、固形がんは、食道がん、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、膵がん、胆管癌、胃がん、膀胱がん、結腸がん、腎がん、及び乳がんからなる群から選択される。

【0511】

特定の実施形態において、本明細書において想定されるCAR改変T細胞を含む組成物は、液性がんまたは血液がんの治療に使用される。

【0512】

ある特定の実施形態において、液性がんまたは血液がんは、白血病、リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。

10

【0513】

ある特定の実施形態において、液性がんまたは血液がんは、急性リンパ球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病、有毛細胞白血病（HCL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、及び慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）及び真性多血症、ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、周辺帯リンパ腫、菌状息肉症、未分化大細胞リンパ腫、セザリー症候群、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、多発性骨髄腫、顕性多発性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、非分泌型骨髄腫、IgD骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、及び髄外性形質細胞腫からなる群から選択される。

20

【0514】

ある特定の実施形態において、液性がんまたは血液がんは、急性リンパ球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、有毛細胞白血病（HCL）、多発性骨髄腫（MM）、急性骨髄性白血病（AML）、または慢性骨髄性白血病（CML）からなる群から選択される。

【0515】

ある特定の実施形態において、液性がんまたは血液がんは、CLLである。

【0516】

特定の実施形態において、治療有効量の本明細書において想定されるCAR発現免疫エフェクター細胞またはそれを含む組成物を、それを必要とする患者に、単独で、または1つ以上の治療剤と組み合わせて投与することを含む方法が提供される。ある特定の実施形態において、この細胞は、STn発現糖タンパク質を発現するがん細胞に関連する状態を発症するリスクのある患者の治療に使用される。したがって、特定の実施形態において、治療有効量の本明細書において想定されるCAR改変細胞をそれを必要とする患者に投与することを含む、がんの少なくとも1つの症状の治療または防止または寛解のための方法。

30

【0517】

本明細書で使用される場合、「個体」及び「対象」という用語は、多くの場合互換的に使用され、遺伝子療法ベクター、細胞ベースの治療薬、及び本明細書の他の箇所で想定される方法を用いて治療され得る疾患、障害、または状態の症状を示す任意の動物を指す。好ましい実施形態では、対象は、遺伝子療法ベクター、細胞ベースの治療薬、及び本明細書の他の箇所で想定される方法を用いて治療され得るがんに関連する疾患、障害、または状態の症状を示す任意の動物を含む。好適な対象（例えば患者）は、実験動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、またはモルモットなど）、家畜、及び飼育動物またはペット（例えばネコまたはイヌなど）を含む。非ヒト霊長類、及び好ましくはヒト患者が含まれる。典型的な対照には、糖タンパク質でSTnを発現するがんを有するか、その診断経験があるか、またはそのリスクがあるか、もしくはそれを有するリスクのあるヒト患者が含まれる。

40

50

【0518】

本明細書で使用される場合、「患者」という用語は、遺伝子療法ベクター、細胞ベースの治療薬、及び本明細書の他の箇所で開示される方法を用いて治療され得る特定の疾患、障害、または状態と診断されたことのある対象を指す。

【0519】

本明細書で使用される「治療 (treatment)」または「治療すること (treating)」には、疾患または病態の症状もしくは病理に対する、あらゆる有益な作用または望ましい作用を含み、治療される疾患または状態の1つ以上の測定可能なマーカーの最小の低減さえも含み得る。治療は、任意選択により、低減疾患もしくは状態、または疾患もしくは状態の進行の遅延、例えば腫瘍増殖の遅延のいずれかを伴ってもよい。「治療」は、疾患もしくは状態、またはその関連症状の完全な根絶あるいは治癒を必ずしも意味しない。

10

【0520】

本明細書で使用される場合、「防止する (prevent)」及び「防止される (prevented)」、「防止すること (preventing)」などの同様の用語は、疾患もしくは状態の発生または再発の可能性を防止、阻害、または低減するための手法を示す。これは、疾患もしくは状態の発症または再発を遅延させること、あるいは疾患もしくは状態の症状の発生または再発を遅延させることも指す。本明細書で使用される場合、「防止 (prevention)」及び同様の用語には、疾患もしくは状態の強度、作用、症状、及び/または負荷を、疾患もしくは状態の発症または再発前に低減させることも含まれる。

20

【0521】

本明細書で使用される場合、「の少なくとも1つの症状を寛解させる」という表現は、対象が治療を受けている疾患または状態の1つ以上の症状を減少させることを指す。特定の実施形態において、治療される疾患または状態はがんであり、寛解される1つ以上の症状としては、脱力感、疲労、息切れ、易挫傷性及び易出血性、頻繁な感染症、リンパ節腫大、腹部の膨張または(腹部器官の肥大による)痛み、骨痛または関節痛、骨折、計画外の体重減少、食欲不振、寝汗、持続的微熱、及び(腎機能不全による)排尿減少が挙げられるが、それらに限定されない。

【0522】

30

「増強する」もしくは「促進する」、または「増加する」もしくは「増幅する」とは、概して、本明細書において想定される組成物、例えば、遺伝子改変T細胞またはCARをコードするベクターが、ビヒクルもしくは対照分子/組成物のいずれかによって引き起こされる応答と比較してより大きな生理学的応答(すなわち、下流作用)をもたらすか、誘発するか、または引き起こす能力を指す。測定可能な生理学的応答は、当該技術分野における理解及び本明細書の説明から明らかであるものの中でもとりわけ、T細胞の増幅、活性化、持続性の増加、及び/またはがん細胞殺滅能力の増加を含み得る。「増加した」または「増強された」量は、典型的には「統計的に有意な」量であり、ビヒクルまたは対照組成物によりもたらされる応答の1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、またはそれ以上(例えば、500、1000倍)(その間及び1を超える全ての整数ならびに小数点、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8などを含む)の増加を含み得る。

40

【0523】

「減少する」、または「低下する」、または「減らす」、または「低減する」、または「軽減する」とは、概して、本明細書において想定される組成物が、ビヒクルもしくは対照分子/組成物のいずれかによって引き起こされる応答と比較してより小さな生理学的応答(すなわち、下流作用)をもたらすか、誘発するか、または引き起こす能力を指す。「減少」または「低減した」量は、典型的には「統計的に有意な」量であり、ビヒクル、対照組成物によりもたらされる応答(参照応答)または特定の細胞系列における応答の1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍

50

、15倍、20倍、30倍、またはそれ以上（例えば、500、1000倍）（その間及び1を超える全ての整数ならびに小数点、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8などを含む）の減少を含み得る。

【0524】

「維持する」、または「保存する」、または「維持」、または「変化しない」、または「実質的に変化しない」、または「実質的に減少しない」とは、概して、本明細書において想定される組成物が、細胞において、ビヒクル、対照分子/組成物のいずれかによって引き起こされる応答、または特定の細胞系列における応答と比較した場合に実質的に同様もしくは比較可能な生理学的応答（すなわち、下流作用）をもたらすか、誘発するか、または引き起こす能力を指す。比較可能な応答とは、参照応答と有意な差がないもの、または測定可能な差がないものである。

10

【0525】

一実施形態において、がんの治療を必要とする対象にそれを行う方法は、本明細書において想定される遺伝子改変免疫エフェクター細胞を含む組成物を、有効量、例えば治療有効量で投与することを含む。適切な投薬量は臨床試験によって決定され得るが、投与の分量及び頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患の種類及び重症度などの要因によって決定される。

【0526】

一実施形態において、対象に投与される組成物中の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の量は、少なくとも 0.1×10^5 個の細胞、少なくとも 0.5×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^5 個の細胞、少なくとも 5×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^6 個の細胞、少なくとも 0.5×10^7 個の細胞、少なくとも 1×10^7 個の細胞、少なくとも 0.5×10^8 個の細胞、少なくとも 1×10^8 個の細胞、少なくとも 0.5×10^9 個の細胞、少なくとも 1×10^9 個の細胞、少なくとも 2×10^9 個の細胞、少なくとも 3×10^9 個の細胞、少なくとも 4×10^9 個の細胞、少なくとも 5×10^9 個の細胞、または少なくとも 1×10^{10} 個の細胞である。特定の実施形態において、約 1×10^7 個のT細胞～約 1×10^9 個のT細胞、約 2×10^7 個のT細胞～約 0.9×10^9 個のT細胞、約 3×10^7 個のT細胞～約 0.8×10^9 個のT細胞、約 4×10^7 個のT細胞～約 0.7×10^9 個のT細胞、約 5×10^7 個のT細胞～約 0.6×10^9 個のT細胞、または約 5×10^7 個のT細胞～約 0.5×10^9 個のT細胞が対象に投与される。

20

30

【0527】

一実施形態において、対象に投与される組成物中の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の量は、少なくとも 0.1×10^4 個の細胞/体重1kg、少なくとも 0.5×10^4 個の細胞/体重1kg、少なくとも 1×10^4 個の細胞/体重1kg、少なくとも 5×10^4 個の細胞/体重1kg、少なくとも 1×10^5 個の細胞/体重1kg、少なくとも 0.5×10^6 個の細胞/体重1kg、少なくとも 1×10^6 個の細胞/体重1kg、少なくとも 0.5×10^7 個の細胞/体重1kg、少なくとも 1×10^7 個の細胞/体重1kg、少なくとも 0.5×10^8 個の細胞/体重1kg、少なくとも 1×10^8 個の細胞/体重1kg、少なくとも 2×10^8 個の細胞/体重1kg、少なくとも 3×10^8 個の細胞/体重1kg、少なくとも 4×10^8 個の細胞/体重1kg、少なくとも 5×10^8 個の細胞/体重1kg、または少なくとも 1×10^9 個の細胞/体重1kgである。特定の実施形態において、約 1×10^6 個のT細胞/体重1kg～約 1×10^8 個のT細胞/体重1kg、約 2×10^6 個のT細胞/体重1kg～約 0.9×10^8 個のT細胞/体重1kg、約 3×10^6 個のT細胞/体重1kg～約 0.8×10^8 個のT細胞/体重1kg、約 4×10^6 個のT細胞/体重1kg～約 0.7×10^8 個のT細胞/体重1kg、約 5×10^6 個のT細胞/体重1kg～約 0.6×10^8 個のT細胞/体重1kg、または約 5×10^6 個のT細胞/体重1kg～約 0.5×10^8 個のT細胞/体重1kgが対象に投与される。

40

【0528】

所望の療法をもたらすために、本明細書において想定される組成物の複数回投与が必要

50

とされる場合があることは、当業者であれば認識するであろう。例えば、組成物は、1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、1年、2年、5年、10年、またはそれ以上のスパンにわたって、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回以上投与されてもよい。

【0529】

ある特定の実施形態において、活性化された免疫エフェクター細胞を対象に投与し、次に再採血し（またはアフエレーシスを行い）、そこから免疫エフェクター細胞を活性化させ、これらの活性化及び増幅した免疫エフェクター細胞を患者に再注入することが望ましい場合がある。このプロセスは、数週間毎に複数回行われてもよい。ある特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、10cc～400ccの採血から活性化され得る。ある特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、100cc、150cc、200cc、250cc、300cc、350cc、または400cc以上の採血から活性化される。理論に束縛されるものではないが、この複数回採血/複数回再注入プロトコルの使用は、ある特定の免疫エフェクター細胞集団を選出することに役立ち得る。

10

【0530】

本明細書において想定される組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸血、留置、または移植を含む、任意の簡便な様式で行うことができる。好ましい実施形態において、組成物は、非経口投与される。本明細書で使用される「非経口投与」及び「非経口投与される」という表現は、通常は注射による経腸及び局所投与以外の投与形態を指し、限定されないが、血管内、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、腫瘍内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、及び胸骨内の注射、ならびに注入を含む。一実施形態において、本明細書において想定される組成物は、腫瘍、リンパ節、または感染部位への直接注射によって対象に投与される。

20

【0531】

一実施形態において、それを必要とする対象は、対象のがんに対する細胞免疫応答を増加させるために有効量の組成物を投与される。免疫応答は、感染細胞、調節性T細胞、及びヘルパーT細胞応答を殺滅することのできる細胞傷害性T細胞によって媒介される細胞免疫応答を含み得る。B細胞を活性化させ、ひいては抗体産生をもたらすことのできるヘルパーT細胞により媒介される体液性免疫応答も誘導され得る。組成物により誘導される免疫応答の種類を分析するには種々の技術を使用することができ、これらは、当該技術分野において、例えば、Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y. に詳しく記載されている。

30

【0532】

T細胞媒介性殺滅の場合、CAR-リガンド結合がT細胞へのCARシグナル伝達を開始し、様々な機序によって標的細胞アポトーシスを誘導することのできるタンパク質を産生または放出するようにT細胞を誘導する、種々のT細胞シグナル伝達経路の活性化がもたらされる。これらのT細胞媒介機序としては、T細胞から標的細胞への細胞内細胞傷害性微小体の移入、標的細胞殺滅を直接（または他のキラーエフェクター細胞の動員によって間接的に）誘導することのできる炎症促進性サイトカインのT細胞分泌、及び標的細胞上の同族の細胞死受容体（例えばFas）に結合した後に標的細胞アポトーシスを誘導するT細胞表面上の細胞死受容体リガンド（例えばFasL）の上方制御が挙げられる（しかしそれらに限定されない）。

40

【0533】

一実施形態において、STn発現がんと診断された対象から免疫エフェクター細胞を取り出し、本明細書において想定されるCARをコードする核酸を含むベクターで該免疫エフェクター細胞を遺伝子改変し、それによって改変された免疫エフェクター細胞の集団を

50

生成し、改変された免疫エフェクター細胞の集団を同じ対象に投与することを含む、糖タンパク質でS T nを発現するがんと診断された対象を治療する方法が提供される。好ましい実施形態において、免疫エフェクター細胞は、T細胞を含む。

【0534】

ある特定の実施形態において、CAR分子をコードする核酸構築物を発現する免疫エフェクター細胞集団を対象に投与するステップを含む、対象において標的細胞集団に対する免疫エフェクター細胞媒介性免疫調節因子応答を刺激するための方法が提供される。

【0535】

特定の実施形態で想定される細胞組成物を投与するための方法は、対象においてCARを直接発現するか、または対象に導入されるとCARを発現する成熟免疫エフェクター細胞に分化する免疫エフェクター細胞の遺伝子改変前駆細胞の再導入時のいずれかであるエクスピボの遺伝子改変免疫エフェクター細胞の再導入をもたらすのに有効な任意の方法を含む。1つの方法は、本明細書において想定されるものに従う核酸構築物をエクスピボで末梢血T細胞に形質導入し、形質導入細胞を対象に戻すことを含む。

【0536】

本明細書に引用される公開文献、特許出願、及び交付済み特許は全て、個々の公開文献、特許出願、または交付済み特許それぞれが参照により組み込まれるよう明確かつ個別に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

【0537】

前述の実施形態は、理解を明確にするために例証及び例によりいくらか詳細に記載されているが、本明細書において想定される教示に照らして、添付の請求項の趣旨及び範囲を逸脱することなくある特定の変更及び改変がそれに対して行われ得ることは、当業者には容易に明らかになるであろう。以下の実施例は、限定ではなく、単なる例示として提供されるものである。当業者であれば、変更または改変しても本質的に同様の結果を得ることができる必須ではない種々のパラメータを容易に認識するであろう。

【実施例】

【0538】

実施例1

抗S T N CARの構築

ヒト化抗S T n s c F v抗体を含むCARを、抗S T n s c F vに作動可能に連結されたM N Dプロモーター、C D 8 由来のヒンジ及び膜貫通ドメイン、及びC D 1 3 7共刺激ドメイン、続いてC D 3 鎖の細胞内シグナル伝達ドメインを含むように設計した。図1。これらの抗S T n CARは、免疫エフェクター細胞での表面発現のためのC D 8 シグナルペプチド(S P)配列を含む。表3は、例示的な抗S T n CARレンチウイルスベクターの様々なヌクレオチドセグメントの識別情報、G e n b a n k照会番号、供給源名、及び引用文献を示す。

10

20

30

【表 3 - 1】

表3.

ヌクレオチド	識別情報	GenBank照会番号	供給源名	引用文献
1～185	pUC19プラスミド骨格	受入番号L0913 7. 2 nt 1-185	pUC19	New England Biolabs
185～222	リンカー	該当なし	合成	該当なし
223～800	CMV	該当なし	pHCMV	(1994)PNAS 91:9564-68
801～1136	R、U5、PBS、及びパッケージング配列	受入番号M1992 1. 2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol:65(11):5732-43
1137～1139	終止コドン(TAG)に変更されたGag開始コドン(ATG)	該当なし	合成	該当なし
1140～1240	HIV-1 gag配列	受入番号M1992 1. 2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol:65(11):5732-43
1241～1243	第2の終止コドンに変更されたHIV-1 gag配列	該当なし	合成	該当なし
1244～1595	HIV-1 gag配列	受入番号M1992 1. 2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol:65(11):5732-43
1596～1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	受入番号M1992 1. 2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol:65(11):5732-43

10

20

30

40

【表 3 - 2】

ヌクレオチド	識別情報	GenBank照会番号	供給源名	引用文献
1993～2517	HIV-1、HXB3 env領域(RRE)を単離	受入番号M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature(1988)335:181-183
2518～2693	HIV-1 env配列S/A	受入番号M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J. Virol:65(11):5732-43
2694～2708	リンカー	該当なし	合成	該当なし
2709～3096	MND	該当なし	rSPA. m Pro. MND	Challita et al. (1995) J. Virol. 69:748-755
3097～3125	リンカー	該当なし	合成	該当なし
3126～3188	シグナルペプチド		合成	該当なし
可変	抗STn scFv	該当なし	合成	該当なし
3927～3935	リンカー	該当なし	合成	該当なし
3936～4142	CD8aヒンジ及びTM	受入番号NM_001768	合成	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4143～4268	CD137(4-1BB)シグナル伝達ドメイン	受入番号NM_001561	合成	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4269～4607	CD3-とシグナル伝達ドメイン	受入番号NM_000734	合成	Milone et al(2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4608～4	HIV-1 ppt及びU3	受入番号M1992	pNL4-3	Maldarelli, et. al.

10

20

30

40

【表 3 - 3】

ヌクレオチド	識別情報	GenBank照会番号	供給源名	引用文献
718	の一部	1. 2 nt 9005-9110		(1991) J Virol:65(11): 5732-43
4719~4 835	U3のHIV-1部分(3 99bp欠失)及びR	受入番号M1992 1. 2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol:65(11): 5732-43
4836~4 859	合成ポリ(A)	該当なし	合成	Levitt, N. Genes & Dev(1989) 3:1019-1025
4860~4 878	リンカー	該当なし	合成	該当なし ¹
4879~7 351	pUC19骨格	受入番号L0913 7. 2 nt 2636-2686	pUC19	New England B iolabs(添付)

【 0 5 3 9 】

実施例 2

ヒト結腸直腸がんのインビトロモデルにおける抗STN CAR T細胞の細胞傷害性

配列番号 15 による軽鎖可変領域及び配列番号 16 による重鎖可変領域を有する抗STN CARを含むCAR T細胞は、結腸直腸癌のインビトロモデルにおいてLS174T細胞の選択的殺滅を示した。LS174T細胞は、高レベルのSTn発現TAG-72糖タンパク質を発現するヒト結腸直腸がん細胞株である。

【 0 5 4 0 】

LS174T細胞でのSTn発現TAG-72糖タンパク質の発現を免疫組織化学的検査によって確認した。1%のウシ血清アルブミン(BSA)及び5µgのSTn特異的抗体(3E8)を含むPBS 100µL中に、 5×10^5 個のLS174T細胞を懸濁させた。この反応物を30分間4℃でインキュベートし、次に、1%のBSAを含むPBSで細胞を2回洗浄した。次に、1µLのマウス抗ヒトIgG-PE(Southern Biotech)を添加し、この混合物を30分間4℃でインキュベートした。次に、1%のBSAを含むPBSで細胞を2回洗浄した。STn発現TAG-72糖タンパク質の発現をフローサイトメトリで確認した。LS174T細胞の98%がSTn発現TAG-72糖タンパク質を発現した。ヒト胃がん細胞株の細胞の95%も、STn発現を示した。対照的に、TAG-72陰性ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)細胞の約2%しかSTnを発現しなかった。

【 0 5 4 1 】

CellTox(商標)Greenを使用し、LS174T細胞に対する抗STN CAR T細胞の細胞傷害活性をアッセイした。 1×10^4 個のLS174T細胞を50µLの培養培地中に懸濁させ、2.0µLのCellTox(商標)Greenと合わせたを添加した。この混合物のアリコートは黒色の96ウェルプレートにとり、ヒト血清及びIL-2(E:T比=5、10、20、30)を含む50µLの培養培地において、 5×10^4 個、 1×10^5 個、 2×10^5 個、または 3×10^5 個のいずれかの抗STN CAR T細胞とアリコートを合わせた。37℃で24時間の培養後、細胞傷害性を次のよ

うに計算した。

$\text{CellTox (商標) Green の蛍光 (RFU)} = \{ \text{T細胞及びE細胞の反応} \} - \{ \text{E細胞の反応} \} - (\text{T細胞の反応、バックグラウンド})$

【0542】

その結果は、抗STn-CAR T細胞が、STnが不在のHUVECと比較して、すなわち抗STn-CARを発現しない対照T細胞と比較して、STn-TAG-72発現LS174Tがん細胞を効果的に殺滅することを示した。

【0543】

実施例3

形質導入T細胞における抗STn-CARの発現及びベクターコピー数

10

大規模な臨床製造プロセスに直接拡張可能なシステムを使用し、CAR T細胞培養物を確立した。簡潔に述べると、末梢血単核細胞(PBMC)を、静置フラスコにおいて、IL-2(Cell Genix)、CD3及びCD28に特異的な抗体(Miltenyi Biotec)、ならびにZSTK474(Selleckchem)を含んだ培地で培養した。配列番号15による軽鎖可変領域及び配列番号16による重鎖可変領域を有する抗STn-CARをコードするレンチウイルス 2×10^8 形質導入単位を、培養開始の1日後に添加した。合計10日の培養日数の間、IL-2及びZSTK474を含む新鮮な培地を追加することにより、抗STn-CAR T細胞を対数期に維持した。培養の最後に、3体のドナーから得た形質導入T細胞において抗STn-CARの細胞表面発現及びベクターコピー数(VCN)を測定した。

20

【0544】

培養の最後に、ベクターまたはゲノム対照RNAsePを検出するプライマーを使用し、定量的PCRによってVCNを評価した。非形質導入T細胞と比較した3体のドナーの形質導入T細胞における抗STn-CARのVCNデータを図3Aに示す。非形質導入対照細胞における検出不可能なVCNと比較して、形質導入T細胞は約4.5のVCNを有した。

【0545】

培養の最後に、T細胞表面での抗STn-CARの発現をフローサイトメトリによって評価した。ビオチン化タンパク質Lに続いてストレプトアビジン-PEを用いる2ステップ検出方法を使用し、抗STn-CAR T細胞を特異的に特定した。3体の正常なドナーのT細胞は、抗STn-CARの高度な発現を示した。この実験の結果を図3Bに示す。

30

【0546】

実施例4

抗STn-CAR T細胞の抗原特異的細胞傷害性

実施例3に記載のように抗STn-CAR T細胞を産生した。培養の最後に、2つの独立したアッセイにおいて、抗STn-CAR T細胞の抗原特異的応答をアッセイした。

【0547】

ビーズベースのサイトカインアッセイ(Luminex)を使用し、TAG72でSTnを発現する細胞株に应答しIFN γ を産生する抗STn-CAR T細胞の能力を検査した。等数の腫瘍細胞及び抗STn-CAR T細胞(各 5×10^4 個)を24時間にわたり共培養した。上清を収集し、産生されたIFN γ の量をLuminexによって数量化した。抗STn-CAR T細胞は、腫瘍細胞なしで培養したとき、IFN γ をほとんどまたは全く産生しなかった。二次元培地において細胞表面でSTnを発現しない腫瘍細胞(A549及びHDL-M-2)と共培養した抗STn-CAR T細胞からIFN γ は産生されなかった。TAG72でSTnを発現する腫瘍細胞(Jurkat及びLS174T)と抗STn-CAR T細胞を共培養したとき、産生されたIFN γ の量は著しく増加した。図4A。

40

【0548】

50

抗STn CAR T細胞と共培養したLS174T細胞の細胞溶解を分析した。生細胞の電気インピーダンスの監視が可能なiCELLigence機器を用い、細胞溶解を実時間で監視した。共培養したLS174T細胞において、抗STn CAR T細胞は細胞溶解を誘導したが、非形質導入対照T細胞は細胞溶解を誘導しなかった。図4B。

【0549】

抗STn CAR T細胞（エフェクター細胞）をLS174T細胞（標的細胞）と様々なエフェクター：標的細胞比で共培養した。抗STn CAR T細胞は、共培養したLS174T細胞において細胞傷害性を用量依存的様式で増加させる。図4C。

【0550】

実施例5

抗STn CAR T細胞は侵襲性インビオ腫瘍モデルにおいて腫瘍の増殖を遅延させる

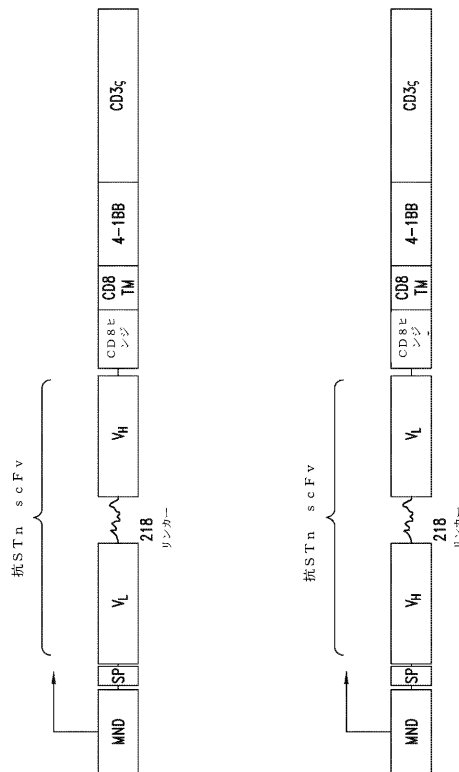
実施例3に記載のように抗STn CAR T細胞を産生した。侵襲性インビオ腫瘍モデルにおいてCAR T細胞の抗腫瘍活性を検査した。動物に結腸腺癌細胞（LS174T）を皮下投与し、翌日に等用量のCAR T細胞（ 2×10^7 個のT細胞）を注入した。シグナルを伝達する能力を欠く短縮化CARを含む対照CAR T細胞は、ビヒクルで処置した動物と比較して腫瘍の増殖に影響を及ぼさなかった。この侵襲性結腸がんモデルにおいて、抗STn CAR T細胞は、腫瘍の増殖を遅延させた。図5。

【0551】

概して、続く特許請求の範囲において、使用される用語は、本明細書及び特許請求の範囲に開示される特定の実施形態に特許請求の範囲を限定するものと解釈されるべきではなく、可能性のある全ての実施形態を、かかる特許請求の範囲が権利を有する同等物の全範囲と共に含むものと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は開示内容により限定されない。

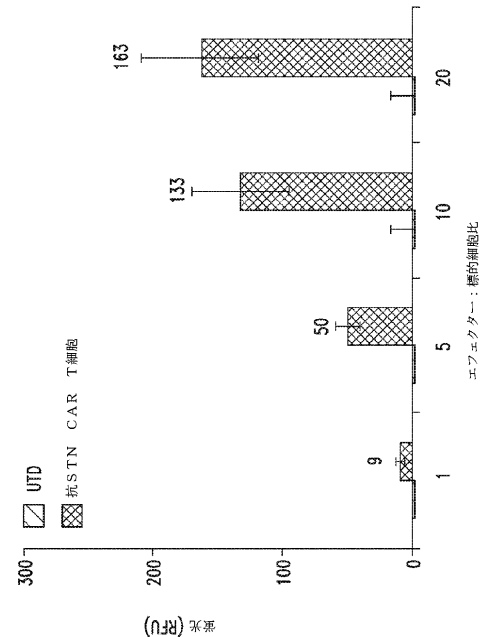
【図1】

【図1】



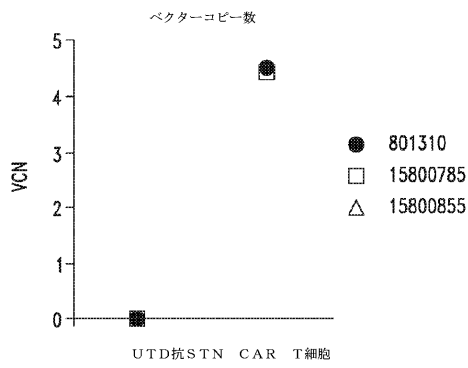
【図2】

【図2】



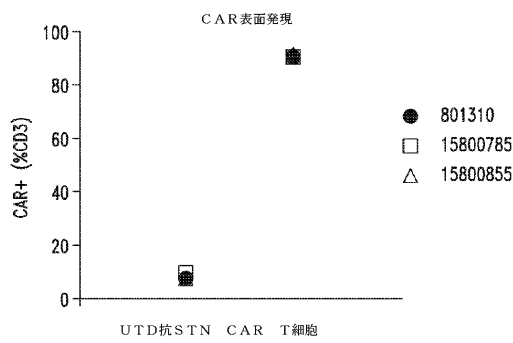
【図 3 A】

【図 3 A】



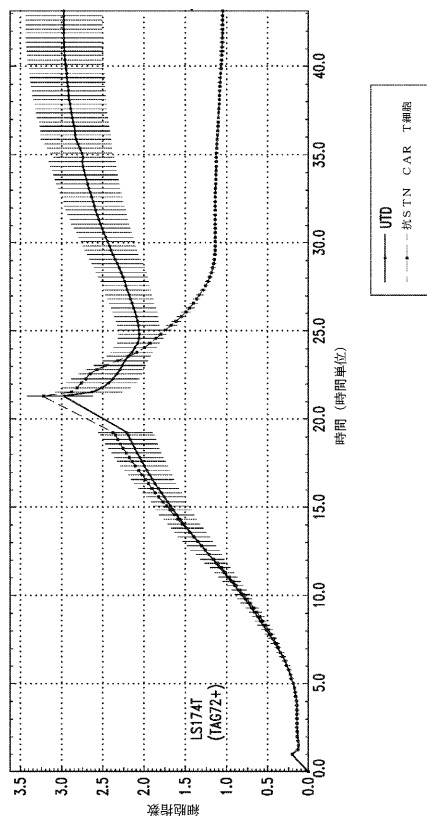
【図 3 B】

【図 3 B】



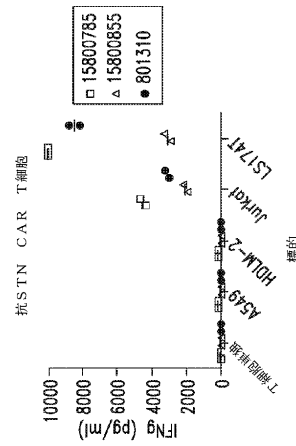
【図 4 B】

【図 4 B】



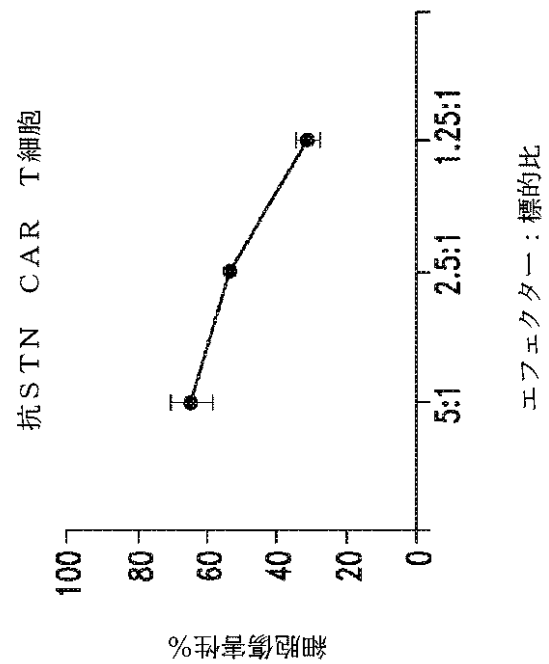
【図 4 A】

【図 4 A】



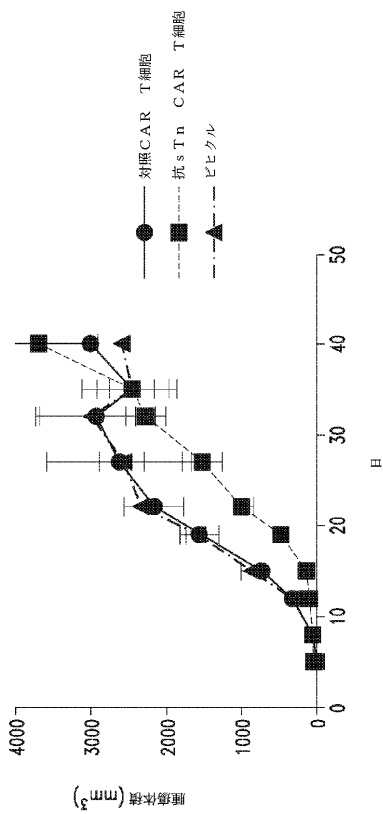
【図 4 C】

【図 4 C】



【図 5】

【図 5】



【配列表】

0006980659000001.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 15/62 (2006.01) C 1 2 N 15/62 Z N A Z

前置審査

(74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策
 (72)発明者 モーガン, リチャード
 アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 03226, センター ハーバー, ピーオー ボックス 1254
 (72)発明者 フリードマン, ケビン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02176, メルローズ, クローバー サークル 4
 (72)発明者 ユ, スン シン
 大韓民国 133-100 ソウル, ソンドン-グ, オクス-ドン, クックドン グリーン アpartment 105-1104
 (72)発明者 チョン, ジェ-ギョン
 大韓民国 150-745 ソウル, ヨンドンボ-グ, ヤンピョン-ドン 2-ガ, サムスン アpartment 102-402
 (72)発明者 チェ, ジン-ア
 大韓民国 153-800 ソウル, クムチョン-グ, ドクサン-ドン 711-2, ヒュンダイ ホームタウン アpartment 106-1102

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 国際公開第2015/105522(WO, A1)
 特表2008-509656(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/12
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 P 35/00
 C 0 7 K 14/705
 C 0 7 K 19/00
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 15/62
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CApus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 UniProt/GeneSeq
 PubMed