

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-530989

(P2020-530989A)

(43) 公表日 令和2年11月5日 (2020.11.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 4 8
C 0 7 K 14/71 (2006.01)	C 0 7 K 14/71	4 C 0 5 7
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	C 0 7 K 14/54	4 C 0 7 2
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 7 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-503988 (P2020-503988)
 (86) (22) 出願日 平成30年7月25日 (2018.7.25)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年3月19日 (2020.3.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/043779
 (87) 国際公開番号 W02019/023396
 (87) 国際公開日 平成31年1月31日 (2019.1.31)
 (31) 優先権主張番号 62/536, 934
 (32) 優先日 平成29年7月25日 (2017.7.25)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 500039463
 ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニバ
 ーシテイ・オブ・テキサス・システム
 アメリカ合衆国 テキサス 78701,
 オースティン, ウェスト 7ティエーエチ
 ストリート 210
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 強化されたキメラ抗原受容体およびその使用

(57) 【要約】

CARのヒンジ領域における切断型EGFRvIII (E v 3) および/またはヒト化scFvを含むキメラ抗原受容体 (CAR) が本明細書において提供される。前記CARを発現する免疫細胞ならびに免疫障害の処置におけるそれらの使用方法が本明細書においてさらに提供される。本発明は、例えば、キメラ抗原受容体 (CAR) であって、切断型EGFRvIII (E v 3) を前記CARの前記ヒンジに含み、前記E v 3 ヒンジは細胞外ドメインと少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを連結するキメラ抗原受容体 (CAR) を提供する。

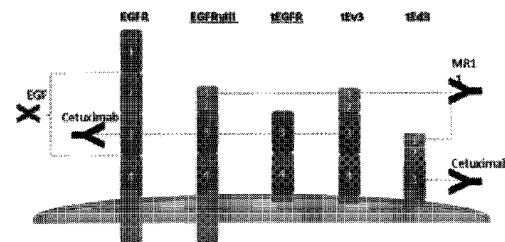


FIG. 2B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体（CAR）であって、切断型EGFRvIII（Ev3）を前記CARの前記ヒンジに含み、前記Ev3ヒンジは細胞外ドメインと少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを連結するキメラ抗原受容体（CAR）。

【請求項 2】

前記Ev3ヒンジが、EGFRvIIIの膜貫通ドメインおよび非機能性エクストドメインを含む請求項1に記載のCAR。

【請求項 3】

前記Ev3ヒンジが、EGFRvIIIエンドドメインを含まない請求項1に記載のCAR。 10

【請求項 4】

EGFRvIIIの前記非機能性エクストドメインが上皮成長因子（EGF）と本質的に結合しない請求項2に記載のCAR。

【請求項 5】

前記Ev3ヒンジが、EGFRの切断型ドメイン1、切断型ドメイン2、ドメイン3、およびドメイン4を含む請求項1～4のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項 6】

EGFRの前記ドメイン3およびドメイン4が切断型でない請求項5に記載のCAR。

【請求項 7】

前記Ev3ヒンジが、配列番号2と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む請求項1～4のいずれか一項に記載のCAR。 20

【請求項 8】

前記Ev3ヒンジが、配列番号2と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む請求項1～4のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項 9】

前記Ev3ヒンジが、配列番号2のアミノ酸配列を含む請求項1～4のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項 10】

前記Ev3ヒンジが、配列番号1と少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされている請求項1～4のいずれか一項に記載のCAR。 30

【請求項 11】

前記Ev3ヒンジが、配列番号1と少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされている請求項1～4のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項 12】

前記Ev3ヒンジが、配列番号1のヌクレオチド配列によってコードされている請求項1～4のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項 13】

前記CARの前記細胞外ドメインが、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、およびscFvからなる群から選択される抗原結合ドメインを含む請求項1に記載のCAR。 40

【請求項 14】

前記抗原結合ドメインがscFvを含む請求項13に記載のCAR。

【請求項 15】

前記scFvが、さらにヒト化scFvとして規定される請求項14に記載のCAR。

【請求項 16】

前記CARの前記抗原結合領域が、1またはそれを超える腫瘍関連抗原に結合する請求項13～15のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項 17】

前記1またはそれを超える腫瘍関連抗原が、CD19、CD319（CS1）、ROR1、CD20、癌胎児性抗原、フェトプロテイン、CA-125、MUC-1、上皮腫瘍 50

抗原、メラノーマ関連抗原、変異 p 5 3、変異 r a s、H E R 2 / N e u、E R B B 2、葉酸結合タンパク質、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 1 2 0、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 4 1、G D 2、C D 5、C D 1 2 3、C D 2 3、C D 3 0、C D 5 6、c - M e t、メソテリン、G D 3、H E R V - K、I L - 1 1 R、鎖、鎖、C S P G 4、E R B B 2、W T - 1、T R A I L / D R 4、V E G F R 2、C D 3 3、C D 4 7、C L L - 1、U 5 s n R N P 2 0 0、C D 2 0 0、B A F F - R、B C M A、および C D 9 9 からなる群から選択される請求項 1 6 に記載の C A R。

【請求項 1 8】

前記 1 またはそれを超える腫瘍関連抗原が、C D 1 9、C D 3 1 9、C D 1 2 3、C D 5、R O R 1、C D 3 3、C D 9 9、C L L - 1、および / またはメソテリンである、請求項 1 6 に記載の C A R。

10

【請求項 1 9】

前記 s c F V が E G F R 結合ドメインを含まない請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 2 0】

前記少なくとも 1 つのシグナル伝達ドメインが、C D 3、C D 2 8、O X 4 0 / C D 1 3 4、4 - 1 B B / C D 1 3 7、F c R I、I C O S / C D 2 7 8、I L R B / C D 1 2 2、I L - 2 R G / C D 1 3 2、D A P 1 2、C D 7 0、C D 4 0、またはそれらの組合せを含む請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 2 1】

前記少なくとも 1 つのシグナル伝達ドメインが D A P 1 2 を含む請求項 1 に記載の C A R。

20

【請求項 2 2】

前記 C A R が I L - 1 5 を含む請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 2 3】

前記 C A R が C D 3、C D 2 8、D A P 1 2、および I L - 1 5 を含む請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 2 4】

前記 C A R が自殺遺伝子をさらに含む請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 2 5】

前記自殺遺伝子が誘導性カスパーゼ 9 である請求項 2 4 に記載の C A R。

30

【請求項 2 6】

軽鎖可変領域 (V_L) および重鎖可変領域 (V_H) を含む、単離された抗原特異的ヒト化単鎖可変断片 (s c F v) であって、前記 s c F v が、

(a) C D 1 9 特異的であり、前記 V_L が配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 8 のアミノ酸配列を含む；

(b) C D 1 2 3 特異的であり、前記 V_L が配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む；

(c) メソテリン特異的であり、前記 V_L が配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む；

40

(d) R O R 1 特異的であり、前記 V_L が配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む；

(e) C D 5 特異的であり、前記 V_L が配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む；

(f) C L L - 1 特異的であり、前記 V_L が配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む；

(g) C D 9 9 特異的であり、前記 V_L が配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含むか、または

(h) (a) ~ (g) のいずれか一つのフレームワーク領域に対して 9 0 % の配列同一性を有する配列

50

であるヒト化単鎖可変断片 (s c F v)。

【請求項 27】

前記 s c F v が C D 19 特異的であり、前記 V_L が配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 8 のアミノ酸配列を含む請求項 26 に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 28】

前記 C D 19 特異的 s c F v が配列番号 6 のアミノ酸配列を含む請求項 27 に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 29】

前記 s c F v が C D 123 特異的であり、前記 V_L が配列番号 13 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 14 のアミノ酸配列を含む請求項 26 に記載のヒト化 s c F v。

10

【請求項 30】

前記 C D 123 特異的 s c F v が配列番号 12 のアミノ酸配列を含む請求項 29 に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 31】

前記 s c F v がメソテリン特異的であり、前記 V_L が配列番号 19 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 20 のアミノ酸配列を含む請求項 26 に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 32】

前記メソテリン特異的 s c F v が配列番号 18 のアミノ酸配列を含む請求項 31 に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 33】

前記 s c F v が R O R 1 特異的であり、前記 V_L が配列番号 25 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 26 のアミノ酸配列を含む請求項 26 に記載のヒト化 s c F v。

20

【請求項 34】

前記 R O R 1 特異的が配列番号 24 のアミノ酸配列を含む請求項 33 に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 35】

前記 s c F v が C D 5 特異的であり、前記 V_L が配列番号 31 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 32 のアミノ酸配列を含む請求項 26 に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 36】

前記 C D 5 特異的が配列番号 30 のアミノ酸配列を含む請求項 35 に記載のヒト化 s c F v。

30

【請求項 37】

前記 s c F v が C D 99 特異的であり、前記 V_L が配列番号 63 のアミノ酸配列を含み、前記 V_H が配列番号 64 のアミノ酸配列を含む請求項 26 に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 38】

前記 C D 99 特異的が配列番号 62 のアミノ酸配列を含む請求項 35 に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 39】

前記 s c F v が、配列番号 6、12、18、24、または 30 のアミノ酸配列のフレームワーク領域に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む請求項 26 ~ 38 のいずれか一項に記載のヒト化 s c F v。

40

【請求項 40】

前記 s c F v が、配列番号 6、12、18、24、または 30 のアミノ酸配列のフレームワーク領域に対して少なくとも 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む請求項 26 ~ 38 のいずれか一項に記載のヒト化 s c F v。

【請求項 41】

請求項 26 ~ 38 のいずれか一項に記載の単離されたヒト化 s c F v をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 42】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 3、9、15、21、または 27 を含む請求項 41 に

50

記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 4 4】

前記ベクターが、さらにウイルスベクターとして規定される請求項 4 3 に記載のベクター。

【請求項 4 5】

前記ヒト化 s c F v が、請求項 2 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の s c F v である請求項 1 5 に記載の C A R。

【請求項 4 6】

請求項 1 ~ 2 5 および 4 5 に記載の C A R をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

【請求項 4 7】

請求項 2 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載のヒト化 s c F v および / または前記 C A R の前記ヒンジ領域において切断型 E G F R v I I I (E v 3) を含む C A R を発現するように操作された宿主細胞。

【請求項 4 8】

前記 C A R が、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の C A R である請求項 4 7 に記載の細胞。

【請求項 4 9】

前記宿主細胞がさらに C A R 免疫細胞として規定される請求項 4 7 に記載の細胞。

【請求項 5 0】

前記免疫細胞が T 細胞、末梢血リンパ球、N K 細胞、インバリアント N K 細胞、N K T 細胞、または幹細胞である請求項 4 9 に記載の細胞。

【請求項 5 1】

前記免疫細胞が T 細胞または N K 細胞である請求項 4 9 に記載の細胞。

【請求項 5 2】

前記幹細胞が間葉系幹細胞 (M S C) または人工多能性幹 (i P S) 細胞である請求項 5 0 に記載の細胞。

【請求項 5 3】

前記免疫細胞が i P S 細胞に由来する請求項 4 9 に記載の細胞。

【請求項 5 4】

前記 T 細胞が C D 8 ⁺ T 細胞、C D 4 ⁺ T 細胞、または T 細胞である請求項 5 0 に記載の細胞。

【請求項 5 5】

前記 T 細胞が細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) である請求項 5 0 に記載の細胞。

【請求項 5 6】

前記免疫細胞が同種である請求項 4 9 に記載の細胞。

【請求項 5 7】

前記免疫細胞が自己である請求項 4 9 に記載の細胞。

【請求項 5 8】

前記免疫細胞が末梢血、臍帯血、または骨髓から単離されている請求項 4 9 に記載の細胞。

【請求項 5 9】

前記免疫細胞が臍帯血から単離されている請求項 4 9 に記載の細胞。

【請求項 6 0】

前記臍帯血が 2 またはそれを超える個々の臍帯血ユニットからプールされている請求項 5 9 に記載の細胞。

【請求項 6 1】

前記 C A R をコードする D N A が前記細胞の前記ゲノムに組み込まれている請求項 4 7 に

10

20

30

40

50

記載の細胞。

【請求項 6 2】

請求項 4 7 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の細胞集団を含む薬学的組成物。

【請求項 6 3】

免疫関連障害における使用のための、請求項 4 7 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の細胞集団を含む組成物。

【請求項 6 4】

有効量の請求項 4 7 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の細胞を前記被験体に投与することを含む、被験体において免疫関連障害を処置する方法。

【請求項 6 5】

前記免疫関連障害が、癌、自己免疫障害、移植片対宿主病、同種移植片拒絶反応、または炎症症状である請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記免疫関連障害が炎症症状であり、前記免疫細胞にはグルココルチコイドレセプターの発現が本質的でない請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記免疫細胞が自己である請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記免疫細胞が同種である請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記免疫関連障害が癌である請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記癌が固形癌または血液悪性腫瘍である請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

少なくとも第 2 の治療薬を投与することをさらに含む請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記少なくとも第 2 の治療薬が化学療法、免疫療法、手術、放射線療法、または生物療法を含む請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記免疫細胞および / または前記少なくとも第 2 の治療薬が静脈内に、腹腔内に、気管内に、腫瘍内に、筋肉内に、内視鏡的に、病変内に、経皮的に、皮下に、局所的に、または直接注射または灌流によって投与される請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

抗 E G F R 抗体を投与することをさらに含む請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記抗 E G F R 抗体がモノクローナル抗体である請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記抗 E G F R 抗体がセツキシマブまたはパニツムマブである請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記抗 E G F R 抗体が、抗体依存性細胞性細胞傷害 (A D C C) を介して E v 3 - C A R 免疫細胞を選択的に除去する請求項 7 4 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記抗 E G F R 抗体が、検出可能なタグおよび / または細胞傷害性薬物に融合されている請求項 7 4 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記検出可能なタグを画像化し、それにより前記 E v 3 - C A R 免疫細胞を検出することをさらに含む請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記抗 E G F R 抗体が、細胞傷害性薬物に融合されている請求項 7 4 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8 1】

前記細胞傷害性薬物が、前記 E v 3 - C A R 免疫細胞において前記自殺遺伝子の活性化を誘導する請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記細胞傷害性薬物が、前記 E v 3 - C A R 免疫細胞の前記除去をもたらす請求項 7 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本願は、2017年7月25日付で出願された米国特許仮出願第62/536,934号に基づく優先権の利益を主張し、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】**配列表の援用**

289KB (マイクロソフトウィンドウズ (登録商標) で計測) であり、2018年7月23日に生成された、「UTFCP1331WO.txt」という名称のファイルに含まれる配列表は、電子申請によって本願とともに出願され、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】**【0003】****背景****1. 分野**

本発明は、一般に免疫学および分子生物学の分野に関する。より詳細には、本発明は免疫細胞に対するものなどの強化されたキメラ抗原受容体 (C A R) に関する。

【0004】**2. 関連技術の説明**

癌と診断された患者が利用できる診断および処置の選択肢の技術的進歩にもかかわらず、予後は依然として不良である場合が多く、多くの患者は治癒することができない。免疫療法は、様々な腫瘍と診断された患者に、強力でありながら標的を絞った処置を提供することが期待され、正常な組織に損傷を与えることなく悪性腫瘍細胞を根絶する可能性がある。理論的には、免疫系の T 細胞は、腫瘍細胞に特異的なタンパク質パターンを認識し、多様なエフェクター機構によってそれらの破壊を媒介することができる。養子 T 細胞療法または N K 細胞療法などのキメラ抗原受容体 (C A R) を発現する免疫細胞の投与は、患者自身の免疫細胞の腫瘍根絶能力を利用して増幅し、その後、正常な組織に損傷を与えることなく残存腫瘍を効果的に除去するような状態で、これらのエフェクターを患者に戻す試みである。一般に、C A R は、ヒンジおよび膜貫通領域を介して T 細胞シグナル伝達分子の細胞質ドメインに結合した腫瘍関連抗原 (T A A) に特異的な抗体の単鎖可変断片 (s c F v) を含む。しかし、免疫細胞療法の臨床使用での多くの欠点により、癌の処置におけるこのアプローチの十分な活用が損なわれる。従って、免疫細胞療法で使用するための改善された C A R にはまだ満たされていないニーズがある。

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【0005】****要旨**

特定の実施形態では、本開示は、強化されたキメラ抗原受容体、ならびに癌および自己免疫障害を含む疾患および障害の処置のためのそれらの使用方法を提供する。一実施形態では、エンドドメインまたは機能性 E G F 結合ドメインを含まない、E v 3 (または t E v 3) と呼ばれる、切断型 E G F R v I I I が提供される。特定の態様では、E v 3 は、E G F R の切断型ドメイン 1 (L 1)、切断型ドメイン 2 (C R 1)、ドメイン 3 (L 2)、およびドメイン 4 (C R 2) (図 2 B に示す通り) を含む。一部の態様では、E v 3 は C A R のヒンジ領域に位置してよく、C A R 検出および / または C A R 発現細胞の除去

に使用することができる。一部の実施形態では、CARは、ヒト化scFvとEv3ヒンジの両方を含む。もう一つの実施形態では、CARのヒト化抗原結合ドメイン、例えばヒト化単鎖可変断片(scFv)などが提供される。さらなる実施形態は、これらの実施形態の1または複数のCARを発現するT細胞またはNK細胞などの免疫細胞を被験体に投与することにより、免疫関連障害を処置する方法を提供する。

【0006】

もう一つの実施形態では、前記CARのヒンジにEv3を含むキメラ抗原受容体(CAR)が提供され、前記Ev3ヒンジは細胞外ドメインと少なくとも1つの細胞内免疫シグナル伝達ドメインを連結する。一部の態様では、Ev3ヒンジは、EGFRvIIIの膜貫通ドメインおよび非機能性エクストドメインを含む。特定の態様では、Ev3ヒンジはEGFRvIIIエンドドメインを含まない。一部の態様では、EGFRvIIIの非機能性エクストドメインは、上皮成長因子(EGF)との結合能が本質的にない。

10

【0007】

一部の態様では、Ev3ヒンジは、配列番号2と少なくとも80%、例えば少なくとも81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性をもつアミノ酸配列を含む。一部の態様では、Ev3ヒンジは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0008】

Ev3は、配列番号2、
【化1】

20

LEKK-

GNVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRK-
VCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDIL
KTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLK
EISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ-
VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPE
CLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHV
CHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPS

30

(部分ドメイン1 - 部分ドメイン2 - ドメイン3 - ドメイン4を含む)を含むか、あるいは、配列番号2に対して少なくとも80%(例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)の配列同一性を有することがある。特定の態様では、Ev3には1、2、3、またはそれを超える変更があることがある。

【0009】

一部の態様では、Ev3ヒンジは、配列番号1に対して少なくとも80%、例えば少なくとも81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%などの配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。特定の態様では、Ev3ヒンジは、配列番号1のヌクレオチド配列によってコードされる。

40

【0010】

特定の態様では、CARの細胞外ドメインは、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、およびscFvからなる群から選択される抗原結合ドメインを含む。一部の態様では、抗原結合ドメインはscFvを含む。特定の態様では、scFvは、さらにヒト化scFvとして規定される。一部の態様では、ヒト化scFvは、実施形態によるscFvである。

【0011】

50

一部の態様では、CARの前記抗原結合領域は、1またはそれを超える腫瘍関連抗原に結合する。特定の態様では、1またはそれを超える腫瘍関連抗原は、CD19、CD319(CS1)、ROR1、CD20、癌胎児性抗原、フェトプロテイン、CA-125、MUC-1、上皮腫瘍抗原、メラノーマ関連抗原、変異p53、変異ras、HER2/Neu、ERBB2、葉酸結合タンパク質、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp41、GD2、CD5、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、メソテリン、GD3、HERV-K、IL-11R、鎖、鎖、CSPG4、ERBB2、WT-1、TRAIL/DR4、VEGFR2、CD33、CLL-1およびCD99からなる群から選択される。特定の態様では、1またはそれを超える腫瘍関連抗原は、CD19、CD319、CD123、CD5、ROR1、メソテリン、CD33、CLL-1、および/またはCD99である。一部の態様では、scFvはEGFR結合ドメインを含まない。

10

【0012】

特定の態様では、少なくとも1つのシグナル伝達ドメインは、CD3、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、FcRI、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP12、CD70、CD40、またはそれらの組合せを含む。特定の態様では、少なくとも1つのシグナル伝達ドメインは、DAP12を含む。一部の態様では、CARは、IL-15を含む。特定の態様では、CARは、CD3、CD28、DAP12、およびIL-15を含む。

20

【0013】

一部の態様では、CARは自殺遺伝子をさらに含む。特定の態様では、自殺遺伝子は誘導性カスパーゼ9である。

【0014】

一実施形態では、軽鎖可変領域(V_L)および重鎖可変領域(V_H)を含む単離された抗原特異的ヒト化単鎖可変断片(scFv)が提供され、scFvは、

(a) CD19特異的であり、V_Lが配列番号7のアミノ酸配列を含み、V_Hが配列番号8のアミノ酸配列を含む；

(b) CD123特異的であり、V_Lが配列番号13のアミノ酸配列を含み、V_Hが配列番号14のアミノ酸配列を含む；

(c) メソテリン特異的であり、V_Lが配列番号19のアミノ酸配列を含み、V_Hが配列番号20のアミノ酸配列を含む；

30

(d) ROR1特異的であり、V_Lが配列番号25のアミノ酸配列を含み、V_Hが配列番号26のアミノ酸配列を含む；

(e) CD5特異的であり、V_Lが配列番号31のアミノ酸配列を含み、V_Hが配列番号32のアミノ酸配列を含む；

(f) CLL-1特異的であり、V_Lが配列番号59のアミノ酸配列を含み、V_Hが配列番号60のアミノ酸配列を含む；

(g) CD99特異的であり、V_Lが配列番号63のアミノ酸配列を含み、V_Hが配列番号64のアミノ酸配列を含むか、または

(h) (a)~(g)のいずれか一つのフレームワーク領域に対して90%の配列同一性を有する配列である。

40

【0015】

一部の態様では、scFv配列は、配列番号6、12、18、24、または30のフレームワーク領域に対して91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を含み、前記配列のCDRに対して100%の配列同一性を含む。特定の態様では、前記配列のCDRは、1、2、または3つの変更を有し得る。

【0016】

一部の態様では、scFvはCD19特異的であり、V_Lは配列番号7のアミノ酸配列を含み、V_Hは配列番号8のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、CD19特異的s

50

c F v は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、s c F v は C D 1 2 3 特異的であり、V_L は配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含み、V_H は配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、C D 1 2 3 特異的 s c F v は配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、s c F v はメソテリン特異的であり、V_L は配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含み、V_H は配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、メソテリン特異的 s c F v は配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、s c F v は R O R 1 特異的であり、V_L は配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含み、V_H は配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、R O R 1 特異的は配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、s c F v は C D 5 特異的であり、V_L は配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含み、V_H は配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、C D 5 特異的は配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む。

10

【0017】

一部の態様では、s c F v は、配列番号 6、12、18、24、または 30 のアミノ酸配列のフレームワーク領域に対して少なくとも 95%、例えば少なくとも 96、97、98、または 99% などの配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0018】

本明細書では、上記の実施形態の単離された s c F v をコードする単離されたポリヌクレオチドがさらに提供される。一部の態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 3、9、15、21、または 27 を含む。その他の態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 3、9、15、21、または 27 に対して少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99% の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0019】

本明細書では、これらの実施形態の単離されたヌクレオチドを含む発現ベクターも提供される。一部の態様では、ベクターはさらにウイルスベクターとして規定される。

【0020】

本明細書では、本実施形態のいずれか 1 つによる C A R をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸がさらに提供される。

【0021】

また、本明細書では、本実施形態のヒト化 s c F v および / または前記 C A R のヒンジ領域において切断型 E G F R v I I I (E v 3) を含む C A R を発現するように操作された宿主細胞が提供される。一部の態様では、C A R は、本実施形態のいずれか一つによる。一部の態様では、C A R をコードする D N A は細胞のゲノムに組み込まれている。

30

【0022】

一部の態様では、宿主細胞はさらに C A R 免疫細胞として規定される。特定の態様では、免疫細胞は T 細胞、末梢血リンパ球、NK 細胞、インバリアント NK 細胞、NK T 細胞、または幹細胞である。特定の態様では、免疫細胞は T 細胞または NK 細胞である。一部の態様では、幹細胞は間葉系幹細胞 (M S C) または人工多能性幹 (i P S) 細胞である。特定の態様では、免疫細胞は i P S 細胞に由来する。一部の態様では、T 細胞は C D 8⁺ T 細胞、C D 4⁺ T 細胞、または T 細胞である。特定の態様では、T 細胞は細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) である。一部の態様では、免疫細胞は同種または自己である。一部の態様では、免疫細胞は末梢血、臍帯血、または骨髓から単離されている。特定の態様では、免疫細胞は、臍帯血から単離されている。特定の態様では、臍帯血は、2 またはそれを超える個々の臍帯血ユニットからプールされている。

40

【0023】

本明細書では、本実施形態のいずれかによる免疫細胞集団を含む薬学的組成物がさらに提供される。また、本明細書では、免疫関連障害における使用のための本実施形態のいずれか一つによる免疫細胞集団を含む組成物が提供される。

【0024】

もう一つの実施形態では、ヒト化 s c F v および / または E v 3 ヒンジを含むものなどの本実施形態のいずれか一つの有効量の C A R 免疫細胞を投与することを含む、被験体に

50

において免疫関連障害を処置する方法が提供される。

【0025】

上記実施形態の一部の態様では、免疫関連障害は、癌、自己免疫障害、移植片対宿主病、同種移植片拒絶反応、または炎症症状である。特定の態様では、免疫関連障害は炎症症状であり、免疫細胞にはグルココルチコイドレセプターの発現が本質的でない。特定の態様では、免疫関連障害は癌である。一部の態様では、免疫細胞は自己または同種である。一部の態様では、癌は固形癌または血液悪性腫瘍である。

【0026】

さらなる態様では、この方法はさらに、少なくとも第2の治療薬を投与することを含む。一部の態様では、少なくとも第2の治療薬は、化学療法、免疫療法、手術、放射線療法、または生物療法を含む。特定の態様では、免疫細胞および/または少なくとも第2の治療薬は、静脈内に、腹腔内に、気管内に、腫瘍内に、筋肉内に、内視鏡的に、病変内に、経皮的に、皮下に、局所的に、または直接注射または灌流によって投与される。

【0027】

一部の態様では、この方法はさらに、抗EGFR抗体を投与することを含む。一部の態様では、抗EGFR抗体はモノクローナル抗体である。特定の態様では、抗EGFR抗体はセツキシマブまたはパニツムマブである。一部の態様では、抗EGFR抗体は、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を介してEV3-CAR免疫細胞を選択的に除去する。特定の態様では、抗EGFR抗体は、検出可能なタグおよび/または細胞傷害性薬物に融合されている。一部の態様では、この方法はさらに、検出可能なタグを画像化し、それによりEV3-CAR免疫細胞を検出することをさらに含む。特定の態様では、抗EGFR抗体は、細胞傷害性薬物に融合されている。一部の態様では、細胞傷害性薬物は、EV3-CAR免疫細胞において自殺遺伝子の活性化を誘導する。一部の態様では、細胞傷害性薬物はEV3-CAR免疫細胞の除去をもたらす。

【0028】

本発明のその他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、本発明の精神および範囲内の様々な変更および修正は、この詳細な説明から当業者に明らかになるので、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい実施形態を示してはいるが、例示のためだけに記載されていることを理解されたい。

【0029】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様をさらに実証するために含まれている。本発明は、本明細書に提示される具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせ、1またはそれを超えるこれらの図面を参照することにより、よりよく理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1-1】図1A~図1Bは、現在のCARとEV3-CARのデザインの比較を示す図である。図1Aは、EV3のストークは、scFvなどによる抗原結合からのシグナルを伝達する統合構造として、ならびに「オフ」スイッチとして機能し、その結果、セツキシマブなどの臨床的にアクセス可能な抗体によって認識されて、CAR陽性免疫細胞を除去することができる。図1Bは、T細胞の使用など、CARを超える強化として、DAP12をEV3-DAP12 CARのシグナルブースターとして利用して、NK細胞におけるCAR機能の有効性を増加させることができる。

【図1-2】図1A~図1Bは、現在のCARとEV3-CARのデザインの比較を示す図である。図1Aは、EV3のストークは、scFvなどによる抗原結合からのシグナルを伝達する統合構造として、ならびに「オフ」スイッチとして機能し、その結果、セツキシマブなどの臨床的にアクセス可能な抗体によって認識されて、CAR陽性免疫細胞を除去することができる。図1Bは、T細胞の使用など、CARを超える強化として、DAP12をEV3-DAP12 CARのシグナルブースターとして利用して、NK細胞におけるCAR機能の有効性を増加させることができる。

【 0 0 3 1 】

【図 2 - 1】図 2 A は、エンドドメインおよび E G F 結合ドメインを含む E G F R と比較した E v 3 を示す模式図である。図 2 B は、E G F R バリエントおよび断片 (f r a g m e n t s) を示す模式図である。図 2 C は、細胞外ドメインのみを含む E v 3 の配列である。

【図 2 - 2】図 2 A は、エンドドメインおよび E G F 結合ドメインを含む E G F R と比較した E v 3 を示す模式図である。図 2 B は、E G F R バリエントおよび断片 (f r a g m e n t s) を示す模式図である。図 2 C は、細胞外ドメインのみを含む E v 3 の配列である。

【図 2 - 3】図 2 A は、エンドドメインおよび E G F 結合ドメインを含む E G F R と比較した E v 3 を示す模式図である。図 2 B は、E G F R バリエントおよび断片 (f r a g m e n t s) を示す模式図である。図 2 C は、細胞外ドメインのみを含む E v 3 の配列である。

10

【 0 0 3 2 】

【図 3 - 1】図 3 A ~ 図 3 E は、抗原 C D 1 9 (A)、h C D 1 9 (B)、C D 1 2 3 (C)、h C D 1 2 3 (D)、および C D 9 9 (E) のレトロウイルスベクターの図である。図 3 F は、他の s c F v と置き換えることができる C D 1 9 に対するヒト化 s c F v を使用する、C A R 2 . 0 のマップ。

【図 3 - 2】図 3 A ~ 図 3 E は、抗原 C D 1 9 (A)、h C D 1 9 (B)、C D 1 2 3 (C)、h C D 1 2 3 (D)、および C D 9 9 (E) のレトロウイルスベクターの図である。図 3 F は、他の s c F v と置き換えることができる C D 1 9 に対するヒト化 s c F v を使用する、C A R 2 . 0 のマップ。

20

【図 3 - 3】図 3 A ~ 図 3 E は、抗原 C D 1 9 (A)、h C D 1 9 (B)、C D 1 2 3 (C)、h C D 1 2 3 (D)、および C D 9 9 (E) のレトロウイルスベクターの図である。図 3 F は、他の s c F v と置き換えることができる C D 1 9 に対するヒト化 s c F v を使用する、C A R 2 . 0 のマップ。

【図 3 - 4】図 3 A ~ 図 3 E は、抗原 C D 1 9 (A)、h C D 1 9 (B)、C D 1 2 3 (C)、h C D 1 2 3 (D)、および C D 9 9 (E) のレトロウイルスベクターの図である。図 3 F は、他の s c F v と置き換えることができる C D 1 9 に対するヒト化 s c F v を使用する、C A R 2 . 0 のマップ。

30

【図 3 - 5】図 3 A ~ 図 3 E は、抗原 C D 1 9 (A)、h C D 1 9 (B)、C D 1 2 3 (C)、h C D 1 2 3 (D)、および C D 9 9 (E) のレトロウイルスベクターの図である。図 3 F は、他の s c F v と置き換えることができる C D 1 9 に対するヒト化 s c F v を使用する、C A R 2 . 0 のマップ。

【図 3 - 6】図 3 A ~ 図 3 E は、抗原 C D 1 9 (A)、h C D 1 9 (B)、C D 1 2 3 (C)、h C D 1 2 3 (D)、および C D 9 9 (E) のレトロウイルスベクターの図である。図 3 F は、他の s c F v と置き換えることができる C D 1 9 に対するヒト化 s c F v を使用する、C A R 2 . 0 のマップ。

【 0 0 3 3 】

【図 4 - 1】図 4 A は、E v 3 抗体が、C A R 1 9 . E v 3 . C D 2 8 . C D 3 、C A R 1 9 . E v 3 . D A P 1 2 . C D 3 またはヒト化 C A R 1 9 . E v 3 . C D 3 形質導入 N K 細胞を認識することを示す。図 4 B は、C D 1 9 + R a j i 腫瘍標的に対する C A R . 1 9 形質導入 N K 細胞の殺傷活性を評価するクロム放出アッセイにおいて、C A R 1 9 . E v 3 . C D 2 8 . D A P 1 2 N K 細胞が、複数のエフェクター：標的比で C D 1 9 + R a j i 細胞を死滅させるのに C A R 1 9 . I g G 1 . C D 2 8 . C D 3 z 形質導入 N K 細胞と同じくらい有効であることが示されたことを示す。

40

【図 4 - 2】図 4 A は、E v 3 抗体が、C A R 1 9 . E v 3 . C D 2 8 . C D 3 、C A R 1 9 . E v 3 . D A P 1 2 . C D 3 またはヒト化 C A R 1 9 . E v 3 . C D 3 形質導入 N K 細胞を認識することを示す。図 4 B は、C D 1 9 + R a j i 腫瘍標的に対する C A R . 1 9 形質導入 N K 細胞の殺傷活性を評価するクロム放出アッセイにおいて、C A R

50

19 . E v 3 . C D 2 8 . D A P 1 2 NK細胞が、複数のエフェクター：標的比で C D 1 9 + R a j i 細胞を死滅させるのに C A R 1 9 . I g G 1 . C D 2 8 . C D 3 z 形質導入NK細胞と同じくらい有効であることが示されたことを示す。

【0034】

【図5-1】図5Aは、CARのヒト化のプラットフォームを示す概略図である。図5Bは、モノクローナル抗体配列分析を示す。

【図5-2】図5Aは、CARのヒト化のプラットフォームを示す概略図である。図5Bは、モノクローナル抗体配列分析を示す。

【図5-3】図5Aは、CARのヒト化のプラットフォームを示す概略図である。図5Bは、モノクローナル抗体配列分析を示す。

10

【図5-4】図5Aは、CARのヒト化のプラットフォームを示す概略図である。図5Bは、モノクローナル抗体配列分析を示す。

【図5-5】図5Aは、CARのヒト化のプラットフォームを示す概略図である。図5Bは、モノクローナル抗体配列分析を示す。

【図5-6】図5Aは、CARのヒト化のプラットフォームを示す概略図である。図5Bは、モノクローナル抗体配列分析を示す。

【図5-7】図5Aは、CARのヒト化のプラットフォームを示す概略図である。図5Bは、モノクローナル抗体配列分析を示す。

【0035】

【図6】図6は、抗体のアイソタイプ、アロタイプ、およびイデオタイプを表す概略図である。抗体の構造決定因子は、単離され、分析および後続のCDR/フレームワークグラフィティングに使用される要素を定義するために描かれている。ヒト免疫グロブリンの5つの主要なアイソタイプは、示されるように(IgG1、2、3、4、IgA1、2)さらに下位分類される。

20

【0036】

【図7-1】図7Aは、V_LおよびV_Hを含むhCD19 scFvおよびmCD19 scFvのアミノ酸配列を示す。CDR領域には下線が引かれている。図7Bは、配列の同一性または相似性によってそれぞれの種の起源を検証するための、hCD19 scFvおよびmCD19 scFvのBLAST分析を示す。図7Cは、mCD19 scFvとヒト化CD19 scFvを比較した分析の要約を示す。

30

【図7-2】図7Aは、V_LおよびV_Hを含むhCD19 scFvおよびmCD19 scFvのアミノ酸配列を示す。CDR領域には下線が引かれている。図7Bは、配列の同一性または相似性によってそれぞれの種の起源を検証するための、hCD19 scFvおよびmCD19 scFvのBLAST分析を示す。図7Cは、mCD19 scFvとヒト化CD19 scFvを比較した分析の要約を示す。

【図7-3】図7Aは、V_LおよびV_Hを含むhCD19 scFvおよびmCD19 scFvのアミノ酸配列を示す。CDR領域には下線が引かれている。図7Bは、配列の同一性または相似性によってそれぞれの種の起源を検証するための、hCD19 scFvおよびmCD19 scFvのBLAST分析を示す。図7Cは、mCD19 scFvとヒト化CD19 scFvを比較した分析の要約を示す。

40

【0037】

【図8-1】図8A～図8D：図8Aは、3D構造モデリングを示す概略図を示す。図8B～図8Dは、ヒトCD19可変軽鎖の3D構造モデリングを示す。完全に自動化されたタンパク質構造相同性モデラーであるSWISS-MODEL^{*}を使用して、ヒト化V_LおよびV_Hドメインの3次元モデルを生成した(具体例として抗CD19を示す)。構造ファイルは、相同性モデリングのテンプレートとして構造抗体データベースであるSAbDabから、SWISS-MODEL内で自動的にアクセスされるPDB構造ファイルを使用して抽出した。

【図8-2】図8A～図8D：図8Aは、3D構造モデリングを示す概略図を示す。図8B～図8Dは、ヒトCD19可変軽鎖の3D構造モデリングを示す。完全に自動化された

50

タンパク質構造相同性モデラーである S W I S S - M O D E L * を使用して、ヒト化 V_L および V_H ドメインの 3 次元モデルを生成した (具体例として抗 C D 1 9 を示す) 。構造ファイルは、相同性モデリングのテンプレートとして構造抗体データベースである S A b D a b から、S W I S S - M O D E L 内で自動的にアクセスされる P D B 構造ファイルを使用して抽出した。

【図 8 - 3】図 8 A ~ 図 8 D : 図 8 A は、3 D 構造モデリングを示す概略図を示す。図 8 B ~ 図 8 D は、ヒト C D 1 9 可変軽鎖の 3 D 構造モデリングを示す。完全に自動化されたタンパク質構造相同性モデラーである S W I S S - M O D E L * を使用して、ヒト化 V_L および V_H ドメインの 3 次元モデルを生成した (具体例として抗 C D 1 9 を示す) 。構造ファイルは、相同性モデリングのテンプレートとして構造抗体データベースである S A b D a b から、S W I S S - M O D E L 内で自動的にアクセスされる P D B 構造ファイルを使用して抽出した。

10

【図 8 - 4】図 8 A ~ 図 8 D : 図 8 A は、3 D 構造モデリングを示す概略図を示す。図 8 B ~ 図 8 D は、ヒト C D 1 9 可変軽鎖の 3 D 構造モデリングを示す。完全に自動化されたタンパク質構造相同性モデラーである S W I S S - M O D E L * を使用して、ヒト化 V_L および V_H ドメインの 3 次元モデルを生成した (具体例として抗 C D 1 9 を示す) 。構造ファイルは、相同性モデリングのテンプレートとして構造抗体データベースである S A b D a b から、S W I S S - M O D E L 内で自動的にアクセスされる P D B 構造ファイルを使用して抽出した。

【図 8 - 5】図 8 A ~ 図 8 D : 図 8 A は、3 D 構造モデリングを示す概略図を示す。図 8 B ~ 図 8 D は、ヒト C D 1 9 可変軽鎖の 3 D 構造モデリングを示す。完全に自動化されたタンパク質構造相同性モデラーである S W I S S - M O D E L * を使用して、ヒト化 V_L および V_H ドメインの 3 次元モデルを生成した (具体例として抗 C D 1 9 を示す) 。構造ファイルは、相同性モデリングのテンプレートとして構造抗体データベースである S A b D a b から、S W I S S - M O D E L 内で自動的にアクセスされる P D B 構造ファイルを使用して抽出した。

20

【図 8 - 6】図 8 A ~ 図 8 D : 図 8 A は、3 D 構造モデリングを示す概略図を示す。図 8 B ~ 図 8 D は、ヒト C D 1 9 可変軽鎖の 3 D 構造モデリングを示す。完全に自動化されたタンパク質構造相同性モデラーである S W I S S - M O D E L * を使用して、ヒト化 V_L および V_H ドメインの 3 次元モデルを生成した (具体例として抗 C D 1 9 を示す) 。構造ファイルは、相同性モデリングのテンプレートとして構造抗体データベースである S A b D a b から、S W I S S - M O D E L 内で自動的にアクセスされる P D B 構造ファイルを使用して抽出した。

30

【図 8 - 7】図 8 A ~ 図 8 D : 図 8 A は、3 D 構造モデリングを示す概略図を示す。図 8 B ~ 図 8 D は、ヒト C D 1 9 可変軽鎖の 3 D 構造モデリングを示す。完全に自動化されたタンパク質構造相同性モデラーである S W I S S - M O D E L * を使用して、ヒト化 V_L および V_H ドメインの 3 次元モデルを生成した (具体例として抗 C D 1 9 を示す) 。構造ファイルは、相同性モデリングのテンプレートとして構造抗体データベースである S A b D a b から、S W I S S - M O D E L 内で自動的にアクセスされる P D B 構造ファイルを使用して抽出した。

40

【図 8 - 8】図 8 A ~ 図 8 D : 図 8 A は、3 D 構造モデリングを示す概略図を示す。図 8 B ~ 図 8 D は、ヒト C D 1 9 可変軽鎖の 3 D 構造モデリングを示す。完全に自動化されたタンパク質構造相同性モデラーである S W I S S - M O D E L * を使用して、ヒト化 V_L および V_H ドメインの 3 次元モデルを生成した (具体例として抗 C D 1 9 を示す) 。構造ファイルは、相同性モデリングのテンプレートとして構造抗体データベースである S A b D a b から、S W I S S - M O D E L 内で自動的にアクセスされる P D B 構造ファイルを使用して抽出した。

【 0 0 3 8 】

【図 9 - 1】図 9 A ~ 図 9 C は、ヒト C D 1 9 可変重鎖の 3 D 構造モデリングを示す。図 9 A は、h C D 1 9 V_L ドメインの特定の例について、S W I S S - M O D E L で、スコ

50

ア (G M Q E) およびマッチング法 (B L A S T または H H b l i t s) を使用して、最も一致する (構造的に相同な) 構造のリストを生成したことを示す。図 9 B ~ 図 9 C は、その後、最高のスコア構造 (2 f g w) を、下のパネルに示されるように h C D 1 9 V_L ドメイン (「 標的 」) とアラインさせたことを示す。

【図 9 - 2】図 9 A ~ 図 9 C は、ヒト C D 1 9 可変重鎖の 3 D 構造モデリングを示す。図 9 A は、h C D 1 9 V_L ドメインの特定の例について、S W I S S - M O D E L で、スコア (G M Q E) およびマッチング法 (B L A S T または H H b l i t s) を使用して、最も一致する (構造的に相同な) 構造のリストを生成したことを示す。図 9 B ~ 図 9 C は、その後、最高のスコア構造 (2 f g w) を、下のパネルに示されるように h C D 1 9 V_L ドメイン (「 標的 」) とアラインさせたことを示す。

10

【図 9 - 3】図 9 A ~ 図 9 C は、ヒト C D 1 9 可変重鎖の 3 D 構造モデリングを示す。図 9 A は、h C D 1 9 V_L ドメインの特定の例について、S W I S S - M O D E L で、スコア (G M Q E) およびマッチング法 (B L A S T または H H b l i t s) を使用して、最も一致する (構造的に相同な) 構造のリストを生成したことを示す。図 9 B ~ 図 9 C は、その後、最高のスコア構造 (2 f g w) を、下のパネルに示されるように h C D 1 9 V_L ドメイン (「 標的 」) とアラインさせたことを示す。

【図 9 - 4】図 9 A ~ 図 9 C は、ヒト C D 1 9 可変重鎖の 3 D 構造モデリングを示す。図 9 A は、h C D 1 9 V_L ドメインの特定の例について、S W I S S - M O D E L で、スコア (G M Q E) およびマッチング法 (B L A S T または H H b l i t s) を使用して、最も一致する (構造的に相同な) 構造のリストを生成したことを示す。図 9 B ~ 図 9 C は、その後、最高のスコア構造 (2 f g w) を、下のパネルに示されるように h C D 1 9 V_L ドメイン (「 標的 」) とアラインさせたことを示す。

20

【図 9 - 5】図 9 A ~ 図 9 C は、ヒト C D 1 9 可変重鎖の 3 D 構造モデリングを示す。図 9 A は、h C D 1 9 V_L ドメインの特定の例について、S W I S S - M O D E L で、スコア (G M Q E) およびマッチング法 (B L A S T または H H b l i t s) を使用して、最も一致する (構造的に相同な) 構造のリストを生成したことを示す。図 9 B ~ 図 9 C は、その後、最高のスコア構造 (2 f g w) を、下のパネルに示されるように h C D 1 9 V_L ドメイン (「 標的 」) とアラインさせたことを示す。

【図 9 - 6】図 9 A ~ 図 9 C は、ヒト C D 1 9 可変重鎖の 3 D 構造モデリングを示す。図 9 A は、h C D 1 9 V_L ドメインの特定の例について、S W I S S - M O D E L で、スコア (G M Q E) およびマッチング法 (B L A S T または H H b l i t s) を使用して、最も一致する (構造的に相同な) 構造のリストを生成したことを示す。図 9 B ~ 図 9 C は、その後、最高のスコア構造 (2 f g w) を、下のパネルに示されるように h C D 1 9 V_L ドメイン (「 標的 」) とアラインさせたことを示す。

30

【 0 0 3 9 】

【図 1 0 - 1】図 1 0 A は、マウス抗体からの C D R 領域の同定および単離 (左上) 、ヒトフレームワーク領域の抜粋 (右パネル) 、およびヒトフレームワーク / マウス C D R グラフティング (左下) を示す、ヒトフレームワークグラフティングの概略図を示す。C D R およびフレームワーク領域は、上記のように配列分析から収集される。図 1 0 B は、特定の I g ドメインの「ヒト化度」を列挙するために、T 2 0 スコアリングシステムを使用するモノクローナル抗体のベースラインヒト化スコアリングを示す (G a o ら、2 0 1 3) 。対照として、スコアリングおよび比較のために現在市場にある抗体から V_L および V_H ドメインを抽出した。示された抗体のヒト化度のスコア (右端の列) は V_L および V_H ドメインについて収載される。図 1 0 C は、商業市場向けに承認された初期の治療用抗体はマウスまたはキメラ抗体 (可変マウス領域 + ヒト定常領域) であり、後の承認はヒト化またはヒト抗体である傾向があることを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。図 1 0 D は、抗体の F D A 承認の年までの可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。V_H ドメ

40

50

インはサイズが大きいため、ヒト化度スコアが (V_L と比較して) 低くなる傾向がある。図 10 E は、示された抗体のヒト化スコアリングを示す。抗治療抗体応答の頻度は % として示され、評価された患者群の大きさが括弧内に示されている。一般に、ヒトまたはヒト化抗体が多いほど、臨床使用で免疫原性が報告される回数が少なくなる。図 10 F は、hCD19 - CAR (配列番号 1) および mCD19 - CAR (配列番号 3) の可変軽鎖のヒト化スコアリングを示す。図 10 G は、hCD19 - CAR (配列番号 2) および mCD19 - CAR (配列番号 4) の可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。

【図 10 - 2】図 10 A は、マウス抗体からの CDR 領域の同定および単離 (左上)、ヒトフレームワーク領域の抜粋 (右パネル)、およびヒトフレームワーク / マウス CDR グラフティング (左下) を示す、ヒトフレームワークグラフティングの概略図を示す。CDR およびフレームワーク領域は、上記のように配列分析から収集される。図 10 B は、特定の Ig ドメインの「ヒト化度」を列挙するために、T20 スコアリングシステムを使用するモノクローナル抗体のベースラインヒト化スコアリングを示す (Gaora, 2013)。対照として、スコアリングおよび比較のために現在市場にある抗体から V_L および V_H ドメインを抽出した。示された抗体のヒト化度のスコア (右端の列) は V_L および V_H ドメインについて収載される。図 10 C は、商業市場向けに承認された初期の治療用抗体はマウスまたはキメラ抗体 (可変マウス領域 + ヒト定常領域) であり、後の承認はヒト化またはヒト抗体である傾向があることを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。図 10 D は、抗体の FDA 承認の年までの可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。 V_H ドメインはサイズが大きいため、ヒト化度スコアが (V_L と比較して) 低くなる傾向がある。図 10 E は、示された抗体のヒト化スコアリングを示す。抗治療抗体応答の頻度は % として示され、評価された患者群の大きさが括弧内に示されている。一般に、ヒトまたはヒト化抗体が多いほど、臨床使用で免疫原性が報告される回数が少なくなる。図 10 F は、hCD19 - CAR (配列番号 1) および mCD19 - CAR (配列番号 3) の可変軽鎖のヒト化スコアリングを示す。図 10 G は、hCD19 - CAR (配列番号 2) および mCD19 - CAR (配列番号 4) の可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。

【図 10 - 3】図 10 A は、マウス抗体からの CDR 領域の同定および単離 (左上)、ヒトフレームワーク領域の抜粋 (右パネル)、およびヒトフレームワーク / マウス CDR グラフティング (左下) を示す、ヒトフレームワークグラフティングの概略図を示す。CDR およびフレームワーク領域は、上記のように配列分析から収集される。図 10 B は、特定の Ig ドメインの「ヒト化度」を列挙するために、T20 スコアリングシステムを使用するモノクローナル抗体のベースラインヒト化スコアリングを示す (Gaora, 2013)。対照として、スコアリングおよび比較のために現在市場にある抗体から V_L および V_H ドメインを抽出した。示された抗体のヒト化度のスコア (右端の列) は V_L および V_H ドメインについて収載される。図 10 C は、商業市場向けに承認された初期の治療用抗体はマウスまたはキメラ抗体 (可変マウス領域 + ヒト定常領域) であり、後の承認はヒト化またはヒト抗体である傾向があることを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。図 10 D は、抗体の FDA 承認の年までの可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。 V_H ドメインはサイズが大きいため、ヒト化度スコアが (V_L と比較して) 低くなる傾向がある。図 10 E は、示された抗体のヒト化スコアリングを示す。抗治療抗体応答の頻度は % として示され、評価された患者群の大きさが括弧内に示されている。一般に、ヒトまたはヒト化抗体が多いほど、臨床使用で免疫原性が報告される回数が少なくなる。図 10 F は、hCD19 - CAR (配列番号 1) および mCD19 - CAR (配列番号 3) の可変軽鎖のヒト化スコアリングを示す。図 10 G は、hCD19 - CAR (配列番号 2) および mC

10

20

30

40

50

D 1 9 - C A R (配列番号 4) の可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。

【図 1 0 - 4】図 1 0 A は、マウス抗体からの C D R 領域の同定および単離 (左上) 、ヒトフレームワーク領域の抜粋 (右パネル) 、およびヒトフレームワーク / マウス C D R グラフティング (左下) を示す、ヒトフレームワークグラフティングの概略図を示す。C D R およびフレームワーク領域は、上記のように配列分析から収集される。図 1 0 B は、特定の I g ドメインの「ヒト化度」を列挙するために、T 2 0 スコアリングシステムを使用するモノクローナル抗体のベースラインヒト化スコアリングを示す (G a o ら、2 0 1 3) 。対照として、スコアリングおよび比較のために現在市場にある抗体から V_L および V_H ドメインを抽出した。示された抗体のヒト化度のスコア (右端の列) は V_L および V_H ドメインについて収載される。図 1 0 C は、商業市場向けに承認された初期の治療用抗体はマウスまたはキメラ抗体 (可変マウス領域 + ヒト定常領域) であり、後の承認はヒト化またはヒト抗体である傾向があることを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。図 1 0 D は、抗体の F D A 承認の年までの可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。V_H ドメインはサイズが大きいため、ヒト化度スコアが (V_L と比較して) 低くなる傾向がある。図 1 0 E は、示された抗体のヒト化スコアリングを示す。抗治療抗体応答の頻度は % として示され、評価された患者群の大きさが括弧内に示されている。一般に、ヒトまたはヒト化抗体が多いほど、臨床使用で免疫原性が報告される回数が少なくなる。図 1 0 F は、h C D 1 9 - C A R (配列番号 1) および m C D 1 9 - C A R (配列番号 3) の可変軽鎖のヒト化スコアリングを示す。図 1 0 G は、h C D 1 9 - C A R (配列番号 2) および m C D 1 9 - C A R (配列番号 4) の可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。

10

20

30

40

50

【図 1 0 - 5】図 1 0 A は、マウス抗体からの C D R 領域の同定および単離 (左上) 、ヒトフレームワーク領域の抜粋 (右パネル) 、およびヒトフレームワーク / マウス C D R グラフティング (左下) を示す、ヒトフレームワークグラフティングの概略図を示す。C D R およびフレームワーク領域は、上記のように配列分析から収集される。図 1 0 B は、特定の I g ドメインの「ヒト化度」を列挙するために、T 2 0 スコアリングシステムを使用するモノクローナル抗体のベースラインヒト化スコアリングを示す (G a o ら、2 0 1 3) 。対照として、スコアリングおよび比較のために現在市場にある抗体から V_L および V_H ドメインを抽出した。示された抗体のヒト化度のスコア (右端の列) は V_L および V_H ドメインについて収載される。図 1 0 C は、商業市場向けに承認された初期の治療用抗体はマウスまたはキメラ抗体 (可変マウス領域 + ヒト定常領域) であり、後の承認はヒト化またはヒト抗体である傾向があることを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。図 1 0 D は、抗体の F D A 承認の年までの可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体 (マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト) に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。V_H ドメインはサイズが大きいため、ヒト化度スコアが (V_L と比較して) 低くなる傾向がある。図 1 0 E は、示された抗体のヒト化スコアリングを示す。抗治療抗体応答の頻度は % として示され、評価された患者群の大きさが括弧内に示されている。一般に、ヒトまたはヒト化抗体が多いほど、臨床使用で免疫原性が報告される回数が少なくなる。図 1 0 F は、h C D 1 9 - C A R (配列番号 1) および m C D 1 9 - C A R (配列番号 3) の可変軽鎖のヒト化スコアリングを示す。図 1 0 G は、h C D 1 9 - C A R (配列番号 2) および m C D 1 9 - C A R (配列番号 4) の可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。

【図 1 0 - 6】図 1 0 A は、マウス抗体からの C D R 領域の同定および単離 (左上) 、ヒトフレームワーク領域の抜粋 (右パネル) 、およびヒトフレームワーク / マウス C D R グラフティング (左下) を示す、ヒトフレームワークグラフティングの概略図を示す。C D R およびフレームワーク領域は、上記のように配列分析から収集される。図 1 0 B は、特定の I g ドメインの「ヒト化度」を列挙するために、T 2 0 スコアリングシステムを使用

するモノクローナル抗体のベースラインヒト化スコアリングを示す（Gaoら、2013）。対照として、スコアリングおよび比較のために現在市場にある抗体からV_LおよびV_Hドメインを抽出した。示された抗体のヒト化度のスコア（右端の列）はV_LおよびV_Hドメインについて収載される。図10Cは、商業市場向けに承認された初期の治療用抗体はマウスまたはキメラ抗体（可変マウス領域+ヒト定常領域）であり、後の承認はヒト化またはヒト抗体である傾向があることを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体（マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト）に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。図10Dは、抗体のFDA承認の年までの可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体（マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト）に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。V_Hドメインはサイズが大きいため、ヒト化度スコアが（V_Lと比較して）低くなる傾向がある。図10Eは、示された抗体のヒト化スコアリングを示す。抗治療抗体応答の頻度は%として示され、評価された患者群の大きさが括弧内に示されている。一般に、ヒトまたはヒト化抗体が多いほど、臨床使用で免疫原性が報告される回数が少なくなる。図10Fは、hCD19-CAR（配列番号1）およびmCD19-CAR（配列番号3）の可変軽鎖のヒト化スコアリングを示す。図10Gは、hCD19-CAR（配列番号2）およびmCD19-CAR（配列番号4）の可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。

【図10-7】図10Aは、マウス抗体からのCDR領域の同定および単離（左上）、ヒトフレームワーク領域の抜粋（右パネル）、およびヒトフレームワーク/マウスCDRグラフトリング（左下）を示す、ヒトフレームワークグラフトリングの概略図を示す。CDRおよびフレームワーク領域は、上記のように配列分析から収集される。図10Bは、特定のIgドメインの「ヒト化度」を列挙するために、T20スコアリングシステムを使用するモノクローナル抗体のベースラインヒト化スコアリングを示す（Gaoら、2013）。対照として、スコアリングおよび比較のために現在市場にある抗体からV_LおよびV_Hドメインを抽出した。示された抗体のヒト化度のスコア（右端の列）はV_LおよびV_Hドメインについて収載される。図10Cは、商業市場向けに承認された初期の治療用抗体はマウスまたはキメラ抗体（可変マウス領域+ヒト定常領域）であり、後の承認はヒト化またはヒト抗体である傾向があることを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体（マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト）に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。図10Dは、抗体のFDA承認の年までの可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。ヒト化度スコアは、同じ種類の抗体（マウス、キメラ、ヒト化、またはヒト）に群がる傾向があり、ヒト化度スコアの増加はヒト化度の内容に相関する。V_Hドメインはサイズが大きいため、ヒト化度スコアが（V_Lと比較して）低くなる傾向がある。図10Eは、示された抗体のヒト化スコアリングを示す。抗治療抗体応答の頻度は%として示され、評価された患者群の大きさが括弧内に示されている。一般に、ヒトまたはヒト化抗体が多いほど、臨床使用で免疫原性が報告される回数が少なくなる。図10Fは、hCD19-CAR（配列番号1）およびmCD19-CAR（配列番号3）の可変軽鎖のヒト化スコアリングを示す。図10Gは、hCD19-CAR（配列番号2）およびmCD19-CAR（配列番号4）の可変重鎖のヒト化スコアリングを示す。

【0040】

【図11-1】図11Aは、CD19-CARおよびhCD19-CAR構築物の概略図を示す。図11Bは、CARの形質導入効率を示す。図11Cは、K562細胞に対する異なるCAR構築物の細胞傷害性を示す。図11Dは、Raji細胞に対する異なるCAR構築物の細胞傷害性を示す。図11Eは、示されたエフェクター：標的比でK562またはRaji細胞に対する対照CD3/IgG1 CARまたはヒト化CD3/IgG1 CARを有する細胞の細胞傷害性アッセイを示す。

【図11-2】図11Aは、CD19-CARおよびhCD19-CAR構築物の概略図を示す。図11Bは、CARの形質導入効率を示す。図11Cは、K562細胞に対する異なるCAR構築物の細胞傷害性を示す。図11Dは、Raji細胞に対する異なるCAR構築物の細胞傷害性を示す。図11Eは、示されたエフェクター：標的比でK562ま

たは R a j i 細胞に対する対照 C D 3 / I g G 1 C A R またはヒト化 C D 3 / I g G 1 C A R を有する細胞の細胞傷害性アッセイを示す。

【図 1 1 - 3】図 1 1 A は、C D 1 9 - C A R および h C D 1 9 - C A R 構築物の概略図を示す。図 1 1 B は、C A R の形質導入効率を示す。図 1 1 C は、K 5 6 2 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 D は、R a j i 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 E は、示されたエフェクター：標的比で K 5 6 2 または R a j i 細胞に対する対照 C D 3 / I g G 1 C A R またはヒト化 C D 3 / I g G 1 C A R を有する細胞の細胞傷害性アッセイを示す。

【図 1 1 - 4】図 1 1 A は、C D 1 9 - C A R および h C D 1 9 - C A R 構築物の概略図を示す。図 1 1 B は、C A R の形質導入効率を示す。図 1 1 C は、K 5 6 2 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 D は、R a j i 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 E は、示されたエフェクター：標的比で K 5 6 2 または R a j i 細胞に対する対照 C D 3 / I g G 1 C A R またはヒト化 C D 3 / I g G 1 C A R を有する細胞の細胞傷害性アッセイを示す。

【図 1 1 - 5】図 1 1 A は、C D 1 9 - C A R および h C D 1 9 - C A R 構築物の概略図を示す。図 1 1 B は、C A R の形質導入効率を示す。図 1 1 C は、K 5 6 2 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 D は、R a j i 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 E は、示されたエフェクター：標的比で K 5 6 2 または R a j i 細胞に対する対照 C D 3 / I g G 1 C A R またはヒト化 C D 3 / I g G 1 C A R を有する細胞の細胞傷害性アッセイを示す。

【図 1 1 - 6】図 1 1 A は、C D 1 9 - C A R および h C D 1 9 - C A R 構築物の概略図を示す。図 1 1 B は、C A R の形質導入効率を示す。図 1 1 C は、K 5 6 2 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 D は、R a j i 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 E は、示されたエフェクター：標的比で K 5 6 2 または R a j i 細胞に対する対照 C D 3 / I g G 1 C A R またはヒト化 C D 3 / I g G 1 C A R を有する細胞の細胞傷害性アッセイを示す。

【図 1 1 - 7】図 1 1 A は、C D 1 9 - C A R および h C D 1 9 - C A R 構築物の概略図を示す。図 1 1 B は、C A R の形質導入効率を示す。図 1 1 C は、K 5 6 2 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 D は、R a j i 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 E は、示されたエフェクター：標的比で K 5 6 2 または R a j i 細胞に対する対照 C D 3 / I g G 1 C A R またはヒト化 C D 3 / I g G 1 C A R を有する細胞の細胞傷害性アッセイを示す。

【図 1 1 - 8】図 1 1 A は、C D 1 9 - C A R および h C D 1 9 - C A R 構築物の概略図を示す。図 1 1 B は、C A R の形質導入効率を示す。図 1 1 C は、K 5 6 2 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 D は、R a j i 細胞に対する異なる C A R 構築物の細胞傷害性を示す。図 1 1 E は、示されたエフェクター：標的比で K 5 6 2 または R a j i 細胞に対する対照 C D 3 / I g G 1 C A R またはヒト化 C D 3 / I g G 1 C A R を有する細胞の細胞傷害性アッセイを示す。

【0 0 4 1】

【図 1 2 - 1】図 1 2 A は、C D 3 1 9 - C A R N K 形質導入を示す。図 1 2 B は、N K 細胞の成長曲線を示す。図 1 2 C は、細胞株での C D 3 1 9 発現を示す。図 1 2 D ~ F は、C D 3 1 9 - C A R N K 細胞傷害性アッセイを示す。図 1 2 G は、K 5 6 2、M M . 1 S、および O P M 2 を含む示された細胞型に対する C D 3 1 9 - C A R N K 細胞を用いる細胞傷害性アッセイを示す。図 1 2 H ~ I は、C D 3 1 9 - C A R N K 細胞がエフェクター表現型を有することを示す。

【図 1 2 - 2】図 1 2 A は、C D 3 1 9 - C A R N K 形質導入を示す。図 1 2 B は、N K 細胞の成長曲線を示す。図 1 2 C は、細胞株での C D 3 1 9 発現を示す。図 1 2 D ~ F は、C D 3 1 9 - C A R N K 細胞傷害性アッセイを示す。図 1 2 G は、K 5 6 2、M M . 1 S、および O P M 2 を含む示された細胞型に対する C D 3 1 9 - C A R N K 細胞を用いる細胞傷害性アッセイを示す。図 1 2 H ~ I は、C D 3 1 9 - C A R N K 細胞がエ

10

20

30

40

50

【図１２－３】図１２Ａは、ＣＤ３１９－ＣＡＲ　ＮＫ形質導入を示す。図１２Ｂは、ＮＫ細胞の成長曲線を示す。図１２Ｃは、細胞株でのＣＤ３１９発現を示す。図１２Ｄ～Ｆは、ＣＤ３１９－ＣＡＲ　ＮＫ細胞傷害性アッセイを示す。図１２Ｇは、Ｋ５６２、ＭＭ．１Ｓ、およびＯＰＭ２を含む示された細胞型に対するＣＤ３１９－ＣＡＲ　ＮＫ細胞を用いる細胞傷害性アッセイを示す。図１２Ｈ～Ｉは、ＣＤ３１９－ＣＡＲ　ＮＫ細胞がエフェクター表現型を有することを示す。

10

20

20

30

40

40

50

50

【0042】

例示の実施形態の説明

キメラ抗原受容体(CAR)に基づく細胞免疫療法は、癌の処置において、特に白血病およびリンパ腫の処置にかなりの有効性を示している。それにもかかわらず、現在利用可能なCARは、様々な設計上の欠陥を含む可能性がある。CARを使用して標的癌免疫療法のために免疫細胞を再プログラムする最近の臨床結果は、強力な抗腫瘍細胞傷害性を示している。大部分のCAR単鎖可変断片(scFv)モジュールはマウス抗体の誘導体であるため、ヒト抗マウス免疫反応は、このようにして得られたCARの効力を損なう。

【0043】

従って、一部の実施形態では、本開示は、抗原に対してヒト化CAR(hCAR)を操作するプラットフォーム技術を提供する。抗原には、CD19(hCD19CAR)、CD123(hCD123CAR)、メソテリン(hMesocAR)、ROR1(hROR1CAR)、CD5(hCD5CAR)、CLL-1(hCLL-1CAR)、および/またはCD99(hCD99CAR)ならびに癌または自己免疫障害などの疾患の処置のために標的となり得るその他の抗原が含まれ得る。従って、特定の実施形態では、本開示は、ヒト化CARおよび癌の処置におけるそれらの使用方法をさらに提供する。

【0044】

一部の実施形態では、本開示は、CAR、具体的にはCARのscFvのヒト化のためのプラットフォームを提供する。このプロセスは、実施例1に記載される5つのモジュールコンポーネントに従う。これらには、配列解析、3D構造モデリング、ヒトフレームワークグラフィティング、ヒト化スコアリング、および機能分析が含まれ得る。次に、IgGは、ヒト化プロセスに焦点を合わせ、アロタイプ(すなわち、同じアイソタイプのバージョン)の広範な配列変異を利用して、ヒトフレームワークの選択を微調整する(図2)。

【0045】

最初のステップでは、ヒト重鎖および軽鎖の抗体配列を、GenBankなどの供給源からのローカルデータベースで精選することができる。可変ドメインは、IgBLAST(BLASTの1つのバージョン)を使用してアラインさせて、アロタイプを線引きし、相同性に従って配列を分類することができる。次いで、CDR領域を特定することができ、フレームワーク配列をカタログに登録する(図1A)。次いで、例えばタンパク質構造相同性モデラー(例えば、SWISS-MODEL)を使用して、3D構造モデリングを実行することができる。

【0046】

一部の実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載されるヒト化scFvでCARを発現するように操作されている。免疫細胞は、NK細胞および/またはT細胞、例えば末梢血、臍帯血、または骨髄由来の浸潤リンパ球に由来するものなどであってよい。本発明のヒト化プラットフォームから誘導されるscFvを含む免疫細胞は、ヒト抗マウス抗体(HAMA)産生の可能性と、遺伝子組み換え免疫細胞療法製品の関連する免疫介在性拒絶反応を軽減することができる。

【0047】

従って、さらなる実施形態は、ヒト化scFvを有するCARを発現する免疫細胞を投与することによって疾患または障害を処置する方法を提供する。これらの方法を使用することにより、免疫拒絶反応が低下し、注入された細胞療法製品の持続性が長くなる。処置することができる例となる被験体としては、CD19⁺CLL、ALLおよびNHLを有する癌患者；AML、CML、MDSおよびBPD CNをはじめとするCD123陽性悪性腫瘍；子宮頸癌、子宮内膜癌、および頭頸部癌をはじめとするメソテリン陽性癌；CLL(例えば、以前にCAR療法を受けていないかまたはCD19陰性疾患でCD19-CARの後に再発した人)、乳癌、卵巣癌および膵臓癌をはじめとするROR1陽性悪性腫瘍；ALLおよびNHLをはじめとするCD5陽性悪性腫瘍ならびに胸腺癌が挙げられる。

【0048】

さらなる実施形態では、本開示は、切断型 E G F R v I I I を含む C A R を提供し、該受容体は、細胞質エンドドメインまたは機能性 E G F 結合ドメインを含まず、本明細書において E v 3 と呼ばれる。E G F R v I I I は、多形神経膠芽腫および肺癌などの腫瘍細胞にのみ見出され、上皮細胞などの正常な E G F R 発現細胞には見出されない E G F R 変異体である。E G F R v I I I は、エクソン 2 ~ 7 の欠失 (8 0 1 塩基対のインフレーム欠失、野生型と比較して 2 6 7 アミノ酸が欠損) をもたらす体細胞変異を有する。E G F R v I I I の欠失は、ドメイン 1 および 2 の大部分も網羅し、その結果切断型ドメイン 1 および切断型ドメイン 2 がもたらされる。さらに、E G F R v I I I は、余分なグリシン残基 (アミノ酸 6 ~ 2 7 3 はグリシン残基 ; すなわち L E E K K G N Y V V T D に置き換えられる) を生成するエクソン 1 とエクソン 8 との融合の結果として特異的エピトープを有し、これは例えば多形神経膠芽腫の場合には腫瘍特異的抗原を形成する。

10

【 0 0 4 9 】

E v 3 (または t E v 3) と呼ばれる、本明細書で提供される切断型 E G F R v I I I は、エンドドメインまたは機能性 E G F 結合ドメインを含まない。具体的には、E v 3 細胞外ドメインは、a) シグナル伝達、b) C A R 陽性を割り当てるための細胞マーカー、および c) 抗体結合 (例えば、セツキシマブとの) による細胞除去のための抗原マーカーのために、膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインを除く C A R のストークとして使用することができる。特定の態様では、E v 3 は、E G F R の切断型ドメイン 1 (L 1) 、切断型ドメイン 2 (C R 1) 、ドメイン 3 (L 2) 、およびドメイン 4 (C R 2) (図 2 B に示す通り) を含む。E v 3 の例となる配列は図 2 C に示される。本発明の E v 3 は、図 2 C の配列と少なくとも 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の配列を含み得る。セツキシマブ結合部位 (ドメイン 3 内) は、E v 3 と野生型 E G F R 細胞外ドメインの両方で保存される。セツキシマブ (および / またはパニツムマブ) 結合部位に加えて、E v 3 エピトープは、その他の抗体 (例えば、M R 1 、 m A b 8 0 6 、および D H 8 . 3) の追加の結合部位を提示する。

20

【 0 0 5 0 】

本明細書で提供される C A R は、E v 3 を、s c F v (すなわち抗原認識ドメイン) とシグナル伝達ドメイン (すなわち C D 2 8 および C D 3) を共有結合する抗原安全スイッチを兼ねることができる統合シグナル伝達ヒンジとして使用することができる。E v 3 は、インビトロおよびインビボでの C A R 免疫細胞の検出も可能にする。その上、E v 3 ヒンジは、遺伝的負荷 (C A R) の保持を保証する。

30

【 0 0 5 1 】

本明細書で提供される E v 3 ヒンジのさらなる態様は、E G F R v I I I に特異的であり、他の組織および細胞、例えば上皮細胞などに存在する E G F R のドメイン I I I および I V と交差反応しない抗体、例えば M R 1 などによって標的となるその能力である。セツキシマブおよびパニツムマブは、臨床的に利用可能な抗体であって F D A に承認されているので、C D 1 9 、C D 1 2 3 、C D 5 、R O R 1 、C D 3 3 、C D 9 9 、およびメソテリンなどの異なる抗原特異性をもつ各 C A R のイディオタイプ抗体の規制承認を得る必要がない。E v 3 - C A R を標的にする能力は、C A R 陽性細胞および / または制御された細胞除去を検出するために使用することができる。細胞除去は、サイトカイン放出症候群、神経毒性、および / またはオンターゲットまたはオフ腫瘍活性などの有害事象の場合に望ましいことがある。E v 3 は T 細胞または N K 細胞などの免疫細胞で標準的に発現しないので、E v 3 を強制発現させると、遺伝子組換え免疫細胞を特異的にマークすることになる。最後に、E v 3 は、シグナル伝達エンドドメイン (細胞質ドメインが除去されるため) または E G F 結合ドメインを含まず、E v 3 を含む C A R は、細胞の外側または内側のいずれにおいても E G F シグナル伝達経路 (例えば、A R 、A R F 4 、C A V 1 、C A V 3 、C B L 、C B L B 、C B L C 、C D 4 4 、C D C 2 5 A 、C R K 、C T N N B 1 、D C N 、E G F 、G R B 1 4 、G r b 2 、J A K 2 、M U C 1 、N C K 1 、N C K 2 、P K C 、P L C G 1 、P L S C R 1 、P T P N 1 、P T P N 1 1 、P T P N 6 、P T P R K 、S H 2 D 3 A 、S H 3 K B P 1 、S H C 1 、S O S 1 、S r c 、S T A T 1 、S T A

40

50

T3、STAT3、STAT5A、UBC、WAS)に応答またはクロストークしないことになる。従って、特定の態様では、これらの遺伝子産物はいずれも、Ev3-CARSのEv3ヒンジに干渉しないと予想される。特定の態様では、Ev3には1、2、3、またはそれを超える変更があることがある。

【0052】

さらなる態様では、Ev3-CARの機能、有効性、および細胞の持続性は、NK細胞活性化の重要な要素であるDNA X活性化タンパク質12(DAP12)シグナル伝達モジュールをEv3-DAP12-CARに組み込むことによってさらに強化され得る。

【0053】

さらなる実施形態は、本明細書で提供されるCARをT細胞およびNK細胞などの免疫細胞に導入する方法を提供する。CAR-TまたはCAR-NK細胞は、癌の処置などのために被験体に投与されてよい。特に、CAR-TまたはCAR-NK細胞で処置され得る癌には、白血病およびリンパ腫、例えば慢性リンパ性白血病(CLL)、急性リンパ性白血病(ALL)、および非ホジキンリンパ腫(NHL)などが含まれる。

I. 定義

【0054】

本明細書において使用される、指定された成分に関して「本質的に含まない」は、指定された成分が意図的に組成物に配合されていないこと、および/または汚染物質としてまたは微量でのみ存在することを意味するために本明細書で使用される。そのため、組成物の意図しない汚染から生じる指定された成分の総量は、0.05%をはるかに下回り、好ましくは0.01%を下回る。最も好ましいのは、指定された成分が標準的な分析方法では検出することができない組成物である。

【0055】

本明細書において使用される場合、「a」または「an」は、1つまたは複数を意味し得る。本明細書の1または複数の請求項において、「含む」という語と併せて使用される場合、「a」または「an」という語は1つまたは複数を意味し得る。

【0056】

請求項における用語「または」の使用は、代替物のみを指すように明示的に示されていない限り、または代替物が相互に排他的でない限り、「および/または」を意味するために使用されるが、本開示は、代替物および「および/または」のみを指す定義を支持する。本明細書において使用される場合、「もう一つの」は、少なくとも第2のまたはそれよりも多くを意味し得る。用語「約」、「実質的に」および「およそ」は、一般に、述べた値のプラスマイナス5%を意味する。

【0057】

用語「外因性」は、細胞または生物のタンパク質、遺伝子、核酸、またはポリヌクレオチドに関連して使用される場合、人工的手段または自然な手段によって細胞または生物に導入されたタンパク質、遺伝子、核酸、またはポリヌクレオチドを指す；あるいは細胞に関連して使用される場合、この用語は、単離されて、その後人工的手段または自然な手段によって他の細胞または生物に導入された細胞を指す。外因性核酸は、異なる生物または細胞由来のものであってもよいし、あるいはそれは生物または細胞内で自然に生じる核酸の1またはそれを超える追加のコピーであってよい。外因性細胞は、異なる生物由来であってよいし、またはそれは同じ生物由来であってよい。限定されない例として、外因性核酸とは、天然の細胞にある染色体位置とは異なる染色体位置にあるか、そうでなければ自然界に見られるものとは異なる核酸配列が隣接している核酸である。

【0058】

「発現構築物」または「発現カセット」は、転写を指示することができる核酸分子を意味する。発現構築物には、最小でも、1またはそれを超える所望の細胞型、組織または器官での遺伝子発現を指示する、1またはそれを超える転写制御要素(例えばプロモーター、エンハンサーまたはその機能的に等価な構造など)が含まれる。さらなる要素、例えば転写終結シグナルなどが含まれていてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

「ベクター」または「構築物」（遺伝子送達系または遺伝子導入「ビヒクル」と呼ばれることもある）とは、インビトロまたはインビボのいずれかで、宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む高分子または分子の複合体を指す。

【 0 0 6 0 】

一般的な種類のベクターである「プラスミド」は、染色体DNAから独立して複製することができる、染色体DNAとは別の染色体外DNA分子である。場合によっては、それは環状で二重鎖である。

【 0 0 6 1 】

本明細書において使用される、用語「患者」または「被験体」とは、生きている哺乳類生物、例えばヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、またはそれらのトランスジェニック種を指す。特定の実施形態では、患者または被験体は霊長類である。ヒト患者の限定されない例は、成人、少年、幼児および胎児である。

10

【 0 0 6 2 】

「免疫障害」、「免疫関連障害」、または「免疫介在性障害」とは、免疫応答が疾患の発症または進行において重要な役割を果たす障害を指す。免疫介在性疾患には、自己免疫障害、同種移植片拒絶、移植片対宿主病ならびに炎症およびアレルギー症状が含まれる。

【 0 0 6 3 】

「免疫応答」は、刺激に対するB細胞、またはT細胞、または先天性免疫細胞などの免疫系の細胞の応答である。一実施形態では、応答は特定の抗原に特異的である（「抗原特異的応答」）。

20

【 0 0 6 4 】

用語「腫瘍関連抗原」、「腫瘍抗原」、および「癌細胞抗原」は、本明細書において同義的に使用される。いずれの場合も、これらの用語は癌細胞によって特異的または優先的に発現されるタンパク質、糖タンパク質、または炭水化物を指す。

【 0 0 6 5 】

「エピトープ」は、アミノ酸配列の特異性によって決定される、抗体によって認識される抗原の部位である。2つの抗体は、競合結合アッセイで測定されるように、各々が他方の抗原との結合を競合的に抑制（ブロック）する場合、同じエピトープに結合すると言われる。あるいは、一方の抗体の結合を減少または排除する抗原の大部分のアミノ酸変異が他方の結合を減少または排除する場合、2つの抗体は同じエピトープを有する。2つの抗体は、各々が他方の抗原との結合を部分的に抑制する場合、かつ/または一方の抗体の結合を減少または排除する一部のアミノ酸変異が他方の結合を減少または排除する場合、重複するエピトープを有すると言われる。

30

【 0 0 6 6 】

疾患または症状の「処置（treating）」または処置（treatment）は、疾患の徴候または症候を緩和するために、1またはそれを超える薬物を患者に投与することを含み得るプロトコルを実行することを指す。処置の望ましい効果には、疾患の進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後の改善が含まれる。緩和は、疾患または症状の徴候または症候が現れる前、ならびに出現した後に起こり得る。従って、「処置（treating）」または「処置（treatment）」には、疾患または望ましくない症状の「予防（preventing）」または「予防（prevention）」が含まれ得る。加えて、「処置（Treating）」または「処置（treatment）」は、徴候または症候の完全な緩和を必要とせず、治癒を必要とせず、具体的には患者にわずかな効果しか与えないプロトコルを含む。

40

【 0 0 6 7 】

「有効」という用語は、その用語が本明細書および/または特許請求の範囲で使用されている場合、所望される、期待される、または意図される結果を達成するのに十分であることを意味する。「有効量」、「治療上有効な量」または「薬剤有効量」は、患者または被験体を化合物で処置する状況で使用される場合、疾患を処置または予防するために被験

50

体または患者に投与される場合の化合物の量が、疾患のそのような処置または予防をもたらすために十分な量であることを意味する。

【0068】

「処置 (treatment)」または「処置 (treating)」には、(1) 疾患の病態または総体症状を経験または表示している被験体または患者においてその疾患を抑制すること (例えば、病態および/または総体症状のさらなる進展を停止させること)、(2) 疾患の病態または総体症状を経験または表示している被験体または患者においてその疾患を改善すること (例えば、病態および/または総体症状を逆転させること)、および/または(3) 疾患の病態または総体症状を経験または表示している被験体または患者において疾患またはその症候の測定可能な減少をもたらすことが含まれる。

10

【0069】

「予防 (prevention)」または「予防 (preventing)」には、(1) リスクがある、かつ/または疾患の素因があるかもしれないが、疾患の病態または総体症状の一部または全部をまだ経験または表示していない被験体または患者において疾患の発症を抑制すること、および/または(2) リスクがある、かつ/または疾患の素因があるかもしれないが、疾患の病態または総体症状の一部または全部をまだ経験または表示していない被験体または患者において疾患の病態または総体症状の発症を遅らせることが含まれる。

【0070】

本明細書において使用される、用語「1または複数のフレームワーク領域」とは、CDRの足場として作用する抗体の可変領域の領域を指す。従って、フレームワーク領域は、可変軽鎖および可変重鎖の非CDR配列を含み得る。可変領域のCDRは、Seela-Culangら、2013年(参照によりその全文が本明細書に援用される)に記載されているKababianナノリングシステムを使用するなど、当技術分野で公知の方法によって決定することができる。Kababian(CITE)により記載されるシステムは、抗体のあらゆる可変領域に適用可能な明確な残基番号付けシステムを提供するだけでなく、3つのCDRを定義する正確な残基境界も提供する。

20

【0071】

本明細書において一般的に使用される場合、「薬学的に許容され得る」とは、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激作用、アレルギー応答、または合理的な利益/リスク比に見合ったその他の問題または合併症なく、人間および動物の組織、器官、および/または体液と接触して使用するのに適している化合物、材料、組成物、および/または剤形を指す。

30

【0072】

「薬学的に許容され得る塩」とは、上で定義されるように薬学的に許容され得、所望の薬理活性を有する本明細書に開示される化合物の塩を意味する。そのような塩には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、および同類のものなどの無機酸で形成された酸付加塩;あるいは、1,2-エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、3-フェニルプロピオン酸、4,4'-メチレンビス(3-ヒドロキシ-2-エン-1-カルボン酸)、4-メチルピシクロ[2.2.2]オクタ-2-エン-1-カルボン酸、酢酸、脂肪族モノおよびジカルボン酸、脂肪族硫酸、芳香族硫酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、炭酸、桂皮酸、クエン酸、シクロペンタンプロピオン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、ヘプタン酸、ヘキサノ酸、ヒドロキシナフトエ酸、乳酸、ラウリル硫酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ムコン酸、o-(4-ヒドロキシベンゾイル)安息香酸、シュウ酸、p-クロロベンゼンスルホン酸、フェニル置換アルカン酸、プロピオン酸、p-トルエンスルホン酸、ビルビン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、酒石酸、ターシャリーブチル酢酸、トリメチル酢酸、および同類のものなどの有機酸で形成された酸付加塩が含まれる。薬学的に許容され得る塩には、存在する酸性プロトンが無機または有機塩基と反応できる場合に形成さ

40

50

れ得る塩基付加塩も含まれる。許容され得る無機塩基には、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アルミニウムおよび水酸化カルシウムが含まれる。許容され得る有機塩基には、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、N - メチルグルカミンおよび同類のものが含まれる。塩が全体として薬学的に許容され得る限り、本発明の任意の塩の一部を形成する特定の陰イオンまたは陽イオンは決定的に重要ではないということを認識する必要がある。薬学的に許容され得る塩のさらなる例ならびにその調製および使用法は、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002)に記載されている。

10

【0073】

「薬学的に許容され得る担体」、「薬物担体」、または単に「担体」は、化学薬品の運搬、送達、および/または輸送に関与する有効成分の薬剤とともに処方される薬学的に許容され得る物質である。薬物担体を使用して薬物の送達および有効性を改善することができ、それには、例えば、薬物バイオアベイラビリティを調節し、薬物代謝を減少させ、かつ/または薬物毒性を低減する制御放出技術が含まれる。一部の薬物担体は、特異的な標的部位への薬物送達の有効性を高めることができる。担体の例としては、リボソーム、ミクロスフェア（例えば、ポリ（乳酸 - コ - グリコール酸）製）、アルブミンミクロスフェア、合成ポリマー、ナノファイバー、タンパク質 - DNA 複合体、タンパク質複合体、赤血球、ウィロソームおよびデンドリマーが挙げられる。

20

【0074】

本明細書において使用される場合、用語「キメラ抗原受容体 (CAR)」は、例えば、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、またはキメラ免疫受容体を指すことがあり、特定の免疫エフェクター細胞に人工的な特異性をグラフティングする操作された受容体を包含し得る。CARを用いて、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に付与し、それにより多数の特異的T細胞を例えば養子細胞療法で用いるために生成することができる。特定の実施形態では、CARは細胞の特異性を例えば腫瘍関連抗原に向ける。一部の実施形態では、CARは、細胞内活性化ドメイン、膜貫通ドメイン、および腫瘍関連抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含む。特定の態様では、CARは、膜貫通ドメインおよびエンドドメインのCD3に融合した、モノクローナル抗体に由来する単鎖可変断片 (scFv) の融合を含む。その他のCAR設計の特異性は、受容体（例えば、ペプチド）のリガンドに由来するか、またはデクチンなどのパターン認識受容体に由来してよい。場合によっては、抗原認識ドメインの間隔を改変して、活性化誘発性細胞死を減少させることができる。場合によっては、CARは、さらなる共刺激シグナル伝達のドメイン、例えばCD3、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10、および/またはOX40を含む。一部の例では、分子をCARと共発現させることができ、それには、共刺激分子、イメージング用のレポーター遺伝子（例えば、ポジトロン放出断層撮影用）、プロドラッグの添加時にT細胞を条件付きで除去する遺伝子産物、ホーミング受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカイン、およびサイトカイン受容体が含まれる。

30

【0075】

用語「抗原提示細胞 (APC)」とは、免疫系の特定のエフェクター細胞によって認識可能なペプチドMHC複合体の形で1またはそれを超える抗原を提示することができ、それにより提示されている1つまたは複数の抗原に対する有効な細胞性免疫応答を誘導する、細胞のクラスを指す。APCは、マクロファージ、B細胞、内皮細胞、活性化T細胞、および樹状細胞などの無傷の全細胞；あるいは、天然に存在するかまたは合成のその他の分子、例えば2 - ミクログロブリンと複合体化する精製MHCクラスI分子などである。多くの種類の細胞は、T細胞認識のために、それらの細胞表面に抗原を提示する能力があり得るが、細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 応答のためにナイーブT細胞を活性化するのに有効な量の抗原を提示する能力を有するのは樹状細胞のみである。

40

【0076】

50

用語「培養」とは、適切な培地での細胞のインビトロ維持、分化、および／または増殖を指す。「濃縮された」とは、全細胞に対して、生物内に存在する組織において見られるよりも大きな割合で存在する細胞を含む組成物を意味する。

【0077】

「抗癌」剤は、例えば、癌細胞の死滅を促進する、癌細胞においてアポトーシスを誘発する、癌細胞の増殖速度を低下させる、転移の発生率または数を低下させる、腫瘍サイズを縮小する、腫瘍増殖を抑制する、腫瘍または癌細胞への血液供給を減少させる、癌細胞または腫瘍に対する免疫応答を促進する、癌の進行を防ぐまたは抑制する、または癌を有する被験体の寿命を延ばすことによって、被験体において癌細胞／腫瘍に悪影響を及ぼすことができる。

【0078】

本明細書において使用される場合、用語「自殺遺伝子」は、死滅のために細胞を選択的に標的化するために使用され得る遺伝子として規定される。

【0079】

ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドまたはポリペプチド領域）が特定の割合（例えば、80%、85%、90%、または95%）の「配列同一性」または「相同性」をもう一つの配列に対して有するということは、アラインさせると、2つの配列を比較する際に、その塩基（またはアミノ酸）の割合が同じになることを意味する。このアライメントおよび相同性パーセントまたは配列同一性パーセントは、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubelら編、1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1.に記載されているものを使用して決定することができる。好ましくは、デフォルトパラメータをアライメントに使用する。好ましいアライメントプログラムは、BLASTであり、デフォルトパラメータを使用する。特に、好ましいプログラムは、BLASTNおよびBLASTPであり、以下のデフォルトパラメータを使用する：遺伝子コード＝標準；フィルター＝なし；鎖＝両方；カットオフ＝60；期待値＝10；マトリックス＝BLOSUM62；記載＝50配列；ソート＝ハイスコア；データベース＝非冗長、GENBANK+EMBL+DDBJ+PDB+GENBANK CDS翻訳+SwissProtein+SPupdate+PIR。

【0080】

本明細書において使用される場合、用語「切断型 (truncated)」とは、全長タンパク質またはタンパク質のドメインよりも短いタンパク質の断片またはタンパク質のドメインを指す。トランケーションは、全長配列の1またはそれを超えるアミノ酸、例えば5、10、15、20、25、30またはそれを超えるアミノ酸の除去によるものであり得る。

II. 免疫細胞

【0081】

本開示の特定の実施形態は、E v 3をCARのヒンジとして、かつ／またはヒト化scFvをcARの抗原結合ドメインとして用いてCARを発現する免疫細胞に関する。免疫細胞は、T細胞（例えば、制御性T細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、またはT細胞）、NK細胞、インパリアントNK細胞、NKT細胞、幹細胞（例えば、間葉系幹細胞(MSC)または人工多能性幹(iPSC)細胞)であってよい。一部の実施形態では、細胞は、単球または顆粒球、例えば、骨髄系細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、および／または好塩基球である。本明細書では、免疫細胞を産生および操作する方法、ならびに養子細胞療法のために細胞を使用および投与する方法も提供され、その場合、細胞は自己または同種であり得る。従って、免疫細胞は、癌細胞を標的にするためなどの免疫療法として使用することができる。

【0082】

免疫細胞は、被験体、特にヒト被験体から単離されたものであり得る。免疫細胞は、関

10

20

30

40

50

心対象の被験体、例えば特定の疾患または症状を有する疑いのある被験体、特定の疾患または症状の素因を有する疑いのある被験体、または特定の疾患または症状の治療を受けている被験体などから得ることができる。免疫細胞は、被験体に存在する任意の場所から収集することができ、それには、限定されるものではないが、血液、臍帯血、脾臓、胸腺、リンパ節、および骨髄が含まれる。単離された免疫細胞は、直接使用してもよいし、凍結などによって一定期間保存してもよい。

【0083】

免疫細胞は、それらが存在する組織から濃縮／精製されてよく、それには、限定されるものではないが、血液（血液バンクまたは臍帯血バンクによって収集された血液を含む）、脾臓、骨髄、外科手術中に除去および／または曝露された組織、ならびに生検手順によって得られた組織が含まれる。免疫細胞が濃縮、単離、および／または精製される組織／器官は、生体および非生体の被験体から単離されてよく、非生体被験体は臓器提供者である。特定の実施形態では、免疫細胞は、血液、例えば末梢血または臍帯血などから単離される。一部の態様では、臍帯血から単離された免疫細胞は、CD4陽性またはCD8陽性T細胞の抑制によって測定されるような免疫調節能力が強化されている。特定の態様では、免疫細胞は、強化された免疫調節能力のために、プールされた血液、特にプールされた臍帯血から単離される。プールされた血液は、2またはそれを超える供給源、例えば3、4、5、6、7、8、9、10またはそれを超える供給源（例えば、ドナー被験体）などに由来してよい。

10

【0084】

免疫細胞の集団は、治療を必要とする被験体、または免疫細胞活性の低下に関連する疾患に罹患している被験体から得ることができる。従って、細胞は、治療を必要とする被験体にとって自己となる。あるいは、免疫細胞の集団は、ドナー、好ましくは組織適合性が一致したドナーから得ることができる。免疫細胞集団は、末梢血、臍帯血、骨髄、脾臓、または免疫細胞が前記被験体またはドナーに存在するその他の器官／組織から収集することができる。免疫細胞は、被験体および／またはドナーのプール、例えばプールされた臍帯血などから単離することができる。

20

【0085】

免疫細胞の集団が被験体とは異なるドナーから得られる場合、得られた細胞は、被験体に導入することができるという点で被験体適合性であるという条件で、ドナーは同種であることが好ましい。同種ドナー細胞は、ヒト白血球抗原（HLA）適合性であってもなくてもよい。

30

A．T細胞

【0086】

一部の実施形態では、免疫細胞はT細胞である。機能性抗腫瘍エフェクター細胞の誘導、活性化、および増殖のためのいくつかの基本的なアプローチは、この20年間に記載されている。これらには、自己細胞、例えば腫瘍浸潤リンパ球（TIL）など；自己DC、リンパ球、人工抗原提示細胞（APC）またはT細胞リガンドおよび活性化抗体で被覆したビーズを使用してエキスビボで活性化させたT細胞、または標的細胞膜の捕捉によって単離された細胞；抗宿主腫瘍T細胞受容体（TCR）を自然に発現する同種細胞；および「Tボディ」として公知の抗体様腫瘍認識能力を示す腫瘍反応性TCRまたはキメラTCR分子を発現するように遺伝的に再プログラムまたは「リダイレクト」された非腫瘍特異的自己または同種細胞が含まれる。これらのアプローチは、本明細書に記載される方法で使用され得るT細胞の調製および免疫化のための多数のプロトコルを生み出した。

40

【0087】

一部の実施形態では、T細胞は、血液、骨髄、リンパ、臍帯、またはリンパ器官に由来する。一部の態様では、細胞はヒト細胞である。細胞は、一般に初代細胞、例えば被験体から直接単離された細胞および／または被験体から単離されて凍結された細胞などである。一部の実施形態では、細胞には、T細胞の1またはそれを超えるサブセットまたはその他の細胞型、例えばT細胞集団全体、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、およびそれらの亜集

50

団など、例えば機能、活性化状態、成熟度、分化の可能性、増殖、再循環、局在性、および/または持続能、抗原特異性、抗原受容体の種類、特定の器官または区画での存在、マーカーまたはサイトカイン分泌プロファイル、および/または分化の程度によって定義される細胞などが含まれる。処置される被験体に関して、細胞は同種および/または自己であり得る。一部の態様、例えば既製技術などでは、細胞は多能性および/または万能性であり、例えば人工多能性幹細胞 (iPSC) などの幹細胞などである。一部の実施形態では、この方法には、本明細書に記載されるように、被験体から細胞を単離し、それらを調製、処理、培養、および/または操作し、凍結保存の前後に同じ患者にそれらを再導入することが含まれる。

【0088】

T細胞 (例えば、CD4⁺ および/または CD8⁺ T細胞) のサブタイプおよび亜集団には、ナイーブT (T_N) 細胞、エフェクターT細胞 (T_{E F F})、メモリーT細胞およびそのサブタイプ、例えば幹細胞メモリーT (T_{SC M})、セントラルメモリーT (T_{C M})、エフェクターメモリーT (T_{E M})、または最終分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、未熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インパリアントT (MAIT) 細胞、天然および適応制御性T (T_{reg}) 細胞、ヘルパーT細胞、例えばTH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞、 / T細胞、および / T細胞がある。

【0089】

一部の実施形態では、1またはそれを超えるT細胞集団は、表面マーカーなどの特定のマーカーに陽性の細胞、または特定のマーカーに陰性の細胞が濃縮されているかまたは枯渇している。場合によっては、そのようなマーカーは、T細胞の特定の集団 (例えば、非メモリー細胞) では存在しないかまたは比較的低いレベルで発現するが、T細胞の特定の他の集団 (例えば、メモリー細胞) では存在するかまたは比較的高いレベルで発現するマーカーである。

【0090】

一部の実施形態では、T細胞は、非T細胞、例えばB細胞、単球、またはCD14などの他の白血球細胞などで発現するマーカーのネガティブ選択によりPBMC試料から分離される。一部の態様では、CD4⁺ またはCD8⁺ 選択ステップを使用してCD4⁺ ヘルパーおよびCD8⁺ 細胞傷害性T細胞を分離する。そのようなCD4⁺ およびCD8⁺ 集団は、1またはそれを超えるナイーブ、メモリー、および/またはエフェクターT細胞亜集団で発現するかまたは比較的高度に発現するマーカーのポジティブまたはネガティブ選択によって亜集団にさらに選別され得る。

【0091】

一部の実施形態では、CD8⁺ T細胞は、例えばそれぞれの亜集団に関連する表面抗原に基づくポジティブまたはネガティブ選択などにより、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、および/またはセントラルメモリー幹細胞がさらに濃縮または枯渇される一部の実施形態では、セントラルメモリーT (T_{C M}) 細胞の濃縮は、有効性を高めるため、例えば投与後の長期生存、増殖、および/または生着を改善するために実行される。これは一部の態様ではそのような亜集団において特に堅牢である。

【0092】

一部の実施形態では、T細胞は自己T細胞である。この方法では、腫瘍試料は患者から得られ、単細胞懸濁液が得られる。単細胞懸濁液は、任意の適切な方法で例えば機械的に (例えば、Miltenyi Biotec、Auburn、Calif. の gentleMACS (商標) 解離装置を使用して腫瘍を脱凝集させる) または酵素的に (例えばコラゲナーゼまたはDNアーゼで) 得ることができる。腫瘍の酵素消化物の単細胞懸濁液はインターロイキン-2 (IL-2) で培養される。

【0093】

培養したT細胞は、プールし、急速に増殖することができる。急速増殖は、約10~約

10

20

30

40

50

14日間の期間にわたって、抗原特異的T細胞の数の少なくとも約50倍の（例えば、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、または100倍の、またはそれを超える）増加をもたらす。より好ましくは、急速増殖は、約10～約14日間の期間にわたって、少なくとも約200倍の（例えば、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍の、またはそれを超える）増加をもたらす。

【0094】

増殖は、当技術分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって達成することができる。例えば、T細胞は、フィーダーリンパ球およびインターロイキン-2（IL-2）がインターロイキン-15（IL-15）のいずれかの存在下で非特異的T細胞受容体刺激を用いて急速増殖させることができ、IL-2が好ましい。非特異的T細胞受容体刺激には、およそ30ng/mlのOKT3、マウスモノクローナル抗CD3抗体（Ortho-McNeil（登録商標）、Raritan, N.J.から入手可能）が含まれ得る。あるいは、T細胞は、T細胞増殖因子、例えば300IU/mlのIL-2またはIL-15（IL-2が好ましい）の存在下で、必要に応じてベクターから発現させることができる癌の1またはそれを超える抗原（その抗原性部分、例えば1または複数のエピトープ、または細胞を含む）、例えばヒト白血球抗原A2（HLA-A2）結合ペプチドによるインビトロでの末梢血単核細胞（PBMC）の刺激によって急速増殖させることができる。インビトロで誘導されたT細胞は、HLA-A2を発現する抗原提示細胞にパルスされた癌の同じ1または複数の抗原による再刺激によって急速増殖する。あるいは、例えば、照射自己リンパ球または照射HLA-A2⁺同種リンパ球およびIL-2でT細胞を再刺激することができる。

10

20

【0095】

自己T細胞は、自己T細胞の成長および活性化を促進するT細胞増殖因子を発現するように改変することができる。適切なT細胞増殖因子としては、例えば、インターロイキン（IL）-2、IL-7、IL-15、およびIL-12が挙げられる。適切な改変方法は当技術分野で公知である。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; および Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994を参照されたい。特定の態様では、改変された自己T細胞はT細胞増殖因子を高レベルで発現する。T細胞増殖因子コード配列、例えばIL-12のコード配列などは、T細胞成長因子コード配列への作動可能な結合が高レベルの発現を促進するプロモーターと同様に、当技術分野で容易に入手可能である。

30

B. NK細胞

【0096】

一部の実施形態では、免疫細胞はナチュラルキラー（NK）細胞である。NK細胞は、多様な腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、ならびに骨髄および胸腺の一部の正常細胞に対して自発的な細胞傷害性を有するリンパ球の亜集団である。NK細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃腺、および胸腺で分化および成熟する。NK細胞は、ヒトのCD16、CD56、およびCD8などの特定の表面マーカーによって検出することができる。NK細胞は、T細胞抗原受容体、panTマーカーCD3、または表面免疫グロブリンB細胞受容体を発現しない。

40

【0097】

特定の実施形態では、NK細胞は、当技術分野で周知の方法によってヒト末梢血単核細胞（PBMC）、未刺激白血球除去製品（PBSC）、ヒト胚性幹細胞（hESCs）、人工多能性幹細胞（iPSCs）、骨髄、または臍帯血から誘導される。特に、臍帯CBがNK細胞を誘導するために使用される。特定の態様では、NK細胞は、NK細胞のエクスピボでの増殖について以前に記載された方法によって単離され増殖される（Spanh

50

oltzら、2011；Shahら、2013）。この方法では、CB単核細胞をフィコール密度勾配遠心分離によって分離し、バイオリアクターでIL-2および人工抗原提示細胞（aAPC）とともに培養する。7日後、細胞培養からCD3を発現している細胞を全て除去し、さらに7日間再培養する。細胞は再びCD3が枯渇し、CD56⁺/CD3⁻細胞またはNK細胞の割合を決定するために特徴付けられる。他の方法では、臍帯CBは、SCF、IL-7、IL-15、およびIL-2を含む培地で培養することによって、CD34⁺細胞の単離およびCD56⁺/CD3⁻細胞への分化によりNK細胞を誘導するために使用される。

C．幹細胞

【0098】

一部の実施形態では、本開示の免疫細胞は、幹細胞、例えば人工多能性幹細胞（PSC）、間葉系幹細胞（MSC）、または造血幹細胞（HSC）であってよい。

【0099】

本明細書において使用される多能性幹細胞は、一般にiPS細胞またはiPSCと略される人工多能性幹（iPS）細胞であってよい。生殖細胞を除いて、どの細胞もiPSCの出発点として使用することができる。例えば、細胞型は、ケラチノサイト、線維芽細胞、造血細胞、間葉系細胞、肝細胞、または胃細胞であり得る。細胞の分化の程度や、細胞が収集される動物の年齢に制限はない；未分化前駆細胞（体性幹細胞を含む）および最終的に分化した成熟細胞でさえ、本明細書に開示される方法において体細胞の供給源として使用することができる。

【0100】

当業者に公知の方法を使用して、体細胞を再プログラムしてiPS細胞を産生することができる。一般に、核再プログラム因子を使用して体細胞から多能性幹細胞を生成する。一部の実施形態では、Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Nanog、およびLin28のうちの少なくとも3つ、または少なくとも4つが使用される。他の実施形態では、Oct3/4、Sox2、c-MycおよびKlf4が使用されるか、またはOct3/4、Sox2、Nanog、およびLin28が使用される。

【0101】

いったん誘導されると、iPSCは多能性を維持するのに十分な培地で培養され得る。特定の実施形態では、規定されていない条件を使用してもよい；例えば、幹細胞を未分化状態に維持するために、線維芽細胞フィーダー細胞でまたは線維芽細胞フィーダー細胞にさらされた培地で多能性細胞を培養することができる。一部の実施形態では、細胞は、フィーダー細胞として、細胞分裂を終わらせるために放射線または抗生物質で処理したマウス胚線維芽細胞の共存下で培養される。あるいは、多能性細胞は、TESR（商標）培地またはE8（商標）/Essential 8（商標）培地などの規定のフィーダー非依存培養系を用いて、本質的に未分化状態で培養および維持することができる。

III．強化されたキメラ抗原受容体

A．切断型EGFRvIII（Ev3）

【0102】

特定の実施形態では、本開示は、抗原結合領域を1または複数の細胞内シグナル伝達ドメインに共有結合させることにより、CARのヒンジまたはストーク領域としてEv3を含む強化されたCARを提供する。抗原結合領域は、マウス抗ヒト抗体などの抗体に由来する抗抗原結合ドメインに由来する単鎖可変断片（scFv）を含み得る。scFvはどんな潜在的抗原も標的化することができる。scFvは、scFvのフレームワーク領域などでヒト化されていてもよい。特定の態様では、検出抗体または除去抗体への接近しやすさ（例えば、ADCC経路）は維持される。

【0103】

Ev3は、配列番号2、

10

20

30

40

【化 2】

LEEKK-

GNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRK-
 VCNGIGIGEFKDSLINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDIL
 KTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRGTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLK
 EISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ-
 VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPE
 CLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHV
 CHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPS

10

(部分ドメイン 1 - 部分ドメイン 2 - ドメイン 3 - ドメイン 4 を含む) を含むか、あるいは、配列番号 2 に対して少なくとも 80% (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100%) の配列同一性を有することがある。特定の態様では、Ev3 には 1、2、3、またはそれを超える変更があることがある。

【0104】

一実施形態では、マウス抗ヒト CD19 モノクローナル抗体に由来する scFv、膜貫通ドメインを含む Ev3 ヒンジ、CD28 エンドドメイン、および CD3 エンドドメインを N 末端から C 末端まで含む CD19 Ev3 - CAR が提供される。もう一つの実施形態では、CD19 Ev3 - CAR は、hCD19 Ev3 - CAR と呼ばれるヒト化 CD19 (hCD19) を含む。CAR は、DAP12 エンドドメインを Ev3 膜貫通ドメインと CD3 エンドドメインとの間などにさらに含むことができる (CD19 Ev3 DAP12 - CAR または hCD19 Ev3 DAP12 - CAR など)。

20

【0105】

一実施形態では、マウス抗ヒト CD123 モノクローナル抗体に由来する scFv、膜貫通ドメインを含む Ev3 ヒンジ、CD28 エンドドメイン、および CD3 エンドドメインを N 末端から C 末端まで含む CD123 Ev3 - CAR が提供される。もう一つの実施形態では、CD123 Ev3 - CAR は、hCD123 Ev3 - CAR と呼ばれるヒト化 CD123 (hCD123) を含む。CAR は、DAP12 エンドドメインを Ev3 膜貫通ドメインと CD3 エンドドメインとの間などにさらに含むことができる (CD123 Ev3 DAP12 - CAR または hCD123 Ev3 DAP12 - CAR など)。

30

【0106】

一実施形態では、マウス抗ヒトメソテリンモノクローナル抗体に由来する scFv、膜貫通ドメインを含む Ev3 ヒンジ、CD28 エンドドメイン、および CD3 エンドドメインを N 末端から C 末端まで含む Mesoev3 - CAR が提供される。もう一つの実施形態では、Mesoev3 - CAR は、hMesoev3 - CAR と呼ばれるヒト化 Mesoev3 (hMesoev3) を含む。CAR は、DAP12 エンドドメインを Ev3 膜貫通ドメインと CD3 エンドドメインとの間などにさらに含むことができる (Mesoev3 DAP12 - CAR または hMesoev3 DAP12 - CAR など)。

40

【0107】

一実施形態では、マウス抗ヒト ROR1 モノクローナル抗体に由来する scFv、膜貫通ドメインを含む Ev3 ヒンジ、CD28 エンドドメイン、および CD3 エンドドメインを N 末端から C 末端まで含む ROR1 - Ev3 - CAR が提供される。もう一つの実施形態では、ROR1 - Ev3 - CAR は、hROR1 Ev3 - CAR と呼ばれるヒト化 ROR1 (hROR1) を含む。CAR は、DAP12 エンドドメインを Ev3 膜貫通ドメインと CD3 エンドドメインとの間などにさらに含むことができる (ROR1 - Ev3 DAP12 - CAR または hROR1 - Ev3 DAP12 - CAR など)。

50

【0108】

一実施形態では、マウス抗ヒトCD5モノクローナル抗体に由来するs c F v、膜貫通ドメインを含むE v 3 ヒンジ、CD28エンドドメイン、およびCD3 エンドドメインをN末端からC末端まで含むCD5 E v 3 - C A Rが提供される。もう一つの実施形態では、CD5 E v 3 - C A Rは、hCD5 E v 3 - C A Rと呼ばれるヒト化CD5 (hCD5) を含む。C A Rは、D A P 1 2 エンドドメインをE v 3 膜貫通ドメインとCD3 エンドドメインとの間などにさらに含むことができる (CD5 E v 3 D A P 1 2 - C A RまたはhCD5 E v 3 D A P 1 2 - C A Rなど)。

【0109】

一実施形態では、マウス抗ヒトCD99モノクローナル抗体に由来するs c F v、膜貫通ドメインを含むE v 3 ヒンジ、CD28エンドドメイン、およびCD3 エンドドメインをN末端からC末端まで含むCD99 E v 3 - C A Rが提供される。もう一つの実施形態では、CD5 E v 3 - C A Rは、hCD99 E v 3 - C A Rと呼ばれるヒト化CD99 (hCD99) を含む。C A Rは、D A P 1 2 エンドドメインをE v 3 膜貫通ドメインとCD3 エンドドメインとの間などにさらに含むことができる (CD99 E v 3 D A P 1 2 - C A RまたはhCD99 E v 3 D A P 1 2 - C A Rなど)。

【0110】

E G F R v I I Iは、E G F R遺伝子のエクソン2～7の突然変異の結果である。それにより、受容体には完全なリガンド結合ドメインがないので、突然変異受容体は既知のリガンドと結合することができなくなる。本開示の切断型E G F R v I I I、E v 3は、E G F R v I I Iの細胞内ドメインまたはエンドドメインの欠失をさらに含む。従って、E v 3は、機能性E G F結合ドメインまたはE G F R v I I Iの細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。

【0111】

E v 3 ヒンジは、配列番号1および/または配列番号2のアミノ酸配列のヌクレオチド配列を含み得る。特定の実施形態では、E v 3 ヒンジは、配列番号1または配列番号2と少なくとも80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%の配列同一性を有する。E v 3 ヒンジ領域は、配列番号2の断片を含んでよく、または受容体断片のN末端またはC末端に追加のアミノ酸を含んでもよい。E v 3の例となる模式図は図2に示される。

【0112】

切断型E G F R v I I IをC A Rのヒンジ領域に含めると、遺伝子積荷の保持が可能になる。E v 3は、安全スイッチおよび/またはインビトロまたはインビボでのC A Rの検出にも使用することができる。一体化したE v 4 ヒンジは、検出または細胞除去のために、臨床的にアクセス可能なモノクローナル抗体 (例えば、セツキシマブ) などの抗体によって認識されることができる。その上、E v 3は、リガンド結合ドメインを含まない；従って、内因性機能または他の経路とのクロストークはない。E v 3は、C A Rシグナル伝達にも役割を果たし、腫瘍特異的であり、C A R療法の副作用を最小限に抑えることができる。

B. 抗原

【0113】

本明細書で提供されるC A Rは、疾患または障害の処置において有用な抗原特異性を有し得る。本明細書で提供されるC A Rは、1を超える抗原、例えば2つの抗原などを含み得る。例となる抗原としては、限定されるものではないが、CD19、CD123、メソテリン、CD5、CD47、C L L - 1、CD33、CD99、C L L - 1、U5 s n R N P 2 0 0、CD200、C S 1、B A F F - R、R O R - 1、CD99、メソテリン、またはB C M Aが挙げられる。

【0114】

本明細書で提供されるヒト化プラットフォームは、任意の所与抗原に対するヒト化C A Rの開発に使用され得る。ヒト化C A Rを伴う、例となる抗原としては、限定されるもの

10

20

30

40

50

ではないが、CD19、CD123、メソテリン、CD5、CD47、CLL-1、CD33、CD99、U5snRNP200、CD200、CS1、BAFF-R、ROR-1、またはBCMAが挙げられる。

【0115】

一実施形態では、コードされた軽鎖可変領域は、ヒトPH0879生殖系列配列の1、2、3または4つ全てのフレームワーク領域を含む。hCD19のコードされた重鎖可変領域は、ヒトACD43442生殖系列配列の1、2、3または4つ全てのフレームワーク領域を含み得る。

【0116】

一実施形態では、コードされた抗原結合ドメインは、配列番号6、12、18、24、30、58または61のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。一実施形態では、抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、本明細書に提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列の少なくとも1、2または3の改変（例えば、置換）であるが10、20または30を超えない改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列、または配列番号7、13、19、25、31、59または63のアミノ酸配列と90～99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域；ならびに/あるいは配列番号：8、14、20、26、32、60または64の重鎖可変領域のアミノ酸配列の少なくとも1、2または3の改変（例えば、置換）であるが10、20または30を超えない改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；あるいは配列番号6、12、18、24、30、58または61のアミノ酸配列と90～99%の同一性を有する配列を含む。

【0117】

一部の実施形態では、CD19のヒト化scFvが本明細書で提供される。ヒト化CD19（hCD19）scFvは、配列番号7

【化3】

(DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKVPKLLIYHTSRLHS
GVPRDFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPYTFGGQGTKVEIKR)

の可変軽鎖配列および配列番号8

【化4】

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSLPDYGVSWVRQAPGKGLEWIGVIWGSE
TTYNSALKSKFIIIRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARHYYYGGSYAMDY
WGQGTLLVTVSS)

の可変重鎖を有し得る。その他の態様では、hCD19 scFvは、配列番号7と少なくとも80%、85%、90%、91%、921%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV_Lおよび/または配列番号8と少なくとも80%、85%、90%、91%、921%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV_Hを含み得る。hCD19 scFvは、配列番号6と少なくとも80%、85%、90%、91%、921%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。hCD19 scFvは、配列番号3と少なくとも80%、85%、90%、91%、921%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。hCD19 scFvのV_Lは、配列番号4と少なくとも80%、85%、90%、91%、921%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。hCD19 scFvのV_Hは、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%、91%、921%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。

【0118】

一部の実施形態では、CD123のヒト化scFvが本明細書で提供される。ヒト化CD123(hCD123)scFvは、配列番号13の可変軽鎖配列と配列番号14の可変重鎖を有し得る。その他の態様では、hCD123scFvは、配列番号13と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV_Lおよび/または配列番号14と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV_Hを含み得る。hCD123scFvは、配列番号12と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。hCD123scFvは、配列番号9と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。hCD123scFvのV_Lは、配列番号10と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。hCD123scFvのV_Hは、配列番号11と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。

10

【0119】

一部の実施形態では、メソテリンのヒト化scFvが本明細書で提供される。ヒト化メソテリン(hMesos)scFvは、配列番号19の可変軽鎖配列と配列番号20の可変重鎖を有し得る。その他の態様では、hMesosscFvは、配列番号19と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV_Lおよび/または配列番号20と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV_Hを含み得る。hMesosscFvは、配列番号18と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。hMesosscFvは、配列番号15と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。hMesosscFvのV_Lは、配列番号16と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。hMesosscFvのV_Hは、配列番号17と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。

20

30

【0120】

一部の実施形態では、ROR1のヒト化scFvが本明細書で提供される。ヒト化ROR1(hROR1)scFvは、配列番号25の可変軽鎖配列と配列番号26の可変重鎖を有し得る。その他の態様では、hROR1scFvは、配列番号25と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV_Lおよび/または配列番号26と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV_Hを含み得る。hROR1scFvは、配列番号24と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。hROR1scFvは、配列番号21と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。

40

50

い。h R O R 1 s c F v の V_L は、配列番号 22 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。h R O R 1 s c F v の V_H は、配列番号 23 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。

【0121】

一部の実施形態では、CD5 のヒト化 s c F v が本明細書で提供される。ヒト化 CD5 (h CD5) s c F v は、配列番号 31 の可変軽鎖配列と配列番号 32 の可変重鎖を有し得る。その他の態様では、h CD5 s c F v は、配列番号 31 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有する V_L および / または配列番号 32 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有する V_H を含み得る。h CD5 s c F v は、配列番号 30 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。h CD5 s c F v は、配列番号 27 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。h CD5 s c F v の V_L は、配列番号 28 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。h CD5 s c F v の V_H は、配列番号 29 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。

【0122】

一部の実施形態では、CD99 のヒト化 s c F v が本明細書で提供される。ヒト化 CD99 (h CD99) s c F v は、配列番号 63 の可変軽鎖配列と配列番号 64 の可変重鎖を有し得る。その他の態様では、h CD99 s c F v は、配列番号 63 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有する V_L および / または配列番号 64 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有する V_H を含み得る。h CD99 s c F v は、配列番号 61 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。h CD99 s c F v は、配列番号 61 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。

【0123】

一部の実施形態では、CD99 のヒト化 s c F v が本明細書で提供される。ヒト化 CD99 (h CD99) s c F v は、配列番号 59 の可変軽鎖配列と配列番号 60 の可変重鎖を有し得る。その他の態様では、h CD99 s c F v は、配列番号 59 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有する V_L および / または配列番号 60 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有する V_H を含み得る。h CD99 s c F v は、配列番号 58 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。h CD99 s c F v は、配列番号 57 と少なくとも 80 %、85

%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされていてよい。

【0124】

遺伝子操作された抗原受容体の標的とされる抗原の中には、養子細胞療法を介して標的となる疾患、状態、または細胞型の状況で発現する抗原がある。疾患および状態の中には、増殖性、腫瘍性、および悪性の疾患および障害があり、それには、血液癌、免疫系の癌、例えばリンパ腫、白血病、および/または骨髄腫、例えばB、T、および骨髄性白血病、リンパ腫、ならびに多発性骨髄腫を含む癌および腫瘍が含まれる。一部の実施形態では、抗原は、正常または非標的細胞または組織、自己免疫または同種免疫障害に関連する抗原、または病原体特異的抗原と比較して、疾患または状態の細胞、例えば腫瘍または病原細胞で選択的に発現または過剰発現する。その他の実施形態では、抗原は正常細胞で発現し、かつ/または操作された細胞で発現する。

10

【0125】

任意の適切な抗原が本発明の方法に使用されてよい。例となる抗原としては、限定されるものではないが、感染病原体、自己(auto-/self-)抗原、腫瘍/癌関連抗原、および腫瘍新抗原からの抗原分子が挙げられる。特定の態様では、抗原には、NY-ESO、EGFRvIII、Muc-1、Her2、CA-125、WT-1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4、およびCEAが含まれる。

20

【0126】

腫瘍関連抗原は、前立腺、乳房、結腸直腸、肺、脾臓、腎臓、中皮腫、卵巣、またはメラノーマの癌に由来し得る。例となる腫瘍関連抗原または腫瘍細胞由来抗原としては、MAGE1、3、およびMAGE4; PRAME; BAGE; RAGE、Lage(NY-ESO 1としても公知); SAGE; およびHAGEまたはGAGEが挙げられる。腫瘍抗原のこれらの限定されない例は、メラノーマ、肺癌腫、肉腫、および膀胱癌腫などの広範な腫瘍型で発現している。前立腺癌腫瘍関連抗原としては、例えば、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、前立腺特異的抗原(PSA)、前立腺酸ホスファターゼ、NKX3.1、および前立腺の6回膜貫通上皮抗原(STEAP)が挙げられる。

30

【0127】

その他の腫瘍関連抗原には、Plu-1、HASH-1、Hash-2、CripTo およびCripTinが含まれる。さらに、腫瘍抗原は、自己ペプチドホルモン、例えば多くの癌の処置に有用な短い10アミノ酸長ペプチドである全長性腺刺激ホルモン放出ホルモンなどであってよい。

【0128】

腫瘍抗原には、HER-2/neu発現などの腫瘍関連抗原発現を特徴とする癌由来の腫瘍抗原が含まれる。関心対象の腫瘍関連抗原には、メラノサイト-メラノーマ系列抗原MART-1/Melan-A、gp100、gp75、mda-7、チロシナーゼおよびチロシナーゼ関連タンパク質などの系列特異的腫瘍抗原が含まれる。実例となる腫瘍関連抗原としては、限定されるものではないが、1またはそれを超える、p53、Ras、c-Myc、細胞質セリン/トレオニンキナーゼ(例えば、A-Raf、B-Raf、C-Raf、サイクリン依存性キナーゼ)、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MART-1、BAGE、DAM-6、-10、GAGE-1、-2、-8、GAGE-3、-4、-5、-6、-7B、NA88-A、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)、TRK受容体、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、ウィルムス腫瘍抗原(WT1)、AFP、-カテニン/m、カスパーゼ-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP

40

50

70 - 2M、HST - 2、KIAA0205、MUM - 1、MUM - 2、MUM - 3、ミオシン/m、RAGE、SART - 2、TRP - 2 / INT2、707 - AP、アネキシンII、CDC27/m、TPI / mbcr - abl、BCR - ABL、インターフェロン制御因子4 (IRF4)、ETV6 / AML、LDLR / FUT、Pml / RAR、腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー1 (TACSTD1) TACSTD2、受容体チロシンキナーゼ (例えば、上皮増殖因子受容体 (EGFR) (特に、EGFRvII)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR)、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR)、細胞質チロシンキナーゼ (例えば、src - ファミリー、syk - ZAP70ファミリー)、インテグリン結合キナーゼ (ILK)、転写のシグナルトランスデューサーおよび活性化因子STAT3、STAT5、およびSTATE、低酸素誘導因子 (例えば、HIF - 1およびHIF - 2)、核内因子カッパB (NF - B)、Notch受容体 (例えば、Notch1 - 4)、c - Met、ラバマイシンの哺乳類標的 (mTOR)、WNT、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK)、およびそれらの調節サブユニット、PMSA、PR - 3、MDM2、メソテリン、腎細胞癌腫 - 5T4、SM22 - 、炭酸脱水酵素I (CAI) およびIX (CAIX) (G250としても公知)、STEAD、TEL / AML1、GD2、プロテインナーゼ3、hTERT、肉腫転座ブレークポイント、EphA2、ML - IAP、EpCAM、ERG (TMPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、ALK、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、ポリシアル酸、MYCN、RhoC、GD3、フコシルGM1、メソセリアン (mesothelium)、PSCA、sLe、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GloboH、NY - BR - 1、RGSS、SART3、STn、PAX5、OY - TES1、精子タンパク質17、LCK、HMWMAA、AKAP - 4、SSX2、XAGE1、B7H3、レグマイン、TIE2、Page4、MAD - CT - 1、FAP、MAD - CT - 2、fos関連抗原1、CBX2、CLDN6、SPANX、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、SUNC1、LRRN1およびイディオタイプに由来するかまたはそれを含む腫瘍抗原が挙げられる。

【0129】

抗原には、腫瘍細胞で変異した遺伝子、または正常細胞と比較して腫瘍細胞で異なるレベルで転写された遺伝子に由来するエピトープ領域またはエピトープペプチド、例えば、テロメラーゼ酵素、サバイピン、メソテリン、変異ras、bcr / abl再配列、Her2 / neu、変異または野生型p53、シトクロムP450 1B1、およびN - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ - Vなどの異常発現イントロン配列など；骨髄腫およびB細胞リンパ腫で特有のイディオタイプを生成する免疫グロブリン遺伝子のクローン再編成；ヒトパピローマウイルスタンパク質E6およびE7などの腫瘍ウイルスプロセスに由来するエピトープ領域またはエピトープペプチドを含む腫瘍抗原；エプスタインバーウイルスタンパク質LMP2；腫瘍選択的発現を伴う非変異癌胎児性タンパク質、例えば癌胎児性抗原およびフェトプロテインなどが含まれる。

【0130】

その他の実施形態では、抗原は、ウイルス、真菌、寄生虫、および細菌などの病原性微生物または日和見病原性微生物 (本明細書では感染症微生物とも呼ばれる) から入手または誘導される。特定の実施形態では、そのような微生物に由来する抗原には、全長タンパク質が含まれる。

【0131】

その抗原が本明細書に記載の方法での使用に企図される実例となる病原生物には、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、単純ヘルペスウイルス (HSV)、呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、サイトメガロウイルス (CMV)、エプスタイン - バーウイルス (EBV)、インフルエンザA、B、およびC、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、ポリオーマウイルス (例えば、BKウイルスおよびJCウイルス)、アデノウイルス、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) (MRSA) を含むStaphylococcus属の種、および肺炎連鎖球

10

20

30

40

50

菌 (*Streptococcus pneumoniae*) を含む *Streptococcus* 属の種が含まれる。当業者に理解されるように、本明細書に記載される抗原として使用するこれらおよび他の病原性微生物に由来するタンパク質、およびこのタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、出版物および G E N B A N K (登録商標)、S w i s s - P r o t (登録商標)、T r E M B L (登録商標) などの公共データベースで特定することができる。

【0132】

ヒト免疫不全ウイルス (H I V) に由来する抗原には、H I V ビリオン構造タンパク質 (例えば、g p 1 2 0、g p 4 1、p 1 7、p 2 4)、プロテアーゼ、逆転写酵素、または t a t、r e v、n e f、v i f、v p r および v p u にコードされる H I V タンパク質が含まれる。

10

【0133】

単純ヘルペスウイルス (例えば、H S V 1 および H S V 2) に由来する抗原としては、限定されるものではないが、H S V 後期遺伝子から発現するタンパク質が挙げられる。後期の遺伝子群は、主にビリオン粒子を形成するタンパク質をコードする。そのようなタンパク質には、ウイルスカプシドを形成する (U L) 5 つのタンパク質: U L 6、U L 1 8、U L 3 5、U L 3 8 および主要なカプシドタンパク質 U L 1 9、U L 4 5、および U L 2 7 が含まれる。これらはそれぞれ本明細書に記載される抗原として使用することができる。本明細書に記載される抗原としての使用が企図されるその他の実例となる H S V タンパク質には、I C P 2 7 (H 1、H 2)、糖タンパク質 B (g B) および糖タンパク質 D (g D) タンパク質が含まれる。H S V ゲノムは少なくとも 7 4 個の遺伝子を含み、それぞれが潜在的に抗原として使用され得るタンパク質をコードしている。

20

【0134】

サイトメガロウイルス (C M V) に由来する抗原には、C M V 構造タンパク質、ウイルス複製の前初期および初期段階で発現するウイルス抗原、糖タンパク質 I および I I I、カプシドタンパク質、コートタンパク質、低マトリックスタンパク質 p p 6 5 (p p U L 8 3)、p 5 2 (p p U L 4 4)、I E 1 および I E 2 (U L 1 2 3 および U L 1 2 2)、U L 1 2 8 - U L 1 5 0 の遺伝子クラスターからのタンパク質産物 (R y k m a n ら、2 0 0 6)、エンベロープ糖タンパク質 B (g B)、g H、g N、および p p 1 5 0 が含まれる。当業者に理解されるように、本明細書に記載される抗原として使用するための C M V タンパク質は、G e n B a n k (登録商標)、S w i s s - P r o t (登録商標)、および T r E M B L (登録商標) などの公共データベースで特定されてよい。

30

【0135】

特定の実施形態での使用が企図される E p s t e i n - B a n ウイルス (E B V) に由来する抗原には、E B V 溶解タンパク質 g p 3 5 0 および g p 1 1 0、E p s t e i n - B a n 核抗原 (E B N A) - 1、E B N A - 2、E B N A - 3 A、E B N A - 3 B、E B N A - 3 C、E B N A - リーダータンパク質 (E B N A - L P) および潜伏膜タンパク質 (L M P) - 1、L M P - 2 A および L M P - 2 B を含む潜伏周期感染中に産生される E B V タンパク質が含まれる。

40

【0136】

本明細書での使用が企図される呼吸器合胞体ウイルス (R S V) に由来する抗原には、R S V ゲノムによってコードされる 1 1 のタンパク質、またはその抗原断片: N S 1、N S 2、N (ヌクレオカプシドタンパク質)、M (マトリックスタンパク質) S H、G および F (ウイルスコートタンパク質)、M 2 (第 2 のマトリックスタンパク質)、M 2 - 1 (伸長因子)、M 2 - 2 (転写調節)、R N A ポリメラーゼ、およびリンタンパク質 P が含まれる。

【0137】

使用が企図される水疱性口内炎ウイルス (V S V) に由来する抗原には、V S V ゲノムによってコードされる 5 つの主要なタンパク質、およびその抗原断片: 巨大タンパク質 (L)、糖タンパク質 (G)、核タンパク質 (N)、リンタンパク質 (P)、およびマトリ

50

ックスタンパク質 (M) のいずれか 1 つが含まれる。

【0138】

特定の実施形態での使用が企図されるインフルエンザウイルスに由来する抗原には、血球凝集素 (HA)、ノイラミニダーゼ (NA)、核タンパク質 (NP)、マトリックスタンパク質 M1 および M2、NS1、NS2 (NEP)、PA、PB1、PB1-F2、および PB2 が含まれる。

【0139】

例となるウイルス抗原には、限定されるものではないが、アデノウイルスポリペプチド、アルファウイルスポリペプチド、カリシウイルスポリペプチド (例えば、カリシウイルスカプシド抗原)、コロナウイルスポリペプチド、ジステンバーウイルスポリペプチド、エボラウイルスポリペプチド、エンテロウイルスポリペプチド、フラビウイルスポリペプチド、肝炎ウイルス (AE) ポリペプチド (B 型肝炎コアまたは表面抗原、C 型肝炎ウイルス E1 または E2 糖タンパク質、コア、または非構造タンパク質)、ヘルペスウイルスポリペプチド (単純ヘルペスウイルスまたは水痘帯状疱疹ウイルス糖タンパク質を含む)、感染性腹膜炎ウイルスポリペプチド、白血病ウイルスポリペプチド、マールブルグウイルスポリペプチド、オルトミクソウイルスポリペプチド、パピローマウイルスポリペプチド、パラインフルエンザウイルスポリペプチド (例えば、血球凝集素およびノイラミニダーゼポリペプチド)、パラミクソウイルスポリペプチド、パルボウイルスポリペプチド、ベスチウイルスポリペプチド、ピコルナウイルスポリペプチド (例えば、ポリオウイルスカプシドポリペプチド)、ポックスウイルスポリペプチド (例えば、ワクシニアウイルスポリペプチド)、狂犬病ウイルスポリペプチド (例えば、狂犬病ウイルス糖タンパク質 G)、レオウイルスポリペプチド、レトロウイルスポリペプチド、およびロタウイルスポリペプチドも含まれる。

【0140】

特定の実施形態では、抗原は細菌抗原であってよい。特定の実施形態では、関心対象の細菌抗原は、分泌ポリペプチドであってよい。その他の特定の実施形態では、細菌抗原には、細菌の外側細胞表面に露出したポリペプチドの一部または複数の部分を有する抗原が含まれる。

【0141】

使用が企図されるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) をはじめとする *Staphylococcus* 属の種に由来する抗原には、毒性調節因子、例えば Agr 系、Sar および Sae、Arl 系、Sar ホモログ (Rot、MgrA、SarS、SarR、SarT、SarU、SarV、SarX、SarZ および TcaR)、Srr 系および TRAP などが含まれる。抗原として機能し得るその他の *Staphylococcus* タンパク質には、Clp タンパク質、HtrA、MsrR、アコニターゼ、CcpA、SvrA、Msa、CfvA および CfvB が含まれる (例えば、*Staphylococcus: Molecular Genetics*, 2008 Caister Academic Press, Ed. Jodi Lindsay を参照)。黄色ブドウ球菌の 2 つの種 (N315 および Mu50) のゲノムが配列決定されており、例えば PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyderら、2007) で公開されている。当業者に理解されるように、抗原として使用するための *Staphylococcus* タンパク質も、GenBank (登録商標)、Swiss-Prot (登録商標)、および TrEMBL (登録商標) などのその他の公共データベースで特定されてよい。

【0142】

本明細書に記載される特定の実施形態での使用が企図される *Streptococcus pneumoniae* に由来する抗原には、ニューモリシン、PspA、コリン結合タンパク質 A (CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht、およびピリントタンパク質 (RrgA; RrgB; RrgC) が含まれる。*Streptococcus pneumoniae* の抗原タンパク質も当技術分野で公知であり

、一部の実施形態では抗原として使用することができる。Streptococcus pneumoniaeの毒性株の完全なゲノム配列は配列決定されており、当業者に理解されるように、本明細書で使用するS. pneumoniaeタンパク質も、GenBank（登録商標）、Swiss-Prot（登録商標）、およびTrEMBL（登録商標）などのその他の公共データベースで特定されてよい。本開示による抗原の特に関心対象であるタンパク質には、肺炎球菌の表面で露出すると予測される病原性因子およびタンパク質が含まれる。

【0143】

抗原として使用され得る細菌抗原の例としては、限定されるものではないが、Actinomycesポリペプチド、Bacillusポリペプチド、Bacteroides 10
ポリペプチド、Bordetellaポリペプチド、Bartonellaポリペプチド、Borreliaポリペプチド（例えば、B. burgdorferi OspA）、Brucellaポリペプチド、Campylobacterポリペプチド、Capnocytophagaポリペプチド、Chlamydiaポリペプチド、Corynebacteriumポリペプチド、Coxiellaポリペプチド、Dermatophilusポリペプチド、Enterococcusポリペプチド、Ehrlichiaポリペプチド、Escherichiaポリペプチド、Francisellaポリペプチド、Fusobacteriumポリペプチド、Haemobartonellaポリペプチド、Haemophilusポリペプチド（例えば、H. influenzae B型外膜 20
タンパク質）、Helicobacterポリペプチド、Klebsiellaポリペプチド、L型細菌ポリペプチド、Leptospiraポリペプチド、Listeriaポリペプチド、Mycobacteriaポリペプチド、Mycoplasmaポリペプチド、Neisseriaポリペプチド、Neorickettsiaポリペプチド、Nocardiaポリペプチド、Pasteurellaポリペプチド、Peptococcusポリペプチド、Peptostreptococcusポリペプチド、Pneumococcusポリペプチド（すなわちS. pneumoniaeポリペプチド）（本明細書の記載を参照）、Proteusポリペプチド、Pseudomonasポリペプチド、Rickettsiaポリペプチド、Rochalimaeaポリペプチド、Salmonellaポリペプチド、Shigellaポリペプチド、Staphylococcusポリペプチド、A群streptococcusポリペプチド（例えば、S. pyogenes Mタンパク質）、B群streptococcus（S. agalactiae）ポリペプチド、Treponemaポリペプチド、およびYersiniaポリペプチド（例えば、Y. pestis F1およびV抗原）が含まれる。 30

【0144】

真菌抗原の例としては、限定されるものではないが、Absidiaポリペプチド、Acremoniumポリペプチド、Alternariaポリペプチド、Aspergillusポリペプチド、Basidiobolusポリペプチド、Bipolarisポリペプチド、Blastomycesポリペプチド、Candidaポリペプチド、Coccidioidesポリペプチド、Conidiobolusポリペプチド、Cryptococcusポリペプチド、Curvalariaポリペプチド、Epidermophytonポリペプチド、Exophialaポリペプチド、Geotrichumポリペプチド、Histoplasmaポリペプチド、Madurellaポリペプチド、Malasseziaポリペプチド、Microsporumポリペプチド、Moniliellaポリペプチド、Mortierellaポリペプチド、Mucorポリペプチド、Paecilomycesポリペプチド、Penicilliumポリペプチド、Phialemoniumポリペプチド、Phialophoraポリペプチド、Protothecaポリペプチド、Pseudallescheriaポリペプチド、Pseudomicrodochiumポリペプチド、Pythiumポリペプチド、Rhizosporidiumポリペプチド、Rhizopusポリペプチド、Scolecobasidiumポリペプチド、Sporothrixポリペプチド、Stemphylium 40
50

mポリペプチド、*Trichophyton*ポリペプチド、*Trichosporon*ポリペプチド、および*Xylohypha*ポリペプチドが含まれる。

【0145】

原虫寄生虫抗原の例としては、限定されるものではないが、*Babesia*ポリペプチド、*Balantidium*ポリペプチド、*Besnoitia*ポリペプチド、*Cryptosporidium*ポリペプチド、*Eimeria*ポリペプチド、*Encephalitozoon*ポリペプチド、*Entamoeba*ポリペプチド、*Giardia*ポリペプチド、*Hammondia*ポリペプチド、*Hepatozoon*ポリペプチド、*Iso*
*spora*ポリペプチド、*Leishmania*ポリペプチド、*Microsporidia*ポリペプチド、*Neospora*ポリペプチド、*Nosema*ポリペプチド、*Pen*
*tatrichomonas*ポリペプチド、*Plasmodium*ポリペプチドが含まれる。10
 蠕虫寄生虫抗原の例としては、限定されるものではないが、*Acanthocheil*
*lonema*ポリペプチド、*Aelurostrongylus*ポリペプチド、*Ancylostoma*ポリペプチド、*Angiostrongylus*ポリペプチド、*Asca*
*ris*ポリペプチド、*Brugia*ポリペプチド、*Bunostomum*ポリペプチド、*Capillaria*ポリペプチド、*Chabertia*ポリペプチド、*Cooperi*
*a*ポリペプチド、*Crenosoma*ポリペプチド、*Dictyocaulus*ポリペプチド、*Di*
*octophyme*ポリペプチド、*Dipetalonema*ポリペプチド、*Diphyll*
*lobothrium*ポリペプチド、*Diplydium*ポリペプチド、*D*
*irofilaria*ポリペプチド、*Dracunculus*ポリペプチド、*Enter*
*obius*ポリペプチド、*Filaroides*ポリペプチド、*Haemonchus*ポリ
 ペプチド、*Lagochilascaris*ポリペプチド、*Loa*ポリペプチド、*Ma*
*nsonella*ポリペプチド、*Muellerius*ポリペプチド、*Nanophye*
*tus*ポリペプチド、*Necator*ポリペプチド、*Nematodirus*ポリペプチ
 ド、*Oesophagostomum*ポリペプチド、*Onchocerca*ポリペプチド、*Opisthorchis*ポリペプチド、*Ostertagia*ポリペプチド、*Par*
*afilaria*ポリペプチド、*Paragonimus*ポリペプチド、*Parasca*
*ris*ポリペプチド、*Physaloptera*ポリペプチド、*Protostrong*
*ylus*ポリペプチド、*Setaria*ポリペプチド、*Spirocerc*
*a*ポリペプチド、*Spirometra*ポリペプチド、*Stephanofilaria*ポリペプチド
 30
*Strongyloides*ポリペプチド、*Strongylus*ポリペプチド、*Th*
*elazia*ポリペプチド、*Toxascaris*ポリペプチド、*Toxocara*ポリ
 ペプチド、*Trichinella*ポリペプチド、*Trichostrongylus*ポリ
 ペプチド、*Trichuris*ポリペプチド、*Uncinaria*ポリペプチド、およ
 び*Wuchereria*ポリペプチド。(例えば、*P. falciparum* *circ*
umsporozoite (*PfCSP*))、スプロゾイト表面タンパク質2 (*PfSS*
P2)、肝臓状態抗原1のカルボキシル末端 (*PfLSA1* *c-term*)、および輸
 出タンパク質1 (*PfExp-1*)、*Pneumocystis*ポリペプチド、*Sarc*
*ocystis*ポリペプチド、*Schistosoma*ポリペプチド、*Theileria*
*a*ポリペプチド、*Toxoplasma*ポリペプチド、および*Trypanosoma*ポリ
 ペプチドが含まれる。40

【0146】

外部寄生虫抗原の例としては、限定されるものではないが、ノミ；カタダニおよびヒメ
 ダニを含むマダニ；ハエ、例えばユスリカ、カ、スナバエ、ブユ、ウシアブ、のサシバエ
 、メクラアブ、ツエツエバエ、サシバエ、ハエ幼虫症の原因となるハエおよびブヨ；あり
 ；クモ、シラミ；コダニ；および半翅類の昆虫、例えばトコジラミおよびサシガメなど由
 来のポリペプチド（抗原ならびにアレルゲンを含む）が含まれる。

C．キメラ抗原受容体

【0147】

一部の実施形態では、CARは、抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインを含

10

20

30

40

50

む。一部の実施形態では、抗原は細胞の表面に発現したタンパク質である。一部の実施形態では、CARはTCRのようなCARであり、抗原は処理されたペプチド抗原、例えば細胞内タンパク質のペプチド抗原であり、これはTCRのように、主要組織適合複合体(MHC)分子の状況において細胞表面で認識される。

【0148】

一部の実施形態では、キメラ抗原受容体は、a)細胞内シグナル伝達ドメイン、b)ヒンジおよび膜貫通ドメイン、例えばEv3ヒンジなど、およびc)抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含む。

【0149】

一部の実施形態では、操作された抗原受容体には活性化または刺激CAR、共刺激CAR(国際公開第2014/055668号参照)、および/または抑制性CAR(iCAR、Fedorovら、2013参照)をはじめとする、キメラ抗原受容体(CAR)が含まれる。CARには一般に、一部の態様ではリンカーおよび/または1またはそれを超える膜貫通ドメインを介して1またはそれを超える細胞内シグナル伝達成分に連結された細胞外抗原(またはリガンド)結合ドメインが含まれる。そのような分子は、一般に、天然の抗原受容体を通るシグナル、共刺激受容体と組み合わせたそのような受容体を通るシグナル、および/または共刺激受容体のみを通るシグナルを模倣するかまたはそれに近似する。

【0150】

本開示の特定の実施形態は、細胞内シグナル伝達ドメイン、膜貫通ドメイン、および1またはそれを超えるシグナル伝達モチーフを含む細胞外ドメインを含む、免疫原性を低下させるためにヒト化されているCAR(hCAR)を含む、抗原特異的CARポリペプチドをコードする核酸をはじめとする核酸の使用に関する。特定の実施形態では、CARは、1またはそれを超える抗原間の共有スペースを含むエピトープを認識し得る。特定の実施形態では、結合領域は、モノクローナル抗体の相補性決定領域、モノクローナル抗体の可変領域、および/またはその抗原結合断片を含み得る。もう一つの実施形態では、その特異性は、受容体に結合するペプチド(例えば、サイトカイン)に由来する。

【0151】

ヒトCAR核酸は、ヒト患者の細胞免疫療法を強化するために使用されるヒト遺伝子であってよいと企図される。特定の実施形態では、本発明は、全長CARcDNAまたはコード領域を含む。抗原結合領域またはドメインは、特定のヒトモノクローナル抗体に由来する単鎖可変断片(scFv)のV_HおよびV_L鎖の断片、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,109,304号に記載されるものを含み得る。断片また、ヒト抗原特異的抗体の任意の数の異なる抗原結合ドメインであり得る。より具体的な実施形態では、断片は、ヒト細胞での発現のためのヒトコドン使用に最適化された配列によってコード化された抗原特異的scFvである。

【0152】

配置は、ダイアボディまたは多量体などの多量体であり得る。多量体は、軽鎖および重鎖の可変部分をダイアボディに交差対合することにより形成される可能性が最も高い。構築物のヒンジ部分は、完全に除去されることから、最初のシステインが維持される、セリンよりもプロリンの置換、最初のシステインまでの切断など、複数の代替形を有することができる。Fc部分は除去され得る。安定している、かつ/または二量体化するタンパク質は、この目的に役立ち得る。例えば、ヒト免疫グロブリン由来のCH2またはCH3ドメインなど、Fcドメインの1つだけを使用することがあり得る。二量体化を改善するために改変されたヒト免疫グロブリンのヒンジ、CH2およびCH3領域を使用することもあり得る。免疫グロブリンのヒンジ部分だけを使用することもあり得る。CD8の部分を使用することもあり得る。

【0153】

一部の実施形態では、CAR核酸は、その他の共刺激受容体、例えば膜貫通ドメインおよび改変されたCD28細胞内シグナル伝達ドメインなどをコードする配列を含む。その

10

20

30

40

50

他の共刺激受容体としては、限定されるものではないが、1またはそれを超えるCD28、CD27、OX-40(CD134)、DAP10、DAP12、および4-1BB(CD137)が挙げられる。CD3によって開始される一次シグナルに加えて、ヒトCARに挿入されたヒト共刺激受容体によって提供される追加シグナルは、NK細胞の完全な活性化に重要であり、インビボでの持続性および養子免疫療法の治療上の成功を改善するのに役立ち得る。CARは、1またはそれを超えるサイトカイン、例えばIL-15などを発現することがある。1またはそれを超えるサイトカインを含めることにより、インビボでの持続性が促進され得る。一部の態様では、CARは、ヒト化scFv、CD3、DAP12、およびIL-15などの抗原結合ドメインを、必要に応じてE_v3ヒンジと組み合わせて含む。

10

【0154】

一部の実施形態では、CARは、特定の抗原(またはマーカーもしくはリガンド)、例えば養子療法の標的となる特定の細胞型で発現する抗原、例えば癌マーカー、および/または減衰反応を誘発することを目的とした抗原、例えば正常または非罹患細胞型で発現する抗原など、に特異的に構築されている。従って、CARは一般にその細胞外部分に1またはそれを超える抗原結合分子、例えば1またはそれを超える抗原結合断片、ドメイン、または部分、あるいは1またはそれを超える抗体可変ドメイン、および/または抗体分子を含む。一部の実施形態では、CARには、抗原結合部分または抗体分子の部分、例えばモノクローナル抗体(mAb)の重鎖可変(V_H)および軽鎖可変(V_L)鎖由来の単鎖抗体断片(scFv)が含まれる。

20

【0155】

キメラ抗原受容体の特定の実施形態では、受容体の抗原特異的部分(抗原結合領域を含む細胞外ドメインと呼ばれることもある)は、腫瘍関連抗原または病原体特異的抗原結合ドメインを含む。抗原には、パターン認識受容体、例えばデクチン-1に認識される炭水化物抗原が含まれる。腫瘍関連抗原は、それが腫瘍細胞の細胞表面で発現する限り、どんな種類のものであってもよい。腫瘍関連抗原の例となる実施形態には、CD19、CD319(CS1)、CD20、癌胎児性抗原、フェトプロテイン、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮腫瘍抗原、メラノーマ関連抗原、変異p53、変異rasなどが含まれる。特定の実施形態では、CARはサイトカインと共発現させて、腫瘍関連抗原の量が少ない場合に持続性を改善し得る。例えば、CARは、IL-15と共発現させてよい。

30

【0156】

キメラ受容体をコードするオープンリーディングフレームの配列は、ゲノムDNA源、cDNA源から得てもよいし、または(例えば、PCRを介して)合成してもよいし、またはそれらの組合せであってもよい。ゲノムDNAのサイズおよびイントロンの数に応じて、イントロンがmRNAを安定化することは見出されているので、cDNAまたはその組合せを使用することが望ましい場合がある。また、mRNAを安定化させるために内因性または外因性の非コード領域を使用することはさらに有利であり得る。

【0157】

キメラ構築物は、裸のDNAとしてまたは適切なベクター中で免疫細胞に導入することができる。裸のDNAを使用するエレクトロポレーションにより、細胞を安定にトランスフェクトする方法は、当技術分野で公知である。裸のDNAとは、一般に、発現に適した配向でプラスミド発現ベクターに含まれるキメラ受容体をコードするDNAを指す。

40

【0158】

あるいは、ウイルスベクター(例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはレンチウイルスベクター)を使用して、キメラ構築物を免疫細胞に導入することができる。本開示の方法による使用に適切なベクターは、免疫細胞において非複製的である。例えば、HIV、SV40、EBV、HSV、またはBPVに基づくベクターなど、多数のベクターがウイルスに基づくことが公知であり

50

、そのベクターでは細胞内で維持されるウイルスのコピー数は細胞の生存力を維持するのに十分なほど少ない。

【0159】

一部の態様では、抗原特異的結合、または認識成分は、1またはそれを超える膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインに連結されている。一部の実施形態では、CARには、CARの細胞外ドメインと融合した膜貫通ドメインが含まれる。一実施形態では、CAR中のドメインの1つと自然に関連している膜貫通ドメインが使用される。一部の例では、膜貫通ドメインは、アミノ酸置換によって選択または修飾されて、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとのそのようなドメインの結合を回避して、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑える。

10

【0160】

一部の実施形態では膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来する。供給源が天然の場合、ドメインは一部の態様において膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来する。膜貫通領域には、T細胞受容体の、または鎖、CD28、CD3、CD3、CD3、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、ICOS/CD278、GITR/CD357、NKG2D、およびDAP分子に由来する（すなわち、少なくとも膜貫通領域を含む）ものが含まれる。あるいは、膜貫通ドメインは、一部の実施形態において合成である。一部の態様では、合成膜貫通ドメインは、主にロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含む。一部の態様では、フェニルアラニン、トリプトファン、バリンのトリプレットは、合成膜貫通ドメインの両端にある。

20

【0161】

特定の実施形態では、NK細胞などの免疫細胞を遺伝的に改変するための本明細書に開示されるプラットフォーム技術は、(i)エレクトロポレーション装置（例えば、ヌクレオフェクター）を使用する非ウイルス遺伝子導入、(ii)エンドドメイン（例えば、CD28/CD3-、CD137/CD3-、またはその他の組合せ）を介してシグナル伝達するCAR、(iii)抗原認識ドメインを細胞表面に接続する可変長の細胞外ドメインを有するCAR、および、場合によっては、(iv)CAR⁺免疫細胞を堅牢にかつ数値的に拡大できるようにするK562由来の人工抗原提示細胞(aAPC)(Singhら、2008; Singhら、2011)を含む。

30

【0162】

一部の実施形態では、CARは、レトロウイルスによって細胞に形質導入されていてよい。レトロウイルスベクターは、pSFG4ベクターであってよい。レトロウイルス導入ベクターpSFG4は、5'LTR、psiパッケージングシーケンス、および3'LTRを含むモロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)由来のウイルス成分を運び、pUC19プラスミド(HindIIIとEcoRI制限酵素部位間の大きな断片[2.63kb])に基づく骨格を含む。LTRはレトロウイルスプロウイルスの両側に見られる長い末端反復配列であり、導入ベクターの場合、目的の遺伝子積荷（本発明者らの例では主にCARおよび関連する遺伝子成分）を囲んでいる。ヌクレオカプシドによるパッケージングの標的部位であるpsiパッケージング配列も、5'LTRとCARコード配列の間に挟まれてシスに組み込まれている。従って、pSFG4導入ベクターの基本構造は、pUC19配列-5'LTR-psiパッケージング配列-関心の遺伝子積荷-3'LTR-pUC19配列として概説され得る。

40

D. 抗原提示細胞

【0163】

マクロファージ、Bリンパ球、および樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞は、特定のMHC分子の発現により区別される。APCは、抗原を内在化し、その抗原の一部を、これらの細胞外膜上のMHC分子とともに再発現する。主要組織適合複合体(MHC)は、複数の遺伝子座を含む大きな遺伝子複合体である。MHCの遺伝子座は、クラスIおよび

50

クラス I I M H C と呼ばれる 2 つの主要なクラスの M H C 膜分子をコードする。T ヘルパーリンパ球は一般に M H C クラス I I 分子に関連する抗原を認識し、T 細胞傷害性リンパ球は M H C クラス I 分子に関連する抗原を認識する。ヒトでは M H C は H L A 複合体と呼ばれ、マウスでは H - 2 複合体と呼ばれる。

【 0 1 6 4 】

a A P C 系は、少なくとも 1 つの外因性補助分子を含んでよい。任意の適切な数および組合せの補助分子を用いてよい。補助分子は、共刺激分子および接着分子などの補助分子から選択してもよい。例となる共刺激分子には、C D 8 6、C D 6 4 (F c R I)、4 1 B B リガンド、および I L - 2 1 が含まれる。接着分子には、セレクチンなどの炭水化物結合糖タンパク質、インテグリンなどの膜貫通結合糖タンパク質、カドヘリンなどのカルシウム依存性タンパク質、および細胞間接着分子 (I C A M) などの単回膜貫通型免疫グロブリン (I g) スーパーファミリータンパク質などを挙げることができ、これらは、例えば、細胞対細胞、または細胞対マトリックスの接触を促進する。例となる接着分子には、L F A - 3 および I C A M s、例えば I C A M - 1 が含まれる。共刺激分子および接着分子を含む、例となる補助分子の選択、クローニング、調製、および発現に有用な技法、方法、および試薬。

I V . 使用方法

【 0 1 6 5 】

一部の実施形態では、本開示は、本開示の C A R (例えば、E v 3 ヒンジおよび / またはヒト化 s c F v を有する C A R) を発現する有効量の免疫細胞を投与することを含む免疫療法のための方法を提供する。一実施形態では、医学的疾患または障害は、免疫応答を誘発する免疫細胞集団の移植によって処置される。本開示の特定の実施形態では、癌または感染は、免疫応答を誘発する免疫細胞集団の移植によって処置される。本明細書では、個体に有効量の抗原特異的細胞療法を投与することを含む、個体において癌を処置するかまたは癌の進行を遅らせる方法が提供される。本発明の方法は、免疫障害、固形癌、血液癌、およびウイルス感染の処置に適用され得る。

【 0 1 6 6 】

特定の実施形態では、本明細書で提供される C A R を発現する免疫細胞、例えば N K 細胞および / または T 細胞を、前記癌によって発現される抗原に特異的な抗原結合ドメインとともに投与することにより、癌患者を処置するための方法が提供される。例えば、慢性リンパ性白血病 (C L L)、B 細胞急性リンパ芽球性白血病 (A L L)、または非ホジキンリンパ腫 (N H L) の被験体を C D 1 9 - E v 3 - C A R 免疫細胞で処置して、癌幹細胞などの C D 1 9 - 陽性細胞を除去することができる。その他の態様では、被験体は急性骨髄性白血病 (A M L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、骨髄異形成症候群 (M D S)、または形質細胞様樹状細胞白血病 (P D C L) を有してよく、C D 1 2 3 - E v 3 - C A R 免疫細胞で処置され得る。さらなる態様では、被験体は T 細胞白血病およびリンパ腫を有し、C D 5 - E v 3 - C A R 免疫細胞で処置されてよい。C L L、乳癌、膵臓癌または肺癌を有する被験体は、R O R 1 - E v 3 - C A R 免疫細胞で処置されてよい。子宮頸癌、子宮内膜癌または卵巣癌を有する被験体は、M e s o - E v 3 - C A R 免疫細胞で処置されてよい。

【 0 1 6 7 】

多発性骨髄腫 (M M) またはその他の C D 3 1 9 を発現する癌の被験体は、C D 3 1 9 - C A R 免疫細胞で処置することができる。一部の態様では、アミロイドーシスの患者は、C D 3 1 9 陽性細胞、例えば癌幹細胞などを除去することによって処置される。一部の態様では、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症 (M G U S) またはくすぶり型骨髄腫の患者は、C D 3 1 9 - C A R 免疫細胞で処置される。自己免疫障害、例えば関節リウマチ、S L E、または自己免疫性溶血性貧血などで C D 3 1 9 陽性細胞を有する被験体は、本実施形態の免疫細胞によって処置され得る。特定の態様では、C D 3 1 9 を発現する癌は、E v 3 - C A R を発現する免疫細胞を C D 3 1 9 s c F v、C D 3、D A P 1 2、および I L - 1 5 とともに投与することによって処置される。

【0168】

部の実施形態では、本明細書で提供されるE v 3 CARを含む細胞は、抗EGFR抗体によって除去および/または検出され得る。例となる抗EGFR抗体としては、限定されるものではないが、セツキシマブ（アービタックス）およびパニツムマブ（ベクティビックス）ならびにバイオ後続品が挙げられる。これらの抗体は両方とも、結腸直腸癌の処置のためにFDAによって承認されている。一部の実施形態では、E v 3 - CARを発現する細胞の検出は、検出可能なタグを有する抗EGFR抗体の投与を含む。その他の態様では、E v 3 - CARを発現している細胞の除去は、ADCCを誘発する抗EGFR抗体の投与を含む。一部の態様では、抗EGFR抗体は、プロドラッグまたは細胞傷害性薬物、例えば毒素などと融合させてよい。

10

【0169】

本発明の処置方法が有用な腫瘍には、悪性細胞型、例えば固形腫瘍または血液腫瘍に見出されるものなどが含まれる。例となる固形腫瘍としては、限定されるものではないが、膵臓、結腸、盲腸、胃、脳、頭、頸部、卵巣、腎臓、喉頭、肉腫、肺、膀胱、メラノーマ、前立腺、および乳房からなる群から選択される器官の腫瘍を挙げることができる。例となる血液腫瘍には、骨髄の腫瘍、T細胞またはB細胞の悪性腫瘍、白血病、リンパ腫、芽細胞腫、骨髄腫、および同類のものが含まれる。本明細書で提供される方法を用いて処置され得る癌のさらなる例としては、限定されるものではないが、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌腫を含む）、腹膜の癌、胃（gastricまたはstomach）癌（胃腸癌および胃腸間質癌を含む）、膵臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮の癌腫、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、様々な種類の頭頸部癌、およびメラノーマが挙げられる。

20

【0170】

癌は具体的には以下の組織型のものである可能性があるが、これらに限定されるものではない：新生物、悪性；癌腫；未分化癌腫；巨細胞および紡錘細胞の癌腫；小細胞癌腫；乳頭癌腫；扁平上皮癌腫；リンパ上皮癌腫；基底細胞癌腫；毛母癌腫；移行上皮癌腫；乳頭移行上皮癌腫；腺癌；悪性ガストリノーマ；胆管細胞癌腫；肝細胞癌腫；肝細胞癌腫と胆管細胞癌腫の併発；索状腺癌；腺様嚢胞癌；腺腫性ポリープの腺癌；腺癌、家族性大腸腺腫症；固形癌腫；悪性カルチノイド腫瘍；細気管支肺腺癌；乳頭状腺癌；嫌色素性癌腫；好酸性癌腫；好酸性腺癌；好塩基性癌腫；明細胞腺癌；顆粒細胞癌腫；濾胞腺癌；乳頭状および濾胞状腺癌；非被嚢性硬化性癌腫；副腎皮質癌腫；類内膜（endometrioid）癌腫；皮膚付属器癌腫；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳道腺癌；粘表皮癌腫；嚢胞腺癌；乳頭状嚢胞腺癌；漿液性乳頭状嚢胞腺癌；粘液嚢胞腺癌；粘液腺癌；印環細胞癌腫；浸潤性乳管癌腫；髓様癌腫；小葉癌腫；炎症性癌腫；乳房バジェット病；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌腫；扁平上皮化生を伴う腺癌；悪性胸腺腫；悪性卵巣間質腫瘍；悪性莢膜細胞腫；悪性顆粒膜細胞腫；悪性アンドロblastoma；セルトリ細胞癌腫；悪性ライディッヒ細胞腫；悪性脂質細胞腫瘍；悪性傍神経節腫；悪性乳房外傍神経節腫；褐色細胞腫；グロムス血管肉腫；悪性メラノーマ；無色素性メラノーマ；表在拡大型メラノーマ；悪性黒子型メラノーマ；末端黒子型メラノーマ；結節性メラノーマ；大色素性母斑の悪性メラノーマ；類上皮細胞メラノーマ；青色母斑、悪性；肉腫；線維肉腫；悪性線維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；胞巣状横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミューラー管混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；癌肉腫；悪性間葉腫；悪性ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胎生期癌；悪性奇形腫；悪性卵巣甲状腺腫；絨毛癌；悪性中腎腫；血管肉腫；血管内皮腫、悪性；カポジ肉腫；悪性血管周皮腫；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽腫；間葉性軟骨肉腫；骨の巨細胞腫；ユーイング肉腫；悪性歯源性腫瘍；エナメル芽細胞歯牙肉腫；悪性エナメル上皮腫；エナメル芽細胞線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫、上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起膠細胞腫；乏突起膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性；小脳肉

30

40

50

腫；神経節芽細胞腫；神経芽細胞腫；網膜芽細胞腫；嗅神経原腫瘍；悪性髄膜腫；神経線維肉腫；悪性神経鞘腫；悪性顆粒細胞腫；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン側肉芽腫；小リンパ球性悪性リンパ腫；びまん性大細胞型悪性リンパ腫；濾胞性悪性リンパ腫；菌状息肉腫；その他の特定の非ホジキンリンパ腫；B細胞リンパ腫；低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽細胞NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；悪性組織球増殖症；多発性骨髄腫；マスト細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞性白血病；赤白血病；リンパ性肉腫細胞性白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；マスト細胞性白血病；巨核芽球性白血病；骨髄肉腫；毛様細胞性白血病；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；急性骨髄性白血病（AML）；および慢性骨髄芽球性白血病。

10

【0171】

特定の実施形態は、白血病の処置方法に関する。白血病は血液または骨髄の癌であり、血液細胞、通常白血球細胞（白血球）の異常な増殖（増殖による産生）を特徴とする。これは、血液腫瘍と呼ばれる疾患の幅広いグループの一部である。白血病は、様々な疾患に及ぶ広義の用語である。白血病は臨床的および病理学的にその急性型と慢性型に分けられる。

20

【0172】

本開示の特定の実施形態では、免疫細胞は、それを必要とする個体、例えば癌または感染症を患っている個体などに送達される。次いで、細胞は個体の免疫系を強化して、それぞれの癌または病原細胞を攻撃する。場合によっては、個体には、1またはそれを超える用量の免疫細胞が与えられる。個体に2またはそれを超える用量の免疫細胞が与えられる場合には、投与と投与の間の期間は、個体での伝播に十分な時間を確保する必要がある、特定の実施形態では、用量と用量の間の期間は1、2、3、4、5、6、7日、またはそれを超える。

【0173】

本開示の特定の実施形態は、免疫介在性障害を処置または予防する方法を提供する。一実施形態では、被験体は自己免疫疾患を有する。自己免疫疾患の限定されない例としては、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアック・スパート（celiac spate）皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、チャグ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡（cicatricial pemphigoid）、CREST症候群、寒冷凝集素病、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症 - 線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス（lupus erythematosus）、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、1型または免疫介在性真性糖尿病、重症筋無力症、ネフローゼ症候群（例えば微小変化型、巣状糸球体硬化症、または膜性腎症など）、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬の関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフ・マン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎（例えば結節性多発性動脈炎、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、または疱疹状皮膚炎 脈管炎など）、白斑、およびウェゲナー肉芽腫症が挙げられる。従って、本明細書に開示される方法を使用して処置され得る自己免疫疾患のいくつかの例としては、限定されるものではないが、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性工

30

40

50

リテマトーデス、Ⅰ型真性糖尿病、クローン病；潰瘍性大腸炎、重症筋無力症、糸球体腎炎、強直性脊椎炎、脈管炎、または乾癬が挙げられる。被験体は、喘息などのアレルギー障害を有していてもよい。

【0174】

さらにもう一つの実施形態では、被験体は、移植臓器または幹細胞のレシピエントであり、免疫細胞は拒絶を予防および／または処置するために使用される。特定の実施形態では、被験体は、移植片対宿主病を有するかまたは発症するリスクがある。GVHDは、血縁ドナーかまたは非血縁ドナーのいずれかの幹細胞を使用するかまたは含む、あらゆる移植の合併症の可能性がある。GVHDには、急性と慢性の2種類がある。急性GVHDは、移植後最初の3カ月以内に現れる。急性GVHDの徴候には、手および足に赤みを帯びた皮膚の発疹が広がり、皮膚が剥がれたり水疱ができたりして、さらに重症になり得ることが含まれる。急性GVHDは胃および腸に影響を与える可能性もあり、その場合、けいれん、吐き気および下痢が起こる。皮膚および目の黄変（黄疸）は、急性GVHDが肝臓に影響を及ぼしたことを示す。慢性GVHDは、その重症度に応じてランク付けされる。ステージ／グレード1は軽度であり、ステージ／グレード4は重度である。慢性GVHDは、移植の3か月後またはそれ以降に発症する。慢性GVHDの症候は急性GVHDの症状に類似しているが、さらに、慢性GVHDは目の粘液腺、口の唾液腺、および胃の内壁と腸を潤滑する腺にも影響を与える可能性がある。本明細書に開示される免疫細胞の集団のいずれかを利用することができる。移植臓器の例としては、腎臓、肝臓、皮膚、脾臓、肺および／または心臓などの固形臓器移植、あるいは脾臓、肝細胞、筋芽細胞、骨髄、または造血またはその他の幹細胞などの細胞移植片が含まれる。移植は、顔の組織などの複合移植であり得る。免疫細胞は、移植前に、移植と同時に、または移植後に投与することができる。一部の実施形態では、免疫細胞は、移植片の前に、例えば移植片の少なくとも1時間、少なくとも12時間、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも1週、少なくとも2週、少なくとも3週、少なくとも4週、または少なくとも1カ月前に投与される。ある特定の、限定されない例では、治療上有効な量の免疫細胞の投与は、移植の3～5日前に行われる。

【0175】

一部の実施形態では、免疫細胞療法の前に、被験体に骨髄非破壊的リンパ球除去化学療法を投与することができる。骨髄非破壊的リンパ球除去化学療法は、任意の適切なそのような治療法であり得、それは任意の適切な経路によって投与され得る。骨髄非破壊的リンパ球除去化学療法は、例えば、特に癌が転移性であり得るメラノーマである場合、シクロホスファミドおよびフルダラビンの投与を含み得る。シクロホスファミドおよびフルダラビンの例となる投与経路は、静脈内である。同様に、任意の適切な用量のシクロホスファミドおよびフルダラビンを投与することができる。特定の態様では、およそ60 mg / kgのシクロホスファミドが2日間投与され、その後におよそ25 mg / m²のフルダラビンが5日間投与される。

【0176】

特定の実施形態では、免疫細胞の成長および活性化を促進する増殖因子が、免疫細胞と同時に、または免疫細胞に続いて被験体に投与される。免疫細胞増殖因子は、免疫細胞の成長および活性化を促進する任意の適切な増殖因子であってよい。適切な免疫細胞増殖因子の例には、インターロイキン（IL）-2、IL-7、IL-15、およびIL-12が含まれ、これらは単独で使用されてもよいし、多様な組合せ、例えばIL-2とIL-7、IL-2とIL-15、IL-7とIL-15、IL-2、IL-7とIL-15、IL-12とIL-7、IL-12とIL-15、またはIL-12とIL-2などで使用されてもよい。

【0177】

治療上有効な量の免疫細胞は、非経口投与、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、胸骨内、または関節内注射、または注入をはじめとする、多くの経路によって投与することができる。

【0178】

養子細胞療法で使用する免疫細胞の治療上有効な量は、処置される被験体において望ましい効果を達成する量である。例えば、これは、進行を抑制するため、または自己免疫または同種免疫疾患の退縮を引き起こすために必要な、あるいは自己免疫疾患によって引き起こされる症状、例えば疼痛および炎症などを緩和できる免疫細胞の量であり得る。それは、炎症、例えば疼痛、浮腫および体温上昇などに関連する症候を軽減するために必要な量であり得る。また、それは移植された臓器の拒絶反応を減少または防止するために必要な量であり得る。

【0179】

免疫細胞集団は、疾患に合った処置計画で投与することができ、例えば1回または2、3回の用量を1日から数日にわたって投与して疾患状態を改善するか、あるいは定期的な用量を長期にわたって投与して疾患の進行を抑制し、疾患の再発を防ぐことができる。製剤に用いられる正確な用量は、投与経路にも依存することになり、疾患または障害の重篤度は、開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。免疫細胞の治療有効量は、処置される被験体、苦痛の重症度と種類、および投与方法に依存することになる。一部の実施形態では、ヒト被験体の処置で使用され得る用量は、少なくとも 3.8×10^4 、少なくとも 3.8×10^5 、少なくとも 3.8×10^6 、少なくとも 3.8×10^7 、少なくとも 3.8×10^8 、少なくとも 3.8×10^9 、または少なくとも 3.8×10^{10} の免疫細胞/ m^2 に及ぶ。特定の実施形態では、ヒト被験体の処置で使用される用量は、約 3.8×10^9 から約 3.8×10^{10} の免疫細胞/ m^2 に及ぶ。さらなる実施形態では、免疫細胞の治療上有効な量は、約 5×10^6 細胞/kg体重から約 7.5×10^8 細胞/kg体重、例えば約 2×10^7 細胞~約 5×10^8 細胞/kg体重、または約 5×10^7 細胞~約 2×10^8 細胞/kg体重で変動し得る。免疫細胞の正確な量は、被験体の年齢、体重、性別、および生理学的症状に基づいて、当業者によって容易に決定される。有効量は、インビトロまたは動物モデルの試験系から得られた用量反応曲線から推定することができる。

【0180】

免疫細胞は、免疫介在性障害の処置のための1またはそれを超えるその他の治療薬と併用して投与されてよい。併用療法には、限定されるものではないが、1またはそれを超える抗菌剤（例えば、抗生物質、抗ウイルス剤および抗真菌剤）、抗腫瘍剤（例えば、フルオロウラシル、メトトレキサート、パクリタキセル、フルダラビン、エトポシド、ドキソルビシン、またはビンクリスチン）、免疫除去剤（例えば、フルダラビン、エトポシド、ドキソルビシン、またはビンクリスチン）、免疫抑制剤（例えば、アザチオプリン、またはグルココルチコイド、例えばデキサメタゾンまたはプレドニゾンなど）、抗炎症剤（例えば、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾンまたはプレドニゾンなどのグルココルチコイド、あるいはアセチルサリチル酸、イブプロフェンまたはナプロキセンナトリウムなどの非ステロイド系抗炎症剤）、サイトカイン（例えば、インターロイキン-10またはトランスフォーミング増殖因子）、ホルモン（例えば、エストロゲン）、またはワクチンが含まれ得る。さらに、限定されるものではないが、カルシニューリン抑制剤（例えば、シクロスポリンおよびタクロリムス）；mTOR抑制剤（例えば、ラパマイシン）；ミコフェノール酸モフェチル、抗体（例えば、CD3、CD4、CD40、CD154、CD45、IVIg、またはB細胞を認識）；化学療法剤（例えば、メトトレキサート、トレオスルファン、ブスルファン）；照射；またはケモカイン、インターロイキンまたはそれらの抑制剤（例えば、BAFF、IL-2、抗IL-2R、IL-4、JAKキナーゼ抑制剤）をはじめとする免疫抑制剤または寛容誘発剤を投与することができる。そのような追加の医薬品は、所望の効果に応じて、免疫細胞の投与の前、投与の最中、または投与の後に投与することができる。細胞および薬剤のこの投与は、同じ経路または異なる経路で、同じ部位または異なる部位のいずれかで行うことができる。

B. 薬学的組成物

【0181】

本明細書では、免疫細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）と薬学的に許容され得る担体を含む薬学的組成物および製剤も提供される。

【0182】

本明細書に記載される薬学的組成物および製剤は、所望の純度を有する有効成分（例えば抗体またはポリペプチドなど）を、凍結乾燥製剤または水溶液の形態の1またはそれを超える随意の薬学的に許容され得る担体と混合することによって調製することができる（Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012）。薬学的に許容され得る担体は、一般に、用いられる投与量および濃度でレシピエントに対して無毒であり、それには、限定されるものではないが、リン酸、クエン酸、およびその他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えばオクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含むその他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；および/またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

C. 併用療法

【0183】

特定の実施形態では、本実施形態の組成物および方法は、少なくとも1つの追加の療法と組み合わせた免疫細胞集団を伴う。追加の療法は、放射線療法、手術（例えば、乳腺腫瘍摘出術および乳房切除術）、化学療法、遺伝子療法、DNA療法、ウイルス療法、RNA療法、免疫療法、骨髄移植、ナノ療法、モノクローナル抗体療法、または前述の組み合わせであってよい。追加の療法は、アジュバントまたはネオアジュバント療法の形であってよい。

【0184】

一部の実施形態では、追加の療法は、低分子酵素抑制剤または抗転移剤の投与である。一部の実施形態では、追加の療法は、副作用制限剤（例えば、処置の副作用の発生および/または重症度を低下させることを目的とする薬剤、例えば、抗吐き気剤など）の投与である。一部の実施形態では、追加の療法は放射線療法である。一部の実施形態では、追加の療法は手術である。一部の実施形態では、追加の療法は放射線療法と手術の併用である。一部の実施形態では、追加の療法はガンマ線照射である。一部の実施形態では、追加の療法は、PBK/AKT/mTOR経路、HSP90抑制剤、チューブリン抑制剤、アポトーシス抑制剤、および/または化学防御剤を標的とする療法である。追加の療法は、当技術分野で公知の1またはそれを超える化学療法剤であってよい。

【0185】

免疫細胞療法は、追加の癌療法、例えば免疫チェックポイント療法などと比べて、前に、最中に、後に、または様々な組合せで投与されてよい。投与は、同時から数分から数日から数週間の範囲の間隔で行うことができる。免疫細胞療法が追加の治療薬とは別に患者に提供される実施形態では、一般に、2つの化合物が有利な併用効果を患者になお発揮することが可能なように、各送達の時間の間にかなりの時間が経って期限が過ぎないようにする。そのような場合、互いに約12~24または72時間以内、より具体的には互いに約6~12時間以内に患者に抗体療法および抗癌療法を提供し得ることが企図される。一部の状況では、それぞれの投与の間に数日（2、3、4、5、6または7日）から数週間（1、2、3、4、5、6、7または8週間）が経過する場合には、処置の期間を大幅に

延長することが望ましいことがある。

【0186】

様々な組合せを用いることができる。以下の例では、CAR免疫細胞療法は「A」であり、抗癌療法は「B」である。

A / B / A B / A / B B / B / A A / A / B A / B / B B / A / A A / B
/ B / B B / A / B / B
B / B / B / A B / B / A / B A / A / B / B A / B / A / B A / B / B / A
B / B / A / A
B / A / B / A B / A / A / B A / A / A / B B / A / A / A A / B / A / A
A / A / B / A

10

【0187】

本実施形態の化合物または療法の患者への投与は、存在する場合は薬剤の毒性を考慮に入れて、そのような化合物の投与のための一般的なプロトコルに従うことになる。そのため、一部の実施形態では、併用療法に起因する毒性を監視するステップがある。

1. 化学療法

【0188】

幅広い種類の化学療法剤を、本実施形態に従って使用することができる。用語「化学療法」とは、癌を処置する薬物の使用を指す。「化学療法剤」は、癌の処置の際に投与される化合物または組成物を意味するために使用される。これらの薬剤または薬物は、細胞内の活動モード、例えば、細胞周期に影響を与えるかどうか、およびどの段階で影響を与えるかによって分類される。あるいは、薬剤は、DNAを直接架橋する能力、DNAの間に介入する能力、または核酸合成に影響を与えることにより染色体異常および有糸分裂異常を誘発する能力に基づいて特徴付けられ得る。

20

【0189】

化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えばチオテパおよびシクロホスファミド (cyclophosphamide) ; スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなど ; アジリジン、例えばベンゾドーパ (benzodopa) 、カルボコン、メツレドーパ (meturedopa) 、およびウレドーパ (uredopa) など ; エチレンイミンおよび、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチルオロメラミン (trimethylolomelamine) を含むメチラメラミン (methyllumelamines) ; アセトゲニン (特にプラタシンおよびプラタシノン) ; カンプトテシン (合成類似体トポテカンを含む) ; プリオスタチン ; カリスタチン ; CC - 1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む) ; クリプトフィシン (特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8) ; ドラスタチン ; デュオカルマイシン (合成類似体、KW - 2189およびCB1 - TM1を含む) ; エリュテロピン ; パンクラチスタチン ; サルコジクチン (sarcodictyin) ; スポンギスタチン (spongistatin) ; ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、シクロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビシン (novembichin) 、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、およびウラシルマスタードなど ; ニトロソ尿素 (nitrosureas) 、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチンなど ; 抗生物質、例えばエンジン抗生物質 (例えば、カリチアマイシン、特にカリチアマイシガンマI (gamma I) およびカリチアマイシンオメガ1 (omega I1)) など ; ダイネミシンAを含むダイネミシン ; ビスホスホネート、例えばクロドロネートなど ; エスペラミシン ; ならびにネオカルチノスタチンクロモフォアおよび関連する色素タンパク質エンジン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウストラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カルピシン、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

30

40

50

ビシン、デトルビシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルビシン (モルホリノ - ドキシソルビシン、シアノモルホリノ - ドキシソルビシン、2 - ピロリノ - ドキシソルビシンおよびデオキシドキシソルビシンを含む)、エビルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンCなど、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、ポルフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、およびゾルビシン; 代謝拮抗剤、例えばメトトレキサートおよび5 - フルオロウラシル (5 - FU) など; 葉酸類似体、例えばデノブテリン、プテロプテリン、およびトリメトトレキサートなど; プリン類似体、例えばフルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、およびチオグアニンなど; ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、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、およびフロクスウリジンなど; アンドロゲン、例えばカルステロン、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、およびテストラクトンなど; 抗副腎剤 (anti-adrenals)、例えばミトタンおよびトリロスタンなど; 葉酸補充剤、例えばフォリン酸など; アセグラトン; アルドホスファミドグリコシド; アミノレプリン酸; エニルウラシル; アムサクリン; ベストラブシル; ビサントレン; エダトラキサート (edatraxate); デフォファミン (defofamine); デメコルシン; ジアジクオン; エルホルミチン (elformithine); 酢酸エリブチニウム; エボチロン; エトグルシド; 硝酸ガリウム; ヒドロキシ尿素; レンチナン; ロニダイニン; メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサマイトシンなど; ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダンモール (mopidanmol); ニトラエリン (nitraerine); ペントスタチン; フェナメット; ピラルビシン; ロソキサントロン; ボドフィリニック酸; 2 - エチルヒドラジド; プロカルバジン; PSK多糖複合体; ラゾキサン; リゾキシン; シゾフィラン; スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジクオン; 2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン (特にT - 2毒素、ベラクリン (verracurin) A、ロリジンAおよびアングエイジン); ウレタン; ビンデシン; 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; ビボプロマン; ガシトシン (gacytosine); アラビノシド (「Ara - C」); シクロホスファミド; タキソイド、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセルゲムシタビン; 6 - チオグアニン; メルカプトプリン; 白金配位錯体、例えばシスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンなど; ビンブラスチン; 白金; エトボシド (VP - 16); イホスファミド; ミトキサントロン; ピンクリスチン; ビノレルビン; ノバントロン; テニボシド; エダトレキサート; ダウノマイシン; アミノプテリン; ゼローダ; イバンドロネート; イリノテカン (例えば、CPT - 11); トポイソメラーゼ抑制剤RFS 2000; ジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylhyloornithine) (DMFO); レチノイド、例えばレチノイン酸など; カベシタビン; カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン (plicomycin)、ゲムシタビエン (gemcitabien)、ナベルピン、ファルネシル - タンパク質トランスフェラーゼ抑制剤、トランス白金、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容され得る塩、酸、または誘導体が含まれる。

2. 放射線療法

【0190】

DNA損傷を引き起こし、広範に使用されているその他の因子には、線、X線、および/または腫瘍細胞への放射性同位体の指示された送達として一般に公知のものが含まれる。マイクロ波、陽子線照射、およびUV照射などのDNA損傷因子のその他の形態も企図される。これらの因子はすべて、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の集合および維持に対する広範囲の損傷に影響を与える可能性が最も高いと思われる。X線の線量範囲は、長期間 (3 ~ 4週間) に対する50 ~ 200レントゲンの一日線量から2000 ~ 6000レントゲンの単回線量までの範囲である。放射性同位

10

20

30

40

50

体の線量範囲は大きく異なり、同位体の半減期、放出される放射線の強度および種類、ならびに新生細胞による取り込みに依存する。

3. 免疫療法

【0191】

当業者は、追加の免疫療法が実施形態の方法と組み合わせて、またはそれと併せて使用されてよいことを理解するであろう。癌の処置の状況において、免疫療法は、一般に、癌細胞を標的として破壊することを免疫エフェクター細胞および分子の使用に頼る。リツキシマブ(RITUXAN(登録商標))は、そのような一例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上の一部のマーカースに特異的な抗体であり得る。抗体は、単独で治療のエフェクターとして働く場合もあれば、細胞の死滅に実際に影響を及ぼすために他の細胞を動員する場合もある。抗体はまた、薬物または毒素(化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など)と結合され、標的化剤として働く場合がある。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接的または間接的に相互作用する表面分子を保有するリンパ球であってよい。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が含まれる。

10

【0192】

抗体-薬物複合体(ADC)は、細胞を死滅させる薬物と共有結合しているモノクローナル抗体(MAb)を含み、併用療法で使用されてよい。このアプローチは、抗原標的に対するMAbの高い特異性と非常に強力な細胞傷害性薬を組み合わせ、その結果、濃縮されたレベルの抗原で腫瘍細胞にペイロード(薬物)を送達する「武装した」MAbをもたらす。薬物の標的化送達はまた、正常組織でのその曝露を最小限に抑え、毒性の減少と治療係数の改善をもたらす。例となるADC薬物としては、ADCETRIS(登録商標)(ブレントキシマブベドチン)およびKADCYLA(登録商標)(トラスツズマブエムタンシンまたはT-DM1)が挙げられる。

20

【0193】

免疫療法の一態様では、腫瘍細胞は、ターゲティングに適している、すなわち他の細胞の大部分には存在しない、いくつかのマーカースを有していなければならない。多くの腫瘍マーカースが存在し、これらのいずれもが、本実施形態の状況でのターゲティングに好適であり得る。一般的な腫瘍マーカースとしては、CD20、癌胎児抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニン受容体、erbBおよびp155が挙げられる。免疫療法の代替態様は、抗癌効果と免疫刺激効果を組み合わせることである。免疫刺激分子も存在し、それには、サイトカイン、例えばIL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、-IFNなど、ケモカイン、例えばMIP-1、MCP-1、IL-8など、および増殖因子、例えばFLT3リガンドなどが含まれる。

30

【0194】

免疫療法の例としては、免疫アジュバント、例えば、Mycobacterium bovis、Plasmodium falciparum、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物；サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、および、IL-1、GM-CSF、およびTNF；遺伝子療法、例えば、TNF、IL-1、IL-2、およびp53；およびモノクローナル抗体、例えば、抗CD20、抗ガングリオシドGM2、および抗p185が含まれる。1またはそれを超える抗癌療法は、本明細書に記載される抗体療法とともに用いることができると企図される。

40

【0195】

一部の実施形態では、免疫療法は、免疫チェックポイント抑制剤であってよい。免疫チェックポイントは、シグナル(例えば、共刺激分子)を上げるか、シグナルを下げる。免疫チェックポイント遮断によって標的となり得る抑制性免疫チェックポイントには、アデノシンA2A受容体(A2AR)、B7-H3(CD276としても公知)、BおよびTリンパ球アテニュエーター(BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4、CD152としても公知)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(I

50

D O)、キラー細胞免疫グロブリン (K I R)、リンパ球活性化遺伝子 - 3 (L A G 3)、プログラム死 1 (P D - 1)、T 細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン 3 (T I M - 3) および T 細胞活性化の V - ドメイン I g サプレッサー (V I S T A) が含まれる。特に、免疫チェックポイント抑制剤は、P D - 1 軸および / または C T L A - 4 を標的とする。

【 0 1 9 6 】

免疫チェックポイント抑制剤は、小分子などの薬物、リガンドまたは受容体の組換え体、または特にヒト抗体などの抗体であり得る。免疫チェックポイントタンパク質またはその類似体の既知の抑制剤を使用してよく、特に抗体のキメラ化、ヒト化またはヒト型を使用してよい。当業者が知るように、代替および / または同等の名称が、本開示で言及される特定の抗体に使用されていることがある。そのような代替名および / または同等名は、本開示の文脈において交換可能である。例えば、ランブロリズマブは M K - 3 4 7 5 およびペンブロリズマブの代替名および同等名でも公知である。

10

【 0 1 9 7 】

一部の実施形態では、P D - 1 結合アンタゴニストは、P D - 1 とそのリガンド結合パートナーの結合を抑制する分子である。具体的な態様では、P D - 1 リガンド結合パートナーは、P D L 1 および / または P D L 2 である。もう一つの実施形態では、P D L 1 結合アンタゴニストは、P D L 1 とその結合パートナーの結合を抑制する分子である。具体的な態様では、P D L 1 結合パートナーは、P D - 1 および / または B 7 - 1 である。もう一つの実施形態では、P D L 2 結合アンタゴニストは、P D L 2 とその結合パートナーの結合を抑制する分子である。具体的な態様では、P D L 2 結合パートナーは P D - 1 である。アンタゴニストは、抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、またはオリゴペプチドであり得る。

20

【 0 1 9 8 】

一部の実施形態では、P D - 1 結合アンタゴニストは、抗 P D - 1 抗体 (例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体) である。一部の実施形態では、抗 P D - 1 抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、および C T - 0 1 1 からなる群から選択される。一部の実施形態では、P D - 1 結合アンタゴニストは、イムノアドヘシン (例えば、定常領域 (例えば、免疫グロブリン配列の F c 領域) に融合した P D L 1 または P D L 2 の細胞外または P D - 1 結合部分を含むイムノアドヘシン) である。一部の実施形態では、P D - 1 結合アンタゴニストは A M P - 2 2 4 である。M D X - 1 1 0 6 - 0 4、M D X - 1 1 0 6、O N O - 4 5 3 8、B M S - 9 3 6 5 5 8、および O P D I V O (登録商標) としても公知のニボルマブは、使用してよい抗 P D - 1 抗体である。M K - 3 4 7 5、M e r c k 3 4 7 5、ランブロリズマブ、K E Y T R U D A (登録商標)、および S C H - 9 0 0 4 7 5 としても公知のペムブロリズマブは、例となる抗 P D - 1 抗体である。h B A T または h B A T - 1 としても公知の C T - 0 1 1 は、抗 P D - 1 抗体でもある。B 7 - D C I g としても公知の A M P - 2 2 4 は、P D L 2 - F c 融合可溶性受容体である。

30

【 0 1 9 9 】

本明細書で提供される方法で標的となり得るもう一つの免疫チェックポイントは、C D 1 5 2 としても公知の細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A - 4) である。ヒト C T L A - 4 の完全な c D N A 配列は、G e n b a n k アクセッション番号 L 1 5 0 0 6 を有する。C T L A - 4 は T 細胞の表面に見出され、抗原提示細胞の表面の C D 8 0 または C D 8 6 に結合すると「オフ」スイッチとして機能する。C T L A 4 は、ヘルパー T 細胞の表面に発現し、抑制シグナルを T 細胞に伝達する免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。C T L A 4 は、T 細胞共刺激タンパク質 C D 2 8 に類似し、両方の分子は、それぞれ B 7 - 1 および B 7 - 2 と呼ばれる、抗原提示細胞上の C D 8 0 および C D 8 6 に結合する。C T L A 4 は抑制シグナルを T 細胞に伝達するが、C D 2 8 は刺激シグナルを伝達する。細胞内 C T L A 4 は、制御性 T 細胞にも見出され、それらの機能に重要であり得る。T 細胞受容体および C D 2 8 による T 細胞の活性化は、B 7 分子の抑制性受容体である C T L A - 4 の発現増加につながる。

40

50

【0200】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント抑制剤は、抗CTLA-4抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体）、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、またはオリゴペプチドである。

【0201】

本発明の方法での使用に適切な抗ヒト-CTLA-4抗体（またはそれに由来するVHおよび/またはVLドメイン）は、当技術分野で周知の方法を使用して生成され得る。あるいは、当該分野で認識される抗CTLA-4抗体を使用することができる。例となる抗CTLA-4抗体は、イピリマブ（10D1、MDX-010、MDX-101、およびYervoy（登録商標）としても公知）またはその抗原結合断片および変異体である。その他の実施形態では、抗体は、イピリマブの重鎖および軽鎖のCDRまたはVRを含む。従って、一実施形態では、抗体は、イピリマブのVH領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメイン、およびイピリマブのVL領域のCDR1、CDR2およびCDR3ドメインを含む。もう一つの実施形態では、抗体は、上記の抗体と同じCTLA-4上のエピトープとの結合について競合し、かつ/または結合する。もう一つの実施形態では、抗体は、上述の抗体と少なくとも約90%の変換領域アミノ酸配列同一性（例えば、イピリマブと少なくとも約90%、95%、または99%変換領域同一性）を有する。

4. 手術

【0202】

癌患者の約60%は何らかの種類の手術を受けることになり、それには予防手術、診断的または病期決定手術、根治手術および緩和手術が含まれる。根治手術には、癌性組織の全部または一部を物理的に除去、切除、および/または破壊する切除術が含まれ、他の療法、例えば本実施形態の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、および/または代替療法などと併用することができる。腫瘍切除術とは、腫瘍の少なくとも一部の物理的な除去を指す。腫瘍切除術に加えて、手術による処置には、レーザー手術、凍結手術、電気手術、および顕微鏡制御手術（モース術）が含まれる。

【0203】

癌性細胞、組織、または腫瘍の一部または全部を切除すると、体内に空洞が形成されることがある。処置は、灌流、直接注射、または追加の抗癌療法による領域の局所適用によって達成されてよい。そのような処置は、例えば、1、2、3、4、5、6、または7日ごと、あるいは1、2、3、4、および5週ごと、あるいは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12カ月ごとに繰り返すことができる。これらの処置も同様に様々な投与量のものであってよい。

5. その他の薬剤

【0204】

処置の治療効果を改善するために、その他の薬剤を本実施形態の特定の態様と組み合わせて使用し得ることが企図される。これらの追加の薬剤には、細胞表面受容体およびギャップ結合のアップレギュレーションに影響を及ぼす薬剤、細胞増殖抑制剤および分化剤、細胞接着の抑制剤、アポトーシス誘導物質に対する過剰増殖性細胞の感受性を高める薬剤、またはその他の生物剤が含まれる。ギャップ結合の数を増やすことによる細胞間シグナル伝達の増加は、隣接する過剰増殖性細胞集団に対する抗過剰増殖効果を増加させる。その他の実施形態では、細胞増殖抑制剤または分化剤を本実施形態の特定の態様と組み合わせて使用して、処置の抗過剰増殖効力を改善することができる。細胞間接着の抑制剤は、本実施形態の有効性を改善することが企図される。細胞間接着抑制剤の例は、焦点接着キナーゼ（FAK）抑制剤およびロバスタチンである。さらに、アポトーシスに対する過剰増殖性細胞の感受性を増加させるその他の薬剤、例えば抗体c225などを、本実施形態の特定の態様と組み合わせて使用して、処置効力を改善することができ得ることが企図される。

V. 製造品またはキット

【0205】

免疫細胞を含む製造品またはキットも本明細書において提供される。製造品またはキットは、免疫細胞を使用して個体の癌を処置するかまたは癌の進行を遅らせるため、または癌を有する個体の免疫機能を高めるための説明書を含む添付文書をさらに含むことができる。本明細書に記載される抗原特異的免疫細胞はどれでも製造品またはキットに含められてよい。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、バッグおよびシリンジが含まれる。容器は、ガラス、プラスチック（例えばポリ塩化ビニルまたはポリオレフィンなど）、または金属合金（例えばステンレス鋼またはハステロイ）などの多様な材料から形成されてよい。一部の実施形態では、容器は製剤を保持し、容器上のラベル、または容器に関連付けられたラベルは、使用方法を示すことができる。製造品またはキットには、その他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用説明書付きの添付文書をはじめとする、商業的およびユーザーの観点から望ましいその他の材料がさらに含まれてよい。一部の実施形態では、製造品には、1またはそれを超える別の薬剤（例えば、化学療法剤、および抗腫瘍剤）がさらに含まれる。1またはそれを超える薬剤に適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、バッグおよびシリンジが含まれる。

V I . 実施例

【0206】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実践において十分に機能するために発明者によって発見された技術を表し、したがって、その実践に好ましいモードを構成すると見なされ得ることを当業者は理解するべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、多くの変更が開示された特定の実施形態において行われ、それでもなお本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果を得ることができることを理解するはずである。

実施例 1 - 切断型 E G F R v I I I (E v 3) C A R の開発

【0207】

E v 3 - C A R は、E v 3 ストークが s c F v などによる抗原結合からのシグナルを変換する統合構造として機能するように設計された。また、「オフ」スイッチは、セツキシマブなどの臨床的にアクセス可能な抗体によって C A R 陽性免疫細胞を除去することが認識され得ることを意味する（図 1 A）。E v 3 - C A R は、D A P 1 2 シグナル伝達ドメインをさらに含むことができ、E v 3 - D A P 1 2 - C A R と名付けられる。エンドドメインおよび E G F 結合ドメインを含む E G F R と比較した E v 3 を示す模式図が図 2 に示される。

【0208】

様々な抗原結合ドメインを有する E v 3 - C A R または E v 3 - D A P 1 2 - C A R をコードするレトロウイルスベクターは、図 3 A ~ 3 D に示されるように生成された。抗原結合ドメインは、マウス抗ヒト抗体に由来する s c F v とヒト化 s c F v の両方であった。ベクターは、C D 2 8 および C D 3 シグナル伝達ドメイン、そして必要に応じて D A P 1 2 を含む。ベクターは、自殺遺伝子である誘導性カスパーゼ 9 も含む。

【0209】

C A R 1 9 . E v 3 . C D 2 8 . C D 3 、 C A R 1 9 . E v 3 . D A P 1 2 . C D 3 またはヒト化 C A R 1 9 . E v 3 . C D 3 をはじめとする C D 1 9 特異的 C A R を N K 細胞に形質導入した（図 4 A）。C A R - N K 細胞を、C D 1 9 + R a j i または K 5 6 2 細胞を死滅させる際のその効力について試験した（図 4 B）。C A R 1 9 - E v 3 - C D 2 8 - D A P 1 2 - C A R N K 細胞は、最大の細胞傷害性を有することが観察された。従って、C A R のヒンジ領域で D A P 1 2 エンドドメインと組み合わせて E v 3 を使用すると、標的細胞に対して非常に細胞傷害性の高い C A R が生成される。

実施例 2 - ヒト化 C A R の開発

【0210】

ヒト化 C A R を産生する際に用いるヒト化 s c F v を生成するためのプラットフォームを開発した。構造的な制約により、一部の残基は抗原結合により寄与するため、3 D モデ

10

20

30

40

50

リングを使用して、重要である可能性のある相互作用を特定し、ヒト化C A Rを生成した。以下に詳述する段階的なプロセスは、以前のサイクルを改善するために反復して繰り返され得る。

【0211】

本明細書で提供されるC A Rヒト化ワークフローは、以下に詳述され、図5 Aに示される5つの基本プロセスモジュールを含む。

【0212】

モジュールIは、モノクローナル抗体(m A b)配列解析を含む。B L A S Tプログラムを、マウスm A b配列などの開始クエリに対して最も一致する免疫グロブリン(I G)配列の検索に用いた(図5 B)。B L A S Tは、ヌクレオチド配列とアミノ酸配列を連続(1対1)かまたは並列(バッチ)で解析することができるほか、精選された配列データベースを含む生殖細胞系遺伝子データベースを同時に検索することができるので、最適なマッチング変数(V遺伝子)を取得する可能性が最大になる。参照配列について、生殖細胞系変数(V)、多様性(D)および結合(J)遺伝子のデータベースを使用して、I G Vドメインフレームワーク領域(F R 1 - 4)および相補性決定領域(C D R)を描写した。各抗体について、可変ドメインを、各々が遺伝子V、D、およびJ遺伝子を含む複数の遺伝子によってコードされている、軽鎖および重鎖について分析した。この研究の焦点は主に、各F RおよびC D R領域の境界を見出し、データベース内の他のI G配列と比較する、定義された領域の状況で変動を比較するV遺伝子にある。

10

【0213】

ゲノム配列内の個々の変動(すなわち、1,000bpのDNA配列あたり1つの一塩基多型と推定される)により、生殖細胞系I G配列は数千のアロタイプ(すなわち、対立遺伝子または遺伝子のバージョン)を含む(図6)。ヒトアロタイプのデータベースを生成し、C A Rのヒト化に活用した。

20

【0214】

一例として、マウス抗体(クローンF M C 63)から抗ヒトC D 19結合ドメインV LおよびV H配列を形質転換するために、C D R移植により特定のヒトアロタイプを使用してヒト化ドメインを誘導した(図7 A)。図7 AのC D R領域には下線が引かれている。

【0215】

フレームワーク配列のソースは、図7 Bに示されるB L A S T(A l t s h u lら、1997)分析により確認された。さらに、配列相同性および同一性は容易に定量化され、図7 Cに要約されている。比較として、新規に作成された配列を以前に利用可能な配列と比較し、実質的かつ容易に区別可能な違いがアミノ酸およびヌクレオチドレベルで検出された。

30

【0216】

モジュールI Iは3D構造モデリングで構成された。抗原結合のための重要な残基を特定するために、3D構造を構築して構築物を評価した。S W I S S - M O D E Lは、ヒト化m A bの3次元モデルを作成するために使用されたタンパク質構造相同性モデラーである。構造ファイルは、相同性モデリングのテンプレートとして構造抗体データベースであるS A b D a bから抽出された。V LおよびV HドメインのC D R領域の3Dコンフォメーションを特徴付ける例として、S W I S S - M O D E L(A r n o l dら、2006; B e n k e r tら、2011)アルゴリズムを使用する相同性モデリングを、以下の一次アミノ酸配列とともに使用した。

40

【化 5】

hCD19 V_L (配列番号 9): DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDIS
 KYLNWYQQKPGKVPKLLIYHTSRLHSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQP
 EDVATYYCQQGNTLPYTFGQGKVEIKR

hCD19 V_H (配列番号 8): EVQLVESGGGLVQPGGSLRL
 SCAASGVSLPDYGVSWVRQAPGKGLEWIGVIWGSETTYYNALSKKFIISRD
 NAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS

【0217】

10

SWISS-MODELテンプレートライブラリー (SMTLバージョン2017-06-28、PDBリリース2017-06-23)を、標的配列hCD19 V_LおよびhCD19 V_Hに一致する進化的関連構造についてBLAST (Altschulら、1997)およびHHblits (Remmertら、2012)で検索した。

【0218】

20

全体として、13,535個のテンプレートがhCD19 V_Lで見出され、2fgw.1.Aが最良適合を示し (図8A)、さらなる解析に使用された。標的配列 (hCD19 V_L)をSMTLに含まれる一次アミノ酸配列に対してBLASTで検索した。合計761個のテンプレートが見出された。最初のHHblitsプロファイルを、Remmertらによって概説された手順を使用して構築し、その後、NR20に対してHHblitsを1回反復した。このようにして得たプロファイルを、次にSMTLのすべてのプロファイルに対して検索した。合計12,946個のテンプレートが見出された。

【0219】

30

全体で、14,631個のテンプレートがhCD19 V_Hに見出され、4uv7.1.Bが最良適合を示し (図8A)、さらなる解析に使用された。標的配列 (hCD19 V_L)をSMTLに含まれる一次アミノ酸配列に対してBLASTで検索した。合計755個のテンプレートが見出された。最初のHHblitsプロファイルを、Remmertらによって概説された手順を使用して構築し、その後、NR20に対してHHblitsを1回反復した。このようにして得たプロファイルを、次にSMTLのすべてのプロファイルに対して検索した。合計13,964個のテンプレートが見出された。

【0220】

テンプレート選択：識別された各テンプレートについて、テンプレートの品質は標的とテンプレートのアライメントの特徴から予測されていた。次に、モデル作成のために最高品質のテンプレートが選択された。

【0221】

40

モデル構築：ProMod3を使用して、標的とテンプレートのアライメントに基づいてモデルを構築した。標的とテンプレート間で保存されていた座標は、テンプレートからモデルにコピーされた。断片ライブラリーを使用して挿入および欠失をリモデリングした。次いで、側鎖を再構築した。最後に、結果として得られるモデルのジオメトリを、力場を使用して正規化した。ProMod3によるループモデリングが失敗した場合、PROMOD-IIを用いて代替りのモデルを構築した (Geuxら、1997)。

【0222】

モデル品質の推定：全体および残基ごとのモデル品質は、QMEANスコアリング関数を使用して評価した (Benkertら、2011)。パフォーマンスを改善するために、個々のQMEAN用語の重みは、特にSWISS-MODEL向けにトレーニングされていた。

【0223】

hCD19 V_LおよびhCD19 V_Hの3次元モデルは、CDR残基が水相を露出し、抗原結合特性と一貫してパラトープ表面を形成できたことを示した。

【0224】

50

モジュール I I I はヒトフレームワークグラフィングで構成された。合成 C A R 構築プロセスの一環として、堅牢で信頼性の高い C D R 移植手法がプラットフォーム技術に含められた。抗原結合配列 (C D R) を特定し、カスタム分析アルゴリズム (従来の K a b a t / I M G T と新規方法の組合せ) を使用して抗体可変ドメインから選択的ヒトフレームワーク配列 (重要な残基の相同性および位置に基づいて慎重に精選されたカスタムデータベース) にスプライシングして、堅牢な発現のための全長ヒト化 s c F v のパネルを作成した。

【 0 2 2 5 】

s c F v の完全なヒト化は、C A R を改変した治療細胞の持続性および生存力を確実にするヒト抗マウス反応性の可能性を減らすと同時に、臨床応用のために m A b の抗原結合ドメインを C A R に組み込むプロセスに不可欠なステップである。本発明の C A R ヒト化プラットフォームの効力は、発現の特徴付け、機能性の検証、および前臨床試験のための、少なくとも 5 つの高品質な全長ヒト化 C A R のパネルの新規作成によって示された。

10

【 0 2 2 6 】

モジュール I V は、ヒト化スコアリングを含む。C A R のヒト化プロセスの一環として、スコアリングメトリックを使用して、合成構築物を定量化し、客観的に評価した。T 2 0¹ スコアリングアルゴリズムを、図 1 0 B に収載される一連の市販のおよび F D A に承認されたモノクローナル抗体 (m A b) に適用してその有用性を試験した。予想通り、V_L および V_H (図 1 0 C) 配列は、ヒト化の程度が高くなるほど、より高いスコアを示す。興味深いことに、V_L 配列は、対の V_H 配列と比較して T 2 0 スコアが高くなる傾向がある。

20

【 0 2 2 7 】

相関分析として、F D A に承認された抗体治療薬に関する情報を評価し、パブリックドメインの処方情報から、報告された免疫原性のレベルを患者において観察した。図 1 0 E に要約されるように、ヒト化のレベルが高いほど、患者において報告された免疫毒性の事例の減少と相関する傾向がある。

【 0 2 2 8 】

ヒト化スコアリングの一例として、V_L および V_H 配列の T 2 0 スコアを、h C D 1 9 C A R と比較した m C D 1 9 C A R のヒト化プロセスの前後で評価した (図 1 0 F ~ G) 。実際に、より高い T 2 0 スコアが、両方の処理された断片 (ヒト化 V_L および V_H) に観察された。ワークフローは反復的であるため、C A R ヒト化プロセスを使用して、免疫原性が低く、持続性が高く、機能が堅牢な C A R を生成することができる。

30

【 0 2 2 9 】

本明細書において開示および特許請求される方法はすべて、本開示に照らして過度の実験を行うことなく作成および実行することができる。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態に関して記載されているが、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法および本明細書に記載される方法のステップまたはステップの順序に変化が加えられてもよいことは当業者に明らかであろう。より具体的には、同じまたは同様の結果を達成しながら、化学的にも生理学的にも関連する特定の薬剤を本明細書に記載される薬剤の代わりに使用してよいことは明らかであろう。当業者に明らか
なそのような類似の置換および改変はすべて、添付される特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲および概念内にあるとみなされる。

40

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載されたものを補足する例示的な手順またはその他の詳細を提供する限りにおいて、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

【化 6】

Altschul, S.F., *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402, 1997.

Arnold, K., *et al.*, *Bioinformatics*, 22, 195-201, 2006.

Benkert, P., *et al.*, *Bioinformatics*, 27, 343-350, 2011.

Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215), 2013.

Gao SH, *et al.*, *BMC Biotechnology*. 13:55, 2013.

Guex, N. *et al.*, *Electrophoresis*, 18, 2714-2723, 1997.

Marco Biasini *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 42 (W1): W252-W258, 2014.

Remmert, M., *et al.*, *Nat Methods*, 9, 173-175, 2012.

Sela-Culang *et al.*, *Frontiers in Immunology*, 4:302, 2013.

Shah *et al.*, *PLoS One*, 8:e776781, 2013.

Singh *et al.*, *Cancer Research*, 68:2961-2971, 2008.

Singh *et al.*, *Cancer Research*, 71:3516-3527, 2011.

米国特許第 7 , 1 0 9 , 3 0 4 号

10

【図 1 - 1】

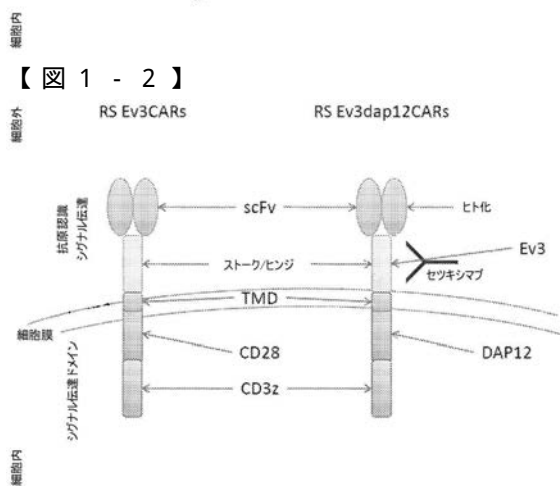
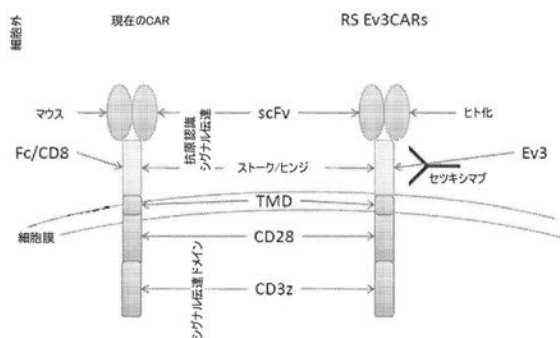


FIG. 1B

【図 2 - 1】

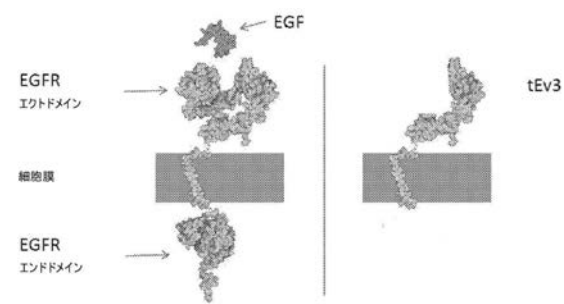


FIG. 2A

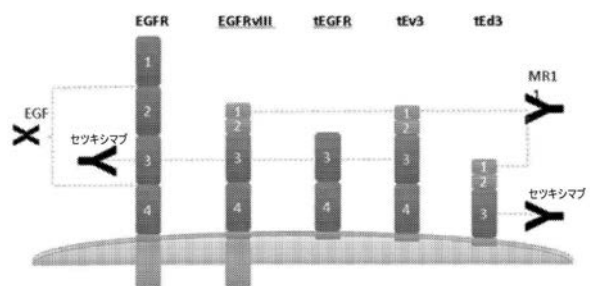


FIG. 2B

【 図 3 - 3 】

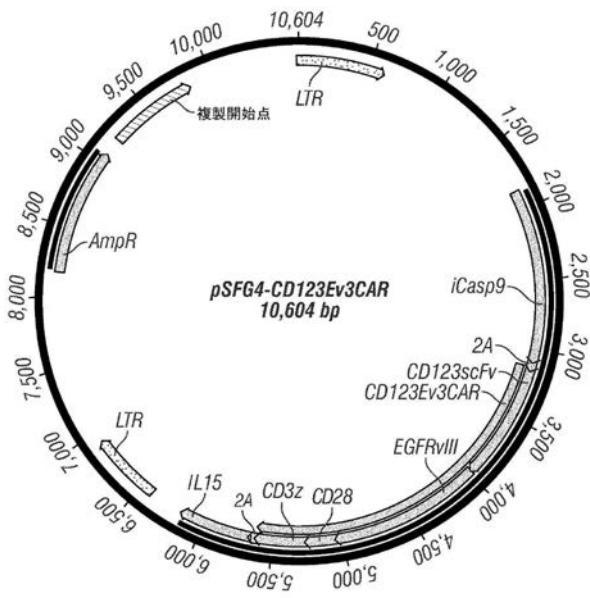


FIG. 3C

【 図 3 - 4 】

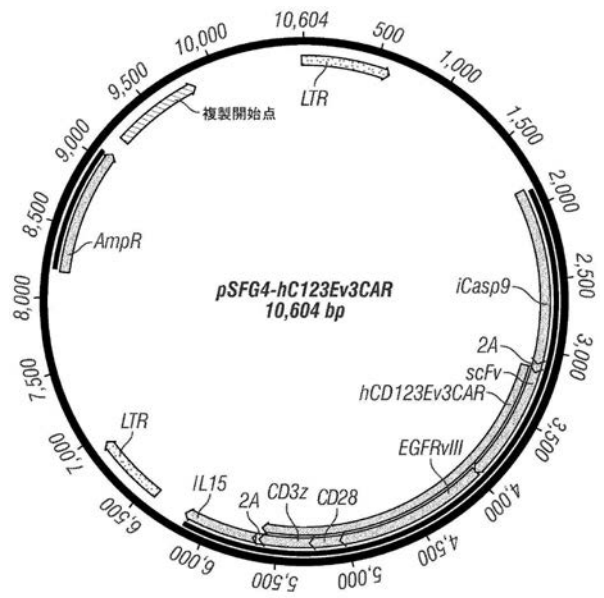


FIG. 3D

【 図 3 - 5 】

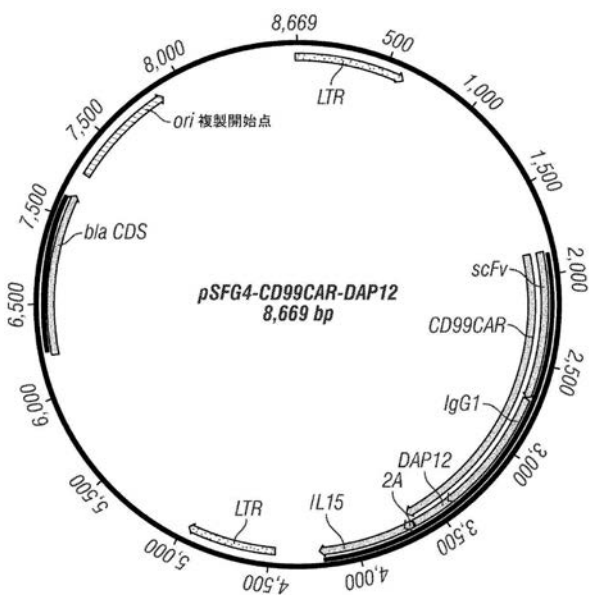


FIG. 3E

【 図 3 - 6 】

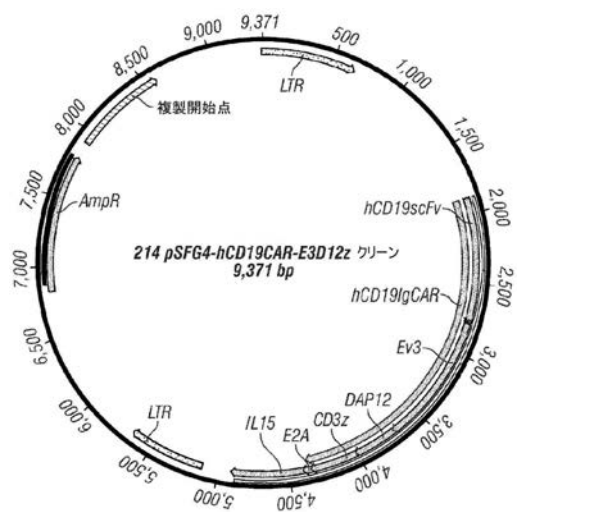


FIG. 3F

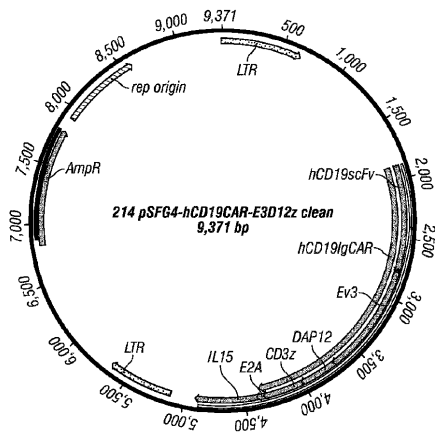


FIG. 3F

【図 4 - 1】

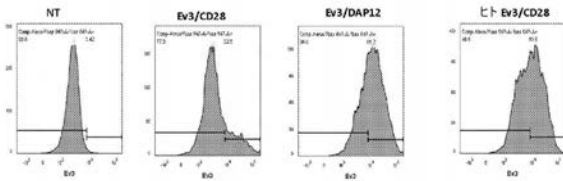


FIG. 4A

【図 4 - 2】

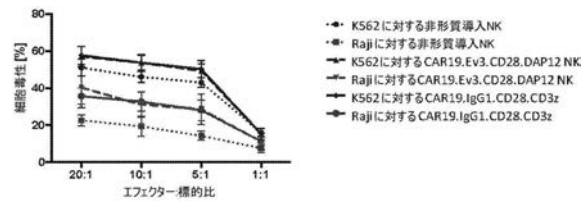


FIG. 4B

【図 5 - 1】

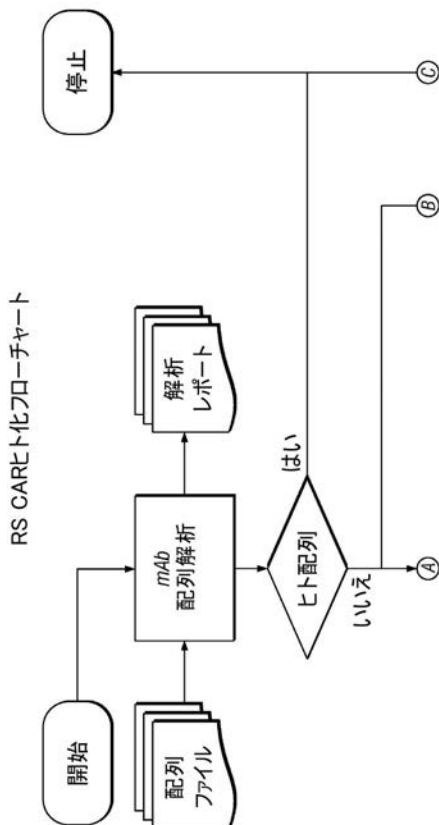
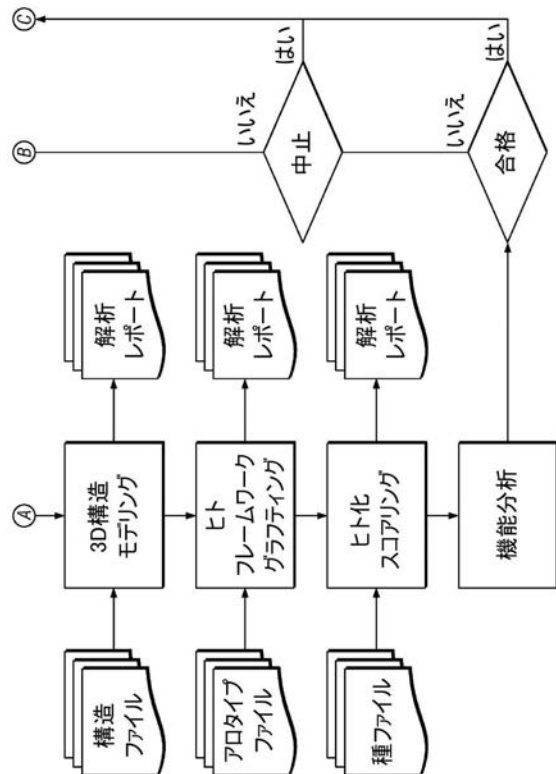
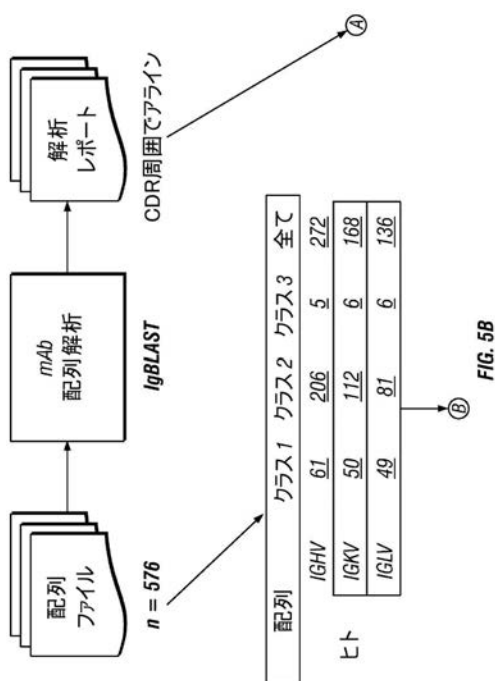


FIG. 5A

【図 5 - 2】

FIG. 5A
(続き)

【 図 5 - 3 】



【 図 5 - 5 】

[illegible]

【 図 5 - 4 】

[illegible]

【 図 5 - 6 】

c) コマンドプロンプト

```

ATGTCGCGCAGACCTCTGATCGCATAGACGGGATATACAGCTTTTAGGGATGAGAGCTGAC
ACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
ACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
> humJ1GLU169 (GLU2-8402, 291 bp)
TCCTGATGACGACGAGCAGGATGCTGCTGCGACGAGTCTCTGTGACGAGCTGAGTCAACGATC
CACGCGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CCTGATTCGCTTCTCTGGCTTCGAGGCTCTGGGACACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GAGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
> humJ1GLU162 (GLU2-8401, U1-2, 291 bp)
ATGATCTGCTGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CTGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CCTGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CAGGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
> humJ1GLU163 270 bp
CAGGATATATGAGCTCAACGCGGCTCAGTGCTCTGGGGGCGCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CTCTGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CTGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CCTGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CAGGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
> humJ1GLU164 390 bp
TTACAGGAGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTGAGGAGCTGCTATGAGGCTGACAGCGACCCCTC
ATGTTGAGGTTGACGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CTGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CTGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG

```

FIG. 5B
(続き)

【図 5 - 7】

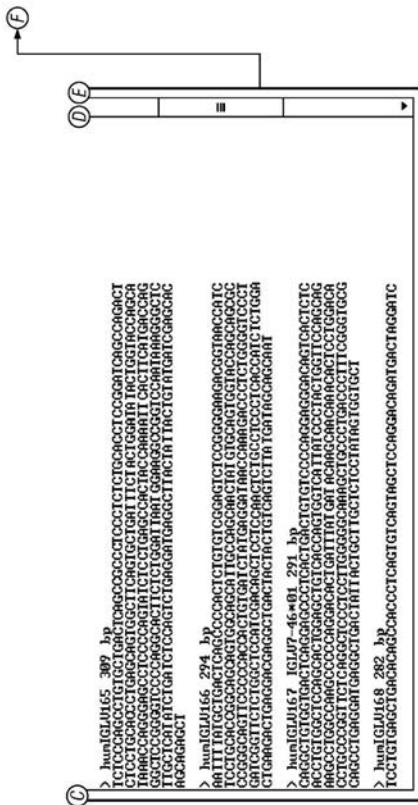


FIG. 7A

【図 6】

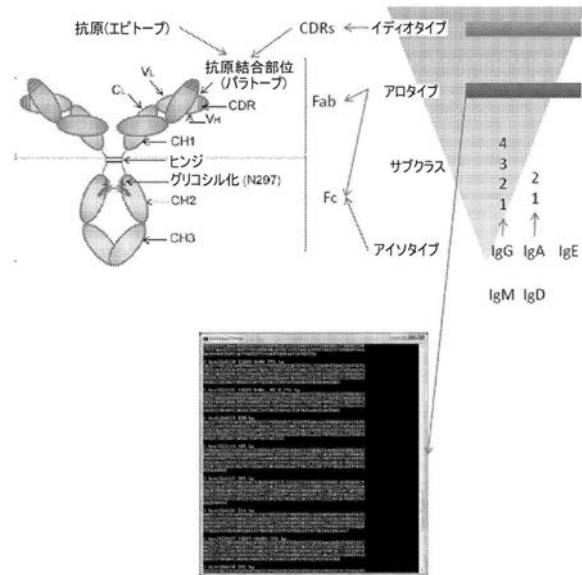


FIG. 6

【図 7 - 1】

hCD19 scFv	
V _L	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDIS KYLNWYQKP GRVPKLLIYH TSRLHSGVDP RFSGSGSGTD FLTISSLPQ EDWAIYYCQ GNTLPYIFGG GTRLEIKR
V _H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGVSLP DYGVSWVQA FKGLENLGV IWGSEITYYN SALKSKFIIS RDNANKSLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKHY YGGSYAMDYN GGGTIVTVSS
mCD19 scFv	
V _L	DIQMTQITSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS KYLNWYQKP DGTVKLLIYH TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISSLPQ EDIATVFCQ GNTLPYIFGG GTRLEIKR
V _H	EVQLQSGGPG LVAPSQSLSV TCTVSGVSLP DYGVSWIROP PRKGLENLGV IWGSEITYYN SALKSKFIIS RDNANKSLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKHY YGGSYAMDYN GGGTIVTVSS

【図 7 - 2】

hCD19 scFv	mCD19 scFv
<ul style="list-style-type: none"> DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITC 	<ul style="list-style-type: none"> DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISC
<ul style="list-style-type: none"> V_L Ig κ鎖 V領域 (MAR)-ヒト(断片) [PH0879] 	<ul style="list-style-type: none"> 免疫グロブリン軽鎖, [Mus musculus] [AAC52468]
<ul style="list-style-type: none"> EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS 	<ul style="list-style-type: none"> EVQLQSGGPG LVAPSQSLSV TCTVS
<ul style="list-style-type: none"> V_H 免疫グロブリン重鎖可変領域、部分 [Homo sapiens][ACD43442] 	<ul style="list-style-type: none"> 免疫グロブリン重鎖可変領域、部分 [Mus musculus] [AAS45200]

FIG. 7B

【 図 7 - 3 】

scFv アミノ酸	scFv ヌクレオチド
<div><div>• V_L 同一性 - 80%</div><div>• V_L 相同性 - 91%</div><div>• V_L アライメントスコア - 480</div></div>	<div><div>• V_L 同一性 - 70%</div><div>• V_L 相同性 - 70%</div><div>• V_L アライメントスコア - 773</div></div>
<div><div>• V_H 同一性 - 75%</div><div>• V_H 相同性 - 88%</div><div>• V_H アライメントスコア - 502</div></div>	<div><div>• V_H 同一性 - 68%</div><div>• V_H 相同性 - 68%</div><div>• V_H アライメントスコア - 741</div></div>

FIG. 7C

【 図 8 - 1 】



【 図 8 - 2 】

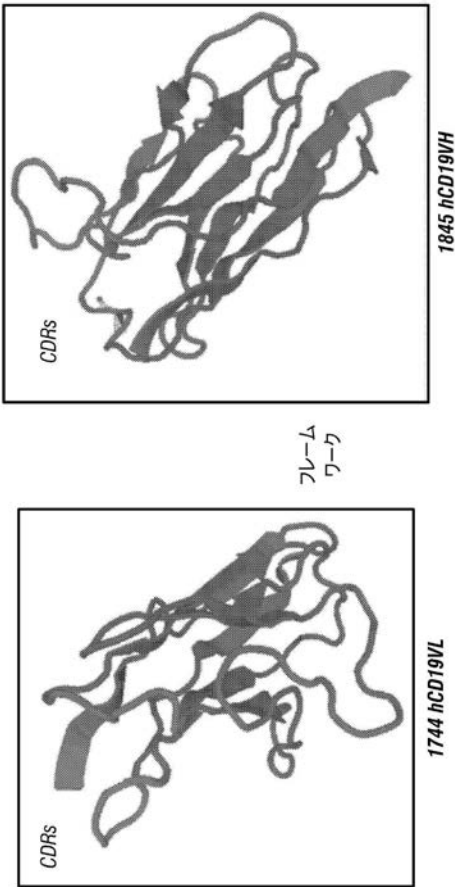


FIG. 8A
(続き)

【 図 8 - 3 】

テンプレート		配列類似性		選択したテンプレートのアライメント		詳細 ▼
◆ 名称	◆ タイトル	◆ カバレッジ	◆ 同一性	◆ 方法	◆ オリゴの状態	◆ リガンド
<input checked="" type="checkbox"/> 2fgw.1.A	H52 FAB (軽鎖)	<div></div>	91.67	X線, 3.0Å	ヘテロオリゴマー	なし
<input type="checkbox"/> 4edw.1.A	タネズマブFab軽鎖	<div></div>	88.89	X線, 2.5Å	ヘテロオリゴマー	なし
<input type="checkbox"/> 2fgw.1.A	H52 FAB (軽鎖)	<div></div>	91.59	X線, 3.0Å	ヘテロオリゴマー	なし
<input type="checkbox"/> 1fgw.1.A	H52 FV (軽鎖)	<div></div>	89.81	X線, 1.9Å	ヘテロオリゴマー	なし
<input type="checkbox"/> 1bj1.1.A	FAB断片	<div></div>	88.89	X線, 2.4Å	ヘテロオリゴマー	なし
<input type="checkbox"/> 1cz8.1.C	中和抗体の軽鎖	<div></div>	87.96	X線, 2.4Å	ヘテロオリゴマー	なし

FIG. 8B

【図 8 - 4】






テンプレート		配列類似性		選択したテンプレートのアライメント			詳細	
名称	タイトル	カバレッジ	同一性	方法	オリゴの状態	リガンド		
<input type="checkbox"/> 1cz8.1.E	中和抗体の軽鎖		87.96	X線, 2.4Å	ヘテロオリゴマー	なし		
<input type="checkbox"/> 3ncj.1.A	Fab15 Mut8軽鎖		89.81	X線, 1.6Å	ヘテロオリゴマー	4 x ZN ²⁺		
<input type="checkbox"/> 4edw.1.A	タネズマFab軽鎖		88.79	X線, 2.5Å	ヘテロオリゴマー	なし		
<input type="checkbox"/> 1bj1.1.A	FAB断片		88.79	X線, 2.4Å	ヘテロオリゴマー	なし		
<input type="checkbox"/> 3na9.1.A	Fab15軽鎖		88.89	X線, 1.7Å	ヘテロオリゴマー	7 x ZN ²⁺		

FIG. 8B
(続き)

【図 8 - 6】

ID	名称	配列同一性	配列類似性	Cov	分解能	方法	GMQE	検出手段
c06fd1666ca2220ea35ab93c1fc958d95033cab3	3ncj.1.A	89.720	0.569	0.991	1.600	X線	0.954	HHolits
ad6c18aab86dfe36a61ba2e4366029652321f06	5dlg.1.A	84.259	0.560	1.000	3.220	X線	0.974	BLAST
134492e94869c4c1fd1211598e652742aae21ac5	5it2.1.B	87.037	0.560	1.000	1.700	X線	0.973	BLAST
3a667af8cf03b012f5f0604711fc4990ad8f0d1	5119.1.A	87.037	0.559	1.000	2.800	X線	0.972	BLAST
b72cc746b30590cbe92a461cafe85bdc2588d1a	5115.1.A	87.037	0.559	1.000	2.600	X線	0.972	BLAST
905cc6876501a29eae10da40e4fda6c610e8c9	4hnt.1.A	86.111	0.559	1.000	2.100	X線	0.963	BLAST
54db60cc7461525f85f93725726295bb4862486	2wub.1.C	85.185	0.559	1.000	2.900	X線	0.967	BLAST
399430263b502e649291e2673e014e0f984593e	3k2u.1.D	85.185	0.559	1.000	2.350	X線	0.967	BLAST
e3dc7f687e865c0184b1f85d002be9f42f32c1	2wuc.1.D	85.185	0.559	1.000	2.700	X線	0.971	BLAST
12f2db1e2160c9dc50754a12c238bac9f988a9c	4n1e.1.A	86.111	0.558	1.000	2.230	X線	0.768	HHolits
b5d1dccc7c5ee7904c2cd2869e2de56872b07135b	4n1e.1.B	86.111	0.558	1.000	2.230	X線	0.887	HHolits

FIG. 8C
(続き)

【図 8 - 5】

思い出されたテンプレート		配列同一性		配列類似性		分解能		方法		GMQE		検出手段			
ID		名称		類似性		Cov		分解能		方法		GMQE		検出手段	
16ab2a54676539ba53545ae4631978d23d69f0f		2fgw.1.A		91.667		0.582		1.000		3.000		X線		0.982 BLAST	
91962cf6f666ff490e541d188d3364a35035627		4edw.1.A		88.889		0.575		1.000		2.480		X線		0.977 BLAST	
a3ebccc75776de851fdee4abc3415195d94f69a6		2fgw.1.A		91.589		0.582		0.991		3.000		X線		0.959 HHolits	
dlfac6a2f9cc24ddb5264a18f3f086df89d329		1fgv.1.A		89.815		0.573		1.000		1.900		X線		0.916 HHolits	
f537a248f491064f4d38449441e7a0a25b3f53e6		1bj1.1.A		88.889		0.572		1.000		2.400		X線		0.977 BLAST	
51836260c466fca1a7d8f93628ed57ead694d44		1cz8.1.C		87.963		0.570		1.000		2.400		X線		0.980 BLAST	
a5214da2aef2b06f4e6382b31e8d11ebfcd037a9		1cz8.1.E		87.963		0.570		1.000		2.400		X線		0.980 BLAST	
0f0883c8a905c2c3db1cac3d80d327d57955a78		3ncj.1.A		89.815		0.569		1.000		1.600		X線		0.983 BLAST	
01aa021a39308f06b2649a645ef740f49a9c21		4edw.1.A		88.785		0.575		0.991		2.480		X線		0.946 HHolits	
16a6f5f3b541f1daa39194e5ff3b18d7ad45a		1bj1.1.A		88.785		0.572		0.991		2.400		X線		0.945 HHolits	
6fe2a7e52fa5012ef38fd0257c3fdd1772b56264		3na9.1.A		88.889		0.564		1.000		1.700		X線		0.980 BLAST	
4eb750c9fe5c850a3e92ec8f95ecd79687e0f39		3ulu.1.B		88.889		0.564		1.000		3.520		X線		0.980 BLAST	
12893efb7685cfaza3929c298d073d36c92959ec		3ulv.1.B		88.889		0.564		1.000		3.522		X線		0.980 BLAST	
0dc02afbccdb59e9fd067834f46c34edf96359a35		5veb.1.B		87.963		0.563		1.000		2.340		X線		0.977 BLAST	
8e7e4d61ab12f05442ec2520a2c16c2a569283a		1cz8.1.C		87.850		0.570		0.991		2.400		X線		0.940 HHolits	
c953ed986eb59ef472c66e925517b17e4cc04		1cz8.1.E		87.850		0.570		0.991		2.400		X線		0.940 HHolits	
a770346bad28b91e373050c1b9a681acd731a88f		2kqm.1.A		85.185		0.562		1.000		NA		NMR		0.885 HHolits	
ef9d37498230eb346e8e34f965966f1195c7a767		2kqm.1.B		85.185		0.562		1.000		NA		NMR		0.885 HHolits	

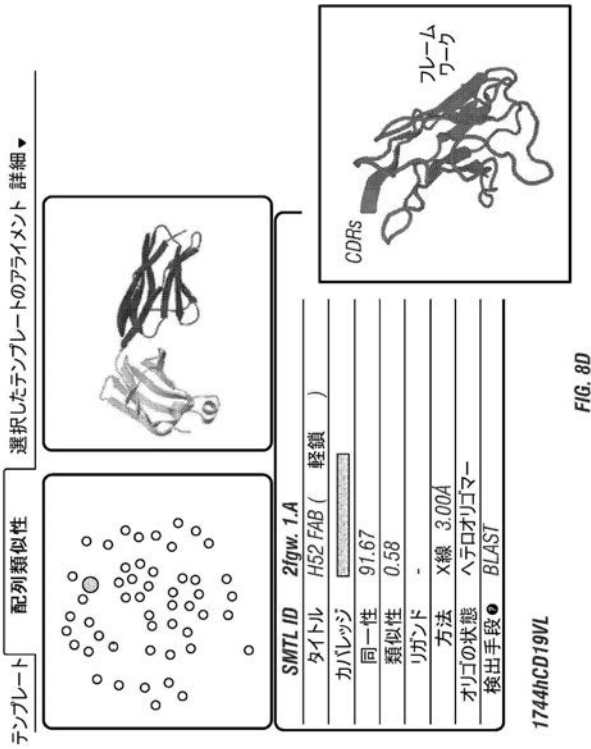
FIG. 8C
(続き)

【図 8 - 7】

テンプレート	配列類似性	選択したテンプレートのアライメント	詳細
✱ 標的 2fgw.1.A DIOMTQSSLSASVGRVLTTCRASQDISKYLNYOQKGVKPKLLIYHTSRLHSGVDPDRFSGSGGTDTFTLT	75		
標的 2fgw.1.A SSIQPEDVATYYCOQNTLPYTFGQGTKEIKR	108		
2fgw.1.A SSIQPEDVATYYCOQNTLPYTFGQGTKEIKR	108		

FIG. 8C
(続き)

【図 8 - 8】



【図 9 - 1】

テンプレート						
配列類似性 選択したテンプレートのアライメント 詳細 ▼						
◆ 名称	◆ タイトル	◆ カバレッジ	◆ 同一性	◆ 方法	◆ オリゴの状態	◆ リガンド
<input type="checkbox"/> 4uv7.1.B	GC11184		73.33	X線, 2.1Å	ヘテロ オリゴマー	2 x MAG-AG ^o , 1 x MAG ^o
<input type="checkbox"/> 4hs8.1.B	抗体hu5B3.V2 Fab重鎖		74.17	X線, 2.6Å	ヘテロ オリゴマー	なし
<input type="checkbox"/> 4jfx.1.B	Fab重鎖		75.63	X線, 1.8Å	ヘテロ オリゴマー	1 x PPI ^o
<input type="checkbox"/> 3g6j.1.D	Fab重鎖		74.17	X線, 3.1Å	ヘテロ オリゴマー	1 x CA ^o
<input type="checkbox"/> 4jfx.1.B	Fab重鎖		73.95	X線, 2.0Å	ヘテロ オリゴマー	なし
<input type="checkbox"/> 4jfx.2.B	Fab重鎖		73.95	X線, 2.0Å	ヘテロ オリゴマー	なし
<input type="checkbox"/> 4lmq.2.A	免疫グロブリンG1 重鎖		76.67	X線, 2.8Å	ヘテロ オリゴマー	なし

FIG. 9A

【図 9 - 2】







テンプレート		配列類似性					選択したテンプレートのアライメント 詳細 ▼	
名称	タイトル	カバレッジ	同一性	方法	オリゴの状態	リガンド		
□ 4lmq.1.B	免疫グロブリンG1 重鎖		76.67	X線, 2.8Å	ヘテロ オリゴマー	なし		
□ 5fuo.1.B	FAB 重鎖		72.50	X線, 3.6Å	ヘテロ オリゴマー	なし		
□ 5fuz.1.A	645 FAB, 重鎖		72.50	X線, 2.7Å	ヘテロ オリゴマー	なし		
□ 1dfb.1.B	IGG1-KAPPA 306 FAB (重鎖)		72.50	X線, 2.7Å	ヘテロ オリゴマー	なし		
□ 1w72.2.C	HYB3 重鎖		77.78	X線, 2.1Å	ヘテロ オリゴマー	1 x GLU-ALA-ASP-PRO-THR- GLY-HIS-SER-TYR ^o		
□ 1w72.1.C	HYB3 重鎖		77.78	X線, 2.1Å	ヘテロ オリゴマー	1 x GLU-ALA-ASP-PRO-THR- GLY-HIS-SER-TYR ^o		

FIG. 9A
(続き)

【図 9 - 3】

ID	名称	配列類似性	配列類似性 Cov	分岐能	方法	GMQE	検出手段
21101ec705d0d41451b058ac59ff02528b091e18a5	4u7.1.B	73.333	0.531	1.000	2.100 X線	0.909	BLAST
45f63856aaf6a0b3a9d224af51a2accf0f5071	4hs8.1.B	74.167	0.529	1.000	2.680 X線	0.885	BLAST
03329674435aac544f4ced5f398115e07f007dd	4jfx.1.B	75.630	0.532	0.992	1.750 X線	0.872	BLAST
20291db99c52a49b9c20c96a0392a6a873f761ae	3g6j.1.D	74.167	0.525	1.000	3.100 X線	0.874	BLAST
49d4e2b0048335bbae43c66a8f6dbb34da268942	4jfx.1.B	73.950	0.531	0.992	1.950 X線	0.879	BLAST
39120a1ab0d0a1dd427f57e5ecd995bcb2ba6d558	4jfx.2.B	73.950	0.531	0.992	1.950 X線	0.879	BLAST
2f2f3012446a5178eb0b1fee9684239011cc1d	4lmq.1.B	76.667	0.524	1.000	2.773 X線	0.891	BLAST
a82368e848fce9786bb3af117a9acc8021b45035	4lmq.2.A	76.667	0.524	1.000	2.773 X線	0.891	BLAST
a52a1879dbd4f56cfde405605006d190d440fea6	5fuo.1.B	72.500	0.523	1.000	3.600 X線	0.897	BLAST
51ffa985d658ff36864c1cf539ae51aace391922	5fuz.1.A	72.500	0.523	1.000	2.680 X線	0.897	BLAST
c5270bf7ad127585242f4b505059eb7b05b509043	1dfb.1.B	72.500	0.523	1.000	2.700 X線	0.847	BLAST
70cd14877987fec3b0b1c3dd05c8760a87d02531b	1w72.1.C	77.778	0.542	0.975	2.150 X線	0.908	BLAST
43b90d3d371865671f955692083780a98ad90eb	1w72.2.C	77.778	0.542	0.975	2.150 X線	0.908	BLAST
795834131fff395c5c440b259404b135d8694eb	4k7p.1.B	73.333	0.534	1.000	2.950 X線	0.881	BLAST
003ef6c39ec26490624d65c11be86921d3cc3588	4qci.1.B	75.424	0.534	0.983	3.353 X線	0.865	BLAST
7264514b518e4f6db8d0c20cf912fa0848b480	4iof.1.C	75.424	0.533	0.983	3.353 X線	0.822	BLAST
d7635c25c1371e7fcd417f0dc67241274fb164	4iof.1.B	75.424	0.533	0.983	3.353 X線	0.822	BLAST

FIG. 9B

【図 9 - 4】

見いだされたテンプレート					
テンプレート	配列類似性	選択したテンプレートのアライメント	詳細	配列類似性	検出手段
ID	名称	配列同一性	Cov	分解能	方法
22691bb26c13370f94f3da002dec8503a3462aa	4mlc.1.B	75.424	0.533	3.501 X線	0.749 BLAST
2747a43a7e9de83ea8cc0b04041608c331610bee	4mlc.2.B	75.424	0.533	3.501 X線	0.800 BLAST
0be5be0780d160c80515d210b80f90b9a2c052da	4q5z.1.B	75.424	0.533	3.930 X線	0.822 BLAST
90b9a1b402478f8e3b6b007236e66d84370596c9	4j90.1.B	74.790	0.527	1.810 X線	0.874 BLAST
a5c366d43831e3404129b8857853950f1aceb065	4jg1.1.B	74.790	0.527	1.550 X線	0.861 BLAST
b49139c7fabcf8a6dc51dc7b0f90cf6228c056c886	4mnp.1.B	73.950	0.526	2.690 X線	0.839 BLAST
6782e472f605d22e20993c8e8d570d5e8e5e6e6e3	5csz.1.A	73.333	0.519	1.800 X線	0.807 BLAST
09293b931a2f68034b3873bdc66c3d9b715b91a6	3grw.1.C	72.500	0.525	2.100 X線	0.883 BLAST
f4c7d463469b16e04f2b47a07d3d8b316258223	4lvh.2.A	70.588	0.525	2.800 X線	0.831 BLAST
2d45fe1b130233f0d36f5254b5c073d3060232a8	4lvh.2.C	70.588	0.525	2.800 X線	0.831 BLAST
fcde5dad1e5a70b6bec51de5a4979439982ad332	4lvh.3.A	70.588	0.525	2.800 X線	0.831 BLAST
8e18b0ce85cf288b0bc1c962e9546d816ceb75db	4lvh.3.C	70.588	0.525	2.800 X線	0.831 BLAST
a95f3b534e5f994314fd1655e4e2b0a20f968f2	3kdm.1.B	79.310	0.545	1.500 X線	0.897 BLAST
552b7cbaa5ef5940b829ceb87498f5ca49ff9343	3kdm.2.B	79.310	0.545	1.500 X線	0.897 BLAST

FIG. 9B
(続き)

【図 9 - 6】

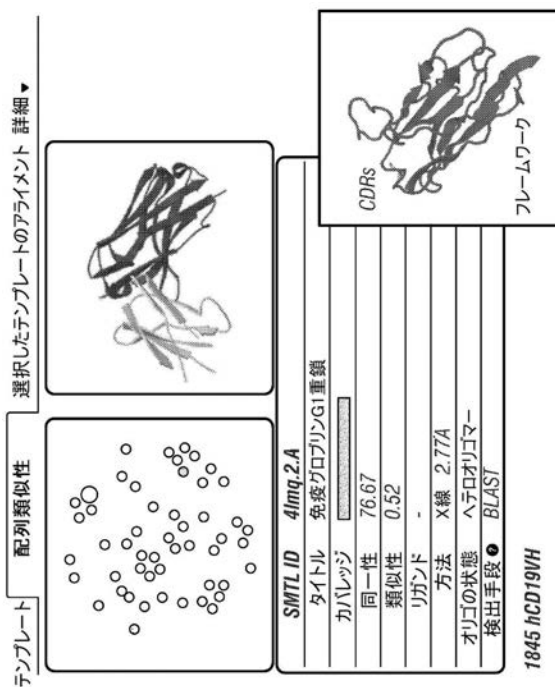


FIG. 9C

【図 9 - 5】



FIG. 9B
(続き)

【図 10 - 1】

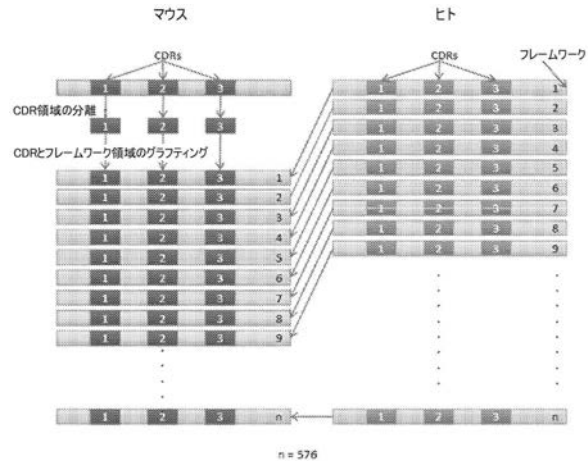


FIG. 10A

【図 10 - 2】

種類	一般名	FDA	商品名	V_H	V_L
マウス	ムロモナブCD3	1992	オルソロンOKT3®	69.87	61.15
マウス	イブリツモマブ・ティウキセタン	2002	ゼヴァリン®	66.07	64.58
キメラ	アブシキマブ	1993	レオプロ®	64.62	66.97
キメラ	リツキシマブ	1997	マブセラ®/リツキシサン®	68.26	66.51
キメラ	バシリキシマブ	1998	シムレクト®	65.26	66.54
キメラ	セツキシマブ	2004	アービタックス®	57.98	65.82
キメラ	シルツキシマブ	2014	シルバント®	74.83	68.67
ヒト化	バリスマブ	1998	シナジス®	80.76	
ヒト化	トラスツズマブ	1998	ハーセプチン®	86.26	93.04
ヒト化	アレムツズマブ	2001	キャンパス®	72.31	85.45
ヒト化	オマリズマブ	2003	ゾレア®	76.36	87.32
ヒト化	ベバシズマブ	2004	AVASATIN®	73.66	89.18
ヒト化	ラニズマブ	2006	ルセンテイス®	72.56	88.54
ヒト化	セルトリスマブ・ベゴル	2008	シムジア®	78.64	89.09
ヒト化	ベルツズマブ	2012	PURJETA®	76.47	90.05
ヒト化	ベムプロリスマブ	2014	キイトルーダ®	75.71	82.28

FIG. 10B

【図 10 - 3】

種類	一般名	FDA	商品名	V_H	V_L
ヒト化	ベトリスマブ	2014	エンタイビオ™	79.88	84.91
ヒト化	エロツズマブ	2015	エムプリシテイ™	78.95	85.05
ヒト化	イダルシズマブ	2015	PRAXBIND®	77.34	85.96
ヒト	アダリムマブ	2002	ヒュミラ®	87.85	91.32
ヒト	カナキヌマブ	2009	イラリス®	90.51	30.72
ヒト	オファヅムマブ	2009	アーゼラ®	92.54	96.73
ヒト	デノスマブ	2010	XGEVA®/プロリア®	90.98	94.41
ヒト	イビリムマブ	2011	ヤーボイ®	90.47	96.62
ヒト	ニボルマブ	2014	オプジーボ®	90.18	96.64
ヒト	ラムシムマブ	2014	サイラムザ®	90.78	82.14
ヒト	ネシツムマブ	2015	ポートラーザ™	90.79	92.59
ヒト	セクキヌマブ	2015	コセンテイクス®	84.09	97.25

FIG. 10B
(続き)

【図 10 - 4】

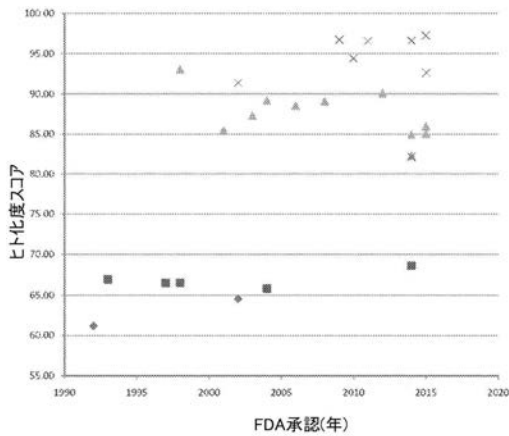


FIG. 10C

【図 10 - 5】

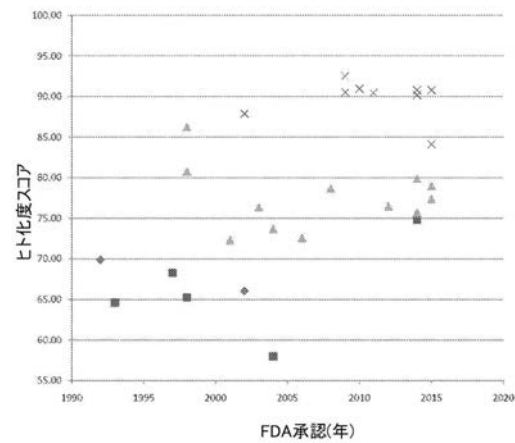


FIG. 10D

【図 10 - 6】

ヒト化スコアリング

抗体名	社名	種類	報告された免疫原性*
Muromonab(OKT3)	オルリバイオテック	マウス	25% (24)
アルシツモマブ(CEAスキャン)	イムノメディクス	マウス	<1% (3/400)
ファリソマブ(Neutrospec)	Palatin Tech.	マウス	0-16.6% (30-54)
イムシロマブ(Myoscint)	セントコア(ジョンソン&ジョンソン)	マウス	<1% (914)
カプロマブ(Prostascint)	サイトジェン	マウス	8%-19% (27-239)
ノフェツモマブ(Verluma)	ペーリンガー・インゲルハイム	マウス	6% (53)
イブリツモマブ(ゼヴァリン)	アイデック・ファーマ(バイオジェン・アイデック)	マウス	1.3% (446)
トシツモマブ(ベキサル)	GSK	マウス	11% (230)
リツキシマブ(リツキサン)	ジェネンテック(ロシュ)/バイオジェン/アイデック	キメラ	11% (2578)
バシリキシマブ(シムレクト)	ノバルティス	キメラ	1-2% (138-339)
インマリキシマブ(レミケード)	セントコア(ジョンソン&ジョンソン)	キメラ	10-15%
セツキシマブ(エルビタックス)	イムクロン(バイーライリリー)	キメラ	5% (1001)
ダクリズマブ(ゼナバックス)	ホフマン・ラ・ロシュ	ヒト化	14-34%
トラスツマブ(ハーセプチン)	ジェネンテック(ロシュ)	ヒト化	<1%
バリビズマブ(シナジス)	メディムン(アストラゼネカ)	ヒト化	0.7%-2% (1002-639)
ガムツマブ(マイロターグ)	ワイス・ファーマ(ファイザー)	ヒト化	0% (277)
アレムツマブ(キャンパス)	Ilex Pharma(ジェンザイム)	ヒト化	1.9-8.3% (133-211)
オマリズマブ(ゾレラ)	ジェネンテック(ロシュ)	ヒト化	<0.1% (1723)
エフェリズマブ(ラプティバ)	ジェネンテック(ロシュ)	ヒト化	6.3% (1063)
ペバシズマブ(アスチン)	ジェネンテック(ロシュ)	ヒト化	0% (~500)
ラニビズマブ(ルセンティス)	ジェネンテック(ロシュ)	ヒト化	1-6%
エクリズマブ(バリス)	アレクシオン・ファーマ	ヒト化	2% (196)
ナタリズマブ(タイサブリ)	バイオジェン・アイデック	ヒト化	9% (627)
セトリズマブ(ベゴルシムジア)	UCB	ヒト化	8% (1509)
トシリズマブ(アクトテム)	ジェネンテック(ロシュ)	ヒト化	2% (2876)
カナキヌマブ(イラリス)	ノバルティス	ヒト	0% (64)
アダリムマブ(アムリ)	アボット	ヒト	2.6%-26%
パニツマブ(ベクティベックス)	アムジェン	ヒト	4.6% (613)
ゴリムマブ(シンボニ)	セントコア(ジョンソン&ジョンソン)	ヒト	4% (1425)
オファツマブ(アルゼラ)	GSK	ヒト	0% (79)
ウスデキヌマブ(ステララ)	セントコア(ジョンソン&ジョンソン)	ヒト	3-5% (743-1198)
デノスマブ(プロリア)	アムジェン	ヒト	<1% (8113)
アプシキシマブ(レオプロ)	セントコア(ジョンソン&ジョンソン)	キメラFab	6%-44% (36)

FIG. 10E

【図 10 - 7】

mCD19CAR
配列可変領域:
DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSLRHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKTKLEKR
鎖: VL
領域: フレームワーク + CDR
T20スコア: 74.07

hCD19CAR (RS)
配列可変領域:
DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKVPKLLIYHTSLRHSGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGNTLPYTFGGGKTKVEIKR
鎖: VL
領域: フレームワーク + CDR
T20スコア: 87.13

FIG. 10F

mCD19CAR
配列可変領域:
EVQLQQSGPGLVAPSSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSSETTY
YNSALKSRITIKDNSKSQLKMNLSLQTDITAIYCAKHYGGSYAMDYWGQG
TTVTSS
鎖: VH
領域: フレームワーク + CDR
T20スコア: 64.67

hCD19CAR (RS)
配列可変領域:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSLPDYGVSWIRQAPGKLEWIGVIWGSSETTY
YNSALKSRITIKDNSKSQLKMNLSLQTDITAIYCAKHYGGSYAMDYWGQG
GTLTVSS
鎖: VH
領域: フレームワーク + CDR
T20スコア: 74.46

FIG. 10G

【図 11 - 1】



FIG. 11A

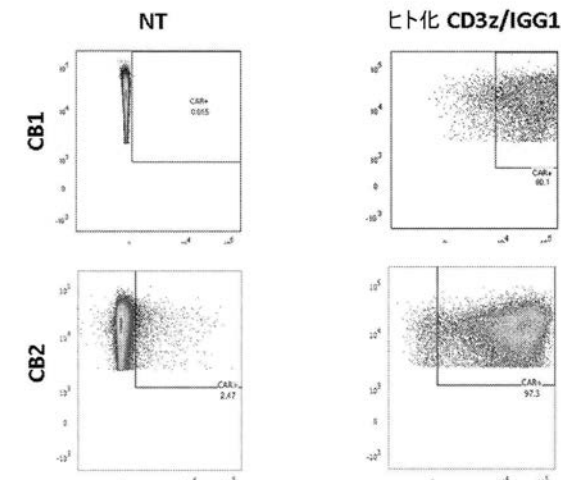


FIG. 11B

【図 11 - 2】

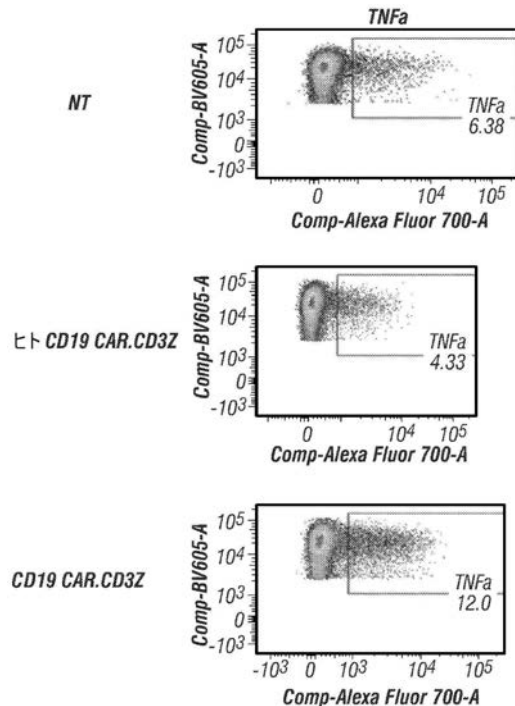
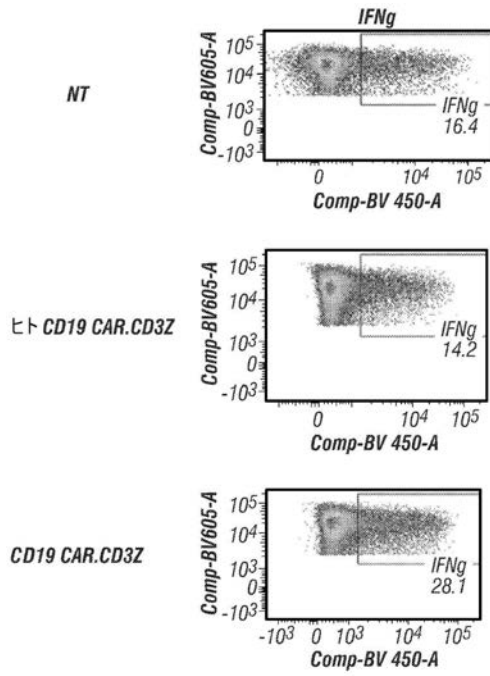
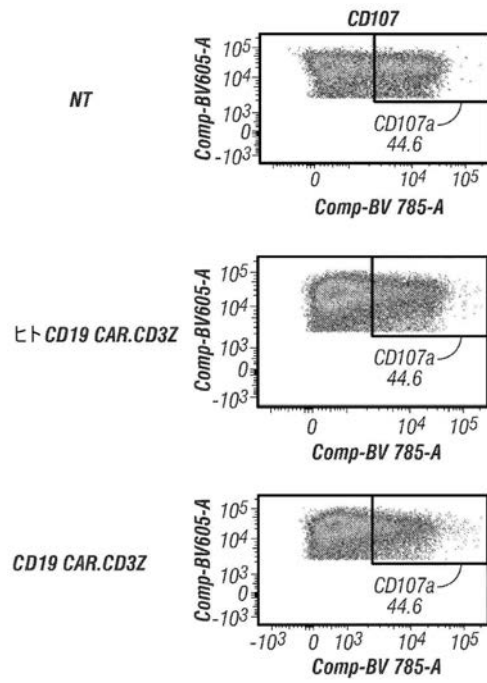


FIG. 11C

【 図 1 1 - 3 】

FIG. 11C
(続き)

【 図 1 1 - 4 】

FIG. 11C
(続き)

【 図 1 1 - 5 】

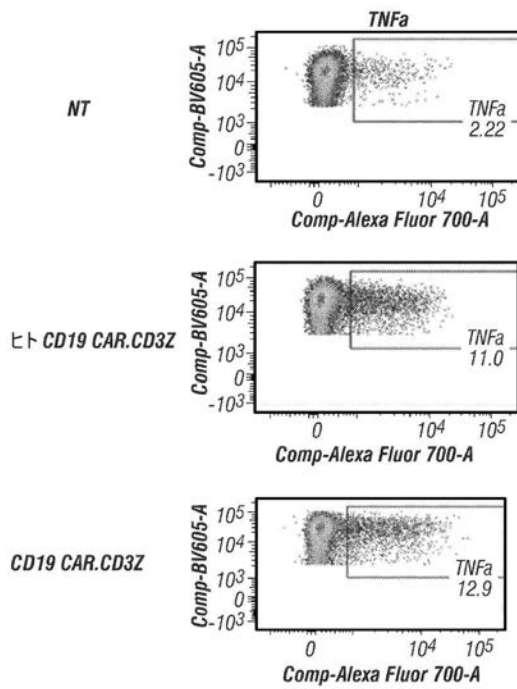
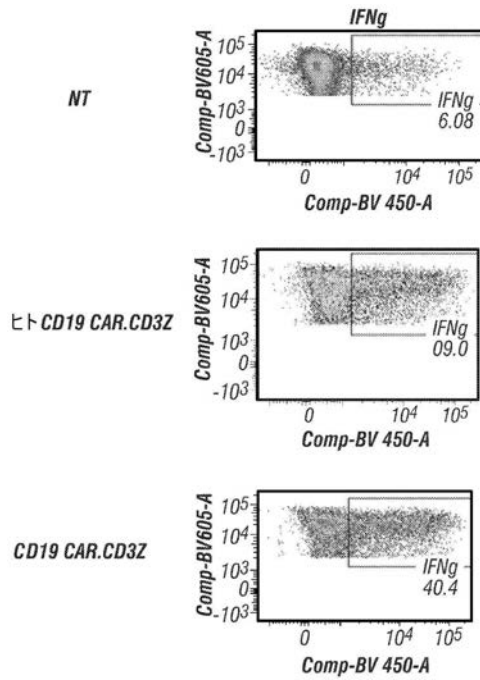
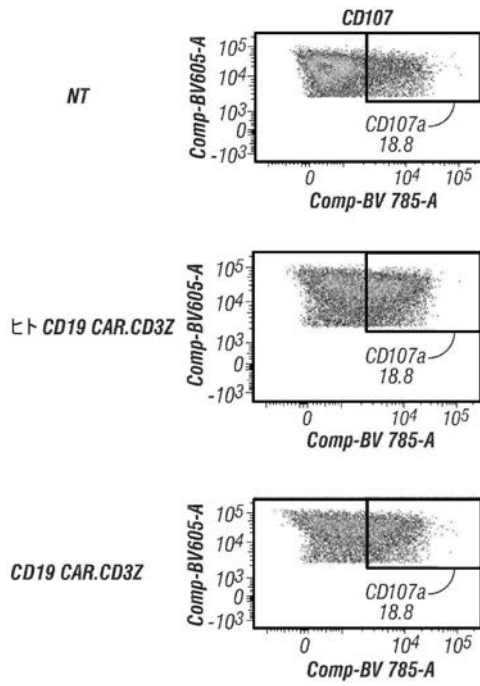


FIG. 11D

【 図 1 1 - 6 】

FIG. 11D
(続き)

【図 1 1 - 7】

FIG. 11D
(続き)

【図 1 1 - 8】

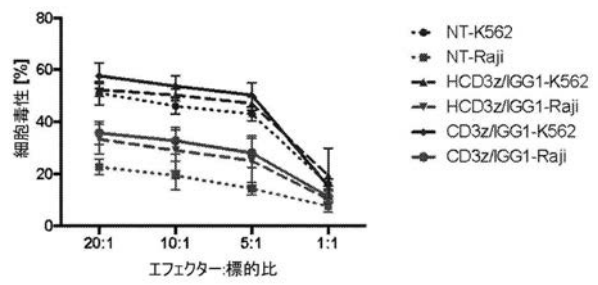


FIG. 11E

【図 1 2 - 1】

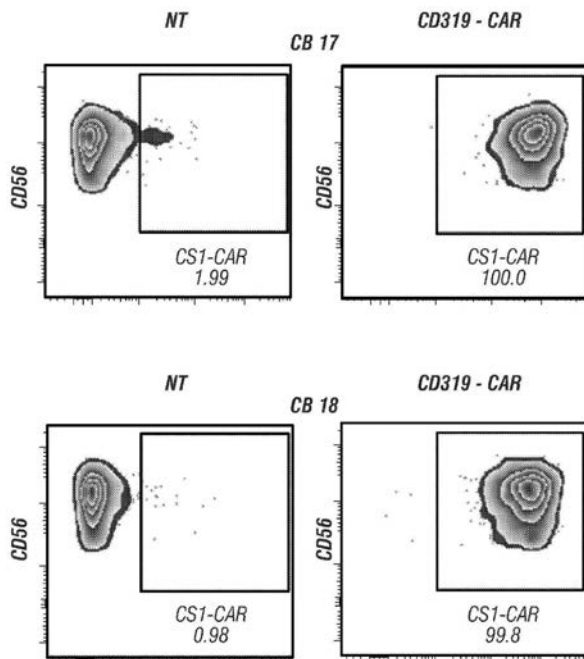


FIG. 12A

【図 1 2 - 2】

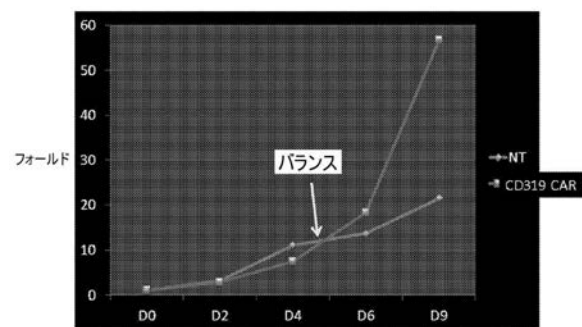


FIG. 12B

【図 12 - 3】

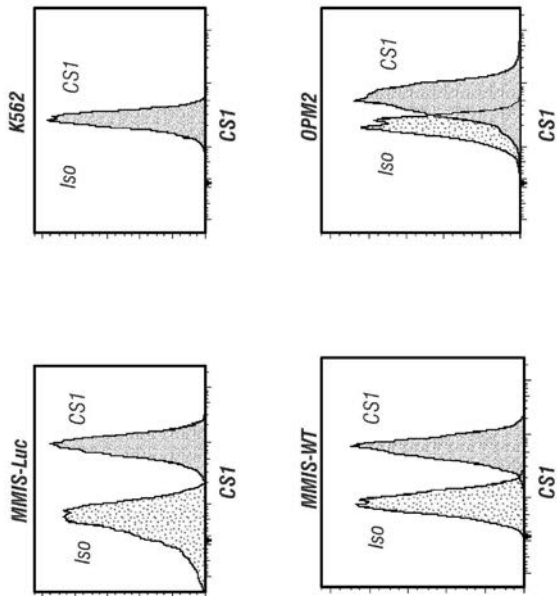


FIG. 12C

【図 12 - 4】

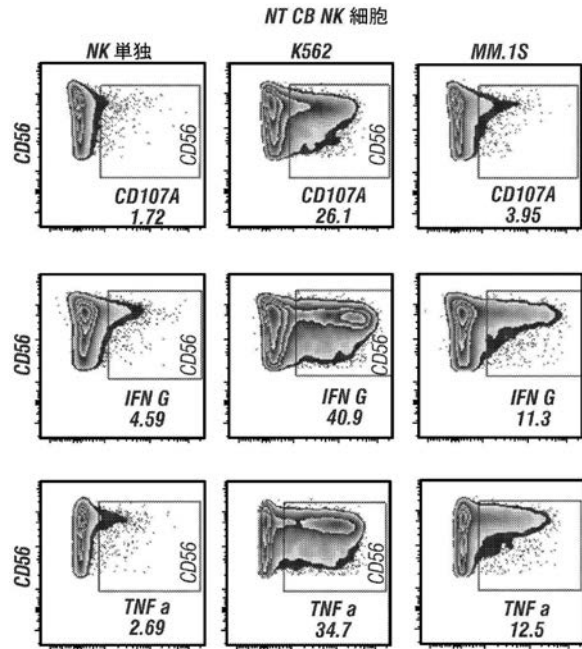
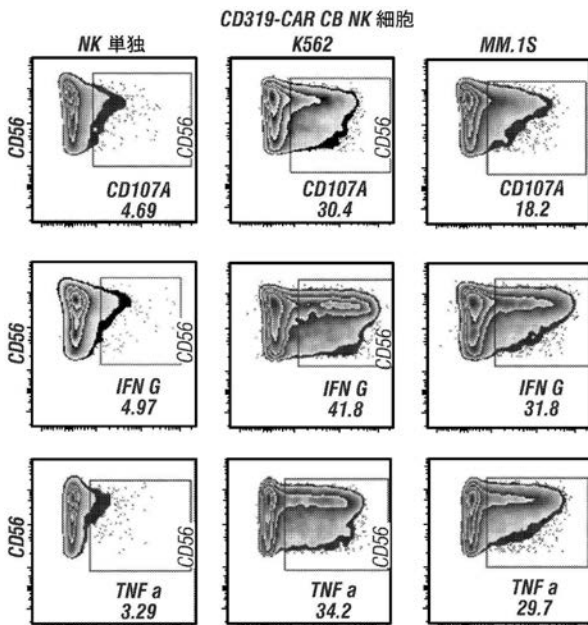


FIG. 12D

【図 12 - 5】

FIG. 12D
(続き)

【図 12 - 6】

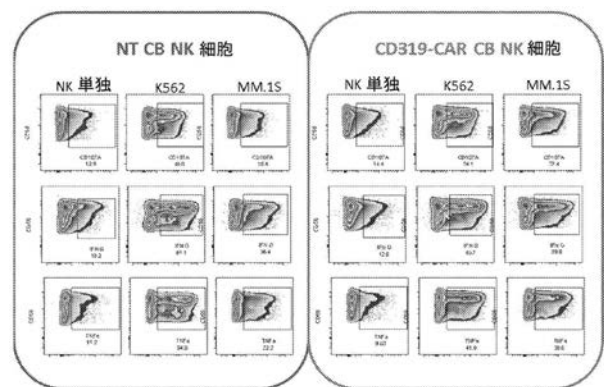


FIG. 12E

【図 12 - 7】

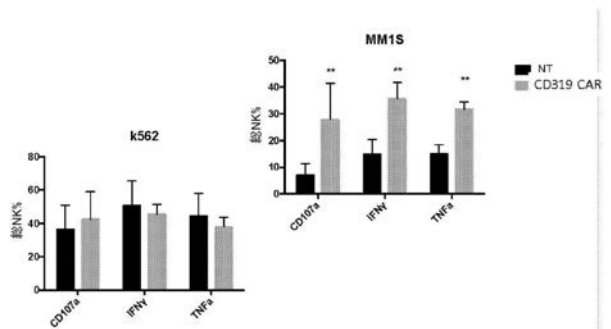


FIG. 12F

【 図 1 2 - 8 】

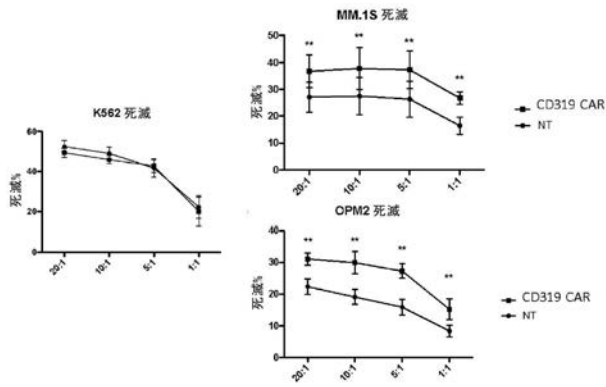


FIG. 12G

【 図 1 2 - 9 】

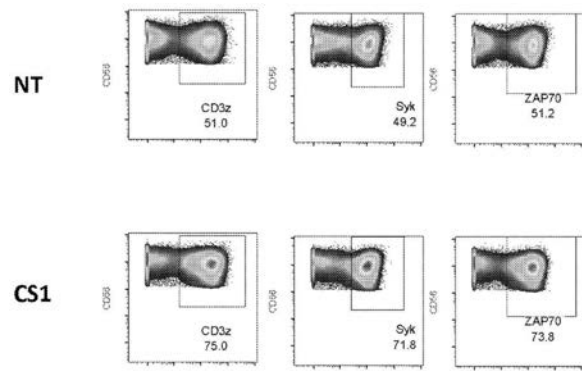


FIG. 12H

【 図 1 2 - 1 0 】

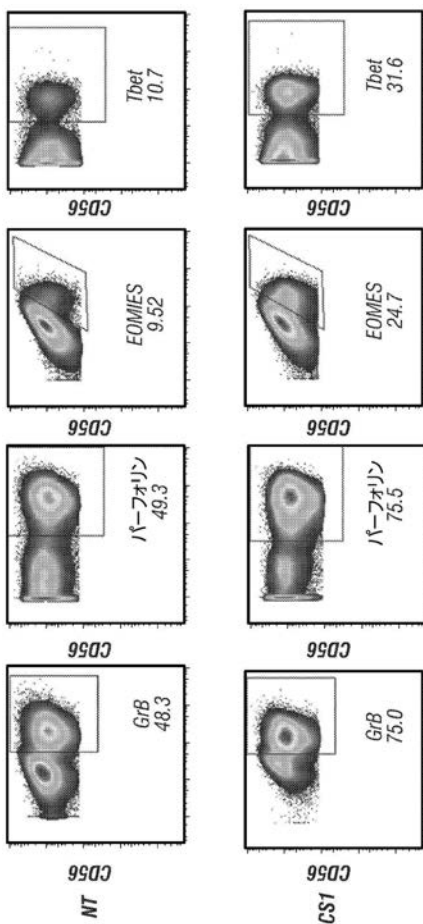


FIG. 12I

【配列表】

2020530989000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US18/43779
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 35/17; C07K 14/705, 14/71, 16/28; C12N 5/078, 15/85 (2018.01) CPC - A61K 35/17, 48/0008; C07K 14/705, 14/7051, 14/71, 16/28, 16/2863; C12N 5/0636, 15/85		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/096329 A1 (JUNO THERAPEUTICS INC) 8 June 2017; paragraphs [0055], [0099], [0113], [0119]	1-20, 24, 25
A	US 2017/0152480 A1 (CITY OF HOPE) 1 June 2017; paragraphs [0048], [0049]	1-20, 24, 25
A	US 2017/0008963 A1 (BROGDON, J et al.) 12 January 2017; paragraphs [0065], [0135], [0195]	1-20, 24, 25
A	US 2016/0145337 A1 (COLLECTIS) 26 May 2016; entire document	13-18
A	(JOHNSON, LA et al.) Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma. <i>Science Translational Medicine</i> , 18 February 2015. Vol. 7, No. 275; entire document; DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa4963	13-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search 4 December 2018 (04.12.2018)		Date of mailing of the international search report 26 DEC 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/43779

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

PCT/US2018/043779 26.12.2018**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US18/43779

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 45-46, 48, 62-82
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

.***-Please see supplemental page-***.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
Claims 1-20, 24, and 25; F(ab')₂ or ScFv (antigen-binding domain); CD19 ScFv (antigen-binding domain target); CD3zeta (signaling domain)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/43779

---Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-44, 47, 49-61, F(ab')₂ (antigen-binding domain); CD3zeta (signaling domain) are directed toward a chimeric antigen receptor. (Optionally, binding domains therefor; nucleic acids encoding the binding domains, vectors comprising the nucleic acids, and host cells engineered to express a CAR comprising the binding domain may also be included in the inventions, based upon available elections.)

The chimeric antigen receptor will be searched to the extent it encompasses a binding domain encompassing an F(ab')₂ (first exemplary binding domain), and a signaling domain encompassing CD3zeta (first exemplary signaling domain). Applicant is invited to elect additional binding domain(s), with, where applicable, corresponding target(s) bound thereby, and corresponding VL and VH sequence(s), framework sequence(s), and/or encoding nucleic acid sequence(s) associated therewith, with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO., such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and/or signaling domain(s) to be searched. Additional binding domain(s) and/or signaling domain(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-12, 13 (in-part), 20 (in-part), 24 and 25 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass F(ab')₂ (antigen-binding domain); CD3zeta (signaling domain). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected binding domain(s), and, where applicable, sequence(s) associated therewith, and/or signaling domain(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a binding domain encompassing a Fab' (binding domain). (It should be noted that SEQ ID NOs 1 and 2 for the nucleic and amino acid sequences of the EV3 hinge region will be searched as a part of the first embodiment of Groups I+.)

No technical features are shared between the binding domains and sequences thereof, and/or signaling domains of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/86	(2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 6
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	A	4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K	35/28		4 C 0 9 1
A 6 1 K	35/545	(2015.01)	A 6 1 K	35/545		4 C 2 0 6
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		4 H 0 4 5
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08		
A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/10		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 K	31/513	(2006.01)	A 6 1 K	31/513		
A 6 1 K	31/519	(2006.01)	A 6 1 K	31/519		
A 6 1 K	31/337	(2006.01)	A 6 1 K	31/337		
A 6 1 K	31/7076	(2006.01)	A 6 1 K	31/7076		
A 6 1 K	31/7048	(2006.01)	A 6 1 K	31/7048		
A 6 1 K	31/704	(2006.01)	A 6 1 K	31/704		
A 6 1 K	31/475	(2006.01)	A 6 1 K	31/475		
A 6 1 K	31/52	(2006.01)	A 6 1 K	31/52		
A 6 1 K	31/573	(2006.01)	A 6 1 K	31/573		
A 6 1 K	31/616	(2006.01)	A 6 1 K	31/616		
A 6 1 K	31/192	(2006.01)	A 6 1 K	31/192		
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	
A 6 1 K	31/436	(2006.01)	A 6 1 K	31/436		
C 0 7 D	239/553	(2006.01)	C 0 7 D	239/553	A	
C 0 7 D	475/08	(2006.01)	C 0 7 D	475/08		
C 0 7 D	305/14	(2006.01)	C 0 7 D	305/14		
C 0 7 H	17/04	(2006.01)	C 0 7 H	17/04		
C 0 7 D	519/04	(2006.01)	C 0 7 D	519/04		
C 0 7 D	473/38	(2006.01)	C 0 7 D	473/38		
C 0 7 J	5/00	(2006.01)	C 0 7 J	5/00		
C 0 7 D	498/18	(2006.01)	C 0 7 D	498/18		

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 アン , ソニー オーン

アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515
 ユニット ナンバー0065, ステム セル トランスプランテーション アンド セル セ
 ラピー, ユー.ディー.エム.ディー.アンダーソン キャンサー センター

(72)発明者 リウ, エンリ

アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515
 ユニット ナンバー0065, ステム セル トランスプランテーション アンド セル セ
 ラピー, ユー.ディー.エム.ディー.アンダーソン キャンサー センター

(72)発明者 シュポール, エリザベス

アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515
 ユニット ナンバー0065, ステム セル トランスプランテーション アンド セル セ
 ラピー, ユー.ディー.エム.ディー.アンダーソン キャンサー センター

(72)発明者 レズヴァニ, ケイティ

アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515
 ユニット ナンバー0065, ステム セル トランスプランテーション アンド セル セ
 ラピー, ユー.ディー.エム.ディー.アンダーソン キャンサー センター

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C048 TT08 UU01 XX01

4C057 BB02 DD01 KK03

4C072 AA03 BB03 CC01 DD07 EE09 FF15 GG07 HH01 QQ00 UU01

4C076 AA11 AA16 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 CC04 CC07 CC27

CC29 FF11 FF68

4C084 AA19 MA02 MA16 MA17 MA21 MA65 MA66 NA05 NA14 ZB07

ZB08 ZB11 ZB26 ZB27 ZC75

4C085 AA03 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06

4C086 AA01 AA02 BA02 BC43 CB07 CB09 CB21 CB22 DA10 DA17

EA10 EA11 EA18 MA01 MA02 MA04 MA07 MA16 MA17 MA21

MA65 MA66 NA05 NA14 ZB07 ZB08 ZB11 ZB26 ZB27 ZC75

4C087 AA01 AA02 BB37 BB44 BB65 MA01 MA02 MA16 MA17 MA21

MA65 MA66 NA05 NA14 ZB07 ZB08 ZB11 ZB26 ZB27 ZC75

4C091 AA01 BB03 BB05 CC01 DD01 EE07 FF01 GG01 HH01 JJ03

KK02 KK12 LL01 MM03 NN01 PA03 PA05 PA09 PB02 QQ01

4C206 AA01 AA02 DA24 KA01 MA01 MA02 MA04 MA11 MA36 MA37

MA41 MA85 MA86 NA05 NA14 ZB07 ZB08 ZB11 ZB26 ZB27

ZC75

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 CA40 DA02 DA75 DA76

EA20 FA74