

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-533621

(P2022-533621A)

(43)公表日 令和4年7月25日(2022.7.25)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783		4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全114頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-568290(P2021-568290)			(71)出願人	518261261
(86)(22)出願日	令和2年5月15日(2020.5.15)				ナンジン レジェンド バイオテック カ
(85)翻訳文提出日	令和4年1月17日(2022.1.17)				ンパニー, リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/090601				NANJING LEGEND BIOT
(87)国際公開番号	WO2020/228825				ECH CO., LTD.
(87)国際公開日	令和2年11月19日(2020.11.19)				中華人民共和国, ジャンスー, ナンジン
(31)優先権主張番号	PCT/CN2019/087260				シティ, ジャンニン ディストリクト,
(32)優先日	令和1年5月16日(2019.5.16)				ロンミャン アベニュー ナンバー568
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				, ビルディング オブ ナンジン ライフ
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				サイエンス タウン ナンバー6
					No. 6 Building of Na
					njing Life Science
					Town, No. 568 Longmi
					an Avenue, Jiangning
					District, Nanjing c
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 認識分子を含む操作された免疫細胞

(57)【要約】

操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含み、標的分子は、細胞外ドメインを含み、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができる、操作された免疫細胞が提供される。一態様において、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、及び免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができる。別の態様において、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、及び操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含み、

前記標的分子は、細胞外ドメインを含み、

前記結合部分は、前記細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、

前記免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に前記標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、

前記免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に前記標的分子及び前記認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができる、操作された免疫細胞。

10

【請求項 2】

(i) 前記標的細胞の前記細胞外ドメインの前記遠位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の前記結合部分から膜までの距離の約 0.5 倍を超え；

(i i) 前記標的分子の前記細胞外ドメインは、少なくとも約 175 アミノ酸長であり、任意選択により、前記結合部分は、前記細胞外ドメインの C 末端から約 50 アミノ酸以上離れている前記細胞外ドメイン中の領域に結合し；及び／又は任意選択により、前記結合部分は、前記細胞外ドメインの N 末端から約 80 アミノ酸以内の領域に結合し；及び／又は

(i i i) 前記細胞外ドメインの前記遠位部分は、前記標的細胞の膜から少なくとも約 30 Å 離れている、請求項 1 に記載の操作された免疫細胞。

20

【請求項 3】

前記標的分子の前記細胞外ドメインは、3 つ以上の Ig 様ドメインを含み、

(i) 前記結合部分は、前記細胞外ドメインの C 末端から最初の 2 つの Ig 様ドメインの外部の領域に結合し；及び／又は

(i i) 前記結合部分は、前記細胞外ドメインの N 末端の最初の Ig 様ドメイン内の領域に結合する、請求項 1 又は 2 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 4】

(i) 前記結合部分は、CD22 のドメイン 1～4 内のエピトープに特異的に結合する参照抗体（「抗 CD22 D1～4 抗体」）と結合について競合し；

(i i) 前記結合部分は、参照抗 CD22 D1～4 抗体の結合エピトープと重複する、CD22 のドメイン 1～4 中のエピトープに結合し；

(i i i) 前記結合部分は、参照抗 CD22 D1～4 抗体のものと同一重鎖及び軽鎖 CDR 配列を含み；及び／又は

(i v) 前記結合部分は、参照抗 CD22 D1～4 抗体のものと同一重鎖可変ドメイン (VH) 及び軽鎖可変ドメイン (VL) 配列を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

30

【請求項 5】

(i) 前記参照抗 CD22 D1～4 抗体は、配列番号 67 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1 (HC-CDR1)、配列番号 68 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2 (HC-CDR2)、配列番号 69 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3 (HC-CDR3)、配列番号 70 のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1 (LC-CDR1)、配列番号 71 のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2 (LC-CDR2) 及び配列番号 72 のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 (LC-CDR3) を含み；及び／又は

40

(i i) 前記参照抗 CD22 D1～4 抗体は、配列番号 73 のアミノ酸配列を含む VH 及び配列番号 74 のアミノ酸配列を含む VL を含む、請求項 4 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 6】

操作された免疫細胞であって、その表面上において、前記標的分子の前記細胞外ドメインの近位部分に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞と比較して、標的細胞であって、その表面上に前記標的分子及び前記認識分子の両方を含む標的細胞を少

50

なくとも3倍だけ死滅させることができる、請求項1～5のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項7】

操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含み、

前記標的分子は、細胞外ドメインを含み、

前記結合部分は、前記細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、

前記操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に前記標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、

前記操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に前記標的分子及び前記認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する、操作された免疫細胞。

10

【請求項8】

(i) 前記標的細胞の前記細胞外ドメインの前記近位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の前記結合部分から膜までの距離の約2倍以下であり；

(i i) 前記標的分子の前記細胞外ドメインは、少なくとも約175アミノ酸長であり、任意選択により、前記結合部分は、前記細胞外ドメインのN末端から約80アミノ酸以上離れている領域の外部に結合し；及び／又は任意選択により、前記結合部分は、前記細胞外ドメインのC末端から約102アミノ酸以内の前記細胞外ドメイン中の領域に結合し；及び／又は

20

(i i i) 前記細胞外ドメインの前記近位部分は、前記標的細胞の膜から約90 Å以下離れている、請求項7に記載の操作された免疫細胞。

【請求項9】

前記標的分子の前記細胞外ドメインは、2つ以上のIg様ドメインを含み、

(i) 前記結合部分は、前記細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメインの外部の領域に結合し；及び／又は

(i i) 前記結合部分は、前記細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメイン内の領域に結合する、請求項7又は8に記載の操作された免疫細胞。

【請求項10】

(i) 前記結合部分は、CD22のドメイン5～7内のエピトープに特異的に結合する参照抗体（「抗CD22 D5～7抗体」）と結合について競合し；

30

(i i) 前記結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体の結合エピトープと重複する、CD22のドメイン5～7中のエピトープに結合し；

(i i i) 前記結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体のものと同一重鎖及び軽鎖CDR配列を含み；及び／又は

(i v) 前記結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体のものと同一VH及びVL配列を含む、請求項9に記載の操作された免疫細胞。

【請求項11】

(i) 前記参照抗CD22 D5～7抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号77のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、配列番号78のアミノ酸配列を含むHC-CDR3、配列番号79のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号80のアミノ酸配列を含むLC-CDR2及び配列番号81のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含み；及び／又は

40

(i i) 前記参照抗CD22 D5～7抗体は、配列番号82のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号83のアミノ酸配列を含むVLを含む、請求項10に記載の操作された免疫細胞。

【請求項12】

操作された免疫細胞であって、その表面上において、前記標的分子の前記細胞外ドメインの遠位末端に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞と比較して、標的細胞であって、その表面上に前記標的分子及び前記認識分子の両方を含む標的細胞を約

50

20%以下だけ死滅させる、請求項7～11のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項13】

前記結合部分は、sdAb、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv又はペプチドリガンドである、請求項1～12のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項14】

前記認識分子は、前記結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項15】

前記標的分子は、膜貫通受容体である、請求項1～14のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

10

【請求項16】

前記標的分子は、CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される、請求項15に記載の操作された免疫細胞。

【請求項17】

前記標的分子は、CD22である、請求項16に記載の操作された免疫細胞。

【請求項18】

前記認識分子は、多重特異性である、請求項1～17のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項19】

前記認識分子は、第2の標的分子を特異的に認識する第2の結合部分を含み、前記結合部分及び前記第2の結合部分は、タンデムに連結される、請求項18に記載の操作された免疫細胞。

20

【請求項20】

(i) 前記結合部分は、前記膜貫通ドメインに直接的又は間接的に融合され；

(ii) 前記結合部分は、前記膜貫通ドメインを含むポリペプチドに非共有結合的に結合され；

(iii) 前記認識分子は、i) 前記結合部分及び結合対の第1のメンバーを含む第1のポリペプチド；並びにii) 前記結合対の第2のメンバーを含む第2のポリペプチドを含み、前記第1のメンバー及び前記第2のメンバーは、互いに結合し、前記第2のメンバーは、前記膜貫通ドメインに直接的又は間接的に融合され；及び／又は

30

(iv) 前記結合部分は、前記膜貫通ドメインを含むポリペプチドに融合される、請求項14～20のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項21】

前記認識分子は、キメラ抗原受容体(「CAR」)である、請求項1～20のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項22】

前記膜貫通ドメインは、CD8α、CD4、CD28、4-1BB、CD80、CD86、CD152及びPD1からなる群から選択される分子に由来し、任意選択により、前記膜貫通ドメインは、CD8αに由来する、請求項21に記載の操作された免疫細胞。

40

【請求項23】

前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b又はCD66dに由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含み、任意選択により、前記一次細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζに由来する、請求項21又は22に記載の操作された免疫細胞。

【請求項24】

前記細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインを含み、任意選択により、前記共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、IT

50

GB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83のリガンド及びそれらの組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する、請求項21～23のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項25】

前記認識分子は、前記結合部分のC末端と前記膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含み、任意選択により、前記ヒンジドメインは、CD8α又はIgG4CH2-CH3に由来する、請求項21～24のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項26】

前記認識分子は、キメラT細胞受容体（「cTCR」）である、請求項1～20のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項27】

前記膜貫通ドメインは、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3γ、CD3ε及びCD3δからなる群から選択されるTCRサブユニットの膜貫通ドメインに由来し、任意選択により、前記膜貫通ドメインは、CD3εの膜貫通ドメインに由来する、請求項26に記載の操作された免疫細胞。

【請求項28】

前記細胞内シグナル伝達ドメインは、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3γ、CD3ε及びCD3δからなる群から選択されるTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインに由来し、任意選択により、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3εの細胞内シグナル伝達ドメインに由来する、請求項26又は27に記載の操作された免疫細胞。

【請求項29】

前記認識分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインは、同じTCRサブユニットに由来する、請求項26～28のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項30】

前記認識分子は、TCRサブユニットの細胞外ドメインの少なくとも一部をさらに含む、請求項26～29のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項31】

前記結合部分は、CD3ε（「eTCR」）のN末端に融合される、請求項30に記載の操作された免疫細胞。

【請求項32】

T細胞である、請求項1～31のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項33】

細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NK-T）細胞及びγδT細胞からなる群から選択される、請求項32に記載の操作された免疫細胞。

【請求項34】

共受容体をさらに含み、任意選択により、前記共受容体は、ケモカイン受容体である、請求項1～33のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項35】

前記標的細胞は、免疫細胞である、請求項1～34のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項36】

前記標的細胞は、腫瘍細胞である、請求項1～34のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項37】

請求項1～36のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞を含む医薬組成物。

【請求項38】

10

20

30

40

50

癌を有する個体を処置する方法であって、有効量の、請求項 37 に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む方法。

【請求項 39】

前記結合部分は、前記細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、前記操作された免疫細胞は、前記個体にとって自己である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記結合部分は、前記細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、前記操作された免疫細胞は、前記個体にとって同種他家である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

前記癌は、T 細胞リンパ腫、白血病、B 細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病（ALL）及び B 細胞リンパ腫からなる群から選択される、請求項 38～40 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 42】

感染症を有する個体を処置する方法であって、有効量の、請求項 37 に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む方法。

【請求項 43】

前記結合部分は、前記細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、前記操作された免疫細胞は、前記個体にとって自己である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記結合部分は、前記細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、前記操作された免疫細胞は、前記個体にとって同種他家である、請求項 42 に記載の方法。

20

【請求項 45】

前記感染症は、HIV 及び HTLV からなる群から選択されるウイルスによる感染である、請求項 42～44 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

前記感染症は、HIV である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

請求項 1～36 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞を作製する方法であって、前記認識分子をコードする 1 つ以上の核酸を免疫細胞に導入し、それにより前記操作された免疫細胞を得ることを含む方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる、2019 年 5 月 16 日に提出された国際特許出願 PCT／中国特許出願公開第 2019／087260 号明細書に対する優先権の利益を主張するものである。

【0002】

ASCII テキストファイル上の配列表の提出

ASCII テキストファイル上の以下の提出の内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる：コンピューター可読形式（CRF）の配列表（ファイル名：761422003140.txt、記録日：2020 年 5 月 11 日、サイズ：78 KB）。

40

【0003】

本発明は、操作された免疫細胞（操作された T 細胞など）であって、それらの表面上において、感染症及び癌を処置するのに有用な認識分子を含む操作された免疫細胞（操作された T 細胞など）に関する。

【背景技術】

【0004】

T 細胞媒介免疫は、ウイルス、細菌、寄生虫感染又は悪性細胞を排除するための抗原（Ag）特異性 T リンパ球を発達させる適応プロセスである。

50

【0005】

CD4+T細胞は、免疫系において最も重要な協調的な役割を果たし、T細胞媒介免疫及びB細胞媒介（又は体液性）免疫の両方において中心的な役割を有する。T細胞媒介免疫において、CD4+T細胞は、CD8+T細胞の活性化及び成熟において役割を果たす。B細胞媒介免疫において、CD4+T細胞は、B細胞を増殖させ、且つB細胞抗体クラススイッチを誘導するように刺激することに関与する。

【0006】

CD4+T細胞が果たす中心的な役割は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）による感染の余波によって最もよく説明されるであろう。ウイルスは、レトロウイルスであり、逆転写酵素と共にその遺伝情報をRNAとして保有するため、宿主細胞に侵入すると、そのRNAゲノムからDNAの生成が可能になることを意味する。次に、DNAは、影響を受けた宿主細胞に組み込まれる場合があり、この時点でウイルス遺伝子が転写され、さらなるウイルス粒子が感染細胞によって生成され、放出される。

【0007】

HIVは、CD4+T細胞を優先的に標的化し；結果として、感染した患者の免疫系は、免疫系の主要な協調細胞の集団が激減するため、次第に易感染性になる。実際に、HIVの後天性免疫不全症候群（AIDS）への進行は、患者のCD4+T細胞数によって特徴付けられる。ウイルスによるCD4+T細胞のこの標的化は、感染した患者が日和見病原体を含む様々な病原体に対して生産的な免疫応答を順調に開始できないことをもたらすものでもある。

【0008】

様々な薬理学的クラスの薬剤によるウイルスの標的化は、ウイルスの耐性を妨げ、感染した患者において著しい有効性を示したが、その完全な有効性を確実にするために患者によって高レベルのアドヒアランスを要求する。実際に、非アドヒアランスは、薬剤耐性株の出現をもたらす可能性があり、患者における疾患及びその後の合併症の両方を効果的に管理し、処置する際にさらなる困難を引き起こす。

【0009】

キメラ抗原受容体（CAR）は、リンパ球の特異性及び機能を初期化する合成受容体の群である。操作されたT細胞は、原理的には多くのタイプの癌に適用可能であるが、好適な標的抗原を同定し、免疫抑制的な腫瘍微小環境を克服し、毒性を低減し、且つ抗原の逃避を妨げるさらなる進歩が未解決のままである。最適なT細胞の選択、遺伝子操作及び細胞製造の進歩により、T細胞ベースの療法の応用範囲が広がり、感染症及び自己免疫への新たな応用が可能になることが期待されている。CAR-T細胞技術の継続的な発展に伴い、研究者らは、T細胞の活性化に密接に関係するいくつかの共刺激分子及び抗原受容体をT細胞の表面上に同時に発現させ、T細胞の死滅活性を高めている。CAR-T細胞の初期化方法は、関連する遺伝子配列をレンチウイルスにより細胞の染色体に直接的に組み込むことであるため、CAR-T細胞は、設計された抗原受容体及び共刺激分子を長期間安定的に発現できる。理論的には、抗原受容体及び共刺激分子の機能は、長期的且つ安定的であり得る。自己由来のCAR-T細胞療法は、様々なB細胞性悪性腫瘍及び多発性骨髄腫に対して有望な効果を発揮することが多くの臨床報告で示されている。しかしながら、一部の患者は、CAR-T細胞療法を受けた後に依然として再発する。

【0010】

典型的なCARは、細胞外抗原認識ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン及びTCRシグナル伝達モチーフを含む。抗原認識ドメインは、抗原のための抗体又は天然の受容体若しくはリガンドに由来する可変領域であり得る。抗原認識ドメインは、CAR-T細胞活性化において重要な役割を果たす。抗原認識ドメインの親和性は、CAR-T細胞が、高レベルの抗原を発現する細胞と、低レベルの抗原を発現する細胞とを識別できるかどうかに影響を与える可能性があり、これは、CAR-Tが腫瘍関連抗原を標的とし、腫瘍特異抗原を標的としないように設計されるときに重要である。腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞上で高レベルにおいて且つ一部の正常細胞上で低レベルにおいて

10

20

30

40

50

発現される抗原である。CARを構築するために腫瘍特異抗原が利用可能でないとき、off-tumor、on-target効果を低減するために、CAR-Tの親和性を微調整することが必要である。広く使用される抗原認識ドメインは、抗体由来の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含むscFvである。scFvは、抗原上のエピトープを認識する。エピトープの位置もCAR-Tの機能において重要な役割を果たし得る。

【0011】

臨床報告（NCT01626495）において、患者は、抗CD19 CARを異常に発現したCD19-白血病に起因して、CD19標的化CAR-T細胞（CTL019）注入の9ヶ月後に再発した。CAR遺伝子は、T細胞製造中に意図せずに単一の白血病のB細胞に導入され、その子孫細胞が白血病細胞の表面上のCD19エピトープとシスに結合することにより、そのような細胞がCTL019による認識からマスクされ、CTL019への耐性をもたらした。

10

【0012】

本明細書で参照される全ての刊行物、特許、特許出願及び公開された特許出願の開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本出願は、一態様において、認識分子（例えば、膜貫通受容体）、操作された免疫細胞、組成物及び処置の方法を提供する。

20

【0014】

本出願の一態様は、操作された免疫細胞（「抗遠位部分の操作された免疫細胞」）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（「抗遠位部分の操作された免疫細胞」）を提供し、標的分子は、細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、認識分子は、結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、単一ドメイン抗体（sdAb）、scFv、Fab'、（Fab'）₂、Fv又はペプチドリガンドである。

30

【0015】

抗遠位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的細胞の細胞外ドメインの遠位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約0.5倍を超える。いくつかの実施形態において、標的細胞の細胞外ドメインの遠位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約1倍を超える。いくつかの実施形態において、標的細胞の細胞外ドメインの遠位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約1.5倍を超える。いくつかの実施形態において、標的細胞の細胞外ドメインの遠位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約2倍を超える。

40

【0016】

抗遠位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的分子の細胞外ドメインは、少なくとも約175アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約50アミノ酸以上離れている細胞外ドメイン中の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約80アミノ酸以上離れている細胞外ドメイン中の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約120アミノ酸以内の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約80アミノ酸以内の領域に結合する。

50

【0017】

抗遠位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、細胞外ドメインの遠位部分は、標的細胞の膜から少なくとも約30 Å離れている。いくつかの実施形態において、細胞外ドメインの遠位部分は、標的細胞の膜から少なくとも約40 Å離れている。いくつかの実施形態において、細胞外ドメインの遠位部分は、標的細胞の膜から少なくとも約60 Å離れている。いくつかの実施形態において、細胞外ドメインの遠位部分は、標的細胞の膜から少なくとも約90 Å離れている。いくつかの実施形態において、細胞外ドメインの遠位部分は、標的細胞の膜から少なくとも約120 Å離れている。

【0018】

抗遠位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的分子の細胞外ドメインは、3つ以上のIg様ドメインを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメインの外部の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の4つのIg様ドメインの外部の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初の3つのIg様ドメイン内（例えば、最初のものの中）の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメイン内の領域に結合する。

【0019】

抗遠位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的分子は、膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される。

【0020】

抗遠位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。いくつかの実施形態において、結合部分は、CD22のドメイン1～4内のエピトープに特異的に結合する参照抗体（「抗CD22 D1～4抗体」）と結合について競合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、参照抗CD22 D1～4抗体の結合エピトープと重複する、CD22のドメイン1～4中のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、参照抗CD22 D1～4抗体のものと同一重鎖及び軽鎖CDR配列を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、参照抗CD22 D1～4抗体のものと同一重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）配列を含む。いくつかの実施形態において、参照抗CD22 D1～4抗体は、配列番号67のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1（HC-CDR1）、配列番号68のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2（HC-CDR2）、配列番号69のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3（HC-CDR3）、配列番号70のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1（LC-CDR1）、配列番号71のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2（LC-CDR2）及び配列番号72のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3（LC-CDR3）を含む。いくつかの実施形態において、参照抗CD22 D1～4抗体は、配列番号73のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号74のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0021】

抗遠位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的分子の細胞外ドメインの近位部分に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞と比較して、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を少なくとも3倍だけ死滅させることができる。

【0022】

本出願の一態様は、操作された免疫細胞（「抗近位部分の操作された免疫細胞」）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（「抗近位部分の操作された免疫細胞」）を提供し

10

20

30

40

50

、標的分子は、細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、認識分子は、結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、s d A b、s c F v、F a b'、(F a b')₂、F v又はペプチドリガンドである。

【0023】

抗近位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的細胞の細胞外ドメインの近位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約2倍以下である。いくつかの実施形態において、標的細胞の細胞外ドメインの近位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約1.5倍以下である。いくつかの実施形態において、標的細胞の細胞外ドメインの近位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約1倍以下である。

10

【0024】

抗近位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的分子の細胞外ドメインは、少なくとも約175アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約80アミノ酸以上離れている領域の外部に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約120アミノ酸以内の細胞外ドメイン中の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約102アミノ酸以内の細胞外ドメイン中の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約50アミノ酸以内の細胞外ドメイン中の領域に結合する。

20

【0025】

抗近位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、細胞外ドメインの近位部分は、標的細胞の膜から約120 Å以下離れている。いくつかの実施形態において、細胞外ドメインの近位部分は、標的細胞の膜から約90 Å以下離れている。いくつかの実施形態において、細胞外ドメインの近位部分は、標的細胞の膜から約60 Å以下離れている。

30

【0026】

抗近位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的分子の細胞外ドメインは、2つ以上のIg様ドメインを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメインの外部の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初の3つのIg様ドメインの外部の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の4つのIg様ドメイン内の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメイン内の領域に結合する。

【0027】

抗近位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的分子は、膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される。

40

【0028】

抗近位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。いくつかの実施形態において、結合部分は、CD22のドメイン5～7内のエピトープに特異的に結合する参照抗体(「抗CD22 D5～7抗体」)と結合について競合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体の結合エピトープと重複する、CD22のドメイン5～7中

50

のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体のものと同じ重鎖及び軽鎖CDR配列を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体のものと同じVH及びVL配列を含む。いくつかの実施形態において、参照抗CD22 D5～7抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号77のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、配列番号78のアミノ酸配列を含むHC-CDR3、配列番号79のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号80のアミノ酸配列を含むLC-CDR2及び配列番号81のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含む。いくつかの実施形態において、参照抗CD22 D5～7抗体は、配列番号82のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号83のアミノ酸配列を含むVLを含む。

10

【0029】

抗近位部分の操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的分子の細胞外ドメインの遠位末端に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞と比較して、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を約20%以下だけ死滅させる。

【0030】

操作された免疫細胞（抗遠位部分及び抗近位部分の操作された免疫細胞を含む）の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、認識分子は、単一特異性である。いくつかの実施形態において、認識分子は、多重特異性である。いくつかの実施形態において、認識分子は、第2の標的分子を特異的に認識する第2の結合部分を含む。いくつかの実施形態において、第2の結合部分は、sdAb、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv又はペプチドリガンドである。いくつかの実施形態において、結合部分及び第2の結合部分は、タンデムに連結される。いくつかの実施形態において、結合部分は、第2の結合部分のN末端である。いくつかの実施形態において、結合部分は、第2の抗原結合部分のC末端である。いくつかの実施形態において、結合部分及び第2の結合部分は、リンカーを介して連結される。

20

【0031】

操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、結合部分は、膜貫通ドメインに直接的又は間接的に融合される。いくつかの実施形態において、結合部分は、膜貫通ドメインを含むポリペプチドに非共有結合的に結合される。いくつかの実施形態において、認識分子は、i) 結合部分及び結合対の第1のメンバーを含む第1のポリペプチド；並びにii) 結合対の第2のメンバーを含む第2のポリペプチドを含み、第1のメンバー及び第2のメンバーは、互いに結合し、第2のメンバーは、膜貫通ドメインに直接的又は間接的に融合される。いくつかの実施形態において、結合部分は、膜貫通ドメインを含むポリペプチドに融合される。

30

【0032】

操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、認識分子は、キメラ抗原受容体（「CAR」）である。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、CD8α、CD4、CD28、4-1BB、CD80、CD86、CD152及びPD1からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、CD8αに由来する。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b又はCD66dに由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζに由来する。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNF

40

50

RSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83のリガンド及びそれらの組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する。いくつかの実施形態において、共刺激シグナル伝達ドメインは、4-1BBの細胞質ドメインを含む。いくつかの実施形態において、認識分子は、結合部分のC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、CD8 α 又はIgG4 CH2-CH3に由来する。

【0033】

操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、認識分子は、キメラT細胞受容体（「cTCR」）である。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 及びCD3 δ からなる群から選択されるTCRサブユニットの膜貫通ドメインに由来する。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、CD3 ϵ の膜貫通ドメインに由来する。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 及びCD3 δ からなる群から選択されるTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインに由来する。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ϵ の細胞内シグナル伝達ドメインに由来する。いくつかの実施形態において、認識分子の膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインは、同じTCRサブユニットに由来する。いくつかの実施形態において、認識分子は、TCRサブユニットの細胞外ドメインの少なくとも一部をさらに含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、CD3 ϵ （「eTCR」）のN末端に融合される。

【0034】

操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NK-T）細胞及び $\gamma\delta$ T細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、共受容体をさらに含む。いくつかの実施形態において、共受容体は、ケモカイン受容体である。

【0035】

操作された免疫細胞の上記の実施形態の1つ以上によるいくつかの実施形態において、標的細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態において、標的細胞は、腫瘍細胞である。

【0036】

本出願の一態様は、上記の抗遠位部分の操作された免疫細胞のいずれか1つによる操作された免疫細胞を含む医薬組成物（「抗遠位部分の医薬組成物」）を提供する。

【0037】

本出願の一態様は、癌を有する個体を処置する方法であって、有効量の、上記の抗遠位部分の医薬組成物のいずれか1つによる医薬組成物を個体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、個体にとって自己である。いくつかの実施形態において、癌は、T細胞リンパ腫、白血病、B細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病（ALL）及びB細胞リンパ腫からなる群から選択される。

【0038】

本出願の一態様は、感染症を有する個体を処置する方法であって、有効量の、上記の抗遠位部分の医薬組成物のいずれか1つによる医薬組成物を個体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、個体にとって自己である。いくつかの実施形態において、感染症は、HIV及びHTLVからなる群から選択されるウイルスによる感染である。いくつかの実施形態において、感染症は、HIVである。

【0039】

本出願の一態様は、上記の抗近位部分の操作された免疫細胞実施形態のいずれか1つによ

10

20

30

40

50

る、抗近位部分の操作された免疫細胞を含む医薬組成物を提供する。

【0040】

本出願の一態様は、癌を有する個体を処置する方法であって、有効量の、上記の抗近位部分の医薬組成物のいずれか1つによる医薬組成物を個体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、個体にとって同種他家である。いくつかの実施形態において、癌は、T細胞リンパ腫、白血病、B細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病（ALL）及びB細胞リンパ腫からなる群から選択される。

【0041】

本出願の一態様は、感染症を有する個体を処置する方法であって、有効量の、上記の抗近位部分の医薬組成物のいずれか1つによる医薬組成物を個体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、個体にとって同種他家である。いくつかの実施形態において、感染症は、HIV及びHTLVからなる群から選択されるウイルスによる感染である。いくつかの実施形態において、感染症は、HIVである。

【0042】

本出願の別の態様は、上記の抗遠位又は抗近位部分の操作された免疫細胞のいずれか1つによる操作された免疫細胞を作製する方法であって、認識分子をコードする1つ以上の核酸を免疫細胞に導入し、それにより操作された免疫細胞を得ることを含む方法を提供する。

【0043】

癌又は感染症（例えば、HIV）を処置する際の使用のための、上記の実施形態のいずれか1つによる遠位部分の認識分子（例えば、膜貫通受容体）、抗遠位部分の操作された免疫細胞又は組成物及び癌又は感染症（例えば、HIV）を処置する際の使用のための、上記の実施形態のいずれか1つによる近位部分の認識分子（例えば、膜貫通受容体）、抗遠位の操作された免疫細胞又は組成物の使用も提供される。

【0044】

上記の操作された免疫細胞のいずれか1つを含む組成物、キット及び製造品がさらに提供される。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1A】CD4結合部分、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン及びCD3ζシグナル伝達ドメインで構成される例示的な抗CD4 CARの構造を示す。CD4結合部分は、CD4のドメイン1中のエピトープ又はCD4のドメイン2及び／若しくは3中のエピトープを特異的に認識できる。

【図1B】抗CD4 CAR-T細胞の2つの異なる種類の表現型を示す。CAR-T No. 1におけるCARは、CD4のドメイン1中のエピトープを特異的に認識するscFvを含有し、CAR+及びCAR-集団の両方においてCD4+細胞を死滅させることができる。CAR-T No. 2におけるCARは、CD4のドメイン2中のエピトープを特異的に認識するscFvを含有し、CAR+標的CD4+細胞を死滅させる際に効果的でなかった。

【図2】抗CD4抗体イバリズマブ、トレガリズマブ及びザノリムマブのドメインマッピングを示す。ヒトCD4の5つの異なるドメインで置換されたマウスCD4は、HEK-293T細胞上で一過的に発現された。抗体を使用して、フローサイトメトリーによってこれらのドメインを検出した。ザノリムマブ VH/VLを使用してCAR-T No. 1を作製し、イバリズマブ VH/VLを使用してCAR-T No. 2を作製した。トレガリズマブ VH/VLを使用してCAR-T No. 3を作製した。

【図3A-3B】仮定上のCAR-T及びCD4相互作用モデルを示す。図3Aは、CAR-T No. 1がCD4ドメイン1中のエピトープを認識し、CAR-T No. 2がCD4ドメイン2又は3中のエピトープを認識することを示す。図3Bは、CAR-T No. 2上のCD4が同じ細胞上のCARによってシスに遮断される一方、CAR-

10

20

30

40

50

T No. 1上のCD4が別のCAR-T細胞によって遮断されず、且つ認識され得ることを示す。

【図4A-4C】抗体遮断アッセイの結果を示す。図4Aは、イバリズマブ、トレガリズマブ及びザノリムマブに関するエピトープマッピングを示す。図4Bは、異なる抗CD4抗体の不存在下又は存在下でのCFSE標識汎T標的細胞と共培養されたCAR-T細胞のフローサイトメトリーを示す。それぞれ50nM及び100nMの2種の遮断用量が使用された。図4Cは、図4BにおけるCAR-T細胞の定量分析を示す。

【図5】抗CD4 CAR-T細胞の細胞傷害効果を示す。CD4 ドメイン1を認識する2つのタイプの抗体がこの実験のCAR-T細胞において使用された。UNT細胞（非形質導入T細胞）及びCAR-T細胞が0.5:1のE:T（エフェクター：標的）比でCFSE標識汎T標的細胞と共に24時間共培養された。CD4の発現は、フローサイトメトリーによって検出された。

【図6A】CARで形質導入されたヒト皮膚Tリンパ種細胞株HHのフローサイトメトリー結果を示す。CAR%比率は、フローサイトメトリーによって検出された。非形質導入HH細胞が対照として使用された。

【図6B】エフェクター細胞と共培養されたCFSE標識HH又はCAR-HH細胞のフローサイトメトリー結果を示す。CD4ドメイン1特異的CAR-T細胞がエフェクター細胞として使用された。CAR-T No. 1及びUNT細胞が対照として使用された。標的細胞上のCD4発現は、フローサイトメトリーによって検出された。

【図6C】UNT+HH試料に基づいて培養された各試料中の相対CD4+%を示す。

【図6D】腫瘍増殖（上段）及び体重（下段）に対するCAR-T NO. 1の効果を示す。

【図7】抗CD4ドメイン1 CAR-T No. 1細胞のインビボ有効性を示す。ヒト免疫系を有するマウス（HISマウス）に 3×10^5 個のCAR+CAR-T細胞又はUNT対照細胞を接種した。脾細胞を養子T細胞治療の18日後にフローサイトメトリー分析のために収集した。

【図8A-8D】抗CD4ドメイン1 eTCR-T細胞の特性評価を示す。図8Aは、抗CD4 eTCR形質導入T細胞集団中のTCR+T細胞のパーセンテージを示す。図8Bは、抗CD4 eTCR-T細胞によるIFN γ 産生を示す。図8Cは、抗CD4 eTCR-T細胞の増殖を示す。図8Dは、標的細胞に対する抗CD4 eTCR-T細胞のインビトロ死滅効果を示す。この抗CD4 eTCRの配列は、配列番号64において列挙される。

【図9】抗CD4 CAR-T細胞の細胞傷害効果を示す。CD4 ドメイン2及び／又はドメイン3を認識する2つのタイプの抗体がこの実験のCAR-T細胞において使用された。UNT細胞（非形質導入T細胞）及びCAR-T細胞が0.5:1のE:T（エフェクター：標的）比でCFSE標識汎T標的細胞と共に24時間共培養された。CD4の発現は、フローサイトメトリーによって検出された。

【図10】CD22結合部分、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン及びCD3 ζ シグナル伝達ドメイン含む例示的な抗CD22 CARの構造を示す。CD22結合部分は、CD22のドメイン1~4中のエピトープ又はCD22のドメイン5~7中のエピトープを特異的に認識できる。

【図11A】実験において使用される2種の抗CD22 CARによって認識されるCD22ドメインを示す。

【図11B】CD22のドメイン3を認識するCAR-T No. 454の細胞傷害効果を示す。

【図11C】CD22のドメイン5~7を認識するCAR-T No. 447の細胞傷害効果を示す。UNT細胞（非形質導入T細胞）及びCAR-T細胞が0.5:1のE:T（エフェクター：標的）比でCFSE標識汎T標的細胞と共に24時間共培養された。CD22の発現は、フローサイトメトリーによって検出された。

【図12】CD22及びCD4の細胞外ドメインの構造を示す。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0046】

本出願は、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の対応する標的分子の特定の領域内のエピトープに結合する認識分子を含む操作された免疫細胞を提供する。例示的な認識分子としては、キメラ抗原受容体（「CAR」）、キメラT細胞受容体（「CTCR」）及び免疫細胞内で機能する他の受容体が挙げられる。本出願は、ある種のタイプの認識分子が、免疫細胞の表面上に発現されるとき、例えば同じ認識分子を発現する他の免疫細胞により、操作された免疫細胞の枯渇又は排除をもたらすことができる（「自己死滅能」とも称される）という驚くべき発見に基づく。一方で、他のタイプの認識分子は、そのような自己死滅能を有さず、代わりに免疫細胞を、同じ認識分子を発現する他の免疫細胞によって死滅されることから保護し得る。自己死滅能を有する認識分子のタイプは、標的分子の遠位部分（即ち細胞膜から離れている部分）を特異的に認識する結合部分を含有する一方、そのような自己死滅能を有しないものは、標的分子の近位部分（即ち細胞膜に近い部分）を特異的に認識する結合部分を含有することが発見された。

10

【0047】

本出願は、2つの例示的な標的分子、即ちCD4及びCD22により、この原理を実証している。例えば、本発明者らは、CD4+細胞又はCD22+細胞を特異的に認識し、且つそれに応答するCAR-T細胞を記載する。本発明者らは、抗CD4ドメイン1CAR-Tが、CAR陰性細胞集団中のCD4+細胞を死滅させるだけでなく、CD4+CAR+細胞も排除することを発見した。対照的に、抗CD4ドメイン2/3 CAR-Tは、CD4+CAR+細胞を排除できない。同様に、抗CD22ドメイン1~4CAR-Tは、CAR陰性細胞集団中のCD22+細胞を死滅させるだけでなく、CD22+CAR+細胞も排除する。対照的に、CD22のドメイン5~7を認識するCAR-Tは、CD22+CAR+細胞を排除できなかった。

20

【0048】

理論に拘束されるものではないが、操作された免疫細胞の表面上の結合分子は、その結合部分が認識するエピトープに応じてそれらの自己死滅能が異なると仮定される。標的分子の近位末端を認識する結合部分は、同じ細胞上の内因的に発現される標的分子から適切な距離内にあり、別の操作された免疫細胞によるエピトープの認識を遮断するため、操作された免疫細胞を攻撃から保護し得る。一方で、標的分子の遠位末端を認識する結合部分は、同じ細胞上の内因的に発現される標的分子から遠すぎて、別の操作された免疫細胞による標的分子の認識を遮断できないため、操作された免疫細胞の死滅をもたらし得る。

30

【0049】

これまでのところ、大部分の操作された免疫細胞（CAR-T細胞など）は、治療される個体から濃縮された自己免疫細胞から製造される。HIV処置のために、起源の免疫細胞がHIVウイルスを含有する場合、操作された免疫細胞もHIVウイルスを含有し、新規感染の原因になる場合がある。例えば、操作された免疫細胞（CAR-Tなど）でCD4+T細胞リンパ腫／白血病を処置するために、免疫細胞集団中に混入されるいずれかのCD4+白血病／リンパ腫細胞が除去される必要があるであろう。操作された免疫細胞を製造している間、濃縮されたT細胞集団中の残留している腫瘍細胞も、免疫細胞受容体を発現するレンチウイルスで形質導入され、免疫細胞受容体について陽性になるであろう。免疫細胞受容体は、そのリガンドにシスに結合するため、操作された免疫細胞上の標的化抗原を遮蔽する場合がある。次に、免疫細胞受容体を発現する腫瘍細胞は、免疫細胞受容体に媒介される死滅を回避し、最終的に抵抗性疾患の再発につながる可能性がある。したがって、自己死滅の能力を有する本明細書に記載される遠位末端結合分子は、自己処置法に特に適しているであろう。

40

【0050】

対照的に、上で論じられる自己免疫細胞のリスクは、同種他家処置に関連して存在しない。同種他家に関連して、操作された免疫細胞がそれら自体を死滅させず、その結果、操作

50

された免疫細胞の有効性がそれらの最大限まで実現され得ることが望ましい。したがって、自己死滅の能力を有しない、本明細書に記載される近位末端結合分子は、同種他家処置法に特に適しているであろう。

【0051】

したがって、本出願は、一態様において、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞を提供し、標的分子は、細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができる。これらの操作された免疫細胞（「抗遠位部分の操作された免疫細胞」）は、癌及び感染症などの疾患の自己処置に特に有用である。

10

【0052】

別の態様において、本出願は、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞を提供し、標的分子は、細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。これらの操作された免疫細胞（「抗近位部分の操作された免疫細胞」）は、癌及び感染症などの疾患の同種他家処置に特に有用である。

20

【0053】

定義

本明細書で使用される「遠位部分」という用語は、標的細胞中の他の細胞外領域と比較して細胞膜から離れている、細胞の表面上の標的分子中の細胞外領域を指す。

【0054】

本明細書で使用される「近位部分」という用語は、標的細胞中の他の細胞外領域と比較して細胞膜に近い、細胞の表面上の標的分子中の細胞外領域を指す。

【0055】

本明細書で使用される場合、分子の領域（例えば、標的分子の細胞外ドメインの遠位部分若しくは近位部分又は認識分子の結合部分）から分子を発現する細胞の膜までの「距離」は、細胞の膜に対するその結合パートナー（例えば、それぞれ認識分子の結合部分又は標的分子の細胞外ドメインの遠位部分若しくは近位部分）との結合に関与する領域中のアミノ酸残基内の集団の中心からの距離を指す。

30

【0056】

「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、全長抗体及びその抗原結合フラグメントを含むが、これらに限定されない様々な抗体構造を包含する。抗体という用語は、従来の四本鎖抗体及び重鎖のみの抗体又はそのフラグメント、例えばVHHなどの単ドメイン抗体を含む。

40

【0057】

全長四本鎖抗体は、二本の重鎖及び二本の軽鎖を含む。軽鎖及び重鎖の可変領域は、抗原結合に関与する。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ「VH」及び「VL」と称される場合がある。両方の鎖における可変領域は、一般に、相補性決定領域（CDR）（LC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）CDR、HC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）CDR）と呼ばれる3つの高度に可変のループを含有する。本明細書で開示される抗体に関するCDR境界及び抗原結合フラグメントは、Kabata、Chothia又はAl-Lazikaniの慣習によって定義又は同定され得る（Al-Lazikani, 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948; Chothia 1985, J. Mol Biol.

50

、186:651-663; Chothia 1987, J. Mol. Biol., 196:901-917; Chothia 1989, Nature, 342:877-883; Kabat 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fourth Edition. US Govt. Printing Off. No. 165-492; Kabat 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242)。重又は軽鎖の3つのCDRは、CDRより高度に保存され、超可変ループを支持する骨格を形成するフレームワーク(FR)として知られる隣接する区間の間に挿入される。重及び軽鎖の定常領域は、抗原結合に関与しないが、様々なエフェクター機能を示す。抗体は、それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づくクラスに割り当てられる。抗体の5つの主要なクラス又はアイソタイプは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ 重鎖の存在によって特徴付けられるIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMである。主要な抗体クラスのいくつかは、IgG1(γ 1重鎖)、IgG2(γ 2重鎖)、IgG3(γ 3重鎖)、IgG4(γ 4重鎖)、IgA1(α 1重鎖)、又はIgA2(α 2重鎖)などのサブクラスに分類される。

10

【0058】

「重鎖のみの抗体」又は「HCAb」という用語は、重鎖を含むが、四本鎖抗体に通常見られる軽鎖を欠く機能的抗体を指す。ラクダ科の動物(ラクダ、ラマ又はアルパカなど)は、HCAbを産生することが知られている。

20

【0059】

「単ドメイン抗体」又は「sdAb」という用語は、3つの相補性決定領域(CDR)を有する単一の抗原結合ポリペプチドを指す。sdAbは、単独で、対応するCDR含有ポリペプチドとの対形成を伴わずに抗原に結合できる。いくつかの場合、単ドメイン抗体は、ラクダ科のHCAbから操作され、それらの重鎖可変ドメインは、本明細書において「VHH」(重鎖抗体の重鎖の可変ドメイン)と称される。ラクダsdAbは、最小の既知の抗原結合抗体フラグメントの1つである(例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-8(1993); Greenberg et al., Nature 374:168-73(1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine(London), 8:1013-26(2013)を参照されたい)。基本的なVHHは、N末端からC末端に以下の構造を有する:FR1~FR4がそれぞれフレームワーク領域1~4を指し、且つCDR1~CDR3が相補性決定領域1~3を指す、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

30

【0060】

「抗体部分」という用語は、全長抗体及びその抗原結合フラグメントを含む。全長抗体は、二本の重鎖及び二本の軽鎖を含む。軽鎖及び重鎖の可変領域は、抗原結合に関与する。両方の鎖における可変領域は、一般に、相補性決定領域(CDR)(LC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)CDR、HC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)CDR)と呼ばれる3つの高度に可変のループを含有する。本明細書で開示される抗体及び抗原結合フラグメントに関するCDR境界は、Kabat、Chothia又はAl-Lazikaniの慣習によって定義又は同定され得る(Al-Lazikani 1997; Chothia 1985; Chothia 1987; Chothia 1989; Kabat 1987; Kabat 1991)。重又は軽鎖の3つのCDRは、CDRより高度に保存され、超可変ループを支持する骨格を形成するフレームワーク(FR)として知られる隣接する区間の間に挿入される。重及び軽鎖の定常領域は、抗原結合に関与しないが、様々なエフェクター機能を示す。抗体は、それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づくクラスに割り当てられる。抗体の5つの主要なクラス又はアイソタイプは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ 重鎖の存在によって特徴付けられるIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMである。主要な

40

50

抗体クラスの一つは、IgG1 (γ 1重鎖)、IgG2 (γ 2重鎖)、IgG3 (γ 3重鎖)、IgG4 (γ 4重鎖)、IgA1 (α 1重鎖)又はIgA2 (α 2重鎖)などのサブクラスに分類される。

【0061】

本明細書で使用される場合、「抗原結合フラグメント」という用語は、例えば、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvフラグメント、ジスルフィド安定化Fvフラグメント(dsFv)、(dsFv)₂、二重特異性dsFv(dsFv-dsFv')、ジスルフィド安定化ダイアボディ(dsダイアボディ)、単鎖Fv(scFv)、scFv二量体(二価ダイアボディ)、1つ以上のCDRを含む抗体の部分から形成される多重特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、二価ドメイン抗体又は抗原に結合するが、完全な抗体構造を含まない任意の他の抗体フラグメントを含む抗体フラグメントを指す。抗原結合フラグメントは、親抗体又は親抗体フラグメント(例えば、親scFv)が結合する同じ抗原に結合できる。いくつかの実施形態において、抗原結合フラグメントは、1つ以上の異なるヒト抗体からフレームワーク領域に移植された特定のヒト抗体に由来する1つ以上のCDRを含み得る。

10

【0062】

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含有する最小の抗体フラグメントである。このフラグメントは、緊密に、非共有結合的に会合した1つの重鎖及び1つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これらの2つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に抗原結合特異性を付与する6つの超可変ループ(各々重及び軽鎖からの3つのループ)が生じる。しかしながら、単一可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、完全な結合部位より低い親和性ではあるが、抗原を認識し、結合する能力を有する。

20

【0063】

「sFv」又は「scFv」とも略される「単鎖Fv」は、単一ポリペプチド鎖に連結されるV_H及びV_L抗体ドメインを含む抗体フラグメントである。いくつかの実施形態において、scFvポリペプチドは、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成することを可能にするV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含む。scFvの概説に関しては、Plueckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

30

【0064】

「ダイアボディ」という用語は、鎖内対合ではなく、Vドメインの鎖間対合が達成され、それにより二価フラグメント、即ち2つの抗原結合部位を有するフラグメントを生じるように、V_H及びV_Lドメイン間に短いリンカー(約5～約10残基など)を典型的に有するsFvフラグメント(前の段落を参照されたい)を構築することにより調製される小さい抗体フラグメントを指す。二重特異性ダイアボディは、2つの抗体のV_H及びV_Lドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する2つの「交差」scFvフラグメントのヘテロ二量体である。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号明細書；国際公開第93/11161号パンフレット；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)においてより詳細に記載されている。

40

【0065】

本明細書で使用される場合、「CDR」又は「相補性決定領域」という用語は、重及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見出される非連続的な抗原結合部位を意味することが意図される。これらの特定の領域は、Kabata et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977)；Kabata et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest

50

t” (1991); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Al-Lazikani B. et al., J. Mol. Biol., 273: 927-948 (1997); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996); Abhinandan and Martin, Mol. Immunol., 45: 3832-3839 (2008); Lefranc M. P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27: 55-77 (2003); 及び Honegger and Plueckthun, J. Mol. Biol., 309: 657-670 (2001) によって記載されており、その定義は、互いに比較したとき、アミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。それにも関わらず、抗体若しくは移植された抗体又はその変異体の CDR を参照するためのいずれかの定義の適用は、本明細書で定義及び使用されるとおりの用語の範囲内であることが意図される。上で引用される参考文献の各々によって定義されるとおりの CDR を包含するアミノ酸残基は、比較として表 1 において下に記載される。CDR 予測アルゴリズム及びインターフェースは、当技術分野において知られており、例えば Abhinandan and Martin, Mol. Immunol., 45: 3832-3839 (2008); Ehrenmann F. et al., Nucleic Acids Res., 38: D301-D307 (2010); 及び Adolf-Bryfogle J. et al., Nucleic Acids Res., 43: D432-D438 (2015) を含む。この段落において引用される参考文献の内容は、本発明における使用のため及び本明細書の 1 つ以上の請求項における包含が可能になるように、全体として参照により本明細書に組み込まれる。別途定義されない限り、本明細書で提供される CDR 配列は、Chothia 定義に基づく。

10

20

【0066】

【表 1】

表 1: CDR 定義

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³	IMGT ⁴	AHo ⁵
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

30

¹残基付番は、Kabat *et al.*, 前掲の命名法に従う。²残基付番は、Chothia *et al.*, 前掲の命名法に従う。³残基付番は、MacCallum *et al.*, 前掲の命名法に従う。

40

⁴残基付番は、Lefranc *et al.*, 前掲の命名法に従う。⁵残基付番は、Honegger and Plueckthun, 前掲の命名法に従う。

【0067】

「Chothia の場合の変域ドメイン残基付番」又は「Chothia の場合のアミノ酸位置付番」という表現及びその変種は、上記の Chothia et al. における抗体の編集の重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインのために使用される付番システムを指す。この付番システムを使用するとき、実際の直鎖アミノ酸配列は、可変ドメインの F

50

R又はHVRの短縮又は挿入に対応するより少ない又は追加のアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後の単一のアミノ酸の挿入（Chothiaに従う残基52a）及び重鎖FR残基82の後の残基の挿入（例えば、Chothiaに従う残基82a、82b及び82cなど）を含み得る。残基のChothia付番は、抗体の配列と、「標準的な」のChothia付番配列との相同性のある領域でのアラインメントにより、所与の抗体について決定され得る。

【0068】

「フレームワーク」又は「FR」残基は、本明細書で定義されるとおりのCDR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0069】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、例えば、集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能な変異、例えば天然に存在する変異を除いて同一である。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、別々の抗体の混合物ではないという抗体の特徴を示す。特定の実施形態において、そのようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、ここで、標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含むプロセスによって得られた。例えば、選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン又は組換えDNAクローンのプールなど、複数のクローンからの固有のクローンの選択であり得る。選択された標的結合配列は、例えば、標的との親和性を高めるため、標的結合配列をヒト化するため、細胞培養における産生を改善するため、インビボでの免疫原性を低下させるため、多重特異性抗体を作るためなど、さらに変更できること及び改変された標的結合配列を含む抗体も本発明のモノクローナル抗体であることを理解すべきである。異なる決定基（エピトープ）に対して向けられた異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して向けられている。モノクローナル抗体調製物は、その特異性に加えて、それらが典型的には他の免疫グロブリンによって汚染されていない点で有利である。

【0070】

「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られる抗体の特徴を示し、いかなる特定の方法によっても抗体の産生を必要とすると解釈されるべきでない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma 14(3):253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号明細書を参照されたい）、ファージディスプレイ技術（例えば、Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)を参照されたい）、ヒト免疫グロブリン遺伝子座又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の部分又は全部を有する、ヒト又はヒト様抗体を動物で産生するための技術（例えば、国際公開第1998/24893号パンフレット；国際公開第1996/34096号パンフレット；国際公開第1996/3373

10

20

30

40

50

5号パンフレット；国際公開第1991/10741号パンフレット；Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993)；Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993)；Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)；米国特許第5,545,807号明細書；同第5,545,806号明細書；同第5,569,825号明細書；同第5,625,126号明細書；同第5,633,425号明細書；及び同第5,661,016号明細書；Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)；Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994)；Morrison, Nature 368:812-813 (1994)；Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14:845-851 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnol. 14:826 (1996)；及びLonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)を参照されたい)を含む様々な技術によって作製され得る。

10

20

30

40

50

【0071】

本明細書のモノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種に由来するか又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体を特異的に含み、鎖の残りの部分が、別の種に由来するか又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体及びそのような抗体のフラグメント（それらが望ましい生物活性を示す限り）の対応する配列と同一又は相同である（例えば、米国特許第4,816,567号明細書；及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)を参照されたい）。キメラ抗体には、PRIMATTIZED（登録商標）抗体が含まれ、ここで、抗体の抗原結合領域は、例えば、アカゲザルを目的の抗原で免疫することによって産生された抗体に由来する。

【0072】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有するキメラ抗体である。一実施形態において、ヒト化抗体は、レシピエントのHVRからの残基が、望ましい特異性、親和性及び／又は能力を有する、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）のHVRからの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、対応する非ヒト残基に置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体に見られない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに改善するために行われ得る。一般に、ヒト化抗体は、実質的に少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの全てを含み、超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、任意選択により、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部も含む。詳細については、例えば、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照されたい。例えば、Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)；Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)；並びに米国特許第6,982,321号明細書及び同第7,087,409号明細書も参照されたい。

【0073】

「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を

有するもの及び／又は本明細書に開示されるヒト抗体を作製するための技術のいずれかを使用して作製されたものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む、当技術分野で知られている様々な技術を使用して産生することができる。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)。ヒトモノクローナル抗体の調製には、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol. 147 (1):86-95 (1991)に記載されている方法も利用可能である。van Dijk及びvan de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001)も参照されたい。ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答してそのような抗体を生成するように改変されたが、その内因性遺伝子座が無効化された、トランスジェニック動物（例えば、免疫化ゼノマウス）に抗原を投与することによって調製できる（例えば、XENOMOUSE™技術に関して、米国特許第6,075,181号明細書及び同第6,150,584号明細書を参照されたい）。例えば、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を用いて生成されたヒト抗体について、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562 (2006)も参照されたい。

10

【0074】

本明細書で使用される場合、「結合する」、「と特異的に結合する」又は「に特異的な」という用語は、標的と抗体との間の結合などの測定可能で再現可能な相互作用を指し、相互作用は、生体分子を含む分子の異種集団の存在における標的の存在を決定する。例えば、標的（エピトープであり得る）に結合するか又は特異的に結合する抗体は、他の標的に結合するよりも高い親和性、結合力、容易性及び／又はより長い期間でこの標的に結合する抗体である。一実施形態において、関連しない標的への抗体の結合の度合いは、例えば、放射免疫測定法（RIA）によって測定された、標的への抗体の結合の約10%より小さい。特定の実施形態において、標的に特異的に結合する抗体は、1 μ M以下、100 nM以下、10 nM以下、1 nM以下又は0.1 nM以下の解離定数（K_d）を有する。特定の実施形態において、抗体は、異種由来のタンパク質中に保存されたタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態において、特異的な結合は、排他的結合を含み得るが、必要とはしない。

20

30

【0075】

「特異性」という用語は、抗原の特定のエピトープについての抗原結合タンパク質（キメラ受容体又は抗体構築物など）の選択的な認識を指す。例えば、天然の抗体は、単一特異性である。本明細書で使用される場合、「多重特異性」という用語は、抗原結合タンパク質が、少なくとも2つが異なる抗原又はエピトープに結合する2つ以上の抗原結合部位を有することを意味する。本明細書で使用する場合、「二重特異性」は、抗原結合タンパク質が2つの異なる抗原結合特異性を有することを意味する。本明細書で使用される場合、「単一特異性」という用語は、各々が同じ抗原又はエピトープに結合する1つ以上の結合部位を有する抗原結合タンパク質を意味する。

40

【0076】

本明細書で使用される場合、「価」という用語は、抗原結合タンパク質における特定の数の結合部位の存在を意味する。例えば、天然の抗体又は全長抗体は、2つの結合部位を有し、二価である。そのため、「三価」、「四価」、「五価」及び「六価」という用語は、抗原結合タンパク質において、それぞれ2つの結合部位、3つの結合部位、4つの結合部位、5つの結合部位及び6つの結合部位の存在を意味する。

【0077】

本明細書で使用される「キメラ抗原受容体」又は「CAR」は、T細胞などの細胞に1つ以上の抗原特異性を移植する遺伝子操作された受容体を指す。CARは、「人工T細胞受容体」、「キメラT細胞受容体」又は「キメラ免疫受容体」としても知られている。いく

50

つかの実施形態において、CARは、腫瘍抗原に特異的な抗体の細胞外可変ドメイン及びT細胞受容体又は他の受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン（1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインなど）を含む。「CAR-T」は、CARを発現するT細胞を指す。

【0078】

本明細書で使用される「T細胞受容体」又は「TCR」は、MHC分子に結合した特定の抗原ペプチドに結合する細胞外抗原結合ドメインを含む、内因性又は組換え／T細胞受容体を指す。いくつかの実施形態において、TCRは、TCR α ポリペプチド鎖及びTCR β ポリペプチド鎖を含む。いくつかの実施形態において、TCRは、腫瘍抗原に特異的に結合する。「TCR-T」は、組換え／TCRを発現するT細胞を指す。

【0079】

本明細書で使用される場合、「キメラT細胞受容体」又は「cTCR」は、特定の抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、TCR複合体の第1のサブユニットの膜貫通ドメイン又はその一部及びTCR複合体の第2のサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメイン又はその一部を含む操作された受容体を指し、TCR複合体の第1又は第2のサブユニットは、TCR α 鎖、TCR β 鎖、TCR γ 鎖、TCR δ 鎖、CD3 ϵ 、CD3 δ 又はCD3 γ である。cTCRの膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインは、TCR複合体の同じサブユニット又はTCR複合体の異なるサブユニットに由来し得る。細胞内ドメインは、天然に存在するTCRサブユニットの全長細胞内シグナル伝達ドメイン又は細胞内ドメインの一部であり得る。いくつかの実施形態において、cTCRは、TCRサブユニットの細胞外ドメイン又はその一部を含む。いくつかの実施形態において、cTCRは、TCRサブユニットの細胞外ドメインを含まない。「eTCR」は、CD3 ϵ の細胞外ドメインを含むcTCRを指す。

【0080】

ポリペプチド配列に関する「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、最大のパーセント配列同一性を達成するために、いずれの保存的置換も配列同一性の一部としてみなさずに配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後の特定のポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の割合として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN又はMEGALIGN（商標）（DNASTAR）ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用する、当技術分野内の様々な方法において達成され得る。当業者は、比較されている配列の全長にわたって最大のアラインメントを得るのに必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定できる。例えば、本明細書に記載される特定のポリペプチドに対して少なくとも70%、85%、90%、95%、98%又は99%の同一性を有し、好ましくは実質的に同じ機能を示すポリペプチド及びそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが企図される。

【0081】

「組換え」という用語は、（1）天然に存在する環境から取り出されたか、（2）遺伝子が天然に見出されるポリヌクレオチドの全部又は一部に関連していないか、（3）天然では連結されていないポリヌクレオチドに機能的に連結されているか、又は（4）天然に存在しない生体分子、例えば遺伝子又はタンパク質を指す。「組換え」という用語は、クローン化されたDNA単離物、化学的に合成されたポリヌクレオチド類似体又は異種システムによって生物学的に合成されたポリヌクレオチド類似体並びにそのような核酸によってコードされるタンパク質及び／又はmRNAに関連して使用することができる。

【0082】

「発現する」という用語は、核酸のタンパク質への翻訳を指す。タンパク質は、発現し細胞内に残るか、細胞表面膜の成分になるか、又は細胞外マトリックス又は培地に分泌され得る。

【0083】

「宿主細胞」という用語は、発現ベクターの複製又は発現をサポートすることができる細

10

20

30

40

50

胞を指す。宿主細胞は、大腸菌（*E. coli*）などの原核細胞又は酵母、昆虫細胞、両生類細胞若しくは哺乳動物細胞などの真核細胞であり得る。

【0084】

本明細書で使用される「トランスフェクトされた」、又は「形質転換された」、又は「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞にトランスファー又は導入されるプロセスを指す。「トランスフェクトされた」、又は「形質転換された」、又は「形質導入された」細胞は、外因性核酸をトランスフェクトされた、形質転換された又は形質導入された細胞である。

【0085】

「インビボ」という用語は、細胞が得られる生物の体内を指す。「エクスビボ」又は「インビトロ」は、細胞が得られる生物の体外を意味する。

【0086】

「細胞」という用語は、一次対象細胞及びその子孫を含む。

【0087】

CD3を発現する細胞に関連して本明細書で使用される場合、「活性化」は、細胞増殖及びサイトカイン産生を含むが、これらに限定されないCD3シグナル伝達経路の下流のエフェクター機能において検出可能な増大を誘導するように十分に刺激された細胞の状態を指す。

【0088】

本明細書で使用される場合、「自己」という用語は、後にその個体に再導入される同じ個体に由来する任意の材料を指すものとする。

【0089】

「同種他家」は、同じ種の異なる個体に由来する移植片を指す。

【0090】

本明細書で使用される場合、「枯渇させる」は、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも99%又は100%の低減を含む。

【0091】

タンパク質の一部を指す際の「ドメイン」という用語は、タンパク質を構成する1つ以上のポリペプチドの構造的及び／又は機能的に関連する部分を含むものとする。例えば、免疫細胞受容体の膜貫通ドメインは、膜にわたる受容体の各ポリペプチド鎖の部分の指し得る。ドメインは、単一ポリペプチド鎖の関連する部分も指し得る。例えば、単量体受容体の膜貫通ドメインは、膜にわたる受容体の単一ポリペプチド鎖の部分の指し得る。ドメインは、ポリペプチドの1つのみの部分も含み得る。

【0092】

本明細書で使用される場合、「単離された核酸」という用語は、ゲノム、cDNA又は合成起源若しくはその一部の組み合わせの核酸を意味するものとし、その起源のために、「単離された核酸」は、（1）自然界で「単離された核酸」が見出されるポリヌクレオチドの全て又は一部と結合していないか、（2）自然界で連結していないポリヌクレオチドと作動可能に連結しているか、又は（3）より大きい配列の一部として自然界に存在していない。

【0093】

別段の指定がない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重バージョンであり、且つ同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。タンパク質又はRNAをコードするヌクレオチド配列という語句は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列がいくつかのバージョンにおいてイントロンを含有し得る範囲までイントロンを含み得る。

【0094】

「作動可能に連結される」という用語は、調節配列と核酸配列との間における後者の発現をもたらす機能的な連結を指す。例えば、第1の核酸配列は、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的な関係に置かれるとき、第2の核酸配列と作動可能に連結されている。例

10

20

30

40

50

例えば、プロモーターは、プロモーターがコード配列の転写又は発現に影響を及ぼす場合にコード配列と作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結されたDNA配列は、連続的であり、且つ2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合、同じ読み枠にある。

【0095】

「誘導性プロモーター」という用語は、その活性が1つ以上の特定のシグナルを付加又は除去することによって調節され得るプロモーターを指す。例えば、誘導性プロモーターは、条件の特定のセットの下、例えばプロモーターを活性化し、且つ／又はプロモーターの抑制を解放する誘導剤又は条件の存在下において、作動可能に連結された核酸の転写を活性化し得る。

10

【0096】

本明細書で使用される場合、「処置」又は「処置する」は、臨床結果を含む有益な又は望ましい結果を得るためのアプローチである。本発明のために、有益な又は望ましい臨床結果としては、以下の1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない：疾患に起因する1つ以上の症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の安定化（例えば、疾患の悪化の予防又は遅延）、疾患の拡散（例えば、転移）の予防又は遅延、疾患の再発の予防又は遅延、疾患の進行の遅延又は緩徐化、病状の改善、疾患の寛解（部分的又は全体的）の提供、疾患を処置するのに必要となる1つ以上の他の薬物の用量の減少、疾患の進行の遅延、生活の質の上昇又は向上、体重増加の増大及び／又は生存の延長。疾患の病理学的結果（例えば、癌における腫瘍体積など）の低減も「処置」に包含される。本発明の方法は、処置のこれらの態様のいずれか1つ以上を企図する。

20

【0097】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」又は「薬理学的に適合性の」は、生物学的に又は他の点で望ましくないことはない材料を意味し、例えば、材料は、患者に投与される医薬組成物に組み込まれ得、何らかの重大な望ましくない生物学的作用を引き起こすことも、又は材料が含有される組成物の他の構成成分のいずれかと有害な様式で相互作用することもない。薬学的に許容される担体又は賦形剤は、要求される毒性学的基準及び製造試験基準を好ましくは満たし、且つ／又は米国食品医薬品局によって作成された *Inactive Ingredient Guide* に含まれる。

30

【0098】

1つ以上のさらなる薬剤「と組み合わせた」投与は、同時の投与及び任意の順序での逐次的な投与を含む。

【0099】

「同時の」という用語は、投与の少なくとも一部が時間的に重複するか、又は一方の治療剤の投与が他方の治療剤の投与と比較して短い時間内に行われる、2つ以上の治療剤の投与を指すために本明細書で使用される。例えば、2つ以上の治療剤は、約10、5又は1分以下のいずれかなどの約15分以下の時間間隔で投与される。

【0100】

「逐次的に」という用語は、1つ以上の治療剤の投与が1つ以上の他の薬剤の投与を中断した後に続く、2つ以上の治療剤の投与を指すために本明細書で使用される。例えば、2つ以上の薬剤は、約20、30、40、50若しくは60分、1日、2日、3日、1週間、2週間若しくは1ヶ月又はそれよりも長いもののいずれかなど、約15分を超える時間間隔で投与される。

40

【0101】

処置のための「対象」又は「個体」は、ヒト、飼育動物及び家畜並びに動物園の動物、スポーツ動物又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、雌ウシなどを含む哺乳動物として分類される任意の動物を指す。

【0102】

本明細書に記載の発明の実施形態は、「からなる」及び／又は「本質的にからなる」実施形態を含むことが理解される。

50

【0103】

本明細書における「約」のついた値又はパラメータへの言及は、その値又はパラメータ自体を対象とする変形形態を含む（且つ説明する）。例えば、「約X」に言及する説明は、「X」の説明を含む。

【0104】

本明細書で使用される場合、「ない」のついた値又はパラメータへの言及は、一般に、値又はパラメータ「以外の」を意味し、説明する。例えば、方法がXタイプの癌を処置するために用いられないことは、方法がX以外のタイプの癌を処置するために用いられることを意味する。

【0105】

本明細書及び添付した請求項において使用される場合、文脈上明確に別段の指示がない限り、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その」は、複数の指示対象を含む。

【0106】

「A及び／又はB」などの語句に本明細書で使用される「及び／又は」という用語は、A及びBの両方；A又はB；A（単独）；並びにB（単独）を含むことが意図される。同様に、「A、B及び／又はC」などの語句に本明細書で使用される「及び／又は」という用語は、以下の実施形態の各々を包含することが意図される：A、B及びC；A、B又はC；A又はC；A又はB；B又はC；A及びC；A及びB；B及びC；A（単独）；B（単独）；並びにC（単独）。

【0107】

認識分子を含む操作された免疫細胞

本出願は、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞を提供し、標的分子は、細胞外ドメインを含み、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができる。一態様において、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、及び免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができる。別の態様において、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、及び操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。

【0108】

本明細書に記載される認識分子は、操作された免疫細胞の表面上に存在する分子を含有する任意の結合部分であり得る。いくつかの実施形態において、認識分子は、結合部分、膜貫通ドメイン及びシグナル伝達ドメインを含む細胞外ドメインを含む免疫細胞受容体分子である。好適な免疫細胞受容体としては、例えば、キメラ抗原受容体及びキメラT細胞受容体が挙げられる。

【0109】

いくつかの実施形態において、結合部分は、抗体又はそのフラグメントである。いくつかの実施形態において、結合部分は、ペプチドリガンドである。

【0110】

いくつかの実施形態において、標的細胞の細胞外ドメインの遠位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約0.5倍を超える（例えば、約1倍を超える、約1.5倍、2倍又はそれを上回って超える）。いくつかの実施形態において、標的細胞の細胞外ドメインの近位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約2倍以下（例えば、約1.5倍以下又は約1倍以下）である。

【0111】

いくつかの実施形態において、細胞外ドメインの遠位部分は、標的細胞の膜から少なくとも約30 Å（例えば、少なくとも約40、60、90、120 Å以上）離れている。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態において、細胞外ドメインの近位部分は、標的細胞の膜から約 120 Å 以下（例えば、約 100、90、80、70 又は 60 Å 以下）にある。

【0112】

いくつかの実施形態において、標的分子の細胞外ドメインは、例えば、少なくとも約 110、120、130、140、150、160、170、175、180、190 又は 200 アミノ酸長を含む、少なくとも約 100 アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、標的分子の細胞外ドメインは、2 つ以上、3 つ以上、4 つ以上、5 つ以上、6 つ以上、7 つ以上又は 8 つ以上の IgG 様ドメインを含む。いくつかの実施形態において、標的分子は、膜貫通受容体である。

【0113】

本明細書に記載される好適な標的分子としては、CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5 及び CD20 が挙げられるが、これらに限定されない。標的分子は、その細胞外ドメイン中に 2 つ以上のリピート（例えば、Ig 様ドメイン）を有し得る。

【0114】

表面抗原分類 4 としても知られる CD4 は、免疫細胞、特に CD4+ 又はヘルパー T 細胞の表面上に見出される糖タンパク質である。CD4 は、HIV-1 の進入及び感染に必要な重要な細胞表面分子である。HIV-1 の進入は、ウイルスエンベロープ (Env) 糖タンパク質 gp120 と、T 細胞受容体 CD4 のドメイン 1 (D1) との相互作用によって誘発される。HIV 感染が進行するにつれて、より多くの CD4+ T 細胞がウイルスによって標的化され、破壊され、次第に易感染性免疫系をもたらし；したがって CD4+ T 細胞数が個体における HIV/AIDS の進行及び段階の代用として使用される。さらに、HIV 遺伝子産物である Env、Vpu 及び Nef は、HIV 感染中に CD4 の下方制御に関与する (Tanaka, M., et al. Virology (2003) 311 (2) : 316-325 を参照されたい)。

【0115】

CD4 は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、4 つの細胞外免疫グロブリンドメインを有する。図 12 に示されるとおり、CD4 の細胞外ドメインは、N 末端から C 末端に、Ig 様 V 型ドメイン（「ドメイン 1」又は D1；アミノ酸残基 26~125）、Ig 様 C2 型 1 ドメイン（「ドメイン 2」又は D2；アミノ酸残基 126~203）、Ig 様 C2 型 2 ドメイン（「ドメイン 3」又は D3；アミノ酸残基 204~317）及び Ig 様 C2 型 3 ドメイン（「ドメイン 4」又は D4；アミノ酸残基 318~374）（アミノ酸残基位置は、ヒト CD4 の全長アミノ酸配列 (UniProtKB ID: P01730)、例えば配列番号 45 に基づく）を含む。D1 及び D3 は、免疫グロブリン可変ドメインとの類似性を示すが、D2 及び D4 は、免疫グロブリン定常ドメインとの類似性を示す。

【0116】

B 細胞受容体 CD22 としても知られる CD22 は、シアル化糖タンパク質（例えば、CD45）に結合し、且つ B 細胞/B 細胞相互作用を媒介する細胞表面受容体である。図 12 に示されるとおり、CD22 の細胞外ドメインは、N 末端から C 末端に、Ig 様 V 型ドメイン（「ドメイン 1」又は「D1」；アミノ酸残基 20~138）、Ig 様 C2 型 1 ドメイン（「ドメイン 2」又は「D2」；アミノ酸残基 143~235）、Ig 様 C2 型 2 ドメイン（「ドメイン 3」又は「D3」；アミノ酸残基 242~326）、Ig 様 C2 型 3 ドメイン（「ドメイン 4」又は「D4」；アミノ酸残基 331~416）、Ig 様 C2 型 4 ドメイン（「ドメイン 5」又は「D5」；アミノ酸残基 419~500）、Ig 様 C2 型 5 ドメイン（「ドメイン 6」又は「D6」；アミノ酸残基 505~582）及び Ig 様 C2 型 6 ドメイン（「ドメイン 7」又は「D7」；アミノ酸残基 593~676）（アミノ酸残基位置は、ヒト CD22 の全長アミノ酸配列 (UniProtKB ID: P20273)、例えば配列番号 66 に基づく）を含む 7 つの Ig 様ドメインを有する。

【0117】

10

20

30

40

50

2型補体受容体(CR2)としても知られるCD21は、ヒトB細胞及びT細胞上のエプスタイン・バーウイルス並びにHNRPVのための補体C3に関する受容体である。CD21は、Bリンパ球活性化に関与する。CD21の細胞外ドメインは、N末端からC末端に、Sushi1(アミノ酸残基21~84)、Sushi2(アミノ酸残基89~148)、Sushi3(アミノ酸残基152~212)、Sushi4(アミノ酸残基213~273)、Sushi5(アミノ酸残基274~344)、Sushi6(アミノ酸残基349~408)、Sushi7(アミノ酸残基409~468)、Sushi8(アミノ酸残基469~524)、Sushi9(アミノ酸残基525~595)、Sushi10(アミノ酸残基600~659)、Sushi11(アミノ酸残基660~716)、Sushi12(アミノ酸残基717~781)、Sushi13(アミノ酸残基786~845)、Sushi14(アミノ酸残基849~909)及びSushi15(アミノ酸残基910~970)(アミノ酸残基位置は、ヒトCD21の全長アミノ酸配列(UniProtKB ID:P20023)に基づく)を含む15個のSushiドメインを有する。

10

【0118】

腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー8(TNFRSF8)としても知られるCD30は、TNFSF8/CD30Lに関する受容体である。CD30は、細胞増殖の調節及び活性化リンパ芽球の形質転換において役割を果たし得る。それは、NF-κBの活性化を介して遺伝子発現を調節する。CD30の細胞外ドメインは、N末端からC末端に、TNFR-Cysドメイン1(アミノ酸残基28~66)、TNFR-Cysドメイン2(アミノ酸残基68~106)、TNFR-Cysドメイン3(アミノ酸残基107~150)、TNFR-Cysドメイン4(アミノ酸残基205~241)、TNFR-Cysドメイン5(アミノ酸残基243~281)及びTNFR-Cysドメイン6(アミノ酸残基282~325)(アミノ酸残基位置は、ヒトCD30の全長アミノ酸配列(UniProtKB ID:P28908)に基づく)を含む6つのTNFR-Cysドメインを有する。

20

【0119】

不活性チロシンプロテインキナーゼ膜貫通受容体ROR1としても知られるROR1は、下流NFκBシグナル伝達経路を活性化するリガンドWNT5Aに関する受容体であり、WNT3A媒介シグナル伝達の阻害をもたらす得る。ROR1の細胞外ドメインは、N末端からC末端に、Ig様C2型ドメイン(アミノ酸残基42~147)、FZドメイン(アミノ酸残基165~299)及びクリングルドメイン(アミノ酸残基312~391)(アミノ酸残基位置は、ヒトROR1の全長アミノ酸配列(UniProtKB ID:Q01973)に基づく)を含む様々なサブドメインを含む。

30

【0120】

T細胞表面糖タンパク質CD5としても知られるCD5は、T細胞増殖を調節する際に受容体として作用し得る。CD5の細胞外ドメインは、N末端からC末端に、SRCR1(アミノ酸残基35~133)、SRCR2(アミノ酸残基159~268)及びSRCR3(アミノ酸残基276~368)(アミノ酸残基位置は、ヒトCD5の全長アミノ酸配列(UniProtKB ID:P06127)に基づく)を含む3つのSRCRドメインを有する。

40

【0121】

Bリンパ球抗原CD20又はMS4A1としても知られるCD20は、Bリンパ球の発生、分化及び活性化に必要な細胞へのカルシウムの流入の調節において役割を果たすBリンパ球に特異的な膜タンパク質である。CD20は、アミノ酸残基79~84及び142~188(アミノ酸残基位置は、ヒトCD20の全長アミノ酸配列(UniProtKB ID:P11836)に基づく)で2つの細胞外ドメインを有する。

【0122】

標的細胞は、標的分子(本明細書に記載される例示的な標的分子など)を発現する任意の細胞であり得る。いくつかの実施形態において、標的細胞は、免疫細胞である。いくつか

50

の実施形態において、標的細胞は、腫瘍細胞である。

【0123】

標的分子の細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合する結合部分を含む認識分子（「遠位部分認識分子」）

本出願は、いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞を提供し、標的分子は、細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的分子の細胞外ドメインの近位部分に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞と比較して、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を少なくとも2倍、例えば少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍又はそれを超えて死滅させることができる。

10

【0124】

結合部分は、s d A b（例えば、V H H）、s c F v、F a b'、（F a b'）₂、F v又はペプチドリガンドであり得るが、これらに限定されない。

【0125】

本発明者らは、抗C D 4 D 1免疫細胞受容体（即ちC D 4のドメイン1を特異的に認識する結合部分を有する免疫細胞受容体）を含有する操作された免疫細胞がそれら自体を死滅させ得ることを実証した。本発明者らは、抗C D 2 2 D 1～4免疫細胞受容体（即ちC D 2 2のドメイン1～4を特異的に認識する結合部分を有する免疫細胞受容体）を含有する操作された免疫細胞がそれら自体を死滅させ得ることをさらに実証した。理論に拘束されるものではないが、操作された免疫細胞中の抗C D 4 D 1部分及び抗C D 2 2 D 1～4部分は、同じ細胞上の固有のC D 4又はC D 2 2から遠すぎて、それぞれ別の操作された免疫細胞によるC D 4のドメイン1又はC D 2 2のドメイン1～4の認識を遮断できないため、操作された免疫細胞の死滅をもたらし得ると考えられる。同様に、標的分子の遠位部分に結合する結合部分を有する他の認識分子は、本明細書に記載される抗C D 4 D 1及び抗C D 2 2 D 1～4と同じ特性を有するであろう。したがって、これらの認識分子は、免疫細胞受容体を発現する自己細胞を除去することが望ましい自己療法に特に有用である。

20

30

【0126】

いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約50アミノ酸以上離れている細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。「細胞外ドメインのC末端」は、細胞外ドメインのC末端を直接的に指し、標的分子上の「膜近傍残基」とも称される。標的分子が膜貫通受容体であるとき、膜近傍残基の直後に膜貫通ドメイン中の最初の残基が続く。遠位部分認識分子は、標的分子と共発現させたとき、他の結合部位が標的分子に結合することを阻害できないように、標的分子の膜近傍残基から十分に離れた領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150アミノ酸以上離れている細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。

40

【0127】

いくつかの実施形態において、結合部分は、標的分子の細胞外ドメインのN末端から約130アミノ酸以内（約120、110、100、90、80、70、60、50、40又は30のいずれか以内など）の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、標的分子の細胞外ドメインのN末端から、以下の領域：アミノ酸残基26～125、26～46、46～66、66～86、86～106及び106～125のいずれか1つ以上内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、

50

結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約80アミノ酸以内の領域（例えば、エピトープ）に結合する。

【0128】

いくつかの実施形態において、標的分子は、3つ以上のIg様ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初のIg様ドメインの外部の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメイン内の領域（例えば、エピトープ）に結合する。

【0129】

いくつかの実施形態において、認識分子の結合部分は、約0.1 pM～約500 nM（これらの値間のいずれかの値及び範囲を含む、約0.1 pM、1.0 pM、10 pM、50 pM、100 pM、500 pM、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM又は500 nMのいずれかなど）で標的分子に結合する。

【0130】

抗CD22 D1～4 結合部分

いくつかの実施形態において、抗CD22 D1～4 認識分子のCD22 結合部分は、約0.1 pM～約500 nM（これらの値間のいずれかの値及び範囲を含む、約0.1 pM、1.0 pM、10 pM、50 pM、100 pM、500 pM、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM又は500 nMのいずれかなど）のK_dを有してCD22のドメイン1～4（D1～4）に結合する。いくつかの実施形態において、CD22は、ヒトCD22である。いくつかの実施形態において、CD22は、配列番号66のアミノ酸配列を含む。

【0131】

いくつかの実施形態において、抗CD22 D1～4 結合部分は、CD22のD1中のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗CD22 D1～4 結合部分は、CD22のD2中のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗CD22 D1～4 結合部分は、CD22のD3中のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗CD22 D1～4 結合部分は、CD22のD4中のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗CD22 D1～4 結合部分は、CD22のD1～D4の中のいずれか2つ以上のドメインを架橋するエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗CD22 D1～4 結合部分は、配列番号66のアミノ酸残基20～416内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗CD22 D1～4 結合部分は、配列番号66の以下の領域：アミノ酸残基20～138、143～235、242～326及び331～416のいずれか1つ以上内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、CD22は、ヒトCD22である。

【0132】

いくつかの実施形態において、CD22 結合部分は、CD22の細胞外ドメインのC末端から少なくとも約50アミノ酸残基、例えば少なくとも約60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240又は260アミノ酸残基のいずれか1つ（これらの値間のいずれかの値及び範囲を含む）だけ離れているエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、CD22 結合部分は、CD22の細胞外ドメインのN末端から約400、380、360、340、320、300、280、260、240、220、200、180、160、140、120、100、90、80、70、60、50以下のいずれか1つのアミノ酸残基（これらの値間のいずれかの値及び範囲を含む）内のエピトープに結合する。

【0133】

いくつかの実施形態において、CD22 結合部分は、CD22を発現する標的細胞の膜から少なくとも約30、40、50、60、70、80、90、100、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260 Å以上離れているCD22分子のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、CD22 結合部分は、CD22を発現する標的細胞の膜から約3

10

20

30

40

50

0～40、40～80、80～120、120～160、160～200、200～240、240～270、30～80、30～120、60～120、60～160、60～100、90～120、100～200、100～150又は30～270 Å 離れているCD22分子のエピトープに結合する。

【0134】

いくつかの実施形態において、D1～D4中のCD22エピトープからの距離は、操作された免疫細胞のCD22結合部分から膜までの距離の約0.5倍超、1倍超、1.5倍超、2倍超、2.5倍超、3倍以上（これらの値間いずれかの値及び範囲を含む）である。

【0135】

いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、例えば、米国特許第9139649号明細書に記載されるとおりのRFB4又はそのヒト化変異体に由来する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、RFB4に対する結合について競合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、RFB4のものと同一又は重複している結合エピトープに結合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、RFB4又はそのヒト化変異体の1、2、3、4、5又は6つの重鎖及び軽鎖相補性決定領域（CDR）を含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、RFB4又はそのヒト化変異体の重鎖可変ドメイン（VH）及び／又は軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。

10

【0136】

いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、例えば、米国特許第7074403号明細書又は米国特許第9139649号明細書に記載されるとおりのエブラツズマブ又はそのバイオシミラーに由来する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、エブラツズマブに対する結合について競合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、エブラツズマブのものと同一又は重複している結合エピトープに結合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、エブラツズマブの1、2、3、4、5又は6つの重鎖及び軽鎖相補性決定領域（CDR）を含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、エブラツズマブの重鎖可変ドメイン（VH）及び／又は軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。

20

【0137】

いくつかの実施形態において、抗CD22 D1～4認識分子のCD22結合部分は、CD22のドメイン1～4（D1～4）内のエピトープに特異的に結合するか（「抗CD22 D1～4抗体」）、又は参照抗CD22 D1～4抗体の結合エピトープと重複する、CD22のD1～4中のエピトープに結合する参照抗体と結合について競合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、参照抗CD22 D1～4抗体のものと同一重鎖及び軽鎖CDR配列を含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、参照抗CD22 D1～4抗体のVH配列と少なくとも約80%（少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%など）の配列同一性を有するVH配列及び／又は参照抗CD22 D1～4抗体の軽鎖可変配列と少なくとも約80%（少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%など）の配列同一性を有するVL配列を含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、参照抗CD22 D1～4抗体のものと同一重鎖及び軽鎖可変配列を含む。

30

40

【0138】

CD22のドメイン1～4を特異的に認識することが知られている任意の抗体は、hLL2（エブラツズマブ）、イノツズマブ（Pfizer、Groningen、Conn.）、BL22（Cambridge Antibody Technology Group、Cambridge、England）、HA22（Cambridge Antibody Technology Group、Cambridge、England）、HB22.7（Duke University、Durham、N.C.）及びRFB4（例えば、Invitrogen、Grand Island、N.Y.；Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、Calif.）を含むが、これらに限定されない参照抗体として機能し得る。

50

【0139】

いくつかの実施形態において、参照抗体は、RFB4又はそのヒト化変異体である。いくつかの実施形態において、参照抗CD22 D1～4抗体は、配列番号67のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1（HC-CDR1）、配列番号68のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2（HC-CDR2）、配列番号69のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3（HC-CDR3）、配列番号70のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1（LC-CDR1）、配列番号71のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2（LC-CDR2）及び配列番号72のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3（LC-CDR3）を含む。いくつかの実施形態において、参照抗CD22 D1～4抗体は、配列番号73のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（VH）及び配列番号74のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。

10

【0140】

いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、配列番号67を含むHC-CDR1、配列番号68を含むHC-CDR2、配列番号69を含むHC-CDR3を含むVH；並びに配列番号70を含むLC-CDR1、配列番号71を含むLC-CDR2及び配列番号72を含むLC-CDR3を含むVLを含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、配列番号73のHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含むVH並びに配列番号74のLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含むVLを含む。いくつかの実施形態において、CD22抗原結合部分は、配列番号73と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVH及び配列番号74と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、配列番号73を含むVH及び配列番号74を含むVLを含む。

20

【0141】

標的分子の細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合する結合部分を含む認識分子（「近位部分認識分子」）

本出願は、いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞を提供し、標的分子は、細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的分子の細胞外ドメインの遠位末端に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞と比較して、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を約20%以下だけ死滅させる。

30

【0142】

結合部分は、sdAb（例えば、VHH）、scFv、Fab'、（Fab'）₂、Fv又はペプチドリガンドであり得るが、これらに限定されない。

40

【0143】

本発明者らは、抗CD4 D2/D3免疫細胞受容体（即ちCD4のドメイン2/3を特異的に認識する結合部分を有する免疫細胞受容体）を含有する操作された免疫細胞がそれら自体を死滅させることができないことを実証した。本発明者らは、抗CD22 D5～7免疫細胞受容体（即ちCD22のドメイン5～7を特異的に認識する結合部分を有する免疫細胞受容体）を含有する操作された免疫細胞がそれら自体を死滅させることもできないことをさらに実証した。理論に拘束されるものではないが、操作された免疫細胞中の抗CD4 D2/D3部分及び抗CD22 D5～7部分は、同じ細胞上の固有のCD4又はCD22から適切な距離内にあり、それぞれ別の操作された免疫細胞によるCD4のD

50

2 / 3 又は CD 2 2 の D 5 ~ 7 の認識を遮断するため、操作された免疫細胞を攻撃から保護し得ると考えられる。同様に、標的分子の近位部分に結合する結合部分を有する他の認識分子は、本明細書に記載される抗 CD 4 D 2 / D 3 及び抗 CD 2 2 D 5 ~ 7 分子と同じ特性を有するであろう。したがって、これらの認識分子は、認識分子を含む細胞が処置全体にわたって持続することが望ましい同種他家療法に特に有用である。

【0144】

いくつかの実施形態において、結合部分は、標的分子の細胞外ドメインの N 末端から約 80 (約 85、90、100、110、120 又はそれを超えるもののいずれかなど) アミノ酸離れている領域の外部に結合する。

【0145】

いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインの C 末端から約 120 (115、110、105 又は 102 など) アミノ酸以内の細胞外ドメイン中の領域 (例えば、エピトープ) に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインの C 末端から約 120 (102、100、90、80、70、60 又は 50 など) アミノ酸以内の細胞外ドメイン中の領域 (例えば、エピトープ) に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインの C 末端から約 50 アミノ酸以内の細胞外ドメイン中の領域 (例えば、エピトープ) に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、標的分子の細胞外ドメインの C 末端から、以下の領域 (例えば、エピトープ) : アミノ酸残基 26 ~ 125、26 ~ 46、46 ~ 66、66 ~ 86、86 ~ 106 及び 106 ~ 125 のいずれか 1 つ以上内のエピトープに結合する。

【0146】

いくつかの実施形態において、標的分子の細胞外ドメインは、2 つ以上の Ig 様ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの N 末端の最初の Ig 様ドメインの外部の領域に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子の細胞外ドメインは、2 つ以上の Ig 様ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの N 末端の最初の Ig 様ドメイン以内の領域 (例えば、エピトープ) に結合する。

【0147】

いくつかの実施形態において、認識分子の結合部分は、約 0.1 pM ~ 約 500 nM (これらの値間のいずれかの値及び範囲を含む、約 0.1 pM、1.0 pM、10 pM、50 pM、100 pM、500 pM、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM 又は 500 nM のいずれかなど) で標的分子に結合する。

【0148】

抗 CD 2 2 D 5 ~ 7 結合部分

いくつかの実施形態において、抗 CD 2 2 D 5 ~ 7 認識分子の CD 2 2 結合部分は、約 0.1 pM ~ 約 500 nM (これらの値間のいずれかの値及び範囲を含む、約 0.1 pM、1.0 pM、10 pM、50 pM、100 pM、500 pM、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM 又は 500 nM のいずれかなど) の K_d を有して CD 2 2 の D 5 ~ 7 に結合する。いくつかの実施形態において、CD 2 2 は、ヒト CD 2 2 である。いくつかの実施形態において、CD 2 2 は、配列番号 66 のアミノ酸配列を含む。

【0149】

いくつかの実施形態において、抗 CD 2 2 D 5 ~ 7 結合部分は、CD 2 2 の D 5 中のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗 CD 2 2 D 5 ~ 7 結合部分は、CD 2 2 の D 6 中のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗 CD 2 2 D 5 ~ 7 結合部分は、CD 2 2 の D 7 中のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗 CD 2 2 D 5 ~ 7 結合部分は、CD 2 2 の D 5 ~ D 7 の中のいずれか 2 つ以上のドメインを架橋するエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗 CD 2 2 D 5 ~ 7 結合部分は、配列番号 66 のアミノ酸残基 419 ~ 676 内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗 CD 2 2 D 5 ~ 7 免疫細胞受容体の CD 2 2 結合部分は、配列番号 66 の以下の領域 : アミノ酸残基 419 ~ 500、505 ~ 582 及び 593 ~ 676 のいずれか 1 つ以上内のエピトープに結合する。

【0150】

いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、CD22の細胞外ドメインのN末端から少なくとも約80アミノ酸残基、例えば少なくとも約90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400以上のアミノ酸残基のいずれか1つ（これらの値間のいずれかの値及び範囲を含む）だけ離れているエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、CD22の細胞外ドメインのC末端から約260、240、220、200、180、160、140、120、100、90、80、70、60、50以下のいずれか1つのアミノ酸残基（これらの値間のいずれかの値及び範囲を含む）内のエピトープに結合する。

10

【0151】

いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、CD22を発現する標的細胞の膜から約140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30 Å以下離れているCD22分子のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、CD22を発現する標的細胞の膜から約0～30、0～40、0～80、0～120、30～60、60～80、80～120、40～80又は30～120 Å離れているCD22分子のエピトープに結合する。

【0152】

いくつかの実施形態において、D5～D7中のCD22エピトープからの距離は、操作された免疫細胞のCD22結合部分から膜までの距離の約2倍以下、1.75倍以下、1.5倍以下、1.25倍以下、1倍以下（これらの値間いずれかの値及び範囲を含む）である。

20

【0153】

いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、例えば、米国特許第10494435号明細書に記載されるとおりのm971又はm972に由来する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、m971に対する結合について競合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、m971のものと同一又は重複している結合エピトープに結合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、m971の1、2、3、4、5又は6つの重鎖及び軽鎖相補性決定領域（CDR）を含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、m971のVH及び／又はVLを含む。

30

【0154】

いくつかの実施形態において、抗CD22 D5～7認識分子のCD22結合部分は、CD22のD5～7内のエピトープに特異的に結合するか（「抗CD22 D5～7抗体」）、又は参照抗CD22 D5～7抗体の結合エピトープと重複する、CD22のD5～7中のエピトープに結合する参照抗体と結合について競合する。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体のものと同一重鎖及び軽鎖CDR配列を含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体のVH配列と少なくとも約80%（少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%など）の配列同一性を有するVH配列及び／又は参照抗CD22 D5～7抗体の軽鎖可変配列と少なくとも約80%（少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%など）の配列同一性を有するVL配列を含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体のものと同一重鎖及び軽鎖可変配列を含む。

40

【0155】

CD22のドメインD5～7を特異的に認識することが知られているいずれかの抗体は、m971及びm972を含むが、これらに限定されない参照抗体として機能し得る。いくつかの実施形態において、参照抗体は、m971である。いくつかの実施形態において、参照抗CD22 D5～7抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号77のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、配列番号78のアミノ酸配列を含むHC-CDR3、配列番号79のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号80のア

50

ミノ酸配列を含むLC-CDR2及び配列番号81のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含む。いくつかの実施形態において、参照抗CD22 D5～7抗体は、配列番号82のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号83のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0156】

いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、配列番号76を含むHC-CDR1、配列番号77を含むHC-CDR2、配列番号78を含むHC-CDR3を含むVH；並びに配列番号79を含むLC-CDR1、配列番号80を含むLC-CDR2及び配列番号81を含むLC-CDR3を含むVLを含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、配列番号82のHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含むVH並びに配列番号83のLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含むVLを含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、配列番号82と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVH及び配列番号83と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの実施形態において、CD22結合部分は、配列番号82を含むVH及び配列番号83を含むVLを含む。

10

【0157】

認識分子の構造

認識分子は、操作された免疫細胞の表面上に存在するいずれかの結合部分含有分子であり得る。操作された免疫細胞は、いくつかの実施形態において、認識分子又はその一部をコードする1つ以上の核酸を含む。本節の議論は、遠位部分認識分子及び近位部分認識分子の両方に適用される。

20

【0158】

いくつかの実施形態において、認識分子は、結合部分（上の節に記載される結合部分）を含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む免疫細胞受容体などの免疫細胞受容体である。いくつかの実施形態において、細胞外ドメイン中の結合部分は、膜貫通ドメインに直接的又は間接的に融合される。例えば、認識分子（これに関連して免疫細胞受容体とも称される）は、N末端からC末端に、結合部分、任意選択のリンカー（例えば、ヒンジ配列又はTCRサブユニットの細胞外ドメイン）、膜貫通ドメイン、任意選択のリンカー（例えば、共刺激ドメイン）及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む単一ポリペプチドであり得る。

30

【0159】

いくつかの実施形態において、細胞外ドメイン中の結合部分は、膜貫通ドメインを含むポリペプチドに非共有結合的に結合される。これは、例えば、一方が結合部分に融合され、他方が膜貫通ドメインに融合された結合対の2つのメンバーを使用して達成され得る。2つの構成要素は、結合対の2つのメンバーの相互作用を介して引き合わせられる。例えば、認識分子（これに関連して免疫細胞受容体とも称される）は、i) 結合部分及び結合対の第1のメンバーを含む第1のポリペプチド；並びにii) 結合対の第2のメンバーを含む第2のポリペプチドを含む細胞外ドメインを含み得、第1のメンバー及び第2のメンバーは、互いに非共有結合的に結合し、結合対の第2のメンバーは、膜貫通ドメインに直接的又は間接的に融合される。好適な結合対としては、ロイシンジッパー、ビオチン／ストレプトアビジン、MICリガンド／iNKG2Dなどが挙げられるが、これらに限定されない。Celsh 173, 1426-1438, Oncoimmunology, 2018; 7(1): e1368604、米国特許第10259858B2号明細書を参照されたい。いくつかの実施形態において、結合部分は、膜貫通ドメインを含むポリペプチドに融合される。

40

【0160】

いくつかの実施形態において、認識分子は、一価であり、即ち1つの結合部分を有する。いくつかの実施形態において、認識分子は、多価であり、即ち2つ以上の結合部分を有す

50

る。

【0161】

本明細書に記載される認識分子は、単一特異性であり得る。いくつかの実施形態において、認識分子は、多重特異性である。例えば、いくつかの実施形態において、認識分子の細胞外ドメインは、第2の抗原を特異的に認識する第2の抗原結合部分を含む。第2の抗原結合部分は、例えば、s d A b（例えば、V H H）、s c F v、F a b'、(F a b')₂、F v又はペプチドリガンドであり得る。結合部分及び第2の抗原結合部分は、タンデムに連結される。いくつかの実施形態において、結合部分は、第2の抗原結合部分のN末端である。いくつかの実施形態において、結合部分は、第2の抗原結合部分のC末端である。いくつかの実施形態において、結合部分及び第2の抗原結合部分は、リンカーを介して連結される。いくつかの実施形態において、第2の抗原結合部分は、C C R 5などのT細胞の表面上の抗原に特異的に結合する。

10

【0162】

いくつかの実施形態において、認識分子（これに関連して免疫細胞受容体とも称される）の膜貫通ドメインは、例えば、C D 2 8、C D 3 ε、C D 3 ζ、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7又はC D 1 5 4に由来する1つ以上の膜貫通ドメインを含む。

【0163】

認識分子（これに関連して免疫細胞受容体とも称される）の細胞内シグナル伝達ドメインは、いくつかの実施形態において、C D 3 ζ、F c R γ、F c R β、C D 3 γ、C D 3 δ、C D 3 ε、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b及びC D 6 6 dからなる群から選択されるタンパク質に見出されるものを含むが、これらに限定されない機能性の一次免疫細胞シグナル伝達配列を含む。「機能性の」一次免疫細胞シグナル伝達配列は、適切な受容体に作動可能に結合されるとき、免疫細胞活性化シグナルを伝達できる配列である。一次免疫細胞シグナル伝達配列のフラグメント又は変異体を含み得る「非機能性の」一次免疫細胞シグナル伝達配列は、免疫細胞活性化シグナルを伝達することができない。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、機能性の一次免疫細胞シグナル伝達配列を欠く。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、いずれかの一次免疫細胞シグナル伝達配列を欠く。

20

30

【0164】

C A R

いくつかの実施形態において、認識分子（これに関連して免疫細胞受容体とも称される）は、キメラ抗原受容体（「C A R」）である。本節の議論は、遠位部分認識分子及び近位部分認識分子の両方に適用される。

【0165】

いくつかの実施形態において、C A Rの膜貫通ドメインは、C D 8 α、C D 4、C D 2 8、4-1 B B、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 5 2及びP D 1からなる群から選択される分子に由来する。いくつかの実施形態において、C A Rの膜貫通ドメインは、C D 8 αに由来する。いくつかの実施形態において、C A Rの膜貫通ドメインは、配列番号37と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、98%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、C A Rの膜貫通ドメインは、配列番号37のアミノ酸配列を有する。

40

【0166】

いくつかの実施形態において、C A Rの細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3 ζ、F c R γ、F c R β、C D 3 γ、C D 3 δ、C D 3 ε、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b又はC D 6 6 dに由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、C A Rの一次細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3 ζに由来する。いくつかの実施形態において、C A Rの一次細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号39と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、98%、99%

50

又はそれを超えるもののいずれか1つ)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、CARの一次細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号39の配列を有する。

【0167】

いくつかの実施形態において、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態において、CARの共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83のリガンド及びそれらの組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する。いくつかの実施形態において、CARの共刺激シグナル伝達ドメインは、4-1BBの細胞質ドメインを含む。いくつかの実施形態において、CARの共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号38と少なくとも約80% (例えば、少なくとも約85%、90%、95%、98%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、CARの共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号38の配列を有する。

10

【0168】

いくつかの実施形態において、CARは、細胞外ドメインのC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、CD8 α に由来する。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、免疫グロブリン (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4及びIgD、例えばIgG4 CH2-CH3) に由来する。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、配列番号40と少なくとも約80% (例えば、少なくとも約85%、90%、95%、98%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、配列番号40のアミノ酸配列を有する。

20

【0169】

いくつかの実施形態において、配列番号75又は84と少なくとも約80% (例えば、少なくとも約85%、90%、95%、98%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCAR又はポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態において、配列番号75又は84を含むCAR又はポリペプチドが提供される。

30

【0170】

cTCR

いくつかの実施形態において、免疫細胞受容体は、キメラT細胞受容体 (「cTCR」) である。本節の議論は、遠位部分認識分子及び近位部分認識分子の両方に適用される。

【0171】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される免疫細胞受容体は、キメラTCR受容体 (「cTCR」) である。cTCRは、通常、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 及びCD3 δ などのTCRサブユニットの全長又は一部に直接的又は間接的に連結された (例えば、融合された) キメラ受容体 (CR) 抗原結合ドメインを含む。融合ポリペプチドは、他のTCRサブユニットと共に機能性TCR複合体に組み込まれ得、TCR複合体に対する抗原特異性を付与する。いくつかの実施形態において、結合ドメインは、CD3 ϵ サブユニット (「eTCR」と称される) の全長又は一部に直接的又は間接的に連結される (例えば、融合される)。cTCRの細胞内シグナル伝達ドメインは、TCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインに由来し得る。cTCRの膜貫通ドメインもTCRサブユニットに由来し得る。いくつかの実施形態において、cTCRの細胞内シグナル伝達ドメイン及び膜貫通ドメインは、同じTCRサブユニットに由来する。いくつかの実施形態において、cTCRの細胞内シグナル伝達ドメイン及び膜

40

50

貫通ドメインは、CD3 ϵ に由来する。いくつかの実施形態において、結合ドメイン及びTCRサブユニット（又はその一部）は、リンカー（GSリンカーなど）を介して融合され得る。いくつかの実施形態において、cTCRは、細胞内シグナル伝達ドメイン及び／又は膜貫通ドメインが由来するTCRサブユニットと同じであり得るか又は異なり得るTCRサブユニットの細胞外ドメイン又はその一部をさらに含む。

【0172】

いくつかの実施形態において、cTCRの膜貫通ドメインは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 及びCD3 δ からなる群から選択されるTCRサブユニットの膜貫通ドメインに由来する。いくつかの実施形態において、cTCRの膜貫通ドメインは、CD3 ϵ の膜貫通ドメインに由来する。いくつかの実施形態において、cTCRの膜貫通ドメインは、配列番号41と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、98%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、cTCRの膜貫通ドメインは、配列番号41の配列を有する。

10

【0173】

いくつかの実施形態において、cTCRの細胞内シグナル伝達ドメインは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 及びCD3 δ からなる群から選択されるTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインに由来する。いくつかの実施形態において、cTCRの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ϵ の細胞内シグナル伝達ドメインに由来する。いくつかの実施形態において、cTCRの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号42と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、98%、99%又はそれを超えるもののいずれか1つ）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、cTCRの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号42の配列を有する。

20

【0174】

いくつかの実施形態において、cTCRの膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインは、同じTCRサブユニットに由来する。いくつかの実施形態において、cTCRは、TCRサブユニットの細胞外配列の少なくとも一部をさらに含み、TCR細胞外配列は、いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン及び／又は細胞内シグナル伝達ドメインと同じTCRサブユニットに由来し得る。いくつかの実施形態において、cTCRは、全長TCRサブユニットを含む。例えば、いくつかの実施形態において、cTCRは、TCRサブユニット（例えば、CD3 ϵ ）のN末端に（直接的又は間接的に）融合された結合ドメインを含む。

30

【0175】

結合部分

本明細書に記載される結合部分は、標的分子の細胞外ドメイン中の一部を特異的に認識する抗体部分又はリガンドであり得る。本節の議論は、遠位部分認識分子及び近位部分認識分子の両方に適用される。

【0176】

いくつかの実施形態において、結合部分は、a)他の分子に関するその結合親和性の少なくとも約10（例えば、少なくとも約10、20、30、40、50、75、100、200、300、400、500、750、1000以上のいずれかを含む）倍である親和性；又はb)他の分子に対する結合に関するそのK_dの約1/10以下（約1/10、1/20、1/30、1/40、1/50、1/75、1/100、1/200、1/300、1/400、1/500、1/750、1/1000以下のいずれか以下など）のK_dを有して標的分子に特異的に結合する。結合親和性は、ELISA、蛍光標識細胞分取（FACS）分析又は放射性免疫沈降法（RIA）など、当技術分野で知られる方法によって決定され得る。K_dは、例えば、Biacoreの機器を利用する表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイ又は例えばSapidyneの機器を利用する結合平衡除外法（KinExA）など、当技術分野で知られる方法によって決定され得る。

40

50

【0177】

いくつかの実施形態において、結合部分は、標的分子に特異的に結合する Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、単鎖Fv (scFv)、単ドメイン抗体 (sdAb) 及びペプチドリガンドからなる群から選択される。

【0178】

いくつかの実施形態において、結合部分は、抗体部分である。いくつかの実施形態において、抗体部分は、単一特異性である。いくつかの実施形態において、抗体部分は、多重特異性である。いくつかの実施形態において、抗体部分は、二重特異性である。いくつかの実施形態において、抗体部分は、タンデム scFv、ダイアボディ (Db)、単鎖ダイアボディ (scDb)、二重親和性再標的化 (DART) 抗体、二重可変ドメイン (DVD) 抗体、化学的に架橋された抗体、ヘテロ多量体抗体又はヘテロコンジュゲート抗体である。いくつかの実施形態において、抗体部分は、scFvである。いくつかの実施形態において、抗体部分は、単ドメイン抗体 (sdAb) である。いくつかの実施形態において、抗体部分は、VHHである。いくつかの実施形態において、抗体部分は、ヒト抗体フレームワーク領域を有する完全ヒト半合成であるか、又はヒト化される。

10

【0179】

抗体部分は、いくつかの実施形態において、1つ以上の抗体部分（本明細書で開示される参照抗体のいずれかなど）に由来する特定の CDR 配列又は1つ以上のアミノ酸置換を含むそのような配列のある種の変異体を含む。いくつかの実施形態において、変異体配列におけるアミノ酸置換は、標的抗原に結合する抗原結合ドメインの能力を実質的に低減しない。標的抗原結合親和性を実質的に向上させるか又は標的抗原の関連する変異体との特異性及び／若しくは交差反応性などのいくつかの他の特性に影響を及ぼす改変も企図される。

20

【0180】

いくつかの実施形態において、結合部分は、約 0.1 pM～約 500 nM（これらの値間のいずれかの値及び範囲を含む、約 0.1 pM、1.0 pM、10 pM、50 pM、100 pM、500 pM、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM 又は 500 nM のいずれかなど）の K_d で標的分子に結合する。

【0181】

例示的な抗 CD22 免疫細胞受容体

30

いくつかの実施形態において、i) CD22 の D1～4 内のエピトープに特異的に結合する CD22 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 膜貫通ドメイン、及びiii) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗 CD22 D1～4 免疫細胞受容体が提供される。いくつかの実施形態において、i) CD22 の D1～4 内のエピトープに特異的に結合する CD22 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 膜貫通ドメイン、及びiii) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗 CD22 D1～4 免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞が提供される。いくつかの実施形態において、抗 CD22 D1～4 免疫細胞受容体をコードする1つ以上の核酸を含む操作された免疫細胞が提供され、抗 CD22 免疫細胞受容体は、i) CD22 の D1～4 内のエピトープに特異的に結合する CD22 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 膜貫通ドメイン、及びiii) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）又は1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）をコードする1つ以上の核酸をさらに含む。

40

【0182】

いくつかの実施形態において、i) CD22 の D5～7 内のエピトープに特異的に結合する CD22 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 膜貫通ドメイン、及びiii) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗 CD22 D5～7 免疫細胞受容体が提供される。いくつかの実施形態において、i) CD22 の D5～7 内のエピトープに特異的に結合する CD22 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 膜貫通ドメイン、及びiii) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗 CD22 D5～7 免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞が

50

提供される。いくつかの実施形態において、抗CD22 D5～7免疫細胞受容体をコードする1つ以上の核酸を含む操作された免疫細胞が提供され、抗CD22 D5～7免疫細胞受容体は、i) CD22のD5～7内のエピトープに特異的に結合するCD22結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 膜貫通ドメイン、及びiii) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）又は1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）をコードする1つ以上の核酸をさらに含む。

【0183】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗CD22免疫細胞受容体は、キメラ抗原受容体（「CAR」）である。したがって、例えば、いくつかの実施形態において、i) CD22のD1～4内のエピトープに特異的に結合するCD22結合部分（例えば、scFv又はsdAbなどの抗CD22抗体部分）を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のヒンジ配列（CD8に由来するヒンジ配列など）；iii) 膜貫通ドメイン（CD8膜貫通ドメインなど）；iv) 細胞内共刺激ドメイン（4-1BB又はCD28に由来する共刺激ドメインなど）、及びv) 細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3ζに由来する細胞内シグナル伝達ドメインなど）を含む抗CD22 D1～4 CARが提供される。いくつかの実施形態において、i) CD22のD1～4内のエピトープに特異的に結合するCD22結合部分（例えば、scFv又はsdAbなどの抗CD22抗体部分）を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のヒンジ配列（CD8に由来するヒンジ配列など）；iii) 膜貫通ドメイン（CD8膜貫通ドメインなど）；iv) 細胞内共刺激ドメイン（4-1BB又はCD28に由来する共刺激ドメインなど）、及びv) 細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3ζに由来する細胞内シグナル伝達ドメインなど）を含む抗CD22 D1～4 CARを含む操作された免疫細胞が提供される。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）又は1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）をコードする1つ以上の核酸をさらに含む。

【0184】

いくつかの実施形態において、i) CD22のD5～7内のエピトープに特異的に結合するCD22結合部分（例えば、scFv又はsdAbなどの抗CD22 D5～7抗体部分）を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のヒンジ配列（CD8に由来するヒンジ配列など）；iii) 膜貫通ドメイン（CD8膜貫通ドメインなど）；iv) 細胞内共刺激ドメイン（4-1BB又はCD28に由来する共刺激ドメインなど）、及びv) 細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3ζに由来する細胞内シグナル伝達ドメインなど）を含む抗CD22 D5～7 CARが提供される。いくつかの実施形態において、i) CD22のD5～7内のエピトープに特異的に結合するCD22結合部分（例えば、scFv又はsdAbなどの抗CD22 D5～7抗体部分）を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のヒンジ配列（CD8に由来するヒンジ配列など）；iii) 膜貫通ドメイン（CD8膜貫通ドメインなど）；iv) 細胞内共刺激ドメイン（4-1BB又はCD28に由来する共刺激ドメインなど）、及びv) 細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3ζに由来する細胞内シグナル伝達ドメインなど）を含む抗CD22 D5～7 CARを含む操作された免疫細胞が提供される。いくつかの実施形態において、i) CD22のD5～7内のエピトープに特異的に結合するCD22結合部分（例えば、scFv又はsdAbなどの抗CD22 D5～7抗体部分）を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のヒンジ配列（CD8に由来するヒンジ配列など）；iii) 膜貫通ドメイン（CD8膜貫通ドメインなど）；iv) 細胞内共刺激ドメイン（4-1BB又はCD28に由来する共刺激ドメインなど）、及びv) 細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3ζに由来する細胞内シグナル伝達ドメインなど）を含む抗CD22 D5～7 CARを含む操作された免疫細胞が提供される。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）又は1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）をコードする1つ以上の核酸をさらに含む。

10

20

30

40

50

分（例えば、s c F v又はs d A bなどの抗C D 2 2 D 5～7抗体部分）を含む細胞外ドメイン；i i）任意選択のリンカー（G Sリンカーなど）；i i i）T C Rサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部；i v）T C Rサブユニットに由来する膜貫通ドメイン、及びv）T C Rサブユニットに由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む抗C D 2 2 D 5～7 c T C Rをコードする1つ以上の核酸を含む操作された免疫細胞が提供される。いくつかの実施形態において、T C Rサブユニットは、T C R α、T C R β、T C R γ、T C R δ、C D 3 γ及びC D 3 εからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びT C Rサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、同じT C Rサブユニットに由来する。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びT C Rサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、C D 3 εに由来する。いくつかの実施形態において、抗C D 2 2 D 5～7 c T C Rは、全長C D 3 εのN末端に融合されたC D 2 2結合ドメインを含む。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）又は1つ以上の共受容体（サイトカイン受容体など）をコードする1つ以上の核酸をさらに含む。

10

【0187】

操作された免疫細胞

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）が提供され、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約50アミノ酸以上（約60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190又は200アミノ酸以上のいずれかなど）離れている細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約120アミノ酸以内（約110、100、90、80、70、60、50、40又は30アミノ酸以内のいずれかなど）の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、C D 2 2、C D 4、C D 2 1（C R 2）、C D 3 0、R O R 1、C D 5及びC D 2 0からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、C D 4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、C D 2 2である。

20

30

【0188】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）が提供され、標的分子は、3つ以上のI g様ドメインを含む細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのI g様ドメインの外部の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のI g様ドメイン内の領域に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、C D 2 2、C D 4、C D 2 1（C R 2）、C D 3 0、R O R 1、C D 5及びC D 2 0からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、C D 4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、C D 2 2である。

40

50

【0189】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び免疫細胞受容体の両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約50アミノ酸以上（約60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190又は200アミノ酸以上のいずれかなど）離れている細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約120アミノ酸以内（約110、100、90、80、70、60、50、40又は30アミノ酸以内のいずれかなど）の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

10

20

【0190】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、3つ以上のIg様ドメインを含む細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び免疫細胞受容体の両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメインの外部の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメイン内の領域に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

30

【0191】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及びCARの両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、CARは、i) 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のヒンジ配列（CD8に由来するヒンジ配列など）；iii) 膜貫通ドメイン（CD8膜貫通ドメインなど）；iv) 細胞内共刺激ドメイン（4-1BB又はCD28に由来する共刺激ドメインなど）、及びv) 細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3 ζ に由来する細胞内シグナル伝達ドメインなど）を含む。い

40

50

くつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約50アミノ酸以上（約60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190又は200アミノ酸以上のいずれかなど）離れている細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約120アミノ酸以内（約110、100、90、80、70、60、50、40又は30アミノ酸以内のいずれかなど）の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

10

【0192】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、3つ以上のIg様ドメインを含む細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及びCARの両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、CARは、i) 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のヒンジ配列（CD8に由来するヒンジ配列など）；iii) 膜貫通ドメイン（CD8膜貫通ドメインなど）；iv) 細胞内共刺激ドメイン（4-1BB又はCD28に由来する共刺激ドメインなど）、及びv) 細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3 ζ に由来する細胞内シグナル伝達ドメインなど）を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメインの外部の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメイン内の領域に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

20

30

【0193】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラT細胞受容体（cTCR）を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及びcTCRの両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、cTCRは、i) 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のリンカー（GSリンカーなど）；iii) TCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部；iv) TCRサブユニットに由来する膜貫通ドメイン、及びv) TCRサブユニットに由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、TCRサブユニットは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 及びCD3 ϵ からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、同じTCRサブユニットに由来する。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、CD3 ϵ に由来する。いくつかの実施形態において、cTCRは、全長CD3 ϵ のN末端に融合された結合

40

50

部分を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約50アミノ酸以上（約60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190又は200アミノ酸以上のいずれかなど）離れている細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約120アミノ酸以内（約110、100、90、80、70、60、50、40又は30アミノ酸以内のいずれかなど）の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

10

【0194】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラT細胞受容体（cTCR）を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、3つ以上のIg様ドメインを含む細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及びcTCRの両方を含む標的細胞を死滅させることができる。いくつかの実施形態において、cTCRは、i) 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のリンカー（GSリンカーなど）；iii) TCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部；iv) TCRサブユニットに由来する膜貫通ドメイン、及びv) TCRサブユニットに由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、TCRサブユニットは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 及びCD3 ϵ からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、同じTCRサブユニットに由来する。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、CD3 ϵ に由来する。いくつかの実施形態において、cTCRは、全長CD3 ϵ のN末端に融合された結合部分を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメインの外部の領域に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメイン内の領域に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

20

30

【0195】

別の態様において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約80アミノ酸以上（約90、100、110、120アミノ酸以上のいずれかなど）離れている領域の外部にある細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。い

40

50

くつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約102アミノ酸以内（例えば、約100、90、80、70、60、50、40又は30アミノ酸以内のいずれかなど）の細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

【0196】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞であって（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、2つ以上のIg様ドメインを含む細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメインの外部の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメイン内の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

【0197】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び免疫細胞受容体を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約80アミノ酸以上（約90、100、110、120アミノ酸以上のいずれかなど）離れている領域の外部にある細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約102アミノ酸以内（例えば、約100、90、80、70、60、50、40又は30アミノ酸以内のいずれかなど）の細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

【0198】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、2つ以上のIg様ドメインを含む細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメインの外部の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメイン内の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

て、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び免疫細胞受容体を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメインの外部の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメイン内の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

10

【0199】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及びCARを含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、CARは、i) 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のヒンジ配列（CD8に由来するヒンジ配列など）；iii) 膜貫通ドメイン（CD8膜貫通ドメインなど）；iv) 細胞内共刺激ドメイン（4-1BB又はCD28に由来する共刺激ドメインなど）、及びv) 細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3 ζ に由来する細胞内シグナル伝達ドメインなど）を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約80アミノ酸以上（約90、100、110、120アミノ酸以上のいずれかなど）離れている領域の外部にある細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約102アミノ酸以内（例えば、約100、90、80、70、60、50、40又は30アミノ酸以内のいずれかなど）の細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

20

30

【0200】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）が提供され、標的分子は、2つ以上のIg様ドメインを含む細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及びCARを含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、CARは、i) 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のヒンジ配列（CD8に由来するヒンジ配列など）；iii) 膜貫通ドメイン（CD8膜貫通ドメインなど）；iv) 細胞内共刺激ドメイン（4-1BB又はCD28に由来する共刺激ドメインなど）、及びv) 細胞内シグナル伝達ドメイン（CD3 ζ に由来する細胞内シグナル伝達ドメインなど）を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメインの外部の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形

40

50

態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメイン内の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

【0201】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラT細胞受容体（cTCR）を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）が提供され、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及びcTCRを含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、cTCRは、i) 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のリンカー（GSリンカーなど）；iii) TCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部；iv) TCRサブユニットに由来する膜貫通ドメイン、及びv) TCRサブユニットに由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、TCRサブユニットは、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3γ及びCD3εからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、同じTCRサブユニットに由来する。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、CD3εに由来する。いくつかの実施形態において、cTCRは、全長CD3εのN末端に融合された結合部分を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約80アミノ酸以上（約90、100、110、120アミノ酸以上のいずれかなど）離れている領域の外部にある細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約102アミノ酸以内（例えば、約100、90、80、70、60、50、40又は30アミノ酸以内のいずれかなど）の細胞外ドメイン中の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

【0202】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラT細胞受容体（cTCR）を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）が提供され、標的分子は、2つ以上のIg様ドメインを含む細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及びcTCRを含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する。いくつかの実施形態において、cTCRは、i) 結合部分を含む細胞外ドメイン；ii) 任意選択のリンカー（GSリンカーなど）；iii) TCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部；iv) TCRサブユニットに由来する膜貫通ドメイン、及びv) TCRサブユニット

10

20

30

40

50

に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、TCRサブユニットは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 及びCD3 ϵ からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、同じTCRサブユニットに由来する。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン及びTCRサブユニットの任意選択の細胞外ドメイン又はその一部は、CD3 ϵ に由来する。いくつかの実施形態において、cTCRは、全長CD3 ϵ のN末端に融合された結合部分を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメインの外部の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメイン内の領域（例えば、エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される膜貫通受容体などの膜貫通受容体である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD4である。いくつかの実施形態において、標的分子は、CD22である。

10

20

30

40

50

【0203】

免疫細胞

本発明に有用な例示的な操作された免疫細胞としては、樹状細胞（未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞を含む）、Tリンパ球（ナイーブT細胞、エフェクターT細胞、メモリーT細胞、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラー細胞、Treg細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）及びリンホカイン活性化キラー（LAK）細胞など）、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NKT細胞、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、単球、マクロファージ、好中球、顆粒球、末梢血単核球（PBMC）及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。免疫細胞の亜集団は、当技術分野で知られている1つ以上の細胞表面マーカー（例えば、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD11c、CD123、CD56、CD34、CD14、CD33など）の存在又は不存在によって定義することができる。医薬組成物が複数の操作された哺乳動物免疫細胞を含む場合、操作された哺乳動物免疫細胞は、免疫細胞型の特定の亜集団、免疫細胞型の亜集団の組み合わせ又は2つ以上の免疫細胞型の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、同種細胞集団に存在する。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、免疫細胞が濃縮された異種細胞集団に存在する。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、リンパ球でない。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、養子免疫療法に適している。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、PBMCである。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、PBMCに由来する免疫細胞である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、CD4⁺T細胞である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、CD8⁺T細胞である。いくつかの実施形態において、治療用細胞は、TCR α 及びTCR β 鎖を発現するT細胞（即ち $\alpha\beta$ T細胞）である。いくつかの実施形態において、治療用細胞は、TCR γ 及びTCR δ 鎖を発現するT細胞（即ち $\gamma\delta$ T細胞）である。いくつかの実施形態において、治療用細胞は、 $\gamma 9\delta 2$ T細胞である。いくつかの実施形態において、治療用細胞は、 $\delta 1$ T細胞である。いくつかの実施形態において、治療用細胞は、 $\delta 3$ T細胞である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、B細胞である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、NK細胞である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、NK-T細胞である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、樹状細胞（DC）である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、DC活性化T細胞である。

【0204】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、一次細胞に由来する。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、個体から単離された一次細胞である。いくつ

かの実施形態において、操作された免疫細胞は、個体から単離された一次細胞から増やされる（例えば、増殖及び／又は分化される）。いくつかの実施形態において、一次細胞は、胸腺から得られる。いくつかの実施形態において、一次細胞は、リンパ又はリンパ節（腫瘍流入領域リンパ節など）から得られる。いくつかの実施形態において、一次細胞は、脾臓から得られる。いくつかの実施形態において、一次細胞は、骨髄から得られる。いくつかの実施形態において、一次細胞は、末梢血液などの血液から得られる。いくつかの実施形態において、一次細胞は、末梢血単核球（P B M C）である。いくつかの実施形態において、一次細胞は、血漿に由来する。いくつかの実施形態において、一次細胞は、腫瘍に由来する。いくつかの実施形態において、一次細胞は、粘膜免疫系から得られる。いくつかの実施形態において、一次細胞は、生検試料から得られる。

10

【0205】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、細胞株に由来する。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、市販の細胞株から得られる。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、個体から単離された一次細胞から確立された細胞株から増やされる（例えば、増殖及び／又は分化される）。いくつかの実施形態において、細胞株は、致死である。いくつかの実施形態において、細胞株は、不死化される。いくつかの実施形態において、細胞株は、白血病又はリンパ腫細胞株などの腫瘍細胞株である。いくつかの実施形態において、細胞株は、P B M Cに由来する細胞株である。いくつかの実施形態において、細胞株は、幹細胞株である。いくつかの実施形態において、細胞株は、N K - 9 2である。

20

【0206】

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、幹細胞に由来する。いくつかの実施形態において、幹細胞は、胚性幹細胞（E S C）である。いくつかの実施形態において、幹細胞は、造血性幹細胞（H S C）である。いくつかの実施形態において、幹細胞は、間葉系幹細胞である。いくつかの実施形態において、幹細胞は、人工多能性幹細胞（i P S C）である。

【0207】

共受容体（「C O R」）

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、1つ以上共受容体（「C O R」）をさらに含む。

30

【0208】

いくつかの実施形態において、C O Rは、免疫細胞の濾胞への遊走を促進する。いくつかの実施形態において、C O Rは、免疫細胞の腸への遊走を促進する。いくつかの実施形態において、C O Rは、免疫細胞の皮膚への遊走を促進する。

【0209】

いくつかの実施形態において、C O Rは、C X C R 5である。いくつかの実施形態において、C O Rは、C C R 9である。いくつかの実施形態において、C O Rは、 $\alpha 4 \beta 7$ （インテグリン $\alpha 4 \beta 7$ とも称される）である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、C X C R 5、 $\alpha 4 \beta 7$ 及びC C R 9からなる群から選択される2つ以上の受容体を含む。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、 $\alpha 4 \beta 7$ 及びC C R 9の両方を含む。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、C X C R 5、 $\alpha 4 \beta 7$ 及びC C R 9を含む。

40

【0210】

C - C ケモカイン受容体タイプ9（C C R 9）としても知られるC C R 9は、ベータケモカイン受容体ファミリーのメンバーであり、その結合リガンドC C L 25に応答するケモタキシスを媒介する。C C R 9は、Gタンパク質共役型受容体と構造的に類似した7回膜貫通ドメインであると予測される。C C R 9は、胸腺及び小腸においてT細胞上で発現され、Tリンパ球の発生及び遊走を調節する際に役割を果たす（U e h a r a , S . , e t a l . (2 0 0 2) J . I m m u n o l . 1 6 8 (6) : 2 8 1 1 - 2 8 1 9）。C C R 9 / C C L 25は、免疫細胞を小腸に誘導することが示されている（P a b s t , O . ,

50

et al. (2004). J. Exp. Med. 199 (3): 411)。したがって、免疫細胞中でCCR9を共発現することにより、操作された免疫細胞を腸に誘導することができる。いくつかの実施形態において、CCR9のスプライシング変異体を使用される。

【0211】

$\alpha 4 \beta 7$ 又はリンパ球パイエル板接着分子(LPAM)は、リンパ球上で発現され、且つ腸関連リンパ系組織へのT細胞ホーミングに関与するインテグリンである(Petrovic, A. et al. (2004) Blood 103 (4): 1542-1547)。 $\alpha 4 \beta 7$ は、CD49d(ITGA4のタンパク質産物、 $\alpha 4$ インテグリンサブユニットをコードする遺伝子)及びITGB7(ITGB4のタンパク質産物、 $\beta 7$ インテグリンサブユニットをコードする遺伝子)で構成されるヘテロ二量体である。いくつかの実施形態において、 $\alpha 4$ のスプライシング変異体は、 $\alpha 4 \beta 7$ ヘテロ二量体に組み込まれる。いくつかの実施形態において、 $\beta 7$ のスプライシング変異体は、 $\alpha 4 \beta 7$ ヘテロ二量体に組み込まれる。他の実施形態において、 $\alpha 4$ のスプライシング変異体及び $\beta 7$ のスプライシング変異体は、ヘテロ二量体に組み込まれる。 $\alpha 4 \beta 7$ 単独又はCCR9と組み合わせた共発現は、操作された免疫細胞を腸に誘導することができる。

【0212】

$\alpha 4 \beta 7$ 及びCCR9は、両方とも腸へのホーミングにおいて機能するが、それらは、必ずしも同時調節されない。ビタミンAの代謝産物であるレチノイン酸は、CCR9及び $\alpha 4 \beta 7$ の両方の発現の誘導において役割を果たす。しかしながら、 $\alpha 4 \beta 7$ 発現は、他の手段を介して誘導される場合がある一方、CCR9発現は、レチノイン酸を必要とする。さらに、結腸向性T細胞は、 $\alpha 4 \beta 7$ のみを発現し、CCR9を発現せず、これは、2つの受容体が必ずしも共発現又は同時調節されないことを示している。(Takeuchi, H., et al. J. Immunol. (2010) 185 (9): 5289-5299を参照されたい)。

【0213】

いくつかの実施形態において、CCR9及び $\alpha 4 \beta 7$ は、操作された免疫細胞を腸に標的化するためのCORとして機能する。

【0214】

いくつかの実施形態において、免疫細胞は、C-X-Cケモカイン受容体タイプ5としても知られるCXCR5を発現する。CXCR5は、C-X-Cケモカイン受容体ファミリーに属する7回膜貫通ドメインを含有するGタンパク質共役型受容体である。CXCR5及びそのリガンドであるケモカインCXCL13は、リンパ節及び脾臓を含む二次リンパ系組織内でリンパ球を濾胞に輸送する際に中心的な役割を果たす。(Buerkle, A. et al. (2007) Blood 110: 3316-3325。)特に、CXCR5は、T細胞がCXCL13に応答してリンパ節B細胞帯に遊走することを可能にする(Schaerli, P. et al. (2000) J. Exp. Med. 192 (11): 1553-1562。)免疫細胞中で発現されるとき、CXCR5は、操作された免疫細胞を濾胞に標的化するためのCORとして機能し得る。いくつかの実施形態において、CXCR5のスプライシング変異体が使用される。

【0215】

一般に、上記のCORのいずれかの天然に存在しない変異体は、操作された免疫細胞において含まれ得る／発現され得る。これらの変異体は、例えば、1つ以上の変異体を含有する場合があるにもかかわらず、対応する天然の受容体の一部又はそれを超える機能を維持し得る。例えば、いくつかの実施形態において、CORは、天然に存在するCCR9、 $\alpha 4 \beta$ 又はCXCR5の変異体であり、変異体は、天然のCCR9、 $\alpha 4 \beta$ 又はCXCR5と少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%又は99%のいずれかで同一なアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、CORは、天然に存在するCCR9、 $\alpha 4 \beta$ 又はCXCR5の変異体であり、変異体は、天然のCCR9、 $\alpha 4 \beta$ 又はCXCR5のものと比較して約1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のいずれか1

10

20

30

40

50

つ以下のアミノ酸置換を含む。

【0216】

いくつかの実施形態において、CORは、ケモカイン受容体である。いくつかの実施形態において、CORは、インテグリンである。いくつかの実施形態において、CORは、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1、XCR1、ACKR1、ACKR2、ACKR3、ACKR4及びCCL2からなる群から選択される。

【0217】

いくつかの実施形態において、CORは、操作された免疫細胞が由来する免疫細胞において正常に発現されない。いくつかの実施形態において、CORは、操作された免疫細胞が由来する免疫細胞において低いレベルで発現される。

10

【0218】

抗HIV抗体

本明細書に記載される操作された免疫細胞は、いくつかの実施形態において、広域中和抗体などの抗HIV抗体をさらに発現（及び分泌）する。bNAbは、HIVに感染したが、抗ウイルス薬を服用せずにウイルス感染を自然に制御できた長期非進行者において最初に発見された。bNAbは、複数のHIVウイルス株を中和する中和抗体である。bNAbは、ウイルスが変異を経ても、ウイルスの保存されたエピトープを標的化する。本明細書に記載される操作された免疫細胞は、いくつかの実施形態において、広域中和抗体を分泌して、他の宿主細胞のHIV感染を遮断することができる。

20

【0219】

いくつかの実施形態において、bNAbは、gp41のMPER、V1V2グリカン、グリカンの外部ドメイン、V3グリカン又はCD4結合部位上のウイルスエピトープを特異的に認識する。bNAbは、ウイルスエンベロープ糖タンパク質とCD4との相互作用を遮断し得る。Mascola and Haynes, Immunol. Rev. 2013 July; 254 (1): 225-44を参照されたい。

【0220】

好適なbNAbとしては、VRC01、PGT-121、3BNC117、10-1074、UB-421、N6、VRC07、VRC07-523、eCD4-IG、10E8、10E8v4、PG9、PGDM 1400、PGT151、CAP256.25、35O22及び8ANC195が挙げられるが、これらに限定されない。Science Translational Medicine, 23 Dec 2015: Vol. 7, Issue 319, pp. 319ra206; PLoS Pathog. 2013; 9 (5): e1003342; 2015 Jun 25; 522 (7557): 487-91; Nat Med. 2017 Feb; 23 (2): 185-191; 及びNature Immunology, volume 19, pages 1179-1188 (2018)を参照されたい。他の好適な広域中和抗体は、例えば、Cohen et al., Current Opin. HIV AIDS, 2018 Jul; 13 (4): 366-373; 及びMascola and Haynes, Immunol. Rev. 2013 July; 254 (1): 225-44で見出され得る。

30

40

【0221】

調製の方法

本明細書に記載される認識分子及び操作された免疫細胞を調製するための組成物及び方法も提供される。

【0222】

抗体部分

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される結合部分は、抗体部分（例えば、抗CD22 D1～4抗体部分及び抗CD22 D5～7抗体部分）を含む。いくつかの実施形態において、抗体部分は、モノクローナル抗体に由来するVH及びVLドメイン又は

50

その変異体を含む。いくつかの実施形態において、抗体部分は、モノクローナル抗体に由来するC_H1及びC_Lドメイン又はその変異体をさらに含む。モノクローナル抗体は、例えば、Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975) 及び Sergeeva et al., Blood, 117 (16):4262-4272 によって記載されるものなど、ハイブリドーマ法を使用して調製され得る。

【0223】

ハイブリドーマ法において、ハムスター、マウス又は他の適切な宿主動物は、通常、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生するか又は産生することができるリンパ球を誘発する免疫剤で免疫化される。代わりに、リンパ球は、インビトロで免疫化され得る。免疫剤は、目的のタンパク質のポリペプチド若しくは融合タンパク質又はペプチド及びMHCタンパク質を含む複合体などの少なくとも2つの分子を含む複合体を含み得る。一般的に、ヒト起源の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球（「PBL」）が使用されるか、又は非ヒト哺乳動物起源が望まれる場合には脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。その後、リンパ球は、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いて不死化細胞株と融合され、ハイブリドーマ細胞を形成する。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特に齧歯類、ウシ及びヒト起源の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫細胞株が利用される。ハイブリドーマ細胞は、未融合の不死化細胞の増殖又は生存を阻害する1種以上の物質を好ましくは含有する好適な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHPR T）を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、通常、HGPRT欠損細胞の増殖を妨げるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン（「HAT培地」）を含む。

10

20

【0224】

いくつかの実施形態において、不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を補助し、且つHAT培地などの培地に対して感受性である。いくつかの実施形態において、不死化細胞株は、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego、California及びAmerican Type Culture Collection、Manassas、Virginiaから入手できるマウスの骨髓腫株である。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株もヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている。Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63。

30

【0225】

次に、ハイブリドーマ細胞が培養されている培養培地は、ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合アッセイ、例えば放射免疫測定法（RIA）若しくは酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によって決定され得る。そのような手法及びアッセイは、当技術分野において知られている。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) のスキャッチャード分析によって決定され得る。

40

【0226】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる。この目的のための適切な培養培地としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地及びRPMI-1640培地が挙げられる。代わりに、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物内の腹水としてインビボで増殖させることができる。

【0227】

50

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、プロテインAーセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製法によって培養培地又は腹水から単離又は精製され得る。

【0228】

いくつかの実施形態において、抗体部分は、抗体部分ライブラリ（scFv又はFabフラグメントを提示するファージライブラリなど）から選択されるクローン由来の配列を含む。クローンは、1つ又は複数の所望の活性を有する抗体フラグメントに関するコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって同定され得る。例えば、ファージディスプレイライブラリを作製し、所望の結合特性を有する抗体についてこのようなライブラリをスクリーニングするための様々な方法が当技術分野において知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N. J., 2001) において概説され、且つ例えばMcCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks and Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N. J., 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34):12467-12472 (2004); 及び Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284 (1-2):119-132 (2004) においてさらに記載されている。

【0229】

特定のファージディスプレイ法において、V_H及びV_L遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって別々にクローン化され、ファージライブラリにおいてランダムに組み合わせられ、続いてWinter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994) において記載されるとおり抗原結合ファージについてスクリーニングされ得る。ファージは、通常、単鎖Fv（scFv）フラグメント又はFabフラグメントのいずれかとしての抗体フラグメントを提示する。免疫化された供給源からのライブラリは、ハイブリドーマの構築の必要を伴わずに免疫原に対して高親和性の抗体を提供する。代わりに、ナイーブなレパートリーをクローン化（例えば、ヒトから）して、Griffiths et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993) によって記載されるとおり、いずれの免疫化も伴わずに広範囲の非自己及び自己抗原に対する抗体の単一の供給源を提供できる。最後に、ナイーブなライブラリは、Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992) によって記載されるとおり、幹細胞に由来する再編成されていないV遺伝子セグメントをクローン化し、且つ高度に可変のCDR3領域をコードし、インビトロでの再編成を達成するランダムな配列を含有するPCRプライマーを使用することによっても合成的に作製され得る。ヒト抗体ファージライブラリを記載する特許公報としては、例えば、米国特許第5,750,373号明細書並びに米国特許出願公開第2005/0079574号明細書、同第2005/0119455号明細書、同第2005/0266000号明細書、同第2007/0117126号明細書、同第2007/0160598号明細書、同第2007/0237764号明細書、同第2007/0292936号明細書及び同第2009/0002360号明細書が挙げられる。

【0230】

抗体部分は、標的抗原（CD4又はCD22ポリペプチドなど）に特異的な抗体についてのライブラリをスクリーニングするファージディスプレイを使用して調製され得る。ライ

10

20

30

40

50

ブラリは、少なくとも 1×10^9 （少なくとも約 1×10^9 、 2.5×10^9 、 5×10^9 、 7.5×10^9 、 1×10^{10} 、 2.5×10^{10} 、 5×10^{10} 、 7.5×10^{10} 又は 1×10^{11} のいずれかなど）の固有のヒト抗体フラグメントの多様性を有するヒト scFv ファージディスプレイライブラリであり得る。いくつかの実施形態において、ライブラリは、全てのヒト重及び軽鎖サブファミリーを包含する健常ドナーに由来するヒト PMBC 及び脾臓から抽出された DNA から構築されたナイーブなヒトライブラリである。いくつかの実施形態において、ライブラリは、自己免疫疾患を有する患者、癌患者及び感染症を有する患者などの様々な疾患を有する患者から単離された PMBC から抽出された DNA から構築されたナイーブなヒトライブラリである。いくつかの実施形態において、ライブラリは、半合成ヒトライブラリであり、重鎖 CDR3 は、完全にランダム化され、全てのアミノ酸（システインを除く）が任意の所与の位置で等しく存在する可能性がある（例えば、Hoett, R. M. et al., Nat. Biotechnol. 23 (3): 344-348, 2005 を参照されたい）。いくつかの実施形態において、半合成ヒトライブラリの重鎖 CDR3 は、約 5 ～ 約 24 個（約 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 又は 24 個のいずれかなど）のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、ライブラリは、完全に合成的なファージディスプレイライブラリである。いくつかの実施形態において、ライブラリは、非ヒトファージディスプレイライブラリである。

10

【0231】

高親和性で標的抗原に結合するファージクローンは、固体支持体（例えば、溶液パニングのためのビーズ又は細胞パニングのための哺乳動物細胞など）に結合した標的抗原に対するファージの反復性の結合に続いて、非結合ファージの除去及び特異的に結合したファージの溶出によって選択され得る。溶液パニングの例において、標的抗原は、固体支持体への固定化のためにビオチン化され得る。ビオチン化標的抗原をファージライブラリ及びストレプトアビジン共役ダイナビーズ M-280 などの固体支持体と混合し、続いて標的抗原-ファージ-ビーズ複合体を単離する。次に、結合したファージクローンを溶出し、発現及び精製のための E. コリ (E. coli) XL1-Blue などの適切な宿主細胞を感染させるために使用する。細胞パニングの例において、CD4 又は CD22 を発現する細胞をファージライブラリと混合した後、細胞を回収し、結合したクローンを溶出し、発現及び精製のための適切な宿主細胞を感染させるために使用する。パニングを溶液パニング、細胞パニング又は両方の組み合わせのいずれかで複数回（約 2、3、4、5、6 以上のいずれかなど）のラウンドで実施して、標的抗原に特異的に結合するファージクローンについて濃縮することができる。濃縮されたファージクローンは、例えば、ELISA 及び FACS を含む、当技術分野において知られる任意の方法により、標的抗原に対する特異的な結合について試験され得る。

20

30

【0232】

いくつかの実施形態において、CD22 結合部分は、参照抗体と同じエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、CD22 結合部分は、参照抗体と結合について競合する。競合アッセイを使用して、2つの抗体部分が、同一の又は立体的に重複しているエピトープを認識することによって同じエピトープに結合する（又は互いに競合する）か、又は1つの抗体が抗原に対する別の抗体の結合を競合的に阻害するかどうかを決定することができる。例示的な競合アッセイとしては、Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.) において提供されるものなどの通例のアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的方法は、Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, N. J.) の Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」において提供されている。いくつかの実施形態において、2つの抗体は、各々が他の結合を 50% 以上遮断する場合、同

40

50

ジエピトープに結合すると言われる。

【0233】

ヒト及びヒト化抗体部分

本明細書に記載される抗体部分は、ヒト又はヒト化であり得る。非ヒト（例えば、ネズミ科）抗体部分のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を典型的に含有するキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv又は抗体の他の抗原結合部分配列）である。ヒト化抗体部分は、レシピエントのCDRの残基が所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のCDR由来の残基により置き換えられたヒト免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそのフラグメント（レシピエント抗体）を含む。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。ヒト化抗体部分は、レシピエント抗体部分にも、移入されたCDR又はフレームワーク配列にも見出されない残基も含み得る。一般に、ヒト化抗体部分は、全て又は実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全て又は実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的に全て含み得る。例えば、Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)を参照されたい。

【0234】

一般に、ヒト化抗体部分は、非ヒトである供給源から導入される1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と呼ばれる場合が多く、これらは、通常、「移入」可変ドメインから得られる。いくつかの実施形態によれば、ヒト化は、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体部分の対応する配列と置換することにより、Winter and co-workers (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988))の方法に従って本質的に実施され得る。したがって、そのような「ヒト化」抗体部分は、実質的に無傷のヒト可変ドメインより少ない部分が非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている抗体部分（米国特許第4,816,567号明細書）である。実際には、ヒト化抗体部分は、通常、一部のCDR残基及び場合により一部のFR残基が齧歯類抗体中の類似部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体部分である。

【0235】

ヒト化の代わりに、ヒト抗体部分が作製され得る。例えば、今日では、免疫時に内因性免疫グロブリンの産生が行われずにヒト抗体の全レパートリーの産生が可能なトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系列変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域（JH）遺伝子のホモ接合型欠失は、内因性抗体産生を完全に阻害することが記載されている。このような生殖細胞系列変異体マウスにヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子列を導入することにより、抗原チャレンジ時にヒト抗体の産生をもたらす。例えば、Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993); 米国特許第5,545,806号明細書、同第5,569,825号明細書、同第5,591,669号明細書；同第5,545,807号明細書；及び国際公開第97/17852号パンフレットを参照されたい。代わりに、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物に導入することにより作製可能であり、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子を部分的に又は完全に不活性化したマウスが挙げられる。チャレンジ時、遺伝子再編成、組み立て

及び抗体レパートリーを含む全ての観点において、ヒトに見られるものに非常に類似するヒト抗体産生が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号明細書；同第5,545,806号明細書；同第5,569,825号明細書；同第5,625,126号明細書；同第5,633,425号明細書；及び同第5,661,016号明細書並びにMarks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)；Lonberg et al., Nature, 368: 856-859 (1994)；Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994)；Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996)；Lonberg and Huzar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995)において記載されている。

10

【0236】

ヒト抗体は、インビトロで活性化されたB細胞（米国特許第5,567,610号明細書及び米国特許第5,229,275号明細書を参照されたい）又はファージディスプレイライブラリを含む、当技術分野で知られる様々な手法を使用することによっても作製され得る。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991)；Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)。Coleら及びBoernerらの手法もヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である。Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)及びBoerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)。

20

【0237】

抗体変異体

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される抗原結合ドメイン（例えば、抗CD22 D1～4抗体部分、抗CD22 D5～7抗体部分及び抗CD4抗体部分）のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗原結合ドメインの結合親和性及び／又は他の生物学的特性を向上させることが望ましい場合もある。抗原結合ドメインのアミノ酸配列変異体は、適切な改変を、抗原結合ドメインをコードするヌクレオチド配列に導入すること又はペプチド合成によって調製され得る。そのような改変としては、例えば、抗原結合ドメインのアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／又はそれへの挿入、及び／又はその置換が挙げられる。最終構築物が所望の特徴、例えば抗原結合を保持することを条件として、最終構築物に到達するように欠失、挿入及び置換の任意の組み合わせがなされ得る。

30

【0238】

いくつかの実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗原結合ドメイン変異体が提供される。置換変異の対象となる部位としては、抗体部分のHVR及びFRが挙げられる。アミノ酸置換は、目的の抗原結合ドメインに導入され得、生成物は、所望の活性、例えば抗原結合の保持／向上又は免疫原性の低下についてスクリーニングされる。

40

【0239】

保存的置換は、下の表2に示される。本明細書で議論される変異体CORSは、そのような保存的置換も含有し得る。

【0240】

50

【表 2】

表 2: 保存的置換

元の 残基	例示的 置換	好ましい 置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

【0241】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に従って異なるクラスに分類され得る：

- a. 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- b. 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- c. 酸性：Asp、Glu；
- d. 塩基性：His、Lys、Arg；
- e. 鎖の配向に影響する残基：Gly、Pro；
- f. 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

40

【0242】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

【0243】

例示的な置換変異体は、例えば、ファージディスプレイに基づく親和性成熟手法を使用し、便利に作製され得る親和性成熟抗体部分である。簡潔に説明すると、1つ以上のCDR残基が変異され、変異体抗体部分がファージ上に提示され、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。改変（例えば、置換）をHVRにおいて作製

50

して、例えば抗体部分の親和性を向上させ得る。そのような改変は、HVR「ホットスポット」、即ち体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を起こすコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)を参照されたい）及び／又は特異性決定残基（SDR）においてなされ得、得られた変異体V_H又はV_Lが結合親和性について試験される。二次ライブラリから構築し、再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))において記載されている。

【0244】

親和性成熟のいくつかの実施形態において、多様性は、様々な方法のいずれか（例えば、エラーブローンPCR、チェインシャッフリング又はオリゴヌクレオチド指定変異誘発）によって成熟について選択された可変遺伝子に導入される。次に、二次ライブラリが作製される。次に、二次ライブラリをスクリーニングして、所望の親和性を有するいずれかの抗体部分変異体を同定する。多様性を導入する別の方法は、複数のHVR残基（例えば、1回で4～6残基）がランダム化されるHVR指定アプローチを含む。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発又はモデリングを使用して、具体的に同定され得る。CDR-H3及びCDR-L3は、特に標的となる場合が多い。

【0245】

いくつかの実施形態において、置換、挿入又は欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体部分の能力を実質的に低減しない限り、1つ以上のHVR内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的改変（例えば、本明細書で定義されたとおりの保存的置換）は、HVR内でなされ得る。そのような改変は、HVR「ホットスポット」又はSDRの外部であり得る。上で提供される変異体V_H及びV_L配列のいくつかの実施形態において、各HVRは、改変されないか、又は1、2若しくは3つ以下のアミノ酸置換を含有する。

【0246】

変異誘発のために標的化され得る抗原結合ドメインの残基又は領域の同定に有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085によって記載されたとおり、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法において、残基又は標的残基の群（例えば、arg、asp、his、lys及びgluなどの荷電残基）を同定し、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）により置き換えて、抗原結合ドメインと抗原との相互作用が影響されるかどうかを決定する。さらなる置換は、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置で導入され得る。代わりに又は加えて、抗原-抗原結合ドメイン複合体の結晶構造を決定して、抗原結合ドメインと抗原との間の接触点を同定することができる。そのような接触残基及び隣接する残基は、置換のための候補として標的化又は排除され得る。変異体をスクリーニングして、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定し得る。

【0247】

アミノ酸配列の挿入は、1つの残基から、100以上の残基を含有するポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端融合及び／又はカルボキシル末端融合並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、N末端メチオニル残基を有する抗原結合ドメインを含む。抗原結合ドメインの他の挿入変異体は、抗原結合ドメインの血清半減期を増大させる酵素（例えば、ADEPT用）又はポリペプチドに対する抗原結合ドメインのN又はC末端への融合を含む。

【0248】

核酸

本明細書では、本明細書に記載される認識分子（又はその1つ以上の部分）、COR及び／又はbNAbをコードする核酸（又は核酸のセット）並びにその核酸を含むベクターも提供される。

10

20

30

40

50

【0249】

認識分子（又はその1つ以上の部分）、COR及び／又はbNAbの発現は、核酸が、例えば、プロモーター（例えば、リンパ球特異的プロモーター）及び3'非翻訳領域（UTR）を含む5'及び／又は3'調節エレメントに作動可能に連結されるように、核酸を適切な発現ベクターを挿入することによって達成され得る。ベクターは、宿主細胞中での複製及び組み込みに好適であり得る。典型的なクローニング及び発現のベクターは、所望の核酸配列の発現の調節に有用な転写及び翻訳ターミネーター、開始配列及びプロモーターを含有する。

【0250】

核酸は、いくつかのタイプのベクターにクローン化することができる。例えば、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス及びコスミドを含むが、これらに限定されないベクターにクローン化することができる。特に着目されるベクターには、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター及び配列決定ベクターが含まれる。

10

【0251】

さらに、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供され得る。ウイルスベクター技術は、当技術分野で周知である。ベクターとして有用なウイルスには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス及びレンチウイルスが含まれるが、これらに限定されない。一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、便宜的な制限エンドヌクレアーゼ部位及び1つ以上の選択可能なマーカーを含む。

20

【0252】

多くのウイルスベースシステムが哺乳動物細胞への遺伝子導入のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達システムのための簡便なプラットフォームを提供する。当技術分野で公知の手法を用いて、選択した遺伝子をベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次に、組換えウイルスを単離し、インビボ又はエクスピボのいずれかで対象の細胞に送達することができる。多くのレトロウイルスシステムが当技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。多くのアデノウイルスベクターが当技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターが使用される。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターは、導入遺伝子の長期安定的な組み込み及び娘細胞におけるその増殖を可能にするため、長期遺伝子導入を達成するために好適なツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖細胞に形質導入できるという点で、マウス白血病ウイルスなどの腫瘍レトロウイルスに由来するベクターよりもさらなる利点を有する。それらは、免疫原性が低いという追加の利点も有する。

30

【0253】

追加のプロモーター要素、例えばエンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは、開始部位の30～110bp上流の領域に位置するが、最近、多くのプロモーターが開始部位の下流にも機能的要素を含むことが示されている。プロモーター要素間のスペーシングは、可動性であることが多く、要素が互いに反転又は移動するときにプロモーター機能が維持される。チミジンキナーゼ（tk）プロモーターでは、活性が低下し始める前にプロモーターエレメント間のスペーシングを50bp間隔に増加させることができる。

40

【0254】

適切なプロモーターの一例は、前初期サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに作動可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる強力な構成的プロモーター配列である。適切なプロモーターの別の例は、伸長成長因子-1 α （EF-1 α ）である。しかし、サルウイルス40（SV40）初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス（MMTV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）ロングターミナルリピート（LTR）プロモーター、MoMu

50

L Vプロモーター、トリ白血病毒プロモーター、エプスタイン・バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター並びに限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター及びクレアチニンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターを含むが、これらに限定されない他の構成的プロモーター配列を使用し得る。

【0255】

ポリペプチド又はその一部の発現を評価するために、細胞に導入される発現ベクターは、選択可能なマーカー遺伝子又はレポーター遺伝子のいずれか又はその両方を含んで、ウイルスベクターを介してトランスフェクト又は感染することが求められる細胞の集団からの発現細胞の同定及び選択を容易にすることもができる。他の態様において、選択可能なマーカーは、別個のDNA片上に輸送され、コトランスフェクション手順において使用され得る。選択可能マーカー及びレポーター遺伝子は、共に宿主細胞における発現を可能にするために適切な調節配列を隣接させ得る。有用な選択可能なマーカーには、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子が含まれる。

【0256】

レポーター遺伝子を使用して、トランスフェクトされる可能性のある細胞を同定し、調節配列の機能性を評価する。一般に、リポーター遺伝子は、レシピエント生物又は組織に存在しないか又はそれらによって発現されず、且つ何らかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性により、その発現が示されるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞に導入された後、適切な時間でアッセイされる。好適なレポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ、βガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子又は緑色蛍光性タンパク質遺伝子が挙げられ得る。好適な発現システムは、周知であり、公知の手法を用いて調製され得るか、又は市販のものから得ることができる。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小の5'隣接領域を有する構築物がプロモーターとして同定される。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結され、プロモーター駆動型転写を調節する能力について薬剤を評価するために使用され得る。

【0257】

哺乳動物細胞において核酸の存在を確認するための例示的な方法は、例えば、サザン及びノーザンブロット、RT-PCR及びPCRなど、当業者によく知られる分子生物学的アッセイ；例えば免疫学的方法（ELISA及びウエスタンブロットなど）による特定のペプチドの存在又は不存在を検出することなどの生化学的アッセイを含む。

【0258】

いくつかの実施形態において、1つ以上の核酸配列が別々のベクター中に含有される。いくつかの実施形態において、核酸配列の少なくともいくつかが同じベクター中に含有される。いくつかの実施形態において、核酸配列の全てが同じベクター中に含有される。ベクターは、例えば、哺乳動物発現ベクター及びウイルスベクター（レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス及びレンチウイルスに由来するものなど）からなる群から選択され得る。

【0259】

例えば、いくつかの実施形態において、核酸は、免疫細胞受容体ポリペプチド鎖をコードする第1の核酸配列、任意選択によりCORポリペプチド鎖をコードする第2の核酸及び任意選択によりbNAbポリペプチドをコードする第3の核酸を含む。いくつかの実施形態において、第1の核酸配列は、第1のベクター中に含有され、任意選択の第2の核酸配列は、第2のベクター中に含有され、且つ任意選択の第3の核酸配列は、第3のベクター中に含有される。いくつかの実施形態において、第1及び第2の核酸配列は、第1のベクター中に含有され、且つ第3の核酸配列は、第2のベクター中に含有される。いくつかの実施形態において、第1及び第3の核酸配列は、第1のベクター中に含有され、且つ第2の核酸配列は、第2のベクター中に含有される。いくつかの実施形態において、第2及び

第3の核酸配列は、第1のベクター中に含有され、且つ第1の核酸配列は、第2のベクター中に含有される。いくつかの実施形態において、第1、第2及び第3の核酸配列は、同じベクター中に含有される。いくつかの実施形態において、第1、第2及び第3の核酸配列は、内部リボソーム侵入部位（IRES）及び自己切断2Aペプチド（P2A、T2A、E2A又はF2Aなど）をコードする核酸からなる群から選択されるリンカーを介して互いに連結され得る。

【0260】

いくつかの実施形態において、第1の核酸配列は、第1のプロモーターの制御下にあり、任意選択の第2の核酸配列は、第2のプロモーターの制御下にあり、且つ任意選択の第3の核酸配列は、第3のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、第1、第2及び第3のプロモーターの一部又は全ては、同じ配列を有する。いくつかの実施形態において、第1、第2及び第3のプロモーターの一部又は全ては、異なる配列を有する。いくつかの実施形態において、第1、第2及び第3の核酸配列の一部又は全ては、マルチシストロンベクター中において単一のプロモーターの制御下で単一の転写物として発現される。いくつかの実施形態において、プロモーターの1つ以上は、誘導性である。

【0261】

いくつかの実施形態において、第1、第2及び第3の核酸配列の一部又は全ては、免疫細胞（T細胞など）中で同様の（実質的に又はほぼ同じ）発現レベルを有する。いくつかの実施形態において、第1、第2及び第3の核酸配列の一部は、少なくとも約2（少なくとも約2、3、4、5又はそれを超えるもののいずれかなど）倍異なる免疫細胞（T細胞など）中での発現レベルを有する。発現は、mRNA又はタンパク質レベルで決定できる。mRNA発現のレベルは、ノーザンブロット法、定量RT-PCR、マイクロアレイ分析などの様々なよく知られた方法を使用して、核酸から転写されたmRNAの量を測定することによって決定できる。タンパク質発現のレベルは、免疫細胞化学染色、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、ウエスタンブロット分析、発光分析、質量分析、高速液体クロマトグラフィー、高圧液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析などを含む既知の方法で測定できる。

【0262】

遺伝子を細胞（免疫細胞など）に導入及び発現する方法は、当技術分野で知られている。発現ベクターに関連して、ベクターは、当技術分野における任意の方法により、宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母又は昆虫細胞に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的又は生物学的手段によって宿主細胞に移すことができる。

【0263】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する物理的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション法、微粒子銃、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法などが挙げられる。ベクター及び／又は外因性核酸を含む細胞を作製する方法は、当技術分野で周知である。いくつかの実施形態において、宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、リン酸カルシウムトランスフェクションによって実施される。

【0264】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNA及びRNAベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えばヒトの細胞に遺伝子を挿入するために最も広く用いられる方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス1、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。

【0265】

ポリヌクレオチドを宿主細胞（免疫細胞など）に導入する化学的手段としては、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ並びに水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリボソームを含む脂質ベースのシステムなどのコロイド分散システムが挙げられる。インビトロ及びインビボで送達媒体として使用するための例示的なコロイドシステムは、リボソーム（例えば、人工膜小胞）である。

10

20

30

40

50

【0266】

非ウイルス送達システムが利用される場合、例示的な送達ビヒクルは、リポソームである。宿主細胞への核酸の導入（インビトロ、エクスピボ又はインビボ）のために、脂質製剤の使用が企図される。別の態様において、核酸は、脂質と関連し得る。脂質に関連する核酸は、リポソームの水性内部に被包されているか、リポソームの脂質二重層に散在しているか、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方に関連する連結分子を介してリポソームに付着しているか、リポソーム内に封入されているか、リポソームと複合体化しているか、脂質を含有する溶液に分散しているか、脂質と混合されているか、脂質と組み合わせられているか、脂質内に懸濁物として含有されているか、ミセルに含有されているか若しくは複合体化しているか又は他の方法で脂質と関連し得る。脂質、脂質／DNA又は脂質／発現ベクター関連組成物は、溶液中の特定の構造に限定されない。例えば、それらは、ミセルとして又は「崩壊した」構造を有する二層構造で存在し得る。それらは、単に溶液中に散在し、サイズ又は形状が均一でない凝集体も形成し得る。脂質は、天然に存在する脂質又は合成脂質であり得る脂肪性物質である。例えば、脂質には、細胞質中に天然に存在する脂肪滴並びに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール及びアルデヒドなどの長鎖脂肪族炭化水素及びその誘導体を含む化合物のクラスが含まれる。

10

【0267】

宿主細胞に外因性核酸を導入するために使用される方法又はそれとは別に細胞を本発明の阻害剤に暴露する方法にかかわらず、宿主細胞中の組換えDNA配列の存在を確認するために様々なアッセイが実施され得る。このようなアッセイとしては、例えば、当業者によく知られる「分子生物学的な」アッセイ、例えばサザン及びノーザンブロット、RT-PCR及びPCR；「生化学的な」アッセイ、例えば免疫学的な手段（ELISA及びウエスタンブロット）により、又は本発明の範囲内に含まれる薬剤を同定するための本明細書に記載されるアッセイにより特定のペプチドの有無を検出することが挙げられる。

20

【0268】

本明細書に記載の核酸は、免疫細胞に一過性に又は安定的に組み込まれ得る。いくつかの実施形態において、核酸は、操作された免疫細胞において一過性に発現される。例えば、核酸は、異種遺伝子発現カセットを含む染色体外アレイの操作された免疫細胞の核に存在し得る。核酸は、ウイルス又は非ウイルス法を含む、当技術分野で知られている任意のトランスフェクション又は形質導入法を使用して、操作された哺乳動物に導入され得る。例示的な非ウイルス性トランスフェクション法には、リン酸カルシウム、デンドリマー、リポソーム又はカチオン性ポリマー（例えば、DEAE-デキストラン又はポリエチレンジアミン）を使用するなどの化学ベースのトランスフェクション；エレクトロポレーション、細胞圧搾、ソノポレーション、光トランスフェクション、インペールフェクション、プロトプラスト融合、流体力学的送達又はトランスポゾンなどの非化学的方法；遺伝子銃、マグネトフェクション又はマグネットアシストトランスフェクション、粒子衝突などの粒子ベースの方法；及びヌクレオフェクションなどのハイブリッド法が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、核酸は、DNAである。いくつかの実施形態において、核酸は、RNAである。いくつかの実施形態において、核酸は、直鎖状である。いくつかの実施形態において、核酸は、環状である。

30

40

【0269】

いくつかの実施形態において、核酸は、操作された免疫細胞のゲノムに存在する。例えば、核酸は、ウイルス性の組み込み、ランダムな組み込み、相同組換え法並びに部位特異的リコンビナーゼ又はインテグラーゼ、トランスポザーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN（登録商標））、CRISPR/Cas9及びジンクフィンガーヌクレアーゼの使用などの部位特異的組み込み法を含むが、これらに限定されない、当技術分野で知られている任意の方法によって免疫細胞のゲノムに組み込まれ得る。いくつかの実施形態において、核酸は、操作された免疫細胞のゲノムの特異的に設計された遺伝子座に組み込まれる。いくつかの実施形態において、核酸は、操作された免疫細胞のゲノムの組み込みホットスポットに組み込まれる。いくつかの実施形態において、核酸は、操

50

作された免疫細胞のゲノムのランダムな遺伝子座に組み込まれる。核酸の複数のコピーが単一の操作された免疫細胞に存在する場合、核酸は、操作された免疫細胞のゲノムの複数の遺伝子座に組み込まれ得る。

【0270】

認識分子、COR及び／又はbNAbをコードする核酸は、プロモーターに作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態において、プロモーターは、内因性プロモーターである。例えば、認識分子、COR又はbNAbをコードする核酸は、CRISPR/Cas9法など、当技術分野で知られる任意の方法を使用して、内因性プロモーターの下流の操作された免疫細胞のゲノムにノックインされ得る。いくつかの実施形態において、内因性プロモーターは、ベクターアクチンなどの豊富なタンパク質のためのプロモーターである。いくつかの実施形態において、内因性プロモーターは、例えば、操作された免疫細胞の内因性活性化シグナルによって誘導可能な誘導性プロモーターである。操作された免疫細胞がT細胞であるいくつかの実施形態において、プロモーターは、T細胞活性化依存性プロモーター（IL-2プロモーター、NFATプロモーター又はNFκBプロモーターなど）である。

10

【0271】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、異種プロモーターである。

【0272】

いくつかの実施形態において、認識分子、COR及び／又はbNAbをコードする核酸は、構成的プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、認識分子、COR又はbNAbをコードする核酸は、誘導性プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、構成的プロモーターは、認識分子をコードする核酸に作動可能に連結され、且つ誘導性プロモーターは、COR又はbNAbをコードする核酸に作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、第1の誘導性プロモーターは、認識分子をコードする核酸に作動可能に連結され、且つ第2の誘導性プロモーターは、CORをコードする核酸に作動可能に連結されるか又はその逆である。いくつかの実施形態において、第1の誘導性プロモーターは、認識分子をコードする核酸に作動可能に連結され、且つ第2の誘導性プロモーターは、bNAbをコードする核酸に作動可能に連結されるか又はその逆である。いくつかの実施形態において、第1の誘導性プロモーターは、CORをコードする核酸に作動可能に連結され、且つ第2の誘導性プロモーターは、bNAbをコードする核酸に作動可能に連結されるか又はその逆である。いくつかの実施形態において、第1の誘導性プロモーターは、第1の誘導条件によって誘導可能であり、第2の誘導性プロモーターは、第2の誘導条件によって誘導可能である。いくつかの実施形態において、第1の誘導条件は、第2の誘導条件と同じである。いくつかの実施形態において、第1の誘導性プロモーター及び第2の誘導性プロモーターは、同時に誘導される。いくつかの実施形態において、第1の誘導性プロモーター及び第2の誘導性プロモーターは、逐次的に誘導され、例えば、第1の誘導性プロモーターは、第2の誘導性プロモーターの前に誘導されるか、又は第1の誘導性プロモーターは、第2の誘導性プロモーターの後に誘導される。

20

30

【0273】

構成的プロモーターは、宿主細胞中で異種遺伝子（導入遺伝子とも称される）が構成的に発現されることを可能にする。本明細書で企図される例示的な構成的プロモーターとしては、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ヒト伸長因子-1アルファ（hEF1α）、ユビキチンCプロモーター（Ubic）、ホスホグリセロキナーゼプロモーター（PGK）、サルウイルス40初期プロモーター（SV40）及びCMV初期エンハンサーと結合したニワトリβ-アクチンプロモーター（CAGG）が挙げられるが、これらに限定されない。このような構成的プロモーターの導入遺伝子発現を活発にする効率は、多数の研究において広く比較されている。例えば、Michael C. Miloneらは、CMV、hEF1α、Ubic及びPGKが、一次ヒトT細胞におけるキメラ受容体発現を活発にする効率を比較し、hEF1αプロモーターが、最も高いレベルの導入遺伝子

40

50

発現を誘導しただけでなく、CD4及びCD8ヒトT細胞において最適に維持されたと結論付けた(Molecular Therapy, 17(8):1453-1464(2009))。いくつかの実施形態において、核酸中のプロモーターは、hEF1 α プロモーターである。

【0274】

誘導性プロモーターは、物理的条件、操作された免疫細胞の微小環境若しくは操作された免疫細胞の生理的状态、誘導因子(即ち誘導剤)又はそれらの組み合わせなどの1つ以上の条件によって誘導され得る。いくつかの実施形態において、誘導条件は、操作された免疫細胞及び／又は医薬組成物を受容する対象において内因性遺伝子の発現を誘導しない。いくつかの実施形態において、誘導条件は、誘導因子、照射(電離放射線、光など)、温度(加熱など)、酸化還元状態、腫瘍環境及び操作された免疫細胞の活性化状態からなる群から選択される。

10

【0275】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、誘導因子によって誘導可能である。いくつかの実施形態において、誘導因子は、化学物質などの小分子である。いくつかの実施形態において、小分子は、ドキシサイクリン、テトラサイクリン、アルコール、金属又はステロイドからなる群から選択される。化学的に誘導されるプロモーターは、最も広く調査されている。そのようなプロモーターは、転写活性がドキシサイクリン、テトラサイクリン、アルコール、ステロイド、金属及び他の化合物などの小分子化学物質の存在又は不存在によって調節されるプロモーターを含む。リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子(rtTA)及びテトラサイクリン応答性エレメントプロモーター(TRE)によるドキシサイクリン誘導性システムは、現在、最も成熟したシステムである。国際公開第9429442号パンフレットは、テトラサイクリン応答性プロモーターによる真核細胞中での遺伝子発現の厳格な制御を記載している。国際公開第9601313号パンフレットは、テトラサイクリン調節性転写修飾因子を開示している。さらに、Tet-onシステムなどのTet技術は、例えば、TetSystems.comのウェブサイト上に記載されている。既知の化学的に調節されるプロモーターのいずれかを使用して、本出願における治療用タンパク質の発現を活発にし得る。

20

【0276】

いくつかの実施形態において、誘導因子は、成長因子、ホルモン又は細胞表面受容体に対するリガンドなどのポリペプチド、例えば腫瘍抗原に特異的に結合するポリペプチドである。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、操作された免疫細胞によって発現される。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、核酸中の核酸によってコードされる。多くのポリペプチド誘導因子も当技術分野において知られており、それらは、本発明における使用に適している場合がある。例えば、エクジソン受容体系遺伝子スイッチ、プロゲステロン受容体系遺伝子スイッチ及びエストロゲン受容体系遺伝子スイッチは、ステロイド受容体に由来するトランス活性化因子を利用する遺伝子スイッチに属する(国際公開第9637609号パンフレット及び国際公開第9738117号パンフレットなど)。

30

【0277】

いくつかの実施形態において、誘導因子は、小分子成分及び1つ以上のポリペプチドの両方を含む。例えば、ポリペプチドの二量体化に依存する誘導性プロモーターが当技術分野において知られており、本発明における使用に適している場合がある。1993年に開発された最初の小分子CIDシステムは、薬物FK506の誘導体であるFK1012を使用して、FKBPのホモ二量体化を誘導した。同様の戦略を採用することにより、Wuらは、ラパログ/FKPB-FRB*及びジベレリン/GID1-GAI二量体化依存性遺伝子スイッチを使用してON-スイッチ方式を介して滴定できるCAR-T細胞を作製することに成功している(C.-Y. Wu et al., Science 350, aab4077(2015))。他の二量体化依存性スイッチシステムとしては、クーママイシン/GyrB-GyrB(Nature 383(6596):178-81)及びH

40

50

a X S / スナッパー タグー HaloTag (Chemistry and Biology 20 (4) : 549-57) が挙げられる。

【0278】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、光誘導性プロモーターであり、誘導条件は、光である。哺乳動物細胞において遺伝子発現を調節するための光誘導性プロモーターも当技術分野で知られている（例えば、Science 332, 1565-1568 (2011) ; Nat. Methods 9, 266-269 (2012) ; Nature 500 : 472-476 (2013) ; Nature Neuroscience 18 : 1202-1212 (2015) を参照されたい）。そのような遺伝子調節システムは、（１）DNA 結合、又は（２）転写活性化ドメインの DNA 結合タンパク質への動員の調節に基づいて２つのカテゴリーに大まかに分類され得る。例えば、カルシニューリンに媒介される NFAT の動員をもたらす青色光（480 nm）に反応して細胞内のカルシウムの増加を誘発するメラノプシンに基づく合成的な哺乳動物の青色光制御転写システムが開発され、哺乳動物細胞において試験された。さらに、最近では、Motta-Mena らは、ヒト細胞株及びゼブラフィッシュ胚において転写開始の高レベルの青色光感受性制御を付与する天然に存在する EL222 転写因子から開発された新規の誘導性遺伝子発現システムを記載した（Nat. Chem. Biol. 10 (3) : 196-202 (2014)）。加えて、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）の光受容体フィトクロム B（PhyB）及びフィトクロム相互作用因子 6（PIF6）の赤色光に誘導される相互作用が、赤色光に誘発される遺伝子発現調節について調査された。さらに、紫外線 B（UVB）誘導性遺伝子発現システムも開発され、哺乳動物細胞における標的遺伝子転写に有効であることが証明された（Gene and Cell Therapy : Therapeutic Mechanisms and Strategies, Fourth Edition CRC Press, Jan. 20th, 2015 のチャプター 25）。本明細書に記載される光誘導性プロモーターのいずれかを使用して、本発明における治療用タンパク質の発現を活発にし得る。

【0279】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、光誘導性分子及び光の組み合わせによって誘導される光誘導性プロモーターである。例えば、化学的誘導因子上の光で切断可能な光ケージド基は、光ケージド基が照射又は他の手段によって除去されない限り、誘導因子を不活性のまま保つ。そのような光誘導性分子としては、小分子化合物、オリゴヌクレオチド及びタンパク質が挙げられる。例えば、ケージドエクジソン、lac オペロンとの使用のためのケージド IPTG、リボザイム媒介遺伝子発現のためのケージドトヨカマイシン、Tet-on システムとの使用のためのケージドドキシサイクリン及び光媒介 FKB P / FRB 二量体化のためのケージドドラパログが開発されている（例えば、Curr Opin Chem Biol. 16 (3-4) : 292-299 (2012) を参照されたい）。

【0280】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、放射線誘導性プロモーターであり、誘導条件は、電離放射線などの放射線である。放射線誘導性プロモーターも、導入遺伝子発現を制御するために当技術分野において知られている。遺伝子発現の変化は、細胞の照射時に起こる。例えば、「最初期遺伝子」として知られる遺伝子の群は、電離放射線に対して迅速に反応し得る。例示的な最初期遺伝子としては、Erg-1、p21 / WAF-1、GADD45 アルファ、t-PA、c-Fos、c-Jun、NF-κB 及び AP1 が挙げられるが、これらに限定されない。最初期遺伝子は、それらのプロモーター領域中に放射線応答配列を含む。コンセンサス配列 CC (A / T) 6 GG (配列番号 65) は、Erg-1 プロモーターにおいて見出されており、血清応答エレメントと称されるか又は GArG エレメントとして知られる。放射線誘導性プロモーター及び導入遺伝子の組み合わせは、集中的に研究されており、治療効果を有して有効であることが証明された。例えば、Cancer Biol Ther. 6 (7) : 1005-12 (2007) 及び G

ene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies, Fourth Edition CRC Press, Jan. 20th, 2015のチャプター25を参照されたい。最初期遺伝子プロモーター又は血清応答エレメント若しくは配列番号65を含む任意のプロモーターのいずれかが、本発明の治療用タンパク質の発現を活発にする放射線誘導性プロモーターとして有用であり得る。

【0281】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、熱誘導性プロモーターであり、誘導条件は、熱である。導入遺伝子発現を活発にする熱誘導性プロモーターも当技術分野において広く研究されている。Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40、Hsp10などを含む熱ショック又はストレスタンパク質（HSP）は、熱又は他の物理的及び化学的ストレス下で細胞を保護する際に重要な役割を果たす。熱ショックタンパク質（HSP）プロモーター並びに増殖停止及びDNA損傷（GADD）153プロモーターを含むいくつかの熱誘導性プロモーターが前臨床試験において試みられている。1985年に最初に記載されたヒトhsp70B遺伝子のプロモーターは、最も効率的な熱誘導性プロモーターの1つであるように見える。Huangらは、hsp70B-EGFP、hsp70B-TNFアルファ及びhsp70B-IL12コード配列の導入後、腫瘍細胞が熱処理時に非常に高い導入遺伝子発現を示した一方、熱処理がない場合、導入遺伝子の発現が検出されなかったことを報告した。加えて、腫瘍増殖は、インビボにおいて、IL12導入遺伝子に加えて熱処理されたマウスの群において著しく遅延された（Cancer Res. 60:3435（2000））。別の科学者のグループは、HSV-tk自殺遺伝子をhsp70Bプロモーターに連結し、マウス乳癌を有するヌードマウスにおいてそのシステムを試験している。腫瘍にhsp70B-HSVtkコード配列を投与し、熱処理したマウスは、熱処理を行わなかった対照と比較して、腫瘍の退縮及び有意な生存率を示した（Hum. Gene Ther. 11:2453（2000））。当技術分野において知られるさらなる熱誘導性プロモーターは、例えば、Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies, Fourth Edition CRC Press, Jan. 20th, 2015のチャプター25において見出され得る。本明細書で議論される熱誘導性プロモーターのいずれかを使用して、本発明の治療用タンパク質の発現を活発にし得る。

【0282】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、酸化還元状態によって誘導可能である。酸化還元状態によって誘導可能である例示的なプロモーターとしては、誘導性プロモーター及び低酸素誘導性プロモーターが挙げられる。例えば、Post Deらは、低酸素誘導性因子（HIF）活性腫瘍細胞において導入遺伝子発現を特異的且つ強力に誘導するHIF応答性プロモーターを開発した（Gene Ther. 8:1801-1807（2001）；Cancer Res. 67:6872-6881（2007））。

【0283】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、操作された免疫細胞の内因性活性化シグナルなどの生理的状态によって誘導可能である。操作された免疫細胞がT細胞であるいくつかの実施形態において、プロモーターは、操作されたT細胞の内因性活性化シグナルによって誘導可能なT細胞活性化依存性プロモーターである。いくつかの実施形態において、操作されたT細胞は、PMA、イオノマイシン又はフィトヘマグルチニンなどの誘導因子によって活性化される。いくつかの実施形態において、操作されたT細胞は、内因性T細胞受容体又は操作された受容体（組換えTCR又はCARなど）を介して腫瘍細胞上の腫瘍抗原の認識によって活性化される。いくつかの実施形態において、操作されたT細胞は、操作されたT細胞又は第2の操作された免疫細胞によって発現される免疫調節剤などの免疫チェックポイントの遮断薬によって活性化される。いくつかの実施形態において、T細胞活性化依存性プロモーターは、IL-2プロモーターである。いくつかの実施形態において、T細胞活性化依存性プロモーターは、NFATプロモーターである。いくつか

の実施形態において、T細胞活性化依存性プロモーターは、NFκBプロモーターである。

【0284】

理論又は仮定に拘束されるものではないが、IL-2プロモーターからの遺伝子転写によって開始されるIL-2発現は、T細胞活性化の主要な活性である。ホルボール12-ミリスチン酸塩13-酢酸塩(PMA)、又はイオノマイシン、又はフィトヘマグルチニンによるヒトT細胞の非特異的刺激は、刺激されたT細胞からのIL-2分泌をもたらす。IL-2プロモーターは、遺伝子操作されたT細胞において活性化に誘導される導入遺伝子発現について調査された(Virology Journal 3:97(2006))。本発明者らは、IL-2プロモーターが、ヒトT細胞株においてPMA/PHA-P活性化の存在下でレポーター遺伝子発現を開始するのに有効であることを見出した。T細胞受容体刺激は、細胞基質カルシウム濃度の増加をもたらし、且つNFAT及びNFκBの両方の核での翻訳をもたらす細胞内反応のカスケードを開始する。活性化されたT細胞の核因子(NFAT)のメンバーは、Tリンパ球中で免疫応答を媒介するCa²⁺依存性転写因子である。NFATは、活性化されたT細胞中での誘導可能なインターロイキン-2(IL-2)発現に非常に重要であることが示されている(Mol Cell Biol. 15(11):6299-310(1995); Nature Reviews Immunology 5:472-484(2005))。本発明者らは、NFATプロモーターが、ヒトT細胞株においてPMA/PHA-P活性化の存在下でレポーター遺伝子発現を開始するのに有効であることを見出した。核因子カッパB(NFκB)を含む他の経路も、T細胞活性化を介して導入遺伝子発現を制御するために利用され得る。

10

20

【0285】

操作された免疫細胞の調製

操作された免疫細胞は、末梢血、臍帯血、骨髄、腫瘍浸潤リンパ球、リンパ節組織又は胸腺組織から得ることができる。宿主細胞は、癒合細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞を含み得る。細胞は、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、マウス、ラット及びそのトランスジェニック種から得ることができる。細胞は、確立された細胞株から得ることができる。

【0286】

認識分子、COR及び／又はbNAbを発現する操作された免疫細胞は、認識分子、COR及び／又はbNAbをコードする1つ以上の核酸(例えば、レンチウイルスベクターを含む)を免疫細胞に導入することによって作製され得る。いくつかの実施形態において、ベクターは、ウイルスベクターである。ウイルスベクターの例としては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアベクター、単純ヘルペスウイルスベクター及びその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスベクター技術は、当技術分野においてよく知られており、例えばSambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)並びに他のウイルス学及び分子生物学のマニュアルにおいて記載されている。

30

40

【0287】

いくつかのウイルスベースシステムが哺乳動物細胞への遺伝子導入のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達システムのための簡便なプラットフォームを提供する。当技術分野において知られる技術を使用して、核酸をベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次に、組換えウイルスを単離し、インビボ又はエクスビボで操作された免疫細胞に送達することができる。いくつかのレトロウイルスシステムが当技術分野において知られている。いくつかの実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。いくつかのアデノウイルスベクターが当技術分野において知られている。いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターが使用される。いくつかの実施形態において、自己不活性化レンチウイルスベクターが使用される。

50

例えば、認識分子、COR及び／又はbNAbをコードする核酸配列を有する自己不活性化レンチウイルスベクターは、当技術分野において知られるプロトコルでパッケージングされ得る。得られたレンチウイルスベクターは、当技術分野において知られる方法を使用して哺乳動物細胞（一次ヒトT細胞など）を形質導入することができる。

【0288】

いくつかの実施形態において、形質導入又はトランスフェクトされた哺乳動物細胞は、核酸の導入後にエキスピボで増やされる。いくつかの実施形態において、形質導入又はトランスフェクトされた哺乳動物細胞は、少なくとも約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、12日又は14日のいずれかにわたって増やすために培養される。いくつかの実施形態において、形質導入又はトランスフェクトされた哺乳動物細胞は、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、12日又は14日以下のいずれかにわたって培養される。いくつかの実施形態において、形質導入又はトランスフェクトされた哺乳動物細胞は、操作された免疫細胞を選択するためにさらに評価されるか又はスクリーニングされる。

10

【0289】

免疫細胞への1つ以上の核酸の導入は、当技術分野で知られている技術を使用して達成することができる。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（操作されたT細胞など）は、インピボで複製することができ、標的抗原の発現に関連する疾患（ウイルス感染など）の持続的制御を導くことができる長期間持続をもたらす。

【0290】

免疫細胞の拡大及び遺伝的修飾前にT細胞の供給源を対象から得る。T細胞は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位の組織、腹水、胸水液、脾臓組織及び腫瘍を含む多くの供給源から得ることができる。本発明のいくつかの実施形態において、当技術分野で入手可能な任意の数の免疫細胞株を使用し得る。本発明のいくつかの実施形態において、免疫細胞は、FICOLL（商標）分離法など、当業者に公知の任意の数の手法を用いて対象から採取した1単位の血液から得ることができる。いくつかの実施形態において、個体の循環する血液由来の細胞は、アフエレーシスによって得られる。アフエレーシス生成物は、典型的に、T細胞、単核球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球及び血小板を含むリンパ球を含有する。いくつかの実施形態において、アフエレーシスによって採取された細胞は、次の処理工程のために、血漿画分を除去するために洗浄され、適切な緩衝液又は培地に入れられ得る。いくつかの実施形態において、細胞は、リン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄される。いくつかの実施形態において、洗浄溶液は、カルシウムを欠いており、マグネシウムを欠き得るか、又は全てではないにしても多くの二価カチオンを欠き得る。洗浄工程は、半自動化「フロースルー」遠心分離（例えば、Cobe 2991 cell processor、Baxter CytoMate又はHaemonetics Cell Saver 5）を製造者の説明書に従って用いることによるなど、当技術分野で公知の方法によって達成され得ることが当業者に容易に理解されるであろう。洗浄後、細胞は、Ca²⁺を含有せず、Mg²⁺を含有しないPBS、PlasmaLyte Aなどの様々な生体適合性緩衝液又は緩衝液を含む若しくは含まない他の生理食塩水溶液中で再懸濁され得る。代替的に、アフエレーシスサンプルの望ましくない成分は、除去され得、細胞は、培養液中に直接再懸濁される。

20

30

40

【0291】

いくつかの実施形態において、免疫細胞（T細胞など）は、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることにより、例えばPERCOLL（商標）勾配による遠心分離又は対向流遠心溶出法（counterflow centrifugal elutriation）により、末梢血リンパ球から単離される。CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺及びCD45RO⁺T細胞などのT細胞の特異的亜集団は、正の選択又は負の選択手法によってさらに単離され得る。例えば、いくつかの実施形態において、T細胞は、望ましいT細胞の正の選択に十分な時間期間中、DYNABEADS（登録商標）M-450CD3／CD28Tなどの抗CD3／抗CD28（即ち3×28）共役ビーズと

50

インキュベーションすることによって単離される。いくつかの実施形態において、時間期間は、約30分である。いくつかの実施形態において、期間は、30分～36時間以上の範囲である（これらの値間の全ての範囲を含む）。いくつかの実施形態において、期間は、少なくとも1、2、3、4、5又は6時間である。いくつかの実施形態において、時間期間は、10～24時間である。いくつかの実施形態において、インキュベーション時間期間は、24時間である。他の細胞の種類と比較してT細胞が少ない任意の状況において、より長いインキュベーション時間を使用してT細胞を単離し得る。さらに、より長いインキュベーション時間の使用により、CD8⁺T細胞捕獲の効率を高めることができる。したがって、T細胞がCD3／CD28ビーズに結合することができる時間を単純に短くするか若しくは長くすることにより、且つ／又はビーズのT細胞に対する比を大きくするか若しくは小さくすることにより、培養開始において又は処理中の他の時間点においてT細胞の亜集団を優先的に選択するか又はしないことができる。さらに、ビーズ又は他の表面上の抗CD3抗体及び／又は抗CD28抗体の割合を大きくするか又は小さくすることにより、培養開始において又は他の望ましい時間点においてT細胞の亜集団を優先的に選択するか又はしないことができる。本発明に関連して、複数回の選択も使用できることが当業者に認識されるであろう。いくつかの実施形態において、選択手順を実行し、活性化及び拡大プロセスにおいて、「選択されない」細胞を使用することが望ましい場合がある。「選択されない」細胞は、さらなる回数の選択に供され得る。

10

【0292】

負の選択によるT細胞集団の濃縮は、負に選択される細胞に特有の表面マーカーを対象とする抗体の組み合わせで達成することができる。一方法は、負に選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーを対象とするモノクローナル抗体の混合物を使用する、陰性磁気免疫接着又はフローサイトメトリーによる細胞の選別及び／又は選択である。例えば、負の選択によってCD4⁺細胞を濃縮するためには、モノクローナル抗体混合物は、典型的に、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR及びCD8に対する抗体を含む。いくつかの実施形態において、典型的には、CD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺及びFoxP3⁺を発現する調節性T細胞のために、濃縮又は正の選択をすることが望ましい場合がある。代替的に、いくつかの実施形態において、T調節性細胞は、抗CD25共役ビーズ又は他の類似の選択法によって枯渇される。

20

【0293】

正又は負の選択による望ましい細胞集団の単離に関して、細胞及び表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度は、変動し得る。いくつかの実施形態において、細胞及びビーズの接触を確実に最大にするために、ビーズ及び細胞と一緒に混合されている体積を著しく減少させる（即ち細胞の濃度を増大させる）ことが望ましい場合がある。例えば、いくつかの実施形態において、約20億細胞／mLの濃度が用いられる。いくつかの実施形態において、約10億細胞／mLの濃度が用いられる。いくつかの実施形態において、約1億細胞／mL超が使用される。いくつかの実施形態において、約1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万又は5000万細胞／mLのいずれかの細胞の濃度が用いられる。いくつかの実施形態において、約7500万、8000万、8500万、9000万、9500万又は1億細胞／mLのいずれかの細胞の濃度が用いられる。いくつかの実施形態において、約1億2500万又は約1億5000万細胞／mLの濃度が用いられる。高濃度を用いると、細胞収率、細胞活性化及び細胞拡大の増大をもたらす得る。さらに、高い細胞濃度を用いると、CD28陰性T細胞など、関心対象の標的抗原を弱く発現している場合がある細胞又は多くの腫瘍細胞が存在するサンプル（即ち白血病血液、腫瘍組織など）からの細胞をより効率的に捕獲することが可能になる。このような細胞集団は、治療的価値を有する場合があり、得ることが望ましいであろう。例えば、高濃度の細胞を用いると、通常ではより弱いCD28発現を有するCD8⁺T細胞をより効率的に選択することができる。

30

40

【0294】

所望の認識分子、任意選択によりCOR及び任意選択によりbNAbを発現する免疫細胞

50

の遺伝子改変前であっても又は後であっても、免疫細胞を活性化及び増殖させることができる。

【0295】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される免疫細胞（T細胞など）は、CD3／TCR複合体関連シグナルを刺激する薬剤が結合された表面及びT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドを接触させることによって増殖される。特に、T細胞集団は、例えば、表面上に固定化された抗CD3抗体若しくはその抗原結合フラグメント又は抗CD2抗体と接触させるか、又はカルシウムイオノフォアと共にプロテインキナーゼC活性化剤（例えば、プリオスタチン）と接触させることによって刺激され得る。T細胞の表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子に結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞の集団は、T細胞の増殖を刺激するのに適切な条件下で抗CD3抗体及び抗CD28抗体と接触され得る。CD4＋T細胞又はCD8＋T細胞の増殖を刺激するために、抗CD3抗体及び抗CD28抗体が使用される。抗CD28抗体の例としては、9.3、B-T3、XR-CD28（Diaclone、Besancon、France）が挙げられ、当技術分野において一般に知られる他の方法と同様に使用され得る（Berg et al., Transplant Proc. 30（8）：3975－3977, 1998；Haanen et al., J. Exp. Med. 190（9）：13191328, 1999；Garland et al., J. Immunol. Meth. 227（1－2）：53－63, 1999）。

10

【0296】

遺伝子改変

いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、CCR5の発現を遮断するか又は減少させるために改変されたT細胞である。例えば、RNA干渉（例えば、siRNA、shRNA、miRNA）、遺伝子編集（例えば、CRISPR又はTALENベースの遺伝子ノックアウト）などを含む遺伝子発現を妨害するための細胞の改変は、当技術分野において知られるそのような手法を含む。

20

【0297】

いくつかの実施形態において、CCR5の発現の低減を有する操作されたT細胞は、CRISPR／Casシステムを使用して作製される。遺伝子編集のCRISPR／Casシステムの概説に関しては、例えば、Jian W&Marraffini LA, Annu. Rev. Microbiol. 69, 2015；Hsu PD et al., Cell, 157（6）：1262－1278, 2014；及びO'Connell MR et al., Nature 516：263－266, 2014を参照されたい。いくつかの実施形態において、T細胞の内因性TCR鎖の一方又は両方の発現の低減を有する操作されたT細胞は、例えば、TALENベースのゲノム編集を使用して作製される。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞、特にドナーから得られた同種他家免疫細胞は、MHC認識に関与するTCRの構成要素を不活性化するために改変され得る。いくつかの実施形態において、改変された免疫細胞は、移植片対宿主病を引き起こさない。

30

【0298】

いくつかの実施形態において、CCR5遺伝子（又はTCR遺伝子）は、CRISPR／Cas9遺伝子編集を使用して不活性化される。CRISPR／Cas9は、2つの主要な特徴を含む：短いガイドRNA（gRNA）及びCRISPR関連エンドヌクレアーゼ又はCasタンパク質。Casタンパク質は、目的の遺伝子の指定された標的化、その後のノックアウトを可能にする操作されたスパーサーを含有するgRNAに結合することができる。標的化されると、Casタンパク質がDNA標的配列を切断し、遺伝子のノックアウトをもたらす。

40

【0299】

いくつかの実施形態において、CCR5遺伝子（又はTCR遺伝子）は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN（登録商標））ベースのゲノム編集を使用して不活性化される。TALEN（登録商標）ベースのゲノム編集は、DNAの特定の領域に

50

対する標的化のために操作され得る制限酵素の使用を含む。転写活性化因子様エフェクター（T A L E）DNA結合ドメインは、DNA切断ドメインに融合される。T A L Eは、ヌクレアーゼを目的の配列に標的化することに関与し、切断ドメイン（ヌクレアーゼ）は、DNAを切断することに関与し、DNAのそのセグメントの除去及びその後の遺伝子のノックアウトをもたらす。

【0300】

いくつかの実施形態において、CCR5遺伝子（又はTCR遺伝子）は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）ゲノム編集法を使用して不活性化される。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン及びDNA切断ドメインで構成される人工的な制限酵素である。ZFN DNA結合ドメインは、DNAの特定の領域に対する標的化のために操作され得る。DNA切断ドメインは、目的のDNA配列の切断に関与し、DNAのそのセグメントの除去及びその後の遺伝子のノックアウトをもたらす。

10

【0301】

いくつかの実施形態において、CCR5遺伝子の発現は、小さい干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA及び短いヘアピンRNA（shRNA）などのRNA干渉（RNAi）を使用することによって低減される。siRNA分子は、目的の遺伝子からのメッセンジャーRNA（mRNA）転写物に相補的な20～25ヌクレオチド長オリゴヌクレオチド二本鎖である。siRNAは、破壊のためにこれらのmRNAを標的化する。標的化により、siRNAは、mRNA転写物が翻訳されることを妨げ、それによりタンパク質が細胞によって産生されることを妨げる。

20

【0302】

いくつかの実施形態において、CCR5遺伝子（又はTCR遺伝子）の発現は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することによって低減される。mRNAを標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、一般に、当技術分野において知られており、遺伝子発現を下方制御するために日常的に使用される。Watts, J. and Corey, D (2012) J. Pathol. 226 (2) : 365-379を参照されたい。

【0303】

操作された免疫細胞の濃縮

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される操作された免疫細胞のいずれかによる操作された免疫細胞のための異種細胞集団を濃縮する方法が提供される。

30

【0304】

標的抗原及び標的リガンド（例えば、CD22 D1～4又はCD22 D5～7）に特異的に結合する操作された免疫細胞（操作されたT細胞など）の特定の亜集団は、ポジティブ選択技術によって濃縮することができる。例えば、いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞（操作されたT細胞など）は、所望の操作された免疫細胞のポジティブ選択に十分な期間、標的抗原コンジュゲートビーズ及び／又は標的リガンドコンジュゲートビーズとのインキュベーションによって濃縮される。いくつかの実施形態において、期間は、約30分である。いくつかの実施形態において、期間は、30分～36時間以上（これらの値間の全ての範囲を含む）の範囲である。いくつかの実施形態において、期間は、少なくとも1、2、3、4、5又は6時間である。いくつかの実施形態において、期間は、10～24時間である。いくつかの実施形態において、インキュベーション期間は、24時間である。異種細胞集団において低レベルで存在する操作された免疫細胞の単離のために、24時間などのより長いインキュベーション時間の使用によって細胞収量を増加させることができる。より長いインキュベーション時間を使用して、他の細胞型と比較して少ない操作された免疫細胞が存在する任意の状況において操作された免疫細胞を単離し得る。本発明に関連して、複数回の選択も使用できることが当業者に認識されるであろう。

40

【0305】

ポジティブ選択による望ましい操作された免疫細胞の集団の単離に関して、細胞及び表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度は、変動し得る。いくつかの実施形態において、細

50

胞及びビーズの接触を確実に最大にするために、ビーズ及び細胞と一緒に混合されている体積を著しく減少させる（即ち細胞の濃度を増大させる）ことが望ましい場合がある。例えば、いくつかの実施形態において、約20億細胞／m lの濃度が使用される。いくつかの実施形態において、約10億細胞／m lの濃度が使用される。いくつかの実施形態において、約1億細胞／m lを超えて使用される。いくつかの実施形態において、約1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万又は5000万細胞／m lのいずれかの細胞の濃度が使用される。いくつかの実施形態において、約7500万、8000万、8500万、9000万又は1億細胞／m lの細胞の濃度が使用される。いくつかの実施形態において、約1億2500万又は約1億5000万細胞／m lの濃度が使用される。高濃度の使用により、細胞収量、細胞の活性化及び細胞増殖の増大をもたらすことができる。さらに、高い細胞濃度の使用により、認識分子、C O R及び／又はb N A bを弱く発現している可能性のある操作された免疫細胞のより効率的な捕捉が可能になる。

10

【0306】

いくつかの実施形態において、濃縮は、最小限の操作された免疫細胞の枯渇をもたらすか又は実質的にもたらさない。例えば、いくつかの実施形態において、濃縮は、操作された免疫細胞の約50%未満（例えば、45、40、35、30、25、20、15、10又は5%のいずれか未満）が枯渇する結果をもたらす。免疫細胞の枯渇は、本明細書に記載の任意の手段を含む、当技術分野で知られている任意の手段によって決定することができる。

20

【0307】

いくつかの実施形態において、濃縮は、最小限の操作された免疫細胞の最終分化をもたらすか又は実質的にもたらさない。例えば、いくつかの実施形態において、濃縮は、操作された免疫細胞の約50%未満（例えば、45、40、35、30、25、20、15、10又は5%のいずれか未満）が最終分化する結果をもたらす。免疫細胞の分化は、本明細書に記載の任意の方法を含む、当技術分野で知られている任意の方法によって決定することができる。

【0308】

いくつかの実施形態において、濃縮は、操作された免疫細胞上での認識分子又はC O Rの最小限の内在化をもたらすか又は実質的に内在化をもたらさない。例えば、いくつかの実施形態において、濃縮は、操作された免疫細胞上の認識分子又はC O Rの約50%未満（約45、40、35、30、25、20、15、10又は5%未満のいずれかなど）が内在化される。操作された免疫細胞上の認識分子又はC O Rの内在化は、本明細書に記載される任意の方法を含む、当技術分野において知られる任意の方法によって決定され得る。

30

【0309】

いくつかの実施形態において、濃縮は、操作された免疫細胞の増殖の増加をもたらす。例えば、いくつかの実施形態において、濃縮は、濃縮後の操作された免疫細胞の数において少なくとも約10%（少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000%以上のいずれかなど）の増加をもたらす。

40

【0310】

したがって、いくつかの実施形態において、認識分子（又はその1つ以上の部分）を発現する操作された免疫細胞のための異種細胞集団を濃縮する方法であって、a）異種細胞集団を、標的分子（C D 2 2 など）若しくはそれに含有される1つ以上のエピトープを含む第1の分子及び／又は標的分子（C D 2 2 など）若しくはそれに含有される1つ以上のエピトープを含む第2の分子と接触させて、第1の分子に結合された操作された免疫細胞を含む複合体及び／又は第2の分子に結合された操作された免疫細胞を含む複合体を形成すること；及びb）複合体を異種細胞集団から分離し、それにより操作された免疫細胞について濃縮された細胞集団を作製することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態において、第1及び／又は第2の分子は、個別に、固体支持体に固定化される。いくつかの

50

実施形態において、固体支持体は、粒子（ビーズなど）である。いくつかの実施形態において、固体支持体は、表面（壁の底など）である。いくつかの実施形態において、第1及び／又は第2の分子は、個別に、タグで標識される。いくつかの実施形態において、タグは、蛍光分子、親和性タグ又は磁気タグである。いくつかの実施形態において、方法は、操作された免疫細胞を第1及び／又は第2の分子から溶出すること及び溶出液を回収することをさらに含む。

【0311】

いくつかの実施形態において、免疫細胞又は操作された免疫細胞は、例えば、ネガティブ濃縮の使用により、CD4+及び／又はCD8+細胞について濃縮され、それにより、細胞混合物は、物理的（カラム）及び磁性（MACS磁性ビーズ）精製工程の両方を含む2工程の精製方法を使用して精製される（Gunzer, M. et al. (2001) J. Immunol. Methods 258 (1-2): 55-63）。他の実施形態において、細胞の集団は、CD4+又はCD8+細胞の濃縮のために特別に設計されたT細胞濃縮カラムの使用により、CD4+及び／又はCD8+細胞について濃縮され得る。さらに他の実施形態において、細胞集団は、市販のキットの使用により、CD4+細胞について濃縮され得る。いくつかの実施形態において、市販のキットは、EASYSEP（商標）ヒトCD4+T細胞濃縮キット（Stemcell Technologies）である。他の実施形態において、市販のキットは、MAGNISORT（商標）マウスCD4+T細胞濃縮キット（Thermo Fisher Scientific）である。

10

【0312】

医薬組成物

本明細書では、本明細書に記載される操作された免疫細胞（T細胞など）を含む、操作された免疫細胞の組成物（本明細書で製剤とも称される医薬組成物など）も提供される。

20

【0313】

いくつかの実施形態において、同じ細胞型の操作された免疫細胞（操作されたT細胞など）の異種細胞集団を含み、且つ同じ認識分子（又はその1つ以上の部分）及び任意選択によりCOR並びに／又は任意選択によりbNAbを発現する操作された免疫細胞の組成物が提供される。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、ナチュラルキラーT細胞及びγδT細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞の組成物は、医薬組成物である。

30

【0314】

いくつかの実施形態において、異なる細胞型の操作された免疫細胞を含む複数の操作された免疫細胞集団を含む異種細胞集団を含み、異なる認識分子（又はその1つ以上の部分）、任意選択により異なるCOR及び／又は任意選択により異なるbNAbを発現する操作された免疫細胞の組成物が提供される。

【0315】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、ヒト個体などの個体への投与に適している。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、注射に適している。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、注入に適している。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、細胞培養培地を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、内毒素又はアレルゲン性タンパク質を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、「実質的に含まない」は、医薬組成物の総体積又は重量の約10%、5%、1%、0.1%、0.01%、0.001%未満、1ppm以下のいずれかである。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、マイコプラズマ、微生物因子及び／又は感染性疾患因子を含まない。

40

【0316】

本出願人の医薬組成物は、任意の数の操作された免疫細胞を含み得る。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、操作された免疫細胞の単一のコピーを含む。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、少なくとも約1、10、100、1000、10⁴、10

50

5、106、107、108以上のいずれかのコピーの操作された免疫細胞を含む。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、操作された免疫細胞の単一の型を含む。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、操作された免疫細胞の少なくとも2つの型を含み、異なる型の操作された免疫細胞は、それらの細胞供給源、細胞型、発現される治療用タンパク質（例えば、認識分子、COR及び／又はbNAb）及び／又はプロモーターなどが異なる。

【0317】

組成物の調製中の様々な時点で細胞を凍結保存することが必要又は有益であり得る。「凍結された／凍結」及び「凍結保存された／凍結保存」という用語は、同じ意味で使用できる。凍結は、凍結乾燥を含む。

10

【0318】

いくつかの実施形態において、細胞は、培養培地から回収され、洗浄され、治療有効量で担体中に濃縮され得る。例示的な担体には、食塩水、緩衝食塩水、生理食塩水、水、ハanks液、リンゲル液、Nonnosol-R (Abbott Labs)、Plasma-Lyte A (登録商標) (Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, IL)、グリセロール、エタノール及びそれらの組み合わせが含まれる。

【0319】

いくつかの実施形態において、担体は、ヒト血清アルブミン (HSA) 又は他のヒト血清成分又はウシ胎児血清で補充することができる。特定の実施形態において、注入のための担体には、5% HSA 又はデキストロースを含む緩衝生理食塩水が含まれる。さらなる等張化剤としては、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール又はマンニトールなどの三価以上の糖アルコール類を含む多価糖アルコール類が挙げられる。

20

【0320】

担体には、クエン酸塩緩衝剤、コハク酸塩緩衝剤、酒石酸塩緩衝剤、フマル酸塩緩衝剤、グルコン酸塩緩衝剤、シュウ酸塩緩衝剤、乳酸塩緩衝剤、酢酸塩緩衝剤、リン酸塩緩衝剤、ヒスチジン緩衝剤及び／又はトリメチルアミン塩などの緩衝剤が含まれ得る。

【0321】

安定化剤は、充填剤から、細胞が容器壁に付着することを防ぐのに役立つ添加剤までの機能に及び得る賦形剤の幅広いカテゴリーを指す。典型的な安定化剤としては、多価糖アルコール；アルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L-ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸及びスレオニンなどのアミノ酸；ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイノシトール、ガラクトクトール、グリセロール及びシクリトール類（イノシトールなど）などの有機糖又は糖アルコール；PEG；アミノ酸ポリマー；尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、アルファ-モノチオグリセロール及びチオ硫酸ナトリウムなどの含硫還元剤；低分子ポリペプチド（即ち残基10未満）；HSA、ウシ血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；キシロース、マンノース、フルクトース及びグルコースなどの単糖類；ラクトース、マルトース及びスクロースなどの二糖類；ラフィノースなどの三糖類並びにデキストランなどの多糖類を挙げることができる。

30

40

【0322】

必要又は有益な場合、組成物は、注射部位の痛みを和らげるためにリドカインなどの局所麻酔剤を含み得る。

【0323】

例示的な防腐剤には、フェノール、ベンジルアルコール、メタクレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ベンザルコニウムハライド、ヘキサメトニウムクロリド、メチル又はプロピルパラベンなどのアル

50

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及び3-ペンタノールが含まれる。

【0324】

組成物内の治療有効量の細胞は、10²細胞超、10³細胞超、10⁴細胞超、10⁵細胞超、10⁶細胞超、10⁷細胞超、10⁸細胞超、10⁹細胞超、10¹⁰細胞超又は10¹¹細胞超であり得る。

【0325】

本明細書に開示される組成物及び製剤において、細胞は、一般に、1リットル以下、500ml以下、250ml以下又は100ml以下の体積である。したがって、投与される細胞の密度は、典型的には、10⁴細胞/ml、10⁷細胞/ml又は10⁸細胞/mlより高い。

10

【0326】

本明細書では、本明細書に記載される認識分子（又はその1つ以上の部分）、任意選択によるCOR及び／又は任意選択によるbNAbをコードする核酸のいずれかを含む核酸組成物（本明細書で製剤とも称される、医薬組成物など）も提供される。いくつかの実施形態において、核酸組成物は、医薬組成物である。いくつかの実施形態において、核酸組成物は、等張化剤、賦形剤、希釈剤、増粘剤、安定化剤、緩衝剤及び／若しくは防腐剤；並びに／又は精製水、水性糖溶液、緩衝溶液、生理食塩水、水性ポリマー溶液、RNAseフリー水などの水性ビヒクルのいずれかをさらに含む。加えられるそのような添加剤及び水性ビヒクルの量は、核酸組成物の使用の形態に従って好適に選択され得る。

20

【0327】

本明細書に開示される組成物及び製剤は、例えば、注射、注入、灌流又は洗浄による投与のために調製することができる。組成物及び製剤は、骨髄、静脈内、皮内、動脈内、結節内、リンパ管内、腹腔内、病変内、前立腺内、腔内、直腸内、局所、髄腔内、腫瘍内、筋肉内、小胞内及び／又は皮下注射用にさらに製剤化することができる。

【0328】

インビボ投与に使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、例えば、無菌ろ過膜を通したろ過によって容易に達成される。

【0329】

賦形剤

30

本出願の医薬組成物は、治療目的のために有用である。したがって、認識分子、任意選択によりCOR及び／又は任意選択によりbNAbを発現する産生細胞などの操作された免疫細胞を含む他の組成物と異なり、本出願の医薬組成物は、個体への投与に適した薬学的に許容される賦形剤を含む。

【0330】

好適な薬学的に許容される賦形剤は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチド又はグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；EDTA又はグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；及び防腐剤を含み得る。いくつかの実施形態において、薬学的に許容される賦形剤は、自己血清を含む。いくつかの実施形態において、薬学的に許容される賦形剤は、ヒト血清を含む。いくつかの実施形態において、薬学的に許容される賦形剤は、非毒性、生体適合性、非免疫原性、生分解性であり、宿主防御機構による認識を回避できる。賦形剤は、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤などのアジュバントも含有し得る。いくつかの実施形態において、薬学的に許容される賦形剤は、操作された免疫細胞又はそれから分泌される抗体若しくは他の治療用タンパク質の安定性を増強する。いくつかの実施形態において、薬学的に許容される賦形剤は、操作された免疫細胞によって分泌される抗体又は他の治療用タンパク質の凝集を減少させる。最終形態は、無菌であり得、中空針などの注射デバイスを通して容易に通過できる場合もある。適切な粘度は、賦形剤の適切な選択によって達成され、維持され得る。

40

50

【0331】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、例えば、約5.0～約8.0、約6.5～約7.5又は約6.5～約7.0のいずれか1つのpH範囲を含む、約4.5～約9.0の範囲のpHを有するように製剤化される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、グリセロールなどの好適な浸透圧調節剤の添加によって血液と等張になるようにも作製され得る。

【0332】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、ヒトへの投与に適している。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、非経口投与によるヒトへの投与に適している。非経口投与に適した製剤としては、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤及び製剤を対象のレシピエントの血液と適合させる溶質を含有し得る水性及び非水性等張無菌注射用溶液並びに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤及び防腐剤を含み得る水性及び非水性無菌懸濁液が挙げられる。製剤は、アンプル及びバイアルなどの単位用量又は複数用量密封容器中に提示され得、使用の直前に、本明細書に記載される治療の方法、投与の方法及び投与レジメンの無菌液体賦形剤（即ち水）を注射のために加えることのみを必要とする状態で保管され得る。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、単回使用密封バイアルなどの単回使用バイアル中に含有される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、複数回使用バイアル中に含有される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、容器中にバルクで含有される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、凍結保存される。

【0333】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、静脈内投与のために製剤化される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、皮下投与のために製剤化される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、腫瘍部位への局所投与のために製剤化される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、腫瘍内注射のために製剤化される。

【0334】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、個体への投与のための特定の基準を満たさなければならない。例えば、米国食品医薬品局は、21 CFR 610及び21 CFR 610.13を含む細胞ベースの免疫療法製品のための基準を設定する規制のガイドラインを発行した。医薬組成物の外観、同一性、純度、安全性及び／又は効力を評価する方法は、当技術分野において知られている。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、操作された哺乳動物免疫細胞以外の細胞培養物中で使用される動物供給源のタンパク質などのアレルギー作用をもたらすことができる外来性のタンパク質を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、「実質的に含まない」は、医薬組成物の総体積又は重量の約10%、5%、1%、0.1%、0.01%、0.001%未満、1ppm以下のいずれかである。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、GMPレベルのワークショップにおいて調製される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、非経口投与のために約5EU/kg体重/時間未満の内毒素を含む。いくつかの実施形態において、医薬組成物中の操作された免疫細胞の少なくとも約70%は、静脈内投与のために生きている。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、米国薬局方（USP）に記載されるとおりの14日間の直接接種試験法を使用して評価した場合、「増殖なし」という結果を有する。いくつかの実施形態において、医薬組成物の投与前に、操作された免疫細胞及び薬学的に許容される賦形剤の両方を含む試料は、最終的な収集のおよそ約48～72時間前（又は培養物の最後の再栄養補給と同時）に無菌試験のために採取されるべきである。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、マイコプラズマの混入がない。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、検出可能な微生物因子を含まない。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、I型HIV、II型HIV、HBV、HCV、ヒトTリンパ球向性ウイルス、I型；及びヒトTリンパ球向性ウイルス、II型などの伝染性の疾患因子を含まない。

【0335】

操作された免疫細胞を使用して疾患を処置する方法

本出願は、感染症、EBV陽性T細胞リンパ球増殖性障害、T細胞前リンパ性白血病、EBV陽性T細胞リンパ球増殖性障害、成人T細胞白血病／リンパ腫、菌状息肉症／セザリ一症候群、原発性皮膚T細胞リンパ球増殖性障害、末梢性T細胞リンパ腫（別段の指定がない場合）、血管免疫芽球形T細胞リンパ腫、及び未分化大細胞リンパ腫、及び自己免疫疾患を含むが、これらに限定されない疾患を処置するために、操作された免疫細胞を投与する方法をさらに提供する。

【0336】

遠位部分認識分子を含有する操作された免疫細胞は、自己療法に特に適している。いくつかの実施形態において、自己リンパ球注入が処置において使用される。自己PBMCは、処置を必要とする患者から回収され、T細胞は、本明細書に記載され、且つ当技術分野において知られる方法を使用して活性化され、増殖され、続いて患者に注入して戻される。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞の投与は、個体において遠位部分認識分子を含む操作された免疫細胞の枯渇（例えば、約70%、80%、90%、99%以上の減少又は完全な消失）をもたらす。

10

【0337】

近位部分認識分子を含有する操作された免疫細胞は、同種他家療法に特に適している。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞の投与は、個体において近位部分認識分子を含む操作された免疫細胞の約50%以下（約40%、30%、20%、10%又は5%のいずれか以下など）の減少をもたらす。

20

【0338】

操作された免疫細胞は、強いインビボ増殖を起こすことができ、血液及び骨髄中で長期間にわたり高レベルで持続する標的抗原（例えば、CD4又はCD22）特異的メモリー細胞を樹立することができる。いくつかの実施形態において、患者に注入された操作された免疫細胞は、癌又はウイルス感染細胞を枯渇させることができる。いくつかの実施形態において、患者に注入された操作された免疫細胞は、癌又はウイルス感染細胞を排除することができる。ウイルス感染処置は、例えば、ウイルス量、生存期間、生活の質、タンパク質の発現及び／又は活性によって評価することができる。

【0339】

本出願の操作された免疫細胞は、いくつかの実施形態において、癌、例えばT細胞リンパ腫、白血病、B細胞前駆体急性リンパ芽球形白血病（ALL）及びB細胞リンパ腫を処置するために個体（例えば、ヒトなどの哺乳動物）に投与され得る。したがって、本出願は、いくつかの実施形態において、個体において癌を処置するための方法であって、有効量の、本明細書に記載される実施形態のいずれか1つに従う操作された免疫細胞を含む組成物（医薬組成物など）を個体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、癌は、T細胞リンパ腫である。

30

【0340】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される癌を処置する方法は、第2の抗癌剤を個体に投与することをさらに含む。好適な抗癌剤としては、CD70標的薬、TRBC1、CD30標的薬、CD37標的薬、CCR4標的薬、CHOP（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾン）、CHOP（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、エトポシド及びプレドニゾン）、EPOCH（エトポシド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、シクロホスファミド及びプレドニゾン）、ハイパーCVAD（シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシン及びデキサメタゾン）、HDAC阻害剤、CD52抗体ベリノスタット、ベンダムスチン、BL-8040、ボルテゾミブ、CPI-613、モガムリズマブ、ネララビン、ニボルマブ、ロミデプシン及びルキシロチニブが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、第2の薬剤は、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、抗CTLA4抗体、抗PD1抗体又は抗PD-L1抗体）である。いくつかの実施形態において、第2の抗癌剤は、操作された免疫細胞と同時に投与される。いくつかの実施形態において、第2の抗癌剤は、操作された免疫細胞の投与と逐次的（例えば、その前又は後）に投与される。

40

50

いくつかの実施形態において、本発明の操作された免疫細胞の組成物は、標的抗原の発現を伴う疾患又は障害を処置するために第2、第3又は第4の薬剤（例えば、抗悪性腫瘍薬、増殖阻害剤、細胞傷害性薬物又は化学療法剤を含む）と組み合わせて投与される。

【0341】

本出願の操作された免疫細胞は、感染症、例えばHIVを処置するためにも個体（例えば、ヒトなどの哺乳動物）に投与され得る。したがって、本出願は、いくつかの実施形態において、個体において感染症を処置するための方法であって、有効量の、本明細書に記載される実施形態のいずれか1つに従う操作された免疫細胞を含む組成物（医薬組成物など）を個体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、ウイルス感染は、例えば、ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV）及びHIV（ヒト免疫不全ウイルス）から選択されるウイルスによって引き起こされる。

10

【0342】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される操作された免疫細胞のいずれかを投与することを含む、HIVを処置する方法が提供される。HIVの2つの亜型：HIV-1及びHIV-2が存在する。HIV-1は、世界的な大流行の原因であり、高い病原性及び高い感染性の両方を有するウイルスである。しかしながら、HIV-2は、西アフリカでのみ流行しており、HIV-1ほどの病原性も感染性もない。HIV-1及びHIV-2感染間の病原性及び感染性の差は、冒された個体においてより効率的な制御をもたらす、HIV-2感染においてウイルスタンパク質に対して開始されるより強い免疫応答に起因する可能性がある（Leligdowicz, A. et al. (2007) J. Clin. Invest. 117 (10): 3067-3074）。これは、HIV-1の世界的な広がり及びHIV-2の限定された地理的な罹患率についての支配的な原因でもあり得る。

20

【0343】

HIV-2感染は、HIV-1感染よりも良好に制御されるが、HIV-2に冒された個体は、依然として処置から恩恵を受けている。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、HIV-1感染を処置するために使用される。他の実施形態において、操作された免疫細胞は、HIV-2感染を処置するために使用される。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、HIV-1及びHIV-2感染を処置するために使用される。

30

【0344】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される感染症を処置する方法は、第2の抗感染症薬を個体に投与することをさらに含む。好適な抗感染症薬としては、抗レトロウイルス薬、広域中和抗体、トール様受容体アゴニスト、潜伏期再活性化剤、CCR5アンタゴニスト、免疫刺激剤（例えば、TLRリガンド）、ワクチン、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、ヌクレオチド逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、HIVプロテアーゼ阻害剤及び注入阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、第2の抗感染症薬は、操作された免疫細胞と同時に投与される。いくつかの実施形態において、第2の抗感染症薬は、操作された免疫細胞の投与と逐次的（例えば、その前又は後）に投与される。

40

【0345】

いくつかの実施形態において、個体は、哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコなど）である。いくつかの実施形態において、個体は、ヒトである。いくつかの実施形態において、個体は、臨床患者、臨床試験ボランティア、実験動物などである。いくつかの実施形態において、個体は、約60歳よりも若年（例えば、約50、40、30、25、20、15又は10歳のいずれかよりも若年を含む）である。いくつかの実施形態において、個体は、約60歳よりも年長（例えば、約70、80、90又は100歳のいずれかよりも年長を含む）である。いくつかの実施形態において、個体は、本明細書に記載の疾患又は障害（癌又はウイルス感染など）の1つ以上であると診断されるか、又は環境的又は遺伝的にその傾向がある。い

50

くつかの実施形態において、個体は、本明細書に記載の1つ以上の疾患又は障害に関連する1つ以上の危険因子を有する。

【0346】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、少なくとも約104、105、106、107、108又は109細胞/kgの体重のいずれかの用量で投与される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、約104～約105、約105～約106、約106～約107、約107～約108、約108～約109、約104～約109、約104～約106、約106～約108又は約105～約107細胞/kgの体重のいずれかの用量で投与される。

【0347】

いくつかの実施形態において、2種以上のタイプの操作された免疫細胞が投与され、異なるタイプの操作された免疫細胞が単一の組成物などで同時に又は任意の好適な順序で逐次的に個体に投与され得る。

【0348】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、1回で投与される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、複数回（2、3、4、5、6又はそれを超える回数のいずれかなど）で投与される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、週に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、4ヶ月に1回、5ヶ月に1回、6ヶ月に1回、7ヶ月に1回、8ヶ月に1回、9ヶ月に1回又は1年に1回投与される。いくつかの実施形態において、投与間の間隔は、約1週間～2週間、約2週間～1ヶ月、約2週間～2ヶ月、約1ヶ月～2ヶ月、約1ヶ月～3ヶ月、約3ヶ月～6ヶ月又は約6ヶ月～1年のいずれか1つである。特定の患者のための最適な投与量及び処置レジームは、疾患の徴候について患者をモニターし、処置を適宜調整することによって医学分野の当業者によって容易に決定され得る。

【0349】

したがって、例えば、いくつかの実施形態において、癌を有する個体を処置する方法であって、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）を個体に投与することを含み、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、個体にとって自己である、方法が提供される。いくつかの実施形態において、認識分子は、CAR又はcTCRなどの免疫細胞受容体である。

【0350】

いくつかの実施形態において、癌（例えば、B細胞関連癌、例えばB細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病又はB細胞リンパ腫）を有する個体を処置する方法であって、有効量の、抗CD22免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞（又は操作された免疫細胞を含む医薬組成物）を個体に投与することを含み、抗CD22免疫細胞受容体は、CD22のD1～4内のエピトープに特異的に結合するCD22結合部分を含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、操作された免疫細胞は、個体にとって自己である、方法が提供される。いくつかの実施形態において、抗CD22免疫細胞受容体は、抗CD22 D1～4 CARである。いくつかの実施形態において、抗CD22免疫細胞受容体は、抗CD22 D1～4 cTCRである。いくつかの実施形態において、癌は、CD22+である。いくつかの実施形態において、癌は、B細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病である。いくつかの実施形態において、癌は、B細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態において、方法は、第2の抗癌剤、例えばCD70標的薬、TRBC1、CD30標的薬、CD37標的薬、CCR4標的薬、CHOP（シクロホスファミド

10

20

30

40

50

、ドキシソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾン）、C H O E P（シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ビンクリスチン、エトポシド及びプレドニゾン）、E P O C H（エトポシド、ビンクリスチン、ドキシソルビシン、シクロホスファミド及びプレドニゾン）、ハイパー-C V A D（シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキシソルビシン及びデキサメタゾン）、H D A C 阻害剤、C D 5 2 抗体ベリノスタット、ベンダムスチン、B L - 8 0 4 0、ボルテゾミブ、C P I - 6 1 3、モガムリズマブ、ネララビン、ニボルマブ、ロミデプシン及びルキシロチニブからなる群から選択される抗癌剤を個体に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態において、第2の抗癌剤は、チェックポイント阻害剤（抗C T L A 4、抗P D 1及び抗P D - L 1など）である。いくつかの実施形態において、方法は、個体から免疫細胞を得ることをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、抗C D 2 2 D 1 ~ 4 免疫細胞受容体をコードする1つ以上の核酸を免疫細胞に導入して、抗C D 2 2 D 1 ~ 4 免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞を作製することをさらに含む。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞の投与は、個体において、抗C D 2 2 D 1 ~ 4 免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞の減少（例えば、約70%、80%、90%、99%以上の減少又は完全な消失）をもたらす。

10

20

30

40

50

【0351】

いくつかの実施形態において、標的細胞であって、その表面上で標的分子を発現する標的細胞（癌細胞など）の数を減少させる方法であって、標的細胞を、有効量の、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）と接触させることを含み、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞及び標的細胞は、同じ個体に由来する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、認識分子は、C A R 又はc T C R などの免疫細胞受容体である。

【0352】

いくつかの実施形態において、C D 2 2 + 細胞（例えば、B細胞関連C D 2 2 + 癌細胞、例えばB細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病又はB細胞リンパ腫細胞）の数を減少させる方法であって、C D 2 2 + 細胞を、有効量の、抗C D 2 2 免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞（又は操作された免疫細胞を含む医薬組成物）と接触させることを含み、抗C D 2 2 免疫細胞受容体は、C D 2 2 のD 1 ~ 4 内のエピトープに特異的に結合するC D 2 結合部分を含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、操作された免疫細胞及びC D 2 2 + 細胞は、同じ個体に由来する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、抗C D 2 2 免疫細胞受容体は、抗C D 2 2 D 1 ~ 4 C A R である。いくつかの実施形態において、抗C D 2 2 免疫細胞受容体は、抗C D 2 2 D 1 ~ 4 c T C R である。

【0353】

いくつかの実施形態において、癌を有する個体を処置する方法であって、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）を個体に投与することを含み、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有し、操作された免疫細胞は、個体にとって同種他家である、方法が提供される。いくつかの実施形態

において、認識分子は、CAR又はcTCRなどの免疫細胞受容体である。

【0354】

いくつかの実施形態において、癌（例えば、B細胞関連癌、例えばB細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病又はB細胞リンパ腫）を有する個体を処置する方法であって、有効量の、抗CD22免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞（又は操作された免疫細胞を含む医薬組成物）を個体に投与することを含み、抗CD22免疫細胞受容体は、CD22のD5～7内のエピトープに特異的に結合するCD22結合部分を含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、操作された免疫細胞は、個体にとって同種他家である、方法が提供される。いくつかの実施形態において、抗CD22免疫細胞受容体は、抗CD22 D5～7 CARである。いくつかの実施形態において、抗CD22免疫細胞受容体は、抗CD22 D5～7 cTCRである。いくつかの実施形態において、癌は、CD22+である。いくつかの実施形態において、癌は、B細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態において、方法は、第2の抗癌剤、例えばCD70標的薬、TRBC1、CD30標的薬、CD37標的薬及びCCR4標的薬からなる群から選択される抗癌剤を個体に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態において、第2の抗癌剤は、チェックポイント阻害剤（抗CTLA4、抗PD1及び抗PD-L1など）である。いくつかの実施形態において、方法は、ドナー個体から免疫細胞を得ることをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、抗CD22 D5～7免疫細胞受容体をコードする1つ以上の核酸を免疫細胞に導入して、抗CD22 D5～7免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞を作製することをさらに含む。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞の投与は、個体において、抗CD22 D5～7免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞の約50%以下（約40%、30%、20%、10%又は5%のいずれか以下など）の減少をもたらす。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、MHC認識に関与するTCRの構成要素を不活性化するために改変される。いくつかの実施形態において、操作された免疫細胞は、GvHDを引き起こさない。

10

20

【0355】

いくつかの実施形態において、標的細胞であって、その表面上で標的分子を発現する標的細胞（癌細胞など）の数を減少させる方法であって、標的細胞を、有効量の、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又はγδT細胞など）と接触させることを含み、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有し、操作された免疫細胞及び標的細胞は、異なる個体に由来する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、認識分子は、CAR又はcTCRなどの免疫細胞受容体である。

30

【0356】

いくつかの実施形態において、CD22+細胞（例えば、B細胞関連CD22+癌細胞、例えばB細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病又はB細胞リンパ腫細胞）の数を減少させる方法であって、CD22+細胞を、有効量の、抗CD22免疫細胞受容体を含む操作された免疫細胞（又は操作された免疫細胞を含む医薬組成物）と接触させることを含み、抗CD22免疫細胞受容体は、CD22のD5～7内のエピトープに特異的に結合するCD22結合部分を含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、操作された免疫細胞及びCD22+細胞は、異なる個体に由来する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、抗CD22免疫細胞受容体は、抗CD22 D5～7 CARである。いくつかの実施形態において、抗CD22免疫細胞受容体は、抗CD22 D5～7 cTCRである。

40

【0357】

50

したがって、例えば、いくつかの実施形態において、感染症（HIVなど）を有する個体を処置する方法であって、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）を個体に投与することを含み、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、個体にとって自己である、方法が提供される。いくつかの実施形態において、認識分子は、CAR又はcTCRなどの免疫細胞受容体である。

10

【0358】

いくつかの実施形態において、感染症（HIVなど）を有する個体を処置する方法であって、操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞（細胞傷害性T細胞、NK細胞又は $\gamma\delta$ T細胞など）を個体に投与することを含み、標的分子は、細胞外ドメイン（少なくとも約175アミノ酸長である細胞外ドメインなど）を含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有し、操作された免疫細胞は、個体にとって同種他家である、方法が提供される。いくつかの実施形態において、認識分子は、CAR又はcTCRなどの免疫細胞受容体である。

20

【0359】

製造品及びキット

本出願のいくつかの実施形態において、癌（例えば、B細胞関連癌）又はウイルス感染（例えば、HIVによる感染）などの感染症の処置に有用な材料を含有する製造品が提供される。製造品は、容器及び容器に付けられた又は関連付けられたラベル又はパッケージ挿入物を含み得る。好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジなどが挙げられる。容器は、ガラス又は合成樹脂などの様々な材料から形成され得る。一般に、容器は、本明細書に記載の疾患又は障害を処置するのに有効な組成物を保持し、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、静注溶液バッグ又は皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、その表面上において、本明細書に記載される認識分子を提示する操作された免疫細胞である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が特定の疾患又は状態を処置するために使用されることを示す。ラベル又はパッケージ挿入物は、患者への操作された免疫細胞の組成物の投与のための説明書をさらに含む。本明細書に記載の組み合わせ療法を含む製造品及びキットも企図される。

30

【0360】

パッケージ挿入物は、治療用製品の商用パッケージに習慣的に含まれる説明書を指し、説明書は、適応症、用法、用量、投与、禁忌及び／又はそのような治療用製品の使用に関する警告についての情報を含む。他の実施形態において、パッケージ挿入物は、組成物が標的抗原陽性ウイルス感染（例えば、HIVによる感染）又は癌（例えば、B細胞関連癌）を処置するために使用されることを示す。

40

【0361】

さらに、製造品は、注射用静菌水（BWFI）、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液及びデキストロース溶液などの医薬的に許容される緩衝液を含む第2の容器をさらに含み得る。製造品は、他の緩衝液、希釈液、フィルター、針及びシリンジを含む、商業及び使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

50

【0362】

様々な目的のために、例えば、本明細書に記載の標的抗原陽性の疾患又は障害の処置のために、任意選択により製造品と組み合わせた有用なキットも提供される。本発明のキットは、操作された免疫細胞の組成物（又は単位剤形及び／又は製造品）を含む1つ以上の容器を含み、いくつかの実施形態において、別の薬剤（本明細書に記載の薬剤など）及び／又は本明細書に記載の方法のいずれかに従う使用のための説明書をさらに含む。キットは、処置に適した個体の選択の説明をさらに含み得る。本出願のキットで提供される説明書は、典型的には、ラベル又はパッケージ挿入物（例えば、キットに含まれる紙のシート）に書かれた説明書であるが、機械可読の説明書（例えば、磁気又は光学記憶ディスクで運ばれる指示）も許容される。

10

【0363】

当業者は、本発明の範囲及び趣旨の範囲内でいくつかの実施形態が可能であることを認識するであろう。次に、本発明は、以下の非限定的な例示的实施形態及び実施例を参照することによってより詳細に説明される。以下の例示的实施形態及び実施例は、本発明をさらに説明するが、当然のことながら、決してその範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0364】

例示的实施形態

本出願は、以下の実施形態を提供する。

1. 操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含み、標的分子は、細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの遠位部分に特異的に結合し、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させることができる、操作された免疫細胞。

20

【0365】

2. 認識分子は、結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態1の操作された免疫細胞。

【0366】

3. 結合部分は、単ドメイン抗体（sdAb）、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv又はペプチドリガンドである、実施形態1又は2の操作された免疫細胞。

30

【0367】

4. 標的細胞の細胞外ドメインの遠位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約0.5倍を超える（例えば、約1倍、1.5倍、2倍又はそれを上回って超える）、実施形態1～3のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0368】

5. 標的分子の細胞外ドメインは、少なくとも約175アミノ酸長である、実施形態1～4のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0369】

6. (i) 結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約50アミノ酸以上離れている細胞外ドメイン中の領域に結合し；

40

(ii) 結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約80アミノ酸以上離れている細胞外ドメイン中の領域に結合し；及び／又は

(iii) 結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約120（例えば、約80）アミノ酸以内の領域に結合する、実施形態1～5のいずれか一項の操作された免疫細胞。

【0370】

7. 細胞外ドメインの遠位部分は、標的細胞の膜から少なくとも約30 Å（例えば、少なくとも約40、60、90、120 Å以上）離れている、実施形態1～6のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0371】

50

8. 標的分子の細胞外ドメインは、3つ以上のIg様ドメインを含む、実施形態1～7のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0372】

9. 結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の2つのIg様ドメインの外部（例えば、最初の3つの外部）の領域に結合する、実施形態8の操作された免疫細胞。

【0373】

10. 結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初の4つのIg様ドメイン内（例えば、最初のものの中）の領域に結合する、実施形態8又は9の操作された免疫細胞。

【0374】

11. 標的分子は、膜貫通受容体である、実施形態1～10のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0375】

12. 標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される、実施形態11の操作された免疫細胞。

【0376】

13. 標的分子は、CD22である、実施形態12の操作された免疫細胞。

【0377】

14. 結合部分は、CD22のドメイン1～4内のエピトープに特異的に結合する参照抗体（「抗CD22 D1～4抗体」）と結合について競合する、実施形態13の操作された免疫細胞。

【0378】

15. 結合部分は、参照抗CD22 D1～4抗体の結合エピトープと重複する、CD22のドメイン1～4中のエピトープに結合する、実施形態13又は14の操作された免疫細胞。

【0379】

16. 結合部分は、参照抗CD22 D1～4抗体のものと同一重鎖及び軽鎖CDR配列を含む、実施形態13～15のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0380】

17. 結合部分は、参照抗CD22 D1～4抗体のものと同一重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）配列を含む、実施形態16の操作された免疫細胞。

【0381】

18. 参照抗CD22 D1～4抗体は、配列番号67のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1（HC-CDR1）、配列番号68のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2（HC-CDR2）、配列番号69のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3（HC-CDR3）、配列番号70のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1（LC-CDR1）、配列番号71のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2（LC-CDR2）及び配列番号72のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3（LC-CDR3）を含む、実施形態14～17のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0382】

19. 参照抗CD22 D1～4抗体は、配列番号73のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号74のアミノ酸配列を含むVLを含む、実施形態14～18のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0383】

20. 操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的分子の細胞外ドメインの近位部分に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞と比較して、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を少なくとも3倍だけ死滅させることができる、実施形態1～19のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0384】

21. 操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的細胞の表面上の標的分子

10

20

30

40

50

に特異的に結合する結合部分を含む認識分子を含み、標的分子は、細胞外ドメインを含み、結合部分は、細胞外ドメインの近位部分に特異的に結合し、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子を含む標的細胞を死滅させることができ、操作された免疫細胞は、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を死滅させる能力を有しないか又は低下した能力を有する、操作された免疫細胞。

【0385】

22. 認識分子は、結合部分、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態21の操作された免疫細胞。

【0386】

23. 結合部分は、sdAb、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv又はペプチドリ 10
ガンドである、実施形態21又は22の操作された免疫細胞。

【0387】

24. 標的細胞の細胞外ドメインの近位部分から膜までの距離は、操作された免疫細胞の結合部分から膜までの距離の約2倍以下（例えば、約1.5倍以下又は約1倍以下）である、実施形態21～23のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0388】

25. 標的分子の細胞外ドメインは、少なくとも約175アミノ酸長である、実施形態21～24のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0389】

26. (i) 結合部分は、細胞外ドメインのN末端から約80アミノ酸以上離れている領域の外部に結合し； 20

(ii) 結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約120（例えば、約102）アミノ酸以内の細胞外ドメイン中の領域に結合し；及び／又は

(iii) 結合部分は、細胞外ドメインのC末端から約50アミノ酸以内の細胞外ドメイン中の領域に結合する、実施形態21～25のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0390】

27. 細胞外ドメインの近位部分は、標的細胞の膜から約120 Å以下（例えば、約100、90、80、70又は60 Å以下）にある、実施形態21～26のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0391】

28. 標的分子の細胞外ドメインは、2つ以上のIg様ドメインを含む、実施形態21～27のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0392】

29. 結合部分は、細胞外ドメインのN末端の最初のIg様ドメインの外部（例えば、最初の4つの外部）の領域に結合する、実施形態28の操作された免疫細胞。

【0393】

30. 結合部分は、細胞外ドメインのC末端から最初の3つのIg様ドメイン内（例えば、最初の2つの中）の領域に結合する、実施形態29の操作された免疫細胞。

【0394】

31. 標的分子は、膜貫通受容体である、実施形態21～30のいずれか1つの操作された免疫細胞。 40

【0395】

32. 標的分子は、CD22、CD4、CD21（CR2）、CD30、ROR1、CD5及びCD20からなる群から選択される、実施形態31の操作された免疫細胞。

【0396】

33. 標的分子は、CD22である、実施形態32の操作された免疫細胞。

【0397】

34. 結合部分は、CD22のドメイン5～7内のエピトープに特異的に結合する参照抗体（「抗CD22 D5～7抗体」）と結合について競合する、実施形態33の操作された免疫細胞。

【0398】

35. 結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体の結合エピトープと重複する、CD22のドメイン5～7中のエピトープに結合する、実施形態33又は34の操作された免疫細胞。

【0399】

36. 結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体のものと同一重鎖及び軽鎖CDR配列を含む、実施形態33～35のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0400】

37. 結合部分は、参照抗CD22 D5～7抗体のものと同一VH及びVL配列を含む、実施形態36の操作された免疫細胞。

【0401】

38. 参照抗CD22 D5～7抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号77のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、配列番号78のアミノ酸配列を含むHC-CDR3、配列番号79のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号80のアミノ酸配列を含むLC-CDR2及び配列番号81のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含む、実施形態34～37のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0402】

39. 参照抗CD22 D5～7抗体は、配列番号82のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号83のアミノ酸配列を含むVLを含む、実施形態35～38のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0403】

40. 操作された免疫細胞であって、その表面上において、標的分子の細胞外ドメインの遠位末端に結合する結合部分を含む認識分子を含む操作された免疫細胞と比較して、標的細胞であって、その表面上に標的分子及び認識分子の両方を含む標的細胞を約20%以下だけ死滅させる、実施形態21～39のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0404】

41. 認識分子は、単一特異性である、実施形態1～40のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0405】

42. 認識分子は、多重特異性体である、実施形態1～40のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0406】

43. 認識分子は、第2の標的分子を特異的に認識する第2の結合部分を含む、実施形態42の操作された免疫細胞。

【0407】

44. 第2の結合部分は、sdAb、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv又はペプチドリガンドである、実施形態43の操作された免疫細胞。

【0408】

45. 結合部分及び第2の結合部分は、タンデムに連結される、実施形態43又は44の操作された免疫細胞。

【0409】

46. 結合部分は、第2の結合部分のN末端である、実施形態45の操作された免疫細胞。

【0410】

47. 結合部分は、第2の抗原結合部分のC末端である、実施形態45の操作された免疫細胞。

【0411】

48. 結合部分及び第2の結合部分は、リンカーを介して連結される、実施形態43～47のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0412】

10

20

30

40

50

49．結合部分は、膜貫通ドメインに直接的又は間接的に融合される、実施形態2～48のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0413】

50．結合部分は、膜貫通ドメインを含むポリペプチドに非共有結合的に結合される、実施形態49の操作された免疫細胞。

【0414】

51．認識分子は、i) 結合部分及び結合対の第1のメンバーを含む第1のポリペプチド；並びに ii) 結合対の第2のメンバーを含む第2のポリペプチドを含み、第1のメンバー及び第2のメンバーは、互いに結合し、第2のメンバーは、膜貫通ドメインに直接的又は間接的に融合される、実施形態50の操作された免疫細胞。

【0415】

52．結合部分は、膜貫通ドメインを含むポリペプチドに融合される、実施形態49の操作された免疫細胞。

【0416】

53．認識分子は、キメラ抗原受容体（「CAR」）である、実施形態1～52のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0417】

54．膜貫通ドメインは、CD8 α 、CD4、CD28、4-1BB、CD80、CD86、CD152及びPD1からなる群から選択される分子に由来する、実施形態53の操作された免疫細胞。

【0418】

55．膜貫通ドメインは、CD8 α に由来する、実施形態54の操作された免疫細胞。

【0419】

56．細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b又はCD66dに由来する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態53～55のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0420】

57．一次細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ に由来する、実施形態56の操作された免疫細胞。

【0421】

58．細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインを含む、実施形態53～57のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0422】

59．共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83のリガンド及びそれらの組み合わせからなる群から選択される共刺激分子に由来する、実施形態58の操作された免疫細胞。

【0423】

60．共刺激シグナル伝達ドメインは、4-1BBの細胞質ドメインを含む、実施形態59の操作された免疫細胞。

【0424】

61．認識分子は、結合部分のC末端と膜貫通ドメインのN末端との間に位置するヒンジドメインをさらに含む、実施形態53～60のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0425】

62．ヒンジドメインは、CD8 α 又はIgG4 C H_2 -C H_3 に由来する、実施形態61の操作された免疫細胞。

【0426】

10

20

30

40

50

63. 認識分子は、キメラT細胞受容体（「cTCR」）である、実施形態1～52のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0427】

64. 膜貫通ドメインは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 及びCD3 δ からなる群から選択されるTCRサブユニットの膜貫通ドメインに由来する、実施形態63の操作された免疫細胞。

【0428】

65. 膜貫通ドメインは、CD3 ϵ の膜貫通ドメインに由来する、実施形態64の操作された免疫細胞。

【0429】

66. 細胞内シグナル伝達ドメインは、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 及びCD3 δ からなる群から選択されるTCRサブユニットの細胞内シグナル伝達ドメインに由来する、実施形態63～65の操作された免疫細胞。

【0430】

67. 細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 ϵ の細胞内シグナル伝達ドメインに由来する、実施形態66の操作された免疫細胞。

【0431】

68. 認識分子の膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインは、同じTCRサブユニットに由来する、実施形態66又は67の操作された免疫細胞。

【0432】

69. 認識分子は、TCRサブユニットの細胞外ドメインの少なくとも一部をさらに含む、実施形態63～68のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0433】

70. 結合部分は、CD3 ϵ （「eTCR」）のN末端に融合される、実施形態69の操作された免疫細胞。

【0434】

71. T細胞である、実施形態1～70のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0435】

72. 細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NK-T）細胞及び $\gamma\delta$ T細胞からなる群から選択される、実施形態71の操作された免疫細胞。

【0436】

73. 共受容体をさらに含む、実施形態1～72のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0437】

74. 共受容体は、ケモカイン受容体である、実施形態73の操作された免疫細胞。

【0438】

75. 標的細胞は、免疫細胞である、実施形態1～74のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0439】

76. 標的細胞は、腫瘍細胞である、実施形態1～74のいずれか1つの操作された免疫細胞。

【0440】

77. 実施形態1～20及び41～76のいずれか1つの操作された免疫細胞を含む医薬組成物。

【0441】

78. 実施形態21～76のいずれか1つの操作された免疫細胞を含む医薬組成物。

【0442】

79. 癌を有する個体を処置する方法であって、有効量の実施形態77の医薬組成物を個体に投与することを含む方法。

【0443】

10

20

30

40

50

80. 操作された免疫細胞は、個体にとって自己である、実施形態79の方法。

【0444】

81. 癌は、T細胞リンパ腫、白血病、B細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病（ALL）及びB細胞リンパ腫からなる群から選択される、実施形態79又は80の方法。

【0445】

82. 感染症を有する個体を処置する方法であって、有効量の実施形態77の医薬組成物を個体に投与することを含む方法。

【0446】

83. 操作された免疫細胞は、個体にとって自己である、実施形態82の方法。

【0447】

84. 感染症は、HIV及びHTLVからなる群から選択されるウイルスによる感染である、実施形態82又は83の方法。

【0448】

85. 感染症は、HIVである、実施形態84の方法。

【0449】

86. 癌を有する個体を処置する方法であって、有効量の実施形態78の医薬組成物を個体に投与することを含む方法。

【0450】

87. 操作された免疫細胞は、個体にとって同種他家である、実施形態86の方法。

【0451】

88. 癌は、T細胞リンパ腫、白血病、B細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病（ALL）及びB細胞リンパ腫からなる群から選択される、実施形態86又は87の方法。

【0452】

89. 感染症を有する個体を処置する方法であって、有効量の実施形態78の医薬組成物を個体に投与することを含む方法。

【0453】

90. 操作された免疫細胞は、個体にとって同種他家である、実施形態89の方法。

【0454】

91. 感染症は、HIV及びHTLVからなる群から選択されるウイルスによる感染である、実施形態89又は90の方法。

【0455】

92. 感染症は、HIVである、実施形態91の方法。

【0456】

93. 実施形態1～76のいずれか1つの操作された免疫細胞を作製する方法であって、認識分子をコードする1つ以上の核酸を免疫細胞に導入し、それにより操作された免疫細胞を得ることを含む方法。

【0457】

94. 実施形態1～76のいずれか1つの操作された免疫細胞の認識分子をコードする1つ以上の核酸を含む組成物。

【実施例】

【0458】

実施例1：材料及び方法

CAR-T細胞構築物。CARをコードするコード配列を含有するプラスミドをGenscriptにおいて合成し、pLVXレンチウイルスベクター中にクローン化した。第二世代レンチウイルスを293T細胞中にパッケージングした。汎T細胞をヒトPBMC（HemaCare）から単離し、抗CD3／抗CD28ビーズ（Miltenyi）によりインビトロで2日間活性化した後、それらを、8µg／mlポリブレンの存在下でCARをコードするレンチウイルスで形質導入した。細胞をレンチウイルスと共に1000gにおいて32℃で1時間スピノキュレートし、24ウェルプレート中で培養した。古い培地を除去し、新鮮な培地を形質導入の1日後に加えた。

10

20

30

40

50

【0459】

CAR-T細胞維持及び表現型決定。CAR-T細胞をAIM-V培地 (Thermal Fisher Scientific) + 5%ウシ胎仔血清 (FBS) + 300 IU/ml IL-2中で培養した。CAR+パーセンテージを、抗Fab抗体 (Jackson Laboratories) によって形質導入の4日後に検出した。細胞を抗CD4及びCD8抗体でも染色して、集団を特徴付けた。

【0460】

細胞死滅アッセイ。T細胞白血病／リンパ腫細胞株Sup-T1及びHH又はCFSE標識ヒト汎T細胞を標的細胞として使用した。CAR-T細胞をエフェクター細胞として使用した。CAR-T細胞及び標的細胞を所望のE:T比で混合した。細胞を共培養した後、それらをフローサイトメトリーのために回収した。上清もサイトカイン検出のために収集した。標的細胞の死滅をCFSE陽性細胞比率又はCD4+陽性細胞比率によって決定した。

10

【0461】

ドメインマッピング。ヒトCD4タンパク質は、4つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン (D1~D4) 及び細胞内ドメイン (D5) を含有する。各ヒトCD4ドメインをマウスCD4骨格にクローン化し、マウスCD4のカウンタードメインを置き換えて、ハイブリッドCD4タンパク質を作製した。ハイブリッドCD4コード配列をpcDNA3.4ベクターにクローン化し、HEK-293細胞中で一過的に発現させた。抗ヒトCD4抗体を使用してこれらの細胞を染色して、いずれのヒトCD4ドメインが各抗体によって認識されるかを決定した。データをBD FACS Celestaフローサイトメーター上で回収し、Flowjoソフトウェアによって分析した。

20

【0462】

エピトープビニング実験。エピトープビニング実験をBiacore機器上で実行した。簡潔には、一次抗体をチップ上で固定し、CD4-Fcタンパク質を第1の期間中にチップに流した。二次抗体を2:1の比でCD4-Fcタンパク質と混合し、第2の期間中にチップに流した。シグナルをBiacoreによって記録した。

【0463】

抗体遮断アッセイ。イバリズマブ、トレガリズマブ及びザノリムマブモノクローナル抗体をGenscriptにおいて製造し、実験において遮断抗体として使用した。エフェクター及びCFSE標識標的細胞を、図面に示されるとおり、50 nM又は100 nMの遮断抗体の不存在又は存在下で共培養した。標的細胞の死滅を、フローサイトメトリーによってCFSEを検出することによって測定した。異なる濃度の抗体を、図面に示されるとおりを使用した。

30

【0464】

CAR+腫瘍細胞死滅アッセイ。ヒト皮膚Tリンパ腫細胞株HH細胞を抗CD4 CARレンチウイルスで形質導入し、CAR+比をフローサイトメトリーによって検出した。8×10⁴個のHH細胞又はCAR-HH細胞を標的細胞として使用し、抗CD4 CAR-Tエフェクター細胞又はUNT細胞と共にE:T=2:1で共培養した。共培養の8日後、CD4+%をフローサイトメトリーによって検出した。

40

【0465】

インビボ有効性。NOD-Prkdcem26Cd52Il2rgem26Cd22/NjuCrマウス (NCG) マウスをNanjing Biomedical Research Institute of Nanjing Universityから購入し、Genscriptモデル動物施設において維持した。新生児NCGマウスにヒト造血幹細胞を移植し、>15週齢のマウスを実験において使用した。NCGマウスを3×10⁵個のCAR+抗CD4ドメイン1 CAR-T細胞又は対照としての同じ総量の非形質導入細胞で処置した。処置後の18日目、マウスを殺し、脾細胞を抗ヒトCD45抗体、抗ヒトCD4抗体及び抗ヒトCD8抗体で染色した。データをBD FACS celestaフローサイトメーター上で回収し、Flowjoソフトウェアによって分析した。

50

【 0 4 6 6 】

実施例 2 . 抗 C D 4 C A R - T 細胞の分析

図 1 A は、C D 4 結合部分（例えば、s c F v 又は s d A b）、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン及び C D 3 ζ シグナル伝達ドメインで構成される抗 C D 4 C A R の構造を示す。

【 0 4 6 7 】

実施例において使用される C A R - T 細胞の C A R s c F v 領域の配列番号は、以下のとおりである。

【 0 4 6 8 】

【表 3】

10

CAR-T No.	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3	VH	VL	CAR
1	1	2	3	4	5	6	7	8	33
4	9	10	11	12	13	14	15	16	34
5	17	18	19	20	21	22	23	24	35
2	25	26	27	28	29	30	31	32	36
3	46	47	48	49	50	51	52	53	54
6	55	56	57	58	59	60	61	62	63
膜貫通ドメイン (Cd8α 膜貫通ドメイン): 配列番号 37									
共刺激ドメイン (4-1-BB 共刺激ドメイン): 配列番号 38									
CD3ζシグナル伝達ドメイン: 配列番号 39									
ヒンジドメイン (CD8α ヒンジドメイン): 配列番号 40									
CD3ε膜貫通ドメイン: 配列番号 41									
CD3εシグナル伝達ドメイン: 配列番号 42									
CD3ε細胞外ドメイン: 配列番号 43									
全長 CD3ε: 配列番号 44									
全長ヒト CD4: 配列番号 45									
抗 CD4 eTCR: 配列番号 64									

20

30

40

【 0 4 6 9 】

C A R + % 比率は、C A R - T N o . 1 細胞において 1 3 . 9 % であり、C A R + % 比率は、N o . 2 細胞において 4 4 . 2 % であった。C A R + % は、N o . 1 より N o . 2 細胞においてより高かったが、死滅効果は、C A R + パーセンテージと相関しなかった。C D 4 + % は、N o . 1 総細胞集団において 0 % であり、それは、N o . 2 総細胞集団において 1 7 . 2 % であった。C D 4 + 細胞は、図 1 B の N o . 2 細胞における C A R + 集団において示されるとおり、大部分が C A R + 細胞であった。したがって、N o . 2 C A R + 集団は、C A R - T 死滅により影響されにくい。抗 C D 1 9 C A R は、同じ細胞上の C D 1 9 抗原を遮断し（即ちシスで遮断）、C A R が形質導入された白血病細胞の C

50

A R-T細胞による死滅からの保護をもたらすことが報告された（参考文献：N a t u r e M e d i c i n e v o l u m e 24, p a g e s 1499-1503（2018））。本発明者らのN o. 2 C A R-Tの表現型は、C A Rが同じ細胞上のC D 4を第2のC A Rによる死滅から遮断し得ることを示唆している。自己の保護は、N o. 1 C A R-T細胞に対して観察されなかった。

【0470】

全てのC A Rが同じ方法で作製され、それらの唯一の相違は、s c F v領域である。s c F vは、C A R-T N o. 1及びN o. 2間において、本発明者らが見た表現型の相違をもたらし得る。C A R-T N o. 1及びN o. 2におけるs c F vは、それぞれザノリムマブ及びイバリズマブに由来した。これらの抗体がいずれのC D 4ドメインを認識するかを検出するために、ドメインマッピング実験を実行した。1つの追加の抗体であるトレガリズマブもこの実験に含まれた。

10

【0471】

C D 4は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。それは、細胞膜の遠位から近位までの4つの細胞外免疫グロブリンドメインであるドメイン1～4を含有する。4つのC D 4細胞外ドメイン及びその細胞内ドメインは、D 1～D 5と命名され、H E K-293細胞においてマウスC D 4骨格と共に一過的に発現された。3つの抗体を使用して、これらの293細胞に対するフローサイトメトリーによってヒトC D 4 D 1～D 5発現を検出した。図2に示されるとおり、イバリズマブ及びトレガリズマブは、ヒトC D 4ドメイン2と相互作用した一方、ザノリムマブは、主にヒトC D 4ドメイン1を認識した。

20

【0472】

本明細書で議論された結果に基づいて、相互作用モデルは、図3A～3Bに示されるとおりに仮定された。C A R-T N o. 1は、ヒトC D 4ドメイン1を認識できるs c F vを有する一方、C A R-T N o. 2は、図3Aに示されるとおりのドメイン2を認識できるs c F vを有する。細胞膜に対する近位ドメインは、同じ細胞表面上で発現されるキメラ抗原受容体までより短い距離内にあり、したがって、キメラ抗原受容体は、図3B中の右に示されるとおりそれに結合できる可能性がある。同じ細胞上のキメラ抗原受容体とC D 4との間の相互作用は、C D 4が別のC A R-Tに認識されることを妨げ、したがって細胞が第2のC A R-T細胞によって死滅されることから保護する。

30

【0473】

実施例3．抗体遮断アッセイ

抗C D 4抗体を使用して、C A R s c F v領域とC D 4分子との間のシス相互作用を模倣した。フローサイトメトリーアッセイ（図2）においてそれぞれC D 4ドメイン2、ドメイン2及びドメイン1を主に認識する3つの抗体、イバリズマブ、トレガリズマブ、ザノリムマブが遮断アッセイにおいて使用された。第一に、エピトープビニング実験を実施して、3つの抗体が同じC D 4結合部位について競合するかどうかを試験した。図4Aに示されるとおり、イバリズマブ及びトレガリズマブは、ヒトC D 4タンパク質に対するこれらの結合について互いに競合する。ザノリムマブ-C D 4相互作用に対するイバリズマブ又はトレガリズマブの影響は、軽微であった。第二に、これらの抗体を使用して、それらが、C A R-Tに媒介される標的細胞の死滅を遮断できたかどうかを試験した（図4B）。抗体遮断実験において、C D 4ドメイン1と相互作用するC A R-T N o. 1がエフェクター細胞として使用された。図4Bに示されるとおり、標的細胞が対照U N T細胞と共培養されたとき、55%のC D 4+細胞があった。標的細胞がC A R-T N o. 1エフェクター細胞と共にインキュベートされたとき、パーセンテージは、6.5%に低下した。イバリズマブ又はトレガリズマブが培養物に加えられたとき、C D 4+細胞のパーセンテージは、約7%のままであったが、これは、これらの2つの抗体が、C A R-T N o. 1に媒介される標的細胞の認識及び死滅を遮断しないことを示唆している。ザノリムマブ抗体が培養物に加えられたとき、C D 4+のパーセンテージは、30%超まで増加したが、これは、C A R-T N o. 1に媒介される死滅を、ドメイン1認識ザノリムマ

40

50

ブ抗体によって遮断できたことを示唆している。これらの結果は、同じ細胞上でのCD4とキメラ抗原受容体相互作用が別のCAR-T細胞によるCD4の認識を遮断できたことを示す。この実験に関する図4Bの定量分析は、図4Cに示される。

【0474】

実施例4．抗CD4 CAR-T細胞に関するアッセイ

自己療法に関して、患者自身のT細胞を使用してCAR-T細胞を作製したとき、CD4ドメイン1を認識する抗CD4 CAR-Tは、他のドメインを認識する抗CD4 CAR-T細胞より好ましい。ドメイン1を標的化する抗CD4 CAR-Tは、CD4をシスで遮断せず、CAR+及びCAR-集団の両方のCD4+細胞を排除して、CAR-T製品におけるHIV感染CD4+T細胞の混入又は悪性T細胞の混入の可能性を回避することができる。抗CD4ドメイン1 CAR-Tの利点をさらに証明するため、CD4のドメイン1を認識するさらに2つの抗CD4 CAR-T細胞を試験した。データは、図5に示される。CAR-T No. 4及びNo. 5の両方がCD4ドメイン1を認識する。CAR-T No. 4及びNo. 5におけるscFvは、それぞれSK3及びRPA-T4に由来した。CD4の他のドメインを認識する抗体に関する自己保護効果を証明するため、さらに2つの抗CD4 CAR-T（ドメイン2～3）を試験した。データは、図9に示される。CAR-T No. 3及びNo. 6細胞の両方がCD4ドメイン2～3を認識する。

10

【0475】

非形質導入汎T細胞（UNT）が陰性対照として使用された。UNT及びCAR-T細胞をCFSE標識汎T細胞と24時間共培養した後、それらをフローサイトメトリーのために収集した。エフェクター細胞集団及び標的細胞集団をCFSEによって区別した。対照UNT試料において、共培養後に18.9%のエフェクター細胞がCD4+であった。No. 4細胞のエフェクター集団において、CD4+は、0%であった。CAR-T No. 5に関して、エフェクター及び標的集団の両方におけるCD4+のパーセンテージは、1%未満であった。対照的に、No. 3及びNo. 6細胞のエフェクター集団において、12.5%及び13.1%のCD4+細胞があった。これは、抗CD4ドメイン1 CAR-TがCAR-T細胞及び標的細胞の両方においてCD4+集団を排除することができ、CAR-T細胞のシスでの遮断がないことをさらに示す。

20

【0476】

実施例5．抗CD4 CAR-T細胞の細胞死滅アッセイ

抗CD4 CAR-T細胞が、CARと同じ細胞上で発現されるCD4分子についてシスでの保護を有しないことをさらに実証するため、CD4+Tリンパ腫細胞株HHをCARレンチウイルスで形質導入した。図6Aにおいて提示されるデータは、形質導入後に77.8%のHH細胞がCAR+であったことを示す。これらの細胞は、CD4及び抗CD4ドメイン1 CARの両方を発現し、CAR-HH細胞と命名された。CAR-HH細胞及びHH細胞を単独で抗CD4ドメイン1 CAR-T No. 1細胞又は対照UNT細胞と共培養した。図6B～6Cは、培養の8日後、UNT処理HH細胞において20%のCD4+細胞があり、UNT処理CAR-HH細胞において17.3%のCD4+細胞があったことを示す。しかしながら、残留しているCD4+細胞のパーセンテージは、HH及びCAR-T細胞と共培養したCAR-HH試料の両方において0.1%未満であった。CAR-T細胞は、HH細胞がCARを発現しているかどうかにかかわらず、HH細胞を死滅させることができた。これらのデータは、抗CD4ドメイン1 CARが、抗CD4ドメインCAR-Tによって認識されるCD4抗原をシスで遮断しないことを証明した。自己療法が望ましい場合、それらは、CAR-T製品中に混入される残留ウイルスに感染したCD4 T細胞又はCD4 Tリンパ腫細胞を排除できる。

30

40

【0477】

実施例6．抗CD4 CAR-T細胞のインビボ分析

抗CD4ドメイン1 CAR-T細胞がインビボで有効であるかどうかを試験するため、ヒト免疫系を有するマウス及びアカゲザルの実験を利用した。ヒトT細胞を有する成体H

50

I Sマウスに抗CD4 CAR-T細胞又はUNT細胞を静脈内注射した。処置後の18日目のマウス脾臓におけるCD4/CD8比は、図7に示される。CD4+のパーセンテージは、UNTマウス脾臓において43.1%であった一方、CAR-Tマウス脾臓において、パーセンテージは、1.25%まで低下した。これらのデータは、抗CD4ドメイン1 CAR-T No. 1細胞がインビボでCD4+細胞を排除するのに非常に有効であったことを示唆する。

【0478】

抗CD4ドメイン1 CAR-T細胞の有効性も細胞由来異種移植マウス(CDX)モデルにおいて評価された。HH T細胞リンパ腫細胞で移植されたマウスを抗CD4 CAR-T No. 1細胞、HBSS緩衝液又はUNT細胞で処置した。図6Dに示されるとおり、腫瘍サイズは、CAR-T処置後15日以内に0まで縮小された一方、2つの対照群において、実験の終わり又は腫瘍量に起因してマウスを殺しなけ

10

【0479】

抗CD4ドメイン1 scFvは、キメラT細胞受容体(「cTCR」)にも構築された。この実施例において、それは、CD3εに連結され、したがって抗CD4 eTCRと命名された。図8Aに示されるとおり、T細胞の46%が形質導入後にeTCR+であった。抗CD4 eTCR細胞は、汎T細胞標的細胞と培養されるときにIFNγを産生したが、そのレベルは、若干上昇したのみであった。図8Cは、抗CD4 eTCR細胞の増殖を示す。細胞は、培養の10日以内に活発に増殖した。図8Dは、これらの抗CD4 eTCR細胞による標的細胞の死滅を示す。CFSE標識汎T細胞を標的細胞として使用し、抗CD4 eTCR細胞と24時間共培養した後、それらをフローサイトメトリーのために収集した。抗CD4 eTCR細胞は、図8Dの右に示されるとおり、全てのCD4+T細胞を排除できた。

20

【0480】

実施例7. 抗CD22 CAR-Tに関するアッセイ

CD4の実施例と同様に、本発明者らは、細胞膜の近くに3つのドメインがあるときに自己保護効果になり得ると仮定した。細胞膜に対する近位ドメインは、同じ細胞表面上で発現されるキメラ抗原受容体までより短い距離内(3ドメイン以内)にあり、したがって、キメラ抗原受容体は、それに結合できる可能性がある。同じ細胞上のキメラ抗原受容体とCD22との間の相互作用は、CD22が別の抗CD22 CAR-Tに認識されることを妨げ、したがって細胞が第2の抗CD22 CAR-T細胞によって死滅されることから保護する。

30

【0481】

この仮定を試験するため、2つの抗CD22 CAR-Tを試験した(図10及び11A)。CAR-T No. 454は、CD22のドメイン3を認識し、CAR-T No. 447は、CD22のドメイン5~7(細胞膜の近くの3つのドメイン)を認識する。UNT細胞(非形質導入T細胞)及びCAR-T細胞が0.5:1のE:T(エフェクター:標的)比でCFSE標識汎T標的細胞(「ARH細胞」)と共に24時間共培養された。残留している標的細胞は、フローサイトメトリーによって検出された。

40

【0482】

抗CD22 CAR-T細胞のCAR scFv領域の配列は、以下のとおりである。

【0483】

【表 4】

CAR-T No.	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3	VH	VL	CAR
454	67	68	69	70	71	72	73	74	75
447	76	77	78	79	80	81	82	83	84
膜貫通ドメイン (Cd8 α 膜貫通ドメイン): 配列番号 37									
共刺激ドメイン (4-1-BB 共刺激ドメイン): 配列番号 38									
CD3 ζ シグナル伝達ドメイン: 配列番号 39									
ヒンジドメイン (CD8 α ヒンジドメイン): 配列番号 40									
CD3 ϵ 膜貫通ドメイン: 配列番号 41									
CD3 ϵ シグナル伝達ドメイン: 配列番号 42									
CD3 ϵ 細胞外ドメイン: 配列番号 43									
全長 CD3 ϵ : 配列番号 44									
全長ヒト CD22: 配列番号 66									

10

20

【0484】

図11B及び11Cに示されるとおり、標的ARH及びCAR454-ARH細胞は、CAR-T No. 454によって死滅され得るが、これは、CAR-T No. 454がそれ自体の保護を有しないことを実証している。対照的に、ドメイン5～7を認識するCAR-T No. 447は、標的ARH細胞を死滅させることができるのみであり、CAR447-ARH細胞の8.15%が残留している。これは、CAR-T No. 447が、CAR及びCD22を共発現する細胞に対して保護効果を有することを実証している。

30

【0485】

配列表

本発明の実施形態による例示的な構築物の配列：

【0486】

40

50

【表 5】

名称	配列 番号	CDR1 配列	配列 番号	CDR2 配列	配列 番号	CDR3 配列
CAR-T No. 1 VH	1	GGSFSGY	2	NHSGS	3	VINWFDP
CAR-T No. 1 VL	4	RASQDISSW LA	5	AASSLQS	6	QQANSFPYT
CAR-T No. 4 VH	9	GYTFTDYV	10	TYTGSGSS	11	RGKGTGFAF
CAR-T No. 4 VL	12	QSVDDYDGD SY	13	AASNLES	14	QQSYEDPPT
CAR-T No. 5 VH	17	GYTFTNY	18	DPSTGY	19	EGGIGGFAY
CAR-T No. 5 VL	20	RASESVDSY DNSFMH	21	RASNLES	22	QQSKEDPYT
CAR-T No. 2 VH	25	GYTFTSY	26	NPYNDG	27	EKDNYATGAWFAY
CAR-T No. 2 VL	28	KSSQSLLYS TNQK	29	WASTRES	30	QQYYSYRT
CAR-T No. 3 VH	46	GFSFSDC	47	SVKSENYG	48	SYRYDVGAWFAY
CAR-T No. 3 VL	49	RASKSVSTS GYSIY	50	LASILES	51	QHSRELPWT
CAR-T No. 6 VH	55	GYTFTNY	56	NTNTGE	57	LGLYYDYGYAM
CAR-T No. 6 VL	58	RASESVDSY GN	59	LASNLES	60	QQNNEDPYT
CAR-T No. 545 VH	67	GFAFSIYDM S	68	YISSGGGTYY DTVKG	69	HSGYGSSYGVLFAF
CAR-T No. 545 VL	70	RASQDISNY LN	71	YTSILHS	72	QQGNTLPWT
CAR-T No. 447 VH	76	GDSVSSNSA AWN	77	RTYYRSKWYN DYAVSVKS	78	EVTGDLEDAFDI
CAR-T No. 447 VL	79	RASQTIWSY LN	80	AASSLQS	81	QQSYSIPQT

10

20

30

【0487】

配列番号07：(CAR No. 1 VH アミノ酸配列)

【化1】

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVINWFDPWGQGLT

40

配列番号08：(CAR No. 1 VL アミノ酸配列)

【化2】

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQDISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPYTFGQGTKLEIK

配列番号15：(CAR-T No. 4 VH アミノ酸配列)

【化3】

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVKQRTGQGLEWIGETYYTGSGSS
YYNEKFKDKATLTVDKASNIAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGKGTGFAFWGQGLT
VSA

50

配列番号 16 : (CAR-T No. 4 VL アミノ酸配列)

【化 4】

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGQP KLLIYAASNLE
SGIPARFTGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQSYEDPPTFAGGTNLEIK

配列番号 23 : (CAR-T No. 5 VH アミノ酸配列)

【化 5】

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTNYLMHWVKQRPGQGLEWIGYIDPSTGY
TVYLLQKFQDKATLTADKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCAKEGGIGGFAYWGQGT LVT
VSA

10

配列番号 24 : (CAR-T No. 5 VL アミノ酸配列)

【化 6】

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYDNSFMHWYQQKPGQP KLLIYRASNLES
GIPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDVATYYCQSKEDPYTFGGG TKLEIK

配列番号 31 : (CAR-T No. 2 VH アミノ酸配列)

【化 7】

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDG
TDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDN YATGAWFAYWGQ
GTLVTVSSA

20

配列番号 32 : (CAR-T No. 2 VL アミノ酸配列)

【化 8】

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY WAS
TRESGVPRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGG TKLEIKR

配列番号 33 : (CAR No. 1 アミノ酸配列)

【化 9】

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AVYGGSFSGYYWSWI
RQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
VINWFDWPWGQGT LVTGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDI
SSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QANSFPYTFGQGT KLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEGGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR

30

配列番号 34 : (CAR No. 1 アミノ酸配列)

【化 10】

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWV
KQRTGQGLEWIGETYTGSGSSYYNEKFKDKATLTVDKASNIAYMQLSSLTSEDSAVYF
CARRGKGTGF AFWGQGT LVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSLGQRAT
ISCKASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGQP KLLIYAASNLESGIPARFTGSGSGTDFTLNIH
PVEEEDTATYYCQSYEDPPTFAGGTNLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL D
KRRGRDP EMGGKPRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR

40

50

配列番号 35 : (CAR No. 5 アミノ酸配列)

【化 1 1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTNYLMHW
VKQRPQGQLEWIGYIDPSTGYTVYLQKFKDKATLTADKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYY
CAKEGGIGGFAYWGQGTLLTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTPSPASLAVSLGQRAT
ISCRASESVDSYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLSESGIPARFSGSGSRTDFTLTIDP
VEADDVATYYCQQSKEDPYTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 36 : (CAR No. 2 アミノ酸配列)

【化 1 2】

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWV
RQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYY
CAREKDNATGAWFAYWGQGTLLTVSSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVS
LGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG
SGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGGTKLEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPL
SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG
RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 37 : (CD8 α 膜貫通ドメインアミノ酸配列)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

配列番号 38 : (4-1BB 共刺激ドメインアミノ酸配列)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE
L

配列番号 39 : (CD3 ζ シグナル伝達ドメインアミノ酸配列)

30

【化 1 3】

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 40 : (CD8 α ヒンジドメインアミノ酸配列)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACD

配列番号 41 : (CD3 ϵ 膜貫通ドメインアミノ酸配列)

VMSVATIVIVDICTITGGLLLLVYYWS

配列番号 42 : (CD3 ϵ シグナル伝達ドメインアミノ酸配列)

40

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQ

配列番号 43 : (CD3 ϵ 細胞外ドメインアミノ酸配列)

【化 1 4】

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHL
SLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD

配列番号 44 : (全長 CD3 ϵ アミノ酸配列)

50

【化 1 5】

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEIL
WQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRA
RVCENCMEMDMVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQR
GQNKERPPPVPNPDIYEPIRKGQRDLYSGLNQRR

配列番号 4 5 : (全長ヒト C D 4 アミノ酸配列)

【化 1 6】

MNRGVPRHLLLVLQLALLPAATQGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSN
QIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEV
QLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVS QLELQD
SGTWTCTVLQNQKKVEFKIDIVLAFQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGEL
WWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTDQPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSG
NLTLALEAKTGKLHQEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVS
KREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLSNIKVLPTWSTPVQPMALIVLGGVAGLL
LFIGLGIFFCVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTCCPHRFQKTCSP

10

配列番号 5 2 : (CAR No. 3 VH アミノ酸配列)

【化 1 7】

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENY
GANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYW
GQGT LVT VSSA

20

配列番号 5 3 : (CAR No. 3 VL アミノ酸配列)

【化 1 8】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPLL IYLASILESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREL PWTFGQGTKVEIKR

配列番号 5 4 : (CAR No. 3 アミノ酸配列)

【化 1 9】

MALPVTALLLPLALLLHAARPEEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWL
RQAPGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAV
YYCSASYRYDVGAWFAYWGQGT LVT VSSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSL
AVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPLL IYLASILESGVPDRFSGSGSG
TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREL PWTFGQGTKVEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG
RREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 6 1 : (CAR No. 6 VH アミノ酸配列)

【化 2 0】

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKCMGWINTNTGEP
TYAEFEKGRFAFSLETSATTAFLQINN LKDEDTATYFCARLGLYYDYGYYAMDYWGQ
GASVT VSS

40

配列番号 6 2 : (CAR No. 6 VL アミノ酸配列)

【化 2 1】

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGN SFMHWYQQKPGQPPLLFIY LASNLES
GVPARFSGSGSRDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNE DPYTFGGG TKLEIK

50

配列番号 63 : (CAR No. 6 アミノ酸配列)

【化 22】

MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWW
 KQAPGKGLKCMGWINTNTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSATTAFLLQINNLLKDEDTATYFC
 ARLGLYYDYGYIAMDYWGQASVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGNIVLTQSPASLAVSL
 GQRATISCRASESVDSYGNFSFMHWYQQKPGQPPKLFYILASNLESGVPAFSGSGSRTD
 FTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPYTFGGGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP
 EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRRE
 EYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 64 : (抗 CD4 e TCR)

【化 23】

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYW
 SWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
 CARVINWFDPWGQGTLTGSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRA
 SQDISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
 YYCQQANSPFYTFGQGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSDGNEEMGGITQTPYKVSISGTT
 VILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSK
 PEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVEYWSKNRKAKAKPV
 TRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDIYPIRKQQRDLVSGLNQRR

20

配列番号 65

CC (A / T) 6GG

配列番号 66 : (全長ヒト CD22 アミノ酸配列)

【化 24】

MHLLGPWLLLLVLEYLAFSDSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILF
 HNPEYNKNTSKFDGTRLYESKDGKVPSEQKRQVFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQL
 GLRMESKTEKWMERIHNLNVSERPFPPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWL
 LEGVPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQL
 NVKHTPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLN
 LREVTKDQSGKYCCQVSNDVGPGRSEEVFLQVQYAPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCM
 SLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAGTYSVAENILGTGQRGPGAE
 LDVQYPPKKVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNPNSSNPSTRYEWWKPHGAWEEPGLGVK
 IQNVGWDNTTIACAACNSWCSWASPVALNVQYAPRDVRVRKIKPLSEIHSGNSVSLQC
 DFSSSHPKVEVQFFWEKNGRLLGKESQLNFDISPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLE
 VLYAPRRLRVSMSPGDQVMGKSATLTCESDANPPVSHYTWFWDWNNQSLPYHSQKLR
 LEPVKVQHSGAYWCQGTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPETIGRRVAVGLGSLAILILAICG
 LKLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYT
 TLRFPENIPRTGDAESSEMQRPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYS
 ELIQFGVGERPQAQENVVILKH

30

40

配列番号 73 : (CAR-T No. 454 VH アミノ酸配列)

【化 25】

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGTT
 YYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGSYGVLFAFWGQ
 GTLVTVSA

配列番号 74 : (CAR-T No. 454 VL アミノ酸配列)

50

【化 2 6】

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK

配列番号 7 5 : (C A R N o . 4 5 4 アミノ酸配列)

【化 2 7】

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWV
RQTPEKRLEWVAYISSGGGTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDAMYY
CARHSGYGSSYGVLFAWYGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTSSLSASL
GDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS
NLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 8 2 : (C A R N o . 4 4 7 V H アミノ酸配列)

【化 2 8】

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSK
WYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQ
GTMVTVSS

20

配列番号 8 3 : (C A R N o . 4 4 7 V L アミノ酸配列)

【化 2 9】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPS
RFSGRGSGTDFTLTISLQAEDFATYYCQQSYIPQTFGQGTKLEIK

配列番号 8 4 : (C A R N o . 4 4 7 アミノ酸配列)

【化 3 0】

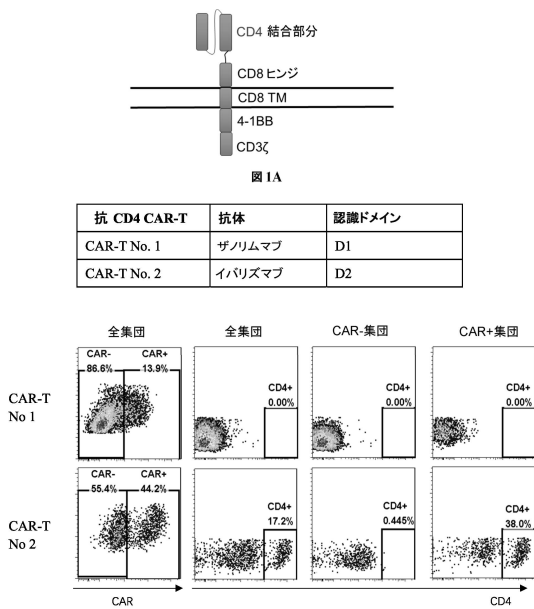
MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWN
WIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAV
YYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLT
ISLQAEDFATYYCQQSYIPQTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR

30

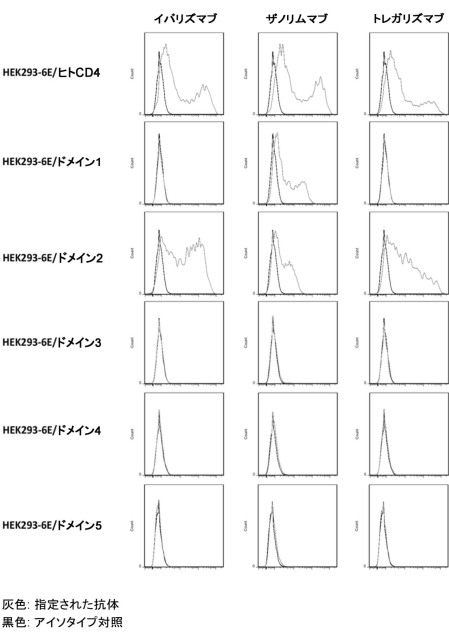
40

50

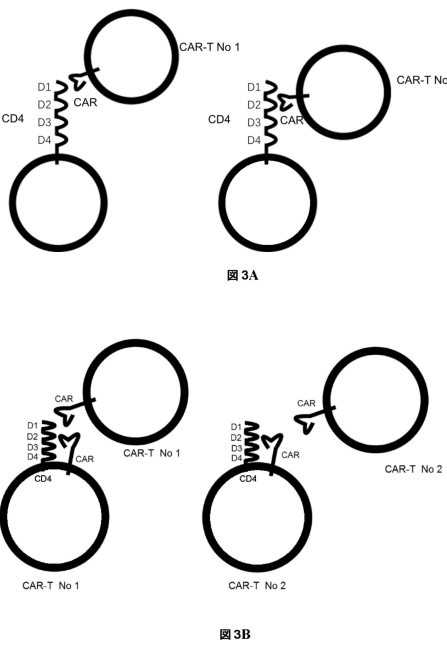
【図面】
【図 1 A - 1 B】



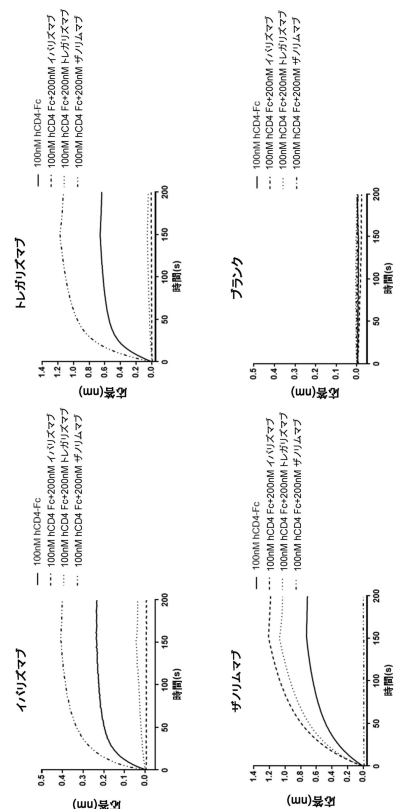
【図 2】



【図 3 A - 3 B】



【図 4 A】



10

20

30

40

50

【図 4 B】

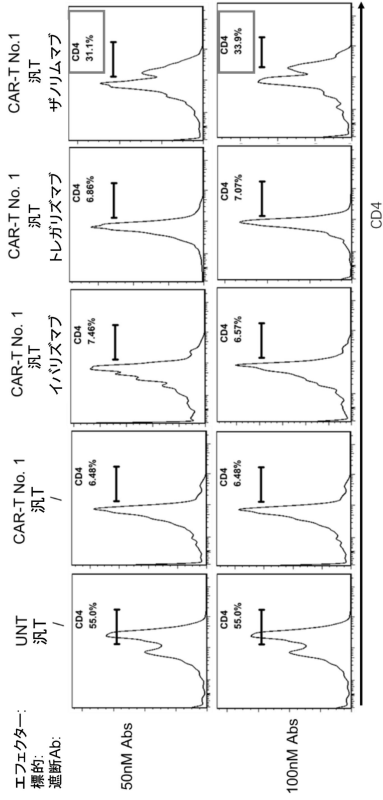


図 4B

【図 4 C】

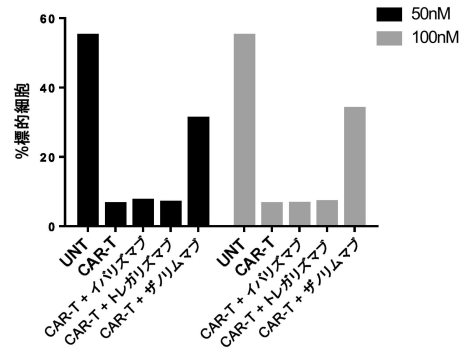


図 4C

【図 5】

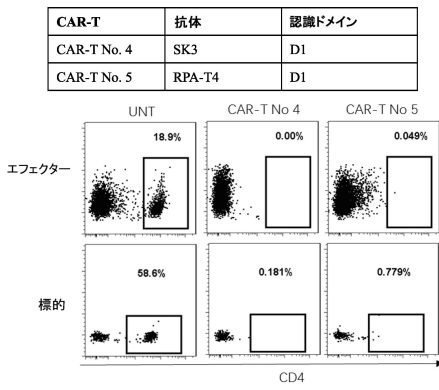


図 5

【図 6 A - 6 B】

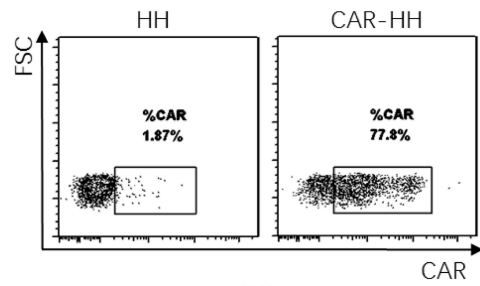


図 6A

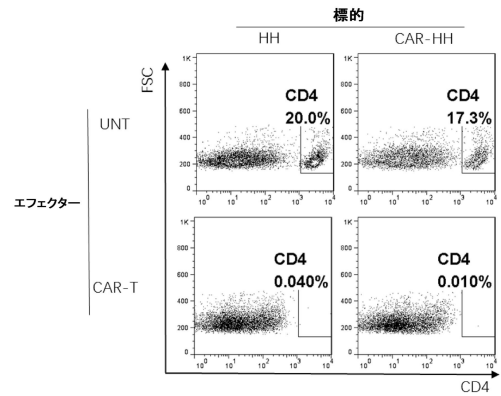


図 6B

10

20

30

40

50

【図 6 C - 6 D】

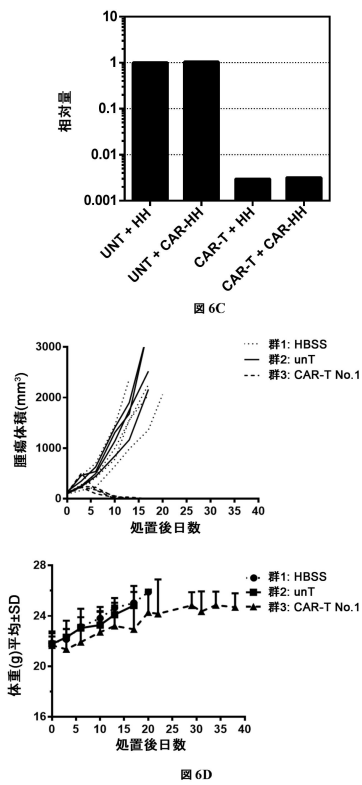


図 6C

図 6D

【図 7】

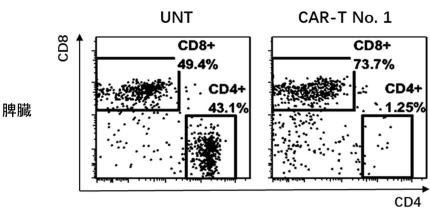


図 7

10

20

【図 8 A - 8 B】

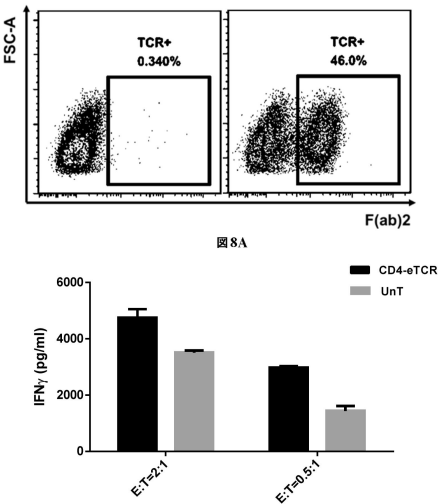


図 8A

図 8B

【図 8 C - 8 D】

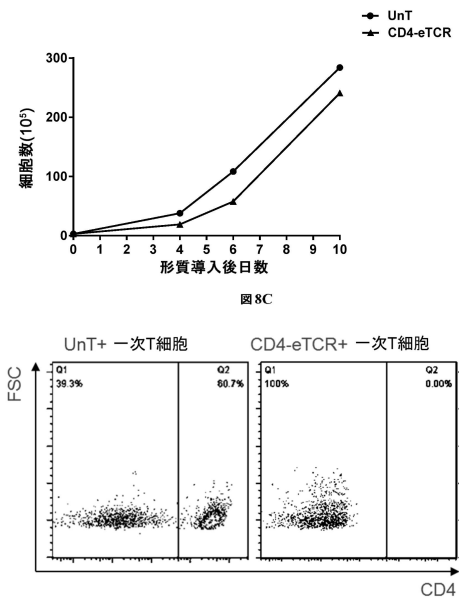


図 8C

図 8D

30

40

50

【図 9】

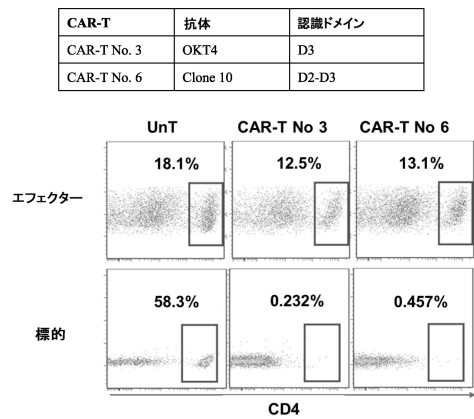


図 9

【図 10】

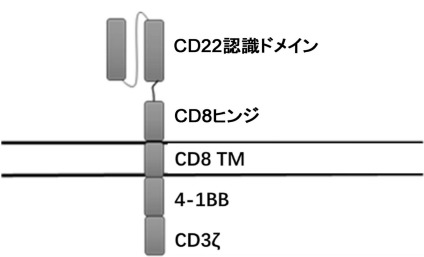


図 10

【図 11 A - 11 B】

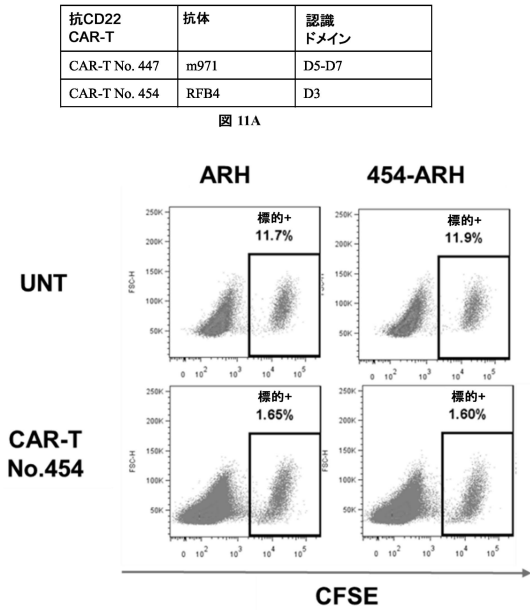


図 11B

【図 11 C】

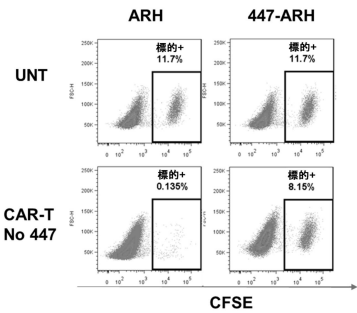


図 11C

10

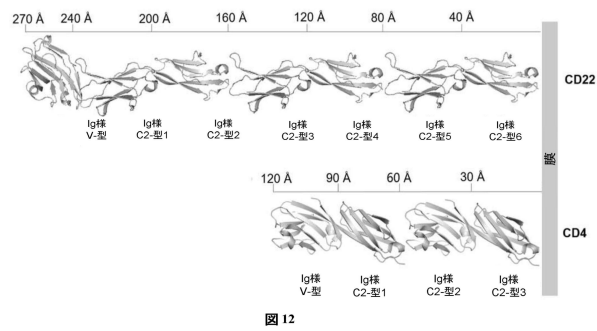
20

30

40

50

【図 1 2】



10

【配列表】

2022533621000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2020/090601															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 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) C12N; A61K; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DWPI;CNABS;CNTXT;WOTXT;EPTXT;USTXT;CNKI;PUBMED;GenBank;SpringerLink;NANJING LEGEND,T cell, ANTI-CD22, CAR-T, cTCR,bispecific,transmembrane receptor,CD22,IG-LIKE, CAR, antibody, domain 1-7,SEQ ID NOs: 67-74																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2016102965 A1 (UCL BUSINESS PLC et al.) 30 June 2016 (2016-06-30) claims 1-3, 13, 15-19, 25-27, description page 3, lines 27-28</td> <td>1-47</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2013123061 A1 (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL D/B/A SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE) 22 August 2013 (2013-08-22) claims 1-104</td> <td>1-47</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>PEARSON, D. et al. "CD22-Binding Peptides Derived from Anti-CD22 Ligand Blocking Antibodies Retain the Targeting and Cell Killing Properties of the Parent Antibodies and May Serve as a Drug Delivery Vehicle" <i>Int J Pept Res Ther</i>, Vol. 14, 01 August 2008 (2008-08-01), page 238, the first paragraph of left column</td> <td>1-47</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ENGEL, P. et al. "Identification of the Ligand-binding Domains of CD22, a Member of the Immunoglobulin Superfamily that Uniquely Binds a Sialic Acid-dependent Ligand" <i>J. Exp. Med</i>, Vol. 181, 30 April 1995 (1995-04-30), abstract</td> <td>1-47</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2016102965 A1 (UCL BUSINESS PLC et al.) 30 June 2016 (2016-06-30) claims 1-3, 13, 15-19, 25-27, description page 3, lines 27-28	1-47	Y	WO 2013123061 A1 (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL D/B/A SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE) 22 August 2013 (2013-08-22) claims 1-104	1-47	Y	PEARSON, D. et al. "CD22-Binding Peptides Derived from Anti-CD22 Ligand Blocking Antibodies Retain the Targeting and Cell Killing Properties of the Parent Antibodies and May Serve as a Drug Delivery Vehicle" <i>Int J Pept Res Ther</i> , Vol. 14, 01 August 2008 (2008-08-01), page 238, the first paragraph of left column	1-47	Y	ENGEL, P. et al. "Identification of the Ligand-binding Domains of CD22, a Member of the Immunoglobulin Superfamily that Uniquely Binds a Sialic Acid-dependent Ligand" <i>J. Exp. Med</i> , Vol. 181, 30 April 1995 (1995-04-30), abstract	1-47
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	WO 2016102965 A1 (UCL BUSINESS PLC et al.) 30 June 2016 (2016-06-30) claims 1-3, 13, 15-19, 25-27, description page 3, lines 27-28	1-47															
Y	WO 2013123061 A1 (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL D/B/A SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE) 22 August 2013 (2013-08-22) claims 1-104	1-47															
Y	PEARSON, D. et al. "CD22-Binding Peptides Derived from Anti-CD22 Ligand Blocking Antibodies Retain the Targeting and Cell Killing Properties of the Parent Antibodies and May Serve as a Drug Delivery Vehicle" <i>Int J Pept Res Ther</i> , Vol. 14, 01 August 2008 (2008-08-01), page 238, the first paragraph of left column	1-47															
Y	ENGEL, P. et al. "Identification of the Ligand-binding Domains of CD22, a Member of the Immunoglobulin Superfamily that Uniquely Binds a Sialic Acid-dependent Ligand" <i>J. Exp. Med</i> , Vol. 181, 30 April 1995 (1995-04-30), abstract	1-47															
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" 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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 03 August 2020		Date of mailing of the international search report 19 August 2020															
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer ZHANG, Yanqing															
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. 86-(10)-53962112															

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/090601

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TUSCANO, J.M.et al. "The Bs20x22 anti-CD20-CD22 bispecific antibody has more lymphomacidal activity than do the parent antibodies alone" <i>Cancer Immunol Immunother</i> , Vol. 60, 24 February 2011 (2011-02-24), pages 771-780	1-47
A	SATAKE, N.et al. "Novel Targeted Therapy for Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Anti-CD22 Antibody-MXD3 Antisense Oligonucleotide Conjugate" <i>Molecular Medicine</i> , Vol. 22, 22 July 2016 (2016-07-22), pages 632-642	1-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/090601

Box No. I 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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/090601

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.: **38-46**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 38-46 relate to a method of treating an individual having a cancer or an infectious disease, so claims 38-46 do not warrant an international search according to the criteria set out in PCR Rule 39.1(iv). An international search is still carried out on the basis of the use of the pharmaceutical composition of claim 37 for the manufacturing of a medicament for the treatment.
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.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/090601

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016102965	A1	30 June 2016	EP	3560953	A1	30 October 2019
				RU	2017121892	A	24 January 2019
				US	2020181232	A1	11 June 2020
				HU	E046262	T2	28 February 2020
				CL	2017001314	A1	15 December 2017
				AU	2015370679	A1	01 June 2017
				CL	2018003216	A1	01 February 2019
				IL	252208	D0	31 July 2017
				KR	102085349	B1	06 March 2020
				JP	6633081	B2	22 January 2020
				CL	2018003217	A1	01 February 2019
				EP	3237442	B1	10 July 2019
				ES	2744910	T3	26 February 2020
				ZA	201703381	B	29 August 2018
				PT	3237442	T	26 September 2019
				US	2019161531	A1	30 May 2019
				SG	11201704084V	A	29 June 2017
				CA	2970440	A1	30 June 2016
				AU	2015370679	B2	21 May 2020
				PL	3237442	T3	28 February 2020
				MX	2017006233	A	24 October 2017
				US	10098926	B2	16 October 2018
				CN	107002045	A	01 August 2017
				US	2017369550	A1	28 December 2017
				EP	3237442	A1	01 November 2017
				BR	112017013690	A2	06 March 2018
				KR	20200003939	A	10 January 2020
				DK	3237442	T3	23 September 2019
				US	2018371054	A1	27 December 2018
				US	10174099	B2	08 January 2019
				US	2017340704	A1	30 November 2017
				JP	2020022508	A	13 February 2020
				JP	2018501794	A	25 January 2018
				RU	2017121892	A3	28 May 2019
				KR	20170092695	A	11 August 2017
				US	2017340705	A1	30 November 2017
WO	2013123061	A1	22 August 2013	US	9447194	B2	20 September 2016
				US	2019119382	A1	25 April 2019
				US	10189903	B2	29 January 2019
				EP	2814846	B1	08 January 2020
				US	2015038684	A1	05 February 2015
				HK	1205144	A1	11 December 2015
				AU	2020203137	A1	04 June 2020
				AU	2013221672	B2	09 November 2017
				JP	2015513394	A	14 May 2015
				AU	2017264982	B2	13 February 2020
				EP	2814846	A4	04 November 2015
				AU	2013221672	A1	07 August 2014
				EP	3594245	A1	15 January 2020
				JP	2019088330	A	13 June 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

International application No.

PCT/CN2020/090601

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 2861491 A1	22 August 2013
		EP 2814846 A1	24 December 2014
		AU 2017264982 A1	07 December 2017
		US 2017107285 A1	20 April 2017

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 31/18 (2006.01)
A 6 1 P 31/14 (2006.01)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)

A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 31/14
C 1 2 N 15/12
C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 15/62

Z

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,N
 E,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,K
 G,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,N
 I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
 TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

i t y , J i a n g s u , C h i n a

(74)代理人 110002077

園田・小林特許業務法人

(72)発明者 ツェン, ミン

アメリカ合衆国 テキサス 7 5 0 6 3 , アービング, ロッキングハム ドライブ 8 1 2

(72)発明者 チェン, リリー

中華人民共和国 3 1 3 0 0 0 チェーチャン, ホウーチョウ, ウーシン ディストリクト, チ
ャオヤン ストリート, ホンフォン コミュニティ, ビルディング 5 5 , スイート 4 0 3

(72)発明者 リュー, シュン

中華人民共和国 2 1 1 1 0 0 チャンスー, ナンチン, チャンニン ディストリクト, フーリン
ストリート, ロンミエン アヴェニュー, アpartment 8 9 , ルーム 9 0 2

F ターム (参考) 4B065 AA92X AA92Y AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
 CA46
 4C087 AA01 AA02 BB65 CA12 NA05 ZB26 ZB27 ZB33