

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7591342号
(P7591342)

(45)発行日 令和6年11月28日(2024.11.28)

(24)登録日 令和6年11月20日(2024.11.20)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17
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
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28

請求項の数 26 (全123頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2018-564239(P2018-564239)	(73)特許権者	508087044 プレシゲン, インコーポレイテッド
(86)(22)出願日	平成29年6月7日(2017.6.7)		アメリカ合衆国 メリーランド州 208
(65)公表番号	特表2019-517267(P2019-517267 A)		76, ジャーマンタウン, セネカ メド
(43)公表日	令和1年6月24日(2019.6.24)		ウズ パークウェイ 20358
(86)国際出願番号	PCT/US2017/036440	(74)代理人	100092783
(87)国際公開番号	WO2017/214333		弁理士 小林 浩
(87)国際公開日	平成29年12月14日(2017.12.14)	(74)代理人	100120134
審査請求日	令和2年6月1日(2020.6.1)		弁理士 大森 規雄
審判番号	不服2022-10700(P2022-10700/J 1)	(74)代理人	100141195
審判請求日	令和4年7月8日(2022.7.8)	(72)発明者	弁理士 西澤 恵美子 シャー, ルトゥル アール.
(31)優先権主張番号	62/347,503		アメリカ合衆国 メリーランド州 208
(32)優先日	平成28年6月8日(2016.6.8)		41, ボイド ハーヴェスト ムーン ロ ード 14302
(33)優先権主張国・地域又は機関			
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CD 3 3 特異的キメラ抗原受容体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨格と、

(a) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列との、少なくとも 90 % の同一性を有するポリペプチドを含む切断型上皮増殖因子受容体をコードする核酸、ならびに

(b) (i) CD 3 3 抗原結合性ドメイン、
(ii) ストークドメイン、
(iii) 膜貫通ドメイン、
(iv) 4 - 1 B B および / または CD 2 8 を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、

および

(v) CD 3 ゼータシグナル伝達ドメイン
を含むキメラ抗原受容体をコードする核酸
とを含むベクター。

【請求項 2】

レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである
、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 3】

前記切断型上皮増殖因子受容体が、配列番号 5 4 のアミノ酸配列または配列番号 5 4 と
1 ~ 2 0 の保存的アミノ酸置換で異なるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項
1 または 2 に記載のベクター。

【請求項 4】

前記 C D 3 3 抗原結合性ドメインが、

(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチド、

(b) (i) 配列番号 9 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドおよび (ii) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチド、

(c) (i) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドおよび (ii) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチド、ならびに

(d) (i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドおよび (ii) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチド

のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 5】

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、4 - 1 B B シグナル伝達ドメインを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 6】

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、C D 2 8 シグナル伝達ドメインを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 7】

前記ベクターが、S l e e p i n g B e a u t y トランスポゾンである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 8】

(a) 前記 C D 3 3 抗原結合性ドメインが、配列番号 8 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドを含み；

(b) 前記ストークドメインが、配列番号 2 2 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドを含み；

(c) 前記共刺激シグナル伝達ドメインが、配列番号 2 8 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドを含み；かつ

(d) 前記 C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインが、配列番号 2 6 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む：

請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 9】

(a) 前記 C D 3 3 抗原結合性ドメインが、配列番号 8 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドを含み；

(b) 前記ストークドメインが、配列番号 2 2 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドを含み；

(c) 前記共刺激シグナル伝達ドメインが、配列番号 2 4 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドを含み；かつ

(d) 前記 C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインが、配列番号 2 6 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む：

請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 10】

前記切断型上皮増殖因子受容体が、配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 11】

前記切断型上皮増殖因子受容体が、配列番号 5 4 と 1 ~ 2 0 の保存的アミノ酸置換で異なるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

(a) I L - 1 5 またはその機能的変異体および (b) I L - 1 5 R またはその機能的変異体を含む融合タンパク質をさらにコードする、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか1項に記載のベクター。

【請求項 1 3】

配列番号 3 7 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む融合タンパク質をさらにコードする、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか1項に記載のベクター。

【請求項 1 4】

1 ~ 2 0 の保存的アミノ酸置換によって配列番号 3 7 のアミノ酸配列と異なるポリペプチドを含む融合タンパク質をさらにコードする、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか1項に記載のベクター。

10

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか1項に記載のベクターを含む免疫エフェクター細胞。

【請求項 1 6】

T 細胞またはナチュラルキラー (N K) 細胞である、請求項 1 5 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 1 7】

細胞傷害性 T リンパ球または調節性 T 細胞である、請求項 1 5 または 1 6 に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項 1 8】

ヒト対象における、標的細胞集団または標的組織に対する T 細胞媒介性免疫応答を刺激するための、有効量の、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか1項に記載の免疫エフェクター細胞を含む組成物。

20

【請求項 1 9】

前記ヒト対象が、急性骨髓性白血病 (A M L) と診断されている、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記 A M L が、再発性または難治性 A M L である、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

免疫エフェクター細胞内で キメラ抗原受容体 を発現させるための系であって、(a) 請求項 7 に記載のベクターと (b) S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼを含む、系。

30

【請求項 2 2】

前記免疫エフェクター細胞が、T 細胞または N K 細胞である、請求項 2 1 に記載の系。

【請求項 2 3】

少なくとも 1 つのさらなる遺伝子をコードする核酸をさらに含む、請求項 2 1 または 2 2 に記載の系。

【請求項 2 4】

前記さらなる遺伝子が、サイトカインをコードする、請求項 2 3 に記載の系。

【請求項 2 5】

前記サイトカインが、I L - 2、I L - 1 5、I L - 1 2、および I L - 2 1 のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 2 4 に記載の系。

40

【請求項 2 6】

改变 T 細胞の増殖または生存を刺激する方法であって、

(a) T 細胞または T 細胞の前駆細胞に、(i) 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか1項に記載のベクター、および (ii) トランスポザーゼをコードするベクターを in vitro でトランスフェクトして、それにより C D 3 3 抗原結合性ドメインを含むキメラ抗原受容体を発現する改变 T 細胞の集団を生成するステップと、

(b) 任意選択で、改变 T 細胞の前記集団を、ex vivo において、2 日間またはこれ未満にわたり培養するステップと

50

を含む方法。

【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、その内容全体が、参照により本明細書に組み込まれる、2016年6月8日に出願された、米国特許仮出願第62/347,503号の利益を主張する。

【0002】

配列表への参照

本出願は、ASCIIフォーマットにおいて、電子的に提出され、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる配列表を含有する。2017年6月6日に作成された前記ASCIICopieは、「50471_709_601_SL.txt」と名付けられ、103,120バイトのサイズである。

10

【背景技術】

【0003】

本明細書では、ヒトにおけるがんを処置するための組成物および方法が提示される。本発明はさらに、骨髄性悪性腫瘍、例えば、急性骨髄性白血病を処置するための、特異的キメラ抗原受容体およびベクターにも関する。

【0004】

急性骨髄性白血病(AML)とは、骨髄が、異常な骨髄芽球を作り出す種類のがんである。AMLは、成人における急性白血病の、最も一般的な形態である(Siegel, R., et al., *Cancer Statistics, CA Cancer J Clin*, 64(1):9-29 (2014))。AMLは、発症時の年齢中央値を65~70歳とする、急速な進行性疾患である。AMLは、急性骨髄性白血病(acute myelocytic leukemia)、急性骨髄性白血病(acute myelogenous leukemia)、急性顆粒球性白血病、および急性非リンパ球性白血病を含む、多くの名称で知られている。「急性」とは、急速に進行する可能性があり、処置されなければ、診断から数カ月以内に致死性となりうる、この疾患の侵襲性の性質を表す。がんは、骨髄内に発するが、血液を介して、他の解剖学的部位へと急速に拡散する。疾患は、小児および成人のいずれにおいても観察されるが、老齢者において、より一般的である。AMLに罹患する可能性は、年齢と共に増加するが、年齢にかかわらずAMLに罹患しうる。急性白血病を伴う成人10人中約8人が、AMLを有し、白血病を伴う小児6人中約1人が、AMLを有すると予想される。米国では、現在のところ、年平均12,000例の新たなAML症例が予測され、約30,000例の患者が、寛解の下で生存しているか、または寛解を経験している。

20

【0005】

老齢のAML患者(65歳)では、生存期間中央値は、短い(65~74歳の患者の3.9カ月間~85歳の患者の1.4カ月間)。AML患者のための処置選択肢は、限定されており、転帰は通例、不良であり、平均5年生存率は、20%であり、65歳を超える患者の5年生存率は、5%未満である(Thein, M. et al., *Outcome of older patients with acute myeloid leukemia: an analysis of SEER data over 3 decades, Cancer*, 119(15):2720-7 (2013))。AMLのある特定の亜群は、第7染色体内の異常、複合核型、既往の骨髄異形成症候群(MDS)または骨髄増殖性腫瘍(MPN)から生じる、再発性および/または難治性AMLおよびAMLを伴う患者など、特に、より不良な転帰を有する。AMLを伴う、65歳以上の患者は、若齢の患者より、好ましくない危険性の細胞遺伝学を示す可能性が大きい。これらの細胞遺伝学因子は、化学療法に対する耐性と関連し、治療に対して、大幅に低い奏効率を示す。奏効率に加えて、AMLを伴う老齢患者は、忍容性および処置転帰の不良のために、標準的な導入化学療法の候補者として検討されないか、またはこれを施されるように選択されないことが多い。導入化学療法は、この患者サブセットでは、高率の処置関連死亡率および完全奏効(CR)率の低さと関連する。現在のところ、標準的な導入化学療法を施されないAML患者のために承認され

30

40

50

た療法は存在しない。治療の欠乏と、奏効率の不良と関連する細胞遺伝学により、AMLは、好適な安全性プロファイルを伴う臨床的利益を裏付ける、新たな薬剤に対する医学的必要を満たされていない。

【 0 0 0 6 】

造血は、多能性幹細胞から、より成熟した分化細胞の表現型への、組織特異的な階層的分化を特徴とする。恒常性造血と同様に、AMLは、この休眠幹細胞集団内で蓄積される、白血病性幹細胞（LSC）をもたらす突然変異から生じると考えられる。このAML LSC集団を消失させることができないため、再発および治療の失敗が結果としてもたらされる。

【 0 0 0 7 】

AMLを伴う大半の患者は、導入化学療法により、寛解を達成するが、多くは、寛解後強化療法の投与にもかかわらず、再発する。再発は、数週間～何年もの後にも発生しうる。患者のうちの最大10%が、導入化学療法に対して抵抗性となる。これらの群の患者（再発性／難治性）のいずれも、特に不良な危険性の群を構成する。同種幹細胞移植は、これらの患者の大半のために推奨される手法と考えられるが、実行可能なのは、少数の患者に限られ、著明な罹患率および死亡率と関連する（Hamadani, M., Awan, F. & Copelan, E., Hematopoietic stem cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia, Biol Blood Marrow Transplant, 5:556-67 (2008)）。加えて、難治性疾患を伴う、移植された患者の転帰も、不良であり（Duval, M. et al., Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure, J Clin Oncol, 28(23):3730-8 (2010)）、再発性疾患を伴う患者のうちのほぼ半数が、化学療法抵抗性であり、したがって、移植にも適さない（Hamadani, M., Awan, F. & Copelan, E., Hematopoietic stem cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia Biol Blood Marrow Transplant, 5:556-67 (2008)、Estey, E., 2013. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. Am J Hematol, 88(4), pp. 318-27）。多くの新規の薬物および手法が、この群の患者のために探索されている。しかし、CR率は、一般に、30%未満である（Lit佐, M. et al., Failure of three novel regimens to improve outcome for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a report from the Eastern Cooperative Oncology Group, Br J Haematol, 148:217-25 (2010)、Cortes, J. et al., Phase 2 randomized study of p53 antisense oligonucleotide (cenersen) plus idarubicin with or without cytarabine in refractory and relapsed acute myeloid leukemia, Cancer, 118(2):418-27 (2012)、Kirschbaum, M. et al., A phase 1 trial dose-escalation study of tipifarnib on a week-on, week-off schedule in relapsed, refractory or high-risk myeloid leukemia, Leukemia, 25(10):1543-7 (2011)）。

【 0 0 0 8 】

AML患者では、細胞遺伝学は、処置に対する応答の予測において、重要な予後因子である（Grimwade, D. et al., The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties, Blood, 92(7):2322-33 (1998)）。AMLを伴い、その白血病性細胞が、t(8;21)、t(15;17)、t(16;16)、またはinv(16)の転座を有する患者は、導入化学療法および集中的な寛解後強化化学療法による転帰が良好である。しかし、第5染色体もしくは第7染色体の異常、11q23、または複合核型は、現在利用可能な導入化学療法および寛解後化学療法によっても、転帰が極めて不良である。正常核型または第8トリソミーを伴う患者は、中程度の予後を有する。AMLを伴う成人中、t(9;22)またはt(4;11)は、極めて不良な予後をもたらす。t(9;22)によるAMLを伴う患者は、化学療法単独では、治癒は、起きるとしても稀である。白血病性芽球上で発現する表面抗原の、免疫表現型の決定は、診断の一助となる場合があり、骨髄性白血病

10

20

30

40

50

、T細胞系の白血病、およびB細胞系の白血病お処置および予後について、重要な示唆を与える。従来の療法を使用する場合にAMLの長期生存の延長を達成しにくいことを踏まると、新規の処置戦略が必要とされている。

【発明の概要】

【0009】

本開示の一態様は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸であって、CARが、(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBおよびCD28のうちの少なくとも1つ、またはこれらの断片を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメイン、ならびに任意選択で、(f)切断型上皮増殖因子受容体(HER1tまたはHER1t-1)を含む、単離核酸に関する。 10

【0010】

本明細書では、骨格と、(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むベクターが提示される。ある特定の実施形態では、切断型上皮増殖因子受容体(HER1tまたはHER1t-1)、または全長CD20もしくは切断型CD20をコードする核酸をさらに含むベクターが提示される。 20

【0011】

本明細書では、骨格と、(1)切断型上皮増殖因子受容体またはこれらの機能的な変異体、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むベクターが提示される。 30

【0012】

ある特定の実施形態では、骨格と、(1)全長CD20およびこの機能的な変異体、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むベクターが提示される。 30

【0013】

ある特定の実施形態では、骨格と、(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメイン、ならびに(f)切断型上皮増殖因子受容体(HER1tまたはHER1t-1)、全長CD20、および切断型CD20(CD20t-1)のうちの少なくとも1つを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むベクターを含む改変細胞(engineered cell)、例えば、免疫エフェクター細胞が提示される。

【0014】

ある特定の実施形態では、(1)切断型上皮増殖因子受容体(HER1tまたはHER1t-1)、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)を含む改変細胞、例えば、免疫エフェクター細胞が提示される。 40

【0015】

ある特定の実施形態では、(1)キルスイッチ、選択マーカー、バイオマーカー、またはこれらの組合せとしての使用のための細胞タグ、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)共刺激シグナル

10

20

30

40

50

伝達ドメイン、および(e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(C A R)を含む改変細胞、例えば、免疫エフェクター細胞が提示される。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、4 - 1 B B および C D 2 8 のうちの少なくとも 1 つを含む。複数の実施形態では、細胞タグは、H E R 1 t 、H E R 1 t - 1 、C D 2 0 、または C D 2 0 t - 1 である。

【 0 0 1 6 】

本明細書では、ヒトにおける、標的細胞集団または標的組織に対する T 細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法であって、ヒトに、有効量の、C A R を発現するように遺伝子改変された細胞を投与するステップを含み、C A R が、(a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、(b) ストークドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、(d) 4 - 1 B B もしくは C D 2 8 、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、(e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメイン、および(f) 切断型上皮増殖因子受容体(H E R 1 t または H E R 1 t - 1)を含む、方法が提示される。

10

【 0 0 1 7 】

本明細書では、キメラ抗原受容体(C A R)をコードする単離核酸であって、C A R が、(a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、(b) ストークドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、(d) 4 - 1 B B もしくは C D 2 8 、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、(e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む、単離核酸が提示される。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、C D 3 3 抗原結合性ドメインは、(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列(h M 1 9 5 s c F v)との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド、(b) 配列番号 9 および 1 0 のアミノ酸配列(M 2 H 1 2)との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド、(c) 配列番号 1 1 および 1 2 のアミノ酸配列(D R B 2)との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド、ならびに(d) 配列番号 1 4 および 1 5 のアミノ酸配列(M y 9 - 6)との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドのうちの少なくとも 1 つを含む。

20

【 0 0 1 9 】

場合によって、C D 3 3 抗原結合性ドメインは、配列番号 8 のアミノ酸配列(h M 1 9 5 s c F v)との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドである。場合によって、ストークドメインは、配列番号 2 2 のアミノ酸配列(C D 8 アルファヒンジ)との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドである。

30

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、4 - 1 B B を含む。場合によって、4 - 1 B B の共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号 2 4 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む。場合によって、共刺激シグナル伝達ドメインは、C D 2 8 を含む。一部の実施形態では、C D 2 8 の共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号 2 8 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む。

40

【 0 0 2 1 】

場合によって、C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインは、配列番号 2 6 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態で

50

は、単離核酸は、切断型上皮増殖因子受容体をさらに含む。場合によって、切断型上皮増殖因子受容体は、HER1tであり、配列番号32のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。場合によって、切断型上皮増殖因子受容体は、HER1t-1であり、配列番号54のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。

【0022】

一部の実施形態では、CARは、配列番号39、41、43、45、47、49、51、53、または55を含むアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。

10

【0023】

本明細書では、骨格と、(1)HER1t、HER1t-1、またはこれらの機能的な変異体のうちの少なくとも1つを含む切断型上皮増殖因子受容体、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むベクターが提示される。

【0024】

本明細書では、骨格と、(1)全長CD20、切断型CD20(CD20t-1)、またはこれらの機能的な変異体、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むベクターが提示される。

20

【0025】

一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである。場合によって、切断型上皮増殖因子受容体は、配列番号32または配列番号54のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。場合によって、ベクターは、切断型CD20(CD20t-1)、またはこの機能的な変異体をコードするヌクレオチド配列を含み、前記CD20t-1は、配列番号56のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。

30

【0026】

一部の実施形態では、全長CD20は、配列番号36のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。場合によって、ベクターは、自己切断型トセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(T2A)ペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。場合によって、ベクターの骨格は、Sleeping BeautyトランスポゾンのDNAプラスミドまたはpFUGWである。

40

【0027】

場合によって、ベクターは、プロモーターをさらに含む。場合によって、プロモーターは、hEF1a1である。場合によって、CD33抗原結合性ドメインは、(a)配列番号8のアミノ酸配列(hM195scFv)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド、(b)配列番号9および10のアミノ酸配列(M2H12)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%

50

、 9 9 %、 または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド、 (c) 配列番号 1 1 および 1 2 のアミノ酸配列 (D R B 2) との、 少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド、 ならびに (d) 配列番号 1 4 および 1 5 のアミノ酸配列 (M y 9 - 6) との、 少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドのうちの少なくとも 1 つを含む。

【 0 0 2 8 】

一部の実施形態では、 C D 3 3 抗原結合性ドメインは、 配列番号 8 のアミノ酸配列との、 少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドである。場合によって、 ストークドメインは、 配列番号 2 2 のアミノ酸配列 (C D 8 アルファヒンジ) との、 少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む。場合によって、 共刺激シグナル伝達ドメインは、 4 - 1 B B を含む。一部の実施形態では、 4 - 1 B B の共刺激シグナル伝達ドメインは、 配列番号 2 4 のアミノ酸配列との、 少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % の同一性を有する核酸配列を含む。

【 0 0 2 9 】

場合によって、 ベクターの共刺激シグナル伝達ドメインは、 C D 2 8 を含む。場合によって、 C D 2 8 の共刺激シグナル伝達ドメインは、 配列番号 2 8 のアミノ酸配列との、 少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % の同一性を有する核酸配列を含む。場合によって、 C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインは、 配列番号 2 6 のアミノ酸配列との、 少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % の同一性を有する核酸配列を含む。

【 0 0 3 0 】

一部の実施形態では、 前記ベクターは、 プラスミドを含む。場合によって、 各前記ベクターは、 発現プラスミドを含む。場合によって、 非ウイルスベクターは、 S l e e p i n g B e a u t y トランスポゾンである。一部の実施形態では、 免疫エフェクター細胞は、 本明細書で開示されるヌクレオチドを含みうる。

【 0 0 3 1 】

本明細書では、 骨格と、 (1) 切断型上皮増殖因子受容体 (H E R 1 t) 、 ならびに (2) (a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、 (b) ストークドメイン、 (c) 膜貫通ドメイン、 (d) 4 - 1 B B もしくは C D 2 8 、 またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、 および (e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする核酸配列とを含むベクターを含む免疫エフェクター細胞が提示される。

【 0 0 3 2 】

本明細書ではさらに、 (1) キルスイッチ、 選択マーカー、 バイオマーカー、 またはこれらの組合せとしての使用のための細胞タグ、 ならびに (2) (a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、 (b) ストークドメイン、 (c) 膜貫通ドメイン、 (d) 4 - 1 B B もしくは C D 2 8 、 またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、 および (e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) を含む免疫エフェクター細胞も提示される。

【 0 0 3 3 】

一部の実施形態では、 細胞タグは、 H E R 1 t 、 H E R 1 t - 1 、 C D 2 0 t - 1 、 または C D 2 0 を含む。場合によって、 細胞タグは、 H E R 1 t を含み、 前記 H E R 1 t は、 配列番号 3 2 のポリペプチド配列を含む。場合によって、 細胞タグは、 H E R 1 t - 1 を含み、 前記 H E R 1 t - 1 は、 配列番号 5 4 のポリペプチド配列を含む。場合によって、 免疫エフェクター細胞は、 本明細書で開示されるベクターを含む。一部の実施形態では、 細胞は、 T 細胞、 ナチュラルキラー (N K) 細胞、 細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) 、

10

20

30

40

50

または調節性T細胞である。場合によって、細胞は、CD33抗原結合性ドメインが、CD33に結合すると、抗腫瘍免疫を呈する。

【0034】

本明細書では、それを必要とするヒト対象における、標的細胞集団または標的組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法であって、前記ヒト対象に、有効量の、CARを発現するように遺伝子改変された細胞を投与するステップを含み、CARが、(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメイン、および(f)切断型上皮増殖因子受容体(HER1t)を含む、方法が提示される。

10

【0035】

一部の実施形態では、ヒトは、急性骨髓性白血病(AML)と診断されている。場合によって、急性骨髓性白血病は、再発性または難治性AMLである。

【0036】

キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸であって、CARが、(a)配列番号8のアミノ酸配列を伴うCD33抗原結合性ドメイン、(b)配列番号22のアミノ酸配列を伴うストークドメイン、(c)配列番号28のアミノ酸配列を伴うCD28を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、(d)配列番号32のアミノ酸配列を伴うHER1tおよび配列番号54のアミノ酸配列を伴うHER1t-1のうちの少なくとも1つを含むHER1タグ、(e)配列番号26のアミノ酸配列を伴うCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む、単離核酸が提示される。

20

【0037】

本明細書ではさらに、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸であって、CARが、(a)配列番号8のアミノ酸配列を伴うCD33抗原結合性ドメイン、(b)配列番号22のアミノ酸配列を伴うストークドメイン、(c)配列番号24のアミノ酸配列を伴う4-1BBを含む共刺激シグナル伝達ドメイン、(d)配列番号32のアミノ酸配列を伴うHER1tおよび配列番号54のアミノ酸配列を伴うHER1t-1のうちの少なくとも1つを含むHER1タグ、(e)配列番号26のアミノ酸配列を伴うCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む、単離核酸も提示される。

30

【0038】

一部の実施形態では、ベクターは、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのうちの1または複数を含む。場合によって、前記ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである。場合によって、非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポゾンである。一部の実施形態では、前記ベクターは、複数のベクターである。

【0039】

免疫エフェクター細胞内でCARを発現させるための系であって、本明細書で開示される単離核酸をコードする、1または複数のベクターを含む系が提示される。一部の実施形態では、前記免疫エフェクター細胞は、T細胞またはNK細胞である。場合によって、前記系は、少なくとも1つのさらなる遺伝子をコードする核酸をさらに含む。場合によって、前記さらなる遺伝子は、サイトカインを含む。一部の実施形態では、前記サイトカインは、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、およびIL-15とIL-15Rとの融合体のうちの少なくとも1つを含む。場合によって、前記サイトカインは、分泌型にある。一部の実施形態では、前記サイトカインは、膜結合型にある。

40

【0040】

場合によって、前記系は、1つのベクターを含む。場合によって、前記1または複数のベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである。一部の実施形態では、非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポゾンである。場合によって、前記系は、Sleeping Beautyトランスポザーゼをさらに含む。場合によって、Sleeping Beautyトラン

50

スポザーゼは、SB11、SB100X、またはSB110である。場合によって、前記免疫エフェクター細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞内でCARを発現させる方法は、前記免疫エフェクター細胞を、本明細書で開示される系と接触させるステップを含む。

【0041】

本明細書では、改変T細胞の増殖および/または生存を刺激する方法であって、(a)細胞の試料を対象から得るステップであって、試料が、T細胞またはT細胞の前駆細胞を含むステップと、(b)細胞に、請求項1から13および44から45のいずれか一項に記載の単離核酸をコードする、1または複数のベクター、およびトランスポザーゼをコードするベクターをトランسفエクトして、改変CD33 CAR発現T細胞の集団をもたらすステップと、(c)任意選択で、CD33 CAR T細胞の集団を、ex vivoにおいて、2日間またはこれ未満にわたり培養するステップとを含む方法が提示される。

10

【0042】

一部の実施形態では、方法は、細胞に、サイトカインをコードするベクターをトランسفエクトするステップをさらに含む。場合によって、サイトカインは、IL-15およびIL-15Rを含む融合タンパク質である。場合によって、前記1または複数のベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである。一部の実施形態では、非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポザーゼである。場合によって、方法は、Sleeping Beautyトランスポザーゼをさらに含む。場合によって、Sleeping Beautyトランスポザーゼは、SB11、SB100X、またはSB110である。

20

【0043】

本開示の特徴は、特に、付属の特許請求の範囲において明示されている。本開示の特徴および利点についてのよりよい理解は、本開示の原理が用いられる、例示的な実施形態を明示する、以下の詳細な記載および付属の図面を参照することにより得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】CD33アイソフォームの構造について描示する概略図である。

【図2】CD33 CARレンチウイルスベクターマップを描示する図である。

【図3】Sleeping Beautyトランスポザーゼ系についての例示的な概略図である。

30

【図4】CAR-T細胞を作出するための、レンチウイルスによる形質導入についての例示的な概略図である。

【図5】養子導入T細胞上の、CD33 CARおよびHER1tの発現を描示する図である。

【図6】レンチウイルスにより形質導入された細胞からの、CD33 CARの発現の、ウェスタンプロットによる確認を裏付ける図である。

【図7】in vitroにおいて培養されたCD33 CAR-T細胞の絶対数の増加、ならびにCD3/CD28ビーズによる刺激の後における、非形質導入T細胞(UNT)およびCD33 CAR-T細胞(CD33 CARLV)からの、全T細胞集団の倍数の増加の動態を示す図である。

40

【図8】レンチウイルスによる形質導入後におけるCD33 CAR-T細胞のコピー数についての評価を提示する図である。

【図9-1】図9A、9B、および9C: CD33 CAR-T細胞の、標的特異的な、in vitroにおける細胞傷害作用を裏付ける図である。CD33特異的細胞傷害作用は、ユーロピウム標識化標的細胞(EL4、EL4/CD33およびMOLM-13)により測定した(図9A)。被験細胞株における、CD33の表面発現レベルは、フローサイトメトリーにより測定した。太字の影付き直線は、アイソタイプ対照抗体による染色を示し、明色の影付き直線は、抗ヒトCD33抗体による染色を示す(図9Bおよび図9C)。

50

【図9-2】図9A、9B、および9C：CD33 CAR-T細胞の、標的特異的な、in vitroにおける細胞傷害作用を裏付ける図である。CD33特異的細胞傷害作用は、ユーロピウム標識化標的細胞（EL4、EL4/CD33およびMOLM-13）により測定した（図9A）。被験細胞株における、CD33の表面発現レベルは、フローサイトメトリーにより測定した。太字の影付き直線は、アイソタイプ対照抗体による染色を示し、明色の影付き直線は、抗ヒトCD33抗体による染色を示す（図9Bおよび図9C）。

【図10A】ex vivoにおいて拡大増殖させたCD33 CAR-T細胞からの、サイトカイン（IFN（図10A）、IL-2（図10B）、およびTNF（図10C））の産生を裏付ける図である。

【図10B】ex vivoにおいて拡大増殖させたCD33 CAR-T細胞からの、サイトカイン（IFN（図10A）、IL-2（図10B）、およびTNF（図10C））の産生を裏付ける図である。

【図10C】ex vivoにおいて拡大増殖させたCD33 CAR-T細胞からの、サイトカイン（IFN（図10A）、IL-2（図10B）、およびTNF（図10C））の産生を裏付ける図である。

【図11】HER1tを発現するCD33 CAR-T細胞のセツキシマブにより誘導される抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用（ADCC）を示す図である。

【図12】AML腫瘍モデルにおける、処置群ごとのNSGマウスの生存曲線を裏付ける図である。

【図13】図13Aおよび13B：fLUC生体発光により測定される腫瘍負荷についての定量的解析を提示する図である。図13A：腹側から見た図であり、図13B：背側から見た図である。

【図14A】CD33 CAR-T細胞で処置されたNSGマウスに由来する血液試料、骨髄試料、および脾臓試料についてのフローサイトメトリー解析を提示する図である。

【図14B】CD33 CAR-T細胞で処置されたNSGマウスに由来する血液試料、骨髄試料、および脾臓試料についてのフローサイトメトリー解析を提示する図である。

【図15】図15Aおよび15B：LVにより形質導入された多様なヒトT細胞上における、CD33 CARおよびHER1tの発現を裏付ける図である。

【図16A】多様なAML細胞株上における、CD33発現についてのフローサイトメトリー結果について描示するグラフを示す図である（図16A）。多様なCD33発現AML細胞株における、多様なLV CD33 CARについての、2時間にわたるユーロピウム放出アッセイの結果について描示するグラフである（図16B）。LV CD33 CARによる、多様なCD33発現AML細胞株の認識時において、T細胞により放出されるサイトカインの発現結果について描示するグラフである（図16C）。

【図16B】多様なAML細胞株上における、CD33発現についてのフローサイトメトリー結果について描示するグラフを示す図である（図16A）。多様なCD33発現AML細胞株における、多様なLV CD33 CARについての、2時間にわたるユーロピウム放出アッセイの結果について描示するグラフである（図16B）。LV CD33 CARによる、多様なCD33発現AML細胞株の認識時において、T細胞により放出されるサイトカインの発現結果について描示するグラフである（図16C）。

【図16C】多様なAML細胞株上における、CD33発現についてのフローサイトメトリー結果について描示するグラフを示す図である（図16A）。多様なCD33発現AML細胞株における、多様なLV CD33 CARについての、2時間にわたるユーロピウム放出アッセイの結果について描示するグラフである（図16B）。LV CD33 CARによる、多様なCD33発現AML細胞株の認識時において、T細胞により放出されるサイトカインの発現結果について描示するグラフである（図16C）。

【図17】CAR33-CD8a-CD28m-Z（Sleeping Beauty）T細胞による、CD33発現白血病細胞株での溶解について描示するグラフを提示する図である。

10

20

30

40

50

【図18】CD33発現標的細胞の存在下における、CAR33 - CD8a - CD28m - Z (Sleeping Beauty) T細胞の、CD107aの脱颗粒化およびIFNの産生に対する効果を裏付けるフローサイトメトリー結果について描示するグラフを提示する図である。

【図19】CD33 CAR (Sleeping Beauty) およびHER1tの、遺伝子改変T細胞上の発現を裏付けるフローサイトメトリー結果について描示するグラフを提示する図である。

【図20A】CD33発現AML細胞内の、本明細書で記載されるCARの効果を描示する図である。図20Aは、多様なAML細胞株上における、CD33発現についてのフローサイトメトリー結果について描示するグラフを提示する。図20Bは、多様なCD33発現AML細胞株における、CAR33 - CD8a - CD28m - Z (Sleeping Beauty) についての、2時間にわたるユーロピウム放出アッセイの結果について描示するグラフを提示する。

【図20B】CD33発現AML細胞内の、本明細書で記載されるCARの効果を描示する図である。図20Aは、多様なAML細胞株上における、CD33発現についてのフローサイトメトリー結果について描示するグラフを提示する。図20Bは、多様なCD33発現AML細胞株における、CAR33 - CD8a - CD28m - Z (Sleeping Beauty) についての、2時間にわたるユーロピウム放出アッセイの結果について描示するグラフを提示する。

【図21-1】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-2】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-3】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-4】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-5】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-6】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-7】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-8】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-9】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-10】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-11】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-12】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-13】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-14】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図21-15】本明細書で記載される方法および組成物についての核酸配列およびポリペプチド配列を例示する配列表を提示する図である。

【図22A-1】本明細書で記載される組成物の、腫瘍細胞と接触させたときの効果であ

10

20

30

40

50

10
つて、マウスにおける *in vivo* の結果を含む効果を提示する図である。図 22 A は、研究の 11 日目 (CAR-T 細胞投与の 3 日後) における、CAR-T 細胞を投与されたマウスの血漿によるサイトカイン解析について描示するグラフを提示する図である。マウスに由来する血漿を回収し、ヒトサイトカインを、マルチプレックス解析物プラットフォームにより評価した。測定されたいいくつかの解析物 (GM-CSF, IFN, TNF, IL-10, IL-18, および IP-10) についての平均値 \pm SEM が示される。群 1 つ当たりのマウスの $N = 11 \sim 15$ であり、これは、規定された時点における組織回収のためのサテライト群の一部であるマウスを含んだ。 $^* p < 0.05$; $^{**} p < 0.01$; $^{***} p < 0.001$; それぞれの処置群に対する、生理食塩液、非形質導入 T 細胞、および CD19-CAR-T 細胞についての、チューキーによる多重比較検定を伴う一元配置分散分析 (ANOVA) である。図 22 B は、CAR-T 細胞による処置後における、AML 腫瘍保有マウスから採取された血液試料の、代表的なサンプリングについて描示するグラフを提示する図である。AML 保有腫瘍マウスを、8 日目に、生理食塩液、非形質導入 T 細胞、CD19-CAR-T 細胞の単回投与、または CD33-CAR-T 細胞で処置した。投与 2 回と注記された群には、研究の 15 日目に、等用量の CD33-CAR-T 細胞だけによる 2 回目を施した。血液試料を、マウスから得て、CAR-T 細胞の存在および存続、ならびに MOLM-13 腫瘍細胞 (CD123 の発現に基づく) の存在について査定した。(A) マウスが瀕死となった 16 日目に、血液試料を、生理食塩液だけ、非形質導入 T 細胞、または CD19-CAR-T 細胞で処置されたマウスから採取した。(B) 18 日目に、血液試料を、CD33-CAR-T 細胞で処置された、残りのマウスから採取した。示されるデータに、FSC/SSC/ヒト CD45+ 細胞について、ゲートをかけた。図 22 C: A LM 腫瘍細胞株 (THP1 および HL60) に対する細胞傷害活性について描示するグラフである。

20
【図 22 A - 2】本明細書で記載される組成物の、腫瘍細胞と接触させたときの効果であつて、マウスにおける *in vivo* の結果を含む効果を提示する図である。図 22 A は、研究の 11 日目 (CAR-T 細胞投与の 3 日後) における、CAR-T 細胞を投与されたマウスの血漿によるサイトカイン解析について描示するグラフを提示する図である。マウスに由来する血漿を回収し、ヒトサイトカインを、マルチプレックス解析物プラットフォームにより評価した。測定されたいいくつかの解析物 (GM-CSF, IFN, TNF, IL-10, IL-18, および IP-10) についての平均値 \pm SEM が示される。群 1 つ当たりのマウスの $N = 11 \sim 15$ であり、これは、規定された時点における組織回収のためのサテライト群の一部であるマウスを含んだ。 $^* p < 0.05$; $^{**} p < 0.01$; $^{***} p < 0.001$; それぞれの処置群に対する、生理食塩液、非形質導入 T 細胞、および CD19-CAR-T 細胞についての、チューキーによる多重比較検定を伴う一元配置分散分析 (ANOVA) である。図 22 B は、CAR-T 細胞による処置後における、AML 腫瘍保有マウスから採取された血液試料の、代表的なサンプリングについて描示するグラフを提示する図である。AML 保有腫瘍マウスを、8 日目に、生理食塩液、非形質導入 T 細胞、CD19-CAR-T 細胞の単回投与、または CD33-CAR-T 細胞で処置した。投与 2 回と注記された群には、研究の 15 日目に、等用量の CD33-CAR-T 細胞だけによる 2 回目を施した。血液試料を、マウスから得て、CAR-T 細胞の存在および存続、ならびに MOLM-13 腫瘍細胞 (CD123 の発現に基づく) の存在について査定した。(A) マウスが瀕死となった 16 日目に、血液試料を、生理食塩液だけ、非形質導入 T 細胞、または CD19-CAR-T 細胞で処置されたマウスから採取した。(B) 18 日目に、血液試料を、CD33-CAR-T 細胞で処置された、残りのマウスから採取した。示されるデータに、FSC/SSC/ヒト CD45+ 細胞について、ゲートをかけた。図 22 C: A LM 腫瘍細胞株 (THP1 および HL60) に対する細胞傷害活性について描示するグラフである。

30
40

【図 22 B - 1】本明細書で記載される組成物の、腫瘍細胞と接触させたときの効果であつて、マウスにおける *in vivo* の結果を含む効果を提示する図である。図 22 A は、研究の 11 日目 (CAR-T 細胞投与の 3 日後) における、CAR-T 細胞を投与され

たマウスの血漿によるサイトカイン解析について描示するグラフを提示する図である。マウスに由来する血漿を回収し、ヒトサイトカインを、マルチプレックス解析物プラットフォームにより評価した。測定されたいくつかの解析物 (GM-CSF、IFN、TNF、IL-10、IL-18、およびIP-10) についての平均値 \pm SEMが示される。群1つ当たりのマウスのN = 11 ~ 15であり、これは、規定された時点における組織回収のためのサテライト群の一部であるマウスを含んだ。^{*}p < 0.05; ^{**}p < 0.01; ^{***}p < 0.001; それぞれの処置群に対する、生理食塩液、非形質導入T細胞、およびCD19-CAR-T細胞についての、チューキーによる多重比較検定を伴う一元配置分散分析(ANOVA)である。図22Bは、CAR-T細胞による処置後における、AML腫瘍保有マウスから採取された血液試料の、代表的なサンプリングについて描示するグラフを提示する図である。AML保有腫瘍マウスを、8日目に、生理食塩液、非形質導入T細胞、CD19-CAR-T細胞の単回投与、またはCD33-CAR-T細胞で処置した。投与2回と注記された群には、研究の15日目に、等用量のCD33-CAR-T細胞だけによる2回目を施した。血液試料を、マウスから得て、CAR-T細胞の存在および存続、ならびにMOLM-13腫瘍細胞(CD123の発現に基づく)の存在について査定した。(A)マウスが瀕死となった16日目に、血液試料を、生理食塩液だけ、非形質導入T細胞、またはCD19-CAR-T細胞で処置されたマウスから採取した。(B)18日目に、血液試料を、CD33-CAR-T細胞で処置された、残りのマウスから採取した。示されるデータに、FSC/SSC/ヒトCD45+細胞について、ゲートをかけた。図22C: ALM腫瘍細胞株(THP1およびHL60)に対する細胞傷害活性について描示するグラフである。

【図22B-2】本明細書で記載される組成物の、腫瘍細胞と接触させたときの効果であって、マウスにおけるin vivoの結果を含む効果を提示する図である。図22Aは、研究の11日目(CAR-T細胞投与の3日後)における、CAR-T細胞を投与されたマウスの血漿によるサイトカイン解析について描示するグラフを提示する図である。マウスに由来する血漿を回収し、ヒトサイトカインを、マルチプレックス解析物プラットフォームにより評価した。測定されたいくつかの解析物 (GM-CSF、IFN、TNF、IL-10、IL-18、およびIP-10) についての平均値 \pm SEMが示される。群1つ当たりのマウスのN = 11 ~ 15であり、これは、規定された時点における組織回収のためのサテライト群の一部であるマウスを含んだ。^{*}p < 0.05; ^{**}p < 0.01; ^{***}p < 0.001; それぞれの処置群に対する、生理食塩液、非形質導入T細胞、およびCD19-CAR-T細胞についての、チューキーによる多重比較検定を伴う一元配置分散分析(ANOVA)である。図22Bは、CAR-T細胞による処置後における、AML腫瘍保有マウスから採取された血液試料の、代表的なサンプリングについて描示するグラフを提示する図である。AML保有腫瘍マウスを、8日目に、生理食塩液、非形質導入T細胞、CD19-CAR-T細胞の単回投与、またはCD33-CAR-T細胞で処置した。投与2回と注記された群には、研究の15日目に、等用量のCD33-CAR-T細胞だけによる2回目を施した。血液試料を、マウスから得て、CAR-T細胞の存在および存続、ならびにMOLM-13腫瘍細胞(CD123の発現に基づく)の存在について査定した。(A)マウスが瀕死となった16日目に、血液試料を、生理食塩液だけ、非形質導入T細胞、またはCD19-CAR-T細胞で処置されたマウスから採取した。(B)18日目に、血液試料を、CD33-CAR-T細胞で処置された、残りのマウスから採取した。示されるデータに、FSC/SSC/ヒトCD45+細胞について、ゲートをかけた。図22C: ALM腫瘍細胞株(THP1およびHL60)に対する細胞傷害活性について描示するグラフである。

【図22C】本明細書で記載される組成物の、腫瘍細胞と接触させたときの効果であって、マウスにおけるin vivoの結果を含む効果を提示する図である。図22Aは、研究の11日目(CAR-T細胞投与の3日後)における、CAR-T細胞を投与されたマウスの血漿によるサイトカイン解析について描示するグラフを提示する図である。マウスに由来する血漿を回収し、ヒトサイトカインを、マルチプレックス解析物プラットフォーム

10

20

30

40

50

ムにより評価した。測定されたいくつかの解析物 (GM-CSF、IFN、TNF、IL-10、IL-18、およびIP-10) についての平均値 \pm SEMが示される。群1つ当たりのマウスのN = 11 ~ 15であり、これは、規定された時点における組織回収のためのサテライト群の一部であるマウスを含んだ。 $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; それぞれの処置群に対する、生理食塩液、非形質導入T細胞、およびCD19-CAR-T細胞についての、チューキーによる多重比較検定を伴う一元配置分散分析(ANOVA)である。図22Bは、CAR-T細胞による処置後における、AML腫瘍保有マウスから採取された血液試料の、代表的なサンプリングについて描示するグラフを提示する図である。AML保有腫瘍マウスを、8日目に、生理食塩液、非形質導入T細胞、CD19-CAR-T細胞の単回投与、またはCD33-CAR-T細胞で処置した。投与2回と注記された群には、研究の15日目に、等用量のCD33-CAR-T細胞だけによる2回目を施した。血液試料を、マウスから得て、CAR-T細胞の存在および存続、ならびにMOLM-13腫瘍細胞(CD123の発現に基づく)の存在について査定した。(A)マウスが瀕死となった16日目に、血液試料を、生理食塩液だけ、非形質導入T細胞、またはCD19-CAR-T細胞で処置されたマウスから採取した。(B)18日目に、血液試料を、CD33-CAR-T細胞で処置された、残りのマウスから採取した。示されるデータに、FSC/SSC/ヒトCD45+細胞について、ゲートをかけた。図22C: ALM腫瘍細胞株(THP1およびHL60)に対する細胞傷害活性について描示するグラフである。

【図23-1】図23A ~ 23E: AML患者のT細胞からの、CD33-CAR-T細胞の作出について記載し、AML腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を裏付ける図である。図23A: AMLドナーに由来するPBMCを得、CD33およびCD3の発現について、表現型を特徴づけした。図23B: ビーズベースの方法を使用して、T細胞を、PBMC画分から単離し、非標識化画分を、CD33+腫瘍細胞について特徴づけた。図23C: T細胞に、LV-CD33-CAR構築物により形質導入し、培養の14日目におけるCARの発現を示す。図23D: 0日目(アッセイの準備がなされた時点)および3日目における、AMLドナーによるCD33-CAR-T細胞の、MOLM-13腫瘍細胞またはAMLドナー腫瘍細胞との共培養物を示す。全ての細胞に、FSC/SSC/生細胞について、ゲートをかけた。図23E: AML患者に由来するCD33-CAR-T細胞の、CD33発現腫瘍細胞との共培養後におけるサイトカイン発現である。細胞内サイトカイン染色は、CD33-CAR-T細胞(AMLドナーE261に由来する)の、表示の腫瘍細胞との共培養の18時間後において実施した。T細胞は、細胞表面染色し、次いで、固定/透過化に続き、サイトカインであるIFNおよびIL-2について染色した。FSC/SSC/生/CD3-T細胞に基づき、細胞にゲートをかけた。AML-E261細胞とは、試料中に存在する、患者の自家CD33腫瘍細胞を指す。

【図23-2】図23A ~ 23E: AML患者のT細胞からの、CD33-CAR-T細胞の作出について記載し、AML腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を裏付ける図である。図23A: AMLドナーに由来するPBMCを得、CD33およびCD3の発現について、表現型を特徴づけした。図23B: ビーズベースの方法を使用して、T細胞を、PBMC画分から単離し、非標識化画分を、CD33+腫瘍細胞について特徴づけた。図23C: T細胞に、LV-CD33-CAR構築物により形質導入し、培養の14日目におけるCARの発現を示す。図23D: 0日目(アッセイの準備がなされた時点)および3日目における、AMLドナーによるCD33-CAR-T細胞の、MOLM-13腫瘍細胞またはAMLドナー腫瘍細胞との共培養物を示す。全ての細胞に、FSC/SSC/生細胞について、ゲートをかけた。図23E: AML患者に由来するCD33-CAR-T細胞の、CD33発現腫瘍細胞との共培養後におけるサイトカイン発現である。細胞内サイトカイン染色は、CD33-CAR-T細胞(AMLドナーE261に由来する)の、表示の腫瘍細胞との共培養の18時間後において実施した。T細胞は、細胞表面染色し、次いで、固定/透過化に続き、サイトカインであるIFNおよびIL-2について染色した。FSC/SSC/生/CD3-T細胞に基づき、細胞にゲートをかけた。AML-E261

10

20

30

40

50

細胞とは、試料中に存在する、患者の自家 CD33 腫瘍細胞を指す。

【図 23-3】図 23 A ~ 23 E : AML 患者の T 細胞からの、 CD33 - CAR - T 細胞の作出について記載し、 AML 腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を裏付ける図である。図 23 A : AML ドナーに由来する PBMC を得、 CD33 および CD3 の発現について、表現型を特徴づけした。図 23 B : ビーズベースの方法を使用して、 T 細胞を、 PBMC 画分から単離し、非標識化画分を、 CD33 + 腫瘍細胞について特徴づけた。図 23 C : T 細胞に、 LV - CD33 - CAR 構築物により形質導入し、培養の 14 日目における CAR の発現を示す。図 23 D : 0 日目 (アッセイの準備がなされた時点) および 3 日目における、 AML ドナーによる CD33 - CAR - T 細胞の、 MOLM - 13 腫瘍細胞または AML ドナー腫瘍細胞との共培養物を示す。全ての細胞に、 FSC / SSC / 生細胞について、ゲートをかけた。図 23 E : AML 患者に由来する CD33 - CAR - T 細胞の、 CD33 発現腫瘍細胞との共培養後におけるサイトカイン発現である。細胞内サイトカイン染色は、 CD33 - CAR - T 細胞 (AML ドナー E 261 に由来する) の、表示の腫瘍細胞との共培養の 18 時間後において実施した。 T 細胞は、細胞表面染色し、次いで、固定 / 透過化に続き、サイトカインである IFN および IL - 2 について染色した。 FSC / SSC / 生 / CD3 T 細胞に基づき、細胞にゲートをかけた。 AML E 261 細胞とは、試料中に存在する、患者の自家 CD33 腫瘍細胞を指す。

【図 24】NK 細胞上における、 CD33 CAR および HER1t の発現について記載する図である。

【図 25】CD33 CAR NK 細胞上における、 HER1t および HER1t - 1 タグの発現について記載する図である。

【図 26】CD33 CAR NK 細胞上における、 CD20t - 1 タグの発現について開示する図である。

【図 27】CD33 - CAR NK 紆胞が、 NK 抵抗性 CD33 + AML 細胞 (MLL - 2 、 KG - 1) を効率的に溶解させることを裏付ける図である。

【図 28】CD33 - CAR NK 紆胞が、 NK 抵抗性 AML 細胞株 (KG - 1) を、低 E : T 比で、効率的に溶解させることを裏付ける図である。

【発明を実施するための形態】

【0045】

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される、全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解する意味と同じ意味を有する。本発明の記載および主張では、以下の用語法を使用する。

【0046】

定義

特許請求の範囲および / または本明細書において、「 ~ を含むこと」という用語と共に使用される場合の、「ある (a) 」または「ある (an) 」という語の使用は、「 1 つの」を意味しうるが、また、「 1 または複数の」、「少なくとも 1 つの」、および「 1 つまたは 1 つを超える」という意味とも合致する。

【0047】

本出願を通して、「約」という用語は、値が、値を決定するのに利用されるデバイス、方法についての誤差の固有の変動、または研究対象間に存在する変動を含むことを指し示すように使用される。典型的に、用語は、状況に応じて、約 1 % 、 2 % 、 3 % 、 4 % 、 5 % 、 6 % 、 7 % 、 8 % 、 9 % 、 10 % 、 11 % 、 12 % 、 13 % 、 14 % 、 15 % 、 16 % 、 17 % 、 18 % 、 19 % 、もしくは 20 % 、またはこれら未満のばらつきを包含することを意図する。

【0048】

特許請求の範囲における「または」という用語は、代替物だけを指すか、または、代替物が相互に排他的であることが明示的に指し示されない限りにおいて、「および / または」を意味するように使用するが、本開示は、代替物だけを指す定義、および「および / または」を指す定義を支持する。

【0049】

本明細書および特許請求の範囲で使用される「～を含むこと (comprising)」（「～を含む (comprise)」および「～を含む (comprises)」など、「～を含むこと (comprising)」の任意の形態）、「～を有すること」（「～を有する (have)」および「～を有する (has)」など、「～を有すること」の任意の形態）、「～を含むこと (including)」（「～を含む (include)」および「～を含む (includes)」など、「～を含むこと (including)」の任意の形態）、または「～を含有すること」（「～を含有する (contain)」および「～を含有する (contains)」など、「～を含有すること」の任意の形態）という語は、包含的またはオープンエンドであり、さらなる、列挙されていない要素または方法ステップを除外しない。本明細書で論じられる任意の実施形態は、本発明の任意の方法または組成物に関して実施することが可能であり、この逆も成り立つことが想定される。さらに、本発明の組成物を使用して、本発明の方法を達成することができる。

10

【0050】

本明細書で使用される「合成」または「改変」とは、天然由来の化合物と対比して、化学的過程および／または人為を介して形成するか、または発現させた化合物を指す。

【0051】

「単離」とは、その天然環境からの核酸の抽出を意味する。「精製」とは、所与の核酸が、天然から抽出されたもの（ゲノムDNAおよびmRNAを含む）であれ、合成されたもの（cDNAを含む）であれ、かつ／または検査室条件下で増幅されたのであれ、純度が増大しており、この場合、「純度」とは、相対的用語であり、「絶対純度」ではないことを意味する。一方、核酸およびタンパク質は、希釈剤またはアジュバントと共に製剤化される場合があるが、実際的な目的では、単離されているものとしうることを理解されたい。例えば、核酸は、細胞への導入のために使用する場合、許容可能な担体または希釈剤と混合することが典型的である。

20

【0052】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。この用語は、分子の一次構造だけを指す。したがって、この用語は、二本鎖DNAおよび一本鎖DNA、三重鎖DNAのほか、二本鎖RNAおよび一本鎖RNAも含む。この用語はまた、例えば、ポリヌクレオチドのメチル化および／またはキャッピングによる修飾形態、ならびにポリヌクレオチドの非修飾形態も含みうる。用語はまた、天然のものではないヌクレオチドまたは合成ヌクレオチドのほか、ヌクレオチド類似体を含む分子を含むことも意図する。

30

【0053】

「ポリペプチド」は、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語と互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。「成熟タンパク質」とは、全長タンパク質であり、任意選択で、グリコシル化または所与の細胞内環境内のタンパク質に典型的な他の修飾を含むタンパク質である。

【0054】

核酸および／または核酸配列は、天然または人工で、共通の先祖核酸または先祖核酸配列に由来する場合、「相同」である。タンパク質および／またはタンパク質配列は、それらのコードDNAが、天然または人工で、共通の先祖核酸または先祖核酸配列に由来する場合、相同である。相同な分子は、相同体と称する場合がある。例えば、本明細書で記載される、任意の天然タンパク質は、任意の利用可能な突然変異誘発法により修飾することができる。発現させると、この突然変異核酸は、元の核酸によりコードされるタンパク質と相同なポリペプチドをコードする。相同性は一般に、2つまたはこれを超える核酸またはタンパク質（またはこれらの配列）の間の配列同一性から推定される。相同性を確立するのに有用な配列の間の同一性の、正確な百分率は、問題の核酸およびタンパク質と共に変動するが、少なくとも25%の配列同一性を使用して、相同性を確立する。高レベルの配列同一性、例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95

40

50

%、もしくは 99%、またはこれを超える配列同一性もまた、相同性を確立するのに使用することができる。本明細書では、配列同一性百分率を決定するための方法（例えば、デフォルトパラメータを使用する、BLASTP および BLASTN）について記載するが、これらは、一般に利用可能である。

【0055】

ポリペプチドの、2つの核酸配列またはアミノ酸配列の文脈における、「同一」または「配列同一性」という用語は、指定された比較域にわたり、最大の照応関係についてアライメントされた場合に同じである、2つの配列内の残基を指す。本明細書で使用される「比較域」とは、少なくとも約20、通例、約50～約200、より通例では、約100～約150の連続する位置によるセグメントであって、その中の配列を、2つの配列を、最適にアライメントした後で、同じ数の、連続する位置による基準配列と比較しうるセグメントを指す。当技術分野では、比較のための配列アライメント法が周知である。比較のための最適な配列アライメントは、Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981) の局所相同性アルゴリズム；Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970) のアライメントアルゴリズム；Pearson and Lipman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:2444 (1988) の類似性検索法；これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装（Intelligentics, Mountain View Calif. による PC/Genie プログラム内の CLUSTAL, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG)、575 Science Dr., Madison, Wis.、U.S.A. における、GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、および TFASTA を含むがこれらに限定されない）により行うことができ、CLUSTAL プログラムについては、 Higgins and Sharp, *Gene*, 73:237-244 (1988) および Higgins and Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989)、Corpet et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:10881-10890 (1988)、Huang et al., *Computer Applications in the Biosciences*, 8:155-165 (1992)、ならびに Pearson et al., *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331 (1994) により十分に記載されている。アライメントはまた、目視および手作業のアライメントにより実施されることも多い。

【0056】

実施形態の1つのクラスでは、本明細書のポリペプチドは、例えば、デフォルトパラメータを使用する、BLASTP（もしくは CLUSTAL、または他の任意の利用可能なアライメントソフトウェア）により測定される通り、基準ポリペプチドまたはこの断片と少なくとも 80%、85%、90%、98% の 99%、または 100% 同一である。同様に、核酸はまた、出発核酸に照らして記載することもでき、例えば、それらは、例えば、デフォルトパラメータを使用する、BLASTN（もしくは CLUSTAL、または他の任意の利用可能なアライメントソフトウェア）により測定される通り、基準核酸またはこの断片と 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、98%、99%、または 100% 同一である。1つの分子が、大型の分子に対して、ある特定の百分率の配列同一性を有するという場合、これは、2つの分子が最適にアライメントされれば、小型の分子内の、前記百分率の残基は、2つの分子が最適にアライメントされた順序に従い、大型の分子内にマッチ残基を見出すことを意味する。

【0057】

核酸配列またはアミノ酸配列に対して適用される「実質的に同一な」という用語は、核酸配列またはアミノ酸配列が、上記で記載したプログラム、例えば、標準的なパラメータを使用する BLAST を使用する基準配列と比較して、少なくとも 90% の配列同一性、またはこれを超える配列同一性、少なくとも 95%、少なくとも 98%、および少なくとも 99% の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。例えば、BLASTN プログラム（ヌクレオチド配列のための）は、デフォルトとして、11 のワード長 (W)、10 の期待値 (E)、M = 5、N = -4、および両方鎖の比較を使用する。アミノ酸配列のために、BLASTP プログラムは、デフォルトとして、3 のワード長 (W)、10 の期待

10

20

30

40

50

値 (E)、および BLOSUM62 スコアリングマトリックスを使用する (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992) を参照されたい)。配列同一性百分率は、2つの最適にアライメントされた配列を、比較域にわたり比較することにより決定し、比較域内のポリヌクレオチド配列の一部は、2つの配列の最適なアライメントのために、基準配列 (付加または欠失を含まない) と比較して、付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含みうる。百分率は、同一な核酸塩基またはアミノ酸残基が、両方の配列内で生じる位置の数を決定して、マッチさせた位置の数を求め、マッチさせた位置の数を、比較域内の位置の総数で除し、結果に、100を乗じて、配列同一性百分率を求めるにより計算する。複数の実施形態では、実質的な同一性は、少なくとも約50残基の長さの配列の領域にわたり、少なくとも約100残基の領域にわたり存在し、複数の実施形態では、配列は、少なくとも約150残基にわたり、実質的に同一である。複数の実施形態では、配列は、コード領域の全長にわたり、実質的に同一である。

【0058】

本明細書で開示されるタンパク質の「機能的変異体」は、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20カ所の保存的アミノ酸置換、またはほぼこれらの数の保存的アミノ酸置換を伴う基準タンパク質のアミノ酸配列を含みうる。「保存的アミノ酸置換」または「保存的突然変異」という語句は、1つのアミノ酸の、共通の特性を伴う、別のアミノ酸による置き換えを指す。個別のアミノ酸の間の共通の特性を規定する、機能的な方式は、相同な生物の、対応するタンパク質の間の、アミノ酸変化の標準化頻度を解析することである (Schulz, G. E. and Schirmer, R. H., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979))。このような解析に従い、群内のアミノ酸が、互いと優先的に交換され、したがって、全体的なタンパク質構造に対するそれらの影響において、最も互いと相似する、アミノ酸群を規定することができる (上述の Schulz, G. E. and Schirmer, R. H.)。保存的突然変異の例は、上記の亜群内のアミノ酸のアミノ酸置換、例えば、陽性電荷を維持しうるような、リシンによる、アルギニンの置換、およびこの逆の置換；陰性電荷を維持しうるような、グルタミン酸による、アスパラギン酸の置換、およびこの逆の置換；遊離-OHを維持しうるような、セリンによる、トレオニンの置換；ならびに遊離-NH₂を維持しうるような、グルタミンによる、アスパラギンの置換を含む。

【0059】

代替的に、または加えて、機能的変異体は、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を伴う、基準タンパク質のアミノ酸配列を含みうる。「非保存的突然変異」は、異なる群の間のアミノ酸置換、例えば、リシンのトリプトファンへの置換、またはフェニルアラニンのセリンへの置換などを伴う。この場合、非保存的アミノ酸置換は、機能的変異体の生物学的活性に干渉したり、これを阻害したりしないことが好ましい。非保存的アミノ酸置換は、機能的変異体の生物学的活性が、親CARと比較して増加するように、機能的変異体の生物学的活性を増強しうる。

【0060】

本明細書で開示されるタンパク質 (これらの機能的部分および機能的変異体を含む) は、1または複数の、天然アミノ酸の代わりに、合成アミノ酸を含みうる。当技術分野では、このような合成アミノ酸が公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、-アミノn-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、trans-3-ヒドロキシプロリンおよびtrans-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、-フェニルセリン-ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、-ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチル-リシン、N',N'-ジベンジル-リシン、6-ヒドロキシリシン、オルニチン、-アミノシクロヘキサンカルボン酸、-アミノシクロヘキサンカルボン酸、-ア

10

20

30

40

50

ミノシクロヘプタンカルボン酸、 - (2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 -ジアミノ酪酸、 -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、および -tert-ブチルグリシンを含む。

【0061】

「CD33」とは、67kDaの1回膜貫通糖タンパク質であり、シアル酸結合性免疫グロブリン様レクチン (Singlecs) スーパーファミリーのメンバーである。CD33は、シアル酸への結合の一因となる、VセットのIg様ドメインと、その細胞外ドメイン内の、C2セットのIg様ドメインとを特徴とする。CD33 mRNAの代替的スプライシングは、図1に示される通り、VセットのIg様ドメインのほか、VセットのIg様ドメインと、C2セットのIg様ドメインとを連結するジスルフィド結合も欠く、短鎖アイソフォーム (CD33m) をもたらす。健常対象では、CD33は主に、通常の複能性骨髓性前駆細胞上、単能性コロニー形成細胞上、単球上、および成熟顆粒球上に見出される、骨髓性分化抗原として発現する。CD33は、80%を超える骨髓性白血病細胞上で発現するが、通常の造血幹細胞上または成熟顆粒球上では発現しない (Andrews, R. et al., The L4F3 antigen is expressed by unipotent and multipotent colony-forming cells but not by their precursors, *Blood*, 68(5):1030-5 (1986))。CD33は、悪性骨髓細胞上、活性化T細胞上、および活性化NK細胞上で発現することが報告されており、AML患者の大多数における芽球の、少なくともサブセット上で見出される (Pollard, J. et al., Correlation of CD33 expression level with disease characteristics and response to gemtuzumab ozogamicin containing chemotherapy in childhood AML, *Blood*, 119(16):3705-11 (2012))。AML芽球上の広範な発現に加えて、CD33は、AMLの基底をなす幹細胞上でも発現しうる。

10

【0062】

「実質的に精製された」という用語は、核酸、ポリペプチド、タンパク質、または他の化合物が、天然では会合する、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、および他の分子を本質的に含まない、すなわち、約50%を超えて含まない、約70%を超えて含まない、約90%を超えて含まない、核酸配列、ポリペプチド、タンパク質または他の化合物を指す。

20

【0063】

本明細書で使用される「コード配列」とは、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのセグメントを指す。領域または配列には、5'末端の近傍では、開始コドンが結合し、3'末端の近傍では、終止コドンが結合する。コード配列はまた、オープンリーディングフレームと称することもできる。

30

【0064】

本明細書で使用される「作動可能に連結された」とは、DNAセグメントの、別のDNAセグメントへの、物理的および/または機能的な連結であって、セグメントが、それらの意図される方式で機能することを可能とするような連結を指す。遺伝子産物をコードするDNA配列は、それが、例えば、プロモーター、エンハンサー、および/またはサイレンサーなどの調節配列に、DNA配列の転写のモジュレーションを、直接的または間接的に可能とする方式で連結されている場合に、調節配列に作動可能に連結されている。例えば、DNA配列は、プロモーターに作動可能に連結されている。それが、プロモーターの転写開始部位に対して、下流において、転写開始部位に対して、適正なリーディングフレーム内で、プロモーターへとライゲーションされている場合、DNA配列を通して、転写の伸長が進行することを可能とする。エンハンサーまたはサイレンサーは、それが、それぞれ、DNA配列の転写を増加または減少させるように、DNA配列へとライゲーションされている場合に、遺伝子産物をコードするDNA配列に作動可能に連結されている。エンハンサーおよびサイレンサーは、DNA配列のコード領域の上流に位置する場合もあり、この下流に位置する場合もあり、この中に埋め込まれている場合もある。シグナル配列が、ポリペプチドの分泌に参与するプレタンパク質として発現する場合、シグナル配列のDNAは、ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結されている。DNA配列の

40

50

、調節配列への連結は、典型的に、適切な制限部位におけるライゲーションにより、または当業者に公知の制限エンドヌクレアーゼを使用して、配列内に挿入された、アダプターまたはリンカーを介して達せられる。

【0065】

「転写調節因子」という用語は、ある特定の環境条件下で、プロモーター駆動性DNA配列の転写を防止もしくは阻害するように作用する生化学的エレメント（例えば、リプレッサータンパク質または核阻害性タンパク質）、または、ある特定の環境条件下で、プロモーター駆動性DNA配列の転写を可能とするか、もしくは刺激するように作用する生化学的エレメント（例えば、インデューサーまたはエンハンサー）を指す。

【0066】

「誘導」という用語は、転写調節因子によりもたらされる、核酸配列の転写、プロモーターの活性、および／またはプロモーターの発現の、何らかの転写基礎レベルと比べた上昇を指す。

【0067】

「プロモーター」とは、コード配列の転写を誘発する、ポリヌクレオチドの領域を指す。プロモーターは、DNAの、同じ鎖上の、遺伝子の転写開始部位の近傍であり、かつ、上流に（センス鎖の5'側領域に向かって）位置する。あるプロモーターが、細胞内の全ての状況において活性があるので、構成的であるのに対し、他のプロモーター、例えば、誘導性プロモーターは、特異的刺激に応答して調節され、活性となる。

【0068】

「プロモーター活性」という用語は、その活性が測定されるプロモーターに作動可能に連結されているヌクレオチド配列の発現の程度を指す。プロモーター活性は、例えば、ノーザンプロット解析により、産生されるRNA転写物の量を決定することにより、直接的に測定することもでき、プロモーターに連結されたレポーター核酸配列など、連結された核酸配列によりコードされる産物の量を決定することにより、間接的に測定することもできる。

【0069】

本明細書で使用される「誘導性プロモーター」とは、転写調節因子、例えば、生物因子または非生物因子の存在または非存在により、活性へと誘導されるプロモーターを指す。誘導性プロモーターは、それらに作動可能に連結した遺伝子の発現が、生物または特に、組織の発生の、ある特定の段階において、オンまたはオフにされうるため、有用である。誘導性プロモーターの例は、アルコール調節性プロモーター、テトラサイクリン調節性プロモーター、ステロイド調節性プロモーター、金属調節性プロモーター、発症機序調節性プロモーター、温度調節性プロモーター、および光調節性プロモーターである。一実施形態では、誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチの一部である。

【0070】

本明細書で使用される「エンハンサー」という用語は、例えば、それが作動可能に連結された核酸配列の転写を増大させるDNA配列を指す。エンハンサーは、核酸配列のコード領域から、何キロベースも離れて位置することが可能であり、調節因子の結合、DNAのメチル化パターン、またはDNA構造の変化を媒介しうる。当技術分野では、様々な異なる供給源に由来する、多数のエンハンサーが周知であり、クローニングされたポリヌクレオチドとして、またはクローニングされたポリヌクレオチド内で利用可能である（例えば、ATCCCなどの寄託先のほか、他の商業的供給源または個人的供給源から）。プロモーター（一般に使用されるCMVプロモーターなど）を含む、多数のポリヌクレオチドはまた、エンハンサー配列も含む。エンハンサーは、コード配列の上流に位置する場合もあり、この中に位置する場合もあり、この下流に位置する場合もある。「Igエンハンサー」という用語は、免疫グロブリン（Ig）遺伝子座内にマップされるエンハンサー領域に由来するエンハンサーエレメント（このようなエンハンサーは、例えば、重鎖（ミュー）5'側エンハンサー、軽鎖（カッパ）5'側エンハンサー、カッパイントロンエンハンサーおよびミューイントロンエンハンサー、ならびに3'側エンハンサーを含む）を指す（一般

10

20

30

40

50

に、Paul W. E. (ed), *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, Raven Press, New York (1993), pages 353-363、および米国特許第5,885,827号明細書を参照されたい)。

【0071】

「発現ベクター」または「ベクター」とは、細胞内のポリヌクレオチドの複製の自律的単位として挙動する（すなわち、それ自身の制御下における複製が可能である）か、または宿主細胞の染色体への挿入により複製が可能となる、任意の遺伝子エレメント、例えば、プラスミド、染色体、ウイルス、トランスポゾンであって、接合させたセグメントの複製および/または発現をもたらすように、それへと、別のポリヌクレオチドセグメントを接合させた遺伝子エレメントである。適切なベクターは、プラスミド、トランスポゾン、バクテリオファージ、およびコスミドを含むがこれらに限定されない。ベクターは、所望の宿主細胞中へのベクターのライゲーションまたは挿入を実施し、接合させたセグメントの発現を実施するのに必要なポリヌクレオチド配列を含有しうる。このような配列は、宿主生物に応じて異なり、転写を実施するプロモーター配列、転写を増加させるエンハンサー配列、リボソーム結合性部位の配列、および転写翻訳終結配列を含む。代替的に、発現ベクターは、ベクターの、宿主細胞のDNA配列へのライゲーションまたは組込みを伴わずに、その中でコードされる核酸配列の産物を、直接発現させることが可能でありうる。

【0072】

ベクターはまた、「選択用マーカー遺伝子」も含みうる。本明細書で使用される「選択用マーカー遺伝子」という用語は、核酸配列を発現する細胞を、対応する選択用薬剤の存在下で、これと順方向または逆方向に、特異的に選択することを可能とする核酸配列を指す。当技術分野では、適切な選択用マーカー遺伝子が公知であり、例えば、国際特許出願公開第1992/08796号パンフレットおよび同第1994/28143号パンフレット、Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567 (1980)、O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527 (1981)、Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072 (1981)、Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1 (1981)、Santerre et al., Gene, 30: 147 (1984)、Kent et al., Science, 237: 901-903 (1987)、Wigler et al., Cell, 11: 223 (1977)、Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026 (1962)、Lowy et al., Cell, 22: 817 (1980)、ならびに米国特許第5,122,464号明細書および同第5,770,359号明細書において記載されている。

【0073】

一部の実施形態では、ベクターは、宿主細胞内で複製することが可能であり、適切な選択的圧の存在下で、宿主細胞内のDNAの染色体外セグメントとして存続する、「エピソーム発現ベクター」または「エピソーム」である（例えば、Conese et al., Gene Therapy, 11:1735-1742 (2004)を参照されたい）。代表的な、市販のエピソーム発現ベクターは、エブスタイン・バー核抗原1 (EBNA1) およびエブスタイン・バーウイルス (EBV) 複製起点 (oriP) を用いるエピソームプラスミドを含むがこれらに限定されない。ベクターである、pREP4、pCEP4、pREP7、ならびにInvitrogen (Carlsbad, Calif.) 製のpcDNA3.1およびStratagene (La Jolla, Calif.) 製のpBK-CMVは、EBNA1およびoriPの代わりに、T抗原およびSV40の複製起点を使用する、エピソームベクターの非限定的な例を表す。

【0074】

「トランスポゾン」または「転移性エレメント」(TE)とは、ゲノム内のその位置を変化させ、場合によって、突然変異を創出または保存し、細胞のゲノムサイズを変更する、ベクターDNA配列である。転移は、TEの重複を結果としてもたらすことが多い。クラスIのTEは、2段階でコピーされる：まず、クラスIのTEは、DNAからRNAへと転写され、次いで、產生されたRNAは、DNAへと逆転写される。次いで、この、コピーされたDNAは、ゲノム内の新たな位置へと挿入される。逆転写ステップは、TE自

10

20

30

40

50

身によりコードされうる、逆転写酵素により触媒される。レトロトランスポゾンの特徴は、HIVなどのレトロウイルスと同様である。クラスIIのTEによるカットアンドペースト転移機構は、RNA中間体を伴わない。転移は、いくつかのトランスポザーゼ酵素により触媒される。あるトランスポザーゼは、DNA内の任意の標的部位に非特異的に結合するのに対し、他のトランスポザーゼは、特異的DNA配列標的に結合する。トランスポザーゼは、標的部位において、互い違いの(staggered)切断をもたらす結果として、5'側または3'側における、一本鎖のDNA突出(粘着(sticky)末端)をもたらす。このステップは、DNAトランスポゾンを切り出し、次いで、DNAトランスポゾンは、新たな標的部位へとライゲーションされるが、この過程は、ギャップを充填するDNAポリメラーゼの活性と、糖リン酸骨格をつなぎ合わせる(close)DNAリガーゼの活性とを伴う。これは、標的部位の重複を結果としてもたらす。DNAトランスポゾンの挿入部位は、標的DNA内の互い違いの切断、およびDNAポリメラーゼによる充填により創出される短い直接的なリピート、ならびにそれらに続く、トランスポザーゼによるTEの切出しに重要な一連の逆位リピートにより同定されうる。細胞周期のS期において、ドナー部位は既に複製されているが、標的部位はまだ複製されていない場合に転移が生じるとカットアンドペーストTEは重複される。転移は、クラスI TEおよびクラスII TEのいずれにおいても、「自律型」または「非自律型」として分類することができる。自律型TEが、それ自身で移動しうるのに対し、非自律型TEは、移動するのに、別のTEの存在を必要とする。これは、非自律型TEが、トランスポザーゼ(クラスIIの場合)または逆転写酵素(クラスIの場合)を欠くためであることが多い。

10

20

【0075】

「トランスポザーゼ」とは、トランスポゾンの末端に結合し、カットアンドペースト機構または複製性転移機構による、トランスポゾンの、ゲノムの別の部分への移動を触媒する酵素を指す。

【0076】

「Sleeping Beauty (SB)トランスポゾン系」とは、DNA配列を、脊椎動物の染色体へと導入するための合成DNAトランスポゾン系を指す。系についての、一部の例示的な実施形態については、例えば、米国特許第6,489,458号明細書、同第8,227,432号明細書、同第9,228,180号明細書および国際公開第2016/145146号パンフレットにおいて記載されている。Sleeping BeautyトランスポザーゼおよびSBトランスポゾン系は、Sleeping Beauty (SB)トランスポザーゼおよびSBトランスポゾンから構成される。複数の実施形態では、Sleeping Beautyトランスポゾン系は、SB11トランスポゾン系、SB100Xトランスポゾン系、またはSB110トランスポゾン系を含みうる。

30

【0077】

本明細書で開示または想定される核酸配列およびベクターは、細胞へと、「トランスフェクション」、「形質転換」、または「形質導入」により導入することができる。本明細書で使用される「トランスフェクション」、「形質転換」、または「形質導入」とは、物理的方法または化学的方法を使用することによる、1または複数の外因性ポリヌクレオチドの、宿主細胞への導入を指す。当技術分野では、多くのトランスフェクション法が公知であり、例えば、リン酸カルシウムDNA共沈殿法(例えば、Murray E. J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Human Press (1991)を参照されたい)；DEAE-デキストラン法；電気穿孔法；カチオン性リポソーム媒介性トランスフェクション法；タングステン粒子促進型遺伝子錠法(Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); and strontium phosphate DNA co-precipitation (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987))を含む。ファージベクターまたはウイルスベクターは、それらの多くが市販されている、適切なパッケージング細胞内で、感染性粒子を増殖させた後で、宿主細胞へと導入することができる。

40

【0078】

本明細書で使用される「T細胞」または「Tリンパ球」とは、細胞媒介性免疫において

50

、中心的な役割を果たす、リンパ球の種類である。「T細胞」または「Tリンパ球」は、細胞表面上のT細胞受容体(TCR)の存在により、B細胞およびナチュラルキラー細胞(NK細胞)など、他のリンパ球と区別されうる。

【0079】

「ヘルパーT細胞」(TH細胞)は、B細胞の、血漿細胞およびメモリーB細胞への成熟、ならびに細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化を含む免疫過程において、他の白血球を支援する。これらの細胞はまた、それらの表面上において、CD4糖タンパク質を発現するため、CD4+T細胞としても公知である。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞(APC)の表面上で発現する、MHCクラスII分子により、ペプチド抗原を提示されると、活性化する。活性化すると、ヘルパーT細胞は、急速に分裂し、活性の免疫応答を調節するか、またはこれらを支援する、サイトカインと呼ばれる、小型のタンパク質を分泌する。これらの細胞は、TH1、TH2、TH3、TH17、Th9、またはTFHを含む、いくつかの亜型であって、異なるサイトカインを分泌して、異なる種類の免疫応答を容易とする、いくつかの亜型のうちの1つへと分化しうる。APCからのシグナル伝達は、T細胞を、特定の亜型へと方向付ける。

10

【0080】

「細胞傷害性T細胞」(TC細胞またはCTL)は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、また、移植片拒絶にも関与している。これらの細胞はまた、それらの表面上において、CD8糖タンパク質を発現するので、CD8+T細胞としても公知である。これらの細胞は、全ての有核細胞の表面上に存在する、MHCクラスI分子と会合する抗原に結合することにより、それらの標的を認識する。調節性T細胞により分泌される、IL-10、アデノシン、および他の分子を介して、CD8+細胞は、アネルギー状態へと不活性される場合があり、これにより、自己免疫疾患を防止する。

20

【0081】

「メモリーT細胞」とは、感染が消失した後で、長期にわたり存続する、抗原特異的T細胞のサブセットである。メモリーT細胞は、それらのコグネイト抗原へと再曝露されると、多数のエフェクターT細胞へと急速に拡大増殖し、これにより、免疫系に、過去の感染に対する「メモリー」をもたらす。メモリーT細胞は、3つの亜型：セントラルメモリーT細胞(TEM細胞)および2種類のエフェクターメモリーT細胞(TEM細胞およびTEMRA細胞)を含む。メモリー細胞は、CD4+細胞の場合もあり、CD8+細胞の場合もある。メモリーT細胞は、典型的に、細胞表面タンパク質である、CD45RO、CD45RA、および/またはCCR7を発現する。

30

【0082】

かつては、サプレッサーT細胞として公知であった、「調節性T細胞」(Treg細胞)は、免疫寛容の維持において役割を果たす。調節性T細胞の主要な役割は、T細胞媒介性免疫を遮断して、免疫反応を終了させ、胸腺内の陰性選択過程を回避した自己反応性T細胞を抑制することである。

【0083】

「ナチュラルキラーT細胞」(NKT細胞：自然免疫系のナチュラルキラー細胞と混同しないものとする)は、獲得免疫系を、自然免疫系と橋渡しする。主要組織適合性複合体(MHC)分子により提示されるペプチド抗原を認識する従来のT細胞と異なり、NKT細胞は、CD1dと呼ばれる分子により提示される糖脂質抗原を認識する。活性化すると、これらの細胞は、Th細胞およびTc細胞の両方に帰せられた機能(すなわち、サイトカインの産生および細胞溶解性/細胞殺滅分子の放出)を果たしうる。NKT細胞はまた、一部の腫瘍細胞およびヘルペスウイルスに感染した細胞を認識し、これらを消失させることも可能である。

40

【0084】

本明細書で使用される「腫瘍抗原」とは、腫瘍細胞内で産生されるかまたは過剰発現する、任意の抗原性物質を指す。腫瘍抗原は、例えば、宿主における免疫応答を誘発しうる。代替的に、本開示の目的では、腫瘍抗原は、健常細胞および腫瘍細胞のいずれもが発現

50

するが、ある特定の腫瘍型を同定するため、適切な治療標的であるタンパク質でありうる。一実施形態では、腫瘍抗原は、骨髓性悪性腫瘍、例えば、急性骨髓性白血病（AML）を処置するためのCAR-T細胞療法の標的である、CD33である。

【0085】

本明細書で使用される「AML」とは、急性骨髓性白血病、急性顆粒球性白血病、および急性非リンパ球性白血病としてもまた公知の、急性骨髓性白血病を指す。AMLは、白血病が発症する細胞型に基づく、8つの異なる亜型を有するため、白血病の他の主要な形態と区別される。したがって、「AML」という用語は、特殊な解析による、骨髓芽球性（M0）、成熟を伴わない骨髓芽球性（M1）、成熟を伴う骨髓芽球性（M2）、前骨髓球性（M3）、骨髓単球性（M4）、単球性（M5）、赤白血病（M6）、および巨核球性（M7）を含む、全ての亜型を指す。本明細書で使用される「AML」はまた、骨髓が、異常な骨髓芽球を作り出すがんである、急性骨髓性白血病も指す。AMLは、成人における急性白血病の、最も一般的な形態である（Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A., *Cancer statistics, 2014, CA Cancer J Clin, 64(1):9-29 (2014)*）。「再発性AML」とは、AMLの寛解期を経験した対象を指す。「難治性AML」とは、その疾患が、初期の標準的な導入療法（例えば、アントラサイクリンおよび／またはシタラビンベースの治療）の第1サイクルに応答しない患者を指す。複数の実施形態では、「難治性AML」とは、その疾患が、標準的な導入療法の、1つもしくは2つまたはこれを超えるサイクルに応答しない患者を指す。

10

【0086】

「養子T細胞移入」とは、腫瘍特異的T細胞の単離およびex vivoにおける拡大増殖であって、ワクチン接種単独または患者の天然の腫瘍応答により得られうる数の細胞より大きな数のT細胞を達成する拡大増殖を指す。次いで、それらの免疫系に、がんに攻撃し、これらを死滅させうるT細胞を介して、残りの腫瘍を圧倒する能力をもたらそうとする試みにおいて、がんを伴う患者へと、腫瘍特異的T細胞を輸注する。がん処置のために、T細胞療法の多くの形態であって、腫瘍浸潤リンパ球またはTILを培養する形態と、1つの特定のT細胞またはクローンを単離および拡大増殖させる形態とが使用されており、なお、腫瘍を強力に認識し、これらに攻撃するように改変されたT細胞を使用する形態も使用されている。

20

【0087】

「抗原認識部分または抗原認識ドメイン」とは、抗原に特異的に結合する分子または分子の部分を指す。一実施形態では、抗原認識部分は、抗体、抗体様分子、またはこれらの断片であり、抗原は、腫瘍抗原である。

30

【0088】

本明細書で使用される「抗体」とは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を指す。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、B細胞の単一のクローニングにより産生され、同じエピトープに結合する抗体を指す。これに対し、「ポリクローナル抗体」とは、異なるB細胞により産生され、同じ抗原の異なるエピトープに結合する抗体の集団を指す。全抗体は、典型的に、4つのポリペプチド：重（H）鎖ポリペプチドの2つの同一なコピー、および軽（L）鎖ポリペプチドの2つの同一なコピーからなる。重鎖の各々は、1つのN末端の可変（VH）領域と、3つのC末端の定常（CH1、CH2、およびCH3）領域とを含有し、各軽鎖は、1つのN末端の可変（VL）領域と、1つのC末端の定常（CL）領域とを含有する。軽鎖および重鎖の各対の可変領域は、抗体の抗原結合性部位を形成する。VH領域と、VL領域とは、各領域が、それらの配列が比較的保存されている、4つのフレームワーク領域を含む、共通の一般的な構造を有する。フレームワーク領域は、3つの相補性決定領域（CDR）により接続されている。CDR1、CDR2、およびCDR3として公知である、3つのCDRは、抗原への結合の一因となる、抗体の「超可変領域」を形成する。

40

【0089】

「抗体様分子」は、例えば、パートナーに選択的に結合することが可能な、Igスーパ

50

ーファミリーのメンバーであるタンパク質でありうる。MHC分子およびT細胞受容体は、このような分子である。一実施形態では、抗体様分子は、TCRである。一実施形態では、TCRは、そのMHCへの結合アフィニティーを増大させるように改変されている。

【0090】

本明細書では、「抗体の断片」、「抗体断片」、「抗体の機能的断片」、および「抗原結合性部分」という用語を、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の、1または複数の断片または部分を意味するように、互換的に使用する（一般に、Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9):1126-1129 (2005)を参照されたい）。抗体断片は、例えば、1もしくは複数のCDR、可変領域（またはこの部分）、定常領域（またはこの部分）、またはこれらの組合せを含むことが所望される。抗体断片の例は、(i) VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、およびCH1ドメインからなる一価断片である、Fab断片；(ii) ストーク領域におけるジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片である、F(ab')2断片；(iii) 抗体の単一のアームのVLドメインおよびVHドメインからなる、Fv断片；(iv) 2つのドメインを、単一のポリペプチド鎖として合成することを可能とする合成リンカーにより接合された、Fv断片の2つのドメイン（すなわち、VLおよびVH）からなる一価分子である、単鎖Fv(scFv)（例えば、Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988); and Osbourn et al., Nat. Biotechnol., 16: 778 (1998)を参照されたい）；ならびに(v) 各ポリペプチド鎖が、同じポリペプチド鎖上のVHとVLとの間の対合を可能とするには短すぎるペプチドリンカーにより、VLへと接続されたVHを含み、これにより、2つの機能的な抗原結合性部位を有する二量体分子を作出するように、異なるVH-VLポリペプチド鎖上の相補的ドメインの間の対合を駆動する、ポリペプチド鎖の二量体である、ダイアボディーを含むがこれらに限定されない。当技術分野では、抗体断片が公知であり、例えば、米国特許出願公開第2009/0093024 A1号明細書において、より詳細に記載されている。

【0091】

「キメラ抗原受容体」はまた、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、キメラ免疫受容体としても公知である。キメラ抗原受容体(CAR)は、任意の特異性を、免疫エフェクター細胞へとグラフトする、改変受容体である。CARは、典型的に、抗原結合性ドメインおよびストーク領域を含む細胞外ドメイン(エクトドメイン)と、膜貫通ドメインと、細胞内ドメイン(エンドドメイン)とを有する。

【0092】

「スペーサー」領域または「ヒンジ」領域という用語を包含する「ストーク」領域を、抗原結合性ドメインを、膜貫通ドメインと連関させるのに使用する。本明細書で使用される「ストークドメイン」という用語は、一般に、ポリペプチド鎖内で、膜貫通ドメインを、細胞外ドメインまたは細胞質ドメインと連結するように機能する、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。複数の実施形態では、ストークドメインは、抗原結合性ドメインが、異なる方向を向いて、抗原認識を容易とすることを可能とするのに十分な程度に可撓性である。一実施形態では、ストークドメインは、IgG1に由来するヒンジ領域である。代替物は、免疫グロブリンのCH2CH3領域と、CD3の一部とを含むがこれらに限定されない。ある実施形態では、ストーク領域は、CD8アルファヒンジ(配列番号22)である。CARに関して使用される場合の「機能的部分」という用語は、本明細書で記載されるCARの、任意の部分または断片であって、機能的部分がその一部であるCAR(親CAR)の生物学的活性を保持する部分または断片を指す。親CARをコードする核酸配列に関して、CARの機能的部分をコードする核酸配列は、親CARのうちの、例えば、約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%、またはこれを超える親CARを含むタンパク質をコードしうる。

【0093】

本明細書で使用される「機能的変異体」という用語は、基準ポリペプチドに対する、実質的または著明な配列同一性または配列類似性を有するポリペプチドまたはタンパク質を

10

20

30

40

50

指し、それがその変異体である、基準ポリペプチドの生物学的活性を保持する。機能的変異体は、例えば、本明細書で記載されるCAR(親CAR)の変異体であって、標的細胞を、親CARと同様の程度、これと同程度、またはこれより高い程度に認識する能力を保持する変異体を包含する。親CARをコードする核酸配列に照らして、CARの機能的変異体をコードする核酸配列は、親CARをコードする核酸配列と、例えば、約10%同一、約25%同一、約30%同一、約50%同一、約65%同一、約70%同一、約75%同一、約80%同一、約85%同一、約90%同一、約95%同一、または約99%同一でありうる。

【0094】

本明細書で使用される「誘導性プロモーター」とは、転写調節因子、例えば、生物因子または非生物因子の存在または非存在により、活性へと誘導されるプロモーターを指す。誘導性プロモーターは、それらに作動可能に連結した遺伝子の発現が、生物または特に、組織の発生の、ある特定の段階において、オンまたはオフにされうるため、有用である。誘導性プロモーターの例は、アルコール調節性プロモーター、テトラサイクリン調節性プロモーター、ステロイド調節性プロモーター、金属調節性プロモーター、発症機序調節性プロモーター、温度調節性プロモーター、および光調節性プロモーターである。誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチの一部でありうる。誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチリガンドの誘導性プロモーターでありうる。場合によって、誘導性プロモーターは、REOSWITCH(登録商標)遺伝子スイッチなど、低分子リガンド誘導性の、2つのポリペプチドによる、エクジソン受容体ベースの遺伝子スイッチでありうる。場合によって、遺伝子スイッチは、限定せずに述べると、それらの各々が、参照によりそれらの全体において組み込まれる、PCT/米国出願第2001/009050号明細書(国際公開第2001/070816号パンフレット)、米国特許第7,091,038号明細書、同第7,776,587号明細書、同第7,807,417号明細書、同第8,202,718号明細書、PCT/米国出願第2001/030608号明細書(国際公開第2002/029075号パンフレット)、米国特許第8,105,825号明細書、同第8,168,426号明細書;PCT/1J52002/005235号明細書(国際公開第2002/066613号パンフレット)、米国出願第10/468,200号明細書(米国公開第20120167239号パンフレット)、PCT/米国出願第2002/005706号明細書(国際公開第2002/066614号パンフレット)、米国特許第7,531,326号明細書、同第8,236,556号明細書、同第8,598,409号明細書、PCT/U52002/005090号明細書(国際公開第2002/066612号パンフレット)、米国特許第8,715,959号明細書(米国公開第20060100416号パンフレット)、PCT/米国出願第2002/005234号明細書(国際公開第2003/027266号パンフレット)、米国特許第7,601,508号明細書、同第7,829,676号明細書、同第7,919,269号明細書、同第8,030,067号明細書、PCT/U52002/005708号明細書(国際公開第2002/066615号パンフレット)、米国出願第10/468,192号明細書(米国公開第20110212528号パンフレット)、PCT/米国出願第2002/005026号明細書(国際公開第2003/027289号パンフレット)、米国特許第7,563,879号明細書、同第8,021,878号明細書、同第8,497,093号明細書、PCT/米国出願第2005/015089号明細書(国際公開第2005/108617号パンフレット)、米国特許第7,935,510号明細書、同第8,076,454号明細書、PCT/U52008/011270号明細書(国際公開第2009/045370号パンフレット)、米国出願第12/241,018号明細書(米国公開第20090136465号パンフレット)、PCT/米国出願第2008/011563号明細書(国際公開第2009/048560号パンフレット)、米国出願第12/247,738号明細書(米国公開第20090123441号パンフレット)、PCT/米国出願第2009/005510号明細書(国際公開第2010/042189号パンフレット)、米国出願第13/123,129号明細書(米国公開第20110

10

20

30

40

50

268766号パンフレット)、PCT/米国出願第2011/029682号明細書(国際公開第2011/119773号パンフレット)、米国出願第13/636,473号明細書(米国公開第20130195800号パンフレット)、PCT/米国出願第2012/027515号明細書(国際公開第2012/122025号パンフレット)、および米国特許第9,402,919号明細書において記載されている系のうちのいずれかを含む、エクジソンベースの受容体の構成要素から選択することができる。

【0095】

本明細書で言及される「増殖性疾患」とは、細胞の過剰な増殖および細胞内マトリックスの過剰な代謝回転が、がんを含むいくつかの疾患の発症機序に著明に寄与する、という統一的概念が提示されていることを意味する。

10

【0096】

本明細書で使用される「患者」とは、がんなどの増殖性障害を伴うか、またはこれを有するかもしくは発症することが疑われる診断された哺乳動物対象を指す。一部の実施形態では、「患者」という用語は、がんなどの増殖性障害を発症する可能性が平均より高い哺乳動物対象を指す。例示的な患者は、ヒト、類人猿、イヌ、ブタ、ウシ、ネコ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、齧歯動物、および本明細書で開示される療法から利益を得うる、他の哺乳動物でありうる。例示的なヒト患者は、男性および/または女性でありうる。

【0097】

本明細書では、「～を投与すること」とは、本明細書で記載される、1または複数の組成物を、患者または対象に施すことを指す。例を目的として、限定せずに述べると、組成物の投与、例えば、注射は、静脈内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹腔内(i.p.)注射、または筋内(i.m.)注射により実施することができる。1または複数のこのように経路を利用することができる。非経口投与は、例えば、ボーラス注射による場合もあり、時間経過にわたる、漸次的な灌流による場合もある。代替的に、または共時的に、投与は、経口経路による投与でありうる。加えて、投与はまた、ボーラスまたは細胞ペレットのデボ手術による場合もあり、医療用デバイスの設置による場合もある。

20

【0098】

本明細書では、「それを必要とする患者」または「それを必要とする対象」とは、がんなどの増殖性障害を伴うか、またはこれを有することが疑われる診断された患者を指す。一実施形態では、患者は、急性リンパ球性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、および慢性骨髓性白血病(CML)などであるがこれらに限定されない白血病を有するか、またはこれらを発症する可能性がある。

30

【0099】

ある実施形態では、本明細書で記載される組成物は、本明細書で記載される核酸配列を発現する変異細胞もしくは宿主細胞、または本明細書で記載される、少なくとも1つの核酸配列を含むベクターを、増殖性障害を処置または防止するのに有効な量で含みうる。本明細書で使用される「処置」、「～を処置すること」などの用語は、所望の薬理学的効果および/または生理学的効果を得ることを指す。複数の実施形態では、効果は、治療的である、すなわち、効果は、疾患および/または疾患に帰せられうる有害症状を、部分的または完全に治癒させる。この目的で、本発明の方法は、本発明の核酸配列、または本発明の核酸配列を含むベクターを発現する宿主細胞を含む、「治療有効量」の組成物を投与するステップを含む。

40

【0100】

「治療有効量」とは、所望の治療結果を達成するのに必要な投与量において、必要な期間にわたり有効な量を指す。治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに1または複数の対象において所望の応答を誘発する、本明細書で記載される組成物の能力などの因子に従い変動しうる。

【0101】

代替的に、薬理学的効果および/または生理学的効果は、「予防的」な場合もある、す

50

なわち、効果は、疾患またはその症状を、完全に、または部分的に予防する。

【0102】

「予防有効量」とは、所望の予防結果（例えば、疾患の発症の防止）を達成するのに必要な投与量において、必要な期間にわたり有効な量を指す。

【0103】

キメラ抗原受容体

本明細書で記載される複数の実施形態では、CARは、標的認識のために、抗体由来の細胞外単鎖可変ドメイン（scFv）を含むことが可能であり、scFvは、可撓性リンカーにより、膜貫通ドメインおよび/またはT細胞活性化のための、例えば、CD3を含む、細胞内シグナル伝達ドメインへと接続されうる。通常、in vivoにおいて、T細胞を活性化させうる場合、T細胞は、抗原誘導性の一次TCRシグナルを、サイトカイン（すなわち、IL-2およびIL-21）の産生を誘導する、CD28に由来する二次共刺激シグナル伝達と共に受け取り、次いで、これらを、自己分泌/傍分泌の形で、シグナル伝達ループへとフィードバックする。これを念頭に置くと、CARは、シグナル伝達ドメイン、例えば、CD28細胞質シグナル伝達ドメイン、または4-1BBシグナル伝達ドメインなど、他の共刺激分子によるシグナル伝達ドメインを含みうる。キメラCD28による共刺激は、抗アポトーシス分子の上方調節およびIL-2の産生のほか、末梢血単核細胞（PBMC）に由来するT細胞を拡大増殖させることにより、T細胞の存続を改善する。

10

【0104】

一実施形態では、CARは、例えば、膜貫通ドメインおよびCD3ゼータのエンドドメインへと融合させた、腫瘍関連抗原であるCD33に特異的なモノクローナル抗体に由来する、単鎖可変断片（scFv）の融合体である。このような分子は、scFvによる、その標的の認識に応答した、ゼータシグナルの伝達を結果としてもたらす。

20

【0105】

ある実施形態では、CARは、エクトドメイン（細胞外）、膜貫通ドメイン、およびエンドドメイン（細胞内）を有しうる。CARエクトドメインについての一実施形態では、シグナルペプチドは、新生タンパク質を、小胞体へと方向付ける。これは、例えば、受容体がグリコシル化され、細胞膜内にアンカリングされた場合である。任意の真核シグナルペプチド配列は、機能的であることが想定されている。一般に、天然において、アミノ最末端の構成要素へと接合しているシグナルペプチドを使用する（例えば、軽鎖-リンカー-重鎖の方向を伴うscFvでは、軽鎖の天然シグナルを使用する）。複数の実施形態では、シグナルペプチドは、GM-CSFRa（配列番号16）またはIgK（配列番号34）である。使用されうる、他のシグナルペプチドは、CD8アルファおよびCD28に由来するシグナルペプチドを含む。

30

【0106】

抗原認識ドメインは、scFvでありうる。しかし、代替物も存在しうる。天然のT細胞受容体（TCR）アルファおよびベータの単鎖に由来する抗原認識ドメインは、単純なエクトドメイン（例えば、HIV感染細胞を認識する、CD4エクトドメイン）のほか、連結された、例えば、サイトカイン（サイトカイン受容体を保有する細胞の認識をもたらす）など、他の認識構成要素を有するので、想定される。例えば、腫瘍関連抗原など、所与の標的に、高アフィニティーで結合する、ほぼ任意のものを、抗原認識領域として使用することができる。

40

【0107】

一般に、CARは、二量体化形態で存在し、細胞外scFv（VLへと連結されたVH）領域、ストークドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達モチーフを連結する融合タンパク質として発現する。第1世代のCARのエンドドメインは、T細胞の活性化を、CD3によるシグナル伝達だけを介して誘導する。第2世代のCARは、CD3およびCD28、または4-1BBもしくはOX40など、他のエンドドメインを介する活性化シグナル伝達をもたらす。第3世代のCARは、CD28、4-1BB、また

50

は O X 4 0 など、3 つのシグナル伝達モチーフの、C D 3 を含有する組合せを介して、T 細胞活性化させる。

【 0 1 0 8 】

複数の実施形態では、本発明は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラ抗原受容体 (C A R) を提供する。複数の実施形態では、細胞外ドメインは、そうでなければ、抗原結合性部分または s c F v と称する、標的特異的結合エレメントと、ストークドメインとを含む。複数の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメイン、または、そうでなければ、細胞質シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達領域およびゼータ鎖部分を含む。

【 0 1 0 9 】

共刺激シグナル伝達領域は、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、C A R の部分を指す。共刺激分子は、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子であって、リンパ球の、抗原に対する、効率的な応答に必要とされる表面分子である。

【 0 1 1 0 】

複数の実施形態では、C A R の細胞外ドメインと、膜貫通ドメインとの間に、ストークドメインが組み込まれる。本明細書で使用される「ストークドメイン」という用語は、一般に、膜貫通ドメインを、s c F v、またはポリペプチド鎖内の細胞質ドメインへと連結するように機能する、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。ストークドメインは、F c ヒンジなどの可撓性ヒンジと、任意選択で、F c の、1 つまたは 2 つの定常ドメインとを含みうる。場合によって、ストーク領域は、I g G 1 に由来するヒンジ領域を含む。代替的な場合に、ストーク領域は、免疫グロブリンのC H 2 C H 3 領域と、任意選択で、C D 3 の一部とを含む。場合によって、ストーク領域は、国際公開第 2 0 1 6 / 0 7 3 7 5 5 号パンフレットにおいて記載されている、C D 8 ヒンジ領域、I g G 4 - F c の 1 2 アミノ酸のヒンジ領域 (E S K Y G P P C P P C P) (配列番号 6 2)、または I g G 4 ヒンジ領域を含む。

【 0 1 1 1 】

膜貫通ドメインは、天然供給源に由来する場合もあり、組換え供給源に由来する場合もある。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合性タンパク質または膜貫通タンパク質に由来しうる。適切な膜貫通ドメインは、T 細胞受容体の、アルファ鎖、ベータ鎖、またはゼータ鎖の膜貫通領域を含む場合もあり、C D 2 8 、C D 3 イプシロン、C D 3 、C D 4 5 、C D 4 、C D 5 、C D 8 アルファ、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 、または C D 1 5 4 に由来する膜貫通領域を含む場合もある。代替的に、膜貫通ドメインは、合成の場合もあり、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含みうる。一部の実施形態では、合成膜貫通ドメインの、一方または両方の末端では、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが見出される。任意選択で、一部の実施形態では、2 ~ 1 0 アミノ酸の間の長さである、短いオリゴヌクレオチドリンカーまたはポリペプチドリンカーは、C A R の膜貫通ドメインと、細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成しうる。一部の実施形態では、リンカーは、グリシン - セリンリンカーである。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8 膜貫通ドメインまたは C D 3 膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8 膜貫通ドメインを含む。他の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 3 膜貫通ドメインを含む。

【 0 1 1 2 】

細胞内ドメインは、1 または複数の共刺激ドメインを含みうる。例示的な共刺激ドメインは、C D 8 、C D 2 7 、C D 2 8 、4 - 1 B B (C D 1 3 7) 、I C O S 、D A P 1 0 、D A P 1 2 、O X 4 0 (C D 1 3 4) 、C D 3 ゼータ、またはこれらの断片もしくは組合せを含むがこれらに限定されない。場合によって、本明細書で記載されるC A R は、C D 8 、C D 2 7 、C D 2 8 、4 - 1 B B (C D 1 3 7) 、I C O S 、D A P 1 0 、D A P 1 2 、O X 4 0 (C D 1 3 4) 、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される共刺激ドメインのうちの 1 もしくは複数、または 2 つもしくはこれを超えるものを含む。場合

10

20

30

40

50

によって、本明細書で記載される C A R は、 C D 2 7 、 C D 2 8 、 4 - 1 B B (C D 1 3 7) 、 I C O S 、 O X 4 0 (C D 1 3 4) 、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される共刺激ドメインのうちの 1 もしくは複数、または 2 つもしくはこれを超えるものを含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、 C D 8 、 C D 2 8 、 4 - 1 B B (C D 1 3 7) 、 D A P 1 0 、 D A P 1 2 、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される共刺激ドメインのうちの 1 もしくは複数、または 2 つもしくはこれを超えるものを含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、 C D 2 8 、 4 - 1 B B (C D 1 3 7) 、またはこれらの断片もしくは組合せから選択される共刺激ドメインのうちの 1 もしくは複数、または 2 つもしくはこれを超えるものを含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、 C D 2 8 および 4 - 1 B B (C D 1 3 7) 、またはこれらのそれぞれの断片を含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、共刺激ドメインである C D 2 8 および O X 4 0 (C D 1 3 4) 、またはこれらのそれぞれの断片を含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、共刺激ドメインである C D 8 および C D 2 8 、またはこれらのそれぞれの断片を含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、共刺激ドメインである C D 2 8 、またはこの断片を含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、共刺激ドメインである 4 - 1 B B (C D 1 3 7) 、またはこの断片を含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、共刺激ドメインである O X 4 0 (C D 1 3 4) 、またはこの断片を含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、共刺激ドメインである C D 8 、またはこの断片を含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、少なくとも 1 つの共刺激ドメインである D A P 1 0 、またはこの断片を含む。場合によって、本明細書で記載される C A R は、少なくとも 1 つの共刺激ドメインである D A P 1 2 、またはこの断片を含む。

【 0 1 1 3 】

本開示の C A R の、細胞質ドメインとしてもまた公知の、細胞内シグナル伝達ドメインは、 C A R を入れた免疫細胞の、通常のエフェクター機能のうちの少なくとも 1 つの活性化の一因となる。「エフェクター機能」という用語は、特化された細胞の機能を指す。T 細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性の場合もあり、サイトカインの分泌を含む、ヘルパー活性の場合もある。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、特化された機能を果たすように細胞を方向付ける、タンパク質の部分を指す。通例、細胞内シグナル伝達ドメインの全体を利用するが、多くの場合、鎖の全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分を使用し、それが、エフェクター機能シグナルを伝達する限りにおいて、このような切断部分を、完全鎖の代わりに使用することができる。したがって、細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの、任意の切断部分を含むことを意図する。一部の実施形態では、細胞内ドメインは、 T 細胞活性化のためのシグナル伝達ドメインをさらに含む。場合によって、 T 細胞活性化のためのシグナル伝達ドメインは、 T C R ゼータ、 F c R ガンマ、 F c R ベータ、 C D 3 ガンマ、 C D 3 デルタ、 C D 3 イプシロン、 C D 5 、 C D 2 2 、 C D 7 9 a 、 C D 7 9 b 、または C D 6 6 d に由来するドメインを含む。場合によって、 T 細胞活性化のためのシグナル伝達ドメインは、 C D 3 に由来するドメインを含む。

【 0 1 1 4 】

本明細書の複数の実施形態では、キメラ抗原受容体 (C A R) をコードする単離核酸であって、 C A R が、 (a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、 (b) ストークドメイン、 (c) 膜貫通ドメイン、 (d) 4 - 1 B B もしくは C D 2 8 、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、 (e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメイン、任意選択で、 (f) 切断型上皮増殖因子受容体 (H E R 1 t または H E R 1 t - 1) を含む、単離核酸が提示される。

【 0 1 1 5 】

本発明の範囲には、本明細書で記載される C A R の機能的部分をコードする核酸配列が含まれる。機能的部分は、例えば、標的細胞を認識するか、または疾患を検出、処置、も

10

20

30

40

50

しくは予防する能力を、親CARと同様の程度、これと同程度、またはこれより高い程度に保持するCARの部分を包含する。

【0116】

複数の実施形態では、CARは、部分のアミノ末端もしくはカルボキシ末端、または両方の末端におけるさらなるアミノ酸であって、親CARのアミノ酸配列内では見出されない、さらなるアミノ酸を含有する。さらなるアミノ酸は、機能的部分の生物学的機能であって、例えば、標的細胞を認識するか、がんを検出するか、がんを処置または防止するなどの生物学的機能に干渉しないことが所望される。さらなるアミノ酸が、CARの生物学的活性を、親CARの生物学的活性と比較して増強することが、より所望される。

【0117】

本明細書で使用される「機能的変異体」という用語は、本発明の核酸配列によりコードされるCARに対する、実質的または著明な配列同一性または配列類似性を有するCAR、ポリペプチド、またはタンパク質を指し、この機能的変異体は、それがその変異体である、CARの生物学的活性を保持する。機能的変異体は、例えば、本明細書で記載されるCAR(親CAR)の変異体であって、標的細胞を、親CARと同様の程度、これと同程度、またはこれより高い程度に認識する能力を保持する変異体を包含する。親CARをコードする核酸配列に照らして、CARの機能的変異体をコードする核酸配列は、親CARをコードする核酸配列と、例えば、約10%同一、約25%同一、約30%同一、約50%同一、約65%同一、約80%同一、約90%同一、約95%同一、または約99%同一である。

10

【0118】

本明細書で記載されるCAR(機能的部分、およびこれらの機能的変異体を含む)は、例えば、ジスルフィド架橋を介して、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、エステル化、N-アシル化、環化されたCAR、あるいは酸添加塩へと転換されたCAR、および/または、任意選択で、二量体化もしくは重合化されたCAR、またはコンジュゲートさせたCARを含む。

20

【0119】

抗原結合性部分

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、そうでなければ、抗原結合性部分と称する、標的特異的結合エレメントを含む。複数の実施形態では、腫瘍細胞上の抗原に特異的に結合する、所望の抗原結合性部分を変更することにより、目的の腫瘍抗原をターゲティングするように、本明細書で記載されるCARを変更する。本発明の文脈では、「腫瘍抗原」または「過剰増殖性障害抗原」または「過剰増殖性障害と関連する抗原」とは、がんなど、特異的な過剰増殖性障害に共通する抗原を指す。

30

【0120】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARの抗原結合性部分は、CD33に特異的(CD33-CAR)である。CD33特異的CARは、細胞表面上で発現すると、T細胞の特異性を、ヒトCD33へとリダイレクトする。複数の実施形態では、抗原結合性ドメインは、標的抗原特異的な、抗CD33モノクローナル抗体の、可変ドメイン軽鎖(VL)および可変ドメイン重鎖(VH)であって、グリシン-セリンリンカーまたはホイットローリンカーなどの可撓性リンカーにより接続された、VLおよびVHを含む単鎖抗体断片(scFv)を含む。複数の実施形態では、scFvは、M195、m2H12、DRB2、および/またはM9-6である。複数の実施形態では、scFvは、ヒト化scFv、例えば、hM195である。一部の実施形態では、抗原結合性部分は、例えば、N末端からC末端へと、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VHと、指向的に連結されたVHおよびVLを含みうる。

40

【0121】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号1のアミノ酸配列(hM195 VL)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するVLポリペプチドを

50

含む抗原結合性部分を含む。

【0122】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号3のアミノ酸配列(hM195 VH)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するVHポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

【0123】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、Gly-Serリンカー(配列番号6)またはリンカーの機能的な変異体を伴う、ヒト化抗CD33 mAbのクローニングであるhM195の抗原結合性部分のVL(配列番号1)およびVH(配列番号3)を含む。

10

【0124】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号8のアミノ酸配列(hM195 VH、VL、およびリンカー)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

【0125】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号9のアミノ酸配列(M2H12 VH)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するVHポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

20

【0126】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号10のアミノ酸配列(M2H12 VL)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するVLポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

【0127】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号11のアミノ酸配列(DRB2 VH)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するVHポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

30

【0128】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号12のアミノ酸配列(DRB2 VL)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するVLポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

【0129】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号13のアミノ酸配列(My9-6 VH)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するVHポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

40

【0130】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARは、配列番号14のアミノ酸配列(My9-6 VL)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するVLポリペプチドを含む抗原結合性部分を含む。

【0131】

複数の実施形態では、抗原結合性部分は、配列番号16のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するGM-CSFR α シグナルペプチドを有する。

50

【0132】

ストークドメイン

複数の実施形態では、本発明の C D 3 3 C A R は、抗原結合性部分と、T 細胞膜との分離をもたらすストークドメインを含む。複数の実施形態では、ストークドメインは、エフェクター - 標的間の最適な膜間距離を確立する。複数の実施形態では、ストークドメインは、抗原結合性ドメインが、その標的に到達するための可撓性をもたらす。一実施形態では、ストークドメインは、C D 8 アルファヒンジドメインである。

【0133】

複数の実施形態では、C D 8 アルファヒンジドメインは、配列番号 2 2 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む。 10

【0134】

膜貫通ドメイン

複数の実施形態では、C A R は、C A R ストークドメインの細胞外ドメインへと融合させた膜貫通ドメインを含む。一実施形態では、天然において、C A R 内のドメインのうちの 1 つと会合する膜貫通ドメインを使用する。複数の実施形態では、膜貫通ドメインは、膜を貫通する、疎水性のアルファヘリックスである。

【0135】

膜貫通ドメインは、天然供給源に由来する場合もあり、合成供給源に由来する場合もある。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合性タンパク質または膜貫通タンパク質に由来しうる。本発明で特に使用される膜貫通領域は、T 細胞受容体の、アルファ鎖、ベータ鎖、またはゼータ鎖、C D 2 8、C D 3 イプシロン、C D 3 、C D 4 5、C D 4 、C D 5 、C D 8 アルファ、C D 9 、C D 1 6 、C D 2 2 、C D 3 3 、C D 3 7 、C D 6 4 、C D 8 0 、C D 8 6 、C D 1 3 4 、C D 1 3 7 、C D 1 5 4 に由来しうる（すなわち、これらの、少なくとも膜貫通領域を含む）。代替的に、膜貫通ドメインは、合成の場合もあり、この場合、膜貫通ドメインは、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含むであろう。複数の実施形態では、合成膜貫通ドメインの各末端では、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが見出されるであろう。任意選択で、複数の実施形態では、2 ~ 1 0 アミノ酸の間の長さである、短いオリゴヌクレオチドリンカーまたはポリペプチドリンカーは、C A R の膜貫通ドメインと、細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成しうる。複数の実施形態では、リンカーは、グリシン - セリンリンカーである。 20 30

【0136】

複数の実施形態では、本明細書で記載される C A R 内の膜貫通ドメインは、C D 8 アルファ膜貫通ドメインである。複数の実施形態では、C D 8 アルファ膜貫通ドメインは、配列番号 1 8 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む。

【0137】

複数の実施形態では、本明細書で記載される C A R 内の膜貫通ドメインは、C D 2 8 膜貫通ドメインである。複数の実施形態では、C D 2 8 膜貫通ドメインは、配列番号 2 0 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む。 40

【0138】

細胞質ドメイン（共刺激ドメインおよびシグナル伝達ドメイン）

本明細書で記載される C A R の、細胞内シグナル伝達ドメインとしてもまた公知の、細胞質ドメインは、C A R を入れた免疫細胞の、通常のエフェクター機能のうちの少なくとも 1 つの活性化の一因となる。「エフェクター機能」という用語は、特化された細胞の機能を指す。T 細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性の場合もあり、サイトカインの分泌を含む、ヘルパー活性の場合もある。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメ 50

イン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、特化された機能を果たすように細胞を方向付ける、タンパク質の部分を指す。通例、細胞内シグナル伝達ドメインの全体を利用しうるが、多くの場合、鎖の全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分を使用し、それが、エフェクター機能シグナルを伝達する限りにおいて、このような切断部分を、完全鎖の代わりに使用することができる。したがって、細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの、任意の切断部分を含むことを意図する。

【 0 1 3 9 】

本明細書で記載される C A R における使用のための細胞内シグナル伝達ドメインの例は、抗原受容体の結合の後において、協同して、シグナル伝達を誘発するように作用する、T 細胞受容体 (T C R) の細胞質配列および共受容体のほか、これらの配列の、任意の誘導体または変異体、および同じ機能的な能力を有する、任意の合成配列を含みうる。

10

【 0 1 4 0 】

T C R 単独を介して発生したシグナルは一般に、T 細胞の完全な活性化には不十分であり、二次シグナルまたは共刺激シグナルもまた、必要とされる。したがって、T 細胞の活性化は、2 つの別個のクラスの細胞質シグナル伝達配列：T C R を介して抗原依存性一次活性化を誘発する、細胞質シグナル伝達配列 (一次細胞質シグナル伝達配列) と、抗原非依存的な形で、二次シグナルまたは共刺激シグナルをもたらすように作用する、細胞質シグナル伝達配列 (二次細胞質シグナル伝達配列) とにより媒介されると言ふことができる。

20

【 0 1 4 1 】

一次細胞質シグナル伝達配列は、T C R 複合体の一次活性化を、刺激的または阻害的に調節する。刺激的に作用する、一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシンペースの活性化モチーフまたは I T A M として公知のシグナル伝達モチーフを含有しうる。

【 0 1 4 2 】

本発明において特に使用される、I T A M 含有初代細胞質シグナル伝達配列の例は、T C R ゼータ、F c R ガンマ、F c R ベータ、C D 3 ガンマ、C D 3 デルタ、C D 3 イプシロン、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、および C D 6 6 d に由来する初代細胞質シグナル伝達配列を含む。複数の実施形態では、本明細書で記載される C A R 内の細胞質シグナル伝達分子は、C D 3 ゼータに由来する細胞質シグナル伝達配列を含む。

【 0 1 4 3 】

複数の実施形態では、C A R の細胞質ドメインは、それ自体で、または本明細書で記載される C A R の文脈において有用な、他の任意の所望される細胞質ドメインと組み合わせて、C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含むようにデザインすることができる。例えば、C A R の細胞質ドメインは、C D 3 ゼータ鎖部分と、共刺激シグナル伝達領域とを含みうる。共刺激シグナル伝達領域は、共刺激分子の細胞内ドメインを含む、C A R の部分を指す。共刺激分子とは、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子であって、リンパ球の、抗原に対する、効率的な応答に必要とされる細胞表面分子である。このような分子の例は、C D 2 7、C D 2 8、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、O X 4 0、C D 3 0、C D 4 0、P D - 1、I C O S、リンパ球機能関連抗原 1 (L F A - 1)、C D 2、C D 7、L I G H T、N K G 2 C、B 7 - H 3、および C D 8 3 に特異的に結合するリガンドなどを含む。複数の実施形態では、共刺激分子を、例えば、C D 2 8 と 4 - 1 B B とを併せて使用することもでき、C D 2 8 と O X 4 0 とを併せて使用することもできる。したがって、本発明を、共刺激シグナル伝達エレメントとしての 4 - 1 B B および C D 2 8 と共に例示するが、他の共刺激エレメントも、本発明の範囲内にある。

30

【 0 1 4 4 】

本明細書で記載される C A R の、細胞質シグナル伝達部分内の、細胞質シグナル伝達配列は、互いと、ランダムな順序で連結することもでき、指定された順序で連結することもできる。任意選択で、複数の実施形態では、2 ~ 1 0 アミノ酸の間の長さである、短いオリゴヌクレオチドリンカーまたはポリペプチドリンカーは、連結を形成しうる。グリシン - セリンのダブレットは、特に、適切なリンカーをもたらす。

40

50

【 0 1 4 5 】

一実施形態では、細胞質ドメインは、C D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインおよびC D 2 8 のシグナル伝達ドメインを含む。別の実施形態では、細胞質ドメインは、C D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインおよび4 - 1 B B のシグナル伝達ドメインを含む。さらに別の実施形態では、細胞質ドメインは、C D 3 ゼータのシグナル伝達ドメイン、ならびにC D 2 8 および4 - 1 B B のシグナル伝達ドメインを含む。

【 0 1 4 6 】

一実施形態では、本明細書で記載されるC A R内の細胞質ドメインは、4 - 1 B B のシグナル伝達ドメインおよびC D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインを含み、この場合、4 - 1 B B のシグナル伝達ドメインは、配列番号2 4 のポリペプチド配列との、少なくとも9 10 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または1 0 0 %の同一性を有するポリペプチド配列を含み、C D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号2 6 の核酸配列との、少なくとも9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または1 0 0 %の同一性を有するポリペプチド配列を含む。

10

【 0 1 4 7 】

一実施形態では、本明細書で記載されるC A R内の細胞質ドメインを、C D 2 8 のシグナル伝達ドメインおよびC D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインを含むようにデザインするが、この場合、C D 2 8 のシグナル伝達ドメインは、配列番号2 8 のポリペプチド配列との、少なくとも9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または1 0 0 %の同一性を有するポリペプチド配列を含み、C D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号2 6 のポリペプチド配列との、少なくとも9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または1 0 0 %の同一性を有するポリペプチド配列を含む。

20

【 0 1 4 8 】

一実施形態では、本明細書で記載されるC A R内の細胞質ドメインは、4 - 1 B B のシグナル伝達ドメインおよびC D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインを含み、4 - 1 B B のシグナル伝達ドメインは、配列番号2 4 に明示されたアミノ酸配列を含み、C D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号2 6 に明示されたアミノ酸配列を含む。

30

【 0 1 4 9 】**さらなる遺伝子エレメント**

細胞療法は、ヒト疾患の処置に向けて、大きな将来性を有するが、細胞自体またはそれらのトランス遺伝子産物に由来する著明な毒性は、臨床的探索を妨げてきた。本明細書で記載される複数の実施形態では、本明細書で記載されるC A Rを含む免疫エフェクター細胞であって、哺乳動物対象、例えば、ヒトへと輸注された免疫エフェクター細胞は、それらの使用から傷害作用が生じた場合、このような免疫エフェクター細胞の作用を調節するために、除去することができる。したがって、ある特定の実施形態では、本明細書で記載される治療剤である、C D 3 3 特異的キメラ抗原受容体に加えてまた、第2の遺伝子も、本明細書で記載される改変免疫エフェクター細胞へと導入することができる。第2の遺伝子は、事実上、C D 3 3 C A R含有細胞の枯渇を可能とする「キルスイッチ」である。ある特定の実施形態では、「キルスイッチ」とは、少なくともH E R 1 もしくはC D 2 0 の抗体結合エピトープ、またはこれらの機能的断片を含み、任意選択で、シグナルポリペプチド配列またはこの断片を含むH E R 1 ポリペプチドまたはC D 2 0 ポリペプチドを含むH E R 1 タグまたはC D 2 0 タグである。

40

【 0 1 5 0 】

ある特定の実施形態では、第2の遺伝子は、上皮増殖因子受容体（H E R 1 ）またはこれらの断片もしくは変異体である、H E R 1 タグである。複数の実施形態では、第2の遺伝子は、切断型ヒト上皮増殖因子受容体1（例えば、H E R 1 t またはH E R 1 t - 1 ）である、H E R 1 タグである。場合によって、第2の遺伝子は、切断型ヒト上皮増殖因子受容体1の変異体である。複数の実施形態では、H E R 1 、H E R 1 t 、およびH E R 1

50

t - 1 のうちの少なくとも 1 つは、 F D A で承認されているセツキシマブ、または H E R 1 、 H E R 1 t 、および / もしくは H E R 1 t - 1 を認識する任意の抗体を投与することを介して、輸注された C A R - T 細胞の枯渇を可能とすることにより、安全性機構をもたらす。複数の実施形態では、 H E R 1 t 遺伝子は、配列番号 3 2 の核酸配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。複数の実施形態では、 H E R 1 t - 1 遺伝子は、配列番号 5 4 の核酸配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。切断型 H E R 1 配列、例えば、 H E R 1 t および H E R 1 t - 1 は、セツキシマブの、受容体への結合を無傷に保ちながら、 E G F リガンドへの結合、 E G F R のホモ二量体化およびヘテロ二量体化、ならびに E G F R 媒介性シグナル伝達の潜在的 possibility を消失させる (Ferguson, K., 2008. A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation. Annu Rev Biophys, Volume 37, pp. 353-373) 。

【 0 1 5 1 】

本発明の、さらなる実施形態では、治療用の C D 3 3 特異的キメラ抗原受容体に加えて、導入される第 2 の遺伝子は、 C D 2 0 タグである。場合によって、 C D 2 0 タグは、全長 C D 2 0 ポリペプチド、または切断型 C D 2 0 ポリペプチド (C D 2 0 t - 1) である。場合によって、 C D 2 0 タグ、例えば、 C D 2 0 または C D 2 0 t - 1 はまた、 F D A で承認されているリツキシマブ療法を投与することを介して、輸注された C A R - T 細胞の枯渇を可能とすることにより、安全性機構ももたらす。ある特定の実施形態では、 C D 2 0 タグは、配列番号 3 6 の配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド配列を有する。ある特定の実施形態では、 C D 2 0 タグは、 C D 2 0 t - 1 タグであり、配列番号 5 6 の配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド配列を有する。一部の実施形態では、 C D 2 0 タグは、配列番号 3 5 の核酸配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む C D 2 0 遺伝子によりコードされる。一部の実施形態では、 C D 2 0 タグは、配列番号 5 7 の核酸配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む C D 2 0 t - 1 遺伝子によりコードされる。

【 0 1 5 2 】

複数の実施形態では、本明細書で記載される C A R を含む C A R ベクターは、配列番号 3 6 の核酸配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有する核酸配列を含む全長 C D 2 0 タグをさらに含む。

【 0 1 5 3 】

複数の実施形態では、キルタグ、例えば、 H E R 1 t タグ、 H E R 1 t - 1 タグ、 C D 2 0 タグ、または C D 2 0 t - 1 タグをコードする遺伝子を、 C D 3 3 C A R へと、 3 ' 末端において、インフレームの、例えば、トセア・アシグナ (Thosea asigna) ウィルス (T 2 A) ペプチドであるがこれらに限定されない、自己切断型ペプチドを介して遺伝子融合させる。複数の実施形態では、 T 2 A ペプチドは、配列番号 3 0 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【 0 1 5 4 】

複数の実施形態では、キルタグ遺伝子を、 p F U G W レンチウイルスプラスミド骨格へと、 C D 3 3 C A R 遺伝子とインフレームでクローニングする。他の実施形態では、両方の遺伝子を、 S l e e p i n g B e a u t y トランスポゾンベクターへとクローニン

10

20

30

40

50

グする。他の実施形態では、キルタグを、別個のレンチウイルスベクターへとクローニングする。さらに他の実施形態では、HER1t、HER1t-1、CD20、またはCD20t-1などのキルタグを、別個のSleeping Beautyトランスポゾンベクターへとクローニングする。ある特定の実施形態では、キルタグは、シグナルペプチド、例えば、GM-CSFRaシグナルペプチドを有し、この場合、GM-CSFRaシグナルペプチドは、配列番号16のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号34の核酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を有するIgKである。場合によって、シグナルペプチドは、IgEおよびCD8、これらの変異体および断片から選択することができる。10

【0155】

本明細書で記載されるCARおよびキルタグをコードする、例示的なベクターを、図2に示す。

【0156】

例示的なCARのオープンリーディングフレーム

本明細書で記載される方法および組成物により包含される、例示的なCARおよびヒトCD33受容体オープンリーディングフレームは、表1にある。

【0157】

【表1】

表1

	CARのORF
1	hM195scFv-CD8a-CD28m-Z (配列番号39)
2	hM195scFv-CD8a-Z (配列番号41)
3	hM195scFv-CD8a-CD28m-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t ((配列番号43))
4	hM195scFv (配列番号45)
5	hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z (配列番号47)
6	hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A-GM-CSFRasp.HER1t (配列番号49)
7	hM195scFv-CD8a-4-1BB-Z-T2A.FL CD20 (配列番号51)
8	ヒトCD33(M1-R287) (配列番号53)

【0158】

本明細書の複数の実施形態では、CARをコードする単離核酸であって、CARが、配列番号配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51または配列番号53のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む、単離核酸が提示される。30

【0159】

表1に列挙された実施形態であって、「hM195scFv」を伴う実施形態の各々では、CARの抗原結合性部分は、配列番号8のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含むhM195scFvである。複数の実施形態では、hM195scFvは、配列番号16のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、GM-CSFRaシグナルペプチドを有する。

【0160】

10

20

30

40

50

表1における実施形態であって、「C D 8 a」を伴う実施形態の各々では、C A Rの膜貫通領域は、配列番号18のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含むC D 8アルファ膜貫通ドメインを含み、ストークドメインは、配列番号22のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含むC D 8 aである。

【0161】

表1における実施形態であって、「C D 2 8 m」を伴う実施形態の各々では、C A Rの細胞内ドメインは、配列番号28のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を伴うC D 2 8を含む。

10

【0162】

表1における実施形態であって、「T 2 A」を伴う実施形態の各々では、C A RのO R Fは、単一のベクターからの、複数の遺伝子産物の産生を可能とする、自己切断型トセア・アシグナ(Thoseaasigna)ウイルス(T 2 A)ペプチドを含む。複数の実施形態では、T 2 Aペプチドは、配列番号30のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

20

【0163】

表1における実施形態であって、「H E R 1 t」を伴う実施形態では、C A RのO R Fは、F D Aで承認されているリツキシマブ療法を投与することを介して、輸注されたC A R-T細胞の枯渇を可能とすることにより、安全性機構をもたらす切断型ヒト上皮増殖因子受容体1(H E R 1 t)を含む。本明細書で記載されるH E R 1 t遺伝子は、配列番号31のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を含みうる。表1において、そうでないことが言及されない限りにおいて、H E R 1 tタグは、G M - C S F R aシグナルペプチド(「G M - C S F R s p」)(配列番号16)を有する。ある特定の実施形態では、H E R 1 tは、別のタグ、例えば、H E R 1 t - 1またはC D 2 0 t - 1で置換することができる。表1における実施形態であって、「I g K s p」を伴う実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号34のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有するI g Kである。

30

【0164】

表1における、複数の実施形態であって、「4 - 1 B B」を伴う、複数の実施形態では、C A RのO R Fは、配列番号24のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を有する共刺激分子を含む。

【0165】

表1における、複数の実施形態であって、「F L C D 2 0」を伴う、複数の実施形態では、C A RのO R Fは、配列番号36のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド配列を含む全長C D 2 0タグを含む。C D 2 0は、F D Aで承認されているリツキシマブ療法を投与することを介して、輸注されたC A R-T細胞の枯渇を可能とすることにより、安全性機構をもたらす。表1における、ある特定の実施形態では、C A RのO R Fは、遺伝子転写のための誘導性プロモーターの制御下にありうる。一態様では、誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチリガンドの誘導性プロモーターでありうる。場合によって、誘導性プロモーターは、R H E O S W I T C H(登録商標)遺伝子スイッチなど、低分子リガンド誘導性の、2つのポリペプチドによる、エクジソン受容体ベースの遺伝子スイッチでありうる。

40

50

【0166】

サイトカイン

一部の実施形態では、本明細書で記載されるCARを、対象へと、サイトカインを含むがこれらに限定されない、1または複数のさらなる治療剤と共に投与する。場合によって、サイトカインは、少なくとも1つのケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壞死因子、またはこれらの変異体もしくは組合せを含む。場合によって、サイトカインは、インターロイキンである。場合によって、インターロイキンは、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、およびこれらの機能的な変異体および断片のうちの少なくとも1つである。一部の実施形態では、サイトカインは、膜結合型の場合もあり、分泌型の場合もある。複数の実施形態では、サイトカインは、可溶性IL-15、可溶性IL-15/IL-15R複合体（例えば、ALT-803）である。ある特定の場合には、インターロイキンは、膜結合型IL-15（mbIL-15）、またはIL-15と、IL-15Rとの融合体を含みうる。一部の実施形態では、mbIL-15は、本明細書で記載される改変免疫エフェクター細胞と共に共発現させることができる、膜結合型キメラIL-15である。一部の実施形態では、mbIL-15は、全長IL-15R、またはこれらの機能的な断片もしくは変異体とインフレームで融合させた、全長IL-15（例えば、天然IL-15ポリペプチド）、またはこれらの断片もしくは変異体を含む。場合によって、IL-15を、IL-15Rへと、リンクマーを介して、間接的に連結する。場合によって、mbIL-15は、Hurton et al., "Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells," PNAS 2016において記載されている通りである。場合によって、サイトカインを、CARと同じ免疫エフェクター細胞内で発現させる。一部の実施形態では、上記で記載したサイトカインは、遺伝子転写のための誘導性プロモーターの制御下にありうる。一態様では、誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチリガンドの誘導性プロモーターでありうる。場合によって、誘導性プロモーターは、RHEOSWITCH（登録商標）遺伝子スイッチなど、低分子リガンド誘導性の、2つのポリペプチドによる、エクジソン受容体ベースの遺伝子スイッチでありうる。

【0167】

さらなる実施形態では、本明細書で記載されるCARを発現する免疫エフェクター細胞は、膜結合型IL-15（「mbIL-15またはmbIL-15」）を発現する。本発明の複数の態様では、mbIL-15は、IL-15とIL-15Rとの融合タンパク質を含む。さらなる実施形態では、mbIL-15は、配列番号37のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0168】

一部の実施形態では、mbIL-15を、本明細書で記載される、HER1t、HER-1t-1、CD20t-1、またはCD20などの細胞タグと共に発現させる。mbIL-15は、HER1t、HER-1t-1、CD20t-1、またはCD20とインフレームで発現させることができる。

【0169】

一部の実施形態では、mbIL-15は、遺伝子転写のための誘導性プロモーターの制御下にありうる。一態様では、誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチリガンドの誘導性プロモーターでありうる。場合によって、誘導性プロモーターは、RHEOSWITCH（登録商標）遺伝子スイッチなど、低分子リガンド誘導性の、2つのポリペプチドによる、エクジソン受容体ベースの遺伝子スイッチでありうる。

【0170】

10

20

30

40

50

ウイルスベースの送達系

本発明はまた、本発明の核酸を挿入したウイルスベースの系などの送達系も提供する。代表的なウイルス発現ベクターは、アデノウイルスベースのベクター（例えば、Crucell, Inc. (Leiden, Netherlands) から市販されている、アデノウイルスベースのPer.C6系）、レンチウイルスベースのベクター（例えば、Life Technologies (Carlsbad, Calif.) 製の、レンチウイルスベースのpLPI）、およびレトロウイルスベクター（例えば、pCFB-EGSHを付加したpFB-ERV）、ヘルペスウイルスを含むがこれらに限定されない。ある実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。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、トランス遺伝子の、娘細胞における、長期にわたる、安定的な組込みおよびその繁殖を可能とするので、長期にわたる遺伝子導入を達成するのに適するツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖性細胞に形質導入しうるという点で、マウス白血病ウイルスなど、がんレトロウイルスに由来するベクターに優る追加の利点を有する。レンチウイルスベクターはまた、低免疫原性という追加の利点も有する。一般に、かつ、複数の実施形態では、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、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1または複数の選択用マーカー（例えば、国際公開第01/96584号パンフレット、国際公開第01/29058号パンフレット、および米国特許第6,326,193号明細書）を含有する。

【0171】

複数の実施形態では、骨格と、(a) CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むレンチウイルスベクターが提示される。任意選択で、ベクターは、切断型上皮増殖因子受容体(HER1tまたはHER1t-1)、CD20t-1、または全長CD20をコードする核酸をさらに含む。

【0172】

場合によって、骨格と、(1)切断型上皮増殖因子受容体、例えば、HER1tもしくはHERt-1、またはこれらの機能的な変異体、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むベクターが提示される。

【0173】

場合によって、骨格と、(1)全長CD20、切断型CD20、またはこれらの変異体、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むベクターが提示される。

【0174】

複数の実施形態では、CD33特異的CARをコードする核酸を、レンチウイルスへと、骨格構成要素を含むベクタークローニングする。例示的な骨格構成要素は、pFUGWおよびpSMPUWを含むがこれらに限定されない。pFUGWレンチウイルスベクター骨格は、自己不活化(SIN)レンチウイルスベクター骨格であり、不要なHIV-1ウイルス配列を除去する結果として、新生物の発生、有害な突然変異、および感染性粒子の再生の潜在的可能性の低減もたらす。複数の実施形態では、CD33 CARをコードするベクターはまた、単一の構築物内で、mbIL-15もコードする。複数の実施形態では、CD33 CARおよびmbIL-15は、2つの個別のレンチウイルスベクター上でコードされる。一部の実施形態では、mbIL-15を、切断型上皮増殖因子受容体タグと共に発現させる。複数の実施形態では、CD33 CARは、mbIL-15および

10

20

30

40

50

細胞タグと共に、単一のレンチウイルスベクターから共発現させることができる。さらなる実施形態では、CD33 CARは、誘導性プロモーターの制御下にありうる。別の実施形態では、mbIL-15は、誘導性プロモーターの制御下にありうる。一態様では、誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチリガンドの誘導性プロモーターでありうる。場合によって、誘導性プロモーターは、RHEOSWITCH(登録商標)遺伝子スイッチなど、低分子リガンド誘導性の、2つのポリペプチドによる、エクジソン受容体ベースの遺伝子スイッチでありうる。

【0175】

一実施形態では、本明細書で記載されるCD33 CARは、抗CD33 scFv、ヒトCD8ヒンジ、および膜貫通ドメイン、ならびにヒト4-1BBシグナル伝達ドメインおよびヒトCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。別の実施形態では、本発明のCD33 CARは、抗CD33 scFv、ヒトCD8ヒンジ、および膜貫通ドメイン、ヒト4-1BBシグナル伝達ドメインおよびヒトCD3ゼータシグナル伝達ドメインと、任意選択で、切断型上皮増殖因子受容体(HER1tまたはHER1t-1)タグとを含む。他の適切なベクターは、宿主細胞のDNAへと、ランダムに組み込まれる場合もあり、発現ベクターと、宿主細胞の染色体との特異的組換えを可能とする組換え部位を含む場合もある、組込み用発現ベクターを含む。このような組込み用発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を用いて、所望のタンパク質の発現をもたらしうる。部位特異的に組み込むベクターの例は、例えば、Invitrogen(Carlsbad, Calif.) (例えば、pcDNA(商標)5/FRT) 製のf1p-in系、またはStratagene(La Jolla, Calif.) 製のpExchange-6 Core Vectorsにおいて見出されうるcre-lox系などのcre-lox系の構成要素を含む。宿主細胞染色体へとランダムに組み込まれるベクターの例は、例えば、Invitrogen(Carlsbad, Calif.) 製のpcDNA3.1(T抗原の非存在下で導入される場合)、およびPromega(Madison, Wis.) 製のpCIまたはpFN10A(ACT)FLEXI(商標)を含む。さらなるプロモーターエレメント、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、プロモーターエレメントは、開始部位の30~110bp上流の領域内に位置するが、多数のプロモーターは、開始部位の下流にも、機能的なエレメントを含有することが近年示されている。エレメントが、互いに対しても逆位であるか、または移動している場合にも、プロモーター機能が保存されるように、プロモーターエレメントの間のスペーシングは、柔軟であることが多い。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターでは、活性が減衰し始める前に、プロモーターエレメントの間のスペーシングが、50bpの距離まで増大する場合がある。個別のエレメントは、転写を活性化させるように、プロモーターに応じて、共作動的に機能する場合もあり、独立に機能する場合もあると考えられる。

【0176】

適切なプロモーターの1つの例は、サイトメガロウイルス(CMV)即初期プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それへと作動的に連結された、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可能である、強力な構成的プロモーター配列である。

【0177】

適切なプロモーターの別の例は、ヒト伸長成長因子1アルファ1(hEF1a1)である。複数の実施形態では、本明細書で記載されるCARを含むベクター構築物は、hEF1a1の機能的変異体を含む。

【0178】

しかし、サルウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)LTR(long terminal repeat)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン-バーウィルス即初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターのほか、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およ

10

20

30

40

50

びクレアチンキナーゼプロモーターなどであるがこれらに限定されない、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もまた、使用することができる。さらに、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定されないものとする。誘導性プロモーターもまた、本発明の一部として想定される。誘導性プロモーターの使用は、このような発現が所望される場合に、それが作動的に連結されたポリヌクレオチド配列の発現をオンにするか、または発現が所望されない場合に、発現をオフにすることが可能な分子スイッチをもたらす。誘導性プロモーターの例は、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリンプロモーターを含むがこれらに限定されない。

【0179】

10

本明細書で記載されるC A R またはこの部分の発現を評価するために、細胞へと導入される発現ベクターはまた、ウイルスベクターを介してトランスフェクトまたは感染させることが求められる細胞集団からの、発現細胞の同定および選択を容易とする、選択用マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子またはこれらの両方も含有しうる。他の態様では、選択用マーカーは、別個のD N A片上に保有され、共トランスフェクション手順で使用する場合もある。選択用マーカーおよびレポーター遺伝子のいずれも、宿主細胞内の発現を可能とするように、適切な調節配列で挟むことができる。有用な選択用マーカーは、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子 (n e o) およびアンピシリン耐性遺伝子などの抗生剤耐性遺伝子を含む。一部の実施形態では、切断型上皮増殖因子受容体 (H E R 1 t またはH E R 1 t - 1) タグを、選択用マーカー遺伝子として使用することができる。

【0180】

20

レポーター遺伝子を、トランスフェクトされた可能性がある細胞を同定し、調節配列の機能性について査定するために使用することができる。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエントの生物または組織において存在しないか、またはこれらにより発現せず、その発現が、何らかの、容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性により顕在化されるポリペプチドをコードする遺伝子である。D N Aを、レシピエント細胞へと導入した後の適切な時点において、レポーター遺伝子の発現についてアッセイする。適切なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、ベータ-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、または緑色蛍光タンパク質遺伝子 (例えば、Ui-Tei et al., FEBS Letters 479: 79-82 (2000)) を含む。適切な発現系が周知であり、公知の技法を使用して調製することもでき、市販品を購入することもできる。一般に、最高レベルのレポーター遺伝子の発現を示す、最小の5'側フランギング領域を伴う構築物は、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、レポーター遺伝子へと連結することができ、薬剤を、プロモーター駆動型転写をモジュレートする能力について査定するのに使用することができる。

30

【0181】

複数の実施形態では、本明細書で記載されるベクターは、トランス遺伝子の発現を駆動するh E F 1 a 1プロモーター、転写を増強するウシ成長ホルモンポリA配列、ウッドチヤック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (W P R E) のほか、p F U G Wプラスミドに由来するL T R配列を含みうる。

40

【0182】

遺伝子を、細胞へと導入し、発現させる方法は、周知である。発現ベクターの文脈では、ベクターを、当技術分野における任意の方法により、宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、または昆虫細胞へと、たやすく導入することができる。例えば、発現ベクターは、宿主細胞へと、物理的手段により導入することもでき、化学的手段により導入することもでき、生物学的手段により導入することもできる。

【0183】

ポリヌクレオチドを、宿主細胞、例えば、免疫エフェクター細胞へと導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション法、遺伝子銃法、マイクロインジェクション法、電気穿孔法などを含む。当技術分野では、ベクターおよび/または外因

50

性核酸を含む細胞を作製するための方法が周知である。例えば、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001))を参照されたい。複数の実施形態では、ポリヌクレオチドを、宿主細胞へと導入するための方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションまたはポリエチレンイミン(PEI)トランスフェクションである。

【0184】

目的のポリヌクレオチドを、宿主細胞、例えば、免疫エフェクター細胞へと導入するための生物学的方法は、DNAベクターおよびRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクターと、とりわけ、レトロウイルスベクターとは、遺伝子を、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞へと挿入するための、最も広く使用さ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I、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスなどに由来しうる。例えば、米国特許第5,350,674号明細書および同第5,585,362号明細書を参照されたい。

10

【0185】

ポリヌクレオチドを、宿主細胞へと導入するための化学的手段は、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油エマルジョン、ミセル、混合型ミセル、およびリポソームを含む脂質ベースの系などのコロイド分散系を含む。in vitroおよびin vivoにおける、送達媒体としての使用のための、例示的なコロイド状系は、リポソーム(例えば、人工膜小胞)である。

20

【0186】

ウイルス送達系を用いる場合、例示的な送達媒体は、リポソームである。脂質製剤を、核酸の、宿主細胞への導入(in vitro、ex vivo、またはin vivoにおける)のために使用することができる。別の態様では、核酸は、脂質と会合させることができ。脂質と会合させた核酸は、リポソームの脂質二重層内に散在する、水性のリポソーム内部に封入することもでき、リポソームおよびオリゴヌクレオチドのいずれとも会合する連結分子を介して、リポソームへと接合させることもでき、リポソーム内に取り込むこともでき、リポソームと複合体化させることもでき、脂質を含有する溶液中に分散させることもでき、脂質と混合することもでき、脂質と組み合わせることもでき、脂質中の懸濁液として含有することもでき、ミセルと共に含有するかもしくは複合体化させることもでき、または他の形で脂質と会合させることもできる。脂質、脂質/DNA、または脂質/発現ベクターに関する組成物は、溶液中の、任意の特定の構造に限定されない。例えば、組成物は、ミセルとしての二重層構造内に存在する場合もあり、「コラブシング」構造を伴う二重層構造内に存在する場合もある。組成物はまた、単に、溶液中に散在させることもでき、おそらく、サイズまたは形状が均質ではない凝集物を形成しうる。脂質とは、天然脂質の場合もあり、合成脂質の場合もある、脂肪性物質である。例えば、脂質は、天然では、細胞質内で発生する脂肪性液滴のほか、長鎖脂肪族炭化水素、ならびに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、およびアルデヒドなど、それらの誘導体を含有する化合物のクラスを含む。

30

【0187】

使用に適する脂質は、市販元から購入することができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(「DMPC」)は、Sigma、St. Louis、Mo.から購入することができ、ジセチルリン酸(「DCP」)は、K & K Laboratories(Plainview, N.Y.)から購入することができ、コレステロール(「Choi」)は、Calbiochem-Behringから購入することができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール(「DMPG」)および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.)から購入することができる。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質原液は、約-20で保存することができる。クロロホルムは、メタノールよりたやすく蒸発するので、唯一の溶媒として使用される。「リポソーム」とは、封入された脂質の二重層または脂凝集物の作出により形成される、様々な単一の脂質媒体および多層性脂質媒体を包含する、一般的

40

50

な用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部の水性媒質を伴う小胞構造を有するものとして特徴づけることができる。多層性リポソームは、水性媒質により分離された複数の脂質層を有する。多層性リポソームは、リン脂質を、過剰量の水溶液中に懸濁させると、自発的に形成される。脂質成分は、閉止構造を形成する前に、自己転移を経、脂質二重層の間に、水および溶解させた溶質を取り込む (Ghosh et al., *Glycobiology* 5: 505-10 (1991))。しかし、溶液中に通常の小胞構造と異なる構造を有する組成物もまた、包含される。例えば、脂質は、ミセル構造を取る場合もあり、脂質分子による不均質の凝集物として存在する場合もある。また、リポフェクタミン・核酸複合体も想定される。

【0188】

非ウイルスベースの送達系

10

本明細書で記載されるCARをコードする核酸はまた、免疫エフェクター細胞へと、DNA配列を、脊椎動物の染色体へと導入するための合成DNAトランスポゾン系を指す「Sleeping Beauty (SB) トランスポゾン系」など、非ウイルスベースの送達系を使用して導入することもできる。例示的なSBトランスポゾン系については、例えば、米国特許第6,489,458号明細書および同第8,227,432号明細書において記載されており、図3に例示されている。Sleeping Beautyトランスポゾン系は、Sleeping Beauty (SB) トランスポザーゼおよびSBトランスポゾンから構成される。

【0189】

DNAトランスポゾンは、1つのDNA部位から、別のDNA部位へと、単純なカットアンドペースト方式で転座する。転移は、規定されたDNAセグメントを、1つのDNA分子から切り出し、同じDNA分子内もしくはゲノム内、または異なるDNA分子内もしくはゲノム内の別の部位へと移動させる、正確な過程である。他のT cell/marine r型トランスポザーゼと同様、SBトランスポザーゼも、トランスポゾンを、レシピエントDNA配列内の、TAジヌクレオチド塩基対へと挿入する。挿入部位は、同じDNA分子内の別の部位の場合もあり、別のDNA分子（または染色体）内の場合もある。ヒトゲノムを含む哺乳動物ゲノムには、約2億カ所のTA部位が存在する。TA挿入部位は、トランスポゾン組込みの過程において、重複される。このTA配列の重複は、転移の顕著な特徴であり、一部の実験では、機構を確認するのに使用される。トランスポザーゼは、トランスポゾン内でコードされる場合もあり、トランスポザーゼは、別の供給源により供給される場合もあり、この場合、トランスポゾンは、非自律型エレメントとなる。非自律型トランスポゾンは、挿入の後、独立では切出しおよび再挿入を行えないため、遺伝子ツールとして最も有用である。SBトランスポゾンは、脊椎動物のゲノムへの遺伝子の導入および遺伝子治療のための非ウイルスベクターとして使用することが想定されている。略述すると、T細胞を遺伝子改変するように、Sleeping Beauty (SB) 系 (Hackett et al., *Mol Ther* 18:674-83, (2010)) を適合させた (Cooper et al., *Blood* 105:1622-31, (2005))。これは、2つのステップ: (i) T細胞の特異性をリダイレクトするためのSBトランスポゾン [すなわち、キメラ抗原受容体 (CAR)] およびSBトランスポザーゼを発現するDNAプラスミドのエレクトロトランスファー (Jin et al., *Gene Ther* 18:849-56, (2011)、Kebriaei et al., *Hum Gene Ther* 23:444-50, (2012))、ならびに (ii) K562細胞株に由来するデザイナー人工抗原提示細胞 (AAPEC) (AAPEC (Activating and Propagating Cell) としてもまた公知である) に接する形での、組込み配列を安定的に発現するT細胞の繁殖および拡大増殖を伴った。一実施形態では、SBトランスポゾン系は、tdIL-15、IL-21、および/またはキメラ抗原受容体をコードするコード配列を含む。このような系については、例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Singh et al., *Cancer Res* (8):68 (2008). April 15, 2008およびMaiti et al., *J Immunother.* 36(2): 112-123 (2013)において記載されている。

【0190】

ある特定の実施形態では、本明細書で記載されるCD33 CARおよびmbIL-1

20

30

40

50

5は、トランスポゾンDNAプラスミドベクター内でコードされ、SBトランスポザーゼは、別個のベクター内でコードされる。ある特定の実施形態では、本明細書で記載されるCD33 CARは、トランスポゾンDNAプラスミドベクター内でコードされ、mb-IL15は、第2のトランスポゾンDNAプラスミドベクター内でコードされ、SBトランスポザーゼは、第3のDNAプラスミドベクター内でコードされる。一部の実施形態では、mbIL-15は、キルタグ、例えば、HER1t、HRt-1、CD20、またはCD20t-1によりコードされる。

【0191】

外因性核酸を、宿主細胞へと導入するか、または細胞を、本発明の阻害剤へと、他の形で曝露するのに使用される方法にかかわらず、宿主細胞内の組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイを実施することができる。このようなアッセイは、例えば、サザンプロット法およびノーザンプロット法、RT-PCRおよびPCRなど、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ；例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウェスタンプロット）、または薬剤を同定するための、本明細書で記載されるアッセイであって、本発明の範囲内に収まるアッセイにより、特定のペプチドの有無を検出するアッセイなどの「生化学的」アッセイを含む。

10

【0192】

複数の実施形態では、SB11トランスポゾン系、SB100Xトランスポゾン系、SB110トランスポゾン系、piggyBacトランスポゾン系（例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Wilson et al., "PiggyBac Transposon-mediated Gene Transfer in Human Cells," Molecular Therapy 15:139-145 (2007)を参照されたい）、および/またはpiggyBatトランスポゾン系（例えば、Mitra et al., "Functional characterization of piggyBat from the bat *Myotis lucifugus* unveils an active mammalian DNA transposon," Proc. Natl. Acad. Sci USA 110:234-239 (2013)を参照されたい）を使用して、CD33 CARおよび他の遺伝子エレメントを、細胞へと送達する。さらなるトランスポザーゼおよびトランスポゾン系については、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第7,148,203号明細書、同第8,227,432号明細書、米国特許公開第2011/01117072号明細書、Mates et al., Nat Genet, 41(6):753-61 (2009). doi: 10.1038/ng.343. Epub 2009 May 3, Gene Ther., 18(9):849-56 (2011). doi: 10.1038/gt.2011.40. Epub 2011 Mar 31 およびIvics et al., Cell, 91(4):501-10, (1997)において提示されている。

20

【0193】

他の実施形態では、リコンビナーゼおよび発現ベクターの組込みを介して、CD33 CARならびにサイトカイン、mbIL-15、および/またはHER1t/HER1t-1/CD20/CD20t-1タグなど、他の遺伝子エレメントを、免疫エフェクター細胞のDNAへと組み込むことができる。このようなベクターは、宿主細胞のDNAへと、ランダムに組み込まれる場合もあり、発現ベクターと、宿主細胞の染色体との特異的組換えを可能とする組換え部位を含む場合もある。このような組込み用発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を用いて、所望のタンパク質の発現をもたらしうる。一部の実施形態では、ドナーポリヌクレオチド上の配列であって、組込み部位を挟む配列と相同な配列の存在によりにより、組込みのターゲティングを促進する。例えば、本明細書で記載されるドナーポリヌクレオチドを使用する、組込みのターゲティングは、従来のトランسفエクション法、例えば、相同組換えにより、遺伝子のノックアウトまたはノックインを創出するのに使用される技法に従い達成することができる。他の実施形態では、ドナーポリヌクレオチド上の配列であって、組込み部位を挟む配列と相同な配列の存在、および部位特異的リコンビナーゼの存在下で、細胞を、ドナーポリヌクレオチドと接触させることの両方によりにより、組込みのターゲティングを促進する。部位特異的リコンビナーゼ、または、単に、リコンビナーゼとは、その適合性の組換え部位の間の、保存的な部位特異的組換えを触媒するポリペプチドを意味する。本明細書で使用される部位特異

30

40

50

的リコンビナーゼは、天然ポリペプチドのほか、活性を保持する誘導体、変異体、および／または断片、ならびに天然ポリヌクレオチド、活性を保持するリコンビナーゼをコードする誘導体、変異体、および／または断片を含む。

【0194】

リコンビナーゼは、標的細胞へと、ターゲティングベクターの導入の前に導入することもでき、これと共に導入することもでき、この後で導入することもできる。リコンビナーゼは、例えば、リポソーム、粒子のコーティング、またはマイクロインジェクションを使用して、細胞へと、タンパク質として直接導入することもできる。代替的に、適切な発現ベクターを使用して、リコンビナーゼをコードするDNAまたはメッセンジャーRNAである、ポリヌクレオチドを、細胞へと導入することもできる。上記で記載したターゲティングベクターの構成要素は、目的のリコンビナーゼをコードする配列を含有する発現カセットの構築において有用である。しかし、リコンビナーゼの発現は、他の方式で、例えば、リコンビナーゼの発現を、調節可能なプロモーター（すなわち、その発現を選択的に誘導または抑制しうるプロモーター）の制御下に置くことにより調節することもできる。

10

【0195】

リコンビナーゼは、インテグラーゼファミリーまたはリゾルバーゼファミリーに由来し、リコンビナーゼのインテグラーゼファミリーは、100を超えるメンバーを有し、例えば、FLP、Cre、およびラムダインテグラーゼを含む。インテグラーゼファミリーはまた、チロシンファミリーまたはラムダインテグラーゼファミリーとも称し、DNAのホスホジエステル結合に対する求核攻撃のために、チロシンの触媒性ヒドロキシル基を使用する。典型的に、チロシンファミリーのメンバーはまず、DNAにニックを入れ、これにより、その後、二重鎖切断を形成する。チロシンファミリーインテグラーゼの例は、Creインテグラーゼ、FLPインテグラーゼ、SSV1インテグラーゼ、およびラムダ（）インテグラーゼを含む。セリンリコンビナーゼファミリーとしてもまた公知の、リゾルバーゼファミリーでは、保存性セリン残基が、DNA標的部位への共有結合性連結を形成する（Grindley, et al., (2006) Ann Rev Biochem 16:16）。

20

【0196】

一実施形態では、リコンビナーゼは、SP-c2リコンビナーゼ、SFP370.1リコンビナーゼ、Bxb1リコンビナーゼ、A118リコンビナーゼ、およびRv1リコンビナーゼからなる群から選択されるリコンビナーゼをコードする核酸配列を含む、単離ポリヌクレオチド配列である。セリンリコンビナーゼの例については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第9,034,652号明細書において詳細に記載されている。

30

【0197】

本発明の実施における使用のためのリコンビナーゼは、組換えにより作製することもでき、既に記載された通りに精製することもできる。所望のリコンビナーゼ活性を有するポリペプチドは、当技術分野で公知の方法であって、タンパク質の硫酸アンモニウム沈殿の方法、サイズ分画、アフィニティクロマトグラフィー、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンアガロースアフィニティクロマトグラフィー（例えば、Thorpe & Smith, Proc. Nat. Acad. Sci. 95:5505-5510, 1998）を含むがこれらに限定されないタンパク質精製の方法により、所望の純度まで精製することができる。

40

【0198】

一実施形態では、リコンビナーゼを、任意の適切な方法による組換えが所望される組換え接合部位を含有する真核細胞へと導入することができる。当技術分野では、例えば、マイクロインジェクションまたは他の方法により、機能的タンパク質を、細胞へと導入する方法が周知である。精製リコンビナーゼタンパク質の導入は、タンパク質の一過性の存在、およびその機能を確認するが、これは、好ましい実施形態であることが多い。代替的に、リコンビナーゼをコードする遺伝子は、細胞を形質転換するのに使用される発現ベクターであって、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドを、真核細胞内のポリヌクレオチドの発現を媒介するプロモーターに作動可能に連結した、発現ベクター内に含まれう

50

る。リコンビナーゼポリペプチドはまた、リコンビナーゼポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAによっても、真核細胞へと導入することができる。リコンビナーゼは、核酸断片の、改変されるゲノムへの挿入に必要であるような場合に限り存在することが一般に好ましい。したがって、大半の発現ベクターと関連する永続性の欠如は、有害ではないと予測される。リコンビナーゼ遺伝子を、目的の外因性ポリヌクレオチドの導入の前に導入することもでき、これと同時に導入することもでき、この後で導入することもできる。一実施形態では、リコンビナーゼ遺伝子は、挿入されるポリヌクレオチドを保有するベクター内に存在し、リコンビナーゼ遺伝子はなお、ポリヌクレオチド内にも、組み入れることができる。

【0199】

一実施形態では、部位特異的組換えのための方法は、第1の組換え部位および第2の組換え部位を用意するステップと、第1の組換え部位および第2の組換え部位を、原核細胞のリコンビナーゼポリペプチドと接触させる結果として、組換え部位の間の組換えをもたらすステップとを含み、リコンビナーゼポリペプチドは、第1の組換え部位と、第2の組換え部位との組換えを媒介することが可能であり、第1の組換え部位は、a t t P または a t t B であり、第2の組換え部位は、a t t B または a t t P であり、第1の組換え接合部位が、a t t B である場合、第2の組換え接合部位は、a t t P であり、第1の組換え接合部位が、a t t P である場合、第2の組換え接合部位は、a t t B であるという条件で、リコンビナーゼは、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) のファージリコンビナーゼ、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) のファージリコンビナーゼ、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) のファージリコンビナーゼ、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) のファージリコンビナーゼ、およびスメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) のファージリコンビナーゼからなる群から選択される。

【0200】

さらなる実施形態は、部位特異的リコンビナーゼの、ゲノムが改変される細胞への導入を提供する。一実施形態は、真核細胞内の部位特異的組換えを得るための方法であって、第1の組換え接合部位および第2の組換え接合部位を含む真核細胞を用意するステップと、第1の組換え接合部位および第2の組換え接合部位を、原核細胞のリコンビナーゼポリペプチドと接触させる結果として、組換え部位の間の組換えをもたらすステップとを含み、リコンビナーゼポリペプチドが、第1の組換え接合部位と、第2の組換え接合部位との組換えを媒介することが可能であり、第1の組換え接合部位が、ファージゲノムの組換え接合部位 (a t t P) 、または細菌ゲノムの組換え接合部位 (a t t B) であり、第2の組換え接合部位が、a t t B または a t t P であり、第1の組換え接合部位が、a t t B である場合、第2の組換え接合部位が、a t t P であり、第1の組換え接合部位が、a t t P である場合、第2の組換え接合部位が、a t t B であるという条件で、リコンビナーゼが、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) のファージリコンビナーゼ、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) のファージリコンビナーゼ、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) のファージリコンビナーゼ、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) のファージリコンビナーゼ、およびスメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) のファージリコンビナーゼからなる群から選択される、方法に関する。ある実施形態では、リコンビナーゼは、A 1 1 8 リコンビナーゼ、S F 3 7 0 . 1 リコンビナーゼ、S P c 2 リコンビナーゼ、R v 1 リコンビナーゼ、およびB x b 1 リコンビナーゼからなる群から選択される。一実施形態では、組換えは、組込みを結果としてもたらす。

【0201】

C D 3 3 C A R およびベクターを含む細胞

本明細書では、本明細書で記載されるC A Rを発現する改変細胞が提示される。ある特定の実施形態では、本明細書で記載される改変細胞は、免疫エフェクター細胞である。本明細書の複数の実施形態では、骨格と、(1)切断型上皮増殖因子受容体 (H E R 1 t またはH E R 1 t - 1) 、ならびに (2) (a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d) 4 - 1 B B もしくはC D 2 8 、またはこれ

10

20

30

40

50

らの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(C A R)をコードする核酸配列とを含むベクターを含む免疫エフェクター細胞が提示される。

【 0 2 0 2 】

ある特定の実施形態では、(a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、(b) ストークドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、(d) 4 - 1 B B もしくは C D 2 8 、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、(e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメイン、および(f) 切断型上皮増殖因子受容体(H E R 1 t または H E R 1 t - 1)を含むキメラ抗原受容体(C A R)を含む免疫エフェクター細胞が提示される。

【 0 2 0 3 】

本明細書の複数の実施形態では、(1) キルスイッチ、選択マーカー、バイオマーカー、またはこれらの組合せとしての使用のための細胞タグ、ならびに(2)(a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、(b) ストークドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、(d) 4 - 1 B B もしくは C D 2 8 、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(C A R)を含む免疫エフェクター細胞が提示される。複数の実施形態では、細胞タグは、 H E R 1 t 、 H E R 1 t - 1 、 C D 2 0 t - 1 、または C D 2 0 である。

10

【 0 2 0 4 】

複数の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、 T 細胞、ナチュラルキラー(N K)細胞、細胞傷害性 T リンパ球(C T L)、および調節性 T 細胞である。複数の実施形態では、細胞は、 C D 3 3 抗原結合性ドメインが、 C D 3 3 に結合すると、抗腫瘍免疫を呈する。

20

【 0 2 0 5 】

改变免疫エフェクター細胞

本明細書で記載される、 1 または複数の異種遺伝子または異種ポリペプチドを発現するように修飾された免疫エフェクター細胞が提示される。本明細書で記載される C D 3 3 C A R 、ならびに H E R 1 t タグ、 H E R 1 t - 1 タグ、 C D 2 0 タグ、および C D 2 0 t - 1 タグのうちの少なくとも 1 つを発現するように修飾された免疫エフェクター細胞が提示される。場合によって、本明細書で開示される C D 3 3 C A R 、 m b I L - 1 5 、ならびに H E R 1 t タグ、 H E R 1 t - 1 タグ、 C D 2 0 タグ、および C D 2 0 t - 1 タグのうちの少なくとも 1 つを発現するように修飾された免疫エフェクター細胞が提示される。

30

【 0 2 0 6 】

本明細書で使用される「 T 細胞」または「 T リンパ球」とは、細胞媒介性免疫において、中心的な役割を果たす、リンパ球の種類である。「 T 細胞」または「 T リンパ球」は、細胞表面上の T 細胞受容体(T C R)の存在により、 B 細胞およびナチュラルキラー細胞(N K 細胞)など、他のリンパ球と区別されうる。

【 0 2 0 7 】

一部の実施形態では、改变免疫エフェクター細胞は、 T 細胞および / またはナチュラルキラー細胞を含む改变免疫細胞である。 T 細胞または T リンパ球は、細胞媒介性免疫に関する白血球の亜型である。例示的な T 細胞は、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、 T H 1 7 細胞、ステムセルメモリー T 細胞(T S C M)、ナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞、エフェクター T 細胞、調節性 T 細胞、またはナチュラルキラー T 細胞を含む。

40

【 0 2 0 8 】

ヘルパー T 細胞(T H 細胞)は、 B 細胞の、血漿細胞およびメモリー B 細胞への成熟、ならびに細胞傷害性 T 細胞およびマクロファージの活性化を含む免疫過程において、他の白血球を支援する。場合によって、 T H 細胞は、細胞表面上の C D 4 糖タンパク質の発現のために、 C D 4 + T 細胞として公知である。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞(A P C)の表面上で発現する、 M H C クラス I I 分子により、ペプチド抗原を提示されると、活性化する。活性化すると、ヘルパー T 細胞は、急速に分裂し、活性の免疫応答を調節するか、またはこれらを支援する、サイトカインと呼ばれる、小型のタンパク質を分泌する

50

。これらの細胞は、T H 1、T H 2、T H 3、T H 17、T h 9、またはT F Hを含む、いくつかの亜型であって、異なるサイトカインを分泌して、異なる種類の免疫応答を容易とする、いくつかの亜型のうちの1つへと分化しうる。A P Cからのシグナル伝達は、T細胞を、特定の亜型へと方向付ける。

【0209】

細胞傷害性T細胞（T C細胞またはC T L）は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、また、移植片拒絶にも関与している。これらの細胞はまた、それらの表面上において、C D 8糖タンパク質を発現するので、C D 8 + T細胞としても公知である。これらの細胞は、全ての有核細胞の表面上に存在する、M H CクラスI分子と会合する抗原に結合することにより、それらの標的を認識する。調節性T細胞により分泌される、I L - 10、アデノシン、および他の分子を介して、C D 8 + 細胞は、アネルギー状態へと不活化される場合があり、これにより、自己免疫疾患を防止する。

10

【0210】

メモリーT細胞は、感染が消失した後で、長期にわたり存続する、抗原特異的T細胞のサブセットである。メモリーT細胞は、それらのコグネイト抗原へと再曝露されると、多数のエフェクターT細胞へと急速に拡大増殖し、これにより、免疫系に、過去の感染に対する「メモリー」をもたらす。メモリーT細胞は、亜型：ステムセルメモリーT細胞（T S C M）、セントラルメモリーT細胞（T C M細胞）および2種類のエフェクターメモリ－T細胞（T E M細胞およびT E M R A細胞）を含む。メモリー細胞は、C D 4 + 細胞の場合もあり、C D 8 + 細胞の場合もある。メモリーT細胞は、細胞表面タンパク質である、C D 4 5 R O、C D 4 5 R A、および／またはC C R 7を発現しうる。

20

【0211】

かつては、サプレッサーT細胞として公知であった、調節性T細胞（T r e g細胞）は、免疫寛容の維持において役割を果たす。調節性T細胞の主要な役割は、T細胞媒介性免疫を遮断して、免疫反応を終了させ、胸腺内の陰性選択過程を回避した自己反応性T細胞を抑制することである。

【0212】

ナチュラルキラーT細胞（N K T細胞）は、獲得免疫系を、自然免疫系と橋渡しする。主要組織適合性複合体（M H C）分子により提示されるペプチド抗原を認識する従来のT細胞と異なり、N K T細胞は、C D 1 dと呼ばれる分子により提示される糖脂質抗原を認識する。活性化すると、これらの細胞は、T h細胞およびT c細胞の両方に帰せられた機能（すなわち、サイトカインの産生および細胞溶解性／細胞殺滅分子の放出）を果たしうる。N K T細胞はまた、一部の腫瘍細胞およびヘルペスウイルスに感染した細胞を認識し、これらを消失させることも可能である。

30

【0213】

ナチュラルキラー（N K）細胞とは、自然免疫系の、細胞傷害性リンパ球の種類である。場合によって、N K細胞は、ウイルス感染および／または腫瘍形成に対する、最前線の防御をもたらす。N K細胞は、感染細胞上またはがん性細胞上に提示されたM H Cを検出することが可能であり、サイトカイン放出を誘発し、その後、溶解およびアポトーシスを誘導する。N K細胞はさらに、抗体および／またはM H Cの非存在下で、ストレス細胞を検出することが可能であり、これにより、迅速な免疫応答を可能とする。

40

【0214】

改变免疫エフェクター細胞の用量

一部の実施形態では、ある量の改变免疫エフェクター細胞を、それを必要とする対象へと投与するが、量は、サイトカインと関連する傷害作用を誘導する有効性および潜在的可能性に基づき決定する。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g当たりの改变免疫エフェクター細胞約10⁵～約10⁹個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g当たりの改变免疫エフェクター細胞約10⁵～約10⁸個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g当たりの改变免疫エフェクター細胞約10⁵～約10⁷個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1

50

k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^6 ~ 約 10^9 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^6 ~ 約 10^8 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^7 ~ 約 10^9 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^5 ~ 約 10^6 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^6 ~ 約 10^7 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^7 ~ 約 10^8 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^9 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^8 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^7 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞の量は、1 k g 当たりの改变免疫エフェクター細胞約 10^6 個を含む。場合によって、改变免疫エフェクター細胞約 10^5 個を含む。

【0215】

一部の実施形態では、改变免疫エフェクター細胞は、CD33特異的CAR-T細胞であるCAR-T細胞である。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ~ 約 10^9 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ~ 約 10^8 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ~ 約 10^7 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ~ 約 10^9 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ~ 約 10^8 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ~ 約 10^9 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^7 ~ 約 10^9 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ~ 約 10^6 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^6 ~ 約 10^7 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^7 ~ 約 10^8 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^8 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^9 個を含む。場合によって、CD33特異的CAR-T細胞の量は、1 k g 当たりのCAR-T細胞約 10^5 ~ 約 10^6 個を含む。

【0216】

免疫エフェクター細胞の供給源

ある特定の態様では、本明細書で記載される実施形態は、リダイレクトされた、抗原特異的免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞、またはNK-T細胞）を作り出し、かつ/またはこれを拡大増殖させる方法であって、細胞に、CARをコードするDNA（またはRNA）構築物を含有する発現ベクターによりトランスフェクトし、次いで、任意選択で、細胞を、フィーダー細胞、組換え抗原、または受容体に対する抗体で刺激して、細胞を増殖させるステップを含む方法を含む。ある特定の態様では、CARを発現するように改変された細胞（または細胞集団）は、幹細胞、iPS細胞、免疫エフェクター細胞、またはこれらの細胞の前駆細胞である。

【0217】

免疫エフェクター細胞の供給源は、同種供給源および自家供給源の両方を含みうる。場

10

20

30

40

50

合によって、免疫エフェクター細胞は、幹細胞または人工多能性幹細胞（iPSC）から分化させることもできる。したがって、実施形態に従い改変するための細胞は、臍帯血、末梢血、ヒト胚性幹細胞、またはiPSCから単離することができる。例えば、同種T細胞は、キメラ抗原受容体を含むように（そして、任意選択で、機能的なTCRを欠くように）改変することができる。一部の態様では、免疫エフェクター細胞は、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）に由来するT細胞などの初代ヒトT細胞である。PBMCは、末梢血から回収することもでき、G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）による刺激の後で、骨髓または臍帯血から回収することもできる。トランスフェクションまたは形質導入（例えば、CARの発現構築物による）の後、細胞は、速やかに輸注するか、または凍結保存することができる。ある特定の態様では、トランスフェクションの後、細胞は、細胞への遺伝子導入後、約1、2、3、4、5日間またはこれを超える日数以内に、*ex vivo*において、バルク集団として、数日間、数週間、または数ヶ月間にわたり繁殖させることができる。さらなる態様では、トランスフェクションの後、トランスフェクト細胞を、クローニングし、組み込まれるか、またはエピソーム内に維持された、単一の発現力セットまたはプラスミドの存在、およびキメラ抗原受容体の発現を裏付けるクローナンを、*ex vivo*において拡大増殖させる。拡大増殖のために選択されたクローナンは、抗原を発現する標的細胞を特異的に認識し、溶解させる能力を裏付ける。組換えT細胞は、IL-2または共通のガンマ鎖に結合する他のサイトカイン（例えば、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、および他のサイトカイン）を伴う刺激により拡大増殖させることができる。組換えT細胞は、人工抗原提示細胞を伴う刺激により拡大増殖させることができる。組換えT細胞は、人工抗原提示細胞に接する形で拡大増殖させることもでき、T細胞表面上のCD3を架橋する、OKT3などの抗体により拡大増殖させることもできる。組換えT細胞のサブセットは、磁気ビーズベースの単離法および/または蛍光活性化細胞分取技術の使用により、さらに選択することができ、APCと共にさらに培養することができる。さらなる態様では、遺伝子改変細胞は、凍結保存することができる。

【0218】

T細胞はまた、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位に由来する組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、多数の供給源から得ることもできる。本発明のある特定の実施形態では、当技術分野において入手可能な、任意の数のT細胞株を使用することができる。本発明のある特定の実施形態では、T細胞は、Ficoll（登録商標）分離など、当業者に公知の、任意の数の技法を使用して、対象から回収された血液単位から得ることができる。複数の実施形態では、個体の循環血液に由来する細胞は、アフェレーシスにより得る。アフェレーシス生成物は、典型的に、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含むリンパ球を含有する。一実施形態では、アフェレーシスにより回収された細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、細胞を、その語における加工ステップのために、適切な緩衝液中または培地中に入れる。本発明の一実施形態では、細胞を、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄する。代替的な実施形態では、洗浄液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠く場合もあり、全てではないが、多くの二価カチオンを欠く場合もある。カルシウムの非存在下における初期活性化ステップは、活性化の強化をもたらす。当業者がたやすく理解する通り、洗浄ステップは、製造元の指示書に従い、半自動式「フロースル」型遠心分離機（例えば、Cobe 2991細胞プロセッサー、Baxter Cytomat e、またはHaemonetics Cell Saver 5）を使用することなど、当業者に公知の方法により達することができる。洗浄の後、細胞を、例えば、Ca²⁺非含有PBS、Mg²⁺非含有PBS、Plasmalyte A、または緩衝液を伴うかもしくは伴わない、他の生理食塩液溶液など、様々な生体適合性の緩衝液中に再懸濁させることができる。代替的に、アフェレーシス試料の、所望されない構成要素を除去し、細胞を、培養培地中に、直接再懸濁させることもできる。

【0219】

別の実施形態では、例えば、PERCOLL（登録商標）勾配を介する遠心分離、また

10

20

30

40

50

は対向流遠心溶出により、赤血球を溶解させ、単球を枯渇させることにより、T細胞を、末梢血リンパ球から単離する。CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、およびCD45RO⁺T細胞など、T細胞の特異的亜集団も、陽性選択法または陰性選択法により、さらに単離することができる。例えば、一実施形態では、T細胞を、DYNABEADS (登録商標) M-450 CD3 / CD28 Tなどの、抗CD3 / 抗CD28 (すなわち、3×28) コンジュゲートビーズを伴う、所望のT細胞陽性選択に十分な時間にわたるインキュベーションにより単離する。一実施形態では、時間は、約30分間である。さらなる実施形態では、時間は、30分間～36時間、またはこれより長い時間、およびこれらの間の任意の整数値の時間の範囲である。さらなる実施形態では、時間は、少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。さらに別の実施形態では、時間は、10～24時間である。一実施形態では、インキュベーション時間は、24時間である。白血病を伴う患者からのT細胞の単離ための、24時間など、長いインキュベーション時間の使用は、細胞収率を増大させうる。腫瘍組織または免疫障害個体から、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を単離する状況など、T細胞が、他の細胞型と比較して少数である、任意の状況においては、より長いインキュベーション時間を使用してT細胞を単離することができる。さらに、長いインキュベーション時間の使用は、CD8⁺ T細胞の捕捉効率も増加させうる。したがって、単に、時間を短くするかまたは長くすることにより、T細胞を、CD3 / CD28 ビーズに結合させることができるとなり、かつ / またはビーズの、T細胞に対する比 (本明細書で、さらに記載される通り) を増加もしくは減少させることにより、T細胞の亜集団を、培養の開始時、もしくは工程中の他の時点において、優先的に、陽性もしくは陰性に選択することができる。加えて、ビーズ上または他の表面上の、抗CD3 および / または抗CD28 抗体の比を増加または減少させることにより、T細胞の亜集団を、培養の開始時、または他の所望の時点において、優先的に、陽性または陰性に選択することができる。当業者は、本発明の文脈では、複数ラウンドにわたる選択もまた、使用しうることを認識するであろう。ある特定の実施形態では、選択手順を実施し、「選択されなかった」細胞を、活性化工程および拡大増殖工程において使用することも所望でありうる。「選択されなかった」細胞はまた、さらなるラウンドにわたる選択にかけることもできる。

【0220】

陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、陰性選択された細胞に固有の表面マーカーを指向する抗体の組合せにより達することができる。1つの方法は、陰性選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーを指向する、モノクローナル抗体のカクテルを使用する、細胞分取および / または陰性の磁気免疫接着もしくはフローサイトメトリーを介する選択である。例えば、CD4⁺細胞を、陰性選択により濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的に、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。ある特定の実施形態では、典型的に、CD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺、およびFoxP3⁺を発現する調節性T細胞を、濃縮または陽性選択することが所望でありうる。代替的に、ある特定の実施形態では、調節性T細胞を、抗CD25コンジュゲートビーズまたは他の同様の選択法により枯渇させることができる。

【0221】

陽性選択または陰性選択により、所望の細胞集団を単離するために、細胞の濃度および表面 (例えば、ビーズなどの粒子) を変動させることができる。ある特定の実施形態では、ビーズと細胞とを、併せて混合する容量を著明に減少させて (すなわち、細胞の濃度を増加させて)、細胞とビーズとの最大の接触を確保することが所望でありうる。例えば、一実施形態では、1ml当たりの細胞20億個の濃度を使用する。一実施形態では、1ml当たりの細胞10億個の濃度を使用する。さらなる実施形態では、1ml当たりの細胞1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個の細胞濃度を使用する。さらに別の実施形態では、1ml当たりの細胞7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個

10

20

30

40

50

の細胞濃度を使用する。さらなる実施形態では、1ml当たりの細胞1億2500万または1億5000万個の濃度を使用しうる。高濃度の使用は、細胞の収量、細胞の活性化、および細胞の拡大増殖の増大を結果としてもたらしうる。さらに、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞、または多くの腫瘍細胞（すなわち、白血病性血液、腫瘍組織など）が存在する試料に由来する細胞など、目的の標的抗原の発現が低度でありうる細胞の、より効率的な捕捉を可能とする。このような細胞集団は、治療的価値を有する可能性があり、得ることが所望であろう。例えば、高細胞濃度の使用は、CD28の発現が通常低度である、CD8⁺T細胞の、より効率的な選択を可能とする。

【0222】

関連する実施形態では、低濃度の細胞を使用することが所望でありうる。T細胞と表面（例えば、ビーズなどの粒子）との混合物を、著明に希釈することにより、粒子と細胞との相互作用を最小化する。これは、粒子に結合する、高量の所望の抗原を発現する細胞を選択する。例えば、CD4⁺T細胞は、高レベルのCD28を発現し、希釈濃度のCD8⁺T細胞より効率的に捕捉される。一実施形態では、使用される細胞濃度は、1ml当たりの細胞5×10⁶個である。他の実施形態では、使用される濃度は、1ml当たりの細胞約1×10⁵個～1ml当たりの細胞1×10⁶個、およびこれらの間の任意の整数値である。

10

【0223】

他の実施形態では、細胞は、速度を変動させて、2～10または室温で、長さを変動させる時間にわたり、ローター上でインキュベートすることができる。

20

【0224】

刺激されるT細胞はまた、洗浄ステップの後で、凍結させることもできる。血漿および血小板を除去する洗浄ステップの後で、細胞を、凍結用溶液中に懸濁させることができる。当技術分野では、多くの凍結用溶液および凍結パラメータが公知であり、この文脈でも有用であろうが、1つの方法は、20%のDMSOおよび8%のヒト血清アルブミンを含有するPBS、もしくは10%のデキストラン40および5%のデキストロース、20%のヒト血清アルブミン、ならびに7.5%のDMSOを含有する培養培地、もしくは31.25%のPlasmalyte-A、31.25%のデキストロース5%、0.45%のNaCl、10%のデキストラン40および5%のデキストロース、20%のヒト血清アルブミン、ならびに7.5%のDMSO、または例えば、HespanおよびPlasmalyte-Aを含有する、他の適切な細胞凍結用培地の使用を伴い、次いで、細胞を、1分間当たり1¹の速度で、-80へと凍結させ、液体窒素保管タンクの蒸気相中で保存する。制御型凍結の他の方法を使用しうるほか、-20または液体窒素中における速やかな非制御型凍結も使用しうる。

30

【0225】

ある特定の実施形態では、凍結保存された細胞を、本明細書で記載される通りに、融解させ、洗浄し、本発明の方法を使用する活性化の前に、室温で、1時間にわたり休眠させる。

【0226】

ある特定の実施形態ではまた、本明細書で記載される拡大増殖細胞が必要とされうる時点の前の期間における、対象からの血液試料またはアフェレーシス生成物のコレクションも提供される。したがって、拡大増殖させる細胞の供給源は、任意の必要な時点において回収することができ、T細胞など、所望の細胞を、本明細書で記載されるT細胞療法などのT細胞療法から利益を得る、任意の数の疾患または状態のためのT細胞療法におけるその後の使用のために、単離し、凍結させることができる。一実施形態では、血液試料またはアフェレーシスを、一般に、健常対象から採取する。ある特定の実施形態では、血液試料またはアフェレーシスを、一般に、疾患を発症する危険性があるが、疾患をいまだ発症していない健常対象から採取し、目的の細胞を、その後の使用のために単離し、凍結させる。ある特定の実施形態では、T細胞を、その後の時点において、拡大増殖させ、凍結させ、使用することができる。ある特定の実施形態では、試料を、患者から、本明細書で記

40

50

載される特定の疾患についての診断の直後であるが、任意の処置の前ににおいて回収する。さらなる実施形態では、細胞を、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法、放射線、シクロスボリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸塩、およびFK506などの免疫抑制剤、抗体、またはCAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスボリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、および照射など、他の免疫除去剤などの薬剤による処置を含むがこれらに限定されない、任意の数の妥当な処置モダリティーの前に、対象に由来する血液試料またはアフェレーシスから単離する。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼである、カルシニューリン（シクロスボリンおよびFK506）を阻害するか、または、増殖因子誘導性シグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）（Liu et al., Cell 66:807-815, (1991)、Henderson et al., Immun 73:316-321, (1991)、Bierer et al., Curr. Opin. Immun 5:763-773, (1993)）。さらなる実施形態では、細胞を、患者のために単離し、骨髄移植または幹細胞移植、フルダラビンなどの化学療法剤、外部ビーム放射線療法（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体を使用するT細胞除去療法を伴う（例えば、この前に、これと同時に、またはこの後で）その後の使用のために凍結させる。別の実施形態では、細胞を、あらかじめ単離し、CD20と反応する薬剤、例えば、RituxanなどのB細胞除去療法の後における処置のためのその後の使用のために凍結させることができる。

【0227】

本発明の、さらなる実施形態では、T細胞を、処置後における患者から直接得る。この点で、ある特定のがん処置、特に、免疫系を損なう薬物による処置の後であって、患者が通常、処置から回復する期間中の、処置の直後である、処置の後において、得られるT細胞の品質は、最適でありうるか、またはex vivoにおいて拡大増殖するそれらの能力について改善されうることが観察されている。同様に、本明細書で記載される方法を使用する、ex vivoにおける改変の後、これらの細胞は、生着の延長、およびin vivoにおける拡大増殖に好ましい状態でありうる。したがって、本発明の文脈内では、この回復期において、T細胞、樹状細胞、または他の造血系列の細胞を含む血液細胞を回収することが想定される。さらに、ある特定の実施形態では、動員（例えば、GM-CSFによる動員）レジメンおよびコンディショニングレジメンを使用して、対象において、とりわけ、治療後における規定された時間窓において、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生、および/またはぞうが好適となる条件を創出することができる。例示的な細胞型は、T細胞、B細胞、樹状細胞、および免疫系の他の細胞を含む。

【0228】

T細胞の活性化および拡大増殖

本明細書で記載されるCARを発現するように、T細胞を改変する前であれ、この後であれ、T細胞は、例えば、米国特許第6,352,694号明細書、同第6,534,055号明細書、同第6,905,680号明細書、同第6,692,964号明細書、同第5,858,358号明細書、同第6,887,466号明細書、同第6,905,681号明細書、同第7,144,575号明細書、同第7,067,318号明細書、同第7,172,869号明細書、同第7,232,566号明細書、同第7,175,843号明細書、同第5,883,223号明細書、同第6,905,874号明細書、同第6,797,514号明細書、同第6,867,041号明細書、および米国特許出願公開第20060121005号明細書において記載されている方法を一般に使用して、活性化させ、拡大増殖させることができる。

【0229】

一般に、本明細書で記載されるT細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する薬剤、およびT細胞表面上の共刺激分子を刺激するリガンドをそれへと接合させた表面との接触により拡大増殖する。特に、T細胞集団は、本明細書で記載される通り、表面上に固定化させた、抗CD3抗体、もしくはこの抗原結合性断片、または抗CD2抗体との

10

20

30

40

50

接触、あるいはカルシウムイオノフォアを伴う、タンパク質キナーゼC活性化因子（例えば、ブリオスタチン）との接触などにより刺激することができる。T細胞表面上のアクセサリー分子を共刺激するために、アクセサリー分子に結合するリガンドを使用する。例えば、T細胞の集団は、T細胞の増殖を刺激するために適切な条件下で、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。CD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞の増殖を刺激するには、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。抗CD28抗体の例は、9.3、B-T3、XR-CD28（Di a c l o n e、B e s a n c o n、F r a n c e）を含み、当技術分野で一般に公知の他の方法と同様に使用することができる（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)）。

【0230】

ある特定の実施形態では、T細胞のための一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、異なるプロトコールによりもたらされる。例えば、各シグナルをもたらす薬剤は、溶液中とする場合もあり、表面へとカップリングさせる場合もある。表面へとカップリングさせる場合、薬剤は、同じ表面へとカップリングさせることもでき（すなわち、「シス」構成）、別個の表面へとカップリングさせることもできる（すなわち、「トランス」構成）。代替的に、1つの薬剤を、表面へとカップリングさせ、他の薬剤を、溶液中とすることもできる。一実施形態では、共刺激シグナルをもたらす薬剤を、細胞表面に結合させ、一次活性化シグナルをもたらす薬剤を、溶液とするか、または表面へとカップリングさせる。ある特定の実施形態では、いずれの薬剤も、溶液中とする。別の実施形態では、薬剤は、可溶性形態であることが可能であり、次いで、Fc受容体もしくは抗体、または薬剤に結合する他の結合剤を発現する細胞などの表面へと架橋される。この点で、本発明における、T細胞の活性化および拡大増殖における使用のために想定される人工抗原提示細胞（a A P C）については、例えば、米国特許出願公開第20040101519号明細書および同20060034810号明細書を参照されたい。

【0231】

一実施形態では、2つの薬剤を、同じビーズ上に、すなわち、「シス」であるか、または別個のビーズへと、すなわち、「トランス」である、ビーズ上に固定化させる。例を目的として述べると、一次活性化シグナルをもたらす薬剤は、抗CD3抗体またはこの抗原結合性断片であり、共刺激シグナルをもたらす薬剤は、抗CD28抗体またはこの抗原結合性断片であり、両方の薬剤を、等分子量で、同じビーズへと、共固定化させる。一実施形態では、CD4⁺T細胞の拡大増殖およびT細胞の増殖のために、ビーズへと結合させた各抗体の、1:1の比を使用する。本発明のある特定の態様では、ビーズへと結合させた抗CD3:CD28抗体の比を、1:1の比を使用して観察される拡大増殖と比較した、T細胞の拡大増殖の増大が観察されるように使用する。特定の一実施形態では、1:1の比を使用して観察される拡大増殖と比較した、約1～約3倍の増大が観察される。一実施形態では、ビーズへと結合させたCD3:CD28抗体の比は、100:1～1:100、およびこれらの間の全ての整数値の範囲である。本発明の一態様では、抗CD3抗体より多くの抗CD28抗体を、粒子へと結合させる、すなわち、CD3:CD28の比は、1未満である。本発明のある特定の実施形態では、抗CD28抗体の、ビーズへと結合させた抗CD3に対する比は、2:1を超える。特定の一実施形態では、ビーズへと結合させたCD3:CD28の、1:100の比を使用する。別の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3:CD28の、1:75の比を使用する。さらなる実施形態では、ビーズへと結合させたCD3:CD28の、1:50の比を使用する。別の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3:CD28の、1:30の比を使用する。複数の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3:CD28の、1:10の比を使用する。別の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3:CD28の、1:3の比を使用する。さらに別の実施形態では、ビーズへと結合させたCD3:CD28の、3:1の比を使用する。

【0232】

10

20

30

40

50

1 : 500 ~ 500 : 1、およびこれらの間の任意の整数値である、粒子の、細胞に対する比を使用して、T細胞または他の標的細胞を刺激することができる。当業者がたやすく理解しうる通り、粒子の、細胞に対する比は、標的細胞と比べた粒子サイズに依存しうる。例えば、小型サイズのビーズが、少数の細胞だけに結合しうるのに対し、大型のビーズは、多くの細胞に結合しうるであろう。ある特定の実施形態では、細胞の、粒子に対する比は、1 : 100 ~ 100 : 1、およびこれらの間の任意の整数値の範囲であり、さらなる実施形態では、比は、1 : 9 ~ 9 : 1、およびこれらの間の任意の整数値を含み、これらもまた、T細胞を刺激するのに使用しうる。抗CD3 / 抗CD28カップリング粒子の、T細胞に対する比であって、T細胞の刺激を結果としてもたらす比は、上記で言及した通り、変動しうるが、ある特定の値は、1 : 100、1 : 50、1 : 40、1 : 30、1 : 20、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、および15 : 1を含み、1つの比は、少なくとも1 : 1の粒子のT細胞に対する比である。一実施形態では、1 : 1またはこれ未満の、粒子の、細胞に対する比を使用する。特定の一実施形態では、粒子 : 細胞比は、1 : 5である。さらなる実施形態では、粒子の、細胞に対する比は、刺激日に応じて変動しうる。例えば、一実施形態では、粒子の、細胞に対する比は、1日目には、1 : 1 ~ 10 : 1であり、さらなる粒子を、細胞へと、その後、最長10日間にわたり、毎日または隔日で追加し、最終的な比を1 : 1 ~ 1 : 10とする（追加日における細胞カウントに基づく）。特定の一実施形態では、粒子の、細胞に対する比は、第1の刺激日には、1 : 1であり、第3の刺激日および第5の刺激日には、1 : 5へと調整される。別の実施形態では、粒子を、1日目における、1 : 1の最終比、ならびに第3の刺激日および第5の刺激日における1 : 5へと、毎日または隔日で追加する。別の実施形態では、粒子の、細胞に対する比は、第1の刺激日には、2 : 1であり、第3の刺激日および第5の刺激日には、1 : 10へと調整される。別の実施形態では、粒子を、1日目における、1 : 1の最終比、ならびに第3の刺激日および第5の刺激日における1 : 10へと、毎日または隔日で追加する。当業者は、様々な他の比も、本発明における使用に適しうることを理解するであろう。特に、比は、粒子のサイズ、ならびに細胞のサイズおよび種類に応じて変動するであろう。

【0233】

本明細書で記載される、さらなる実施形態では、T細胞などの免疫エフェクター細胞を、薬剤コーティングビーズと組み合わせ、その後、ビーズと細胞とを分離し、次いで、細胞を培養する。代替的な実施形態では、培養の前に、薬剤コーティングビーズと、細胞とを分離せず、併せて培養する。さらなる実施形態では、ビーズおよび細胞を、まず、磁力などの力を適用することにより濃縮する結果として、細胞表面マーカーのライゲーションの増加もたらし、これにより、細胞の刺激を誘導する

【0234】

例を目的として述べると、抗CD3および抗CD28を接合させた常磁性ビーズ（3 × 28ビーズ）を、T細胞に接触させることにより、細胞表面タンパク質をライゲーションさせることができる。一実施形態では、細胞（例えば、T細胞10⁴ ~ 10⁹個）と、ビーズ（例えば、比を1 : 1とする、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3 / CD28 T常磁性ビーズ、またはMiltenyi Biotech製のMACS（登録商標）MicroBeads）とを、緩衝液中、例えば、PBS（カルシウムおよびマグネシウムなどの二価カチオンを伴わない）中で組み合わせる。ここでもまた、当業者は、任意の細胞濃度を使用しうることをたやすく理解することができる。例えば、標的細胞は、試料中で極めて稀であり、試料のうちの0.01%だけを含む場合もあり、全試料（すなわち、100%）が、目的の標的細胞を含む場合もある。したがって、任意の細胞数が、本発明の文脈内にある。ある特定の実施形態では、粒子と細胞とを、併せて混合する容量を著明に減少させて（すなわち、細胞の濃度を増大させて）、細胞と粒子との最大の接触を確保することが所望でありうる。例えば、一実施形態では、約1m1当たりの細胞20億個の濃度を使用する。別の実施形態では、1m1当たりの細胞1億個を超える濃度を使

10

20

30

40

50

用する。さらなる実施形態では、1 ml当たりの細胞1 0 0 0万、1 5 0 0万、2 0 0 0万、2 5 0 0万、3 0 0 0万、3 5 0 0万、4 0 0 0万、4 5 0 0万、または5 0 0 0万个の細胞濃度を使用する。さらに別の実施形態では、1 ml当たりの細胞7 5 0 0万、8 0 0 0万、8 5 0 0万、9 0 0 0万、9 5 0 0万、または1億個の細胞濃度を使用する。さらなる実施形態では、1 ml当たりの細胞1億2 5 0 0万または1億5 0 0 0万个の濃度を使用しうる。高濃度の使用は、細胞の収量、細胞の活性化、および細胞の拡大増殖の増大を結果としてもたらしうる。さらに、高細胞濃度の使用は、C D 2 8陰性T細胞など、目的の標的抗原の発現が低度でありうる細胞の、より効率的な捕捉を可能とする。ある特定の実施形態では、このような細胞集団は、治療的価値を有する可能性があり、得ることが所望であろう。例えば、高細胞濃度の使用は、C D 2 8の発現が通常低度である、C D 8⁺T細胞の、より効率的な選択を可能とする。

【0235】

本明細書で記載される一実施形態では、混合物を、数時間（約3時間）～約14日間またはこれらの間の任意の整数値時間にわたり培養することができる。別の実施形態では、混合物を、21日間にわたり培養することができる。本発明の一実施形態では、ビーズおよびT細胞を、併せて、約8日間にわたり培養する。別の実施形態では、ビーズおよびT細胞を、併せて、2～3日間にわたり培養する。T細胞の培養期間が、60日間またはこれを超えるように、数サイクルにわたる刺激もまた、所望でありうる。T細胞の培養に適切な条件は、増殖および生存に必要な因子であって、血清（例えば、ウシ胎仔血清またはヒト血清）、インターロイキン2（IL-2）、インスリン、IFN-ガンマ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF、およびTNF-アルファ、または当業者に公知である、細胞の増殖のための、他の任意の添加剤を含む因子を含有しうる、適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640、またはX-vivo 15（Lonza））を含む。細胞の増殖のための、他の添加剤は、界面活性剤、プラズマネート、およびN-アセチルシステインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤を含むがこれらに限定されない。培地は、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、アルファ-MEM、F-12、X-Vivo 15およびX-Vivo 20、Optimizer、アミノ酸の添加、ピルビン酸ナトリウム、ならびにビタミン、無血清もしくは適量の血清（または血漿）の補充、または規定されたセットのホルモン、ならびに/あるいはT細胞の増殖および拡大増殖に十分な量のサイトカインを含みうる。抗生剤、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験培養物に限り組み入れ、対象へと輸注される細胞培養物には組み入れない。標的細胞は、増殖を支援するのに必要な条件、例えば、適切な温度（例えば、37）および雰囲気（例えば、空気+5%のCO₂）下で維持する。

【0236】

変動させる刺激時間へと曝露されたT細胞は、異なる特徴を呈しうる。例えば、典型的な血液生成物またはアファレーシスされた末梢血単核細胞生成物は、細胞傷害性T細胞集団またはサブレッサーT細胞集団（T_C、CD8⁺）より多くのヘルパーT細胞集団（T_H、CD4⁺）を有する。CD3受容体およびCD28受容体を刺激することによる、ex vivoにおけるT細胞の拡大増殖は、約8～9日目の前には、主にT_H細胞からなるが、約8～9日目の後では、ますます多くのT_C細胞の集団を含むT細胞の集団をもたらす。したがって、処置の目的に応じて、対象に、主にT_H細胞を含むT細胞集団を輸注することも、有利でありうる。同様に、T_C細胞の抗原特異的サブセットを単離した場合、このサブセットを、より大きな程度で拡大増殖させることが有益でありうる。

【0237】

さらに、CD4マーカーおよびCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーも、著明に変動するが、大部分は、細胞拡大増殖工程の経過中において、再現可能な形で変動する。したがって、このような再現性は、特殊な目的のためのT細胞生成物の活性化を調整する能力を可能とする。

【0238】

10

20

30

40

50

場合によって、実施形態の免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）を、A a P C (activating and propagating cell)と共に共培養して、細胞の拡大増殖を支援する。A a P Cはまた、人工抗原提示細胞（a A P C）と称することもできる。例えば、抗原提示細胞（A P C）は、実施形態の治療用組成物および細胞療法用生成物の調製において有用である。一態様では、A a P Cは、トランスジェニックK562細胞でありうる。抗原提示系の調製および使用に関する、一般的な指針については、例えば、それらの各々が参照により組み込まれる、米国特許第6,225,042号明細書、同第6,355,479号明細書、同第6,362,001号明細書、および同第6,790,662号明細書、米国特許出願公開第2009/0017000号明細書および同第2009/0004142号明細書、ならびに国際公開第2007/103009号パンフレットを参照されたい。実施形態についてのなおさらなる態様では、トランスジェニックC A R細胞の培養は、C A Rを発現する免疫エフェクター細胞の拡大増殖を刺激する、樹状細胞またはA a P C (activating and propagating cell)の存在下で、トランスジェニックC A R細胞を培養することを含む。なおさらなる態様では、A a P Cは、A a P Cの表面上で発現したC A R結合性抗体またはこの断片を含む。A a P Cは、場合によって、T細胞を活性化させるかまたは共刺激する、さらなる分子を含みうる。さらなる分子は、場合によって、膜結合型C サイトカインを含みうる。なおまださらなる態様では、A a P Cは、不活化させているかもしくは照射されているか、または感染性物質について調べられ、これを含まないことが確認されている。なおさらなる態様では、A a P Cの存在下におけるトランスジェニックC A R細胞の培養は、I L - 15、I L - 21、および/またはI L - 2などの可溶性サイトカインを含む培地中で、トランスジェニックC A R細胞を培養することを含む。細胞を、約10:1～約1:10、約3:1～約1:5、約1:1～約1:3（免疫エフェクター細胞対A a P C）、またはこの中で導出可能な任意の範囲の比で培養することができる。例えば、T細胞およびA a P Cの共培養は、約1:1、約1:2または約1:3の比でありうる。

【0239】

一態様では、A a P Cは、C D 137 Lを発現しうる。他の態様では、A a P Cは、C D 19、C D 64、C D 86、またはm I L 15をさらに発現しうる。ある特定の態様では、A a P Cは、例えば、O K T 3および/またはU C H T 1など、少なくとも1つの抗C D 3抗体クローニングを発現しうる。一態様では、A a P Cは、不活化させる（例えば、照射する）ことができる。一態様では、A a P Cは、感染性物質について調べられ、これを含まないことが確認されている場合がある。当技術分野では、このようなA a P Cを作製するための方法が公知である。一態様では、A a P Cを伴うC A R改变T細胞集団の培養は、細胞を、約10:1～約1:10、約3:1～約1:5、約1:1～約1:3（T細胞対A a P C）、またはこの中で導出可能な任意の範囲の比で培養することを含みうる。例えば、T細胞およびA a P Cの共培養は、約1:1、約1:2または約1:3の比でありうる。一態様では、培養するステップは、アミノビスホスホネート（例えば、ゾレドロン酸）と共に培養することをさらに含みうる。

【0240】

さらなる態様では、トランスジェニックC A R細胞の集団を、7、14、21、28、35、42日間、49、56、63、または70日間を超えない日数にわたり培養および/または刺激する。ある実施形態では、刺激は、トランスジェニックC A R T細胞の、A a P Cとの共培養であって、C A R陽性T細胞の増殖を促進する共培養を含む。別の態様では、トランスジェニックC A R細胞の集団を、刺激1回、刺激2回、刺激3回、刺激4回、刺激5回、刺激5回、刺激6回、刺激7回、刺激8回、刺激9回、または刺激10回を超えない回数にわたり刺激する。場合によって、トランスジェニック細胞を、A a P Cの存在下にあるe x v i v oでは培養しない。一部の特殊な場合には、実施形態の方法は、トランスフェクションステップおよび/または培養するステップの後で、細胞集団を、C A Rを発現する免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）について濃縮するステップをさらに含む。濃縮するステップは、蛍光活性化細胞分取（F A C S）と、C A Rを発

10

20

30

40

50

現する細胞について分取することを含みうる。さらなる態様では、CARを発現する細胞について分取することは、CAR結合性抗体の使用を含む。濃縮するステップはまた、CD56+細胞の枯渇も含みうる。実施形態についての、なおまださらなる態様では、方法は、トランスジェニックCAR細胞の集団についての凍結保存試料をさらに含む。

【0241】

場合によって、AaPCを、さらなるプロセシングを伴わずに、ペプチドの、MHC分子との直接的な結合を可能とする、最適な長さのペプチドと共にインキュベートする。代替的に、細胞は、目的の抗原（すなわち、MHC非依存型の抗原認識の場合）を発現しうる。さらに、場合によって、APCは、特異的なCARポリペプチドまたは一般的なCARポリペプチド（例えば、uAaPC（universal activating and propagating cell））に結合する抗体を発現しうる。このような方法については、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2014/190273号パンフレットにおいて開示されている。ペプチド-MHC分子または目的の抗原に加えて、AaPC系はまた、少なくとも1つの外因性支援分子も含みうる。任意の適切な数および組合せの支援分子を利用することができる。支援分子は、共刺激分子および接着分子などの支援分子から選択することができる。例示的な共刺激分子は、CD70およびB7.1（B7.1は、かつては、B7として公知であり、また、CD80としても公知であった）を含み、これらは、とりわけ、T細胞の表面上のCD28分子および/またはCTLA-4分子に結合し、これにより、例えば、T細胞の拡大増殖、Th1の分化、短期的なT細胞の生存、およびインターロイキン(IL)2など、サイトカインの分泌に影響を及ぼす。接着分子は、セレクチンなどの炭水化物結合性糖タンパク質、インテグリンなどの膜貫通結合生糖タンパク質、カドヘリンなどのカルシウム依存性タンパク質、および例え、細胞間または細胞-マトリックス間の接触を促進する、細胞間接着分子(ICAM)などの、1回膜貫通免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリータンパク質を含みうる。例示的な接着分子は、LFA-3およびICAM-1などのICAM、を含む。共刺激分子および接着分子を含む、例示的な支援分子の選択、クローニング、調製、および発現に有用な技法、方法、および試薬については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,225,042号明細書、同第6,355,479号明細書、および同第6,362,001号明細書において例示されている。

【0242】

AaPCとなるように選択される細胞は、好ましくは、細胞内抗原プロセシング、細胞内ペプチドトラフィッキング、および/またはMHCクラスI分子もしくはクラスII分子の細胞内ペプチドローディングを欠損させているか、あるいは。変温性（すなわち、哺乳動物細胞株より、温度刺激に対する感受性が小さい）であるか、あるいは欠損および変温特性の両方を有する。好ましくは、AaPCとなるように選択される細胞はまた、細胞へと導入される、外因性のMHCクラスI分子またはクラスII分子、および支援分子の構成要素に対する、少なくとも1つの内因性対応物（例えば、内因性のMHCクラスI分子もしくはクラスII分子、および/または上記で記載した内因性支援分子）を発現する能力も欠く。さらに、AaPCは、AaPCを作出するための、それらの改変の前に、細胞が保有していた欠損および変温特性を保持することが好ましい。例示的なAaPCは、昆虫細胞株など、TAP（transporter associated with antigen processing）欠損細胞株を構成するか、またはこれに由来する。例示的な変温性昆虫細胞株は、Schneider 2細胞株などのショウジョウバエ（Drosophila）属細胞株（例えば、Schneider 1972を参照されたい）である。Schneider 2細胞の調製、増殖、および培養のための例示的な方法は、米国特許第6,225,042号明細書、同第6,355,479号明細書、および同第6,362,001号明細書において提示されている。

【0243】

一実施形態ではまた、AaPCを、凍結融解サイクルにもかける。例示的な凍結融解サイクルでは、凍結が、迅速に生じるように、AaPCを含有する、適切なレセプタクルを

10

20

30

40

50

、適量の液体窒素、固体二酸化炭素（すなわち、ドライアイス）、または同様の低温材料と接触させることにより、A a P Cを凍結させることができる。次いで、凍結させたA P Cを、A a P Cの、低温材料からの摘出、および周囲の室温条件への曝露により、または微温水浴もしくは手の温熱を利用して、融解時間の短縮を促進する、促進融解工程により融解させる。加えて、融解の前に、A a P Cを、凍結させ、長f時間にわたり保存することができる。凍結させたA a P Cはまた、融解させ、次いで、さらなる使用の前に、凍結乾燥させることもできる。好ましくは、ジメチルスルホキシド（D M S O）、ポリエチレングリコール（P E G）、および他の保存剤など、凍結融解手順に有害な影響を及ぼしうる保存剤は、凍結融解サイクルを経るA a P Cを含有する培地には非含有とするか、またはこのような保存剤を本質的に欠く培地へのA a P Cの導入などにより、本質的に除去する。

10

【 0 2 4 4 】

さらなる実施形態では、不活化の後で、細胞の増殖、複製、または核酸の発現が本質的に生じないように、異種核酸およびA a P Cに内因性の核酸を、架橋により不活化させることができる。一実施形態では、A a P Cを、外因性M H Cおよび支援分子の発現、このような分子の、A a P C表面上の提示、ならびに提示されたM H C分子への、選択された、1または複数のペプチドのローディングの後の時点において不活化させる。したがって、このような、選択されたペプチドをロードした不活化A a P Cは、増殖または複製が本質的に不可能とされているが、選択されたペプチドの提示機能は保持する。好ましくは、架橋はまた、A a P Cの抗原提示細胞機能を、実質的に低下させずに、細菌およびウイルスなどの汚染微生物を本質的に含まない、A a P Cももたらす。したがって、架橋は、A a P Cを使用して開発される細胞療法製品の安全性に関する懸念を軽減する一助となる一方、重要なA a P C機能を維持する。架橋およびA a P Cに関する方法については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20090017000号明細書を参照されたい。

20

【 0 2 4 5 】

ある特定の実施形態では、改変抗原提示細胞（A P C）がさらに提供される。e x v i v oにおいて、免疫エフェクター細胞を繁殖させるのに、このような細胞を、例えば、上記で記載した通りに使用することができる。さらなる態様では、改変A P C自体を、患者へと投与し、これにより、i n v i v oにおける免疫エフェクター細胞の拡大増殖を刺激することができる。実施形態の改変A P C自体を、治療剤として使用することができる。他の実施形態では、改変A P Cを、標的抗原に特異的な内因性免疫エフェクター細胞の活性化を刺激し、かつ／または標的抗原に特異的な、養子導入された免疫エフェクター細胞の活性を増加させるか、もしくは存続を延長しうる治療剤として使用することができる。

30

【 0 2 4 6 】

本明細書で使用される「改変A P C」という用語は、少なくとも第1のトランス遺伝子を含み、第1のトランス遺伝子が、H L Aをコードする細胞を指す。このような改変A P Cは、抗原が、H L Aと複合したA P Cの表面上に提示されるように、抗原の発現のための第2のトランス遺伝子をさらに含みうる。一部の態様では、改変A P Cは、抗原を提示した細胞型（例えば、樹状細胞）でありうる。さらなる態様では、改変A P Cは、T細胞またはT細胞の前駆細胞など、通常、抗原を提示しない細胞型（「T - A P C」と称する）から作製することができる。したがって、一部の態様では、実施形態の改変A P Cは、H L Aが、標的抗原のエピトープと複合した改変A P Cの表面上で発現するように、標的抗原をコードする第1のトランス遺伝子と、ヒト白血球抗原（H L A）をコードする第2のトランス遺伝子とを含む。ある特定の具体的な態様では、改変A P C内で発現するH L Aは、H L A - A 2である。

40

【 0 2 4 7 】

一部の態様では、実施形態の改変A P Cは、共刺激分子をコードする、少なくとも第3のトランス遺伝子をさらに含みうる。共刺激分子は、膜結合型C サイトカインでありう

50

る、共刺激サイトカインでありうる。ある特定の態様では、共刺激サイトカインは、膜結合型IL-15などのIL-15である。一部のさらなる態様では、改変APCは、編集（または欠失）遺伝子を含みうる。例えば、PD-1、LIM-3、CTLA-4、またはTCRなどの阻害性遺伝子は、遺伝子の発現を低減するかまたは消失させるように編集することができる。実施形態の改変APCは、任意の目的の標的抗原をコードするトランス遺伝子をさらに含みうる。例えば、標的抗原は、感染性疾患抗原または腫瘍関連抗原（TAA）でありうる。

【0248】

本開示の一実施形態では、本明細書で記載される免疫エフェクター細胞を、ポイントオブケア施設において改変する。場合によって、ポイントオブケア施設は、対象の近傍の病院または機関（例えば、医療機関）にある。場合によって、免疫エフェクター細胞を、キメラ受容体および/またはサイトカインを、免疫エフェクター細胞へと改変/導入することにより改変し、次いで、対象へと、迅速に輸注する。一部の実施形態では、このような免疫エフェクター細胞を、電気穿孔を介して、本明細書で記載されるベクターにより改変する。他の実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターの場合もあり、ウイルスベクターの場合もある。1つの場合には、非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポゾン系を含む。場合によって、改変免疫エフェクター細胞は、繁殖ステップおよび活性化ステップを経ない。場合によって、改変免疫エフェクター細胞は、インキュベーションステップまたは培養するステップを経ない。他の場合には、キメラ受容体およびサイトカインを、前記免疫エフェクター細胞へと改変/導入することにより、免疫エフェクター細胞を改変し、次いで、対象へと、迅速に輸注する。他の場合には、キメラ受容体およびサイトカインを、前記細胞へと改変/導入することにより、免疫エフェクター細胞を改変し、次いで、対象へと、少なくとも0、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間以内に、迅速に輸注する。他の場合には、キメラ受容体およびサイトカインを、細胞へと改変/導入することにより、NK細胞またはT細胞を改変し、次いで、対象へと、0日間、<1日間、<2日間、<3日間、<4日間、<5日間、<6日間、または<7日間以内に、迅速に輸注する。場合によって、免疫エフェクター細胞の供給源は、同種供給源および自家供給源の両方を含みうる。1つの場合には、免疫エフェクター細胞は、T細胞またはNK細胞でありうる。1つの場合には、キメラ受容体は、CD33 CARでありうる。別の場合には、サイトカインは、mbIL-15でありうる。別の場合には、CD33 CARを発現する免疫エフェクター細胞は、HER1tタグまたはHER1t-1タグを含みうる。別の場合には、HER1tタグは、配列番号32もしくは54、またはこれらの変異体もしくは断片を含みうる。1つの場合には、mbIL-15は、配列番号37、またはこの変異体もしくは断片によるmbIL-15である。別の場合には、mbIL-15はまた、HER1tタグまたはHER1t-1タグも含みうる。さらに別の場合には、CD33 CARおよび/またはmbIL-15の発現を、本明細書で記載される遺伝子スイッチ発現系によりモジュレートする。

【0249】

治療的適用

本明細書の複数の実施形態では、レンチウイルスベクター(LV)により形質導入された免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）について記載される。例えば、LVは、CD33の抗原認識ドメインを、CD8アルファヒンジのストークドメインおよびこの変異体、CD3ゼータの細胞内ドメイン、CD28、4-1BB、またはこれらの任意の組合せとCD3ゼータの細胞内ドメインを組み合わせるCARをコードする。したがって、場合によって、形質導入されたT細胞は、CAR媒介性T細胞応答を誘発しうる。

【0250】

本明細書で記載される複数の実施形態では、初代T細胞の特異性を、CD33腫瘍抗原へとリダイレクトするCARの使用が提示される。したがって、本発明はまた、哺乳動物における、標的細胞集団または標的組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための

10

20

30

40

50

方法であって、哺乳動物へと、CARを発現するT細胞を投与するステップを含み、CARが、CD33、ストークドメイン、例えば、ヒトCD3ゼータの細胞内ドメインを含むゼータ鎖部分、および共刺激シグナル伝達領域と、特異的に相互作用する結合性部分を含む、方法も提供する。

【0251】

一実施形態では、本開示は、本発明のCD33特異的CARを発現するように、T細胞を、遺伝子改変し、CAR-T細胞を、それを必要とするレシピエントへと輸注する種類の細胞療法を含む。輸注された細胞は、レシピエントにおける腫瘍細胞を死滅させることができある。抗体療法と異なり、CAR-T細胞は、in vivoにおいて複製される結果として、持続的な腫瘍のコントロールをもたらしうる、長期にわたる存続をもたらすことが可能である。

10

【0252】

一実施形態では、本明細書で記載されるCAR-T細胞は、in vivoにおける、口バストなT細胞の拡大増殖を経ることが可能であり、長期間にわたり存続しうる。別の実施形態では、本発明のCAR-T細胞は、さらなる腫瘍の形成または増殖を阻害するよう再活性化させうる、特異的メモリーT細胞へと進化する。

【0253】

本明細書で記載されるCAR改変T細胞はまた、ex vivoにおける免疫化および/または哺乳動物のin vivoにおける治療のための、ある種のワクチンとしても用いられうる。複数の実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。ex vivoにおける免疫化に関して述べると、i) 細胞の拡大増殖、ii) CARをコードする核酸の、細胞への導入、および/またはiii) 細胞の凍結保存のうちの少なくとも1つを、in vitroにおいて行ってから、免疫エフェクター細胞を、哺乳動物へと投与する。

20

【0254】

ex vivoにおける手順は、周知であり、下記で、より完全に論じられる。略述すると、細胞を、哺乳動物（例えば、ヒト）から単離し、本明細書で開示されるCARを発現させるベクターにより、遺伝子改変する（すなわち、in vitroにおいて形質導入またはトランスフェクトする）。CAR改変細胞を、哺乳動物レシピエントへと投与して、治療的利益をもたらすことができる。哺乳動物レシピエントは、ヒトであることが可能であり、CAR改変細胞は、レシピエントに対して、自家でありうる。代替的に、細胞は、レシピエントに対して、同種の場合もあり、同系の場合もあり、異種の場合もある。

30

【0255】

造血幹細胞および造血前駆細胞の、ex vivoにおける拡大増殖のための手順については、参考により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,199,942号明細書において記載されており、本発明の細胞へと適用することができる。当技術分野では、他の適切な方法も公知であり、したがって、本発明は、細胞のex vivoにおける拡大増殖の、任意の特定の方法に限定されない。略述すると、ex vivoにおける、T細胞の培養および拡大増殖は、(1) CD34+の造血幹細胞および造血前駆細胞を、哺乳動物の末梢血採取物または骨髄外植物から回収することと、(2)このような細胞を、ex vivoにおいて拡大増殖させることとを含む。米国特許第5,199,942号明細書において記載されている細胞的増殖因子に加えて、flt3-L、IL-1、IL-3、およびc-kitリガンドなど、他の因子も、細胞を培養および拡大増殖させるために使用することができる。

40

【0256】

ex vivoにおける免疫化の点で、細胞ベースのワクチンを使用することに加えて、本発明はまた、患者における抗原に対して方向付けられた免疫応答を誘発する、in vivoにおける免疫化のための組成物および方法も提供する。

【0257】

一般に、本明細書で記載される通りに活性化させ、拡大増殖させた細胞は、免疫障害個体において発生する疾患の処置および防止において用いることができる。特に、本発明の

50

C A R 改変 T 細胞を、例えば、急性骨髓性白血病 (A M L) など、骨髓性悪性腫瘍の処置において使用する。本発明の、ある特定の実施形態では細胞を、 A M L を発症する危険性がある患者の処置において使用する。したがって、本発明は、 A M L を、処置または予防するための方法であって、それを必要とする対象へと、治療有効量の、本発明の C A R 改変 T 細胞を投与するステップを含む方法を提供する。複数の実施形態では、本明細書で記載される通りに活性化させ、拡大増殖させた細胞は、再発性または難治性 A M L の処置において用いることができる。

【 0 2 5 8 】

略述すると、本発明の医薬組成物は、本明細書で記載される標的細胞集団を、 1 または複数の、薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて含みうる。このような組成物は、中性緩衝生理食塩液、リン酸緩衝生理食塩液などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤； E D T A またはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および保存剤を含みうる。複数の実施形態では、本発明の組成物を、静脈内投与のために製剤化する。

10

【 0 2 5 9 】

本明細書で記載される医薬組成物は、処置される（または予防される）疾患に適切な形で投与することができる。投与の数量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患の種類および重症度などの因子により決定されるが、適切な投与量は、臨床試験により決定することができる。

20

【 0 2 6 0 】

「免疫有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」を指し示す場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍のサイズ、感染または転移の程度、および状態の個体差を考慮して、医師により決定されうる。一般に、本明細書で記載される T 細胞を含む医薬組成物は、これらの範囲内の全ての整数値を含む、体重 1 k g 当たりの細胞 $10^4 \sim 10^9$ 個、体重 1 k g 当たりの細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個の投与量で投与しうることが言明されうる。 T 細胞組成物はまた、これらの投与量で、複数回にわたり投与することもできる。細胞は、免疫療法において一般に公知の輸注法を使用することにより投与することができる（例えば、 Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676 (1988) を参照されたい）。特定の患者に最適な投与量および処置レジメは、医療技術分野における当業者が、患者を、疾患の徴候についてモニタリングし、これに応じて、処置を調整することにより、たやすく決定しうる。

30

【 0 2 6 1 】

ある特定の実施形態では、活性化 T 細胞を、対象へと投与し、次いで、その後、再採血し（またはアフェレーシスを実施し）、本発明に従い、これに由来する T 細胞を活性化させ、患者に、これらの活性化させ、拡大増殖させた T 細胞を再輸注することが所望されうる。この工程は、数週間ごとに、複数回にわたり実行することができる。ある特定の実施形態では、 T 細胞を、 10 c c ~ 400 c c の採血物から活性化させることができる。ある特定の実施形態では、 T 細胞を、 20 c c 、 30 c c 、 40 c c 、 50 c c 、 60 c c 、 70 c c 、 80 c c 、 90 c c 、または 100 c c の採血物から活性化させることができる。理論に束縛されずに述べると、この複数回にわたる採血 / 複数回にわたる再輸注のプロトコールの使用は、ある特定の T 細胞集団を選び出すのに用いられうる。別の実施形態では、放射線または化学療法を介する、患者のリンパ枯渇後に、対象組成物である活性化 T 細胞を投与することが所望されうる。

40

【 0 2 6 2 】

本明細書で記載される組成物の投与は、エアゾール吸入、注射、内服、移入、植込み、または移植を含む、任意の好都合な形で実行することができる。本明細書で記載される組成物は、患者へと、皮下投与、皮内投与、腫瘍内投与、リンパ節内投与、骨髓内投与、筋内投与、静脈内（ i . v . ）注射、または腹腔内投与することができる。一実施形態では

50

、本発明のT細胞組成物を、患者へと、皮内注射または皮下注射により投与する。別の実施形態では、本発明のT細胞組成物を、i.v.注射により投与する。T細胞組成物は、腫瘍、リンパ節、または感染部位へと、直接注射することができる。

【0263】

患者へと投与される、上記の処置の投与量は、処置される状態および処置のレシピエントの正確な性質と共に変動するであろう。ヒト投与のための投与量のスケーリングは、当技術分野で許容されている慣行に従い実施することができる。例えば、上記の処置用量は、1kg当たりのCAR+細胞 1×10^4 個～1kg当たりのCAR+細胞 5×10^6 個の範囲でありうる。例示的な用量は、1kg当たりのCAR+細胞 1×10^4 個、1kg当たりのCAR+細胞 1×10^5 個、1kg当たりのCAR+細胞 3×10^5 個、1kg当たりのCAR+細胞 1×10^6 個、または1kg当たりのCAR+細胞 5×10^6 個でありうる。したがって、適切な用量は、成人患者のために調整することもでき、小児患者のために調整することもできる。

【0264】

代替的に、哺乳動物（例えば、ヒト）へと投与される免疫エフェクター細胞の典型的な量は、例えば、細胞100万～1000億個の範囲でありうるが、この例示的な範囲を下回るか、または上回る量も、本発明の範囲内にある。例えば、本発明の宿主細胞の用量は、細胞約100万～約500億個（例えば、細胞約500万個、細胞約2500万個、細胞約5億個、細胞約10億個、細胞約50億個、細胞約200億個、細胞約300億個、細胞約400億個、または前出の値のうちのいずれか2つにより規定される範囲）、細胞約1000万～約1000億個（例えば、細胞約2000万個、細胞約3000万個、細胞約4000万個、細胞約6000万個、細胞約7000万個、細胞約8000万個、細胞約9000万個、細胞約100億個、細胞約250億個、細胞約500億個、細胞約750億個、細胞約900億個、または前出の値のうちのいずれか2つにより規定される範囲）、細胞約1億個～細胞約500億個（例えば、細胞約1億2000万個、細胞約2億5000万個、細胞約3億5000万個、細胞約4億5000万個、細胞約6億5000万個、細胞約8億個、細胞約9億個、細胞約30億個、細胞約300億個、細胞約450億個、または前出の値のうちのいずれか2つにより規定される範囲）でありうる。

【0265】

治療有効性または予防有効性は、処置された患者についての、定期的な評価によりモニタリングすることができる。数日間またはこれを超える反復投与のために、状態に応じて、疾患症状の所望の抑制が生じるまで、処置を反復する。しかし、他の投与量レジメンが有用な場合もあり、本発明の範囲内にある。所望の投与量は、組成物の単回のボーラス投与により送達することもでき、組成物の複数回のボーラス投与により送達することもでき、組成物の連続輸注投与により送達することもできる。

【0266】

開示される核酸配列、またはこれらの核酸配列を含むベクターを発現する免疫エフェクター細胞を含む組成物は、哺乳動物へと共投与されうる、1または複数のさらなる治療剤と共に投与することができる。「～を共投与すること」とは、1もしくは複数のさらなる治療剤と、本発明の宿主細胞もしくは本発明のベクターを含む組成物とを、1もしくは複数のさらなる治療剤の効果を増強するのに十分に近接した時点において投与すること、またはこの逆を意味する。この点で、本明細書で記載される免疫エフェクター細胞、または本明細書で記載されるベクターを含む組成物を、1または複数のさらなる治療剤と同時に投与することもでき、これを第1に投与し、1または複数のさらなる治療剤を、第2に投与することもでき、この逆にすることもできる。代替的に、開示される免疫エフェクター細胞、または本明細書で記載されるベクターを含む組成物と、1または複数のさらなる治療剤とは、同時に投与することもできる。

【0267】

本発明の宿主細胞および/または本発明のベクターを含む組成物中に含まれている（またはキット内に含まれている）か、またはこれらと共に共投与されるうる治療剤の例は、

10

20

30

40

50

インターロイキン、サイトカイン、インターフェロン、アジュvant、および化学療法剤である。複数の実施形態では、さらなる治療剤は、IFN-アルファ、IFN-ベータ、IFN-ガンマ、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、LT-ベータ、TNF-アルファ、増殖因子、およびhGH、ヒトToll様受容体である、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、およびTLR10のリガンドである。

【0268】

Bc1-2阻害剤、STAT3阻害剤、またはSTAT5阻害剤もまた、組成物中に含まれているか、またはこれと共に共投与される（またはキット内に含まれている）。がん細胞は、Bc1-2などの抗アポトーシスタンパク質を過剰発現する場合もあり、天然のアポトシスメディエーターまたは薬理学的薬剤に対する、異常に高度な耐性を結果としてもたらす経路（すなわち、STAT5およびSTAT3）の活性化を遷延させている場合もある。薬物療法の手法と、免疫療法の手法とを組み合わせて、1つを超えるアポトーシス経路を用いることは、腫瘍細胞死を増加させ、治療に対する耐性を減少させることが想定される。低分子阻害剤の使用は、腫瘍細胞内の、アポトシス促進分子と、抗アポトシス分子との均衡を、腫瘍細胞を、死へと感作するか、または腫瘍特異的T細胞との遭遇時における殺滅への耐性を減少させる程度に十分にシフトさせうる。Bc1-2発現の上昇は、急性骨髓性白血病（AML）および慢性リンパ球性白血病（CLL）などの血液悪性腫瘍、および充実性腫瘍（すなわち、黒色腫、乳がん、および卵巣がん）において見出されている。STAT3またはSTAT5の活性化の遷延は、AML、CLL、慢性骨髓性白血病、大型顆粒リンパ球性白血病、および白血病細胞株において観察されている。Bc1-2、STAT3、またはSTAT5をターゲティングする低分子阻害剤は、本発明の組成物中に含まれており、これと共に共投与され、かつ/またはこれと共に共培養されることが想定される。1つのb c 1 - 2 阻害剤は、ABT-737である。この化合物は、これらのB c 1 - 2 ファミリータンパク質をターゲティングするが、A 1 またはM c 1 - 1 はターゲティングしない、BH3模倣低分子阻害剤（SMI）群の一部である。ABT-737は、B c 1 - 2 、B c 1 - x L 、およびB c 1 - w に対するアフィニティーが、顕在的に大きいため、従来のB C L - 2 阻害剤とは異なる。いわゆるBH3模倣薬物である、ABT-199は、慢性リンパ球性白血病を伴う患者における、B c 1 - 2 タンパク質の機能を遮断するようにデザインされている。

【0269】

STAT3阻害剤およびSTAT5阻害剤は、Fagardet al., STAT3 inhibitors for cancer therapy, JAK-STAT, 2:1 (2013), e22882, DOI: 10.4161/jkst.22882およびFurqan, et al., Journal of Hematology & Oncology 2013, 6:90 doi:10.1186/1756-8722-6-90において記載されている、STAT3阻害剤およびSTAT5阻害剤を含むがこれらに限定されない。JAK/STAT経路エフェクターに加えて、負の調節因子の3つの主要なクラス：SOCS（suppressors of cytokine signaling）、PIAS（protein inhibitors of activated stats）、およびPTPも存在する。チロシンホスファターゼは、JAKの活性を無効化する。これらの調節因子のうちで、最もよく特徴づけられているものは、マウスマスイートン遺伝子の産物である、SHP-1である。SHP-1は、2つのSH2ドメインを含有し、リン酸化JAKまたはリン酸化受容体に結合して、これらの活性化シグナル伝達分子の脱リン酸化を容易としうる。CD45など、他のチロシンホスファターゼは、受容体のサブセットを介して、JAK/STATシグナル伝達の調節において役割を果たすと考えられる。したがって、JAK/STAT経路は、本開示の組成物のための薬物標的であることが想定される。

【0270】

「消泡剤」は、加工時における発泡であって、水性分散液の凝固、薄膜完成品中の気泡を結果としてもたらすか、または、一般に、加工を損なう発泡を低減する。例示的な抗発泡剤は、シリコンエマルジョン（silicon emulsion）またはセスキオレ

10

20

30

40

50

イン酸 (sesquoleate) ソルビタンを含む。

【0271】

「抗酸化剤」は、例えば、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、およびトコフェロールを含む。ある特定の実施形態では、抗酸化剤は、必要とされる場合、化学的安定性を増強する。

【0272】

本明細書で記載される製剤は、抗酸化剤、金属キレート化剤、チオールを含有する化合物、および他の一般的な安定化剤から利益を得る場合がある。このような安定化剤の例は、(a) 約0.5%～約2%w/vのグリセロール、(b) 約0.1%～約1%w/vのメチオニン、(c) 約0.1%～約2%w/vのモノチオグリセロール、(d) 約1mM～約10mMのEDTA、(e) 約0.01%～約2%w/vのアスコルビン酸、(f) 0.003%～約0.02%w/vのポリソルベート80、(g) 0.001%～約0.05%w/vのポリソルベート20、(h) アルギニン、(i) ヘパリン、(j) 硫酸デキストラン、(k) シクロデキストリン、(l) ポリ硫酸ペントサン、および他のヘパリノイド、(m) マグネシウムおよび亜鉛などの二価カチオン、または(n) これらの組合せを含むがこれらに限定されない。

10

【0273】

「結合剤」は、凝集性の性質を付与し、例えば、アルギン酸およびその塩；カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース（例えば、Methocel（登録商標））、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース（例えば、Kluceel（登録商標））、エチルセルロース（例えば、Ethocel（登録商標））、および結晶セルロース（例えば、Avicel（登録商標））などのセルロース誘導体；微晶質デキストロース；アミロース；ケイ酸マグネシウムアルミニウム；多糖酸；ペントナイト；ゼラチン；ポリビニルピロリドン／酢酸ビニルコポリマー；クロスポビドン；ポビドン；デンプン；アルファデンプン；トラガント、デキストリン、スクロース（例えば、Dipac（登録商標））、グルコース、デキストロース、糖蜜、マンニトール、ソルビトール、キシリトール（例えば、Xylitol（登録商標））、およびラクトースなどの糖；アカシア、トラガント、ガッティガム、イサポールハスクの粘液、ポリビニルピロリドン（例えば、Polyvidone（登録商標）CL、K011idone（登録商標）CL、Polyplasdone（登録商標）XL-10）、カラマツ由来のアラビノガラクタン(arabogalactan)、Veegum商標)、ポリエチレングリコール、蠍、アルギン酸ナトリウムなどの天然ガムまたは合成ガムを含む。

20

【0274】

「担体」または「担体材料」は、医薬中で一般に使用される任意の賦形剤を含み、イプルチニブおよび抗がん剤の化合物など、本明細書で開示される化合物との適合性、ならびに所望の剤形の放出プロファイル特性に基づき選択されるものとする。例示的な担体材料は、例えば、結合剤、懸濁剤、崩壊剤、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定化剤、滑沢剤、保湿剤、希釈剤などを含む。「薬学的に適合性の担体材料」は、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセロリン酸カルシウム、カルシウム乳酸、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン(PVP)、コレステロール、コレステロールエステル、カゼイン酸ナトリウム、ダイズレシチン、タウロコール酸、ホスファチジルコリン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸二カリウム、セルロースおよびセルロースコンジュゲート、糖、ステアロイル乳酸ナトリウム、カラギーナン、モノグリセリド、ジグリセリド、アルファデンプンなどを含みうるがこれらに限定されない。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995)、Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975、Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980、およびPharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999)を

30

40

50

参照されたい。

【0275】

「分散剤」および／または「粘性モジュレーティング剤」は、液体培地または顆粒化法またはブレンド法を介して、薬物の拡散および均質性を制御する材料を含む。一部の実施形態では、これらの薬剤はまた、コーティングマトリックスまたはエローディングマトリックスの有効性も促進する。例示的な拡散促進剤／分散剤は、例えば、親水性ポリマー、電解質、Tween (登録商標) 60 または Tween (登録商標) 80、PEG、ポリビニルピロリドン (PVP；市販品では、Plasdone (登録商標) として公知である)、and 例え、ヒドロキシプロピルセルロース (例え、HPC、HPC-SL、およびHPC-L)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (例え、HPMC K100、HPMC K4M、HPMC K15M、およびHPMC K100M)、カルボキシメチルセルロースナトリウム (carboxymethylcellulose sodium)、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸酢酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPM CAS)、非晶質セルロースなど、炭水化物ベースの分散剤、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、トリエタノールアミン、ポリビニルアルコール (PVA)、ビニルピロリドン／酢酸ビニルコポリマー (S630)、酸化エチレンおよびホルムアルデヒドを伴う、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)-フェノールポリマー (チロキサポールとしても公知である)、ポロキサマー (例え、酸化エチレンと、酸化プロピレンとのブロックコポリマーである、Pluronics F68 (登録商標)、Pluronics F88 (登録商標)、およびPluronics F108 (登録商標))；およびポロキサミン (例え、酸化プロピレンおよび酸化エチレンの、エチレンジアミンへの逐次的付加から導出される四官能性ブロックコポリマーである、Poloxyamine 908 (登録商標) (BASF Corporation, Parsippany, N.J.) としてもまた公知のTetronic 908 (登録商標))、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、またはポリビニルピロリドンK30、ポリビニルピロリドン／酢酸ビニルコポリマー (S-630)、ポリエチレングリコール (例え、ポリエチレングリコールは、約300～約6000、または約3350～約4000、または約7000～約5400の分子量を有し)、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ポリソルベート80、アルギン酸ナトリウム、例え、トラガントガムおよびアカシアガム、グアルガムなどのガム、キサンタンガムを含むキサンタン、糖、例え、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース誘導体、ポリソルベート80、アルギン酸ナトリウム、モノラウリン酸ポリエトキシル化ソルビタン、モノラウリン酸ポリエトキシル化ソルビタン、ポビドン、カルボマー、ポリビニルアルコール (PVA)、アルギン酸塩、キトサン、およびこれらの組合せを含む。セルロースまたはトリエチルセルロースなどの可塑化剤もまた、分散剤として使用することができる。特に、リポソーム分散液中および自己乳化分散液中で有用な分散剤は、ジミリストイルホスファチジルコリン、鶏卵由来する天然ホスファチジルコリン、鶏卵由来する天然ホスファチジルグリセロール、コレステロール、およびイソプロピルミリスチン酸である。

【0276】

1または複数のエロージョン促進剤の、1または複数の拡散促進剤との組合せもまた、本組成物中で使用することができる。

【0277】

「希釈剤」という用語は、送達の前に、目的の化合物を希釈するのに使用される化合物を指す。希釈剤はまた、より安定的な環境をもたらしするため、化合物を安定化させるのにも使用することができる。当技術分野では、緩衝液中に溶解させた塩 (これはまた、pHの制御または維持ももたらし) を、リン酸緩衝生理食塩液溶液を含むがこれらに限定されない希釈剤として用いる。ある特定の実施形態では、希釈剤は、組成物のバルクを増大させて、圧縮を容易とするか、またはカプセルの充填のための均質なブレンドに十分

10

20

30

40

50

なバルクを創出する。このような化合物は、例えば、ラクトース、デンプン、マンニトール、ソルビトール、デキストロース、Avicel（登録商標）などの結晶セルロース；二塩基性リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム二水和物；リン酸三カルシウム、リン酸カルシウム；無水ラクトース、噴霧乾燥ラクトース；アルファデンプン、Di-Pac（登録商標）（Amstar）などの圧縮糖；マンニトール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸酢酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロースベースの希釈剤、粉砂糖；一塩基性硫酸カルシウム一水和物、硫酸カルシウム二水和物；乳酸カルシウム三水和物、デキストレート（dextrose）；加水分解シリアル固体、アミロース；粉末セルロース、炭酸カルシウム；グリシン、カオリン；マンニトール、塩化ナトリウム；イノシトール、ベントナイトなどを含む。

【0278】

「充填剤」は、ラクトース、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、二塩基性リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、結晶セルロース、セルロース 粉末、デキストロース、デキストレート（dextrose）、デキストラン、デンプン、アルファデンプン、スクロース、キシリトール、ラクチトール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、ポリエチレングリコールなどの化合物を含む。

【0279】

「滑沢剤」および「流動促進剤」とは、材料の接着または摩擦を防止、低減、または阻害する化合物である。例示的な滑沢剤は、例えば、ステアリン酸、水酸化カルシウム、滑石、フマル酸ステアリルナトリウム、鉱物油などの炭化水素、または水素化ダイズ油（Sterotex（登録商標））などの水素化植物油、高脂肪酸、ならびにアルミニウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛など、それらのアルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩、ステアリン酸、ステアリン酸ナトリウム、グリセロール、滑石、蠍、Stearowet（登録商標）、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、ナトリウム酢酸、塩化ナトリウム、ロイシン、ポリエチレングリコール（例えば、PEG-4000）、またはCarbowax（商標）などのメトキシポリエチレングリコール、ナトリウムオレイン酸、安息香酸ナトリウム、ベヘン酸グリセリル、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸マグネシウムまたはラウリル硫酸ナトリウム、Soyloid（商標）、Cabil-O-Sil（登録商標）などのコロイド状シリカ、トウモロコシデンプンなどのデンプン、シリコーン油、界面活性剤などを含む。

【0280】

「可塑化剤」とは、マイクロカプセル化材料を軟化させるのに使用される化合物、またはマイクロカプセル化材料の脆性を低下させるフィルムコーティングである。適切な可塑化剤は、例えば、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350、およびPEG 800などのポリエチレングリコール、ステアリン酸、プロピレングリコール、オレイン酸、トリエチルセルロース、およびトリアセチンを含む。一部の実施形態では、可塑化剤はまた、分散剤または保湿剤としても機能しうる。

【0281】

「可溶化剤」は、トリアセチン、クエン酸トリエチル、オレイン酸エチル、カプリル酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、ナトリウムドクセート（doccussate）、ビタミンE TPGS、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、N-ヒドロキシエチルピロリドン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、エタノール、n-ブタノール、イソプロピルアルコール、コレステロール、胆汁塩、ポリエチレングリコール200～600、グリコフロール、トランスクトール、プロピレングリコール、およびジメチルイソソルビドなどの化合物を含む。

【0282】

「安定化剤」は、任意の抗酸化薬剤、緩衝液、酸、保存剤などの化合物を含む。

【0283】

「懸濁剤」は、ポリビニルピロリドン、例えば、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、またはポリビニルピロリドンK3

10

20

30

40

50

0、ビニルピロリドン／酢酸ビニルコポリマー（S 6 3 0）、ポリエチレングリコール（例えば、ポリエチレングリコールは、約300～約6000、または約3350～約4000、または約7000～約5400の分子量を有しる）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸酢酸ヒドロキシメチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、例えば、トラガントガムおよびアカシアガム、グアルガムなどのガム、キサンタンガムを含むキサンタン、糖、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースなどのセルロース誘導体、ポリソルベート80、アルギン酸ナトリウム、モノラウリン酸ポリエトキシル化ソルビタン、モノラウリン酸ポリエトキシル化ソルビタン、ポビドンなどの化合物を含む。

【0284】

「界面活性剤」は、ラウリル硫酸ナトリウム、ナトリウムドクセート（docusate）、Twee n 6 0 またはTwee n 8 0、トリアセチン、ビタミンE T P G S、モノオレイン酸ソルビタン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ポリソルベート（p o l y s o r b a t e）、ポロキサマー、胆汁塩、モノステアリン酸グリセリン、酸化エチレンと酸化プロピレンとのコポリマー、例えば、Pluron ict（登録商標）（B A S F）などの化合物を含む。他の一部の界面活性剤は、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよび植物油、例えば、ポリオキシエチレン（60）水素化ヒマシ油；ならびにポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびアルキルフェニルエーテル、例えば、オクトキシノール10、オクトキシノール40を含む。一部の実施形態では、界面活性剤は、物理的安定性を増強するか、または他の目的で、組み入れることができる。

【0285】

「粘性増強剤」は、例えば、メチルセルロース、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸酢酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボマー、ポリビニルアルコール、アルギン酸塩、アカシア、キトサン、およびこれらの組合せを含む。

【0286】

「保湿剤」は、オレイン酸、モノステアリン酸グリセリン、ソルビタンモノオレイン酸、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ナトリウムドクセート（docusate）、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ナトリウムドクセート（docusate）、トリアセチン、Twee n 8 0、ビタミンE T P G S、アンモニウム塩などの化合物を含む。

【0287】

キットおよび組成物

本開示の一態様は、本発明のC D 3 3 特異的C A Rをコードするコード領域と、任意選択で、安全性の理由で組み入れられる遺伝子、例えば、H E R 1 t またはH E R 1 t - 1、およびこれらの機能的変異体、またはC D 2 0 またはC D 2 0 t - 1、およびこれらの機能的変異体とを含む第1のベクターを含む、キットおよび組成物に関する。これらのキットおよび組成物は、各々が異なるタンパク質またはタンパク質のサブセットをコードする、複数のベクターを含みうる。これらのベクターは、ウイルスベクターの場合もあり、非ウイルスベクターの場合もあり、エピソームベクターの場合もあり、組込みベクターの場合もある。一部の実施形態では、ベクターは、トランスポゾン、例えば、s l e e p i n g b e a u t y トランスポゾンである。

【0288】

一部の実施形態では、キットおよび組成物は、ベクターだけでなく、また、細胞、およびインターロイキン、サイトカイン、インターロイキン、および化学療法剤、アジュvant、保湿剤、または乳化剤などの薬剤も含む。一実施形態では、細胞は、T細胞である。

10

20

30

40

50

一実施形態では、キットおよび組成物は、I L - 2 を含む。一実施形態では、キットおよび組成物は、I L - 2 1 を含む。一実施形態では、キットおよび組成物は、B c l - 2 阻害剤、S T A T 3 阻害剤、またはS T A T 5 阻害剤を含む。複数の実施形態では、キットは、I L - 1 5 、またはm b I L - 1 5 を含む。

【0289】

本明細書の、ある特定の実施形態では、本明細書で記載される、1または複数の方法による使用のためのキットおよび製品が開示される。このようなキットは、バイアル、試験管など、1または複数の容器であって、容器の各々が、本明細書で記載される方法において使用される個別のエレメントのうち1つを含む容器を受容するように区画化されたキャリングケース、パッケージ、または容器を含む。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管を含む。一実施形態では、容器は、ガラスまたはプラスチックなど、様々な材料から形成されている。

10

【0290】

本明細書で提示される製品は、パッケージング材料を含有する。医薬パッケージング材料の例は、プリスター・パック、ボトル、試験管、バッグ、容器、ボトル、ならびに選択される製剤と、意図される投与方式および処置方式とに適する、任意のパッケージング材料を含むがこれらに限定されない。

【0291】

例えば、容器は、C A R - T 細胞（例えば、本明細書で記載されるC D 3 3 特異的C A R - T 細胞）と、任意選択で、加えて、本明細書で開示されるサイトカインおよび／または化学療法剤とを含む。このようなキットは、任意選択で、本明細書で記載される方法におけるその使用に関する記載または表示または指示書の内容確認を含む。

20

【0292】

キットは、典型的に、内容物を列挙する表示、および／または使用のための指示書、ならびに使用のための指示書を伴う添付文書を含む。典型的に、指示書のセットもまた、組み入れられると予想される。

【0293】

一部の実施形態では、表示は、容器上に貼付されているか、または容器に付随する。一実施形態では、表示を形成する文字、数、または他の記号が、容器自体へと接着されているか、鋳造されているか、またはエッティングされている場合、表示は容器上に貼付されており、表示はまた、容器を保持する、レセプタクルまたはキャリングケース内に、例えば、パッケージ添付文書として存在する場合、容器に付随する。一実施形態では、表示は、内容物が、具体的な治療適用に使用されるものであることを指し示すのに使用される。表示はまた、内容物の、本明細書で記載される方法などにおける使用のための指示も指し示す。

30

【0294】

配列

表2には、本明細書で提示される実施形態に含まれる、ある特定の配列についての代表的なリストを提示する。

【0295】

40

【表 2 - 1】

配列名	配列番号	配列	
hM195 VL (アミノ酸)	1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVNDYGISFMNWFQQKPGKAPKL LIYAASNQGSGVPSRFSGSGLTDFTLTSSLQPDDFATYYCQQSKEVPW TFGQGTKVEIK	
hM195 VL (スクレオチド)	2	Gacattcagatgaccaggctccgagctctgtccgcatcagtaggagac agggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggcatt agctttatgaactggccaacagaaaccggaaaggctccataagcttctg atttacgctgcatccaaccaaggctccgggttaccctctcgcttctcaggc agtggatctggacagacttcaacttcacttcatctgcagcctgat gacttcgcaacctattactgtcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttc ggtaaggagccaagggtggagatcaa	10
hM195 VH (アミノ酸)	3	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFDYNMHWVRQAPGQGLEWIGY IYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGR PAMDYWGQGTLTVSS	20
hM195 VH (スクレオチド)	4	Caggttcagctggcagttctggagctggaggtaagaaggccctggagactca gtgaagggttcctgcaagcttctggctacacccactgactacaacatg cactgggtaggcaggctccctggccaaggccctggaaatggattggatataatt tatcttacaatgggttaccggctacaaccagaaggtaaaggcaaggcc acaattacagcagacgagactaacaacagcctacatggactctccagc ctgaggctgaggacactgcagtttacttgcgcaagaggcgccccgct atggactactggggccaagggactctggtactgtctttca	
(G4S)3 リンカー (スクレオチド)	5	Ggtggcggtggctcgccgggtgggggtcggtggcgccggatct	30
(G4S)3 リンカー (アミノ酸)	6	GGGGSGGGGSGGGGS	
リンカーを伴う hM195 scFv	7	Gacattcagatgaccaggctccgagctctgtccgcatcagtaggagac agggtcaccatcacatgcagagccagcgaaagtgtcgacaattatggcatt	40

【0296】

【表 2 - 2】

配列名	配列番号	配列
(ヌクレオチド)		agctttatgaactggttccaacagaaacccgggaaggctctaagcttctg atttacgcgtcatccaaccaaggctccggggtaccctctcgcttcaggc agtggatctggacagacttcactctcaccatcatctcgacgcgtat gacttcgcacacttattactgtcagcaagtaaggaggttccgtggacgttc ggtcaaggggaccaagggtggagatcaaaggtggcggtggctcggcggtgg gggtcggtggcgccggatctcagggtcagctggcagtcggagctgag gtgaagaaggctggagctcagtgaaaggtttctgcaaagcttctggctac accttcactgactacaacatgcactgggtgaggcaggctctggccaaggc ctggaaatggattggatataattatccttacaatgggttaccggctacaac cagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagacgagactaaca gcctacatgaaactctccagcctgaggctgaggacactgcagtcattac tgcgcagagggcgccccgctatggactactggggcaagggactctggc actgtctttca
リンカーを伴う hM195 scFv (アミノ酸)	8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGKAPKL LIYAASNQSGGVPSRSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPW TFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQFKSKATITADE STNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTIVTVSS
M2H12 VH (アミノ酸)	9	QVQLQQSGPELVRPGTFVFKISCKASGYTFTNYD INWVNQRPGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKF KAKATLTADKSSSTAYLQLNNLTSENSAVYFCAS GYEDAMDYWGQGTSVTVSS
M2H12 VL (アミノ酸)	10	DIKMTQSPSSMYASLGERVIINCKASQDINSYLS WFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRSGSG SGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGA GTKLELKR
DRB2 VH (アミノ酸)	11	EVKLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTDYV VHWLKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKF KGKATLTSDKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCA

10

20

30

40

【0297】

【表 2 - 3】

配列名	配列番号	配列	
		RDYRYEVYGMDYWGQGTSVTVSS	
DRB2 VL (アミノ酸)	12	DIVLTQSPTIMSASPGERVTMTCTASSSVNYIH WYQQKSGDSPLRWIFDTSKVASGVPARFSGSG SGTSYSLTISTMEAEDAATYYCQQWRSYPLTFG DGTRLELKRAAADAPTWS	10
My9-6 VH (アミノ酸)	13	QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTS YYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQK FKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDAVYYC AREVRLRYFDVWGAGTTTVSS	
My9-6 VL (アミノ酸)	14	NIMLTQSPSSLAWSAGEKVTMSCKSSQSFFSS SQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIYWASTRESGP DRFTGSGSGTDFTLTISSVQSEDLAIYYCHQYLS SRTFGGGTKLEIKR	20
GM-CSFRa シグナル ペプチド (ヌクレオチド)	15	Atgctgctgctgggaccagcctgctgtgtgagctgccccacccggcc tttctgctgatcccc	
GM-CSFRa シグナル ペプチド (アミノ酸)	16	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	
CD8 アルファ TM (ヌクレオチド)	17	Atctacatctggccctctggccggcacctgtggcgtctgctgagc ctggtcatcacccctgtactgcaaccaccggaat	30
CD8 アルファ TM (アミノ酸)	18	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRN	
CD28 TM (ヌクレオチド)	19	Ttttgggtgctgggtggggggagtcctggcttgctatagcttgcta gtaacagtggccttattatattctgggtg	
CD28 TM (アミノ酸)	20	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAIFIIFWV	40

【0298】

【表 2 - 4】

配列名	配列番号	配列
CD8 アルファ ヒンジ (ヌクレオチド)	21	Aagccaccaccacccctgcccctagaccccaaccccgccctacaatc gccagccagccctgaggcctgaggcccgaaggccctgttagacccctggc ggagccgtgcacaccagaggcctggatttcgcctgcgac
CD8 アルファ ヒンジ (アミノ酸)	22	KPTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
4-1BB シグナル伝達 ドメイン (ヌクレオチド)	23	Aagagaggccgaaagaaactgctgtacatcttcaagcagcccttcatgcgg cccgtgcagaccaccaggaaagaggacggctgcagctgccggccccgag gaagaggaaggcggctgcgaactg
4-1BB シグナル伝達 ドメイン (アミノ酸)	24	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRFPEEE ^{EGG} CEL
CD3 ζ シグナル伝達 ドメイン (ヌクレオチド)	25	Cgggtgaagttcagccggagcggccacgcggccctgcctaccaggcaggccag aaccaggctgtacaacggactgtaacctggccggaggatgacgtgc ctggacaaggcggagaggccggaccctgagatggccggcaagccccggaga aagaaccctcaggaggccctgtataacgaactgcagaaagacaagatggcc gaggccctacagcggatcggcatgaagggcggcggcggaggggcaaggcc cagcagccctgtaccaggccctgagcaccgcaccaaggataccatcgc gccctgcacatgcaggccctgccccccaga
CD3 ζ シグナル伝達 ドメイン (アミノ酸)	26	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
CD28 シグナル伝達 ドメイン (ヌクレオチド)	27	Aggagcaaggcggagcaggcggccacagcgactacatgaacatgacccccc cgaggccctggcccccacccggaaaggactaccaggccctacgcccctccagg gacttcggccctaccggagc
CD28 シグナル伝達 ドメイン	28	RSKRSRGHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

10

20

30

40

【 0 2 9 9 】

【表 2 - 5】

配列名	配列番号	配列	
(アミノ酸)			
T2A (ヌクレオチド)	29	GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGC CCT	
T2A (アミノ酸)	30	EGRGSLLTCGDVEENPGP	10
HER1t (ヌクレオチド)	31	Cgcaaagtgttaacggaataggattggtaattaaagactcactctcc ataaaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacccatcagtggc gatcccacatctgccggtgccattttagggtgactccttacacataact cctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaacccgtaaaggaaatc acagggtttttgtgattcaggctggcctgaaaacaggacggacccat gcctttagaaaccttagaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggtcag tttcttgcagtgtcagccgtgaacataacatccttgggattacgcctcc ctcaaggagataagtgtatggagatgtgataatttcaggaaacaaaatttg tgctatgcaaataacaataactggaaaaactgtttgggacccctccggtcag aaaacccaaaattataagcaacagagggtgaaaacagctgcaaggccacaggc caggctgccatgcctgtgtcccccggggctgctggggccggagccc agggactgcgtcttgccggaaatgtcagccggaggcagggaaatgcgtggac aagtgcacccctgtggggatgtggagatgtgataatttcaggaaacaaaatttg tgcatatcagtgccacccagactgtatccgtgtgcccactacattgacggc acaggacggggaccagacaactgtatccgtgtgcccactacattgacggc ccccactgcgtcaagacactgtggccggcaggagtcatgggagaaaacaacacc ctggcttggaaagtacgcagacgcggccatgtgtgcccactgtgcatcca aactgcacccctgtggggatgtggccactgggatgtggggccctcttg ctgctgggtggccctggggatggccatgttcatg	20
HER1t (アミノ酸)	32	RKVCNGIGIGEFKDSLISINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGQKTKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGR ECVDKCNLLEGEPEFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGL EGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGLFM	30

【0300】

【表 2 - 6】

配列名	配列番号	配列
IgK シグナル ペプチド (ヌクレオチド)	33	Atgaggctccctgctcagctcgtggggctgctaattgctctgggtcccagga tccagttggg
IgK シグナル ペプチド (アミノ酸)	34	MRLPAQLLGLLMLWVPGSSG
FL CD20 (ヌクレオチド)	35	Atgacaacacccagaaaattcagtaatggactttccggcagagccatg aaaggccctattgctatgcaatctggtccaaaaccactttcaggaggatg tcttcactgggtggccccacgcaaagcttcatgagggatctaagact ttggggctgtccagattatgaatggcttccacattgcccgggt cttctgtatgtccacgggatctatgcacccatctgtgtactgtgtgg taccctctggggaggcattatgtatattattccggatcactcctggca gcaacggagaaaaactccaggaaagtgtttggtaaaggaaaaatgataatg aattcattgagcctttgctgccatttctggaatgattttcaatcatg gacatacttaatattaaaattccatttttaaaatggagagtctgaat tttattagagctcacacaccatattacatatacaactgtgaaccagct aatccctctgagaaaaactcccatctacccaaactgttacagcatacaa tctctgttctggcattttgtcagtgtatcttgccttcttccag gaacttgcatacgatggcatgttgcataatggaaaagaaacgtgtcc agacccaaatctaatacgatgttgcgtcagcagaagaaaaaaaagaacag actattgaaataaaagaagaatgtggcttaactgaaacatcttccaa ccaaagaatgaagaagacattgaattattccaatccaagaagaggaagaa gaagaaacagagacgaaacttccagaacccatctccaaatcggatc ccaatagaaaaatgacagctctcct
FL CD20 (アミノ酸)	36	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESK TLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTWYPLWGGIMYIISGSL LAATEKNSRKCLVKGKMMNSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKME SLENFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIF AFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLT ETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP
mbIL-15 (アミノ酸)	37	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSSLSSNGNVTESGCKECEELEE

10

20

30

40

【0301】

【表 2 - 7】

配列名	配列番号	配列
		<p>KNIKEFLQS</p> <p>FVHIVQMFINTSSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQITCPPMSVEHAD IWVKSYSLY</p> <p>SRERY1CNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPLKCIRDPAVHQ PAPPSTVTT</p> <p>AGVTPQPELSLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTT EISSHESSH</p> <p>GTPSQTAKNWELETASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSQ</p> <p>TPPLASVEMEAMEALPVWTGTSRDEDLENCSSHLL</p>
hM195scFv -CD8a- CD28m-Z	38	<p>atgctgctgctggtgaccagcctgctgtgagctgcccaccccgcc tttctgctgatccccgacattcagatgaccagtctccgagctctgtcc gcatcagtaggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcgaagtgtc gacaattatggcatttagctttagtgcactgttccaaacagaaacccggaaag gctcctaagcttctgatttacgctgcattcaaccaaggctccgggttaccc tctcgcttctcagggcgtggatctggcagacttcactctcaccatttca tctctgcagcctgtatgcacttcgcaaccttattactgtcagcaagtaaggag gttccgtggacgttccggtaaggagcaagggtggagatcaaagggtggcgg ggctcggccgggtgggtgggtggcggatctcaggttgcagctgg cagtctggagctgaggtgaagaagcctggagactcagtgaaagggtttcctgc aaagcttctggctacacccactgtactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggaatggattatatttacccatgttacatgg ggtaccggctacaaccagaagttcaagagaacggccacaattacagcagac gagactaacaacagcctacatggactctccagcctgaggtctgaggac actgcagtcttactactgcgcaagggcggccctgatggactactggggc caaggactctggtactgtcttcaaagccaccacccctgccc agacccttcaaccccgccctacaatccgcggccagccctgagcc ccgcgcgcgttaggcctgcgcgtggcgagccgtgcacccaggcc gatttcgcgcgtgcacatctacatctggccctctggccggcacctgtgg gtgctgctgtggatccctgtactgcacccatgtcaaccaccggaaatagg agcaaggcgagcaggccggccacaggcactacatgaacatgaccccccgg aggcctggcccccacccggaaagcactaccgcctacgcccctccaggac ttcgccgcctaccggagccgggtgaagttcagccggagcggcgcaccc gcctaccaggccagaaccaggctgtacacacgactgtgaacctggccgg agggaggagttacgcgtgtggacaaggcgagaggccggaccctgagatg ggcggcaagcccccggagaaagaaccctcaggagggcctgtataacgactg cagaaagacaagatggccaggcctacaggcggatcggcatgtggcggag cggcggagggcgaaggccacgcacggcctgtaccaggcctgagcaccgg accaaggatatacgcacgcctgcacatgcaggccctgccccccaga</p>
hM195scFv -CD8a-	39	MLLLVTSLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT

【0302】

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

配列名	配列番号	配列
CD28m-Z		ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFQGQTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFDTDYNMHWRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLTVSSKPTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRGHSD YMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
hM195scFV -CD8a-Z	40	atgctgctgctggtgaccagcctgctgttgagctgccccaccccgcc tttctgctgatccccgacattcagatgaccaggctccggagctctgtcc gcatcagttaggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcggaaagtgtc gacaattatggcatttagctttagactggttccaacagaaaccgggaag gctcctaagcttgcattttacgtgcattccaaaccaaggctccgggttaccc tctcgcttcaggcaggatggatctggacagacttcacttcattca tctctgcaggcgtgacttcgaaccttattactgtcagcaaaggtaaggag gttccgtggacggttcggtaaggaccagggtggagatcaaagggtggcgg ggctcggcgggtgggtcggttcggcggcggatctcagggtcagctgg cagtcggagctggatgtggagacttcgggagctcagtgagggttctgc aaagcttctggctacacccatgtactgactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggatggattggatataatttattcatttacaatgg ggtaccggctacaaccagaaggtaagagcaaggccacaattacagcagac gagagactaacacaggcctacatggactctccagctgggtctgaggac actgcagtctattactgcgcagaggccggccctatggactactgggg caaggactctggtactgtcttcaagcccaccaccaccctgg agaccccaacccagccctacaatgcgcaggccggcggatctgg cccggactggcgttagacccgtccgtggcggaggcggatctgg gatttcgcctgcgcacatctacatctggccctctggccggcacctgtgg gtgctgctgtggcatccctgtactgcacccaccggaaatgg gtgaagttcaggccggagcgcgcggcggcggatccctgg cagctgtacaacggactgtggatgggggggggggggggggggg gacaaggccggagggccggggccctggatggccggcaagcccccggagaaag aacccctcaggagggccctgtataacgaaactgcagaaagacaagatggccgag gcctacagcggcggatccctggatgggggggggggggggggg gacccggcgttaccaggccctggatgggggggggggggggg ctgcacatgcaggccctggcccccaga
hM195scFV -CD8a-Z	41	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFQGQTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFDTDYNMHWRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA

10

20

30

40

【0303】

【表 2 - 9】

配列名	配列番号	配列
		MDYWGQGTLVTVSSKPTTTPAPRPPAPTIAQSPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
hM195scFv -CD8a- CD28m-Z- T2A-GM- CSFRasp.H ER1t	42	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGAGCTGCCACCCGCC TTCTGCTGATCCCCGACATTAGATGACCCAGTCTCCGAGCTCTGTCC GCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAAAGTGC GACAATTATGGCATTAGCTTATGAACTGGTCCAACAGAAACCCGGGAAG GCTCCTAAGCTTCTGATTTACGCTGCATCCAACCAAGGCTCGGGGTACCC TCTCGCTTCTCAGGCACTGGATCTGGACAGACTTCACTCTCACCATTCA TCTCTGCAGCCTGATGACTTCGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAAGGAG GTTCCGTTGGACGTTGGTCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGTGGCGGT GGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTCGGCGCGGATCTCAGGTTCACTGGT CAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAACGCTGGGAGCTCAGTGAAGGTTCTGC AAAGCTCTGGCTACACCTTCACTGACTACAACATGCACTGGGTGAGGCAG GCTCCTGGCCAAGGCCTGGAATGGATTGGATATATTATCCTAACATGGT GGTACCGGCTACAACCAAGAAGTCAAGAGCAAGGCCACAATTACAGCAGAC GAGAGTACTAACACAGCCTACATGGAACCTCTCCAGCCTGAGGTCTGAGGAC ACTGCAGTCTATTACTGCGCAAGAGGGCGCCCCCTATGGACTACTGGGGC CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTCAAAGCCACCAACCCCTGCCCT AGACCTCAACCCAGCCCCCTACAATGCCAGCCAGCCCCCTGAGCCTGAGG CCCGAACCTGTAGACCTGCCGCTGGCGAGCCGTGCACACCAGAGGCC GATTCGCCCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGCCGGCACCTGTGGC GTGCTGCTGCTGAGCTGGTCATCACCTGTACTGCAACCACCGGAATAGG AGCAAGCGGAGCAGAGGCGGCCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCGG AGGCCCTGGCCCCACCCCGGAAGCACTACCGCCCTACGCCCTCCAGGGAC TTCGCCCTACCGGAGGCCGGTGAAGTTCAAGCCGGAGCGCCAGCCCCCT GCCTACCGCAGGGCCAGAACCCAGCTGTACAACCGAGCTGAACCTGGCCGG AGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCGGACCTGAGATG GGCGCAAGCCCCGGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCCTGTATAACGAACCTG CAGAAAGACAAGATGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG CGCGGAGGGCAAGGGCCACGAGGCCCTGTACAGGGCCTGAGCACCGCC ACCAAGGATAACCTACGACGCCCTGCACATGCAAGGCCCTGCCAGACTC GAGGGCGGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTAACATGCCGTACGTGGAG GAGAATCCGCCCTAGGATGCTTCTCTGGTACAAGCCTCTGCTCTGT GAGTTACCAACCCAGCATTCTCTGATCCCACGCAAAGTGTGAACCGGA ATAGGTATTGGTGAATTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATT AAACACTTCAAAAACCTGCACCTCATCAGTGGGATCTCCACATCCTGCC GTGGCATTTAGGGTGACTCCTCACACATACTCTCTGGATCCACAG GAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTGCTGATT CAGGCTGGCCTGAAAACAGGAGGGACCTCCATGCCCTTGAGAACCTAGAA

【0304】

【表 2 - 10】

配列名	配列番号	配列
		ATCATACGCGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTCTCTGCAGTC AGCTGAACATAACATCCTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGAT GGAGATGTGATAATTCAGGAAACAAAAATTGCTATGAAATACAATA AACTGGAAAAAACTGTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACAAAAATTATAAGC AACAGAGGTGAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCC TGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCGGAGGCCAGGGACTGCGTCTTG CGGAATGTCAGCCAGGGCAGGGAAATGCGTGGACAAGTGCAACCTCTGG GGTGAAGCCAAGGGAGTTGTGGAGAACTCTGAGTGACAGTGCAAC GAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGAC AACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGCCACTGCGTCAAGACC TGCCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGCTGGAAAGTAC GACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCAAACATGCAACCTACGG ACTGGGCCAGGTCTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCTAAGATCCGTCC ATGCCCACTGGGATGGTGGGGCCCTCTTGCTGGTGGTGGCCCTG GGGATCGGCCTTCATG
hM195scFv -CD8a- CD28m-Z- T2A-GM- CSFRasp.H ER1t	43	MLLLVTSLLCELPHAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPQDDFATYYCQQSKEVPWTFQGQTKVEIKGGGSGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLTVSSKPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYCNHRNRSKRSRGHSD YMNMTRRPGPTRHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQQNL YNENLNLRREYDVLDRKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKM YEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGR GSLLTCGDVEENPGPRMLLVTSLLCELPHAFLLIPRKVCNGIGIGEF KDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELD KTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNI TSLGLRSLKEISDGDIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR ENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE PREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC

10

20

30

40

【0305】

【表 2 - 11】

配列名	配列番号	配列
		PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPS IATGMVGALLLLVALGIGLFM
hM195scFv	44	<p>Atgctgctgctggtgaccagcctgctgtgagctgccccaccccgcc tttctgctgatccccacattcagatgacccagtctccgagctctgtcc gcatcagtaggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcagaaagtgtc gacaattatggcattagctttatgaactggttccaacagaaaccgggaag gctcctaagctctgatttacgctgcatccaaccaaggctccgggtaccc tctcgcttctcaggcagtggatctggacagacttacttcaccattca tctctgcagcctgatgacttcgcaaccttactgtcagcaaagttaaggag gttccgtggacgttccgtcaagggaccaaggtaggtggagatcaaaggtaggtgg ggctcggccgggtgggtggcggggatctcaggttcagctgg cagtctggagctgaggtgaagaagcctggagctcagtgaaagggtttcctgc aaagctctggctacacccactgactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggatggattggatattttatccttacaatgg ggtacccggctacaaccagaaggtagttcaagagcaaggccacaattacagcagac gagagtactaacacagcctacatggaacttcacgcctgaggctgaggac actgcagtcttacttcgcaagagggcgccccctatggactactggggc caagggactctggtactgtctttca</p>
hM195scFv	45	<p>MLLLVTSLLCELPHPAFLLIPDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPDDDFATYYCQQSKEVPWTFQGTKEIKGGGGSGGGGGGGGSQV QLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGIY PYNGGTGYNQKFKSATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTIVTVSS</p>
hM195scFv -CD8a-4- 1BB-Z	46	<p>atgctgctgctggtgaccagcctgctgtgagctgccccaccccgcc tttctgctgatccccacattcagatgacccagtctccgagctctgtcc gcatcagtaggagacagggtcaccatcacatgcagagccagcagaaagtgtc gacaattatggcattagctttatgaactggttccaacagaaaccgggaag gctcctaagctctgatttacgctgcatccaaccaaggctccgggtaccc tctcgcttctcaggcagtggatctggacagacttacttcaccattca tctctgcagcctgatgacttcgcaaccttactgtcagcaaagttaaggag gttccgtggacgttccgtcaagggaccaaggtaggtggagatcaaaggtaggtgg ggctcggccgggtgggtggcggggatctcaggttcagctgg cagtctggagctgaggtgaagaagcctggagctcagtgaaagggtttcctgc</p>

【0306】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

配列名	配列番号	配列	
		aaagcttctggctacacccactgactacaacatgcactgggtgaggcag gctcctggccaaggcctggaatggattggatatttatccttacaatggt ggtaccggctacaaccagaagttcaagagcaaggccacaattacagcagac gagagtactaacaacacagcctacatggactctccagcctgaggctgaggac actgcagtctattactgcgcaagagggccccctatggactactggggc caagggactctggtactgtcttcaagccaccaccaccctgccccct agacctccaaccccagccctacaatgcgcagccagccctgaggctgagg cccgaagcctgttagacctggcgctggcgagccgtgcacaccagaggcctg gatttcgcctgcgacatctacatctggccctctggccggcacctgtggc gtgctgctgctgaggctggatcatcaccctgtactgcacaccaggaaataag agaggccggaagaaactgtgtacatcttcaagcagcccttcatgcggccc gtgcagaccacccaggaagaggacggctgcagctgcccggccccggag gaggaaggcggctgcgaaactgcgggtgaagttcagccggagccgacccc cctgcctaccagcaggccagaaccagctgtacaacgagctgaacctggcc cggaggaggaggtacgcgtctggacaagcggagaggccggaccctgag atggggcgcaagcccccggagaaagaaccctcaggagggctgtataacgaa ctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcggatcggcatgaaggc gagcggcggagggcaaggccacgacggcctgtaccagggcctgagcacc gccaccacccatgcacatgcggccctgcacatgcaggccctgccccccaga	
		10	
hM195scFv -CD8a-4- 1BB-Z	47	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQSGVPSRFSGSGSTDFTLT ISSLPQDDFATYYCQQSKEVWTFQQGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKPGSSVKVSKASGYTFDYNMHWRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTIVTVSSKPTTTPAPRPPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITYCNHRNKRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLRREEYDVLKRRGRDPMEGGKPRRKNPQEGLYNELQDKKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLAPR	20
hM195scFv -CD8a-4- 1BB-Z- T2A-GM- CSFRasp.H ER1t	48	atgctgctgctggtgaccagcctgctgtgtgagctgccccacccccc tttctgctgatccccgacattcagatgaccagtcgtctgtcc gcatcagtaggagacagggtcaccatcactgcagagccagcgaagtgtc gacaattatggcatttagcttataactggttcaacagaaacccggaaag gctcctaagcttctgatttacgcgtcatccaaaccaaggctccgggtaccc tctcgcttcctcaggcagtggatctggacagacttcacttcaccattca tctctgcagcctgtatgcacttcgcaaccttactgtcagcaaagtaaggag gttccgtggacgttccggtaagggaccaaggatggagatcaaaggatggc ggctcggcgggtggatctggcggatctcaggatcagctggatcgg cagtctggagctgaggtaagaaggctggagactcagtttcc aaagcttctggctacacccactgactacaacatgcactgggtgaggc gctcctggccaaggcctggaatggattggatatttatccttacaatggt	30
		40	

【0307】

【表 2 - 13】

配列名	配列番号	配列
		ggtaccggctacaaccagaagttcaagagagaaggccacaattacagcagac gagagtactaacaacacgcctacatggactctccagcctgaggtctgaggac actgcgtctattactgcgcaagaggcgccccctatggactactgggc caaggactctggtactgtcttcaaagccaccaccaccctgcccct agacctccaaccccaagccctacaatcgccaggcagccctgagctgagg cccgaacgcgttagacactgcccgtggcgagcgtgcacaccagaggcctg gatttcgcctgcgacatctacatctggccctctggccggcacctgtggc gtgctgctgctgagccctggtcatcacccctgtactgcaaccaccgaaataag agaggccggaagaaaactgctgtacatcttcaagcagcccttcatcgcc gtgcagaccacccaggaaagaggacggctgcagctgcgggtttcccgaggaa gaggaaggcggctgcgaactgcgggtgaagttcagccggagcgcgcacgc cctgcattaccagcaggccagaaccagctgtacacagcagactgaacctggc cgaggaggaggactgacgtgctggacaagcggagaggccggaccctgag atggccggcaagcccccggagaaaagaaccctcaggagggctgtataacgaa ctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcggatcggcatgaaggc gagcggcggagggcaagggccacacggcgttaccaggccgtgagcacc gccaccaggatacctacgacgcctgcacatgcaggccctgccccca ctcgaggcggcggagggcagaggacttcttaacatgcggtgacgtg gaggagaatccggcccttaggatgttctctggtacaaggccctgtct tgtgagttaccacaccaggcattctctgtatccacgcgaaagtgttaac ggaataggtattggtaatttaaagactcactctccataatgtctcgaat attaaacacttcaaaaactgcacccatcagtggcgtatccacatcctg ccgggtgcatttaggggtgactccttacacataactcctctggatcca caggactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggttttgctg attcaggcttggctgaaaacaggacggacccatgccttgcggatc gaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggcgtatggcggatc gtcagcctgaacataacatccttggattacgccttcaaggagataagt gatggagatgtgataatttcaggaaaacaaaatttgctatgcaaataca ataaaactggaaaaactgtttggacccctcggtcagaaaaccaaaattata agcaacagaggtaaaacagctgcaaggccacaggccaggctgcac ttgtgcctcccgaggcgtgctggggccggagccaggactgcgtct tgccggaatgtcaggcggaggacatgcgttgcggatc gagggtgagccaaggagtttggagaactctgagtgcatacagtgc ccagagtgcctgcctcaggccatgacatcacactgcacaggacggg gacaactgtatccaggatgtgcccactacattgacggccccactgc acactgcggcggcaggatgtgtgccacatgtggacttgc gcagacggccatgtgtgccatccaaactgcacactacgg tgcaactggccaggatgttgcggatgtggggccctcttgc tccatgccactggatgtggggccctcttgc ctgggatcggccatgt 10
hM195scFv -CD8a-4- 1BB-Z- T2A-GM-	49	MLLLVTSLLCELPHAFLLIPDIQMTQSPSSLASVGDRVITCRASES VDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPDDFATYYCQQSKEVPWTFQGQTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYFTTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQKFKSATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA 30

【0308】

【表 2 - 14】

配列名	配列番号	配列
CSFRasp.H ER1t		MDYWGQGTLVTVSSKPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNKRGRKLLYIF KQPFPMPVQTTQEEGDCSREFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGEG RGSSLTCGVEENPGPRMLLLVTSLLCLELPHPAFLIPRKVCNGIGIGE FKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDQELDI LKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN ITSLGLRSLKEISDGVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSKATGQVCHALCSPEGCWGPPEPRDCVSCRNVSRGRCVDKCNLLEG EPREFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKT CPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIP SIATGMVGALLLLLVALGIGLFM
hM195scFv -CD8a-4- 1BB-Z- T2A.FL CD20	50	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGTGAGCTGCCACCCGCC TTCTGCTGATCCCCACATTAGATGACCCAGTCTCGAGCTCTGTCC GCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAAAGTGC GACAATTATGGCATTAGCTTATGAACTGGTCCAACAGAAACCCGGGAAG GCTCCTAACGCTCTGATTTACGCTGCATCCAACCAAGGCTCCGGGTACCC TCTCGCTTCTCAGGAGTGGATCTGGACAGACTCTACTCTCACCACTTCA TCTCTGAGCCTGATGACTTCGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAAGGAG GTTCCGTTGGACGTTGGTCAAGGGACCAAGGGTGGAGATCAAAGGTTGGCGGT GGCTCGGGCGGTGGGGTGGGGTGGCGGGATCTCAGGTTCAAGCTGGTG CAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCTGGAGCTCAGTGAAGGTTCTGC AAAGCTCTGGCTACACCTCACTGACTACAACATGCACTGGGTGAGGCAG GCTCTGGCCAAGGGCTGGAATGGATTGGATATATTATCCTAACATGGT GGTACCGGCTACAACAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACAATTACAGCAGAC GAGAGTACTAACACAGCTACATGAACTCTCAGGCTGAGGTCTGAGGAC ACTGCAGTCTATTACTGCGCAAGAGGGCGCCCGCTATGGACTACTGGGC CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTCAAAGCCACCAACCCCTGCC AGACCTCAACCCAGCCCTACAATGCCAGCCAGCCCTGAGCCTGAGG CCCGAAGCCTGTAGACCTGCCGCTGGCGAGCCGTGACACCAGAGGCC GATTCGCCTGCGACATCTACATCTGGCCCTCTGGCGGCCACCTGTGGC GTGCTGCTGCTGAGCTGGTACATCACCCTGTACTGCAACCACCGAATAAG AGAGGCCGGAGAAACTGCTGTACATCTCAAGCAGCCCTCATGCC GTGCAGACCAACCCAGGAAGAGGAGCGCTGAGCTGCGCTGGTCC GAGGAAGGCGGCTGCAACTGCGGGTAAGTTAGCCGGAGCGCAGGCC CCTGCC TACCAAGCAGGGCAGAACAGCTGTACAAGCAGCTGAACCTGGGC CGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCGGACCTGAG ATGGGCGGCAAGCCCGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCTGTATAACGAA CTGCAGAAAGACAAGATGGCGAGGCCACAGCAGATCGGCATGAAGGGC GAGCGCGGAGGGCAAGGGCACGACGCCCTGACATGCCAGGCC GCCACCAAGGATACTACGACGCCCTGACATGCCAGGCC CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTAACATGCC GAGGAGAATCCCGGCCCTAGGATGACAACACCCAGAAATTCA 40

【0309】

【表 2 - 15】

配列名	配列番号	配列	
		ACTTCCCAGAGCCAATGAAAGGCCATTGCTATGCAATCTGGTCCA AAACCACTTCAGGAGGATGTCCTACTGGGGCCCCACGCAAAGCTC TTCATGAGGAACTCAAGACTTTGGGGCTGTCCAGATTATGAATGGGCTC TTCCACATTGCCCTGGGGGCTCTGTGATGATCCCAGCAGGGATCTATGCA CCCATCTGTGACTGTGTTACCCCTCTCTGGGAGGATTATGTATATT ATTCGGATCACTCTGGCAGCAACGGAGAAAACTCCAGGAAGTGTGTTG GTCAAAGGAAAATGATAATGAATTCTTGAGCCTTTGCTGCCATTCT GGAATGATTCTTCAATCATGGACATACTTAATATTAAAATTCCTT TTAAAATGGAGAGTCTGAATTATTAGAGCTCACACACCATAATTAAAC ATATACAACTGTGAAACCAGCTAACCTCTGTTCTGGCATTGTCAGTGTG CAAACTGTTACAGCATAACATCTGTTCTGGCATTGTCAGTGTG CTGATCTTGCTTCCAGGAACTTGTAATAGCTGGCATGTTGAGAAT GAATGAAAAGAACGTGCTCCAGACCCAACTAAACATAGTTCTCTGTCA GCAGAAGAAAAAAAGAACAGACTATTGAAATAAGAAGAAGTGGTTGGG CTAACTGAAACATCTCCAACCAAAGAATGAAGAAGACATTGAAATTATT CCAATCCAAGAAGAGGAAGAAGAACAGAGACGAACCTCCAGAACCT CCCCAGATCAGGAATCCTCACCAATAGAAAATGACAGCTCCT	10
hM195scFv -CD8a-4- 1BB-Z- T2A.FL CD20	51	MLLLVTSLLCELPHAFLLIPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASES VDNYGISFMNWQQKPGKAPKLILYIASNQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPDFATYYCQSQSKEVWPWTGQGKTVIEKGGGSGGGGGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHVRQAPGQGLEWIGYIY PYNGGTGYNQFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPA MDYWGQGTLVTVSKPTTAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITYCNHRNKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEDVLDKRRGRDPREMGGKPRRKNPQEGLYNELKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGEG RGSLLTGVEDENPGPRMTTPRNSVNGTFPAEPMKPIAMQSGPKPLFR RMSSLVGPQTQSFMRMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICV TVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMMIMNSLSFAAISGMI LSTMIDILNIKISHFLKMESENFIARHTPYINIYCEPANPSEKNSPSTQY CYSIQSLFLGILSVMILFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSA EEKKEQTIEIKEVVGLTETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEETETNFPEP PQDQESSSPIENDSSP	20
ヒト CD33(M1- R287)	52	Atgccgctgctgactgtccccgtgtggcagggccctggctatg gatccaaatttctggctgcaagtgcaggagtcaatgcggatcaggagggt ttgtgcgtcctgtccctgcactttcttccatccataccctactacgac aagaactccccagttcatggttactggttccggagccattatatcc agggactctccagtgccacaacaaagctagatcaagaagtacaggaggag actcaggcagattccgcctctggatcccagtaggaacaactgctcc ctgagcatcgtagacgccaggaggataatggtcataactcttcgg	30

【0310】

【表 2 - 16】

配列名	配列番号	配列	
		atggagagaggaaagtaccaaatacagttacaaatctccccagctctctgtc catgtgacagacttgacccacaggccaaatccatccctggactcta gaacccggccactccaaaacctgacctgctctgtgtcctggcctgtgag cagggacacaccccgatcttcctcggtgtcagctgccccacccctcg ggccccaggactactcactcctcggtcataatcacccacggccccag gaccacggcaccacccatccagtcacatcgacttccacagaaccca actacggagagaaccatccagtcacatcgacttccacagaaccca acaactggtatcttcaggagatggctcaggaaacaagagaccagagca ggagtggatctggccattggaggagctgggttacagccctgctcgct cttgcctcatcttcatgtgaagacccacaggagg	10
ヒト CD33(M1- R287)	53	MPLLLLPLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPY DKNSPVHGWFREGAIIISRDSPVATNKLDQEVQETQGRFLLGDPSRNN CSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIP GTLEPGHSKNLTCCSVWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIIT PRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVVPQNPTTGIFPGDGSGK QETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRR	20
HER1t- 1	54	RKVCNGIGIGEFKDSLISINATNIKHKKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGQTKIISNRGENSKATGQVHALCSPEGCWGPEPRDCVSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSFWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWRSKRS	30
HER1t-1	55	cgcaaagtgtacggaataggattggtaatggactctcc ataaaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacccatcactggc gatctccacatctgccggatggcatttaggggtactccttcacacatact cctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatc acaggggttttgcattcaggctggcctgaaaacaggacggacactccat gccttggagaaccttagaaatcatcgcggcaggaccaagacatggtcag tttcttgcagtgtcagccatgaaatccatcctggattacgctcc ctcaaggagataagtgtatggagatgtgataatttcaggaaacaaaatttg tgctatgcaataacaataaaactggaaaaactgtttggacccctccggc aaaacaaaattataagcaacagagggtgaaaacagctgcaaggccacaggc caggctgccatgccttgctcccccggggctgctggggccggagccc agggactgcgtctctggcggcggctggcggatctggatggatggatgg ggcggatctggatggcggatctggatggatggatggatggatggatgg gtctggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg gtgaggagataaggaggagc	30
CD20t-1	56	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESK TLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTWYPLWGGIMYIISGSL LAATEKNSRKCLVKGKMMIMNSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKME SLNFIRAHPTYINIYCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIF AFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEKKIEQTLIEKEVVGLT ETSSQPKNEEDIE	40

【0311】

【表 2 - 1 7】

【实施例】

[0 3 1 2]

これらの例は、例示的な目的だけで提示されるものであり、本明細書で提示される特許請求の範囲を限定しようとするものではない。

〔 0 3 1 3 〕

〔实施例 1〕

レンチウイルスベクターを介する、CD33 CARの送達：CD33 CAR レンチウイルスベクターは、HIV-1由来のベクター骨格に基づき構築した。HER1 t 遺伝子を、CD33 CAR へと、3'末端において、インフレームの、自己切断型トセア・アシ

グナ (*Thosea asigna*) ウィルス 2 A ペプチドペプチド (T 2 A) を介して遺伝子融合させた。いずれの遺伝子も、下記で記載される p F U G W レンチウイルスプラスミド骨格へとクローニングした。

【0314】

C D 3 3 C A R レンチウイルスのために、V S V - G (水疱性口内炎ウイルス (V S V - G) の糖タンパク質) を、H I V - 1 エンベロープタンパク質の代替物として使用する結果として、ベクター安定性の改善、標的細胞への指向性、および形質導入の効率をもたらした (Cronin, J., Zhang, X. & Reiser, J., *Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping*, *Curr Gene Ther*, 5(4):387-98 (2005))。

【0315】

产生時に、C D 3 3 C A R ウィルス粒子を、アセンブルし、トランスフェクトH E K 2 9 3 T 細胞の表面から出芽させた。V S V - G タンパク質は、p M N D - V S V G ヘルパープラスミドによりもたらし、ベクターコアおよび酵素タンパク質は、p 8 . 9 s o (G a g P o l) ヘルパープラスミドによりもたらし、R N A ゲノムの、ウィルス粒子への、効率的な輸送およびパッケージングに必要とされるR e v タンパク質は、p R S V - R e v プラスミドによりもたらした。V p u、V i f、V p r、N e f、およびT a t を含む、他の全てのH I V - 1 アクセサリータンパク質を、C D 3 3 C A R ベクターから欠失させた。

【0316】

p F U G W レンチウイルスベクター骨格は、S I N レンチウイルスベクター骨格である。

【0317】

調節エレメント

L V - C D 3 3 C A R ベクターは、トランス遺伝子の発現を駆動する、ヒト伸長因子1アルファ1 (E F 1 A 1) プロモーターおよびウシ成長ホルモンポリA配列、ならびにK o z a k リボソーム開始配列を含有した。ベクターは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (W P R E) のほか、p F U G W プラスミドに由来するL T R 配列も使用した。複製起点は、p U C 1 9 プラスミドに基づいた。図2は、C D 3 3 C A R のレンチウイルスベクターマップである。

【0318】

[実施例2]

C D 3 3 C A R ベクターを作り出す方法

L V - C D 3 3 C A R ベクターを、3つの供給源からアセンブルした：

(1) 以下を、既に構築されたベクターから得、制限酵素であるP a c I およびB l p I で消化した：

(a) p F U G W 骨格構成要素

(b) ヒト伸長因子1アルファ1プロモーター (E F 1 A 1) プロモーター、およびG M - C S F R アルファシグナルペプチドを伴う抗C D 3 3 s c F v を駆動するエンハンサー

(c) C D 8 ヒンジ領域および膜貫通領域

(2) 4 - 1 B B シグナル伝達ドメインモジュールは、合成遺伝子として得た；

(3) C D 3 、T 2 A 転写リンカー、G M - C S F R アルファシグナルペプチド、H E R 1 t 枯渇マーカー、ウシ成長ホルモンポリA、およびフランкиングのクローニング部位を含有する領域を、P C R により増幅した。

【0319】

各カセットへと施された相同性領域を使用して、3つのD N A カセットを、i n v i t r o におけるアセンブリー反応において、併せてアニーリングした。結果として得られるレンチウイルスベクターは、レンチウイルスゲノムに対して逆方向で、目的のトランス遺伝子 (C D 3 3 C A R およびH E R 1 t) を含有した。S t b 1 4 大腸菌 (*E. coli*) 株への形質転換の後、陽性コロニーを、コロニーP C R により同定し、3つのインサート片を、サンガーシーケンシングにより検証した。全プラスミド配列を、I l l u m i n a

10

20

30

40

50

Next Generation Sequencingにより検証した。

【0320】

4つのプラスミド、LV-CD33 CARベクタープラスミド、ならびに3つのヘルパープラスミド、p8.9so (GagPol)；pMND-VSVG；およびpRSV-Revのリン酸カルシウム沈殿トランスフェクションを使用して、10%FBSを伴うDMEM中のHEK-293T細胞内で、ベクターを作出した。

【0321】

プラスミドトランスフェクションの約18時間後、完全培地交換を、ベンゾナーゼ(50U/mL)を含有する培養培地により実行した。培地交換の約24時間後、培養物上清を含有するベクターを採取し、これに、採取物1とラベル付けした。細胞に、未使用の培地を再フィードし、インキュベーターへと戻した。フィルターを使用して、採取物1の上清を清澄化させ、2~8の間で、一晩にわたり保存した。

10

【0322】

翌日、細胞を、顕微鏡により観察し、ベクターを含有する上清を、前出と同様に濾過される採取物2として、再度採取した。採取物1の上清を、濾過された採取物2の上清と組み合わせ、プールされた上清を、0.45μmのフィルターを通して、さらに清澄化させた。アニオン交換膜クロマトグラフィーを使用して、清澄化させたベクター採取物を、精製し、中空糸デバイスを使用して、選択した培地へと、濃縮および透析濾過した。精製されたLV-CD33 CARベクターを充填し、-80で凍結させて保存した。

【0323】

20

[実施例3]

送達系の効率

健常ドナーに由来するT細胞への、LV-CD33 CARレンチウイルスベクターによる形質導入は、典型的に、形質導入の12~14日後において、CD33 CARおよびHER1tを安定的に共発現する、25~50%の細胞を結果としてもたらした。図4は、CAR-T細胞の作出のための、典型的なレンチウイルスによる形質導入の概略について記載する。図5は、レンチウイルスによる形質導入の12日後における、健常ドナーのT細胞1個からの、CD33 CARおよびHER1tの発現についての代表的なデータを示す。Dynabeads(登録商標)Human T-Activator CD3/CD28ビーズを使用して、精製ヒトCD3+ T細胞を活性化させてから、感染多量度(MOI)を5として、CD33 CARレンチウイルスベクターによる形質導入を行った。細胞は、IL-2を含有する培地で、形質導入後12日間にわたり増殖させた。形質導入の12日後に、フローサイトメトリー解析を実施して、それぞれ、プロテインLおよびセツキシマブmAbにより測定される、CD33 CARおよびHER1tの発現を評価した。

30

【0324】

図6は、CD33 CARの、レンチウイルスにより形質導入された細胞からの発現を、ウェスタンプロットにより確認する。拡大増殖させた、非形質導入CD33 CAR-T細胞またはレンチウイルス形質導入CD33 CAR-T細胞を培養し、プロテアーゼ阻害剤を伴うRIPA緩衝液を使用して、細胞溶解物を作出した。また、還元条件を伴うゲルへとロードされたタンパク質の量を標準化ように、ドナーにおいて作出された試料に対して、BCAアッセイも実施した。タンパク質の転写後、膜をプロッキングし、次いで、1μg/mLの抗CD3 抗体(クローン8D3)に続き、ヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ検出抗体でプロービングした。バンドは、化学発光により検出し、デジタルイメージングシステムにより捕捉した。16kDaのバンドが、内因的に発現したCD3を表すのに対し、60kDaのバンドは、CD3シグナル伝達部分を発現するCD33 CARを表す。CD33 CAR-T細胞だけが、内因性のCD3 バンドに加えて、60kDaのバンドを示すのに対し、非形質導入細胞およびJurkat T細胞は、内因性CD3だけを提示する。

40

【0325】

50

図 7 は、レンチウイルスベクターによる形質導入後における培養物中の、 C D 3 3 C A R - T 細胞の、 *ex vivo* における増殖を示す。出発細胞集団は、 2.5×10^5 個であり、示されるデータは、4例の独立の T 細胞ドナーによる平均値 \pm S E M である。 C D 3 3 C A R - T 細胞は、効率的に形質導入され、 *ex vivo* において、臨床的に妥当な用量が達成されたことを意味するレベルへと拡大増殖された。

【 0 3 2 6 】

[実施例 4]

遺伝子素材の組込み

送達された遺伝子素材は、プロウイルスゲノムの形態で組み込まれた。レンチウイルスによる形質導入を使用して、T 細胞内に導入されたトランス遺伝子は、研究期間にわたり安定的であった。図 8 は、レンチウイルスによる形質導入後における、 C D 3 3 - C A R - T 細胞についてのコピー数評価である。5のM O I を使用して、ヒト S U P T 1 T 細胞または健常なドナー 2 7 0 1 6 9 (D 2 7 0 1 6 9) に由来する T 細胞への、レンチウイルスによる形質導入後において、宿主ゲノムへと組み込まれた遺伝子コピーの数を決定するのに、ドロップレットデジタル P C R (d d P C R) を用いた。形質導入の少なくとも 1 4 日間後において、ゲノム D N A (g D N A) を得た。 d d P C R 反応は、 B i o - R a d 社製の d d P C R システム (Q X 2 0 0 T M A u t o D G d d P C R システム) を、 C D 3 3 C A R を検出するための、 T a q m a n ベースのプライマーおよびプローブセットと共に使用して準備した。あらゆる細胞は、2 コピーずつの R N a s e P 遺伝子を有するという仮定に基づき、 R N a s e P を、コピー数変異体 (C N V) を評価するための、標準化基準遺伝子として使用した。 S U P T 1 / C D 3 3 C A R - T 細胞上および D 2 7 0 1 6 9 / C D 3 3 C A R - T 細胞上の C D 3 3 C A R の発現は、フローサイトメトリーにより確認され、それぞれ、約 8 0 % および約 3 0 % (データは示さない) であると報告された。 D 2 7 0 1 6 9 / C D 3 3 C A R - T 細胞について、アッセイにおいて測定された試料 (「測定」と称する) は、混合集団に由来するが、さらなる計算を実施して、 C A R を発現する T 細胞の、インサートのコピー数 (「逆算」と称する) を決定した。示されるデータは、2 つの実験による、細胞 1 個当たりの平均値コピー数 \pm S D である。

【 0 3 2 7 】

[実施例 5]

遺伝子導入系の有効性について評価する、動物モデルおよび培養細胞モデル

導入された遺伝子の発現により測定される、レンチウイルス媒介性遺伝子導入の効率を、形質導入細胞のフローサイトメトリーにより査定した (図 5)。形質導入 T 細胞の拡大増殖は、妥当な用量を達成するように、形質導入後 1 2 ~ 1 4 日間にわたり、 *ex vivo* の培養物培地内で実行した (図 7)。

【 0 3 2 8 】

前臨床解析において、レンチウイルスによる形質導入 (図 8) を伴う T 細胞表面上で観察される C D 3 3 C A R のレベルは、 *in vitro* において、異なる C D 3 3 陽性標的腫瘍細胞株を、効率的かつ特異的に消失させる (図 9) ほか、 C D 3 3 陽性腫瘍を保有するマウスの生存を、対照群に対して、統計学的に有意なレベルまで延長する (図 1 2) のに十分であった。また、さらなる支持データについては、図 5 および 6 も参照されたい。

【 0 3 2 9 】

C D 3 3 C A R - T 細胞の機能的な能力を、 *in vitro* モデルおよび *in vivo* モデルの両方において調べた。

【 0 3 3 0 】

C D 3 3 C A R - T 細胞についての *in vitro* 試験は、 C D 3 3 を発現する A M L 細胞株のほか、表面上にヒト C D 3 3 を発現するように形質導入されたマウス E L 4 細胞株に対する細胞傷害作用、および C D 3 3 陽性標的細胞との共培養時における、 I F N - 、 I L - 2 、および T N F - サイトカインの分泌を含んだ。 C D 3 3 C A R - T 細胞は、セツキシマブの投与により、輸注された C A R - T 細胞の枯渇を可能とするよう

10

20

30

40

50

に、HER1^tタンパク質を共発現した。ADCCにより、CD33 CAR-T細胞を消失させるセツキシマブの能力についてもまた、in vivoにおいて評価した。

【0331】

CD33 CAR-T細胞は、標的細胞に対して、用量依存的に、特異的に細胞傷害性であった(図9)。エフェクター：標的(E:T)比を10:1(B)とした細胞傷害作用CD33 CAR-T細胞、およびE:T比を1:1(B)とした細胞傷害作用CD33 CAR-T細胞を、2時間にわたるユーロピウム放出アッセイにより測定した。標的細胞に対する、CD33 CAR-T細胞による用量依存的細胞傷害作用を、10:1のE:T比と1:1比のE:T比との間で観察したが、標的細胞が、表面上で、CD33を発現した場合に限り、有意な細胞傷害作用が観察された。非形質導入T細胞は、任意の被験標的細胞に対する、有意な細胞傷害作用を示さなかった。グラフに示されるデータは、4例の異なるドナーに由来する平均値±SEMであり、**p値<0.01および***p値<0.001である。

10

【0332】

CD33 CAR-T細胞は、様々な標的細胞株との共培養時に、非形質導入T細胞と比較して、高レベルの、多様なサイトカインを、特異的に分泌した(図10)。CD33を発現する、多様な標的AML細胞株との共培養後において、非形質導入T細胞およびCD33 CAR-T細胞からのサイトカイン産生についての評価。マウスEL4細胞株を、ヒトCD33発現についての陰性対照として使用した。T細胞を、共に、エフェクター：標的(E:T)比を10:1として、一晩にわたり共培養し、培養物上清を、QBeads(Intellicyt)を使用する、マルチプレックスサイトカイン解析のために回収した。ヒトIFN、ヒトIL-2、およびヒトTNF分泌の、培養培地への発現についてのマルチプレックス解析をアッセイした。CD33 CAR-T細胞の、CD33を発現する標的細胞との共培養後に、同じ標的細胞を伴う、非形質導入T細胞による基本発現レベルと比較した場合に、高レベルのサイトカインである、IFN、IL-2、およびTNFが検出された。プロットされた値は、被験試料についての平均値±SDを、二連で表す。

20

【0333】

セツキシマブは、表面上で、HER1^tを発現するCD33 CAR-T細胞を、用量依存的に消失させることができた(図11)。ADCCは、E:T比を5:1とする、精製エフェクターNK細胞と共に、24時間にわたり共インキュベートされたPKH26標識化標的細胞を使用する、7-AADの取込みについてのフローサイトメトリー解析により決定した。セツキシマブによる、CD33 CAR-T細胞に対する、特異的な用量依存的ADCCを観察した。プロットされた値は、被験試料についての平均値±SDを、二連で表す。

30

【0334】

また、生物発光イメージングにより腫瘍負荷をモニタリングするのに、fLUCを発現するように形質導入されたAML細胞株であるMOLM-13(MOLM-13/fLUC)を使用して、腫瘍負荷を特異的に低減する、CD33 CAR-T細胞の能力を、免疫不全NSGにおける、in vivoの異種移植モデル(NOD.Cg-PrkdcscidIL2rgtm1Wjl/SzJ、NODscidガンマ)マウスにおいても調べた。研究デザインの詳細については、表2に描示する。MOLM-13/fLUC腫瘍を保有するNSGマウスにおける、CD33 CAR-T細胞の投与は、生理食塩液、非形質導入T細胞、およびCD33 CAR-T細胞と同じ健常T細胞ドナーから作出された、非特異的CD19 CAR-T細胞からなる対照処置群と比較した場合に、統計学的に有意なレベル($P<0.001$)へと、腫瘍負荷を低減し、生存平均値を延長した。CD33 CAR-T細胞は、腫瘍を保有するマウスのin vivoにおいて増殖した(図14)。注射の前の、NSGマウスにおける、CD33 CAR-T細胞についてのフローサイトメトリー解析、および処置されたマウスの多様な組織内の、CD33 CAR-T細胞の検出を実行して、in vivoにおけるCAR-T細胞の存続および拡大増殖を

40

50

記録した(図14A)。CD33 CARレンチウイルスにより、健常ドナーT細胞に形質導入し、ex vivoにおいて拡大増殖させた。処置のための、CD33 CAR-T細胞の注射の前に、フローサイトメトリー解析を実施して、CD33 CARの発現レベルを評価した。示される集団に、FSC/SSC/生/CD3+細胞について、ゲートをかけた(図14B)。18日目(尾静脈への全身IV注射による、CD33 CAR-T細胞注射の10日後)に、フローサイトメトリー解析を、MOLM-13腫瘍を保有する、CD33 CAR-T処置マウスから回収された、血液試料、骨髄試料、および脾臓試料に対して実施して、CD33 CAR-T細胞の存在を検出した。集団に、FSC/SSC/hCD45/hCD3の発現に基づきゲートをかけた、1つの代表的なマウスに由来するデータ。

10

【0335】

0日目において、免疫不全NSGマウスに、ホタルルシフェラーゼ(fLUC)遺伝子を発現するように修飾されたMOLM-13細胞株(MOLM-13/fLUC)5×10⁵個を、静脈内(IV)注射した。7日目に、腫瘍を保有するマウスを、IVISイメージングを介する生物発光の発現により確認し、次いで、様々な処置群へと無作為化した。8日目に、マウスを、IV注射を介する生理食塩液だけ、非形質導入T細胞(マウス1匹当たりの全T細胞10⁷個)、細胞タグを伴わないか、もしくはHER1t細胞タグを伴うCD33 CAR-T細胞(マウス1匹当たりのCD33 CAR-T細胞10⁷個)、またはCD19 CAR-T細胞(マウス1匹当たりのCD19 CAR-T細胞10⁷個)により処置した。加えて、15日目に、別の群のマウスに、HER1t細胞タグを伴うCD33 CAR-T細胞(マウス1匹当たりのCD33 CAR+T細胞10⁷個)の2回目の投与を施した。全腫瘍負荷を、生物発光イメージングを使用するfLUC発現により、研究の経過にわたり査定した。様々な処置群による生存曲線を、図12に示す。生理食塩液、非形質導入T細胞、およびCD19 CAR-T細胞におけるマウスの生存時間中央値は、15日間であった。細胞タグを含有しないCD33 CAR-T細胞で処置されたマウスも、生存を延長したが、CD33 CAR-T細胞(投与1または2回)で処置された全てのマウスは、最長29日間の完全な生存を示した。

20

【0336】

腹側および背側から見た平均フラックス値を、様々な処置群について、図13にプロットする。示される値は、光子/秒として表した全フラックス値であり、各群について、平均±SEMを示した。実線の上向き矢印は、各群についての、CAR-Tの投与日を指示し、15日目における、点線の上向き矢印は、投与2回群についての、CD33 CAR-Tの2回目の投与を指示す。

30

【0337】

40

50

【表 3】

表 3: *in vivo* の NSG マウスにおける CD33 CAR-T 細胞の有効性について査定する研究デザイン

例数	腫瘍細胞株	0 日目における腫瘍細胞用量(投与経路)	処置	動物 1 匹当たりの用量(細胞数)	CAR T 細胞投与の実施(日目)
12	MOLM-13/fLUC	細胞 5×10^5 個(静脈内)	生理食塩液	該当なし	8 日目
12	MOLM-13/fLUC	細胞 5×10^5 個(静脈内)	非形質導入 T 細胞	10^7	8 日目
11	MOLM-13/fLUC	細胞 5×10^5 個(静脈内)	CD33 CAR-T(細胞タグを伴わない)	10^7	8 日目
11	MOLM-13/fLUC	細胞 5×10^5 個(静脈内)	細胞タグを伴う CD33 CAR-T(投与 1 回)	10^7	8 日目
11	MOLM-13/fLUC	細胞 5×10^5 個(静脈内)	細胞タグを伴う CD33 CAR-T(投与 2 回)	各投与当たり 10^7 個	8 日目および 15 日目
12	MOLM-13/fLUC	細胞 5×10^5 個(静脈内)	CD19 CAR-T	10^7	8 日目

10

20

【0338】

[実施例 6]

サイトカイン解析: マウスに由来する血漿試料を、プロトコール内の特異的時点、またはマウスが瀕死となり、人道的理由で安樂死させられた時点において回収した。血漿を得るために、血液を、回収用 EDTA 試験管内に回収し、次いで、室温、 $5,000 \times g$ で、15 分間にわたりスピンし、次いで、結果として得られる血漿を、きれいな回収用試験管へと導入した。血漿を凍結させ、アッセイまで、-80°で保存した。ProcartaPLEX (登録商標) ヒトサイトカイン / ケモカイン / 増殖因子パネル 1 キット (eBioscience) は、以下の解析物: 脳由来神経栄養因子 (BDNF)、上皮増殖因子 (EGF)、エオタキシン、線維芽細胞増殖因子 2 (FGF-2)、顆粒球 / マクロファージ - コロニー刺激因子 (GM-CSF)、GRO アルファ (CXCL1)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インターフェロン (IFN) アルファ、IFN ガンマ (IFN- γ)、インターロイキン (IL) - 1 受容体アルファ (IL-1RA)、IL-1 アルファ、IL-1 ベータ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17A、IL-18、IL-21、IL-22、IL-23、IL-27、IL-31、インターフェロン ガンマ誘導性タンパク質 10 (IP-10; CXCL10 としてもまた公知である)、白血病阻害因子 (LIF)、単球走化性タンパク質 - 1 (MCP-1; CCL2 としても公知である)、マクロファージ炎症性タンパク質 1 アルファ (MIP-1 アルファ; CCL3 としてもまた公知である)、MIP-1 ベータ (CCL4 としてもまた公知である)、ベータ - 神経増殖因子 (NGF ベータ)、RANTES (CCL5 としてもまた公知の Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted)、血小板由来増殖因子 BB (PDGF-BB)、胎盤増殖因子 1 (PIGF-1)、幹細胞因子 (SCF)、間質由来因子 1 アルファ (CXCL12 アルファ としてもまた公知の SDF-1 アルファ)、腫瘍壞死因子アルファ (TNF アルファ)、TNF ベータ (リンホトキシンアルファ としてもまた公知である)、血管内皮増殖因子アルファ (VEGF-A)、および血管内皮増殖因子 D (VEGF-D) のマルチプレックス検出のための、45 プレックスの磁気ビーズベースのキットである。アッセイは、製造元の特殊なプロトコールに従い実施した。データは、Bio-PLEX Manager ソフトウェア version 6.1 を稼働する Bio-Rad Bi

30

40

50

o - P l e x (登録商標) 200 測定器 (Bio - Rad, Hercules, CA) 上で収集した。

【0339】

11日目に、マウスから採取された血漿を使用して、ヒトサイトカインおよびヒト増殖因子の発現について評価した。図22Aを参照されたい。MOLM-13およびNSGマウスへと導入されるT細胞は、ヒト由来であるので、ヒトサイトカインの測定は、腫瘍細胞に対して作用するCAR-T細胞の作用機構への詳細について、さらに検討することを可能とした。生理食塩液による処置だけを施されたMOLM-13腫瘍保有マウスでは、MCP-1およびMIP-1ベータ(データは示さない)のほか、他のいくつかの増殖因子など、一部のヒト全身サイトカインが検出されたが、IFN およびTNF などのサイトカインのレベルは、検出範囲を下回った(図22A)。非形質導入T細胞で処置されたMOLM-13腫瘍保有マウスもまた、生理食塩液だけにより処置された群と比較して同様の、サイトカインおよび増殖因子の発現パターンを示し続けた。非形質導入T細胞群において見られたサイトカインおよび増殖因子のレベルは、このマウスマル系における、ヒトT細胞と腫瘍細胞との混合物によるベースライン値をもたらす。CD33-CAR-T細胞(CAR-T細胞が、細胞タグを共発現したのかどうかにかかわらず)によるサイトカイン発現データの解析は、GM-CSF、IL-10、IL-18、およびIP-10に加えて、著明なレベルのIFN およびTNF の産生を示した。これに対し、CD19-CAR-T細胞の、MOLM-13腫瘍保有マウスへの投与は、GM-CSF、IFN 、IL-18などのサイトカインについて、生理食塩液だけまたは非形質導入T細胞のマウス群と比較して、わずかなレベルの上昇を示したが、これらのサイトカインの発現レベルは、CD33-CAR-T細胞(細胞タグを伴わない)またはCD33-CAR-T細胞(細胞タグを伴う)またはCD33-CAR-T細胞(細胞タグを伴う;投与2回)を投与されたマウスにおいて検出される、同じサイトカインのレベルと比較した場合、それほど上昇しなかった。

【0340】

血液試料は、腫瘍細胞のほか、養子導入T細胞の存在について、フローサイトメトリーにより査定する研究の、指定された時点において採取した。図22Bにおいて示される通り、16日目に、マウスの末梢血中では、MOLM-13/fLUC細胞の存在を検出することができた。MOLM-13細胞内の、CD33抗原の喪失の過小評価または潜在的 possibilityを回避するために、CD123抗体を用いて、腫瘍細胞を同定した。生理食塩液だけ、非形質導入T細胞、またはCD19-CAR-T細胞を投与されたマウスから得られた末梢血試料中では、MOLM-13腫瘍細胞が検出された。加えて、非形質導入T細胞またはCD19-CAR-T細胞を施されたマウスからは、導入されたT細胞が、血液中で、16日目および血液についての細胞解析を開始した11日目という早期に検出された。CD33-CAR-T細胞を投与されたマウスに由来する血液は、MOLM-13腫瘍細胞が、ほとんど存在しない~全く存在しない一方で、T細胞集団は、明らかに存在することを示した。

【0341】

図22Cは、さらなるAML腫瘍細胞株(THP1およびHL60)に対する細胞傷害活性を裏付ける。CD33-CAR-T細胞の、リダイレクトされた細胞傷害性機能についてのさらなる証拠は、CD33腫瘍細胞との共培養時における、免疫エフェクター細胞によるサイトカイン発現を査定することによりもたらされた。いくつかのCD33発現腫瘍細胞株を、CD33-CAR-T細胞との共培養後における、IFN 、TNF (また、TNF とも称する)、およびIL-2の発現の誘導について評価した。CD33-CAR-T細胞の、CD33発現腫瘍細胞との共培養は、同じドナーに由来する非形質導入T細胞と比較して、IFN 、TNF 、およびIL-2の発現の顕著な増加を引き起した(図10)。さらに、腫瘍標的の陰性対照として用いられた親EL4細胞株からは、サイトカインの発現が検出されなかった。細胞内サイトカイン染色(ICS)を、標的特異性についてのさらなる確認として実施した。CD33-CAR-T細胞が、CD33を発

10

20

30

40

50

現するMOLM-13腫瘍細胞、THP-1腫瘍細胞、またはHL-60腫瘍細胞との、一晩にわたる共培養の後において、IFNおよびIL-2の両方の発現を、細胞レベルで裏付けたのに対し、マウスEL4細胞との共培養は、T細胞だけにより見られるレベルを上回る、著明なサイトカイン発現を示さなかった（図23E）。

【0342】

CD33-CAR-T細胞は、再発性AML疾患を伴うAML患者（ドナーE261）から得られた細胞から作出了。略述すると、AMLドナーに由来する凍結保存PBM Cを融解させ、抗CD3/抗CD28ビーズを使用して、T細胞を選択し拡大増殖させた。T細胞に、CD33-CAR-LV粒子により形質導入し、T細胞を、培養物中で拡大増殖させた。この融解PMB C試料の特徴付けから、このドナーからの場合、PBM C試料中に存在するT細胞は低頻度であり、主にCD33+細胞からなることが明らかとなった（図23A）。CD33-CAR-T細胞を作出する、LVによる形質導入のために、T細胞を、単離し、活性化させ、拡大増殖させた。T細胞単離後における残りの細胞は、CD33+であり（図E-B）、サイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の使用により、培養物中で維持した。このAMLドナーについて、T細胞のうちの約41%は、LVによる形質導入後の、12日間にわたる培養の後において評価される通り、細胞表面上で、CD33-CARを発現した（図23C）。細胞傷害活性は、このドナーに由来するCD33-CAR-T細胞の、MOLM-13腫瘍細胞または患者自身のCD33発現腫瘍細胞との、フローサイトメトリーベースの共培養アッセイにおいて裏付けた。残りの細胞集団の、査定した時点（0日目および3日目）における、染色による、細胞上の、CD3（T細胞）およびCD33（腫瘍）の発現についての評価によれば、CD33-CAR-T細胞との共培養だけが、CD33発現腫瘍細胞を消失させることができたのにに対し、非形質導入（UNT）T細胞を伴う共培養設定では、細胞殺滅が観察されなかった（図23D）。

【0343】

加えて、細胞内サイトカイン染色を使用するフローサイトメトリーにより評価される通り、AMLドナーから作出されたCD33-CAR-T細胞はまた、IFNおよびIL-2の発現も誘導した。細胞内サイトカイン染色は、CD33-CAR-T細胞（AMLドナーE261に由来する）の、表示の腫瘍細胞との共培養の、18時間後において実施した。T細胞は、細胞表面染色し、次いで、固定/透過化に続き、サイトカインであるIFNおよびIL-2について染色した。FSC/SSC/生/CD3 T細胞に基づき、細胞にゲートをかけた。CD33-CAR-T細胞独またはマウスEL4腫瘍細胞との共培養が、IFNまたはIL-2の発現を示さなかったのに対し、MOLM-13または特定のドナー細胞に由来する腫瘍細胞との共培養後においては、いずれのサイトカインの発現の増大も観察された（図23E）。加えて、CD33-CARを発現する細胞からのサイトカイン発現が、特異的に誘導されたのに対し、CARを発現しないT細胞は、サイトカインの発現を示さなかった。

【0344】

[実施例7]

多様なシグナル伝達ドメインを伴うレンチウイルスCD33-CARを構築し、発現について調べた。CD3シグナル伝達ドメインだけを伴うCD33-CAR、CD28-CD3z（CD28zと称する）シグナル伝達ドメインを伴うCD33-CAR、またはwith HER1tの共発現を伴うCD28-CD3zドメインを伴うCD33-CARを伴うレンチウイルス粒子を、図4に概括された概略図に従い、あらかじめ活性化させたヒトT細胞へと形質導入した。フローサイトメトリー解析は、形質導入の12~14日後に、T細胞について実施した。CD33-CARの発現は、プロテインL染色を介して検出し、HER1tは、セツキシマブ染色を介して検出した（図15Aおよび15B）。

【0345】

その標的を認識するCD33-CAR（異なるシグナル伝達ドメインを伴う）の特異性を裏付けるために、共培養アッセイを、多様な腫瘍細胞株に対して実施した。被験細胞株

10

20

30

40

50

上の C D 3 3 の発現を表示した(図 16 A)。K 5 6 2 細胞は、C D 3 3 を内因的に発現するので、K 5 6 2 / C D 1 2 3 において、発現を観察し、K 5 6 2 / C D 3 3 細胞株には、C D 3 3 を過剰発現するように形質導入したことに留意されたい。E L 4 は、ヒト C D 3 3 を発現しないマウス細胞株である。細胞傷害作用は、D E L F I A B A T D A 試薬(D E L F I A E u T D A 細胞傷害作用アッセイ; Perkin Elmer)を使用して、多様な腫瘍標的細胞株を標識化し、次いで、C D 3 3 C A R T 細胞または非形質導入 T 細胞(U N T)を、標識化腫瘍細胞と共に、エフェクター:標的比(E : T)を、20 : 1 の比として共培養することにより決定した。2 時間後に、アッセイに由来する上清を採取し、D E L F I A ユーロピウムアッセイを添加することにより現像し、時間分解型蛍光測定器上で読み取った(図 16 B)。20 : 1 のエフェクター:標的(E : T)比を用いる、C D 3 3 C A R T 細胞の、C D 3 3 を発現する腫瘍細胞との共培養、および18 時間にわたるインキュベーションによりロバストなI F N 産生を得、培養物上清を採取し、製造元の指示書に従い、E L I S A により、I F N の産生についてアッセイした。非形質導入 T 細胞(U N T)は、共培養物中で、I F N が、ほとんど検出されない~全く検出されなかった(図 16 C)。

【0346】

AML を伴うと診断された患者の、凍結保存 P B M C 試料に由来する T 細胞への、レンチウイルスによる形質導入は、健常ドナーの T 細胞に由来する T 細胞への形質導入のために、上記で概括された工程と同様に実施した。略述すると、抗 C D 3 / C D 2 8 ビーズに続き、M O I を変動させる、レンチウイルスによる、C D 3 3 C A R - 4 1 B B z - T 2 A - H E R 1 t の形質導入を使用して、P B M C 試料から単離された T 細胞を活性化させた。形質導入された T 細胞培養物を、14 日間の培養期間にわたり拡大増殖させた。プロテイン L の染色により決定される C A R の発現は、培養物拡大増殖期間全体にわたり査定した。C D 3 3 C A R のレベルは、T 細胞表面上で観察した(データは示さない)。

ドナーの自家 C D 3 3 発現腫瘍細胞のほか、AML 腫瘍細胞株を用いて、C D 3 3 C A R T 細胞の細胞傷害活性を裏付けた。1 つの場合には、低 E : T 比を使用して、共培養物を準備した。様々な時点において、フローサイトメトリー解析を実施して、T 細胞の存在および頻度を決定し、多様な時点において、共培養物中に存在する C D 3 3 発現腫瘍細胞を評価した。C D 3 3 C A R - T 細胞の、自家 C D 3 3 発現腫瘍細胞との共培養は、C D 3 3 + 腫瘍細胞の減少または非存在により決定される通り、細胞傷害活性を裏付けた(データは示さない)。同様の知見は、M O L M - 1 3 など、公知の被験 A M L 腫瘍細胞株によっても観察された。

【0347】

[実施例 8]

S l e e p i n g B e a u t y による C D 3 3 C A R

様々な C D 3 3 C A R 構築物を、S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼ-トランスポゾン系において、構築および作出した(図 3)。例えば、C D 3 3 - C D 8 a - C D 2 8 T M - C D 3 z 構築物を、多様な E F 1 a プロモーター長(短、中、および長)で作り出した。また、H E R 1 t 細胞タグを伴う C D 3 3 C A R 構築物も作りだし、調べた。

【0348】

ゲノムへの構築物の組込みを媒介するように、S l e e p i n g B e a u t y ベースのトランスポゾン系を使用して、C A R 構築物を、細胞へと、電気穿孔を介して導入した。0 日目に、P B M C 2 0 0 0 万個を、15 μ g のトランスポゾンおよび5 μ g のトランスポザーゼ(p K a n - C M V - S B 1 1)と混合された100 μ L のA m a x a H u m a n T c e l l N u c l e o f e c t o r s o l u t i o n (型番: V P A - 1 0 0 2; Lonza、Basel、Switzerland)中に再懸濁させ、P r o g r a m U - 1 4 を使用して、電気穿孔した。翌日(1 日目)、細胞をカウントし、セツキシマブを使用する、プロテイン L 染色およびH E R 1 t 染色により、C A R の発現について表面染色した。細胞を、比を1 : 1 とする、照射(100 G y)またはマイトマ

10

20

30

40

50

イシンC処理されたAaPCで刺激した。使用されるAaPC細胞は、CD33の内因的発現を伴う、CD64 - CD86 - 41BBL - CD19 - mbIL - 15 / IL15Ra - ROR1抗原を発現するK562 - AaPCであった。CAR T細胞を、比を1:1とするAaPCで刺激した。培養物に、刺激の第1のラウンドには、IL - 21 (30ng/ml)だけを補充し、その後、残りの刺激には、組換えヒトIL - 2 (50IU/ml)およびIL - 21 (30ng/ml) (PeproTech)を補充した。T細胞培養物は、典型的に、7日間にわたり続いた各刺激サイクルの終了時において表現型解析にかけた。プロテインL染色を用いて、またはマルチパラメータフローサイトメトリーにより検出される、組換えCD33 / Fcタンパク質染色により、培養物を、CAR発現について、表現型解析にかけた。培養物はまた、NK細胞 (CD3 - CD56+集団として規定される)の増殖についても、緊密にモニタリングし、百分率が、全細胞集団のうちの10%を超えたなら、製造元の指示書に従い、CD56についての磁気ビーズ (stem Cell Technologiesおよび/またはMiltenyi Biotech)を使用して、CAR T細胞培養物から除去した。フローサイトメトリーを使用して、AaPCによる刺激後における、複数のドナーPBMCからの、CD33 CARの発現について査定した。

【0349】

その標的を認識するCD33 CAR (様々なシグナル伝達ドメインを伴う)の特異性を裏付けるために、共培養アッセイを、多様な腫瘍細胞株に対して実施した。K562細胞は、CD33を内因的に発現し、EL4は、ヒトCD33を発現しないマウス細胞株であることに留意されたい。細胞傷害作用は、DELFIA BATDA試薬 (DELFIA EuTDA細胞傷害作用アッセイ; Perkin Elmer)を使用して、多様な腫瘍標的細胞株を標識化し、次いで、CD33 CAR T細胞または非形質導入T細胞 (UNT)を、標識化腫瘍細胞と共に、エフェクター:標的比 (E:T)を、10:1の比とし、E:T比を2:1として共培養することにより決定した。2時間後に、アッセイに由来する上清を採取し、DELFIAユーロピウムアッセイを添加することにより現像し、時間分解型蛍光測定器上で読み取った (図17)。

【0350】

脱顆粒化アッセイ、およびIFNによる細胞内サイトカイン染色

リソソーム膜タンパク質1 (LAMP-1) としてもまた公知のCD107aは、細胞の後期エンドソーム - リソソーム内では、構成的に発現するが、脱顆粒化細胞の細胞表面上では、一過性に発現する。CD33の発現を伴うかまたは伴わない、異なる標的細胞を認識するCD33 CAR Tの能力を、細胞1個当たりの細胞内IFNの共時的な検出により評価する、脱顆粒化アッセイを確立した。略述すると、CD33 CAR T細胞を、96ウェルプレート内のE:T比を10:1として、標的細胞と共に共培養した。標的細胞は、K562 / CD19 (内因性のCD33発現を有する)、THP-1およびEL-4 (マウス細胞株)を含んだ。共培養の開始時に、蛍光コンジュゲートCD107a抗体または蛍光コンジュゲートアイソタイプ抗体を、Transport Inhibitor Cocktail (モネンシンおよびブレフェルジンを含有する; 1倍濃度; eBioscience)と共に添加し、37で、4時間にわたりインキュベートした。インキュベーション時間の終了時に、細胞を、プレート内でペレット化させ、細胞表面抗原を、CAR発現およびT細胞マーカーの検出のために染色した。細胞表面染色の後、細胞はまた、製造元の指示書に従い、Fixable Cell viability dye (eBioscience)によっても染色し、次いで、洗浄するのに続き、Fix / Perm Solution (BD Biosciences)による固定を行った。試料を固定した後で、細胞を、Perm / Wash solution (BD Biosciences)中で洗浄し、次いで、蛍光コンジュゲート抗ヒトIFN抗体で細胞内染色した。試料を洗浄し、次いで、適切な染色緩衝液中に再懸濁させ、LSR IIフローサイトメーター (BD Biosciences)により、データを収集した。図18に示した通り、CD107a脱顆粒化の著明な発現が、K562由来細胞およびCD33を発現す

10

20

30

40

50

る T H P - 1 細胞株だけにおいて観察されたのに対し、免疫エフェクター細胞だけおよび E L - 4 との共培養により観察された脱顆粒化は、最小限であった。細胞内 I F N 発現についても、同様のパターンを観察した。

【0351】

[実施例 9]

ゲノムへの構築物の組込みを媒介するように、S l e e p i n g B e a u t y ベースのトランスポゾン系を使用して、C A R 構築物を、細胞へと、電気穿孔を介して導入した。0 日目に、P B M C 2 0 0 0 万個を、1 5 μ g のトランスポゾン (C D 3 3 C A R - C D 8 - C D 2 8 z に対して) および 5 μ g のトランスポザーゼ (p K a n - C M V - S B 1 1) と混合された 1 0 0 μ L の A m a x a H u m a n T c e l l N u c l e o f e c t o r s o l u t i o n (型番 : V P A - 1 0 0 2 ; L o n z a , B a s e l , S w i t z e r l a n d) 中に再懸濁させ、P r o g r a m U - 1 4 を使用して、電気穿孔した。翌日 (1 日目) 、細胞をカウントし、セツキシマップを使用する、プロテイン L 染色およびH E R 1 t 染色により、C A R の発現について表面染色した。細胞を、比を 1 : 1 とする、照射 (1 0 0 G y) またはマイトイシン C 処理された A a P C で刺激した。使用される A a P C 細胞は、C D 6 4 - C D 8 6 4 1 B B L - C D 1 9 - m b I L - 1 5 / I L 1 5 R a - R O R 1 抗原を発現する K 5 6 2 - A a P C であった。C A R T 細胞を、比を 1 : 1 とする A a P C で刺激した。培養物に、刺激の第 1 のラウンドには、I L - 2 1 (3 0 n g / m l) だけを補充し、その後、残りの刺激には、組換えヒト I L - 2 (5 0 I U / m l) および I L - 2 1 (3 0 n g / m l) (P e p p r o - T e c h) を補充した。T 細胞培養物は、典型的に、7 日間にわたり続いた各刺激サイクルの終了時において表現型解析にかけた。プロテイン L 染色を用いて、またはマルチパラメータフロー-サイトメトリーにより検出される、組換え C D 3 3 / F c タンパク質染色により、培養物を、C A R T 細胞の発現について、表現型解析にかけた。培養物はまた、N K 細胞 (C D 3 - C D 5 6 + 集団として規定される) の増殖についても、緊密にモニタリングし、百分率が、全細胞集団のうちの 1 0 % を超えたら、製造元の指示書に従い、C D 5 6 についての磁気ビーズ (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s および / または M i l t e n y i B i o t e c) を使用して、C A R T 細胞培養物から除去した。フローサイトメトリーを使用して、A a P C による刺激後における、多様なドナー P B M C からの、C D 3 3 C A R の発現について査定した。代表的なドナーによるデータを、C D 3 3 C A R - C D 8 - C D 2 8 z については、表 3 にまとめ、H E R 1 t 細胞タグを伴うかまたは伴わない C D 3 3 - C A R - C D 8 - 4 - 1 B B z については、表 4 にまとめる。図 1 9 は、H E R 1 t タグを伴う、S l e e p i n g B e a u t y C D 3 3 C A R - C D 2 8 z 構築物の発現をさらに裏付ける。

【0352】

表 4 は、様々な P B M C ドナーにおける、例示的な S l e e p i n g B e a u t y C D 3 3 - C D 8 a - C D 2 8 z C A R の発現を裏付ける。

【0353】

【表 4】

P B M C ドナー	C D 3 3 C A R (C A R 3 3 - C D 8 a - C D 8 m - Z) 発現				
	1 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目
205	4%	22%	79%	96%	99%
309	11%	61%	90%	98%	99%
309R	15%	52%	89%	94%	94%

【0354】

表5は、様々なPBMCドナーにおける、例示的な、HER1tタグの発現を伴うSleeping Beauty CD33-CD8a-41BBz CAR、およびHER1tタグの発現を伴わないSleeping Beauty CD33-CD8a-41BBz CARの発現を裏付ける。

【0355】

【表5】

PBMC ドナー	CD33 CAR (CAR33-CD8-41BBz) の発現				
	1日目	7日目	14日目	21日目	28日目
ドナー309	68.9	78.1	79.5	91.2	95
ドナー270169	60.1	65.4	76.2	84.2	94.3
ドナー6507	64.1	52.5	26.8	26.1	40.4
ドナー163890	47.4	63.9	64.2	7022	95.3

PBMC ドナー	CD33 CAR/Her1t (CAR33-CD8-41BBz-HER1t) の発現				
	1日目	7日目	14日目	21日目	28日目
ドナー309	46.7	78.6	86.9	92.4	98.5
ドナー270169	35.7	80.5	89.4	92.4	88.9
ドナー6507	36.7	80.1	79.2	89.1	83.7
ドナー163890	39.7	77.3	85.5	92.8	86.9

【0356】

[実施例10]

レンチウイルスによる、NK細胞への形質導入はまた、多様なHER1tタグ（配列番号32および54）およびCD20tタグへとカップリングさせたCD33 CARによっても実施した。図25～27は、CD33 CAR、ならびにHER1tタグおよびCD20t-1タグの、NK細胞上の発現を裏付ける。図28～29はまた、CD33 CAR NK細胞が、NK抵抗性CD33+ AML細胞を、異なるE:T比で、効率的に溶解させることも裏付けた。異なる標的細胞と共に共培養したところ、CD33 CAR NK細胞により、サイトカイン（例えば、IFN、TNF-a、IL-6、RANTES、GM-CSF、IL-10、MIP-1a、およびMIP-1b）が産生された（データは示さない）。

【0357】

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される、全ての技術用語および科学用語ならびに任意の頭字語は、本発明の分野における当業者が一般に理解する意味と同じ意味を有する。

【0358】

本明細書では、本開示の好ましい実施形態を示し、それについて記載してきたが、当業者には、このような実施形態が、例だけを目的として提示されていることが明らかであろう。今や、本開示から逸脱しない限りにおいて、当業者は、多数の変更、変化、および

10

20

30

40

50

代用に想到するであろう。本明細書で記載される実施形態、またはこれらの実施形態、もしくはその中で記載される態様のうちの1または複数の組合せに対する、多様な代替物を、本開示の実施において利用しうることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は、本開示の範囲を規定するものであり、これらの特許請求の範囲の範囲内にある方法および構造、ならびにそれらの均等物は、その対象となることが意図される。

本発明は以下の態様を含み得る。

[1]

キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸であって、前記CARが、

(a) CD33抗原結合性ドメイン、

(b) ストークドメイン、

(c) 膜貫通ドメイン、

(d) 4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、

(e) CD3ゼータシグナル伝達ドメイン

を含む、単離核酸。

[2]

前記CD33抗原結合性ドメインが、

(a) 配列番号8のアミノ酸配列(hM195scFv)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号9および10のアミノ酸配列(M2H12)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号11および12のアミノ酸配列(DRB2)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド、ならびに

(d) 配列番号14および15のアミノ酸配列(My9-6)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチド

のうちの少なくとも1つを含む、請求項1に記載の単離核酸。

[3]

前記CD33抗原結合性ドメインが、配列番号8のアミノ酸配列(hM195scFv)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドである、請求項1または2に記載の単離核酸。

[4]

前記ストークドメインが、配列番号22のアミノ酸配列(CD8アルファヒンジ)との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドである、請求項1または2に記載の単離核酸。

[5]

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、4-1BBを含む、請求項1から4のいずれかに記載の単離核酸。

[6]

4-1BBの共刺激シグナル伝達ドメインが、配列番号24のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項5に記載の単離核酸。

[7]

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、CD28を含む、請求項1から5のいずれかに記載の単離核酸。

10

20

30

40

50

[8]

C D 2 8 の共刺激シグナル伝達ドメインが、配列番号 2 8 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 7 に記載の単離核酸。

[9]

前記 C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインが、配列番号 2 6 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の単離核酸。

[1 0]

10

切断型上皮増殖因子受容体をさらに含む、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の単離核酸。

[1 1]

前記切断型上皮増殖因子受容体が、H E R 1 t であり、配列番号 3 2 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 0 に記載の単離核酸。

[1 2]

20

前記切断型上皮増殖因子受容体が、H E R 1 t - 1 であり、配列番号 5 4 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 0 に記載の単離核酸。

[1 3]

前記 C A R が、配列番号 3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、または 5 5 に示されるアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の単離核酸。

[1 4]

骨格と、

(1) H E R 1 t 、H E R 1 t - 1 、またはこれらの機能的な変異体のうちの少なくとも 1 つを含む切断型上皮増殖因子受容体、ならびに

30

(2) (a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、

(b) ストークドメイン、

(c) 膜貫通ドメイン、

(d) 4 - 1 B B もしくは C D 2 8 、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および

(e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメイン

を含むキメラ抗原受容体 (C A R)

をコードする核酸配列とを含むベクター。

[1 5]

40

骨格と、

(1) 全長 C D 2 0 、切断型 C D 2 0 (C D 2 0 t - 1) 、またはこれらの機能的な変異体、ならびに

(2) (a) C D 3 3 抗原結合性ドメイン、

(b) ストークドメイン、

(c) 膜貫通ドメイン、

(d) 4 - 1 B B もしくは C D 2 8 、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および

(e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメイン

を含むキメラ抗原受容体 (C A R)

をコードする核酸配列とを含むベクター。

50

[1 6]

レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項 1 4 または 1 5 に記載のベクター。

[1 7]

前記切断型上皮増殖因子受容体が、配列番号 3 2 または配列番号 5 4 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 4 に記載のベクター。

[1 8]

切断型 C D 2 0 (C D 2 0 t - 1)、またはこの機能的な変異体をコードするヌクレオチド配列を含み、前記 C D 2 0 t - 1 が、配列番号 5 6 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 5 に記載のベクター。

10

[1 9]

前記全長 C D 2 0 が、配列番号 3 6 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 5 に記載のベクター。

[2 0]

自己切断型トセア・アシグナ (Thosea asigna) ウィルス (T 2 A) ペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 4 から 1 9 のいずれかに記載のベクター。

20

[2 1]

前記骨格が、 S l e e p i n g B e a u t y トランスポゾンの D N A プラスミドまたは p F U G W である、請求項 1 4 から 2 0 のいずれかに記載のベクター。

[2 2]

プロモーターをさらに含む、請求項 1 4 から 2 1 のいずれかに記載のベクター。

[2 3]

前記プロモーターが、 h E F 1 a 1 である、請求項 2 2 に記載のベクター。

[2 4]

前記 C D 3 3 抗原結合性ドメインが、

(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列 (h M 1 9 5 s c F v) との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド、

30

(b) 配列番号 9 および 1 0 のアミノ酸配列 (M 2 H 1 2) との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号 1 1 および 1 2 のアミノ酸配列 (D R B 2) との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド、ならびに

(d) 配列番号 1 4 および 1 5 のアミノ酸配列 (M y 9 - 6) との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチド

40

のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 4 から 2 3 のいずれかに記載のベクター。

[2 5]

前記 C D 3 3 抗原結合性ドメインが、配列番号 8 のアミノ酸配列との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するポリペプチドである、請求項 1 4 から 2 4 のいずれかに記載のベクター。

[2 6]

前記ストークドメインが、配列番号 2 2 のアミノ酸配列 (C D 8 アルファヒンジ) との、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8

50

%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項14から25のいずれかに記載のベクター。

[27]

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、4-1BBを含む、請求項14から26のいずれかに記載のベクター。

[28]

4-1BBの共刺激シグナル伝達ドメインが、配列番号24のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を含む、請求項27に記載のベクター。

[29]

前記共刺激シグナル伝達ドメインが、CD28を含む、請求項14から26のいずれかに記載のベクター。

[30]

CD28の共刺激シグナル伝達ドメインが、配列番号28のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を含む、請求項29に記載のベクター。

[31]

前記CD3ゼータシグナル伝達ドメインが、配列番号26のアミノ酸配列との、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を含む、請求項14から30のいずれかに記載のベクター。

[32]

プラスミドを含む、請求項14から31のいずれか一項に記載のベクター。

[33]

各前記ベクターが、発現プラスミドを含む、請求項14から31に記載のベクター。

[34]

前記非ウイルスベクターが、Sleeping Beautyトランスポゾンである、請求項16に記載のベクター。

[35]

請求項1から13のいずれか一項に記載のヌクレオチドを含む免疫エフェクター細胞。

30

[36]

骨格と、(1)切断型上皮増殖因子受容体(HER1t)、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列とを含むベクターを含む免疫エフェクター細胞。

[37]

(1)キルスイッチ、選択マーカー、バイオマーカー、またはこれらの組合せとしての使用のための細胞タグ、ならびに(2)(a)CD33抗原結合性ドメイン、(b)ストークドメイン、(c)膜貫通ドメイン、(d)4-1BBもしくはCD28、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、および(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)を含む免疫エフェクター細胞。

40

[38]

前記細胞タグが、HER1t、HER1t-1、CD20t-1、またはCD20を含む、請求項37に記載の免疫エフェクター細胞。

[39]

前記細胞タグが、HER1tを含み、前記HER1tが、配列番号32のポリペプチド配列を含む、請求項38に記載の免疫エフェクター細胞。

[40]

前記細胞タグが、HER1t-1を含み、前記HER1t-1が、配列番号54のポリ

50

ペプチド配列を含む、請求項 3 8 に記載の免疫エフェクター細胞。

[4 1]

請求項 1 4 から 3 4 のいずれかに記載のベクターを含む免疫エフェクター細胞。

[4 2]

T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 、または調節性 T 細胞である、請求項 3 5 から 4 1 のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞。

[4 3]

前記 CD 3 3 抗原結合性ドメインが、CD 3 3 に結合すると、抗腫瘍免疫を呈する、請求項 4 2 に記載の免疫エフェクター細胞。

[4 4]

それを必要とするヒト対象における、標的細胞集団または標的組織に対する T 細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法であって、前記ヒト対象に、有効量の、CAR を発現するように遺伝子改変された細胞を投与するステップを含み、前記 CAR が、

(a) CD 3 3 抗原結合性ドメイン、

(b) ストークドメイン、

(c) 膜貫通ドメイン、

(d) 4 - 1 BB もしくは CD 2 8 、またはこれらの両方を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、

(e) CD 3 ゼータシグナル伝達ドメイン、および

(f) 切断型上皮増殖因子受容体 (HER1t)

を含む、方法。

[4 5]

前記ヒトが、急性骨髓性白血病 (AML) と診断されている、請求項 4 4 に記載の方法。

[4 6]

前記急性骨髓性白血病が、再発性または難治性 AML である、請求項 4 5 に記載の方法。

[4 7]

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする単離核酸であって、前記 CAR が、

(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列を伴う CD 3 3 抗原結合性ドメイン、

(b) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を伴うストークドメイン、

(c) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を伴う CD 2 8 を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、

(d) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を伴う HER1t および配列番号 5 4 のアミノ酸配列を伴う HER1t - 1 のうちの少なくとも 1 つを含む HER1 タグ；

(e) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を伴う CD 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む、単離核酸。

[4 8]

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする単離核酸であって、前記 CAR が、

(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列を伴う CD 3 3 抗原結合性ドメイン、

(b) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を伴うストークドメイン、

(c) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を伴う 4 - 1 BB を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、

(d) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を伴う HER1t および配列番号 5 4 のアミノ酸配列を伴う HER1t - 1 のうちの少なくとも 1 つを含む HER1 タグ、

(e) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を伴う CD 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む、単離核酸。

[4 9]

請求項 4 7 および 4 8 に記載のポリヌクレオチドのうちの任意の 1 または複数を含むベクター。

[5 0]

レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項 4 9 に記載のベクター。

10

20

30

40

50

[5 1]

前記非ウイルスベクターが、Sleeping Beauty トランスポゾンである、請求項 50 に記載のベクター。

[5 2]

複数のベクターである、請求項 49 に記載のベクター。

[5 3]

免疫エフェクター細胞内で CAR を発現させるための系であって、請求項 1 から 13 および 47 から 48 のいずれか一項に記載の単離核酸をコードする、1 または複数のベクターを含む系。

[5 4]

前記免疫エフェクター細胞が、T 細胞または NK 細胞である、請求項 53 に記載の系。

10

[5 5]

少なくとも 1 つのさらなる遺伝子をコードする核酸をさらに含む、請求項 53 から 54 のいずれか一項に記載の系。

[5 6]

前記さらなる遺伝子が、サイトカインを含む、請求項 55 に記載の系。

[5 7]

前記サイトカインが、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、および IL-15 と IL-15R との融合体のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 56 に記載の系。

[5 8]

前記サイトカインが、分泌型にある、請求項 56 に記載の系。

20

[5 9]

前記サイトカインが、膜結合型にある、請求項 56 に記載の系。

[6 0]

1 つのベクターを含む、請求項 53 から 59 のいずれか一項に記載の系。

[6 1]

前記 1 または複数のベクターが、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項 53 から 60 のいずれか一項に記載の系。

[6 2]

前記非ウイルスベクターが、Sleeping Beauty トランスポゾンである、請求項 61 に記載の系。

30

[6 3]

Sleeping Beauty トランスポザーゼをさらに含む、請求項 62 に記載の系。

[6 4]

前記 Sleeping Beauty トランスポザーゼが、SB11、SB100X、または SB110 である、請求項 63 に記載の系。

[6 5]

前記免疫エフェクター細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 53 から 64 のいずれか一項に記載の系。

40

[6 6]

免疫エフェクター細胞内で CAR を発現させる方法であって、前記免疫エフェクター細胞を、請求項 53 から 65 のいずれか一項に記載の系と接触させるステップを含む方法。

[6 7]

変更 T 細胞の増殖および / または生存を刺激する方法であって、

(a) 細胞の試料を対象から得るステップであって、前記試料が、T 細胞または T 細胞の前駆細胞を含むステップと、

(b) 前記細胞に、請求項 1 から 13 および 47 から 48 のいずれか一項に記載の単離核酸をコードする、1 または複数のベクター、ならびにトランスポザーゼをコードするベクターをトランスフェクトして、変更 CD33 CAR 発現 T 細胞の集団をもたらすステ

50

ップと、

(c) 任意選択で、CD33 CAR T細胞の前記集団を、ex vivoにおいて、2日間またはこれ未満にわたり培養するステップとを含む方法。

[68]

前記細胞に、サイトカインをコードするベクターをトランスフェクトするステップをさらに含む、請求項67に記載の方法。

[69]

前記サイトカインが、IL-15およびIL-15Rを含む融合タンパク質である、請求項68に記載の方法。

[70]

前記1または複数のベクターが、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項66から69のいずれか一項に記載の方法。

[71]

前記非ウイルスベクターが、Sleeping Beautyトランスポゾンである、請求項70に記載の方法。

[72]

Sleeping Beautyトランスポザーゼをさらに含む、請求項71に記載の方法。

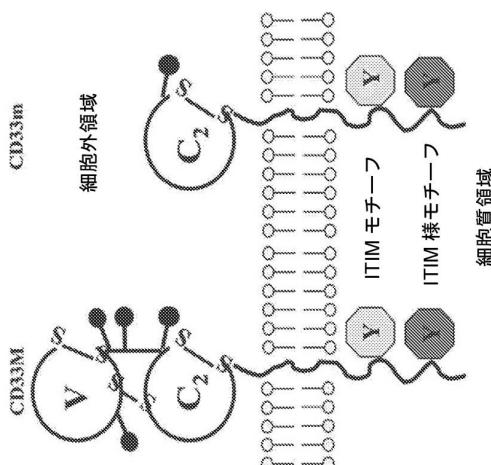
[73]

前記Sleeping Beautyトランスポザーゼが、SB11、SB100X、またはSB110である、請求項72に記載の方法。

【図面】

【図1】

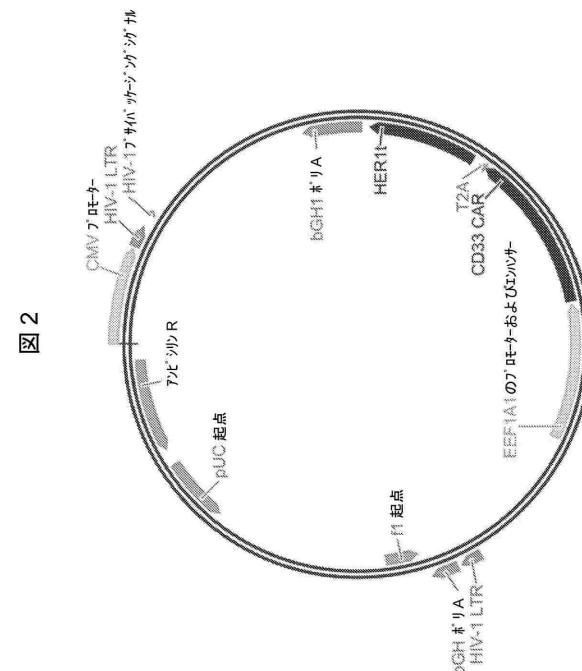
図1



CD33m

細胞外領域

【図2】



10

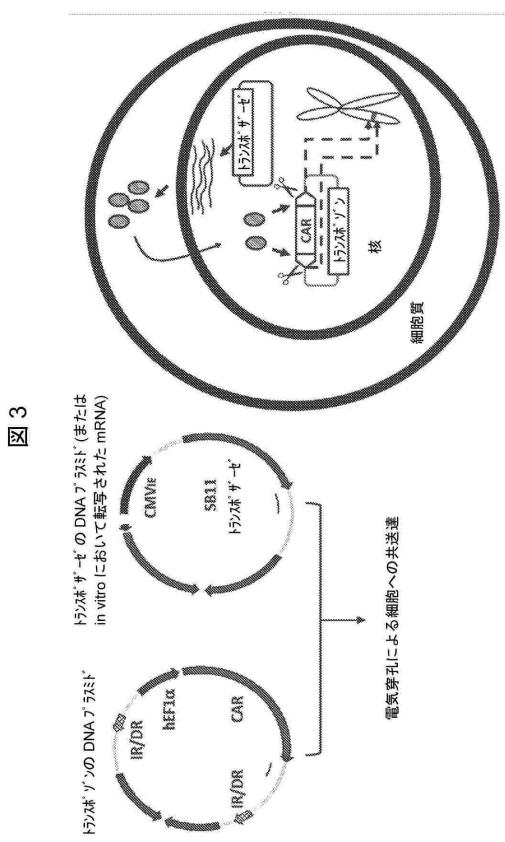
20

30

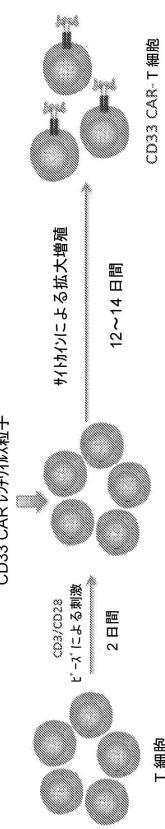
40

50

【図3】



【図4】



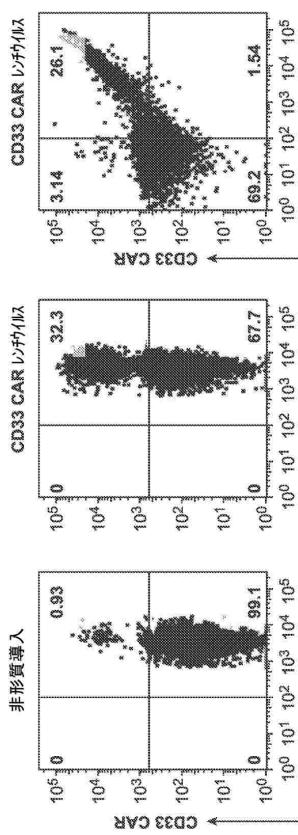
10

20

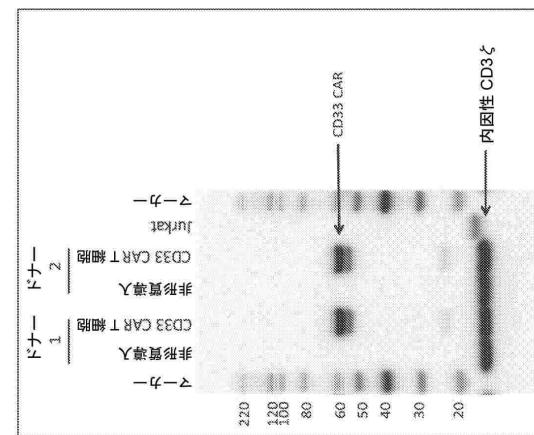
30

40

【図5】



【図6】



50

【図 7】

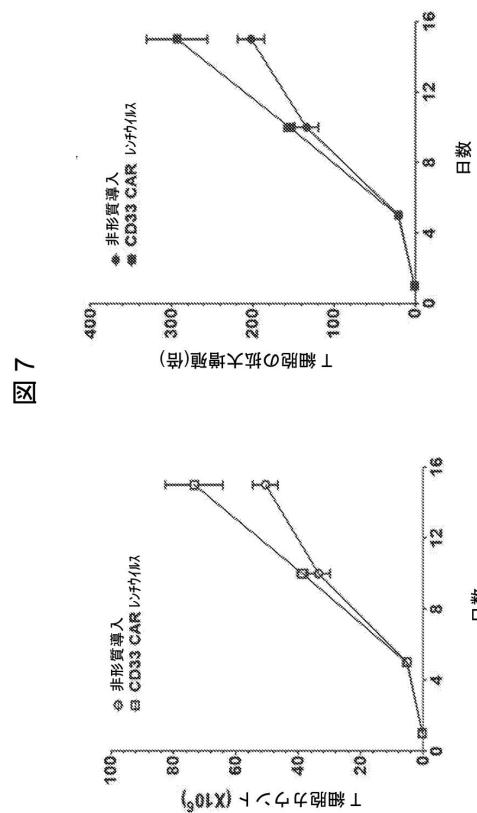
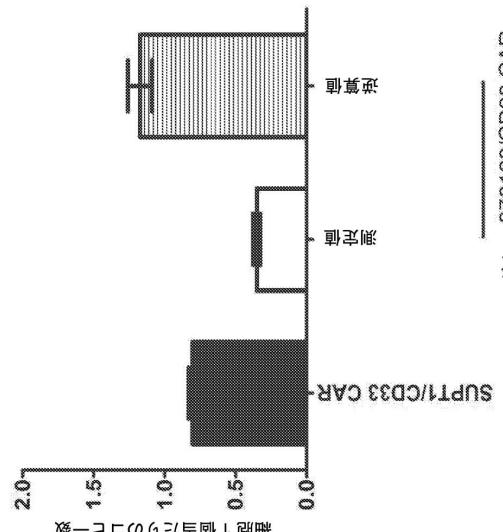


図 7

【図 8】



ドナ- 270169/CD33 CAR

10

20

30

40

【図 9 - 1】

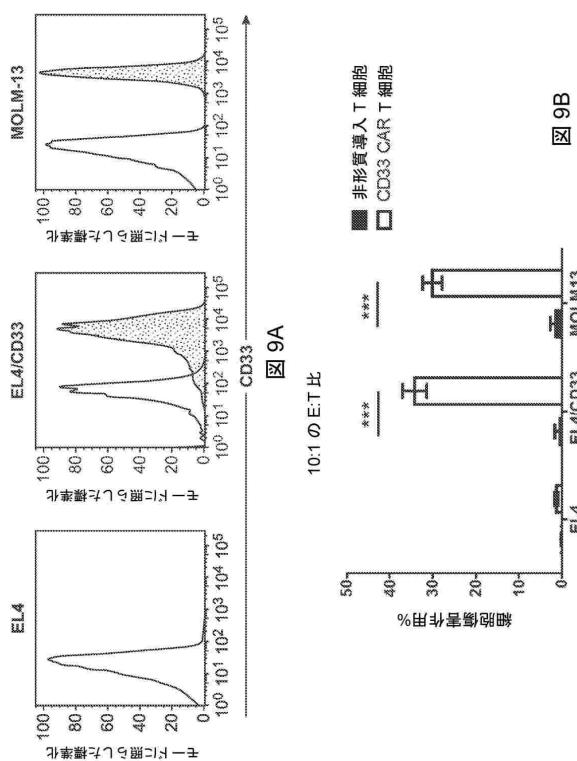


図 9B

【図 9 - 2】



1:1 の E:T 比

図 9C

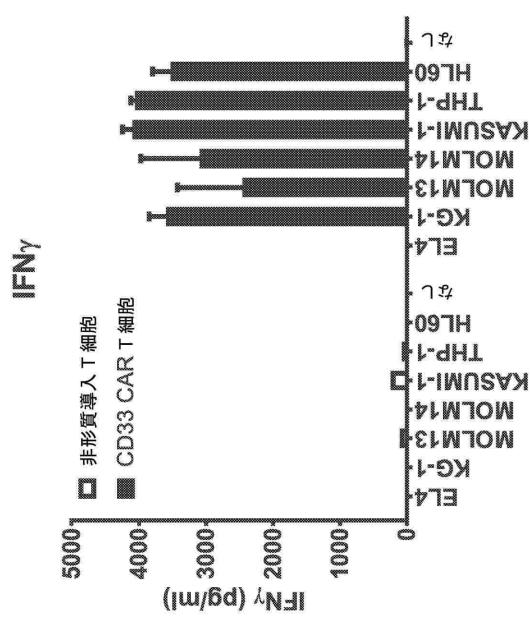
図 8

図 8

50

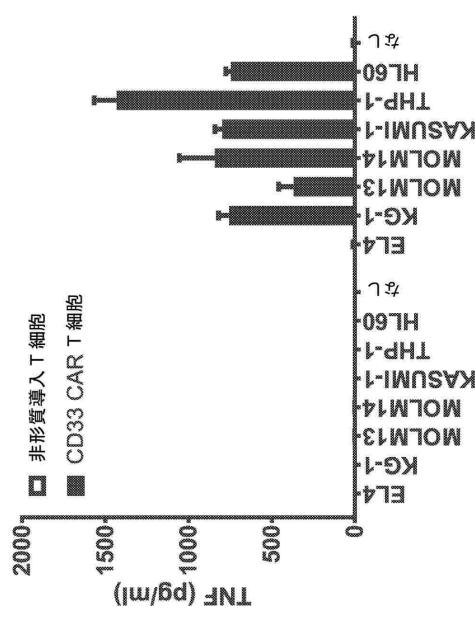
【図 10 A】

図 10A



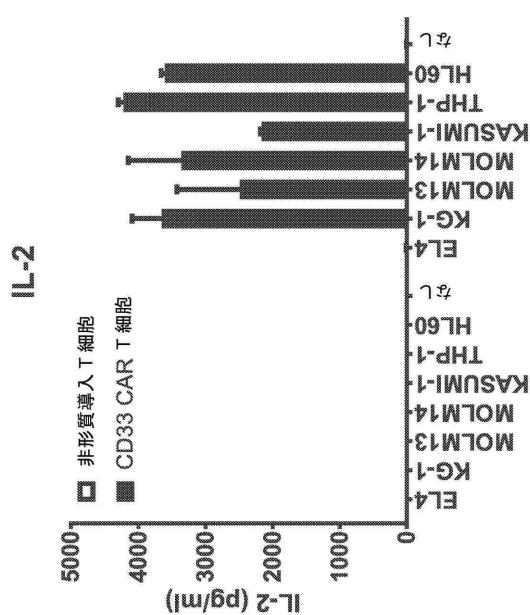
【図 10 B】

図 10B



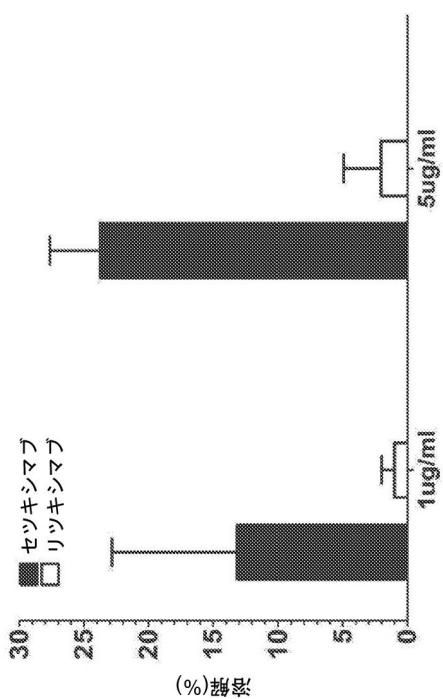
【図 10 C】

図 10C



【図 11】

図 11



10

20

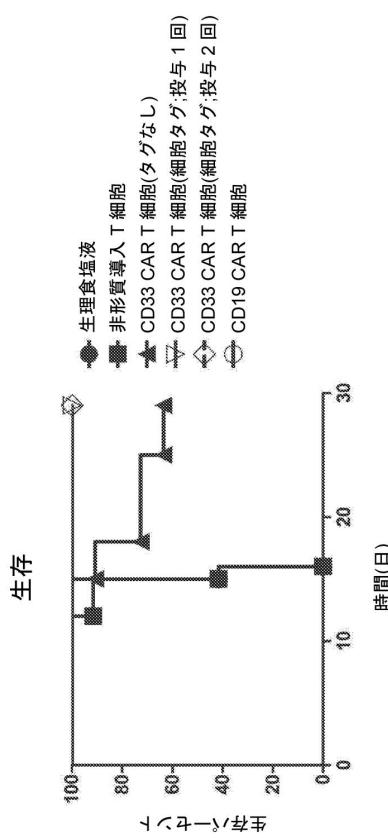
30

40

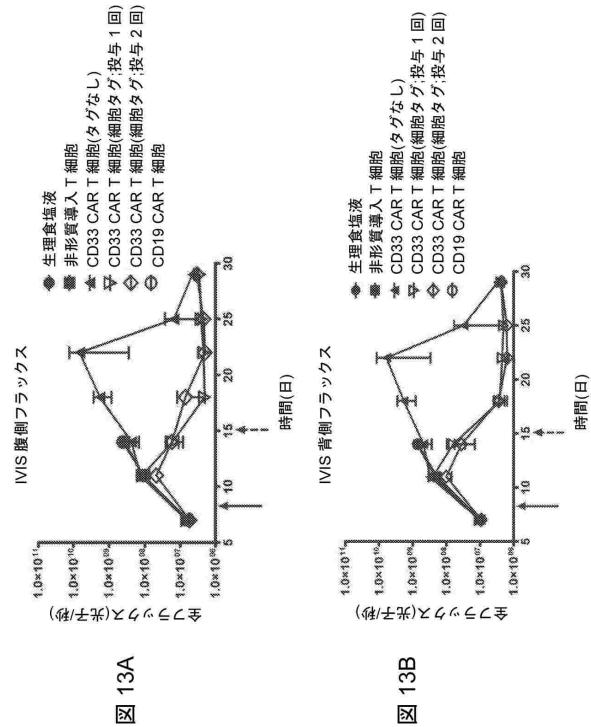
50

【図 1 2】

図 12



【図 1 3】



10

20

30

40

【図 1 4 A】

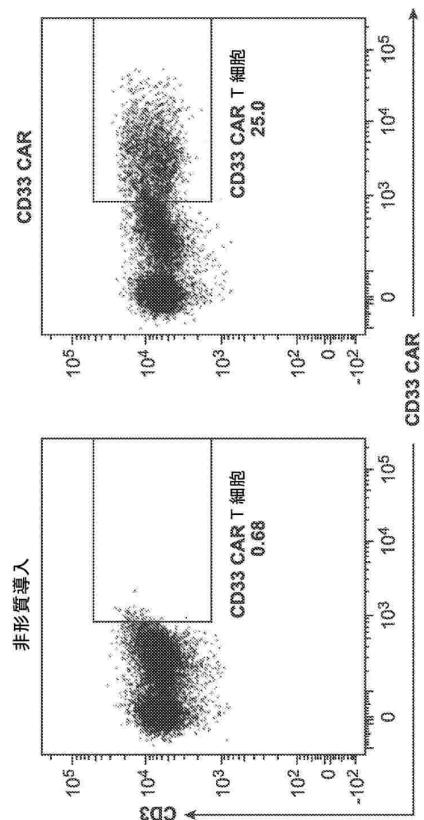
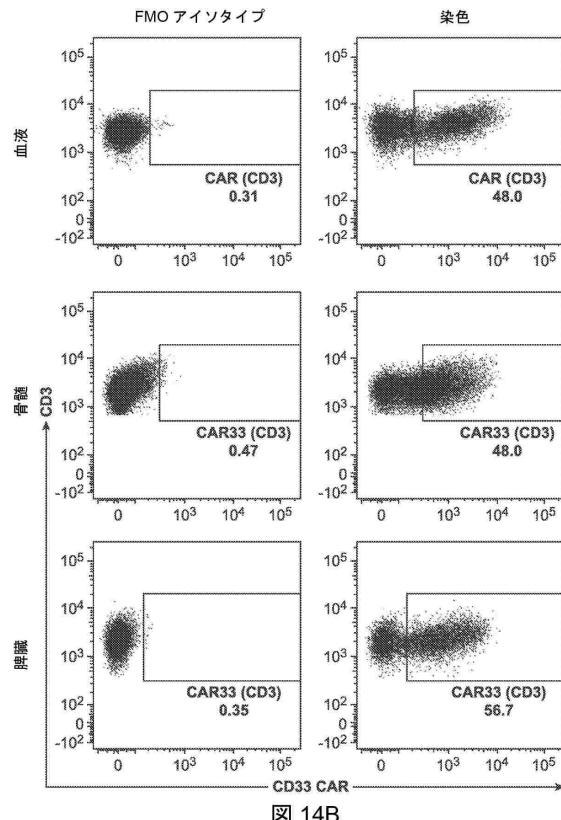


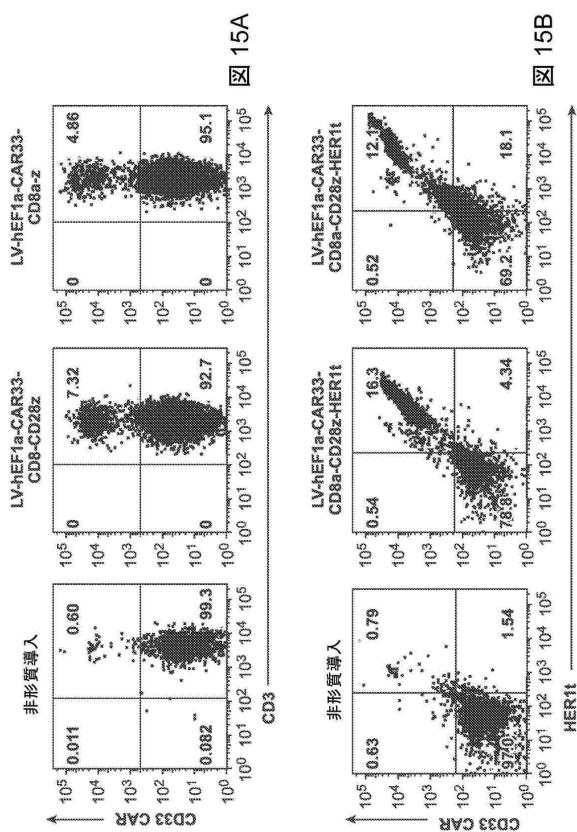
図 14A

【図 1 4 B】



50

【図 15】



【図 16 A】

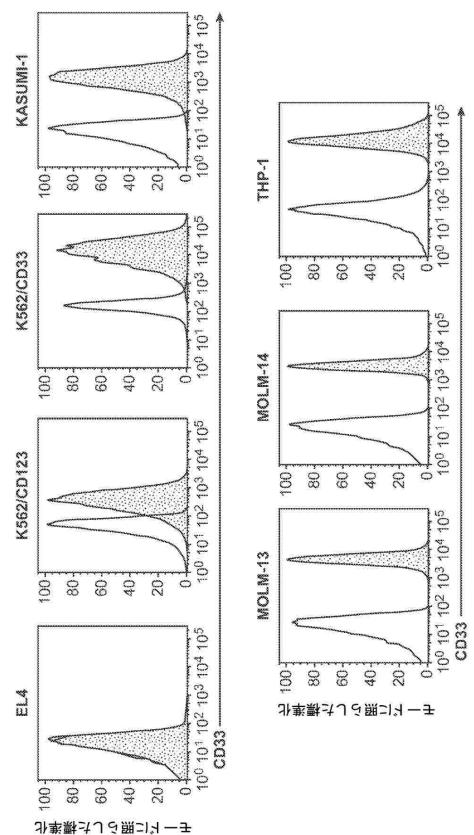
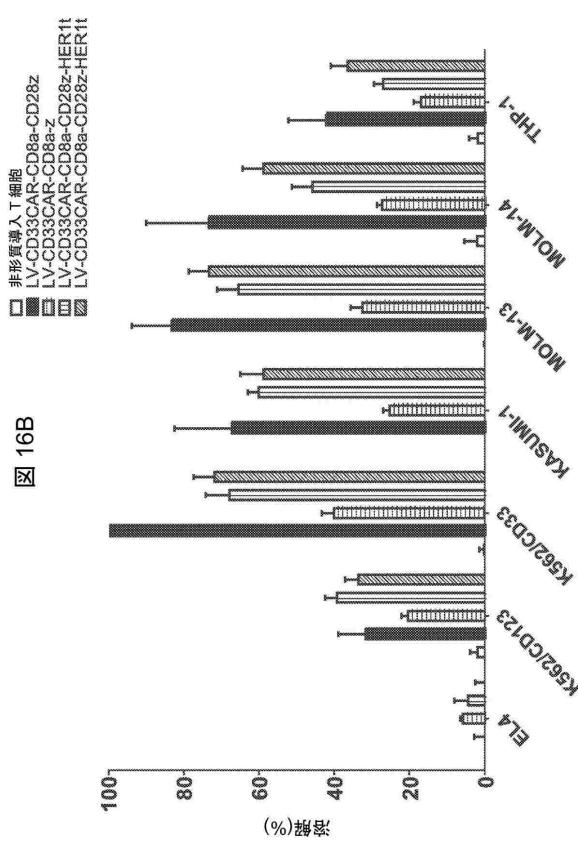
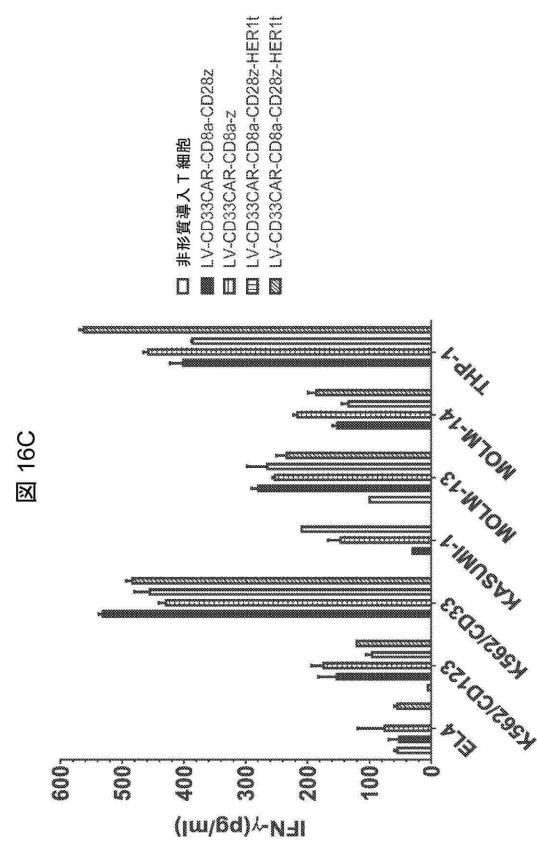


図 16A

【図 16 B】



【図 16 C】



【図 17】

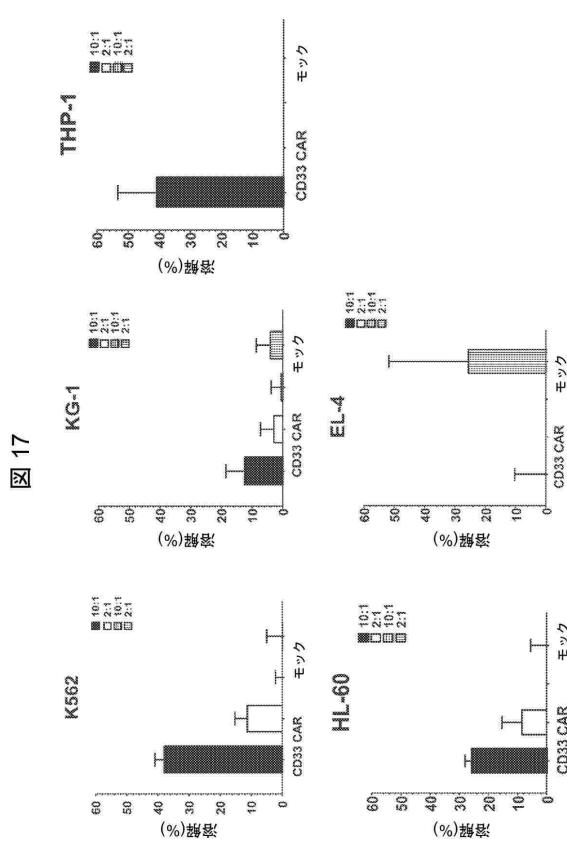


図 17

【図 18】

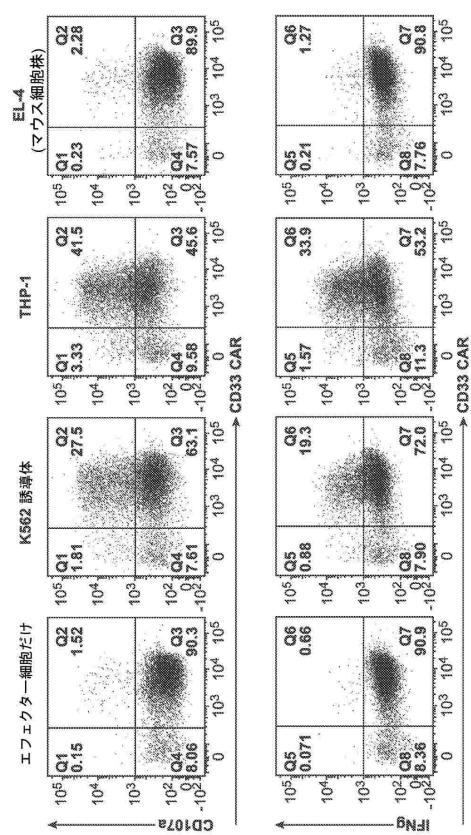


図 18

10

20

30

【図 19】

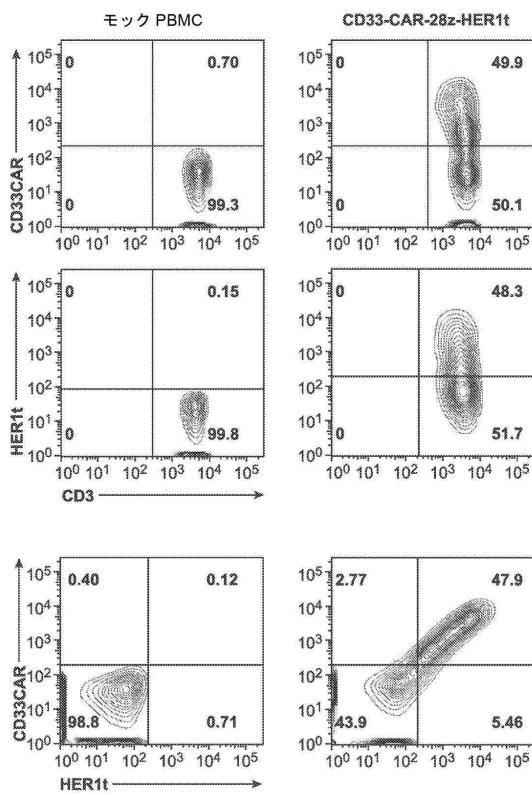


図 19

【図 20 A】

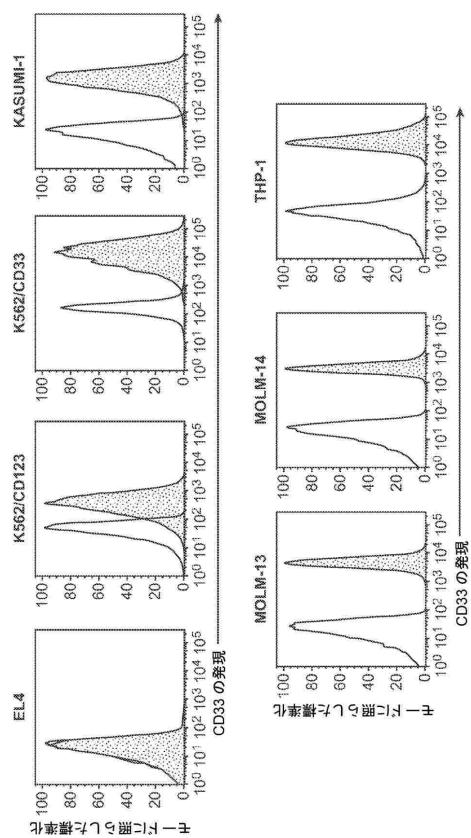
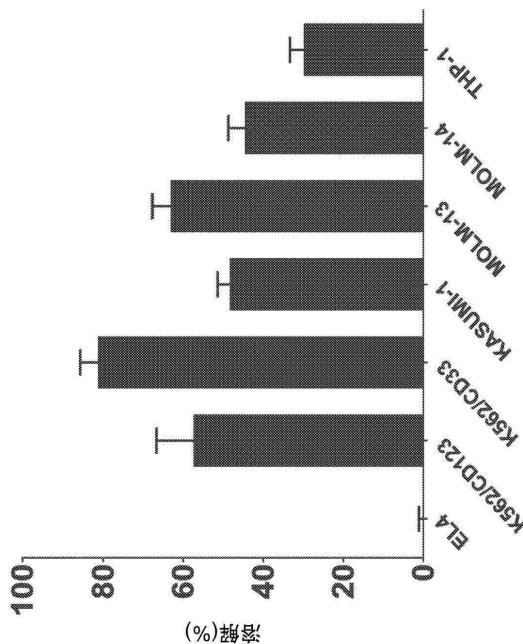


図 20A

40

50

【図20B】



20

【図21-2】

図 21 続き

配列名	配列番号	配列
		tactgcgcagaaggaggcgccccgtatggactactgggccaaggggactctggta ctgtcgatccca
リンク器を伴うhm195 scFv (アミノ酸)	8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVNDYGISFMNWFOQKGPKAPKL LIYASNOGSGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDFATYYCQOSKEVPW TFGGTYKVEK1GGGGGGGGGGGGGGQVLLQSGAEVKKPGSSVCKSA SGYFTDNGWQHWRQAPQGQLEWIGYIYPNYNGGTOYNNQKFKSATITADE STNTAYMELSSRLSEDATAVYVCRGPAMDYWGQTLVTVSS
M2H12 VH (アミノ酸)	9	QVQLQQSGPELVRPGFTVKISCKASGYFTNVD INNNVNNQRPQGQGLEWIGYIYPNYNGGTOYNNQKFKSATITADE KAKATLTDAKSSSTAYLQLNLTENSEVAFYFCAS GYEDADWYWGQTSVTVSS
M2H12 VL (アミノ酸)	10	DIKMTQSPSSMSALGERVIIINCKASQDINSYLS WFQOKPQKSPKTLIYRANRLVGDVPSPRFSGSG SGQDYSLTISSLEYEDMGIYCLQYDEFPLTFGA GTKLELRK
DRB2 VH (アミノ酸)	11	EVKLEQSGPELVLVKPGAVKMSKCKASGYKFTDYY VHVLWKQPKQGQGLEWIGYIYPNYNGGTOYNNQKFKSATITADE KGKATLTDKSSSTAYMVEVSLTSEDSAVYCA RDYRYEVYVGMWDWQGQTSVTVSS
DRB2 VL (アミノ酸)	12	DIVLTTQSPITMASPQGERVITCTASSSVNLYIH WVQOKSGSDPLWIFDTSKVAGSVPARFSGSG SGTSYSLTISTMEAATYCCQWRSYPLTFG DGTRLKLKRADAAPTVS
My9-6 VH (アミノ酸)	13	QVQLQQGAEVVKPGAVKMSKCKASGYFTIFS YYIHNWQKTPQGQGLEWIGYIYPNYNGGTOYNNQK FKGKATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYCA AREVRLRYFDWVGAQGTIVTIVSS
My9-6 VL (アミノ酸)	14	NIMLTTQSPSSLLAVSAGEKVTMCKSSKSQVFFSS SQKNYLWYHQQIPQGQSPKLLIYWAHSTRESGVIP DRFTGSGSGTDFTLTISSVQSEDLAZYIYCHQYLS SRTFGGGKLKEIJKR
GM-CSFRα シグナル ペプチド (スクレオチド)	15	Atgcgtcgctgtggaccaggcgtctgtgtggactgcggccacccgccttc tgctgatcccc
GM-CSFRα シグナル ペプチド (アミノ酸)	16	MLLVLVTSLLCELPHPAFLLIP
CD8 アルファ TM(スクレオチド)	17	Attcatacttggggccctctggccggccatctgtggcgtctgtggactgg tcatcacccctgtactgtcaaccacccggat

【図2.1-1】

図 21

10

20

30

40

【 図 2-1-3 】

図 21 続き

50

【図21-4】

図 21 続き

【 図 2-1-5 】

図 21 続き

【 図 2-1-6 】

図 21 続き

【図 2-1-7】

図 21 続き

【図21-8】

図 21 続き

【図21-9】

図 21 続き

【図21-10】

図 21 続き

【図2-1-1】

図 21 続き

【 図 2-1-12 】

図 21 続き

配列名	配列番号	配列
CD28		TTTACGTCGATCACAACAAAGGCTCGGGGTACCCCTCGCTTCAGGCAGTGG ATCTGGACAGCTTACCTACCTACCCATTCTACCGCTACGACTGACTCTGGCA ACCTATTACCTGACGAAAGTGAAGGGTCTGGCTGACGCTTGGCTGAAGGACCA AGGTGGAGATCAAGGGTGGGGTGGCTCTGGGGCGTGGGGTGGGGTGGCGCG ATCTCAAGGTTCACTGGTGGCACTTGGAGCTGAGGTGAAGAACGGCTGGAGCTCA GTGAAGGTTCTTCAGAACAGTCTGGTACACCTCTGACTGAAACACAGTCACT GGTGTGGGAGCAGCCTGGCACAAGGCTGGATGTTGGATATATTCTCTTCA CAATGGTGGTACCGCTACAACAAAGGCTCAAGGAGCTAACAGGACCAATTACAGCA GACGGAGACTAATCAACAGCCTACATGAGGACTCTGGCTGAGGTCTGGAGACA CTGAGCTTACTTACTGGCAGAACGGGGCTGGCTATGGACTACTGGGCGCAAG GACTCTGGTACTCTCTTCAAAAGGCCAACACAGGCTGGCTGGAGCTTACAGCTTCA ACCCACGCCCTACATGGCAGCACCGGGCTGGACTGAGGCCCGAGGCTGGTCA GACCTGGCGCTGGGGAGCAGCTGGCACACAGGAGCTGGATTGCTGGCTGG CTACATCTGGGCCCTTCTGGGGCCAGCTGTGGCTGCTGGCTGAGGCCCTGGT ATCACCTGGTACTGCAACACCAGGAATAAGAGAGGCCGAGAAAGACTGTACA TCTTCAAGCAGGCTTCTGGGGCCCTGGACAGGACCAAGGAGGAGGGCTGG CAGCTGGCGGTTCCGGAGGAAAGGAGGACGGCTGGAGCTGGCCTGGAGTGG AGCCGGAGGCGGCCAGCCTGGCTTACAGCAGGGCAACAGGCTGATCAACG AGCTGAACCTGGGGCGAGGGAGGAGTACAGCTGGCTGGCAACAGGGAGGGGCC GGACCTGGAGATGGGGGGAGCAGGGCCGGAAAGAAACCTTGGAGGGGGCTGG AAGCAACTGGCAAGAAAGCAAGATGGGGGGAGCAGGGCTGGAGATGGGGGG GGAGGG CACCAGGACTACCTGAGCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GG GG GCAATGAAGGGCCCTTACTTCTGGTCAACTTGGTCAACAAACACTTGGAGGG ATGTCAGCTTACTGG TGGGGGGCTTGGCAAGATTGATGGCTTCTTCCACATGGCTGGGGGGGGGGGG GTATGGCTTCCAGGGGGACTTGTACCCACTGTGTTGACTGTGGTGTACCCCT TGG ACTCCAGGAAAGTGTGGTCAAAGGAAAAAAATGATAATGATAATTGATTCAGG TCTGGCATTTCTGG TCCCATTTTAAAGATGGAGATGTAATTGATAAGAGCTCACACCATATAAAT TTAACATTAACACTGGACAGCTTACCTCTGGAGAAAACCTCCCATAC CCAAACTGTACGACTACATCTGGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG ATCTTGGCTTCTGGCAAGGGGGGTGTACCCACTGTGTTGACTGGGGGGGGGGGG AAAGGAGCTGGCTCCAGGACCAATTACAACTAGTCTTGGTCACTGGGGGGGGGG AAAAGAACAGACATTGAAATAAAAGAAGAATGTTGGGGCTAACATGAAACATCT TCCCAACAAAGATGGAGAACAGACTTACATGAAATGTTGGGGGGGGGGGGGGGG AAGAAGAACAGAACAGACACTTGGAGACTCTTCCAGGAGTCAAGGATCTTCA AATAGAGGAAATGAGCAGCTGGCTTCT
hM195scFv- CD8a-4-	51	MLLLLTSLLLCPHPAFLLIIDLDMQTPSSLLSASVGDRTTITCRASES VDNYG1SFLPWFQDKPGKAPLLIYIAASNGGSSVSPRSFSGSSGGTDFLL

【 図 2-1-13 】

図 21 続き

【 図 2-1-14 】

図 21 続き

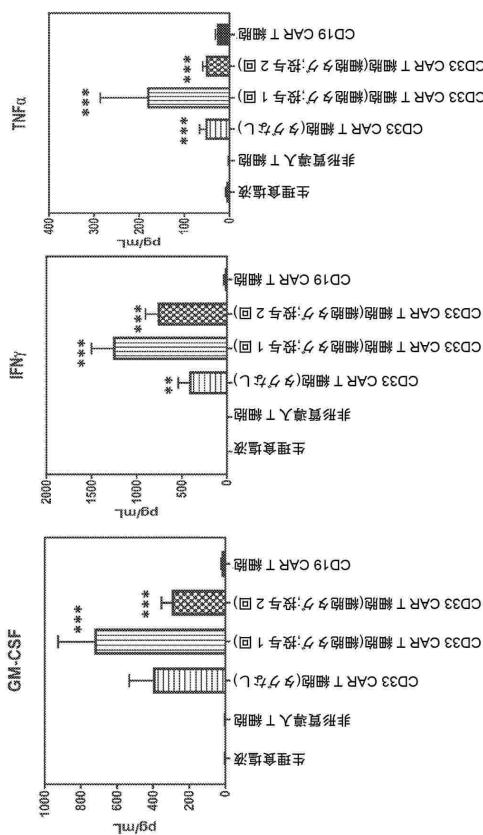
【 図 2-1-15 】

図 21 続き

配列名	配列番号	配列
DNAX 活性化タンパク質 10 (DAP 10) シグナル伝達ドメイン	59	LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG
DNAX 活性化タンパク質 12 (DAP 12) シグナル伝達ドメイン	60	tacttcctggccggctgtggccctcggggcgaggggtctggggggcggcggcggcggccggaaacgggtatcactggacggcggatcgccattatcaggagctccgggttcgttacagccacacacacagggccgttattacaaa
DNAX 活性化タンパク質 12 (DAP 12) シグナル伝達ドメイン	61	YFLGLRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYYK

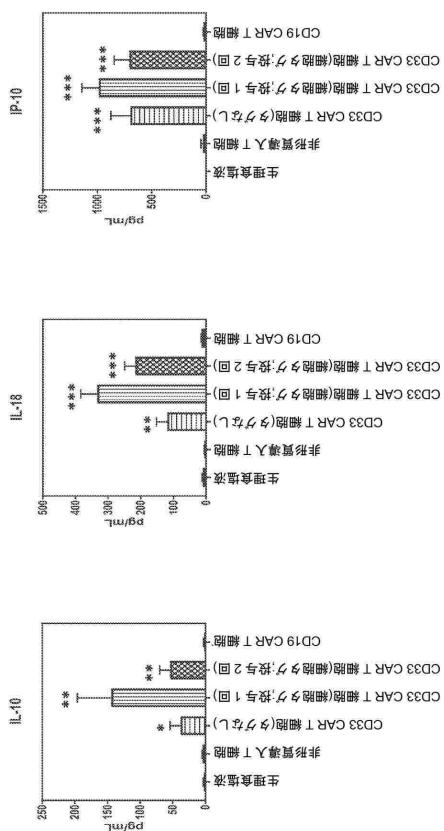
【図 22A-1】

図 22A-1



【図 22A-2】

図 22A-2



【図 22B-1】

図 22B-1

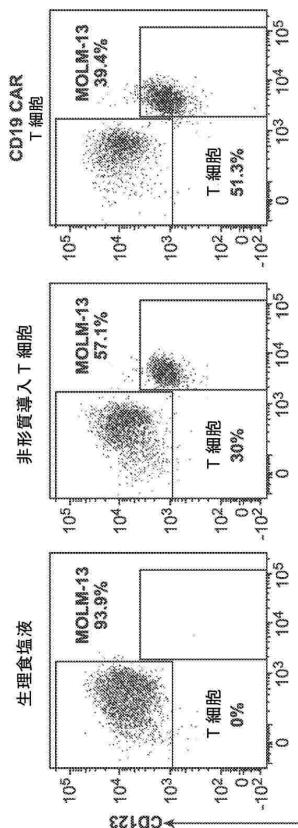


図 22B-1

【図 22B-2】

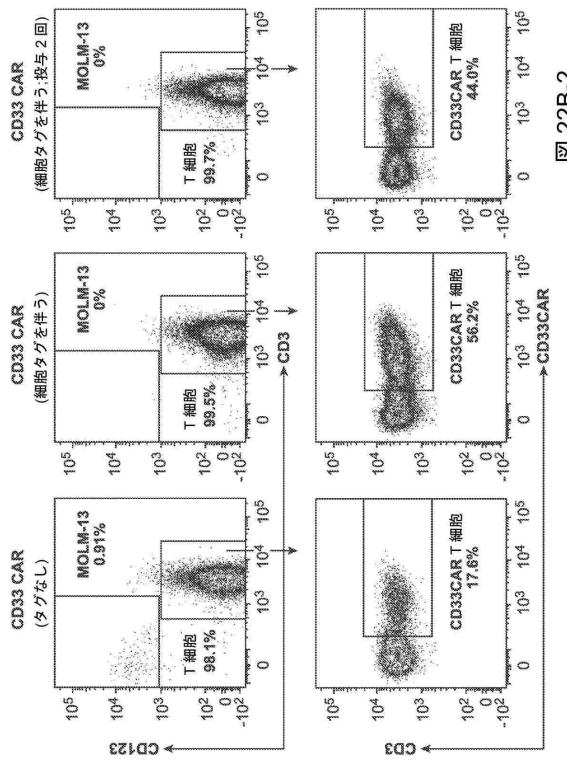
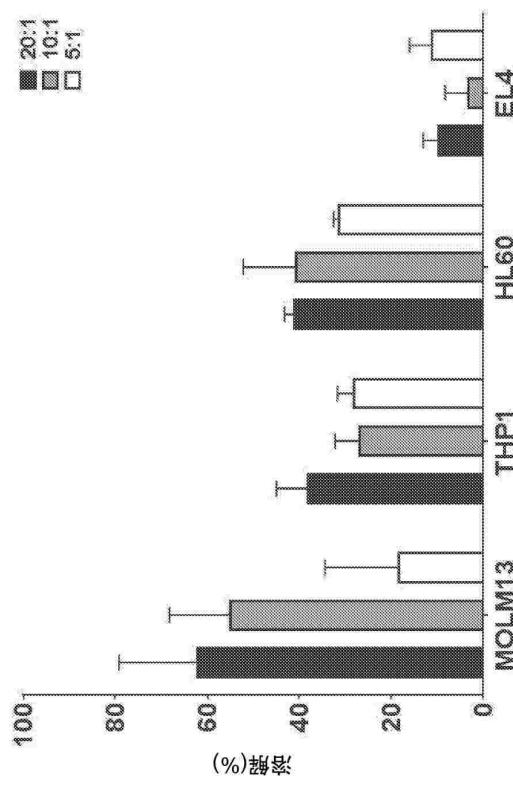


図 22B-2

【図 22C】

図 22C



【図 23-1】

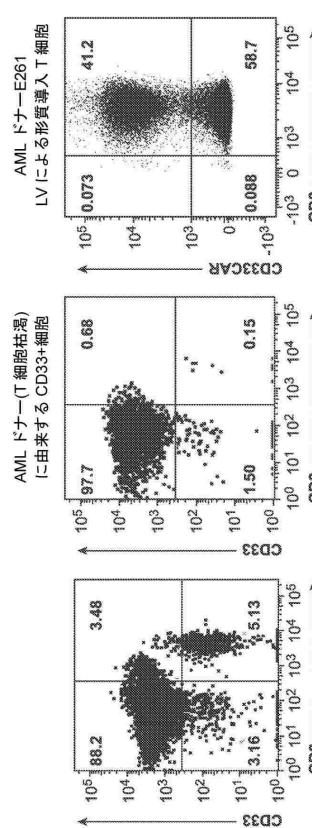


図 23C

図 23B

図 23A

【図 23-2】

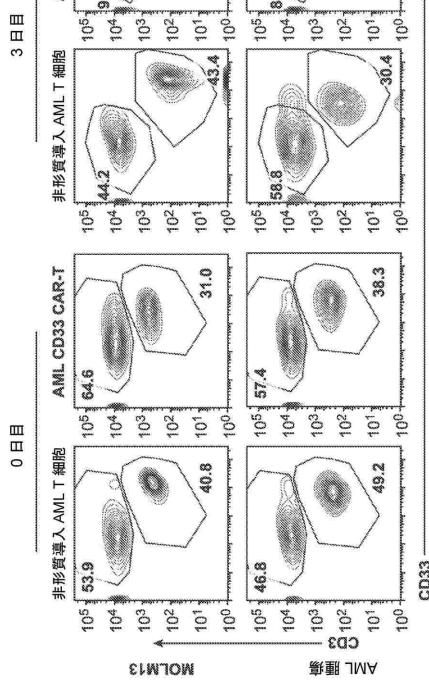


図 23D

【図 23-3】

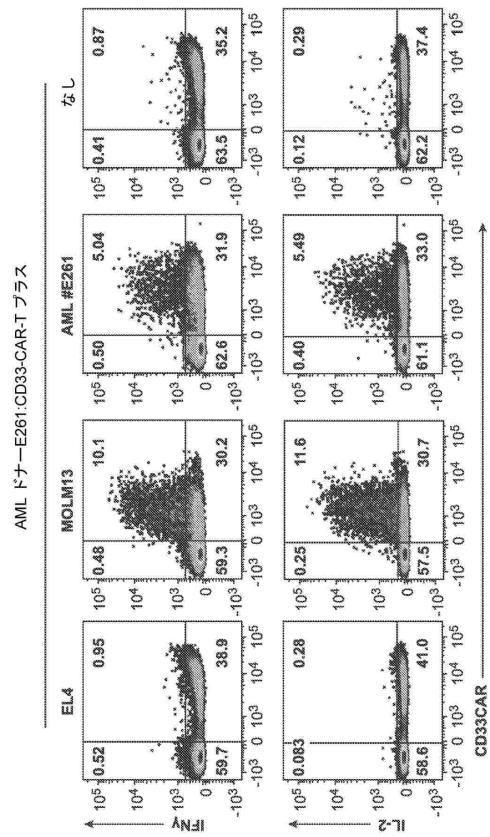
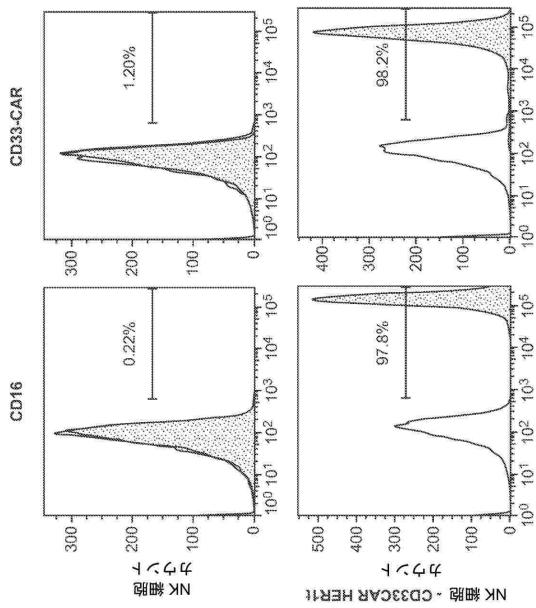
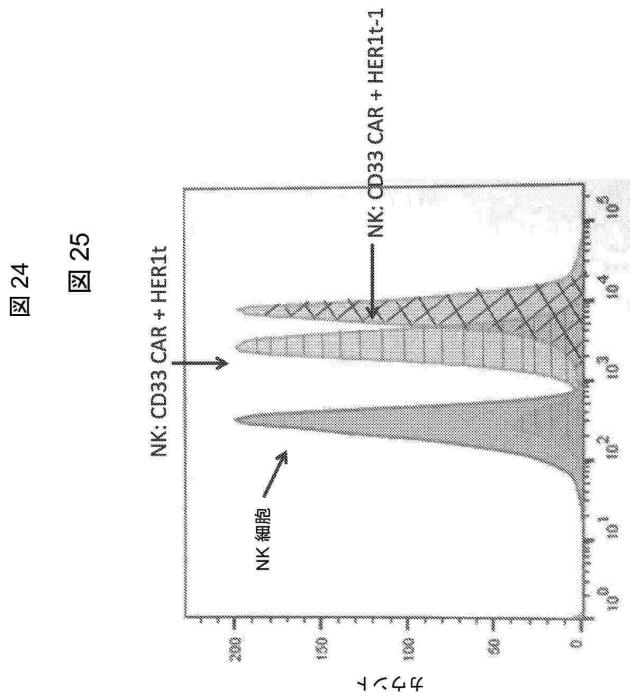


図 23E

【図 24】



【図 25】

図 24
図 25

10

20

【図 26】

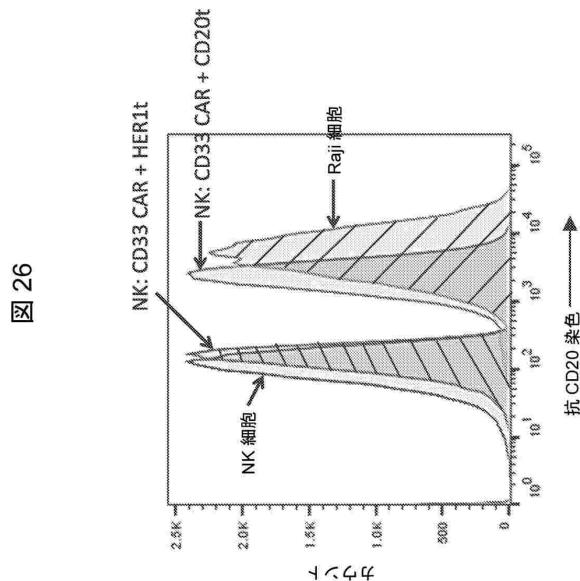
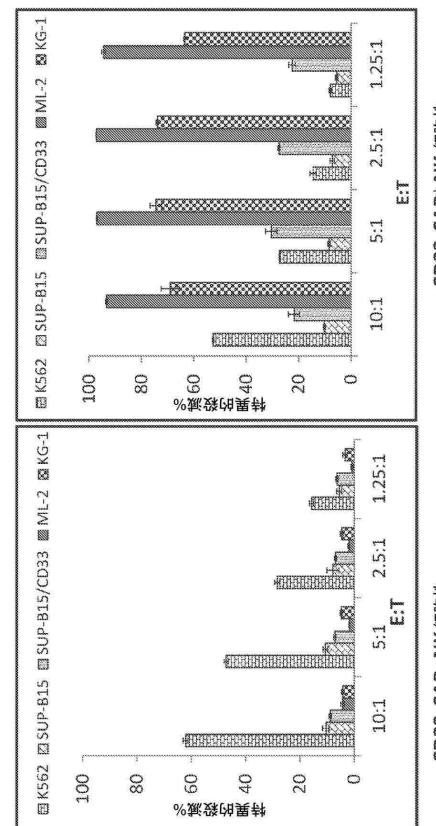


図 26

【図 27】

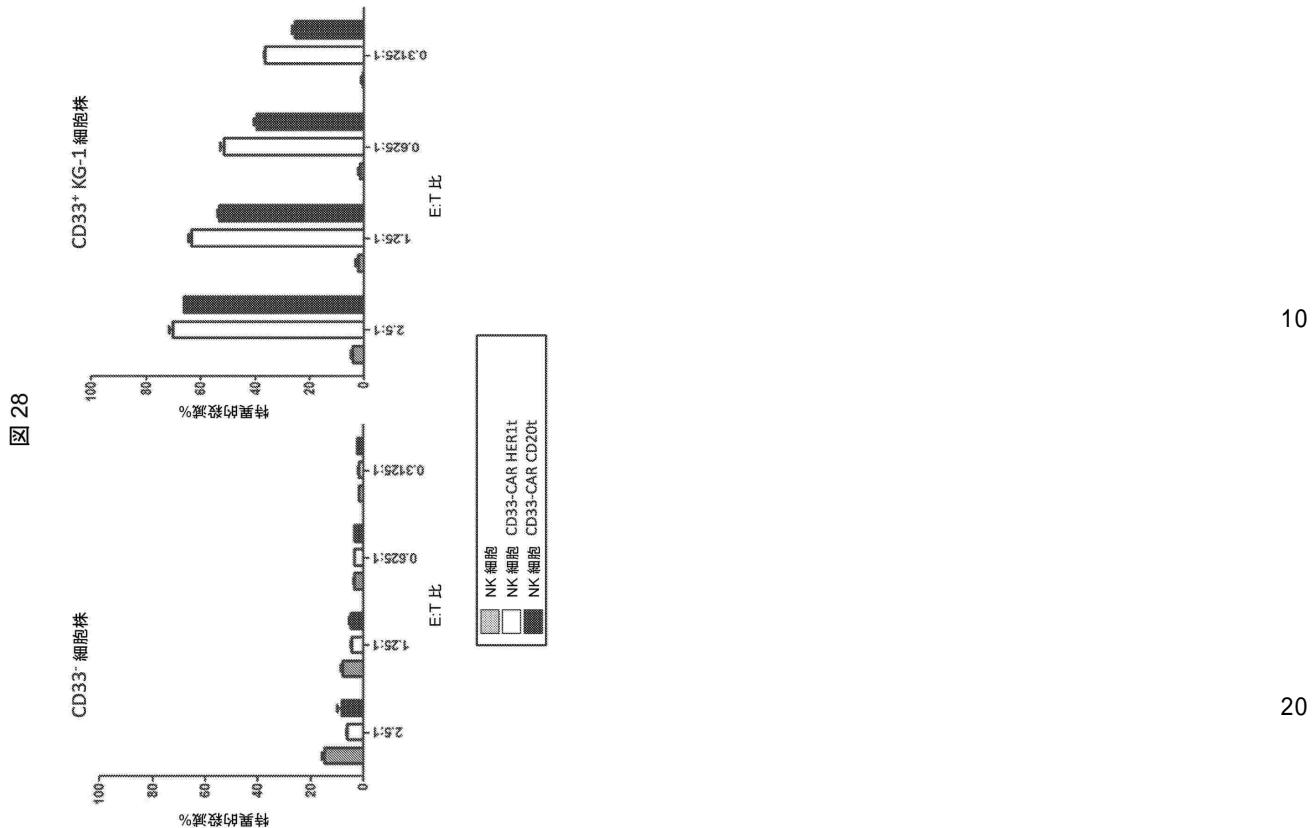


30

40

50

【図 28】



【配列表】

0007591342000001.ap

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
C 1 2 N	15/867(2006.01)	C 1 2 N	15/867

米国(US)

(72)発明者 チャン, ティム

アメリカ合衆国 メリーランド州 21702, フレデリック シエリー サークル ユニット 2 デイー 2508

(72)発明者 エムテージ, ピーター

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94549, ラファイエット テラス ウェイ アパートメント . 47 3573

(72)発明者 ヤルラガッダ, ラムヤ

アメリカ合衆国 メリーランド州 20878, ゲイザーズバーグ ウエスト サイド ドクター. アパートメント. 302 327

合議体

審判長 福井 悟

審判官 名和 大輔

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献

国際公開第2015/150526 (WO, A2)

国際公開第2015/157391 (WO, A1)

特表2013-509879 (JP, A)

国際公開第2016/014576 (WO, A1)

国際公開第2015/142675 (WO, A2)

国際公開第2015/123642 (WO, A1)

Blood (2011), Vol. 118, No. 21, p. 643

Blood (2013), Vol. 122, No. 21, p. 4497

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

CAPLUS / MEDLINE / BIOSIS / EMBASE (STN)

JSTPLUS / JMEDPLUS / JST7580 (JDreamIII)