

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6467661号
(P6467661)

(45) 発行日 平成31年2月13日 (2019.2.13)

(24) 登録日 平成31年1月25日 (2019.1.25)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 5/0783

請求項の数 17 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2015-557071 (P2015-557071)	(73) 特許権者	509307635
(86) (22) 出願日	平成26年2月6日 (2014.2.6)		セルジーン コーポレイション
(65) 公表番号	特表2016-506746 (P2016-506746A)		アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
(43) 公表日	平成28年3月7日 (2016.3.7)		901, サミット, モリス アベニュー
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/015113		86
(87) 国際公開番号	W02014/124143	(74) 代理人	100097456
(87) 国際公開日	平成26年8月14日 (2014.8.14)		弁理士 石川 徹
審査請求日	平成29年2月3日 (2017.2.3)	(72) 発明者	ビタオ リアング
(31) 優先権主張番号	61/761, 548		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0
(32) 優先日	平成25年2月6日 (2013.2.6)		7624 クロスター ペサニ サークル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		65
		(72) 発明者	スチュアート アボット
			アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0
			7059 ウォーレン カサレ ドライブ
			15

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善された特異性を有する改変型Tリンパ球

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

改変型Tリンパ球であって：

a. 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び第一の細胞内シグナルドメインを含む、第一のポリペプチドであって、該第一の抗原が：腫瘍細胞上の抗原、腫瘍関連抗原、又は腫瘍特異的抗原であり；かつ該第一のポリペプチドが、共刺激ドメインを含まない、前記第一のポリペプチド；及び

b. 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、又は該第二の抗原と結合する受容体；及び1以上の共刺激性ドメインを含む第二の細胞内シグナルドメインを含む、第二のポリペプチド；を含み、

前記第二の抗原が、血管内皮増殖因子 (VEGF) 又は損傷関連分子パターン分子 (DAMP) であり、該DAMPが、熱ショックタンパク質、染色体関連タンパク質高移動度グループボックス1 (HMGB1)、S100A8 (MRP8、カルグラニユリンA)、S100A9 (MRP14、カルグラニユリンB)、血清アミロイドA (SAA)、デオキシリボ核酸、アデノシントリリン酸、尿酸、又はヘパリン硫酸であり；かつ該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる、前記改変型Tリンパ球。

【請求項2】

前記第一の抗原が、腫瘍細胞上の抗原である、請求項1記載の改変型Tリンパ球。

【請求項3】

10

20

前記腫瘍細胞が、固形腫瘍中の細胞である、請求項1又は2記載の改変型Tリンパ球。

【請求項4】

前記抗原が、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原である、請求項1記載の改変型Tリンパ球。

【請求項5】

前記腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原が、Her2、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、PSMA、BCMA、アルファ-フェトプロテイン（AFP）、癌胎児性抗原（CEA）、癌抗原-125（CA-125）、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、上皮性膜タンパク質（EMA）、上皮性腫瘍抗原（ETA）、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原（MAGE）、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維酸性タンパク質（GFAP）、肉眼的嚢胞性疾患液体タンパク質（GCDFP-15）、HMB-45抗原、タンパク質メラニン-A（Tリンパ球に認識されるメラノーマ抗原；MART-1）、myo-D1、筋特異的アクチン（MSA）、ニューロフィラメント、神経特異的エノラーゼ（NSE）、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシス、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、ピルビン酸キナーゼイソ酵素タイプM2の二量体形（腫瘍M2-PK）、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリエーションIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、請求項4記載の改変型Tリンパ球。

【請求項6】

前記第一の抗原が、インテグリン α 3（CD61）、ガラクチン、K-Ras（V-Ki-ras2キルステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子）、又はRai-Bである、請求項1記載の改変型Tリンパ球。

【請求項7】

前記第一の細胞内シグナルドメインが、CD3シグナルドメインであるか又はそれを含む、請求項1～6のいずれか一項記載の改変型Tリンパ球。

【請求項8】

前記1以上の共刺激性ドメインが、共刺激性CD27ポリペプチド配列、共刺激性CD28ポリペプチド配列、共刺激性OX40（CD134）ポリペプチド配列、共刺激性4-1BB（CD137）ポリペプチド配列、及び共刺激性誘導性T細胞共刺激性（ICOS）ポリペプチド配列のうちの1以上を含む、請求項1～7のいずれか一項記載の改変型Tリンパ球。

【請求項9】

改変型Tリンパ球であって：

a. 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び1以上の共刺激性ドメインを含む第一の細胞内シグナルドメインを含む第一のポリペプチドであって、該第一の抗原が：腫瘍細胞上の抗原、腫瘍関連抗原、又は腫瘍特異的抗原である、前記第一のポリペプチド；及び

b. 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、又は該第二の抗原に結合する受容体；及び第二の細胞内シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない、第二のポリペプチド；を含み、

前記第二の抗原が、血管内皮増殖因子（VEGF）又は損傷関連分子パターン分子（DAMP）であり、該DAMPが、熱ショックタンパク質、染色体関連タンパク質高移動度グループボックス1（HMGB1）、S100A8（MRP8、カルグラニユリンA）、S100A9（MRP14、カルグラニユリンB）、血清アミロイドA（SAA）、デオキシリボ核酸、アデノシントリリン酸、尿酸、又はヘパリン硫酸であり；かつ該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる、前記改変型Tリンパ球。

【請求項10】

前記第一の抗原結合ドメイン又は前記第二の抗原結合ドメインのいずれか又は両方が、

scFv抗体断片である、請求項9記載の改変型Tリンパ球。

【請求項 1 1】

前記第一の抗原が、腫瘍細胞上の抗原である、請求項9又は10記載の改変型Tリンパ球。

【請求項 1 2】

前記腫瘍細胞が、固形腫瘍中の細胞である、請求項9～11のいずれか一項記載の改変型Tリンパ球。

【請求項 1 3】

前記第一の抗原が、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原である、請求項9又は10記載の改変型Tリンパ球。

【請求項 1 4】

前記腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原が、Her2、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、PSMA、BCMA、アルファ-フェトプロテイン（AFP）、癌胎児性抗原（CEA）、癌抗原-125（CA-125）、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、上皮性膜タンパク質（EMA）、上皮性腫瘍抗原（ETA）、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原（MAGE）、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維酸性タンパク質（GFAP）、肉眼的嚢胞性疾患液体タンパク質（GCDFP-15）、HMB-45抗原、タンパク質メラニン-A（Tリンパ球に認識されるメラノーマ抗原；MART-1）、myo-D1、筋特異的アクチン（MSA）、ニューロフィラメント、神経特異的エノラーゼ（NSE）、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、ピルビン酸キナーゼイソ酵素タイプM2の二量体形（腫瘍M2-PK）、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子パリアントIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、請求項13記載の改変型Tリンパ球。

【請求項 1 5】

前記第一の抗原が、インテグリン α 3（CD61）、ガラクチン、K-Ras（V-Ki-ras2キルステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子）、又はRai-Bである、請求項9又は10記載の改変型Tリンパ球。

【請求項 1 6】

前記第二の細胞内シグナルドメインが、CD3 シグナルドメインであるか又はそれを含む、請求項9～15のいずれか一項記載の改変型Tリンパ球。

【請求項 1 7】

前記1以上の共刺激性ドメインが、共刺激性CD27ポリペプチド配列、共刺激性CD28ポリペプチド配列、共刺激性OX40（CD134）ポリペプチド配列、共刺激性4-1BB（CD137）ポリペプチド配列、又は共刺激性誘導性T細胞共刺激性（ICOS）ポリペプチド配列のうちの1以上を含む、請求項9～16のいずれか一項記載の改変型Tリンパ球。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2013年2月6日に出願された、米国仮特許出願第61/761,548号に対する優先権を主張し、その開示はその全てが参照により本明細書に組み込まれている。

【0002】

（1. 技術分野）

本明細書における開示は、免疫学分野、及びより具体的には、Tリンパ球又は他の免疫細胞の改変に関する。

【背景技術】

【0003】

（2. 背景）

Tリンパ球（また、T細胞とも呼ばれる）のような免疫系の細胞は、特定の抗原の認識又

10

20

30

40

50

はそれらとの相互作用に際し、細胞の活性化をもたらす受容体又は受容体複合体を通じて、特定の抗原を認識し、かつそれらと相互作用する。そのような受容体の一例は、8つのタンパク質の複合体である、抗原特異的Tリンパ球受容体複合体（TCR/CD3）である。T細胞受容体（TCR）はTリンパ球の表面に発現する。一構成要素であるCD3は、不変の構造を有し、リガンドによるTCRの占拠に続く細胞内シグナルを担う。抗原-CD3複合体に対するTリンパ球受容体（TCR/CD3）は、主要組織適合複合体（MHC）のタンパク質により提示される、抗原ペプチドを認識する。MHC複合体及びペプチドは、抗原提示細胞及び他のTリンパ球の標的の表面に発現する。TCR/CD3複合体が刺激されると、Tリンパ球が活性化し、その結果、抗原特異的な免疫応答が起こる。該TCR/CD3複合体はエフェクター機能、及び免疫系の調節において、中心的役割を果たす。

10

【0004】

Tリンパ球が完全に活性化するためには、第二の共刺激性シグナルを必要とする。そのようなシグナルがないと、Tリンパ球は、TCRに対する抗原の結合に応答しなくなるか、又はアネルギー状態となる。そのような共刺激性シグナルは、例えば、Tリンパ球タンパク質であるCD28によりもたらされ、このタンパク質は、抗原提示細胞上のCD80及びCD86と相互作用する。もう一つのTリンパ球タンパク質である、ICOS（誘導性共刺激タンパク質）は、ICOSリガンドと結合したときに、共刺激性シグナルをもたらす。

【0005】

TCR複合体の本質的な抗原結合、シグナル及び刺激性機能は、一般にキメラ抗原受容体（CAR）と呼ばれる単一ポリペプチド鎖に対する、遺伝子組換え法により低下させられてきた。例えば、Eshharの米国特許第7,741,465号；Eshharの米国特許出願公開第2012/0093842号を参照されたい。そのようなCARを備えたTリンパ球は、一般にCAR-Tリンパ球と呼ばれる。しかしながら、そのようなCARがTリンパ球を、特異的腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原に対し効率的に標的化し、かつTリンパ球を、そのような抗原を発現する腫瘍細胞を殺すべく効率的に標的化することができる一方、そのような設計は、Tリンパ球を、そのような抗原を発現する、正常で健康な細胞までも殺すよう方向付けるといふ、重大な副作用を生じさせる。そのように、そのようなCAR-Tリンパ球の使用は一般に、腫瘍に体内のいかなる他の細胞にも発現しない抗原が発現するという、比較的稀な状況に限定されている。

20

【0006】

本明細書に記載されるのは、現在のCAR設計のこの欠点を克服する、キメラ受容体を含む改変型Tリンパ球である。

30

【発明の概要】

【0007】

（3. 概要）

第一の態様において、本明細書で提供されるのは、改変型リンパ球、例えば、少なくとも2つの異なるポリペプチド、例えばキメラ受容体を含む改変型Tリンパ球である。ここで、該免疫シグナルは、例えばキメラ受容体である、第一のポリペプチドの、第一の抗原への結合に由来し、第二のポリペプチド、例えばキメラ受容体により産生される共刺激性シグナルから分離されている。かつここで、該共刺激性シグナルは、第二のキメラ受容体による、第二の抗原の抗原結合に依存する。本明細書の全体にわたって使用される「第一のポリペプチド」は、主たる抗原結合免疫シグナルを生成するポリペプチドを示し、「第二のポリペプチド」は、共刺激性免疫シグナルを生成するポリペプチドである。特定の実施態様において、2つのポリペプチド（例えば、キメラ受容体）は、改変型Tリンパ球に1つのCARコンストラクトを用いて導入され、該ポリペプチドは、1つのORFから2つの異なるポリペプチドを（実質的に等量）発現することを可能とする開裂配列（T2A又はP2A）により、分離される。

40

【0008】

一実施態様において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって、第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び第一の細胞内シグナルドメインを含

50

み、共刺激性ドメインを含まない、第一のポリペプチド；及び第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、又は該第二の抗原と結合する受容体；及び第二の細胞内シグナルドメインを含む、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球（CAR-Tリンパ球）である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメインに該第一の抗原が結合し、該第二の結合ドメインに該第二の抗原が結合しないこと、又は該第二の抗原結合ドメインに該第二の抗原が結合し、該第一の結合ドメインに第一の第二の抗原が結合しないことは、該改変型Tリンパ球のアネルギー、又は該第一の抗原若しくは該第二の抗原に対する該Tリンパ球の非応答性を誘導する。

10

【0009】

他の具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン及び該第二の抗原結合ドメインは、独立に、受容体の抗原結合部位、抗体の抗原結合部位、又は他のペプチド系高分子抗原結合剤である。特定の具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン又は該第二の抗原結合ドメインのいずれか又は両方は、scFv抗体断片である。具体的な実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドのいずれか又は両方は、さらに膜貫通ドメインを含む。他の具体的な実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドは、T細胞生存モチーフを含む。具体的な実施態様において、該T細胞生存モチーフは、CD28 T細胞生存モチーフである。他の具体的な実施態様において、該T細胞生存モチーフは、IL-7受容体（IL-7R）の細胞内シグナルドメイン、IL-12受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-15受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-21受容体の細胞内シグナルドメイン、又はトランスフォーミング成長因子（TGF β ）受容体の細胞内シグナルドメインである。他のより具体的な実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドは、T細胞生存モチーフを含む、CD28分子の一部を含む。より具体的な実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドは、T細胞生存モチーフを含む、CD28分子を含む。特定の具体的な実施態様において、該第一の細胞内シグナルドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含むポリペプチド配列を含む。より具体的な実施態様において、前記ポリペプチド配列は、CD3 シグナルドメインである。

20

【0010】

特定の具体的な実施態様において、該第一の抗原は、腫瘍細胞上の抗原である。より具体的な実施態様において、該腫瘍細胞は、固形腫瘍中の細胞である。他のより具体的な実施態様において、該腫瘍細胞は血液癌の細胞である。他の具体的な実施態様において、該抗原は、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原である。より具体的な実施態様において、該腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原は、Her2、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、PSMA（前立腺特異的膜抗原）、B細胞成熟抗原（BCMA）、アルファ-フェトプロテイン（AFP）、癌胎児性抗原（CEA）、癌抗原-125（CA-125）、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、上皮性膜タンパク質（EMA）、上皮性腫瘍抗原（ETA）、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原（MAGE）、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維酸性タンパク質（GFAP）、肉眼的嚢胞性疾患液体タンパク質（gross cystic disease fluid protein）（GCDFF-15）、HMB-45抗原、タンパク質メラニン-A（Tリンパ球に認識されるメラノーマ抗原；MART-1）、myo-D1、筋特異的アクチン（MSA）、ニューロフィラメント、神経特異的エノラーゼ（NSE）、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、ピルビン酸キナーゼイソ酵素タイプM2の二量体形（腫瘍M2-PK）、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EphA2、CSPG4、CD138、FAP（線維芽細胞活性化タンパク質）、CD171、カップ、ラムダ、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、EGFR、EGP2、EGP40、EpCAM、胎児性AChR、FR α 、GD3、HLA-A1+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、Lewis-Y、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、ROR1、サバイピン、TAG72、TEM、VEGFR2、EGFRvIII（表皮性成長因子バリエーション）

30

40

50

1)、精子タンパク質17 (Sp17)、メソセリン、PAP (前立腺酸性ホスファターゼ)、プロステイン、TARP (T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質)、Trp-p8、STEAP1 (プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原)、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である。具体的な実施態様において、該第一の抗原はPSCAである。他の具体的な実施態様において、該第一の抗原はPSMAである。他の具体的な実施態様において、該第一の抗原はBCMAである。他の具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメインがHER2に特異的である場合、改変型T細胞の第二のポリペプチドの抗原結合ドメインは、MUC-1に特異的でない。

【0011】

他の具体的な実施態様において、該第一の抗原は、インテグリン α 3 (CD61)、ガラクトニン、K-Ras (V-Ki-ras2キルステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子) 又はRal-Bである。

【0012】

他の具体的な実施態様において、該第二の抗原は、成長因子、サイトカイン、又はインターロイキンである。特定の実施態様において、該第二の抗原は、分子、例えば、血管形成又は脈管形成に関連する、成長因子、サイトカイン、又はインターロイキンである。より具体的な実施態様において、該第二の抗原は、血管内皮増殖因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様成長因子 (IGF)、又はインターロイキン-8 (IL-8) である。従って、該第二の抗原結合ドメインは、例えば、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8に特異的な抗体 (又はその断片、例えば、scFv) ; 又はVEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8に対する受容体であり得る。具体的な実施態様において、該第二の抗原結合ドメインは、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、TGF- β 、IL4、IL-10、IL13、又はIL-8に対する受容体である。他の具体的な実施態様において、該第二の抗原結合ドメインは、VEGFに対する受容体であり、ここで、該VEGFに対する受容体は、VEGFR、例えば、VEGFR1、VEGFR2、又はVEGFR3である。

【0013】

他の具体的な実施態様において、該第二の抗原により提供されるシグナル伝達の活性化は、抗原に起因するものではなく、低酸素に関連する。より具体的な実施態様において、該刺激は、低酸素誘導性因子-1 (HIF-1)、HIF-1、HIF-2、HIF-2、HIF-3、又はHIF-3 が活性化することにより誘導される。

【0014】

他の具体的な実施態様において、該第二の抗原は、インターロイキンである。

【0015】

他の具体的な実施態様において、該第二の抗原は損傷関連分子パターン分子 (DAMP; また、アラミンとしても知られる) である。より具体的な実施態様において、該DAMPは、熱ショックタンパク質、染色体関連タンパク質高移動度グループボックス1 (HMGB1)、S100A8 (また、MRP8、又はカルグラニユリンAとしても知られる)、S100A9 (また、MRP14、又はカルグラニユリンBとしても知られる)、血清アミロイドA (SAA)、デオキシリボ核酸、アデノシントリリン酸、尿酸、又はヘパリン硫酸である。

【0016】

特定の具体的な実施態様において、該第二の抗原は、腫瘍細胞により提示される抗原に結合する、抗体上の抗原である。

【0017】

具体的な実施態様において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球 (CAR-Tリンパ球) であって、第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び第一の細胞内シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない、第一のポリペプチド; 及びVEGFに結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン結合、及び第二の細胞内シグナルドメイン (共刺激性ドメイン) を含む第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球 (CAR-Tリンパ球) である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合に、最大の細胞傷害性を呈するようになる。具体的な実施態様において、該第一の抗原

10

20

30

40

50

は、PSCA、PSMA、又はBCMAである。他の具体的な実施態様において、該第一の細胞外抗原結合ドメインは、抗体又はその断片（例えば、scFv）、例えば、PSCA、PSMA、又はBCMAに特異的な抗体又はその断片を含む。他の具体的な実施態様において、VEGFに結合する該抗原結合ドメイン結合は、VEGFに対する受容体、すなわち、VEGFRである。他の具体的な実施態様において、該VEGFRはVEGFR1、VEGFR2、又はVEGFR3である。他の具体的な実施態様において、該VEGFRはVEGFR2である。

【0018】

本明細書のいかなる実施態様の具体的な実施態様においても、該第二のポリペプチドは1以上の共刺激性ドメインを含む。具体的な実施態様において、該1以上の共刺激性ドメインは、共刺激性CD27ポリペプチド配列、共刺激性CD28ポリペプチド配列、共刺激性OX40（CD134）ポリペプチド配列、共刺激性4-1BB（CD137）ポリペプチド配列、TILR2、TILR4、TILR7、TILR9、Fc受容体鎖、Fc受容体鎖、又は共刺激性誘導性T細胞共刺激性（ICOS）ポリペプチド配列のうちの1以上を含む。

10

【0019】

本明細書で提供される改変型Tリンパ球の具体的な実施態様において、該第一のポリペプチドは、細胞外腫瘍抗原結合ドメイン及びCD3シグナルドメインを含み、かつここで、該第二のポリペプチドは抗原結合ドメインを含み、該抗原は血管形成又は脈管形成因子、及び1以上の共刺激性分子シグナルドメインである。該血管形成因子は、例えば、VEGFであり得る。該1以上の共刺激性分子シグナルモチーフは、例えば、CD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのそれぞれに由来する、共刺激性シグナルドメインを含み得る。より具体的な実施態様において、該第一のポリペプチドは、細胞外腫瘍抗原結合ドメイン及びCD3

20

シグナルドメインを含み、かつここで、該第二のポリペプチドは抗原結合ドメインを含み、該抗原はVEGF、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのそれぞれに由来する、共刺激性シグナルドメインである。より具体的な実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドは、T細胞生存モチーフを含む。より具体的な実施態様において、該T細胞生存モチーフは、IL-7受容体（IL-7R）の細胞内シグナルドメイン、IL-12受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-15受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-21受容体の細胞内シグナルドメイン、又はトランスフォーミング成長因子（TGF）受容体の細胞内シグナルドメインであるか、又はこれらに由来する。そのため、該改変型Tリンパ球の、より具体的な実施態様において、該第一のポリペプチドは細胞外腫瘍抗原結合ドメイン及びCD3シグナルドメインを含み、かつここで、該第二のポリペプチドは抗原結合ドメインを含み、該抗原はVEGF、IL-7受容体細胞内T細胞生存モチーフ、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのそれぞれに由来する、共刺激性シグナルドメインである。

30

【0020】

改変型Tリンパ球の他の具体的な実施態様において、該第一の抗原は、腫瘍特異的抗原又は腫瘍関連抗原であり、かつ該第一の細胞内シグナルドメインは、CD3シグナルドメインを含み；かつここで、該第二のポリペプチドは、該第二の抗原に結合する抗原結合ドメイン、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのそれぞれに由来する、共刺激性シグナルドメインを含む。より具体的な実施態様において、該第二のポリペプチドは、細胞内T細胞生存モチーフ、例えば、IL-7受容体（IL-7R）の細胞内シグナルドメイン、IL-12受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-15受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-21受容体の細胞内シグナルドメイン、又はトランスフォーミング成長因子（TGF）受容体の細胞内シグナルドメインである、又はこれらに由来する、T細胞生存モチーフをさらに含む。

40

【0021】

本明細書で提供される、いかなる改変型Tリンパ球の具体的な実施態様においても、該第二の抗原はVEGF又はIL-4である。

【0022】

特定の実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン又は該第二の抗原結合ドメインのみが、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原と結合し、該第一の抗原結合ドメイン又は該第二の抗原結合ドメインのもう一方が、腫瘍特異的抗原又は腫瘍関連抗原ではない抗原と結合

50

する。そのような実施態様において、第一又は第二の刺激性シグナルの一方のみが、腫瘍特異的抗原又は腫瘍関連抗原により生成される；第一又は第二の刺激性シグナルのもう一方は、他のタイプの抗原、例えば、腫瘍環境に関連する抗原（例えば、タンパク質又は他の生体分子）により生成される。

【0023】

また、特定の実施態様において、本明細書で提供されるのは、第一及び第二のポリペプチド、並びに1以上のさらなるポリペプチド、例えば、抗原結合ドメイン及びシグナルドメインを含む、1以上のさらなるポリペプチドを含む、改変型Tリンパ球である。具体的な実施態様において、該ポリペプチドのうちの1つのみ（例えば、該第一のポリペプチド、該第二のポリペプチド、又は該1以上のさらなるポリペプチドのうちの1つのみ）が腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原に結合する、抗原結合ドメインを含む；それぞれの残りの該ポリペプチドは、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原ではない抗原と結合する、抗原結合ドメインを含む。他の具体的な実施態様において、2以上の該第一のポリペプチド、該第二のポリペプチド、及び該1以上のさらなるポリペプチドは、1以上の腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原と結合する抗原結合ドメインを含み、ここで、少なくとも1つの該ポリペプチドは腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原に結合しない、抗原結合ドメインを含む。

【0024】

他の態様において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって、第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び第一の細胞内シグナルドメインを含む、第一のポリペプチド；及び第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、又は該第二の抗原と結合する受容体；及び第二の細胞内シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメインに該第一の抗原が結合し、該第二の結合ドメインに該第二の抗原が結合しないこと、又は該第二の抗原結合ドメインに該第二の抗原が結合し、該第一の抗原結合ドメインに第一の第二の抗原が結合しないことにより、該改変型Tリンパ球のアネルギー、又は該改変型Tリンパ球の、該第一の抗原に対する非応答性が誘導される。具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン及び該抗原結合ドメインは、独立に、受容体の抗原結合部位又は抗体の抗原結合部位である。他の具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン又は該第二の抗原結合ドメインの、いずれか又は両方は、scFv抗体断片である。具体的な実施態様において、該第一のポリペプチド及び/又は該第二のポリペプチドは、膜貫通ドメインをさらに含む。より具体的な実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドは、T細胞生存モチーフ、例えば、本明細書に記載されるいずれかのT細胞生存モチーフを含む。

【0025】

他の具体的な実施態様において、該第一の抗原は腫瘍細胞、例えば、固形腫瘍又は血液癌細胞中の細胞上の抗原である。具体的な実施態様において、該第一の抗原は、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原、例えば、Her2、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、PSMA（前立腺特異的膜抗原）、B細胞成熟抗原（BCMA）、アルファ-フェトプロテイン（AFP）、癌胎児性抗原（CEA）、癌抗原-125（CA-125）、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、上皮性膜タンパク質（EMA）、上皮性腫瘍抗原（ETA）、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原（MAGE）、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維酸性タンパク質（GFAP）、肉眼的嚢胞性疾患液体タンパク質（GCDP-15）、HMB-45抗原、タンパク質メラニン-A（Tリンパ球に認識されるメラノーマ抗原；MART-1）、myo-D1、筋特異的アクチン（MSA）、ニューロフィラメント、神経特異的エノラーゼ（NSE）、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、ピルビン酸キナーゼイソ酵素タイプM2の二量体形（腫瘍M2-PK）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である。特定の実施態様において、該腫瘍関連抗原は、CD19、CD22、CD27、CD30、CD

10

20

30

40

50

70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリアントIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、又はS TEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）である。

【0026】

他の具体的な実施態様において、該第一の抗原は、インテグリン α 3（CD61）、ガラクトニン、K-Ras（V-Ki-ras2キルステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子）又はRa1-Bである。

【0027】

特定の具体的な実施態様において、該第二の細胞内シグナルドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）、例えば、CD3 シグナルドメインを含む、ポリペプチド配列を含む。具体的な実施態様において、該第二の抗原は成長因子、サイトカイン、又はインターロイキンである。他の具体的な実施態様において、該第二の抗原は、血管形成又は脈管形成に関連する、成長因子、サイトカイン、又はインターロイキン、例えば、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である。他のより具体的な実施態様において、該第二のキメラ受容体によるシグナル伝達は、低酸素関連因子、例えば、HIF-1、HIF-1、HIF-2、HIF-2、HIF-3、又はHIF-3 が活性化することにより誘導される。他の具体的な実施態様において、該第二の抗原はインターロイキンである。他の具体的な実施態様において、該第二の抗原はDAMP、例えば、熱ショックタンパク質、HMGB1、S100A8、S100A9、SAA、DNA、ATP、尿酸、又はヘパリン硫酸である。他の具体的な実施態様において、該第二の抗原は、投与ペプチド、例えば、抗体又は合成ポリペプチドである。他の具体的な実施態様において、該第二の抗原は、腫瘍細胞により提示される抗原に結合する、抗体上の抗原である。特定の具体的な実施態様において、該第一のポリペプチド及び/又は該第二のポリペプチドは1以上の共刺激性ドメイン、例えば、共刺激性CD27ポリペプチド配列、共刺激性CD28ポリペプチド配列、共刺激性OX40（CD134）ポリペプチド配列、共刺激性4-1BB（CD137）ポリペプチド配列、TILR2、TILR4、TILR7、TILR9、Fc受容体鎖、Fc受容体鎖、又は共刺激性誘導性T細胞共刺激性（ICOS）ポリペプチド配列のうちの1以上を含む。先のいずれかの実施態様において、具体的な実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドは、T細胞生存モチーフを含み、例えば、該T細胞生存モチーフは、IL-7受容体（IL-7R）の細胞内シグナルドメイン、IL-12受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-15受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-21受容体の細胞内シグナルドメイン、又はトランスフォーミング成長因子（TGF β ）受容体の細胞内シグナルドメインであるか、又はこれらに由来する。

【0028】

他の態様において、本明細書で提供されるのは、疾病又は疾患を有する個体を治療する方法であり、ここで、該疾病又は疾患は、第一の抗原により特徴づけられるか、特徴づけることが可能であり、かつ第二の抗原と関連する。一実施態様において、該第一の抗原は、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原である。

【図面の簡単な説明】

【0029】

（3.1 図面の簡単な説明）

【図1】4つのCARである、SP：シグナルペプチド；EC：細胞外；TM：膜貫通；IC：細胞内の略図。

【0030】

【図2】4つのCARである、SP：シグナルペプチド；EC：細胞外；TM：膜貫通；IC：細胞内の略図。

【発明を実施するための形態】

【0031】

（4. 発明の詳細な説明）

本明細書で提供されるのは、所望の抗原を提示する細胞に方向づけられた、遺伝的に改変された免疫系細胞、例えばTリンパ球（Tリンパ球）であり、現行のTリンパ球をベース

10

20

30

40

50

治療法と比較し、そのような細胞に対しより高い特異性を示すものである。一般に、現行の改変型Tリンパ球は、キメラ抗原受容体又はCARとして知られるポリペプチドを発現するよう改変されている。例えば、Eshharの米国特許第7,741,465号を参照されたい。CARを発現するTリンパ球は、CAR-Tリンパ球として知られている。CARの一般構造は、細胞外部位及び細胞内部位を含む1つのポリペプチド鎖を含み；Tリンパ球の細胞膜にCARをつなぎとめるため、膜貫通部位が任意に追加されている。該細胞外部位は、関心のある抗原、例えば細胞上の抗原、例えば、腫瘍特異的抗原又は腫瘍関連抗原に結合することのできる、ドメイン又はモチーフを含む。該細胞内部位は、CARの細胞外部位への抗原の結合に応答して、Tリンパ球が活性化するために必要な、主たる抗原結合シグナルを伝達することのできる、ドメイン又はモチーフを含む。一般に、このドメインまたはモチーフは、ITAM（免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ）を含むか、又はそのものである。CARに適したITAMを含むポリペプチドは、例えば、ジータCD3鎖（CD3 ζ ）、又はそのITAMを含む部分を含む。Tリンパ球が十分に活性化するために、第二の共刺激性シグナルを必要とすることを踏まえ、より最近では、CARの設計が繰り返されており、細胞内部位に、1以上の共刺激性モチーフ、典型的には、CD27、CD28又はCD137（4-1BB）の共刺激性部位がさらに含まれる。そのような設計により、CARを発現するTリンパ球が、該CARの細胞外ドメインに関心の対象となる抗原が結合した際に、十分に活性化されることを可能とし、それによりCAR-Tリンパ球が抗原を有する細胞を殺すことが可能となる。

10

【0032】

そのような改変型Tリンパ球は、特定の抗原を有する有害な細胞を殺すのにとっても有効となり得るが、それらには、そのような抗原を低量であるが、検出可能な量発現する正常細胞を殺す作用もある。改変型Tリンパ球のそのような腫瘍外活性は、受容者の正常組織に重篤な損傷、及び死さえももたらし得る。例えば、ERBB2を過剰発現する腫瘍に方向づけられた 10^{10} 個のCAR-Tリンパ球を投与された転移性結腸癌患者は、投与後15分以内に肺の痛みを経験し、続いて多臓器不全及び出血により死亡した。Morganらの文献「ERBB2を認識するキメラ抗原受容体を、遺伝子導入されたTリンパ球の投与後の、深刻な不利益事象の事例報告（Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T lymphocytes Transfected with a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2）」Molecular Therapy 18(4):843-851 (2010)を参照されたい。そのような有害な腫瘍外効果は、単鎖CAR及びそれらを発現するTリンパ球の利用可能性を厳しく制限する。

20

30

【0033】

しかしながら、そのようなCARを介した腫瘍外効果は、主たる抗原結合シグナル伝達を共刺激から分離することで低減又は排除される。その結果、抗原の結合単独では改変型Tリンパ球の活性化に十分でなくなる。例えば、ここでは主たる及び第二のシグナルの両方が腫瘍を有する組織に特有に認められ、正常組織では認められないことが期待されよう。本明細書に開示されるように、この分離は、共刺激性ポリペプチド、例えばキメラ受容体を発現するよう改変された、又は2以上の人工ポリペプチド、例えば、キメラ受容体であり、少なくともその1つが主たる抗原結合シグナル伝達ドメインを含み、また、共刺激性モチーフも含むことはなく、少なくともその1つが共刺激性ドメイン又はモチーフを含むが、主たる抗原結合シグナル伝達ドメインを含まない、キメラ受容体（2以上のキメラ受容体は同一の抗原と結合しない）を発現するよう改変された、Tリンパ球の使用を通じて達成される。主たるシグナル伝達ポリペプチド（生得のTCRでも、人工ポリペプチドでも）に加え、共刺激性ポリペプチドが結合しない場合、改変型Tリンパ球は非応答状態、アネルギー、又はアポトーシスに至る。

40

【0034】

（4.1 二重特異性改変型Tリンパ球）

（4.1.1 第一の形態）

特定の実施態様において、本明細書で提供されるのは、特定の抗原に応答して共刺激性シグナルを提供する1つの人工共刺激性ポリペプチド、例えば、キメラ受容体を含む改変型Tリンパ球である；しかしながら、主たる抗原結合シグナルは、生得のT細胞受容体タン

50

パク質を通じて伝達される。この1つのポリペプチドは、例えば第一の抗原と結合する抗原結合ドメイン、及び1以上の共刺激性ドメインを含むが、ITAM又はCD3のような主たる抗原結合シグナル生成ドメインに欠ける。この形態において、該改変型T細胞は、主たる抗原結合シグナルについて、生得のT細胞受容体及びCD3シグナルタンパク質に依存する。共刺激性ポリペプチドは、Tリンパ球の特定の抗原への応答を増強する、共刺激性シグナルを提供する。特定の実施態様において、T細胞は本来、第一の抗原、例えば、腫瘍特異的抗原(TSA)又は腫瘍関連抗原(TAA)及び人工ポリペプチド(例えばキメラ抗原受容体)を認識し、かつ共刺激性ポリペプチドの抗原結合ドメインもまた、該第一の抗原と結合する。他の実施態様において、T細胞は本来、第一の抗原、例えば、腫瘍特異的抗原(TSA)又は腫瘍関連抗原(TAA)、及び人工ポリペプチド(例えば、キメラ受容体)を認識し、及び共刺激性ポリペプチドの抗原結合ドメインは、第二の別の抗原、例えば、異なるTSA又はTAAと結合する。他の実施態様において、T細胞は本来、第一の抗原、例えば腫瘍特異的抗原(TSA)又は腫瘍関連抗原(TAA)、及び人工ポリペプチド(例えば、キメラ受容体)を認識し、かつ共刺激性ポリペプチドの抗原結合ドメインは、TSA又はTAAではない第二の抗原に結合する。

10

【0035】

人工ポリペプチド(例えば、キメラ受容体)の抗原結合部位は、抗原に結合するポリペプチドドメイン、モチーフ又は配列のいずれでもよい。特定の実施態様において、抗原結合ドメインは、受容体の抗原結合部位、又は抗体の抗原結合部位である。例えば、抗原結合ドメインは、受容体又はその抗原結合部位、例えば腫瘍細胞により産生されるリガンドに対する受容体、抗体、抗体鎖、又はその抗原結合部位、Fcドメイン、グリコホスファチジルイノシトールアンカードメインなどであり得る。そのため、特定の実施態様において、該抗原結合はscFv抗体断片である。特定の他の実施態様において、抗原結合ドメインは、ペプチド系高分子抗原結合剤、例えば、ファージディスプレイタンパク質の別形態である。特定の他の実施態様において、抗原結合ドメインは抗原に直接結合しないが、抗原に結合する改変型タンパク質に結合する。具体的な実施態様において、例えば、抗原結合ドメインは、抗原に結合するポリペプチド又は高分子上のリガンド、例えばアビジンに結合するリガンド、例えばビオチンを含む。様々な実施態様において、抗原結合ドメインによる抗原結合は、主要組織適合複合体(MHC)に関連する抗原提示に拘束され得、又はMHCに拘束され得ない。

20

30

【0036】

特定の実施態様において、人工ポリペプチド(キメラ受容体)の内部の1以上の共刺激性ドメインは、共刺激性CD27ポリペプチド配列、共刺激性CD28ポリペプチド配列、共刺激性OX40(CD134)ポリペプチド配列、共刺激性4-1BB(CD137)ポリペプチド配列、又は共刺激性誘導性T細胞共刺激性(ICOS)ポリペプチド配列のうちの1以上を含む。

【0037】

第一の抗原は関心のある任意の抗原、例えば、細胞の表面に発現する抗原でもよい。好ましい実施態様において、該第一の抗原は、腫瘍細胞上の抗原、例えばTAA又はTSAである。該腫瘍細胞は、例えば固形腫瘍の細胞、又は血液癌の細胞であり得る。特定の具体的な実施態様において、該抗原は、腫瘍関連抗原、又は腫瘍特異的抗原、例えば、Her2、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、PSMA(前立腺特異的膜抗原)、B細胞成熟抗原(BCMA)、ERK5、アルファ-フェトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)、癌抗原-125(CA-125)、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、上皮性膜タンパク質(EMA)、上皮性腫瘍抗原(ETA)、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原(MAGE)、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)、肉眼的嚢胞性疾患液体タンパク質(GCDFP-15)、HMB-45抗原、タンパク質メラニン-A(Tリンパ球に認識されるメラノーマ抗原; MART-1)、myo-D1、筋特異的アクチン(MSA)、ニューロフィラメント、神経特異的エノラーゼ(NSE)、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、ピルビン酸キナーゼイソ酵素タイプM2の二量体形(腫瘍M2-PK)、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である。特定の実施態様において

40

50

、腫瘍関連抗原は、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリアントIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリディングフレームタンパク質）、Trp-p8、又はSTEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）である。

【0038】

特定の実施態様において、TAA又はTSAは癌/精巣（CT）抗原、例えば、BAGE、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-ESO-1、NY-SAR-35、OY-TES-1、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1、又はTPTEである。

【0039】

特定の他の実施態様において、TAA又はTSAは糖類又はガングリオシド、例えば、fuc-GM1、GM2（癌胎児性抗原免疫原性-1；OFA-I-1）；GD2（OFA-I-2）、GM3、GD3などである。

【0040】

特定の他の実施態様において、TAA又はTSAは -アクチニン-4、Bage-1、BCR-ABL、Bcr-Abl融合タンパク質、 -カテニン、CA 125、CA 15-3（CA 27.29\BCAA）、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、Casp-8、cdc27、cdk4、cdkn2a、CEA、coa-1、dek-can融合タンパク質、EBNA、EF2、エプスタイン-バーウイルス抗原、ETV6-AML1融合タンパク質、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-1、2、及び3、neo-PAP、ミオシンクラスI、OS-9、pml-RAR 融合タンパク質、PTPRK、K-ras、N-ras、トリオースリン酸イソメラーゼ、Gage3、4、5、6、7、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、NA-88、NY-Eso-1/Lage-2、SP17、SSX-2、TRP2-Int2、gp100（Pmel 17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、RAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15(58)、RAGE、SCP-1、Hom/Mel-40、PRAME、p53、H-Ras、HER-2/neu、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、ヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6及びE7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、13-カテニン、Mum-1、p16、TAGE、P SMA（前立腺特異的膜抗原）、B細胞成熟抗原（BCMA）、CT7、テロメラーゼ、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733（EpCAM）、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP、又はTPSである。

【0041】

他の具体的な実施態様において、該第一の抗原は、インテグリン v 3（CD61）、ガラクトシン、K-Ras（V-Ki-ras2キルステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子）、又はRa1-Bである。

【0042】

他の腫瘍関連及び腫瘍特異的抗原は当業者に公知であり、本明細書で提供される改変型Tリンパ球の標的となり得る。

【0043】

人工ポリペプチドの抗原結合ドメインに結合される、第二の抗原がTSA又はTAAではない、特定の実施態様において、抗原は、例えば成長因子、サイトカイン又はインターロイキン、例えば血管形成又は脈管形成に関連する、成長因子、サイトカイン、又はインターロイキンであり得る。そのような成長因子、サイトカイン、又はインターロイキンは、例えば血管内皮増殖因子（VEGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、又はインターロイキン-8（IL-8）を含み得る。

【0044】

また、腫瘍は該腫瘍近傍に限られた、低酸素環境を生み出すこともできる。そのように、他のより具体的な実施態様において、該人工ポリペプチド（例えば、キメラ受容体）によるシグナル伝達は、低酸素関連因子、例えば、HIF-1、HIF-1、HIF-2、HIF-2、HIF-3、又はHIF-3 が活性化することにより誘導され、又は別段に低酸素応答エレメントが活性化することにより誘導される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

また、腫瘍ができると、正常組織に局所の損傷ができ、損傷関連分子パターン分子として知られる分子（DAMP；また、アラームンとしても知られる）が放出され得る。特定の実施態様において、第二の抗原はDAMP、例えば、熱ショックタンパク質、染色体関連タンパク質高移動度グルーボックス1（HMGB1）、S100A8（MRP8、カルグラニユリンA）、S100A9（MRP14、カルグラニユリンB）、血清アミロイドA（SAA）、デオキシリボ核酸、アデノシントリリン酸、尿酸、又はヘパリン硫酸である。

【 0 0 4 6 】

(4.1.2 第二の形態、基本構造)

一態様において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって、第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び第一の細胞内シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない第一のポリペプチド；及び第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、又は該第二の抗原に結合する受容体；及び第二の細胞内シグナルドメインを含む、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。一般に、2つのポリペプチドは、両方ともキメラ受容体である。該第一の抗原結合ドメインに該第一の抗原が結合し、該第二の結合ドメインに該第二の抗原が結合しないこと、又は該第二の抗原結合ドメインに該第二の抗原が結合し、該第一の結合ドメインに第一の抗原が結合しないことのいずれかにより、該改変型Tリンパ球のアレルギーが誘導され、又は改変型Tリンパ球が、第一の抗原結合ドメインへの第一の抗原の結合単独に対し非応答性になる。

【 0 0 4 7 】

第一のポリペプチド及び第二のポリペプチドの抗原結合部位は、独立に、抗原に結合する任意のポリペプチドドメイン、モチーフ又は配列であり得る。該第一の抗原結合ドメイン及び該第二の抗原結合ドメインは独立に、受容体の抗原結合部位又は抗体の抗原結合部位である。例えば、第一及び第二の抗原結合ドメインは受容体又はその抗原結合部位、例えば、腫瘍細胞により産生されるリガンドに対する受容体、抗体、抗体鎖、又はその抗原結合部位、Fcドメイン、グリコホスファチジルイノシトールアンカードメインなどであり得る。そのため、特定の実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン又は該第二の抗原結合ドメインのいずれか又は両方は、scFv抗体断片である。特定の他の実施態様において、第一及び第二の抗原結合ドメインはペプチド系高分子抗原結合剤、例えばファージディスプレイタンパク質の別形態であり得る。様々な実施態様において、抗原結合ドメインによる抗原の結合は主要組織適合複合体（MHC）に関連する抗原提示に拘束され得るか、又はMHCに拘束され得ない。

【 0 0 4 8 】

該細胞外及び細胞内部位に加え、該第一のポリペプチド及び/又は該第二のポリペプチドは、膜貫通ドメインをさらに含むことが好ましい。膜貫通ドメインは、任意の膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインから得ることができ、又はこれらに由来することができ、かつそのような膜貫通ドメインの全て又は一部を含むことができる。具体的な実施態様において、膜貫通ドメインは例えばCD16、サイトカイン受容体、及びインターロイキン受容体、又は成長因子受容体などから得ることができ、又はこれらに由来することができる。

【 0 0 4 9 】

また、第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドは、T細胞生存モチーフを含んでもよい。T細胞生存モチーフは、抗原による刺激後のTリンパ球の生存を促進する、任意のポリペプチド配列又はモチーフであり得る。特定の実施態様において、T細胞生存モチーフは、CD3、CD28、IL-7受容体（IL-7R）の細胞内シグナルドメイン、IL-12受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-15受容体の細胞内シグナルドメイン、IL-21受容体の細胞内シグナルドメイン、又はトランスフォーミング成長因子（TGF）受容体の細胞内シグナルドメインであるか、又はこれらに由来する。

【 0 0 5 0 】

第一のポリペプチドの第一の細胞内シグナルドメインは、第一のポリペプチドの第一の抗原結合ドメインを起点とする抗原結合シグナルを、例えば生得のTリンパ球受容体のCD3 (CD3ジータ)鎖と同様の様式で伝達することのできる、任意のポリペプチドであり得る。特定の実施態様では、第一の細胞内シグナルドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (ITAM) を含むポリペプチド配列を含む。ポリペプチド配列は、CD3 シグナルドメイン又はそのシグナル伝達バリエーションであることが好ましい。

【 0 0 5 1 】

第二のポリペプチドは、1以上の共刺激性ドメインを含み、第二の抗原が第二のポリペプチドの第二の抗原結合ドメインに結合したときに、第二のポリペプチドが共刺激を提供することを可能とする。任意の共刺激性モチーフ、又はその機能的部位が使用され得る。特定の具体的な実施態様において、1以上の共刺激性ドメインは、共刺激性CD27ポリペプチド配列、共刺激性CD28ポリペプチド配列、共刺激性OX40 (CD134) ポリペプチド配列、共刺激性4-1BB (CD137) ポリペプチド配列、又は共刺激性誘導性T細胞共刺激性 (ICOS) ポリペプチド配列のうちの1以上を含む。

【 0 0 5 2 】

第一の抗原は、関心のある抗原、例えば細胞表面に発現する抗原であり得る。好ましい実施態様において、該第一の抗原は腫瘍細胞上の抗原、例えば、TSA又はTAA、例えば、先の第5.1節に開示するTSA又はTAAのいずれかである。該腫瘍細胞は例えば、固形腫瘍又は血液癌の細胞であり得る。

【 0 0 5 3 】

該抗原は腫瘍又は癌種の細胞、例えばリンパ腫、肺癌、乳癌、前立腺癌、副腎皮質癌、甲状腺癌、上咽頭癌、メラノーマ、例えば悪性メラノーマ、皮膚癌、結腸癌、類腱腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、内分泌腫瘍、ユーイング肉腫、末梢性原始神経外胚葉腫瘍、固形胚細胞腫瘍、肝芽細胞腫、神経芽細胞腫、非横紋筋肉腫軟部組織肉腫 (non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcoma)、骨肉腫、網膜芽腫、横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、神経膠芽細胞腫、粘液腫、線維腫、脂肪腫などの細胞上に発現する任意の抗原であり得る。より具体的な実施態様において、該リンパ腫は、慢性リンパ性白血病 (小型リンパ性リンパ腫)、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、脾臓周辺帯リンパ腫、形質細胞性骨髓腫、形質細胞腫、節外周辺帯B細胞リンパ腫、MALTリンパ腫、節周辺帯B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦隔 (胸腺) 大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、パーキットリンパ腫、Tリンパ球前リンパ球性白血病、Tリンパ球大型顆粒リンパ球性白血病、侵襲性NK細胞白血病、成人Tリンパ球白血病/リンパ腫、節外性NK/Tリンパ球リンパ腫、鼻型、腸疾患型Tリンパ球リンパ腫、肝脾Tリンパ球リンパ腫、芽球性NK細胞リンパ腫、菌状息肉腫、セザリー症候群、原発性皮膚未分化大細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症、血管免疫芽球性Tリンパ球リンパ腫、末梢性Tリンパ球リンパ腫 (不特定)、未分化大細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、又は非ホジキンリンパ腫であり得る。

【 0 0 5 4 】

第二の抗原は、第一の抗原と異なる抗原であり得るが、第一の抗原に関係するものであることが好ましい。例えば、第一及び第二の抗原の両方が、同じ腫瘍細胞種の上に存在する腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原であり得る。第一の抗原が腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原であり、該第二の抗原は腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原ではないことが好ましい。そのような実施態様において、第二の抗原は、特定の実施態様において、腫瘍の一側面、例えば、腫瘍の環境に関係する。例えば、腫瘍は腫瘍を取り囲む組織において、炎症状態を誘導することができ、腫瘍の末梢部に向けての、及び末梢部での血管形成を増進する、血管新生増殖因子、インターロイキン、及び/又はサイトカインを放出することができる。そのため、具体的な実施態様において、第二の抗原は成長因子、サイトカイン又はインターロイキン、例えば血管形成又は脈管形成に関連する、成長因子、サイトカイン、又

はインターロイキンである。そのような成長因子、サイトカイン、又はインターロイキンには、例えば血管内皮増殖因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様成長因子 (IGF)、又はインターロイキン-8 (IL-8) が含まれ得る。

【 0 0 5 5 】

また、腫瘍は腫瘍近傍に限られた、低酸素環境を生み出すこともできる。そのように、他のより具体的な実施態様において、該第二のキメラ受容体によるシグナル伝達は、低酸素関連因子、例えばHIF-1、HIF-1、HIF-2、HIF-2、HIF-3、又はHIF-3が活性化することにより誘導され、又は別に、低酸素応答エレメントが活性化することにより誘導される。

10

【 0 0 5 6 】

また、腫瘍ができると、正常組織に局所の損傷ができ、損傷関連分子パターン分子 (DAMP; また、アラミンとしても知られる。) として知られる分子が放出され得る。特定の実施態様において、第二の抗原はDAMP、例えば熱ショックタンパク質、染色体関連タンパク質高移動度グループボックス1 (HMGB1)、S100A8 (MRP8、カルグラニユリンA)、S100A9 (MRP14、カルグラニユリンB)、血清アミロイドA (SAA)、デオキシリボ核酸、アデノシントリリン酸、尿酸、又はヘパリン硫酸などである。

【 0 0 5 7 】

キメラ受容体、例えば第二のキメラ受容体ポリペプチドを、抗原本来のものではない抗原又は取り囲む組織に方向づけることは可能である。例えば、腫瘍細胞、又は取り囲む正常組織の細胞は、細胞上の少なくとも一つの抗原に結合する抗体と接触し得る。この場合、抗体上の任意の抗原自体が、第二のキメラ受容体ポリペプチドの第二の抗原結合部位に結合できる。特定の実施態様において、第一のポリペプチドの、第一の抗原結合部位に結合する第一の抗原は、腫瘍細胞により提示される抗原に結合する、抗体上の抗原である。特定の実施態様において、第二のポリペプチドの、第二の抗原結合部位に結合する第二の抗原は、腫瘍細胞により提示される抗原に結合する、抗体上の抗原である。特定の実施態様において、第一の抗原は第一の抗体上の抗原であり、第二の抗原は第二の抗体上の抗原である。そのような実施態様において、第一の抗体は、例えば腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原に結合する抗体であり得、第二の抗体は腫瘍に関連するサイトカイン、インターロイキン、成長因子、DAMP、又は他の非TAA、非TSAタンパク質に対する抗体である。

20

30

【 0 0 5 8 】

(4.1.3. 具体的実施態様)

そのため、一形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない、第一のポリペプチド；及びb) 血管形成又は脈管形成因子に結合する細胞外抗原結合ドメイン及び第二の細胞内シグナルドメインを含む、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

40

【 0 0 5 9 】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合するscFv又はその抗原結合部位、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない、第一のポリペプチド；及びb) 血管形成又は脈管形成因子に結合する細胞外抗原結合ドメイン、及び第二の細胞内シグナルドメインを含む、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【 0 0 6 0 】

より具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a

50

）腫瘍関連抗原（TAA）又は腫瘍特異的抗原（TSA）である、第一の抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及び第二の細胞内シグナルドメインを含み、該第二の抗原がVEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化される場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【0061】

他のより具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び第一の細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まず、該第一の抗原がTAA又はTSAである、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのうちの1以上に由来する、共刺激性シグナルドメインを含む第二の細胞内シグナルドメインを含み、該第二の抗原がVEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈し得る。

【0062】

他のより具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン；及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まず、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDPF-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子パリアントIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する細胞外抗原結合ドメイン、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのうちの1以上に由来する共刺激性シグナルドメインを含む、第二の細胞内シグナルドメインを含み、該第二の抗原がVEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【0063】

他のより具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まず、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDPF-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子パリアントIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質

、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する、第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBの、それぞれに由来する共刺激性シグナルドメインを含む、細胞内シグナルドメインを含み、該第二の抗原がVEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【0064】

他のより具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合するscFv又はその抗原結合部位；及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まず、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ER K5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDPF-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリアントIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する細胞外抗原結合ドメイン、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのそれぞれに由来する共刺激性シグナルドメインを含む第二の細胞内シグナルドメインを含み、該第二の抗原がVEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【0065】

先の具体的な形態のいずれにおいても、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドのいずれか又は両方が、T細胞生存モチーフ、例えばCD28、IL-7R、IL-12R、IL-15R、IL-21R、TGF Rに由来するT細胞生存モチーフを含む。

【0066】

（4.1.4. 第三の形態、基本構造）

改変型Tリンパ球内に含まれる2つのポリペプチド（例えば、キメラ受容体）は、第一のポリペプチドの第一の抗原結合ドメインへの、第一の抗原（例えば、TAA又はTSA）の結合によって、主たる抗原結合シグナルは產生されないが、共刺激性シグナルが產生され、かつ第二の抗原の結合によって、主たる抗原結合シグナルが產生されるように、設計することができる。そのような形態は、2つの抗原結合という事象が、Tリンパ球を最大限に活性化するために行われる点で、先の第一の形態と同じ利点を享受する。

【0067】

そのため、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び第一の細胞内シグナルドメインを含む第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン；及び第二の細胞内シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。先のように、該第一の抗原及び該第二の抗原は、異なる抗原である。具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメインに該第一の抗原が結合し、該第二の抗原結合ドメインに該第二の抗原が結合しないこと、又は該第二の抗原結合ドメインに該第二の抗原が結合し、該第一の結合ドメインに第一の第二の抗原が結合しないことにより、該改変型Tリンパ球のアネルギー

ーが誘導される。

【0068】

特定の実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン及び該第二の抗原結合ドメインは、独立に、任意の抗原結合ドメイン、例えば先の5.2節に開示する抗原結合ドメインのいずれか、例えば、受容体の抗原結合部位又は抗体の抗原結合部位である。より具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン又は該第二の抗原結合ドメインのいずれか又は両方はscFv抗体断片である。

【0069】

第一のポリペプチドは、1以上の共刺激性ドメインを含み、それにより第一のポリペプチドの第一の抗原結合ドメインに、第一の抗原が結合したときに、第一のポリペプチドが共刺激を提供することが、可能となる。任意の共刺激性モチーフ、又はそれらの機能部位が使用され得る。特定の具体的な実施態様において、1以上の共刺激性ドメインは、共刺激性CD27ポリペプチド配列、共刺激性CD28ポリペプチド配列、共刺激性OX40 (CD134) ポリペプチド配列、共刺激性4-1BB (CD137) ポリペプチド配列、又は共刺激性誘導性T細胞共刺激性 (ICOS) ポリペプチド配列のうちの1以上を含む。

【0070】

第二のポリペプチドの第二の細胞内シグナルドメインは、第二のポリペプチドの第二の抗原結合ドメインに由来する抗原結合シグナルを、例えば生得Tリンパ球受容体のCD3 (CD3ジータ) 鎖と同様の様式で伝達することのできる、任意のポリペプチドであり得る。特定の実施態様において、第二の細胞内シグナルドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (ITAM) を含むポリペプチド配列を含む。ポリペプチド配列はCD3 シグナルドメイン又はそのシグナル伝達バリエーションであることが好ましい。

【0071】

特定の実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドのいずれかは、さらに膜貫通ドメインを含む。特定の実施態様において、第一のポリペプチドは、1以上の共刺激性ドメインを含み、これにより、第一の抗原が第二のポリペプチドの第一の抗原結合ドメインに結合したときに、第一のポリペプチドが共刺激を提供することが可能となる。任意の共刺激性ドメイン、又はそれらの機能部位、例えばCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのそれぞれに由来する、共刺激性シグナルドメインが使用され得る。特定の他の実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドは、T細胞生存モチーフを含む。

【0072】

この形態において、第一の抗原は、関心のある抗原、例えば細胞の表面上に発現する抗原でよい。好ましい実施態様において、該第一の抗原は、腫瘍細胞上の抗原である。腫瘍細胞は例えば、固形腫瘍又は血液癌、例えば先の5.2節に開示するいずれかの種類の癌又は腫瘍の細胞であり得る。特定の具体的な実施態様において、該抗原はTAA又はTSA、例えば先の5.1節に開示するいずれかのTAA又はTSAである。

【0073】

第二の抗原は、第一の抗原と異なる任意の抗原であり得るが、第一の抗原と関係するものであることが好ましい。例えば、第一及び第二の抗原の両方が、同じ腫瘍細胞腫上に存在する腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原であり得る。第一の抗原はTAA又はTSAであり、該第二の抗原はTAA又はTSAでないことが好ましい。そのような実施態様において、第二の抗原は、特定の実施態様において、腫瘍の一側面、例えば、腫瘍の環境と関係し得る。例えば、腫瘍は該腫瘍を取り囲む組織中に炎症状態を誘導し、血管形成を増進する、血管新生増殖因子、インターロイキン、及び/又はサイトカインを腫瘍末梢部の中に、及び末梢部で放出することができる。そのため、具体的な実施態様では、第二の抗原は成長因子、サイトカイン、又はインターロイキン、例えば、血管形成又は脈管形成に関連する成長因子、サイトカイン、又はインターロイキン、例えば、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である。他のより具体的な実施態様において、該第二のキメラ受容体によるシグナル伝達は、低酸素関連因子、例えば、HIF-1、HIF-1、HIF-2、HIF-2、HIF-3、又はH

10

20

30

40

50

IF-3 が活性化することによって誘導される。特定の他の実施態様において、第二の抗原はDAMP、例えば、熱ショックタンパク質、HMGB1、S100A8 (MRP8、カルグラニユリンA)、S100A9 (MRP14、カルグラニユリンB)、SAA、デオキシリボ核酸、アデノシントリリン酸、尿酸、又はヘパリン硫酸である。

【0074】

(4.1.5. 具体的な実施態様)

そのため、一形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び第一の細胞内シグナルドメインを含む、第一のポリペプチド；及びb) 血管形成又は脈管形成因子に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【0075】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合するscFv又はその抗原結合部位、及び第一の細胞内シグナルドメインを含む第一のポリペプチド；及びb) 血管形成又は脈管形成因子に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まない、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【0076】

より具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び第一の細胞内シグナルドメインを含み、該第一の抗原が、腫瘍関連抗原 (TAA) 又は腫瘍特異的抗原 (TSA) である、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まず、該第二の抗原が、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【0077】

他のより具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのうちの1以上に由来する共刺激性シグナルドメインを含む第一の細胞内シグナルドメインを含み、該第一の抗原が、TAA又はTSAである、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まず、該第二の抗原が、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【0078】

他のより具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのうちの1以上に由来する共刺激性シグナルドメインを含む細胞内シグナルドメインを含み、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、

クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDFP-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリエーションIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及び第二の抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まず、該第二の抗原がVEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

10

【0079】

他のより具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのそれぞれに由来する共刺激性シグナルドメインを含む細胞内シグナルドメインを含み、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDFP-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリエーションIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、共刺激性ドメインを含まず、該第二の抗原が、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

20

30

【0080】

他のより具体的な形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びCD27、CD28、OX40、ICOS、及び4-1BBのそれぞれに由来する、共刺激性シグナルドメインを含む、細胞内シグナルドメインを含み、共刺激ドメインを含まず、該第一の細胞外抗原結合ドメインが、csFv又はその抗原結合部位であり、かつ、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDFP-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリエーションIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、及び細胞内CD3 シグナルドメインを含み、該第二の抗原が、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシ

40

50

グナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、最大の細胞傷害性を呈するようになる。

【0081】

先の特定の形態のいずれにおいても、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドのいずれか又は両方が、T細胞生存モチーフ、例えば、CD28、IL-7R、IL-12R、IL-15R、IL-21R、TGF Rに由来するT細胞生存モチーフを含む。

【0082】

(4.1.6. 第四の形態、基本構造)

第四の形態において、改変型Tリンパ球内に含まれる2つのキメラ受容体は、第一の抗原に方向づけられた第一のキメラ受容体が、主たる抗原結合シグナルドメイン及び共刺激性ドメインの両方を含むが、T細胞生存モチーフを含むポリペプチド配列を含まず、対し、第二の抗原に方向づけられた第二のキメラ受容体が、T細胞生存モチーフを含むポリペプチド配列を含むように構築することができる。この形態において、Tリンパ球は所望の抗原を発現する細胞へ方向づけられ、かつ、抗原の結合に際し、抗原結合及び共刺激性シグナルが生成する；しかしながら、第二の抗原に第二のキメラ受容体が結合しない場合には、Tリンパ球は生存へと向かわない。かくして、腫瘍外効果は、再び、排除され、軽減される。

【0083】

そのため、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって、a) 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、シグナルドメイン、及び1以上の共刺激性モチーフを含む、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、共刺激性モチーフを含まない、第二のポリペプチド；を含む、改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。特定の実施態様において、該T細胞生存モチーフは、IL-7受容体細胞内T細胞生存モチーフであり、CD28、IL-7R、IL-12R、IL-15R、IL-21R、又はTGF Rに由来するT細胞生存モチーフである。特定の実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドのいずれか又は両方は、膜貫通ドメインを含む。より具体的な実施態様において、該第二のポリペプチドは、T細胞生存モチーフを含むCD27、CD28、IL-7R、IL-12R、IL-15R、IL-21R、又はTGF Rのドメインを含む。

【0084】

先の記載の通り、第一の抗原結合ドメイン及び第二の抗原結合ドメインは、構造的に独立した、任意の抗原結合ドメイン、例えば、先の5.2節に開示する抗原結合ドメインのいずれかであり、例えば、受容体の抗原結合部位又は抗体の抗原結合部位である。より具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン又は該第二の抗原結合ドメインのいずれか又は両方は、scFv抗体断片である。第一の抗原は、関心のある抗原、例えば、細胞表面上に発現する抗原でよい。好ましい実施態様において、該第一の抗原は、腫瘍細胞上の抗原である。腫瘍細胞は、例えば、固形腫瘍又は血液癌、例えば、先の5.2節に開示するいずれかの種類の癌又は腫瘍の細胞であり得る。特定の具体的な実施態様において、該抗原は、TAA又はTSA、例えば、先の5.1節に開示するTAA又はTSAのいずれかである。第二の抗原は、第一の抗原とは別のものであり、血管形成又は脈管形成因子、例えば、先の5.1節に開示する血管形成又は脈管形成因子のいずれか；又は任意のDAMP、例えば、先の5.1節で開示するDAMPであり得る。他の具体的な実施態様において、該第二のキメラ受容体によるシグナル伝達は、低酸素関連因子、例えばHIF-1、HIF-1、HIF-2、HIF-2、HIF-3、又はHIF-3の活性化により誘導される。

【0085】

第一のポリペプチドの第一の細胞内シグナルドメインは、第一のポリペプチドの第一の抗原結合ドメインを起点とする抗原結合シグナルを、例えば生得のTリンパ球受容体のCD3 (CD3ジータ) 鎖と同様の様式で、伝達できる任意のポリペプチドであり得る。特定の実施態様において、第二の細胞内シグナルドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化

10

20

30

40

50

モチーフ (ITAM) を含むポリペプチド配列を含む。ポリペプチド配列は、CD3 シグナルドメイン又はそのシグナル伝達バリエーションであることが好ましい。第一のポリペプチドは、1以上の共刺激性ドメイン、例えば、任意の共刺激性モチーフ又はそれらの機能部位、例えば、共刺激性CD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOSのポリペプチド配列をさらに含む。

【0086】

(4.1.7. 具体的実施態様)

一形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及び1以上の共刺激性モチーフを含む、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、共刺激性モチーフを含まない、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ生存する。

10

【0087】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOSに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含む、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、共刺激性モチーフを含まない、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ生存する。

20

【0088】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOSに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含む第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、共刺激性モチーフを含まず、該第二の抗原が、血管形成若しくは脈管形成因子、又はDAMPである、第二のポリペプチド；を含む前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。他のより具体的な実施態様においては、該第二のキメラ受容体によるシグナル伝達は、低酸素関連因子、例えば、HIF-1、HIF-1、HIF-2、HIF-2、HIF-3、又はHIF-3 が活性化することにより誘導される。

30

【0089】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOSに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含む第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、共刺激性モチーフを含まず、該第二の抗原が、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ生存する。

40

【0090】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD28、OX40、及び4-1BBに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含む、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを

50

含み、共刺激性モチーフを含まない、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び前記T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ生存する。

【0091】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であり：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOSに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含み、該第一の抗原がTAA又はTSAである、第一のポリペプチド、及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、共刺激性モチーフを含まない、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ生存する。

10

【0092】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOSに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含み、該第一の抗原が、TAA又はTSAである、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、共刺激性モチーフを含まず、該第二の抗原が、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ生存する。

20

【0093】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン；細胞内CD3 シグナルドメイン；及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOSに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含み、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDP-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2 (ガングリオシドG2)、EGFRvIII (表皮性成長因子バリアントIII)、精子タンパク質17 (Sp17)、メソセリン、PAP (前立腺酸性ホスファターゼ)、プロステイン、TARP (T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質)、Trp-p8、STEAP1 (プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原)、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、共刺激性モチーフを含まない、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ生存する。

30

40

【0094】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン；細胞内CD3 シグナルドメイン；及びCD27、CD28、OX40及び4-1BBのそれぞれに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含み、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDP-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2 (ガングリオシ

50

ドG2)、EGFRvIII(表皮性成長因子バリエーションIII)、精子タンパク質17(Sp17)、メソセリン、PAP(前立腺酸性ホスファターゼ)、プロステイン、TARP(T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質)、Trp-p8、STEAP1(プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原)、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、共刺激性モチーフを含まず、該第二の抗原が、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ生存する。

【0095】

10

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDFP-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2(ガングリオシドG2)、EGFRvIII(表皮性成長因子バリエーションIII)、精子タンパク質17(Sp17)、メソセリン、PAP(前立腺酸性ホスファターゼ)、プロステイン、TARP(T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質)、Trp-p8、STEAP1(プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原)、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン；細胞内CD3シグナルドメイン；及びCD27、CD28、OX40及び4-1BBのそれぞれに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含む、第一のポリペプチド；及びb) VEGFと結合する第二の細胞外抗原結合ドメインを含み、共刺激性モチーフを含まない、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ生存する。

20

【0096】

(4.1.8. 第五の形態、基本構造)

第五の形態において、改変型Tリンパ球内に含まれる2つのキメラ受容体は、第一の抗原に方向づけられた第一のキメラ受容体が、第一の細胞外抗原結合ドメイン及びT細胞生存モチーフ、例えば細胞内T細胞生存モチーフを含むが、主たる抗原結合シグナルドメイン(例えば、CD3)及び共刺激性ドメインは含まず、対し第二の抗原に方向づけられた第二のキメラ受容体が、主たる抗原結合シグナルドメイン(例えば、CD3)、及び1以上の共刺激性ドメインを含むポリペプチド配列を含むように、構築され得る。この形態において、Tリンパ球は所望の抗原を発現する細胞に方向づけられ、かつ、抗原の結合に際し、Tリンパ球生存シグナルが生成する；しかしながら、第二の抗原に第二のキメラ受容体が結合していない場合には、抗原結合及び共刺激性シグナルが生成しないため、Tリンパ球は活性化しない。かくして、腫瘍外効果は、再び、排除され、又は軽減される。

30

【0097】

そのため、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメイン又は共刺激性モチーフを含まない、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、及び1以上の共刺激性モチーフを含む、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該第一のシグナルドメイン及び該第二のシグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化される場合にのみ生存し、活性化される。特定の実施態様において、該T細胞生存モチーフは、IL-7受容体の細胞内T細胞生存モチーフであり、CD28、IL-7R、IL-12R、IL-15R、IL-21R、又はTGF Rに由来するT細胞生存モチーフである。特定の実施態様において、該第一のポリペプチド又は該第二のポリペプチドのいずれか又は両方が、膜貫通ドメインを含む。より具体的な実施態様において、該第一のポリ

40

50

ペプチドは、T細胞生存モチーフを含むCD27、CD28、IL-7R、IL-12R、IL-15R、IL-21R、又はTGF Rのドメインを含む。

【0098】

先の記載の通り、第一の抗原結合ドメイン及び該第二の抗原結合ドメインは、構造的に独立した、任意の抗原結合ドメイン、例えば、先の5.2節に開示するいずれかの種類の抗原結合ドメインであり、例えば、受容体の抗原結合部位又は抗体の抗原結合部位である。より具体的な実施態様において、該第一の抗原結合ドメイン又は該第二の抗原結合ドメインのいずれか又は両方は、scFv抗体断片である。第一の抗原は、関心のある抗原、例えば、細胞表面上に発現する抗原でよい。好ましい実施態様において、該第一の抗原は、腫瘍細胞上の抗原である。腫瘍細胞は、例えば、固形腫瘍又は血液癌、例えば、先の5.1節に開示するいずれかの種類の癌又は腫瘍の細胞であり得る。特定の具体的な実施態様において、該抗原は、TAA又はTSA、例えば、先の5.1節に開示するTAA又はTSAのいずれかである。第二の抗原は、第一の抗原とは別のものであり、血管形成又は脈管形成因子、例えば、先の5.1節に開示する血管形成又は脈管形成因子のいずれか；又は任意のDAMP、例えば、先の5.1節で開示するDAMPであり得る。他の具体的な実施態様において、該第二のキメラ受容体によるシグナル伝達は、低酸素関連因子、例えば、HIF-1、HIF-1、HIF-2、HIF-2、HIF-3、又はHIF-3が活性化することにより誘導される。

10

【0099】

第二のポリペプチドの細胞内シグナルドメインは、第二のポリペプチドの抗原結合ドメインを起点とする抗原結合シグナルを、例えば、生得Tリンパ球受容体のCD3（CD3ジータ）鎖と同様の様式で、伝達できる任意のポリペプチドであり得る。特定の実施態様において、細胞内シグナルドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含むポリペプチド配列を含む。ポリペプチド配列はCD3シグナルドメイン又はそのシグナル伝達バリエーションであることが好ましい。第二のポリペプチドは1以上の共刺激性ドメイン、例えば、任意の共刺激性モチーフ又はその機能部位、例えば、共刺激性CD27、CD28、OX40（CD134）、4-1BB（CD137）、又はICOSポリペプチド配列をさらに含む。

20

【0100】

（4.1.9. 具体的実施態様）

一形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まない、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3シグナルドメイン、及び1以上の共刺激性モチーフを含む、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該シグナルドメイン及び該T細胞生存モチーフが、それぞれ該第二の抗原及び該第一の抗原により活性化された場合にのみ、活性化され、生存する。

30

【0101】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まない、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3シグナルドメイン、及びCD27、CD28、OX40（CD134）、4-1BB（CD137）、又はICOS由来の共刺激性ポリペプチド配列を含む第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は該T細胞生存モチーフ及び該シグナルドメインがそれぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、活性化され、生存する。

40

【0102】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まない、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3シグナ

50

ルドメイン、及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOS由来の共刺激性ポリペプチド配列を含み；主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まず、該第二の抗原が血管形成若しくは脈管形成因子、又はDAMPである、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は該T細胞生存モチーフ及び該シグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。

【0103】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まない、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOS由来の共刺激性ポリペプチド配列を含み、該第二の抗原が、VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該T細胞生存モチーフ及び該シグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。

10

【0104】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まない、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD28、OX40、及び4-1BB由来の共刺激性ポリペプチド配列を含む、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該T細胞生存モチーフ及び該シグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。

20

【0105】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まず、該第一の抗原が、TAA又はTSAである、第一のポリペプチド；及びb) 第二の抗原と結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOS由来の共刺激性ポリペプチド配列を含む、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該T細胞生存モチーフ及び該シグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。

30

【0106】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原と結合する第一の抗原結合ドメイン、及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まず、該第一の抗原が、TAA又はTSAである、第一のポリペプチド；及びb) VEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン、及びCD27、CD28、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、又はICOS由来の共刺激性ポリペプチド配列を含む、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該T細胞生存モチーフ及び該シグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。

40

【0107】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a) 第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン；及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まず、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA

50

、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDFP-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリエーションIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及びb）第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン、細胞内CD3 シグナルドメイン；及びCD27、CD28、OX40（CD134）、4-1BB（CD137）、又はICOS由来の共刺激性ポリペプチド配列を含む、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該T細胞生存モチーフ及び該シグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。

【0108】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a）第一の抗原に結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン；及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まず、該第一の抗原が、Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDFP-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリエーションIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質である、第一のポリペプチド；及びb）第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン；細胞内CD3 シグナルドメイン；及びCD27、CD28、OX40、及び4-1BBのそれぞれに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含み、該第二の抗原がVEGF、bFGF、PDGF、HGF、IGF、又はIL-8である、第二のポリペプチド；を含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該T細胞生存モチーフ及び該シグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。

【0109】

他の形態において、本明細書で提供されるのは、改変型Tリンパ球であって：a）Her2、PSCA、PSMA、BCMA、ERK5、AFP、CEA、CA-125、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、EMA、ETA、チロシナーゼ、MAGE、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、GFAP、GCDFP-15、HMB-45抗原、MART-1、myo-D1、MSA、ニューロフィラメント、NSE、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PK、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2（ガングリオシドG2）、EGFRvIII（表皮性成長因子バリエーションIII）、精子タンパク質17（Sp17）、メソセリン、PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）、プロステイン、TARP（T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質）、Trp-p8、STEAP1（プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原）、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質に結合する、第一の細胞外抗原結合ドメイン；及びT細胞生存モチーフを含み、主たる抗原結合シグナルドメインを含まず、かつ共刺激性モチーフを含まない、第一のポリペプチド；及びb）第二の抗原に結合する第二の細胞外抗原結合ドメイン；細胞内CD3 シグナルドメイン；及びCD27、CD28、OX40、及び4-1BBのそれぞれに由来する共刺激性ポリペプチド配列を含み、該第二の抗原が、VEGFである、第二のポリペプチドを含む、前記改変型Tリンパ球である。ここで、該改変型リンパ球は、該T細胞生存モチーフ及び該シグナルドメインの両方が、それぞれ該第一の抗原及び該第二の抗原により活性化された場合にのみ、生存する。

【0110】

(4.1.10. 他の形態)

特定の実施態様において、改変型Tリンパ球は、第一のポリペプチドとして改変型TCRを、及び共刺激性シグナルを産生する人工の第二のポリペプチドを含む。具体的な実施態様において、改変型TCRは、例えば生得の抗原結合ドメインを、特定の抗原に結合するドメインで置き換えることにより改変される。具体的な実施態様において、Tリンパ球は抗MART-1 TCRの 及び 鎖をコードするポリヌクレオチドで形質転換される。Tリンパ球は、同様に、TCRが抗原、例えばTSA又はTAAによって方向づけられる場合に、TCRの 及び サブユニットをコードするポリヌクレオチドで形質転換され得る。好ましい実施態様において、改変型Tリンパ球は、人工の共刺激性ポリペプチド、例えば先の5.1節に開示される共刺激性ポリペプチド、又は先の5.2節に開示される第二のポリペプチドのうちの一つをコードするポリヌクレオチドで、さらに形質転換される。

10

【0111】

改変型Tリンパ球が2つのポリペプチド、例えば、キメラ受容体を含む、特定の実施態様において、第一のポリペプチドは、第一の抗原結合ドメイン、主たる抗原結合シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3 ）、及び1つの共刺激性ドメイン（例えば、CD28又はそれに由来する共刺激性ポリペプチド配列）を含み、第二のポリペプチドは、第二の抗原結合ドメイン及び少なくとも1つの共刺激性ドメイン、例えば、CD27、4-1BB、OX40、IL-7Rなどに由来する共刺激性ドメインを含む。より具体的な実施態様において、第二のポリペプチドは、少なくとも2つ、又は少なくとも3つの共刺激性ドメインを含む。

20

【0112】

特定の他の実施態様において、本明細書で提供される改変型Tリンパ球は、第一の抗原結合ドメイン、主たる抗原結合シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3 ）を含み、かつ共刺激性ドメイン（例えば、CD28又はそれに由来する共刺激性ポリペプチド配列）を含まない、第一のポリペプチド（例えば、キメラ受容体）；第二の抗原結合ドメイン及び少なくとも1つの共刺激性ドメインを含む、第二のポリペプチド（キメラ受容体）；並びに抗原結合ドメイン及び少なくとも1つの他の共刺激性ドメインを含む第三のポリペプチドを含む。この実施態様において、共刺激性ドメインの総数は、少なくとも2つの別個のキメラ受容体の間で分配される。少なくとも2つの異なるキメラ受容体は同じ抗原、又は異なる抗原に結合する抗原結合ドメインを含むことができる。

30

【0113】

(4.2. 単離ポリペプチド（キメラ抗原受容体）)

本明細書で提供される第一及び第二のポリペプチドは、本明細書で提供される、改変型Tリンパ球を生産するのに有用であり、例えばアシル化、アミド化、グリコシル化、メチル化、リン酸化、硫酸化、SUMO化、ユビキチン化などによって改変してもよい。ポリペプチドは検出可能なシグナルを提供することの可能な標識、例えば放射性同位体及び蛍光化合物で標識してもよい。第一又は第二のポリペプチドの、1以上の側鎖は、コハク酸若しくは他のカルボン酸の酸無水物による、リシン及びアミノ末端残基の誘導体化、又は例えば、メチルピコリンイミダートのようなイミドエステル；ピリドキサルホスフェート；ピリドキサル；クロロポロヒドリド；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2,4ペンタンジオン；及びグリオキシレートを用いたトランスアミナーゼ触媒反応による誘導体化により、誘導体化してもよい。カルボキシル側鎖のアスパルチル又はグルタミルは、1-シクロヘキシル-3-(2-モルフォリニル-(4-エチル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドのような、カルボジイミド(R-N=C=N-R')との反応により、選択的に改変され得る。

40

【0114】

(4.3. 単離核酸)

開示されたポリペプチド（例えば、キメラ受容体）は、当該技術分野で周知の方法に従って、ポリヌクレオチド配列によりコードされ得る。ポリヌクレオチドは、免疫細胞、例えばTリンパ球の形質転換に適した、任意のポリヌクレオチドベクターに組み込まれ得る

50

。例えば、Tリンパ球は、第一及び第二のポリペプチド（例えば、キメラ受容体）がコードされた、ポリヌクレオチドを組み込んだ合成ベクター、レンチウイルス又はレトロウイルスベクター、自律複製プラスミド、ウイルス（例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、又はヘルペスウイルス）などを用いて、形質転換され得る。Tリンパ球の形質転換に適したレンチウイルスベクターには、限定はされないが、例えば、米国特許第5,994,136号；第6,165,782号；第6,428,953号；第7,083,981号；及び第7,250,299号に記載されたレンチウイルスベクターがある。Tリンパ球の形質転換に適したHIVベクターには、限定はされないが、例えば、米国特許第5,665,577号に記載されたレンチウイルスベクターがある。

【0115】

第一及び第二のポリペプチドの、例えば改変型Tリンパ球内での生産に有用な核酸には、DNA、RNA、又は核酸アナログがある。核酸アナログは、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格を改変することができ、デオキシチミジンのデオキシウリジンによる置換、デオキシシチジンの5-メチル-2'-デオキシシチジン又は5-ブromo-2'-デオキシシチジンによる置換を含むことができる。糖部分の改変は、リボース糖の2'ヒドロキシルを改変して2'-O-メチル又は2'-O-アシル糖を形成させることを含むことができる。デオキシリボースリン酸骨格を改変して、それぞれの塩基部分が6員のモルフォリノ環に結合したモルフォリノ核酸、又はデオキシリン酸骨格が偽ペプチド骨格に置き換わり、4種の塩基が保持される、ペプチド核酸を生産することができる。例えば、Summerton及びWellerの文献（1997）Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:187-195；及びHyrupらの文献（1996）Bioorgan. Med. Chain. 4:5-23を参照されたい。さらに、デオキシリン酸骨格は、例えば、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエート骨格、ホスホロアミダイト、又はアルキルホスホトリエステル骨格で置換することができる。

【0116】

（4.4. Tリンパ球）

本明細書で提供される、組成物及び方法において使用されるTリンパ球は、ナイーブTリンパ球又はMHC拘束を受けたTリンパ球でよい。特定の実施態様において、Tリンパ球は腫瘍浸潤リンパ球（TIL）である。特定の実施態様において、Tリンパ球は腫瘍生検から単離し、又は腫瘍生検から単離したTリンパ球から拡張させたものである。特定の他の実施態様において、T細胞は末梢血液、臍帯血、又はリンパから拡張させた、Tリンパ球から単離し、又は拡張させたものである。

【0117】

本法で使用される免疫細胞、例えば、改変型Tリンパ球は、改変型Tリンパ球を投与されることになる個体にとって、自己由来であることが好ましい。特定の他の実施態様において、改変型Tリンパ球は、改変型Tリンパ球が投与されることになる個体にとって、同種異系である。同種異系のTリンパ球を、改変型Tリンパ球の調製に使用する場合、個体における移植片対宿主病（GVHD）の可能性を減らすような、Tリンパ球を選択することが好ましい。例えば、特定の実施態様において、ウイルス特異的Tリンパ球を、改変型Tリンパ球の調製のために選択する；そのようなリンパ球は、受容者の任意の抗原に結合し、それにより活性化されるための固有の能力がきわめて低いと期待される。特定の実施態様において、受容者体内での同種異系Tリンパ球の拒絶反応は、宿主に1以上の免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、シクロホスファミドなどを共投与することにより軽減できる。

【0118】

一実施態様において、Tリンパ球を、個体から取得し、続いて任意に拡張させ、及び続いて第一のポリペプチドをコードする、第一のポリヌクレオチド、及び第二のポリペプチドをコードする、第二のポリヌクレオチドで形質転換させ、及び続いて任意に拡張させる。二重形質転換体は、例えば、各ベクターに特有の選択マーカーを使用して、選択することができる。他の実施態様において、Tリンパ球を個体から取得し、続いて任意に拡張させ、及び続いて第一のポリペプチド及び第二のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオ

チドで形質転換させ、及び続いて任意に拡張させる。ポリヌクレオチドを有する細胞を、選択マーカーを用いて選択する。

【0119】

ある実施態様においては、人工の共刺激性ポリペプチド（1つの共刺激性ポリペプチドが使用される実施態様におけるもの）に加えて、又は第一のポリペプチド及び第二のポリペプチド（改変型Tリンパ球が、抗原結合シグナル、及び共刺激性シグナルを分離するポリペプチドを含む、実施態様におけるもの）に加えて、該改変型Tリンパ球は、生得のTCR複合体を形成することのできる生得のTCRタンパク質、例えば、TCR- α 及びTCR- β を含む。特定の他の実施態様において、改変型Tリンパ球のTCR- α 及びTCR- β をコードする生得の遺伝子のいずれか又は両方が改変され、非機能性になっている。例えば、一部または全体が削られる、変異が挿入されるなどである。

10

【0120】

特定の実施態様において、Tリンパ球は腫瘍巣から単離されるもの、例えば、腫瘍浸潤リンパ球である；そのようなTリンパ球はTSA又はTAAに特異的であると期待される。

【0121】

特定の実施態様において、第一のポリペプチド及び第二のポリペプチドのシグナルモチーフを使用して、改変型Tリンパ球の増殖と拡張を促進することができる。例えば、未改変Tリンパ球、及びCD3 シグナルドメイン及びCD28共刺激性ドメインを含むポリペプチドを含むTリンパ球は、CD3及びCD28に対する抗体、例えばビーズに接着した抗体を使用して拡張できる。例えば、米国特許第5,948,893号；第6,534,055号；第6,352,694号；第6,692,964号；第6,887,466号；及び第6,905,681号を参照されたい。同様に、第一のポリペプチド上のシグナルモチーフに対する抗体、及び第二のポリペプチドのシグナルモチーフに対する抗体を使用して、第一及び第二のポリペプチドの両方を含むTリンパ球の増殖を刺激することができる。

20

【0122】

特定の実施態様において、第一及び第二のポリペプチドが、Tリンパ球において、1つのベクター又は2つの別個のベクターのどちらから発現されたとしても、それぞれ第一のポリペプチド、及び第二のポリペプチドが結合する、第一及び第二の抗原を使用することにより、第一のポリペプチド、及び第二のポリペプチドの両方を発現する、Tリンパ球の選択的拡張を促進することができる。例えば、一実施態様においては、第一のポリペプチドが結合する第一の抗原が、TSAであり、第二のポリペプチドが結合する第二の抗原が、血管形成因子であり、第一のポリペプチド及び第二のポリペプチドを含むTリンパ球を、TSA及び血管形成因子の存在下で培養すると、第一又は第二の抗原の一方を単独で存在させて培養した場合や、又はどちらも存在しない条件で培養した場合と比較し、増殖が増加する。

30

【0123】

特定の他の実施態様において、第一及び第二のポリペプチドを含むTリンパ球は、第一のポリペプチドのシグナルドメインと結合する抗体と、第二のポリペプチドと結合できる抗原を結び付けて使用して、刺激されると増殖する。例えば、第一のポリペプチドのシグナルドメインが、CD3 であり、第二のポリペプチドに結合する抗原が、VEGFである実施態様において、第一及び第二のポリペプチドを含むTリンパ球は、該細胞をVEGF、及びCD3に結合する抗体を組み合わせ存在させた条件で培養することにより、刺激されて、増殖する。他の実施態様において、第一及び第二のポリペプチドを含むTリンパ球は、第一のポリペプチド、及び第二のペプチドの共刺激性ドメインと結合することのできる抗原を使用して、刺激され、増殖する。例えば、第一のポリペプチドに結合する抗原が、HER2であり、第二のポリペプチドの共刺激性モチーフを、CD28から得る実施態様において、第一及び第二のポリペプチドを含むTリンパ球は、HER2タンパク質及びCD28に結合する抗体の存在下で培養することにより刺激され、増殖する。

40

【0124】

先の実施態様にいずれかにおいて、抗原及び/又は抗体は、Tリンパ球を培養する培地中

50

で遊離して存在するか、又はそのいずれか若しくは両方を、固体支持体、例えば、組織培養プラスチック表面、ビーズなどに付着することができる。

【0125】

改変型Tリンパ球は、必要に応じて実質的に全ての改変型Tリンパ球を殺すことを可能とする、「自殺遺伝子」又は「安全スイッチ」を任意に含むことができる。例えば、改変型Tリンパ球は、特定の実施態様において、HSVチミジンキナーゼ（HSV-TK）遺伝子を含むことができ、この遺伝子はガンシクロビルとの接触により改変型Tリンパ球の死をもたらす。他の実施態様において、改変型Tリンパ球は誘導性カスパーゼ、例えば誘導性カスパーゼ9（icaspase9）、例えば、カスパーゼ9と、特定の小分子医薬を用いて二量体化させることができる、ヒトFK506結合タンパク質との融合タンパク質を含む。Straathofらの文献、Blood 105(11):4247-4254 (2005)を参照されたい。

10

【0126】

（4.5. 改変型Tリンパ球の使用方法）

改変型免疫細胞、例えば本明細書で提供される改変型Tリンパ球を使用して、Tリンパ球の標的とする、例えば、殺すことが望まれる、1種以上の細胞を有する個体を処置することができる。特定の実施態様において、殺すべき細胞は癌細胞、例えば、腫瘍細胞である。好ましい実施態様において、癌細胞は、固形腫瘍の細胞である。具体的な実施態様において、細胞は、リンパ腫、肺癌、乳癌、前立腺癌、副腎皮質癌、甲状腺癌、上咽頭癌、メラノーマ、例えば悪性メラノーマ、皮膚癌、結腸癌、類腱腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、内分泌腫瘍、ユーイング肉腫、末梢性原始神経外胚葉腫瘍、固形胚細胞腫瘍、肝芽細胞腫、神経芽細胞腫、非横紋筋肉腫軟部組織肉腫、骨肉腫、網膜芽腫、横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、神経膠芽細胞腫、粘液腫、線維腫、脂肪腫などの細胞である。より具体的な実施態様において、該リンパ腫は、慢性リンパ性白血病（小型リンパ性リンパ腫）、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、脾臓周辺帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、形質細胞腫、節外周辺帯B細胞リンパ腫、MALTリンパ腫、節周辺帯B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦隔（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、パーキットリンパ腫、Tリンパ球前リンパ球性白血病、Tリンパ球大型顆粒リンパ球性白血病、侵襲性NK細胞白血病、成人Tリンパ球白血病/リンパ腫、節外性NK/Tリンパ球リンパ腫、鼻型、腸疾患型Tリンパ球リンパ腫、肝脾Tリンパ球リンパ腫、芽球性NK細胞リンパ腫、菌状息肉腫、セザリー症候群、原発性皮膚未分化大細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症、血管免疫芽球性Tリンパ球リンパ腫、末梢性Tリンパ球リンパ腫（不特定）、未分化大細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、又は非ホジキンリンパ腫であり得る。

20

30

【0127】

Tリンパ球により治療できる、疾病又は疾患を有する個体、例えば癌を有する個体に投与した後の、改変型Tリンパ球の効果は、特定の疾病又は疾患に特異的で、当業者に公知であり、疾病又は疾患の進行の指標となる1以上の基準により評価することができる。一般に、そのような個体への改変型Tリンパ球の投与は、1以上の該基準が、検出可能な程度に、例えば、有意に、病的な状態の値または範囲から、正常な状態の値又は範囲へと、又はそれに向かって変動する場合に、有効である。

40

【0128】

改変型Tリンパ球は、任意の医薬として許容し得る溶液中で製剤化することができ、生細胞の送達に適した溶液、例えば、生理食塩水溶液（リンゲル溶液など）、ゼラチン、糖質（例えば、ラクトース、アミロース、デンプンなど）、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが好ましい。そのような調製物は、改変型Tリンパ球を加える前に滅菌することが好ましく、かつ滑剤、保存料、安定剤、乳化剤、浸透圧に影響する塩、緩衝剤、及び着色料のような補助剤と混合することができる。改変型Tリンパ球の製剤に使用するのに適した医薬担体は、当該技術分野で公知であり、例えば、WO 96/05309に記載されている。

50

【0129】

特定の実施態様において、改変型Tリンパ球は、個別の投与量で製剤化され、該個別の投与量は、少なくとも、最大でも、又は約 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、又は 1×10^{11} 個の改変型Tリンパ球を含む。特定の実施態様において、改変型Tリンパ球は、静脈内、動脈内、非経口、筋肉内、皮下、髄膜内、若しくは眼球内投与、又は特定の器官若しくは組織内への投与のために製剤化される。

【実施例】

【0130】

(5. 実施例)

10

(5.1. 実施例1：前立腺癌の治療)

個体はステージT2の前立腺癌を呈し、領域または他のリンパ節に拡がっていない(N0、M0)。組織学等級はG2であると決定される。総合的に、個体はステージIIの前立腺癌を有すると決定される。個体に、200 mlの生理食塩水溶液中の、1つのキメラ受容体を含む $10^9 \sim 10^{10}$ 個の改変型Tリンパ球を、30分にわたる静脈内注入により投与する。キメラ受容体は、PSCAに結合する細胞外抗原結合領域、膜貫通ドメイン、及びCD27、CD28、4-1BB、及びOX40のそれぞれに由来する細胞内共刺激性ドメインを含む。個体は投与から30、60、及び90日後に、前立腺癌ステージ及びリンパ節への拡散について再び評価され、前立腺組織生検の組織学分析が行われる。

【0131】

20

(5.2. 実施例2：前立腺癌の治療)

個体はステージT2の前立腺癌を呈し、領域または他のリンパ節に拡がっていない(N0、M0)。組織学等級はG2であると決定される。総合的に、個体はステージIIの前立腺癌を有すると決定される。個体に、200 mlの生理食塩水溶液中の、第一及び第二のキメラ受容体を含む $10^9 \sim 10^{10}$ 個の改変型Tリンパ球を、30分にわたる静脈内注入により投与する。第一のキメラ受容体は、PSCAに結合する細胞外抗原結合領域、膜貫通ドメイン、及びCD3に由来するシグナル伝達ドメインを含む。第二のキメラ受容体は、ERK5タンパク質に結合する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及びCD27、CD28、4-1BB、及びOX40のそれぞれに由来する細胞内共刺激性ドメインを含む。個体は投与から30、60、及び90日後に、前立腺癌ステージ及びリンパ節への拡散について再び評価され、前立腺組織生検の組織学分析が行われる。

30

【0132】

(5.3. 実施例3：乳癌の治療)

個体は少なくとも1つの領域リンパ節に拡がったステージ3の乳癌を呈する。癌組織を除去する外科手術の後、個体に、200 mlの生理食塩水溶液中の、第一及び第二のキメラ受容体を含む $10^9 \sim 10^{10}$ 個の改変型Tリンパ球を、30分にわたる静脈内注入により投与する。第一のキメラ受容体は、HER2に結合する細胞外抗原結合領域、膜貫通ドメイン、及びCD3に由来するシグナル伝達ドメインを含む。第二のキメラ受容体は、エストロゲン受容体(ER)に結合する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及びCD27、CD28、4-1BB、及びOX40のそれぞれに由来する細胞内共刺激性ドメインを含む。個体は投与から30、60、90、及び180日後に、残る乳房組織の乳癌、及び他のリンパ節への拡散について評価される。

40

【0133】

(5.4. 実施例4：二重の抗原特異性を有する改変型Tリンパ球)

本実施例では、2つのキメラ抗原受容体(CAR)を含む改変型Tリンパ球の作製について記載する。ここで、第一のCARは、腫瘍特異的抗原に特異的な抗原結合ドメインを含み、かつ、第二のCARは、腫瘍特異的抗原ではないが、腫瘍形成に関連する抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む。

【0134】

(CARのコンストラクト)

図1に示したCARを、標準の方法論により調製した。CD28ヒンジに連結した抗HER2抗体の

50

scFv、CD28膜貫通(TM)ドメイン、CD3ジータ鎖、及びtdTomatoレポーター遺伝子からなる抗HER2に基づくCAR、「HER2-CAR」を構築し、レンチウイルスベクターにクローニングした。このCARは、腫瘍特異的抗原に特異的な抗原結合ドメイン、及び刺激性ドメインを含むCARを表す。

【0135】

VEGF特異的な抗原結合ドメイン、腫瘍特異的抗原ではない抗原、並びに共刺激性ドメインを含む2つのCAR、「VEGFR2-CD28」及び「VEGFR2-28TM-CD28」を作製した。どちらのCARもVEGF抗原の受容体、すなわち、VEGFR2の一部からなる抗原結合部位を含む。VEGFR2-CD28はヒトVEGFR2細胞外(EC)ドメイン、続いてVEGFR2 TMドメイン、CD28 ICドメイン、T2A配列(ゾーシー・アシグナ(thosea assigna)ウイルス2Aペプチド)及び(レポーター遺伝子としての使用のための)GFPを含む。VEGFR2-28TM-CD28は、ヒトVEGFR2細胞外(EC)ドメインに続き、CD28 TMドメイン、CD28細胞内(IC)ドメイン、T2A配列、及びGFPを含む。

10

【0136】

また、VEGFを認識する対照コンストラクトも作製した。「VEGFR2」と名付けられた対照コンストラクトは、ヒトVEGFR2細胞外(EC)ドメイン、続いてVEGFR2 TMドメイン、T2A配列、及びGFPを含む。従って、対照コンストラクトは、VEGFR2-CD28及びVEGFR2-28TM-CD28と名付けられたコンストラクトに存在するCD28 ICドメインを有さない。

【0137】

(T細胞におけるCARコンストラクトの発現)

20

先に記載のCARコンストラクトの、T細胞での発現を調べた。T細胞を単離するため、健康なドナーの全血由来パフィーコートから、Ficoll-Paque Plus(商標)(GE Healthcare、Piscataway、NJ)密度勾配遠心法で、末梢血単核球(PBMC)を分離した。Pan T Isolation Kit II(Miltenyi Biotec、Cambridge、MA)を使用し、メーカーの説明書に従って、PBMCから汎T細胞を、負の選択にかけた。

【0138】

HER2-CAR、VEGFR2-CD28、VEGFR2-28TM-CD28、又はVEGFR2 CARのコンストラクトを含むプラスミドを、初代T細胞にエレクトロポレーションにより導入し、エレクトロポレーションしたT細胞をRPMI-10培地中で一晚培養した。エレクトロポレーションから24時間後にT細胞を回収し、HER2-ヒトIgG-Fcキメラタンパク質で染色し、続いて(抗HER2の検出のための)APC結合ヤギ抗ヒトIgG-Fcポリクローナル抗体；又は(VEGFR2の検出のための)マウス抗ヒトVEGFR2モノクローナル抗体(mAb)で染色した。染色した細胞をフローサイトメトリーで分析した。全ての例で、CARの抗原結合ドメイン及びそれぞれのCARのレポーター遺伝子(tdTomato又はGFP)の発現が検出され、トランスジーンがT細胞に安定に伝達されていることが確認された。IL-7により活性化されたT細胞に、それぞれのCARコンストラクトを伝達することで、HER2-CARコンストラクトが、遺伝子導入したT細胞における抗HER2の発現をもたらすことができ、VEGFR2-CD28、VEGFR2-28TM-CD28、及びVEGFR2 CARコンストラクトが、遺伝子導入したT細胞において、VEGFR2の正の発現をもたらすことができることを、さらに確認した。

30

【0139】

(活性化されたT細胞によるVEGF産生及びVEGFR2発現)

40

内因のVEGFR2の発現が、VEGFに結合させることを意図した、VEGFR2細胞外ドメインを含むコンストラクトにおける、VEGFR2細胞外ドメインの発現と競合しないことを確実にするため、予備実験を行い、活性化されたT細胞によるVEGFの産生及びVEGFR2の発現の水準を評価した。

【0140】

ヒト初代T細胞を、先に記載の通りに単離し、ピーズ：細胞を3:1の比率とした抗CD3/CD28 DynaBeads(登録商標)で刺激した。細胞を、50 IU/mlのIL-2存在下、RPMI-10培地中で培養した。刺激されたT細胞によるVEGFR2の発現を、刺激から25日間にわたって(最初の4日は毎日、続いて第一週経過後は2日ごとに)フローサイトメトリーで評価した。活性

50

化されたT細胞によるVEGFR2の発現は、刺激から2日後までは観察されず、続いて3日目までに発現が著しく減少し、4日目までには発現が消失した。4日目以降、VEGFR2の発現は観察されなかった。

【 0 1 4 1 】

先に記載のDynaBeadによる活性化後のT細胞上清中のVEGF-AをCytometric Bead Array (CBA) によって測定した。最低のVEGF分泌 (< 10 pg/ml) が検出された。

【 0 1 4 2 】

データは、活性化されたヒトT細胞における内因のVEGF及びVEGFR2の発現が最低になったことを示唆している。

【 0 1 4 3 】

(共刺激アッセイ)

VEGFR2 ECドメインを含むコンストラクトが、共刺激をもたらすことができるかどうか評価するため、ヒト初代汎T細胞に、VEGFR2-CD28、VEGFR2-28TM-CD28、又はVEGFR2レンチウイルスベクターのいずれかを遺伝子導入し、続いて固定化抗ヒトCD3及び抗ヒトVEGFR2 mAb又は可溶VEGFで刺激した。抗ヒトCD3は、二重シグナル系において第一の「シグナル」を引き起こす(すなわち、腫瘍抗原に特異的な抗原結合ドメイン、及び活性化ドメイン(例えば、CD3ジータ鎖)を含むCARが腫瘍抗原に結合すること)リガンドとして選択した。T細胞を抗VEGFR2 mAb又は可溶性VEGFのいずれかと共に培養すると、VEGFR2-CD28レンチベクター又はVEGFR2-28TM-CD28レンチベクターのいずれかで遺伝子導入されたT細胞は、刺激されるが、VEGFR2レンチベクターで遺伝子導入されたT細胞は、刺激されない。これは、活性化マーカーCD69及び4-1BBの上方調節によって裏付けられる。

【 0 1 4 4 】

さらに、VEGFR2-CD28レンチベクター及びVEGFR2-28TM-CD28レンチベクターを遺伝子導入されたT細胞では、抗VEGFR2 mAb処理又はVEGF処理に際し、IL-2、グランザイムB、及びIFN- γ を分泌する水準が上昇するが、VEGFR2レンチベクターを遺伝子導入されたT細胞では、上昇しないことが確かめられた。合わせて考えると、この結果は、遺伝子導入されたT細胞におけるVEGFR2 ECドメインの発現は、VEGFR2 ECが、CD28 ICドメインを含むCARの一部として発現する場合に、細胞内CD28シグナルをもたらすことができることを示唆している。

【 0 1 4 5 】

(HER2-CAR の機能の評価)

HER2-CAR の機能の実証は、遺伝子導入されたT細胞において、固定化HER2-Fcキメラタンパク質でT細胞を刺激することにより確認された。CD28の共刺激の陽性対照として、もう1つのコンストラクト、「HER2-CAR28」を作製した。このコンストラクトは、CD28膜貫通(TM)ドメイン及びCD3ジータ鎖の間に、CD28細胞内ドメインが含まれている点を除いて、HER2-CAR と名付けられたCARコンストラクトと、同一である。

【 0 1 4 6 】

HER2-Fcキメラタンパク質により、T細胞が刺激されることを確かめるため、刺激48時間後に、T細胞の活性化マーカーである、CD69及びCD71の発現を調べた。HER2-CAR、及びHER2-CAR28を遺伝子導入された細胞の双方において、tdTomato陽性細胞のみが、CD69及びCD71の上方調節を示した。HER2-CAR28を遺伝子導入されたT細胞においては、HER2-CARを遺伝子導入されたT細胞におけるよりも、CD69及びCD71の頻度及び平均蛍光強度が高くなる(HER2-CAR細胞の25%が、CD69を発現していたのと比較し、42%のHER2-CAR28細胞が、CD69を発現していた(偽遺伝子導入を受けた細胞では、0.04%が発現していた); HER2-CAR細胞の10%が、CD71を発現していたのと比較し、27%のHER2-CAR28細胞が、CD71を発現していた(偽遺伝子導入を受けた細胞では、0.04%が発現していた))ことが観察され、HER2-CAR28コンストラクトの細胞内CD28シグナルドメインが活性を有することを示唆していた。

【 0 1 4 7 】

また、抗VEGFR2 mAb又はVEGFと、HER2-CAR 又はHER2-CAR28 で遺伝子導入されたT細胞

10

20

30

40

50

胞とを一緒に培養することによる影響も確認した。T細胞をHER2-Fc、及びVEGFR2 mAb又はVEGFで48時間にわたって処理し、続いてフローサイトメトリー分析を行い、CD69及びCD71の表面発現を評価した。先に記載の場合の増強と比較し、CD69及びCD71の両方の発現の増強は、ごく最低限しか観察されなかった。

【0148】

(二重シグナル系の評価)

VEGFR2を介した共刺激を確認した後、HER2-CAR 及びVEGFR2-CD28ICの二重シグナルを評価した。二重シグナルを評価するため、先に記載の通りにT細胞を単離し、これらに(i) 抗HER2ドメインを含むCAR (すなわち、HER2-CAR) ; (ii) VEGFR2受容体細胞外ドメインを含むCAR (すなわち、VEGFR2-CD28、VEGFR2-28TM-CD28、又はVEGFR2と名付けられたCAR) の両方を遺伝子導入した。遺伝子導入されたT細胞による、それぞれのCARの発現を、先の記載の通り、フローサイトメトリーを使用して、レポーター遺伝子 (すなわち、tdTomato又はGFP) の発現を測定することにより、確認した。

【0149】

HER2-CAR と、及び3つのVEGFR2 CARコンストラクトの内の1つ (すなわち、VEGFR2-CD28、VEGFR2-28TM-CD28、又はVEGFR2と名付けられたCARコンストラクト) との両方を遺伝子導入したT細胞を、HER2-Fcと、抗VEGFR2 mAb又はVEGFのいずれかとで刺激した後、これらT細胞による、T細胞活性化マーカーCD69及びCD71の発現を調べた。

【0150】

その結果、GFPを発現するT細胞 (すなわち、VEGFR2 ECドメインを含むCARコンストラクトを発現するT細胞) において、CD69及びCD71の発現が、用量反応的に増強されることを観察した。また、VEGFによる刺激により、GFPを発現するT細胞 (すなわち、VEGFR2 ECドメインを含む、CARコンストラクトを発現するT細胞) における、CD69及びCD71の発現が増幅することも示された。試験した最大用量 (1 ug/ml HER2-Fc/1 ug/ml 抗VEGFR2、又は1 ug/ml HER2-Fc/100 ng/ml 抗VEGF) では、対照コンストラクト (すなわち、VEGFRと名付けられたCARコンストラクト) を含むT細胞と比較して、VEGFR2-28TM-CD28コンストラクトを含むT細胞において、CD69及びCD71の発現が大きく上昇することが観察された。従って、VEGFR2の共刺激が確かめられた。対照コンストラクト (すなわち、VEGFRと名付けられたCARコンストラクト) を含むT細胞と比較して、VEGFR2-CD28コンストラクトを含むT細胞による、CD69及びCD71の発現を比較すると、同様の傾向が観察された。

【0151】

この例は、2つのCARを含み、シグナルドメインが第一のCARに存在し、共刺激性ドメインが第二のCARに存在する、機能的CAR T細胞が作製できることを示している。そのようなCAR T細胞は疾病、例えば癌の治療に有用である。このような疾病の治療においては、2つのCARによる、2つの別個の抗原の認識に依存する、二重シグナルのアプローチを利用することが望ましい。

【0152】

(5.5. 実施例5: 二重の抗原特異性を有する改変型Tリンパ球)

本実施例では、本願に記載される、二重シグナルのアプローチに使用することのできるCARを含む、改変型Tリンパ球の作製について、記載する。改変型Tリンパ球は、腫瘍特異的抗原に、特異的な抗原結合ドメインを含む、第一のキメラ抗原受容体、及び腫瘍特異的抗原ではないが、腫瘍形成に関連する抗原に特異的な、抗原結合ドメインを含む、第二のキメラ抗原受容体を含む。本実施例では、2つのCARは、CARがP2Aにより分離されている、1つのCARコンストラクトを使用して、改変型T細胞に導入される。このCARコンストラクトにより、2つの異なるCARを1つのORFから、実質的に等量発現させることが可能となる。

【0153】

図4にCARを含むコンストラクトを示す。第一のコンストラクト、「CAR1」は、抗HER2 scFvに続いて、CD28ヒンジ、CD28膜貫通(TM)ドメイン、CD3ジータ鎖、T2A配列、及びtdTomatoレポーター遺伝子を含む。「CAR2」は、抗HER2 scFvに続いて、CD28ヒンジ、CD28膜貫通(TM)ドメイン、CD28 ICドメイン、CD3ジータ鎖、T2A配列、及びtdTomatoレポーター

ー遺伝子を含む。「CAR3」は、ヒトVEGFR2細胞外（EC）ドメインに続いて、VEGFR2 TMドメイン、P2A配列、抗HER2 scFv、CD28ヒンジ、CD28膜貫通（TM）ドメイン、及びCD3ジータ鎖を含む。「CAR4」は、ヒトVEGFR2細胞外（EC）ドメインに続いて、CD28膜貫通（TM）ドメイン、CD28 ICドメイン、抗HER2 scFv、CD28ヒンジ、CD28膜貫通（TM）ドメイン、及びCD3ジータ鎖を含む。

【0154】

CAR1は、主たるシグナルドメイン（CD3ジータ鎖）を含むが、共刺激性ドメインを含まない、第一世代の抗HER2 CARを代表する。CAR 2は、主たるシグナルドメイン（CD3ジータ鎖）及び共刺激性ドメイン（CD28 ICドメイン）の両方を含む第二世代の抗HER2 CARを代表する。CAR3は、二重CARの対照コンストラクトであり、HER2の主たるシグナル部位（HER2 scFV及びCD3ジータ鎖）を含み、また、VEGFR2の第二のシグナルドメインも含むが、第二のシグナルドメインは、共刺激性ドメインを含まない。CAR4は二重CARのコンストラクトであり、HER2の主たるシグナル部位（HER2 scFV及びCD3ジータ鎖）を含み、また、共刺激性ドメイン（CD28 IC）を伴う、VEGFR2の第二のシグナルドメインも含む。

【0155】

汎T細胞を、先に記載の通りに単離し、これらに先に記載のCARコンストラクト（CAR1～CAR4）を遺伝子導入し、伝達から24時間後に分析した。抗HER2の発現は、いずれのCARコンストラクトを遺伝子導入したT細胞においても検出された。抗HER2及びVEGFR2の両方の発現が、CAR3又はCAR4を遺伝子導入したT細胞において検出された。従って、先に記載のCARコンストラクトが、T細胞において適正に発現することが確かめられた。

【0156】

CARコンストラクトの発現を確かめたら、コンストラクトを発現するT細胞を、HER2-Fc（0.25 ug/ml又は1.0 ug/ml）と共に培養し、HER2-scFvを含むコンストラクトの刺激を誘導した（主たるシグナル）。単独での刺激か、又は抗VEGFR2抗体（0.25 ug/ml又は1.0 ug/ml）若しくはVEGF（1、10、又は100 ng/ml）のいずれかと組み合わせて、VEGFR2を含むコンストラクトの刺激を誘導した（共刺激）。CAR1又はCAR2のいずれかを遺伝子導入したT細胞において、VEGFR2を活性化させても、抗HER2による単独の活性化について観察されるような、刺激に対するT細胞活性化マーカーであるCD69又はCD71の、表面マーカーの発現は変化しないことが見出された（フローサイトメトリーで評価した）。

【0157】

対照的に、CAR4を遺伝子導入したT細胞において、HER2-Fc及び抗VEGFR2の両方で刺激をすると、HER2-Fc単独で刺激された、CAR4発現CAR T細胞におけるCD69の発現と比較して、CD69の発現が高まった。HER2-Fc刺激に対する、このVEGFR2を介したCD69の発現の上方調節の増強は、コンストラクト（すなわち、CAR3）のVEGFR2 CAR中に、共刺激性ドメインが存在していない対照二重刺激CARコンストラクト（CAR3）を、遺伝子導入されたT細胞においては観察されない。特に、0.25 ug/ml HER2-Fc単独で刺激した際の、CD69⁺ CAR4発現CAR T細胞が、33.4%であったのと比較し、それぞれ0.25 ug/ml HER2-Fc/0.25 ug/ml抗VEGFR2及び0.25 ug/ml HER2-Fc/1.0 ug/ml抗VEGFR2の用量で刺激をした際に、CAR4を発現するCAR T細胞の73.6%及び72.9%が、CD69を発現した；一方、0.25 ug/ml HER2-Fc単独で刺激した際の、CD69⁺ CAR3発現CAR T細胞が、4.9%であったのと比較し、それぞれ同じ用量の、HER2-Fc及び抗VEGFR2で刺激をした際に、CAR3を発現するCAR T細胞のわずか6.13%及び3.69%しか、CD69を発現しなかった。同様の結果は、CD71の発現を分析した際も観察された。1.0 ug/ml HER2-Fc単独で刺激した際のCD71⁺ CAR4発現CAR T細胞が22.8%であったのと比較し、それぞれ1.0 ug/ml HER2-Fc/0.25 ug/ml抗VEGFR2及び1.0 ug/ml HER2-Fc/1.0 ug/ml抗VEGFR2の用量で刺激をした際に、CAR4を発現するCAR T細胞の45.2%及び50.7%が、CD71を発現した；一方、1.0 ug/ml HER2-Fc単独で刺激した際の、CD71⁺ CAR3発現CAR T細胞が10.3%であったのと比較し、それぞれ同じ用量のHER2-Fc及び抗VEGFR2で刺激をした際に、CAR3を発現するCAR T細胞のわずか7.80%及び7.89%しか、CD71を発現しなかった。

【0158】

同様に、CAR4を形質導入したT細胞において、HER2-Fc及びVEGFの両方で刺激をすると、

コンストラクト（すなわち、CAR3）のVEGFR2 CAR中に、共刺激性ドメインが存在していない、対照二重刺激CARコンストラクト（CAR3）を形質導入したT細胞における、CD69の発現水準と比較して、CD69の発現が高まった。特に、0.25 μ g/ml HER2-Fc単独で刺激した際の、CD69⁺ CAR4発現CAR T細胞が、33.4%であったのと比較し、それぞれ0.25 μ g/ml HER2-Fc/1 ng/ml VEGF、0.25 μ g/ml HER2-Fc/10 ng/ml VEGF、及び0.25 μ g/ml HER2-Fc/100 ng/ml VEGFの用量で刺激をした際に、CAR4を発現するCAR T細胞の35.3%及び48.2%、及び48.5%が、CD69を発現した；一方、0.25 μ g/ml HER2-Fc単独で刺激した際の、CD69⁺ CAR3発現CAR T細胞が、4.9%であったのと比較し、それぞれ同じ用量の、HER2-Fc及びVEGFで刺激をした際に、CAR3を発現するCAR T細胞のわずか3.40%、2.69%、及び2.55%しか、CD69を発現しなかった。CD71の発現については、1.0 μ g/ml HER2-Fc単独で刺激した際の、CD71⁺ CAR4発現CAR T細胞が、22.8%であったのと比較し、それぞれ1.0 μ g/ml HER2-Fc/1 ng/ml VEGF、1.0 μ g/ml HER2-Fc/10 ng/ml VEGF、及び1.0 μ g/ml HER2-Fc/100 ng/ml VEGFの用量で刺激をした際に、CAR4を発現するCAR T細胞の30.10%及び42.30%、及び47.30%が、CD71を発現することが確認された；一方、1.0 μ g/ml HER2-Fc単独で刺激した際の、CD71⁺ CAR3発現CAR T細胞が、10.3%であったのと比較し、それぞれ同じ用量の、HER2-Fc及びVEGFで刺激をした際に、CAR3を発現するCAR T細胞のわずか10.70%、4.81%、及び7.33%しか、CD69を発現しなかった。

10

【0159】

グランザイムBは、細胞傷害性Tリンパ球の、顆粒内に存在する酵素である。CAR1、CAR3、又はCAR4のいずれかを遺伝子導入したT細胞による、グランザイムBの分泌を評価した。いずれかの対照CAR（CAR1又はCAR3）を遺伝子導入したT細胞と比較し、CAR4を遺伝子導入したT細胞では、0.25 μ g/ml HER2-Fc/0.25 μ g/ml抗VEGFR2及び0.25 μ g/ml HER2-Fc/1.0 μ g/ml抗VEGFR2の用量の、HER2-Fc及び抗VEGFR2で刺激をした際に、発現するグランザイムBの水準が上昇した。同様に、いずれかの対照CAR（CAR1又はCAR3）を遺伝子導入したT細胞と比較し、CAR4を遺伝子導入されたT細胞では、0.25 μ g/ml HER2-Fc/1 ng/ml VEGF及び0.25 μ g/ml HER2-Fc/100 ng/ml VEGFの用量の、HER2-Fc及びVEGFで刺激をした際に、発現するグランザイムBの水準が上昇した。

20

【0160】

CAR1、CAR3、又はCAR4を遺伝子導入されたT細胞の、HER2-Fcと、抗VEGFR2抗体又はVEGFのいずれかとを組み合わせた刺激後の生存能力を評価した。汎T細胞を記載の通り単離した。24時間培養した後、HER2-Fc（1.0 μ g/ml）と、抗VEGFR2抗体（0.25 μ g/ml若しくは1.0 μ g/ml）又はVEGF（1 ng/ml若しくは100 ng/ml）のいずれかとにより、48時間にわたってT細胞を刺激した。全体で13日間培養した後、T細胞の生存能力を決定した。それぞれのケースで、二重対照CAR（すなわち、CAR3）又はCAR1と名付けられた対照CARを遺伝子導入したT細胞よりも、二重刺激CAR（すなわち、CAR4）を遺伝子導入したT細胞の方が、高い生存能力を示した。

30

【0161】

この例は、実施例4の結果 第一のCARに、シグナルドメインが存在し、第二のCARに、共刺激性ドメインが存在する、2つのCARを含む、機能的CAR T細胞が作製できることを裏付けるものであり、2つのCARコンストラクトが、1つのコンストラクトとしてCAR T細胞中で発現させられること（例えば、T細胞に両方のCARを含む、1つのCARを遺伝子導入することができること）をさらに示している。

40

【0162】

（等価物）

本開示は、本明細書に記載された特定の実施態様により範囲を限定されるものではない。さらに、記載内容に加え、本明細書で提供される主題事項の様々な改変が、先の記載から、当業者には明らかとなる。そのような改変は、添付する請求項の範囲内に位置するよう意図するものである。

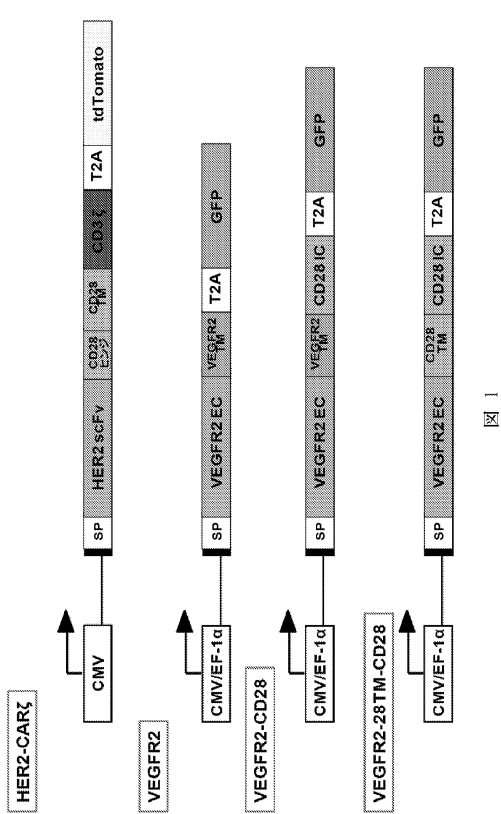
【0163】

様々な刊行物、特許及び特許出願が本明細書に引用されており、それらの開示は、その

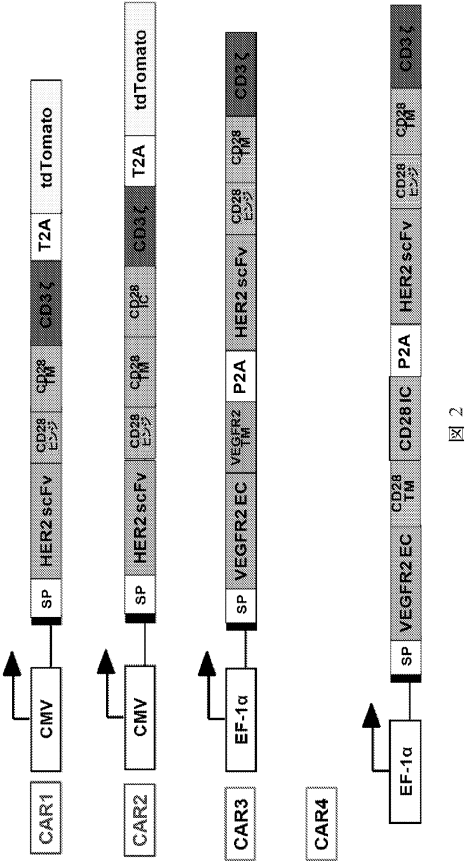
50

全てが、参照により組み込まれている。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(72)発明者 ウエイ リウ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08807 ブリッジウォーター バンデルベール ロード 392

審査官 星 功介

(56)参考文献 特開2004-113062(JP, A)

Duong, CPM, et al., Enhancing the specificity of T-cell cultures for adoptive immunotherapy of cancer, Immunotherapy, 2011年, 3(1), 33-48

RIET, ERHOHUNG DER ANTIGEN-SELEKTIVITAT VON T-ZELLEN DURCH KOEXPRESSION CHIMARER 以下備考, [ONLINE], DISS UNIVERSITAT ZU KOLN, 2010年, ANTIGEN-REZEPTOREN UNTERSCHIEDLICHER SPEZIFITAT, URL, <http://kups.ub.uni-koeln.de/3261>

Kloss, CC, et al., Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells, Nat biotechnol, 2013年 1月31日, 31(1), 71-75

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/28, 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)