

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-508371
(P2025-508371A)

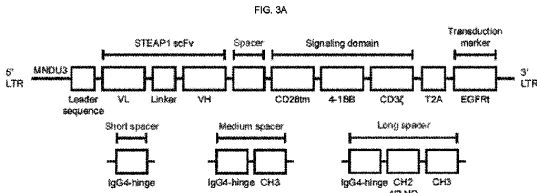
(43)公表日 令和7年3月26日(2025.3.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 7
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全95頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-547419(P2024-547419)		(71)出願人	522176001	
(86)(22)出願日	令和5年2月10日(2023.2.10)			フレッド ハッチンソン キャンサー センター	
(85)翻訳文提出日	令和6年9月30日(2024.9.30)			アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/062428			9 シアトル フェアビュー アベニュー	
(87)国際公開番号	WO2023/154890			ノース 1 1 0 0	
(87)国際公開日	令和5年8月17日(2023.8.17)		(74)代理人	100188499	
(31)優先権主張番号	63/309,389			弁理士 勝又 政徳	
(32)優先日	令和4年2月11日(2022.2.11)		(74)代理人	100127568	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士 酒井 善典	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		(74)代理人	100171402	
		最終頁に続く		弁理士 上田 ▲茂▼	
			(74)代理人	100213779	
				弁理士 小川 有佳子	
			(74)代理人	100077012	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 S T E A P 1 に結合するキメラ抗原受容体

(57)【要約】

STEAP1に結合する結合ドメインを有するキメラ抗原受容体 (CAR) を開示する。本明細書に開示されるCARは、前立腺がん、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍 (EFT)、膀胱がん、卵巣がんおよび横紋筋肉腫の治療に使用することができる。本明細書に開示されるCARは、STEAP1抗原の密度が低い状態であっても、STEAP1に結合して細胞傷害作用を誘導することができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

キメラ抗原受容体（CAR）であって、細胞により発現された場合に、

（i） a． North、IMGT、KabatまたはChothiaのナンバリングに基づく、DSTP3086S抗体由来の一組の相補性決定領域（CDR）を有するSTEAP1結合ドメインと、

 b． CH2ドメインに4/2-NQ変異を有するIgG4ヒンジ-CH2-CH3スペーサーとを含む細胞外部分；

（ii） CD3ζシグナル伝達ドメインと4-1BBシグナル伝達ドメインを含む細胞内部分；および

（iii） 前記細胞外部分を前記細胞内部分に連結するCD28膜貫通ドメインを含む、CAR。

10

【請求項 2】

治療を必要とする対象の治療のための、請求項1に記載のCARの使用であって、前記対象が、STEAP1抗原密度が低い状態を有する、使用。

【請求項 3】

キメラ抗原受容体（CAR）であって、細胞により発現された場合に、

STEAP1結合ドメインを含む細胞外部分；

エフェクタードメインを含む細胞内部分；および

前記細胞外部分を前記細胞内部分に連結する膜貫通ドメインを含む、CAR。

20

【請求項 4】

前記STEAP1結合ドメインが、North、IMGT、KabatまたはChothiaのナンバリングに基づく、DSTP3086S抗体由来の一組の相補性決定領域（CDR）を有する、請求項3に記載のCAR。

【請求項 5】

前記STEAP1結合ドメインが、一本鎖可変領域断片（scFv）を含む、請求項3に記載のCAR。

【請求項 6】

前記scFvが、配列番号5に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域と、配列番号4に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域とを有する、請求項5に記載のCAR。

30

【請求項 7】

前記scFvが、配列番号5に示される配列を有する重鎖可変領域と、配列番号4に示される配列を有する軽鎖可変領域とを有する、請求項5に記載のCAR。

【請求項 8】

前記scFvが、配列番号3に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項5に記載のCAR。

【請求項 9】

前記scFvが、配列番号3に示される配列を有する、請求項5に記載のCAR。

【請求項 10】

前記scFvが、配列番号9に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる重鎖可変領域と、配列番号7に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる軽鎖可変領域とを有する、請求項5に記載のCAR。

40

【請求項 11】

前記scFvが、配列番号9に示される配列によってコードされる重鎖可変領域と、配列番号7に示される配列によってコードされる軽鎖可変領域とを有する、請求項5に記載のCAR。

【請求項 12】

前記scFvが、配列番号6に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列

50

によってコードされる、請求項 5 に記載の CAR。

【請求項 13】

前記 scFv が、配列番号 6 に示される配列によってコードされる、請求項 5 に記載の CAR。

【請求項 14】

前記細胞外部分が、スペーサーをさらに含む、請求項 3 に記載の CAR。

【請求項 15】

前記スペーサーが 230 アミノ酸長以下である、請求項 14 に記載の CAR。

【請求項 16】

前記スペーサーが、IgG4 のヒンジ領域、CH2 ドメインおよび CH3 ドメインからなる、請求項 14 に記載の CAR。 10

【請求項 17】

前記 IgG4 がヒト IgG4 である、請求項 16 に記載の CAR。

【請求項 18】

前記スペーサーが、配列番号 20 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、請求項 14 に記載の CAR。

【請求項 19】

前記スペーサーが、配列番号 20 に示される配列を有する、請求項 14 に記載の CAR。

【請求項 20】

前記スペーサーが、配列番号 21 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項 14 に記載の CAR。 20

【請求項 21】

前記スペーサーが、配列番号 21 に示される配列によってコードされる、請求項 14 に記載の CAR。

【請求項 22】

前記エフェクタードメインが、CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部を含むか；4-1BB シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、CD28 シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、4-1BB シグナル伝達ドメインを含むか；CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、CD28 シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部を含むか；または CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、4-1BB シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、CD28 シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部を含む、請求項 3 に記載の CAR。 30

【請求項 23】

前記エフェクタードメインが、CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体またはその一部と、4-1BB シグナル伝達ドメインの全体またはその一部を含む、請求項 22 に記載の CAR。

【請求項 24】

前記 CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 24、25 および／または 26 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、請求項 23 に記載の CAR。

【請求項 25】

前記 CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 24、25 または 26 に示される配列を有する、請求項 23 に記載の CAR。 40

【請求項 26】

前記 CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 22 および／または 23 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項 23 に記載の CAR。

【請求項 27】

前記 CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 22 または 23 に示される配列によってコードされる、請求項 23 に記載の CAR。

【請求項 28】

前記4-1BBシグナル伝達ドメインが、配列番号30、31および／または32に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項23に記載のCAR。

【請求項29】

前記4-1BBシグナル伝達ドメインが、配列番号30、31または32に示される配列を有する、請求項23に記載のCAR。

【請求項30】

前記4-1BBシグナル伝達ドメインが、配列番号27、28および／または29に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項23に記載のCAR。

【請求項31】

前記4-1BBシグナル伝達ドメインが、配列番号27、28または29に示される配列によってコードされる、請求項23に記載のCAR。

【請求項32】

前記膜貫通ドメインが、CD28膜貫通ドメインを含む、請求項3に記載のCAR。

【請求項33】

前記CD28膜貫通ドメインが、配列番号37、38および／または39に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項32に記載のCAR。

【請求項34】

前記CD28膜貫通ドメインが、配列番号37、38または39に示される配列を有する、請求項32に記載のCAR。

【請求項35】

前記CD28膜貫通ドメインが、配列番号33、34、35および／または36に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項32に記載のCAR。

【請求項36】

前記CD28膜貫通ドメインが、配列番号33、34、35または36に示される配列によってコードされる、請求項32に記載のCAR。

【請求項37】

前記STEAP1結合ドメインが、STEAP1 scFvを含み、前記細胞内部分が、CD3ζシグナル伝達ドメインと4-1BBシグナル伝達ドメインを含み、前記膜貫通ドメインが、CD28膜貫通ドメインを含む、請求項3に記載のCAR。

【請求項38】

配列番号2に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項3に記載のCAR。

【請求項39】

配列番号2に示される配列を有する、請求項3に記載のCAR。

【請求項40】

配列番号1に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項3に記載のCAR。

【請求項41】

配列番号1に示される配列によってコードされる、請求項3に記載のCAR。

【請求項42】

タグカセットまたは自殺スイッチをさらに含む、請求項3に記載のCAR。

【請求項43】

多量体化ドメインをさらに含む、請求項3に記載のCAR。

【請求項44】

自己切断ポリペプチドをさらに含む、請求項3に記載のCAR。

【請求項45】

前記自己切断ポリペプチドが、豚テシオウイルス-1由来の自己切断ポリペプチド（P2A）、Thosea asignaウイルス由来の自己切断ポリペプチド（T2A）、馬鼻炎Aウイ

10

20

30

40

50

ルス由来の自己切断ポリペプチド（E2A）、口蹄疫ウイルス由来の自己切断ポリペプチド（F2A）、またはこれらのバリエーションである、請求項44に記載のCAR。

【請求項46】

前記自己切断ポリペプチドが、T2A自己切断ポリペプチドである、請求項44に記載のCAR。

【請求項47】

形質導入マーカをさらに含む、請求項3に記載のCAR。

【請求項48】

前記形質導入マーカが、切断型上皮成長因子受容体（EGFRt）である、請求項47に記載のCAR。

【請求項49】

前記EGFRtが、配列番号41に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項48に記載のCAR。

【請求項50】

前記EGFRtが、配列番号41に示される配列を有する、請求項48に記載のCAR。

【請求項51】

前記EGFRtが、配列番号40に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる、請求項48に記載のCAR。

【請求項52】

前記EGFRtが、配列番号40に示される配列によってコードされる、請求項48に記載のCAR。

【請求項53】

前記CARを発現する免疫細胞が、Steap1bを発現する細胞に対して反応性を示さない、請求項1または3に記載のCAR。

【請求項54】

請求項3に記載のCARをコードする遺伝子コンストラクト。

【請求項55】

配列番号2に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項54に記載の遺伝子コンストラクト。

【請求項56】

配列番号2に示される配列を有する、請求項54に記載の遺伝子コンストラクト。

【請求項57】

請求項54に記載の遺伝子コンストラクトが封入されたナノ粒子。

【請求項58】

請求項3に記載のCARを発現するように遺伝子組換えされた細胞。

【請求項59】

対象から得られた自家細胞または対象と同種の細胞である、請求項58に記載の細胞。

【請求項60】

インビボの細胞またはエクスビボの細胞である、請求項58に記載の細胞。

【請求項61】

T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK-T細胞、単球／マクロファージ、造血幹細胞（HSC）または造血前駆細胞（HPC）である、請求項58に記載の細胞。

【請求項62】

CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞および／またはナイーブT細胞から選択されるT細胞である、請求項58に記載の細胞。

【請求項63】

CD8+T細胞である、請求項58に記載の細胞。

【請求項64】

CD4+T細胞である、請求項58に記載の細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 65】

請求項 3 に記載の CAR を発現するように遺伝子組換えされた細胞集団。

【請求項 66】

対象から得られた自家細胞または対象と同種の細胞を含む、請求項 65 に記載の細胞集団。

【請求項 67】

インビボの細胞集団またはエクスビボの細胞集団である、請求項 65 に記載の細胞集団。

【請求項 68】

T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK-T 細胞、単球／マクロファージ、造血幹細胞（HSC）および／または造血前駆細胞（HPC）を含む、請求項 65 に記載の細胞集団。

10

【請求項 69】

CD4+T 細胞および CD8+T 細胞を含む、請求項 65 に記載の細胞集団。

【請求項 70】

CD4+T 細胞と CD8+T 細胞を 1：1 の比率で含む、請求項 69 に記載の細胞集団。

【請求項 71】

（i）請求項 3 に記載の CAR を発現するように遺伝子組換えされた細胞と、（ii）薬学的に許容される担体とを含む製剤。

【請求項 72】

20

STEAP1 関連疾患を有する対象を治療する方法であって、STEAP1 関連疾患を有する対象に、治療有効量の請求項 71 に記載の製剤を投与することによって、前記対象を治療する工程を含む、方法。

【請求項 73】

前記対象が有する STEAP1 関連疾患が、STEAP1 抗原の密度が低い状態で STEAP1 を発現している病変細胞の存在に基づくものである、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記 STEAP1 抗原の密度が低い状態が、病変細胞 1 個あたりの STEAP1 分子の数が 50,000 個未満の状態である、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

30

前記 STEAP1 抗原の密度が低い状態が、病変細胞 1 個あたりの STEAP1 分子の数が 30,000 個未満の状態である、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 76】

前記 STEAP1 抗原の密度が低い状態が、病変細胞 1 個あたりの STEAP1 分子の数が 15,000 個未満の状態である、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 77】

前記 STEAP1 抗原の密度が低い状態が、病変細胞 1 個あたりの STEAP1 分子の数が 10,000 個未満の状態である、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 78】

前記 STEAP1 抗原の密度が低い状態が、病変細胞 1 個あたりの STEAP1 分子の数が 5,000 個未満の状態である、請求項 73 に記載の方法。

40

【請求項 79】

前記 STEAP1 抗原の密度が低い状態が、病変細胞 1 個あたりの STEAP1 分子の数が 2,000 個未満の状態である、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 80】

前記 STEAP1 抗原の密度が低い状態が、病変細胞 1 個あたりの STEAP1 分子の数が 1,500 個未満の状態である、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 81】

前記病変細胞の試料を得る工程と、前記病変細胞の STEAP1 抗原の密度を測定する工程をさらに含む、請求項 73 に記載の方法。

50

【請求項 8 2】

前記STEAP1関連疾患が、前立腺がん、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（EFT）、膀胱がん、卵巣がんまたは横紋筋肉腫を含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記STEAP1関連疾患が、致死性の転移性去勢抵抗性前立腺がんを含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 4】

STEAP1発現細胞に対する免疫応答を必要とする対象において、STEAP1発現細胞に対する免疫応答を提供する方法であって、

治療有効量の請求項 7 1 に記載の製剤を前記対象に投与することによって、STEAP1発現細胞に対する免疫応答を前記対象に提供する工程を含む、方法。

【請求項 8 5】

前記STEAP1発現細胞が、前立腺がん細胞、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（EFT）細胞、膀胱がん細胞、卵巣がん細胞または横紋筋肉腫細胞を含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記STEAP1発現細胞が、前立腺がん細胞を含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記前立腺がん細胞が、致死性の転移性去勢抵抗性前立腺がん細胞を含む、請求項 8 6 に記載の方法。

【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、2022年2月11日に出願された米国仮特許出願第63/309,389号の優先権を主張するものであり、この出願の内容は、本明細書に記載されているかのように、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

連邦政府の助成による研究開発に関する陳述

本発明は、米国陸軍医療研究開発指揮部によって付与された助成金番号W81XWH-21-1-0581による政府支援を受けてなされたものである。米国政府は、本発明に関し一定の権利を保有する。

【0003】

配列表の参照

本願に付随する配列表は、ハードコピーではなくXMLフォーマットで提供され、この配列表は参照により本明細書に援用される。この配列表を含むXMLファイルの名称は、F053-0149PCT Sequence Listing.xmlである。このXMLファイルのサイズは196KBであり、2023年2月10日に作成されたものであり、Patent Centerを経由して電子的に提出されたものである。

【0004】

本開示は、STEAP1に結合する結合ドメインを有するキメラ抗原受容体（CAR）を提供する。本明細書に開示されるCARは、STEAP1抗原の密度が低い状態であっても、STEAP1に結合して細胞傷害作用を誘導することができる。本明細書に開示されるCARは、前立腺がん、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（EFT）、膀胱がん、卵巣がん、横紋筋肉腫などの、STEAP1を発現するがんの治療に使用することができる。

【背景技術】

【0005】

世界保健機関によれば、がんは世界で第2位の主要な死因であり、がんによる死亡は2018年には推計で960万人に達した。

【0006】

STEAP1は、前立腺がん、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（EFT）、膀胱がん、卵巣がん、横紋筋肉腫などの、多くのがんにおいて発現がアップレギュレートされるタンパク質である。前立腺がんは、皮膚がんに加えて男性において最もよく診断されるがんである。前立腺がんは、男性のがんによる死因の第2位になっている。ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（EFT）は、骨または軟部組織から発生する青色小型円形細胞腫瘍のファミリーである。このファミリーは、小児および若年層において2番目に多い悪性骨腫瘍であり、米国での発病率は毎年200症例に上る。

【0007】

長年にわたり、がんに対して選択される治療は、外科手術、化学療法および／または放射線療法であった。最近になって、主にがん細胞に認められる特異的な分子および／または免疫表現型の変化を同定し、これらを利用することによって、がん細胞を特異的な標的とする標的化の進んだ治療が開発された。例えば、多数のがん細胞が、その細胞表面に特定のマーカーを選択的に発現しており、このようなマーカーは、抗体ベースの治療の標的として利用されている。

【0008】

免疫系細胞の遺伝子操作技術は大きな進歩を遂げ、がん細胞などの望ましくない細胞を標的として、これを殺傷することが可能になった。これらの免疫細胞の多くは、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作されたT細胞である。CARは、遺伝子組換えされたT細胞が、がん細胞を認識して、これを殺傷することを可能にするいくつかの特徴的な構成要素を含むタンパク質である。これらの構成要素は、少なくとも細胞外部分と細胞内部分を含む。この細胞外部分は、望ましくない細胞の表面に選択的に存在するマーカー（例えば抗原）（例えばSTEAP1）に特異的に結合する結合ドメインを含む。そのようなマーカーに結合ドメインが結合すると、結合した細胞を破壊するように、細胞内部分からT細胞にシグナルが伝達される。CARは、細胞外部分を細胞内部分に連結することができる膜貫通ドメインをさらに含むことができる。

【0009】

CARの機能を増強することができるその他の構成要素を使用することもできる。例えば、スパーサーは、CARの立体構造に柔軟性をさらに付与することによって、標的細胞のマーカーに対する結合ドメインの結合能を増強できることが多く、その結果、細胞溶解作用が増強される。特定のCARにおけるスパーサーの適切な長さは、数多くの要因に左右され、これには、標的マーカーが望ましくない細胞の細胞膜の表面からどれくらい近い位置または遠い位置にあるのかという要件が含まれる。したがって、CARの全般的な構造は公知であるが、特定のCARがインビボで細胞溶解作用を誘導する能力は、精力的な研究や調査が行われるべき分野として依然として存在しつづけている。また、抗原密度が低い状態であっても、CARの細胞溶解作用を誘導することは依然として困難である。

【0010】

前立腺がん（PCa）に関して具体的に述べると、最も一般的な前立腺がんは、通常、腺癌として分類され、腺癌とは、臓器の粘液分泌腺に生じるがんの1種である。前立腺がんは、男性生殖器系の前立腺（精漿を産生する分泌腺）から生じる。局所的な前立腺がん（PCa）は治療が可能であり、診断からの5年生存率はほぼ100%である。前立腺がんの治療方法の一部として、外科手術、放射線照射、凍結療法またはホルモン療法がある。

【0011】

前立腺がんの増殖は、テストステロンを含むアンドロゲンと呼ばれる男性ホルモンによって誘導されることが多いことから、ホルモン療法は前立腺がんに対して効果的な治療法として利用できる場合がある。このようなホルモン療法では、患者の体内のアンドロゲン濃度を低下させる。アンドロゲン濃度は、精巣の外科的摘出、アンドロゲンの産生を阻止する薬物の投与、および／または生体に対するアンドロゲンの作用の阻害によって低下させることができる。残念ながら、ホルモン依存性がんの大部分では、1～3年経過後に、このような種類の治療に対して難治性になり、ホルモン療法を継続しているにもかかわらず、がんが再増殖し始める。ホルモン療法が前立腺がんに対する治療有効性を失った場合

、このような前立腺がんは、「去勢抵抗性」前立腺がんまたはCRPCと呼ばれる。残念ながら、前立腺がんがCRPCになった場合、5年生存率は30%まで低下する。したがって、その他の生存率が低いがんの中でも、CRPCの治療が可能な治療法が強く必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本開示は、STEAP1発現がんの治療用の、STEAP1に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を提供する。本明細書に開示されるCARは、STEAP1抗原の密度が低い状態であっても、STEAP1に結合して細胞傷害作用を誘導することができ、かつSTEAP1に対して非常に特異的であるという重要な利点を有する。本明細書に開示されるCARは、このような特徴を有することから、オフターゲット毒性を最小限に抑えつつ、がんの増殖と成長により抗原密度が増加するよりも前のがんの進行初期にCARを使用することができることから、臨床的に重要な進歩を達成することができる。がんの成長の初期段階で介入することによって、顕著に良好な治療成果が得られることが多い。また、潜在的な毒性が低減されていることから、臨床的重要性が高い。

【0013】

特定の実施形態において、本開示のCARは、細胞により発現された場合に、（i）バンドルツズマブベドチン（DSTP3086S；マウスモノクローナル抗体であるmAb 120.545のヒト化バリエーション）に由来するscFv結合ドメインと、CH2ドメインに4/2-NQ変異を有するIgG4ヒンジ-CH2-CH3を含む長いスペーサーとを含む細胞外部分；（ii）CD3z活性化ドメインと4-1BB共刺激ドメインを含む細胞内部分；および（iii）前記細胞外部分を前記細胞内部分に連結するCD28膜貫通ドメインを含んでいる。

【0014】

本明細書に開示されるCARは、前立腺がん、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（EFT）、膀胱がん、卵巣がん、横紋筋肉腫などの、STEAP1を発現するがんの治療に使用することができる。特定の実施形態において、本明細書に開示されるCARは、致死性の転移性去勢抵抗性前立腺がんの治療に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

本願で提出された図面の一部は、カラーの方が理解しやすいと考えられる。本出願人は、これらの図面のカラー版も原出願の一部と見なしており、後の手続きにおいて、図面のカラー画像を提出できる権利を保有している。

【0016】

【図1A-1E】致死性の転移性去勢抵抗性前立腺がん（mCRPC）における6回膜貫通型前立腺上皮抗原1（six-transmembrane epithelial antigen of prostate 1（STEAP1））と前立腺特異的膜抗原（PSMA）の比較分析を示す。（1A）ワシントン大学のTissue Acquisition Necropsyにおいて作製した組織マイクロアレイ92（UW TMA92）にスポットされたmCRPC組織の特性を示す。（1B）各mCRPC組織コアにおけるSTEAP1とPSMAの免疫組織化学（IHC）染色の平均Hスコアをペアにして示したプロットである。各mCRPCコアは、グラフの左側から右側の方向に、10-013_BB、10-013_Q、10-013_R、10-056_J、10-056_K、10-068_II、10-068_PP、11-028_DD、11-028_H、11-028_L、12-005_H、12-005_K、12-005_QQ、12-011_I、12-011_J、12-011_LL、12-021_H、12-021_I、13-012_I、13-012_L、13-012_OO、13-042_JJ、13-042_M、13-042_O、13-084_H、13-084_II、13-099_H、13-099_J、13-101_K、13-101_SS、13-101_UU、13-104_I、13-104_K、13-104_OO、13-117_BB、13-117_H、13-117_OO、13-122_H、13-122_II、13-122_OO、14-031_GG、14-031_H、14-031_K、14-039_E、14-039_K、14-043_CC、14-043_H、14-043_OO、14-053_AA、14-053_H、14-053_O、14-077_K、14-077_N、14-091_TT、14-091_E、14-096_FF、14-

096_II、14-105_I、14-105_J、14-105_VV、15-003_GG、15-003_H、15-010_H、15-010_K、15-019_CC、15-019_HH、15-023_I、15-023_L、15-023_LL、15-069_I、15-069_KK、15-069_P、15-090_H、15-090_I、15-090_LL、15-096_FF、15-096_H、15-096_L、16-052_BB、16-052_JJ、16-071_H、16-071_I、16-071_KK、16-080_FF、16-080_L、16-080_LL、16-101_EE、16-101_J、16-101_N、17-007_AA、17-007_EE、17-007_H、17-017_H、17-017_O、17-017_SS、17-022_H、17-022_JJ、17-033_FF、17-033_H、17-036_H、17-036_HH、17-036_L、17-042_GG、17-042_H、17-042_PP、17-043_I、17-043_II、17-043_J、17-057_J、17-057_N、17-072_E、17-072_H、17-081_M、および17-081_Pを示す。(1C) Hスコアの閾値30よりも上または下のSTEAP1のIHC染色またはPSMAのIHC染色とともに、mCRPC組織コアの頻度を示した分割表である。(1D、1E) STEAP1のIHC染色またはPSMAのIHC染色を行った後の選択されたmCRPC組織コアの顕微鏡写真を示し、(1D) PSMAの発現が存在しないが、STEAP1の発現が存在する領域と、(1E) STEAP1の発現が存在しないが、PSMAの発現が存在する腫瘍内不均一性領域を強調表示している。スケールバー=50 μ m。
【0017】

【図2A-2D】致死性mCRPC組織におけるSTEAP1の発現の特性を示す。(2A) STEAP1のIHC染色後に選択したmCRPC組織コアの顕微鏡写真を示し、染色強度スコア0、1、2または3と一致する細胞膜染色を強調表示している。(2B) mCRPC組織コアのSTEAP1のHスコアを転移部位ごとに示したプロットを示す。破線は、STEAP1のHスコアが30のラインを示す。*は、 $p < 0.01$ を示す。各mCRPC組織コアにおける(2C) STEAP1のHスコアとアンドロゲン受容体(AR)のHスコアのプロット、または(2D) STEAP1のHスコアとシナプトフィジン(SYP)のHスコアのプロットを示す。ピアソン相関係数(r)と p 値を示している。

【0018】

【図3A-3I】STEAP1 CAR T細胞療法用のリード細胞を同定するための、第2世代4-1BBキメラ抗原受容体(CAR)のスクリーニングを示す。(3A) STEAP1 CARレンチウイルスコンストラクトの模式図と、短いスペーサー、中程度の長さのスペーサーまたは長いスペーサーを用いたバリエーションを示す。LTR=長鎖末端反復配列；MNDU3=モロニー Maus 白血病ウイルスのU3領域；scFv=一本鎖可変領域断片；VL=軽鎖可変領域；VH=重鎖可変領域；tm=膜貫通ドメイン；EGFRt=切断型上皮成長因子受容体；4/2 NQ=Fc γ 受容体への結合を阻止するCH2ドメインの変異。(3B) 22Rv1親細胞、22Rv1 STEAP1ノックアウト(ko)細胞、およびレンチウイルスからの発現によりSTEAP1の発現をレスキューした22Rv1 STEAP1 ko細胞におけるSTEAP1の発現を示したイムノプロット分析を示す。タンパク質ローディングコントロールとしてGAPDHを使用した。(3C) 非形質導入T細胞またはSTEAP1-BB ζ CAR T細胞と、各22Rv1細胞派生株を1:1の比率で24時間共培養した際の、IFN- γ 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)の結果を示す。各条件につき $n=4$ の反復を行った。エラーバーは標準偏差(SD)を示す。(3D) 22Rv1標的細胞と、(左図) STEAP1-BB ζ CAR T細胞または(右図) 非形質導入T細胞とを様々な標的：エフェクター(E:T)細胞比で共培養した後、蛍光ライブセルイメージングで測定した22Rv1標的細胞の相対的細胞生存率の経時変化を示す。(3E) 22Rv1 STEAP1 ko標的細胞と、(左図) STEAP1-BB ζ CAR T細胞または(右図) 非形質導入T細胞とを様々なE:T細胞比で共培養した後、蛍光ライブセルイメージングで測定した22Rv1 STEAP1 ko標的細胞の相対的細胞生存率の経時変化を示す。図3Dおよび図3Eにおいて、各条件につき $n=4$ の反復を行い、エラーバーは平均値の標準誤差(SEM)を示す。(3F) アンドロゲン受容体(AR)陽性のヒト前立腺がん細胞株において、STEAP1が発現されているが、AR陰性の前立腺がん細胞株では、STEAP1が発現されていないことが示されたイムノプロット分析を示す。タンパク質ローディングコントロールとしてGAPDHを使用した。(3G) 非形質導入T細胞またはSTEAP1-BB ζ CAR T細胞と、図3Fに示したヒト前立腺がん細胞株を1:1の比率で24時間共

10

20

30

40

50

培養した際の、ELISAによるIFN- γ の定量を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーはSDを示す。(3H) 22Rv1株、PC3株、PC3から派生させたPC3 STEAP1 ko株におけるSTEAP1の発現を評価するための、長時間露出によるイムノブロット分析を示す。タンパク質ローディングコントロールとしてGAPDHを使用した。(3I) 非形質導入T細胞またはSTEAP1-BB ζ CAR T細胞と、図3Fに示したヒト前立腺がん細胞株を1:1の比率で24時間共培養した際の、ELISAによるIFN- γ の定量を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーはSDを示す。

【0019】

【図4A-4D】STEAP1-BB ζ CAR T細胞の抗原特異的な活性化と標的細胞細胞の溶解の検証を示す。(4A) 非形質導入対照条件またはSTEAP1 CARレンチウイルスを形質導入した条件での増殖の10日目におけるCD4 T細胞産物とCD8 T細胞産物のイムノフェノタイピングを示す代表的なフローサイトメトリプロットを示す。(4B) 対照培養条件または(4C) 非形質導入T細胞もしくはSTEAP1-BB ζ CAR T細胞と、DU145細胞株もしくはDU145 STEAP1細胞株とを1:1の比率で24時間共培養した際の、ELISAによるIFN- γ の定量を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーはSDを示す。(4D) DU145 STEAP1標的細胞と、STEAP1-BB ζ CAR T細胞または非形質導入T細胞とを1:1の比率で共培養した後、蛍光ライブセルイメージングで測定したDU145 STEAP1標的細胞の相対的細胞生存率の経時変化を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーはSEMを示す。

【0020】

【図5A-5G】マウス/ヒトSteap1キメラを用いた、STEAP1-BB ζ CAR T細胞のSTEAP1細胞外ドメインの特異性の測定を示す。(5A) DU145細胞株においてヒトSTEAP1 (hSTEAP1) およびマウスSteap1 (mSteap1) が発現されていないことと、レンチウイルスで組換えたDU145 hSTEAP1株とDU145 mSteap1株においてhSTEAP1とmSteap1が発現されていることが確認されたイムノブロット分析を示す。タンパク質ローディングコントロールとしてGAPDHを使用した。(5B) STEAP1-BB ζ CAR T細胞を、(5B) DU145細胞株、DU145 hSTEAP1細胞株もしくはDU145 mSteap1細胞株と1:1の比率で24時間共培養した場合、または(5C) STEAP1-BB ζ CAR T細胞を対照培養条件で24時間共培養した場合の、ELISAによるIFN- γ の定量を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーはSDを示す。(5D) 強調表示した細胞外ドメイン (mECD、三角形を示していないボックス) を有するmSteap1タンパク質と、各mECDを、それぞれに対応するhSTEAP1細胞外ドメインで置換した (hECD、三角形を示したボックス) マウス/ヒトSteap1キメラタンパク質の模式図を示す。(5E) STEAP1-BB ζ CAR T細胞と、hSTEAP1、mSteap1またはマウス/ヒトSteap1キメラタンパク質を発現するように組換えた各DU145株を1:1の比率で24時間共培養した際の、ELISAによるIFN- γ の定量を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーはSDを示す。(5F) 図5Eに示した各標的細胞と、STEAP1-BB ζ CAR T細胞とを1:1の比率で共培養した後、蛍光ライブセルイメージングで測定した各標的細胞の相対的細胞生存率の経時変化を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーはSEMを示す。(5G) hSTEAP1 ECD2 (配列番号178) とmSteap1 ECD2 (配列番号179) のアミノ酸配列のアライメントから、198番目と209番目に非保存残基が存在することが示されたことを示す。

【0021】

【図6A-6D】STEAP1Bアイソフォームに対するSTEAP1-BB ζ CAR T細胞の反応性の評価を示す。(6A) ヒトSTEAP1Bアイソフォーム1 (配列番号178)、ヒトSTEAP1Bアイソフォーム2 (配列番号178)、またはヒトSTEAP1Bアイソフォーム3 (配列番号178) と、hSTEAP1 ECD2 (配列番号178) とのアミノ酸配列のアライメントから、完全な配列保存性が示されたことを示す。(6B) TOPCONSによるhSTEAP1、mSteap1および3つのヒトSTEAP1Bアイソフォームの膜タンパク質トポロジーのコンセンサス予測と、その信頼性スコアを示したプロットを示す。(6C) ヒトSTEAP1Bアイソ

フォーム1の膜タンパク質トポロジー予測のプロットであり、様々な種類のアルゴリズム間で不一致が見られたことが示されている。(6D) STEAP1-BBζ CAR T細胞と、hSTEAP1、mSteap1またはヒトSTEAP1Bアイソフォームを発現するように組換えた各DU145株を1:1の比率で24時間共培養した際の、ELISAによるIFN-γの定量を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーは標準偏差を示す。このデータから、STEAP1Bアイソフォームに対して本開示のCARが反応性を持たないことが示され、本開示のCARの特異性が強調され、オフターゲット毒性が極めて低減されているか、オフターゲット毒性が起こる可能性ないことが示された。

【0022】

【図7A-7H】天然にSTEAP1を発現する前立腺がんモデルにおけるSTEAP1-BBζ CAR T細胞療法のインビボでの抗腫瘍活性を示す。(7A) 正常なCD4/CD8比で 5×10^6 個の非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞を腫瘍内注射により単回投与したNSGマウスにおける22Rv1皮下腫瘍の体積の経時変化を示す。エラーバーはSDを示す。*は、 $p < 0.05$ を示す；****は、 $p < 0.0001$ を示す。(7B) 22Rv1播種モデル(上図)とC4-2B播種モデル(下図)における腫瘍チャレンジ実験の模式図を示す。fLuc=ホタルルシフェラーゼ；BLI=生物発光イメージング。(7C) 22Rv1-fLuc転移性腫瘍を移植し、0日目に、正常なCD4/CD8比で 5×10^6 個の非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞を静脈内注射により単回投与することにより治療したNSGマウスの連続生物発光ライブイメージングを示す。Xは死亡したマウスを示す。輝度スケールを示す。(7D) 図7Cに示した各マウスの生物発光ライブイメージングにおいて定量した全光束の経時変化を示すプロットである。(7E) 図7Cに示したマウスのカプランマイヤー生存曲線と、ログランク検定により求めた統計学的有意差を示す。(7F) C4-2B転移性腫瘍を移植し、0日目に、正常なCD4/CD8比(すなわち1:1)で 5×10^6 個の非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞を静脈内注射により単回投与することにより治療したNSGマウスの連続生物発光ライブイメージングを示す。Xは死亡したマウスを示す。輝度スケールを示す。(7G) 図7Fに示した各マウスの生物発光ライブイメージングから定量した全光束の経時変化を示したプロットである。(7H) 実験の最後の49日目に、STEAP1-BBζ CAR T細胞で治療したマウスの脾細胞をフローサイトメトリーで分析することにより定量したCD3+EGFRt+ STEAP1-BBζ CAR T細胞を示す。図面に示した実験はいずれも少なくとも2回行った。

【0023】

【図8A-8D】ヒト前立腺がん細胞株の異種移植片モデルにおけるSTEAP1-BBζ CAR T細胞療法の抗腫瘍治療活性を示す。(8A) STEAP1-BBζ CAR T細胞を用いた腫瘍内治療の25日後の22Rv1皮下腫瘍のCD3 IHC染色を示す顕微鏡写真である。スケールバー=100 μm。(8B) 22Rv1-fLuc転移性腫瘍を移植し、非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞で治療した後のNSGマウスの平均体重の経時変化を示したプロットである。エラーバーはSDを示す。(8C) C4-2B-fLuc転移性腫瘍を移植し、非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞で治療した後のNSGマウスの平均体重の経時変化を示したプロットである。エラーバーはSDを示す。(8D) C4-2B-fLuc転移性腫瘍を移植し、(左側)非形質導入T細胞または(右側)STEAP1-BBζ CAR T細胞で治療したNSGマウスの肝組織および肺組織のエクスピボ生物発光イメージングを示す。輝度スケールを示す。

【0024】

【図9A-9H】新たに作製したヒトSTEAP1ノックインマウスモデル(hSTEAP1-KI)とマウス化STEAP1 CARを用いたmouse-in-mouse系の構築を示す。(9A) C57Bl/6背景のマウスSteap1座位にヒトSTEAP1のエクソン2~5をノックインするための、ターゲティングベクターを使用した相同組換え方法を示す模式図である。FRT=フリッパゼ認識標的。(9B) 野生型アレルまたはhSTEAP1-KIアレルの一部を増幅するプライマーペアを使用した、野生型マウス(+/+)、ヘテロ接合体マウス(KI/+)、またはホモ接合体マウス(KI/KI)の尾の先端を用いたジェノタイピングのPCR産物の可視化を

示す。NTC=null鑄型対照。(9C) hSTEAP1-KI/+マウスから得た組織の調査における、18Sの発現で正規化したヒトSTEAP1の発現のqPCRの結果を示す。各性別に特有の臓器：n=3、および共通の臓器：n=6。エラーバーはSDを示す。(9D) (左側) +/+マウスまたは(右側) KI/+マウスから得た前立腺組織と、(9E) KI/+マウスから得た副腎のSTEAP1 IHC染色の顕微鏡写真を示す。スケールバー=50 μ m。(9F) マウス化STEAP1 CARのレトロウイルスコンストラクトの模式図である。MuLV=マウス白血病ウイルス；mCD19t=マウス切断型CD19。(9G) フローサイトメトリーで測定したマウスCD3+CD19t+細胞の頻度に基づく、3つの独立した実験におけるレトロウイルスによる活性化マウスT細胞への形質導入効率の定量を示す。(9H) RM9標的細胞またはRM9-hSTEAP1標的細胞と、マウスSTEAP1-mBB ζ CAR T細胞または非形質導入T細胞を1:1の比率で共培養した後、蛍光ライブセルイメージングで測定した相対的細胞生存率の経時変化を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーはSEMを示す。***はp<0.001を示す。

10

20

30

【0025】

【図10A-10H】同系の播種性前立腺がんを有するhSTEAP1-KIマウスにおける、マウスSTEAP1-mBB ζ CAR T細胞の有効性と安全性の測定を示す。(10A) hSTEAP1-KI/+マウスにおけるRM9-hSTEAP1播種性モデルの腫瘍チャレンジ実験の模式図である。Cy=(プレコンディショニング用の)シクロホスファミド。(10B) RM9-hSTEAP1-fLuc転移性腫瘍を移植し、0日目に、 5×10^6 個のマウス非形質導入T細胞またはSTEAP1-mBB ζ CAR T細胞を静脈内注射により単回投与することにより治療したhSTEAP1-KI/+マウスの連続生物発光ライブイメージングを示す。Xは死亡したマウスを示す。輝度スケールを示す。(10C) 図10Bに示した各マウスの生物発光ライブイメージングから定量した全光束の経時変化を示したプロットである。(10D) 図10Bに示したマウスの Kaplan-Meier 生存曲線と、ログランク検定により求めた統計学的有意差を示す。(10E) マウス非形質導入T細胞治療群と、(10F) STEAP1-mBB ζ CAR T細胞治療群の(図10Bでナンバリングした)各マウスの体重の経時変化のプロットを示す。(10G) マウス非形質導入T細胞で治療後のRM9-hSTEAP1腫瘍のSTEAP1 IHC染色の顕微鏡写真を示し、(左側) 強力かつ均一なSTEAP1発現が示された領域と、(右側) 不均一なSTEAP1発現が示された領域を示す。スケールバー=50 μ m。(10H) STEAP1-mBB ζ CAR T細胞で治療後のRM9-hSTEAP1腫瘍の代表的なSTEAP1 IHC染色を示し、STEAP1の発現が示されていないことを示す。スケールバー=50 μ m。

【0026】

【図11A-11B】マウスSTEAP1-mBB ζ CAR T細胞で治療したhSTEAP1-KI/+マウスの前立腺または副腎において組織構造が維持され、T細胞浸潤の増加が認められなかったことを示す。(11A) 非形質導入T細胞または(11B) STEAP1-mBB ζ CAR T細胞で治療したマウスから摘出したhSTEAP1-KI/+前立腺のヘマトキシリン&エオシン(H&E)染色とCD3 IHC染色の代表的な顕微鏡写真を示す。矢尻は、わずかに見られたCD3+細胞を示す。スケールバー=50 μ m。

【0027】

【図12A-12G】(12A) 非形質導入T細胞または短いスパーサーを有するSTEAP1 CAR T細胞または中程度の長さのスパーサーを有するSTEAP1 CAR T細胞と、各22Rv1細胞派生株を1:1の比率で24時間共培養した際の、IFN- γ 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)の結果を示す。各条件につきn=4の反復を行った。エラーバーはSDを示す。(12B) Bangs Laboratories社製のQuantum Simply Cellular Microspheresを用いたフローサイトメトリーにより測定した、22Rv1前立腺がん細胞株、C4-2B前立腺がん細胞株、PC3前立腺がん細胞株およびDU145前立腺がん細胞株における細胞1個あたりのSTEAP1分子の絶対量のプロットと表を示す。(12C) PC3標的細胞と、非形質導入T細胞またはSTEAP1-mBB ζ CAR T細胞を1:1の比率で共培養した後、蛍光ライブセルイメージングで測定したPC3標的細胞の相対的細胞生存率の経時変化を示す。各条件につきn=4の反復を行い、エラーバーはSEMを示す。(12D) PC3播種性モデル

40

50

の腫瘍チャレンジ実験の模式図である。(12E) PC3-fLuc転移性腫瘍を移植し、0日目に、正常なCD4/CD8比で 5×10^6 個の非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞を静脈内注射により単回投与することにより治療したNSGマウスの連続生物発光ライブイメージング(BLI)を示す。いずれの治療群のマウスも、4週目に重症急性移植片対宿主病(GVHD)を発症したことから安楽死させた。輝度スケールを示す。(12F) 図12Eに示した各マウスの生物発光ライブイメージングから定量した全光束の経時変化を示したプロットである。(12G) ユーイング肉腫細胞株であるRD-ES標的細胞またはSK-ES-1標的細胞と、非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞を1:1の比率で共培養した後、蛍光ライブセルイメージングで測定した各標的細胞の相対的細胞生存率の経時変化を示す。各条件につきn=4の反復を行い、エラーバーはSEMを示す。

10

【0028】

【図13】本開示を支持する配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

世界保健機関によれば、がんは世界で第2位の主要な死因であり、がんによる死亡は2018年には推計で960万人に達した。長年にわたり、がんに対して選択される治療は、外科手術、化学療法および／または放射線療法であった。最近になって、主にがん細胞に認められる特異的な分子の変化を同定し、これらを利用することによって、がん細胞の特異的な標的とする標的化の進んだ治療が開発された。例えば、多数のがん細胞が、その細胞表面に特定のマーカー(例えば抗原)を選択的に発現しており、このようなマーカーは、抗体ベースの治療の標的として利用されている。

20

【0030】

標的療法を成功させるために重要な事項の1つとして、標的がん細胞マーカーの選択がある。標的マーカーとしては、免疫原性であり、増殖および分化に極めて重要な役割を果たし、あらゆる悪性細胞および悪性幹細胞の表面上のみで発現されており、すべての患者または少なくとも大半の患者において陽性の検査結果が得られるものが理想的である(Cheever, et al., 2009. Clin. Cancer Res. 15(17): 5323-8337)。

【0031】

STEAP1(PRSS24、STEAP、6回膜貫通型前立腺上皮抗原1(six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1)、またはSTEAPファミリーメンバー1としても知られている)は、6つの膜貫通領域を有することから命名された339アミノ酸長のタンパク質であり、前立腺がん、膀胱がん、卵巣がん、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍(EFT)などの様々な腫瘍においてアップレギュレートされる(Hubert et al., Proc Natl Acad Sci USA 96(25): 14523-8 (1999); Rodeberg et al., Clin Cancer Res 11(12): 4545-52 (2005))。トランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析や、機能的な研究から、STEAP1の発現が、酸化ストレス応答と活性酸素種の増加に相関することが示されている。

30

【0032】

前立腺がんは、皮膚がんに加えて男性において最もよく診断されるがんであり、男性のがんによる死因の第2位になっている。前立腺がんでは、致死性転移性前立腺がんの最大88%にSTEAP1が発現されており、これに対して、前立腺特異的膜抗原(PSMA)は、致死性転移性前立腺がんの最大で61%にしか発現されていない。

40

【0033】

ユーイング肉腫ファミリー腫瘍(EFT)は、骨または軟部組織から発生する青色小型円形細胞腫瘍のファミリーである。このファミリーは、小児および若年層において2番目に多い悪性骨腫瘍であり、米国での発病率は毎年200症例に上る(Esiashvili et al., J Pediatr Hematol Oncol. 30(6): 425-30 (2008))。EFTは、22番染色体にあるEWS(ユーイング肉腫遺伝子)が、E26形質転換特異的転写因子ファミリー遺伝子のうちの1つと特異的に転座することの特徴とする。STEAP1は、EFT患者の免疫組織学的マーカーとして有用である可能性があり、114個のEFT試料のうち71個(62.3%)にお

50

いて、STEAP1の免疫反応性が細胞膜に検出された（Grunewald et al., Ann Oncol, 23(8): p. 2185-90 (2012)）。EFT患者において行われた別の遺伝子プロファイル解析研究では、骨髄でのSTEAP1転写産物の不在が、患者の全生存期間および新たな転移なしでの生存率と強く相関することが示された。STEAP1の発現は、60%を超えるEFT腫瘍で検出されるが、正常組織（膀胱および前立腺の分泌組織）ではほとんど検出されないことから、STEAP1が、抗体ベースの戦略と免疫細胞ベースの戦略の標的として有用である可能性がある。

【0034】

ヒトSTEAP1（NCBI参照配列：NP_036581.1）は、以下のアミノ酸配列を有する。
MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPLVLLHLHQTAHADEF
DCPSELQHTQELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTLLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVI
NKVLPMSVITLLALVYLPGVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFF
FAVLHAIYSLSPMRRSYRYKLLNWAYQQVQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVG
LAILALLAVTSIPSVSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTIHALIFAWNKKWIDIKQFV
WYTPPTFMIAVFLPIVVLIFKSILFLPCLRRKKILKIRHGWEDVTKINKTEICSQL（配列
番号142）。

10

【0035】

マウスSTEAP1（NCBI参照配列：NP_081675.2）は、以下のアミノ酸配列を有する。

MEISDDVTNPEQLWKMKPKGNLEDDSYSTKDSGETSMLKRPGLSHLQHAVHVDAF
DCPSELQHTQEFPNWRPLVKVAAIISSLTFLYTLLREIIYPLVTSREQYFYKIPILVI
NKVLPMAVITLLALVYLPGELAAVVQLRNGTKYKKFPPWLDWRMLARKQFGLLSFF
FAVLHAVYSLSPMRRSYRYKLLNWAYKQVQQNKEDAWVEHDVWRMEIYVSLGIV
GLAILALLAVTSIPSVSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTVHALVFAWNKKWVDVSQ
FVWYMPPTFMIAVFLPTLV LICKIALCLPCLRRKKILKIRCGWEDVSKINRTEMASRL
（配列番号143）。

20

【0036】

イヌのSTEAP1（NCBI参照配列：XP_013974694.1）は、以下のアミノ酸配列を有する。

MESRQDITSQEELWTMKPRRNLEEDDYLDKDSGDTRVLKRPLVLLHMHQTTHFDEF
DCPAELKHKQELFPMWRWPVKIAAVISSLTFLYTLLREIIHPFVTSHQQYFYKIPILV
INKVLPMSVITLLALVYLPGVIAAVVQLHNGTKYKKFPHWLDWRMLTRKQFGLLSF
FFAVLHAIYSLSPMRRSYRYKLLNWAYQQVQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIV
TLAILALLAVTSIPSVSDSLTWREFHYIQSKLGMVSLLLGTIHALIFAWNKKWVDIKQF
VWYTPPTFMIAVFLPIVVLICKAILFLPCLRRKKILKIRHGWEDVTKINKTEMS（配列
番号144）。

30

【0037】

免疫系細胞の遺伝子操作は大きな進歩を遂げ、がん細胞などの望ましくない細胞を標的として、これを殺傷することが可能になった。これらの免疫細胞の多くは、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作されたT細胞である。CARは、遺伝子組換えされた免疫細胞が、がん細胞を認識して、これを殺傷することを可能にするいくつかの特徴的な構成要素を含むタンパク質である。これらの構成要素は、細胞により発現された場合に、少なくとも細胞外部分と細胞内部分を含む。この細胞外部分は、望ましくない細胞の表面に選択的に存在するマーカー（例えば抗原）（例えばSTEAP1）に特異的に結合する結合ドメインを含む。結合ドメインは、通常、モノクローナル抗体（mAb）に由来する一本鎖可変領域断片（scFv）であるが、目的のマーカーに特異的に結合するその他のフォーマットに基づくものであってもよい。

40

【0038】

そのようなマーカーに結合ドメインが結合すると、結合した細胞を破壊するように、細胞内部分から免疫細胞にシグナルが伝達される。細胞内部分は、その一部として組み込ま

50

れたエフェクタードメインに基づいて、そのような活性化シグナルを発生する。第1世代CARは、エフェクタードメインとして、CD3ζの細胞質内ドメインを利用して開発された。第2世代CARは、CD3ζの細胞質内ドメインに、分化抗原群28（CD28）または4-1BB（CD137）の細胞質内ドメインのクラスターを組み合わせることで開発された。第3世代CARは、エフェクタードメインとして、CD3ζの細胞質内ドメインを、CD28の細胞質内ドメインおよび4-1BBの細胞質内ドメインと組み合わせることで開発された。

【0039】

CARは、細胞外部分を細胞内部分に連結する膜貫通ドメインをさらに含むことができるが、すべてのCARに膜貫通ドメインが必要なわけではない。

【0040】

CARの機能を増強することができるその他の構成要素を使用することもできる。例えば、スペーサーは、CARの立体構造に柔軟性をさらに付与することができる。特定のCARにおけるスペーサーの適切な長さは、数多くの要因に左右され、これには、標的マーカーが望ましくない細胞の細胞膜の表面からどれくらい近い位置または遠い位置にあるのかという要件が含まれる。

【0041】

本開示は、前立腺がん、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（EFT）、膀胱がん、卵巣がん、横紋筋肉腫などのSTEAP1関連疾患の治療用のCARを提供する。特定の実施形態において、本明細書に開示されるCARは、致死性の転移性去勢抵抗性前立腺がんの治療に使用することができる。特定の実施形態において、本明細書に開示されるCARは、ユーイング肉腫の治療に使用することができる。特定の実施形態において、本明細書に開示されるCARは、抗原密度が低い状態であっても、細胞溶解活性を付与することができ、関連性が高いSTEAP1Bに交差反応性をほとんど示さないか、全く示さない。例えば、本明細書に示したデータでは、細胞1個あたり1,491個のSTEAP1分子しか発現していないPC3細胞株に対して有意な細胞溶解活性を有することが示されている。このデータは、細胞1個あたり69,475個のSTEAP1分子を発現する22Rv1細胞株や、細胞1個あたり67,462個のSTEAP1分子を発現するC4-2B細胞株との比較を行った結果である。さらに、本明細書に示したデータでは、本明細書に記載のCARはSTEAP1に対して高い反応性を有するが、STEAP1との相同性が最も高いタンパク質であるSTEAP1Bアイソフォームに対しては反応性を示さないことが示されている。この結果から、本明細書に記載のCARは、抗原密度が低い状態でも細胞溶解活性を付与できるだけでなく、STEAP1に対して高い特異性を有することから、オフターゲット反応性に関する臨床的懸念が低減されていることが示された。抗原密度が低い状態でも細胞溶解活性を付与できることから、治療として重要な臨床的有用性を提供でき、腫瘍量が増大して抗原密度が高い状態になる前に、効果的に投与することができる。

【0042】

本明細書において、「抗原密度が低い状態」とは、病変細胞1個あたり50,000個未満のがん分子、病変細胞1個あたり40,000個未満のがん分子、病変細胞1個あたり30,000個未満のがん分子、病変細胞1個あたり20,000個未満のがん分子、病変細胞1個あたり10,000個未満のがん分子、病変細胞1個あたり5,000個未満のがん分子、病変細胞1個あたり4,000個未満のがん分子、病変細胞1個あたり3,000個未満のがん分子、病変細胞1個あたり2,000個未満のがん分子、または病変細胞1個あたり1,500個未満のがん分子が発現されていることを意味する。

【0043】

本明細書において、「STEAP1抗原密度が低い状態」とは、病変細胞1個あたり50,000個未満のSTEAP1分子、病変細胞1個あたり40,000個未満のSTEAP1分子、病変細胞1個あたり30,000個未満のSTEAP1分子、病変細胞1個あたり20,000個未満のSTEAP1分子、病変細胞1個あたり10,000個未満のSTEAP1分子、病変細胞1個あたり5,000個未満のSTEAP1分子、病変細胞1個あたり4,000個未満のSTEAP1分子、病変細胞1個

10

20

30

40

50

あたり3,000個未満のSTEAP1分子、病変細胞1個あたり2,000個未満のSTEAP1分子、または病変細胞1個あたり1,500個未満のSTEAP1分子が発現されていることを意味する。

【0044】

「STEAP1関連疾患」は、対象の体内の病変細胞または感染細胞においてSTEAP1が発現されている疾患であり、このSTEAP1によって、治療的処置の標的化送達用の抗原が提供される疾患である。このような疾患では、オンターゲット副作用／オフターゲット副作用が最小限化または排除されるように、病変細胞または感染細胞によりSTEAP1が選択的に発現されていなければならない。

【0045】

STEAP1を発現する病変細胞は、本明細書に記載の治療による破壊の標的となる細胞である。STEAP1を発現する病変細胞としては、例えば、前立腺がん細胞（例えば、去勢抵抗性前立腺がん細胞）、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍細胞（ユーイング肉腫細胞を含む）、膀胱がん細胞、乳がん細胞、卵巣がん細胞、結腸がん細胞、肺がん細胞および腎臓がん細胞が挙げられる。

【0046】

特定の実施形態において、本開示のCARは、細胞により発現された場合に、(i) バンドルツズマブベドチン（DSTP3086S；マウスモノクローナル抗体であるmAb 120.545のヒト化バリエーション）に由来するVL-VHの順のscFv結合ドメインと、CH2ドメインに4/2-NQ変異を有するIgG4ヒンジ-CH2-CH3を含む長いスペーサーとを含む細胞外部分；(ii) CD3ζ活性化ドメインと4-1BB共刺激ドメインを含む細胞内部分；および(iii) 前記細胞外部分を前記細胞内部分に連結するCD28膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態において、バンドルツズマブベドチンに由来するVL-VHの順のscFv結合ドメインは、配列番号3に示されるものである。特定の実施形態において、CH2ドメインに4/2-NQ変異を有するIgG4ヒンジ-CH2-CH3を含む長いスペーサーは、配列番号20に示されるものであり、配列番号21に示される配列によってコードされる。特定の実施形態において、CD3ζ活性化ドメインは、配列番号24に示されるものであり、配列番号22に示される配列によってコードされる。特定の実施形態において、4-1BB共刺激ドメインは、配列番号30に示されるものであり、配列番号27に示される配列によってコードされる。特定の実施形態において、CD28膜貫通ドメインは、配列番号37に示されるものであり、配列番号33に示される配列によってコードされる。特定の実施形態において、本開示のCARは、配列番号2に示される配列を有し、配列番号1に示される配列によってコードされる。追加の配列およびコード配列を図13に示している。

【0047】

特定の実施形態において、本開示は、STEAP1に結合する一本鎖可変領域断片（scFv）、スペーサー、膜貫通ドメイン、および細胞内エフェクタードメインを含むCARを提供する。

【0048】

特定の実施形態において、本開示は、STEAP1に結合する一本鎖可変領域断片（scFv）、IgG4ヒンジとCH2-CH3スペーサー、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインを含むCARを提供する。特定の実施形態において、本開示のCARは、STEAP1に結合するscFv、IgG4ヒンジとCH2-CH3スペーサー、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメイン、Thyosa asignaウイルス2A（T2A）の切断ドメイン、および切断型EGFRを含む。特定の実施形態において、STEAP1 CARは、レンチウイルスベクターを用いて免疫細胞に送達される。特定の実施形態において、STEAP1 CARを発現するように形質導入された細胞は、切断型EGFRの発現によりソートされた細胞である。特定の実施形態において、STEAP1に結合するscFVは、バンドルツズマブベドチン（DSTP3086S）に由来するものである。

【0049】

特定の実施形態において、本開示は、長いスペーサーを有するCARを提供する。特定

10

20

30

40

50

の実施形態において、長いスペーサーは、IgG4のヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む（その全長は282アミノ酸長になる）。スペーサーとして利用されるIgG4ドメインは、ヒトFc受容体への結合を阻止する変異を含んでいてもよい。特定の実施形態において、この変異には、IgG4のCH2ドメインの最初の6個のアミノ酸（APEFLG、配列番号145）を、IgG2の最初の5個のアミノ酸（APPVA、配列番号146）で置換することが含まれる。特定の実施形態において、長いスペーサーは、CH2ドメインに4/2-NQ変異を有するように組換えられている。

【0050】

本開示の様々な態様について、さらに詳しく補足しながら以下で説明する。本開示の様々な態様は、以下の項目、すなわち、(i) 免疫細胞；(ii) 細胞試料の回収および細胞濃縮；(iii) キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子組換えされた細胞集団；(iii-a) 遺伝子工学的手法；(iii-b) CARの構成要素；(iii-b-i) 結合ドメイン；(iii-b-ii) スペーサー；(iii-b-iii) 膜貫通ドメイン；(iii-b-iv) 細胞内エフェクタードメイン；(iii-b-v) リンカー；(iii-b-vi) タグカセット、形質導入マーカーおよび／または自殺スイッチを含む制御機能；(iii-b-vii) 多量体化ドメイン；(iv) 遺伝子組換え細胞の特性評価；(v) 細胞活性化培養条件；(vi) エクスビボで製造された細胞製剤；(vii) インビボで細胞を組換えるための標的指向性ウイルスベクターおよびナノ粒子；(viii) 使用方法；(ix) 対照集団から得られる参照レベル；(x) キット；(xi) 例示的な実施形態；(xii) 実験例；ならびに (xiii) 結語に沿って説明する。これらの見出しは、系統的に説明する目的のみで記載されており、本開示の範囲や解釈を限定するものではない。

【0051】

(i) 免疫細胞

本開示は、CARを発現するように遺伝子組換えされた細胞について述べる。遺伝子組換え細胞は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK-T細胞、単球／マクロファージ、リンパ球、造血幹細胞（HSC）、造血前駆細胞（HPC）、および／またはHSCとHPCの混合物（すなわちHSPC）を含んでいてもよい。特定の実施形態において、遺伝子組換え細胞はT細胞を含む。

【0052】

いくつかの種類のT細胞のサブセットがこれまでに見出されており、それぞれのT細胞サブセットが、特徴的な機能を有する。例えば、T細胞の大半は、数個のタンパク質の複合体として存在するT細胞受容体（TCR）を有する。実際のT細胞受容体は、2つの別個のペプチド鎖で構成されており、これらのペプチド鎖は、独立した遺伝子であるT細胞受容体 α 遺伝子とT細胞受容体 β 遺伝子（TCR α とTCR β ）からそれぞれ産生され、 α TCR鎖と β TCR鎖と呼ばれる。

【0053】

$\gamma\delta$ T細胞は、その表面上に特徴的なT細胞受容体（TCR）を持つT細胞の小さなサブセットである。 $\gamma\delta$ T細胞において、TCRは、1つの γ 鎖と1つの δ 鎖から構成されている。このグループのT細胞は、 $\alpha\beta$ T細胞ほどには一般的に認められない（T細胞全体の2%しか存在しない）。

【0054】

CD3は、あらゆる成熟T細胞に発現されている。活性化T細胞は、4-1BB（CD137）、CD69およびCD25を発現している。T細胞上には、CD5とトランスフェリン受容体も発現されている。

【0055】

T細胞は、ヘルパーT細胞（CD4+T細胞）と細胞傷害性T細胞（CTL、CD8+T細胞）にさらに分類することができ、細胞傷害性T細胞には細胞溶解性T細胞が含まれる。ヘルパーT細胞は、免疫学的プロセスにおいて他の白血球を助ける役割を果たしており、形質細胞へのB細胞の成熟や、細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化という機能を発揮する。ヘルパーT細胞は、その表面にCD4タンパク質を発現することから、CD4+

T細胞としても知られている。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞（APC）の表面上に発現されるMHCクラスII分子によるペプチド抗原の提示を受けて活性化される。ヘルパーT細胞は、活性化されると、急速に分裂して、活発な免疫応答の調節または支援を担うサイトカインと呼ばれる小型のタンパク質を分泌する。

【0056】

細胞傷害性T細胞は、ウイルス感染細胞と腫瘍細胞を破壊することができ、移植拒絶反応にも関与している。細胞傷害性T細胞は、その表面にCD8糖タンパク質を発現することから、CD8+T細胞としても知られている。細胞傷害性T細胞は、生体内のほぼすべての細胞の表面に存在するMHCクラスI分子に結合した抗原に結合することによって、その標的を認識する。

【0057】

本明細書において、「セントラルメモリー」T細胞（または「TCM」）は、抗原を経験したCTLであり、ナイーブ細胞と比較して、その表面上にCD62LまたはCCR-7とCD45ROを発現するが、CD45RAを発現していないか、CD45RAの発現が低下しているCTLを指す。特定の実施形態において、セントラルメモリー細胞は、ナイーブ細胞と比較して、CD62L、CCR7、CD25、CD127、CD45ROおよびCD95の発現が陽性であり、CD45RAの発現が低下している。

【0058】

本明細書において、「エフェクターメモリー」T細胞（または「TEM」）は、抗原を経験したT細胞であり、セントラルメモリー細胞と比較して、その表面上にCD62Lを発現していないか、CD62Lの発現が低下しており、ナイーブ細胞と比較して、CD45RAを発現していないか、CD45RAの発現が低下しているT細胞を指す。特定の実施形態において、エフェクターメモリー細胞は、ナイーブ細胞またはセントラルメモリー細胞と比較して、CD62LおよびCCR7の発現が陰性であり、CD28およびCD45RAの発現が陽性あるいは陰性である。また、エフェクターT細胞は、メモリーT細胞またはナイーブT細胞と比較して、グランザイムBおよびパーフォリンが陽性である。

【0059】

本明細書に記載の「ナイーブ」T細胞は、抗原を経験していないT細胞であり、セントラルメモリー細胞またはエフェクターメモリー細胞と比較して、CD62LおよびCD45RAを発現しており、CD45ROを発現していないT細胞を指す。特定の実施形態において、ナイーブCD8+Tリンパ球は、ナイーブT細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられ、ナイーブT細胞の表現型マーカーとしては、CD62L、CCR7、CD28、CD127およびCD45RAが挙げられる。

【0060】

ナチュラルキラー細胞（NK細胞、K細胞およびキラー細胞としても知られている）は、インターフェロンまたはマクロファージ由来のサイトカインに応答して活性化される。NK細胞は、ウイルス感染症を抑える役割を果たすのに対して、獲得免疫応答では、感染症を排除することができる抗原特異的細胞傷害性T細胞が産生される。NK細胞は、CD8、CD16およびCD56を発現するが、CD3は発現していない。

【0061】

NK細胞にはNK-T細胞が含まれる。NK-T細胞は、特化したT細胞集団であり、セミンバリアントT細胞受容体（TCR $\alpha\beta$ ）と、ナチュラルキラー細胞に通常関連する表面抗原とを発現している。NK-T細胞は、抗細菌免疫応答と抗ウイルス免疫応答に寄与し、腫瘍関連免疫監視または腫瘍関連免疫抑制を促進する。ナチュラルキラー細胞と同様に、NK-T細胞も、パーフォリン、FasおよびTNFに関連する細胞傷害性を誘導することができる。活性化されたNK-T細胞は、IFN- γ とIL-4を産生することができる。特定の実施形態において、NK-T細胞はCD3+/CD56+である。

【0062】

マクロファージ（およびその前駆細胞である単球）は、生体内のあらゆる組織に存在し（場合によっては、ミクログリア、クッパー細胞および破骨細胞として存在し）、アポト

10

20

30

40

50

ーシスを起こした細胞、病原体およびその他の非自己成分を貪食する。単球／マクロファージは、CD11b、F4/80；CD68；CD11c；IL-4R α ；および／またはCD163を発現する。

【0063】

未熟な樹状細胞（すなわち前活性化状態の樹状細胞）は、末梢の抗原およびその他の非自己成分を貪食して、活性化状態となり、リンパ組織のT細胞領域に遊走してT細胞に抗原を提示する。樹状細胞は、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD21、CD35、CD39、CD40、CD86、CD101、CD148、CD209およびDEC-205を発現する。

【0064】

造血幹／前駆細胞すなわちHSPCは、造血幹細胞と造血前駆細胞の組み合わせを指す。

10

【0065】

造血幹細胞は、インビボで自己複製が可能であるか、インビトロで自己複製して実質的に無制限に増殖することが可能であり、その他の種類のあらゆる造血細胞に分化することができる未分化の造血細胞を指す。

【0066】

造血前駆細胞は、造血幹細胞に由来する細胞であるか、または成熟細胞にさらに分化可能な胎生組織に由来する細胞である。特定の実施形態において、造血前駆細胞は、CD24^{lo} Lin⁻CD117⁺造血前駆細胞である。HPCは、(i) 骨髄系前駆細胞に分化して、最終的に単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板または樹状細胞を発生させることができるか、あるいは(ii) リンパ系前駆細胞に分化して、最終的にT細胞、B細胞およびNK細胞を発生させることができる。

20

【0067】

HSPCは、他の種類の造血細胞と比べてHSPCにおいて発現量が増加する特異的マーカーが陽性であってもよい。そのようなマーカーとして、例えば、CD34、CD43、CD45RO、CD45RA、CD59、CD90、CD109、CD117、CD133、CD166、HLA DRまたはこれらの組み合わせが挙げられる。さらに、HSPCは、他の種類の造血細胞において発現されるマーカーが陰性であってもよい。そのようなマーカーとして、例えば、Lin、CD38またはその組み合わせが挙げられる。HSPCはCD34⁺細胞であることが好ましい。

【0068】

細胞もしくは細胞集団が特定のマーカーに対して「陽性」であるという説明、または細胞もしくは細胞集団が特定のマーカーを発現するという説明は、細胞の表面または細胞の内部に検出可能な特定のマーカーが存在することを意味する。細胞表面マーカーについて述べる場合、「陽性」は、例えば、細胞表面マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、その抗体を検出することなどを利用したフローサイトメトリーにより検出される細胞表面発現が存在し、その染色が、フローサイトメトリーにおいて、アイソタイプを一致させた対照を用いて同一の条件で同じ手順で検出した染色よりも実質的に高レベルで検出されるか、かつ／またはそのマーカーが陽性であることが知られている細胞の染色と同程度のレベルで検出されるか、かつ／またはそのマーカーが陰性であることが知られている細胞の染色よりも実質的に高レベルで検出されることを意味する。

30

【0069】

細胞もしくは細胞集団が特定のマーカーに対して「陰性」であるという説明、または細胞もしくは細胞集団がマーカーを発現しないという説明は、細胞の表面または細胞の内部に実質的に検出可能な特定のマーカーが存在しないことを意味する。細胞表面マーカーについて述べる場合、「陰性」は、例えば、細胞表面マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、その抗体を検出することなどを利用したフローサイトメトリーにより検出される細胞表面発現が存在せず、その染色が、フローサイトメトリーにおいて、アイソタイプを一致させた対照を用いて同一の条件で同じ手順で検出した染色よりも実質的に高レベルで検出されないか、かつ／またはそのマーカーが陽性であることが知られている細胞の染色よりも実質的に低レベルで検出されるか、かつ／またはそのマーカーが陰性であることが知られている細胞の染色と同程度に検出されることを意味する。

40

50

【0070】

本開示の教示に従って遺伝子が組換えられる細胞は、適切と認められる場合、患者由来の細胞（自家細胞）であってもよく、患者と同種の細胞であってもよく、インビボの細胞またはエクスピボの細胞であってもよい。

【0071】

(ii) 細胞試料の回収および細胞濃縮

試料の回収方法および試料の濃縮方法は、当業者に公知である。いくつかの実施形態において、細胞は細胞株に由来するものである。いくつかの実施形態において、細胞は、異種細胞源から得られたものであり、例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはブタから得られたものである。特定の実施形態において、細胞はヒトに由来するものであり、例えば、治療を受ける患者に由来するものである。

10

【0072】

いくつかの実施形態において、T細胞は、全血、末梢血単核細胞（PBMC）、白血球、骨髓、胸腺、組織生検試料、腫瘍、リンパ節、腸管関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、その他のリンパ組織、肝臓、肺、胃、腸管、大腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸部、精巣、卵巣、扁桃腺もしくはその他の臓器、および／もしくはこれらの臓器に由来する細胞などの試料に由来するもの、またはこれらの試料から単離されたものである。特定の実施形態において、例えば、アフエレーシスや白血球アフエレーシスなどによって、対象の循環血液由来の細胞が得られる。特定の実施形態において、試料は、T細胞などのリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、その他の有核白血球、HSC、HPC、HSPC、赤血球および／または血小板を含み、いくつかの態様において、試料は、赤血球や血小板以外の細胞を含み、さらなる処理が必要とされる。特定の実施形態において、T細胞はPBMCに由来するものである。

20

【0073】

いくつかの実施形態において、対象から回収した血液細胞は、例えば、血漿画分を除去するため、かつ次の処理工程用に適切なバッファーまたは培地に細胞を懸濁するために洗浄を行う。特定の実施形態において、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄する。いくつかの実施形態において、洗浄溶液は、カルシウムおよび／またはマグネシウムを含んでおらず、かつ／または二価カチオンの大部分を含んでいないか、二価カチオンを全く含んでいない。洗浄は、半自動「フロースルー」遠心分離機（例えばCobe 2991セルプロセッサー、Baxter社）を、製造業者の説明書に従って使用して行うことができる。タンジェンシャルフローろ過（TFF）を行うこともできる。特定の実施形態において、洗浄後の細胞は、Ca⁺⁺/Mg⁺⁺不含PBSなどの、様々な種類の生体適合性バッファーに再懸濁することができる。

30

【0074】

単離は、様々な細胞調製工程および細胞分離工程のうちの1つ以上を含んでいてもよく、これらの細胞調製工程および細胞分離工程には、大きさ、密度、特定の試薬に対する感受性もしくは耐性、ならびに／または抗体もしくはその他の結合パートナーに対する親和性（例えば免疫親和性）などの1つ以上の特性に基づいた分離が含まれる。特定の実施形態において、単離は、1つの装置または1つの設備を使用して単一の方法で連続的および／または同時に行われる。特定の実施形態において、様々な異なる集団の単離、培養および／または組換えは、1つの試料などの1つの出発組成物または出発材料から開始される。

40

【0075】

特定の実施形態において、試料は、密度を利用した細胞分離法およびその関連手法を用いてT細胞を濃縮することができる。例えば、白血球は、赤血球を溶解した後に、パーコール濃度勾配またはフィコール濃度勾配を利用して遠心分離することによって、末梢血中のその他の種類の細胞から分離することができる。

【0076】

特定の実施形態において、特定の種類のT細胞を濃縮していないバルクT細胞集団を使

50

用することができる。特定の実施形態において、細胞マーカーを利用したポジティブ選択および／またはネガティブ選択により、選択された種類のT細胞を濃縮および／または単離することができる。ポジティブ選択では、捕捉剤に結合した細胞マーカーを有する細胞を取得して、次の用途に使用する。ネガティブ選択では、細胞マーカーに対する抗体などの捕捉剤に結合しなかった細胞を取得して、次の用途に使用する。いくつかの例では、ポジティブ選択された画分とネガティブ選択された画分の両方を取得して、次の用途に使用することができる。特定の実施形態において、CD4+T細胞および／またはCD8+T細胞はPBMCから濃縮される。

【0077】

上記の細胞分離によって、特定のマーカーを発現する特定の細胞集団または細胞の100%の濃縮または除去が達成される必要はない。例えば、特定の種類の細胞のポジティブ選択または濃縮は、そのような細胞の数または割合を増加させることを意味するが、そのマーカーを発現しない細胞を完全に除去する必要はない。同様に、特定の種類の細胞のネガティブ選択、除去または排除は、そのような細胞の数または割合を減少させることを意味するが、そのような細胞を完全に除去する必要はない。

【0078】

いくつかの例では、分離工程を複数回行うことによって、1回の工程でポジティブ選択された画分またはネガティブ選択された画分を、次のポジティブ選択またはネガティブ選択などの別の分離工程で処理する。

【0079】

いくつかの実施形態では、細胞マーカーに対する抗体または結合ドメインを、磁気ビーズや常磁性ビーズなどの固体担体または固体マトリックスに結合させて、ポジティブ選択および／またはネガティブ選択により、細胞を分離することができる。例えば、いくつかの実施形態では、免疫磁気分離技術（または親和性磁気分離技術）を用いて、細胞および細胞集団を分離または単離する（Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher (c) Humana Press Inc., Totowa, NJ)の「Methods」において総説されている）。さらに、米国特許公開第4,452,773号；米国特許公開第4,795,698号；米国特許公開第5,200,084号；および欧州特許公開第452342号も参照されたい。

【0080】

いくつかの実施形態において、親和性を利用した選択は、磁気活性化セルソーティング（MACS）（ミルテニーバイオテク社、カリフォルニア州オーバーン）によって行われる。MACSシステムは、磁性粒子が結合した細胞を高純度で選択することができる。特定の実施形態では、外部磁界を印加した後に非標的種と標的種を連続的に溶出するモードでMACSを作動させる。すなわち、磁性粒子に結合した細胞を保持しつつ、磁性粒子に結合しなかった細胞を溶出させる。次に、この第1の溶出工程が終了したら、磁場でトラップして溶出を阻止した細胞を、溶出と回収が可能となる何らかの方法で解放する。特定の実施形態では、非標的細胞に標識して、不均一細胞集団から除去する。

【0081】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の細胞集団は、複数の細胞表面マーカーが染色された細胞を流体の流れに乗せて分析を行うフローサイトメトリーにより、回収および濃縮される（または除去される）。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の細胞集団は、分取用（FACS）ソーティングにより、回収および濃縮される（または除去される）。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の細胞集団は、微小電気機械システム（MEMS）チップと、FACSを利用した検出システムとを組み合わせて使用することにより、回収および濃縮される（または除去される）（例えば、WO2010/033140、Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573；およびGodin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376を参照されたい）。いずれの場合でも、複数のマーカーで細胞を標識して、明確に定義された細胞のサブセットを高純度で単離することができる。

【0082】

様々なT細胞亜集団の細胞マーカーについては、前述した通りである。特定の実施形態において、特定のT細胞亜集団、例えば、1つ以上の細胞表面マーカーが陽性であるか、高発現しているT細胞、例えば、CCR7、CD45RO、CD8、CD27、CD28、CD62L、CD127、CD4かつ／またはCD45RA T細胞は、ポジティブ選択技術またはネガティブ選択技術により単離される。

【0083】

CD3+CD28+T細胞は、抗CD3／抗CD28結合磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T Cell Expander）を用いて、ポジティブ選択して、増殖させることができる。

10

【0084】

特定の実施形態において、CD8+またはCD4+の選択工程を行うことによって、CD4+ヘルパーT細胞とCD8+細胞傷害性T細胞を分離する。このようなCD8+集団とCD4+集団は、1つ以上のナイーブT細胞亜集団、メモリーT細胞亜集団および／またはエフェクターT細胞亜集団に発現されるマーカー、またはこれらのT細胞亜集団において比較的高発現されているマーカーのポジティブ選択またはネガティブ選択を行うことによって、様々な亜集団にさらにソートすることができる。

【0085】

いくつかの実施形態において、セントラルメモリーT（TCM）細胞を得るための濃縮を行う。特定の実施形態において、メモリーT細胞は、CD8+末梢血リンパ球のCD62L陽性サブセットとCD62L陰性サブセットの両方に含まれている。PBMCは、抗CD8抗体および抗CD62L抗体などを使用して、CD62L画分、CD8画分および／またはCD62L+CD8+画分を濃縮または除去することができる。

20

【0086】

いくつかの実施形態において、セントラルメモリーT（TCM）細胞は、CCR7、CD45RO、CD27、CD62L、CD28、CD3および／またはCD127の細胞表面発現が陽性または高発現していることに基づいて濃縮される。いくつかの態様では、TCM細胞は、CD45RAおよび／またはグランザイムBを発現または高発現する細胞のネガティブ選択により濃縮される。いくつかの態様において、TCM細胞が濃縮されたCD8+集団の単離は、CD4、CD14およびCD45RAを発現する細胞を除去し、かつCCR7、CD45ROおよび／またはCD62Lを発現する細胞をポジティブ選択または濃縮することによって行われる。一態様において、セントラルメモリーT（TCM）細胞の濃縮は、CD4の発現に基づいて選択された陰性細胞画分から開始し、この画分に対して、CD14とCD45RAの発現に基づくネガティブ選択と、CD62Lの発現に基づくポジティブ選択を行うことにより実施される。このような選択は、いくつかの態様では同時に行われ、別の態様では連続して行われ、どのような順序で行ってもよい。いくつかの態様において、CD8+細胞集団またはCD8+細胞亜集団の調製に使用したのと同じ選択工程をCD4の発現に基づいて実施することによって、CD4+細胞集団またはCD4+細胞亜集団を得ることもでき、この際、CD4に基づく分離により得られた陽性画分と陰性画分の両方を保持して、さらに1つ以上のポジティブ選択工程またはネガティブ選択工程を行ってもよい。

30

40

【0087】

さらに、公知のマーカープロファイルと公知の技術に基づいて、その他の種類の細胞を濃縮することもできる。例えば、CD34+のHSC、HSPおよびHSPCは、磁性微粒子に直接または間接的に結合させた抗CD34抗体と、磁気細胞セパレーター（例えば、CliniMACS（登録商標）細胞分離システム（ミルテニーバイオテク社、ドイツ、ベルギッシュ・グラートバッハ））を組み合わせ使用して濃縮することができる。

【0088】

(iii) キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子組換えされた細胞集団

本明細書に記載のキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように、細胞集団の遺伝子組換えを行ってもよい。

50

【0089】

(iii-a) 遺伝子工学的手法

本明細書に開示されたCARをコードする所望の遺伝子は、当技術分野で公知の方法によって細胞に導入することができ、このような方法として、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、遺伝子配列を含むウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体による遺伝子移入、微小核細胞融合法による遺伝子移入、スフェロプラスト融合、インビボナノ粒子による送達などが挙げられる。当技術分野において、外来遺伝子を細胞に導入する技術として様々なものが知られており（例えば、Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen, et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29:69-92を参照されたい）、レシピエント細胞に必要な発達機能および生理機能が過度に破壊されない範囲で、このような技術を使用してもよい。外来遺伝子が細胞において発現されるように、かつ特定の例では、好ましくは遺伝性であり、その子孫細胞でも発現されるように、これらの技術を利用して、細胞に外来遺伝子を安定に移入することができる。

10

【0090】

「遺伝子」は、本明細書に記載のSTEAP1結合ドメインを含むCARをコードする核酸配列を指す。この用語の定義には、様々な配列多型、変異および／または配列バリエーションが含まれ、このような変化は、コードされているCARの機能に実質的な影響を与えない。「遺伝子」という用語は、コード配列だけでなく、プロモーター領域、エンハンサー領域、終結領域などの調節領域を含んでいてもよい。分子をコードする遺伝子配列は、CARの発現を誘導するDNAまたはRNAであってもよい。これらの核酸配列は、RNAに転写されるDNA鎖配列またはタンパク質に翻訳されるRNA配列であってもよい。この核酸配列には、全長核酸配列と、全長タンパク質に由来する部分配列の両方が含まれる。これらの配列は、特定の種類の細胞においてコドン選択性を付与するために導入してもよい配列、または天然配列の縮重コドンをさらに含んでいてもよい。完全な遺伝子配列の一部も、当業者により理解されるものとして、本開示を通して参照している。

20

【0091】

CARをコードする遺伝子配列が本明細書において提供され、この遺伝子配列は、本明細書で提供されるその他の情報に基づいて、関連するアミノ酸配列から、合成法または組換え法により容易に作製することができる。いくつかの実施形態において、これらの配列のいずれかをコードする遺伝子配列は、これらの配列をコードする遺伝子配列を容易に切断し、別の配列をコードする別の遺伝子配列と容易に置換できるように、コード配列の5'末端および／または3'末端に1つ以上の制限酵素部位を有していてもよい。いくつかの実施形態において、上記配列をコードする遺伝子配列は、哺乳動物細胞での発現用にコドン最適化されていてもよい。

30

【0092】

「コードする」は、cDNAやmRNAなどの、遺伝子内の特定のヌクレオチド配列が、規定されたアミノ酸配列などの別の巨大分子を合成するための鋳型として機能するという特性を指す。したがって、特定の遺伝子に対応するmRNAが転写および翻訳されて、細胞またはその他の生物系においてタンパク質が産生される場合、その遺伝子はこのタンパク質をコードする。「タンパク質をコードする遺伝子配列」には、同じアミノ酸配列または実質的に類似の形態および機能を有するアミノ酸配列をコードするあらゆる縮重ヌクレオチド配列が含まれる。

40

【0093】

発現されるCARの2つ以上の部分をコードする複数のポリヌクレオチド遺伝子配列は、互いに作動可能に連結することができ、関連する調節配列に連結することもできる。例えば、調節配列と外因性核酸配列が機能的に連結されている場合があり、これによって外因性核酸配列が発現される。別の一例において、第1の核酸配列と第2の核酸配列が、機

50

能的に関連するように配置されている場合、この第1の核酸配列と第2の核酸配列は、作動可能に連結されていてもよい。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、このプロモーターは、このコード配列に作動可能に連結されている。通常、作動可能に連結されているDNA配列は連続しており、コード領域が必要であったり有用である場合、同じリーディングフレーム内にコード領域が連結されている。

【0094】

「ベクター」は、別の核酸を輸送することができる核酸分子である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、ファージのいずれであってもよい。「発現ベクター」とは、適切な環境下に置かれた場合に、該発現ベクター内に組み込まれた1つ以上の遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を誘導することができるベクターである。

10

【0095】

「レンチウイルス」は、分裂細胞および非分裂細胞に感染することができるレトロウイルス属のウイルスを指す。レンチウイルスのいくつかの例として、HIV（ヒト免疫不全ウイルス：HIV1型およびHIV2型を含む）；ウマ伝染性貧血ウイルス；ネコ免疫不全ウイルス（FIV）；ウシ免疫不全ウイルス（BIV）；およびサル免疫不全ウイルス（SIV）が挙げられる。

【0096】

レンチウイルスベクターは、少なくともレンチウイルスゲノムの一部に由来するベクターであり、特に、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)に記載されているような自己不活性型レンチウイルスベクターが挙げられる。臨床で使用されてもよいレンチウイルスベクターのその他の例として、Oxford BioMedica社から市販されているLENTIVECTOR（登録商標）遺伝子送達技術、Lentigen社から市販されているLENTIMAXTMベクターシステムなどが挙げられる。さらに、非臨床用のレンチウイルスベクターも利用可能であり、当業者に公知である。特定の実施形態では、レンチウイルスまたはレンチウイルスベクターを使用して、CARを発現するように細胞の遺伝子組換えを行う。

20

【0097】

「レトロウイルス」は、RNAゲノムを有するウイルスである。「ガンマレトロウイルス」は、レトロウイルス科に属するウイルスを指す。例示的なガンマレトロウイルスとして、マウス幹細胞ウイルス、マウス白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス、およびトリ細網内皮症ウイルスが挙げられる。

30

【0098】

レトロウイルスベクターを使用することもできる（Miller, et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599を参照されたい）。そのような実施形態において、発現される遺伝子は、レトロウイルスベクターにクローニングされて、細胞内に送達される。特定の実施形態において、レトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージングと組み込みに必要とされるシス作用配列をすべて含んでおり、すなわち、（a）ベクターの両末端に位置する長鎖末端反復配列（LTR）またはその一部と、（b）マイナス鎖およびプラス鎖のDNA合成のためのプライマー結合部位と、（c）ゲノムRNAのビリオンへの組み込みに必要とされるパッケージングシグナルとを含んでいる。レトロウイルスベクターに関するさらに詳しい説明は、Boesen, et al., 1994, Biotherapy 6:291-302; Cloves, et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiem, et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; およびGrossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114に記載されている。アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）およびアルファウイルスを使用することもできる。Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503, Rosenfeld, et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld, et al., 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli, et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; Walsh, et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; およびLundstrom, 1999, J. R

40

50

except. Signal Transduct. Res. 19: 673-686を参照されたい。その他の遺伝子送達方法として、哺乳動物の人工染色体 (Vos, 1998, Curr. Op. Genet. Dev. 8:351-359) ; リボソーム (Tarahovsky and Ivanitsky, 1998, Biochemistry (Mosc) 63:607-618) ; リボザイム (Branch and Klotman, 1998, Exp. Nephrol. 6:78-83) ; および三重らせんDNA (Chan and Glazer, 1997, J. Mol. Med. 75:267-282) の使用が挙げられる。

【0099】

本開示に好適であり利用可能なウイルスベクターには数多くのものがあり、これにはヒトの遺伝子治療用に同定されたものが含まれる (Pfeifer and Verma, 2001, Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177を参照されたい)。レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターの使用法、ならびにCAR導入遺伝子を含むウイルス粒子で哺乳動物宿主細胞を形質導入するための細胞へのパッケージング方法は、例えば、米国特許公開第8,119,772号; Walchli, et al., 2011, PLoS One 6:327930; Zhao, et al., 2005, J. Immunol. 174:4415; Engels, et al., 2003, Hum. Gene Ther. 14:1155; Frecha, et al., 2010, Mol. Ther. 18:1748; およびVerhoeven, et al., 2009, Methods Mol. Biol. 506:97に記載されている。さらに、レトロウイルスおよびレンチウイルスのベクターコンストラクトならびにその発現系は市販されている。

【0100】

標的化された遺伝子工学的方法を利用してもよい。CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas (CRISPR関連タンパク質) ヌクレアーゼシステムは、細菌系を利用した遺伝子工学に用いられる組換えヌクレアーゼシステムである。CRISPR-Casシステムに関する情報およびその構成要素は、例えば、米国特許公開第8697359号、米国特許公開第8771945号、米国特許公開第8795965号、米国特許公開第8865406号、米国特許公開第8871445号、米国特許公開第8889356号、米国特許公開第8889418号、米国特許公開第8895308号、米国特許公開第8906616号、米国特許公開第8932814号、米国特許公開第8945839号、米国特許公開第8993233号および米国特許公開第8999641号ならびにこれらの関連出願; ならびにWO 2014/018423、WO2014/093595、WO2014/093622、WO2014/093635、WO2014/093655、WO2014/093661、WO2014/093694、WO2014/093701、WO2014/093709、WO2014/093712、WO2014/093718、WO2014/145599、WO2014/204723、WO2014/204724、WO2014/204725、WO2014/204726、WO2014/204727、WO2014/204728、WO2014/204729、WO2015/065964、WO2015/089351、WO2015/089354、WO2015/089364、WO2015/089419、WO2015/089427、WO2015/089462、WO2015/089465、WO2015/089473、WO2015/089486、WO2016205711、WO2017/106657およびWO2017/127807ならびにこれらの関連出願に記載されている。

【0101】

特定の実施形態では、遺伝子編集剤としてジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を使用する。ZFNは、特定の位置でDNAに結合してこれを切断するように組換えられた部位特異的なヌクレアーゼの1種である。ZFNは、DNA配列の特定の部位に二本鎖切断 (DSB) を導入するために使用され、二本鎖切断が導入されることにより、様々な種類の細胞のゲノム内のユニークな配列をターゲティングすることができる。ジンクフィンガーは、ジンクフィンガー結合ドメイン内の30アミノ酸長のドメインであり、その構造は、亜鉛イオンの配位により安定化されている。ジンクフィンガーの例として、C2H2ジンクフィンガー、C3Hジンクフィンガー、およびC4ジンクフィンガーが挙げられる。設計されたジンクフィンガードメインは、自然界には存在しないドメインであり、主に合理的な基準を元にその設計/組成が構築されており、例えば、既存のZFPの設計および結合データに関する情報を格納しているデータベース内の情報を処理するコンピューターアルゴリズムや置換規則の適用などに基づいて作製される。よく知られているZFNの例として、F

okIヌクレアーゼとジンクフィンガーDNA結合ドメインの融合体がある。ZFNに関するさらなる情報および本開示の教示の範囲内で有用なZFNについては、例えば、米国特許公開第6,534,261号；米国特許公開第6,607,882号；米国特許公開第6,746,838号；米国特許公開第6,794,136号；米国特許公開第6,824,978号；米国特許公開第6,866,997号；米国特許公開第6,933,113号；米国特許公開第6,979,539号；米国特許公開第7,013,219号；米国特許公開第7,030,215号；米国特許公開第7,220,719号；米国特許公開第7,241,573号；米国特許公開第7,241,574号；米国特許公開第7,585,849号；米国特許公開第7,595,376号；米国特許公開第6,903,185号；米国特許公開第6,479,626号；米国特許公開第2003/0232410号および米国特許公開第2009/0203140号、ならびにGaj et al., Nat Methods, 2012, 9(8):805-7；Ramirez et al., Nucl Acids Res, 2012, 40(12):5560-8；Kim et al., Genome Res, 2012, 22(7): 1327-33；Urnov et al., Nature Reviews Genetics, 2010, 11:636-646；Miller, et al. Nature biotechnology 25, 778-785 (2007)；Bibikova, et al. Science 300, 764 (2003)；Bibikova, et al. Genetics 161, 1169-1175 (2002)；Wolfe, et al. Annual review of biophysics and biomolecular structure 29, 183-212 (2000)；Kim, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 1156-1160 (1996)；およびMiller, et al. The EMBO journal 4, 1609-1614 (1985)を参照されたい。

10

【0102】

特定の実施形態では、遺伝子編集剤として転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）を用いることができる。TALENは、転写活性化因子様エフェクター（TALE）DNA結合タンパク質とDNA切断ドメインを含む融合タンパク質である。TALENは、DNAに二本鎖切断を誘導して細胞の修復機構を誘導することによって、遺伝子およびゲノムを編集するために使用される。一般に、2つのTALENが、標的DNA部位の両側に結合して、この標的DNA部位を挟み込み、DNA切断ドメインを二量化して、二本鎖切断を誘導する。TALENに関するさらなる情報については、米国特許公開第8,440,431号；米国特許公開第8,440,432号；米国特許公開第8,450,471号；米国特許公開第8,586,363号；および米国特許公開第8,697,853号；ならびにJoung and Sander, Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(1):49-55；Beurdeley et al., Nat Commun, 2013, 4: 1762；Scharenberg et al., Curr Gene Ther, 2013, 13(4):291-303；Gaj et al., Nat Methods, 2012, 9(8):805-7；Miller, et al. Nature biotechnology 29, 143-148 (2011)；Christian, et al. Genetics 186, 757-761 (2010)；Boch, et al. Science 326, 1509-1512 (2009)；およびMoscou, & Bogdanove, Science 326, 1501 (2009)を参照されたい。

20

30

【0103】

特定の実施形態では、遺伝子編集剤としてMegaTALを使用することができる。MegaTALは、一本鎖を極めてまれな位置で切断するヌクレアーゼ構造を有し、メガヌクレアーゼのDNA切断ドメインにTALEが融合されている。メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼとも呼ばれる）は、DNA認識能とヌクレアーゼ機能を同ドメインに併せ持つ単鎖ペプチドである。megaTALは、TALENとは異なり、その機能活性に単一のペプチド鎖の送達を必要とする。

40

【0104】

特定の実施形態では、細胞内へのCARコンストラクトの組み込みを行うために、遺伝子編集剤として、トランスポゾンを利用したシステムを使用することができる。一般に、そのような方法では、(i) トランスポゼース（またはトランスポゼースポリペプチド）をコードする第1のベクターと、(ii) トランスポゾン反復配列により挟まれた所望の遺伝子因子をコードする第2のベクターを細胞に導入する。トランスポゾンすなわち転移因子は、その上流と下流に末端反復配列を有する（短い）核酸配列を含み、標的DNA配列の切断と、標的DNA配列への核酸の挿入を促進する酵素をコードしている。

【0105】

50

異種DNA配列の遺伝子挿入に適合するように構築されたトランスポゾン／トランスポゼースシステムが数種類存在する。そのようなトランスポゼースの例として、sleeping beauty（「SB」、例えば、サケ科魚類のゲノムに由来するもの）；piggyback（例えば、鱗翅目の昆虫細胞および／またはトビイロホオヒゲコウモリに由来するもの）；mariner（例えば、ショウジョウバエに由来するもの）；frog prince（例えば、ヒョウガエルに由来するもの）；Tol1；Tol2（例えば、メダカに由来するもの）；TcBuster（例えば、コクヌストモドキ（*Tribolium castaneum*）に由来するもの）、Helraiser、Himar1、Passport、Minos、Ac/Ds、PIF、Harbinger、Harbinger3-DR、HSmr1およびspinONが挙げられる。トランスポゼースおよびトランスポゾンシステムは、米国特許第6,489,458号；米国特許第7,148,203号；米国特許第8,227,432号；および米国特許第9,228,180号にも記載がある。

10

【0106】

(iii-b) CARの構成要素

前述したように、CAR分子は、遺伝子組換えされたT細胞が、がん細胞などの望ましくない細胞を認識して、これを殺傷することを可能にするいくつかの特徴的な構成要素を含む。これらの構成要素は、少なくとも細胞外部分と細胞内部分を含む。この細胞外部分には、望ましくない細胞の表面に選択的に存在するマーカーに特異的に結合する結合ドメインが含まれる。そのようなマーカーに結合ドメインが結合すると、結合した細胞を破壊するように、細胞内部分がT細胞を活性化する。CARは、細胞外部分を細胞内部分に連結する膜貫通ドメインと、CARの機能を増強することができるその他の構成要素とをさらに含む。例えば、スペーサー配列および／または1つ以上のリンカー配列をCARに組み込むことによって、CARの立体構造に柔軟性をさらに付与することができ、標的細胞のマーカーに対する結合ドメインの結合能を増強できることが多い。

20

【0107】

(iii-b-i) 結合ドメイン

特定の例において、本開示は、STEAP1に結合する抗体に基づくCARに使用される結合ドメインを提供する。抗体は、重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子という2つの遺伝子から生成される。抗体は、通常、重鎖の2つの同一コピーと軽鎖の2つの同一のコピーを含む。重鎖可変領域と軽鎖可変領域において、相補性決定領域（CDR）と呼ばれるセグメントが、エピトープへの結合を決定づける。各重鎖は3つのCDR（すなわち、CDRH1、CDRH2およびCDRH3）を有し、各軽鎖は3つのCDR（すなわち、CDRL1、CDRL2およびCDRL3）を有する。CDR領域は、フレームワーク残基（FR）によって挟まれている。CDRまたはFRの正確なアミノ酸配列の境界は、数多くの公知のナンバリングスキームのいずれかを使用して、容易に決定することができる。公知のナンバリングスキームとしては、Kabat et al. (1991) “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (Kabatのナンバリングスキーム)；Al-Lazikani et al. (1997) J Mol Biol 273: 927-948 (Chothiaのナンバリングスキーム)；Maccallum et al. (1996) J Mol Biol 262: 732-745 (Contactのナンバリングスキーム)；Martin et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 9268-9272 (AbMのナンバリングスキーム)；North et al. (2011) J. Mol. Biol. 406(2):228-56 (Northのナンバリングスキーム)；Lefranc M P et al. (2003) Dev Comp Immunol 27(1): 55-77 (IMGTのナンバリングスキーム)；およびHonegger and Pluckthun (2001) J Mol Biol 309(3): 657-670（「Aho」のナンバリングスキーム）によるものが挙げられる。CDRまたはFRの境界は、同定に使用したスキームに応じて様々に変動する場合がある。例えば、Kabatのスキームは構造アライメントに基づいているが、Chothiaのスキームは構造情報に基づいている。また、KabatとChothiaのスキームのナンバリングは、最も一般的な抗体領域配列の長さに基づいており、挿入は、例えば「30a」のような、挿入を示す文字で示され、一部の抗体では欠失が見られる。これらの2つのスキームでは、異なる位置に挿入と欠失（「インデル」）が含まれていることから、ナンバリングが異なって

30

40

50

くる。Contactスキームは、複雑な結晶構造の分析に基づいており、Chothiaのナンバリングスキームと多くの点で類似している。特定の実施形態において、本明細書に開示される抗体のCDR配列は、Kabatのナンバリングに従って示されたものである。Northのナンバリングでは、CDRループの立体構造の構造解析において、他のスキームよりも長い配列が使用されている。CDR残基は、ABodyBuilderなどのソフトウェアプログラムを使用して同定することができる。

【0108】

場合によっては、CARに使用するための、本明細書に記載の結合ドメインに基づく別のscFvを、当技術分野で公知の方法に従って調製することができる（例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい）。scFv分子は、柔軟なポリペプチドリンカーを使用して、抗体のVH領域とVL領域を連結することによって作製することができる。短いポリペプチドリンカー（例えば、5～10アミノ酸長）を使用する場合、鎖内フォールディングが阻止される。鎖間フォールディングには、2つの可変領域が結合して、機能的エピトープの結合部位が形成される必要がある。リンカーの方向性および大きさの例に関しては、例えば、Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448、米国特許公開第2005/0100543号、米国特許公開第2005/0175606号、米国特許公開第2007/0014794号、WO2006/020258、およびWO2007/024715を参照されたい。より具体的には、scFvのVLとVHの連結に使用されるリンカー配列は、通常、5～35アミノ酸長である。特定の実施形態において、VL-VHのリンカーとして、5～35アミノ酸長、10～30アミノ酸長または15～25アミノ酸長が挙げられる。リンカーの長さを変えても、活性が保持されていてもよく、活性が増強されてもよく、これによって、活性研究において優れた有効性が得られてもよい。一般に、CARの結合ドメインとしてscFvが使用されることが多い。特定の実施形態において、本開示のCARは、STEAP1に結合する結合ドメインを含む。特定の実施形態において、STEAP1に結合する結合ドメインは、scFvである。特定の実施形態において、STEAP1に結合する結合ドメインは、バンドルツズマブドチン（DSTP3086S）に由来するscFvである。特定の実施形態において、STEAP1に結合する結合ドメインは、マウスモノクローナル抗体mAb 120.545のヒト化されたバリエーションである。特定の実施形態において、STEAP1に結合する結合ドメインは、配列番号6に示される配列によってコードされる。特定の実施形態において、STEAP1に結合する結合ドメインは、配列番号3に示される。

【0109】

本明細書に開示されたCARでは、Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂などの別の結合断片を使用することもできる。CARで使用するための抗体ベースの結合ドメインフォーマットの別の例として、scFvから作製されたgrababodyや、可溶性VHドメイン抗体が挙げられる。これらの抗体は重鎖可変領域のみを用いて結合領域を形成している。例えば、Jespersen et al., Nat. Biotechnol. 22:1161, 2004; Cortez-Retamozo et al., Cancer Res. 64:2853, 2004; Baral et al., Nature Med. 12:580, 2006; および Barthelémy et al., J. Biol. Chem. 283:3639, 2008を参照されたい。

【0110】

特定の実施形態において、結合ドメインは、ヒト化抗体またはその組換え断片を含む。特定の実施形態において、非ヒト抗体はヒト化されており、ヒトにおいて天然に産生される抗体またはその断片との類似性を増加させるために、抗体の1個以上のアミノ酸残基が改変されている。このような非ヒトアミノ酸残基は、「インポート」残基と呼ばれることが多く、通常、「インポート」可変ドメインから取得される。本明細書に提供されるように、ヒト化抗体または抗体断片は、非ヒト免疫グロブリン分子に由来する1つ以上のCDRと、フレームワーク領域とを含み、フレームワークを含むアミノ酸残基は、ヒト生殖細胞系に由来するものであるか、その大部分がヒト生殖細胞系に由来するものである。ヒト化抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を使用して作製することができ、そのような技術として、CDR移植法（例えば、欧州特許第239,400号；WO 91/09967；およ

び米国特許公開第5,225,539号、米国特許公開第5,530,101号および米国特許公開第5,585,089号を参照されたい)、veneeringまたはresurfacing(例えば、欧州特許公開第592,106号および欧州特許公開第519,596号; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; および Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973を参照されたい)、鎖シャッフリング(例えば、米国特許公開第5,565,332号を参照されたい)、ならびに、例えば、米国特許公開第2005/0042664号、米国特許公開第2005/0048617号、米国特許公開第6,407,213号、米国特許公開第5,766,886号、WO9317105、Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994)、および Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994)に開示されている技術が挙げられる。フレームワーク領域内のフレームワーク残基は、例えば、STEAP1への結合を向上させるために、CD Rドナー抗体由来の対応する残基で置換されることが多い。このようなフレームワーク残基の置換は、当技術分野で公知の方法により特定され、例えば、CD R残基とフレームワーク残基の相互作用をモデル化して、STEAP1への結合に重要なフレームワーク残基を特定し、かつ配列比較により特定の位置に通常は見られないフレームワーク残基を特定することによって行われる(例えば、米国特許公開第5,585,089号; および Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323を参照されたい)。

10

20

【0111】

機能性バリエーションは、タンパク質の生理的作用に実質的な影響を与えない1つ以上の残基の付加または置換を含む。また、機能性断片は、タンパク質の生理的作用に実質的な影響を与えない1つ以上の欠失または切断を含む。実質的な影響がないことは、活性化試験または結合試験において実験的に同程度の結果が観察されることから確認することができる。細胞内ドメイン(例えば細胞内シグナル伝達部分)の機能性バリエーションおよび機能性断片は、本開示で述べた活性化状態にある場合、野生型参照細胞内ドメインと同程度の活性化シグナルまたは抑制シグナルを伝達する。また、結合ドメインの機能性バリエーションおよび機能性断片は、野生型参照結合ドメインと同程度のレベルでそれらのコグネイト抗原またはコグネイトリガンドに結合する。

30

【0112】

特定の実施形態において、本開示の結合ドメインのVL領域は、本開示の抗体のVL領域に由来するものであるか、本開示の抗体のVL領域を元に作製されたものであり、本開示の抗体のVL領域と比較して、1個以上(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個)の挿入、1個以上(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個)の欠失、1個以上(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個)のアミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)、またはこれらの変化の組み合わせを含む。各CDRに変化が含まれていないか、多くても1個、2個または3個の変化しか含まれておらず、かつ組換えられたVL領域を含む結合ドメインが、野生型の結合ドメインと同程度の親和性で標的に特異的に結合できる限り、挿入、欠失または置換は、VL領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端または両端を含むVL領域のどの位置に存在していてもよい。

40

【0113】

特定の実施形態において、本開示の結合ドメインのVH領域は、本開示の抗体のVH領域に由来するものであるか、本開示の抗体のVH領域を元に作製されたものであり、本開示の抗体のVH領域と比較して、1個以上(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個)の挿入、1個以上(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個)の欠失、1個以上(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9

50

個、10個)のアミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換)、またはこれらの変化の組み合わせを含んでいてもよい。各CDRに変化が含まれていないか、多くても1個、2個または3個の変化しか含まれておらず、かつ組換えられたVH領域を含む結合ドメインが、野生型の結合ドメインと同程度の親和性で標的に特異的に結合できる限り、挿入、欠失または置換は、VH領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端または両端を含むVH領域のどの位置に存在していてもよい。

【0114】

特定の実施形態において、結合ドメインは、軽鎖可変領域(VL)もしくは重鎖可変領域(VH)またはその両方と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%の同一性を有する配列を含むか、このような同一性を有する配列であり、STEAP1に特異的に結合する本開示の抗体またはその断片もしくは誘導体と比べて、各CDRに変化が含まれていないか、多くても1個、2個または3個の変化しか含まれていない。

【0115】

(iii-b-ii) スペーサー

CARのその他の構成要素から適切な距離を取り、かつ／またはその他の構成要素と比べて柔軟性を持たせるため、スペーサーが使用される。本明細書で述べるように、特定の実施形態において、STEAP1発現細胞に結合し、細胞破壊を誘導できるように、スペーサーの長さはカスタマイズされる。特定の実施形態において、スペーサーの長さは、細胞マーカーのエピトープの位置、エピトープに対する結合ドメインの親和性、および／またはSTEAP1に結合した後の、STEAP1結合因子の細胞破壊誘導能に応じて選択することができる。

【0116】

典型的なスペーサーとして、10～250アミノ酸長のスペーサー、10～200アミノ酸長のスペーサー、10～150アミノ酸長のスペーサー、10～100アミノ酸長のスペーサー、10～50アミノ酸長のスペーサー、または10～25アミノ酸長のスペーサーが挙げられる。

【0117】

特定の実施形態において、スペーサーは、5アミノ酸長、8アミノ酸長、10アミノ酸長、12アミノ酸長、14アミノ酸長、20アミノ酸長、21アミノ酸長、26アミノ酸長、27アミノ酸長、45アミノ酸長、50アミノ酸長または75アミノ酸長である。このような長さのスペーサーは、短いスペーサーに該当する。

【0118】

特定の実施形態において、スペーサーは、76アミノ酸長、90アミノ酸長、100アミノ酸長、110アミノ酸長、120アミノ酸長、125アミノ酸長、128アミノ酸長、131アミノ酸長、135アミノ酸長、140アミノ酸長、150アミノ酸長、160アミノ酸長、170アミノ酸長、または179アミノ酸長である。このような長さのスペーサーは、中程度の長さのスペーサーに該当する。

【0119】

特定の実施形態において、スペーサーは、180アミノ酸長、190アミノ酸長、200アミノ酸長、210アミノ酸長、220アミノ酸長、228アミノ酸長、230アミノ酸長、240アミノ酸長、250アミノ酸長、260アミノ酸長、または270アミノ酸長である。このような長さのスペーサーは、長いスペーサーに該当する。

【0120】

例示的なスペーサーとして、免疫グロブリンのヒンジ領域の全長またはその一部が挙げられる。免疫グロブリンのヒンジ領域は、野生型の免疫グロブリンのヒンジ領域であってもよく、改変された野生型の免疫グロブリンのヒンジ領域であってもよい。特定の実施形態において、免疫グロブリンのヒンジ領域は、ヒト免疫グロブリンのヒンジ領域である。本明細書において、「野生型の免疫グロブリンのヒンジ領域」は、天然の抗体の上部およ

10

20

30

40

50

び中央部において、重鎖のCH1ドメインとCH2ドメインの間に位置してこれらを連結するヒンジのアミノ酸配列（IgG、IgAおよびIgDの場合）、または重鎖のCH1ドメインとCH3のドメインの間に位置してこれらを連結するヒンジのアミノ酸配列（IgEおよびIgMの場合）を指す。

【0121】

免疫グロブリンのヒンジ領域は、IgG、IgA、IgD、IgEまたはIgMのヒンジ領域であってもよい。IgGのヒンジ領域は、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のヒンジ領域であってもよい。IgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはIgDに由来する配列は、それぞれ単独で使用する事ができ、CH2領域の全体もしくはその一部と組み合わせて使用することができ、CH3領域の全体もしくはその一部と組み合わせて使用することができ、またはCH2領域の全体もしくはその一部とCH3領域の全体もしくはその一部と組み合わせて使用することができる。

10

【0122】

特定の実施形態において、スペーサーは、IgG4のヒンジ領域を含む短いスペーサーである。特定の実施形態において、短いスペーサーは、配列番号11、12または13によってコードされる。特定の実施形態において、スペーサーは、IgG4のヒンジ領域とIgG4のCH3領域を含む中程度の長さのスペーサーである。特定の実施形態において、中程度の長さのスペーサーは、配列番号15または18によってコードされる。特定の実施形態において、スペーサーは、IgG4のヒンジ領域、IgG4のCH2領域およびIgG4のCH3領域を含む長いスペーサーである。特定の実施形態において、長いスペーサーは、配列番号21によってコードされる。特定の実施形態において、長いスペーサーは、CH2ドメインに4/2-N/Qの変異を含む。変異は、Fcγ受容体への結合と活性化誘導型細胞死を阻止するために使用することができる。

20

【0123】

本明細書に記載のCARにおいて使用することができるヒンジ領域のその他の例として、CD8α、CD4、CD28、CD7などの、1型膜タンパク質の細胞外領域に存在するヒンジ領域が挙げられ、これらの1型膜タンパク質は野生型であってもよく、そのバリエーションであってもよい。

【0124】

特定の実施形態において、スペーサーは、II型C型レクチンのドメイン間領域（ストーク領域）のヒンジ領域、または分化抗原群（cluster of differentiation）（CD）分子のストーク領域のヒンジ領域を含む。II型C型レクチンまたはCD分子の「ストーク領域」は、II型C型レクチンまたはCD分子において、C型レクチン様ドメイン（CTLD）（例えば、ナチュラルキラー細胞受容体のCTLDに類似するもの）と疎水性部分（膜貫通ドメイン）の間に位置する細胞外ドメイン（ECD）の一部を指す。例えば、ヒトCD94（GenBankアクセッション番号AAC50291.1）の細胞外ドメインは、34～179番目のアミノ酸残基に相当するが、CTLDは、61～176番目のアミノ酸残基に相当し、ヒトCD94分子のストーク領域は、34～60番目のアミノ酸残基を含むことから、疎水性部分（膜貫通ドメイン）とCTLDの間に位置する（Boyington et al., Immunity 10:15, 1999を参照されたい；その他のストーク領域の説明については、Beavil et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:153, 1992;およびFigdor et al., Nat. Rev. Immunol. 2:11, 2002をさらに参照されたい）。これらのII型C型レクチンまたはCD分子は、ストーク領域と膜貫通領域の間またはストーク領域とCTLDの間に連結アミノ酸をさらに有していてもよい（後述する）。別の一例において、233アミノ酸長のヒトNKG2Aタンパク質（GenBankアクセッション番号：P26715.1）は、71～93番目のアミノ酸からなる疎水性部分（膜貫通ドメイン）と94～233番目のアミノ酸からなる細胞外ドメインとを有する。ヒトNKG2Aタンパク質のCTLDは119～231番目のアミノ酸を含み、ストーク領域は99～116番目のアミノ酸を含み、このストーク領域には、追加の連結アミノ酸が隣接していてもよい。その他のII型C型レクチンもしくはCD分子、またはこれらの細胞外リガンド結合ドメイン、ストーク領域およびCTLDも、当技術分野で公知である（例

30

40

50

例えば、ヒトCD23、ヒトCD69、ヒトCD72、ヒトNKG2AおよびヒトNKG2Dの配列およびこれらの説明については、GenBankアクセス番号：NP 001993.2；AAH07037.1；NP 001773.1；AAL65234.1；およびCAA04925.1をそれぞれ参照されたい）。

【0125】

(iii-b-iii) 膜貫通ドメイン

本明細書で述べるように、CAR内の膜貫通ドメインは、細胞膜を介して細胞外部分と細胞内部分を連結する役割を果たす。膜貫通ドメインは、改変された細胞において、発現された分子を細胞膜に繋ぎ止めることができる。

【0126】

膜貫通ドメインは、天然由来のものであってもよく、かつ／または合成されたものであってもよい。天然由来のものである場合、膜貫通ドメインは、膜結合型タンパク質に由来するものであってもよく、膜貫通型タンパク質に由来するものであってもよい。膜貫通ドメインは、少なくとも、T細胞受容体の α 鎖、 β 鎖もしくは ζ 鎖、CD28、CD27、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、Toll様受容体1（TLR1）、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8またはTLR9の膜貫通領域を含んでいてもよい。特定の実施形態において、膜貫通ドメインは、少なくとも、例えば、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1（CD11a、CD18）、ICOS（CD278）、4-1BB（CD137）、GITR、CD40、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、TNFR2、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、SLAMF6（NTB-A、Lyl08）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、またはNKG2Cの膜貫通領域を含んでいてもよい。特定の実施形態において、ヒトIg（免疫グロブリン）のヒンジ（例えば、IgG4のヒンジやIgDのヒンジ）、GSリンカー（例えば、本明細書に記載のGSリンカー）、KIR2DS2のヒンジ、CD8aのヒンジなどの、様々なヒトヒンジも同様に使用することができる。特定の実施形態において、CARは、CD28膜貫通ドメインを含む。CD28膜貫通ドメインは、第2世代4-1BB CAR T細胞の活性化のための抗原閾値を低下させることが示されている。

【0127】

特定の実施形態において、膜貫通ドメインは、細胞膜内で熱力学的に安定な、通常15～30アミノ酸長の三次元構造を有する。膜貫通ドメインの構造は、 α ヘリックス、 β バレル、 β シート、 β ヘリックスまたはこれらの任意の組み合わせを含むことができる。

【0128】

膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接している1個以上の追加のアミノ酸を含んでいてもよく、例えば、CARの細胞外領域内の1個以上のアミノ酸（例えば、細胞外領域の最大15個のアミノ酸）、および／またはCARの細胞内領域内の1個以上の追加のアミノ酸（例えば、細胞内部分の最大で15個のアミノ酸）を含んでいてもよい。一態様において、膜貫通ドメインは、シグナル伝達ドメイン、共刺激ドメインまたはヒンジドメインの由来源であるタンパク質と同じタンパク質に由来するものであってもよい。別の態様において、膜貫通ドメインは、CARのその他のドメインの由来源であるタンパク質とは別のタンパク質に由来するものである。場合によっては、前記キメラ受容体のドメインが、同じまたは異なる表面膜タンパク質に由来する膜貫通ドメインに結合することを回避できるような膜貫通ドメインを選択してもよく、あるいはこのような回避が可能なアミノ酸置換によって膜貫通ドメインを改変してもよく、これによって、前記受容体複合体の他の意図しないメンバーとの相互作用を最小限に抑えることができる。特定の実施形態において、膜

貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインをコードする核酸配列（配列番号33、34、35または36）によってコードされる。特定の実施形態において、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインのアミノ酸配列（配列番号37、38または39）を含む。

【0129】

(iii-b-iv) 細胞内エフェクタードメイン

CARの細胞内エフェクタードメインは、CARが発現された細胞の活性化を担う。したがって、「エフェクタードメイン」という用語は、活性化シグナルの形質導入に十分な細胞内ドメインの一部を含むことを意味する。エフェクタードメインは、適切なシグナルを受けた場合に、細胞の生物学的応答または生理学的応答を直接的または間接的に促進することができる。特定の実施形態において、エフェクタードメインは、CARが標的分子に結合した場合に、シグナルを受けるタンパク質またはタンパク質複合体の一部であるか、または標的分子に直接結合し、その結果、エフェクタードメインからシグナルが誘導される。エフェクタードメインは、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）などの、1つ以上のシグナル伝達ドメインまたはシグナル伝達モチーフを含んでいる場合に、細胞の応答を直接促進してもよい。別の実施形態において、エフェクタードメインは、共刺激ドメインなどの細胞の応答を直接促進する1つ以上の別のタンパク質と関連することによって、間接的に細胞の応答を促進する。

10

【0130】

エフェクタードメインは、がん細胞により発現された細胞マーカーに組換え細胞が結合した際に、この組換え細胞の少なくとも1つの機能を活性化させることができる。組換え細胞の活性化には、分化、増殖および／または活性化のうちの1つ以上またはその他のエフェクター機能が含まれていてもよい。特定の実施形態において、エフェクタードメインは、T細胞受容体と共刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達部分を含んでいてもよく、共刺激ドメインは、補助受容体または共刺激分子に由来する細胞質内配列を含んでいてもよい。

20

【0131】

エフェクタードメインは、1つ、2つまたは3つ以上の、細胞内シグナル伝達部分（例えば、受容体のシグナル伝達ドメインや細胞質内シグナル伝達配列など）、共刺激ドメイン、またはこれらの組み合わせを含んでいてもよい。例示的なエフェクタードメインとして、4-1BB（CD137）、CARD11、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD27、CD28、CD79A、CD79B、DAP10、FcR α 、FcR β （Fc ϵ R1b）、FcR γ 、Fyn、HVE M（LIGHTR）、ICOS、LAG3、LAT、Lck、LRP、NKG2D、NOTCH1、pT α 、PTCH2、OX40、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、TCR α 、TCR β 、TRIM、Wnt、Zap70およびこれらの任意の組み合わせから選択されるシグナル伝達ドメインおよび／または刺激ドメインが挙げられる。特定の実施形態において、例示的なエフェクタードメインとして、CD86、Fc γ R1a、DAP12、CD30、CD40、PD-1、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83に特異的に結合するリガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD29）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、GADS、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8およびTLR9から選択されるシグナル伝達ドメインおよび／または共刺激ドメインが挙げられる。特定の実施形態において、エフェクタードメインは、CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む。

30

40

【0132】

50

刺激性に作用する細胞内シグナル伝達部分配列は、iTAMを含んでいてもよい。細胞質内主要シグナル伝達配列を含むiTAMの例として、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD5、CD22、CD66d、CD79a、CD79b、共通FcR γ (FCER1G)、Fc γ R11a、FcR β (Fc ϵ Rib)、DAP10またはDAP12に由来するものが挙げられる。特定の実施形態において、CD3 ζ のバリエーションは、少なくとも1つ、2つ、3つまたはすべてのITAM領域を保持している。

【0133】

特定の実施形態において、エフェクタードメインは、細胞質内シグナル伝達タンパク質と会合する細胞質内部分を含み、この細胞質内シグナル伝達タンパク質は、リンパ球受容体またはそのシグナル伝達ドメイン、複数のITAMを含むタンパク質、共刺激ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせである。

10

【0134】

細胞内シグナル伝達部分のさらなる例として、CD3 ζ 鎖の細胞質内配列、および／またはこれと共働して作用することにより結合ドメインとの会合後に続くシグナル伝達を開始する補助受容体が挙げられる。

【0135】

共刺激ドメインは、細胞マーカーへの結合に対する効率的なリンパ球応答に、その活性化が必要とされるドメインである。いくつかの分子は、細胞内シグナル伝達部分または共刺激ドメインとして置き換え可能である。共刺激ドメインの例として、CD27、CD28、4-1BB (CD 137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原 1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、およびB7-H3、ならびにCD83に特異的に結合するリガンドが挙げられる。例えば、CD27の共刺激は、インビトロにおいて、ヒトCAR T細胞の増殖、エフェクター機能および生存を増強し、インビボにおいて、ヒトT細胞の持続性と抗がん活性を増強することが実証されている (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706)。そのような共刺激ドメイン分子のさらなる例として、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、NKG2D、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Lyl08)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/CbpおよびCD19aが挙げられる。特定の実施形態において、共刺激ドメインは、4-1BBシグナル伝達ドメインを含む。

20

30

【0136】

特定の実施形態において、細胞内シグナル伝達部分をコードする核酸配列は、CD3 ζ をコードする配列 (配列番号22または23) と、4-1BBのシグナル伝達部分のバリエーションをコードする配列 (配列番号27、28または29) とを含む。特定の実施形態において、細胞内シグナル伝達部分のアミノ酸配列は、CD3 ζ のバリエーション (配列番号24、25または26) と4-1BBの一部 (配列番号30、31または32) とを含む細胞内シグナル伝達部分を含む。

40

【0137】

特定の実施形態において、細胞内シグナル伝達部分は、(i) CD3 ζ のシグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部、(ii) 4-1BBのシグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部、または (iii) CD3 ζ および4-1BBのシグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部を含む。特定の実施形態において、細胞内シグナル伝達部分は、(i) CD3 ζ のシグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部、(ii) 4-1BBのシグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部、(iii) CD28のシグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部

50

、または (iv) CD3 ζ 、4-1BBおよびCD28のシグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部を含む。

【0138】

細胞内部分は、Wntシグナル伝達経路（例えば、LRP、RykもしくはROR2）、NOTCHシグナル伝達経路（例えば、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3もしくはNOTCH4）、ヘッジホッグシグナル伝達経路（例えば、PTCHもしくはSMO）、受容体チロシンキナーゼ（RTK）（例えば、上皮成長因子（EGF）受容体ファミリー、線維芽細胞増殖因子（FGF）受容体ファミリー、肝細胞増殖因子（HGF）受容体ファミリー、インスリン受容体（IR）ファミリー、血小板由来成長因子（PDGF）受容体ファミリー、血管内皮細胞成長因子（VEGF）受容体ファミリー、トロポミオシン受容体キナーゼ（Trk）受容体ファミリー、エフリン（Eph）受容体ファミリー、AXL受容体ファミリー、白血球チロシンキナーゼ（LTK）受容体ファミリー、tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1（TIE）受容体ファミリー、受容体チロシンキナーゼ様オーファン（ROR）受容体ファミリー、ディスコイジンドメイン（DDR）受容体ファミリー、rearranged during transfection（RET）受容体ファミリー、チロシンプロテインキナーゼ様（PTK7）受容体ファミリー、related to receptor tyrosine kinase（RYK）受容体ファミリー、もしくは筋特異的キナーゼ（MuSK）受容体ファミリー）；Gタンパク質共役型受容体（GPCR）（FrizzledもしくはSmoothed）；セリン／スレオニンキナーゼ受容体（BMPRもしくはTGFR）；またはサイトカイン受容体（IL1R、IL2R、IL7RもしくはIL15R）から選択されるタンパク質のうちの1つ以上をさらに含んでいてもよい。

10

20

【0139】

(iii-b-v) リンカー

本明細書において、リンカーは、CAR分子において2つの構成要素を連結する部分であれば、どのようなものであってもよい。リンカーは、構成要素を連結するという目的のみを果たすものである場合もあるが、リンカーの多くは、連結すること以外の別の目的を果たすものである。リンカーは、例えば、scFvにおいて、抗体由来結合ドメインのVLとVHを連結することができ、CARの構成要素同士の間での連結アミノ酸として機能することができる。

【0140】

30

リンカーは、リンカーの所望の機能に応じて、柔軟なリンカー、剛直なリンカー、半剛直なリンカーのいずれであってもよい。リンカーは、連結アミノ酸をさらに含んでいてもよい。例えば、特定の実施形態において、リンカーは、CARの様々な構成要素の間で立体構造が移動するための柔軟性と空間を提供する。一般に使用される柔軟なリンカーとして、Gly-Serリンカーが挙げられる。特定の実施形態において、リンカー配列は、グリシンとセリンの反復配列を含み、例えば、1～10個の $(\text{Gly}_x\text{Ser}_y)_n$ からなる反復配列などが挙げられ、ここで、xおよびyは独立して0～10の整数であり、ただし、xとyの両方が0の場合は除かれ、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9または10の整数である。具体例として、 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ （配列番号147）、 $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ （配列番号148）、 $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n(\text{Gly}_2\text{Ser})_n$ （配列番号149）、または $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n(\text{Gly}_4\text{Ser})_1$ （配列番号150）が挙げられる。特定の実施形態において、リンカーは、 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ （配列番号151）、 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ （配列番号152）、 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_2$ （配列番号153）、 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_1$ （配列番号154）、 $(\text{Gly}_3\text{Ser})_2$ （配列番号155）、 $(\text{Gly}_3\text{Ser})_1$ （配列番号156）、 $(\text{Gly}_2\text{Ser})_2$ （配列番号157）、 $(\text{Gly}_2\text{Ser})_1$ 、GGSGGGSGSG（配列番号158）、GGSGGGSGSG（配列番号159）またはGGSGGGSG（配列番号160）である。

40

【0141】

特定の実施形態において、リンカー領域は、 $(\text{GGGG})_n$ （配列番号147）であり、ここで、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9またはそれ以上の整数を含む整数である。特定の実施形態において、スペーサーは、 $(\text{EAAAK})_n$ （配列番号161）であり、ここで、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9またはそれ以上の整数を含む整数である。

50

【0142】

場合によっては、柔軟なリンカーでは、特定の用途において要求されるCARの距離や位置を保持することができない場合がある。このような場合、剛直なリンカーや半剛直なリンカーが有用である場合がある。剛直なリンカーまたは半剛直なリンカーの例として、プロリンリッチリンカーが挙げられる。特定の実施形態において、プロリンリッチリンカーは、偶然性のみに依存して配列に含まれることが期待される数よりも多くのプロリン残基を有するペプチド配列である。特定の実施形態において、プロリンリッチリンカーは、その配列においてプロリン残基が全体の少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも48%、少なくとも50%または少なくとも51%を占めるリンカーである。プロリンリッチリンカーの具体例として、唾液プロリンリッチタンパク質（PRP）の断片が挙げられる。

10

【0143】

リンカーは、酸誘導性切断、光誘導性切断、ペプチダーゼ誘導性切断、エステラーゼ誘導性切断、ジスルフィド結合切断などの切断に感受性を有していてもよい（切断可能なリンカー）。あるいは、リンカーは、切断に対して実質的に耐性を有していてもよい（例えば、安定なリンカーまたは切断不能なリンカー）。いくつかの態様において、リンカーは、荷電しやすいリンカー、親水性リンカー、またはジカルボン酸ベースのリンカーである。

【0144】

連結アミノ酸は、スペーサーを用いて距離を設ける必要がない場合、かつ／またはスペーサーを用いて距離を設けることが望ましくない場合に、配列同士の連結に使用することができるリンカーであってもよい。例えば、連結アミノ酸は、細胞内共刺激シグナル伝達部分同士の連結に使用することができる短いアミノ酸配列であってもよい。特定の実施形態において、連結アミノ酸は9アミノ酸長以下である（例えば、2アミノ酸長、3アミノ酸長、4アミノ酸長、5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、または9アミノ酸長である）。特定の実施形態において、グリシン-セリンダブレットを適切な連結アミノ酸リンカーとして用いることができる。特定の実施形態において、例えば、アラニンやグリシンなどの単一のアミノ酸を適切な連結アミノ酸として用いることができる。

20

【0145】

(iii-b-vi) タグカセット、形質導入マーカーおよび／または自殺スイッチを含む制御機能

30

特定の実施形態において、CARコンストラクトは、1つ以上のタグカセットおよび／または形質導入マーカーを含むことができる。インビトロ、インビボおよび／またはエクスピボにおいて、タグカセットおよび／または形質導入マーカーを使用することによって、遺伝子組換え細胞の活性化、増殖促進、検出、濃縮、単離、追跡、除去および／または排除を行うことができる。「タグカセット」は、CARに付加、融合またはその一部として組み込まれるユニークな合成ペプチド配列であり、この合成ペプチド配列に、コグネイトな結合分子（例えば、リガンド、抗体またはその他の結合パートナー）を特異的に結合させることによって、その結合特性を利用して、タグ付加タンパク質および／またはタグ付加タンパク質を発現する細胞の活性化、増殖促進、検出、濃縮、単離、追跡、除去および／または排除を行うことができる合成ペプチド配列を指す。形質導入マーカーも、同じ目的で使用するができるが、形質導入マーカーは、天然の分子に由来するものであり、CAR分子内の他の構成要素から形質導入マーカーを隔てることのできるスキッピング因子を利用して発現されることが多い。

40

【0146】

コグネイトな結合分子に結合するタグカセットとしては、例えば、Hisタグ（HHHHHH；配列番号162）、Flagタグ（DYKDDDDK；配列番号163）、Xpressタグ（DLYDDDDK；配列番号164）、Aviタグ（GLNDIFEAQKIEWHE；配列番号165）、カルモジュリンタグ（KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL；配列番号166）、ポリグルタミ

50

ン酸タグ、HAタグ (YPYDVDPDYA ; 配列番号167)、Mycタグ (EQKLISEEDL ; 配列番号168)、Strepタグ (従来のSTREP (登録商標) タグを指す (WRHPQFGG ; 配列番号169))、STREP (登録商標) タグII (WSHPQFEK ; 配列番号170 (IBA Institut für Bioanalytik社、ドイツ) ; 例えば、米国特許公開第7,981,632号を参照されたい)、Softag 1 (SLAELLNAGLGGS ; 配列番号171)、Softag 3 (TQDPSRVG ; 配列番号172)、およびV5タグ (GKPIPNNPLLGLDST ; 配列番号173) が挙げられる。

【0147】

本明細書に開示されたタグカセット配列に特異的に結合して複合体を形成する結合分子は市販されている。例えば、Hisタグ抗体は、ライフテクノロジーズ、Pierce Antibodies、GenScriptなどの製造業者から市販されている。Flagタグ抗体は、Pierce Antibodies、GenScript、シグマ アルドリッチなどの製造業者から市販されている。Xpressタグ抗体は、Pierce Antibodies、ライフテクノロジーズ、GenScriptなどの製造業者から市販されている。Aviタグ抗体は、Pierce Antibodies、IsBio、Genecopoeiaなどの製造業者から市販されている。カルモジュリンタグ抗体は、サンタクルーズバイオテクノロジー、Abcam、Pierce Antibodiesなどの製造業者から市販されている。HAタグ抗体は、Pierce Antibodies、Cell Signal、Abcamなどの製造業者から市販されている。Mycタグ抗体は、サンタクルーズバイオテクノロジー、Abcam、Cell Signalなどの製造業者から市販されている。Strepタグ抗体は、Abcam、Iba、キアゲンなどの製造業者から市販されている。

【0148】

形質導入マーカーは、切断型CD19 (tCD19 ; Budde et al., Blood 122: 1660, 2013を参照されたい) ; 切断型ヒトEGFR (tEGFRまたはEGFRt ; Wang et al., Blood 118: 1255, 2011を参照されたい) ; ヒトCD34のECD ; および／またはCD34抗原由来の標的エピトープ (Fehse et al, Mol. Therapy 1(5 Pt 1) ; 448-456, 2000を参照されたい) とCD20抗原由来の標的エピトープ (Philip et al, Blood 124: 1277-1278を参照されたい) を組み合わせたRQR8のうちの少なくとも1つから選択してもよい。特定の実施形態において、細胞は、EGFRtを発現するように遺伝子組換えされている。

【0149】

特定の実施形態において、CARコンストラクトは、自己切断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができ、この自己切断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、CARコンストラクトをコードするポリヌクレオチドと、形質導入マーカー (例えばEGFRt) をコードするポリヌクレオチドの間に配置される。例示的な自己切断ポリペプチドとして、豚テシオウイルス-1に由来する2Aペプチド (P2A)、Thosea asignaウイルスに由来する2Aペプチド (T2A)、馬鼻炎Aウイルスに由来する2Aペプチド (E2A)、口蹄疫ウイルスに由来する2Aペプチド (F2A)、またはこれらのバリエーションが挙げられる。さらに、2Aペプチドの例示的な核酸配列およびアミノ酸配列は、例えば、Kimら (PLOS One 6: e18556 (2011)) にも記載されている。特定の実施形態において、細胞は、自己切断ポリペプチドを含むように遺伝子組換えされている。特定の実施形態において、自己切断ポリペプチドはT2Aを含む。

【0150】

制御機能は、CARに複数コピーで含まれていてもよく、スキッピング因子を使用して別の分子として発現させることもできる。例えば、CARは、1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのタグカセットを有していてもよく、かつ／または1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つの形質導入マーカーが発現されてもよい。例えば、本開示の実施形態には、2つのMycタグカセット、HisタグとHAタグを含むカセット、HAタグとSoftag1タグを含むカセット、またはMycタグとSBPタグを含むカセットを有するCARコンストラクトが含まれていてもよい。例示的な形質導入マーカーおよびコグネイトペアは、米国特許公開第13/463,247号に記載されている。

【0151】

少なくとも1つの制御機能をCARに組み込むことによる利点の1つとして、タグカセットに対してコグネイトな結合分子を使用することによって、対象に投与されるCAR発現細胞を増加させたり、除去したりできることが挙げられる。特定の実施形態において、本開示は、タグカセットに特異的な抗体を使用することによって、制御機能に特異的なコグネイトな結合分子を使用することによって、または制御機能に特異性を有する第2のCAR発現組換え細胞を使用することによって、CARを発現する組換え細胞を除去する方法を提供する。組換え細胞の除去は、制御機能に特異的な除去剤を使用して行ってもよい。例えば、EGFRtを使用する場合、細胞毒性試薬（例えば、毒素や放射性金属など）に融合または結合された抗EGFRt結合ドメイン（例えば、抗体やscFvなど）を使用してもよく、あるいは抗EGFRt／抗CD3二重特異性scFvまたは抗EGFRt CAR T細胞を使用してもよい。

10

【0152】

特定の実施形態において、iCaspase9コンストラクト（iCasp9）をコードするポリヌクレオチドを、自殺スイッチとしてCARコンストラクトに挿入してもよい。

【0153】

特定の実施形態において、制御機能に特異的に結合する抗体（例えば抗タグ抗体）を使用することによって、または制御機能に特異的に結合するその他のコグネイト結合分子によって、CARを発現する組換え細胞をインビボで検出または追跡してもよく、この制御機能の結合パートナーは、X線、CTスキャン、MRIスキャン、PETスキャン、超音波、フローサイトメトリー、近赤外線イメージングシステム、またはその他のイメージング方法で検出できるように、蛍光色素、放射性トレーサー、酸化鉄ナノ粒子、または当技術分野で公知のその他の造影剤に結合されている（例えば、Yu, et al., Theranostics 2: 3, 2012を参照されたい）。

20

【0154】

したがって、少なくとも1つの制御機能とCARを発現する組換え細胞は、タグカセットが導入されていない組換え細胞よりも、例えば、容易に同定でき、単離でき、ソートでき、増殖の誘導ができ、追跡でき、かつ／または除去できる。

【0155】

(iii-b-vii) 多量体化ドメイン

【0156】

特定の実施形態において、CARは多量体化ドメインを含んでいてもよい。タンパク質の生物学的活性は、その三次構造および四次構造に左右される。四次構造は、別のタンパク質サブユニットまたはポリペプチドとの物理的相互作用および化学的相互作用を必要とする。「多量体化ドメイン」は、共有結合および／または非共有結合結合を介して2つ以上のタンパク質（モノマー）を互いに相互作用させるドメインである。タンパク質中に多量体化ドメインが存在すると、タンパク質の相互作用が発生して、多量体に組み込まれた単位／モノマーの数に応じて、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体などを形成することができる。

30

【0157】

特定の実施形態において、多量体化ドメインは、2つの相補的なモノマー同士を結合させることによって二量体の形成を可能にする二量体化ドメインである。特定の実施形態において、相補的なモノマーとして、PRKAR1AとPRKAR1A（配列番号87と配列番号88）、PRKAR1BとPRKAR1B（配列番号89）、PRKAR1R（配列番号90と配列番号91）、およびPRKAR1E（配列番号92）が挙げられる。特定の実施形態において、二量体化ドッキングドメイン（DDD）は、cAMP依存性プロテインキナーゼ（PKA）調節サブユニットに由来するものであってもよく、アンカードメイン（AD）とペアを形成することができる。アンカードメインは、PKAのRサブユニットとの会合に介在する様々なAキナーゼアンカータンパク質（AKAP）の特定の領域に由来するものであってもよい。特定の実施形態において、相補的なモノマーは、DDD（配列番号93および94）とAD（配列番号95および96）を含む。当業者であれば、その他のDDDとADも公知であり、これらを

40

50

使用することもできることを認識しており、その他のDDDとADとしては、p53から得られる4ヘリックスバンドル型DDDドメイン (Newlon, et al. EMBO J. 2001; 20: 1651-1662; Newlon, et al. Nature Struct Biol. 1999; 3: 222-227)、DCoH (肝細胞核因子1 α (TCF1) のプテリン-4- α -カルビノールアミンデヒドラターゼ/二量体化補因子)、およびHNF-1 (肝細胞核因子1) (Rose, et al. Nature Struct Biol. 2000; 7: 744-748) が挙げられる。使用できる可能性のあるその他のAD配列として、米国特許公開第2003/0232420 (A1) 号に記載のものが挙げられる。

【0158】

特定の実施形態において、相補的な結合ドメインは二量体化することができる。特定の実施形態において、結合ドメインは、Fc ϵ RI鎖に由来する膜貫通ポリペプチドである。特定の実施形態において、一方のCARがFc ϵ RI α 鎖の一部を含み、もう一方のCARがFc ϵ RI β 鎖の一部を含むことから、これらのFc ϵ RI鎖が自発的に二量体化して、二量体のCARを形成することができる。特定の実施形態において、CARが、Fc ϵ RI α 鎖の一部とFc ϵ RI γ 鎖の一部とを含むことから、これらのFc ϵ RI鎖が自発的に三量体化して、三量体のCARを形成することができる。別の一実施形態において、複数鎖を有するCARが、Fc ϵ RI α 鎖の一部と、Fc ϵ RI β 鎖の一部と、Fc ϵ RI γ 鎖の一部とを含むことから、これらのFc ϵ RI鎖が自発的に四量体化して、四量体のCARを形成することができる。

【0159】

特定の実施形態において、相補的な結合ドメインは、酵素とその基質/阻害薬の間の結合のような結合事象に由来するものであってもよく、例えば、クチナーゼとホスホン酸塩の間の結合事象に由来するものであってもよい (Hodneland, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 5048-5052)。このような相補的な結合ドメインを利用して、2つの会合する部分を生成させてもよく (「ドッキング」工程)、次に共有結合により安定化させてもよい (「ロック」工程)。

【0160】

特定の実施形態において、結合ドメインは、受容体の二量体ペアの間の結合のような結合事象に由来するものであってもよく、このような結合事象として、インターロイキン8受容体 (IL-8R) ; LFA-IとGPIIb/IIIaなどのインテグリンヘテロ二量体 ; 神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン3 (NT-3)、インターロイキン8 (IL-8)、血管内皮細胞成長因子 (VEGF)、VEGF-C、VEGF-D、PDGFのメンバー、脳由来神経栄養因子 (BDNF) などの二量体リガンドポリペプチド (Arakawa et al., J Biol. Chem., 269:27833-27839, 1994; Radziejewski et al., Biochem, 32: 1350, 1993) ; およびWO2012001647 (A2) に記載されているような、これらのドメインのうち、親和性が改変されたドメインのバリエーションが挙げられる。

【0161】

特定の実施形態において、二量体化ドメインは、タンパク質配列モチーフを含んでいてもよく、このようなタンパク質配列モチーフとして、コイルドコイル、acid patch、ジックフィンガー、カルシウムハンド、CH1-CLペア、遺伝子組換えにより形成された「ノブ」および/または「突出」を有する「界面」 (米国特許公開第5821333号)、ロイシンジッパー (米国特許公開第5932448号)、SH2およびSH3 (Vidal et al., Biochemistry, 43:7336-44, 2004)、PTB (Zhou et al., Nature, 378:584-592, 1995)、WW (Sudol Prog Biochys Mol Bio, 65:113-132, 1996)、PDZ (Kim et al., Nature, 378: 85-88, 1995; Komau et al., Science, 269:1737-1740, 1995)、ならびにWD40 (Hu et al., J Biol Chem., 273:33489-33494, 1998) が挙げられる。

【0162】

特定の実施形態において、二量体化ドメインに対応する配列として、Junのロイシンジッパードメイン (配列番号97)、Fosの二量体化ドメイン (配列番号98)、WWモチーフのコンセンサス配列 (配列番号99)、GenBankアクセッション番号AAF73912.1で入手可能なSH2Bアダプタータンパク質の二量体化ドメイン (Nishi et al., Mol Cell

Biol, 25: 2607-2621, 2005; 配列番号100)、GenBankアクセッション番号AAD 22543.1で入手可能なIB1のSH3ドメイン (Kristensen et al., EMBO J., 25: 785-797, 2006; 配列番号101)、GenBankアクセッション番号NP_005535.1で入手可能なヒトDOK-7のPTBドメイン (Wagner et al., Cold Spring Harb Perspect Biol. 5: a008987, 2013; 配列番号102)、UniProtアクセッション番号Q01826で入手可能なSATB1のPDZ様ドメイン (Galande et al., Mol Cell Biol. Aug; 21: 5591-5604, 2001; 配列番号103)、UniProtアクセッション番号O14727で入手可能なAPAFのWD40反復配列 (Jorgensen et al., 2009. PLOS One. 4(12):e8463; 配列番号104)、UniProtアクセッション番号I6L9E7で入手可能なダイオキシン受容体のPASモチーフ (Pongratz et al., Mol Cell Biol, 18:4079-4088, 1998; 配列番号105)、およびUniProtアクセッション番号P20472で入手可能なパルプアルブミンのEFハンド構造 (Jamalian et al., Int J Proteomics, 2014: 153712, 2014; 配列番号106) が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0163】

特定の実施形態において、相補的な結合ドメインは、第3の分子または化学誘導因子を使用して誘導することができる。この二量体化方法では、第1のCARが、化学誘導因子の二量体化結合ドメイン1 (CBD1) を含み、かつ第2のCARが、前記化学誘導因子の第2の二量体化結合ドメイン (CBD2) を含むことが必要であり、これらのCBD1とCBD2が、二量体化を誘導する化学誘導因子 (CID) に同時に結合することができる。CBD1は、FK結合タンパク質12 (FKBP12) のラパマイシン結合ドメイン (配列番号107) を含んでいてもよく、CBD2は、mTORのFKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) ドメイン (配列番号108) を含んでいてもよい。この場合、CIDは、ラパマイシンまたはその誘導体を含んでいてもよく、ラパマイシンまたはその誘導体によって、CBD1とCBD2をヘテロ二量体化させることができる。CBD1とCBD2が、FKBP12のFK506 (タクロリムス) 結合ドメインと、シクロフィリンAのシクロスポリン結合ドメインである場合、CIDは、FK506/シクロスポリン融合タンパク質を含んでいてもよい。CBD1とCBD2が、F36V変異を含むFKBP12結合ドメインである場合、CIDはAP1903であってもよい。CBD1とCBD2が、エストロゲン結合ドメイン (EBD) と、ストレプトアビジン結合ドメインである場合、CIDは、エストロン/ビオチン融合タンパク質であってもよい。CBD1とCBD2が、グルココルチコイド結合ドメイン (GBD) と、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 結合ドメインである場合、CIDは、デキサメサゾン/メトトレキセート融合分子であってもよい。CBD1とCBD2が、O⁶-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ (AGT) 結合ドメインと、DHFR結合ドメインである場合、CIDは、O⁶-ベンジルグアニン誘導体/メトトレキセート融合分子であってもよい。CBD1とCBD2が、レチノイン酸受容体ドメインと、エクジソン受容体ドメインである場合、CIDはRSL1を含んでいてもよい。また、CID結合ドメインを使用して、CIDへの親和性を改変することもできる。例えば、FRBの2095番目、2098番目および2101番目のアミノ酸を改変することによって、ラパマイシンへの結合性を改変することができる (Bayle et al, Chemistry & Biology 13, 99-107, 2006)。

【0164】

さらに、C4b多量体化ドメインを使用することもできる。本開示において使用可能な具体的なC4b多量体化ドメインを、配列番号109~141に示している。特定の実施形態において、C4b多量体化ドメインは、(i) 12番目のグリシン、(ii) 28番目のアラニン、(iii) 29番目、34番目、36番目および/もしくは41番目のロイシン; (iv) 32番目のチロシン; (v) 33番目のリシン; ならびに/または (vi) 6番目および18番目のシステインを含む多量体化ドメインである。特定の実施形態において、C4b多量体化ドメインは、(i) 12番目のグリシン、(ii) 28番目のアラニン、(iii) 29番目、34番目、36番目および41番目のロイシン; (iv) 32番目のチロシン; (v) 33番目のリシン; ならびに (vi) 6番目および18番目のシステインを含む多量体化ドメインである。

【0165】

C4b多量体化ドメインは、N末端の少なくとも1アミノ酸長の連続した残基（例えば、少なくとも2アミノ酸長、3アミノ酸長、4アミノ酸長、5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長または10アミノ酸長の連続した残基）が欠失した配列番号109～141のいずれかを含んでいてもよい。さらなる実施形態は、C末端の少なくとも1アミノ酸長の連続した残基（例えば、少なくとも2アミノ酸長、3アミノ酸長、4アミノ酸長、5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長または10アミノ酸長の連続した残基）の欠失を含んでいてもよい。

【0166】

C4b多量体化ドメインに関する特定の実施形態は、A6；E11；A13；D21；C22；P25；A27；E28；L29；R30；T31；L32；L33；E34；I35；K37；L38；L40；E41；I42；Q43；K44；L45；E48；L49；およびQ50のうちの少なくとも1つの残基を含むか、これらのうちの少なくとも1つの残基を含むように改変されている。さらなる実施形態では、A6；E11；A13；D21；C22；P25；A27；E28；L29；R30；T31；L32；L33；E34；I35；K37；L38；L40；E41；I42；Q43；K44；L45；E48；L49；およびQ50を含んでいるか、これらの残基を含むように改変されている。特定のC4b多量体化ドメインに関する実施形態は、アミノ酸配列「AELR」を含む。

【0167】

特定の実施形態において、フェリチンベースのデキストラマー多量体化を利用することができる。例示的なフェリチン融合配列は、PMID 26279189に記載されている。

【0168】

特定の実施形態において、二量体化を引き起こすさらなる方法を利用することができる。CARにおいて二量体化ドメインを形成するさらなる改変には、両方のCARへの第2のシステイン残基の導入による、C末端ドメインの第2の鎖間ジスルフィド結合の形成；各CARコンストラクトのC末端ドメインにおける相互作用残基の交換（「knob-in-hole」）；およびCD3ζへのCARの可変ドメインの直接融合（CD3ζ融合体）（Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 2009, 20:1240-1248）が含まれていてもよい。

【0169】

(iv) 遺伝子組換え細胞の特性評価

特定の実施形態において、遺伝子組換え細胞は、CARの細胞表面発現に関して評価を行うことができる。特定の実施形態において、遺伝子組換え細胞の少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%において、検出可能なレベルのCARが発現されている。

【0170】

細胞表面タンパク質の発現は、当技術分野で公知の方法を使用したフローサイトメトリーによって測定することができる。フローサイトメトリーでは、蛍光分子が付加され、所望の細胞表面マーカーを標的とする因子（例えば抗体）で細胞集団を標識することによって、その細胞表面マーカーが陽性の細胞集団を定量し、その細胞表面マーカーの発現量を定量することができる。

【0171】

組換えた細胞内のゲノムへのCARの組み込みは、デジタルドロップレットPCR（ddPCR）によって測定することができる。デジタルPCRは、試料中のDNA濃度を定量することができる。デジタルPCRでは、PCR反応混合物（例えば、核酸分子試料と複数コピーのPCRプローブを含む）が反応区画に分割され、PCRプローブを全く含まない区画と、1コピー以上のPCRプローブを含む区画とが複数作製される。各区画のPCR増幅が行われ、PCR反応により各区画が分析される。1コピー以上のプローブと1コピー以上の標的DNA分子を含む区画から陽性のエンドポイントが得られ、これに対して、PCRプローブを含んでいない区画からは陰性のエンドポイントが得られる。次に、陽性反応の区画をポアソン分布に当てはめて、分割前の試料の体積あたりの標的DNA分子の絶対コピー数（すなわち、試料1μlあたりのコピー数）を求める（Hindson, B. et al., (2011) Anal Ch

em. 83:8604-8610を参照されたい)。デジタルドロップレットPCRは、デジタルPCRの変法であり、油中水型エマルションを用いて核酸試料を液滴に分割することの特徴とする。PCR増幅は、液滴に対して一括で行われ、流路系を使用して、液滴の分注と個々の液滴の分析が行われる。当業者であれば、ddPCRを使用して、試料中のDNAの絶対定量を行って、コピー数多型分析を行うことや、ゲノムの編集の効率を評価することができる。

【0172】

組換え細胞は、サイトカインに依存しない増殖についても、評価を行うことができる。組換え細胞は、刺激性サイトカイン（例えばIL-2やIL-7）の存在下のみにおいて、増殖すると予想される。サイトカインの非存在下での増殖は、腫瘍形成能が存在することの指標となる。特定の実施形態において、組換え細胞は、1種以上の刺激性サイトカイン（例えばIL-2やIL-7）の存在下または非存在下において、1日、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間または20日間増殖される。特定の実施形態において、従来する方法（例えば、フローサイトメトリー、顕微鏡観察、光学密度、代謝活性）を使用して、細胞数および生存率から増殖を評価する。特定の実施形態において、1日目、2日目、3日目、4日目、5日目または6日目から増殖の評価を開始する。特定の実施形態において、1日ごと、2日ごと、3日ごと、4日ごと、5日ごと、6日ごと、7日ごと、または8日ごとに増殖を評価する。特定の実施形態において、増殖期の終了時に、サイトカインの非存在下での増殖を評価する。いくつかの特定の実施形態では、サイトカインの非存在下で組換え細胞の増殖が認められない場合に、腫瘍形成能がないと定義される。特定の実施形態において、増殖期の終了時の細胞集団の増殖が、増殖期の開始時の0.1倍未満、0.2倍未満、0.3倍未満、0.4倍未満、0.5倍未満、0.6倍未満、0.7倍未満、0.8倍未満、0.9倍未満、1.0倍未満、1.1倍未満、1.2倍未満、1.3倍未満、1.4倍未満または1.5倍未満である場合に、増殖が認められないと定義される。特定の実施形態において、組換え細胞は、サイトカインによる刺激の非存在下、成長因子による刺激の非存在下、および抗原刺激の非存在下において増殖しない。

【0173】

(v) 細胞活性化培養条件

細胞集団は、培養開始用組成物中でインキュベートすることによって、増殖させることができる。インキュベーションは、バッグ、細胞培養プレート、フラスコ、チャンバー、クロマトグラフィーカラム、架橋されたゲル、架橋されたポリマー、カラム、培養ディッシュ、中空糸、マイクロタイタープレート、シリカコーティングガラスプレート、チューブ、チューブセット、ウェル、バイアル、またはその他の培養用容器もしくは細胞培養用容器などの培養容器中で行うことができる。

【0174】

特定の実施形態において、細胞集団は、遺伝子組換えを行う前またはその後に、培養開始用組成物中でインキュベートすることができる。特定の実施形態において、細胞集団のインキュベーションは、遺伝子組換えを行う前に、1日～6日間、1日～5日間、1日～4日間、1日～3日間、1日～2日間、または1日行うことができる。特定の実施形態において、細胞集団のインキュベーションは、遺伝子組換えを行った後に、1日～6日間、1日～5日間、1日～4日間、1日～3日間、1日～2日間、または1日行うことができる。特定の実施形態において、細胞集団のインキュベーションは、遺伝子組換えと同時に進行することができる。

【0175】

培養条件には、特定の培地、温度、酸素含量、二酸化炭素含量、時間、ならびに作用物質（例えば、栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオン、および／または刺激因子（例えば、サイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、および細胞を活性化するように設計されたその他の薬剤））のうちの1つ以上が含まれていてもよい。

【0176】

いくつかの態様において、インキュベーションは、米国特許公開第6,040,177号、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660、Terakura et al. (2012) Blood. 117:72-82、および／またはWang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701に記載されている技術などに従って行われる。

【0177】

T細胞の培養用の例示的な培養培地として、

(i) 非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウムおよびペニシリン／ストレプトマイシンを添加したRPMI；

(ii) HEPES、5～15%ヒト血清、1～3%L-グルタミン、0.5～1.5%ペニシリン／ストレプトマイシン、および 0.25×10^{-4} ～ 0.75×10^{-4} M β -メルカプトエタノールを添加したRPMI；

(iii) 10%ウシ胎児血清 (FBS)、2mM L-グルタミン、10mM HEPES、100U/mlペニシリンおよび100m/mlストレプトマイシンを添加したRPMI-1640；

(iv) 10%FBS、2mM L-グルタミン、10mM HEPES、100U/mlペニシリンおよび100m/mlストレプトマイシンを添加したDMEM培地；ならびに

(v) 5%ヒトAB型血清 (Gemcell、カリフォルニア州ウェスト・サクラメント)、1%HEPES (Gibco、ニューヨーク州グランド・アイランド)、1%ペニシリン／ストレプトマイシン (Gibco)、1%GlutaMax (Gibco)、および2%N-アセチルシステイン (シグマ アルドリッチ社、ミズーリ州セントルイス) を添加したX-Vivo 15培地 (ロンザ社、メリーランド州ウォークーズビル) が挙げられる。

さらに、T細胞培養培地は、ハイクローン (ユタ州ローガン) の市販品としても入手可能である。上記の培養培地に添加することができるさらなるT細胞活性化成分については、以下でより詳細に述べる。

【0178】

いくつかの実施形態において、T細胞の増殖は、培養開始用組成物に、非分裂性の末梢血単核細胞 (PBMC) などのフィーダー細胞を加え (例えば、増殖を行う前の細胞集団において、Tリンパ球1個あたりのPBMCフィーダー細胞の数が、少なくとも5個、10個、20個もしくは40個またはそれ以上の個数となるような比率で加え)、次に、(例えば、T細胞の数を拡大するのに十分な時間にわたって) 培養物をインキュベートすることによって行う。いくつかの態様において、非分裂性フィーダー細胞は、 γ 線照射したPBMCフィーダー細胞を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、細胞分裂を防ぐため、3000～3600radの γ 線をPBMCに照射する。いくつかの態様において、フィーダー細胞は、T細胞集団を添加する前に培養培地に加える。

【0179】

T細胞のインキュベーションでは、EBVで形質転換した非分裂性のリンパ芽球様細胞 (LCL) をフィーダー細胞として加える工程をさらに含んでいてもよい。6000～10,000radの γ 線をLCLに照射してもよい。いくつかの態様において、LCLフィーダー細胞は、適切な量で提供され、例えば、LCLフィーダー細胞と増殖開始時のTリンパ球の比率が少なくとも10:1となるように提供される。

【0180】

いくつかの実施形態において、刺激条件には、ヒトTリンパ球の増殖に適した温度が含まれ、この温度は、例えば、少なくとも25℃、少なくとも30℃、または37℃であってもよい。

【0181】

T細胞の活性化培養条件には、培養開始用組成物中のT細胞が増殖または拡大する条件が含まれる。T細胞活性化条件には、1種以上のサイトカインが含まれていてもよく、例えば、インターロイキン (IL) -2、IL-7、IL-15および／またはIL-21が含まれていてもよい。IL-2の含有量は、10～100ng/mlの範囲 (例えば、40ng/ml、50ng/mlま

10

20

30

40

50

たは60 ng/ml)であってもよい。IL-7、IL-15および／またはIL-21は、それぞれ0.1～50 ng/mlの範囲(例えば、5 ng/ml、10 ng/mlまたは15 ng/ml)で含まれていてもよい。特定の実施形態では、50 ng/mlのIL-2を使用する。特定の実施形態では、それぞれ10 ng/mlのIL-7、IL-15およびIL-21を使用する。

【0182】

特定の実施形態において、T細胞活性化培養条件には、T細胞を刺激するエピトープが含まれていてもよい。T細胞を刺激的するエピトープとしては、CD3、CD27、CD2、CD4、CD5、CD7、CD8、CD28、CD30、CD40、CD56、CD83、CD90、CD95、4-1BB (CD 137)、B7-H3、CTLA-4、Frizzled-1 (FZD1)、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、HVEM、ICOS、IL-1R、LAT、LFA-1、LIGHT、MHCI、MHCII、NKG2D、OX40、ROR2およびRTKが挙げられる。

10

【0183】

CD3は、T細胞受容体の主要なシグナル伝達因子である。前述したように、CD3は、あらゆる成熟T細胞に発現されている。特定の実施形態において、CD3を刺激する分子(すなわちCD3結合ドメイン)は、OKT3抗体(米国特許公開第5,929,212号;米国特許公開第4,361,549号;ATCC(登録商標)CRL-8001TM;およびArakawa et al., J. Biochem. 120, 657-662 (1996)を参照されたい)、2G6-F3抗体、4B4-D7抗体、4E7-C9抗体、または18F5-H10抗体に由来するものであってもよい。

【0184】

特定の実施形態において、CD3を刺激する分子は、少なくとも0.25 ng/mlもしくは0.5 ng/mlの濃度、または2.5～10 μg/mlの濃度で培養培地に含まれていてもよい。特定の実施形態では、CD3を刺激する分子(例えばOKT3)を5 μg/mlの濃度で使用する。

20

【0185】

特定の実施形態において、aviタグに関連する活性化分子をビオチン化して、スト렙トアビジンビーズに結合させることができる。この方法を利用することにより、例えば、除去可能なT細胞エピトープ刺激活性化系を構築することができる。

【0186】

CD28に結合する例示的なドメインとして、TGN1412、CD80、CD86もしくは9D7抗体、またはこれらの派生物が挙げられる。CD28に結合する抗体として、さらに9.3抗体、KOLT-2抗体、15E8抗体、248.23.2抗体、EX5.3D10抗体、およびCD28.3抗体(GenBankアクセッション番号:AF451974.1において合成一本鎖Fvコンストラクトとして寄託されたもの;さらにVanhove et al., BLOOD, 15 Jul. 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570も参照されたい)が挙げられる。さらに、細胞分裂促進抗体(5.11A1)のFab断片と複合体化したヒトCD28の結晶構造である1YJDがある。特定の実施形態において、9D7抗体と競合しない抗体が選択される。

30

【0187】

4-1BB結合ドメインは、Taraban et al. Eur J Immunol. 2002 December; 32(12):3617-27に記載されているように、LOB12、IgG2a、LOB12.3またはIgG1から派生させることができる。特定の実施形態において、4-1BB結合ドメインは、米国特許公開第9,382,328に記載のモノクローナル抗体に由来するものである。別の4-1BB結合ドメインは、米国特許公開第6,569,997号、米国特許公開第6,303,121号、およびMittler et al. Immunol Res. 2004; 29(1-3):197-208に記載されている。

40

【0188】

OX40 (CD134) および／またはICOSの活性化を利用してもよい。OX40結合ドメインは、米国特許公開第20100196359号、米国特許公開第20150307617号、WO 2015/153513、WO2013/038191、およびMelero et al. Clin Cancer Res. 2013 Mar. 1; 19(5):1044-53に記載されている。ICOSに結合してこれを活性化することができる例示的な結合ドメインは、例えば、米国特許公開第20080279851号、およびDeng et al. Hybrid Hybridomics. 2004 June; 23(3):176-82に記載されている。

【0189】

50

T細胞活性化剤が可溶性である場合、ポリエチレングリコール（PEG）分子などの別の分子に結合させることができる。適切なPEG分子であれば、どのようなものであっても使用することができる。通常、1000Da以下の分子量のPEG分子であれば、水または培養培地に溶解することができる。場合によっては、そのようなPEGベースの試薬は、市販の活性化PEG分子（例えば、NOF North America Corporation社（米国カリフォルニア州アーバイン）から入手可能なPEG-NHS誘導体、またはCreative PEGWorks社（米国ノースカロライナ州チャペルヒル）から入手可能な活性化PEG誘導体）を使用して調製することができる。

【0190】

特定の実施形態において、細胞刺激剤は、培養培地中の固相に固定される。特定の実施形態において、固相は、培養容器の表面である（例えば、バッグ、細胞培養プレート、チャンバー、クロマトグラフィーカラム、架橋されたゲル、架橋されたポリマー、カラム、培養ディッシュ、中空系、マイクロタイタープレート、シリカコーティングガラスプレート、チューブ、チューブセット、ウェル、バイアル、または細胞用もしくは細胞培養用のその他の構造もしくはは容器の表面である）。

【0191】

特定の実施形態において、固相を培養培地に加えることができる。そのような固相として、例えば、ビーズ、中空系、樹脂、膜およびポリマーが挙げられる。

【0192】

例示的なビーズとして、磁気ビーズ、ポリマービーズおよび樹脂ビーズ（例えば、Strep-Tactin（登録商標）セファロース、Strep-Tactin Superflow、およびStrep-Tactin MacroPrep（IBA社（ゲッティンゲン）））が挙げられる。抗CD3／抗CD28ビーズは、T細胞増殖用試薬（インビトロジェン社）として市販されている。抗CD3／抗CD28ビーズは、4.5 μmの均一な大きさの超常磁性非発熱性滅菌ポリスチレンビーズであり、ヒトT細胞上のCD3細胞表面分子に対する親和性精製されたモノクローナル抗体とCD28細胞表面分子に対する親和性精製されたモノクローナル抗体の混合物でコーティングされている。中空系は、TerumoBCT社（米国コロラド州レイクウッド）から入手可能である。樹脂としては、金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）用樹脂（例えばTALON（登録商標）樹脂（Westburg社（ルースデン）））が挙げられる。膜としては、紙類およびクロマトグラフィーマトリックスの膜基質（例えば、ニトロセルロース膜またはポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜）が挙げられる。

【0193】

例示的なポリマーとして、例えば多糖類マトリックスなどの多糖類が挙げられる。このようなマトリックスとして、アガロースゲル（例えば、SuperflowTMアガロースまたはセファロース（登録商標）材料、例えば、様々なビーズの大きさおよび細孔径で市販されているSuperflowTMセファロース）、または架橋デキストランゲルが挙げられる。さらなる具体例として、デキストランが共有結合された微粒子状架橋アガロースマトリックスが挙げられ、（様々なビーズの大きさおよび様々な細孔径で）市販されており、Sephadex（登録商標）またはSuperdex（登録商標）としてGEヘルスケア社から入手可能である。

【0194】

使用してもよい合成ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、多糖類とアガロースのコポリマー（例えば、ポリアクリルアミド／アガロース複合体）、または多糖類とN,N'-メチレンビスアクリルアミドのコポリマーが挙げられる。デキストランとN,N'-メチレンビスアクリルアミドのコポリマーの例としては、Sephacryl（登録商標）シリーズの材料（Pharmacia Fine Chemicals社、ニュージャージー州ピスカタウェイ）が挙げられる。

【0195】

特定の実施形態では、合成ポリマーに結合された微粒子シリカ、または天然ポリマーに結合された微粒子シリカを使用してもよく、例えば、多糖類グラフトシリカ、ポリビニル

10

20

30

40

50

ピロリドングラフトシリカ、ポリエチレンオキシドグラフトシリカ、ポリ（2-ヒドロキシエチルアスパルトアミド）シリカ、およびポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）グラフトシリカなどが挙げられる。

【0196】

細胞活性化剤は、共有結合を介して固相に固定することができ、または非共有結合を介して可逆的に固相に固定することができる。

【0197】

特定の実施形態において、T細胞活性化培養培地には、FACSでソートした後に、HEPES、5～15%ヒト血清、1～3%L-グルタミン、0.5～1.5%ペニシリン／ストレプトマイシン、 $0.25 \times 10^{-4} \sim 0.75 \times 10^{-4} \text{ M}$ β -メルカプトエタノール、ならびにそれぞれ5～15 ng/ml（例えば10 ng/ml）の濃度のIL-7、IL-15およびIL-21を添加したRPMI中で培養したT細胞集団が含まれる。培養は、平底ウェルプレートに $0.1 \sim 0.5 \times 10^6$ 個/ウェルの密度で播種して行われる。活性化後の3日目に、組織培養処理プレートに細胞を移す。

【0198】

特定の実施形態において、T細胞活性化培養培地には、FACSでソートした後に、HEPES、10%ヒト血清、2%L-グルタミン、1%ペニシリン／ストレプトマイシン、 $0.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ β -メルカプトエタノール、ならびにそれぞれ5～15 ng/ml（例えば10 ng/ml）の濃度のIL-7、IL-15およびIL-21を添加したRPMI中で培養したCD8+T細胞集団が含まれる。培養は、非組織培養処理96/48ウェルプレートに $0.1 \sim 0.5 \times 10^6$ 個/ウェルの密度で播種して行われる。活性化後の3日目に、組織培養処理プレートに細胞を移す。

HSC/HSPの培養条件には、Notchアゴニストを添加して増殖させることが含まれていてもよく（例えば、米国特許公開第7,399,633号；米国特許公開第5,780,300号；米国特許公開第5,648,464号；米国特許公開第5,849,869号；および米国特許公開第5,856,441号を参照されたい）、この培養条件での成長因子は、25～300 ng/mlのSCF、25～300 ng/mlのFlt-3L、25～100 ng/mlのTPO、25～100 ng/mlのIL-6、および10 ng/mlのIL-3である。より具体的な実施形態では、50 ng/ml、100 ng/mlまたは200 ng/mlのSCF；50 ng/ml、100 ng/mlまたは200 ng/mlのFlt-3L；50 ng/mlまたは100 ng/mlのTPO；50 ng/mlまたは100 ng/mlのIL-6；および10 ng/mlのIL-3を使用することができる。

【0199】

(vi) エクスビオで製造された細胞製剤

特定の実施形態において、遺伝子組換え細胞は、培養培地から回収し、洗浄し、濃縮して、治療有効量で担体に混合することができる。例示的な担体として、食塩水、緩衝生理食塩水、生理食塩水、水、ハンクス溶液、リンゲル溶液、Normosol-R（Abbott Labs社）、PLASMA-LYTE A（登録商標）（Baxter Laboratories社、イリノイ州モートン・グローブ）、グリセロール、エタノールおよびこれらの組み合わせが挙げられる。

【0200】

特定の実施形態において、ヒト血清アルブミン（HSA）もしくはその他のヒト血清成分またはウシ胎児血清を担体に添加することができる。特定の実施形態において、点滴用の担体は、5%HASまたはデキストロースを添加した緩衝生理食塩水を含む。別の等張化剤として、三価糖アルコールまたはそれよりも価数の大きい糖アルコールを含む多価糖アルコールが挙げられ、例えば、グリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトールなどが挙げられる。

【0201】

担体は、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、酒石酸緩衝液、フマル酸緩衝液、グルコン酸緩衝液、シュウ酸緩衝液、乳酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液および／またはトリメチルアミン塩などの緩衝剤を含んでもよい。

【0202】

安定剤は、容器の壁面への細胞の接着を阻止することができる添加物から増量剤といっ

10

20

30

40

50

た様々な機能を有することができる幅広い種類の添加剤を指す。典型的な安定剤として、多価糖アルコール；アルギニン、リシン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L-ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニンなどのアミノ酸；ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイノシトール、ガラクトクトール、グリセロール、シクリトール（例えばイノシトール）などの有機糖類または糖アルコール類；PEG；アミノ酸ポリマー；尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロール、チオ硫酸ナトリウムなどの硫黄含有還元剤；低分子量ポリペプチド（すなわち残基数が10個未満のポリペプチド）；HSA、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；キシロース、マンノース、フルクトース、グルコースなどの単糖類；ラクトース、マルトース、スクロースなどの二糖類；ラフィノースなどの三糖類；およびデキストランなどの多糖類が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0203】

必要とされる場合または有益である場合、製剤は、注射部位の疼痛を緩和するために、リドカインなどの局所麻酔剤を含んでもよい。

【0204】

例示的な保存剤として、フェノール、ベンジルアルコール、m-クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ベンザルコニウムハロゲン化物、塩化ヘキサメトニウム、アルキルパラベン類（例えば、メチルパラベンやプロピルパラベン）、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノールおよび3-ペンタノールが挙げられる。

【0205】

製剤中に含まれる細胞の治療有効量は、 10^2 個を超える数、 10^3 個を超える数、 10^4 個を超える数、 10^5 個を超える数、 10^6 個を超える数、 10^7 個を超える数、 10^8 個を超える数、 10^9 個を超える数、 10^{10} 個を超える数、または 10^{11} 個を超える数であってもよい。

【0206】

本明細書に開示される製剤において、細胞は、通常、1L以下、500ml以下、250ml以下または100ml以下の体積中に含まれる。したがって、投与される細胞の密度は、通常、 10^4 個/mlを超える密度、 10^7 個/mlを超える密度、または 10^8 個/mlを超える密度である。

【0207】

前述したように、製剤には、少なくとも1種の遺伝子組換え細胞（例えば、組換えT細胞、組換えNK細胞または組換え幹細胞）が含まれていてもよい。また、製剤には異なる種類の遺伝子組換え細胞（例えば、T細胞、NK細胞および／または幹細胞の組み合わせ）が含まれていてもよい。

【0208】

異なる種類の遺伝子組換え細胞または細胞サブセット（例えば、組換えT細胞、組換えNK細胞および／または組換え幹細胞）は、様々な比率で提供することができ、例えば、1:1:1の比率、2:1:1の比率、1:2:1の比率、1:1:2の比率、5:1:1の比率、1:5:1の比率、1:1:5の比率、10:1:1の比率、1:10:1の比率、1:1:10の比率、2:2:1の比率、1:2:2の比率、2:1:2の比率、5:5:1の比率、1:5:5の比率、5:1:5の比率、10:10:1の比率、1:10:10の比率、10:1:10などの比率で提供することができる。これらの比率は、同じCAR構成要素または異なるCAR構成要素を発現する細胞の数にも適用できる。2種類の細胞のみを組み合わせる場合、または製剤中に含まれており、発現されるCAR構成要素が2種類の組み合わせのみである場合、これらの比率は、上記の3つの数値の組み合わせから作成可能な2つの数値の組み合わせであってもよい。いくつかの実施形態において、組み合わせた細胞集団は、インビトロ、インビボおよび／またはエクスビボにおいて、有効性および／または細胞増殖を試

験し、有効性および／または細胞増殖が得られる細胞の比率が選択される。特定の実施形態には、1：1の比率のCD4 T細胞とCD8 T細胞が含まれる。

【0209】

本明細書に開示された細胞ベースの製剤は、例えば、注射、点滴、灌流または洗浄での投与用に調製することができる。この製剤は、骨髄注射、静脈内注射、皮内注射、動脈内注射、リンパ節内注射、リンパ管内注射、腹腔内注射、病巣内注射、腫瘍内注射、膀胱内注射および／または皮下注射用にさらに製剤化することができる。

【0210】

(vii) インビボで細胞を組換えるための標的指向性ウイルスベクターおよびナノ粒子

標的指向性を付与したウイルスベクターおよび／またはナノ粒子を用いて、インビボまたはエキスピボで免疫細胞を遺伝子組換えすることもできる。CARをコードする遺伝子の細胞への送達に利用することができるウイルスベクターは、本明細書に別記されており、標的指向性が付与されたウイルスベクター（例えばシュードタイプのウイルスベクター）が当技術分野において多く知られている。

【0211】

細胞を標的とする例示的なナノ粒子として、細胞を標的とするリガンド（例えば、CD3、CD4、CD8、CD34）を表面に結合させたナノ粒子があり、このナノ粒子は、細胞を標的とするリガンドが表面に結合されていることから、選択された種類の細胞によって選択的に取り込まれる。次に、ナノ粒子により遺伝子組換え成分が送達されて、CARが発現される。

【0212】

例示的なナノ粒子として、リポソーム（水性コアを取り囲む少なくとも1層の脂質二重層が同心球を形成している微小な小胞）、リポソームナノ粒子（そのコア内に、さらに小さい別のナノ粒子を封入するために用いられるリポソーム構造）、および脂質ナノ粒子（リポソームに特徴的な連続的な脂質二重層を持たないリポソーム様構造）が挙げられる。その他のポリマー系ナノ粒子や、多孔性ネットワークを形成することができる材料で構成された多孔性ナノ粒子を用いることもできる。例示的な材料として、金属、遷移金属およびメタロイド（例えば、リチウム、マグネシウム、亜鉛、アルミニウムおよびシリカ）が挙げられる。

【0213】

インビボでの送達および細胞への取り込みを目的としたナノ粒子は、荷電していないコーティングまたは負に荷電したコーティングを有していてもよく、このナノ粒子の大きさは130nm以下であってもよい。ナノ粒子の寸法は、例えば、動的光散乱法および／または電子顕微鏡法などの従来の技術を用いて測定することができる。特定の実施形態において、ナノ粒子は、WO2014153114、WO2017181110およびWO201822672に記載されているものであってもよい。

【0214】

製剤中に含まれるベクターおよび／またはナノ粒子の治療有効量は、0.1～5μg/kgまたは0.5～1μg/kgの範囲であってもよい。別の例において、用量として、1μg/kg、30μg/kg、90μg/kg、150μg/kg、500μg/kg、750μg/kg、0.1～5mg/kgまたは0.5～1mg/kgが挙げられる。別の例において、用量として、1mg/kg、10mg/kg、30mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、100mg/kg、300mg/kg、500mg/kg、700mg/kg、1000mg/kgまたはそれ以上の用量が挙げられる。

【0215】

(viii) 使用方法

本明細書に開示された方法は、本明細書に開示された製剤を用いて、対象（ヒト、愛玩動物（イヌ、ネコ、爬虫類、トリなど）、家畜（ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、ニワトリなど）または研究用動物（サル、ラット、マウス、魚類など））を治療することを含む。対象の治療には、治療有効量を送達することが含まれる。治療有効量は、有効量、予防的処置および／または治療的処置を提供できる量を含む。

【0216】

「有効量」は、対象において所望の生理的变化を起こさせるのに必要な製剤の量である。例えば、有効量は、免疫原性抗がん作用を提供することができる。有効量は、研究目的で投与されることが多い。本明細書に開示された有効量は、がんの発生または進行の評価に関連する動物モデルまたはインビトロアッセイにおいて、統計学的に有意な効果を引き起こすことができる量である。免疫原性製剤は有効量で提供することができ、この有効量によって免疫応答が刺激される。

【0217】

「予防的処置」は、がんの徴候もしくは症状を示していない対象またはがんの初期徴候もしくは初期症状のみを示す対象に対して、そのがんがさらに進展するリスクを軽減または低減する目的で行われる処置を含む。したがって、予防的処置は、STEAP1を発現するがんを予防する処置として機能する。特定の実施形態において、予防的処置は、原発性がん腫瘍部位からの転移の発生を抑制するか、遅延させるか、阻止するものである。

【0218】

「治療的処置」は、がんの症状または徴候を示す対象に対して、がんの徴候または症状を軽減または排除する目的で行われる処置を含む。治療的処置により、がんの存在または活性の抑制、制御もしくは排除を行うことができ、かつ／またはがんの副作用の抑制、制御もしくは排除を行うことができる。

【0219】

有効量、予防的処置または治療的処置としての機能は、互いに排他的ではなく、特定の実施形態では、投与された用量によって2種以上の処置を行ってもよい。

【0220】

特定の実施形態において、治療有効量により抗がん作用を得ることができる。抗がん作用としては、がん細胞の数の減少、転移の数の減少、腫瘍体積の減少、平均余命の延長、がん細胞における化学療法感受性または放射線感受性の誘導、がん細胞の近傍における血管新生の抑制、がん細胞の増殖の抑制、腫瘍の増殖の抑制、転移の阻止もしくは減少、対象の寿命の延長、がん関連疼痛の抑制、ならびに／または治療後のがんの再燃もしくは再発の減少が挙げられる。特定の実施形態において、治療有効量により、抗原密度が低い状態での抗がん作用を得ることができる。

【0221】

「腫瘍」は、細胞の異常増殖（新生物細胞または腫瘍細胞と呼ばれる）によって形成された腫脹または病変である。「腫瘍細胞」は、急速かつ無秩序な細胞増殖によって増殖し、新たな増殖を開始させる刺激を止めた後も増殖し続ける異常細胞である。腫瘍は、正常組織の構造組織化および機能協調が部分的または完全に失われており、通常、識別可能な組織塊を形成し、この組織塊は、良性、前悪性または悪性である場合がある。

【0222】

特定の実施形態において、治療有効量により免疫応答が誘導される。免疫応答は、STEAP1を発現するがん細胞に対するものであってもよい。

【0223】

「STEAP1陽性細胞」は、その表面上にSTEAP1を発現する細胞を指す。「STEAP1陽性がん細胞」は、その表面上にSTEAP1を発現するがん細胞を指す。いくつかの実施形態において、細胞表面上のSTEAP1の発現は、例えば、免疫組織化学分析やFACSなどの方法において、STEAP1に対する抗体を使用することによって測定される。あるいは、STEAP1 mRNAの発現は、細胞表面上のSTEAP1発現と相関すると考えられ、STEAP1 mRNAの発現は、例えば、in situハイブリダイゼーションおよび／またはRT-PCR（定量RT-PCRを含む）により測定することができる。

【0224】

本明細書に開示されたCARで治療できるSTEAP1関連疾患の例としては、前立腺がん（例えば去勢抵抗性前立腺がん）、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（ユーイング肉腫を含む）、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、大腸がん、肺がんおよび腎臓がんが挙げられる。

【0225】

前述したように、本明細書に開示されたCARは、抗原密度が低い状態のがんを有する対象の治療に使用することができる。特定の例では、対象におけるがんのSTEAP1抗原発現量を評価し、抗原密度が低い状態であることに基づいて、対象の治療に使用する本開示のCARを選択することを含む。

【0226】

本明細書に開示されたCARは、抗原密度が低い状態のがんを有する対象の治療に限定されず、抗原密度が高い状態のがんを有する対象にも使用することができる。抗原密度が高い状態としては、病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が50,000個を超える対象；病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が60,000個を超える対象；病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が70,000個を超える対象；病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が80,000個を超える対象；病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が90,000個を超える対象；または病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が100,000個を超える対象が挙げられる。

10

【0227】

投与に際して、治療有効量（本明細書において「用量」とも呼ぶ）は、初めに、インビトロアッセイおよび／または動物モデル研究の結果に基づいて推定することができる。このような情報を使用して、目的の対象に有用な投与量をより正確に決定することができる。特定の対象に投与される実際の用量は、標的、体重、疾患の重症度、がんの種類、がんのステージ、過去の治療的介入または併用されている治療的介入、対象の特発性疾患および投与経路などの物理的要因および生理学的要因などのパラメータを考慮に入れて、医師、獣医師または研究者により決定することができる。

20

【0228】

細胞ベースの製剤の治療有効量は、 $10^4 \sim 10^9$ 個/kg体重または $10^3 \sim 10^{11}$ 個/kg体重であってもよい。投与される治療有効量として、 10^2 個を超える数の細胞、 10^3 個を超える数の細胞、 10^4 個を超える数の細胞、 10^5 個を超える数の細胞、 10^6 個を超える数の細胞、 10^7 個を超える数の細胞、 10^8 個を超える数の細胞、 10^9 個を超える数の細胞、 10^{10} 個を超える数の細胞、または 10^{11} 個を超える数の細胞が挙げられる。

【0229】

製剤中に含まれるベクターおよび／またはナノ粒子の治療有効量は、 $0.1 \sim 5 \mu\text{g/kg}$ または $0.5 \sim 1 \mu\text{g/kg}$ の範囲であってもよい。別の例において、用量として、 $1 \mu\text{g/kg}$ 、 $30 \mu\text{g/kg}$ 、 $90 \mu\text{g/kg}$ 、 $150 \mu\text{g/kg}$ 、 $500 \mu\text{g/kg}$ 、 $750 \mu\text{g/kg}$ 、 $0.1 \sim 5 \text{mg/kg}$ または $0.5 \sim 1 \text{mg/kg}$ が挙げられる。別の例において、用量として、 1mg/kg 、 10mg/kg 、 30mg/kg 、 50mg/kg 、 70mg/kg 、 100mg/kg 、 300mg/kg 、 500mg/kg 、 700mg/kg 、 1000mg/kg またはそれ以上の用量が挙げられる。

30

【0230】

治療有効量は、治療レジメンのコース中（例えば、毎日、1日おき、3日ごと、4日ごと、5日ごと、6日ごと、週1回、2週ごと、3週ごと、毎月、2ヶ月ごと、3ヶ月ごと、4ヶ月ごと、5ヶ月ごと、6ヶ月ごと、7ヶ月ごと、8ヶ月ごと、9ヶ月ごと、10ヶ月ごと、11ヶ月ごと、または年1回）に、1回の投与または複数回の投与により達成することができる。特定の実施形態において、治療プロトコルは、臨床試験プロトコルまたはFDAに承認された治療プロトコルに応じて決定してもよい。

40

【0231】

治療有効量は、例えば、注射、点滴、灌流または洗浄によって投与することができる。投与経路としては、静脈内ボラス投与、皮内投与、動脈内投与、腹腔内投与、リンパ節内投与、リンパ管内投与、腹腔内投与、病巣内投与、前立腺内投与、髄腔内投与、腫瘍内投与、膀胱内投与および／または皮下投与が挙げられる。

【0232】

特定の実施形態において、本開示の細胞は、関連する治療方法に併用して（例えば、関連する治療方法を行う前、それと同時に、それ以降に）患者に投与され、この関連する治

50

療方法の数は特に限定されない。特定の実施形態において、本開示の細胞は、化学療法；光線照射；シクロスポリン、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；CAM PATHなどのその他の免疫除去剤；抗CD3抗体；その他の抗体治療；細胞毒素；フルダラビン；シクロスポリン；FK506；ラパマイシン；ミコフェノール酸；ステロイド；FR901228；サイトカイン；または放射線照射に併用して使用してもよい。

【0233】

特定の実施形態において、本明細書に開示されたCARを発現するエフェクター免疫細胞を含む製剤は、化学療法剤と併用投与してもよく、併用される化学療法剤の数は特に限定されない。化学療法剤の例として、チオテパやシクロホスファミド（CYTOXANTM）などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、ピボスルファンなどのスルホン酸アルキル類；benzodopa、カルボコン、meturedopa、uredopaなどのアジリジン類；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、またはトリメチロールメラミンを用いたレジメンを含む、エチレンイミン類およびメチルメラミン類；クロラムブシル、chlomaphazine、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、novembichin、phenesterine、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード類；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソウレア類；aclacinomycin、アクチノマイシン、authramycin、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、carabycin、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、potfiromycin、ピューロマイシン、quelamycin、rodorubicin、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ソルビシンなどの抗生物質；メトトレキサートや5-フルオロウラシル（5-FU）などの代謝拮抗薬；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FUなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの副腎抑制剤；フォリン酸などの葉酸補給剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；edatraxate；defofamine；デメコルチン；ジアジクオン；エフロルニチン；エリプチニウム酢酸塩；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；gacytosine；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド類、例えば、パクリタキセル（タキソールTM、ブリistol・マイヤーズ スクイブ社）、およびドセタキセル（タキソテール（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer社）；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチンやカルボプラチンなどの白金類似体；ビンブラスチン；白金製剤；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；ト

10

20

30

40

50

ボイソメラーゼ阻害薬RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；タルグレチンTM（ベキサロテン）やPanretinTM（abtretinoin）などのレチノイン酸誘導体；ONTAKTM（デニロイキン ジフチトクス）；エスペラミシン類；カペシタビン；ならびに前記化学療法剤のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。化学療法剤の定義には、腫瘍に対するホルモンの作用を制御または抑制する抗ホルモン剤がさらに含まれ、このような抗ホルモン剤としては、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害薬である4,5-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、トレミフェン（フェアストン）などの抗エストロゲン薬；フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、リュープロリド、ゴセレリンなどの抗アンドロゲン薬；および前記抗ホルモン剤のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。さらに、適切であると認められる場合、化学療法剤の組み合わせが投与され、これには、CHOP療法、すなわち、シクロホスファミド（シトキサン（登録商標））、ドキシソルビシン（ヒドロキシドキシソルビシン）、ビンクリスチン（オンコビン（登録商標））およびプレドニゾンの組み合わせが含まれる。

10

20

30

40

50

【0234】

いくつかの実施形態において、化学療法剤は、本開示の組換え細胞または核酸の投与と同時に投与されるか、または本開示の組換え細胞または核酸を投与してから1週間以内に投与される。別の実施形態において、化学療法剤は、本開示の組換え細胞または核酸を投与してから、1～4週間後、1週間～1ヶ月後、1週間～2ヶ月後、1週間～3ヶ月後、1週間～6ヶ月後、1週間～9ヶ月後、または1週間～12ヶ月後に投与される。別の実施形態において、化学療法剤は、本開示の細胞または核酸の投与の少なくとも1ヶ月前に投与される。いくつかの実施形態において、本開示の方法は、2種以上の化学療法剤を投与することをさらに含む。

【0235】

本明細書に記載の製剤に併用して、様々な追加の治療剤を使用してもよい。例えば、有用である可能性のある追加の治療剤として、ニボルマブ（オプジーボ（登録商標））、ペムブロリズマブ（キイトルーダ（登録商標））、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、アテゾリズマブなどのPD-1阻害薬；およびイピリムマブ（ヤーボイ（登録商標））などのCTLA-4阻害薬が挙げられる。

【0236】

本開示との併用に適した追加の治療剤として、アビラテロン酢酸エステル、アパルタミド、ビカルタミド、カバジタキセル、カソデックス（ビカルタミド）、デガレリクス、ドセタキセル、エンザルタミド、アーリーダ（登録商標）（アパルタミド）、フルタミド、酢酸ゴセレリン、ジェブタナ（登録商標）（カバジタキセル）、酢酸ロイプロリド、Lupron（登録商標）（酢酸ロイプロリド）、Lupron Depot（酢酸ロイプロリド）、Lupron Depot-Ped（酢酸ロイプロリド）、塩酸ミトキサントロン、Nilandron（登録商標）（ニルタミド）、ニルタミド、Provence（登録商標）（シプロイセル-T）、ラジウム223二塩化物、シプロイセル-T、タキソテール（ドセタキセル）、Viadur（酢酸ロイプロリド）、ゾーフイゴ（ラジウム223二塩化物）、イクスタンジ（エンザルタミド）、ゾラデックス（酢酸ゴセレリン）、またはザイティガ（アビラテロン酢酸エステル）が挙げられる。

【0237】

さらなる実施形態において、CARを含む免疫細胞を含む製剤は、抗炎症剤とともに投与することができる。抗炎症剤または抗炎症薬としては、ステロイド類およびグルココルチコイド類（ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾンおよびトリアムシノロンを含む）；ならびにアスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗TNF薬、シクロホスファミドおよびミコフェノール酸塩を含む非ステロイド系抗炎症剤（NSAIDs）が挙げられる。例示的なNSAIDsとしては、イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム

、Cox-2阻害薬、およびサリチル酸系が挙げられる。例示的な鎮痛剤としては、アセトアミノフェン、オキシコドン、トラマドール、およびプロポキシフェン塩酸塩が挙げられる。例示的なグルココルチコイド類としては、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、およびプレドニゾンが挙げられる。例示的な生物学的応答修飾物質としては、細胞表面マーカー（例えばCD4やCD5など）に対する分子；TNFアンタゴニスト（例えば、エタネルセプト（エンブレル（登録商標））、アダリムマブ（ヒュミラ（登録商標））およびインフリキシマブ（レミケード（登録商標）））などのサイトカイン阻害薬；ケモカイン阻害薬；ならびに接着分子阻害薬が挙げられる。生物学的応答修飾物質には、モノクローナル抗体および組換え分子も含まれる。例示的なDMARDsとしては、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシラミン、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、金製剤（経口製剤（オーラノフィン）および筋肉内注射）、ならびにミノサイクリンが挙げられる。

10

【0238】

特定の実施形態において、本明細書に記載の製剤は、サイトカインに併用して投与される。本明細書において、「サイトカイン」は、1つの細胞集団によって放出されて、細胞間メディエーターとして別の細胞に作用するタンパク質を指す。サイトカインの例として、リンホカイン、モノカインおよび従来のポリペプチドホルモンが挙げられる。サイトカインとしては、ヒト成長ホルモン、ヒトN-メチオニル成長ホルモン、ウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；濾胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体形成ホルモン（LH）などの糖タンパク質ホルモン；肝細胞増殖因子（HGF）；線維芽細胞増殖因子（FGF）；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；ミューラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮細胞成長因子；インテグリン；トロンプオエチン（TPO）；NGF- β などの神経成長因子（NGF）；血小板由来増殖因子；TGF- α やTGF- β などのトランスフォーミング増殖因子（TGF）；インスリン様成長因子IおよびII；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ などのインターフェロン；マクロファージCSF（M-CSF）などのコロニー刺激因子（CSF）；顆粒球マクロファージCSF（GM-CSF）；顆粒球CSF（G-CSF）；IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15などのインターロイキン（IL）；TNF- α やTNF- β などの腫瘍壊死因子；LIFやkitリガンド（KL）などのその他のポリペプチド因子などが含まれる。本明細書において、「サイトカイン」には、天然由来のタンパク質または組換え細胞培養由来のタンパク質、および天然の配列を有するサイトカインの生物学的に活性な等価物も含まれる。

20

30

【0239】

(ix) 対照集団から得られる参照レベル

本明細書に記載の治療に関連するパラメータとして得られた数値は、対照集団から得られた参照レベルと比較することができ、この比較から、本明細書に記載の治療が、治療を必要とする対象に有効かどうかを示すことができる。参照レベルは、対照集団から得られた1つ以上の関連するデータセットから得ることができる。本明細書において、「データセット」は、所望の条件下で試料（または試料集団）の評価によって得られる数値のセットである。データセットの数値は、例えば、実験により試料から測定値を得た後、これらの測定値からデータセットを構築することによって得ることができる。当業者であれば理解できるように、参照レベルは、例えば、個々のデータ点の収集により得られたの意味のある集合参照レベル（例えば、平均値、中央値、平均値の中央値など）を得るのに有用な、当技術分野で公知の数学式または統計式に基づくものであってもよい。あるいは、参照レベルまたはこれを作成するためのデータセットは、研究所などのサービス提供者、またはデータセットが格納されたデータベースもしくはサーバから得ることができる。

40

【0240】

50

データセットから得られた参照レベルは、対照集団から事前に得られた測定値から得られたものであってもよい。「対照集団」は、指定された特性が類似した対象または試料をグループ化したものである。グループ化は、例えば、臨床的パラメータ、臨床的評価、治療レジメン、疾患の状態、病態の重症度などに従って行われる。特定の実施形態において、グループ化は、年齢層（例えば60～65歳）とがんの状態に基づいて行われる。特定の実施形態において、正常な対照集団は、被験対象と年齢が一致しており、がんを有していない個体が含まれる。特定の実施形態において、年齢が一致した個体として、状況に応じて臨床的関連性が得られるように、例えば、0～10歳、30～40歳、60～65歳、70～85歳などの個体が挙げられる。特定の実施形態において、対照集団には、STEAP1関連疾患を有するが、治療有効量を投与していない個体が含まれていてもよい。

10

【0241】

特定の実施形態において、本明細書に記載の治療に関連する特定のパラメータの数値に関連する参照レベルは、本明細書に開示された治療が、治療を必要とする対象に対して治療学的に有効であるのかどうかを判断するために、対照集団での治療に関連する特定の対応するパラメータの数値に基づいて得られる。

【0242】

特定の実施形態において、標本値が参照レベルと比べて統計学的に有意な差があるのかどうかということに基づいて結論が引き出される。差異が偶然のみに基づいて起こったものであると予想される水準にある場合、測定値は統計学的に有意な差はない。これに対して、統計学的に有意な差または増加は、偶然のみで起こると予想されるものよりも大きい差異または増加である。統計学的有意性があること、または統計学的有意性がないことは、当技術分野で公知の様々な方法のうちのいずれを使用して決定してもよい。統計学的有意性の指標として一般に使用されているものの一例として、p値がある。p値は、特定のデータ点に等しい結果が得られる確率を示し、ここで、データ点は偶然のみによって得られる結果である。p値が0.05以下の場合に、結果が有意である（偶然ではない）と見なされることが多い。特定の実施形態において、標本値と参照レベルの間で統計学的有意差がない場合、標本値は、正常な対照集団から得られた参照レベルと「同程度」である。

20

【0243】

(x) キット

本開示はキットをさらに含む。キットは、本明細書に開示された方法を実施するための様々な成分を含んでいてもよい。例えば、キットは、実施される方法の態様に応じて、本明細書に開示されたCARをコードする1つ以上の核酸；図13に示されるタンパク質またはそのコード配列；第2世代4-1BBキメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸；短いスパーサー、中程度の長さのスパーサーまたは長いスパーサーを有するレンチウイルスSTEAP1 CARコンストラクト；scFvをコードする核酸；VLをコードする核酸；VHをコードする核酸；膜貫通ドメインをコードする核酸；EGFRtをコードする核酸；細胞（例えば、免疫細胞、T細胞、CD4 T細胞、CD8 T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK-T細胞、単球／マクロファージ、リンパ球、造血幹細胞（HSC）、造血前駆細胞（HPC）、および／もしくはHSCとHPCの混合物（すなわちHSPC）、非形質導入T細胞、STEAP1-BBζ CAR T細胞、22Rv1 STEAP1ノックアウト（ko）細胞、レンチウイルスからの発現によりSTEAP1の発現がレスキューされた22Rv1 STEAP1 ko細胞）；細胞株（例えば、アンドロゲン受容体（AR）陽性のヒト前立腺がん細胞株、AR陰性の前立腺がん細胞株、DU145細胞株、DU145 STEAP1細胞株、レンチウイルスで組換えたDU145 hSTEAP1細胞株、レンチウイルスで組換えたDU145 mSteap1細胞株、C4-2B前立腺がん細胞株、PC3前立腺がん細胞株）；組織試料（例えば、末梢血単核細胞（PBMC）、白血球、骨髄、胸腺、組織生検試料、腫瘍、リンパ節、腸管関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、その他のリンパ組織、肝臓、肺、胃、腸管、大腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸部、精巣、卵巣、扁桃腺もしくはその他の臓器、および／またはこれらの臓器に由来する細胞）；遺伝子発現成分（例えば、ベクター（例えば、レンチウイルスベクターやレトロウイルスベクター）により提供される発現用遺伝

30

40

50

子、CRISPRの構成要素、ZFN、TALEN、MegaTAL、標的指向性ウイルスベクターおよび／または標的指向性ナノ粒子）；細胞処方成分または細胞活性化成分（例えば、生理食塩水、緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS））；生体適合性バッファ（Ca⁺⁺/Mg⁺⁺不含PBS、生理食塩水、水、ハンクス溶液、リンゲル溶液）；T細胞刺激性エпитープ（例えば、抗CD3／抗CD28結合ビーズ、OKT3、TGN1412）；培養を開始するための組成物（RPMI、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン／ストレプトマイシン、EBVで形質転換した非分裂性リンパ芽球様細胞（LCL）、IL-21、ヒト血清アルブミン（HSA）もしくはその他のヒト血清成分またはウシ胎児血清、デキストロース、安定剤、保存剤）；併用療法成分（例えば、局所麻酔剤、化学療法剤、免疫抑制剤、抗炎症剤）；蛍光分子タグを付加した抗体；PCR増幅用配列；サイトカイン（例えば、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21）；培養容器；参照レベル；同系の播種性前立腺がんを有するhSTEAP1-KIマウス；野生型アレレルまたはhSTEAP1-KIアレレルの一部を増幅するためのプライマーペア；GAPDH；IFN-γの酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；培養プレートなどを含んでいてもよい。

10

【0244】

以下の例示的な実施形態および実施例は、本開示の非限定的な特定の実施形態を示すために記載されている。本開示を参照した当業者であれば、本明細書に開示された特定の実施形態に様々な変更を加えることができることを理解し、このような変更を加えたとしても、本開示の要旨および範囲から逸脱することなく、同様の結果または類似した結果が得られることも理解できるであろう。

20

【0245】

(xi) 例示的な実施形態

1. キメラ抗原受容体（CAR）であって、細胞により発現された場合に、

(i) a. North、IMGT、KabatまたはChothiaのナンバリングに基づく、DSTP3086S抗体由来の一組の相補性決定領域（CDR）を有するSTEAP1結合ドメインと、

b. CH2ドメインに4/2-NQ変異を有するIgG4ヒンジ-CH2-CH3スペーサーとを含む細胞外部分；

(ii) CD3ζシグナル伝達ドメインと4-1BBシグナル伝達ドメインを含む細胞内部分；および

(iii) 前記細胞外部分を前記細胞内部分に連結するCD28膜貫通ドメインを含む、CAR。

30

2. 治療を必要とする対象の治療のための、実施形態1に記載のCARの使用であって、前記対象が、STEAP1抗原密度が低い状態を有する、使用。

3. キメラ抗原受容体（CAR）であって、細胞により発現された場合に、

STEAP1結合ドメインを含む細胞外部分；

エフェクタードメインを含む細胞内部分；および

前記細胞外部分を前記細胞内部分に連結する膜貫通ドメインを含む、CAR。

4. 前記STEAP1結合ドメインが、North、IMGT、KabatまたはChothiaのナンバリングに基づく、DSTP3086S抗体由来の一組の相補性決定領域（CDR）を有する、実施形態3に記載のCAR。

40

5. 前記STEAP1結合ドメインが、一本鎖可変領域断片（scFv）を含む、実施形態3または4に記載のCAR。

6. 前記scFvが、配列番号5に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域と、配列番号4に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域とを有する、実施形態5に記載のCAR。

7. 前記scFvが、配列番号5に示される配列を有する重鎖可変領域と、配列番号4に示される配列を有する軽鎖可変領域とを有する、実施形態5に記載のCAR。

8. 前記scFvが、配列番号3に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態5に記載のCAR。

50

9. 前記 scFv が、配列番号 3 に示される配列を有する、実施形態 5 に記載の CAR。
10. 前記 scFv が、配列番号 9 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列によってコードされる重鎖可変領域と、配列番号 7 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列によってコードされる軽鎖可変領域とを有する、実施形態 5 ～ 9 のいずれか 1 つに記載の CAR。
11. 前記 scFv が、配列番号 9 に示される配列によってコードされる重鎖可変領域と、配列番号 7 に示される配列によってコードされる軽鎖可変領域とを有する、実施形態 5 ～ 9 のいずれか 1 つに記載の CAR。
12. 前記 scFv が、配列番号 6 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態 5 ～ 11 のいずれか 1 つに記載の CAR。
13. 前記 scFv が、配列番号 6 に示される配列によってコードされる、実施形態 5 ～ 11 のいずれか 1 つに記載の CAR。
14. 前記細胞外部分が、スペーサーをさらに含む、実施形態 3 ～ 13 のいずれか 1 つに記載の CAR。
15. 前記スペーサーが 230 アミノ酸長以下である、実施形態 14 に記載の CAR。
16. 前記スペーサーが、IgG4 のヒンジ領域、CH2 ドメインおよび CH3 ドメインからなるか；IgG4 のヒンジ領域および CH2 ドメインからなるか；または IgG4 のヒンジ領域からなる、実施形態 14 または 15 に記載の CAR。
17. 前記 IgG4 が ヒト IgG4 である、実施形態 16 に記載の CAR。
18. 前記スペーサーが、配列番号 20 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、実施形態 14 ～ 17 のいずれか 1 つに記載の CAR。
19. 前記スペーサーが、配列番号 20 に示される配列を有する、実施形態 14 ～ 18 のいずれか 1 つに記載の CAR。
20. 前記スペーサーが、配列番号 21 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態 14 ～ 18 のいずれか 1 つに記載の CAR。
21. 前記スペーサーが、配列番号 21 に示される配列によってコードされる、実施形態 14 ～ 18 のいずれか 1 つに記載の CAR。
22. 前記エフェクタードメインが、CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部を含むか；4-1BB シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、CD28 シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、4-1BB シグナル伝達ドメインを含むか；CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、CD28 シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部を含むか；または CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、4-1BB シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部と、CD28 シグナル伝達ドメインの全体もしくはその一部を含む、実施形態 3 ～ 21 のいずれか 1 つに記載の CAR。
23. 前記エフェクタードメインが、CD3 ζ シグナル伝達ドメインの全体またはその一部と、4-1BB シグナル伝達ドメインの全体またはその一部を含む、実施形態 22 に記載の CAR。
24. 前記 CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 24、25 および / または 26 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、実施形態 22 または 23 に記載の CAR。
25. 前記 CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 24、25 または 26 に示される配列を有する、実施形態 22 または 23 に記載の CAR。
26. 前記 CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 22 および / または 23 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態 23 ～ 25 のいずれか 1 つに記載の CAR。
27. 前記 CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 22 または 23 に示される配列によってコードされる、実施形態 23 ～ 25 のいずれか 1 つに記載の CAR。
28. 前記 4-1BB シグナル伝達ドメインが、配列番号 30、31 および / または 32 に示される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、実施形態 23 ～ 27 のいずれか 1 つに記載の CAR。

10

20

30

40

50

29. 前記4-1BBシグナル伝達ドメインが、配列番号30、31または32に示される配列を有する、実施形態23～28のいずれか1つに記載のCAR。
30. 前記4-1BBシグナル伝達ドメインが、配列番号27、28および／または29に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態23～28のいずれか1つに記載のCAR。
31. 前記4-1BBシグナル伝達ドメインが、配列番号27、28または29に示される配列によってコードされる、実施形態23～28のいずれか1つに記載のCAR。
32. 前記膜貫通ドメインが、CD28膜貫通ドメインを含む、実施形態3～31のいずれか1つに記載のCAR。
33. 前記CD28膜貫通ドメインが、配列番号37、38および／または39に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態32に記載のCAR。 10
34. 前記CD28膜貫通ドメインが、配列番号37、38または39に示される配列を有する、実施形態32に記載のCAR。
35. 前記CD28膜貫通ドメインが、配列番号33、34、35および／または36に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態32～34のいずれか1つに記載のCAR。
36. 前記CD28膜貫通ドメインが、配列番号33、34、35または36に示される配列によってコードされる、実施形態32～34のいずれか1つに記載のCAR。
37. 前記STEAP1結合ドメインが、STEAP1 scFvを含み、前記細胞内部分が、CD3ζシグナル伝達ドメインと4-1BBシグナル伝達ドメインを含み、前記膜貫通ドメインが、CD28膜貫通ドメインを含む、実施形態3～36のいずれか1つに記載のCAR。 20
38. 配列番号2に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態3～37のいずれか1つに記載のCAR。
39. 配列番号2に示される配列を有する、実施形態3～37のいずれか1つに記載のCAR。
40. 配列番号1に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態3～39のいずれか1つに記載のCAR。
41. 配列番号1に示される配列によってコードされる、実施形態3～40のいずれか1つに記載のCAR。
42. タグカセットまたは自殺スイッチをさらに含む、実施形態3～41のいずれか1つに記載のCAR。 30
43. 多量体化ドメインをさらに含む、実施形態3～42のいずれか1つに記載のCAR。
44. 自己切断ポリペプチドをさらに含む、実施形態3～43のいずれか1つに記載のCAR。
45. 前記自己切断ポリペプチドが、豚テシオウイルス-1由来の自己切断ポリペプチド(P2A)、Thosea asignaウイルス由来の自己切断ポリペプチド(T2A)、馬鼻炎Aウイルス由来の自己切断ポリペプチド(E2A)、口蹄疫ウイルス由来の自己切断ポリペプチド(F2A)、またはこれらのバリエーションである、実施形態44に記載のCAR。
46. 前記自己切断ポリペプチドが、T2A自己切断ポリペプチドである、実施形態44に記載のCAR。
47. 形質導入マーカーをさらに含む、実施形態3～46のいずれか1つに記載のCAR。
48. 前記形質導入マーカーが、切断型上皮成長因子受容体(EGFRt)である、実施形態47に記載のCAR。 40
49. 前記EGFRtが、配列番号41に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態47または48に記載のCAR。
50. 前記EGFRtが、配列番号41に示される配列を有する、実施形態48または49に記載のCAR。
51. 前記EGFRtが、配列番号40に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされる、実施形態48～50のいずれか1つに記載のCAR。
52. 前記EGFRtが、配列番号40に示される配列によってコードされる、実施形態48～50のいずれか1つに記載のCAR。
53. 前記CARを発現する免疫細胞が、Steap1bを発現する細胞に対して反応性を示さな 50

い、実施形態1～52のいずれか1つに記載のCAR。

54. 実施形態1、3～53、88および89のいずれか1つに記載のCARをコードする遺伝子コンストラクト。

55. 配列番号2に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態54に記載の遺伝子コンストラクト。

56. 配列番号2に示される配列を有する、実施形態54に記載の遺伝子コンストラクト。

57. 実施形態54～56のいずれか1つに記載の遺伝子コンストラクトが封入されたナノ粒子。

58. 実施形態1、3～53、88および89のいずれか1つに記載のCARを発現するように遺伝子組換えされた細胞。

59. 対象から得られた自家細胞または対象と同種の細胞である、実施形態58に記載の細胞。

60. インビボの細胞またはエクスピボの細胞である、実施形態58または59に記載の細胞。

61. T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK-T細胞、単球／マクロファージ、造血幹細胞（HSC）または造血前駆細胞（HPC）である、実施形態58～60のいずれか1つに記載の細胞。

62. CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞および／またはナイーブT細胞から選択されるT細胞である、実施形態58～61のいずれか1つに記載の細胞。

63. CD8+T細胞である、実施形態58～62のいずれか1つに記載の細胞。

64. CD4+T細胞である、実施形態58～62のいずれか1つに記載の細胞。

65. 実施形態1、3～53、88および89のいずれか1つに記載のCARを発現するように遺伝子組換えされた細胞集団。

66. 対象から得られた自家細胞または対象と同種の細胞を含む、実施形態65に記載の細胞集団。

67. インビボの細胞集団またはエクスピボの細胞集団である、実施形態65または66に記載の細胞集団。

68. T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK-T細胞、単球／マクロファージ、造血幹細胞（HSC）および／または造血前駆細胞（HPC）を含む、実施形態65～67のいずれか1つに記載の細胞集団。

69. CD4+T細胞およびCD8+T細胞を含む、実施形態65～68のいずれか1つに記載の細胞集団。

70. CD4+T細胞とCD8+T細胞を1：1の比率で含む、実施形態69に記載の細胞集団。

71. (i) 実施形態1、3～53、88および89のいずれか1つに記載のCARを発現するように遺伝子組換えされた細胞と、(ii) 薬学的に許容される担体とを含む製剤。

72. STEAP1関連疾患を有する対象を治療する方法であって、STEAP1関連疾患を有する対象に、治療有効量の実施形態71に記載の製剤を投与することによって、前記対象を治療する工程を含む、方法。

73. 前記対象が有するSTEAP1関連疾患が、STEAP1抗原の密度が低い状態でSTEAP1を発現している病変細胞の存在に基づくものである、実施形態72に記載の方法。

74. 前記STEAP1抗原の密度が低い状態が、病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が50,000個未満の状態である、実施形態73に記載の方法。

75. 前記STEAP1抗原の密度が低い状態が、病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が30,000個未満の状態である、実施形態73に記載の方法。

76. 前記STEAP1抗原の密度が低い状態が、病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が15,000個未満の状態である、実施形態73に記載の方法。

77. 前記STEAP1抗原の密度が低い状態が、病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が10,000個未満の状態である、実施形態73に記載の方法。

78. 前記STEAP1抗原の密度が低い状態が、病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が5

10

20

30

40

50

,000個未満の状態である、実施形態73に記載の方法。

79. 前記STEAP1抗原の密度が低い状態が、病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が2,000個未満の状態である、実施形態73に記載の方法。

80. 前記STEAP1抗原の密度が低い状態が、病変細胞1個あたりのSTEAP1分子の数が1,500個未満の状態である、実施形態73に記載の方法。

81. 前記病変細胞の試料を得る工程と、前記病変細胞のSTEAP1抗原の密度を測定する工程をさらに含む、実施形態73に記載の方法。

82. 前記STEAP1関連疾患が、前立腺がん、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（EFT）、膀胱がん、卵巣がんまたは横紋筋肉腫を含む、実施形態73～81のいずれか1つに記載の方法。

83. 前記STEAP1関連疾患が、致死性の転移性去勢抵抗性前立腺がんを含む、実施形態73～81のいずれか1つに記載の方法。

84. STEAP1発現細胞に対する免疫応答を必要とする対象において、STEAP1発現細胞に対する免疫応答を提供する方法であって、

治療有効量の実施形態71に記載の製剤を前記対象に投与することによって、STEAP1発現細胞に対する免疫応答を前記対象に提供する工程を含む、方法。

85. 前記STEAP1発現細胞が、前立腺がん細胞、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍（EFT）細胞、膀胱がん細胞、卵巣がん細胞または横紋筋肉腫細胞を含む、実施形態84に記載の方法。

86. 前記STEAP1発現細胞が、前立腺がん細胞を含む、実施形態84に記載の方法。

87. 前記前立腺がん細胞が、致死性の転移性去勢抵抗性前立腺がん細胞を含む、実施形態86に記載の方法。

88. CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD5、CD22、CD66d、CD79a、CD79b、共通FcR γ （FCER1G）、Fc γ R11a、FcR β （Fc ϵ Rib）、DAP10、DAP12、CD27、CD28、4-1BB（CD 137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、TNFR2、TRANSCENDENT/RANKL、DNAM1（CD 226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、NKG2D、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Lyl08）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、および／またはCD19aの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態1および3～53のいずれか1つに記載のCAR。

89. CD28、CD27、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、Toll様受容体1（TLR1）、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1（CD 11a、CD18）、ICOS（CD278）、4-1BB（CD 137）、GITR、CD40、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、TNFR2、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、SLAMF6（NTB-A、Lyl08）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、またはNKG2Cの膜貫通ドメインを含む、実施形態1、3～31、38～

10

20

30

40

50

53および88のいずれか1つに記載のCAR。

【0246】

(xii) 実験例

進行性前立腺がんにおけるキメラ抗原受容体T細胞療法によるSTEAP1のターゲティング

【0247】

方法：

細胞株：

22Rv1 (CRL-2505)、LNCaP (CRL-1740)、PC3 (CRL-1435)、DU145 (HTB-81)、NCI-H660 (CRL - 5813)、C4-2B (CRL-3315)、RM9 (RL-3312) およびMyc-CaP (CRL-3255) は、American Type Culture Collectionから入手した。LNCaP95細胞は、Stephen R. Plymate (ワシントン大学、シアトル) から供与されたものであった。MSKCC EF1は、過去の報告に従って (Lee, J.K., et al., PNAS 115, E4473-e4482 (2018))、Yu Chen (Memorial Sloan Kettering Cancer Center) から供与を受けたMSKCC PCa4オルガノイド株から誘導した。細胞株は、10% FBS、100 U/mL ペニシリンおよび100 μg/mL ストレプトマイシン、ならびに4 mmol/L GlutaMAX (サーモフィッシュャー社) を添加したRPMI 1640培地中で維持した。22Rv1 STEAP1 ko細胞およびPC3 STEAP1 ko細胞は、Broad Institute Genetic Perturbation PlatformのsgRNA Designerにより予測された配列を標的とする4種のsgRNAのいずれか1つをそれぞれ発現するPX458プラスミド (Addgene社、#48138) のプールを22Rv1細胞に一過性にトランスフェクトすることによって作製した (Doench, J.G., et al., Nat. Biotechnol. 34, 184-191 (2016))。これらのsgRNAの配列を以下に示す。

- 1) 5'-ATAGTCTGTCTTACCCAATG-3' (配列番号174)
- 2) 5'-CCTTTGTAGCATAAGGACAC-3' (配列番号175)
- 3) 5'-ATCCACTTATCCAACCAATG-3' (配列番号176)
- 4) 5'-CATCAACAAAGTCTTGCCAA-3' (配列番号177)

トランスフェクションの48~72時間後に、ソニー社製SH800セルソーターを用いてGF陽性細胞を1個ずつソートし、96ウェルプレートに播種して、クローン性に増殖させた。ギブソンアッセムブリーにより、ヒトSTEAP cDNA、マウスSteap1 cDNA、ヒトSTEAP1の細胞外ドメインを含めて再構築したマウスSteap1 cDNA、またはヒトSTEAP1B cDNAを第三世代レンチウイルスベクターFU-CGWのEcoRI部位にクローニングした (Xin, L., et al., PNAS 103, 7789-7794 (2006))。過去の報告に従ってレンチウイルスを作製し、力価を測定した後 (Xin, L., et al., PNAS 100, 11896-11903 (2003))、22Rv1 STEAP1 ko細胞またはDU145細胞への形質導入に使用した。

【0248】

結果

致死性の転移性去勢抵抗性前立腺がん (mCRPC) の組織に広く発現されるSTEAP1

まず、STEAP1の発現パターンと発現量を、進行性前立腺がんにおける前立腺特異的膜抗原 (PSMA) と比較することにより評価した。2010年から2017年の間にワシントン大学のTumor Acquisition Necropsy Programにおいて45人の致死性mCRPC患者から迅速生検により採取された転移性組織由来の121個のコアで構成された組織マイクロアレイの二重スポットにおいて、免疫組織化学染色 (IHC) を行った (Roudier, M.P., et al. Human pathology 34, 646-653 (2003)) (図1A)。研究病理医により各コアのSTEAP1およびPSMAの細胞膜染色のスコアを評価し、染色強度 (0、1、2または3; 図2A) に各強度のがん細胞染色の割合を掛けて半定量的なHスコアを求めた (図1B)。この結果に基づき、一般化線形混合統計モデルを使用したところ、STEAP1の染色結果がゼロ以外のスコアになるオッズは、PSMAの7.7倍であることが判明した (95% CI: 2.8~20.8、 $p < 0.001$)。Hスコアのカットオフ値を30として、最小染色閾値を適用したところ、閾値に一致した評価可能なコアの87.7% (114個のうち100個) においてSTEAP1が染色されていたのに対して、PSMAは60.5% (114個のうち69個)

しか染色されていないことが判明した（図1C）。さらに、コアの28.1%（114個のうち32個）は、STEAP1が染色されたことが示されたが、PSMAは染色されず（図1D）、これに対して、STEAP1が染色されず、PSMAが染色されたコアは0.9%しかなかった（114個のうち1個）。コア内にPSMAの不均質な発現が見られた症例がいくつか見られたが（図1E）、mCRPC生検における腫瘍内PSMAの不均質性に関する最近の報告と一致していた（Paschalis, A., et al. European urology (2019)）。

【0249】

最小染色閾値に基づくSTEAP1染色は、骨転移の96%（50個のうち48個）、リンパ節転移の95%（20個のうち19個）、および内臓転移の76.6%（47個のうち36個）において同定された（図2B）。骨転移部位とリンパ節転移部位の間、またはリンパ節転移部位と内臓転移部位の間で、STEAP1の染色強度の違いは観察されなかった。しかし、骨転移は、内臓転移よりもSTEAP1のH-スコアが高いことが示された（骨転移183.6に対して内臓転移121.9、 $p=0.0018$ ）。組織マイクロアレイ上にスポットされた症例において、ピアソンの相関係数を求めたところ、STEAP1の発現とアンドロゲン受容体（AR）の発現の間で正の相関があることが同定され（ $r=0.3057$ 、95% CI: 0.1314~0.4616、 $p<0.001$ ）（図2C）。STEAP1は、アンドロゲンにより調節される遺伝子であることから、この結果は予想通りであった（Gomes, I.M., et al., The Prostate 73, 605-613 (2013)；およびSharp, A., et al., The Journal of clinical investigation 129, 192-208 (2019)）。一方で、STEAP1の発現と神経内分泌分化マーカーであるシナプトフィジン（SYN）の発現の間では、負の相関があることが分かった（ $r=-0.2172$ 、95% CI: -0.3843~-0.03628、 $p=0.0192$ ）（図2D）。これらの結果から、PSMAと同様に（Bakht, M.K., et al., Endocrine-related cancer 26, 131-146 (2018)）、STEAP1の発現は、前立腺がんの神経内分泌分化転換により消失する可能性があることが示唆された。

【0250】

強力かつ抗原特異的なSTEAP1 CARの開発

STEAP1は後期mCRPCにおいて広範に発現されていることから、後期mCRPCにおいてSTEAP1を標的とするものの論理的根拠が得られたことを踏まえ、STEAP1特異的第2世代CARを発現するレンチウイルスを作製した。4-1BBの共刺激ドメインは、T細胞の記憶形成と長期持続性に関連することから、好適であると判断され（Salter, A.I., et al., Science signaling 11(2018)）、CD28の膜貫通ドメインは、第2世代4-1BB CAR T細胞を活性化させるための抗原閾値を低減することが示されていることから、CD28の膜貫通ドメインを導入した（Majzner, R.G., et al., Cancer discovery 10, 702-723 (2020)）。さらに、バンドルツズマブベドチン（DSTP3086S）に由来するヒト化一本鎖可変領域断片（scFv）の全長を組み込んだ。バンドルツズマブベドチン（DSTP3086S）は、ペイロードの脱離により治療域に問題が生じたことから、第I/II相臨床試験後に開発が中止されたSTEAP1を標的とする抗体薬物複合体である。このscFvは、元々はAgensys社により開発されたマウスモノクローナル抗体（mAb 120.545）のヒト化バリエーションであり、細胞を用いた結合アッセイにおいて、1nMの親和性を有することが示されている（Challita-Eid, P.M., et al., Cancer research 67, 5798-5805 (2007)）。CARの活性の調節が可能かどうかを検討するため、短いスペーサー（IgG4ヒンジ）、中程度の長さのスペーサー（IgG4ヒンジ-CH3）、長いスペーサー（IgG4ヒンジ-CH2-CH3）の3種の長さのヒンジ／スペーサーのいずれかを組み込んだ。この長いスペーサーは、過去の報告に従って、CH2ドメインに4/2-NQ変異を含むように改変されたものであり（Hudecek, M., et al., Cancer immunology research 3, 125-135 (2015)）、この変異が組み込まれていることから、長いスペーサーを有するCAR T細胞を免疫不全マウスに養子移入した際に発生するFcγ受容体への結合と活性化誘導型細胞死が阻止される。形質導入マーカーとして切断型上皮成長因子受容体（EGFRt）を共発現するレンチウイルスベクターに、この3種のCAR候補をクローニングした（図3A）。フェレーシスから回収したヒトドナー由来の末梢血単核細胞（PBMC）から濃縮し

たヒトCD4 T細胞およびCD8 T細胞に、作製したレンチウイルスを形質導入した。増殖させたCD4 CAR T細胞とCD8 CAR T細胞のイムノフェノタイピングを実施し（図4A）、正常なCD4/CD8比となるように定義した組成の細胞産物に再構成して、CAR T細胞の機能活性を評価した。

【0251】

遺伝的背景を統一した方法でSTEAP1の発現を制御するため、天然にSTEAP1を発現するヒト前立腺がん細胞株22Rv1に焦点を当てた。CRISPR/Cas9ゲノム編集によるSTEAP1のノックアウト（ko）を行った。次に、STEAP1を発現するレンチウイルスを22Rv1 STEAP1 ko株に形質導入して、STEAP1レスキュー株を作製した（図3B）。次に、この細胞株を使用して、まず、短いスペーサー、中程度の長さのスペーサーまたは長いスペーサーを有する3種のSTEAP1 CAR T細胞との共培養アッセイを実施し、T細胞活性化の指標としてインターフェロン- γ （IFN- γ ）の放出を測定することにより、3種のSTEAP1 CAR T細胞のスクリーニングを行った。長いスペーサーを有するSTEAP1 CAR T細胞のみ（「STEAP1-BB ζ CAR T細胞」と呼ぶ）が、抗原特異的なIFN- γ 放出パターンを示した（図3Cおよび図4B）。さらに、STEAP1-BB ζ CAR T細胞は、非形質導入T細胞と比較して、22Rv1細胞を実質的に用量依存的に細胞溶解し（図3D）、22Rv1 STEAP1 ko細胞の生存率を相対的に向上させた（図3E）。次に、STEAP1の発現を天然に欠失しているヒト前立腺がん細胞株DU145に、レンチウイルスによる形質導入を行うことによって、STEAP1を発現するように組換えた細胞株（DU145 STEAP1）において、類似した試験を行った。この実験設定では、DU145 STEAP1細胞との共培養においてのみ、STEAP1-BB ζ CAR T細胞の活性化が観察され、DU145親細胞との共培養ではSTEAP1-BB ζ CAR T細胞の活性化は観察されなかった（図4C）。また、DU145 STEAP1細胞との共培養での細胞溶解活性は、STEAP1-BB ζ CAR T細胞のみで観察され、非形質導入T細胞では観察されなかった（図4D）。

【0252】

次に、ヒト前立腺がん細胞株のさらに大型のパネルを分析して、イムノブロット分析により、それらの天然のSTEAP1発現の特性を評価した。アンドロゲン受容体（AR）の発現／活性を有することが知られている細胞株（LNCaP、22Rv1、VCaP、およびLNCaP 95）は、様々な発現量のSTEAP1発現を示したが、AR-null細胞株（PC3、DU145、MSKCC EF1、およびNCI-H660）は、検出可能なレベルのSTEAP1発現を示さなかった（図3F）。STEAP1-BB ζ CAR T細胞と、これらの細胞株の共培養をさらに行って、IFN- γ の放出に基づき、STEAP1-BB ζ CAR T細胞の抗原特異的な活性化をさらに検証した（図3G）。しかし、PC3株において結果の不一致が見られ、見かけ上はSTEAP1の発現が示されなかったにもかかわらず（図3F）、STEAP1-BB ζ CAR T細胞の大幅な活性化が誘導された。過去の文献では、PC3細胞株においてSTEAP1が低レベルで発現されていることが示唆されている（Gomes, I.M., et al., Genes & cancer 5, 142-151 (2014)）。実際に、イムノブロット法において有意に長時間露出すると、STEAP1の非常に低い発現の存在を示唆するバンドが認められた（図3H）。STEAP1-BB ζ CAR T細胞の活性化が、PC3株におけるこのような微量のSTEAP1発現によるものであったのかどうかを確認するため、PC3株由来の3つのSTEAP1 ko株を作製し（図3G）、STEAP1-BB ζ CAR T細胞との共培養を再度行った。PC3株においてSTEAP1をノックアウト（ko）すると、STEAP1-BB ζ CAR T細胞の活性化が消失したことから（図3I）、特異性がさらに確認され、抗原密度が低い状態でも、STEAP1-BB ζ CAR T細胞が感受性を有するというエビデンスが得られた。

【0253】

マウスSteap1およびヒトSTEAP1BとのSTEAP1-BB ζ CARの交差反応性の機能的測定
mAb120.545に由来するscFvの抗ヒト特異性と一致して、STEAP1-BB ζ CAR T細胞は、マウスSteap1と交差反応性を示さなかった（図5A～5C）。しかし、このことは、マウスSteap1において、3つのヒトSTEAP1細胞外ドメイン（ECD）を個別に再構築して、STEAP1-BB ζ CAR T細胞によるエピトープ認識に、どのECDが重要であるの

かを調べるきっかけとなった（図5D）。各マウスECDをヒトECDで置換したマウスSteap1を発現するように組換えたDU145細胞と、STEAP1-BBζ CAR T細胞の共培養実験を行った。ヒトSTEAP1 ECD2は、STEAP1-BBζ CAR T細胞の活性化に関連しており（図5E）、標的細胞を溶解したが（図5F）、ヒトSTEAP1 ECD1やヒトSTEAP1 ECD3では、このような活性化や標的細胞の溶解は認められなかった。興味深いことに、ヒトSTEAP1は、マウスSteap1 ECD2と93.9%（33個のアミノ酸のうち31個）の相同性を示したことから（図5G）、ヒトSTEAP1のQ198および／またはI209が、STEAP1-BBζ CAR T細胞により認識されて、IFN-γの産生を誘導するのに極めて重要であることが示された。

【0254】

ヒトSTEAPファミリーのタンパク質のうち、STEAP1Bは、STEAP1と最も高い相同性を有する（Gomes, I.M., et al., Genes & cancer 5, 142-151 (2014)）。3つのSTEAP1B転写産物が同定され、いずれもヒトSTEAP1 ECD2のアミノ酸配列が完全に保存されていた（図6A）。コンセンサス膜タンパク質トポロジー予測アルゴリズムであるTOPCONS（Bernsel, A., et al., Nucleic acids research 37, W465-W468 (2009)）からは、3種のSTEAP1Bタンパク質アイソフォームにおいて、これらのECD2配列が細胞外に位置することが予測されたが（図6B）、モデル間のコンセンサスが欠如していたことから、信頼性スコアは低かった（図6C）。隠れマルコフモデルを使用した事前分析でも、STEAP1Bタンパク質アイソフォーム1およびアイソフォーム2において、これらのECD2配列が、細胞外にあるのではなく、細胞内にあることが示唆された（Gomes, I.M., et al., Genes & cancer 5, 142-151 (2014)）。しかし、STEAP1Bの結晶構造を解明することによって、これらの予測を直接実証する必要がある。

【0255】

免疫不全マウスにおいて構築した天然にSTEAP1を発現する播種性前立腺がんモデルにおけるSTEAP-1BBζ CAR T細胞の強力な抗腫瘍効果

インビボでの抗腫瘍活性の最初のスクリーニングとして、雄性NOD scidγ (NSG) マウスに22Rv1細胞を移植して、皮下異種移植片腫瘍を作製した。腫瘍の増殖が100mm³に達した時点で、5×10⁶個の非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞を腫瘍内注射により単回投与してマウスを治療した。STEAP1-BBζ CAR T細胞で腫瘍内治療を行うことによって、腫瘍の増殖が有意に抑制され、治療後16日目までに統計学的有意性が示された（図7A）。25日目にマウスを殺し、STEAP1-BBζ CAR T細胞で治療したマウスから残存腫瘍を摘出したところ、広い領域で壊死性残屑が確認され、生存腫瘍領域ではCD3+ STEAP1-BBζ CAR T細胞の浸潤が認められた（図8A）。

【0256】

レンチウイルスを22Rv1細胞に形質導入して、ホタルルシフェラーゼ (fLuc) を発現させ、10⁶個の22Rv1-fLuc細胞を雄性NSGマウスの尾静脈に注射した。2週間後に、生物発光ライブイメージング (BLI) を行って、転移の定着を可視化し、この時点で、5×10⁶個の非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞を静脈内注射により単回投与してマウスを治療した（図7B）。連続生物発光イメージングを行ったところ、非形質導入T細胞で治療したマウスでは、急速に疾患が進行したことが示されたが、STEAP1-BBζ CAR T細胞を投与したマウスでは腫瘍の進行が有意に遅延し（図7C、図7D）、生存率が延長した（STEAP1-BBζ CAR T細胞で治療したマウスの生存期間が97日であったのに対して、非形質導入T細胞で治療したマウスの生存期間は31日であった；ログランク検定で求めたp=0.0018；図7E）。また、これらの治療群間ではマウスの体重に有意差は認められなかった（図8B）。

【0257】

さらに、尾静脈注射により、C4-2B-fLuc細胞を雄性NSGマウスに接種した。C4-2Bは、LNCaP株から派生させた去勢抵抗性株であり（Chen, M.E., et al., The Journal of biological chemistry 273, 17618-17625 (1998)）、典型的な前立腺がんによく一致した増殖動態を示す。C4-2B-fLuc細胞の注射の4週間後に、転移腫瘍の定着

10

20

30

40

50

を生物発光イメージングで確認し、 5×10^6 個の非形質導入T細胞またはSTEAP1-BBζ CAR T細胞を静脈内注射により単回投与してマウスを治療した（図7B）。治療から5週間以内に、連続生物発光イメージングにより、STEAP1-BBζ CAR T細胞を投与したすべてのマウスにおいて完全奏効が示された（図7F、図7G）。非形質導入T細胞治療群において、体重減少が増強する傾向が認められたが（図8C）、恐らくは、サンプルサイズが小さかったことから、統計学的に有意ではなかった。STEAP1-BBζ CAR T細胞で治療したマウスを解剖したところ、肉眼的病変は認められず、エクスピボ生物発光イメージングで評価した臓器ではシグナルは検出されなかったことから、マウスにおいて腫瘍が治癒したと見られたことが示唆された（図8D）。実験の最後に、CD3+EGFRt+脾細胞が検出されたことから、STEAP1-BBζ CAR T細胞の末梢での持続性が同定された（図7H）。

10

【0258】

mouse-in-mouse STEAP1 CAR T細胞試験により示された安全性と有効性

PC3細胞株での非常に低いSTEAP1抗原密度において、STEAP1-BBζ CAR T細胞の活性化と細胞溶解活性が観察されたことから、オンターゲットな腫瘍毒性とオフターゲットな腫瘍毒性が生じる懸念があった。遺伝学的に扱いやすいモデル生物において潜在的な毒性を評価するため、C57Bl/6背景のマウスSteap1遺伝子にヒトSTEAP1遺伝子をノックインすることによって、ヒトSTEAP1ノックインマウス（hSTEAP1-KI）を作製した（図9A）。テールDNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってジェノタイピングを行うことにより、マウスコロニーを確立した（図9B）。ホモ接合体のhSTEAP1-KIマウスとヘテロ接合体のhSTEAP1-KIマウスは、いずれも野生型の同腹仔と比べて、表現型の異常や生殖異常は存在しないように見えた。ヘテロ接合体の雄性および雌性hSTEAP1-KI（hSTEAP1-KI/+）マウスにおいて、定量的逆転写PCR（qRT-PCR）を利用したヒトSTEAP1の発現に関する組織調査を行ったところ、前立腺において最も高い相対発現量が示され、これに次いで子宮と副腎における相対発現量が高かった（図9C）。さらに、雄性hSTEAP1-KI/+マウスの前立腺と副腎のSTEAP1 IHC染色によりインサイチュー分析を行ったところ、ヒトSTEAP1の発現が前立腺の管腔上皮細胞に局限しており（図9D）、副腎皮質でもヒトSTEAP1の発現が見られることが判明した（図9E）。

20

【0259】

STEAP1-BBζ CARにおいて、scFvとIgG4ヒンジ-CH2-CH3スペーサーを保持したまま、CD28の膜貫通ドメインと、4-1BBの共刺激ドメインと、CD3ζの活性化ドメインを、それぞれに対応するマウスオソログで置換したSTEAP1 CARのマウス化形態（「STEAP1-mBBζ CAR」と呼ぶ）を作製し、ガンマレトロウイルスコンストラクトにクローニングした（図9F）。さらに、形質導入マーカーであるEGFRtを切断型マウスCD19（mCD19t）で置換して、免疫原性が生じる可能性を最小限に抑えた。このレトロウイルスは、マウス脾細胞から濃縮したT細胞に効率的に形質導入できることが確認され（図9G）、得られたマウスSTEAP1-mBBζ CAR T細胞は、レンチウイルスを用いた形質導入によりヒトSTEAP1を発現するように組換えたRM9マウス前立腺がん細胞株（RM9-hSTEAP1）の細胞溶解を誘導できることが確認された（図9H）。

30

【0260】

STEAP1-mBBζ CAR T細胞療法の安全性と有効性を調べるため、ヘテロ接合体の雄性hSTEAP1-KIマウスに、同系のRM9-STEAP1-fLuc細胞を尾静脈注射により接種した（図10A）。1週間後に生物発光イメージングにより転移性腫瘍の定着を確認した後、プレコンディショニング用のシクロホスファミド100mg/kgを、腹腔内注射によりマウスに投与した。翌日に、マウスを無作為化し、尾静脈注射により、 5×10^6 個の非形質導入マウスT細胞またはマウスSTEAP1-mBBζ CAR T細胞を投与して治療を行った。マウスSTEAP1-mBBζ CAR T細胞を投与したマウスは、生物発光イメージングで分析したところ、いずれも治療の開始から1週間以内に腫瘍量の減少が示された（図10B、図10C）。この応答は短期間しか観察されなかったが、生存率がわずかに延長した（マウスSTEAP1-mBBζ CAR T細胞で治療したマウスの生存期間が21日であったのに対して

40

50

、非形質導入マウスT細胞で治療したマウスの生存期間は12日であった；ログランク検定で求めた $p=0.0138$ ；図10D）。重要な点として、この用量レベルでのマウスSTEAP1-mBBζ CAR T細胞療法に特異的に関連する全体的な毒性や早期死亡が見られなかったことから、抗腫瘍効果を有するという明確なエビデンスが観察された。腫瘍量の増加に伴う体重減少は、両方の治療群で共通して見られた（図10E、図10F）。非形質導入マウスT細胞で治療したマウスから実験の最後に摘出した残存腫瘍病巣では、わずかに局所不均一性が見られるヒトSTEAP1の発現が示された（図10G）。一方、マウスSTEAP1-mBBζ CAR T細胞で治療したマウスから摘出した腫瘍は、いずれもヒトSTEAP1の発現が顕著に存在しないことが示された（図10H）。これらの知見から、STEAP1-RM9腫瘍細胞よりも先に存在していた内因性の抵抗性、または動的なSTEAP1抗原の喪失による適応抵抗性が示唆された。重要な点として、STEAP1-mBBζ CAR T細胞で治療したヘテロ接合体hSTEAP1-KIマウスでは、非形質導入T細胞で治療したヘテロ接合体hSTEAP1-KIマウスと比較して、明らかな組織破壊は認められず、前立腺へのCD3+T細胞の浸潤の増加も認められなかった（図11A、図11B）。

10

【0261】

(xiii) 結語

本明細書で提供する核酸配列およびアミノ酸配列は、米国特許法施行規則37 C.F.R.規則1.831~1.835に規定され、WIPO標準ST.26（2022年7月1日に発効）にも示されているような、ヌクレオチド塩基およびアミノ酸残基に用いられる略号で示されている。各核酸配列に対して1種類の鎖のみを示しているが、その相補鎖が適切である場合、その相補鎖も実施形態に含まれる。

20

【0262】

本明細書に明示されていない範囲に及んで、本明細書に開示されたタンパク質のコード配列、および本明細書に開示されたコード配列によりコードされるタンパク質配列は、当業者によって容易に調製することができる。

【0263】

本明細書に開示された配列および引用された配列のバリエーションも本願に含まれる。生物学的活性を失うことなく、どのアミノ酸残基を置換、挿入あるいは欠失できるのかということ判断するための指標は、当技術分野でよく知られているコンピュータプログラム、例えば、DNASTARTMソフトウェア（米国ウィスコンシン州マディソン）を使用して見出すことができる。本明細書に開示されたタンパク質バリエーションのアミノ酸変化は保存的アミノ酸変化であることが好ましく、すなわち、電荷が同程度のアミノ酸同士の置換または非電荷のアミノ酸同士の置換であることが好ましい。保存的アミノ酸変化には、側鎖に関連するアミノ酸ファミリーのメンバーによる置換が含まれる。

30

【0264】

ペプチドまたはタンパク質におけるアミノ酸の適切な保存的置換は当業者に公知であり、通常、最終的に得られる分子の生物学的活性を変えずに、このような保存的置換を行うことができる。当業者であれば、通常、ポリペプチドの重要でない領域の1個のアミノ酸を置換しても、生物学的活性は実質的に変化しないことを熟知しているであろう（例えば、Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224を参照されたい）。天然のアミノ酸は、通常、保存的置換ファミリーに分類され、具体的には、第1群：アラニン（Ala）、グリシン（Gly）、セリン（Ser）およびトレオニン（Thr）；第2群：（酸性）：アスパラギン酸（Asp）およびグルタミン酸（Glu）；第3群：（酸性；極性を持つ負電荷残基およびそれらのアミドとしても分類される）：アスパラギン（Asn）、グルタミン（Gln）、AspおよびGlu；第4群：GlnおよびAsn；第5群：（塩基性；極性を持つ正電荷残基としても分類される）：アルギニン（Arg）、リシン（Lys）およびヒスチジン（His）；第6群（大型脂肪族非極性残基）：イソロイシン（Ile）、ロイシン（Leu）、メチオニン（Met）、バリン（Val）およびシステイン（Cys）；第7群（極性無電荷）：チロシン（Tyr）、Gly、Asn、Gln、Cys、SerおよびThr；第8群（大型芳香族残基）：

40

50

フェニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp) および Tyr; 第9群 (非極性): プロリン (Pro)、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Met および Trp; 第11群 (脂肪族): Gly、Ala、Val、Leu および Ile; 第10群 (非極性の小型脂肪族残基またはわずかに極性を持つ小型脂肪族残基): Ala、Ser、Thr、Pro および Gly; ならびに第12群 (硫黄含有残基): Met および Cys に分類される。さらなる情報は、Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company に記載されている。

【0265】

そのような変化を加える際に、アミノ酸の疎水性指標を考慮に入れてもよい。タンパク質上で相互に作用する生物学的機能を付与する際に、アミノ酸の疎水性指標が重要であることは、当技術分野で広く理解されている (Kyte and Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157(1), 105-32)。各アミノ酸は、その疎水性と電荷特性に基づいて疎水性指標が割り当てられている (Kyte および Doolittle, 1982)。各アミノ酸の疎水性指標は、Ile (+4.5); Val (+4.2); Leu (+3.8); Phe (+2.8); Cys (+2.5); Met (+1.9); Ala (+1.8); Gly (-0.4); Thr (-0.7); Ser (-0.8); Trp (-0.9); Tyr (-1.3); Pro (-1.6); His (-3.2); グルタミン酸 (-3.5); Gln (-3.5); アスパラギン酸 (-3.5); Asn (-3.5); Lys (-3.9); および Arg (-4.5) となっている。

10

【0266】

同程度の疎水性指標または疎水度を有する別のアミノ酸で特定のアミノ酸を置換しても、類似した生物学的活性を有するタンパク質が得られ、すなわち、生物学的に同等の機能性を有するタンパク質が得られることは当技術分野でよく知られている。そのような変化を加える場合、疎水性指標が±2の範囲内のアミノ酸同士の置換が好ましく、疎水性指標が±1の範囲内のアミノ酸同士の置換が特に好ましく、疎水性指標が±0.5の範囲内のアミノ酸同士の置換がさらに特に好ましい。さらに、類似のアミノ酸同士の置換は、親水性に基づいて効果的に行えることも当技術分野でよく知られている。

20

【0267】

米国特許第4,554,101号に詳しく述べられているように、各アミノ酸残基には親水性値が割り当てられており、各アミノ酸残基の親水性値は、Arg (+3.0); Lys (+3.0); アスパラギン酸 (+3.0±1); グルタミン酸 (+3.0±1); Ser (+0.3); Asn (+0.2); Gln (+0.2); Gly (0); Thr (-0.4); Pro (-0.5±1); Ala (-0.5); His (-0.5); Cys (-1.0); Met (-1.3); Val (-1.5); Leu (-1.8); Ile (-1.8); Tyr (-2.3); Phe (-2.5); Trp (-3.4) となっている。同程度の親水性値を有する別のアミノ酸で特定のアミノ酸を置換することができ、このような置換を行っても、生物学的に同等のタンパク質が得られ、特に、免疫学的に同等のタンパク質が得られることはよく知られている。そのような変化を加える場合、親水性値が±2の範囲内のアミノ酸同士の置換が好ましく、親水性値が±1の範囲内のアミノ酸同士の置換が特に好ましく、親水性値が±0.5の範囲内のアミノ酸同士の置換がさらに特に好ましい。

30

【0268】

先に概説したように、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖の置換基の相対的な類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、大きさなどに基づいて行ってもよい。

40

【0269】

また、本明細書に別記するように、遺伝子配列のバリエーションには、コドン最適化バリエーション、配列多型、スプライスバリエーション、および／またはコードされた産物の機能に統計学的に有意な影響を与えない変異が含まれる。

【0270】

本明細書に開示したタンパク質、核酸および遺伝子配列のバリエーションには、本明細書に開示されたタンパク質、核酸または遺伝子配列と少なくとも70%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性または少なくとも99%の配列同一性を有する配列も

50

含まれる。

【0271】

「配列同一性 (%)」は、配列同士を比較することによって測定された2つ以上の配列の関係性を指す。当技術分野において、「同一性」は、タンパク質配列鎖間、核酸配列鎖間または遺伝子配列鎖間のマッチングによって測定された、タンパク質配列同士、核酸配列同士または遺伝子配列同士の関連性の程度も意味する。「同一性」(「類似性」と呼ぶことも多い)は、公知の方法により容易に計算することができ、このような方法として、Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1994); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (Von Heijne, G., ed.) Academic Press (1987); および Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Oxford University Press, NY (1992)に記載のものが挙げられる。同一性の測定方法としては、試験した配列間でベストマッチが得られるように設計されたものが好ましい。同一性および類似性の測定方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムにおいて体系化されている。配列アラインメントと同一性の計算は、バイオインフォマティクス計算ソフトウェアであるLASERGENEスイートに含まれるMegaalignプログラム(DNASTAR社、ウィスコンシン州マディソン)を用いて行ってもよい。配列のマルチプルアラインメントは、Clustal形式のアライメント法を用いて行うこともできる(Higgins and Sharp CABIOS, 5, 151-153 (1989)、デフォルトパラメータ(ギャップペナルティ=10、ギャップ長ペナルティ=10)を使用)。関連するプログラムとして、さらに、GCGプログラムスイート(Wisconsinパッケージバージョン9.0、Genetics Computer Group (GCG)、ウィスコンシン州マディソン); BLASTP、BLASTN、BLASTX (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)); DNASTAR (DNASTAR社、ウィスコンシン州マディソン); およびSmith-Watermanアルゴリズムが組み込まれたFASTAプログラム(Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Publisher: Plenum, New York, N.Y.)が挙げられる。本開示において、配列分析ソフトウェアを分析に使用した場合、分析結果は、プログラムの基準となる「デフォルト値」に基づく解釈される。本明細書において、「デフォルト値」は、ソフトウェアの初期化時に、ソフトウェアにあらかじめ登録されている一連の数値またはパラメータを意味する。

【0272】

バリエーションには、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、本明細書に開示された配列にハイブリダイズし、参照配列と同じ機能を持つ核酸分子も含まれる。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、50%ホルムアミド、5×SSC (750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストランおよび断片処理済み20μg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中において42℃で一晩インキュベーションした後に、0.1×SSCを用いて50℃でフィルターを洗浄することが含まれる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの変更およびシグナル検出の変更は、主に、ホルムアミドの濃度(ホルムアミドの割合を低くすると、ストリンジェンシーが低くなる)、塩条件または温度を調節することによって行われる。例えば、中程度に高いストリンジェントな条件には、6×SSPE (20×SSPE=3M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA, pH 7.4)、0.5%SDS、30%ホルムアミド、100μg/mlブロッキング用サケ精子DNAを含む溶液中において37℃で一晩インキュベーションした後に、1×SSPEと0.1%SDSを用いて50℃で洗浄することが含まれる。さらに、さらに低いストリンジェンシーは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション後の洗浄を高い塩濃度(例えば5×SSC)で行うことによって達成される。前述の条件は、ハイブリダイゼーション実験のバックグラウンドを低下させるために

使用される別のブロッキング試薬を添加し、かつ／またはこのような別のブロッキング試薬に置き換えることによって様々に変更することができる。一般的なブロッキング試薬として、デンハルト試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性サケ精子DNAおよび市販の専売製剤が挙げられる。特定のブロッキング試薬を添加する場合、適合性の問題により、前述のハイブリダイゼーション条件を一部変更することが必要になる場合がある。

【0273】

「特異的に結合する」とは、関連する環境試料中のその他の分子や成分とは有意に結合しないが、 10^5 M^{-1} と同等以上の親和性または K_a （すなわち、 $1/\text{M}$ の単位で表される特定の結合相互作用の平衡結合定数）で、結合ドメイン（例えば、CARの結合ドメイン）とその認識結合分子とが結合することを指す。結合ドメインは、「高親和性」または「低親和性」として分類してもよい。特定の実施形態において、「高親和性」の結合ドメインは、少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも 10^{12} M^{-1} または少なくとも 10^{13} M^{-1} の K_a を有する結合ドメインを指す。特定の実施形態において、「低親和性」の結合ドメインは、 10^7 M^{-1} 以下、 10^6 M^{-1} 以下または 10^5 M^{-1} 以下の K_a を有する結合ドメインを指す。あるいは、親和性は、特定の結合相互作用の平衡解離定数（ K_d ）（単位：M）（例えば、 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ）として定義してもよい。特定の実施形態において、結合ドメインは「増強された親和性」を有していてもよく、これは、選択された結合ドメインまたは組換えられた結合ドメインが、その認識結合分子に対して野生型（または親の）結合ドメインよりも強力な結合を示すことを指す。例えば、増強された親和性は、その認識結合分子に対する K_a （平衡結合定数）が基準となる結合ドメインよりも高いことによるものであってもよく、その認識結合分子に対する K_d （解離定数）が基準となる結合ドメインよりも低いことによるものであってもよく、その認識結合分子に対する解離速度（ K_{off} ）が基準となる結合ドメインよりも低いことによるものであってもよい。特定の認識結合分子に特異的に結合する結合ドメインを検出するためのアッセイや、結合親和性を測定するアッセイとして、ウエスタンブロット、ELISA、BIACORE分析などの様々なものが知られている（さらに、例えば、Scatchard, et al., 1949, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660；および米国特許第5,283,173号、米国特許第5,468,614号または類似の刊行物も参照されたい）。

【0274】

別段の記載がない限り、本開示は、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学および組換えDNAに関する従来技術を使用して実施することができる。これらの方法は以下の刊行物に記載されている。例えば、Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989); F. M. Ausubel, et al. eds., Current Protocols in Molecular Biology, (1987); the series Methods IN Enzymology (Academic Press, Inc.); M. MacPherson, et al., PCR: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1991); MacPherson et al., eds. PCR 2: Practical Approach, (1995); Harlow and Lane, eds. Antibodies, A Laboratory Manual, (1988)；およびR. I. Freshney, ed. Animal Cell Culture (1987)を参照されたい。

【0275】

当業者であれば理解できるように、本明細書に開示された各実施形態は、記載された特定の構成要素、工程、材料または成分を含むか、実質的にこれらからなるか、またはこれらからなる。したがって、「含む」または「含んでいる」という用語は、「含むか、実質的に～からなるか、または～からなる」という意味を有すると解釈すべきである。「含む」という移行句は、その量が多くても、記載されていない構成要素、工程、材料または成分が含まれていることを意味するが、これに限定されない。「からなる」という移行句は、記載されていない構成要素、工程、材料、成分をすべて除外する。「実質的に～からなる」という移行句は、記載された構成要素、工程、材料または成分、および実施形態に重大な影響を及ぼさない構成要素、工程、材料または成分に、実施形態の範囲を限定する。

重大な影響とは、本明細書で述べるような、インビトロ細胞傷害アッセイにおける STEA P1 発現細胞による溶解を統計学的に有意に低下させる影響を指す。

【0276】

別段の記載がない限り、本明細書および請求項において、分子量や反応条件などの、材料の量や特性を表すあらゆる数値は、あらゆる場合において、「約」という用語で修飾されていると解釈される。したがって、別段の記載がない限り、本明細書および添付の請求項に記載の数値パラメータは、本発明により得ようとする所望の特性に応じて変動する近似値である。請求項に記載の範囲と等価の原則の適用範囲を限定するものではないが、各数値パラメータは、少なくとも、報告された有効数字の数値に照らして、かつ通常の端数処理を行うことによって解釈されるべきである。さらに明確に述べれば、「約」という用語は、記載の数値または範囲とともに使用された場合、当業者によって合理的に解釈される意味を有し、すなわち、記載の数値の±20%の範囲；記載の数値の±19%の範囲；記載の数値の±18%の範囲；記載の数値の±17%の範囲；記載の数値の±16%の範囲；記載の数値の±15%の範囲；記載の数値の±14%の範囲；記載の数値の±13%の範囲；記載の数値の±12%の範囲；記載の数値の±11%の範囲；記載の数値の±10%の範囲；記載の数値の±9%の範囲；記載の数値の±8%の範囲；記載の数値の±7%の範囲；記載の数値の±6%の範囲；記載の数値の±5%の範囲；記載の数値の±4%の範囲；記載の数値の±3%の範囲；記載の数値の±2%の範囲；または記載の数値の±1%の範囲で、記載の数値または範囲よりもある程度多いまたは少ないことを示す。

【0277】

広範な本発明の範囲を示す数値範囲およびパラメータは、近似値および近似範囲であるものの、具体例に記載された数値は、可能な限り正確に報告している。しかし、すべての数値は、各試験用測定に付随する標準偏差により必然的に生じる特定の誤差を本質的に含んでいる。

【0278】

本発明の説明において（特に以下の請求項の説明において）使用されている「a」、「an」、「the」およびこれらに類似した指示語は、別段の記載がない限り、または文脈上別の意味が明示されていない限り、単数ものも複数ものも包含すると解釈される。本明細書に記載の数値範囲は、その数値範囲に含まれる各数値を個別に指す簡略的な方法であることを意図している。別段の記載がない限り、各数値は、あたかも個別に本明細書に記載されているかのように、本明細書に記載されている。別段の記載がない限り、または文脈上別の意味が明示されていない限り、本明細書に記載の方法はいずれも任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供されるあらゆる例示の使用、または例示を示す言語（例えば「など」）は、本発明を詳しく説明することのみを目的としたものであり、請求項に記載の本発明の範囲を限定するものではない。本明細書に記載の用語は、本発明の実施に必須の、請求項に記載されていない構成要素を示していると解釈すべきではない。

【0279】

本明細書に開示された本発明のその他の構成要素の群分けまたは本発明の様々な実施形態の群分けは、本発明を限定するものであると解釈すべきではない。各群のメンバーは、本明細書または請求項に個別に記載されていてもよく、本明細書に記載の群のその他のメンバーまたはその他の構成要素と組み合わせて本明細書または請求項に記載されていてもよい。便宜上および／または特許性の理由で、ある群の1つ以上のメンバーを別の群に加えてもよく、あるいは、ある群から1つ以上のメンバーを削除してもよいことが予想される。そのような付加や削除を行う場合、本明細書は、添付の請求項に記載のすべてのマーカー群の説明を充足するように構成された群を含む。

【0280】

本発明の特定の実施形態を本明細書に記載しており、これには、本発明の実施に際して本発明者らが最良の形態であると認識している実施形態が含まれている。当然のことながら、当業者であれば、前述の詳細な説明を熟読することにより、本明細書に記載の実施形

態を様々に変更できることを容易に理解できるであろう。本発明者らは、当業者がこのような変形例を適宜採用することができると予想しており、本明細書に具体的に記載された態様以外の態様で本発明が実施されることも意図している。したがって、本発明は、準抛法の範囲内で可能な限り、添付の請求項に記載の本発明の主題からのあらゆる変更および本発明の主題のあらゆる等価物を含む。さらに、別段の記載がない限り、または文脈上別の意味が明示されていない限り、あらゆる変形例における前述の構成要素のあらゆる組み合わせも本発明に含まれる。

【0281】

さらに、本明細書を通して、様々な特許、刊行物、雑誌記事およびその他の文書（本明細書の引用文献）を引用している。本明細書において引用された各文献は、本明細書の一部を構成するものとして、その引用された教示が引用により本明細書に個別に援用される。

10

【0282】

最後に、本明細書に開示された本発明の実施形態は、本発明の原理を説明するものであると解釈される。本発明の範囲内で、その他の変更を採用してもよい。したがって、一例として、本明細書の教示に従って、本発明の別の構成を使用してもよいが、これに限定されない。したがって、本発明は、本明細書の明示および記載に厳密に限定されるものではない。

【0283】

本明細書に記載の詳細は一例であり、本発明の好ましい実施形態を例示することのみを目的としており、最も有用なものであると考えられるものを提供するため、かつ本発明の様々な実施形態の原理と概念上の態様を容易に理解できるものするために提示している。この点に関して、本発明の基本的な理解に必要な情報よりも詳しく本発明の構造の詳細を説明することはしておらず、当業者であれば、図面および／または実施例を参照しながら本発明の説明を熟読することによって、本発明のいくつかの形態をどのようにして実際に具現化すればよいのかを容易に理解できるであろう。

20

【0284】

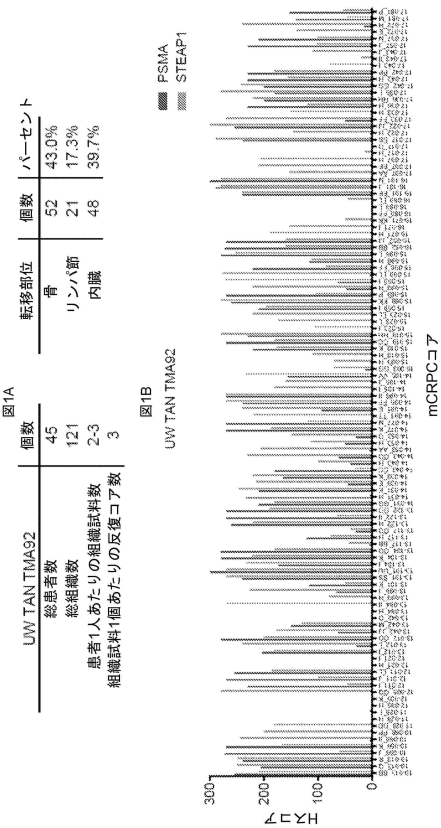
本開示において用いられる定義および説明は、実施例において明白かつ明確な変更が加えられない限り、あるいは用語の意味によって解釈が意味をなさなくなったり、実質的に意味なさなくなる場合を除いて、将来的な解釈を制御することが意図されている。用語の解釈から用語の定義が意味をなしていなかったり、実質的に意味をなしていない場合は、ウェブスター辞典（第3版）またはOxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Eds. Attwood T et al., Oxford University Press, Oxford, 2006)などの当業者に公知の辞書から用語の定義を引用されたい。

30

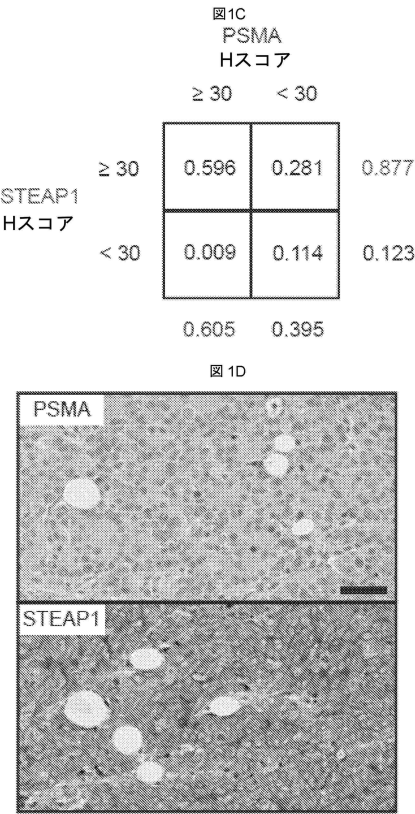
40

50

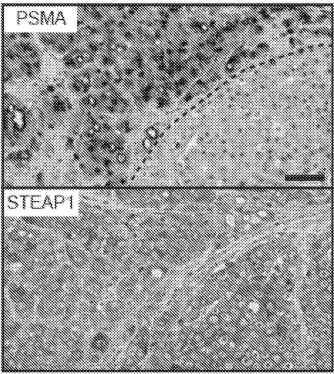
【図面】
【図 1 A – B】



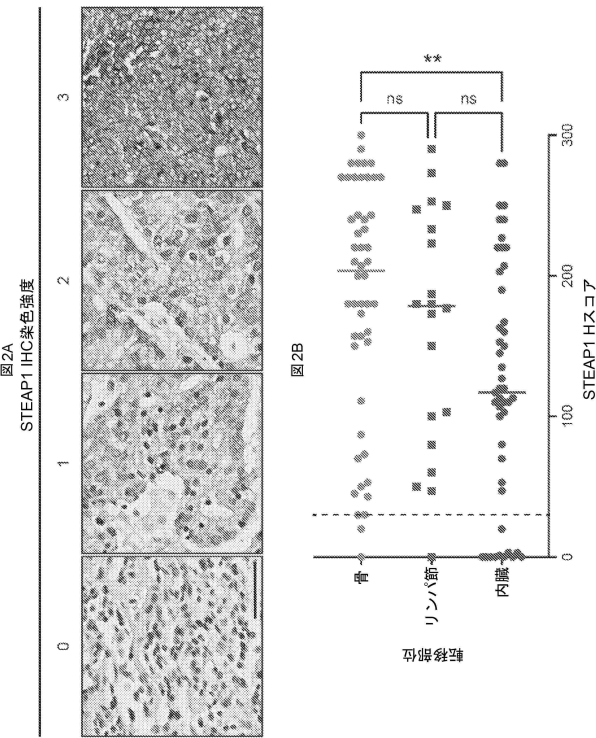
【図 1 C – D】



【図 1 E】



【図 2 A – B】



10

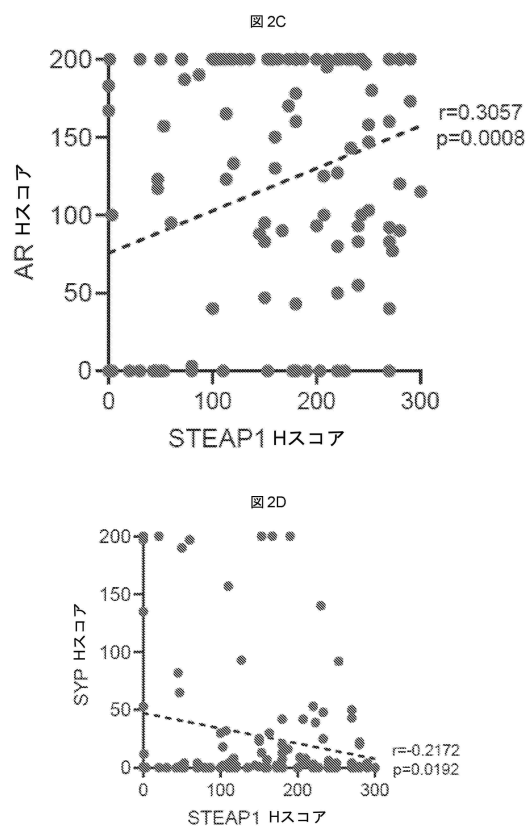
20

30

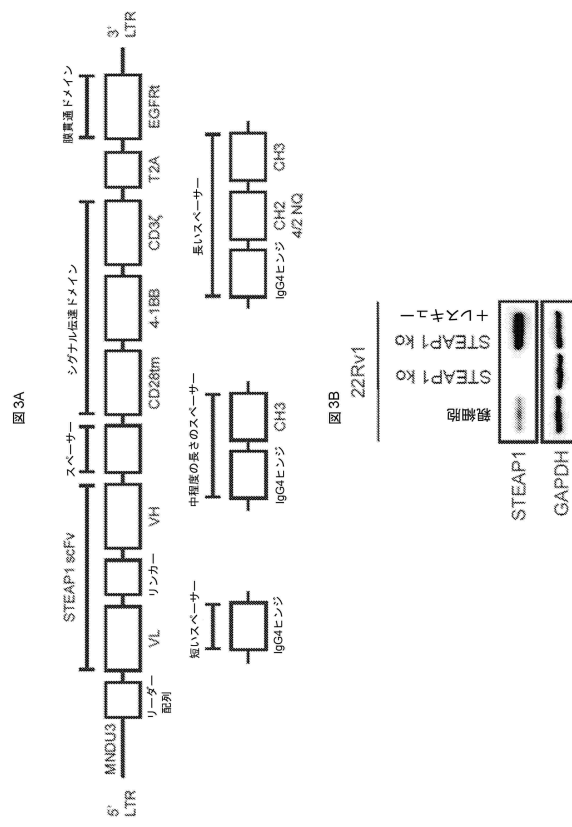
40

50

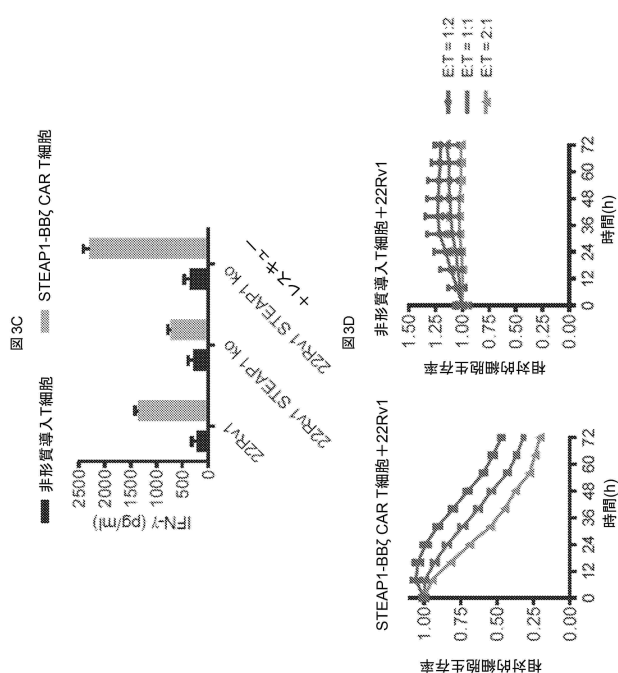
【圖 2 C - D】



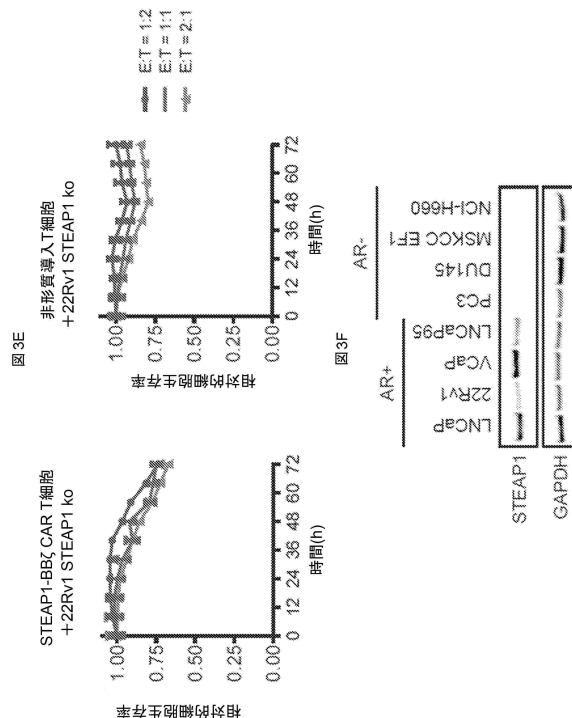
【圖 3 A - B】



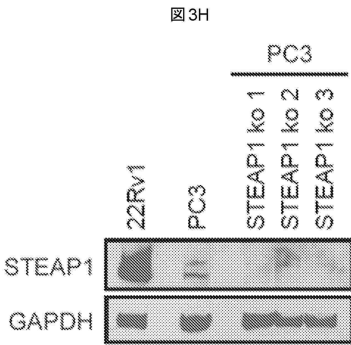
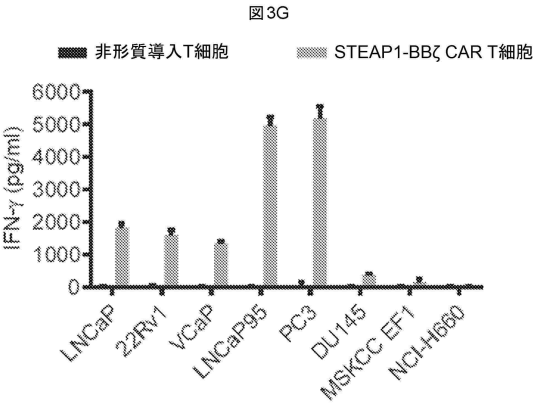
【図 3 C - D】



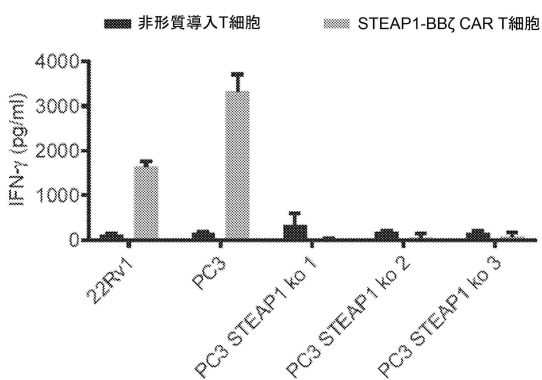
【図 3 E - F】



【図 3 G - H】



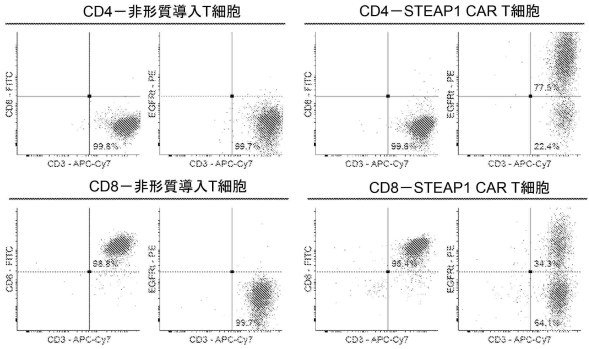
【図 3 I】



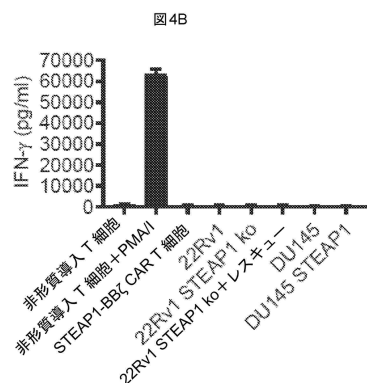
10

20

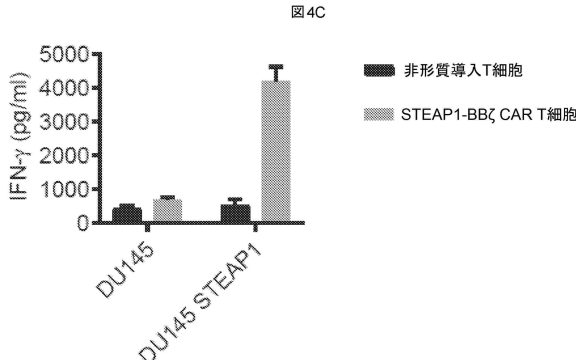
【図 4 A】



【図 4 B - C】



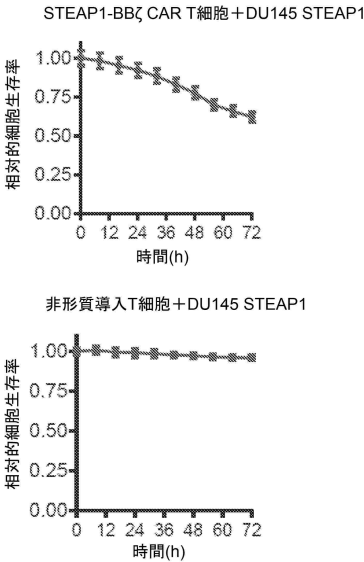
30



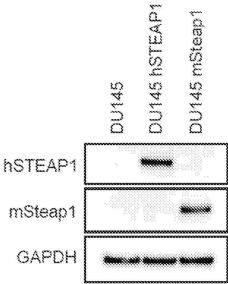
40

50

【 図 4 D 】

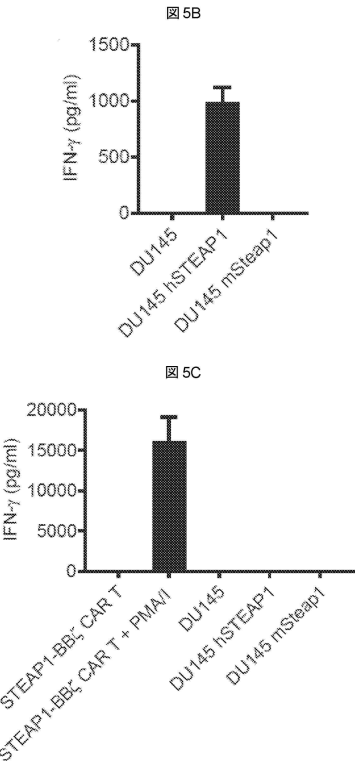


【 図 5 A 】

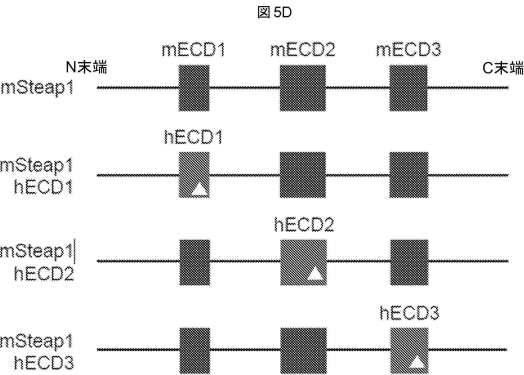


10

【 図 5 B - C 】



【 図 5 D - E 】



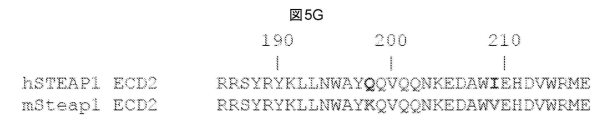
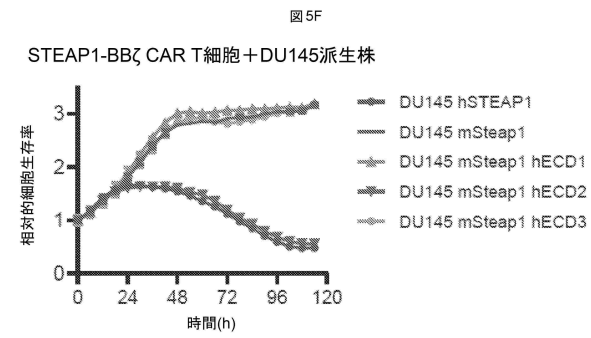
20

30

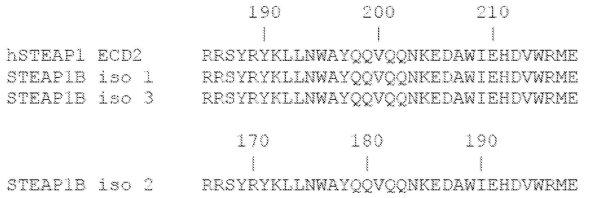
40

50

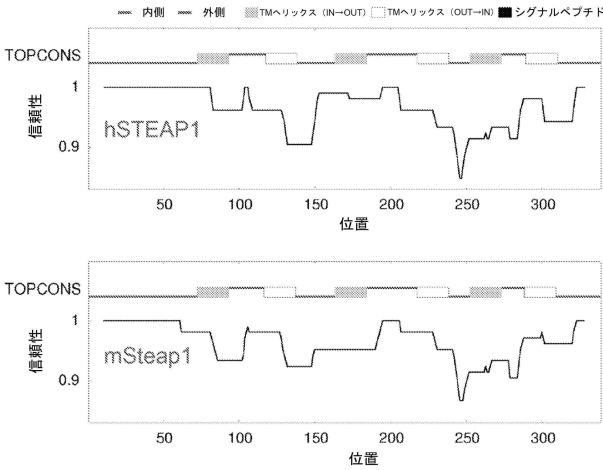
【図 5 F - G】



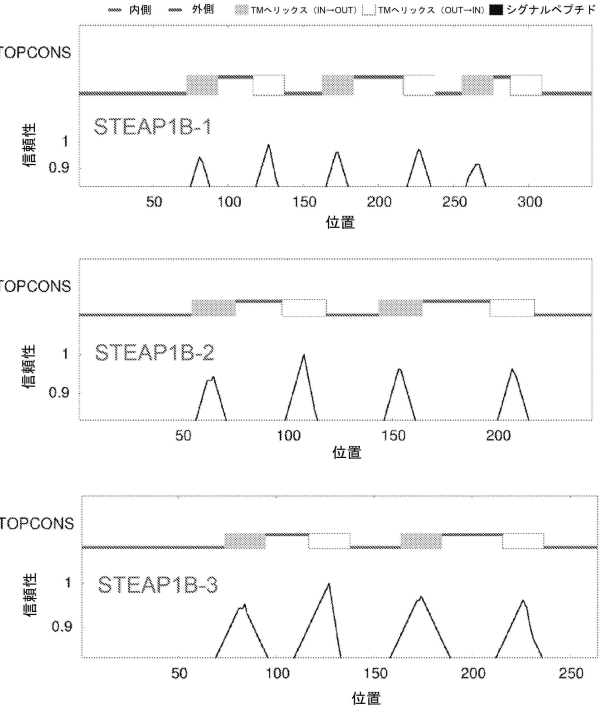
【図 6 A】



【図 6 B - 1】



【図 6 B - 2】



10

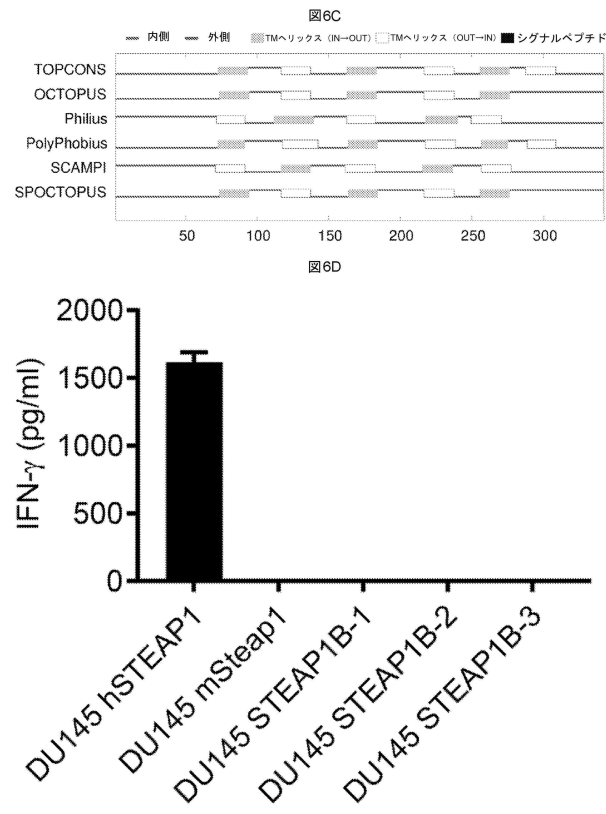
20

30

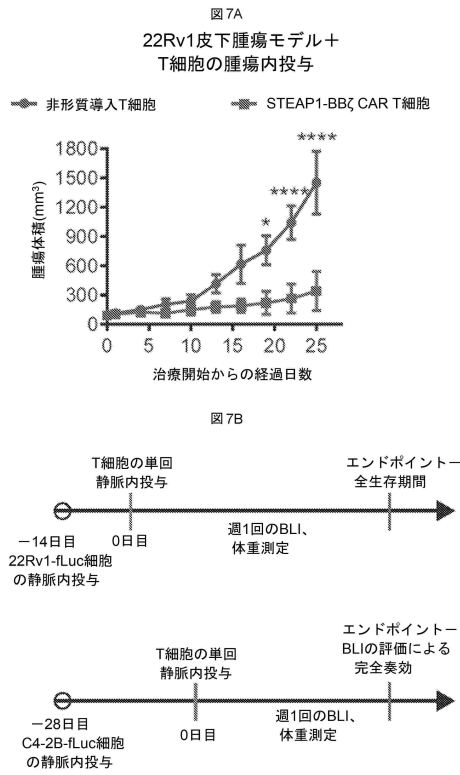
40

50

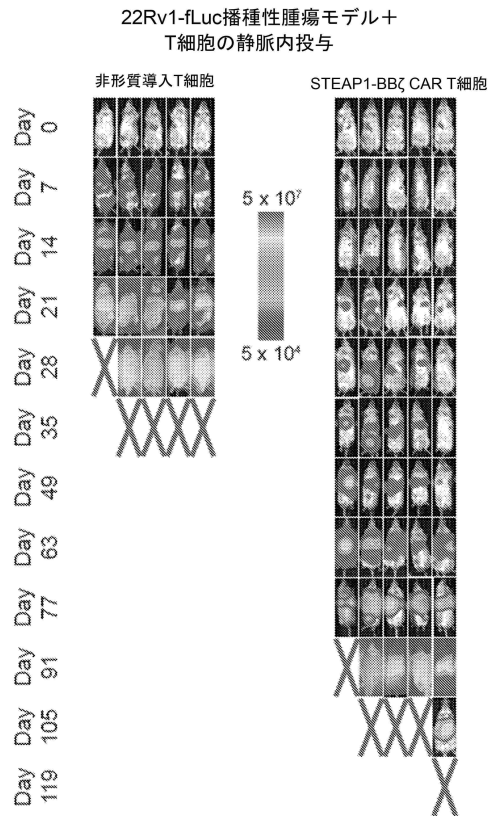
【図 6 C - D】



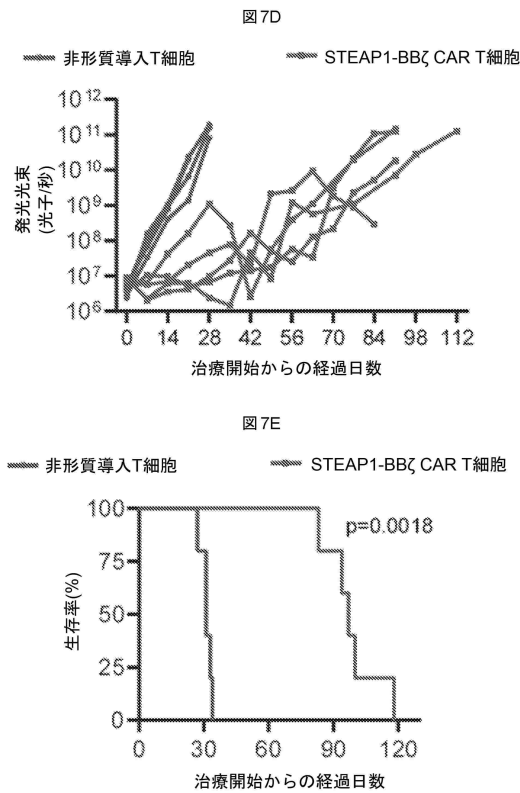
【図 7 A - B】



【図 7 C】



【図 7 D - E】



10

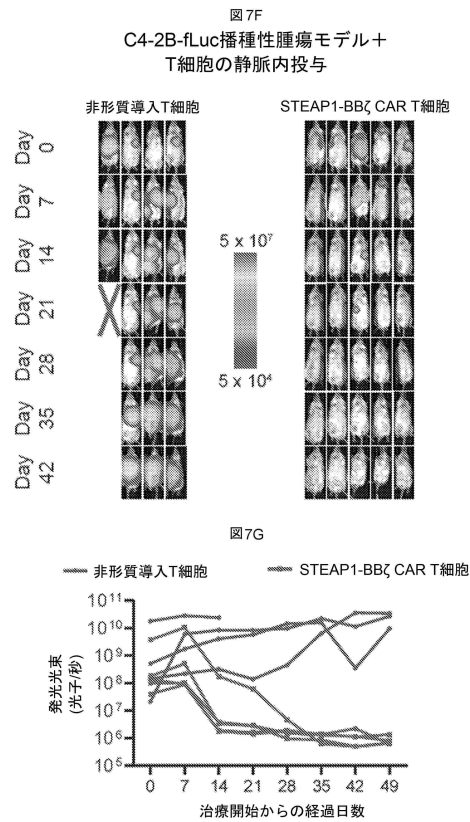
20

30

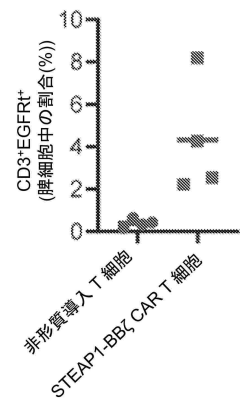
40

50

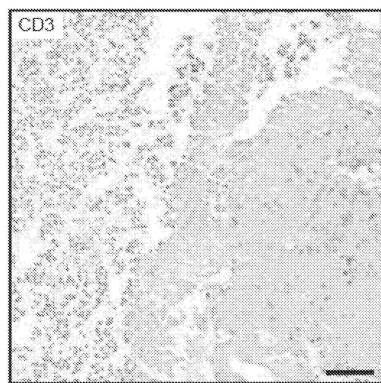
【図 7 F - G】



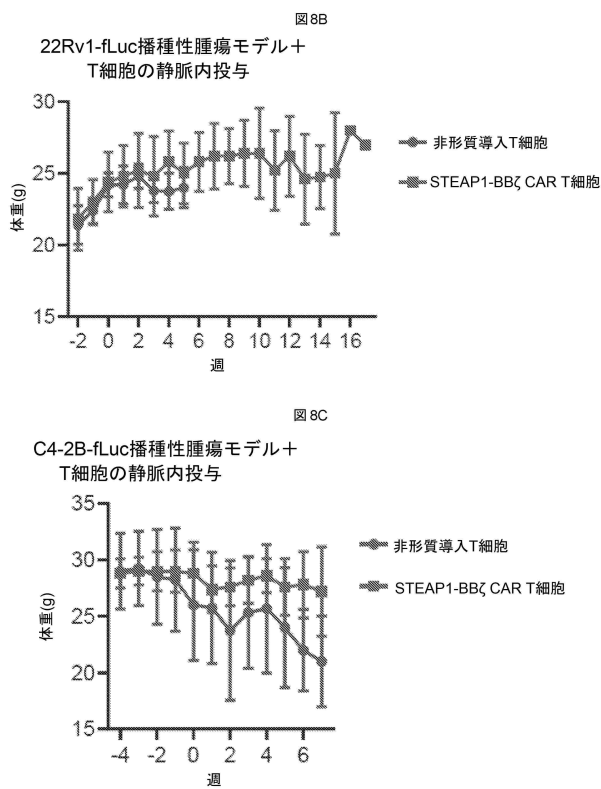
【図 7 H】



【図 8 A】



【図 8 B - C】



10

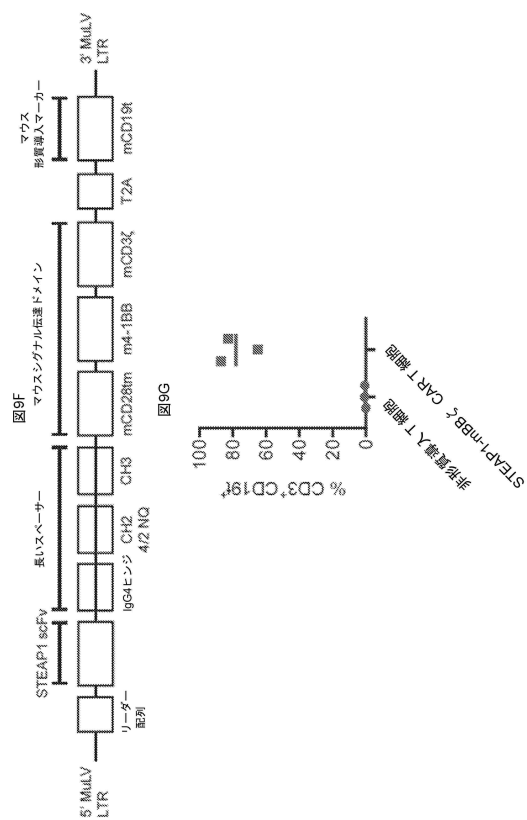
20

30

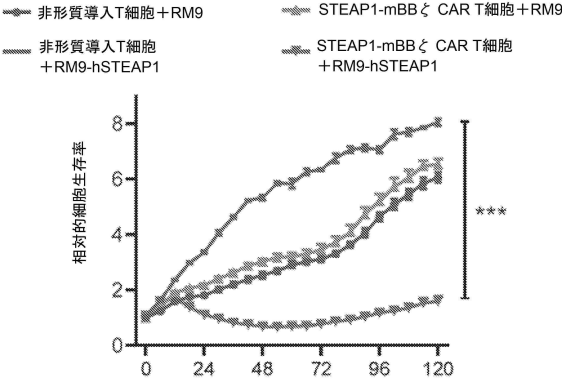
40

50

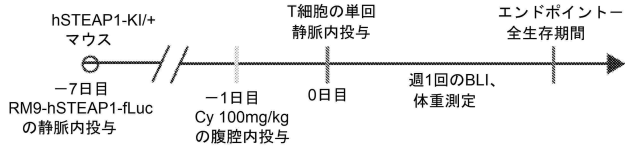
【図 9 F - G】



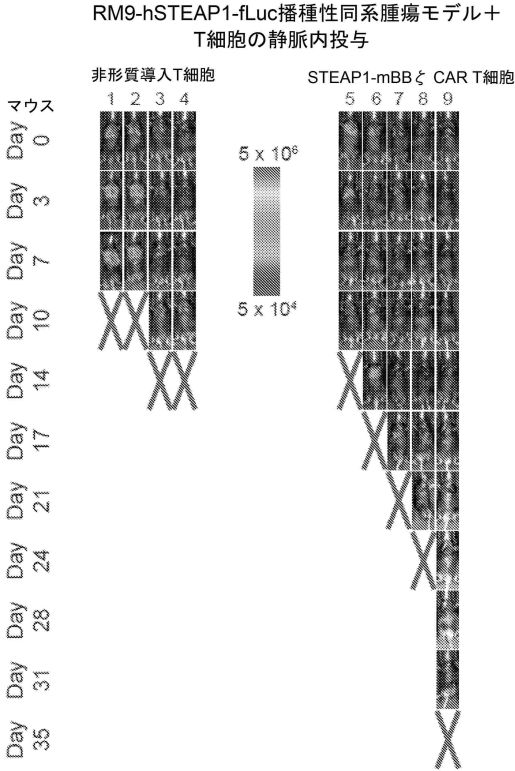
【図 9 H】



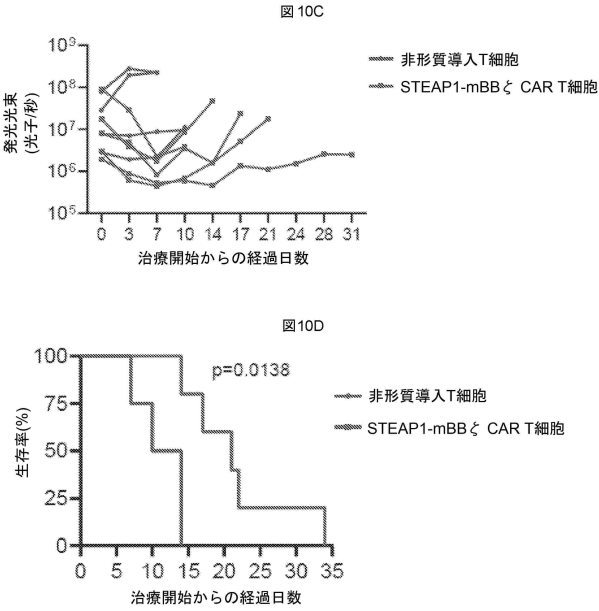
【図 10 A】



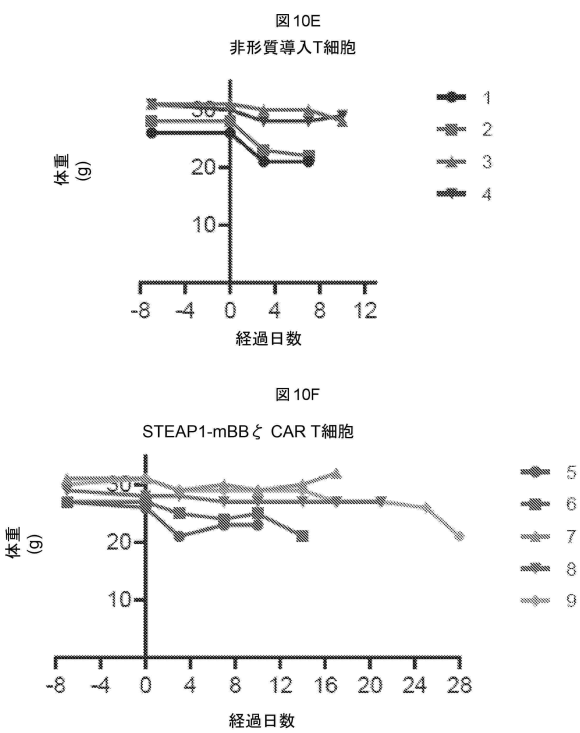
【図 10 B】



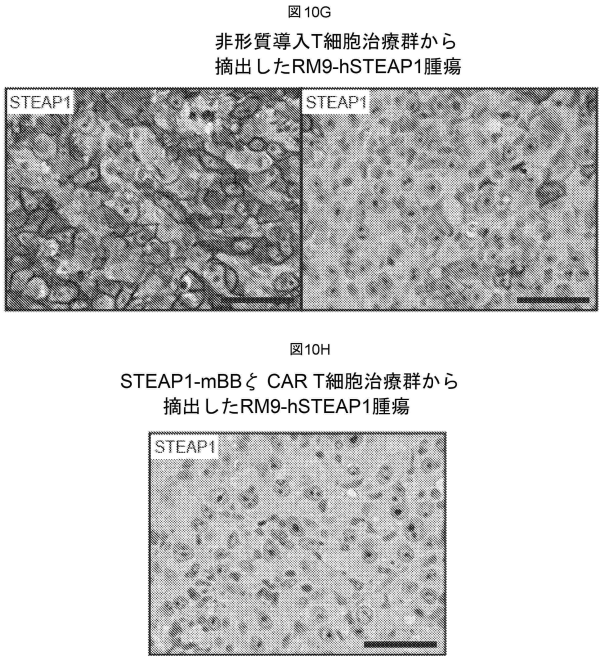
【図 1 0 C - D】



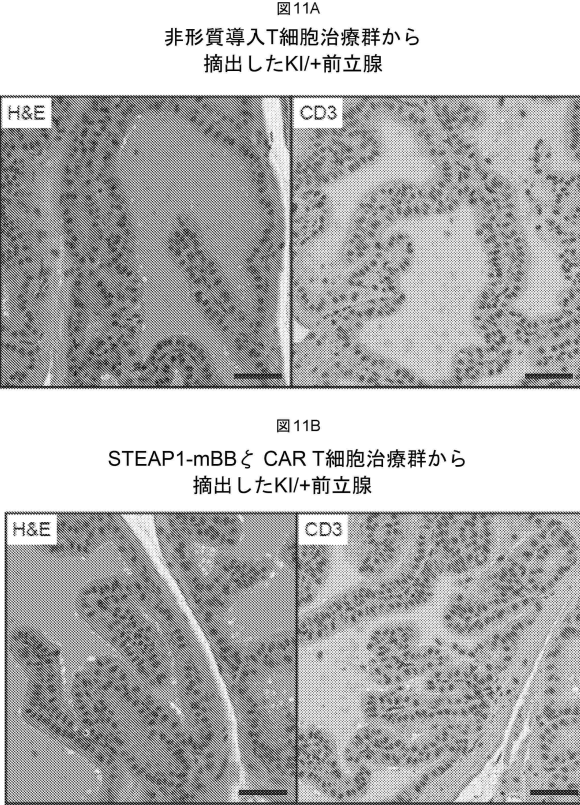
【図 1 0 E - F】



【図 1 0 G - H】



【図 1 1 A - B】



10

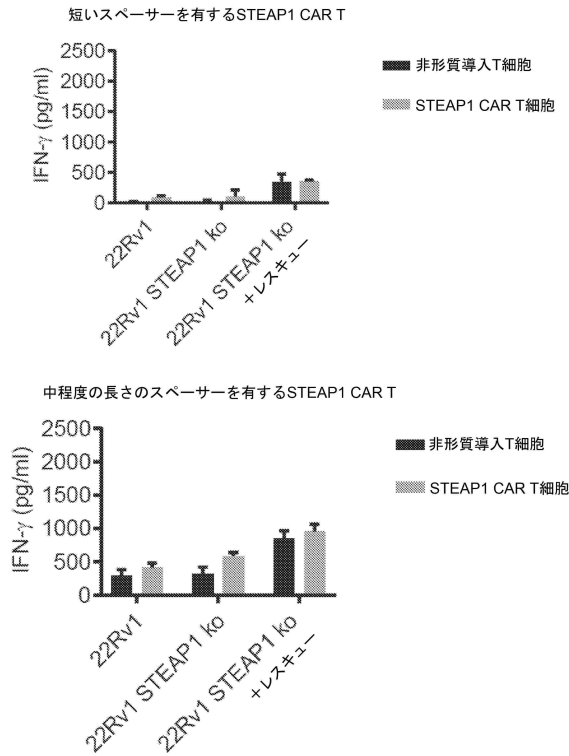
20

30

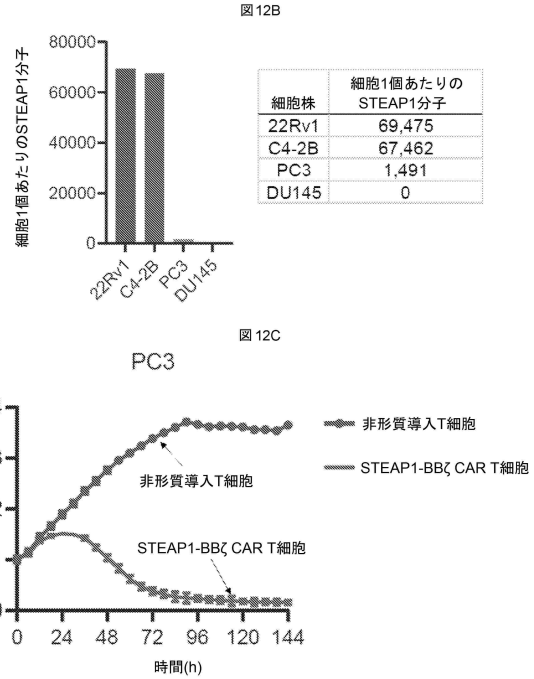
40

50

【図 1 2 A】



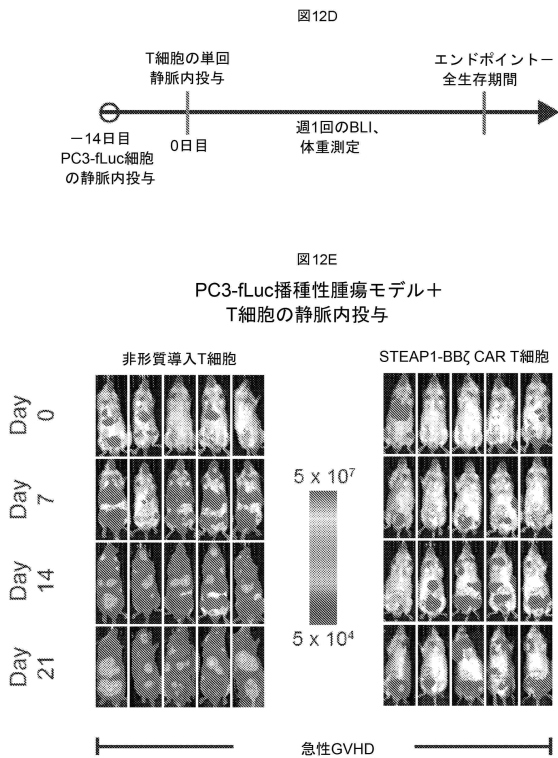
【図 1 2 B - C】



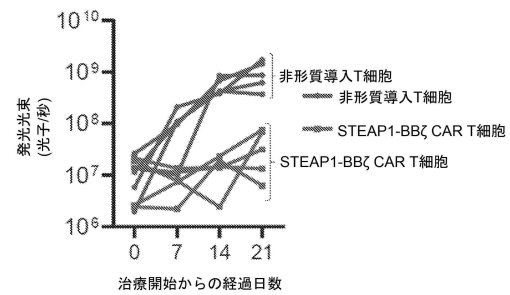
10

20

【図 1 2 D - E】



【図 1 2 F】

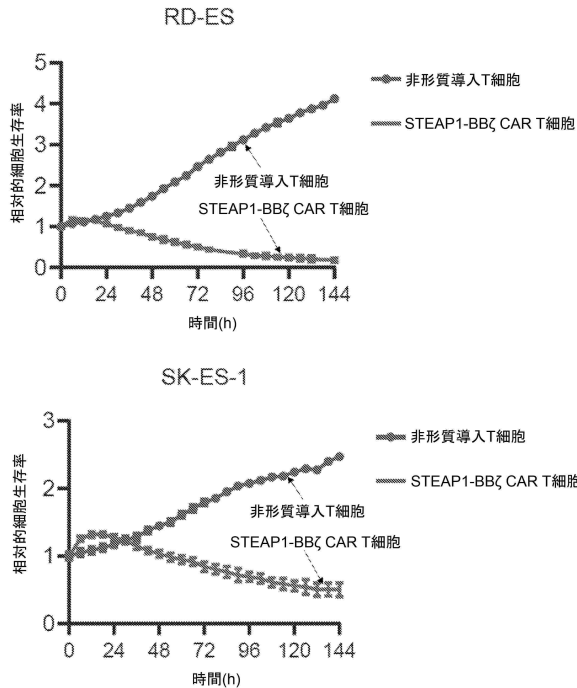


30

40

50

【図 1 2 G】



【図 13-2】

TATGGGACTTCTCTAC TTGGCAGTACATCTACGTTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGATG
CGGTTTGTGGGCAGTACAATGGGCGGTGGATAGCGGTTTGACTCAGCGGGGATTCGAAGT
CTCCACCCCATTCGAGCTCAATGGGAGTTTGTTTGGACCAAAATCAGCGGAGCTTCCAA
AATGTGCTGAACAACCTCGGCCCATTAGCGCAAAATGGGCGTGGAGGTGTACGTTGGGGAGG
TCTTATATAGCAGAGCTCGTTTAGTAAGCGGGGTCTCTGTGGTAGCAGGATCTTGAGCC
TGGGAGCTCTCGGCTAACTAGGAACACCAGCTGCTAAGCGCTCAATAAAGCTTGCCTTGAG
TGCTTCAAGTAGTGTGCGCCGTCTGTGTGATGCTGTGTAAGTACAGAGTCCCTCAGAGT
CTTTAGTACGTGTGAAAACTCTAGCAGGTGGCCGCGCAACGGGAGCTGTGAAGCGGAA
GGAAACACGAGGAGCTCTCTCGACGACGAGCTCGGCTTTGAGACGGCGCAGCGCAAA
AGGCCAGGGGCGGCGACTGTGTGATGACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGCTGGAAG
AAGAGATGGGTGCGGAGCGCTGATTAAGCGGGGGAGAAATAGATCGCGATGGAAG
AAAAATCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAATAATAATTAACATATAGTAGTGGGCA
GACGAGGAGCTAAGCAAGCTTCGAGCTTAATCTCGGCTGTGTGAAGAACTCAGAAGGCGTGA
CGAAATAGCTGGGACAGCTACAACCATCCCTTGACAGAGTACAGAAGAATTAGATCAT
ATAATCATAGTGAACACCTCTATTGTGTGATACAAAGATAGAGATAAAGACACCAAG
GAAGGTTTAGACAAGATAGAGGAAGGACAAAAAGTAGAACCCCGCAGACAGCG
CGCGCTGATCTCAGACCTGGAGGGAGGATATAGGGGACAATTTGGAGAGCGTAATT
TAAATATAAGTAGTAAAAATGAACCTTAGGATGAGTACCCCAAGGCAAGGAAGA
GTGGTCAGAGAGAAAAAGAGAGCTGGGAATAGGAGCTTGTCTTGCTTGGGTTCTGGGA
CGACGACGAAGCACTATGGGCGACGCTCAATGAGCGTGCAGCTGCGGCGCAGACAATTA
TTGCTCGTATAGTGCAGCAGCAGACAATTTGCTGAGGCGTTTAGGCGGCAACAGCATC
TTGTGGAACCTCAGACTCTGGGGCATACGACGCTCAGCGGAAGAATCTGGCTGTGGAA
GATACCTAAAGGATAACAGCTCTCGGGGATTTGGGGTGTCTGTGAAATCACTTTTGAC
CACTCGTGTGCTTGGAAATGCTAGTTGGAATATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATACA
CGACCTGGATGGGTGGGACAGAGAATAAATAACATACAGAAGCTAATACACTCTTAATT
GAAGATCGCAAAACCGCAAGAAAGAAATGAACAGAATAATTGGAATATGATAAATGG
CAAGTTTGTGGAATTTGGTTTAACATACAAAATTTGCTGTGGTATATAAAATTTATTAAG
TAGTAGAGGCGCTGTGATGTTTGAAGATATGTTTTCGTGATCTTCTATAGTAGTAAGGAT
AGCGAGGGAATTACCATTATGCTTTCAGCAACCTCCCAACCCGAGGGGACAGCT
AGGCCCGAAGGAATAGAAGAAAGAGGTGGAGAGAGACAGACAGATCCATTGCAATT
GTGAACGAGCTCGAGCGGTTATCGATAGCTAATTCACAAATGGGAGTTATCTCCACCAAT
TAAAGAAAGAGGGGGGATTTGGGGGTACGTGCGAGGAAAGAAATGATAGACATAATAGC
AACAGACAATAACAATAAGAAATACAAAACAAATACAAAATTCAAAATTTCCGGGTTT
TACAGGCGACAGAGATCGAGTTTGGGAATAGCTTGATCGAATTGCAATTTTGTAAAA
CAGCAGGATATAGTGTGCTCAGGCTCTAAGTTTGACTACAACAATACACCGCTGAGGCCTA
TAGAGTCAGCAGCTAGATAGAATAAATGATTTTATTATGCTCCAGAAAGTGGGGGAA
GAAAGCCGCCAATCTGAGTTTGGCAGCTAGGATACAGGTTAGGAACAGAGACAGCA
GAATATGCCCACCAAGAGATATCTGTGAAGCAAGTTCTGCCCCGCTCAGGGCCAAG
ACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTCTGCCCC
GGCTCAGGCGCAAGACAGATGGTCCCGAGTACGCGTCCGCCCTCAGGAGCTTTAGAG
AACCTACAGTATTTTCCAGGTCGCCCAAGGAGCTGAATACCGCTTGCCTTATTTGAAC
TAAACCATATGCTGCGCTCTGCTGCTTGTTCGCGGCTTCTGCTCCCGGAGCTCAATAAA
GAGCCCAACCCCTCACTCGGCGCAGCTAGATCTGGAATGCAATTCGCCACCGCCGC
ACAGTGTGCTGTGCTGACGACCGCTGCTGTGTGCGAGCTGCCACCCGCCGCTTCTGT
CTGATCCCGGATCGCGGGGTGGGAGTGGTGGGAGTACGCTGATACAAATGACTCA

【図 13-1】

CCPCL-MNDU3-STEAP1bindingdomain-IgG4Hinge-CH2-CH3-4-2NQ-CD28Tm41BBSSig-
CD3zeta-2TA-EGFR

CAGGTGGGCATTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGGAACCCCTATTTGTTATTTTTTCAATACAT
TCAAAATGTATGTACCGCTCATAGACAAATAACCTGCATAAATGCTCAATAATATGAAAAAG
GAAGAGTATGAGTATTCACAACTTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCC
TTCTGTTTGTGTCACCCGGAACCGCGTGGTGAAGAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGG
TGACGAGTGGGTACATCGAATCGATGGATTCACAGACGCGGTAAAGTCCTTGAGAGTTTTTCG
CCGGAAGAAATCGTTTCCAATATGATGACCATTTTTAAAGTTCGCTATGTTCGCGCGGATATATC
CCGTATGATCGCGCGGGAAGAAGCAACTCGGTCCGCCGATACACTATTTCAGATGACTTT
GGTTGAGTACACCAAGTCACAGAAAGACATCTTACGAGTGGCATGACAGTAAAGGAATTA
TGCAAGTCGTGCCATTAACCTGAGTAGATAACCATCCGGCCAACTTACTCTGACAAAGATCG
GAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCCTTG
CTGTGTGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATCAACCAACGACGCGTGACCAACGATGC
ATCGTAGCAATGGCAACAGCTGGTCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTGACTCT
CCGGCAACAATTAATAGATCGATGGATGGCGCGGATAAAGTTCGACGAGCCACTTCGCGCTC
GGCCCTTCGCGGTGCTGGTTTATTTGCTGATAAATCGGACGGGTGACGGTGCGTCTCG
CGGTATCAATTGACGACATCGGGCCAGATGGTAAGAACTCCCGGTATCGATGATTATCTACAC
GACGGGAGTACGAGCAACTATGATAGTAAGCAAAATAGACAGATCGCTGAGTAGTAGTGGCTC
ACTGATTAAGCATTTGTTAGTCTGCAGACCAAGTTTACTCATATATGATTTAGATTATTTAAA
ACTTCATTTTAAATTAAGAAAGTATAGTGAAGATGCTTTTATGTAATCTCATTGACCAAAAT
CCCTTAACGTGATTTTTCGTTCCTACGAGCTGACAGCCCGTAGAAAAGATCAAAAGGATCT
TCTTGAGATCCTTTTTTTCGCGCTAATCTGCTGCTTGCAAAAAAAAACCCCGCTACC
AGCGGTGGTTTGTGTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCGGAAGGTAACTGGGCTT
AGACAGAGCCGAGATACAAATACGTCTCTTAGTGTAGCGGTAGTTAGGCCAACCATTCGA
AGAATCTGTAGACCCCGCTACATACCTCGCTCGCTAATCTGTTCACAGTGGCTGCTCG
CAGTGGCGATAGCTCGTGTCTTCACGGGTGGACTGACAGCAAGATGTTACCGGATAAGCG
GACGGCGTCGGGCTGACGAGGGGGGTTGTCGACACAGCCAGCTTTGGAGGAAACGACCT
CAACGGAATCGATACCTTACAGCTGAGTACTGAGAAAAGCGCCACGCTTCCGGAAGGGA
GAAAGCGGAGACGGTATCCGTAAGACGGCAGGGTCGGAACAGAGGACGCGACAGGGA
GCTTCAGGGGGGAGACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACT
TGAGCTCGATTTTTGTAGCTGCTGTCAGGGGCGGAGCTATGAAAAAACGCCAGCAAC
GCGGCTTTTTACGGTTCTCGGCTTTTGCTGGCTTTTTGTCACATGTTCTTCTCGGTT
ATGCCCTGATTTGTGGATTAACGTTATACCGGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCGG
ATCGCGAACGACCGACGCGAGCGAGCTGATGAGCGAGGAAGCGGAAGCGGCCAATACG
CAAAACCGCCTCCCGCCGGGTTGGCCGATCTTAATGACGCTGGCAACAGACAGTTTCC
CGACTGAAAGCGGCGATGAGCGAACGCAATTAATGTGAGTAGTACTGACTCAATTAGGC
ACCCAGCGCTTGAACCTTTATGCTTCGCGCTGATATGTTGTGGGAATGACCGGATAA
CAATTTACACAGCTAACACGCTTAGCCATGATTACGGCAAGCGCGCAATTAAGCCCTCACT
AAGGAGCAACAAAGCTGGAGCTGCAAGCTTGGCCATTTGCATACGTTGTATCCATATCAAT
TAGTACATTTATTTGGCTCATGTCCAACATACCGGCACTGTGACATGATTATGACTAG
TTATTAAGTAATCAATACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATAGAGTTTCGCGGTTA
CTAACTACTCGTTAAGTATGCCCGCTGCTGACCGCCCAAGCAGCCCGCCGCTTACGAT
CAATAATGACGATATGTTCCCGATAGTACAGCCAAATAGGACATTTCCATGAGCTCAATGGT
GGAGTATTTACGTTAAATCGCCCATTTGACGTACATCAAGTTGATCATATGCAAGTACG
CCCGCTATTCAGTCAATGACGGTAATGGCCCGCTGGCATTTGCCGATATGCCGACATGACTC

【図 13-3】

GTCTCCTCTTCTCACTCTCAGCGAGTGTGGTGATCGAGTAACCACTACTTGAACGTAACG
CAGTCTTTTGTGTATAGAAATATCAGAAAACCTATCGCCCTGGTACCAAGAGACGCCG
GTAAAGCAACCAAAATGCTCATATATCTGGGCATCAACACGGGAAAGTGGGTGTGCCCTCCC
GCTTCTCTGGCAGTGGGAGTGGGACAGCAATTTAGCTGACTACTCTCAAGTCTTCAACCGGA
AGACTTCGCTACCTACTATTGTGACAACTACTATACTCTCTGGCAGCTTTGGTCAAGTA
CTAAGTGCAGATAAAACGGGGTGGTGGTGGCTCTGGGGGTGGCGAGTGCAGGAGTGGGA
GATCAAGAAGTGAACCTGTGCAAGCGGTGGGCGCACTTGCACGCCAGGGGATCACT
CAGATTGCTTGTGCACTGTGGATATCCATAAAGCATGATTATGCTCGGAATTTGGTCT
CGCCAGCGCTCGGGAAAAGGCGTCAATGGTGGGTCACTATTCTCACTTGTGCTACATA
TCCTCAACCCGAGCTTGAAGTTCAGGTTCACTATCTAGGGAATATAGCAAGAACCTC
TGACTCTCAAGTGAACAGTCTGAGAGCGGGAAGATACAGACTGATATATTGTGCGCGCG
AAAGGAACATATGATTATGACATATATTATTCGCTGAGTAAGTACTGGGGTCAGGCCACCT
TGTCAGGCTCAGTTTCAAGATTCAAGTACGAGCGGCCCTGCCCTCTGCCCTGCCCGCCC
CTGGCGCGGACCCAGCGTGTCTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGCAAGCAAGCTGATGATCG
CGGGAGCCCCGAGGTTGACCTGTGGTGGTGGAGCTGTCCAGAGAGAGACCCGAGGCTCC
ATTCAACTGTGATCTGGACGGCTGGAGGTCGACCAACGAGCAACCAAGCCCGGGAG
GAGCATGTTCCAGAGCACTCAACGGGTGTGCTCGTGTGACCTGTGCTGACCCAGGAGCT
GTCAACGCGCAAGGAATACAAGTGTAAAGTGTCCAAAGGCGCTGCCACAGCATCGA
GAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGGCCCAGGTGTACACCTTGCCCT
CTAGCCCAAGAGGAGATGACCAAGATACAGGTTGCTCTTGACCTGCTGCTGTGAAGGCTTCT
ACCCAGCGACATCCGCGTGGTGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGCAAGCACTACAAG
ACCAACCCCCCTGTGCTGGACAGCAAGCGACGCACTTCTCTGTACAGAGGCTGACCGTG
ACAAGAGCCCGTGGCAGGAGGGCAAGCTTCTTACGCTCTCGTGATGACAGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCTGGGCAAGATGTTTGGGTGCT
GGTGTGGTGGCGGGGTGCTGGCCTGTCACGCTCTGTGTCAGTGTGCTGCTTATCA
TCTTTTGGGTAAGAAGAGGAGCGGAAGAGCTGCTGTATATCTTAAAGACGCTTTTAGAG
ACCTGTGCTAAAACCCCAAGGAGGCGGGGTGTTCTCTGCTCTCCAGAGCGGAGGA
AGGAGGGTGCAGCTTGGCGGAGGCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCCGCGACGCCCTCT
GCTCACCGACGAGGCCAAGTACAGTGTACACAGAGTGAACCTGGGCAAGAGGGAAGA
GTACAGACTCTTGATAAAGCGGAGAGCGCGGAGCACTGAGATGGCGCGAAGCTCTGG
GGAAGAACCCCAAGGAAGGCTGTATACGAATCTGCAAGAAGCAAGATGGCCGAGGCT
ACAAGCAGATCGCATGTAAGGGCGAGCGAGGCGGGGCAAGGCGACAGCGCCTGTG
TCAGGGTCTGTCCACCGCCACAGGATAGCTACGACGCGCTGCAGTCTGACGGCCCTG
CCCCAAGGCTCGAGGGCGGGGAGAGGCGAGGAGGAAGTCTTCAACATGCGGTGACGTG
GAGGAGAATCCGCGCCCTAGGATGCTTCTCTGTGACAAAGCTCTGCTCTGTGATTA
CCACACCAAGCTTCTCTGTATCCACGCAAGGTGTGAACGGAATGATTTGGGAATT
TTAAGACTCACTCTCATTAATGTGCGCAATTTAAACACTCTAAAACCTGCTCCATC
AGTGGGCGATCTCCCACTTCTGCCGTGGCACTTTAGGGGTGACTCTTCCACACACTCTCTC
CTCGTAGCCACAGGAATCGATATTCTGAAAACCGTAAGGAAATCAGAGGTTTTTGTG
GATTCAGGCTTGGCTCGAAACAGAGCGAGCCTCATGCTTGTGAGAACCTGAAGATCAT
CGCGGACGAGCAACGAACATGTCAGTTTCTCTGACCTGTCGAGCTGGAACATAACT
CTCTGGGATGCTGCTCCCTCAAGGATGAAGTGAAGTGAGTGATATAATTTCAAGAAACAA
AAATTTGTGCTATGCAATAACAATAAAGTGAAAAAAAGCTTTGGGCACTCCGCTGACAAA
CCAAAATTATGACCAACAGAGGTGAAGCAAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGCTGCGCAT
CTTTGCTTCTCCCGCAGGGCTGCTGGGCGCGAGCGACGAGGAGCTGCTGCTCTTGGCGG

【図 1 3 - 4】

AATGTCACGCCAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAAG
GGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCAT
GAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGA
CGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCAATGGGAGAAAACAACCCCTGG
TCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACG
GATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCATAAGATCCCGTCCATCG
CCACTGGGATGTGTGGGGCCCTCCTCTTGTCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCCT
TTATGTGAGTTAACTCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA
ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGATCATGCTATT
GCTTCCCGTATGGCTTTTCACTTTTCTCCTCTGTATAAATCCTGGTTGCTGCTCTTTATGA
GGAGTTGTGGCCCGTTGTCAAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACCTGTGTTTGTCTGACGCAAC
CCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACTGTACGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCC
CCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCTTCCCGCTGCTGTGACAGGGG
CTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGCTCCTTTCTTGG
GCTGCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGCTCCTTCTGCTACGTCCTCTTC
GGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCCTCTTCG
CGCTCTCGCCTTCCGCCCTCAGACGAGTCGGAATCTCCCTTTGGCGCCGCTCCCGCGCTCG
ACTGATCAAAATCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCACTGTAGATCTT
AGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTAACCTCCCAACGAAGACAA
GTGTGGAAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTTCATGTCTATTATTACAGTATTATAACTTGCA
AAGAAATGAATATCAGAGAGTAGAGGAACTTGTTTATTGACAGCTTATAATGTTACAAAAT
AAGCAATAGCATCACAATTTGACAAAATAAGCAATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGGTGTT
GTCCAAACTCATCAATGATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCTTAACCTCGGCC
CATCCCGCCCTCAAGCTCCGCCCACTTCCGCCATTCTCCGCAAGTGTGCTCAATATTTT
TTTATTATTAGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGA
GGGCTTTTTTGGAGGCGTACGCCCGCTCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCCGCAAGCTT
GTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTAAGTGGGAAAAACCTGGCGT
TACCCAATTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATACGCAAGAG
GCCCGCACCATGCTCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGCGCGACGC
GCCCTGTAGCGGGCAGTAAGCGCGGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTA
CACTTGCACGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCCGCAAGCTT
CGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCT
TTACGGCACCTCGACGCCCAAAAAAATGATTAGGGGTGATGGTTACAGTAGTGCGCCAT
CCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAACCT
TTGCCAAACTGGAACAACAGCTCAACCTATCTCGGCTATTCTTTGATTATTAAGGAGTTT
GCCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTTA
ACAAAAATTAACGTTTACAATTTCC (SEQ ID NO: 1)

STEAP1-BBζ CAR (STEAP1-IgG4Hinge-CH2-CH3-4-2NQ-CD28TM-41BBSig-CD3zeta)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTKSSQSLLYRSNQKNYLAWYQKPGKAPKLLIYWASTRESG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYNYPRTFGQGTVKEIKRGGGSGGGGSG
GGGSEVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWNWRQAPGKLEWWGYISNSGS

【図 1 3 - 6】

GTGGTGTGCCCTCCCGCTTCTCTGGCAGTGGGAGTGGGACAGACTTTACGCTGACTACT
CAAGTCTTCAACCGGAAGACTTCGCTACCTACTATTGTACGAACTACTATAACTTACCTCG
ACCTTTGGTCAAGGTACTAAGGTCGAGATAAAACGG (SEQ ID NO: 7)

(G4S)3 Linker encoding sequence
GAGTGTGGTGGCTCTGGGGGTCGGGCTAGCGGAGGTGGAGGATCA (SEQ ID NO: 8)

STEAP1_scFv_VH encoding sequence
GAAGTGCACCTCGTCGAAAGCGGTGGGGGACTGTCCAGCCAGGGGACTCACTCAGATTG
TGTGTGCAGTTAGTGAATCTCCATAAGTGATTATGCCCTGGAATGGTGCCGCGAGG
CTCCGGGAAAAGGGCTCGAATGGGTGCGGTACATTTCTAACTCTGGCTTACATCTCTACAA
CCCGAGCTTGAAGTCCAGGTTCACTATCTAGGGATAATACGAAGAACACTCTGTACCTC
CAGATGAACAGTCTGAGAGCAACAGGATACAGCAAGTGATTATTGTGCGCGGAGAAAGAAC
TAGATTATGACGACTATTATTATGCCATGGATTACTGGGGTCAGGGCACCCCTTGTGACCG
TCAGTTCA (SEQ ID NO: 9)

IgG4 hinge -A
ESKYGPCPCPCP (SEQ ID NO: 10)

IgG4 hinge coding sequence-A
GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT (SEQ ID NO: 11)

IgG4 hinge coding sequence-B
GAGTCTAAGTACGGACCGCTTGCCACCGTGCCCA (SEQ ID NO: 12)

IgG4 hinge coding sequence-C
GAGTCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT (SEQ ID NO: 13)

IgG4-CH2 domain
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREE
QFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKSA (SEQ ID NO: 14)

IgG4-CH2 domain encoding sequence
GCCCGCCCGCTGGCCGAGCCAGCGTGTCTCTGTTCCCGCCCAAGCCCAAGGACACCCCT
GATGATCAGCCGGAGCCCGGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGAAGTGTCCAGGAGGAC
CCCGAGTCCAGTTCAACTGTGACGTGGACGGCTGGAGGTGCACAAAGCCCAAGGAA
CCCGGGAGAGCAAGTTCCAGAGCACTTACCGGGTGGTGTCTGCTGACCGCTGTCTGCA
CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAG
CAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA (SEQ ID NO: 15)

IgG4-int(DS) coding sequence
GGCCAGCCTAGAGAACCCAGAGTGTACACCTGCCTCCAGCCAGGAAGAGATGACCAA
GAACCAAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCAACCCAGCGATATCGCCGTGGA
ATGGAGAGCAACGGCCAGCCCGGAGCAACACTCAAGACCAACCCCGCTGTGCTGGACA
CGCAGCGCAGCTTCTCTGTACTCCCGCTGACCGTGGACAAGACCGGTGGCAGGAA

【図 1 3 - 5】

TSYNPSLKSRTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARERNYDYDDYYYAMDYWGQGLT
VTVSSESKYGPCCPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKSAK
GQPREPQVYLPSPQEEETKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNYTKQSLSLSLGKMFVWLTVVGGVLAACYSL
LVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGRVRFKRS
ADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRKRRDPEMGGKPRRKPNPEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 2)

STEAP1_scFv
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTKSSQSLLYRSNQKNYLAWYQKPGKAPKLLIYWASTRESG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYNYPRTFGQGTKEIKRGGGSGGGGSGG
GGGSEVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWNWRQAPGKLEWWGYISNSGS
TSYNPSLKSRTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARERNYDYDDYYYAMDYWGQGLT
VTVSS (SEQ ID NO: 3)

Variable light chain of STEAP1_scFv
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTKSSQSLLYRSNQKNYLAWYQKPGKAPKLLIYWASTRESG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYNYPRTFGQGTKEIKR (SEQ ID NO: 4)

Variable heavy chain of STEAP1_scFv
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWNWRQAPGKLEWWGYISNSGSTSYN
PSLKSRTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARERNYDYDDYYYAMDYWGQGLTVTS
S (SEQ ID NO: 5)

STEAP1_scFv encoding sequence (VL - (G4S)3 linker is underlined - VH)
GATATACAAATGACTCAGTCTCCTTCTTCACTCTCAGCGAGTGTGGTGATCGAGTAACCAT
TACTTGCAGTCAAGCCAGTCTTTGTGTATAGAAGTAATCAGAAAACTATCTGGCCTGGT
ACCAACAGAAAGCCCGGTAAGGCCACCAAAATTCGTCTATATCTGGGATCAACACGGGAA
GTGGTGTGCCCTCCCGCTTCTCTGCGAGTGGGAGTGGGACAGACTTTACGCTGACTATCT
CAAGTCTTCAACCGGAAGACTTTCGTACCTACTATTGTACGAATACTAACTATCTCGG
ACCTTTGGTCAAGGTACTAAGGTGAGATAAAACGGGGTGGTGGTGGCTCTGGGGGTGGC
GGTAGCGGAGGTGGAGGATCAGAAGTGCAACTCGTCCGAAAAGCGGTGGCGGACTTGTCCA
GCCAGGGGATCACTCAGATTGTCTTGTGCAAGTGTAGTGGAATCTCCATAACAAGTATTAT
GCCTGGAATGGTTCGCCAGGCTCCGGAAAAGGCGTCAATGGGTGGGTGCAATTTCT
AAGTGTGGCTCTACATCTACAAACCGAGCTTGAAGTCCAGGTTCACTATATCTAGGGATA
ATAGCAAGAACACTCTGTACCTCCAGATGAACAGTCTGAGAGCGGGAAGATACACGAGTGTA
TTATTGTGCGCGGGAAGGAAGTATGATTATGACGAGCTATTATTATGCCATGGATTACTGGG
GTCAGGGCACCCCTTGTACCGCTCAGTTCA (SEQ ID NO: 6)

STEAP1_scFv_VL encoding sequence
GATATACAAATGACTCAGTCTCCTTCTTCACTCTCAGCGAGTGTGGTGATCGAGTAACCAT
TACTTGCAGTCAAGCCAGTCTTTGTGTATAGAAGTAATCAGAAAACTATCTGGCCTGGT
ACCAACAGAAAGCCCGGTAAGGCCACCAAAATTCGTCTATATCTGGGATCAACACGGGAA

【図 1 3 - 7】

GGCAACGCTTCAAGTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA
TCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 16)

IgG4 CH3 domain
KGQPREPQVYLPSPQEEETKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
SFFLYSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNYTKQSLSLSLGK (SEQ ID NO: 17)

IgG4 CH3 domain coding sequence
AGGGCCAGCCTCGGAGGCCCAAGGTGTACACCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACC
AAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAGAACACCCCGCTGTGCTGGA
CAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGG
AGGGCAACGCTTTTGAAGTGTCTGATGATGACGAGGCGCTGCACAACTACACCCAGA
AGACGCTGTCCCTGAGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 18)

Intermediate Spacer coding sequence (IgG4 hinge-CH3 domain)
GAATCTAAGTACGGACCGCCTGCCCCCTTGCCCTAGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAG
GTGTACACCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGC
CTGTTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCC
CGAGAACAACTACAAGACCAACCCCGCTGTGCTGGACAGCGACGGCAAGCTTCTTCTGTA
CAGCAGGCTGACCGGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGCTTTAGCTGTCTCG
TGATGACAGAGGCCCTGCACAACCACTACCCAGAAAGAGCCTGCTCCCTGAGCCTGGGCA
AG (SEQ ID NO: 19)

Long Spacer (IgG4 hinge-CH2 domain-CH3 domain)
ESKYGPCPCPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKSAKQPR
EPQVYLPSPQEEETKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNYTKQSLSLSLGK (SEQ ID NO: 20)

Long Spacer Coding Sequence (IgG4 hinge-CH2 domain-CH3 domain)
GAATCTAAGTACGGACCGCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGCTGGCCGAGCCAG
CGTGTCTCTGTTTCCCGCCCAAGCCCAAGGACCACTGATGATCAGCCGAGCCCGGAGGT
GACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGTGACG
TGACCGGCTGGAAGGTGCACAACGCCAAGCAAGCCCGCGGAGGAGCAGTTCCAGAGC
ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTACACCTGCCCTGCCCTGAAACCGCAAGGA
ATACAAAGTGTAAAGTGTCCAAAGGGGCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCA
GGCCAAAGGGCCAGCCTCGGAGGCCAGGTGTACACCTGCCCTGCCCTGAAACCGCAAGGA
ATGACCAAGAACTAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCAGCATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCAACCCCGCTGT
GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCT
GGCAGAGGGCAACGCTTTAGCTGTCTCGGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCAGAAAGAGCTGTCCCTGAGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 21)

【 図 1 3 － 8 】

CD3zeta signaling domain encoding sequence-A
GGCGGAGGGCGGGTGAAATTTCAGCAGAAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGGCC
AGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGAAGAGTACGACGTCCTGGATA
AGCGGAGAGGGCCGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCAAGGA
AGCCCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCAT
GAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACC
GCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGG (SEQ ID NO: 22)

CD3ζ signaling domain encoding sequence-B
CGGGTGAAGTTTCAGCAGAAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGGCCAGAAATCAGCT
GTACAACGAGCTGAACCTGGGCAAGAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAG
GCCGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCAAGGAAGGCCCTGTAT
AACGAATCGCAGAAAGACAAGATGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGCGGA
GCGGAGGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAG
GATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGG (SEQ ID NO: 23)

CD3ζ signaling domain-A
GGGRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 24)

CD3ζ signaling domain-B
RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 25)

CD3ζ signaling domain -C
ELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 26)

4-1BB signaling encoding sequence-A
AAGAGAGGACGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTTAAGCAGCCTTTTATGAGACCTGTCCAAA
CAACCCAAGAGGAGCGGGTGTTCTGTGCTCTCCAGAGGAGGAGGAAGGAGGGTGC
GAGCTG (SEQ ID NO: 27)

4-1BB signaling encoding sequence-B
AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATTTCAAACAACCATTTATGAGACCAAGTACAAA
TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAGAAGAAGAAGGAGGATGTGA
ACTG (SEQ ID NO: 28)

【 図 1 3 － 1 0 】

AGGACGGACCTCCATGCCTTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACAT
GGTCAGTTTTCTCTTGCAGTGCCTCAGCCTGAACATAAATCCTTGGGATTACGCTCCCTCA
AGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAAATACA
ATAAATCGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAAACCAAAATTTAAGCAACAGAG
GTGAAAAAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCGCAGGGGC
TGCTGGGGCCCGGAGCCAGGGAAGTGCCTCTTGGCGGAATGTCAAGCCAGGCGAGGGA
ATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAAGGAGTTTGTGGAGAATCTCTGA
GTGCATACAGTGCACCCAGAGTGCCTGCCTAGGCCCATGAACATCACTGCACAGGAGC
GGGACCAAGCAACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGAC
CTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAAACAACCCCTGGTCTGGAAGTACGACAGCGCC
GCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTG
AAGGCTGTCCACAGGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATGCCCACTGGGATGGTGGGGGCC
CTCCTCTTGCTGCTGGTGGGCCCTGGGGATCGGCCTATTTCATG (SEQ ID NO: 40)

EGFRt
MLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNIGIGIEFKDLSINATNIKHFNKNTSISGDHLHPVAFRGD
SFTHTPPLDPOELDILKTVKEITGFLIQAWPENRDLHAFENLEIIRGTRKQHGQFSLAVLSNIT
SLGLRSLKAEISDGVIVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGOVCHALCS
PEGCWGPEPRDCVCSNRVSRGRECYDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTG
RGPNDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYCTGPGLE
GCPNTNGKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM (SEQ ID NO: 41)

tCD19 coding sequence
ATGCCACCTCCAAGACTCCTCTTCTCCTCCTTCTCCTGACACCAATGGAAGTCAGGCGCTG
AGGAACCTCTAGTGGTGAAGGTGGAAGAGGAGATAACGCTGTGTTACAGTGCCTCAAGG
GAACCTCAGATGGACCCCACTCAGCAGCTGACCTGGTCTCGGGAGTCTCCGCTTAAACCCCT
TCCTGAAACTCAGCCTTGGACTGCCAGGTCTGGGAATCCACATGAGGCCCACTGGCTATCT
GGCTGTTCACTTTCAACGCTCTCTCAACAGATGGGAGGCTTCTACCTGTGTACAGCCTGGACC
ACCTTCTGAGAAGGCATGGCAGCCTGGTTGGACAGTCAATGTGAGGGTTCTGGTGAGCT
GTTCCGGTGAATGTTTCGGACCTAGGTGGACTGGGATGTGGTCTGAAGAACAGGTGCTCT
AGAGGGACCTAGCTCTCCTTCGGGGAAGCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGTGGGCCAA
AGACCGCCCTGAGATCTGGGAGGGAAGCGCTCCGCTGTGTCCCACCGGAGGACAGCCTGA
ACAGAGCCCTCAGCCAGGACCTCACCATGGCCCTGGCTCCACACTCTGGCTGTCTGTG
GGGTACCCCTGACTCTGTGTCCAGGGGCCCCCTCTCCTGGAACCATGTGCAACCCCAAG
GGGCCTAAGTCACTGAGCCTAGAGCTGAAGGACGATCGCCCTGCAGAGATATGTGG
GTAATGGAGACGGGTGTTGTTGCCCCGGGCCACAGCTCAAGACGCTGGAAAGTATTAT
TGTCACCGTGGCAACCTGACCATGTCAATCCACCTGGAGATCACTGCTCGGCCAGACTAT
GGCACTGGCTGCTGAGGACTGGTGGCTGGAAGGCTCAGCTGTGACTTTGGCTTATCTGA
TCTTCTGCCTGTGTTCCCTGTGGGCACTTCTTCATCTTCAAAGAGCCCTGGTCTGAGGAG
GAAAAGATGA (SEQ ID NO: 42)

T2A encoding sequence-A
CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAA
TCCCGGCCCTAGG (SEQ ID NO: 43)

【 図 1 3 － 9 】

4-1BB signaling coding sequence-C
GTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAAGTAC
AAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAGAAGAAGAAGGAGGAT
GTGAACCTG (SEQ ID NO: 29)

4-1BB costimulatory domain -A
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 30)

4-1BB costimulatory domain-B
VKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 31)

4-1BB costimulatory domain -C
VKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGC (SEQ ID NO: 32)

CD28TM encoding sequence-A
ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGAC
AGTGGCCCTTCATCATCTTTTGGGA (SEQ ID NO: 33)

CD28TM encoding sequence-B
ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGCGAGCGCTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCAC
CGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTG (SEQ ID NO: 34)

CD28TM encoding sequence-C
ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGCGAGCGCTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCAC
CGTGGCCTTCATCATCTTTTGG (SEQ ID NO: 35)

CD28TM encoding sequence-D
ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGAC
AGTGGCCTTCATCATCTTTTGG (SEQ ID NO: 36)

CD28 Transmembrane Domain-A
MFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW (SEQ ID NO: 37)

CD28 Transmembrane Domain - B
MFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW (SEQ ID NO: 38)

CD28 Transmembrane Domain - C
FWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW (SEQ ID NO: 39)

EGFRt encoding sequence
ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCCTCTGA
TCCCACGCAAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAGACTCACTCTCCATAAAT
GCTACGAAATATTAAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCG
CGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTACACACATACCTCCTCTGGATCCACAGGAACCTGGA
TATTCTGAAAACCGTAAGGAATCACAGGGTTTTTGTGATTACAGGCTTGGCCTGAAAAAC

【 図 1 3 － 1 1 】

T2A encoding sequence-B
CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAA
TCCAGGCCCTAGG (SEQ ID NO: 44)

Thoseaasigna Virus 2A (T2A) Peptide-A
LEGGGEGRGSLLTGCDVEENPGPR (SEQ ID NO: 45)

Thoseaasigna Virus 2A (T2A) Peptide-B
GSGEGRGSLLTGCDVEENPGP (SEQ ID NO: 46)

Porcine Teschovirus-1 2a (P2A) Peptide
GSGATNFSLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 47)

Equine Rhinitis A Virus (ERAV) 2A (E2A) Peptide
GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 48)

Foot-And-Mouth Disease Virus 2A (F2A) Peptide
GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 49)

CMV promoter sequence
AGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC
GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTTCATTG
ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT
ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCC
CAGTACATGACCTTATGGGAATTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT
TACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACG
GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTGGCACAAAAATCAA
CGGGACTTCCAAAAATGTCGTAAACAACCTCCGCCCAATTGACGCAAAATGGGCGGTAGCGCT
GTACGTTGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG (SEQ ID NO: 50)

EF1 promoter encoding sequence-A
GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCAACAGTCCCC
GAGAAGTTGGGGGAGGGGTGCGGCAATTGAACCGGTGCTAGAGAAGGTGGCGCGGGG
TAAACTGGGAAAGTGAATGTCGTGTACTGGCTCGCCCTTTTCCCGAGGTGGGGGAGAAC
CGTATATAAGTGACGATGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCCGCCAGAAC
ACAGCTGAAAGTCTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTACCGCGCCCGCCGCTACCTGAGG
CCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCTCCCGCCTGTGTGGCTCCTGAACT
TGCGTCCCGCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCT
CCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGCTCTCCACGCTTTGCCGTGACCCTGCTTGCTCA
ACTCTACGCTTTGTCTGTTTCTGTTCTGCGCGGTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCG
CCTAC (SEQ ID NO: 51)

【 図 1 3 - 1 2 】

EF1 promoter encoding sequence-B
GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCTCAGTGGGCAGAGCCGACATCGCCACAGTCCCC
GAGAAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAAGGTGGCGCGGGG
TAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCCTTTTCCGAGGGGTGGGGGAGAAC
CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTGCCGCCAAGAC
ACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCGCCCTACCTGAGG
CCGCCATCCAGCCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCCTCCCGCCTGTGGTGCCCTCTGAACT
TGCGTCCGCCGTCTAGTAAAGTTTAAAGCTCAGGTCAGAGCCGGGCCCTTTGTCGGCGCT
CCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCTGACCTGCTTGTCTCA
ACTCTACGTCTTTGTTGTTTCTGTTCTCGCGCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCG
CCTACG (SEQ ID NO: 52)

Psi encoding sequence-A
TCGACGCGAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTG
GTGAGTAGCCCAAAATTTTACTGACGGGAGGCTAGAGGAGAGAGATGGGTGCGGAGAGC
GTCAGTATTAAAGCGGGGAG (SEQ ID NO: 53)

Psi encoding sequence -B
CTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTAGCCG
AAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCACT (SEQ
ID NO: 54)

RRE encoding sequence-A
GCCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC
GCAGCCTCAATGACGCTGACGGTAGAGGCCAGACAATATTGTCTGGTATAGTGACGACG
CAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGG
GGCATCAAGCAGCTCCAGGC (SEQ ID NO: 55)

RRE encoding sequence-B
GCAAGAGAAAGAGTGGTGACAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTT
GGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACA
GGCCAGACAATTATTGTCTGTTATAGTGACGAGCAGAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAG
GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGATC
CTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGGGGTTGCTCTGGA
AAACTCATTTGACCACTGCTGTGCCTTGGATC (SEQ ID NO: 56)

Flap
TACAAATGGCAGTATTCATCCAAATTTTAAAGAAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC
AGGGGAAAGAATAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTTACAAAAACAA
TTACAAAAATTCAAAATTTTGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTGG (SEQ ID
NO: 57)

GM-CSF signal peptide encoding sequence
ATGCTGCTGCTGGTGACCGCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTTCTGCTG
ATCCCC (SEQ ID NO: 58)

【 図 1 3 - 1 4 】

U5 encoding sequence-A
CAAGTAGTGTGTGCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAGTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTT
AGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCA (SEQ ID NO: 66)

U5 encoding sequence -B
CTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCGTCTGTTGTGTG
ACTCTGGTAAGTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCT (SEQ ID NO:
67)

AmpR encoding sequence
ATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG
AGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCACTCAC
AGAAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATG
AGTGATAACACTGCGCGCAACTTACTTCTGACAAAGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAAACC
GCTTTTTTGACACAATGAGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
ATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCCAGTGCCTGTAGCAATGGCAACAACGCT
TGCGCAACTATTAACTGCGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTG
GATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTT
TATTGCTGATAAATCTGGAGCGCGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGACGACTGGG
GCCAGGATGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTAT
GGAATGACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAAGCATTGG (SEQ ID
NO: 68)

AmpR
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCTGTT
TTTGCTCACCCGAAACCGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA
GTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAG
AAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATT
GACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAG
TACTCACCAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTG
CTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACC
GAAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGG
GAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACAGCAGGAGCGTGACACCAACGATGCCGTGAGCA
ATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAAC
AATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTCTGAGGACCACTTCTCGCTCGGCCCTTC
CGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAACTGTGAGCCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCA
TTGAGCACTGGGGCCAGATGTTAAGCCCTCCCGTATCTGATGTTATCTACAGCAGGGGGA
GTCAGGCAACTATGGATGAACGAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAA
GCATTGGT (SEQ ID NO: 69)

ColE1 origin encoding sequence-A
TCATGACCAAAATCCCCTTAACGTGAGTTTTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAA
GATCAAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAA
AACCACCGCTACCAAGCGGTGGTTTGTTCGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAA

【 図 1 3 - 1 3 】

GM-CSFR encoding sequence
ATGCTGCTGCTCGTGACCAAGCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCACCCCTGCCTTTCTGCTG
ATCCCC (SEQ ID NO: 59)

dWPRE encoding sequence
ATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAGTATTGCTCCTT
TTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCT
TTCAATTTTCTCCTCTTGATATAAATCCTGGTTGCTGCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT
TGTCAGGCAACGCTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGG
CATTGCCACCACCTGTGACGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACG
GCGGAACTCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCAC
TGACAATTCGCTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGCTTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTT
GCCACCTGGATTCTGCGCGGAGCTCCTTCTGCTACGCTCCCTTCCGGCCCTCAATCCAGCG
GACCTTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTTGGCTTCG
CCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCCGC(SEQ ID NO: 60)

WPRE
ATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAGTATTG
GCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCG
TATGGCTTCATTTTCTCCTCTTGATAAAATCCTGGTTGCTGCTCTTTATGAGGAGTTGTG
GCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGG
TTGGGCGATTGCCACCACTGTGACGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATT
GCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCTTGCCTTGCCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTT
GGGCACTGACAATTCGTTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGCTTTCTTGGCTGCTCGC
CTGTGTGCCACCTGGATTCTGCGCGGAGCTGCTTCTGCTACGCTCCCTTCCGGCCCTCAA
TCCAGCGGAACTTCTTCCCGCGGCTGCTGCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTTCC
CCTTCCGCTCAGACGAGTCGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCCGATCGAT (SEQ ID
NO: 61)

U3 encoding sequence
TGGAAAGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACT (SEQ ID NO:
62)

delU3
GTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAA
GGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAAGAAGACAAGAT (SEQ ID NO: 63)

R encoding sequence-A
GGGTCTCTCTGGTTAGACAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCA
CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTT (SEQ ID NO: 64)

R encoding sequence-B
CTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG
CTTAAGTAGGGAACCACTG (SEQ ID NO: 65)

【 図 1 3 - 1 5 】

GGTAAGTGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAACTGTCCTTCTAGTGAGCCGTAGTTA
GGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC
CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGAACCAAGACGATAGT
TACCGGATAAAGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGACACAGCCCGACTTG
GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAG
CTTCCGGAAGGAGAAAGGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGGAACAGGAGA
GCGCAGCAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCTGGTATCTTTATAGTCTCTGCGGTTTCG
CCACTCTGACTTGAAGCTGCAATTTTGTGATCGTCTGACAGGGGGCGGAGCCTATGGA
AAACGCCAGCAACGCGGCC (SEQ ID NO: 70)

CoE1 origin encoding sequence -B
AAAAGGATAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT
TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAAGATCTCTTGAGATCCTTTTT
TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAGCAAAAAAACCCGCTACCGAGCGGTGGTTTGT
GGCGCTCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCCGAGATA
CCAAATACTGTTTCTAGTGATGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAC
CGCTCATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC
GTGCTTACCGGGTTGGAACCAAGCAGATGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTG
AACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATA
CCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCGGAAGGAGAAAGCGCGAGCTG
ATCCGTTAAGCGCAGGGTCTGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAA
CGCCTGATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTTG
TGATGCTCTGACGGGGGCGGAGCCTATGGAAGAACCGCAGCAACCGCGGCTTTTTACG
GTTCTGCGCTTTTGTGGCTTTTGTGCTACATGTTCTTCTGCTGTTATCCCTGATTCTG
TGATAACCGCTATTACCGCTTTGAGTGAAGCTGATACCGCTCGCCGACCGCAACGACCG
AGCGACGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG (SEQ ID NO: 71)

LacO encoding sequence
GGAATTGTGAGCGGATAACAATT (SEQ ID NO: 72)

M13-rev encoding sequence
CAGGAAACAGCTATGACCATG (SEQ ID NO: 73)

T3 encoding sequence
ATTAACCTCACTAAAGGGA (SEQ ID NO: 74)

cPPT encoding sequence
CACAAATGGCAGTATTATCCACAATTTTAAAGAAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC
AGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAA
TTACAAAAATTCAAAATTTTCGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGG (SEQ
ID NO: 75)

MNDU3 promoter encoding sequence
ATCGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTGTACTCAA
CAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGATAGAATAAAAGATTTTATTAG

10

20

30

40

50

【 図 1 3 - 1 6 】

TCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGCCAAGCTAGGATCAAG GTTAGGAACAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCC TGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCT GTGGTAAGCAGTTCTCGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAAGATGCGGTC CCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAA ATGACCCCTGTGCCTTATTTGAACATAACCAATCAGTTGCTTCTGCTTCTGTTCGCGGCTT CTGCTCCCCGAGCTCAATAAAGAGGCCACAACCCCTCACTCGGCGCGATC (SEQ ID NO: 76)

EcoR1 encoding sequence
GAATTC

Kozak encoding sequence
GCCGCCACC

T7 encoding sequence
CCCTATAGTGAGTCGATTAC (SEQ ID NO: 77)

M13-fwd encoding sequence
ACTGCGCTCGTTTTACA (SEQ ID NO: 78)

LacZ alpha encoding sequence
TGGCGTAATAGCGAAAGAGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAAT GGGAATGG (SEQ ID NO: 79)

M13 origin encoding sequence
ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCA CGTTCCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGCGTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAG TGCCTTACGCGACCTCGACCCCAAAAACCTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCA TCGCCCTGATAGACGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAC TCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCATATCTCGGCTATATCTTTTGATTATAAGGG ATTTTGGCGATTTCGGCCTATTTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAACAAAAATTTAACGCGAA TTTTAAACAAAATATTACGTTTACAATTT (SEQ ID NO: 80)

SV40
GGTCGAGATCCGGTGCACCAAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC TAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTATATGCA GAGGCCGAGGCCGCGCTCGCCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGA GGCCTAGGCTTTTGCAAA (SEQ ID NO: 81)

6-histidine tag coding sequence: CATCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO: 82)

3 x glycine linker: GGG

【 図 1 3 - 1 8 】

TGCTGGGAGTTACAGCTGTGGGTGAACAACTCCATAGACAGACAGCGTCCAAGGCCTG GACACTTGAAAGTGCTGTATGCACCCAGGAGGCTGCGTGTGTCCATGAGCCCAGGGGACCA AGTGATGGAGGGGAAGAGTGCAACCCTGACCTGTGAGAGCGACGCCAACCTCCCGTCT CCCACTACACCTGGTTTGACTGGAATAACCAAGCCTCCCCACCACAGCAAGAAGCTGA GATTGGAGCCGGTGAAGGTCCAGCACTCGGGTGCCCTACTGTTGCCAGGGGACCAACAGT TRGGGCAAGGCCGTTGCGCTCTCAGCACCTCACCGTCTACTATAGCCCGGAGACC (SEQ ID NO: 86)

PRKAR1A dimerization domain
RSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO: 87)

SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO: 88)

PRKAR1B dimerization domain
SLKGCELYVQLHGQQVLKQVHLCSKPERPMKFLREHFKEKLEENR (SEQ ID NO: 89)

PRKAR1R dimerization domain
RSLRECELYVQKHNIQALLKDRIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO: 90)

SLRECELYVQKHNIQALLKDRIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO: 91)

PRKAR1E dimerization domain
SLRECELYVQKHNIQALLKDEIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO: 92)

Dimerization and Docking Domain (DDD)
SHIQPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 93)

CGHIQPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 94)

Anchoring Domain (AD)
QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 95)

CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO: 96)

Jun Leucine Zipper
RIARLEEKVKTAKQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMN (SEQ ID NO: 97)

Fos Leucine Zipper
LTDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKELEFILAA (SEQ ID NO: 98)

consensus sequence for a WW motif
WX7 G(K/R)X1 (Y/F)(Y/F)X1 (N/D)X2 (T/S)(K/R)X1 (T/S)(T/Q/S)WX2 P
where X represents any amino acid and bold letters represent highly conserved amino acids (SEQ ID NO: 99)

【 図 1 3 - 1 7 】

3 x glycine linker coding sequence: GGGCGGGCGG

Portion of CD22 extracellular domain that contains CD22 domains defined as Ig-like C2-type 3, Ig-like C2-type 4, Ig-like C2-type 5, Ig-like C2-type 6:
PEPSTVQLHSPAEGSQVEFLCMSLANPLNTYWHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAGT YSCVAENILGTGORGPGAELDVQYPPKVVTTVIQNPMPPIREGDVT/LSCNYYNSNPSTRYEV KPHGAWEEPSTGLVLKIQNVGWDNTTIAACAACNSWCSWASPVALNVQYAPRDVRVRKIPLSEI HSGNSVSLQCDFSSSHPKVEQVFFWEKNRLLGKESQLNFDISIPEDAGSYSCWVNNSIGQTA SKAWTLEVLYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTFWFDWNQSLPYHSQ KLRLEPVKVQHSWAYWCQGTNTSVGKGRSPLSTLVVYSPET (SEQ ID NO: 83)

Portion of CD22 extracellular domain that contains CD22 domains defined as Ig-like C2-type 3, Ig-like C2-type 4, Ig-like C2-type 5, Ig-like C2-type 6 coding sequence:
CCGGAACCTTCCACGGTTCAGATCCTCACTCACCGGCTGTGGAGGGAGCTCAAGTCGAG TTTCTTTGCTGTCACTGGCCAATCCTCTTCCAACAAATTACACGTGGTACCACAATGGGAA AGAAATGCAAGGGAAGGACAGAGGAGAGAAAGTCCACATCCCAAGATCCTCCCTTGGCACGC TGGGAATATTCTCTGTGTGGCAGAAAACATTCTTGCTGATGCACAGAGGGGCCCTGGAGC TGAGCTGGATGTCCAGTATCCTCCCAAGAAGGTGACCACAGTGAATCAAAACCCCATGCC GATTCCAGAAAGGAGACACAGTGACCCCTTCTGTAACTACAATTCAGTAACCCCAAGTGT ACCCGGTATGAATGGAAACCCCATGGCGCCTGGGAGGAGCCATCGCTTGGGGTGCTGAA GATCCAAAACGTTGGCTGGGACAACACAACCATCGCCTGCCAGCTTGTAAATAGTTGGTG CTCGTGGGCTCCCCGTGCGCCCTGAATGTCAGTATGCCCCCCGAGACGTGAGGGTCC GGAAATCAAGCCCTTTCGAGATTCACTCTGGAACCTCGTGACGCTCCCAATGTGACTT CTCGAAGCAGCCACCCCAAGAAAGTCCAGTCTTCTGGGAGAAAAATGGCAGGCTTCTGGG GAAAGAAAGCCAGCTGAAATTTTGACTCCATCTCCCCAGAAGATGCTGGGAGTTACAGCTGC TGGGTGAACCAACTCCATAGGACAGACAGCGTCCAAGGCCCTGGACACTTGAAGTGCTGTAT GCACCCAGGAGGCTCGCTGTGTCCATGAGCCCAGGGGACCAAGATGAGAGGGGAAGAG TGCAACCTGACCTGTGAGAGCGACGCCAACCCCTCCCGTCTCCCACTACACCTGTTTGA CTGGAATAACCAAGCCTCCCCACCACAGCCAGAAGCTGAGATTGGAGCCGGTGAAGGT CCAGCACTCGGGTGCCCTACTGTGCCAGGGGACCAACAGATGTGGGCAAGGGCCGTTCCG CTCTCAGCACCTCACCGTCTACTATAGCCCCGAGACC (SEQ ID NO: 84)

Portion of CD22 extracellular domain that contains CD22 domains defined as Ig-like C2-type 5, Ig-like C2-type 6:
PRDVRVRKIPLSEIHSGNSVSLQCDFSSSHPKVEQVFFWEKNRLLGKESQLNFDISIPEDAG SYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYT WFDWNQSLPYHSQKLRLEPVKVQHSWAYWCQGTNTSVGKGRSPLSTLVVYSPET (SEQ ID NO: 85)

Portion of CD22 extracellular domain that contains CD22 domains defined as Ig-like C2-type 5, Ig-like C2-type 6 coding sequence:
CCCCGAGACGTGAGGGTCCGGAAATCAAGCCCCTTTCGAGAGTTCACTCTGGAACCTCG GTCAGCTCCAATGTGACTTCTCAAGCAGCCACCCCAAGAAAGTCCAGTCTTCTGGGAGA AAAATGGCAGGCTTCTGGGGAAGAAAGCCAGCTGAATTTTGACTCCATCTCCCCAGAAGA

【 図 1 3 - 1 9 】

SH2B adapter protein dimerization domain
WRFCESSHARAALDFARRFRLYLASHPOYAGPGAEEAFSRRFAELFLQHFEAEVARAS (SEQ ID NO: 100)

SH3 domain that allows homodimerization of IB1
THAIRFRVPRHEDELEVDPLLVELQAEDYVWYEAYNMRTGARGVFPAYYAE (SEQ ID NO: 101)

PTB domain of human DOK-7
LGEVHRFHVTVPAGTKLESGPATLHLCNDVLVLRDIPPAVTGQWKLSLDRRYGAVPSGFIFEG GTRCGYVAGVFFLSAAGEQISFLFDCIVRGISPTKG (SEQ ID NO: 102)

PDZ-like domain of SATB1
DCKEEHAEFLVLRKDMFLNQLIEMALLSLGYSHSSAAQAQGLIQVGKWNVPVLSYVTDAPDAT VADMQLDVYHVVTLLKIQLHSCPKLEDLPPEQWSHTTVRNALKDLLKDMNQSS (SEQ ID NO: 103)

WD40 repeats of APAF
CAPWPMVEKLIKQCLKENPQERPTSAQVFDILNSAELVCLTRILLPKNVIVECMVATHHNSRN ASIWLGCCHTDRGQLSFLDLNTEGYTSEEVADSRILCLALVHPVEKESWVSGTSGTLTVINT EDGKKRHTLEKMTDSVTCLYCNFSFKQSKQKNFLLVGTAAGKLAIFEDKTVLKGAAPLKILNIG NVSTPLMCLSESTNTERNVMWGGCGSQLFSYAAFSDSNITVVVDALYIAKQNSPVVEVVD KKTCLGLLIDCVHFLREVVMVKETKIFSFSDNFTIQKLIETRTNKECHKMSYSGRVNKLCLQKN TALWGTGGGHILLDLSTRRLRVIYVFCNSVVRVMMTAQLGSLKNVMLVLGYNRKNTGKTQK KEIQSCLTVWDINLPHVEQNLEKHIEVRKELAEKMRRTSVE (SEQ ID NO: 104)

PAS motif of the dioxin receptor
DQELKHLILEAADGLFVIESGTGRVYVYSDSVTPVLNQQQSEWFGSTLYDQVHPDDVDKLR EQLSTSENALTGR (SEQ ID NO: 105)

EF hand motif of parvalbumin
LSAKETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES (SEQ ID NO: 106)

FKBP12 domain
MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCWHYTMLEDDGKGFSSRRDNPFKMLGKQEVIRGWEEG VAQMSVGQRAKLTISPDIYAGTAGHPGIIIPHATLVFDVLELLKLE (SEQ ID NO: 107)

FRB segment of mTOR
MASRLWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRD LMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIKLES (SEQ ID NO: 108)

C4b Multimerization Domains
SGRAHAGWETPEGCEQVLTKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIQLELQRDSARQSTLD KELVPR (SEQ ID NO: 109)

KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLIEQKLKVELQGLSKE (SEQ ID NO: 110)

10

20

30

40

50

【 図 1 3 - 2 0 】

ETPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDSARQSTLDKEL
(SEQ ID NO: 111)

WETPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDSARQSTLDKEL
(SEQ ID NO: 112)

CEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDSARQSTLDKEL (SEQ ID NO: 113)

ETPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDSARQYTLDKEL
(SEQ ID NO: 114)

ETPEGCEQVLGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDRARQSTLDKEL
(SEQ ID NO: 115)

ETPEGCEQVLGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDRARQSTWDKEL
(SEQ ID NO: 116)

EVPEGCEQVQAGRRMQCLADPYEVKMALEVYKLSLEIELLELQRDKARKSSVLRQL
(SEQ ID NO: 117)

VYPEGCEHILGKRTMQCLPNPEDVKMALEIYKLSLDIELLELQRDRAKESTVQSPV
(SEQ ID NO: 118)

EVPKDCEHVFAGKRLMQCLPNSNDVKMALEVYKLTLEIKQLQLQIDKAKHVDREL
(SEQ ID NO: 119)

EYPEDCEQVHEGKRLMQCLPNLEEIKLALALEYKLSLETKLELQIDKEKKAKAKYSI
(SEQ ID NO: 120)

EYPEDCEQVHEGKRLMECLPTLEEIKLALALAYKLSLETNLELQIDKEKKAKAKYST
(SEQ ID NO: 121)

EIAEGCEQVLGKRLMQCLPKPEDVRTALEYKLSLEIKQLEKLEKEEKECTPEVQE
(SEQ ID NO: 122)

EYPEGCEQVVTGRKLLQCLSRPEEVKLALEVYKLSLEIEILQTNKLKKEAFLLREREKNVTCDFN
PE (SEQ ID NO: 123)

EYPEGCEQVVTGRKLLKCLSRPEEVKLALEVYKLSLEIALLELQIDKPKDAS (SEQ ID NO: 124)

EVPENECQVVGKRLMKCLSNPDEAQMALQLYKLSLEAELLRLQIVKARQGS (SEQ ID NO: 125)

EASEDLKPALTGKNTMQYVPNSHDVKMALEIYKLTLEVELLQLQIQKEKHTEAH
(SEQ ID NO: 126)

VSAEVCEAVFKGKLLKCLPNAMEVKMALEVYKLSLEIEKLEQEKKRLEIA (SEQ ID NO: 127)

【 配 列 表 】

2025508371000001.xml

【 図 1 3 - 2 1 】

EVPEECKQVAAGRKLECLPNPSDVKMALEVYKLSLEIEQLEKEKYVKIQEKFSKKEMKQLTSA
LH (SEQ ID NO: 128)

EVLEDCEIVSRGAQLLHCLSSPEDVHRALKVYKLFLEIERLEHQKEKWQLHRKPQSMK
(SEQ ID NO: 129)

EGPEDCEIVNKGKRLQCLSSPEDVQRALEVYKLSLEIERLEQQREKRTSVHRKAHYTKVDGP
(SEQ ID NO: 130)

EAPEGCEQVLTGKRLMQCLPSPEDVKVALEVYKLSLEIKQLEKERDKLMNTHQKFSEKEEMKD
LFFP (SEQ ID NO: 131)

EVPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIELLELQIDKARQGS (SEQ ID NO: 132)

GCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDSARQS (SEQ ID NO: 133)

ETPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDSARQS (SEQ ID NO: 134)

GSEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDSARQSTLDKEL
(SEQ ID NO: 135)

ETPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEIYKLTLEIEQLELQRDSARQSTLDKEL
(SEQ ID NO: 136)

ETPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEIYKLSLEIKQLELQRDSARQSTLDKEL
(SEQ ID NO: 137)

EGCEQILTGRKRLMQCLPDPEDVKMALEIYKLSLEIKQLELQRDRARQSTL (SEQ ID NO: 138)

ETPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIKQLELQRDRARQSTLDKEL
(SEQ ID NO: 139)

EGCEQILTGRKRLMQCLPNPEDVKMALEIYKLSLEIEQLELQRDRARQSTLKD (SEQ ID NO: 140)

WETPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDSARQSTLDKELVPR
(SEQ ID NO: 141)

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/62428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C07K 16/40 (2023.01)

ADD. A61K 35/17, A61P 35/00, C12N 15/62 (2023.01)

CPC - INV. A61K 39/0011, C12N 5/0636

ADD. A61K 39/001193, C07K 14/7151

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	US 2021/0277148 A1 (AMGEN INC.) 9 September 2021 (09.09.2021) Abstract; Claim 1; Claim 2; para [0006]; [0009-0010]; [0039]; [0055]; [0058]; [0062]; [0076]; [0091]	3, 5, 14-17, 22-23, 32, 37, 42, 44-47, 53/3 4, 6-9, 18-20, 24-29, 33-34, 43, 48-52 10-13, 21, 30-31, 35-36, 38-41
Y	US 2021/0145882 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER et al.) 20 May 2021 (20.05.2021) Abstract; Claim 1; Claim 13; para [0004]; [0066]; [0082]; [0177]	1-2, 53/1
Y	DANILA et al., Phase I Study of DSTP3086S, an Antibody-Drug Conjugate Targeting Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 1, in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer, J Clin Oncol, 5 Nov 2019, Vol. 37, No.36, p3518-3527. Abstract; p3518, col 2, last para; p3524, col 2, para 1	1-2, 4, 53/1
Y	WO 2008/052187 A2 (GENENTECH, INC.) 2 May 2008 (02.05.2008) Abstract; Claim 3; Claim 5; SEQ ID NO 6; SEQ ID NO 10	6-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 2023

Date of mailing of the international search report

AUG 31 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/62428

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	WO 2014/165818 A2 (T CELL THERAPEUTICS, INC.) 9 October 2014 (09.10.2014) Claim 68; para [0101]; SEQ ID NO 2; SEQ ID NO 34	8-9 — 12-13
Y	WO 2020/160050 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 6 August 2020 (06.08.2020) para [0068]; SEQ ID NO 194	18-19
Y — A	WO 2020/163682 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 13 August 2020 (13.08.2020) Claim 15; SEQ ID NO 15	20 — 21
Y	WO 2017/066481 A1 (CITY OF HOPE) 20 April 2017 (20.04.2017) Claim 16; SEQ ID NO 45	24-25
Y	US 2019/0161520 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 30 May 2019 (30.05.2019) Claim 1; SEQ ID NO 20	26-27
Y	WO 2012/079000 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 14 June 2012 (14.06.2012) p33, ln 20-23; SEQ ID NO 23	28-29
Y	US 2016/158359 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 9 June 2016 (09.06.2016) Table 5; SEQ ID NO:135	33-34
Y — A	WO 2019/246593 A2 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 26 December 2019 (26.12.2019) Claim 7; para [0038]; SEQ ID NO 157	43 — 38-39
Y	WO 2011/056894 A2 (JENSEN) 12 May 2011 (12.05.2011) Abstract; Claim 5; SEQ ID NO:3; para [0019]; SEQ ID NO 1	48-52
A	WO 2017/186928 A1 (CUREVAC AG) 2 November 2017 (02.11.2017) Claim 1; SEQ ID NO 39128; SEQ ID NO 23843	10-11
A	WO 2021/009694 A1 (NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE) 21 January 2021 (21.01.2021) para [00133]; SEQ ID NO: 39	30-31
A	WO 2015/086551 A2 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER et al.,) 7 May 2015 (07.05.2015) SEQ ID NO 14	35-36
A	GenBank Accession No. GU235986, Synthetic construct clone 01 anti-Elmeria acervulina merozoite immunoglobulin single-chain variable fragment gene, partial cds, 25 July 2016 [online]. [Retrieved on 21 July 2023]. Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU235986 > Entire document	40-41

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/62428

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

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

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/62428

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

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

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

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

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

—Please see continuation in first extra sheet —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-53, limited to SEQ ID NOs:22, 24, 27, 30, 33, 37

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/62428

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

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

Group I+, Claims 1-53, directed to a STEAP1-binding chimeric antigen receptor (CAR). The CAR will be searched to the extent that the CAR encompasses a CD3 signaling domain of SEQ ID NO: 24, encoded by SEQ ID NO:22, 4-1BB signaling domain of SEQ ID NO:30, encoded by SEQ ID NO:27, CD28 transmembrane domain of SEQ ID NO:37, encoded by SEQ ID NO:33 (note, these are the first claimed sequences for the inventive CAR). The first named invention was determined based on the first claimed CD3 (claims 24 and 26), 4-1BB (claims 28 and 30), and CD28 (claims 33 and 35) sequences for the inventive method antibody embodiment. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-53 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the CAR encompasses a CD3 signaling domain of SEQ ID NO: 24, encoded by SEQ ID NO:22, 4-1BB signaling domain of SEQ ID NO:30, encoded by SEQ ID NO:27, CD28 transmembrane domain of SEQ ID NO:37, encoded by SEQ ID NO:33. Additional CAR polypeptide(s) with additional CD3, 4-1BB and/or CD28 amino acid and/or encoding sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected CAR polypeptide(s) with additional CD3, 4-1BB and/or CD28 amino acid and/or encoding sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "*" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a CAR comprising a CD3 signaling domain of SEQ ID NO: 25, encoded by SEQ ID NO:23, 4-1BB signaling domain of SEQ ID NO:30, encoded by SEQ ID NO:27, CD28 transmembrane domain of SEQ ID NO:37, encoded by SEQ ID NO:33 (claims 1-53).

Group II, claims 54-57, directed to a genetic construct encoding a STEAP1-binding CAR.

Group III, claims 58-71, directed to a cell genetically modified to express a STEAP1-binding CAR, and a population of said cells.

Group IV, claims 72-87, directed to a method of treating a subject with a STEAP1-related disorder and providing an immune response against STEAP1-expressing cells in a subject.

The inventions listed as Groups I+, II, III and IV do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Groups I+ each include the special technical feature of a unique amino acid and/or nucleic acid sequence. Each nucleic acid sequence encodes a unique peptide, and is considered a distinct technical feature. Each amino acid sequence comprises a unique peptide, and is considered a distinct technical feature.

Additionally,

Group I+ has the special technical feature of a STEAP1-binding chimeric antigen receptor (CAR), that is not required by Groups II-IV. Group II has the special technical feature of a genetic construct encoding a STEAP1-binding CAR, that is not required by Groups I+, III and IV.

Group III has the special technical feature of a cell genetically modified to express a STEAP1-binding CAR, and a population of said cells, that is not required by Groups I+, II and IV.

Group IV has the special technical feature of a method of treating a subject with a STEAP1-related disorder and providing an immune response against STEAP1-expressing cells in a subject, that is not required by Groups I+, II and III.

Common technical features

No technical features are shared between the CD3, 4-1BB and CD28 amino acid sequences in each of Group I+ inventions and, accordingly, these inventions lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+, II, III and IV were considered to share the technical features of including:

a chimeric antigen receptor (CAR) comprising, when expressed by a cell,

an extracellular component comprising a STEAP1 binding domain;

an intracellular component comprising an effector domain; and

a transmembrane domain linking the extracellular component to the intracellular component,

these shared technical features are previously disclosed by US 2021/0277148 A1 to Amgen Inc., (hereinafter 'Amgen').

—please see continuation on next sheet —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/62428

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

—continued from previous sheet—

Amgen teaches a chimeric antigen receptor (CAR) comprising, when expressed by a cell, an extracellular component comprising a STEAP1 binding domain; an intracellular component comprising an effector domain; and a transmembrane domain linking the extracellular component to the intracellular component (Abstract - 'Antigen binding molecules, chimeric receptors, and engineered immune cells to STEAP1 are disclosed in accordance with the invention. The invention further relates to vectors, compositions, and methods of treatment and/or detection using the STEAP1 antigen binding molecules and engineered immune cells.'; Claim 1 - 'A chimeric antigen receptor comprising: (i) an antigen binding molecule that specifically binds to STEAP1, wherein the antigen binding molecule comprises: a) a variable heavy chain CDR1 comprising an amino acid sequence'; para [0009] - 'In other embodiments, the chimeric antigen receptor further comprises at least one costimulatory domain. In further embodiments, the chimeric antigen receptor further comprises at least one activating domain.'; para [0010] - 'In certain embodiments the costimulatory domain is a signalling region of CD28.'; para [0039] - 'The nucleotide sequence of the CD28T molecule, including the extracellular CD28T domain, and the CD28 transmembrane and intracellular domains is set forth in SEQ ID NO:1'; para [0055] - 'CD3 is an element of the T cell receptor on native T cells, and has been shown to be an important intracellular activating element in CARs. In a preferred embodiment, the CD3 is CD3 zeta, the nucleotide sequence of which is set forth in SEQ ID NO:9').

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+, II, III and IV inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 P	13/08 (2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	35/15 (2025.01)	A 6 1 K	35/15	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	40/00 (2025.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K	40/11 (2025.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	40/13 (2025.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 0 7 K	16/32 (2006.01)	A 6 1 K	40/00	
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	A 6 1 K	40/11	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	A 6 1 K	40/13	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 0 7 K	16/32	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N	5/078 (2010.01)	C 1 2 N	15/12	
		C 1 2 N	15/13	
		C 1 2 N	15/63	Z
		C 1 2 N	5/078	

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

弁理士 岩谷 龍

(72)発明者 リー, ジョン ケー.

アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0

(72)発明者 パリヴァ, ティファニー

アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0

F ターム (参考)

4B065 AA90X AB01 AC14 BA01 BA02 CA24 CA25 CA44
 4C084 AA13 MA66 NA06 NA14 ZA811 ZA812 ZB261 ZB262
 4C085 AA13 AA14 CC22 CC23 DD62 EE01 GG01 GG02 GG04 GG05
 GG06
 4C087 AA01 AA02 BB43 BB65 MA66 NA05 NA14 ZA81 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20
 FA74