(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-515995
(P2025-515995A)
(43)公表日　令和7年5月23日(2025.5.23)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	ZNA	4B065
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13		4C076
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z	4C084
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00		4C085
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00		4C087

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全88頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-560356(P2024-560356)
(86)(22)出願日　令和5年4月13日(2023.4.13)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月3日(2024.12.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/065710
(87)国際公開番号　WO2023/201288
(87)国際公開日　令和5年10月19日(2023.10.19)
(31)優先権主張番号　63/331,758
(32)優先日　令和4年4月15日(2022.4.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/341,995
(32)優先日　令和4年5月13日(2022.5.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　592017633
ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイション
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フルーツ ストリート ５５
(74)代理人　110002077
園田・小林弁理士法人
(72)発明者　マウス， マルセラ ヴィー．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， リッチモンド サークル １６
(72)発明者　レイク， マーク
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１１４， ボストン， フルーツ ストリート ５５
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＤ３３結合Ｔ細胞エンゲージ抗体分子を含むＣＤ７０結合ＣＡＲ－Ｔ細胞

(57)【要約】
本開示は、ＣＤ７０に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、ＣＤ３３に結合するＴ細胞エンゲージ抗体分子（ＴＥＡＭ）とを含む細胞を特徴とするがんを治療するための方法及び組成物、ＣＤ７０に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）及び／又はＣＤ３３に結合するＴＥＡＭをコードする核酸分子、並びにそれらに関連する組成物及び方法に関する。
【選択図】図１

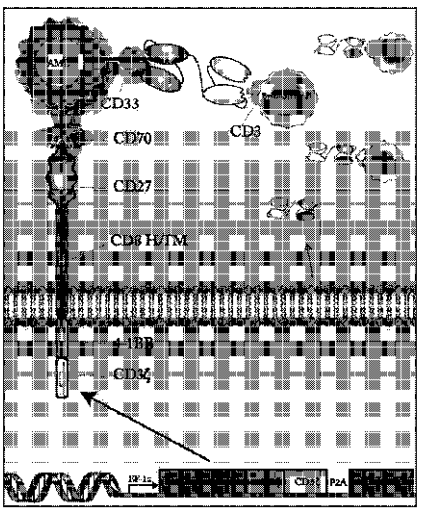


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＣＤ７０に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、ＣＤ３３に結合するＴ細胞エンゲージ抗体分子（ＴＥＡＭ）とを含む細胞。
【請求項２】
免疫細胞である、請求項１に記載の細胞。
【請求項３】
免疫細胞が、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞、骨髄系由来サプレッサー細胞、間葉系幹細胞、それらの前駆体、又は組み合わせである、請求項２に記載の細胞。
【請求項４】
免疫細胞がＴ細胞である、請求項３に記載の細胞。
【請求項５】
対象、任意選択的にヒト対象から採取される、請求項１から４の何れか一項に記載の細胞。
【請求項６】
ＣＡＲが、
（ｉ）ＣＤ７０に結合するポリペプチドを含む細胞外標的結合ドメイン；
（ｉｉ）膜貫通ドメイン；及び
（ｉｉｉ）細胞内シグナル伝達ドメイン
を含む、請求項１から５の何れか一項に記載の細胞。
【請求項７】
細胞外標的結合ドメインが、ＣＤ２７のＣＤ７０結合ドメインを含む、請求項６に記載の細胞。
【請求項８】
細胞外標的結合ドメインが、ＣＤ２７の細胞外ドメインを含む、請求項７に記載の細胞。
【請求項９】
細胞外標的結合ドメインが、配列番号：１、８、又は９の何れか一つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項８に記載の細胞。
【請求項１０】
細胞外標的結合ドメインが、配列番号：１、８、又は９の何れか一つのアミノ酸配列を含む、請求項９に記載の細胞。
【請求項１１】
細胞外標的結合ドメインが、抗ＣＤ７０抗体、任意選択的にｓｃＦｖを含む、請求項６に記載の細胞。
【請求項１２】
膜貫通ドメインが、ＣＤ２７の膜貫通ドメインである、請求項６から１１の何れか一項に記載の細胞。
【請求項１３】
細胞内シグナル伝達ドメインが、（ｉ）ＩＴＡＭ含有シグナル伝達ドメイン及び／又は（ｉｉ）一つ若しくは複数の共刺激タンパク質若しくはサイトカイン受容体由来の一つ若しくは複数のシグナル伝達ドメインを含む、請求項６から１２の何れか一項に記載の細胞。
【請求項１４】
細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３γ、ＣＤ３ε、ＣＤ３δ、又はＣＤ３ζドメインを含む、請求項１３に記載の細胞。
【請求項１５】
細胞内シグナル伝達ドメインがＣＤ３ζドメインを含む、請求項１４に記載の細胞。
【請求項１６】

共刺激ドメインが、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、２Ｂ４、ＫＩＲ、ＯＸ４０、ＩＣＯＳ、ＭＹＤ８８、ＩＬ２受容体、又はＳｙｎＮｏｔｃｈドメインを含む、請求項６から１５の何れか一項に記載の細胞。

【請求項１７】

共刺激ドメインが４－１ＢＢドメインを含む、請求項１６に記載の細胞。

【請求項１８】

細胞外標的結合ドメインがシグナルペプチドを更に含み、任意選択的にシグナルペプチドがＣＤ２７シグナルペプチドを含む、請求項１から１７の何れか一項に記載の細胞。

【請求項１９】

ＣＡＲが、配列番号：２～７の何れか一つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から１８の何れか一項に記載の細胞。

【請求項２０】

ＣＡＲが、配列番号：２～７の何れか一つのアミノ酸配列を含む、請求項１から１９の何れか一項に記載の細胞。

【請求項２１】

ＴＥＡＭが、抗ＣＤ３３抗体又はその機能的断片を含む、請求項１から２０の何れか一項に記載の細胞。

【請求項２２】

抗ＣＤ３３抗体が、断片抗原結合領域（Ｆａｂ領域）、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ナノボディ又はモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項２１に記載の細胞。

【請求項２３】

抗ＣＤ３３抗体がｓｃＦｖである、請求項２１又は請求項２２に記載の細胞。

【請求項２４】

抗ＣＤ３３抗体が、配列番号：２０のアミノ酸配列を有するＶＨドメイン及び／又は配列番号：１９のアミノ酸配列を有するＶＬドメインを含む、請求項２１から２３の何れか一項に記載の細胞。

【請求項２５】

ＶＨドメインがＶＬドメインのＮ末端にある、請求項２４に記載の細胞。

【請求項２６】

ＶＬドメインがＶＨドメインのＮ末端にある、請求項２４に記載の細胞。

【請求項２７】

ＴＥＡＭが免疫細胞結合部分を含み、任意選択的に免疫細胞結合部分が、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＸＣＲ３、ＣＣＲ４、ＧＡＲＰ、ＬＡＰ、ＣＤ２５、ＣＴＬＡ－４、又はＣＤ１６に結合する、請求項１から２６の何れか一項に記載の細胞。

【請求項２８】

免疫細胞結合部分が、断片抗原結合領域（Ｆａｂ領域）、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ナノボディ又はモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項２７に記載の細胞。

【請求項２９】

免疫細胞結合部分が抗ＣＤ３　ｓｃＦｖである、請求項２７又は請求項２８に記載の細胞。

【請求項３０】

ＴＥＡＭが、抗ＣＤ３３抗体と免疫細胞結合部分の間にリンカーを含む、請求項２７から２９の何れか一項に記載の細胞。

【請求項３１】

リンカーが非切断性リンカー、任意選択的に（ＧＧＧＧＳ）３（配列番号：２７）リンカーである、請求項３０に記載の細胞。

【請求項３２】

ＴＥＡＭが、分泌タグ、任意選択的にＩｇＫ分泌タグを更に含む、請求項１から３１の

何れか一項に記載の細胞。
【請求項３３】
ＴＥＡＭが、配列番号：１７～１８の何れか一つと少なくとも８５％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１から３２の何れか一項に記載の細胞。
【請求項３４】
配列番号：１７～１８の何れか一つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド分子を含む、請求項１から３３の何れか一項に記載の細胞。
【請求項３５】
ＴＥＡＭをコードする核酸配列がコドン最適化されている、請求項１から３４の何れか一項に記載の細胞。
【請求項３６】
ＣＡＲをコードする核酸配列を含む第一のポリヌクレオチド分子と、ＴＥＡＭをコードする核酸配列を含む第二のポリヌクレオチド分子とを含む、請求項１から３５の何れか一項に記載の細胞。
【請求項３７】
ＣＡＲをコードする核酸配列とＴＥＡＭをコードする核酸配列とを含むポリヌクレオチド分子を含む、請求項１から３５の何れか一項に記載の細胞。
【請求項３８】
ポリヌクレオチド分子が、ＣＡＲをコードする核酸配列とＴＥＡＭをコードする核酸配列との間のリンカーをコードする核酸配列を更に含み、任意選択的にリンカーが切断性リンカーである、請求項３７に記載の細胞。
【請求項３９】
切断性リンカーが自己切断可能であり、任意選択的にＰ２Ａ、Ｅ２Ａ、Ｆ２Ａ、又はＴ２Ａ自己切断性リンカーである、請求項３８に記載の細胞。
【請求項４０】
切断性リンカーがプロテアーゼモチーフを含む、請求項３７に記載の細胞。
【請求項４１】
リンカーが配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む、請求項３８に記載の細胞。
【請求項４２】
ポリヌクレオチド分子が、ＣＡＲをコードする核酸配列とＴＥＡＭをコードする核酸配列に作用可能に連結されたプロモーターを含む、請求項３４から４１の何れか一項に記載の細胞。
【請求項４３】
プロモーターが構成的に活性なプロモーターである、請求項４２に記載の細胞。
【請求項４４】
プロモーターがＥＦ１アルファプロモーターである、請求項４３に記載の細胞。
【請求項４５】
ポリヌクレオチド分子のセンス鎖が、５’から３’にかけて、ＣＡＲをコードする核酸配列、リンカー、及びＴＥＡＭをコードする核酸配列を含む、請求項３９から４４の何れか一項に記載の細胞。
【請求項４６】
ポリヌクレオチド分子のセンス鎖が、５’から３’にかけて、ＴＥＡＭをコードする核酸配列、リンカー、及びＣＡＲをコードする核酸配列を含む、請求項３９から４４の何れか一項に記載の細胞。
【請求項４７】
ポリヌクレオチド分子が、配列番号：２２～２５の何れか一つと少なくとも８５％同一であるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、請求項３４から４６の何れか一項に記載の細胞。
【請求項４８】
請求項３７から４４の何れか一項に記載のＣＡＲとＴＥＡＭをコードする核酸配列を含

むポリヌクレオチド。
【請求項４９】
請求項１から４７の何れか一項に記載のＣＡＲとＴＥＡＭを含むポリペプチド。
【請求項５０】
請求項１から４７の何れか一項に記載の細胞を対象に投与することを含む方法。
【請求項５１】
ＣＤ７０を発現するがん細胞を特徴とするがんの治療方法であって、請求項１から４７の何れか一項に記載の細胞の有効量を、治療を必要とする対象に投与することを含む、方法。
【請求項５２】
ＣＤ７０とＣＤ３３を発現するがん細胞を特徴とするがんの治療方法であって、請求項１から４７の何れか一項に記載の細胞の有効量を、治療を必要とする対象に投与することを含む、方法。
【請求項５３】
ＣＤ３３を発現するがん細胞を特徴とするがんの治療方法であって、請求項１から４７の何れか一項に記載の細胞の有効量を、治療を必要とする対象に投与することを含む、方法。
【請求項５４】
ＣＤ７０の発現が減少したがん細胞を特徴とするがんの治療方法であって、請求項１から４７の何れか一項に記載の細胞の有効量を、治療を必要とする対象に投与することを含む、方法。
【請求項５５】
対象がヒトである、請求項５０から５４の何れか一項に記載の方法。
【請求項５６】
投与が注入を含む、請求項５０から５５の何れか一項に記載の方法。
【請求項５７】
がんが血液がんである、請求項５１から５６の何れか一項に記載の方法。
【請求項５８】
がんが骨髄がんである、請求項５１から５７の何れか一項に記載の方法。
【請求項５９】
がんが急性骨髄性白血病である、請求項５１から５８の何れか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
[関連出願]
この出願は、それぞれの内容全体が出典明示によりここに援用される、２０２２年４月１５日出願の米国仮出願第６３／３３１７５８号及び２０２２年５月１３日出願の米国仮出願第６３／３４１９９５号に対して米国特許法第１１９条（ｅ）項に基づく利益を主張する。
【０００２】
[政府の資金提供]
この発明は、国立衛生研究所から授与された助成金番号５Ｒ０１ＣＡ２３８２６８－０３に基づく政府支援を受けてなされた。政府は、本発明に所定の権利を有する。
【背景技術】
【０００３】
キメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ）は、所定の血液悪性腫瘍に非常に効果的であった。ＴＮＦ－αファミリーメンバーＣＤ７０は、ＡＭＬにおける有望な表面標的抗原として現れた。しかし、抗原特異的がん治療後に抗原エスケープが起こり、抗原陰性がんの再発につながる可能性がある。
【発明の概要】

【０００４】
本開示は、ＣＤ７０を発現する細胞と任意選択的にＣＤ７０の発現レベルが低い細胞又はＣＤ７０を発現しない細胞を特徴とするがん（例えば、抗ＣＤ７０治療に応答してＣＤ７０発現細胞をもはや特徴としないがん（例えば、ＣＤ７０抗原エスケープ））を治療するための方法及び組成物に関する。本開示は、部分的には、そのような抗原エスケープを克服する組成物及び方法に関する。本開示は、ＣＤ７０ ＣＡＲ Ｔ細胞がＴ細胞エンゲージ抗体分子（ＴＥＡＭ）を発現し分泌するように操作される二重標的化戦略を提供する。幾つかの実施態様では、ＴＥＡＭはがん結合部分（例えば、抗ＣＤ３３抗体）と免疫細胞結合部分（例えば、抗ＣＤ３抗体）を含む。理論に縛られることは望まないが、ＴＥＡＭは、ＣＤ７０ ＣＡＲ発現とは無関係に、ＣＡＲ－Ｔ細胞又はバイスタンダー細胞を標的がん細胞（例えば、ＣＤ３３を発現するがん細胞）又は骨髄由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）（例えば、ＣＤ３３を発現するＭＤＳＣ）に結合するように指示しうる。

【０００５】
従って、一態様では、本開示は、ＣＤ７０に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、ＣＤ３３に結合するＴ細胞エンゲージ抗体分子（ＴＥＡＭ）とを含む細胞に関する。幾つかの実施態様では、細胞は免疫細胞である。幾つかの実施態様では、免疫細胞は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞、骨髄系由来サプレッサー細胞、間葉系幹細胞、それらの前駆体、又は組み合わせである。幾つかの実施態様では、免疫細胞はＴ細胞である。幾つかの実施態様では、細胞は、対象、任意選択的にヒト対象から採取される。

【０００６】
幾つかの実施態様では、ＣＡＲは、（ｉ）ＣＤ７０に結合するポリペプチドを含む細胞外標的結合ドメイン；（ｉｉ）膜貫通ドメイン；及び（ｉｉｉ）細胞内シグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施態様では、細胞外標的結合ドメインは、ＣＤ２７のＣＤ７０結合ドメインを含む。幾つかの実施態様では、細胞外標的結合ドメインは、ＣＤ２７の細胞外ドメインを含む。幾つかの実施態様では、細胞外標的結合ドメインは、配列番号：１、８、又は９の何れか一つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、細胞外標的結合ドメインは、配列番号：１、８、又は９の何れか一つのアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、細胞外標的結合ドメインは、抗ＣＤ７０抗体、任意選択的にｓｃＦｖを含む。幾つかの実施態様では、膜貫通ドメインは、ＣＤ２７の膜貫通ドメインである。幾つかの実施態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、（ｉ）ＩＴＡＭ含有シグナル伝達ドメイン及び／又は（ｉｉ）一つ若しくは複数の共刺激タンパク質若しくはサイトカイン受容体由来の一つ若しくは複数のシグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３γ、ＣＤ３ε、ＣＤ３δ、又はＣＤ３ζドメインを含む。幾つかの実施態様では、細胞内シグナル伝達ドメインはＣＤ３ζドメインを含む。幾つかの実施態様では、共刺激ドメインは、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、２Ｂ４、ＫＩＲ、ＯＸ４０、ＩＣＯＳ、ＭＹＤ８８、ＩＬ２受容体、又はＳｙｎＮｏｔｃｈドメインを含む。幾つかの実施態様では、共刺激ドメインは４－１ＢＢドメインを含む。幾つかの実施態様では、細胞外標的結合ドメインはシグナルペプチドを更に含む。幾つかの実施態様では、シグナルペプチドはＣＤ２７シグナルペプチドを含む。幾つかの実施態様では、ＣＡＲは、配列番号：２～７の何れか一つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ＣＡＲは、配列番号：２～７の何れか一つのアミノ酸配列を含む。

【０００７】
幾つかの実施態様では、ＴＥＡＭは、抗ＣＤ３３抗体又はその機能的断片（例えば、抗ＣＤ３３抗体のＶＨ及び／又はＶＬドメイン）を含む。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３３抗体は、断片抗原結合領域（Ｆａｂ領域）、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ナノボディ又はモノクローナル抗体からなる群から選択される。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３３抗体はｓｃＦｖである。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３３抗体は、配列番号：２０のアミノ酸配列を有するＶＨドメイン及び／又は配列番号：１９のアミノ酸配列

を有するＶＬドメインを含む。幾つかの実施態様では、ＶＨドメインはＶＬドメインのＮ末端にある。幾つかの実施態様では、ＶＬドメインはＶＨドメインのＮ末端にある。幾つかの実施態様では、ＴＥＡＭは免疫細胞結合部分を含む。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＸＣＲ３、ＣＣＲ４、ＧＡＲＰ、ＬＡＰ、ＣＤ２５、ＣＴＬＡ－４、又はＣＤ１６に結合する。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は、断片抗原結合領域（Ｆａｂ領域）、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ナノボディ又はモノクローナル抗体からなる群から選択される。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は抗ＣＤ３ ｓｃＦｖである。幾つかの実施態様では、ＴＥＡＭは、抗ＣＤ３３抗体と免疫細胞結合部分の間にリンカーを含む。幾つかの実施態様では、リンカーは非切断性リンカー、任意選択的に（ＧＧＧＧＳ）３（配列番号：２７）リンカーである。幾つかの実施態様では、ＴＥＡＭは、分泌タグ、任意選択的にＩｇＫ分泌タグを更に含む。幾つかの実施態様では、ＴＥＡＭは、配列番号：１７～１８の何れか一つと少なくとも８５％同一であるアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、細胞は、配列番号：１７～１８の何れか一つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド分子を含む。幾つかの実施態様では、ＴＥＡＭをコードする核酸配列はコドン最適化されている。

【０００８】

幾つかの実施態様では、細胞は、ＣＡＲをコードする核酸配列を含む第一のポリヌクレオチド分子と、ＴＥＡＭをコードする核酸配列を含む第二のポリヌクレオチド分子とを含む。幾つかの実施態様では、細胞は、ＣＡＲをコードする核酸配列とＴＥＡＭをコードする核酸配列とを含むポリヌクレオチド分子を含む。幾つかの実施態様では、ポリヌクレオチド分子は、ＣＡＲをコードする核酸配列とＴＥＡＭをコードする核酸配列との間のリンカーをコードする核酸配列を更に含み、任意選択的にリンカーは切断性リンカーである。幾つかの実施態様では、切断性リンカーは自己切断可能であり、任意選択的にＰ２Ａ、Ｅ２Ａ、Ｆ２Ａ、又はＴ２Ａ自己切断性リンカーである。幾つかの実施態様では、切断性リンカーはプロテアーゼモチーフを含む。幾つかの実施態様では、リンカーは配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む。幾つかの実施態様では、ポリヌクレオチド分子は、ＣＡＲをコードする核酸配列とＴＥＡＭをコードする核酸配列に作用可能に連結されたプロモーターを含む。幾つかの実施態様では、プロモーターは構成的に活性なプロモーターである。幾つかの実施態様では、プロモーターはＥＦ１アルファプロモーターである。

【０００９】

幾つかの実施態様では、ポリヌクレオチド分子のセンス鎖は、５’から３’にかけて、ＣＡＲをコードする核酸配列、リンカー、及びＴＥＡＭをコードする核酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ポリヌクレオチド分子のセンス鎖は、５’から３’にかけて、ＴＥＡＭをコードする核酸配列、リンカー、及びＣＡＲをコードする核酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ポリヌクレオチド分子は、配列番号：２２～２５の何れか一つと少なくとも８５％同一であるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。

【００１０】

幾つかの態様では、本開示は、ここに記載のＣＡＲとＴＥＡＭをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドに関する。幾つかの態様では、本開示は、ここに記載のＣＡＲとＴＥＡＭを含む細胞に関する。

【００１１】

幾つかの態様では、本開示は、ここに記載の細胞を対象に投与することを含む方法に関する。幾つかの態様では、本開示は、ＣＤ７０を発現するがん細胞を特徴とするがんの治療方法であって、ここに記載の細胞の有効量を、治療を必要とする対象に投与することを含む、方法に関する。幾つかの態様では、本開示は、ＣＤ７０とＣＤ３３を発現するがん細胞を特徴とするがんの治療方法であって、ここに記載の細胞の有効量を、治療を必要とする対象に投与することを含む、方法に関する。

【００１２】

幾つかの態様では、本開示は、ＣＤ３３を発現するがん細胞を特徴とするがんの治療方

法であって、ここに記載の細胞の有効量を、治療を必要とする対象に投与することを含む、方法に関する。

【００１３】

幾つかの態様では、本開示は、ＣＤ７０の発現が減少したがん細胞を特徴とするがんの治療方法であって、ここに記載の細胞の有効量を、治療を必要とする対象に投与することを含む、方法に関する。

【００１４】

幾つかの実施態様では、対象はヒトである。幾つかの実施態様では、投与は注入を含む。幾つかの実施態様では、がんは血液がんである。幾つかの実施態様では、がんは骨髄がんである。幾つかの実施態様では、がんは急性骨髄性白血病である。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

次の図面は本明細書の一部を構成し、本開示の所定の態様を更に実証するために含められており、ここに提示される特定の実施態様の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の一つ又は複数を参照することにより、よりよく理解されうる。

【００１６】

【図１】図１は、ＣＤ３３－ＣＤ３二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（又はＴ細胞エンゲージ抗体分子（ＴＥＡＭ））を分泌するｔｒＣＤ２７－ＣＤ８Ｈ／ＴＭ ＣＡＲの図を示している。ＣＤ２７ ＣＡＲは急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）に結合でき、ＣＤ３３ ＴＥＡＭはバイスタンダーＴ細胞をＡＭＬ細胞にエンゲージさせうる。

【図２】図２は、ＡＭＬ ＰＤＸにおけるＣＤ７０標的ＣＡＲ治療後のＣＤ７０低再発性を示すフローサイトメトリーデータのグラフを示している。ＮＳＧマウスに、－４日目に５×１０^{6}個のＤＦＡＭ６８５５５ ＡＭＬ患者由来異種移植細胞が移植された。０日目に、マウスには２×１０^{6}個のｔｒＣＤ２７ＣＤ８Ｈ／ＴＭ改変ＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞が投与された。殆どのｔｒＣＤ８Ｈ／ＴＭ改変マウスでは腫瘍が除去されたが、一部のマウスではＣＤ７０低腫瘍が再発した。

【図３Ａ】図３Ａ～３Ｃは、ＡＭＬにおけるコンビナトリアルＣＡＲターゲットとしてのＣＤ３３とＣＤ７０のペア発現を示している。図３Ａは、血液中のＣＤ３３とＣＤ７０の共発現を示している。

【図３Ｂ】図３Ｂは、原発ＡＭＬサンプルにおけるＣＤ３３とＣＤ７０の単独発現及び共発現を示している。

【図３Ｃ】図３Ｃは、ＡＭＬ細胞におけるＣＤ３３＋ＣＤ７０抗原ペアの共発現を、正常ＢＭ ＨＳＣ及びＴ細胞と比較したものである。

【図４】図４は、ＣＡＲ^{ＴＥＡＭ}の推定上の利点を示す概略図である。ＣＡＲ^{ＴＥＡＭ}細胞は、迅速な腎クリアランスを示し、肝細胞を温存し、肝毒性が減少する。

【図５Ａ】図５Ａ～５Ｅは、例示的ＣＡＲ及びＴＥＡＭの図と、ＴＥＡＭがＣＡＲ－Ｔ細胞によって分泌され、適切な標的抗原に結合することを証明するグラフを示している。［図５Ａ］ｔｒＣＤ２７ ＣＡＲ及び／又はＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトの構造。

【図５Ｂ】活性型Ｔ細胞の健康なドナーＴ細胞の形質導入効率（ｎ＝３の異なる健康なドナー、少なくとも２つの別々の実験を表す）。

【図５Ｃ】示された細胞（行）からの上清を、示された細胞型（列）に添加し、抗Ｈｉｓタグ（ＴＥＡＭ）結合について評価した。

【図５Ｄ】示されたコンストラクトを形質導入したジャーカットＴ細胞からの上清を、プレート結合Ｍｏｌｍ１３腫瘍細胞並びに抗ＨｉｓタグＡＦ６４７抗体（レッド）と共にインキュベートした。蛍光強度をインキュサイトで測定し、代表的な画像を示す。

【図５Ｅ】示されたコンストラクトを形質導入したジャーカットＴ細胞の上清を、Ｍｏｌｍ１３腫瘍細胞及び未形質導入（ＵＴＤ）の健康な初代ヒトＴ細胞及び抗ＣＤ６９抗体と共培養した。ＣＤ６９を発現する細胞の経時的なパーセントを示す。ＰＭＡ＝ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート陽性対照。

【図６】図６は、ＣＡＲ－Ｔ細胞及びＴＥＡＭの作用の図と、ＣＤ３３ ＴＥＡＭがＵＴ

Ｄ駆動の標的依存性細胞傷害を媒介することを示すグラフを示している。ｔｒＣＤ２７ＣＡＲ－ＣＤ３３－ＴＥＡＭ又はｔｒＣＤ２７－ＣＤ１９－ＴＥＡＭコンストラクトを形質導入した細胞、又は未形質導入Ｔ細胞（ＵＴＤ）を、トランスウェルインサートの上部に添加した。未形質導入Ｔ細胞を、Ｍｏｌｍ１３ＷＴ又はＭｏｌｍ１３ＣＤ３３－細胞と共にトランスウェルインサートの底部に添加した。ｔｒＣＤ２７－ＣＡＲ－ＣＤ３３－ＴＥＡＭコンストラクトのみがＭｏｌｍ１３ＷＴ細胞のクリアランスを媒介することができたが、これは標的依存性であり、ＣＤ３３の喪失で抑制された。

【図７Ａ】図７Ａ～７Ｂは、ＣＡＲとＴＥＡＭによる同時のＴ細胞リダイレクトが異種腫瘍に対して有効であり、個々のＣＡＲの混合物よりも優れていることを示すグラフと顕微鏡写真を示している。［図７Ａ］個別に標的化されたＣＤ７０又はＣＤ３３ ＣＡＲ－Ｔ細胞を、異なるレベルのＣＤ７０又はＣＤ３３（左）を用いてＡＭＬ標的に対してＣＤ７０ＣＡＲＣＤ３３ＴＥＡＭ又はＣＤ７０ＣＡＲＣＤ１９ＴＥＡＭと比較した。ＣＤ７０ＣＡＲＣＤ３３ＴＥＡＭ細胞は、インキュサイトでのリアルタイム細胞傷害性アッセイにおいて優れた細胞傷害性とＣＡＲ増殖を示した。

【図７Ｂ】実験終了時の代表的な画像を図７Ｂに示す。腫瘍細胞はグリーンである。表示されたデータは、３人の健康なドナーのＴ細胞から２回繰り返して製造されたＣＡＲ－Ｔ細胞を表すものである。実験は少なくともｎ＝２回繰り返した。

【図８Ａ】図８Ａ～８Ｅは、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}がインビボで混合腫瘍集団を根絶することを示している。図８Ａは、ＮＳＧマウスに、生物発光（ＢＬＩ）レポーターであるクリックビートルグリーンを発現する５×１０^{5}個の混合集団Ｍｏｌｍ１３細胞（９０％ Ｍｏｌｍ１３^{ＣＤ７０ＫＯ}、１０％ Ｍｏｌｍ１３^{ＷＴ}、ｎ＝１０マウス／群）を－７日目に注射したことを示している。０日目に、マウスに、２×１０^{6}個のＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}又はＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}細胞を投与した（群当たり個々のＴ細胞ドナー当たり、ｎ＝５マウス）。

【図８Ｂ】図８Ｂ～８Ｃは、連続ＢＬＩモニタリングにより、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}マウス群の腫瘍が根絶されたが、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}では腫瘍増殖が制御されなかったことを示している。Ｐ値は二元配置分散分析によって示される。

【図８Ｃ】（上記）

【図８Ｄ－Ｅ】図８Ｄは、ＣＡＲ－Ｔ注射後１４～２８日目にフローサイトメトリーで定量した末梢血増殖を示している。Ｐ値は、個々のマン・ホイットニーのＵ検定の結果として報告される。図８Ｅは、ＣＡＲ－Ｔ注射後＋２１日目にマウスの血液からフローサイトメトリーで得た末梢血ＣＡＲ－Ｔ表現型プロファイリングを、刺激も形質導入もされていないドナー適合Ｔ細胞と比較して示す。代表的な例を示す。ＣＭ（セントラルメモリー）、ＥＭ（エフェクターメモリー）、ＴＤＥ（最終分化エフェクター）。

【図９Ａ】図９Ａ～９Ｃは、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}細胞が、インビボでＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}細胞と比較して多岐にわたる発現プログラムを示すことを示している。図９Ａは、コンストラクト間の転写プログラムの差異を強調したボルケーノプロットを示している。調整ｐ値が０．０５（Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ）未満の遺伝子はレッドで着色されている。

【図９Ｂ】図９Ｂは、全ての利用可能なパスウェイを統合して、偏りのない形でパスウェイクラスタリングが実施されたことを示している（上）。選択されたパスウェイのヒートマップを下に示す。

【図９Ｃ】図９Ｃは、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}（右）及びＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}（左）のＴＣＲシグナル伝達のパスウェイスコアを示している。Ｐ値は、独立ｔ検定による。

【図１０】図１０は、患者由来異種移植（ＰＤＸ）ＡＭＬマウスモデルへの二通りの異なる用量のＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}ＣＡＲ Ｔ細胞の投与を示している。５×１０^{6}個のＡＭＬ ＰＤＸ細胞を、－４日目にマウスに投与した。０日目に、５×１０^{5}個又は１×１０^{6}個のＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}ＣＡＲ Ｔ細胞をマウスに投与した。未治療及びＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}を対照として使用した。１５日目に、マウスの血液

中の腫瘍細胞（ＣＤ３３＋／ＣＤ４５＋）濃度を測定した。結果は、５×１０^{5}個及び１×１０^{6}個のＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}ＣＡＲ Ｔ細胞を投与すると、腫瘍細胞濃度に同様の効果があったことを示している。

【図１１Ａ－Ｂ】図１１Ａ～１１Ｅは、ＣＤ３３Ｔ細胞エンゲージ抗体分子を分泌するＣＤ７０－ＣＡＲ－Ｔ細胞の構築を示している。図１１Ａは、ＮＳＧマウスに５×１０^{6}個のＤＦＡＭ６８５５５ ＡＭＬ患者由来異種移植細胞を－４日目に移植したことを示している。０日目に、マウスに２×１０^{6}個のＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与した。殆どのＣＡＲ－Ｔ細胞治療マウスでは腫瘍が消失したが、一部のマウスではＣＤ７０^{ｌｏｗ}腫瘍が再発した。図１１Ｂは、ＣＤ３３－ＣＤ３Ｔ細胞エンゲージ抗体分子を分泌するＣＤ７０ＣＡＲ－Ｔ細胞を示している。

【図１１Ｃ】（上記）

【図１１Ｄ－Ｅ】図１１Ｄは、ここで使用したＣＡＲのコンストラクト図を示している。図１１Ｅは、初代健常ドナーＴ細胞の形質導入効率を示している（ｎ＝３の異なる健常ドナーで、少なくとも２つの別々の実験を代表）。

【図１２Ａ】図１２Ａ～１２Ｄは、ＴＥＡＭがＣＡＲ－Ｔ細胞によって分泌され、適切な標的抗原に結合することを示している。図１２Ａは、示された条件（行）からの上清を、示された細胞型（列）に添加し、フローサイトメトリーによって抗Ｈｉｓタグ（ＴＥＡＭ）結合について評価したことを示している。

【図１２Ｂ－Ｃ】図１２Ｂは、示されたコンストラクトを形質導入したジャーカットＴ細胞の上清を、プレート結合したＣＤ３３発現Ｋ５６２腫瘍細胞並びに抗ＨｉｓタグＡＦ６４７抗体と共にインキュベートしたことを示している。蛍光強度をインキュサイトで測定し、代表的な画像を示す。図１２Ｃは、示されたコンストラクトを形質導入したジャーカットＴ細胞から得た上清を、Ｍｏｌｍ１３腫瘍細胞、未形質導入（ＵＴＤ）の健康な初代ヒトＴ細胞、及び抗ＣＤ６９抗体と共培養したことを示している。ＣＤ６９を発現する細胞の経時的なパーセントを示す。ＰＭＡ＝ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート陽性対照。

【図１２Ｄ】図１２Ｄは、７０^{33}又は７０^{19}コンストラクトを形質導入した細胞、又はＵＴＤをトランスウェルインサートの上部に添加したことを示している。ＵＴＤは、Ｍｏｌｍ１３^{ＷＴ}又はＭｏｌｍ１３^{ＣＤ３３ＫＯ}細胞と共にトランスウェルインサートの底部に添加した。腫瘍増殖を経時的に測定した。Ｐ値は、示された条件間の二元配置分散分析を表す。実験は少なくともｎ＝２回繰り返した。

【図１３Ａ】図１３Ａ～１３Ｃは、ＣＡＲとＴＥＡＭによる同時Ｔ細胞リダイレクトが異種腫瘍に対して有効であり、個々のＣＡＲの混合物よりも優れていることを示している。図１３Ａは、個別に標的化されたＣＡＲ３３Ｔ細胞を、２：１のエフェクター：標的比で、改変されたＭｏｌｍ１３ｗｔ、Ｍｏｌｍ１３^{ＣＤ７０ＫＯ}、Ｍｏｌｍ１３^{ＣＤ３３ＫＯ}ＡＭＬ標的に対して７０^{33}又は７０^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞と比較したことを示している。

【図１３Ｂ－１】フローサイトメトリーで評価した示された標的の発現（左）と、リアルタイム細胞傷害性アッセイ（図１３Ｂ上部）及びＣＡＲ－Ｔ増殖（図１３Ｂ下部）の結果が示されている。

【図１３Ｂ－２】（上記）

【図１３Ｃ】図１３Ｃは、示された条件での４０時間後のインキュサイトからの代表的な画像を示している。表示されたデータは、３人の健康なドナーのＴ細胞から製造されたＣＡＲ－Ｔ細胞を二組実施したデータの組み合わせを表している。実験は少なくともｎ＝２回繰り返した。Ｐ値は、示された条件の二元配置分散分析を表す。

【図１４Ａ－Ｂ】図１４Ａ～１４Ｄは、ＡＭＬの患者由来異種移植モデルにおいて、ＣＡＲとＴＥＡＭを介した同時Ｔ細胞リダイレクトが標準ＣＡＲ－Ｔ細胞よりも優れていることを示している。図１４Ａは、５×１０^{6}個のＤＦＡＭ６８５５５ ＡＭＬ ＰＤＸ細胞を、－４日目にＮＳＧマウス（ｎ＝５匹／群）に尾静脈から注射したことを示している。４日後の０日目に、５×１０^{5}個又は１×１０^{6}個の７０^{33}又は７０^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞を尾静脈から注射した。図１４Ｂは、ＣＤ３３ ＴＥＡＭを分泌するＣＤ７０ＣＡＲ－Ｔ

細胞（７０^{33}）が、ＣＤ１９ ＴＥＡＭを分泌するＣＤ７０ＣＡＲ－Ｔ細胞（７０^{19}）よりも高い効率で循環ＣＤ３３＋腫瘍細胞を殺傷することを示している。
【図１４Ｃ－Ｄ】１４Ｃは、＋１４日目に循環している７０^{33}及び７０^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞の数を示している。図１４Ｄは、実験におけるマウスの生存率である。Ｐ値は、ログランクマンテルコックスを表す。
【図１５Ａ－Ｂ】図１５Ａ～１５Ｈは、７０^{33}がインビボで混合腫瘍集団を根絶することを示している。図１５Ａは、ＮＳＧマウスに、生物発光（ＢＬＩ）レポーターであるクリックビートルグリーンを発現する５×１０^{5}個の混合集団Ｍｏｌｍ１３細胞（９０％ Ｍｏｌｍ１３^{CD70KO}、１０％ Ｍｏｌｍ１３^{WT}、ｎ＝１０マウス／群）を－７日目に注射したことを示している。０日目に、マウスに７０^{19}又は７０ＣＡＲ^{33}細胞の何れかを２×１０^{6}個投与した（群当たり個々のＴ細胞ドナー当たり、ｎ＝５マウス）。図１５Ｂは、ＣＡＲ－Ｔ注射後１４～２８日目にフローサイトメトリーで定量したＣＡＲ－Ｔ細胞の末梢血増殖を示している。
【図１５Ｃ】図１５Ｃ～１５Ｄは、腫瘍増殖の連続ＢＬＩモニタリングを示している。Ｐ値は二元配置分散分析を表す。
【図１５Ｄ－Ｅ】図１５Ｄ（上記）。図１５Ｅは、ＣＡＲ－Ｔ注射後＋２１日目にマウスの血液からフローサイトメトリーで得た末梢血ＣＡＲ－Ｔ表現型プロファイリングを、刺激も形質導入もしていないドナー適合Ｔ細胞と比較して示している。代表的な例を示す。ＣＭ（セントラルメモリー）、ＥＭ（エフェクターメモリー）、ＴＤＥ（最終分化エフェクター）。
【図１５Ｆ】図１５Ｆは、混合腫瘍モデルのマウスの脾臓から＋２８日目にＦＡＣＳ選別したＣＡＲ－Ｔ細胞が、カスタム「ドロップイン」遺伝子セットに加えてＣＡＲ－Ｔ特性評価パネルを用いてナノストリングで遺伝子発現解析を受けたことを示している。ボルケーノプロットは、コンストラクト間の転写プログラムの差異を強調している。調整ｐ値が０．０５未満（Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ）の遺伝子は濃いグレーで着色している。
【図１５Ｇ－Ｈ】図１５Ｇは、全ての利用可能なパスウェイを統合する偏りのない形で実施されたパスウェイ階層的クラスタリングを示している（上部）。選択されたパスウェイのヒートマップが示される。図１５Ｈは、７０^{33T}及び７０ＣＡＲ^{19}のＴＣＲシグナル伝達のパスウェイスコアを示している。ｐ値は独立ｔ検定による。
【図１６Ａ－Ｂ】図１６Ａ～１６Ｇは、ＴＥＡＭがＡＭＬ患者のＴ細胞を効果的にリダイレクトして腫瘍細胞を殺傷することを示している。図１６Ａは、そのＴ細胞が利用されたＡＭＬ患者の臨床的特徴を示している。図１６Ｂは、ＡＭＬ患者のＴ細胞と健康なドナーのＴ細胞とを比較したフローＴ細胞表現型を示している。
【図１６Ｃ】図１６Ｃは、ＡＭＬ患者のＴ細胞における代表的な表現型とＰＤ－１発現を示している。
【図１６Ｄ】図１６Ｄは、ＴＥＡＭ産生細胞と、単離されたＡＭＬ患者のＴ細胞及びＭｏｌｍ１３腫瘍標的との共培養を示している。リアルタイム細胞傷害性をインキュサイトで測定。
【図１６Ｅ】図１６Ｅは、健康なドナーと比較した患者から得られた１８時間後の正規化されたサイトカイン測定値を示している。
【図１６Ｆ】図１６Ｆは、腫瘍標的と共に、上部のＴＥＡＭ産生細胞と、下部の単離されたＡＭＬ患者Ｔ細胞を用いたトランスウェルアッセイを示している。リアルタイム細胞傷害性が測定され（上部）、活性化（ＣＤ６９）が下部に示される。
【図１６Ｇ】図１６Ｇは、４０時間の活性化での代表的な画像を示している。
【図１７】図１７は、ＣＡＲとＴＥＡＭによる同時Ｔ細胞リダイレクトが、内因性抗原発現レベルを持つ異種腫瘍に対して有効であり、個々のＣＡＲの混合物よりも優れていることを示している。個別に標的化されたＣＡＲ３３Ｔ細胞を、ＡＭＬ細胞株Ｋａｓｕｍｉ１、Ｍｏｎｏｍａｃ１、及びＯＣＩ－ＡＭＬ３に対して、２：１のエフェクター：標的比で７０^{33}又は７０^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞と比較した。フローサイトメトリーで評価された示

された標的の発現（左）と、リアルタイム細胞傷害性アッセイ（上部）及びＣＡＲ－Ｔ増殖（下部）の結果が示される。表示されたデータは、３人の健康なドナーのＴ細胞から製造されたＣＡＲ－Ｔ細胞を二組で実施した複合データを表している。実験は少なくともｎ＝２回繰り返した。Ｐ値は、示された条件の二元配置分散分析を表す。

【図１８】図１８は、利用可能な全てのパスウェイを統合して、パスウェイ階層クラスタリングが偏りのない形で実施されたことを示している（上部）。ヒートマップは全てのナノストリングの利用可能な経路を示す。

【発明を実施するための形態】

【００１７】

［ＣＤ－７０結合キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）］

本開示は、幾つかの態様では、腫瘍壊死アルファファミリーメンバーであるＣＤ７０を標的とするＣＡＲ－Ｔ細胞と、血液悪性腫瘍（例えば、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ））の治療のためのＣＡＲ－Ｔ細胞の使用を提供する。ＣＤ７０は骨髄芽球及び白血病幹細胞で一貫して発現されるが、健康なヒト組織での発現は非常に制限されている。過去に実証されているように、ＣＤ７０を標的とするＣＡＲ－Ｔ細胞は、例えば、その全体が出典明示により援用されるＰＣＴ／ＵＳ２０２０／０５１０１８に記載されているように、インビトロ及びインビボの白血病モデルにおいて抗原特異的活性化、サイトカイン産生、及び細胞傷害活性を達成した。

【００１８】

本開示の幾つかの態様は、（ｉ）ＣＤ７０に結合するポリペプチドを含む細胞外標的結合ドメイン；（ｉｉ）膜貫通ドメイン；及び（ｉｉｉ）細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を提供する。

【００１９】

「キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）」とは、抗原結合機能と細胞活性化機能の両方を実施するように改変された受容体タンパク質を指す。幾つかの実施態様では、ＣＡＲは、別個の機能を有する複数の連結ドメインを含む。ＣＡＲドメインには、抗原結合機能を持つもの、構造機能を持つもの、及びシグナル伝達機能を持つものが含まれる。幾つかの実施態様では、ＣＡＲは、少なくとも、細胞外リガンドドメイン、膜貫通ドメイン、及び以下に定義される刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン（ここでは「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも呼ばれる）を含む。幾つかの実施態様では、ＣＡＲは、任意選択的なリーダー配列（「シグナルペプチド」とも呼ばれる）、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、及び細胞内刺激ドメインを含む。幾つかの実施態様では、ＣＡＲ内のドメインは同じポリペプチド鎖にあり、例えば、キメラ融合タンパク質を含む。幾つかの実施態様では、ＣＡＲ内のドメインは互いに近接していない。

【００２０】

幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲは、表面抗原分類７０（ＣＤ７０）に結合するポリペプチドを含む細胞外標的結合ドメインを含む。「ＣＤ７０」は、ヒトＣＤ７０遺伝子（ＮＣＢＩ遺伝子ＩＤ：９７０）によってコードされるポリペプチドを指す。ここに記載されるように、ＣＤ７０の発現は、正常なヒト（非がん）組織では高度に限定されている。しかし、ＣＤ７０は、数多くのがん、例えば、膀胱がん、浸潤性乳癌、子宮頸がん、胆管細胞癌、結腸直腸がん、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣ）、食道がん、神経膠芽腫（ＧＢＭ）、頭頸部がん、低悪性度神経膠腫（ＬＧＧ）、肝がん、肺腺がん、メラノーマ、中皮腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、肉腫、胃がん、精巣胚細胞性がん、胸腺腫、甲状腺がん、子宮がん、ブドウ膜黒色腫、淡明細胞型腎細胞癌（ｃｃＲＣＣ）、嫌色素性腎細胞癌、乳頭状腎細胞癌（ｐＲＣＣ）、急性骨髄性白血病、及び腺様嚢胞癌（ＡＣＣ）において発現される（Ｐａｎ－Ｃａｎｃｅｒ Ａｔｌａｓ ２０１８）。ＣＤ７０は、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞外ドメインを含むサイトカインである。ＣＤ７０の細胞外ドメインはＣＤ２７のリガンドである。

【００２１】

幾つかの実施態様では、ＣＤ７０に結合するポリペプチドは、ＣＤ２７抗原とも呼ばれる表面抗原分類２７（ＣＤ２７）のＣＤ７０結合ドメインを含む。「ＣＤ２７」は、ヒトＣＤ２７遺伝子（ＮＣＢＩ遺伝子ＩＤ：９３９、Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ：Ｐ２６８４２）によってコードされるポリペプチドを指す。ＣＤ２７アミノ酸配列の例を以下に提供する。

ＭＡＲＰＨＰＷＷＬＣＶＬＧＴＬＶＧＬＳＡＴＰＡＰＫＳＣＰＥＲＨＹＷＡＱＧＫＬＣＣＱＭＣＥＰＧＴＦＬＶＫＤＣＤＱＨＲＫＡＡＱＣＤＰＣＩＰＧＶＳＦＳＰＤＨＨＴＲＰＨＣＥＳＣＲＨＣＮＳＧＬＬＶＲＮＣＴＩＴＡＮＡＥＣＡＣＲＮＧＷＱＣＲＤＫＥＣＴＥＣＤＰＬＰＮＰＳＬＴＡＲＳＳＱＡＬＳＰＨＰＱＰＴＨＬＰＹＶＳＥＭＬＥＡＲＴＡＧＨＭＱＴＬＡＤＦＲＱＬＰＡＲＴＬＳＴＨＷＰＰＱＲＳＬＣＳＳＤＦＩＲＩＬＶＩＦＳＧＭＦＬＶＦＴＬＡＧＡＬＦＬＨＱＲＲＫＹＲＳＮＫＧＥＳＰＶＥＰＡＥＰＣＨＹＳＣＰＲＥＥＥＧＳＴＩＰＩＱＥＤＹＲＫＰＥＰＡＣＳＰ（配列番号：８）

【００２２】

ＣＤ２７タンパク質は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを有する。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０結合ドメインは、ＣＤ２７の細胞外シグナル伝達ドメイン内に位置する。幾つかの実施態様では、細胞外領域には、複数のシステインリッチドメイン（ＣＲＤ）、すなわちＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３が含まれる。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０結合ドメインは、ＣＲＤ２ドメイン内に位置する。

【００２３】

幾つかの実施態様では、ＣＤ２７のＣＤ７０結合ドメインは、ＣＤ２７の細胞外ドメインに位置するＴＲＰＨＣＥＳＣＲＨＣＮ（配列番号：９）のアミノ酸配列を含むペプチドを含む。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞外標的結合ドメインは、配列番号：９のアミノ酸配列と少なくとも７０％同一（例えば、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％、又は少なくとも９９％同一）であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞外標的結合ドメインは、配列番号：９のアミノ酸配列を含む。

【００２４】

幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞外標的結合ドメインは、ＣＤ２７の細胞外ドメイン又はその機能的断片（例えば、ＣＤ７０に結合可能な断片）を含むポリペプチドを含む。幾つかの実施態様では、機能的断片は、配列番号：９又はそのバリアントを含む。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞外標的結合ドメインは、配列番号：１、８又は９のアミノ酸配列と少なくとも７０％同一（例えば、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％又は少なくとも９９％同一）であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞外標的結合ドメインは、配列番号：１のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【００２５】

幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞外標的結合ドメイン内のＣＤ７０に結合するポリペプチドは、抗ＣＤ７０抗体を含む。ここで使用される「抗体」という用語は、異なる型の抗体と抗体断片を包含する。幾つかの実施態様では、抗体には、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、並びに、限定されないが、単鎖可変断片（ｓｃＦＶ）、ラクダ類由来ナノボディの重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）及び可変ドメイン（ＶＨＨ）などの単一ドメイン抗体を含む、それらの機能的断片、並びに組換えフィブロネクチンドメインなどの抗原結合ドメインとして機能することが当該技術分野で知られている代替スキャフォールドなどが含まれる。幾つかの実施態様では、抗原結合ドメインは、ＣＡＲが最終的に使用されるのと同じ種に由来することが有益である。例えば、ヒトで使用する場合、ＣＡＲの抗原結合ドメインは、抗体又は抗体断片の抗原結合ドメインのヒト残基又はヒト化残基を含むことが有益でありうる。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞外標

的結合ドメイン内のＣＤ７０に結合するポリペプチドは、ＣＤ７０に結合するｓｃＦｖを含む。

【００２６】

幾つかの実施態様では、ＣＤ７０抗体は、そのそれぞれの全体が出典明示により援用される米国特許第１１４３４２９８号、米国特許第７４９１３９０号、米国特許第８１２４７３８号、米国特許第１１３７７５００号、又は米国特許第９７０１７５２号に記載されている抗体又は抗原結合ドメイン（例えば、ＣＤＲ又はＶＨ及びＶＬ）を含む。

【００２７】

幾つかの実施態様では、抗体はヒト抗体又は抗体断片である。幾つかの実施態様では、抗体はヒト化抗体又は抗体断片である。ヒト化抗体は、ＣＤＲグラフティング（例えば、それぞれのその全体が出典明示によりここに援用される欧州特許第ＥＰ２３９４００号；国際公開第ＷＯ９１／０９９６７号；及び米国特許第５２２５５３９号、第５５３０１０１号、及び第５５８５０８９号を参照）、ベニアリング又はリサーフェシング（例えば、それぞれのその全体が出典明示によりここに援用される欧州特許第ＥＰ５９２１０６号及び第ＥＰ５１９５９６号；Ｐａｄｌａｎ，１９９１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２８（４／５）：４８９－４９８；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ等，１９９４，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７（６）：８０５－８１４；及びＲｏｇｕｓｋａ等，１９９４，ＰＮＡＳ，９１：９６９－９７３を参照）、鎖シャフリング（例えば、その全体が出典明示によりここに援用される米国特許第５５６５３３２号を参照）、並びに、例えば、それぞれのその全体が出典明示によりここに援用される米国特許出願公開第２００５／００４２６６４号、米国特許出願公開第２００５／００４８６１７号、米国特許第６４０７２１３号、米国特許第５７６６８８６号、国際公開第ＷＯ９３１７１０５号、Ｔａｎ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６９：１１１９－２５（２００２）、Ｃａｌｄａｓ等，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，１３（５）：３５３－６０（２０００）、Ｍｏｒｅａ等，Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０（３）：２６７－７９（２０００）、Ｂａｃａ等，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２（１６）：１０６７８－８４（１９９７）、Ｒｏｇｕｓｋａ等，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，９（１０）：８９５－９０４（１９９６）、Ｃｏｕｔｏ等，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５５（２３ Ｓｕｐｐ）：５９７３ｓ－５９７７ｓ（１９９５）、Ｃｏｕｔｏ等，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５５（８）：１７１７－２２（１９９５）、Ｓａｎｄｈｕ Ｊ Ｓ，Ｇｅｎｅ，１５０（２）：４０９－１０（１９９４）、及びＰｅｄｅｒｓｅｎ等，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２３５（３）：９５９－７３（１９９４）に開示された技術を含む、当該分野で知られている様々な技術を使用して産生することができる。しばしば、フレームワーク領域内のフレームワーク残基は、抗原結合を変更（例えば改善）するために、ＣＤＲドナー抗体由来の対応残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当該技術分野でよく知られている方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するためのＣＤＲ及びフレームワーク残基の相互作用のモデル化、及び特定の位置の異常なフレームワーク残基を特定するための配列比較によって、特定される。（例えば、その全体が出典明示によりここに援用されるＱｕｅｅｎ等，米国特許第５５８５０８９号；及びＲｉｅｃｈｍａｎｎ等，１９８８，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３を参照。）

【００２８】

ヒト化抗体又は抗体断片には、非ヒト源由来の一又は複数のアミノ酸残基が残っている。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合「移入」残基と呼ばれ、典型的には「移入」可変ドメインから取得される。ここで提供されるように、ヒト化抗体又は抗体断片は、非ヒト免疫グロブリン分子由来の一つ又は複数のＣＤＲとフレームワーク領域を含み、フレームワークを含むアミノ酸残基は、完全に又は大部分がヒト生殖系列に由来する。抗体又は抗体断片のヒト化のための複数の技術が当該技術分野でよく知られており、本質的には、Ｗｉｎｔｅｒと共同研究者の方法（Ｊｏｎｅｓ等，Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ等，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４－１５３６（１

９８８））に従って、齧歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列に置き換えること、すなわち、ＣＤＲグラフティング（その内容が出典明示によりここに援用される、ＥＰ２３９４００；ＰＣＴ公開第ＷＯ９１／０９９６７号；及び米国特許第４８１６５６７号；第６３３１４１５号；第５２２５５３９号；第５５３０１０１号；第５５８５０８９号；第６５４８６４０号）によって、実施されうる。そのようなヒト化抗体及び抗体断片では、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない部分が、非ヒト種由来の対応する配列に置換されている。ヒト化抗体は、しばしば、一部のＣＤＲ残基と、場合によっては一部のフレームワーク（ＦＲ）残基が、齧歯類抗体の類似部位由来の残基に置換されたヒト抗体である。抗体及び抗体断片のヒト化は、また、ベニアリング又はリサーフェシング（ＥＰ５９２１０６；ＥＰ５１９５９６；Ｐａｄｌａｎ，１９９１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２８（４／５）：４８９－４９８；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ等，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７（６）：８０５－８１４（１９９４）；及びＲｏｇｕｓｋａ等，ＰＮＡＳ，９１：９６９－９７３（１９９４））又は鎖シャフリング（米国特許第５５６５３３２号）によって達成することができ、これらの内容は、その全体が出典明示によりここに援用される。

【００２９】

幾つかの実施態様では、抗体はディスプレイライブラリーから得られる。ディスプレイライブラリーはエンティティの集合であり；各エンティティには、アクセス可能なポリペプチド構成要素と、ポリペプチド構成要素をコード又は識別する回収可能な構成要素が含まれる。ポリペプチド構成要素は、異なるアミノ酸配列が表されるように変わる。ポリペプチド構成要素は、任意の長さ、例えば３アミノ酸から３００アミノ酸以上までの長さでありうる。ディスプレイライブラリーエンティティには、一を超えるポリペプチド構成要素、例えばＦａｂの二つのポリペプチド鎖が含まれうる。例示的な一実施態様では、ディスプレイライブラリーを使用して抗原結合ドメインを識別することができる。選択では、ライブラリーの各メンバーのポリペプチド構成要素が抗原又はその断片でプローブされ、ポリペプチド構成要素が抗原に結合すると、ディスプレイライブラリーメンバーが、典型的には担体上での保持によって、識別される。

【００３０】

保持されたディスプレイライブラリーメンバーは、担体から回収され、分析される。分析には、増幅と、類似又は異なる条件下でのその後の選択が含まれうる。例えば、正の選択と負の選択を交互に行うことができる。分析には、ポリペプチド構成要素のアミノ酸配列の決定と、詳細な特性評価のためのポリペプチド構成要素の精製がまた含まれうる。

【００３１】

ディスプレイライブラリーには、様々な形式が使用されうる。例には、ファージディスプレイが含まれる。ファージディスプレイでは、タンパク質構成要素は、典型的にはバクテリオファージコートタンパク質に共有結合している。結合は、コートタンパク質に融合されたタンパク質構成要素をコードする核酸の翻訳によって生じる。結合には、可動性ペプチドリンカー、プロテアーゼ部位、又は終止コドンの抑制の結果として取り込まれたアミノ酸を含まれうる。ファージディスプレイは、例えば、米国特許第５２２３４０９号；国際公開第９２／１８６１９号；国際公開第９１／１７２７１号；国際公開第９２／２０７９１号；国際公開第９２／１５６７９号；国際公開第９３／０１２８８号；国際公開第９２／０１０４７号；国際公開第９２／０９６９０号；国際公開第９０／０２８０９号に記載されている。タンパク質構成要素をディスプレイするバクテリオファージは、標準的なファージ調製法、例えば増殖培地からのＰＥＧ沈殿法を使用して増殖させ収集されうる。個々のディスプレイファージを選択した後、増幅後に、選択されたタンパク質構成要素をコードする核酸を、選択されたファージに感染した細胞から、又はファージ自体から単離することができる。個々のコロニー又はプラークを拾い、核酸を単離して配列決定することができる。他のディスプレイ形式には、細胞ベースのディスプレイ（例えば、国際公開第０３／０２９４５６号を参照）、タンパク質－核酸融合（例えば、米国特許第６２０７４４６号を参照）、リボソームディスプレイ、及び大腸菌ペリプラズムディスプレイが

含まれる。

【００３２】

ここに記載のＣＡＲの膜貫通ドメインは、天然源又は組換え源の何れかに由来しうる。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質又は膜貫通タンパク質に由来しうる。一態様では、膜貫通ドメインは、ＣＡＲが標的に結合するたびに、細胞内ドメインにシグナル伝達をすることができる。この発明で特に使用される膜貫通ドメインには、少なくとも、例えばＴ細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖又はゼータ鎖、ＣＤ２８、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８（例えば、ＣＤ８アルファ、ＣＤ８ベータ）、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ２７、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４の膜貫通領域が含まれうる。幾つかの実施態様では、膜貫通ドメインには、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ベータ、ＩＬ２Ｒガンマ、ＩＬ７Ｒａ、ＩＴＧＡ１、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＴＧＡ４、ＩＡ４、ＣＤ４９Ｄ、ＩＴＧＡ６、ＶＬＡ－６、ＣＤ４９ｆ、ＩＴＧＡＤ、ＣＤ１１ｄ、ＩＴＧＡＥ、ＣＤ１０３、ｒｆＧＡＬ、ＣＤ１１ａ、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＡＭ、ＣＤ１１ｂ、ＩＴＧＡＸ、ＣＤ１１ｃ、ＩＴＧＢ１、ＣＤ２９、ＩＴＧＢ２、ＣＤ１８、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＢ７、ＴＮＦＲ２、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴ ＡＭ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＰＳＧＬ１、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙｌ０８）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦｌ、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＬＴＢＲ、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、及びＣＤ１９の膜貫通領域が含まれうる。幾つかの実施態様では、膜貫通ドメインはＣＤ２８膜貫通ドメイン又はＣＤ８膜貫通ドメインである。幾つかの実施態様では、膜貫通ドメインは、ＣＤ２７の膜貫通ドメインである。幾つかの実施態様では、ＣＤ２７の膜貫通ドメインは、ＩＬＶＩＦＳＧＭＦＬＶＦＴＬＡＧＡＬＦＬ（配列番号：１０）のアミノ酸配列を含む。

【００３３】

幾つかの実施態様では、膜貫通ドメインは、ヒンジ、例えばヒトタンパク質由来のヒンジを介して、ＣＡＲの細胞外領域、例えばＣＡＲのリガンドドメインに結合されうる。例えば、一実施態様では、ヒンジは、ヒトＩｇ（免疫グロブリン）ヒンジ、例えばＩｇＧ４ヒンジ、又はＣＤ８ａヒンジでありうる。

【００３４】

幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞質ドメイン又は領域には、一つ又は複数の細胞内シグナル伝達ドメインが含まれる。細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＡＲが導入された免疫細胞の通常のエフェクター機能の少なくとも一つを活性化することができる。ここに記載のＣＡＲで使用するための細胞内シグナル伝達ドメインの例には、抗原受容体エンゲージ後にシグナル伝達を開始するために協調して作用するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）及び共受容体の細胞質配列、並びにこれらの配列の任意の誘導体又はバリアント、及び同じ機能的能力を有する任意の組換え配列が含まれる。

【００３５】

Ｔ細胞活性化は、ＴＣＲを介して抗原依存性一次活性化を開始するもの（一次細胞内シグナル伝達ドメイン）と、抗原に依存しない形で作用して二次又は共刺激シグナルを提供するもの（二次細胞質ドメイン、例えば共刺激ドメイン）という二つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列によって媒介されると言うことができる。

【００３６】

該用語がここで使用される場合、「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＡＲ含有細胞、例えばＣＡＲ Ｔ細胞又は

ＣＡＲ発現ＮＫ細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成しうる。例えばＣＡＲ Ｔ細胞又はＣＡＲ発現ＮＫ細胞における免疫エフェクター機能の例には、サイトカインの分泌を含む、細胞溶解活性及びヘルパー活性が含まれる。実施態様では、細胞内シグナル伝達ドメインはエフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊な機能を実施するように指示する。細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分が使用される限り、そのような切断部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、インタクト鎖の代わりに使用することができる。従って、細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断部分を含むことを意味する。

【００３７】

幾つかの実施態様では、一つ又は複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。例示的な一次細胞内シグナル伝達ドメインには、一次刺激又は抗原依存性刺激を担う分子に由来するものが含まれる。幾つかの実施態様では、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフ又はＩＴＡＭとして知られるシグナル伝達モチーフを含む。ＩＴＡＭを含む一次細胞質シグナル伝達配列の例には、限定されないが、ＣＤ３ゼータ、ＦｃＲガンマ、ＦｃＲベータ、ＣＤ３ガンマ、ＣＤ３デルタ、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ３シータ、ＣＤ３イータ、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ２７８（「ＩＣＯＳ」）、ＦｃｅＲＩ、ＣＤ６６ｄ、ＤＡＰ１０、及びＤＡＰ１２に由来するものが含まれる。幾つかの実施態様では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）シグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）シグナル伝達ドメインは、ＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧＲＤＰＥＭＧＧＫＰＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲ（配列番号：１１）のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲのＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）シグナル伝達ドメインは、配列番号：１１のアミノ酸配列と少なくとも７０％同一（例えば、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％、又は少なくとも９９％同一）のアミノ酸配列を含む。

【００３８】

幾つかの実施態様では、一つ又は複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激細胞内ドメインを含む。共刺激細胞内シグナル伝達ドメインとは、共刺激分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来する分子の細胞内部分全体、又は天然細胞内シグナル伝達ドメイン全体、又はその機能的断片を含みうる。例示的な共刺激細胞内シグナル伝達ドメインには、共刺激シグナル（例えば、抗原非依存性刺激）を担う分子に由来するもの、及びサイトカイン受容体に由来するものが含まれる。幾つかの実施態様では、一つ又は複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメイン、及び一つ又は複数の共刺激タンパク質又はサイトカイン受容体からの共刺激細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【００３９】

「共刺激分子」という用語は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それによって、限定されないが増殖などのＴ細胞による共刺激応答を媒介するＴ細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激分子は、効率的な免疫応答に必要とされる、抗原受容体又はそのリガンド以外の細胞表面分子である。そのような分子の例としては、ＭＨＣクラスＩ分子、ＴＮＦ受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球性活性化分子（ＳＬＡＭタンパク質）、活性化ＮＫ細胞受容体、ＢＴＬＡ、Ｔｏｌｌリガンド受容体、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、Ｂ７－Ｈ３、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＧＩＴＲ、ＢＡＦＦＲ、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＫＩＲＤＳ２、ＳＬＡ

ＭＦ７、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦｌ）、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４６、ＣＤ１９、ＣＤ４、ＣＤ８アルファ、ＣＤ８ベータ、ＩＬ２Ｒベータ、ＩＬ２Ｒガンマ、ＩＬ７Ｒアルファ、ＩＴＧＡ４、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＴＧＡ４、ＩＡ４、ＣＤ４９Ｄ、ＩＴＧＡ６、ＶＬＡ－６、ＣＤ４９ｆ、ＩＴＧＡＤ、ＣＤ１１ｄ、ＩＴＧＡＥ、ＣＤ１０３、ＩＴＧＡＬ、ＣＤ１１ａ、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＡＭ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＩＴＧＢ１、ＣＤ２９、ＩＴＧＢ２、ＣＤ１８、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＢ７、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、ＴＮＦＲ２、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴＡＭ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＰＳＧＬｌ、ＣＤＩＯＯ（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ６９、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙｌ０８）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＬＴＢＲ、ＬＡＴ、ＧＡＤＳ、ＳＬＰ－７６、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＣＤ１９ａ、及びＣＤ８３と特異的に結合するリガンドが含まれる。例えば、ＣＤ２７共刺激は、インビトロでヒトＣＡＲＴ細胞の増殖、エフェクター機能、及び生存を促進し、インビボでヒトＴ細胞の持続性及び抗腫瘍活性を増強することが実証されている（Ｓｏｎｇ等 Ｂｌｏｏｄ．２０１２；１１９（３）：６９６－７０６）。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの共刺激ドメインは、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、２Ｂ４、ＫＩＲ、ＣＤ２７、ＯＸ４０、ＩＣＯＳ、ＭＹＤ８８、ＩＬ２受容体、及びＳｙｎＮｏｔｃｈから選択される一つ又は複数の共刺激タンパク質又はサイトカイン受容体からの一つ又は複数のシグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの共刺激ドメインは、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施態様では、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメインは、ＫＲＧＲＫＫＬＬＹＩＦＫＱＰＦＭＲＰＶＱＴＴＱＥＥＤＧＣＳＣＲＦＰＥＥＥＥＧＧＣＥＬ（配列番号：１２）のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号：１２のアミノ酸配列と少なくとも７０％同一（例えば、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％、又は少なくとも９９％同一）のアミノ酸配列を含む。

【００４０】

幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン、例えばＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインなどのＩＴＡＭ含有ドメインを単独で、又は共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、２Ｂ４、ＫＩＲ、ＣＤ２７、ＯＸ４０、ＩＣＯＳ、ＭＹＤ８８、ＩＬ２受容体、及びＳｙｎＮｏｔｃｈから選択される一つ又は複数の共刺激タンパク質又はサイトカイン受容体からの共刺激ドメイン）と組み合わせて含む。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）シグナル伝達ドメインと４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【００４１】

幾つかの実施態様では、ＣＡＲの異なるドメイン間で異なるリンカー配列、例えば、$(GGGS)_n$（配列番号：３５）リンカーが使用されてもよく、ここで、ｎは１～２０（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、又は２０）である。幾つかの実施態様では、リンカーは$(GGGS)_7$（配列番号：３６）である。幾つかの実施態様では、ＣＡＲは、細胞外標的結合ドメインと膜貫通領域との間に、ＣＤ２７からの追加の配列、例えばＣＤ２７のストーク及びヒンジ領域を含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ２７のストーク及びヒンジ領域は、ＰＬＰＮＰＳＬＴＡＲＳＳＱＡＬＳＰＨＰＱＰＴＨＬＰＹＶＳＥＭＬＥＡＲＴＡＧＨＭＱＴＬＡＤＦＲＱＬＰＡＲＴＬＳＴＨＷＰＰＱＲＳＬＣＳＳＤＦＩＲ（配列番号：１３）のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ＣＡＲは、細胞外標的結合ドメインと膜貫通領域との間のストーク及びヒンジ領域などのＣＤ２７の追加の配列を含まない。

【００４２】

幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲは、配列番号：２～７の何れか一つのアミ

ノ酸配列と少なくとも７０％同一（例えば、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％、又は少なくとも９９％同一）であるアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲは、配列番号：２～７の何れか一つのアミノ酸配列を含む。

【００４３】

幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲは、抗原結合ドメインのアミノ末端（Ｎ末端）にリーダー配列（ここではシグナルペプチドとも呼ばれる）を更に含む。幾つかの実施態様では、ＣＡＲは、抗原結合ドメインのＮ末端にリーダー配列を更に含み、リーダー配列は、細胞プロセシング及びＣＡＲの細胞膜への局在化中に、抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）から任意選択的に切断される。幾つかの実施態様では、リーダー配列は、ＣＤ２７シグナルペプチド（例えば、ＭＡＲＰＨＰＷＷＬＣＶＬＧＴＬＶＧＬＳ（配列番号：１４）のアミノ酸配列を有するペプチド）である。幾つかの実施態様では、リーダー配列は、インターロイキン２シグナルペプチド又はＣＤ８リーダー配列である。幾つかの実施態様では、リーダー配列は、ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰ（配列番号：１５）のアミノ酸配列を含む。

【００４４】

幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＡＲは、（例えば、細胞外標的結合ドメインとリーダー配列の間に）追加のアミノ酸配列を更に含む。幾つかの実施態様では、追加の配列はアフィニティータグ（例えば、Ｍｙｃタグ、ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号：１６））である。

【００４５】

［Ｔ細胞エンゲージ抗体分子（ＴＥＡＭ）］

幾つかの態様では、本出願は、ＣＤ７０に結合するＣＡＲ（ＣＤ７０ ＣＡＲ）（例えば、上記のもの）とＣＤ３３に結合するＴＥＡＭ（ＣＤ３３ ＴＥＡＭ）とを含む細胞（例えば、Ｔ細胞）を開示する。ここに記載されるＴＥＡＭは、第一の結合部分（例えば、抗ＣＤ３３抗体）と第二の結合部分（例えば、免疫細胞結合部分）とを含む分子である。理論に縛られることを望まないが、ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、免疫細胞をがんにエンゲージさせるための第二の結合部位（すなわち、ＣＤ３３）を提供することにより、がん抗原エスケープ（例えば、がん細胞がＣＡＲによって標的とされる分子をもはや発現しない）を克服するのに役立つ。幾つかの実施態様では、ＣＤ３３ ＴＥＡＭはＴ細胞をがんにエンゲージさせる。ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、ＣＡＲ－Ｔ細胞と天然Ｔ細胞の両方をがん細胞にエンゲージさせうる。ここに開示されているように、ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭを発現するＣＡＲ－Ｔ細胞は、ＣＤ７０喪失を伴う再発がん細胞の治療において有効性が向上している。

【００４６】

幾つかの実施態様では、ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、抗ＣＤ３３抗体と免疫細胞結合部分を含む。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３３抗体には、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、並びに限定されないが、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ラクダ科動物由来ナノボディの重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）及び可変ドメイン（ＶＨＨ）などの単一ドメイン抗体を含むその機能的断片、並びに組換えフィブロネクチンドメインなどの抗原結合ドメインとして機能することが当該技術分野で知られている代替スキャフォールドなどが含まれる。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３３抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、ＶＨドメイン、ついでＶＬドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３３抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、ＶＬドメイン、ついでＶＨドメインを含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ３３抗体はｓｃＦｖである。幾つかの実施態様では、ＣＤ３３抗体は、配列番号：１９のＶＬドメイン又はそのバリアントと、配列番号：２０のＶＨドメイン又はそのバリアントを含む。

【００４７】

幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３３抗体は、それぞれのその全体が出典明示により援用される米国特許第１１１３６３９０号、米国特許第１０５５６９５１号、米国特許第１０

７８７５１４号、米国特許第８７５９４９４号、米国特許第１０００００５６６号、米国特許第１１１７４３１３号、米国特許第１０７１１０６２号、米国特許第１１４６６０８２号、及び米国特許第２０２１０３１７２０８号に記載されている抗体又は抗原結合ドメイン（例えば、ＣＤＲ又はＶＨ及びＶＬ）の何れか一つを含む。

【００４８】

幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞、骨髄由来サプレッサー細胞、間葉系幹細胞、又はそれらの組み合わせ、或いはそれらの任意の前駆体、誘導体、又は前駆細胞の表面で発現されるタンパク質に結合する分子である。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は、Ｔ細胞の表面で発現されるタンパク質（例えば、ＣＤ３）に結合する分子である。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は、Ｔ細胞の細胞表面マーカーに結合する。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＸＣＲ３、ＣＣＲ４、ＧＡＲＰ、ＬＡＰ、ＣＤ２５、ＣＴＬＡ－４、又はＣＤ１６からなる群から選択される。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は、ここに記載の抗体（例えば、Ｔ細胞の表面上に発現されるタンパク質に結合する抗体）である。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分には、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、並びに限定されないが、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ラクダ科動物由来ナノボディの重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）及び可変ドメイン（ＶＨＨ）などの単一ドメイン抗体を含むその機能的断片、並びに組換えフィブロネクチンドメインなどの抗原結合ドメインとして機能することが当該技術分野で知られている代替スキャフォールドなどが含まれる。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分はｓｃＦｖである。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は抗ＣＤ３抗体である。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけてＶＨドメイン、次いでＶＬドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３３抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、ＶＬドメイン、ついでＶＨドメインを含む。幾つかの実施態様では、免疫細胞結合部分は、配列番号：２１（抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ）のアミノ酸配列又はそのバリアントを含む。

【００４９】

幾つかの実施態様では、抗ＣＤ３抗体は、米国特許第９６５７１０２号、米国特許出願公開第２０２１０２４４８１５号、米国特許第１１５３０２７５号、米国特許第１０７５９８５８号、米国特許出願公開第２０２２０３８０４６４号、米国特許出願公開第２０２１０２５３７０１号、及び米国特許第１１５０５６０６号に記載されている抗体又は抗原結合ドメイン（例えば、ＣＤＲ又はＶＨ及びＶＬ）の何れか一つを含む。

【００５０】

幾つかの実施態様では、ＣＤ３３　ＴＥＡＭは、ＣＤ３３抗体と免疫細胞結合部分との間にリンカーを含む。幾つかの実施態様では、リンカーはペプチドリンカーである。幾つかの実施態様では、リンカーは非切断性である。幾つかの実施態様では、リンカーはグリシンリンカーである。幾つかの実施態様では、リンカーはＧｌｙＳｅｒリンカーである。幾つかの実施態様では、ＧｌｙＳｅｒリンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＳ（配列番号：３４）を含む。幾つかの実施態様では、ＧｌｙＳｅｒリンカーは、アミノ酸配列（ＧＧＧＳ）２（配列番号：３７）、（ＧＧＧＳ）３（配列番号：２６）、（ＧＧＧＳ）４（配列番号：３８）、（ＧＧＧＳ）５（配列番号：３９）、（ＧＧＧＳ）６（配列番号：４０）を含む。幾つかの実施態様では、ＧｌｙＳｅｒリンカーは、アミノ酸配列（ＧＧＧＧＳ）２（配列番号：４１）、（ＧＧＧＧＳ）３（配列番号：２７）、（ＧＧＧＧＳ）４（配列番号：２８）、（ＧＧＧＧＳ）５（配列番号：４２）、（ＧＧＧＧＳ）６（配列番号：４３）を含む。幾つかの実施態様では、リンカーは、配列番号：２６～３０の何れか一つのアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、リンカーは、配列番号：２６のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、リンカーは、ここに記載の任意のリンカーである。

【００５１】

幾つかの実施態様では、ＣＤ３３　ＴＥＡＭはシグナルペプチドを含む。幾つかの実施

態様では、シグナルペプチドは、ＩｇＫシグナルペプチド、ＣＤ８シグナルペプチド、又はＣＤ２７シグナルペプチドである。幾つかの実施態様では、シグナルペプチドは、配列番号：１４、１５又は３３の何れか一つのアミノ酸配列を含み、或いは配列番号：１４、１５又は３３の何れか一つのアミノ酸配列を含むか、又は配列番号：１４、１５又は３３の何れか一つの配列と少なくとも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％、又は少なくとも１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００５２】

幾つかの実施態様では、ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、ＣＤ３３ ｓｃＦｖ、非切断性リンカー、及びＣＤ３ ｓｃＦｖを含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、ＣＤ３３ ｓｃＦｖ、非切断性リンカー、ＣＤ３ ｓｃＦｖ、Ｈｉｓ６タグ、Ｔ２Ａ自己切断性配列、及び蛍光タンパク質（例えば、ｍＣｈｅｒｒｙ）を含む。

【００５３】

幾つかの実施態様では、ＣＤ３３ ＴＥＡＭはコドン最適化されている。コドン最適化は、タンパク質（例えば、ＣＤ３３ ＴＥＡＭ）の発現を改善するタンパク質をコードする核酸配列（例えば、ＣＤ３３ ＴＥＡＭをコードする核酸配列）にサイレント変異を導入するプロセスである。コドン最適化では、タンパク質のアミノ酸配列は変更されない。コドン最適化の方法は、例えば、Ｍａｕｒｏ等，ＢｉｏＤｒｕｇｓ ３２．１（２０１８）：６９－８１に記載されているように、当該技術分野でよく知られている。

【００５４】

幾つかの実施態様では、ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、配列番号：１７～１８の何れか一つと少なくとも８５％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、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％、又は少なくとも９９．５％）同一のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、配列番号：１７～１８の何れか一つのアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、配列番号：１７～１８の何れか一つのアミノ酸配列からなる。

【００５５】

［ＣＤ７０ ＣＡＲ－ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクト］

幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、ここに記載のＣＤ７０ ＣＡＲとここに記載のＣＤ３３ ＴＥＡＭを含む。ここで使用されるコンストラクトとは、一つ又は複数の構成要素を含む（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭを含む）核酸配列又はアミノ酸配列を指す。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ－ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、ここに記載のＣＤ７０に結合することができるＣＤ２７又はその断片を含むＣＤ７０ ＣＡＲを含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ－ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭの間にリンカーを含む。幾つかの実施態様では、リンカーは切断性リンカーである。幾つかの実施態様では、切断性リンカーはプロテアーゼ切断性リンカーである。幾つかの実施態様では、リンカーは自己切断性リンカー（例えば、Ｐ２Ａ（配列番号：３２）、Ｅ２Ａ、Ｆ２Ａ、又はＴ２Ａ（配列番号：３１））である。幾つかの実施態様では、リンカーは配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含む。理論に縛られることはないが、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、融合タンパク質として発現されると、ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭとの間の切断性リンカーで切断を被る場合がある。この切断により、ＣＤ３３ ＴＥＡＭが放出される。ＣＤ３３ ＴＥＡＭは細胞から分泌され得、ＣＤ３３を発現するがん細胞及び免疫細胞（例えば、ＣＡＲ－Ｔ細胞、非形質導入Ｔ細胞、内因性Ｔ細胞、及び／又はＣＤ３を発現するバイスタンダーＴ細胞）に結合しうる。幾つかの実施態様では、ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、ＣＡＲ－Ｔ細胞、非形質導入Ｔ細胞、内因性Ｔ細胞、及び／又はＣＤ３を発現するバイスタンダーＴ細胞を活性化しうる。

【００５６】

幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭはそれぞれ、プロモーター、例えばここに記載のプロモーターに作用可能に連結されている。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭは、同じプロモーターに作用可能に連結されている。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭは、異なるプロモーターに作用可能に連結されている。幾つかの実施態様では、プロモーターは構成的プロモーターであり、ここに記載のものである。幾つかの実施態様では、プロモーターは誘導性プロモーターであり、ここに記載のものである。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭは、ＥＦ１アルファプロモーターに作用可能に連結されている。

【００５７】

幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、ＣＤ７０ ＣＡＲ（例えば、ＣＤ２７ ＣＡＲ）、切断性リンカー（例えば、Ｐ２Ａ）、及びＣＤ３３ ＴＥＡＭを含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、ＣＤ３３ ＴＥＡＭ、切断性リンカー（例えば、Ｐ２Ａ）、及びＣＤ７０ ＣＡＲ（例えば、ＣＤ２７ ＣＡＲ）を含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、切断型ＣＤ２７ ＣＡＲ及びＣＤ３３ ＴＥＡＭを含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、切断型ＣＤ２７（ｔｒＣＤ２７）、ＣＤ８ヒンジ、ＣＤ８膜貫通、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメイン、ＣＤ３ゼータドメイン、Ｐ２Ａ非形質導入切断可能ペプチド、ＩｇＫリーダー、ＣＤ３３ ｓｃＦｖ、及びＣＤ３ ｓｃＦｖを含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、切断型ＣＤ２７（ｔｒＣＤ２７）、ＣＤ８ヒンジ、ＣＤ８膜貫通、４－１ＢＢ細胞内シグナル伝達ドメイン、ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、Ｐ２Ａ切断可能ペプチド、ＩｇＫリーダー、ＣＤ３３ ｓｃＦｖ、非切断性リンカー、及びＣＤ３ ｓｃＦｖを含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、切断型ＣＤ２７（ｔｒＣＤ２７）、ＣＤ８ヒンジ、ＣＤ８膜貫通、４－１ＢＢ細胞内シグナル伝達ドメイン、ＣＤ３ゼータドメイン、Ｐ２Ａ切断可能ペプチド、ＩｇＫリーダー、ＣＤ３３ ｓｃＦｖ、非切断性リンカー、ＣＤ３ ｓｃＦｖ、Ｈｉｓ６タグ、Ｔ２Ａ切断可能ペプチド、及び蛍光タンパク質（例えば、ｍＣｈｅｒｒｙ）を含む。

【００５８】

幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、配列番号：２２～２５の何れか一つと少なくとも８５％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、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％、又は少なくとも９９．５％）同一であるアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、配列番号：２２～２５の何れか一つのアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、配列番号：２２～２３の何れか一つのアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、配列番号：２２～２５の何れか一つのアミノ酸配列からなる。

【００５９】

幾つかの態様では、本開示は、細胞、例えばＴ細胞においてＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトを発現するための核酸分子（例えばベクター）を提供する。幾つかの実施態様では、核酸分子は、ここに記載のＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトをコードするヌクレオチド配列を含む。所望の分子をコードする核酸配列は、当該技術分野で知られている組換え方法を使用して、例えば、標準的な技術を使用して、遺伝子を発現する細胞からライブラリーをスクリーニングすることにより、又は同じものを含むことが知られているベクターから遺伝子を誘導することにより、又は同じものを含む細胞及び組織から直接単離することにより、得ることができる。ここで使用される組換えＤＮＡ及び分子クローニング技術は、当該技術分野でよく知られており、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．及びＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．ＭＯＬＥＣ

ＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，２版；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９；及びＳｉｌｈａｖｙ，Ｔ．Ｊ．，Ｂｅｎｎａｎ，Ｍ．Ｌ．及びＥｎｑｕｉｓｔ，Ｌ．Ｗ．ＥＸＰＥＲＩＭＥＮＴＳ ＷＩＴＨ ＧＥＮＥ ＦＵＳＩＯＮＳ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８４；及びＡｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．等，ＩＮ ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ及びＷｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ出版，１９８７；（それぞれの全体が出典明示によりここに援用される）に記載されている。或いは、目的の遺伝子は、クローン化ではなく、合成により産生することができる。

【００６０】

幾つかの実施態様では、所望のＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトは、トランスポゾンによって細胞内で発現させうる。幾つかの実施態様では、天然又は合成核酸ＣＡＲの発現は、典型的には、ＣＡＲをコードする核酸をプロモーターに作用可能に連結し、そのコンストラクトを発現ベクター中に組み込むことによって達成される。ベクターは、複製及び真核生物への組み込みに適切でありうる。典型的なクローニングベクターには、転写及び翻訳ターミネーター、開始配列、及び所望の核酸配列の発現の調節に有用なプロモーターが含まれる。本開示の発現コンストラクトは、標準的な遺伝子送達プロトコルを使用して、核酸免疫化及び遺伝子治療にまた使用されうる。遺伝子送達の方法は、当該技術分野で知られている。例えば、その全体が出典明示によりここに援用される米国特許第５３９９３４６号、第５５８０８５９号、第５５８９４６６号を参照のこと。

【００６１】

追加のプロモーター要素、例えばエンハンサーは、転写開始の頻度を制御する。典型的には、これらは開始部位の３０～１１０ｂｐ上流の領域に位置しているが、最近、多くのプロモーターが開始部位の下流にも機能的要素を含むことが示されている。プロモーター要素間の間隔は柔軟であることが多いため、要素が反転したり、互いに対して移動したりしても、プロモーター機能は保持される。チミジンキナーゼ（ｔｋ）プロモーターでは、プロモーター要素間の間隔を５０ｂｐまで広げると、活性が低下し始める。プロモーターによっては、個々の要素が協力して又は独立して転写を活性化するように機能できるようである。

【００６２】

適切なプロモーターの一例は、最初期サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに作用可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる強力な構成的プロモーター配列である。適切なプロモーターの別の例は、伸長因子１ａ（ＥＦ－１ａ）である。しかし、他の構成的プロモーター配列をまた使用してもよく、これには、限定されないが、サルウイルス４０（ＳＶ４０）初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）末端反復配列（ＬＴＲ）プロモーター、ＭｏＭｕＬＶプロモーター、鳥類白血病ウイルスプロモーター、エプスタインバーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、並びに限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターが含まれる。更に、本開示は構成的プロモーターの使用に限定されない。誘導性プロモーターもまた本開示の一部として考慮される。誘導性プロモーターの使用は、そのような発現が望まれる場合に作用可能に連結されるポリヌクレオチド配列の発現をオンにし、又は発現が望まれない場合に発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例には、限定されないが、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリンプロモーターが含まれる。幾つかの実施態様では、プロモーターはＥＦ－１ａプロモーターである。

【００６３】

幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトをコードするヌクレオチド配列を含む核酸はベクターである。核酸は、多くのタイプのベクターにクローニングすることができる。例えば、核酸は、限定されないが、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス、及びコスミドを含むベクターにクローニングすることができる。特に興味深いベクターには、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、及びシーケンシングベクターが含まれる。

【００６４】

更に、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供されうる。ウイルスベクター技術は、当該技術分野でよく知られており、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ等（２００１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）、並びに他のウイルス学及び分子生物学マニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスには、限定されないが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及びレンチウイルスが含まれる。一般に、適切なベクターには、少なくとも一つの生物で機能する複製起点、プロモーター配列、簡便な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び一つ又は複数の選択マーカーが含まれる（例えば、国際公開第０１／９６５８４号；国際公開第０１／２９０５８号；及び米国特許第６３２６１９３号）。

【００６５】

哺乳動物細胞への遺伝子導入のために、多くのウイルスベースの系が開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための簡便なプラットフォームを提供する。選択された遺伝子は、当該技術分野で知られている技術を使用して、ベクターに挿入され、レトロウイルス粒子にパッケージ化されうる。その後、組換えウイルスを単離し、インビボ又はエクスビボで対象の細胞に送達することができる。幾つかの実施態様では、レトロウイルスベクターが使用される。幾つかの実施態様では、レンチウイルスベクターが使用される。幾つかの実施態様では、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターをまた使用することができる。

【００６６】

レンチウイルスなどのレトロウイルス由来のベクターは、導入遺伝子の長期にわたる安定した組込みと娘細胞でのその増殖を可能にするため、長期的な遺伝子導入を達成するのに適したツールである。レンチウイルスベクターは、マウス白血病ウイルスなどの腫瘍レトロウイルス由来のベクターに比べて、肝細胞などの非増殖細胞に形質導入できるという追加の利点がある。また、免疫原性が低いという追加の利点もある。ここで使用される「レンチウイルス」は、レトロウイルス科の属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染できる点でレトロウイルスの中でも独特である；それらは宿主細胞のＤＮＡに有意な量の遺伝情報を送達できるため、遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の一つである。ＨＩＶ、ＳＩＶ、及びＦＩＶは全てレンチウイルスの例である。レンチウイルス由来のベクターは、インビボで有意なレベルの遺伝子導入を達成する手段を提供する。

【００６７】

核酸又はタンパク質を細胞に送達するための当該技術分野で知られている任意の方法、例えばトランスフェクション、形質転換、形質導入、又はエレクトロポレーションを使用することができる。ここで使用されている「トランスフェクトされた」又は「形質転換された」又は「形質導入された」という用語は、外来性核酸が宿主細胞に移入又は導入されるプロセスを指す。「トランスフェクトされた」又は「形質転換された」又は「形質導入された」細胞とは、外来性核酸でトランスフェクトされ、形質転換され、又は形質導入された細胞である。細胞には、初代対象細胞とその子孫が含まれる。

【００６８】

［ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭを含む細胞］

幾つかの態様では、この出願は、ここに記載のＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭを含む細胞を開示する。幾つかの実施態様では、細胞は、ここに記載のＣＤ７０ ＣＡＲ－ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトを含む。幾つかの実施態様では、細胞は免疫細胞であ

る。幾つかの実施態様では、免疫細胞は哺乳動物免疫細胞である。幾つかの実施態様では、免疫細胞はヒト免疫細胞である。「免疫細胞」は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞、骨髄由来サプレッサー細胞、間葉系幹細胞、又はそれらの組み合わせ、或いはそれらの任意の前駆体、誘導体、又は前駆細胞でありうる。幾つかの実施態様では、免疫細胞はＴ細胞である。幾つかの実施態様では、免疫細胞はヒトＴ細胞である。

【００６９】

免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位の組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含む、多数の供給源から得ることができる。免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）は、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞又は前駆細胞から産生することもできる。幾つかの実施態様では、限定されないが、当該技術分野で入手可能な、例えばＨｅｐ－２、ジャーカット、及びＲａｊｉ細胞株を含む、任意の数の免疫細胞株を使用することができる。幾つかの実施態様では、免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）は、Ｆｉｃｏｌｌ^{TM}分離などの当業者に知られている任意の数の技術を使用して、対象から採取された血液ユニットから得ることができる。幾つかの実施態様では、個体の循環血液からの細胞は、アフェレーシスによって得られる。アフェレーシス生成物には、典型的には、Ｔ細胞、単球、顆粒球、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、他の有核白血球、赤血球、及び血小板を含むリンパ球が含まれる。幾つかの実施態様では、アフェレーシスによって収集された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、その後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液又は培地に入れることができる。幾つかの実施態様では、細胞はリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄される。幾つかの実施態様では、洗浄液にはカルシウムが含まれず、マグネシウムも含まれず、又は二価カチオンの全てではないにしても多くが含まれない場合がある。また、驚くべきことに、カルシウムが存在しない状態での初期の活性化ステップは、活性化の増大につながる。当業者であれば容易に理解できるように、洗浄ステップは、製造元の指示に従って、半自動「フロースルー」遠心分離機（例えば、Ｃｏｂｅ２９９１細胞プロセッサー、Ｂａｘｔｅｒ ＣｙｔｏＭａｔｅ、又はＨａｅｍｏｎｅｔｉｃｓ Ｃｅｌｌ Ｓａｖｅｒ ５）を使用するなど、当業者に知られている方法で達成されうる。洗浄後、細胞は、例えば、Ca^{2+}フリー、Mg^{2+}フリーのＰＢＳ、ＰｌａｓｍａＬｙｔｅ Ａ、又は緩衝液を伴うか伴わない他の生理食塩水などの様々な生体適合性緩衝液に再懸濁することができる。或いは、アフェレーシスサンプルの望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁することもできる。

【００７０】

幾つかの実施態様では、免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）は、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ^{TM}勾配による遠心分離又は向流遠心溶出法によって、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることによって、末梢血リンパ球から分離される。$CD3^+$、$CD28^+$、ＣＤ４＋、$CD8^+$、$CD45RA^+$、及び$CD45RO^+$Ｔ細胞などの特定のＴ細胞亜集団を、ポジティブ又はネガティブ選択技術によって更に分離することができる。

【００７１】

ネガティブ選択によるＴ細胞集団の濃縮は、ネガティブ選択された細胞に独特の表面マーカーに対する抗体の組み合わせによって達成することができる。一つの方法は、ネガティブ選択された細胞に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用する、陰性磁気免疫接着又はフローサイトメトリーによる細胞選別及び／又は選択である。例えば、ネガティブ選択によって$CD4^+$細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルには、典型的には、ＣＤ１４、ＣＤ２０、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１６、ＨＬＡ－ＤＲ、及びＣＤ８に対する抗体が含まれる。所定の実施態様では、典型的には$CD4^+$、$CD25^+$、$CD62L^{hi}$、$GITR^+$、及び$FoxP3^+$を発現する制御性Ｔ細胞を濃縮又はポジティブ選択することが望ましい場合がある。或いは、幾つかの実施態様では、抗Ｃ２５結合ビーズ又は他の同様の選択方法によってＴ制御性細胞が枯渇される。

【００７２】

改変免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）は、自己由来でありうる。「自己由来」とは、免疫細

胞が対象から得られ、ここに記載のＣＡＲを発現するように改変され、同じ対象に投与されることを意味する。対象に自己細胞を投与すると、非自己細胞の投与と比較して、免疫細胞の拒絶反応が減少する可能性がある。或いは、改変免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）は、同種細胞でありうる。「同種」である細胞は、第一の対象から得られ、ここに記載のＣＡＲを発現するように改変され、第一の対象とは異なるが同じ種の第二の対象に投与される。例えば、同種免疫細胞は、ヒトドナーに由来し、ドナーとは異なるヒトレシピエントに投与されうる。

【００７３】

幾つかの実施態様では、この出願は、ここに記載のＣＤ７０ ＣＡＲ（例えば、ＣＤ２７細胞外結合ドメイン）とＣＤ３３ ＴＥＡＭ（例えば、抗ＣＤ３３抗体と抗ＣＤ３抗体を含む）を含むＣＡＲ－Ｔ細胞を開示する。幾つかの実施態様では、ＣＡＲ－Ｔ細胞は、配列番号：２２～２５の何れか一つのアミノ酸配列をコードするＣＤ７０ ＣＡＲ－ＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトを含む。

【００７４】

［治療方法］

幾つかの実施態様では、この出願は、細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲとＣＤ３３ ＴＥＡＭを含むＣＡＲ－Ｔ細胞）の有効量を対象者に投与することを含む、がん（例えば、ＣＤ７０及びＣＤ３３を発現する細胞を特徴とするがん）を治療する方法を開示する。幾つかの実施態様では、本方法は、ＣＤ７０を発現する細胞を特徴とするがんを治療するためのものであり、その方法は、ここに記載の改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）又は改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）を含む組成物の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む。幾つかの実施態様では、本方法は、ＣＤ７０を発現する細胞とＣＤ７０の発現レベルが低い（すなわち、ＣＤ７０を発現する前述のがん細胞のレベルよりも低い）細胞又はＣＤ７０を発現しない細胞を特徴とするがんを治療するためのものであり、その方法は、ここに記載の改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）又は改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）を含む組成物の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む。幾つかの実施態様では、本方法は、ＣＤ７０を発現するがんを有するか又は有すると診断された対象にＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することを含む。幾つかの実施態様では、その方法は、ＣＤ７０を発現するがん細胞を有する対象にＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することを含む。幾つかの実施態様では、本方法は、ＣＤ７０とＣＤ３３を発現するがん細胞を有する対象にＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することを含む。幾つかの実施態様では、本方法は、ＣＤ３３を発現するがん細胞を有する対象にＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することを含む。幾つかの実施態様では、本方法は、ＣＤ７０ ＣＡＲベースの治療に耐性があるがん細胞（例えば、ＣＤ７０発現が低下しているか、又は変異によりがん細胞のＣＤ７０へのＣＤ７０ ＣＡＲの結合性が低下している）を有する対象にＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することを含む。幾つかの実施態様では、本方法は、ＣＤ７０発現が減少したがん細胞を有する対象にＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することを含む。ここで使用される減少したＣＤ７０発現は、ＣＤ７０ ＣＡＲ Ｔ細胞ががん細胞の死滅を方向付けるのに十分な量のＣＤ７０を発現するがん細胞（例えば、抗ＣＤ７０治療薬でまだ治療されていないＣＤ７０発現がん細胞）と比較して減少している。幾つかの実施態様では、減少したＣＤ７０発現は、抗ＣＤ７０治療薬（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ）でまだ治療されていないＣＤ７０発現がん細胞及び／又は抗ＣＤ７０ ＣＡＲ Ｔ細胞によって死滅化されると予想されるＣＤ７０発現がん細胞と比較して、少なくとも０．１％（例えば、少なくとも０．５％、少なくとも１％、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なく

とも９８％、又は少なくとも９９％）減少している。幾つかの実施態様では、減少したＣＤ７０発現は、Ｍｏｌｍ１３^{WT}細胞のＣＤ７０発現と比較して、少なくとも０．１％（例えば、少なくとも０．５％、少なくとも１％、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％）減少している。幾つかの実施態様では、減少したＣＤ７０発現は、検出可能なＣＤ７０発現がない（例えば、検出可能なＣＤ７０細胞表面発現がない）ことを意味する。

【００７５】

幾つかの実施態様では、本方法は、ここに記載のＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を、ＣＤ７０を発現するがんを有する対象に投与することを含む。当業者であれば、１回以上の投与後、一部のがん細胞ではＣＤ７０発現が低下し、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞に結合しないようになる場合があることを理解するであろう。従って、幾つかの実施態様では、ここに記載のＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞をＣＤ７０を発現するがんを有する対象に投与する方法には、ＣＤ７０発現が低下したがん細胞に一又は複数回のＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することが含まれる。

【００７６】

幾つかの実施態様では、本方法は、ＣＤ７０を発現するがんを有する対象にＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することを含み、がんがＣＤ７０発現を減少させるか、又はそうでなければＣＤ７０ ＣＡＲ－Ｔ細胞に対して耐性となる場合、本方法はＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与することを更に含む。

【００７７】

ここで使用される「治療する」という用語は、標的疾患、標的疾患の症状、又は標的疾患に対する素因を有する対象に、疾患、疾患の症状、又は疾患に対する素因を治癒し、治し、緩和し、軽減し、変更し、治療し、寛解し、改善し、又は影響を及ぼす目的で、一又は複数種の活性剤を含む組成物を適用し又は投与することを指す。

【００７８】

幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を使用した対象におけるがんの治療は、全身毒性をもたらさない。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を使用した対象におけるがんの治療は、ＣＤ３３ ＴＥＡＭ全身毒性をもたらさない。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を使用した対象におけるがん治療は、肝毒性をもたらさない。幾つかの実施態様では、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞を使用した対象におけるがんの治療は、ＣＤ３３ ＴＥＡＭ肝毒性をもたらさない。

【００７９】

幾つかの実施態様では、本方法は、ＣＤ７０を発現する細胞を特徴とするがんを治療するためのものであり、この方法は、ここに記載の改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）又は改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）を含む組成物の有効量と、がんにおけるＣＤ７０の発現を増強する薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【００８０】

ＣＤ７０を発現する細胞を特徴とするがんの例には、限定されないが、膀胱がん、浸潤性乳癌、子宮頸がん、胆管癌、結腸直腸がん、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣ）、食道がん、神経膠芽腫（ＧＢＭ）、頭頸部がん、低悪性度神経膠腫（ＬＧＧ）、肝がん、肺腺がん、メラノーマ、中皮腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、肉腫、胃がん、精巣胚細胞性がん、胸腺腫、甲状腺がん、子宮がん、ブドウ膜黒色腫、淡明細胞型腎細胞癌（ｃｃＲＣＣ）、嫌色素性腎細胞癌、乳頭状腎細胞癌（ｐＲＣＣ）、急性骨髄性白血病、及び腺様嚢胞癌（ＡＣＣ）が含まれる。幾つかの実施態様では、がんはリンパ腫である

。幾つかの実施態様では、リンパ腫は、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、Ｂ細胞リンパ芽球性リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、辺縁帯リンパ腫、又はＴ細胞リンパ腫である。幾つかの実施態様では、がんは白血病である。幾つかの実施態様では、白血病は、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、Ｂ細胞リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、又はＴ細胞白血病である。幾つかの実施態様では、がんは骨髄がんである。幾つかの実施態様では、がんは急性骨髄性白血病である。

【００８１】

本開示の他の態様は、ここに記載の免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）の何れか一つを含む組成物を提供する。幾つかの実施態様では、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）を含む組成物は、がん細胞におけるＣＤ７０発現を増強する薬剤を更に含む。幾つかの実施態様では、薬剤は、がんにおけるＣＤ－７０コード遺伝子の低メチル化をもたらす。幾つかの実施態様では、薬剤はアザシチジン又はデシタビンである。幾つかの実施態様では、組成物は、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）とアザシチジンを含む。幾つかの実施態様では、組成物は、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０を標的とするＣＡＲ－Ｔ細胞）とアザシチジンを含み、アザシチジンは組成物中に１００μＭ以下（例えば、１００μＭ以下、９０μＭ以下、８０μＭ以下、７０μＭ以下、６０μＭ以下、５０μＭ以下、４０μＭ以下、３０μＭ以下、２０μＭ以下、１０μＭ以下、５μＭ以下、１μＭ以下）の濃度を有する。幾つかの実施態様では、組成物は、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）とアザシチジンを含み、アザシチジンは組成物中に１００μＭ、９０μＭ、８０μＭ、７０μＭ、６０μＭ、５０μＭ、４０μＭ、３０μＭ、２０μＭ、１０μＭ、５μＭ、又は１μＭの濃度を有する。

【００８２】

［投与］

幾つかの実施態様では、組成物は薬学的組成物である。幾つかの実施態様では、組成物は、当該技術分野で典型的に用いられる薬学的に許容される担体、添加物又は安定剤（これらの全てが「添加物」と呼ばれる）、例えば緩衝剤、安定化剤、保存料、等張剤、非イオン性界面活性剤、抗酸化剤及び／又は他の種々の添加剤を更に含む。

【００８３】

幾つかの実施態様では、ここに記載の改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）の何れか一つ、又はここに記載の改変免疫細胞を含む組成物の何れか一つが対象に投与される。従って、本開示の幾つかの態様は、ここに記載の改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）又は改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）を含む組成物の何れか一つを対象に投与する方法を提供する。

【００８４】

幾つかの実施態様では、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）と薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）が同時に投与される（例えば、改変免疫細胞と薬剤が投与のための組成物中に製剤化される）。幾つかの実施態様では、組成物は、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞）とアザシチジンを含み、アザシチジンは組成物中に１００μＭ以下（例えば、１００μＭ以下、９０μＭ以下、８０μＭ以下、７０μＭ以下、６０μＭ以下、５０μＭ以下、４０μＭ以下、３０μＭ以下、２０μＭ以下、１０μＭ以下、５μＭ以下、１μＭ以下）の濃度を有する。幾つかの実施態様では、組成物は、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞）とアザシチジンを含み、アザシチジンは組成物中に１００μＭ、９０μＭ、８０μＭ、７０μＭ、６０μＭ、５０μＭ、４０μＭ、３０μＭ、２０μＭ、１０μＭ、５μＭ、又は１μＭの濃度を有する。

【００８５】
幾つかの実施態様では、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）と薬剤は逐次的に投与される。幾つかの実施態様では、薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）は、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞）が投与される前に投与される。幾つかの実施態様では、薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）の投与と、改変免疫細胞の投与との間に待ち期間がある。待ち期間は、薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）ががんにおけるＣＤ７０発現を増強し、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）が投与される前に対象から排除されるための期間である。幾つかの実施態様では、待ち期間は３時間以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、２４時間以上）である。

【００８６】
幾つかの実施態様では、薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）は、薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）に曝露されていない同じがんと比較して、がんにおけるＣＤ７０発現を、少なくとも１０％（例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも１００％、少なくとも２倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、又はそれ以上）増強する。

【００８７】
幾つかの実施態様では、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞）と薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）の両方を対象に投与すると、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞）又は薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）を単独で投与した場合と比較して、治療効果が少なくとも１０％（例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも１００％、少なくとも２倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、又はそれ以上）増強される。治療効果は、例えばがん細胞の除去、対象の生存期間の延長など、当該技術分野で知られている方法によって測定されうる。

【００８８】
ここに記載された方法を実施するために、改変免疫細胞（例えば、ＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞）及び／又はがんにおけるＣＤ７０発現を増強する薬剤（例えば、アザシチジン又はデシタビン）の有効量を、適切な経路（例えば、静脈内注入）を介して対象に投与することができる。免疫細胞集団を、投与前に薬学的に許容される担体と混合して薬学的組成物を形成してもよく、これもまた本開示の範囲内である。

【００８９】
治療される対象は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ブタ、ウシ、ラット、イヌ、モルモット、ウサギ、ハムスター、ネコ、ヤギ、ヒツジ又はサル）でありうる。対象は、がん又は免疫障害（例えば、自己免疫疾患）に罹患している場合がある。

【００９０】
ここで使用される「有効量」という用語は、単独で、又は一又は複数種の活性剤と組み合わせて、対象に治療効果を与えるために必要とされる各活性成分の量を指す。当業者によって認識されるように、有効量は、治療される特定の症状、症状の重症度、年齢、身体状態、サイズ、性別及び体重を含む個々の患者のパラメーター、治療期間、投与経路、添加物の使用、他の活性成分との併用（ある場合）、及び医療従事者の知識及び専門的知識の範囲内の類似の要因に応じて変化する。投与される量は、例えば、個体の免疫系が細胞性免疫応答を生じさせる能力を含み、治療される対象に依存する。投与する必要がある活性成分の正確な量は、医療従事者の判断に依存する。しかし、適切な投薬量の範囲は、当業者であれば容易に決定できる。

【００９１】
ここに記載の治療法は、化学療法、手術、放射線療法、遺伝子療法など、がんの他の種類の治療法と組み合わせて利用されうる。そのような治療法は、ここに記載の免疫療法と

同時に又は逐次的に（任意の順序で）施されうる。追加の治療剤と同時投与される場合、相加作用又は相乗効果により、各薬剤に対する適切な治療有効投薬量を減らすことができる。

【００９２】

ここに記載の改変免疫細胞との組み合わせに有用な他の抗がん治療剤の非限定的な例としては、限定されないが、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、ＰＤＬ１、ＰＤ１、及びＣＴＬＡ４阻害剤）、抗血管新生剤（例えば、ＴＮＰ－４７０、血小板因子４、トロンボスポンジン－１、メタロプロテアーゼの組織阻害剤、プロラクチン、アンジオスタチン、エンドスタチン、ｂＦＧＦ可溶性受容体、トランスフォーミング増殖因子ベータ、インターフェロンアルファ、可溶性ＫＤＲ及びＦＬＴ－１受容体、及び胎盤プロリフェリン関連タンパク質）；ＶＥＧＦアンタゴニスト（例えば、抗ＶＥＧＦ抗体、ＶＥＧＦバリアント、可溶性ＶＥＧＦ受容体断片）；化学療法化合物が含まれる。例示的な化学療法化合物としては、ピリミジンアナログ（例えば、５－フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタビン、ゲムシタビン及びシタラビン）；プリンアナログ（例えば、フルダラビン）；葉酸アンタゴニスト（例えば、メルカプトプリン及びチオグアニン）；抗増殖又は抗有糸分裂剤、例えばビンカアルカロイド；微小管破壊剤、例えば、タキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン及びナベルビン、及びエピジポドフィロトキシン；ＤＮＡ損傷剤（例えば、アクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチネルアミンオキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メルクロレタミン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソウレア、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテール、テニポシド、トリエチレンチオホスホラミド及びエトポシド）が含まれる。

【００９３】

幾つかの実施態様では、放射線、又は放射線と化学療法が、ここに記載の改変免疫細胞を含む細胞集団と組み合わせて使用される。追加の有用な薬剤及び治療法は、Ｐｈｙｓｉｃｉａｎ’ｓ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，５９補版，（２００５），ＴｈｏｍｓｏｎＰＤＲ，Ｍｏｎｔｖａｌｅ Ｎ．Ｊ．；Ｇｅｎｎａｒｏ等編，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０補版，（２０００），Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ及びＷｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ Ｍｄ．；Ｂｒａｕｎｗａｌｄ等編 Ｈａｒｒｉｓｏｎ’ｓ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１５補版，（２００１），ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ，ＮＹ；Ｂｅｒｋｏｗ等編 Ｔｈｅ Ｍｅｒｃｋ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，（１９９２），Ｍｅｒｃｋ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｒａｈｗａｙ Ｎ．Ｊ．に見出すことができる。

【００９４】

この出願を通して引用される、参照文献、発行済み特許、公開特許出願、及び同時係属中の特許出願を含む、全ての特許及びその他の刊行物は、例えば、ここに記載される技術に関連して使用されるかもしれないそのような刊行物に記載された方法論を説明し開示する目的で、出典明示によりここに明示的に援用される。これらの刊行物は、本出願の出願日より前のそれらの開示についてのみ提供される。この点に関し如何なるものも、発明者等が先の技術の理由で又は任意の他の理由のためにそのような開示に先行する権利がないことを自認していると解釈されるべきではない。日付に関する全ての記述又はこれらの文書の内容に関する提示は、出願人が入手できる情報に基づいており、これらの文書の日付又は内容の正確さに関して何ら自認を構成するものではない。

【００９５】

本開示の実施態様の説明は、網羅的であること又は本開示を開示された正確な形態に限定することを意図したものではない。本開示の特定の実施態様及び実施例を例示目的でこ

こで説明するが、関連分野の当業者が認識するように、本開示の範囲内で様々な均等の変形が可能である。例えば、方法の工程又は機能が所与の順序で提示されているが、代替の実施態様では、異なる順序で機能を実行してもよく、又は機能は実質的に同時に実施されてもよい。ここで提供される開示の教示は、必要に応じて他の手順又は方法に適用することができる。ここで説明される様々な実施態様は、更なる実施態様を提供するために組み合わせることができる。本開示の態様は、必要に応じて、上記の参考文献及び出願の組成物、機能、及び概念を用いて本開示のまた更なる実施態様を提供するように変更することができる。更に、生物学的機能の均等性の考慮により、種類又は量において生物学的又は化学的作用に影響を与えることなく、タンパク質構造に幾らかの変更を加えることができる。詳細な説明に照らして、これらの変更及び他の変更を本開示に加えることができる。そのような変更は全て、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【００９６】

前述の実施態様の何れかの特定の要素は、他の実施態様の要素と組み合わせるか、又は置き換えることができる。更に、本開示の所定の実施態様に関連する利点をこれら実施態様の文脈において説明したが、他の実施態様もまたそのような利点を示し得、全ての実施態様が本開示の範囲内に入るために必ずしもそのような利点を示す必要はない。

【００９７】

ここに記載される技術は、決して更なる限定であると解釈されるべきではない、次の実施例によって更に例証される。

表1：配列

配列番号	名称	配列
1	CD70 CAR 細胞外標的結合ドメイン	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECD
2	CD70 CAR 1	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
3	CD70 CAR 2	EQKLISEEDLATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
4	CD70 CAR 3	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
5	CD70 CAR 4	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
6	CD70 CAR 5	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
7	CD70 CAR 6	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
8	CD27	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHP

		QPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSS DFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCP REEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
9	CD27 CD70 結合ドメイン	TRPHCESCRHCN
10	CD27 膜貫通ドメイン	ILVIFSGMFLVFTLAGALFL
11	CD3-ゼータ シグナル伝達 ドメイン	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
12	4-1BB 共刺激 シグナル伝達 ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
13	CD27 ストーク 及びヒンジ	PLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQ LPARTLSTHWPPQRSLCSSDFIR
14	CD27 シグナル ペプチド	MARPHPWWLCVLGTLVGLS
15	CD8 リーダー 配列	MALPVTALLLPLALLLHAARP
16	Myc タグ	EQKLISEEDL
17	CD33 (VL/VH) TEAM	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFQQKPGKAPK LLMYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQTKE VPWSFGQGTKVEVKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKN RATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLVT VSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQ RPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGS GGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSP KRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWS SNPLTFGAGTKLELK
18	CD33 (VH/VL) TEAM	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWI GYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYC VNGNPWLAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTL SASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFQQKPGKAPKLLMYAASNQG SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTK VEVKGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVK QRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGG SGGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTS PKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQW SSNPLTFGAGTKLELK
19	抗 CD33 scFv VL	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFQQKPGKAPK LLMYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQTKE VPWSFGQGTKVEVK
20	抗 CD33 scFv VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWI GYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYC VNGNPWLAYWGQGTLVTVSS
21	抗 CD3 scFv	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEW IGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQ SPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKV ASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGT

		KLELKHHHHHH
22	CD27 CAR - CD33 TEAM (VH/VL) [CD27-シグナル-trCD27-CD8H/TM-4-1BBz-CD33H-CD33L-CD3 CAR-TEAM]	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPG TFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLV RNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPRSGGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHMETDTLLLW VLLLWVPGSTGDEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHW VRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELS SLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFQQKPGKAP KLLMYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQTK EVPWSFGQGTKVEVKGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGY TFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEG GSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYM NWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
23	CD27 CAR - CD33 TEAM (VL/VH) [CD27-シグナル-trCD27-CD8H/TM-4-1BBz-CD33L-CD33H-CD3 CAR-TEAM]	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPG TFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLV RNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPRSGGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHMETDTLLLW VLLLWVPGSTGDDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFL TWFQQKPGKAPKLLMYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPD DFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPY NGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNP WLAYWGQGTLVTVSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGY TFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEG GSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYM NWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
24	CD27 CAR - CD33 TEAM (VH/VL) [CD27-シグナル-trCD27-CD8H/TM-4-1BBz-CD33H-CD33L-CD3 CAR-TEAM (mCherry 含む)]	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPG TFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLV RNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHP QPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSS DFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGGSGATNFSLLK QAGDVEENPGPMHMETDTLLLWVLLLWVPGSTGDEVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQ KFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SESLDNYGIRFLTWFQQKPGKAPKLLMYAASNQGSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPDDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVKGGGGSDIKL

		QQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYI NPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARY YDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSPA IMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASG VPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLE LKHHHHHH
25	CD27 CAR－CD33 TEAM（VL/VH） [CD27-シグナル-trCD27-CD8H&TM-4-1BBz-CD33L-CD33H-CD3 CAR-TEAM（mCherry 含む）]	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPG TFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLV RNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHP QPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSS DFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGGSGATNFSLLK QAGDVEENPGPMHMETDTLLLWVLLLWVPGSTGDDIQLTQSPSTLSA SVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFQQKPGKAPKLLMYAASNQGSG VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVE VKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTIT DSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNT AYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLVTVSSGGGGSDIKL QQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYI NPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARY YDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSPA IMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASG VPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLE LKHHHHHH
26	リンカー1（G3S)3	GGGSGGGSGGGS
27	リンカー2（G4S)3	GGGGSGGGGSGGGGS
28	リンカー3（G4S)4	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
29	リンカー4	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
30	リンカー5	GGSSRSSSSGGGGSGGGG
31	T2A	SGGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR
32	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
33	IgK－シグナル配列	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD
34	リンカー	GGGS
35	リンカー－（G3S)20	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
36	リンカー－（G3S)7	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
37	リンカー－（G3S)2	GGGSGGGS
38	リンカー－（G3S)4	GGGSGGGSGGGSGGGS
39	リンカー－（G3S)5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
40	リンカー－（G3S)6	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
41	リンカー－（G4S)2	GGGGSGGGGS
42	リンカー－（G4S)5	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
43	リンカー－（G4S)6	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

【実施例】

【００９８】

急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）は、成人における最も一般的な急性白血病であり、半世紀前は一様に致命的であったが、現在では成人の症例の４０％において強化化学療法により治癒が可能である[1]。これは大幅な改善を表しているが、治癒率が急速に１０％を下回る高齢及び再発／難治性患者に対して著しい未充足の臨床ニーズが残っている[1]。ＡＭＬの治療は、強化「導入」細胞傷害性化学療法の登場以来５０年以上ほとんど変わっていないが、２０１７年以降、ヘッジホッグ、ＢＣＬ－２、ＦＬＴ３、ＩＤＨ１／２の阻害剤、ＣＤ３３抗体薬物複合体、並びに導入化学療法のより強力なリポソーム製剤を含む８種の薬

剤がＦＤＡ承認されている[2]。これらの介入治療は大きな進歩を表すが、ＡＭＬ患者の大多数は依然として反応しないか又は再発し、その病気で死亡している。

【００９９】

免疫療法革命は、多くの悪性腫瘍で劇的な反応を示してきた[3]。しかし、この治療法はＡＭＬでは限られた成功しか収めていないが、これはおそらく、骨髄由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）、Ｔ制御細胞（T_{reg}）、及びエフェクター（T_{eff}）細胞が豊富な免疫抑制性微小環境と相まって、腫瘍の遺伝子変異数が低いためにネオ抗原が不足するためである[4－8]。新たに診断されたＡＭＬ患者と再発ＡＭＬ患者のＴ細胞サブセットと免疫チェックポイントの発現に関する最近の研究において、ＡＭＬ患者では健康な対照と比較してT_{reg}と消耗したT_{eff}細胞が豊富であることが特定された[9]。

【０１００】

Ｔ細胞プライミングと限られた天然ＴＣＲレパートリーを迂回する一つの方法は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を用いてＴ細胞をリダイレクトし、ＣＡＲ－Ｔ細胞を養子免疫療法として注入することである。ＣＡＲ－Ｔ細胞療法は、２０１７年に高悪性度のＢ細胞悪性腫瘍２件[10，11]、現在では合計４件に対してＦＤＡ承認を取得し、リンパ系悪性腫瘍の治療に急速に革命をもたらした。これらの療法は悪性クローンの破壊をもたらすが、標的腫瘍外効果も生じ、正常なＢ細胞が排除されて低ガンマグロブリン血症を引き起こすが、幸いなことに、これは静脈内免疫グロブリンの投与によって管理可能である。

【０１０１】

ＡＭＬの治療に養子細胞療法を使用することは、より困難であった。ＡＭＬ芽球に存在する利用可能な表面抗原の大部分は、多くの骨髄及び幹細胞集団にも存在し、その長期的なアブレーションは生存と両立しない。ＡＭＬにおける多くの異なる抗原を標的とするＣＡＲが最近開示されており（ＣＤ１２３[12，13]、ＣＤ３３[14，15]、ＦＬＴ３[16]）、そのうちの幾つかは現在第Ｉ相臨床試験中であるが、何れもリンパ系悪性腫瘍に対するＣＤ１９ほど理想的なものではない[17]。これらのうち少なくとも一つは、治療を受けた最初の患者が死亡するなど、重篤な副作用を引き起こしたが、これは、ＣＡＲが正常な脈管構造上のＣＤ１２３を標的とすることによる副作用が原因である可能性がある[18]。

【０１０２】

ＣＤ７０は、Ｔ細胞シグナル伝達に関与するＣＤ２７のリガンドとして機能する腫瘍壊死アルファファミリーメンバーである。ＣＤ７０は正常組織では極めて限定的に発現するが、ＡＭＬを含む多くのがん型では顕著に過剰発現する[19，20]。ＣＤ７０を標的とする最初のＡＭＬ薬で、抗体薬物複合体（ＡＤＣ）であるＡＲＧＸ－１１０は、伝統的な治療法に適さない新たに診断されたＡＭＬ患者を対象とした第Ｉ相試験で印象的な奏効率を示した[21]。ＣＤ１９を標的とする二重特異性Ｔ細胞エンゲージャーであるブリナツモマブに関するこれまでの限られた経験から、ＣＡＲ－Ｔ細胞は効果的である一方で、伝統的な抗体ベースの治療法よりも臨床効果が高い可能性があることが示唆されている[22]。

【０１０３】

ＣＡＲ－Ｔ毒性の臨床管理が改善されたことにより、リンパ系悪性腫瘍に対するＣＡＲ－Ｔ細胞療法が現在直面している重大な問題は再発である（図２）。特にＢ細胞急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）では、再発した患者の最大９４％で標的抗原の喪失が起こる場合がある[23]。厳しい現実として、適切に選択された標的抗原の発現が僅かに低下するだけでも、ＣＡＲによる殺傷を逃れるのに十分な場合がある[24]。抗原エスケープの課題に対処するために、幾つかの戦略が採用されている：連結された単鎖可変断片を含む二つの抗原を標的とする二重特異性ＣＡＲ（タンデムＣＡＲ）、又は同じＴ細胞で発現される二つの完全に別々のＣＡＲ（バイシストロニックＣＡＲ）は、現在、様々な成功を収めながら初期段階の臨床試験が行われている[25－29]。我々は最近、複数の抗原を同時に標的とし、腫瘍部位に限定された局所的なＴＥＡＭ分泌を介して標的毒性を最小限に抑える、二重特異性Ｔ細胞エンゲージ抗体分子（ＴＥＡＭ）分泌ＣＡＲ－Ｔ細胞（ＣＡＲ－ＴＥＡＭ）を利用した別の新規二重標的戦略を開発した[30]。この技術には、ＣＡＲから分泌されたＴＥＡＭを介して（複数のウイルス組込みイベントを防ぐために低いＭＯＩが必要な

ため）臨床グレードのＣＡＲ－Ｔ細胞産物に注入された細胞全体の７０％超を典型的には占める、形質導入されていない（が注入された）Ｔ細胞を活用できるという追加の利点がある。特にＡＭＬでは、単一の固有抗原の均一な発現がないため、標的抗原の発現を高める戦略又は多重標的アプローチが賢明でありうることが示唆される[19]。一つの特によく特徴付けられたＡＭＬ抗原はＣＤ３３で、これは白血病性芽球の最大９０％で発現している（正常な骨髄細胞及び一部の前駆細胞でも発現しているが、ＣＤ３４$^{+}$幹細胞では発現していない[31]）[32]。ＡＭＬ細胞株及び一次患者サンプルの包括的なＡＭＬサーフェーソーム解析により、ＡＭＬにおけるＣＤ３３とＣＤ７０の同時標的化が、重複しないバイスタンダー組織毒性を有する患者の９７％以上で実行可能であることが予測された[19]（図３Ａ～３Ｃ）。同時に抗原異質性に対処し、$T_{conventional}$、T_{reg}、及び消耗したT_{eff}の動員を通じて局所抗腫瘍活性を促進し、免疫抑制性ＭＤＳＣを排除するために、ＣＤ３／ＣＤ３３ ＴＥＡＭ分泌ＣＤ７０標的ＣＡＲ（ＣＡＲ－ＴＥＡＭ）を作製した（図１及び図５Ａ）。

【０１０４】

ＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞は骨髄に移動し、そこでＡＭＬ芽球を溶解すると同時に、ごく少量のＣＤ３３ ＴＥＡＭを局所的に送達して$T_{conventional}$細胞とエンゲージさせ、ＡＭＬ芽球及びＭＤＳＣに対するＣＤ７０標的ＣＡＲの作用を更に増強するが、ヒトにおけるＴＥＡＭの極めて急速なクリアランスにより全身毒性は引き起こさない[22]（図４）。

【０１０５】

バイシストロニックベクターのサイズが大きいにもかかわらず、ｔｒＣＤ２７－ＣＡＲ－ＣＤ３３－ＴＥＡＭは、３人の健康なドナーのＴ細胞で６０％を超える、単一標的コンストラクトと同等の導入効率を示した（図５Ｂ）。結果は、ＴＥＡＭがＣＡＲ－Ｔ細胞によって分泌されることを示している（図５Ｃ）。結果はまた、ｔｒＣＤ２７－ＣＡＲ－ＣＤ３３－ＴＥＡＭの上清からのＴＥＡＭが標的発現細胞に特異的に結合することを示している（図５Ｄ）。結果はまた、ＣＤ３３ＴＥＡＭが、ＣＤ６９を発現する細胞の割合を減少させることを示した（図５Ｅ）。

【０１０６】

追加の実験では、（１）ＣＤ３３を発現する、（２）ＣＤ３３を発現しない、（３）ＣＤ７０を発現しない、Ｍｏｌｍ１３細胞の治療においてｔｒＣＤ２７－ＣＤ３３－ＴＥＡＭ及びｔｒＣＤ２７－ＣＤ１９－ＴＥＡＭコンストラクトを比較した。ＣＤ７０ＣＡＲ^{CD33TEAM}若しくはＣＤ７０ＣＡＲ^{CD19TEAM}コンストラクトを形質導入した細胞、又は非形質導入Ｔ細胞（ＵＴＤ）をトランスウェルインサートの上部に添加した。非形質導入Ｔ細胞をＭｏｌｍ１３^{WT}又はＭｏｌｍ１３^{CD33KO}細胞と共にトランスウェルインサートの底部に添加した。ＣＤ７０ＣＡＲ^{CD33TEAM}コンストラクトのみがＭｏｌｍ１３^{WT}細胞クリアランスを媒介することができ、これは標的依存的であり、ＣＤ３３の喪失によって無効になった。底部にＵＴＤがないウェルも腫瘍を殺傷することができず、殺傷がＴＥＡＭ単独ではなくＵＴＤ＋ＴＥＡＭによって媒介されたことが実証された（図６）。これらの結果は、ＴＥＡＭがＵＴＤ駆動の標的依存性細胞傷害を媒介することを示している。実験ではまた、ＣＡＲとＴＥＡＭを介した同時Ｔ細胞リダイレクトが異種腫瘍に対して有効であり、個々のＣＡＲの混合物よりも優れていることも示された。個別に標的化されたＣＤ７０又はＣＤ３３ＣＡＲ－Ｔ細胞を、異なるレベルのＣＤ７０又はＣＤ３３を含むＡＭＬ標的に対して、ＣＤ７０ＣＡＲ^{CD33TEAM}又はＣＤ７０ＣＡＲ^{CD19TEAM}と比較した（図７Ａ、左）。ＣＤ７０ＣＡＲ^{CD33TEAM}細胞は、エフェクター対標的比２：１で、インキュサイトでのこのリアルタイム細胞傷害アッセイで優れた細胞傷害性とＣＡＲ増殖を示した（図７Ａ～７Ｂ）。ＣＡＲ－Ｔ細胞は、３人の健康なドナーのＴ細胞から二組、製造した。

【０１０７】

次に、ＣＤ７０ＣＡＲ^{CD33TEAM}を、インビボでＡＭＬの異種移植モデルにおける有効性について試験した。ＮＳＧマウスに、生物発光（ＢＬＩ）レポーターであるクリッ

クビートルグリーンを発現する５×１０^{5}個の混合集団Ｍｏｌｍ１３細胞（９０％ Ｍｏｌｍ１３^{ＣＤ７０ＫＯ}、１０％ Ｍｏｌｍ１３^{ＷＴ}、ｎ＝１０マウス／群）を－７日目に注射した（図８Ａ）。０日目に、マウスに２×１０^{6}個のＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}又はＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}細胞の何れかを投与した（各群につき個々のＴ細胞ドナー当たりｎ＝５マウス）。連続ＢＬＩモニタリングにより、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}マウス群の腫瘍が根絶されが、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}では腫瘍増殖が制御不能であることが明らかになった（図８Ｂ～８Ｃ）。ＣＡＲ－Ｔ注射後１４～２８日目に、フローサイトメトリーによって末梢血増殖を定量した（図８Ｄ）。ＣＡＲ－Ｔ注射後２１日目にマウスの血液からフローサイトメトリーによって末梢血ＣＡＲ－Ｔ表現型プロファイリングをまた実施し、刺激を受けず、形質導入されていない、ドナーが一致したＴ細胞と比較した（図８Ｅ）。

【０１０８】

ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}細胞もまた、インビボでＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}細胞と比較して異なる発現プログラムを示すことが分かった。ＣＡＲ－Ｔ細胞を、混合腫瘍モデルのマウスの脾臓から蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）によって分離した。次に、ＣＡＲ－Ｔ細胞を溶解し、カスタムの「ドロップイン」遺伝子セットに加えてＣＡＲ－Ｔ特性評価パネルを用いてナノストリングを介して遺伝子発現解析を行った（図９Ａ～９Ｃ）。

【０１０９】

次に、患者由来の異種移植ＡＭＬマウスモデルに投与されるＣＡＲ－Ｔ細胞の用量を減らすことで治療効果が変化するかどうかを決定した。５×１０^{5}個及び１×１０^{6}個のＣＤ７０ ＣＡＲ ＣＤ３３ ＴＥＡＭ ＣＡＲ－Ｔ細胞の用量を投与した（図１０）。結果は、両方の用量でこのマウスのＣＤ３３＋／ＣＤ４５＋細胞（腫瘍）の数に同様の減少を示した。

【０１１０】

全体として、これらの知見は、ＣＤ３３及びＣＤ７０抗原発現が変動する腫瘍標的に対してＣＤ３３標的Ｔ細胞エンゲージ抗体分子を分泌するＣＤ７０標的ＣＡＲの効力を実証している。

【０１１１】

特によく特徴付けられているＡＭＬ抗原の一つはＣＤ３３で、これは白血病芽球の最大９０％で発現している^{31}（正常な骨髄細胞及び一部の前駆細胞にも発現しているが、ＣＤ３４＋幹細胞には発現していない^{32}）。重要なのは、モノクローナル抗体を用いた骨髄自家移植の治療によるＣＤ３３＋細胞の除去により、分化が決まった骨髄前駆細胞が除去される一方で、遅延しながらも正常な三線形造血が起こることである^{33}。意外なことに、ＣＤ３３は肝細胞にも見出され、ＣＤ３３ ＡＤＣであるゲムツズマブオゾガマイシン（ＧＯ）による治療は、肝静脈閉塞症（ＶＯＤ）という形で致命的な肝毒性を引き起こした^{34}。ＣＤ３３は、ＡＭＬ患者の骨髄中の免疫抑制性ＭＤＳＣにも見出されうる。最近、ＣＤ３／ＣＤ３３二重特異性Ｔ細胞エンゲージャーを使用するこれらのＭＤＳＣとＡＭＬの相乗的標的化がインビトロで成功したことが実証された^{35}。ＡＭＬ細胞株と一次患者サンプルの包括的なＡＭＬサーフェーソーム解析により、ＡＭＬにおけるＣＤ３３とＣＤ７０の同時標的化は、重複しないバイスタンダー組織毒性を有する患者の９７％以上で実行可能であると予測された^{19}。

【０１１２】

同時に抗原異質性に対処し、Ｔｃｏｎｖｅｎｔｉｏｎａｌ、Ｔｒｅｇ、及び消耗したＴｅｆｆの動員を通じて局所抗腫瘍活性を促進し、免疫抑制性ＭＤＳＣを排除するために、以前に最適化されたＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔプラットフォームに基づいて、ＣＤ３／ＣＤ３３ ＴＥＡＭ分泌ＣＤ７０標的ＣＡＲ（ＣＡＲ－ＴＥＡＭ）を作製し、試験した^{36}。

【０１１３】

ＡＭＬの患者由来異種移植モデルにおいて、改変されたヒンジと膜貫通ドメインを含む第二世代リガンドベースのＣＤ７０標的ＣＡＲコンストラクトが、未改変型と比較して、

プロテアーゼ媒介ＣＡＲ断頭を無効にするのに優れていることが以前に実証された（Ｌｅｉｃｋ等 ２０２２）。しかし、一部のマウスではＣＤ７０抗原発現が失われた（図１１Ａ）。ＣＤ３３は、ＡＭＬ芽球の大部分で高度に発現している骨髄抗原であり（実際、ＰＤＸモデルでは高レベルで発現していた（図１１Ｂ））、ＣＡＲ－Ｔ細胞によるＣＤ３３とＣＤ７０の複合標的化により、重複しないバイスタンダーによる腫瘍外毒性を伴うＡＭＬの大部分が排除されると示唆されている（Ｐｅｒｎａ等 ２０１７）。従って、最適化されたＣＤ７０標的ＣＡＲを、７０^{33}と呼ばれるＣＤ３３標的Ｔ細胞エンゲージ抗体分子（ＴＥＡＭ）を分泌するように改変することにより、二重標的化戦略を開発するためのプラットフォームとして利用した（図１１Ｃ）。下流の試験では、このコンストラクトをＣＤ３３標的ＣＡＲ（ＣＡＲ３３）及び、典型的なＡＭＬ症例では見られない抗原であるＣＤ１９標的ＴＥＡＭ７０^{19}を分泌した対照型と比較した（図１１Ｄ）。分泌型ＴＥＡＭの追加ペイロードにもかかわらず、形質導入効率は健康なドナーのＴ細胞全体で十分以上であり、ＣＡＲ３３と同等であった（図１１Ｅ）。

【０１１４】

ＴＥＡＭ分子のその意図した抗原への適切な標的結合を確実にするために、コンストラクトの各々を形質導入したジャーカットＴ細胞から上清を採取し、関連する抗原を発現する標的細胞と共にインキュベートし、フローサイトメトリーによってＴＥＡＭの存在をアッセイした（図１２Ａ）。７０^{33}上清はＣＤ３３発現Ｋ５６２並びに非形質導入Ｔ（ＵＴＤ）細胞に結合し、７０^{19}上清はＣＤ１９発現Ｋ５６２及びＵＴＤに結合することが見出された。別個の確認アッセイでは、７０^{33}又は７０^{19}上清を固定化ｍｏｌｍ１３腫瘍標的に添加し、続いて抗Ｈｉｓ－ＰＥ抗体を加えることで、顕微鏡でＴＥＡＭ結合の可視化を可能にした（図１２Ｂ）。

【０１１５】

次に、ＴＥＡＭ分子がバイスタンダーＴ細胞を活性化する能力を評価するために、固定化された腫瘍標的、ＵＴＤ Ｔ細胞、及び活性化マーカーＣＤ６９に対する抗体を含むウェルに７０^{33}、７０^{19}、又はＵＴＤ上清を添加した。７０^{33}上清は、ＵＴＤ上清と区別がつかなかった７０^{19}（ｐ＝．０００１）よりも有意に多くのＵＴＤ ＣＤ６９発現をもたらすことが見出された（図１２Ｃ）。最後に、ＴＥＡＭの細胞溶解能を確認するために、ＴＥＡＭ産生細胞を、細胞が通過するには小さ過ぎるがタンパク質が通過するには十分に大きいトランスウェルインサートの上部に配置する一方、腫瘍標的とＵＴＤを底部に配置したトランスウェルアッセイを実施した（図１２Ｄ）。７０^{33}産生細胞をトランスウェルの上部に配置し、ＵＴＤを底部に含めた場合にのみ、腫瘍が除去された（ｐ＝．０１８）。この現象は標的特異的であり、Ｍｏｌｍ１３^{ＣＤ３３ＫＯ}はトランスウェルインサートの上部に７０^{33}又は７０^{19}があったかどうかに関係なく同じ速度で増殖した（ｐ＝．９７）。

【０１１６】

ＣＤ３３ ＴＥＡＭ分子の特異性と細胞溶解能を確認した後、異なるレベルのＣＤ３３及びＣＤ７０抗原発現下で全体のコンストラクトがどのように機能するかを調査した。ＣＡＲ３３、７０^{19}、７０^{33}の殺傷能を野生型及び改変ｍｏｌｍ１３細胞株と比較したところ、７０^{33}ＣＡＲ－Ｔ細胞は、７０^{19}（ｐ＝．０６４）に対するｍｏｌｍ１３^{ＷＴ}、ＣＡＲ３３（ｐ＝．００７）に対するｍｏｌｍ１３^{ＣＤ３３ＫＯ}、及び７０^{19}（ｐ＜．０００１）に対するｍｏｌｍ１３^{ＣＤ７０ＫＯ}に対して優れた細胞傷害性を媒介することが見出された（図１３Ａ～１３Ｃ）。７０^{33}ＣＡＲ－Ｔ細胞がまた、各並び替えにわたって最も高い増殖レベルを有していた（図１３Ｂ）。ＡＭＬ細胞株Ｋａｓｕｍｉ１、Ｍｏｎｏｍａｃ１、及びＯＣＩ－ＡＭＬ３において異なる天然レベルのＣＤ３３及びＣＤ７０を標的とするために７０^{33}を使用した場合にも同様の結果が見られた（図１７）。

【０１１７】

二重標的７０^{33}系のインビトロ効力を確立した後、元のＰＤＸモデルに戻り、この戦略が元の最適化されたＣＤ７０ ＣＡＲよりも改善されたかどうかを確認した。ＰＤＸモデルのストレスバージョンでは、ＮＳＧマウスに－４日目に５×１０^{6}個の新鮮なＰＤＸ

細胞を注入し、続いて０日目に５×１０^{5}個又は１×１０^{6}個の７０^{33}又は７０^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞（それぞれ以前の治療用量の１／２と１／４）を注射した（図１４Ａ）。７０^{33}ＣＡＲ－Ｔ細胞は、両方の用量レベルで、＋１４日目までに優れた腫瘍制御（それぞれｐ＝．００２８、ｐ＝．００５９、図１４Ｂ）、数値的に高い増殖（それぞれｐ＝．７８、ｐ＝．１３、図１４Ｃ）、及び生存期間の延長（両方ともｐ＝．０２７、図１４Ｄ）をもたらした。

【０１１８】

ＣＤ７０ ＣＡＲ単独療法後に以前に特定されていたＣＤ７０抗原エスケープをより正確にモデル化するために、５×１０^{5}個のＭｏｌｍ１３^{WT}細胞及びＭｏｌｍ１３^{CD70KO}細胞の混合物をＮＳＧマウスに－７日目に注射し、続いて７日後の０日目に２×１０^{6}個の７０^{19}、７０^{33}、又はＵＴＤ細胞を注射した（図１５Ａ）。７０^{33}ＣＡＲ－Ｔ細胞は、全ての時点で７０^{19}と比較して有意に高い増殖を示した（＋１４日目；ｐ＝．０５３、＋２１日目；ｐ＝０．１３、＋２８日目；ｐ＝．０００８７）。生物発光イメージングによって評価した腫瘍は、両方の健康なドナーからのＣＡＲ－Ｔ細胞によって＋１８日目までに７０^{33}マウスで根絶されたが、７０^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞は腫瘍増殖を制御できなかった（ｐ＝０．０００３、図１５Ｃ～１５Ｄ）。＋２１日目には、両方のコンストラクトが主にセントラルメモリー様表現型をとった（図１５Ｅ）。

【０１１９】

これら二つのＣＡＲ－Ｔ細胞の挙動を駆動する異なる転写プログラムがあったかどうかを理解するために、＋２８日目に各群のマウスの脾臓を収集し、ＣＡＲ－Ｔ細胞に対してＦＡＣＳ分取を実施し、その後、標的遺伝子発現解析を行った（図１５Ｆ）。ＪＡＫ２及びＭＹＣのようなＣＡＲ－Ｔ細胞増殖シグナル伝達のキープレイヤーは７０^{33}でより高く、ＣＩＳＨ及びＰＤＣＤ１（ＰＤ－１）のようなＴ細胞機能のネガティブレギュレーターは７０^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞でより高くなった。興味深いことに、ＮＫ細胞のような表現型の採用はＣＡＲ－Ｔ機能不全と関連していたため（Ｇｏｏｄ等 ２０２１）、７０^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞と比較して７０^{33}で発現の倍率変化が最も高かった遺伝子はＮＫ細胞受容体ＮＣＲ１であった。不偏経路クラスタリングの結果、活性化、細胞傷害性、及び持続性におけるシグネチャースコアに重要な違いがあるそれぞれのＣＡＲコンストラクトがまとめられた（図１５Ｇ、図１８）。７０^{33}ＣＡＲ－Ｔ細胞におけるＴＣＲシグナル伝達の有意に高いパスウェイスコアは、ＣＡＲとＴＣＲ（ＴＥＡＭとのエンゲージによる）を介した同時ＣＡＲ－Ｔ活性化を示唆している（図１５Ｈ）。

【０１２０】

がん患者におけるＣＡＲ－Ｔ細胞療法の一つの限界は、がん自体の免疫抑制効果、又は強化化学免疫療法によるＴ細胞の損傷のために、製造基質として使用される本質的に欠陥のあるＴ細胞であったことである（Ｄａｓ等 ２０１９；Ｆｒａｉｅｔｔａ等 ２０１８）。ここに記載されるＴＥＡＭがＡＭＬ患者のＴ細胞をうまく活用してＡＭＬを標的にする能力を評価するために、同種骨髄移植を含む様々な強化化学療法と免疫療法を受けたＡＭＬ患者からＰＢＭＣを採取した（図１６Ａ）。Ｔ細胞を単離し、フローサイトメトリーによる表現型解析を実施した。ＡＭＬ患者のＴ細胞は、健康なドナーＴ細胞と比較して、より分化して消耗した表現型であることが見出された（図１６Ｂ～１６Ｃ）。ＡＭＬ患者の細胞は、腫瘍の存在下で有意な活性化を示したが（ｐ＝．０３６）、健康なドナーＴ細胞と比較するとレベルは低かった（ｐ＝．００５２、図１６Ｇ）。ＴＥＡＭを介してリダイレクトされたバイスタンダーとして作用するＡＭＬ患者Ｔ細胞の細胞傷害性を評価するために、その単離されたＴ細胞をＴＥＡＭ産生細胞及びＡＭＬ標的と共培養した。ＡＭＬ患者は一様に有意な細胞傷害性を示した（ｐ＝．０００２、健康なドナーＴ細胞（ｐ＝．０１７）よりは効力が低かった、図１６Ｄ）。ＡＭＬ患者のＴ細胞は炎症性サイトカインを産生したが、興味深いことにＩＦＮｇを除いて健康なドナーＴ細胞より数は少なかった（図１６Ｅ）。

【０１２１】

［参考文献］

1. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. New England Journal of Medicine 2015;373(12):1136-1152. DOI:10.1056/NEJMra1406184。
2. Guerra VA, DiNardo C, Konopleva M. Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia. Best practice & research Clinical haematology 2019;32(2):145-153。(In eng)。DOI:10.1016/j.beha.2019.05.008。
3. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. The New England journal of medicine 2017;377(25):2500-2501. (In eng). DOI:10.1056/NEJMc1713444。
4. Daver NG, Basu S, Garcia-Manero G等 Phase IB/II study of nivolumab with azacytidine (AZA) in patients (pts) with relapsed AML. Journal of Clinical Oncology 2017;35(15_suppl):7026-7026. DOI:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.7026。
5. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P等 Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature 2013;499(7457):214-218. (In eng). DOI:10.1038/nature12213。
6. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L等 Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. New England Journal of Medicine 2016;374(23):2209-2221. DOI:10.1056/NEJMoa1516192。
7. Pyzer AR, Stroopinsky D, Rosenblatt J等 Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Expanded in Patients with AML and Are Dependent on MUC1 Expression. Blood 2014;124(21):226-226. DOI:10.1182/blood.V124.21.226.226。
8. Alex AA, Tartour E, Gey A等 Myeloid Derived Suppressor Cells in Acute Leukemia and Its Association with Conventional Cytogenetic and Molecular Risk Factors. Blood 2012;120(21):1446-1446. DOI:10.1182/blood.V120.21.1446.1446。
9. Williams P, Basu S, Garcia-Manero G等 The distribution of T-cell subsets and the expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia. Cancer 2019;125(9):1470-1481. DOI:10.1002/cncr.31896。
10. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA等 Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B

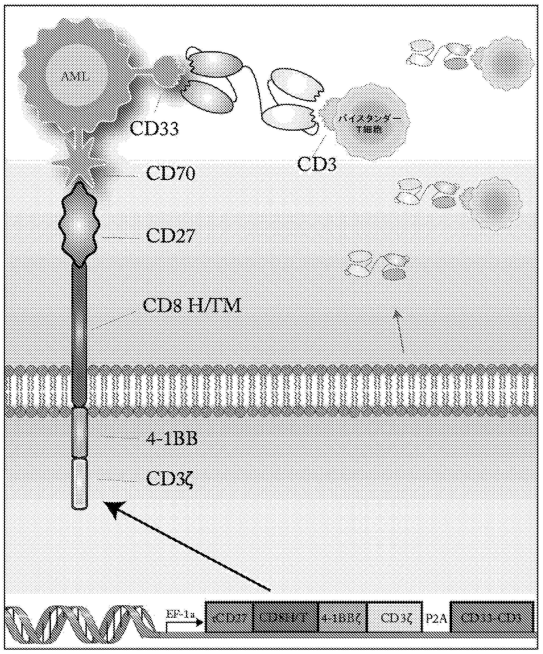
－Ｃｅｌｌ Ｌｙｍｐｈｏｍａｓ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１７；３７７（２６）：２５４５－２５５４．ＤＯＩ：１０．１０５６／ＮＥＪＭｏａ１７０８５６６。
１１．Ｎｅｅｌａｐｕ ＳＳ，Ｌｏｃｋｅ ＦＬ，Ｂａｒｔｌｅｔｔ ＮＬ等 Ａｘｉｃａｂｔａｇｅｎｅ Ｃｉｌｏｌｅｕｃｅｌ ＣＡＲ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｔｈｅｒａｐｙ ｉｎ Ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ Ｌａｒｇｅ Ｂ－Ｃｅｌｌ Ｌｙｍｐｈｏｍａ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１７；３７７（２６）：２５３１－２５４４．ＤＯＩ：１０．１０５６／ＮＥＪＭｏａ１７０７４４７。
１２．Ｍａｒｄｉｒｏｓ Ａ，Ｄｏｓ Ｓａｎｔｏｓ Ｃ，ＭｃＤｏｎａｌｄ Ｔ等 Ｔ ｃｅｌｌｓ ｅｘｐｒｅｓｓｉｎｇ ＣＤ１２３－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ ｅｘｈｉｂｉｔ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｃｙｔｏｌｙｔｉｃ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ ａｎｄ ａｎｔｉｔｕｍｏｒ ｅｆｆｅｃｔｓ ａｇａｉｎｓｔ ｈｕｍａｎ ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ．Ｂｌｏｏｄ ２０１３；１２２（１８）：３１３８－３１４８．ＤＯＩ：１０．１１８２／ｂｌｏｏｄ－２０１２－１２－４７４０５６。
１３．Ｌｕｏ Ｙ，Ｃｈａｎｇ Ｌ－Ｊ，Ｈｕ Ｙ，Ｄｏｎｇ Ｌ，Ｗｅｉ Ｇ，Ｈｕａｎｇ Ｈ．Ｆｉｒｓｔ－ｉｎ－Ｍａｎ ＣＤ１２３－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ－Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｔ Ｃｅｌｌｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ Ａｃｕｔｅ Ｍｙｅｌｏｉｄ Ｌｅｕｋｅｍｉａ．Ｂｌｏｏｄ ２０１５；１２６（２３）：３７７８－３７７８．ＤＯＩ：１０．１１８２／ｂｌｏｏｄ．Ｖ１２６．２３．３７７８．３７７８。
１４．Ｗａｎｇ Ｑ－ｓ，Ｗａｎｇ Ｙ，Ｌｖ Ｈ－ｙ等 Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ＣＤ３３－ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｔ Ｃｅｌｌｓ ｉｎ Ｏｎｅ Ｐａｔｉｅｎｔ Ｗｉｔｈ Ｒｅｌａｐｓｅｄ ａｎｄ Ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ Ａｃｕｔｅ Ｍｙｅｌｏｉｄ Ｌｅｕｋｅｍｉａ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ２０１５；２３（１）：１８４－１９１．ＤＯＩ：ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｍｔ．２０１４．１６４。
１５．Ｋｉｍ ＭＹ，Ｙｕ Ｋ－Ｒ，Ｋｅｎｄｅｒｉａｎ ＳＳ等 Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ ＣＤ３３ ｉｎ Ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ｔｏ Ｅｎａｂｌｅ ＣＡＲ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ Ａｃｕｔｅ Ｍｙｅｌｏｉｄ Ｌｅｕｋｅｍｉａ．Ｃｅｌｌ ２０１８；１７３（６）：１４３９－１４５３．ｅ１９．ＤＯＩ：ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ｃｅｌｌ．２０１８．０５．０１３。
１６．Ｊｅｔａｎｉ Ｈ，Ｇａｒｃｉａ－Ｃａｄｅｎａｓ Ｉ，Ｎｅｒｒｅｔｅｒ Ｔ等 ＣＡＲ Ｔ－ｃｅｌｌｓ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ＦＬＴ３ ｈａｖｅ ｐｏｔｅｎｔ ａｃｔｉｖｉｔｙ ａｇａｉｎｓｔ ＦＬＴ３－ＩＴＤ＋ ＡＭＬ ａｎｄ ａｃｔ ｓｙｎｅｒｇｉｓｔｉｃａｌｌｙ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ＦＬＴ３－ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｃｒｅｎｏｌａｎｉｂ．Ｌｅｕｋｅｍｉａ ２０１８；３２（５）：１１６８－１１７９．ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓ４１３７５－０１８－０００９－０。
１７．Ｈｏｆｍａｎｎ Ｓ，Ｓｃｈｕｂｅｒｔ ＭＬ，Ｗａｎｇ Ｌ等 Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＣＡＲ）Ｔ Ｃｅｌｌ Ｔｈｅｒａｐｙ ｉｎ Ａｃｕｔｅ Ｍｙｅｌｏｉｄ Ｌｅｕｋｅｍｉａ（ＡＭＬ）．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１９；８（２）（Ｉｎ ｅｎｇ）．ＤＯＩ：１０．３３９０／ｊｃｍ８０２０２００。
１８．Ｍｅｌａｏ Ａ．ＦＤＡ Ｓｕｓｐｅｎｄｓ ＵＣＡＲＴ１２３ Ｔｒｉａｌｓ Ａｆｔｅｒ Ｐａｔｉｅｎｔ Ｄｅａｔｈ．Ｉｍｍｕｎｏ－ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｎｅｗｓ．Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ７，２０１７。
１９．Ｐｅｒｎａ Ｆ，Ｂｅｒｍａｎ ＳＨ，Ｓｏｎｉ ＲＫ等 Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｎｇ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｉｃｓ ｆｏｒ Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｒｅｃｅｐ

tor Therapy of AML. Cancer Cell 2017;32(4):506-519.e5. DOI:doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.004。
20. Riether C, Schurch CM, Buhrer ED等 CD70/CD27 signaling promotes blast stemness and is a viable therapeutic target in acute myeloid leukemia. J Exp Med 2017;214(2):359-380. (In eng). DOI:10.1084/jem.20152008。
21. Ochsenbein A. Argx-110 Targeting CD70, in Combination with Azacitidine, Shows Favorable Safety Profile and Promising Anti-Leukemia Activity in Newly Diagnosed AML Patients in an Ongoing Phase 1/2 Clinical Trial. Abstract 2680. American Society of Hematology Annual Meeting. San Diego, CA2018。
22. Slaney CY, Wang P, Darcy PK, Kershaw MH. CARs versus BiTEs: A Comparison between T Cell-Redirection Strategies for Cancer Treatment. Cancer Discov 2018;8(8):924-934. (In eng). DOI:10.1158/2159-8290.Cd-18-0297。
23. Majzner RG, Mackall CL. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. Nature Medicine 2019;25(9):1341-1355. DOI:10.1038/s41591-019-0564-6。
24. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ等 CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. Nat Med 2018;24(1):20-28. (In eng). DOI:10.1038/nm.4441。
25. Shah NN, Zhu F, Schneider D等 Results of a phase I study of bispecific anti-CD19, anti-CD20 chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells for relapsed, refractory, non-Hodgkin lymphoma. Journal of Clinical Oncology 2019;37(15_suppl):2510-2510. DOI:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2510。
26. Gardner R, Annesley C, Finney O等 Early Clinical Experience of CD19 x CD22 Dual Specific CAR T Cells for Enhanced Anti-Leukemic Targeting of Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood 2018;132:278-278. DOI:10.1182/blood-2018-99-113126。
27. Amrolia PJ, Wynn R, Hough R等 Simultaneous Targeting of CD19 and CD22: Phase I Study of AUTO3, a Bicistronic Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy, in Pediatric Patients with Relapsed/Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (r/r B-ALL): Amelia Study. Blood 2018;132(Supplement 1):279-279. DOI:10.1182/blood-2018-99-118616。

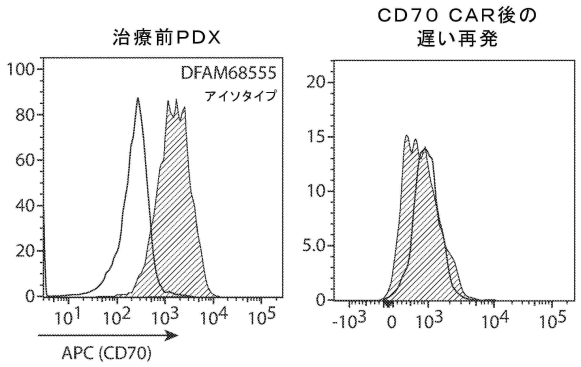
２８．Ｈｏｓｓａｉｎ Ｎ，Ｓａｈａｆ Ｂ，Ａｂｒａｍｉａｎ Ｍ等 Ｐｈａｓｅ Ｉ Ｅｘｐｅｒｉｅｎｃｅ ｗｉｔｈ ａ Ｂｉ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ ＣＡＲ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ＣＤ１９ ａｎｄ ＣＤ２２ ｉｎ Ａｄｕｌｔｓ ｗｉｔｈ Ｂ－Ｃｅｌｌ Ｍａｌｉｇｎａｎｃｉｅｓ．Ｂｌｏｏｄ ２０１８；１３２：４９０－４９０．ＤＯＩ：１０．１１８２／ｂｌｏｏｄ－２０１８－９９－１１０１４２。
２９．Ｓｃｈｕｌｔｚ Ｌ，Ｄａｖｉｓ Ｋ，Ｂａｇｇｏｔｔ Ｃ等 Ｐｈａｓｅ １ Ｓｔｕｄｙ ｏｆ ＣＤ１９／ＣＤ２２ Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＣＡＲ） Ｔｈｅｒａｐｙ ｉｎ Ｃｈｉｌｄｒｅｎ ａｎｄ Ｙｏｕｎｇ Ａｄｕｌｔｓ ｗｉｔｈ Ｂ Ｃｅｌｌ Ａｃｕｔｅ Ｌｙｍｐｈｏｂｌａｓｔｉｃ Ｌｅｕｋｅｍｉａ（ＡＬＬ）．Ｂｌｏｏｄ ２０１８；１３２：８９８－８９８．ＤＯＩ：１０．１１８２／ｂｌｏｏｄ－２０１８－９９－１１７４４５。
３０．Ｃｈｏｉ ＢＤ，Ｙｕ Ｘ，Ｃａｓｔａｎｏ ＡＰ等 ＣＡＲ－Ｔ ｃｅｌｌｓ ｓｅｃｒｅｔｉｎｇ ＢｉＴＥｓ ｃｉｒｃｕｍｖｅｎｔ ａｎｔｉｇｅｎ ｅｓｃａｐｅ ｗｉｔｈｏｕｔ ｄｅｔｅｃｔａｂｌｅ ｔｏｘｉｃｉｔｙ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１９；３７（９）：１０４９－１０５８．ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓ４１５８７－０１９－０１９２－１。
３１．Ｈａｕｓｗｉｒｔｈ ＡＷ，Ｆｌｏｒｉａｎ Ｓ，Ｐｒｉｎｔｚ Ｄ等 Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｔａｒｇｅｔ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ＣＤ３３ ｉｎ ＣＤ３４＋／ＣＤ３８－／ＣＤ１２３＋ＡＭＬ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ ２００７；３７（１）：７３－８２．ＤＯＩ：１０．１１１１／ｊ．１３６５－２３６２．２００７．０１７４６．ｘ。
３２．Ｎｇｕｙｅｎ ＤＨ，Ｂａｌｌ ＥＤ，Ｖａｒｋｉ Ａ．Ｍｙｅｌｏｉｄ ｐｒｅｃｕｒｓｏｒｓ ａｎｄ ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｃｅｌｌｓ ｅｘｐｒｅｓｓ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ＣＤ３３－ｒｅｌａｔｅｄ Ｓｉｇｌｅｃｓ．Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ ２００６；３４（６）：７２８－７３５．ＤＯＩ：ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ｅｘｐｈｅｍ．２００６．０３．００３。
３３．Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ ＭＪ，Ｓｏｉｆｆｅｒ ＲＪ，Ｆｒｅｅｄｍａｎ ＡＳ等 Ｈｕｍａｎ ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ ｄｅｐｌｅｔｅｄ ｏｆ ＣＤ３３－ｐｏｓｉｔｉｖｅ ｃｅｌｌｓ ｍｅｄｉａｔｅｓ ｄｅｌａｙｅｄ ｂｕｔ ｄｕｒａｂｌｅ ｒｅｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ ｏｆ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｓｉｓ：ｃｌｉｎｉｃａｌ ｔｒｉａｌ ｏｆ ＭＹ９ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｐｕｒｇｅｄ ａｕｔｏｇｒａｆｔｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ．Ｂｌｏｏｄ １９９２；７９（９）：２２２９－３６．（Ｉｎ ｅｎｇ）。
３４．Ｒａｊｖａｎｓｈｉ Ｐ，Ｓｈｕｌｍａｎ ＨＭ，Ｓｉｅｖｅｒｓ ＥＬ，Ｍｃ Ｄｏｎａｌｄ ＧＢ．Ｈｅｐａｔｉｃ ｓｉｎｕｓｏｉｄａｌ ｏｂｓｔｒｕｃｔｉｏｎ ａｆｔｅｒ ｇｅｍｔｕｚｕｍａｂ ｏｚｏｇａｍｉｃｉｎ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ） ｔｈｅｒａｐｙ．Ｂｌｏｏｄ ２００２；９９（７）：２３１０－４．（Ｉｎ ｅｎｇ）．ＤＯＩ：１０．１１８２／ｂｌｏｏｄ．ｖ９９．７．２３１０。
３５．Ｊｉｔｓｃｈｉｎ，Ｒ．等 ＣＤ３３／ＣＤ３－ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｔ－ｃｅｌｌ ｅｎｇａｇｉｎｇ（ＢｉＴＥＲ） ａｎｔｉｂｏｄｙ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔ ｔａｒｇｅｔｓ ｍｏｎｏｃｙｔｉｃ ＡＭＬ ｍｙｅｌｏｉｄ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｃｅｌｌｓ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｆｏｒ ＩｍｍｕｎｏＴｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ ｖｏｌ．６ Ｐｒｅｐｒｉｎｔ ａｔ ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１８６／ｓ４０４２５－０１８－０４３２－９（２０１８）。
３６．Ｌｅｉｃｋ，Ｍ．Ｂ．等 Ｎｏｎ－ｃｌｅａｖａｂｌｅ ｈｉｎｇｅ ｅｎｈａｎｃｅｓ ａｖｉｄｉｔｙ ａｎｄ ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｏｆ ＣＡＲ－Ｔ ｃｅｌｌｓ ｆｏｒ ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ．Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ４０，４９４－５０８．ｅ５（２０２２）。

【図面】

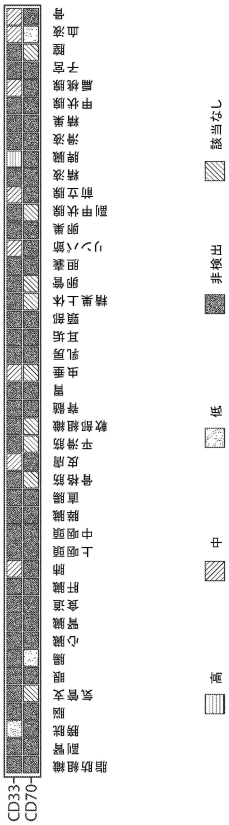
【図１】



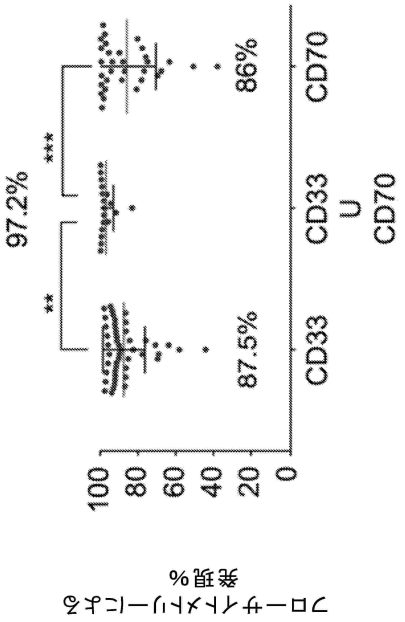
【図２】



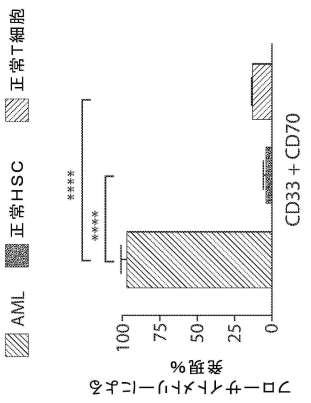
【図３Ａ】



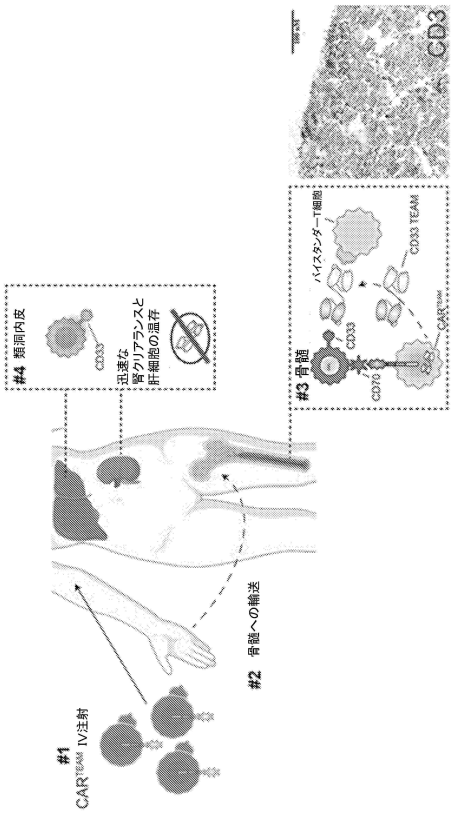
【図３Ｂ】



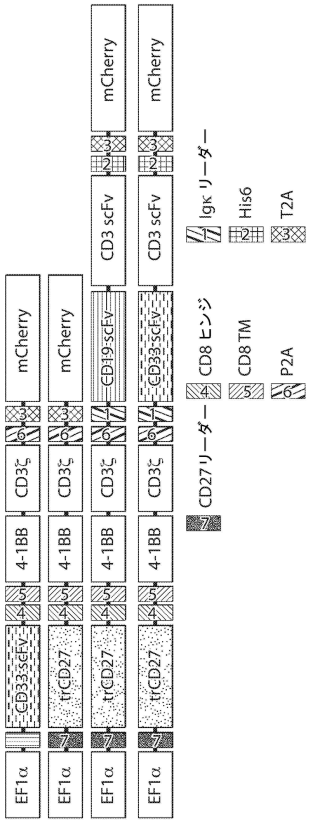
【図３Ｃ】



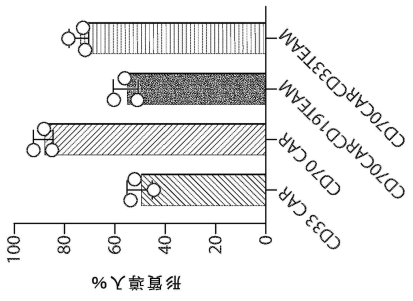
【図４】



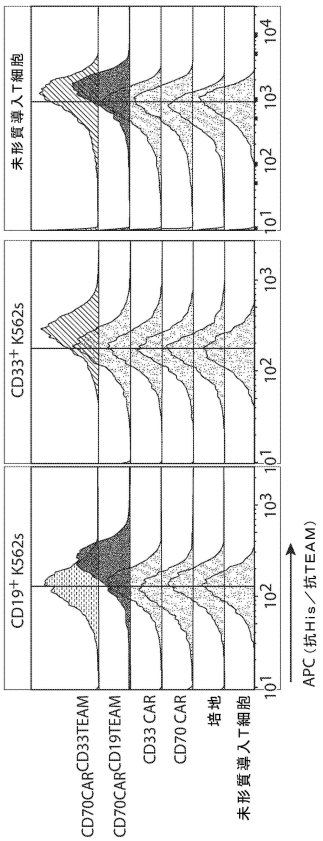
【図５Ａ】



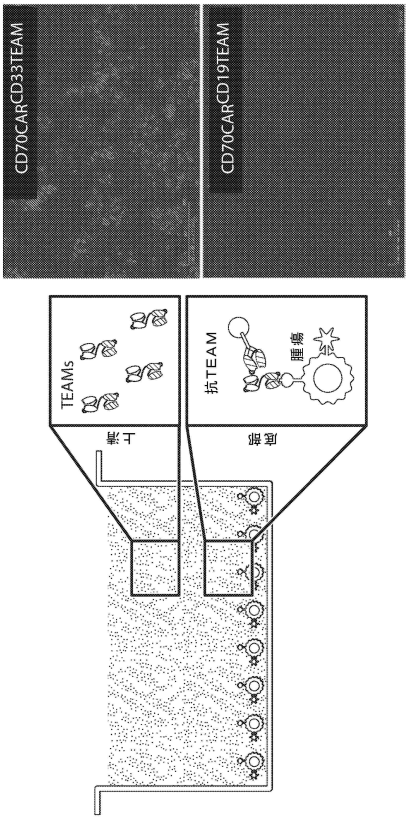
【図５Ｂ】



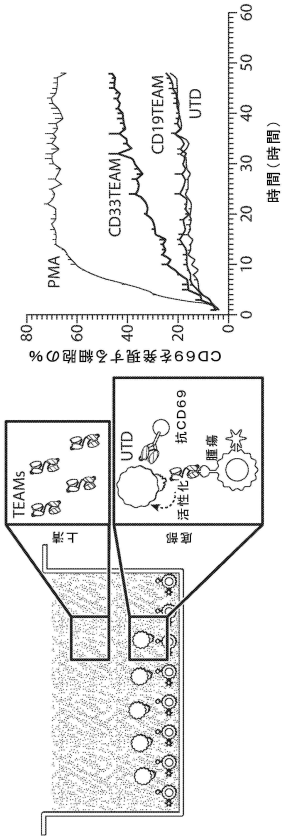
【図５Ｃ】



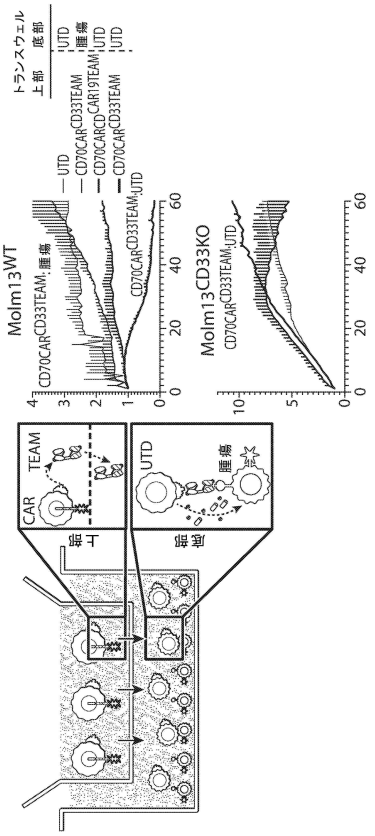
【図５Ｄ】



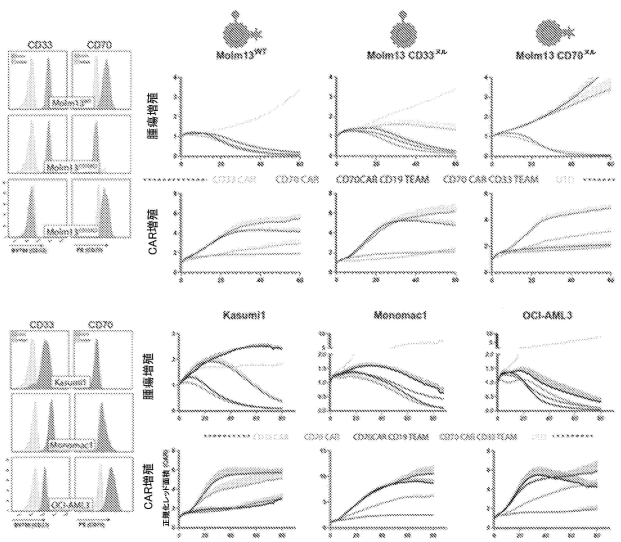
【図５Ｅ】



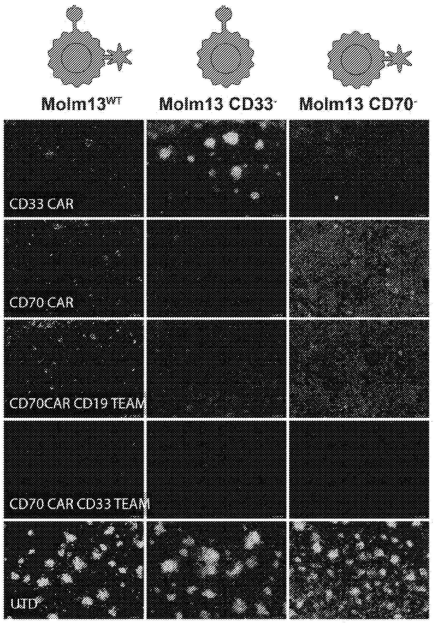
【図６】



【図７Ａ】

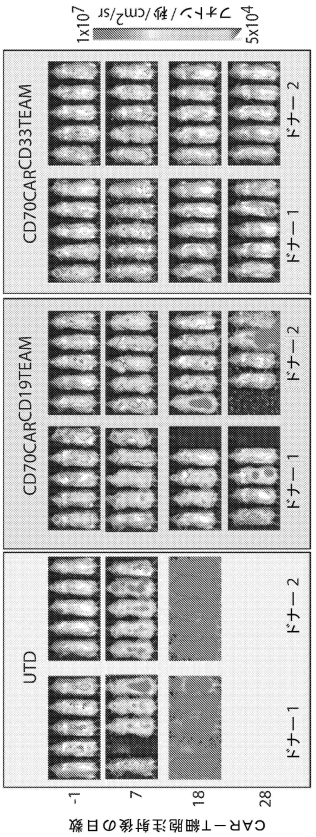


【図７Ｂ】

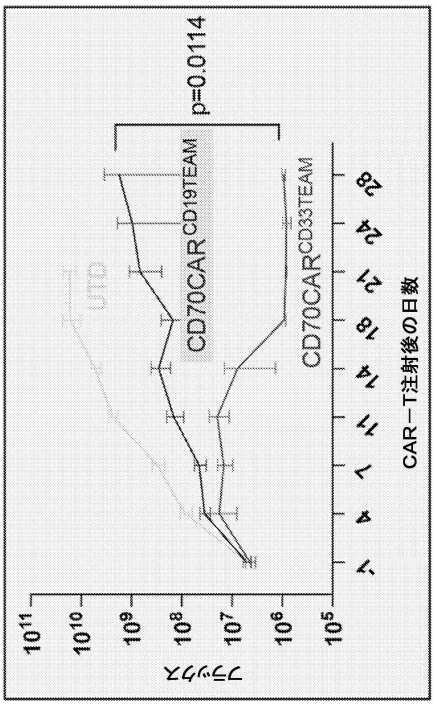


【図８Ａ】

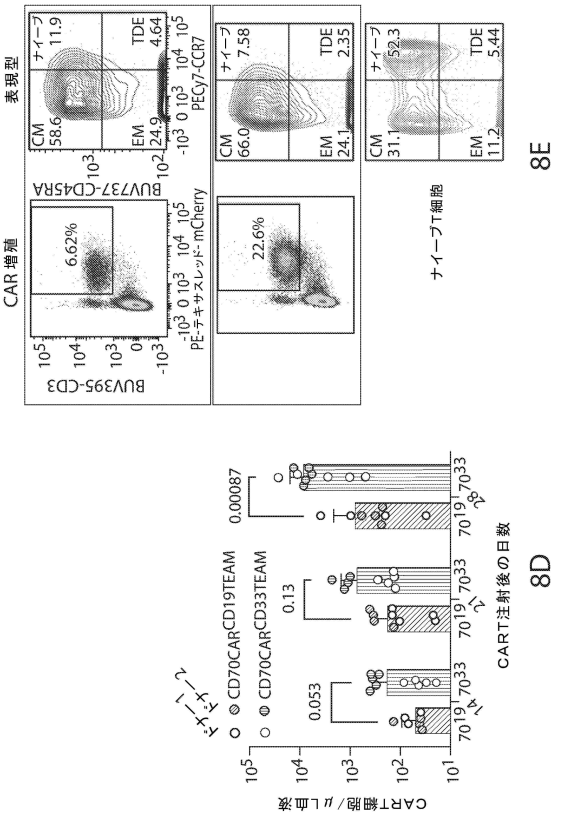
【図８Ｂ】



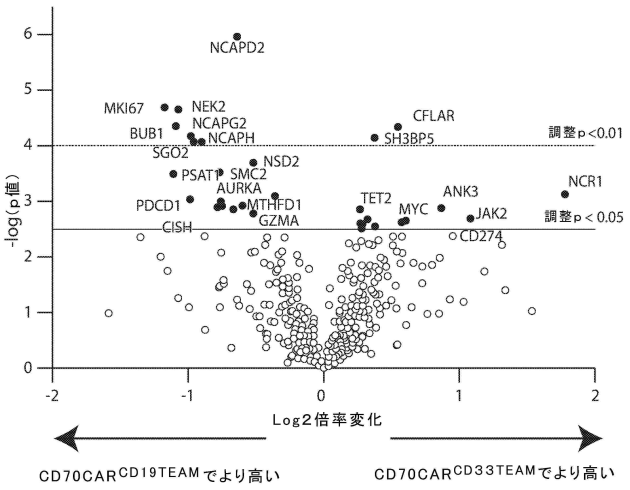
【図８Ｃ】



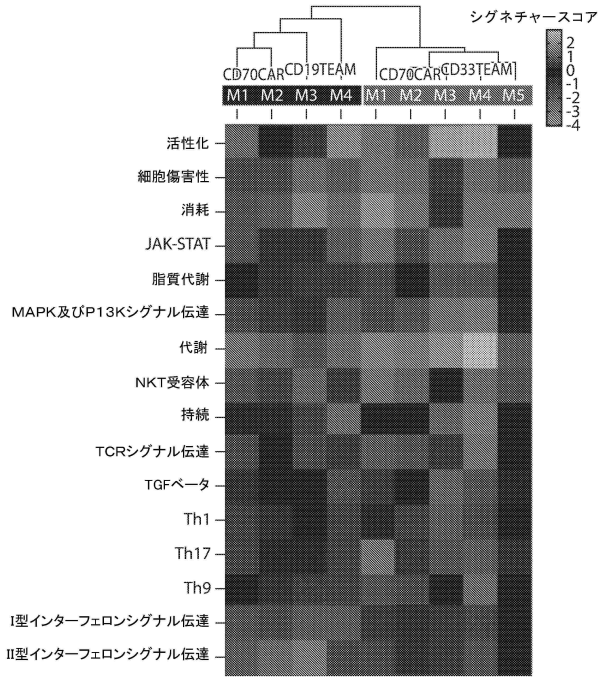
【図８Ｄ－Ｅ】



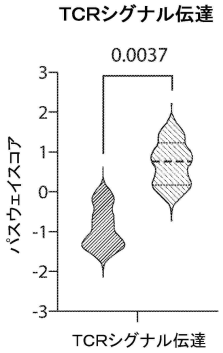
【図９Ａ】



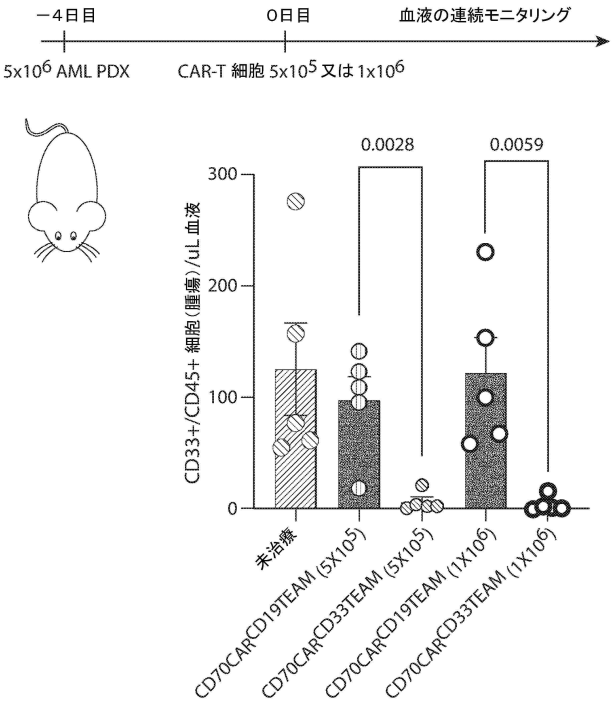
【図９Ｂ】



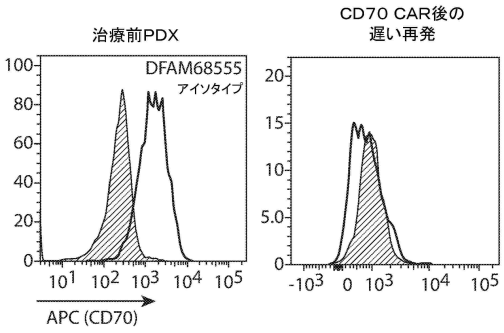
【図９Ｃ】



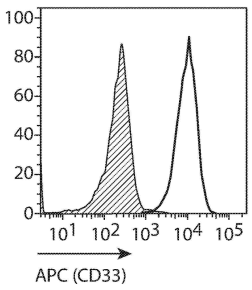
【図１０】



【図１１Ａ－Ｂ】

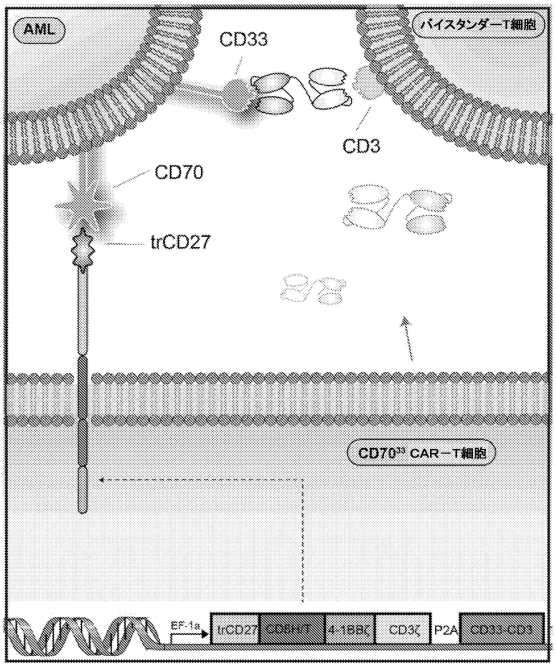


11A

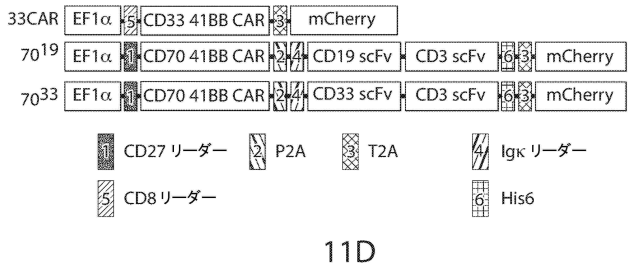


11B

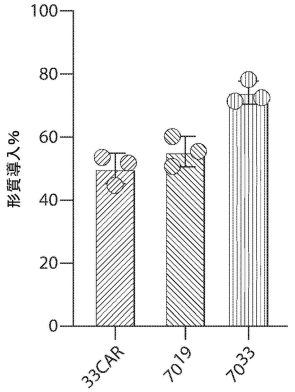
【図１１Ｃ】



【図１１Ｄ－Ｅ】

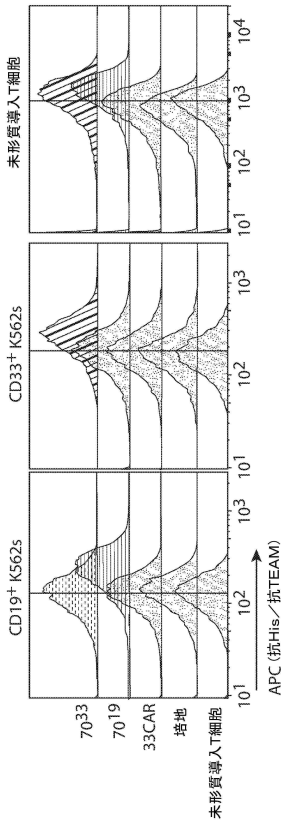


11D

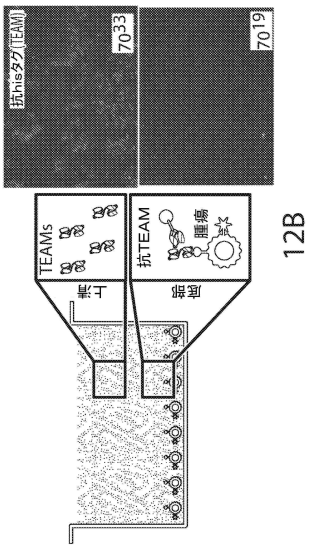


11E

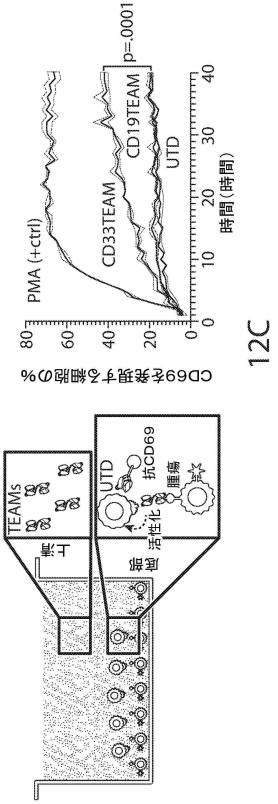
【図１２Ａ】



【図１２Ｂ－Ｃ】

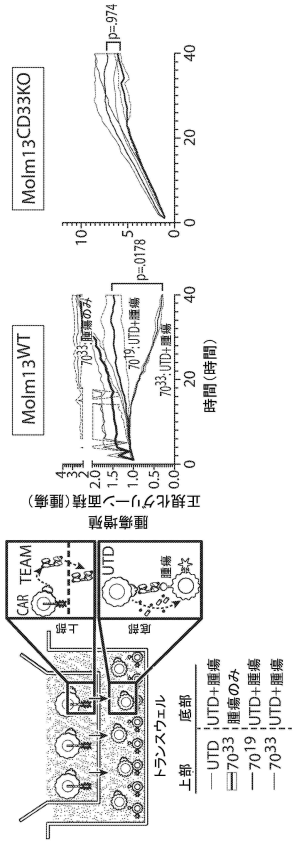


12B

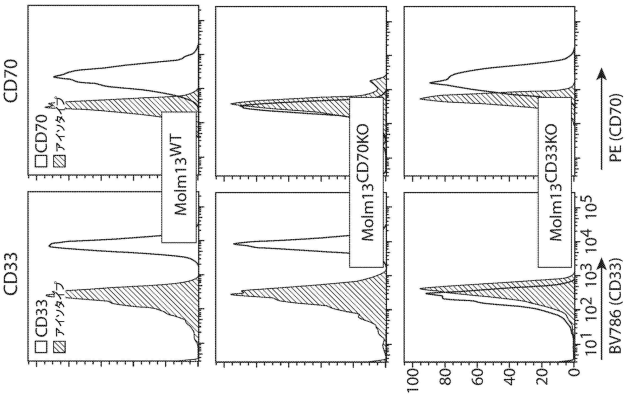


12C

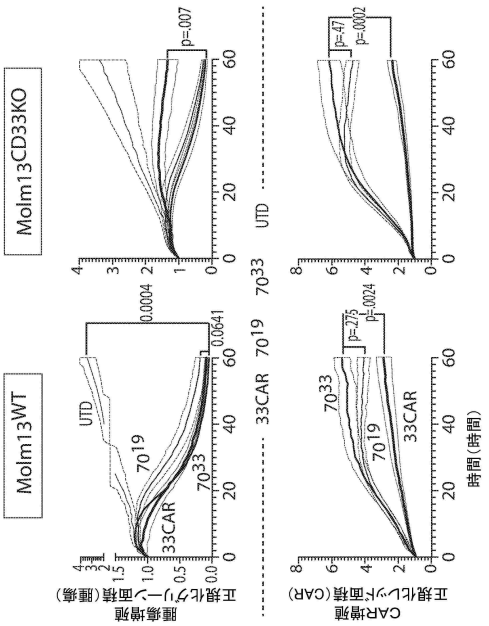
【図１２Ｄ】



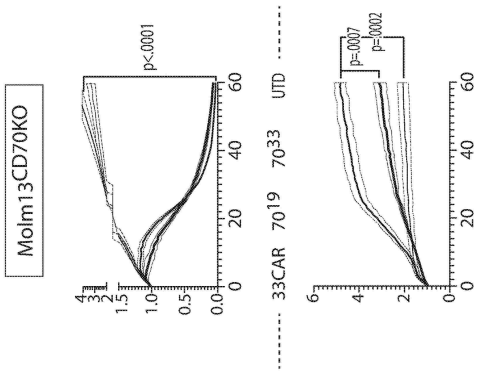
【図１３Ａ】



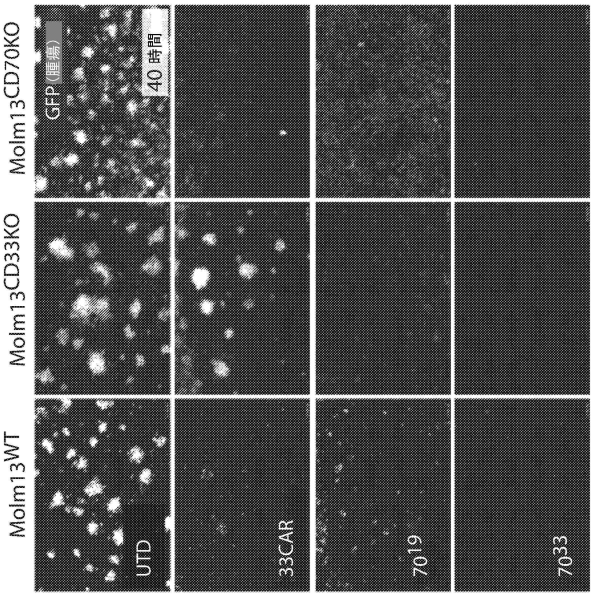
【図１３Ｂ－１】



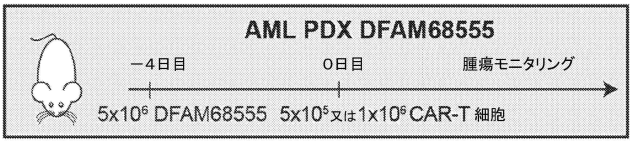
【図１３Ｂ－２】



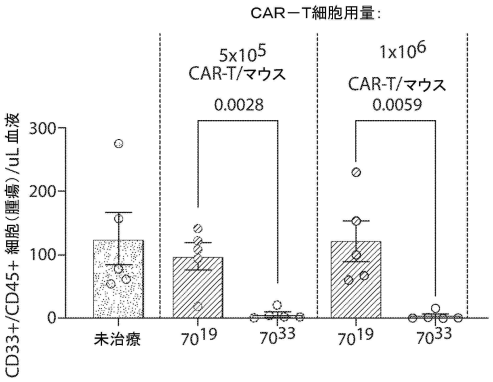
【図１３Ｃ】



【図１４Ａ－Ｂ】

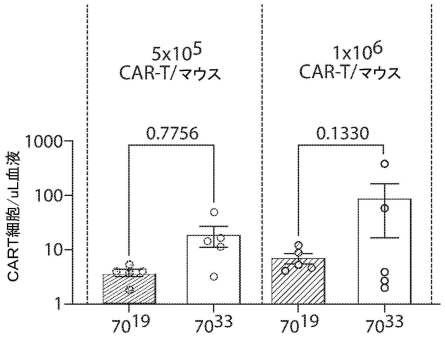


14A

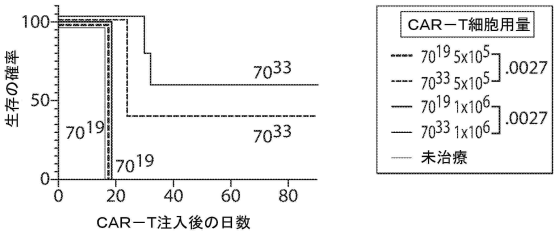


14B

【図１４Ｃ－Ｄ】

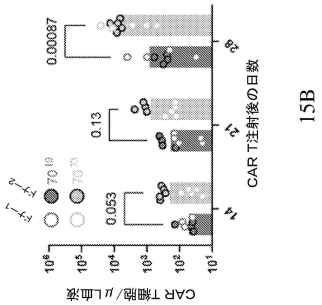


14C

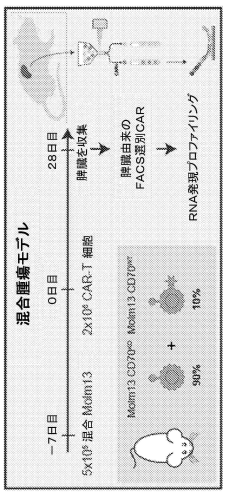


14D

【図１５Ａ－Ｂ】

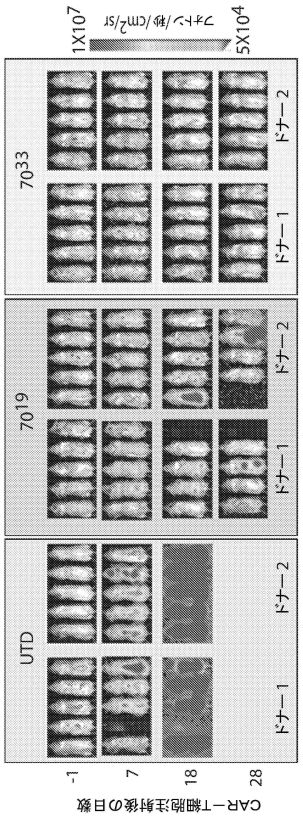


15B

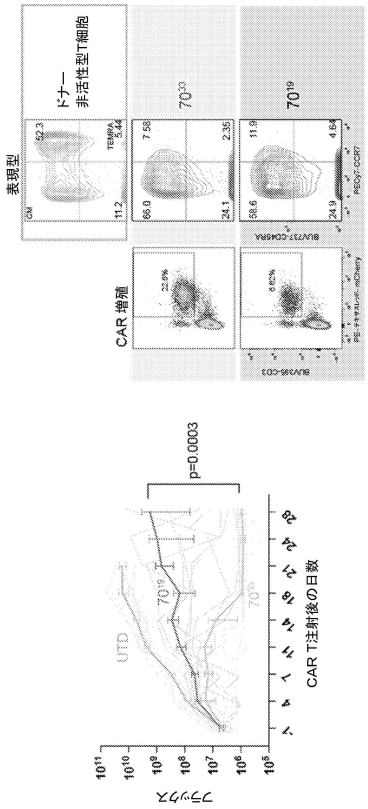


15A

【図１５Ｃ】



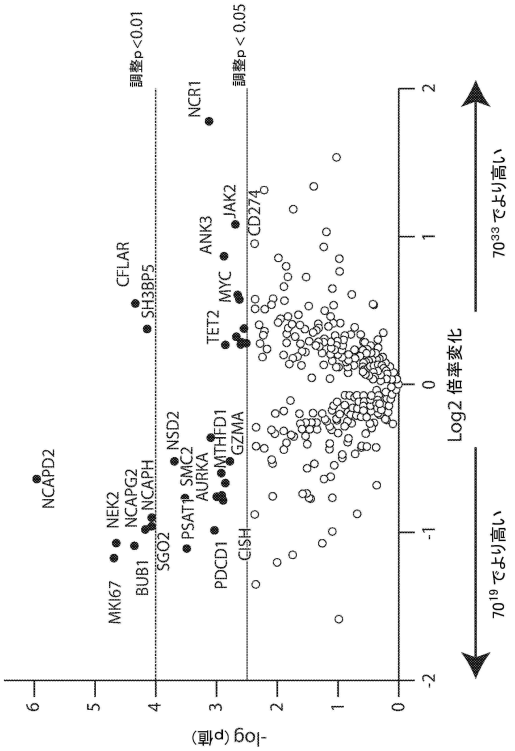
【図１５Ｄ－Ｅ】



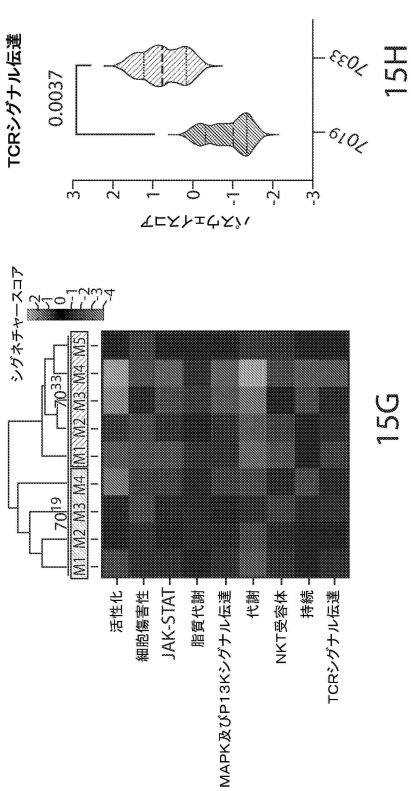
15E

15D

【図１５Ｆ】



【図１５Ｇ－Ｈ】



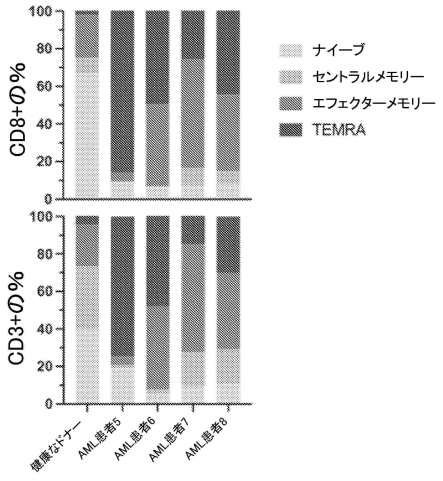
15H

15G

【図１６Ａ－Ｂ】

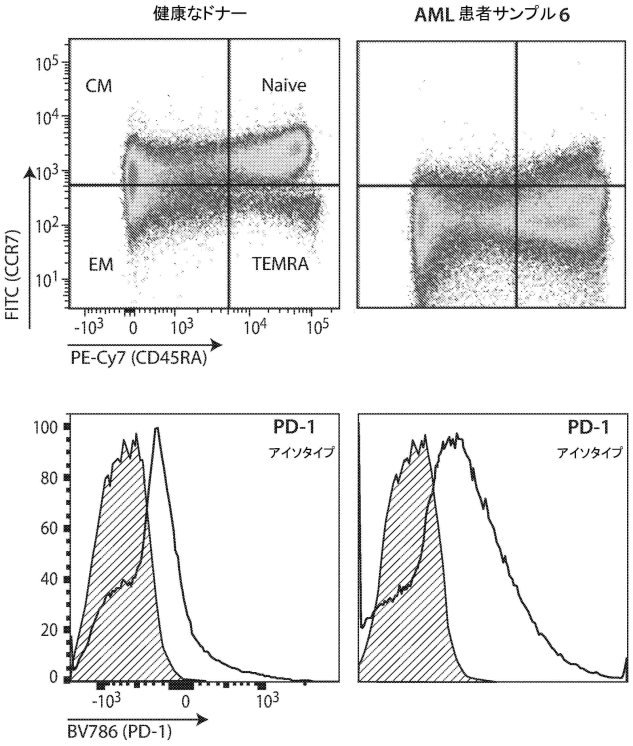
患者ID	診断	年齢	治療
1	再発したAML	74	HMA
2	再発したAML	35	導入、地固め、移植 、HAM
3	CRのAML	78	HMA
4	CRのAML	66	導入+IDHi
5	難治性AML	36	導入、地固め、移植 、MEC、HMA/rev
6	再発したAML	29	導入、地固め、移植 、hidac
7	再発したAML	70	HMA、導入、地固め、移植、シタラビン/MTX
8	再発したAML	78	HMA

16A

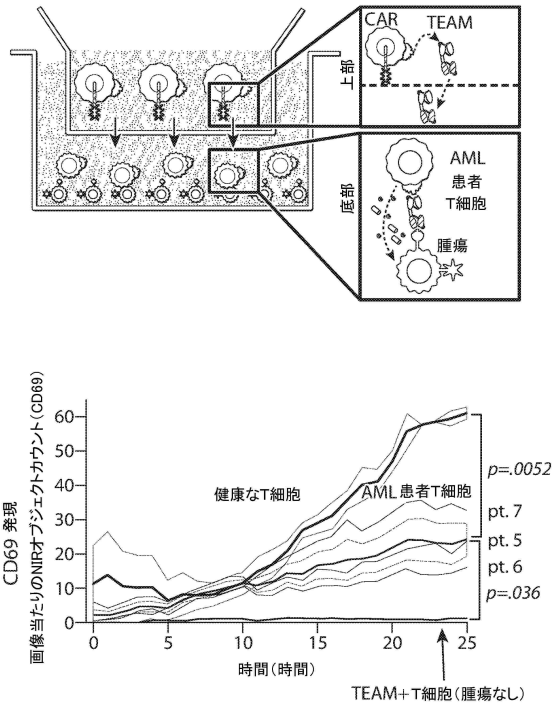


16B

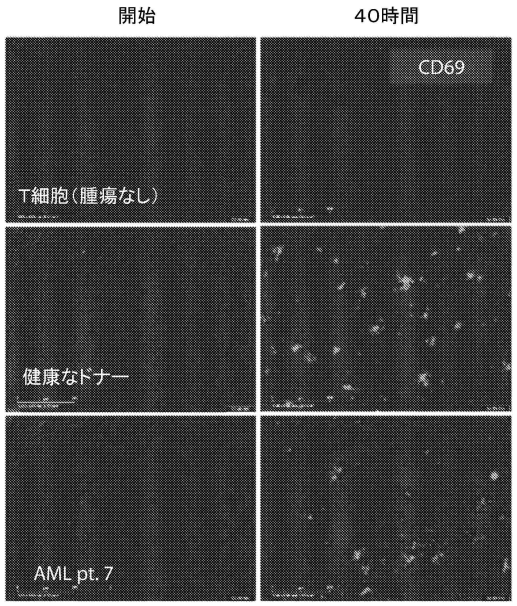
【図１６Ｃ】



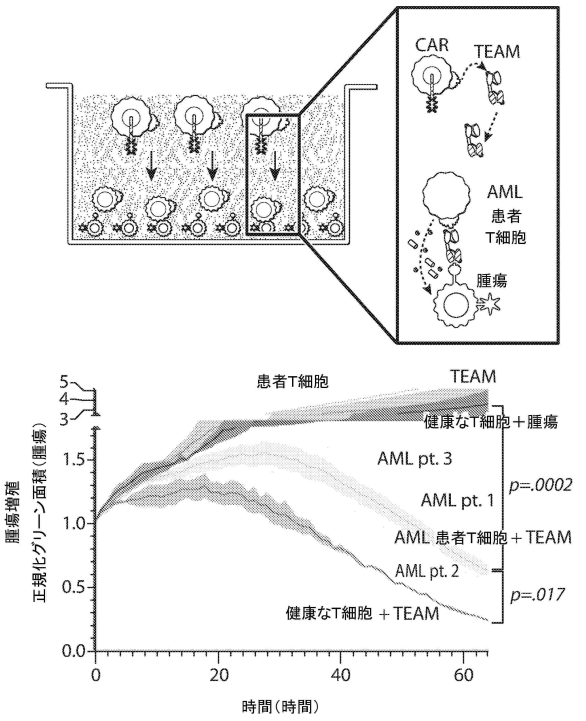
【図１６Ｄ】



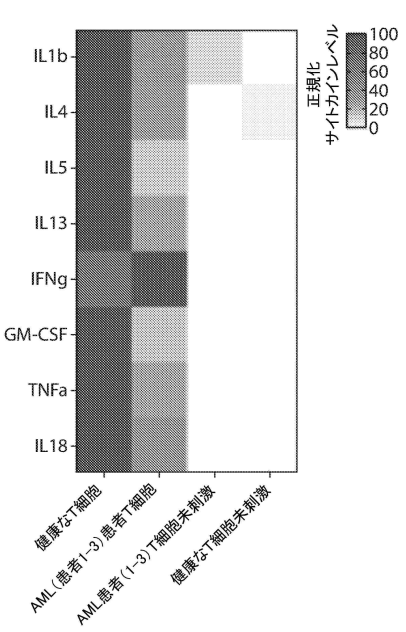
【図１６Ｅ】



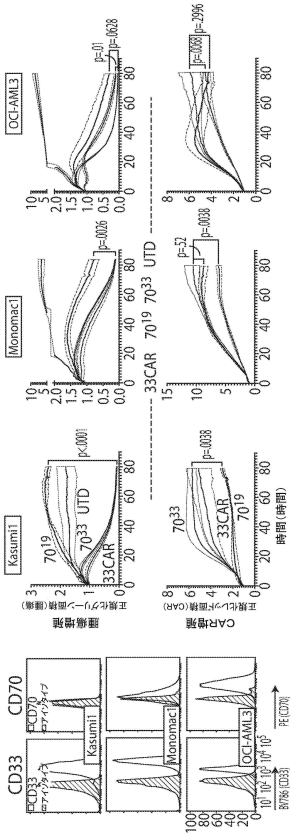
【図１６Ｆ】



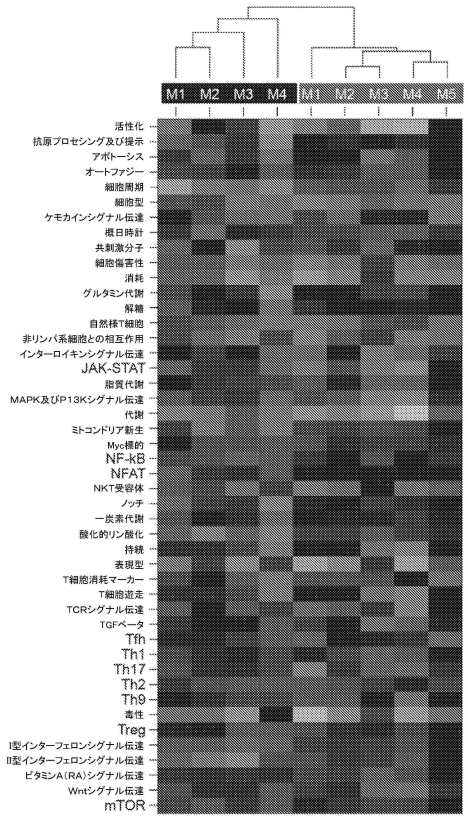
【図１６Ｇ】


IL1b
IL4
IL5
IL13
IFNg
GM-CSF
TNFa
IL18
正規化
サイトカインレベル
100
80
60
40
20
0
健康なT細胞
AML（患者1-3）患者T細胞
AML患者（1-3）T細胞未刺激
健康なT細胞未刺激

【図１７】

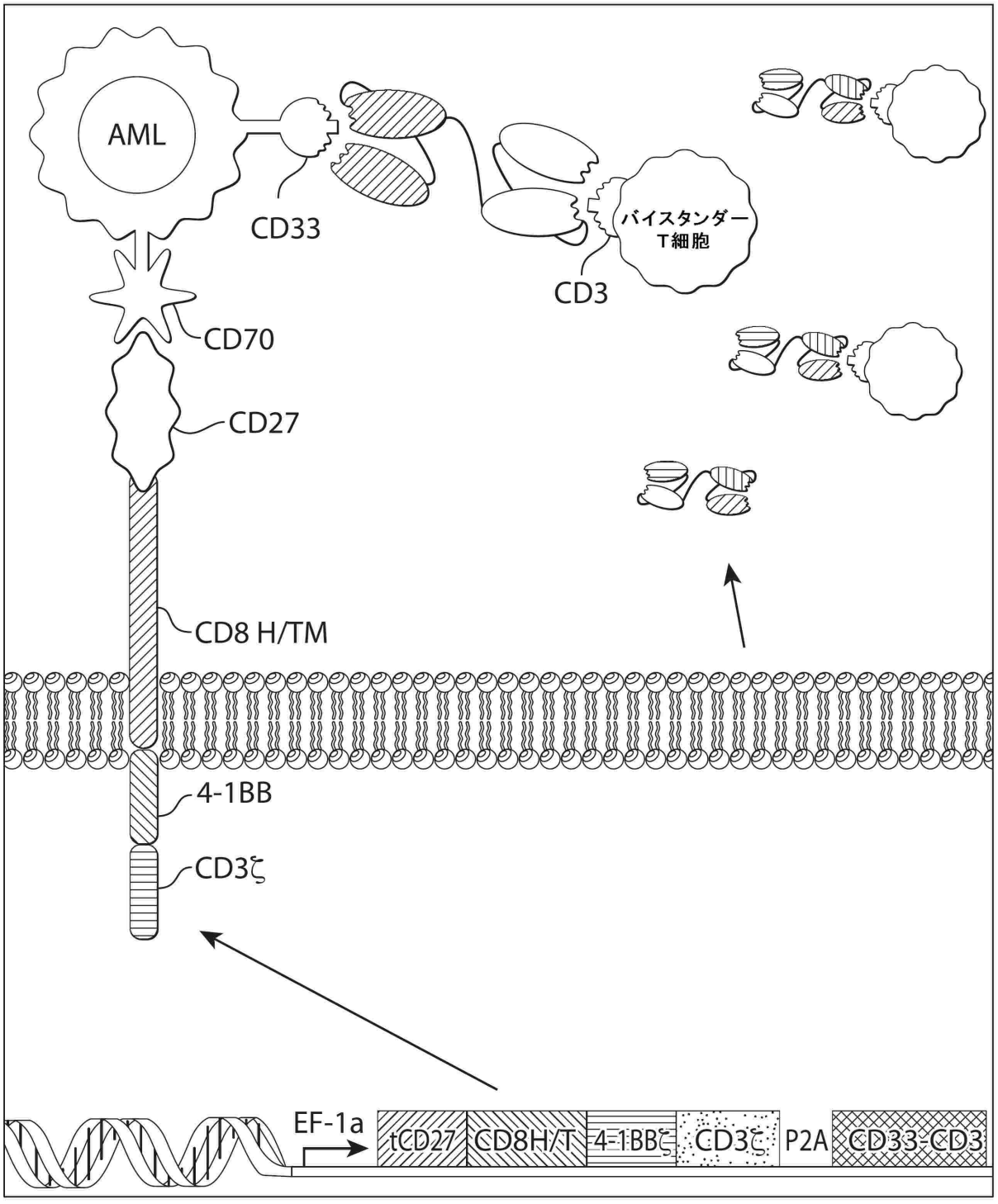

OCI-AML3
Monomac1
Kasumi1
UTD
33CAR
腫瘍増殖
CAR増殖
時間（時間）
CD70
CD33
Kasumi1
Monomac1
OCI-AML3

【図１８】


M1
M2
M3
M4
M5
活性化
抗原プロセシング及び提示
アポトーシス
オートファジー
細胞周期
細胞型
ケモカインシグナル伝達
概日時計
共刺激分子
細胞傷害性
消耗
グルタミン代謝
解糖
自然様T細胞
非リンパ系細胞との相互作用
インターロイキンシグナル伝達
JAK-STAT
脂質代謝
MAPK及びP13Kシグナル伝達
代謝
ミトコンドリア新生
Myc様的
NF-kB
NFAT
NKT受容体
ノッチ
一炭素代謝
酸化的リン酸化
持続
表現型
T細胞消耗マーカー
T細胞遊走
TCRシグナル伝達
TGFベータ
Tfh
Th1
Th17
Th2
Th9
毒性
Treg
I型インターフェロンシグナル伝達
II型インターフェロンシグナル伝達
ビタミンA（RA）シグナル伝達
Wntシグナル伝達
mTOR

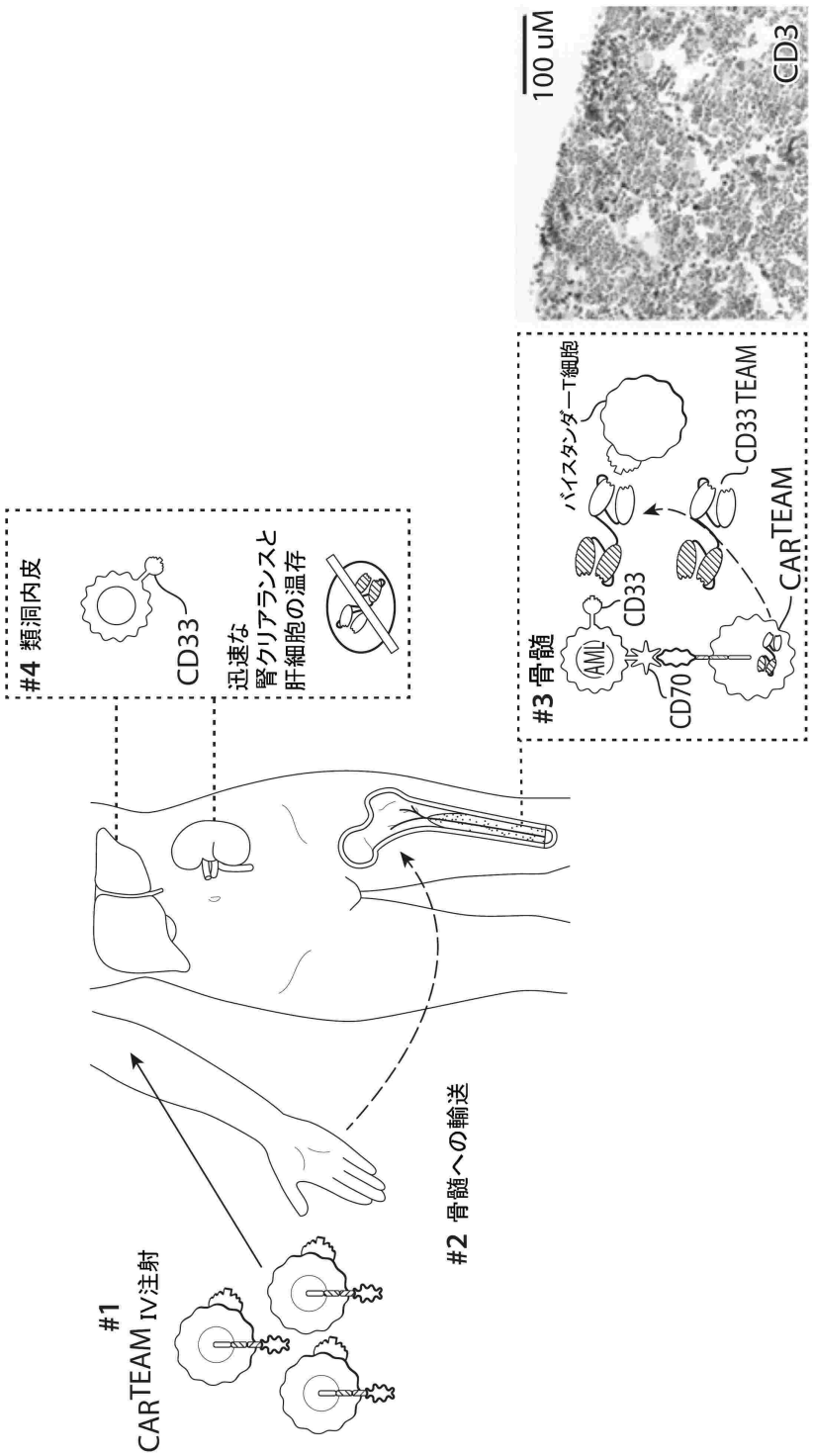
【配列表】
20255159950000001.xml

【手続補正書】
【提出日】令和７年１月１５日(２０２５.１.１５)
【手続補正１】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図１】



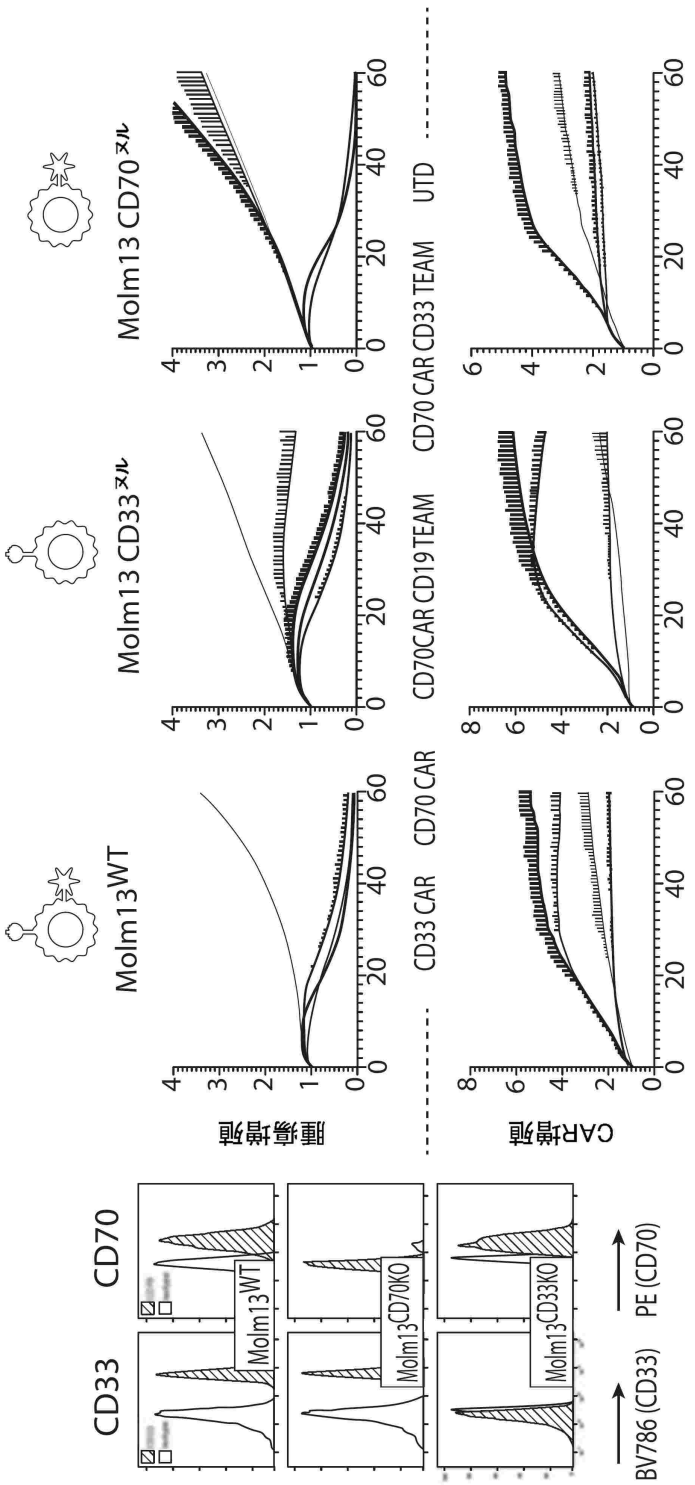
【手続補正２】
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図４】



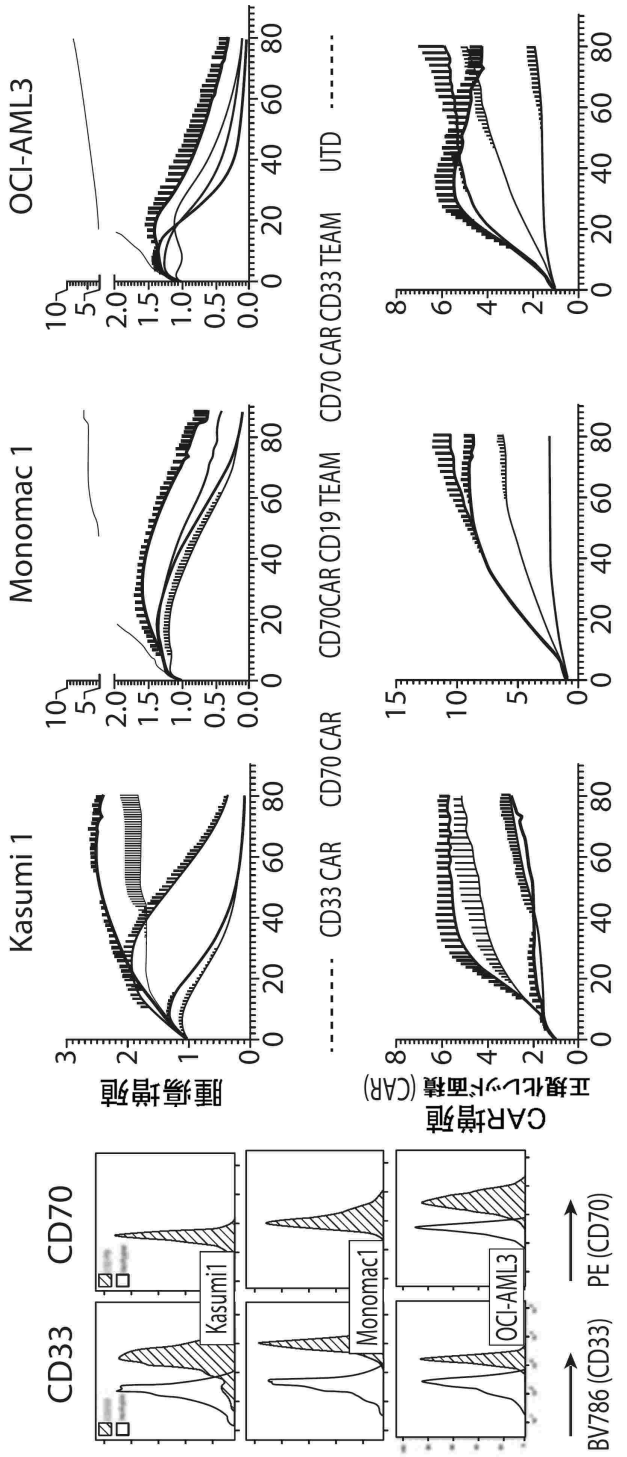
【手続補正３】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図７Ａ
【補正方法】削除
【補正の内容】
【手続補正４】

【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図７Ａ－１
【補正方法】追加
【補正の内容】
【図７Ａ－１】



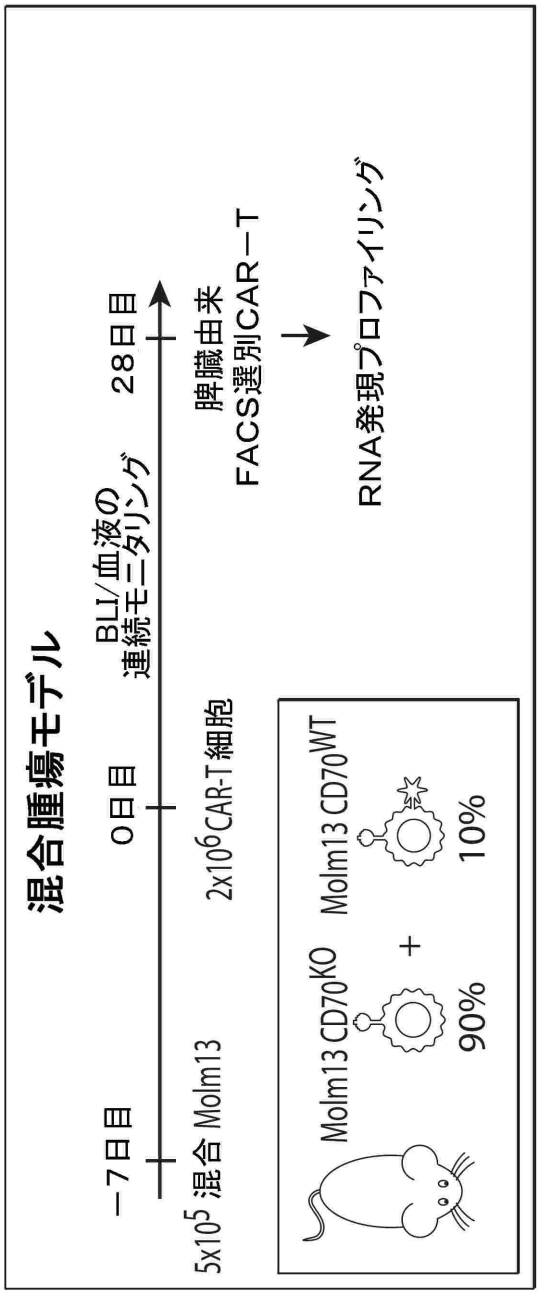
【手続補正５】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図７Ａ－２
【補正方法】追加
【補正の内容】

【図７Ａ－２】



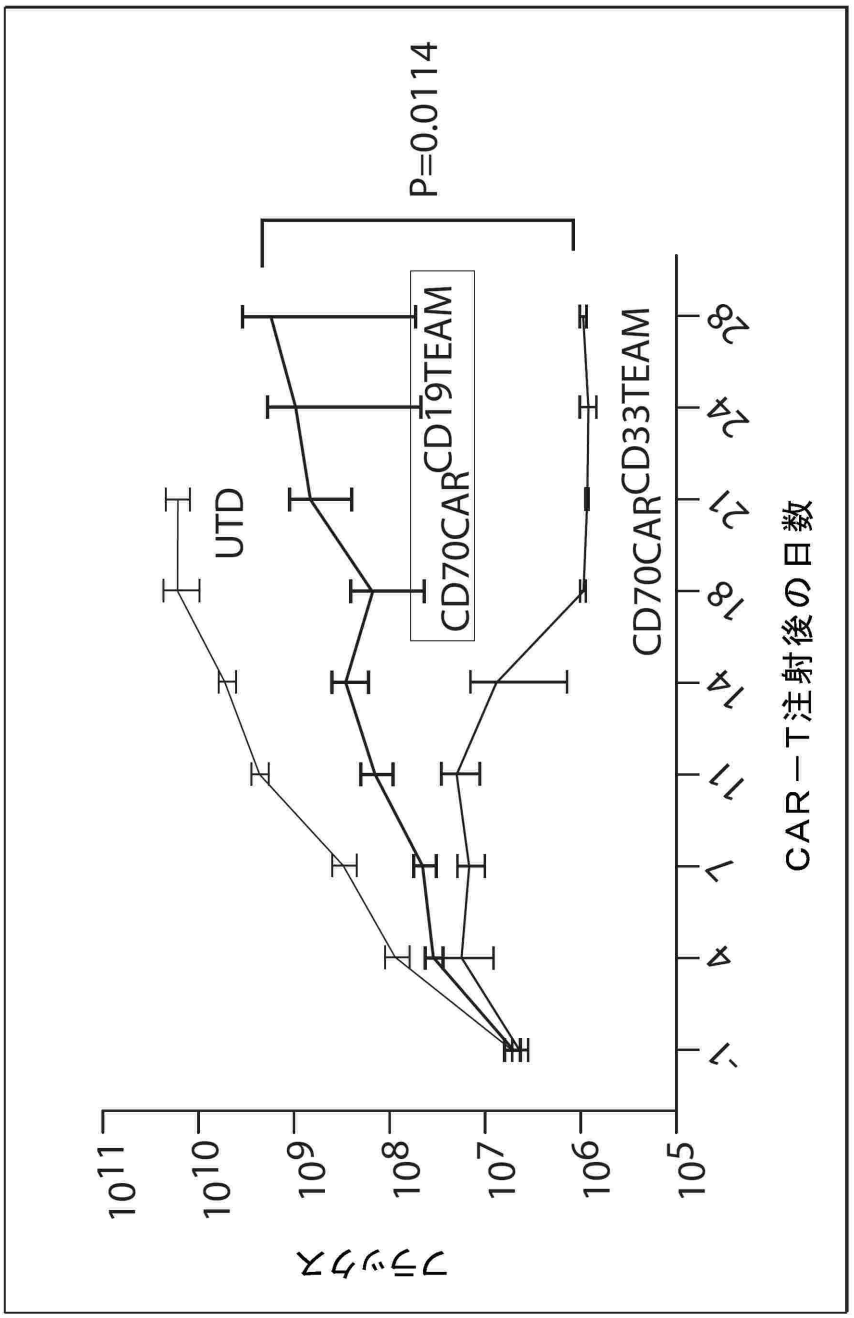
【手続補正６】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図８Ａ
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図８Ａ】



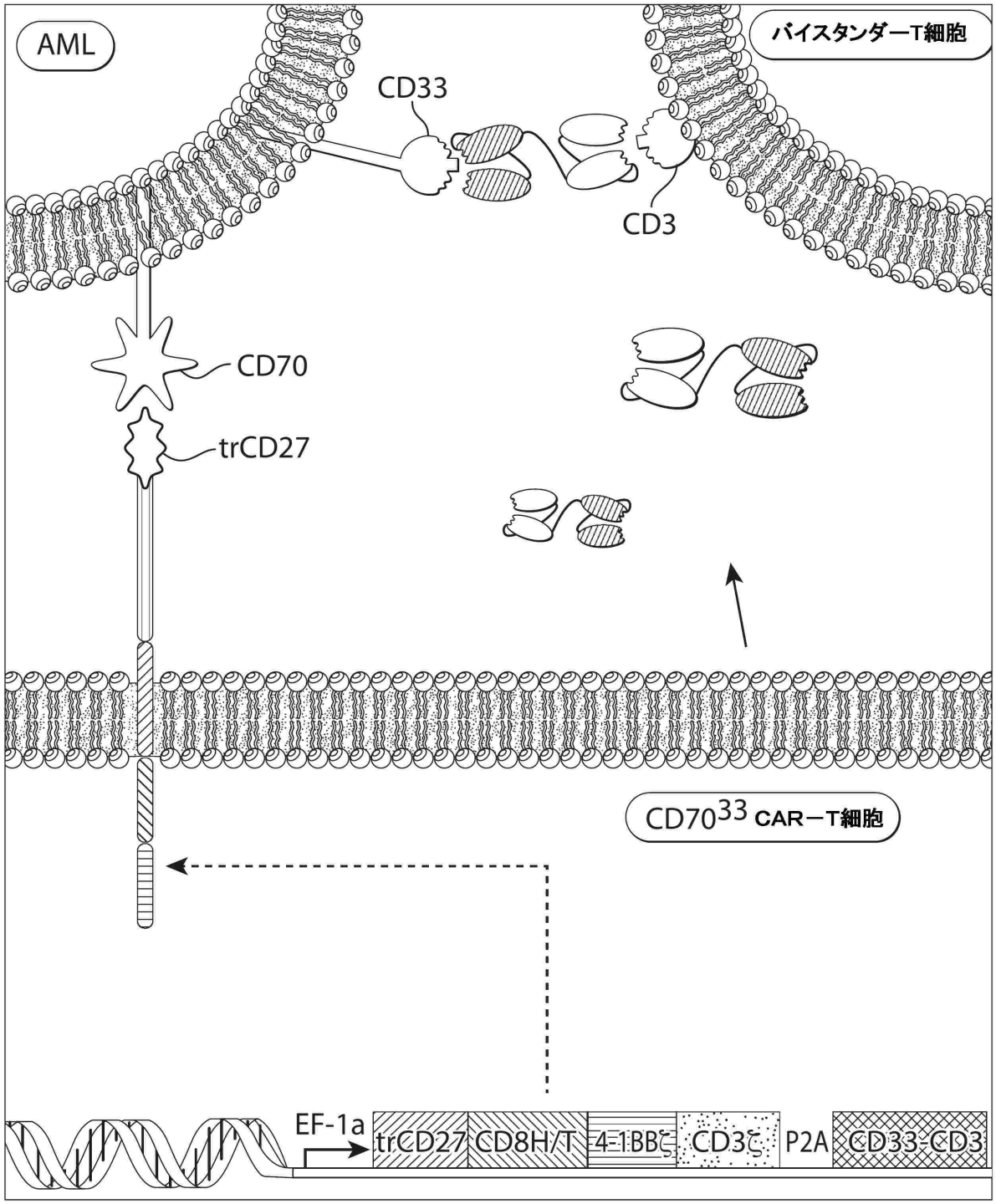
【手続補正７】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図８Ｃ
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図８Ｃ】



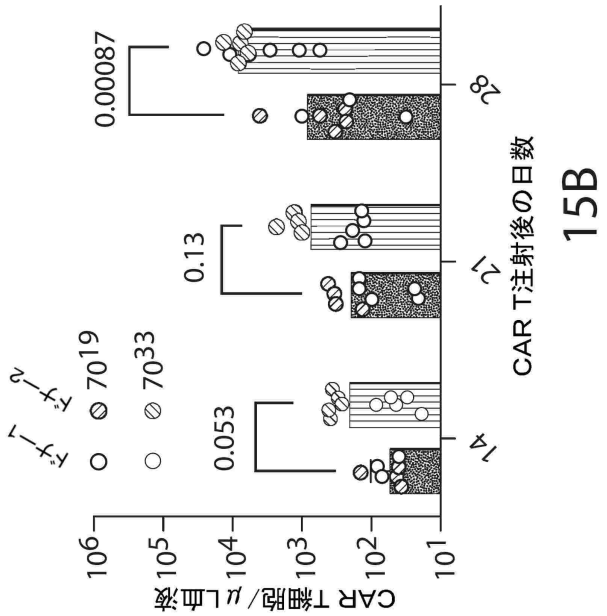
【手続補正８】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図１１Ｃ
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図１１Ｃ】

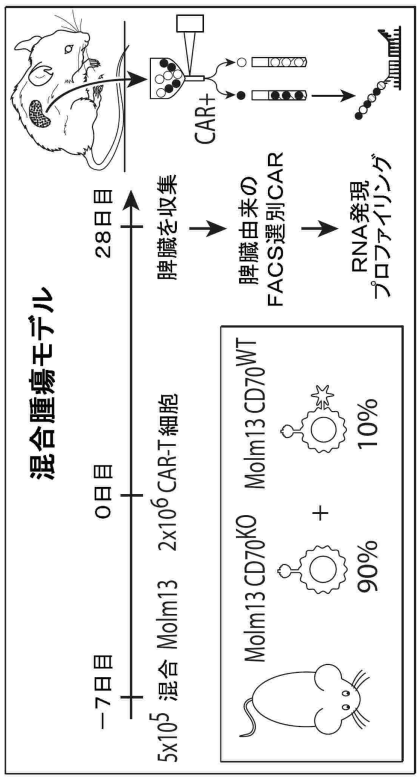


【手続補正９】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図１５Ａ－Ｂ
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図１５Ａ－Ｂ】



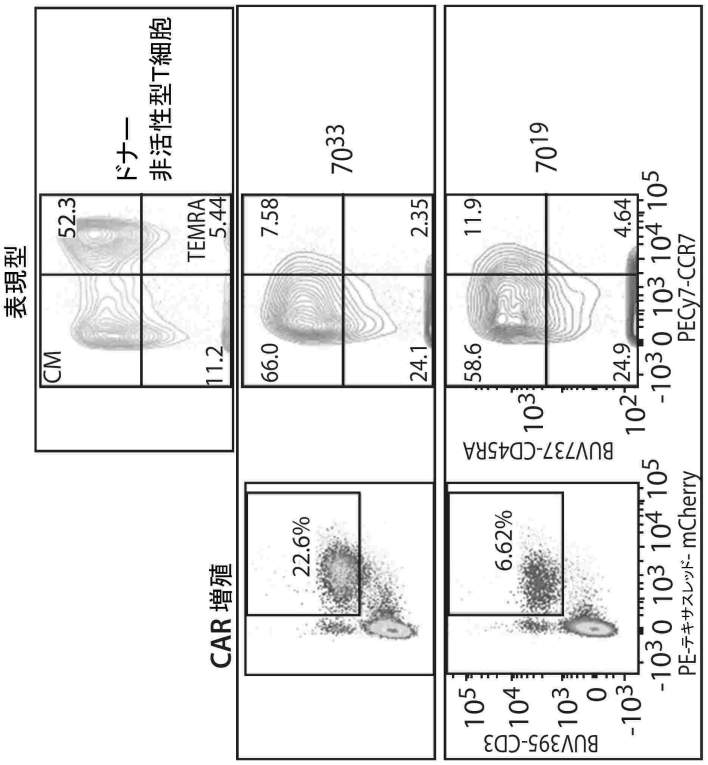
15B



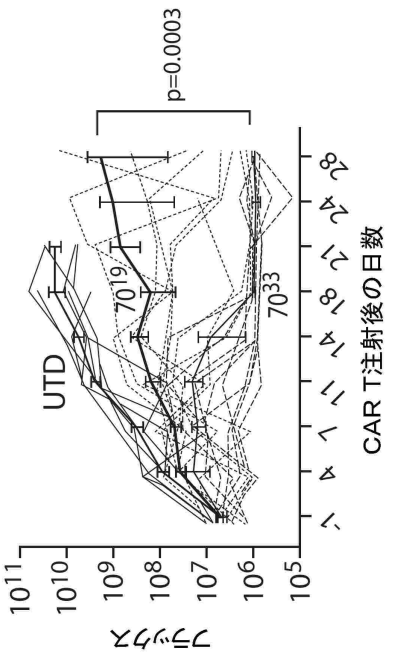
15A

【手続補正１０】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図１５Ｄ－Ｅ
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図１５Ｄ－Ｅ】



15E



15D

【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１６】
【図１】図１は、ＣＤ３３－ＣＤ３二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（又はＴ細胞エンゲージ抗体分子（ＴＥＡＭ））を分泌するｔｒＣＤ２７－ＣＤ８Ｈ／ＴＭ ＣＡＲの図を示している。ＣＤ２７ ＣＡＲは急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）に結合でき、ＣＤ３３ ＴＥＡ

Ｍはバイスタンダー Ｔ細胞をＡＭＬ細胞にエンゲージさせうる。
【図２】図２は、ＡＭＬ ＰＤＸにおけるＣＤ７０標的ＣＡＲ治療後のＣＤ７０低再発性を示すフローサイトメトリーデータのグラフを示している。ＮＳＧマウスに、－４日目に５×１０^{6}個のＤＦＡＭ６８５５５ ＡＭＬ患者由来異種移植細胞が移植された。０日目に、マウスには２×１０^{6}個のｔｒＣＤ２７ＣＤ８Ｈ／ＴＭ改変ＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞が投与された。殆どのｔｒＣＤ８Ｈ／ＴＭ改変マウスでは腫瘍が除去されたが、一部のマウスではＣＤ７０低腫瘍が再発した。
【図３Ａ】図３Ａ～３Ｃは、ＡＭＬにおけるコンビナトリアルＣＡＲターゲットとしてのＣＤ３３とＣＤ７０のペア発現を示している。図３Ａは、血液中のＣＤ３３とＣＤ７０の共発現を示している。
【図３Ｂ】図３Ｂは、原発ＡＭＬサンプルにおけるＣＤ３３とＣＤ７０の単独発現及び共発現を示している。
【図３Ｃ】図３Ｃは、ＡＭＬ細胞におけるＣＤ３３＋ＣＤ７０抗原ペアの共発現を、正常ＢＭ ＨＳＣ及びＴ細胞と比較したものである。
【図４】図４は、ＣＡＲ^{ＴＥＡＭ}の推定上の利点を示す概略図である。ＣＡＲ^{ＴＥＡＭ}細胞は、迅速な腎クリアランスを示し、肝細胞を温存し、肝毒性が減少する。
【図５Ａ】図５Ａ～５Ｅは、例示的ＣＡＲ及びＴＥＡＭの図と、ＴＥＡＭがＣＡＲ－Ｔ細胞によって分泌され、適切な標的抗原に結合することを証明するグラフを示している。［図５Ａ］ｔｒＣＤ２７ ＣＡＲ及び／又はＣＤ３３ ＴＥＡＭコンストラクトの構造。
【図５Ｂ】活性型Ｔ細胞の健康なドナーＴ細胞の形質導入効率（ｎ＝３の異なる健康なドナー、少なくとも２つの別々の実験を表す）。
【図５Ｃ】示された細胞（行）からの上清を、示された細胞型（列）に添加し、抗Ｈｉｓタグ（ＴＥＡＭ）結合について評価した。
【図５Ｄ】示されたコンストラクトを形質導入したジャーカットＴ細胞からの上清を、プレート結合Ｍｏｌｍ１３腫瘍細胞並びに抗ＨｉｓタグＡＦ６４７抗体（レッド）と共にインキュベートした。蛍光強度をインキュサイトで測定し、代表的な画像を示す。
【図５Ｅ】示されたコンストラクトを形質導入したジャーカットＴ細胞の上清を、Ｍｏｌｍ１３腫瘍細胞及び未形質導入（ＵＴＤ）の健康な初代ヒトＴ細胞及び抗ＣＤ６９抗体と共培養した。ＣＤ６９を発現する細胞の経時的なパーセントを示す。ＰＭＡ＝ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート陽性対照。
【図６】図６は、ＣＡＲ－Ｔ細胞及びＴＥＡＭの作用の図と、ＣＤ３３ ＴＥＡＭがＵＴＤ駆動の標的依存性細胞傷害を媒介することを示すグラフを示している。ｔｒＣＤ２７ＣＡＲ－ＣＤ３３－ＴＥＡＭ又はｔｒＣＤ２７－ＣＤ１９－ＴＥＡＭコンストラクトを形質導入した細胞、又は未形質導入Ｔ細胞（ＵＴＤ）を、トランスウェルインサートの上部に添加した。未形質導入Ｔ細胞を、Ｍｏｌｍ１３ＷＴ又はＭｏｌｍ１３ＣＤ３３－細胞と共にトランスウェルインサートの底部に添加した。ｔｒＣＤ２７－ＣＡＲ－ＣＤ３３－ＴＥＡＭコンストラクトのみがＭｏｌｍ１３ＷＴ細胞のクリアランスを媒介することができたが、これは標的依存性であり、ＣＤ３３の喪失で抑制された。
【図７Ａ－１】図７Ａ－１～２及び図７Ｂは、ＣＡＲとＴＥＡＭによる同時のＴ細胞リダイレクトが異種腫瘍に対して有効であり、個々のＣＡＲの混合物よりも優れていることを示すグラフと顕微鏡写真を示している。［図７Ａ－１～２］個別に標的化されたＣＤ７０又はＣＤ３３ ＣＡＲ－Ｔ細胞を、異なるレベルのＣＤ７０又はＣＤ３３（左）を用いてＡＭＬ標的に対してＣＤ７０ＣＡＲＣＤ３３ＴＥＡＭ又はＣＤ７０ＣＡＲＣＤ１９ＴＥＡＭと比較した。ＣＤ７０ＣＡＲＣＤ３３ＴＥＡＭ細胞は、インキュサイトでのリアルタイム細胞傷害性アッセイにおいて優れた細胞傷害性とＣＡＲ増殖を示した。
【図７Ａ－２】（上記）
【図７Ｂ】実験終了時の代表的な画像を図７Ｂに示す。腫瘍細胞はグリーンである。表示されたデータは、３人の健康なドナーのＴ細胞から２回繰り返して製造されたＣＡＲ－Ｔ細胞を表すものである。実験は少なくともｎ＝２回繰り返した。
【図８Ａ】図８Ａ～８Ｅは、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}がインビボで混合腫瘍集団を

根絶することを示している。図８Ａは、ＮＳＧマウスに、生物発光（ＢＬＩ）レポーターであるクリックビートルグリーンを発現する５×１０^{5}個の混合集団Ｍｏｌｍ１３細胞（９０％ Ｍｏｌｍ１３^{ＣＤ７０ＫＯ}、１０％ Ｍｏｌｍ１３^{ＷＴ}、ｎ＝１０マウス／群）を－７日目に注射したことを示している。０日目に、マウスに、２×１０^{6}個のＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}又はＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}細胞を投与した（群当たり個々のＴ細胞ドナー当たり、ｎ＝５マウス）。

【図８Ｂ】図８Ｂ～８Ｃは、連続ＢＬＩモニタリングにより、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}マウス群の腫瘍が根絶されたが、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}では腫瘍増殖が制御されなかったことを示している。Ｐ値は二元配置分散分析によって示される。

【図８Ｃ】（上記）

【図８Ｄ－Ｅ】図８Ｄは、ＣＡＲ－Ｔ注射後１４～２８日目にフローサイトメトリーで定量した末梢血増殖を示している。Ｐ値は、個々のマン・ホイットニーのＵ検定の結果として報告される。図８Ｅは、ＣＡＲ－Ｔ注射後＋２１日目にマウスの血液からフローサイトメトリーで得た末梢血ＣＡＲ－Ｔ表現型プロファイリングを、刺激も形質導入もされていないドナー適合Ｔ細胞と比較して示す。代表的な例を示す。ＣＭ（セントラルメモリー）、ＥＭ（エフェクターメモリー）、ＴＤＥ（最終分化エフェクター）。

【図９Ａ】図９Ａ～９Ｃは、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}細胞が、インビボでＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}細胞と比較して多岐にわたる発現プログラムを示すことを示している。図９Ａは、コンストラクト間の転写プログラムの差異を強調したボルケーノプロットを示している。調整ｐ値が０．０５（Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ）未満の遺伝子はレッドで着色されている。

【図９Ｂ】図９Ｂは、全ての利用可能なパスウェイを統合して、偏りのない形でパスウェイクラスタリングが実施されたことを示している（上）。選択されたパスウェイのヒートマップを下に示す。

【図９Ｃ】図９Ｃは、ＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}（右）及びＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}（左）のＴＣＲシグナル伝達のパスウェイスコアを示している。Ｐ値は、独立ｔ検定による。

【図１０】図１０は、患者由来異種移植（ＰＤＸ）ＡＭＬマウスモデルへの二通りの異なる用量のＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}ＣＡＲ Ｔ細胞の投与を示している。５×１０^{6}個のＡＭＬ ＰＤＸ細胞を、－４日目にマウスに投与した。０日目に、５×１０^{5}個又は１×１０^{6}個のＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}ＣＡＲ Ｔ細胞をマウスに投与した。未治療及びＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ１９ＴＥＡＭ}を対照として使用した。１５日目に、マウスの血液中の腫瘍細胞（ＣＤ３３＋／ＣＤ４５＋）濃度を測定した。結果は、５×１０^{5}個及び１×１０^{6}個のＣＤ７０ＣＡＲ^{ＣＤ３３ＴＥＡＭ}ＣＡＲ Ｔ細胞を投与すると、腫瘍細胞濃度に同様の効果があったことを示している。

【図１１Ａ－Ｂ】図１１Ａ～１１Ｅは、ＣＤ３３Ｔ細胞エンゲージ抗体分子を分泌するＣＤ７０－ＣＡＲ－Ｔ細胞の構築を示している。図１１Ａは、ＮＳＧマウスに５×１０^{6}個のＤＦＡＭ６８５５５ ＡＭＬ患者由来異種移植細胞を－４日目に移植したことを示している。０日目に、マウスに２×１０^{6}個のＣＤ７０標的ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与した。殆どのＣＡＲ－Ｔ細胞治療マウスでは腫瘍が消失したが、一部のマウスではＣＤ７０^{ｌｏｗ}腫瘍が再発した。図１１Ｂは、ＣＤ３３－ＣＤ３Ｔ細胞エンゲージ抗体分子を分泌するＣＤ７０ＣＡＲ－Ｔ細胞を示している。

【図１１Ｃ】（上記）

【図１１Ｄ－Ｅ】図１１Ｄは、ここで使用したＣＡＲのコンストラクト図を示している。図１１Ｅは、初代健常ドナーＴ細胞の形質導入効率を示している（ｎ＝３の異なる健常ドナーで、少なくとも２つの別々の実験を代表）。

【図１２Ａ】図１２Ａ～１２Ｄは、ＴＥＡＭがＣＡＲ－Ｔ細胞によって分泌され、適切な標的抗原に結合することを示している。図１２Ａは、示された条件（行）からの上清を、示された細胞型（列）に添加し、フローサイトメトリーによって抗Ｈｉｓタグ（ＴＥＡＭ）結合について評価したことを示している。

【図１２Ｂ－Ｃ】図１２Ｂは、示されたコンストラクトを形質導入したジャーカットＴ細胞の上清を、プレート結合したＣＤ３３発現Ｋ５６２腫瘍細胞並びに抗Ｈｉｓタグ ＡＦ６４７抗体と共にインキュベートしたことを示している。蛍光強度をインキュサイトで測定し、代表的な画像を示す。図１２Ｃは、示されたコンストラクトを形質導入したジャーカットＴ細胞から得た上清を、Ｍｏｌｍ１３腫瘍細胞、未形質導入（ＵＴＤ）の健康な初代ヒトＴ細胞、及び抗ＣＤ６９抗体と共培養したことを示している。ＣＤ６９を発現する細胞の経時的なパーセントを示す。ＰＭＡ＝ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート陽性対照。

【図１２Ｄ】図１２Ｄは、70^{33}又は70^{19}コンストラクトを形質導入した細胞、又はＵＴＤをトランスウェルインサートの上部に添加したことを示している。ＵＴＤは、$Molm13^{WT}$又は$Molm13^{CD33KO}$細胞と共にトランスウェルインサートの底部に添加した。腫瘍増殖を経時的に測定した。Ｐ値は、示された条件間の二元配置分散分析を表す。実験は少なくともｎ＝２回繰り返した。

【図１３Ａ】図１３Ａ～１３Ｃは、ＣＡＲとＴＥＡＭによる同時Ｔ細胞リダイレクトが異種腫瘍に対して有効であり、個々のＣＡＲの混合物よりも優れていることを示している。図１３Ａは、個別に標的化されたＣＡＲ３３Ｔ細胞を、２：１のエフェクター：標的比で、改変されたＭｏｌｍ１３ｗｔ、$Molm13^{CD70KO}$、$Molm13^{CD33KO}$ＡＭＬ標的に対して70^{33}又は70^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞と比較したことを示している。

【図１３Ｂ－１】フローサイトメトリーで評価した示された標的の発現（左）と、リアルタイム細胞傷害性アッセイ（図１３Ｂ上部）及びＣＡＲ－Ｔ増殖（図１３Ｂ下部）の結果が示されている。

【図１３Ｂ－２】（上記）

【図１３Ｃ】図１３Ｃは、示された条件での４０時間後のインキュサイトからの代表的な画像を示している。表示されたデータは、３人の健康なドナーのＴ細胞から製造されたＣＡＲ－Ｔ細胞を二組実施したデータの組み合わせを表している。実験は少なくともｎ＝２回繰り返した。Ｐ値は、示された条件の二元配置分散分析を表す。

【図１４Ａ－Ｂ】図１４Ａ～１４Ｄは、ＡＭＬの患者由来異種移植モデルにおいて、ＣＡＲとＴＥＡＭを介した同時Ｔ細胞リダイレクトが標準ＣＡＲ－Ｔ細胞よりも優れていることを示している。図１４Ａは、5×10^{6}個のＤＦＡＭ６８５５５ ＡＭＬ ＰＤＸ細胞を、－４日目にＮＳＧマウス（ｎ＝５匹／群）に尾静脈から注射したことを示している。４日後の０日目に、5×10^{5}個又は1×10^{6}個の70^{33}又は70^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞を尾静脈から注射した。図１４Ｂは、ＣＤ３３ ＴＥＡＭを分泌するＣＤ７０ＣＡＲ－Ｔ細胞（70^{33}）が、ＣＤ１９ ＴＥＡＭを分泌するＣＤ７０ＣＡＲ－Ｔ細胞（70^{19}）よりも高い効率で循環ＣＤ３３＋腫瘍細胞を殺傷することを示している。

【図１４Ｃ－Ｄ】１４Ｃは、＋１４日目に循環している70^{33}及び70^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞の数を示している。図１４Ｄは、実験におけるマウスの生存率である。Ｐ値は、ログランクマンテルコックスを表す。

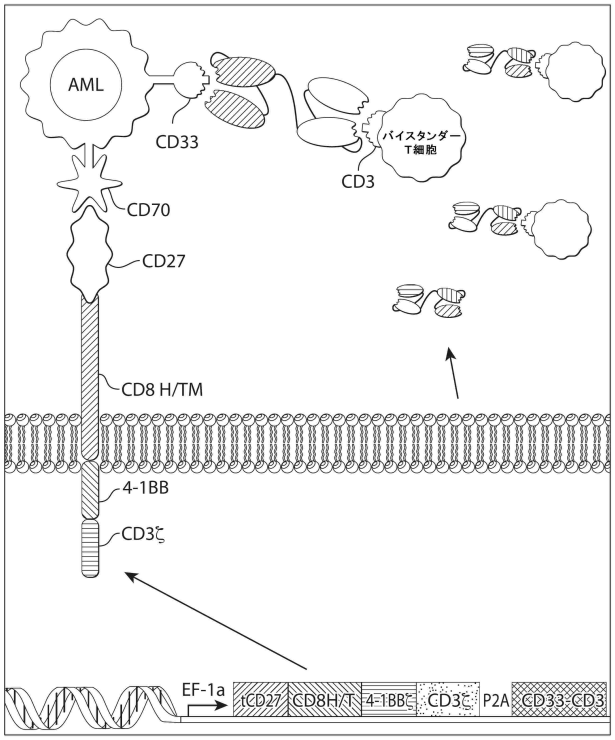
【図１５Ａ－Ｂ】図１５Ａ～１５Ｈは、70^{33}がインビボで混合腫瘍集団を根絶することを示している。図１５Ａは、ＮＳＧマウスに、生物発光（ＢＬＩ）レポーターであるクリックビートルグリーンを発現する5×10^{5}個の混合集団Ｍｏｌｍ１３細胞（９０％ $Molm13^{CD70KO}$、１０％ $Molm13^{WT}$、ｎ＝１０マウス／群）を－７日目に注射したことを示している。０日目に、マウスに70^{19}又は$70CAR^{33}$細胞の何れかを2×10^{6}個投与した（群当たり個々のＴ細胞ドナー当たり、ｎ＝５マウス）。図１５Ｂは、ＣＡＲ－Ｔ注射後１４～２８日目にフローサイトメトリーで定量したＣＡＲ－Ｔ細胞の末梢血増殖を示している。

【図１５Ｃ】図１５Ｃ～１５Ｄは、腫瘍増殖の連続ＢＬＩモニタリングを示している。Ｐ値は二元配置分散分析を表す。

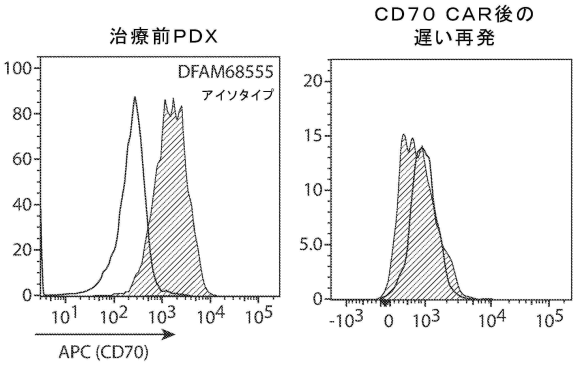
【図１５Ｄ－Ｅ】図１５Ｄ（上記）。図１５Ｅは、ＣＡＲ－Ｔ注射後＋２１日目にマウスの血液からフローサイトメトリーで得た末梢血ＣＡＲ－Ｔ表現型プロファイリングを、刺激も形質導入もしていないドナー適合Ｔ細胞と比較して示している。代表的な例を示す。

ＣＭ（セントラルメモリー）、ＥＭ（エフェクターメモリー）、ＴＤＥ（最終分化エフェクター）。
【図１５Ｆ】図１５Ｆは、混合腫瘍モデルのマウスの脾臓から＋２８日目にＦＡＣＳ選別したＣＡＲ－Ｔ細胞が、カスタム「ドロップイン」遺伝子セットに加えてＣＡＲ－Ｔ特性評価パネルを用いてナノストリングで遺伝子発現解析を受けたことを示している。ボルケーノプロットは、コンストラクト間の転写プログラムの差異を強調している。調整ｐ値が０．０５未満（Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ）の遺伝子は濃いグレーで着色している。
【図１５Ｇ－Ｈ】図１５Ｇは、全ての利用可能なパスウェイを統合する偏りのない形で実施されたパスウェイ階層的クラスタリングを示している（上部）。選択されたパスウェイのヒートマップが示される。図１５Ｈは、70^{33T}及び$70CAR^{19}$のＴＣＲシグナル伝達のパスウェイスコアを示している。ｐ値は独立ｔ検定による。
【図１６Ａ－Ｂ】図１６Ａ～１６Ｇは、ＴＥＡＭがＡＭＬ患者のＴ細胞を効果的にリダイレクトして腫瘍細胞を殺傷することを示している。図１６Ａは、そのＴ細胞が利用されたＡＭＬ患者の臨床的特徴を示している。図１６Ｂは、ＡＭＬ患者のＴ細胞と健康なドナーのＴ細胞とを比較したフローＴ細胞表現型を示している。
【図１６Ｃ】図１６Ｃは、ＡＭＬ患者のＴ細胞における代表的な表現型とＰＤ－１発現を示している。
【図１６Ｄ】図１６Ｄは、ＴＥＡＭ産生細胞と、単離されたＡＭＬ患者のＴ細胞及びＭｏｌｍ１３腫瘍標的との共培養を示している。リアルタイム細胞傷害性をインキュサイトで測定。
【図１６Ｅ】図１６Ｅは、健康なドナーと比較した患者から得られた１８時間後の正規化されたサイトカイン測定値を示している。
【図１６Ｆ】図１６Ｆは、腫瘍標的と共に、上部のＴＥＡＭ産生細胞と、下部の単離されたＡＭＬ患者Ｔ細胞を用いたトランスウェルアッセイを示している。リアルタイム細胞傷害性が測定され（上部）、活性化（ＣＤ６９）が下部に示される。
【図１６Ｇ】図１６Ｇは、４０時間の活性化での代表的な画像を示している。
【図１７】図１７は、ＣＡＲとＴＥＡＭによる同時Ｔ細胞リダイレクトが、内因性抗原発現レベルを持つ異種腫瘍に対して有効であり、個々のＣＡＲの混合物よりも優れていることを示している。個別に標的化されたＣＡＲ３３Ｔ細胞を、ＡＭＬ細胞株Ｋａｓｕｍｉ１、Ｍｏｎｏｍａｃ１、及びＯＣＩ－ＡＭＬ３に対して、２：１のエフェクター：標的比で70^{33}又は70^{19}ＣＡＲ－Ｔ細胞と比較した。フローサイトメトリーで評価された示された標的の発現（左）と、リアルタイム細胞傷害性アッセイ（上部）及びＣＡＲ－Ｔ増殖（下部）の結果が示される。表示されたデータは、３人の健康なドナーのＴ細胞から製造されたＣＡＲ－Ｔ細胞を二組で実施した複合データを表している。実験は少なくともｎ＝２回繰り返した。Ｐ値は、示された条件の二元配置分散分析を表す。
【図１８】図１８は、利用可能な全てのパスウェイを統合して、パスウェイ階層クラスタリングが偏りのない形で実施されたことを示している（上部）。ヒートマップは全てのナノストリングの利用可能な経路を示す。

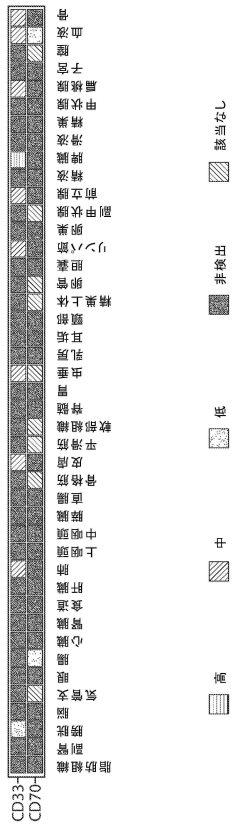
【手続補正書】
【提出日】令和７年５月１日(２０２５.５.１)
【手続補正１】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【手続補正１】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】全図
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図面】
【図１】



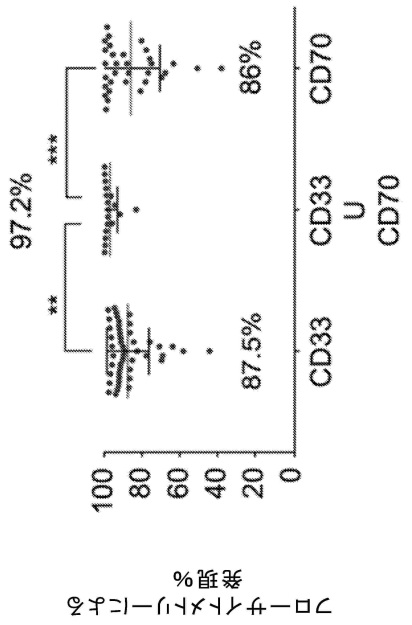
【図２】



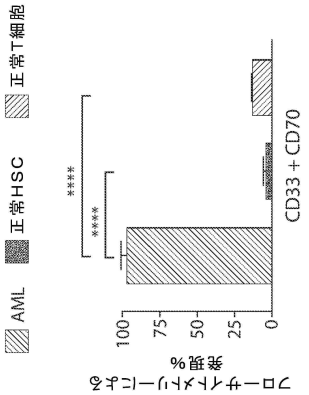
【図３Ａ】



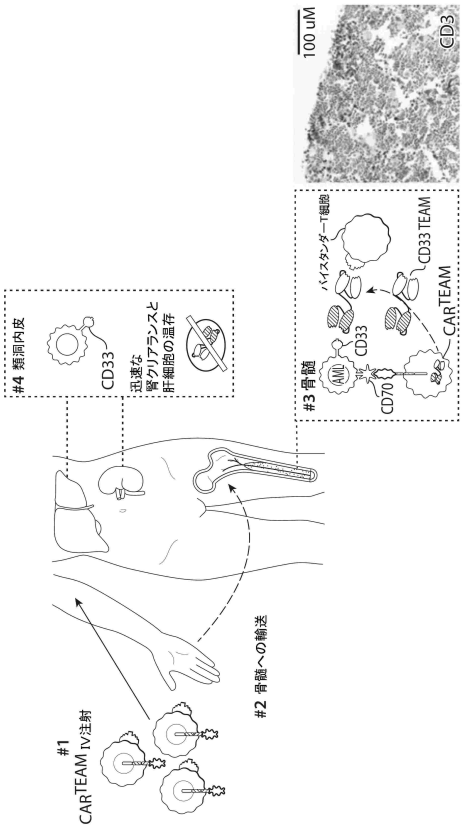
【図３Ｂ】



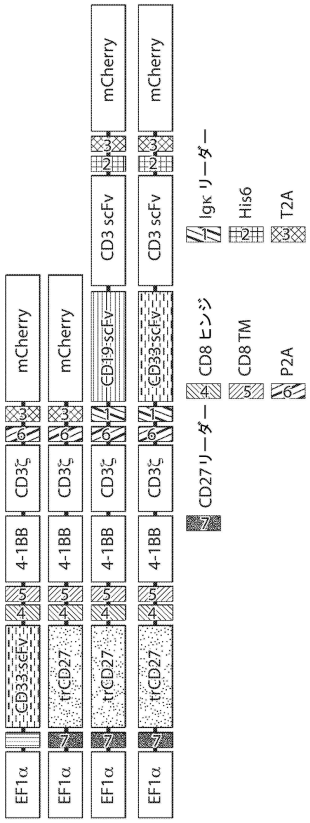
【図３Ｃ】



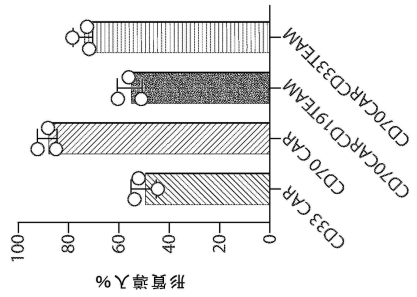
【図４】



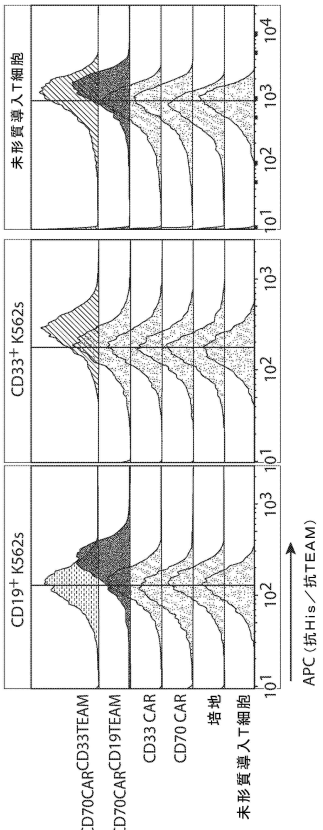
【図５Ａ】



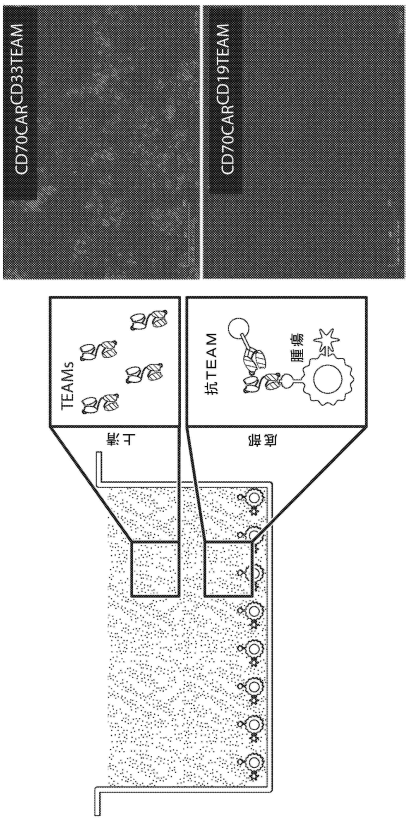
【図５Ｂ】



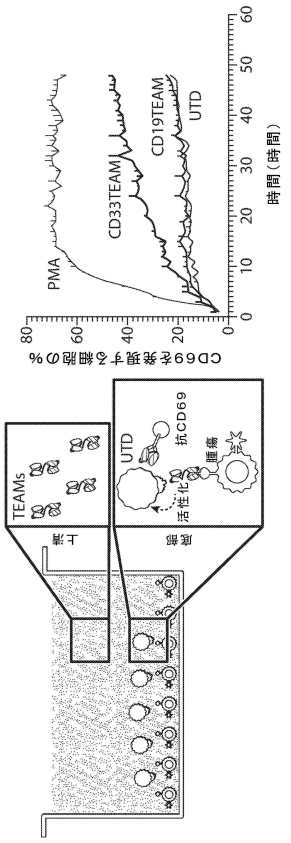
【図５Ｃ】



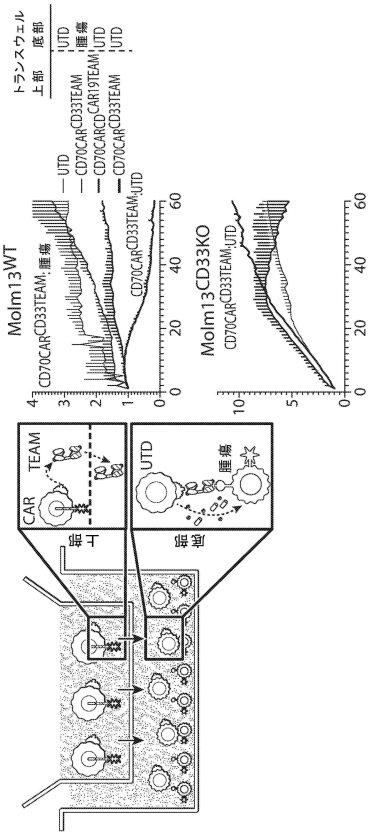
【図５Ｄ】



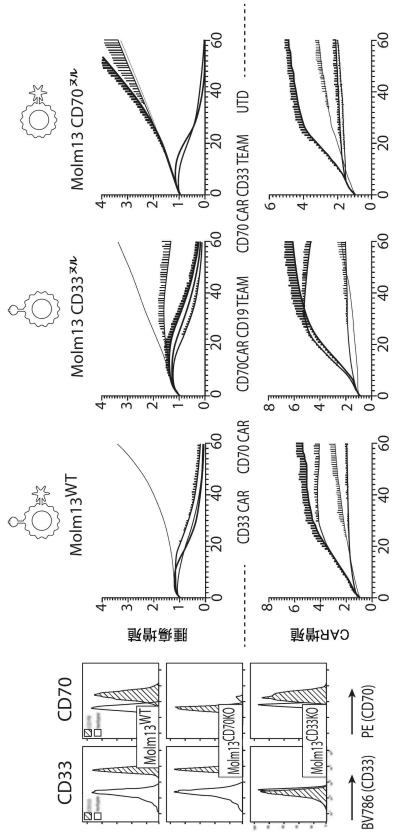
【図５Ｅ】



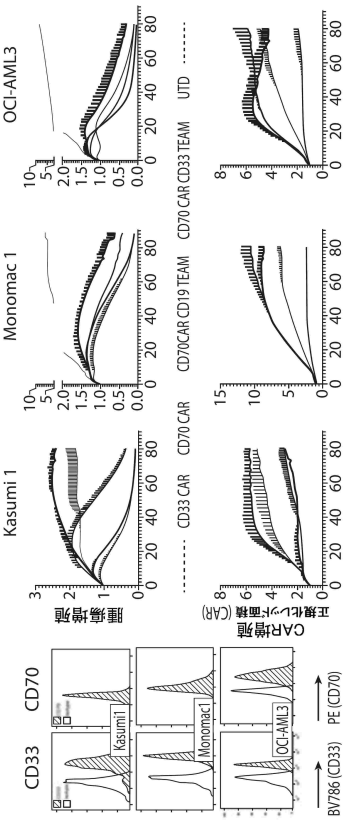
【図６】



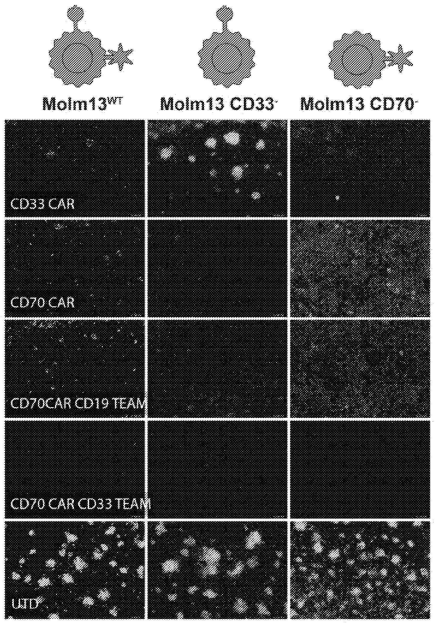
【図７Ａ－１】



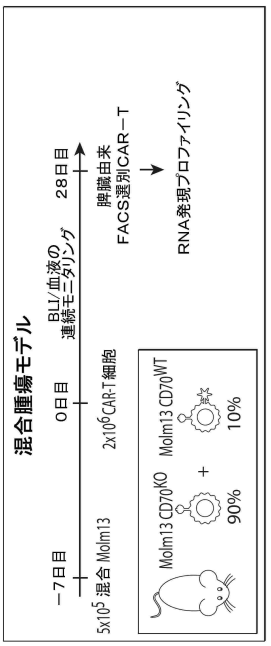
【図７Ａ－２】



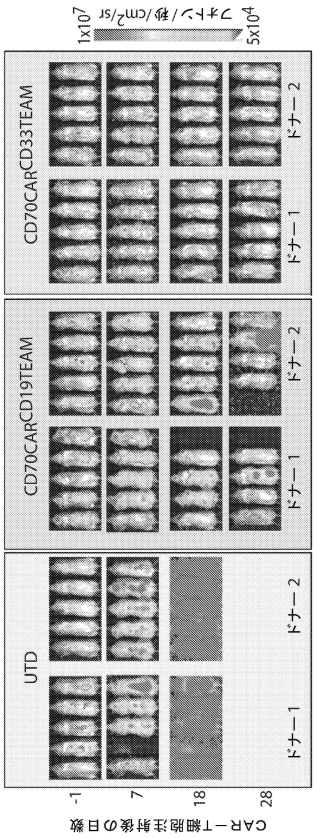
【図７Ｂ】



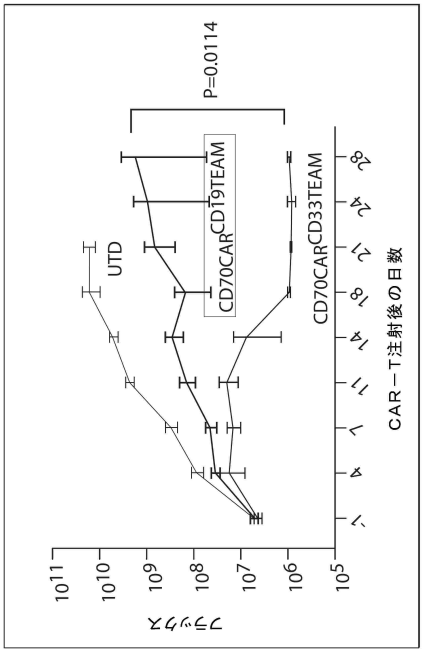
【図８Ａ】



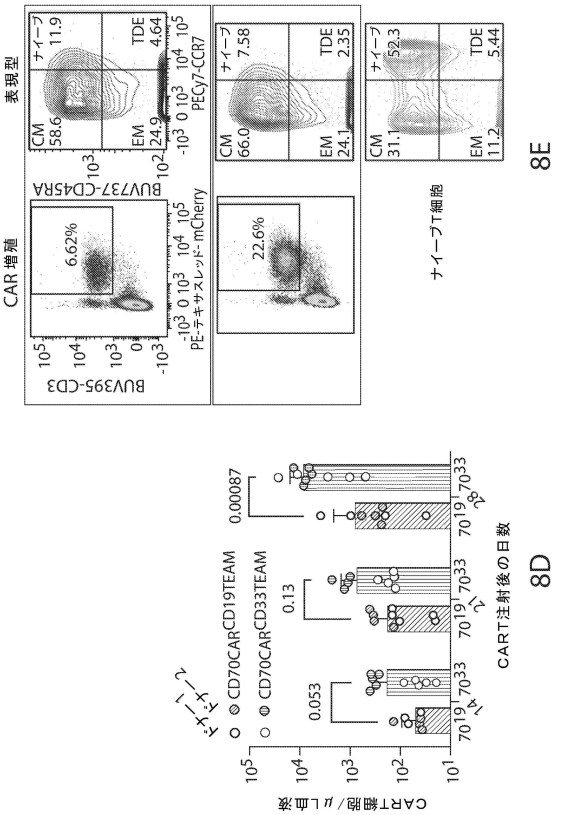
【図８Ｂ】



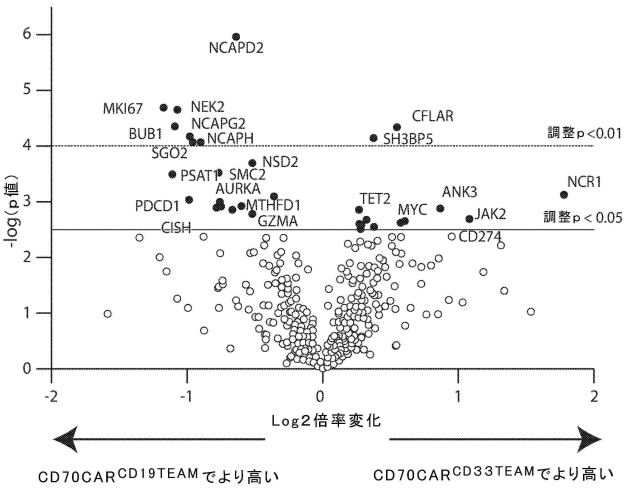
【図８Ｃ】



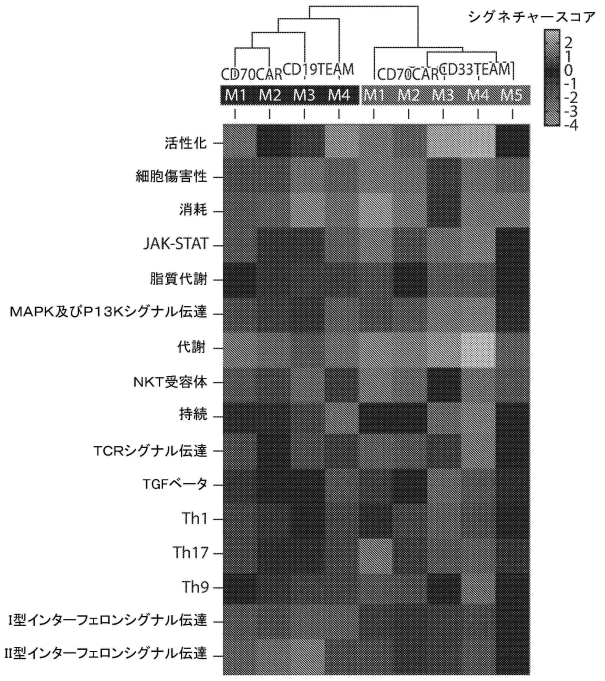
【図８Ｄ－Ｅ】



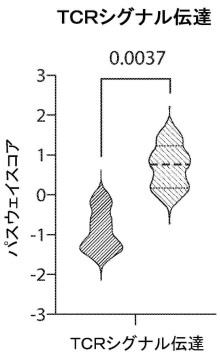
【図９Ａ】



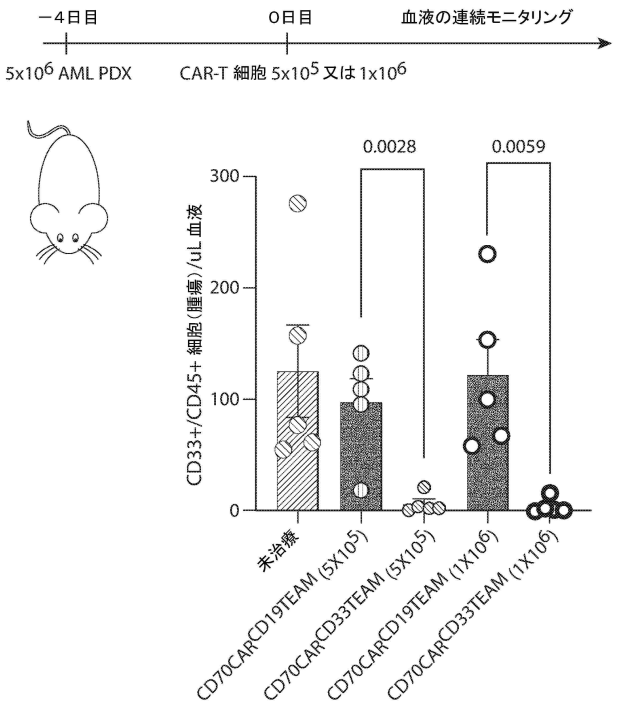
【図９Ｂ】



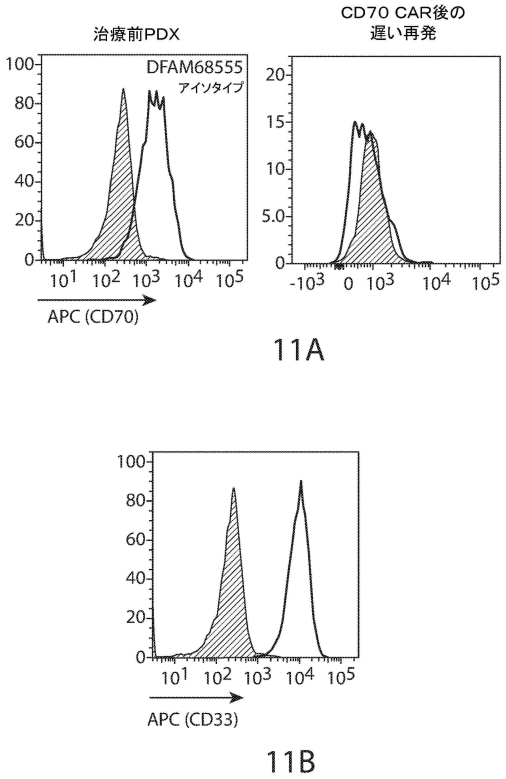
【図９Ｃ】



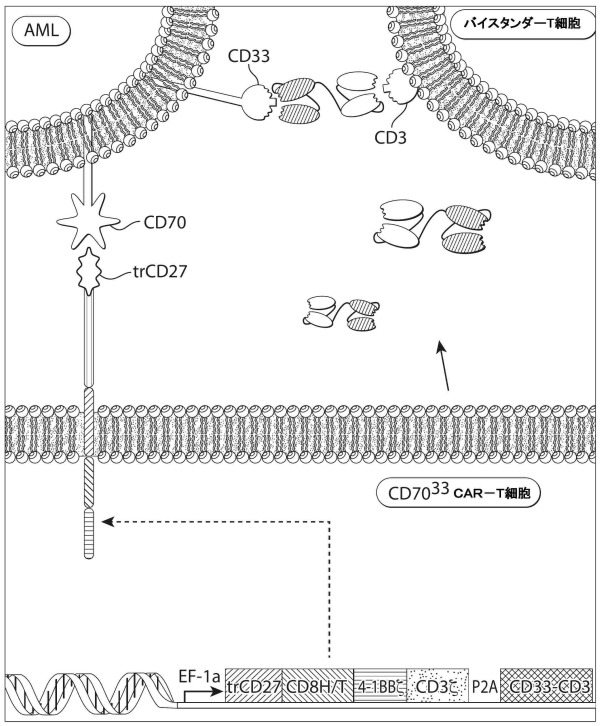
【図１０】



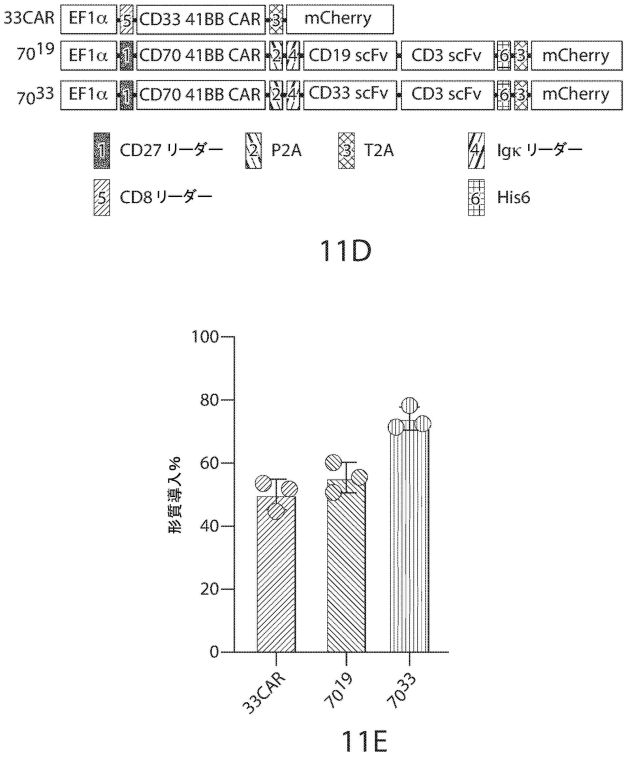
【図１１Ａ－Ｂ】



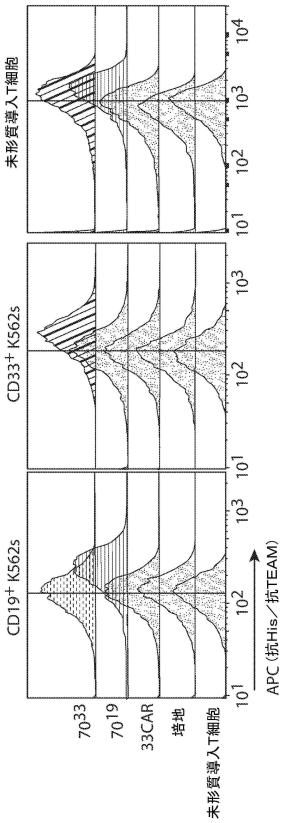
【図１１Ｃ】



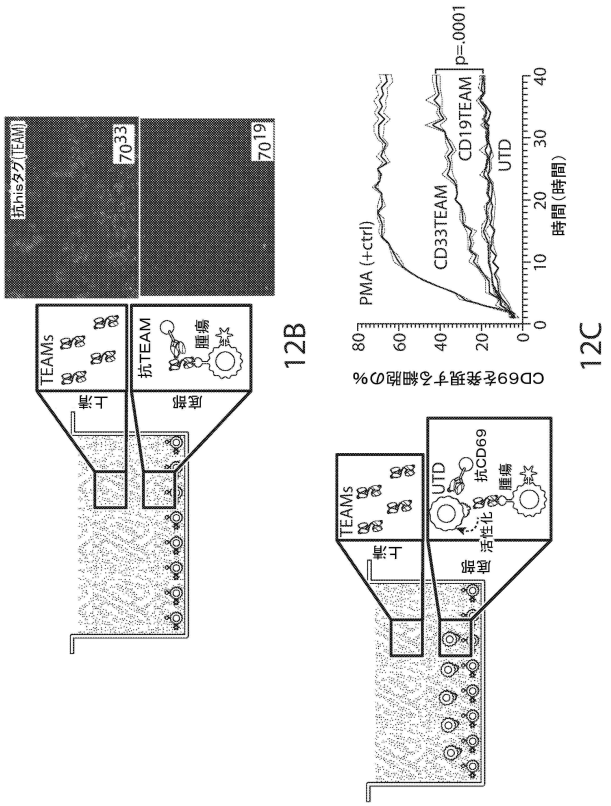
【図１１Ｄ－Ｅ】



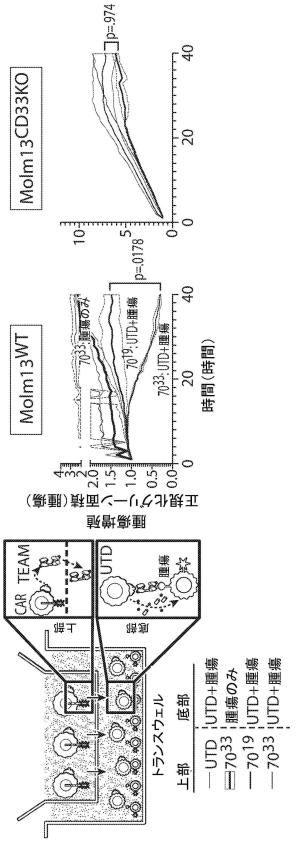
【図１２Ａ】



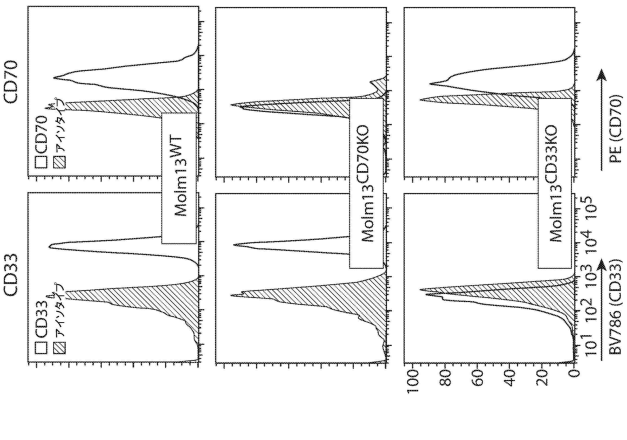
【図１２Ｂ－Ｃ】



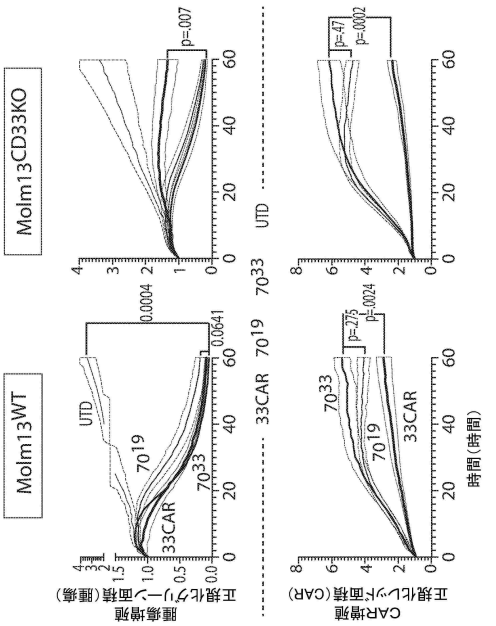
【図１２Ｄ】



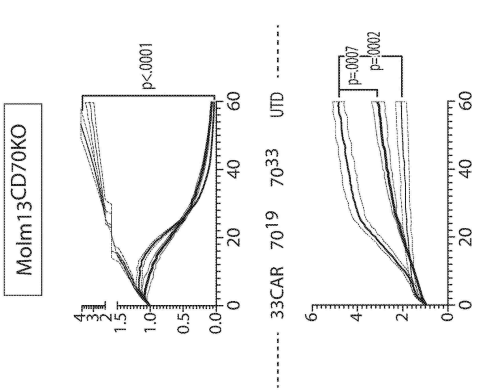
【図１３Ａ】



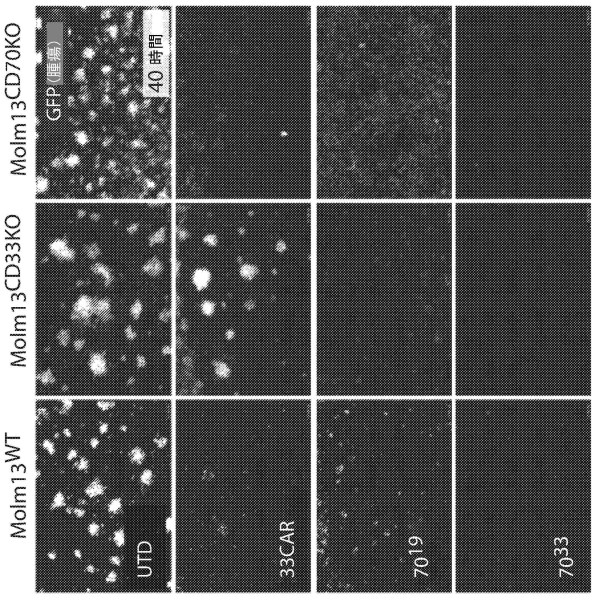
【図１３Ｂ－１】



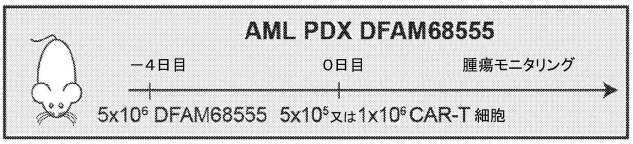
【図１３Ｂ－２】



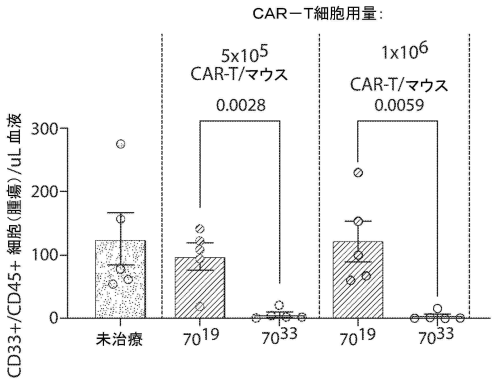
【図１３Ｃ】



【図１４Ａ－Ｂ】

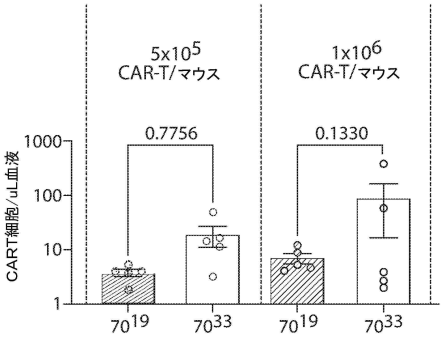


14A

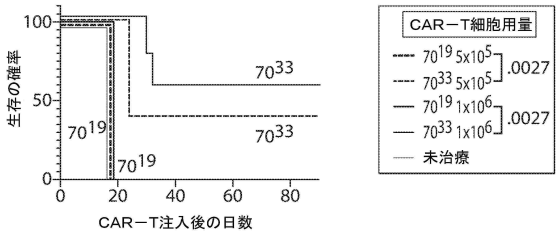


14B

【図１４Ｃ－Ｄ】

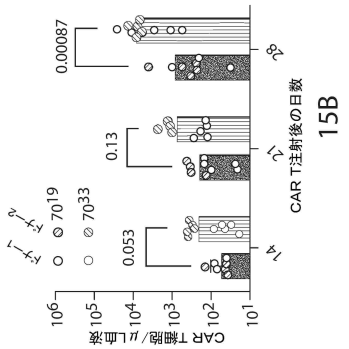


14C

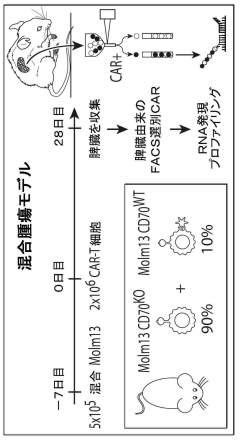


14D

【図１５Ａ－Ｂ】

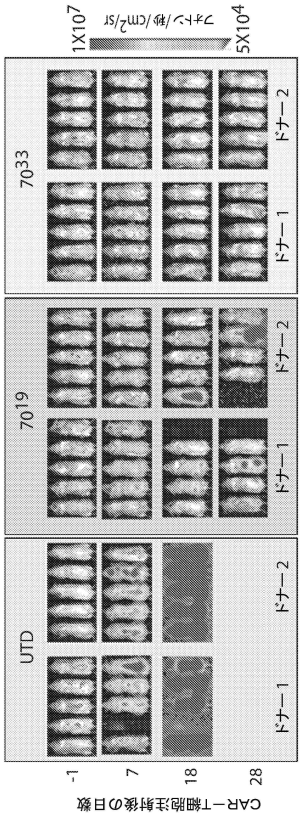


15B

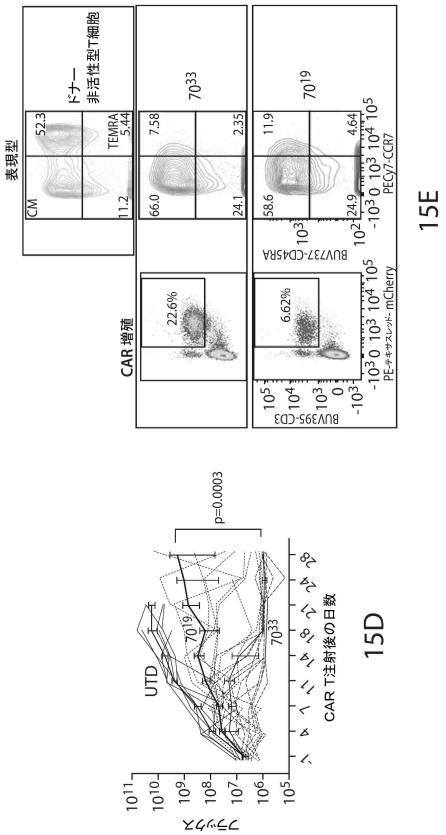


15A

【図１５Ｃ】



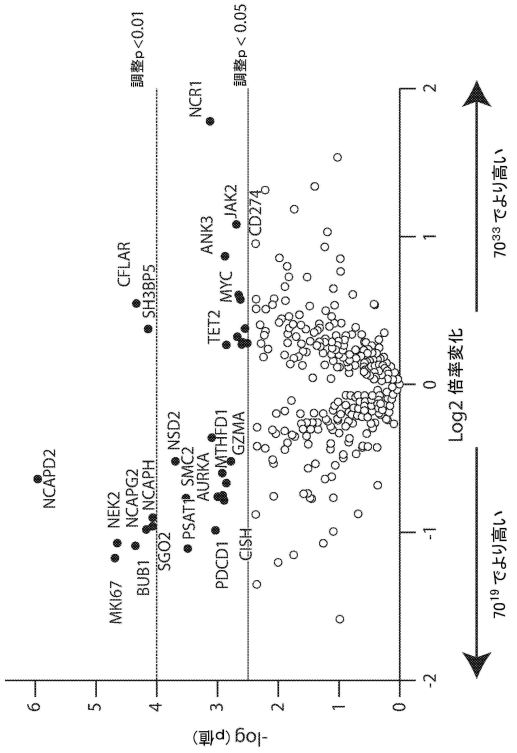
【図１５Ｄ－Ｅ】



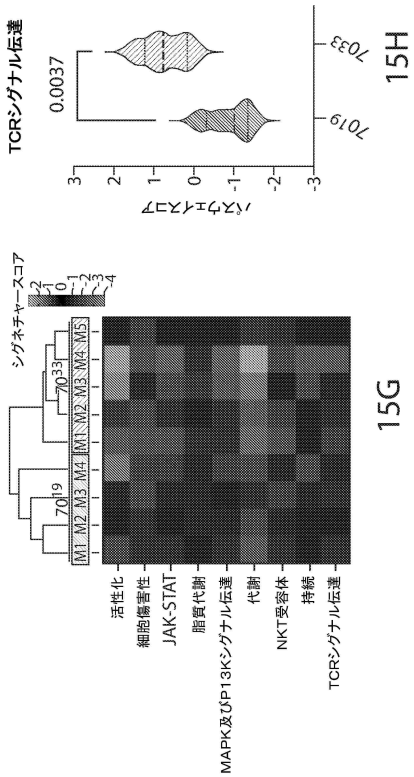
15E

15D

【図１５Ｆ】



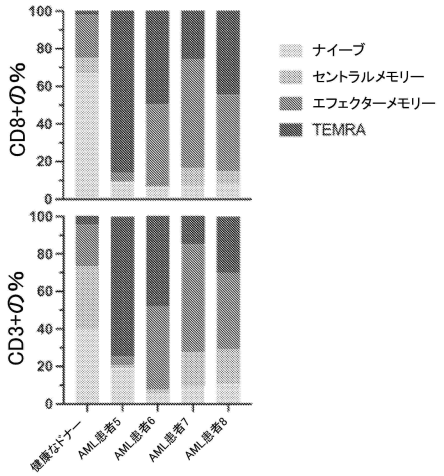
【図１５Ｇ－Ｈ】



【図１６Ａ－Ｂ】

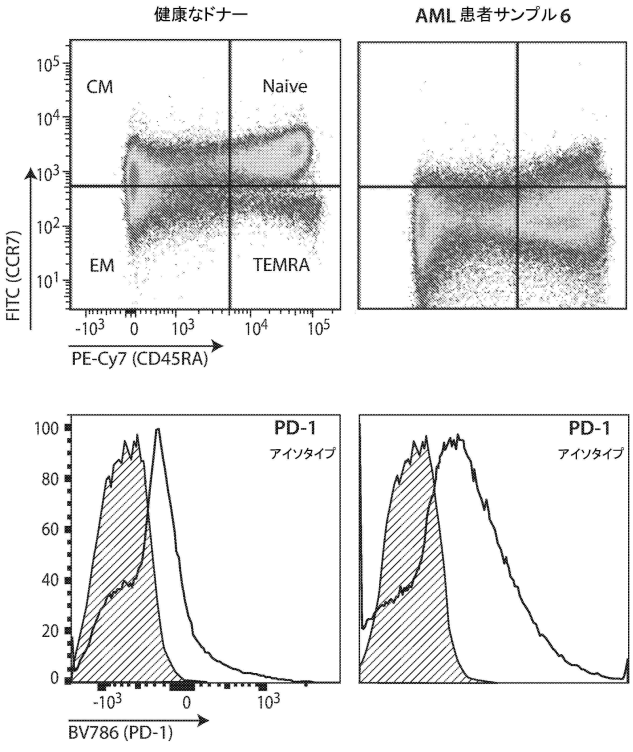
患者ID	診断	年齢	治療
1	再発したAML	74	HMA
2	再発したAML	35	導入、地固め、移植 、HAM
3	CRのAML	78	HMA
4	CRのAML	66	導入+IDHi
5	難治性AML	36	導入、地固め、移植 、MEC、HMA/rev
6	再発したAML	29	導入、地固め、移植 、hidac
7	再発したAML	70	HMA、導入、地固め、移植、シタラビン/MTX
8	再発したAML	78	HMA

16A

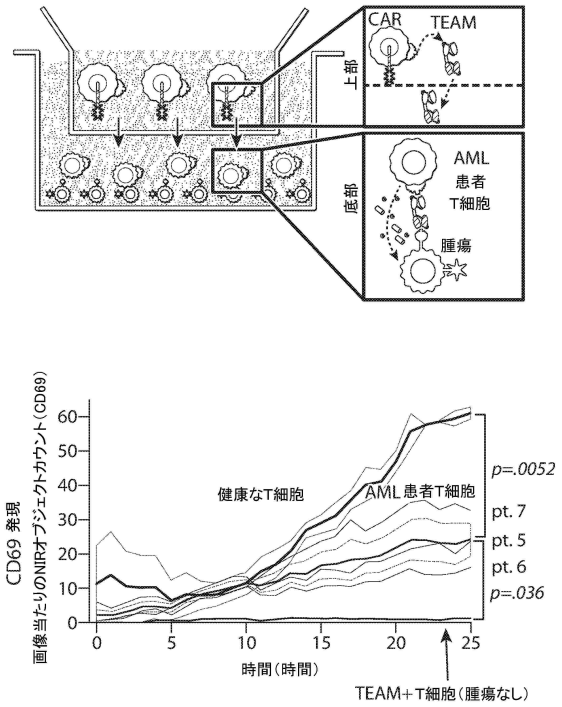


16B

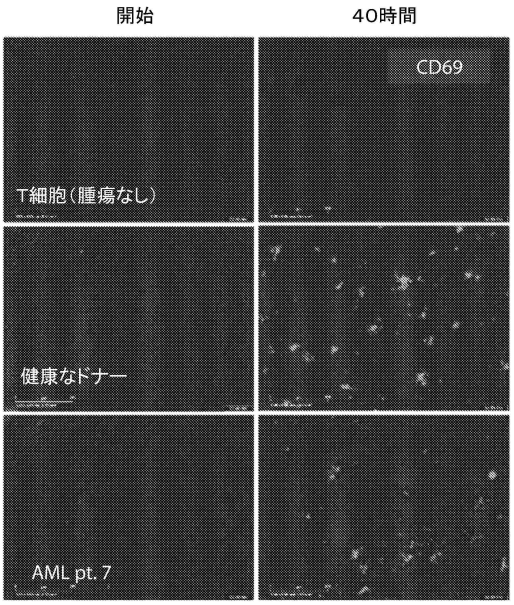
【図１６Ｃ】



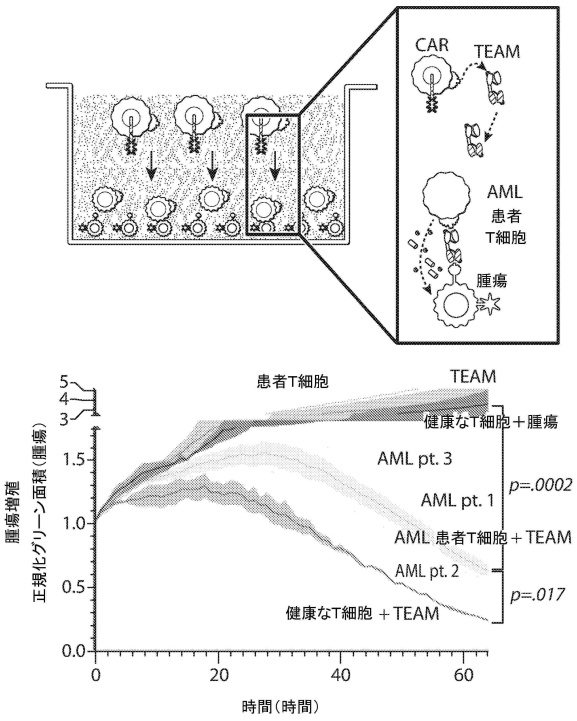
【図１６Ｄ】



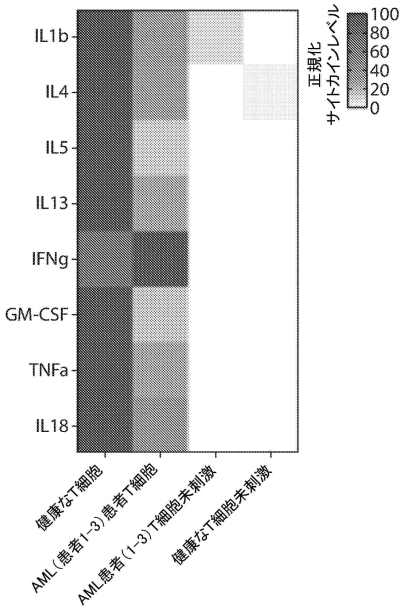
【図１６Ｅ】



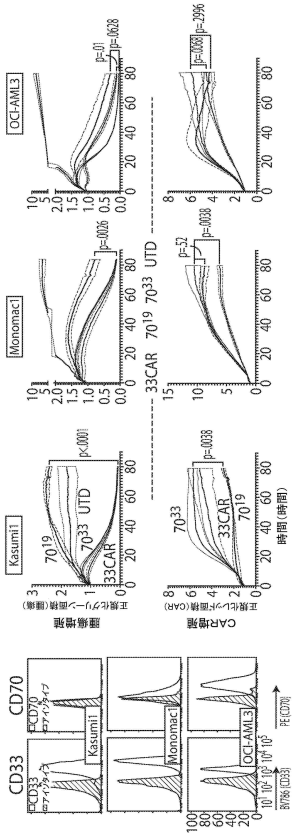
【図１６Ｆ】



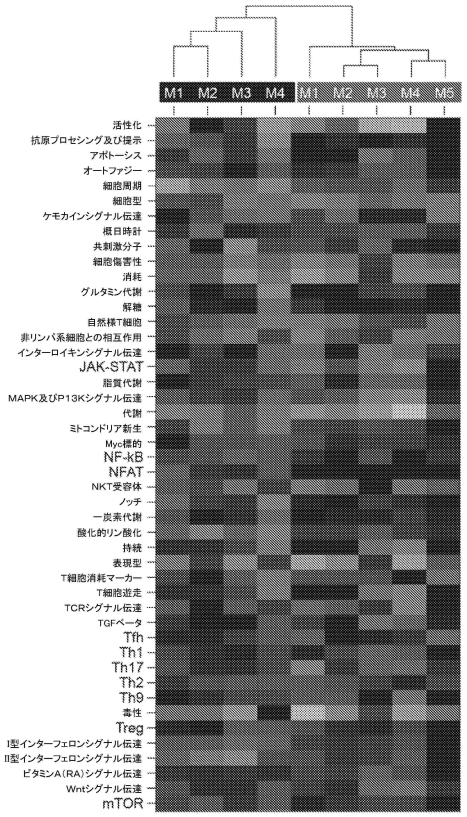
【図１６Ｇ】



【図１７】



【図１８】



【手続補正２】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正２
【補正方法】削除
【補正の内容】
【手続補正３】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正３
【補正方法】削除
【補正の内容】
【手続補正４】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正４
【補正方法】削除
【補正の内容】
【手続補正５】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正５
【補正方法】削除
【補正の内容】
【手続補正６】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正６
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正７】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正７
【補正方法】削除
【補正の内容】
【手続補正８】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正８
【補正方法】削除
【補正の内容】
【手続補正９】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正９
【補正方法】削除
【補正の内容】
【手続補正１０】
【補正対象書類名】手続補正書
【補正対象項目名】手続補正１０
【補正方法】削除
【補正の内容】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/65710

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 35/17; C07K 14/705; C12N 15/86 (2023.01)
ADD.

CPC - INV. C12N 5/0636; A61K 35/17; A61K 39/0011; A61K 39/001102; A61K 51/1027; C07K 14/705; C07K 14/70575; C12N 15/86; C12N 2510/00
ADD.

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 database consulted during the international search (name of database 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	US 2021/0261919 A1 (CRISPR THERAPEUTICS AG) 26 August 2021; [0013], [0026], [0396]	1-5
A	US 2019/0328787 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 31 October 2019; Entire document	1-5
A	US 10,875,919 B2 (ALECTOR LLC) 29 December 2020; Entire document	1-5

☐ 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	Date of mailing of the international search report
29 June 2023 (29.06.2023)	JUL 31 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/65710

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 13*ter*.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/US23/65710

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.: 6-59
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:

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.:

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61P 7/00 (2006.01)		A61P	7/00		4H045
A61P 35/02 (2006.01)		A61P	35/02		
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	T	
A61K 47/68 (2017.01)		A61K	39/395	U	
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	47/68		
A61K 40/31 (2025.01)		A61K	48/00		
A61K 40/33 (2025.01)		A61K	40/31		
A61K 40/50 (2025.01)		A61K	40/33		
A61K 40/42 (2025.01)		A61K	40/50		
A61K 40/11 (2025.01)		A61K	40/42		
A61K 40/15 (2025.01)		A61K	40/11		
A61K 40/19 (2025.01)		A61K	40/15		
A61K 40/17 (2025.01)		A61K	40/19		
A61K 40/13 (2025.01)		A61K	40/17		
A61K 40/10 (2025.01)		A61K	40/13		
A61K 35/17 (2025.01)		A61K	40/10		
A61K 35/15 (2025.01)		A61K	35/17		
		A61K	35/15		

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,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,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,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

Fターム（参考）
4B065 AA94X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44
4C076 AA95 BB11 CC14 CC27 CC41 EE59
4C084 AA13 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA511 ZB021 ZB091 ZB261 ZB271
4C085 AA14 AA16 BB01 CC03 CC31 DD62 EE01 GG01
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 CA16 MA66 NA05 NA13 ZA51 ZB02 ZB09 ZB26 ZB27
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 DA50 DA76 EA20 FA72 FA74