

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7672340号

(P7672340)

(45)発行日 令和7年5月7日(2025.5.7)

(24)登録日 令和7年4月24日(2025.4.24)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

T

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 35/12 (2015.01)

A 6 1 K 35/12

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

Z N A

C 0 7 K 16/30 (2006.01)

C 0 7 K 16/30

請求項の数 37 (全82頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-547039(P2021-547039)

(86)(22)出願日 令和1年10月18日(2019.10.18)

(65)公表番号 特表2022-513372(P2022-513372
A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/057017

(87)国際公開番号 WO2020/081988

(87)国際公開日 令和2年4月23日(2020.4.23)

審査請求日 令和4年10月11日(2022.10.11)

(31)優先権主張番号 62/748,198

(32)優先日 平成30年10月19日(2018.10.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 500213834

メモリアル スローン ケタリング キャ
ンサー センターアメリカ合衆国 1 0 0 6 5 ニューヨー
ク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー
1 2 7 5

(73)特許権者 521167040

バイオエヌテック リサーチ アンド デ
ベロップメント, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
1 3 9, ケンブリッジ, エリー スト
リート 4 0, スイート 1 1 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シアリルルイスAを標的とするキメラ抗原受容体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象において悪性成長を処置または防止する方法における使用のための組成物であって、キメラ抗原受容体(CAR)を含む免疫応答性細胞を含み、

前記方法が、前記組成物の投与の前に、前記対象を低線量の照射に曝露することを含み、

前記CARが、シアリルルイスAに特異的に結合する細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、

前記細胞外抗原結合性ドメインは、

配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域CDR2、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域CDR3、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域CDR1、配列番号5に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域CDR2および配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域CDR3を含む、組成物。

【請求項2】

前記細胞外抗原結合性ドメインは、

a) 配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

b) 配列番号8に示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記細胞外抗原結合性ドメインが、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記細胞外抗原結合性ドメインが、一本鎖可変断片 (s c F v) を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記細胞外抗原結合性ドメインが、ヒト s c F v を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記細胞外抗原結合性ドメインが、F a b を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記細胞外抗原結合性ドメインが、F (a b)₂ を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 s c F V、F a b および F (a b)₂ のうち 1 つまたは複数が、異種配列との融合タンパク質中に含まれて、前記細胞外抗原結合性ドメインを形成する、請求項 4 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記細胞外抗原結合性ドメインが、前記細胞外抗原結合性ドメインの重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間にリンカーを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記細胞外抗原結合性ドメインが、前記細胞外抗原結合性ドメインの 5' 末端に共有結合によって繋がれるシグナルペプチドを含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記膜貫通ドメインが、C D 8 ポリペプチド、C D 2 8 ポリペプチド、C D 3 ζ ポリペプチド、C D 4 ポリペプチド、4-1 B B ポリペプチド、O X 4 0 ポリペプチド、I C O S ポリペプチド、C T L A-4 ポリペプチド、P D-1 ポリペプチド、L A G-3 ポリペプチド、2 B 4 ポリペプチド、B T L A ポリペプチドまたはそれらの組合せを含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記細胞内ドメインが、少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達領域をさらに含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達領域が、C D 2 8 ポリペプチド、4-1 B B ポリペプチド、O X 4 0 ポリペプチド、I C O S ポリペプチド、D A P-1 0 ポリペプチドまたはそれらの組合せを含む、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達領域が、C D 2 8 ポリペプチドを含む、請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記細胞内ドメインが、野生型 C D 3 ζ ポリペプチドまたは改変された C D 3 ζ ポリペプチドを含み、前記改変された C D 3 ζ ポリペプチドが、a) 免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (I T A M) のすべてもしくは一部を欠き、前記 I T A M が、I T A M 1、I T A M 2 および I T A M 3 であり、ならびに／または、b) 塩基性豊富ストレッチ (B R S) 領域のすべてもしくは一部を欠き、前記 B R S 領域が、B R S 1、B R S 2 および B R S 3 である、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記改変された C D 3 7 ポリペプチドが、

- a) I T A M 2 もしくはその部分を欠き、
- b) I T A M 1 もしくはその部分を欠き、
- c) I T A M 3 もしくはその部分を欠き、
- d) I T A M 2 もしくはその部分の欠失を含み、
- e) I T A M 1 もしくはその部分の欠失を含み、ならびに／または
- f) I T A M 3 もしくはその部分の欠失を含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記改変された C D 3 7 ポリペプチドが、

- a) B R S 2 もしくはその部分を欠き、
- b) B R S 1 もしくはその部分を欠き、
- c) B R S 3 もしくはその部分を欠き、ならびに／または
- d) B R S 1 もしくはその部分、B R S 2 もしくはその部分および B R S 3 もしくはその部分を欠き、
- e) B R S 2 もしくはその部分の欠失を含み、
- f) B R S 1 もしくはその部分の欠失を含み、
- g) B R S 3 もしくはその部分の欠失を含み、ならびに／または
- h) B R S 1 もしくはその部分、B R S 2 もしくはその部分および B R S 3 もしくはその部分の欠失を含む、請求項 15 または 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記改変された C D 3 7 ポリペプチドが、I T A M 2、I T A M 3、B R S 2 および B R S 3 を欠くか、または、I T A M 2、I T A M 3、B R S 2 および B R S 3 の欠失を含む、請求項 15 から 17 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

ヒンジ／スパーサー領域をさらに含み、前記膜貫通ドメインが、C D 8 ポリペプチド、C D 28 ポリペプチド、C D 3 7 ポリペプチド、C D 4 ポリペプチド、4-1 B B ポリペプチド、O X 40 ポリペプチド、C D 166 ポリペプチド、C D 8 a ポリペプチド、C D 8 b ポリペプチド、I C O S ポリペプチド、I C A M-1 ポリペプチド、C T L A-4 ポリペプチド、C D 27 ポリペプチド、C D 40 / M y 88 ペプチド、N K G D 2 ペプチドまたはそれらの組合せからなる群から選択される分子の天然または改変された膜貫通ドメインである、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

前記ヒンジ／スパーサー領域が、前記膜貫通ドメインが由来するものと同一の分子に由来する、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記 C A R が、

- a) C D 28 ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域および C D 28 ポリペプチドの膜貫通ドメイン、
 - b) C D 84 ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域および C D 84 ポリペプチドの膜貫通ドメイン、
 - c) C D 166 ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域および C D 166 ポリペプチドの膜貫通ドメイン、
 - d) C D 8 a ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域および C D 8 a ポリペプチドの膜貫通ドメイン、または
 - e) C D 8 b ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域および C D 8 b ポリペプチドの膜貫通ドメイン
- を含む、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記 C A R が、C D 166 ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域および C D 166 ポ

10

20

30

40

50

リペプチドの膜貫通ドメインを含む、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記膜貫通ドメインおよび前記ヒンジ／スパーサー領域が、異なる分子に由来する、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記 C A R が、C D 2 8 ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域および I C O S ポリペプチドの膜貫通ドメインを含む、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記 C A R が、組換え発現されるか、またはベクターから発現される、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記ベクターが、レトロウイルスベクターである、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記免疫応答性細胞が、前記 C A R を含む組成物を使用して改変される、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記 C A R が、前記免疫応答性細胞の表面で構成的に発現される、請求項 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記免疫応答性細胞が、T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ヒト胚性幹細胞、リンパ球様前駆細胞、T 細胞前駆体細胞、およびリンパ球様細胞が分化し得る多能性幹細胞からなる群から選択される、請求項 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記免疫応答性細胞が、T 細胞である、請求項 2 9 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記 T 細胞が、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）、制御性 T 細胞およびセントラルメモリー T 細胞からなる群から選択される、請求項 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

医薬組成物であり、薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記悪性成長が、膵臓がんである、請求項 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記方法が、前記対象において腫瘍負荷を低減または根絶する、請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記対象がヒトである、請求項 1 から 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 6】

悪性成長を処置または防止するためのキットであって、請求項 1 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物を含む、キット。

【請求項 3 7】

前記悪性成長が、膵臓がんである、請求項 3 6 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2018 年 10 月 19 日に出願された米国仮出願第 62 / 748, 198 号の優先権を主張し、その内容は、参照によりその全体が組み込まれ、かつ、優先権が主張される。

配列表

10

20

30

40

50

本出願は、A S C I I形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照によって本明細書に援用される。上記A S C I Iのコピーは、2019年11月12日に作成され、072734 0955 S L . t x tと命名され、サイズが36,876バイトである。

【0002】

導入

本開示の主題は、がん（例えば、膵臓がん）を処置するための方法および組成物を提供する。本開示の主題は、シアリルルイスAを特異的に標的とするキメラ抗原受容体（CAR）に関する。本開示の主題は、このようなCARを含む免疫応答性細胞、ならびにがん（例えば、膵臓がん）を処置するためにこのようなCARおよびこのような細胞を使用する方法をさらに提供する。

10

【背景技術】

【0003】

細胞ベースの免疫療法は、がんの処置のための治療の可能性を有する療法である。T細胞および他の免疫細胞は、選択された抗原に対して特異的なキメラ抗原受容体（CAR）と呼ばれる、抗原の人工または合成受容体をコードする遺伝物質の導入によって、腫瘍抗原を標的とするように改変され得る。CARを使用する標的化T細胞療法は、血液悪性腫瘍の処置において最近の臨床成功を示した（Dunbar et al., Science (2018);359）。固形腫瘍を標的とするCAR療法に対する応答は、今日まで、比較的に乏しいものであった（Sadelain et al., Nature (2017);545:423-431）。すべてのがん、特に、固形腫瘍における克服する課題のうちの1つは、抗原不均一性である。すべてまたはほとんどのB細胞悪性腫瘍がCD19を発現するのに対し（Brentjens et al., Nat Med (2003); 9:279-286）、多数の潜在的CAR標的は、患者内のすべての腫瘍細胞のうちのほんの一部のみで発現され、抗原逃避のリスクをもたらす。低レベル抗原発現はまた、CAR療法に対する耐性をもたらす可能性がある（Fry et al., Nat Med (2018); 24:20-28）。2つまたはそれより多い抗原を標的とすることが、定義された逃避集団またはクローンの事象において実行され得る（Wilkie et al., J Clin Immunol (2012); 32:1059-1070、Kloss et al., Nat Biotechnol (2013); 31:71-75、Ruella et al., J Clin Invest (2016); 126:3814-3826、Hegde et al., J Clin Invest (2016); 126:3036-3052、Zah et al., Cencer Immunol Res 2016; 4:498-508）が、より大きな、または定義されていない標的不均一性を克服するために他のアプローチが必要とされる。したがって、固形腫瘍細胞において高度に発現される抗原を標的とするCARを設計する新規治療戦略および最小の毒性で強力な抗がん効果を誘導可能な戦略が必要である。

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【文献】Dunbar et al., Science (2018);359

【文献】Sadelain et al., Nature (2017);545:423-431

【文献】Brentjens et al., Nat Med (2003); 9:279-286

【文献】Fry et al., Nat Med (2018); 24:20-28

【文献】Wilkie et al., J Clin Immunol (2012); 32:1059-1070

【文献】Kloss et al., Nat Biotechnol (2013); 31:71-75

【文献】Ruella et al., J Clin Invest (2016); 126:3814-3826

【文献】Hegde et al., J Clin Invest (2016); 126:3036-3052

【文献】Zah et al., Cencer Immunol Res 2016; 4:498-508

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示の主題は、概して、シアリルルイスAを標的とするキメラ抗原受容体（CAR）

40

50

を提供する。

【0006】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAへの結合について、参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合する。一部のこのような実施形態では、シアリルルイスAに結合する参照抗体またはその抗原結合性部分は、1、2または3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2および／またはCDR3）含む重鎖可変領域ならびに1、2または3つの軽鎖CDR（CDR1、CDR2および／またはCDR3）を含む軽鎖可変領域を含み、重鎖CDR1、CDR2およびCDR3ならびに軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3は、その内容が参照によりその全体が組み込まれる米国特許第9,475,874号において開示される抗体のうちいずれか1つの重鎖CDR1、CDR2およびCDR3ならびに軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3から選択される。

10

【0007】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAへの結合について、参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合し、参照抗体またはその抗原結合性部分は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2および配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。

20

【0008】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、参照抗体またはその抗原結合性部分と同一または重複する、シアリルルイスA上のエピトープに結合し、参照抗体またはその抗原結合性部分は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2および配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。

30

【0009】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAに特異的に結合し、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3またはその保存的改変および配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3またはその保存的改変を含む。

【0010】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2またはその保存的改変および配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2またはその保存的改変を含む。

40

【0011】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1またはその保存的改変および配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1またはその保存的改変を含む。

【0012】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAに特異的に結合し、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2および配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む。

50

【0013】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAに特異的に結合し、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2および配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0014】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2および配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。

10

【0015】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAに特異的に結合し、配列番号7と少なくとも約80%相同（例えば、少なくとも約80%同一）であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

20

【0016】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAに特異的に結合し、配列番号8と少なくとも約80%相同（例えば、少なくとも約80%同一）であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0017】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAに特異的に結合し、

a) 配列番号7と少なくとも約80%相同（例えば、少なくとも約80%同一）であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

30

b) 配列番号8と少なくとも約80%相同（例えば、少なくとも約80%同一）であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0018】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0019】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号7と少なくとも約80%相同（例えば、少なくとも約80%同一）であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号8と少なくとも約80%相同（例えば、少なくとも約80%同一）であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号8に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号8に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0020】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、一本鎖可変断片（scFv）を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、ヒトscFvを含む。

50

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、必要に応じて架橋される Fab を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、F(ab)₂ を含む。ある特定の実施形態では、scFV、Fab および F(ab)₂ のうち1つまたは複数が、異種配列との融合タンパク質中に含まれて、細胞外抗原結合性ドメインを形成する。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、細胞外抗原結合性ドメインの重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間にリンカーを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、細胞外抗原結合性ドメインの5'末端に共有結合によって繋がれるシグナルペプチドを含む。

【0021】

ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8ポリペプチド、CD28ポリペプチド、CD3ζポリペプチド、CD4ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、ICOSポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、BTLAポリペプチド、合成ペプチド（免疫応答と関連するタンパク質をベースとしない）またはそれらの組合せを含む。ある特定の実施形態では、細胞内ドメインは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域をさらに含む。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域は、CD28ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、ICOSポリペプチド、DAP-10ポリペプチドまたはそれらの組合せを含む。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域は、CD28ポリペプチドを含む。

【0022】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、野生型CD3ζポリペプチドまたは改変されたCD3ζポリペプチドを含む。一部の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、(a) 少なくとも1つもしくは複数の（例えば、1、2もしくは3つの）免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）のすべてもしくは一部を欠き、ITAMは、ITAM1、ITAM2、および／もしくはITAM3であり得るか、またはそれを含み、ならびに／または(b) 少なくとも1つもしくは複数の（例えば、1、2もしくは3つの）塩基性豊富ストレッチ（basic-rich stretch）（BRS）領域のすべてもしくは一部を欠き、BRS領域は、BRS1、BRS2およびBRS3であり得るか、またはそれを含む。ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARの細胞内シグナル伝達ドメイン中に含まれる改変されたCD3ζポリペプチドは、以下の特徴のうち少なくとも1つまたは複数を含む：

- a) ITAM2もしくはその部分を欠き、必要に応じて、i) ITAM3もしくはその部分および／またはii) ITAM1もしくはその部分をさらに欠き、
- b) ITAM1もしくはその部分を欠き、必要に応じて、ITAM3もしくはその部分をさらに欠き、
- c) ITAM3もしくはその部分を欠き、
- d) ITAM2もしくはその部分の欠失を含み、必要に応じて、i) ITAM3もしくはその部分の欠失および／またはii) ITAM1もしくはその部分の欠失をさらに含み、
- e) ITAM1もしくはその部分の欠失を含み、必要に応じて、ITAM3もしくはその部分の欠失をさらに含み、ならびに／または
- f) ITAM3もしくはその部分の欠失を含む。

【0023】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARの細胞内シグナル伝達ドメイン中に含まれる改変されたCD3ζポリペプチドは、以下の特徴のうち少なくとも1つまたは複数を含む：

- a) BRS2もしくはその部分を欠き、必要に応じて、i) BRS3もしくはその部分および／またはii) BRS1もしくはその部分をさらに欠き、
- b) BRS1もしくはその部分を欠き、必要に応じて、BRS3もしくはその部分をさらに欠き、
- c) BRS3もしくはその部分を欠き、ならびに／または

10

20

30

40

50

d) BRS1もしくはその部分、BRS2もしくはその部分およびBRS3もしくはその部分を欠き、

e) BRS2もしくはその部分の欠失を含み、必要に応じて、i) BRS3もしくはその部分の欠失および／またはii) BRS1もしくはその部分の欠失をさらに含み、

f) BRS1もしくはその部分の欠失を含み、必要に応じて、BRS3もしくはその部分の欠失をさらに含み、

g) BRS3もしくはその部分の欠失を含み、ならびに／または

h) BRS1もしくはその部分、BRS2もしくはその部分およびBRS3もしくはその部分の欠失を含む。

【0024】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARの細胞内シグナル伝達ドメイン中に含まれる改変されたCD3ζポリペプチドは、ITAM2、ITAM3、BRS2およびBRS3を欠くか、または、ITAM2、ITAM3、BRS2およびBRS3の欠失を含む。

【0025】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARの膜貫通ドメインは、CD8ポリペプチド、CD28ポリペプチド、CD3ζポリペプチド、CD4ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、CD166ポリペプチド、CD166ポリペプチド、CD8aポリペプチド、CD8bポリペプチド、ICOSポリペプチド、ICAM-1ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、CD27ポリペプチド、CD40/My88ポリペプチド、NKGD2ポリペプチドまたはそれらの組合せからなる群から選択される分子の天然または改変された膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む。

【0026】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARは、ヒンジ／スペーサー領域を、例えば、CARの細胞外抗原結合性ドメインおよび膜貫通ドメインの間にさらに含む。一部の実施形態では、このようなヒンジ／スペーサー領域は、CD8ポリペプチド、CD28ポリペプチド、CD3ζポリペプチド、CD4ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、CD166ポリペプチド、CD166ポリペプチド、CD8aポリペプチド、CD8bポリペプチド、ICOSポリペプチド、ICAM-1ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、CD27ポリペプチド、CD40/My88ポリペプチド、NKGD2ポリペプチドまたはそれらの組合せからなる群から選択される分子の天然または改変されたヒンジ／スペーサー領域であるか、またはそれを含む。

【0027】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARは、膜貫通ドメインおよびヒンジ／スペーサー領域を含み、その両方とも同一分子に由来する。例えば、ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARは、

a) CD28ポリペプチドのヒンジ／スペーサー領域およびCD28ポリペプチドの膜貫通ドメイン、

b) CD84ポリペプチドのヒンジ／スペーサー領域およびCD84ポリペプチドの膜貫通ドメイン、

c) CD166ポリペプチドのヒンジ／スペーサー領域およびCD166ポリペプチドの膜貫通ドメイン、

d) CD8aポリペプチドのヒンジ／スペーサー領域およびCD8aポリペプチドの膜貫通ドメイン、または

e) CD8bポリペプチドのヒンジ／スペーサー領域およびCD8bポリペプチドの膜貫通ドメインを含む。

【0028】

ある特定の実施形態では、CARは、CD166ポリペプチドのヒンジ／スペーサー領域およびCD166ポリペプチドの膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態では、本

10

20

30

40

50

明細書において記載されるCARは、膜貫通ドメインおよびヒンジ／スペーサー領域を含み、各々は、異なる分子に由来する。例えば、ある特定の実施形態では、このようなCARは、CD28ポリペプチドのヒンジ／スペーサー領域およびICOSポリペプチドの膜貫通ドメインを含み得る。

【0029】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARは、組換え発現されるか、またはベクターから発現される。ある特定の実施形態では、このようなベクターは、レトロウイルスベクター（例えば、γレトロウイルスベクター）である。

【0030】

本開示の主題は、本明細書において開示されるCARを含む免疫応答性細胞をさらに提供する。ある特定の実施形態では、このような免疫応答性細胞は、本明細書において記載されるCARを含むベクターを用いて形質導入される。ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARは、免疫応答性細胞の表面で構造的に発現される。本開示に従って有用である免疫応答性細胞の例として、それだけには限らないが、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ヒト胚性幹細胞、リンパ球様前駆細胞、T細胞前駆体細胞（T cell-precursor cell）および多能性幹細胞（例えば、リンパ球様細胞が分化し得る）が挙げられる。ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARを含む免疫応答性細胞は、T細胞である。ある特定の実施形態では、このようなT細胞は、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、制御性T細胞およびセントラルメモリーT細胞からなる群から選択される。

【0031】

本開示の主題はまた、本明細書において開示されるCARをコードする核酸分子を提供する。

【0032】

本開示の主題は、各々本明細書において開示される核酸分子を含むベクターをさらに提供する。ある特定の実施形態では、このようなベクターは、レトロウイルスベクター（例えば、γレトロウイルスベクター）である。

【0033】

本開示の主題はまた、本明細書において開示されるようなCARをコードする核酸配列を含む核酸分子を発現する宿主細胞を提供する。ある特定の実施形態では、このような宿主細胞は、T細胞である。

【0034】

さらに、本開示の主題は、シアリルルイスAに結合する免疫応答性細胞を生成するための方法を提供する。ある特定の実施形態では、このような方法は、免疫応答性細胞中に、本明細書において開示されるCARをコードする核酸配列を導入することを含む。

【0035】

さらに、本開示の主題は、シアリルルイスAに結合する免疫応答性細胞（例えば、本明細書において開示されるもの）を含む組成物を提供する。ある特定の実施形態では、このような組成物は、シアリルルイスAに結合する免疫応答性細胞（例えば、本明細書において開示されるもの）および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。

【0036】

さらに、本開示の主題は、対象において悪性成長を処置および／または防止する方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、対象に有効量の本明細書において開示される免疫応答性細胞または本明細書において開示される組成物を投与することを含む。ある特定の実施形態では、悪性成長は、膵臓がんである。ある特定の実施形態では、方法は、対象において腫瘍負荷を低減または根絶する。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。

【0037】

本開示の主題はまた、悪性成長を処置および／または防止するためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、本明細書において開示される免疫応答性細胞を含

10

20

30

40

50

む。ある特定の実施形態では、キットは、新生物を有する対象を処置するために免疫応答性細胞を使用するための指示書 (written instruction) をさらに含む。ある特定の実施形態では、悪性成長は、膵臓がんである。

【0038】

例として与えられるが、本発明を記載される具体的な実施形態に限定することを意図したものではない以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1-1】図1A~1Fは、放射線療法 (RT) が標的抗原発現に影響を及ぼすことなく膵臓がんをCAR T細胞による殺滅に対して感受性にすることを示す図である。図1Aは、様々な線量の放射線への曝露の48時間後の腫瘍細胞生存率を示すグラフである。図1Bは、低線量RT (2 Gy) に曝露させ、48時間後にCAR T細胞とともに示された比で18時間インキュベートし、その後殺滅パーセントを決定したCapan2膵臓がん細胞を示すグラフである。図1Cは、標的抗原発現レベルがRTの48時間後に不変であったことを示す図である。図1Dは、RTの6時間後の標的細胞のトランスクリプトーム解析が有意に影響を受けたいくつかのアポトーシス経路を明らかにすることを示す図である。図1Eは、標的抗原 (シアリルルイスA (Le^A) 発現capan2細胞) への曝露後のCAR T細胞の培地におけるTRAIL mRNA発現およびタンパク質レベルを示すグラフである。図1Fは、標的抗原を発現するかまたは発現しない標的細胞において成長させたLBBzおよびL (del) CAR T細胞の培地において定量したTRAILタンパク質を示すグラフである。LFC=log2倍率変化、E:T=エフェクター:標的。

【図1-2】同上。

【図2】図2A~2Cは、活性化CAR T細胞によって発現したTRAILが低線量放射線に曝露された異種腫瘍集団 (heterogeneous tumor population) における抗原陰性腫瘍細胞に対して機能的に有意であることを示す図である。図2Aは、CAR活性化T細胞が放射線増感抗原陽性および抗原陰性腫瘍細胞に作用するTRAILを産生することを示す図である。図2B~2Cは、Ag⁺細胞をルシフェラーゼ発現Ag⁻細胞と75:25の比で混合し、低線量RTに曝露させ、示されたCAR T細胞と4日間共培養し、続いてAg⁻細胞殺滅の定量を行ったことを示すグラフである。

【図3-1】図3A~3Bは、増感RT (sensitizing RT) が膵臓がん細胞をTRAIL誘導死に関して転写プライミングすることを示す図である。図3Aは、生存および遊走、腫瘍支持炎症、ネクロプトーシス、アポトーシス、ならびにデスレセプターエンドサイトーシスを含む様々なTRAIL応答を媒介することが公知のシグナル伝達分子のRNA発現レベルを、Capan2膵臓がん細胞へのRT曝露の前後のRNAseqによって3回の生物学的反復で定量したことを示す図である。有意に誘導された分子および下方調節した分子をそれぞれ赤色および緑色で示し、程度を色勾配によって表す。灰色の分子は有意には変化しなかった。図3Bは、CTV標識Ag⁻細胞を、非標識Ag⁺細胞、アネキシンV595、およびTRAIL^{-/-}またはTRAIL^{wt}CAR T細胞との共培養の2日前にRTに曝露させたことを示す図である。培養を生ビデオ顕微鏡検査によってモニタリングし、Ag⁻細胞アポトーシスを経時的に定量した。

【図3-2】同上。

【図4-1】図4A~4Mは、増感RTによりCAR T細胞がin vivoにおいて異種PDACを排除することが可能となることを示す図である。図4Aは、75:25のLeA (+): (-) で混合され、次いでNSGマウスの膵臓に注射されたCapan2腫瘍細胞を示す図である。腫瘍を9日間定着させた後、マウスにRTとそれに続くCAR T細胞とを投与した。図4Bは、異なる処置群間の死亡時の腫瘍体積変化のウォーターフォールプロットを示す。図4C~4Hは、BLIを毎週実施したことを例証するグラフである。図4I~4Kは、CARまたはRT+CAR処置マウスからの腫瘍のT細胞浸潤を、初めの19日間にわたるBLI T細胞イメージング (形質導入されたT細胞における

G-Lucを検出する)を使用して(図4I)、および21日目に 殺したマウスからのIHCによって(図4J~4K、すべてns)決定したことを示す図である。図4Lは、進行したマウスにおける腫瘍が経時的に減少した標的抗原発現を表すことをFACSによって示す図である。図4Mは、RT+L (del) またはRT+L (del) -TRAIL CAR T細胞を用いて処置したマウスのBLIを示すグラフである。

【図4-2】同上。

【図4-3】同上。

【図4-4】同上。

【図4-5】同上。

【図5-1】図5A~5Gは、緩和的RTおよびCAR T細胞を用いて処置した、異種腫瘍を有するDLBC患者の転帰を示す図である。図5Aは、総身または局所RTを、画像誘導放射線を使用して脾臓の異種腫瘍を保有するマウスに送達し、続いてCAR T細胞を送達したことを示す図である。図5B~5Dは、腫瘍負荷をBLIによってモニタリングしたことを示すグラフである。図5E~5Fは、CD19に関してIHC(図5E)およびフローサイトメトリー(図5F)によって検査した、CAR T細胞処置前の患者生検を例証する図である。図5Gは、緩和的下肢RTおよび全身1928z CAR T細胞の前、ならびに1、2および6か月後のFDG-PETスキャンを示す図である。

【図5-2】同上。

【図5-3】同上。

【図6-1】図6A~6Cは、LeAを標的とするCARがLeAを発現する細胞を特異的に溶解することを示す図である。図6Aは、イメージングのための膜結合G-Lucを含有するLBBz CAR T細胞設計を示す図である。図6Bは、PC3、Capan2およびBxPC3細胞における内因性LeA発現をフローサイトメトリーによって検査したことを示す図である。図6Cは、LBBzもしくはL28z CAR T細胞または形質導入されていないT細胞と様々なエフェクター：標的比で18時間混合し、続いて標的細胞殺滅の定量を行ったPC3、Capan2またはBxPC3細胞を例証するグラフである。

【図6-2】同上。

【図6-3】同上。

【図6-4】同上。

【図7】図7は、Capan2細胞をLeA⁺およびLeA⁻集団にFACS選別し、次いで75:25のLeA⁺/腫瘍細胞の比で混合したことを示す図である。LeA⁻に選別されたCapan2細胞は経時的にLeA⁻のままである。

【図8】図8は、TRAIL^{wt}またはCRISPRノックアウトCAR T細胞を標的において刺激し、次いでTRAIL mRNAを定量してwt非刺激CAR T細胞と比較して表したグラフである。

【図9】図9は、生存および遊走、腫瘍支持炎症、ネクロプトーシス、アポトーシス、ならびにデスレセプターエンドサイトーシスを含む様々なTRAILプロセスを媒介することが公知の分子の低線量RT後のmRNAの倍率変化を示す表である。0.05未満の調整p値を有する分子が示される。

【図10】図10は、CAR形質導入およびTCRノックアウト後かつin vivo注射前の典型的なT細胞プロファイルを示す図である。

【図11】図11は、CTZ T細胞生物発光イメージングによって経時的に定量したCAR T細胞腫瘍浸潤により、TRAILノックアウトLBBz CAR T細胞とL (del) CAR T細胞の両方が脾臓腫瘍に経時的に蓄積することが示されることを示すグラフである。

【図12-1】図12A~12Bは、CAR T細胞がin vivoにおいて存続し、腫瘍に侵入し、異種Ag⁺/脾臓がんを保有するマウスにおけるAg⁺腫瘍細胞を減少させることを示す図である。図12Aは、6週前にCAR T細胞を用いて処置したマウス由来の血液、脾臓および腫瘍から単離した細胞をCAR T細胞含量に関して分析したこ

10

20

30

40

50

とを示す図である（純粋なT細胞集団対照は下に示す）。図12Bは、CAR T細胞処置後の異なる時点における脾臓腫瘍からのLeA発現のIHCを示す図であり、療法全体にわたって標的抗原発現腫瘍細胞の減少を示す。

【図12-2】同上。

【図12-3】同上。

【図13】図13は、総身または局所RTを用いて処置したマウスの腫瘍におけるT細胞蓄積を示すグラフである。脾臓腫瘍におけるLBBz CAR T細胞を、局所RT、総身RT(TBI)またはRT無しと、それに続くCAR T細胞とを用いて処置したマウスにおいて、生物発光イメージングを使用して経時的に定量した。

【発明を実施するための形態】

【0040】

本開示の主題は、シアリルルイスAを標的とする抗原結合性タンパク質、例えば、キメラ抗原受容体(CAR)を提供する。

【0041】

本開示の主題はまた、ルイスA標的化CARおよび／またはそれをコードする核酸（複数可）を含む免疫応答性細胞（例えば、T細胞（例えば、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、制御性T細胞、セントラルメモリーT細胞など）、ナチュラルキラー(NK)細胞、ヒト胚性幹細胞、リンパ球様前駆細胞、T細胞前駆体細胞およびリンパ球様細胞がそれから分化し得る多能性幹細胞）ならびに腫瘍、例えば、脾臓がんを処置および／または防止するためにこのような免疫応答性細胞を使用する方法も提供する。

【0042】

I. ある特定の定義

別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。以下の参考文献は、本発明において使用される用語の多くの一般的な定義を有する技術のうち1つを提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994)、The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988)、The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)、およびHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で使用される場合、以下の用語は、別に記載されない限り、以下のそれらに帰する意味を有する。

【0043】

本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定されるような特定の値の許容される誤差範囲内を意味し、これは、幾分かは、値が測定または決定される方法、すなわち、測定システムの制限に依存する。例えば、「約」は、当技術分野における慣例によって、3もしくは3を超える標準偏差以内を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の最大20%、好ましくは、最大10%、より好ましくは、最大5%、より好ましくは、さらに最大1%の範囲を意味する場合もある。あるいは、特に、生物システムまたはプロセスに関して、この用語は、値の1桁以内、好ましくは、5倍以内、より好ましくは、2倍以内を意味し得る。

【0044】

本明細書で使用される場合、「細胞集団」という用語は、同様または異なる表現型を発現する少なくとも2個の細胞の集団を指す。限定されない例では、細胞集団は、同様または異なる表現型を発現する少なくとも約10個、少なくとも約100個、少なくとも約200個、少なくとも約300個、少なくとも約400個、少なくとも約500個、少なくとも約600個、少なくとも約700個、少なくとも約800個、少なくとも約900個、少なくとも約1000個の細胞を含み得る。

【0045】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、無傷抗体分子だけでなく、免疫原結合能を保持する抗体分子の断片も意味する。このような断片も当技術分野で周知であり

10

20

30

40

50

、*in vitro*および*in vivo*の両方で常用される。したがって、本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、無傷の免疫グロブリン分子だけでなく、周知の活性断片 $F(ab')_2$ および Fab も意味する。無傷抗体の Fc 断片を欠く、 $F(ab')_2$ および Fab 断片は、循環からより迅速に除去され、無傷抗体より非特異的組織結合が少ない可能性がある (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983))。本発明の抗体は、天然抗体全体、二重特異性抗体、キメラ抗体、 Fab 、 Fab' 、一本鎖 V 領域断片 ($scFv$)、融合ポリペプチドおよび非従来型の抗体を含む。ある特定の実施形態では、抗体は、ジスルフィド結合によって内部接続された少なくとも2つの重 (H) 鎖および2つの軽 (L) 鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域 (本明細書において V_H と略される) および重鎖定常 (CH) 領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、 $CH1$ 、 $CH2$ および $CH3$ から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (本明細書において V_L と略される) および軽鎖定常 CL 領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、 CL から構成される。 V_H および V_L 領域は、フレームワーク領域 (FR) と呼ばれるより保存されている領域が散在する、相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分され得る。各 V_H および V_L は、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順序で配置された3つの CDR および4つの FR : $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$ から構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの、免疫系の種々の細胞 (例えば、エフェクター細胞) および古典的補体系の第1の構成成分 ($C1q$) を含む宿主組織または因子への結合を媒介し得る。

【0046】

本明細書で同義的に使用される場合、抗体の「抗原結合性部分」、「抗原結合性断片」または「抗原結合性領域」という用語は、抗原に結合し、抗体に抗原特異性を付与する抗体の領域または部分を指し、抗原結合性タンパク質、例えば、抗体の断片は、抗原 (例えば、ペプチド/HLA複合体) に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数の断片を含む。抗体の抗原結合性機能は、全長抗体の断片によって実施され得るということが示されている。抗体の「抗体断片」という用語内に包含される抗原結合性部分の例として、 Fab 断片、 V_L 、 V_H 、 CL および $CH1$ ドメインからなる一価断片、 $F(ab)_2$ 断片、ヒンジ領域でジスルフィド橋によって連結された2つの Fab 断片を含む二価断片、 V_H および $CH1$ ドメインからなる Fd 断片、抗体の単一アームの V_L および V_H ドメインからなる Fv 断片、 V_H ドメインからなる dAb 断片 (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546) ならびに単離された相補性決定領域 (CDR) が挙げられる。

【0047】

さらに、 Fv 断片の2つのドメイン、 V_L および V_H は、別個の遺伝子によってコードされるが、それらを、 V_L および V_H 領域が対となって一価分子を形成する単一タンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって組換え法を使用して結合し得る。これらは、一本鎖 Fv ($scFv$) として公知である、例えば、Bird et al., 1988 Science 242:423-426、および Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883 を参照されたい。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を使用して得られ、断片は、無傷抗体と同一の方法で有用性についてスクリーニングされる。

【0048】

本明細書で使用される場合、「一本鎖可変断片」または「 $scFv$ 」という用語は、 V_H : V_L ヘテロ二量体を形成するように共有結合によって連結された免疫グロブリン (例えば、マウスまたはヒト) の重鎖 (V_H) および軽鎖 (V_L) の可変領域の融合タンパク質である。重鎖 (V_H) および軽鎖 (V_L) を、直接的に結合するか、または V_H の N 末端と V_L の C 末端を、もしくは V_H の C 末端と V_L の N 末端を接続するペプチドをコードするリンカー (例えば、約10、15、20、25個のアミノ酸) によって結合する。リンカーは、普通、可動性のためにグリシンに富み、溶解性のためにセリンもしくはトレオニンに富む。リンカーは、細胞外抗原結合性ドメインの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を連結できる。ある特定の実施形態では、リンカーは、以下に提供されるような配列番号1

1 に示される配列を有するアミノ酸を含む。

GGGGSGGGSGGGGS [配列番号 1 1]

【0049】

ある特定の実施形態では、配列番号 1 1 のアミノ酸配列をコードする核酸配列は、以下に提供される配列番号 1 2 に示される：

GGCGGCGGCGGATCTGGAGGTGGTGGCTCAGGTGGCGGAGGCTCC [配列番号 1 2]

【0050】

定常領域の除去およびリンカーの導入にかかわらず、s c F v タンパク質は、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。一本鎖 F v ポリペプチド抗体は、Huston, et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988) によって記載されるような、V_H をコードする配列および V_L をコードする配列を含む核酸から発現され得る。米国特許第 5, 091, 513 号、同 5, 132, 405 号および同 4, 956, 778 号ならびに米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 1 9 6 7 5 4 号および同 2 0 0 5 0 1 9 6 7 5 4 号も参照されたい。阻害活性を有するアンタゴニスト s c F v も記載されている（例えば、Zhao et al., Hyrbidoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51、Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12、Shieh et al., J Immunol 2009 183 (4):2277-85、Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63、Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61、Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84、Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40 も参照されたい）。刺激活性を有するアゴニスト s c F v が記載されている（例えば、Peter et al., J Biochem 2003 25278(38):36740-7、Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71、Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55、Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66 を参照されたい）。

【0051】

本明細書で使用される場合、「F (a b)」とは、抗原に結合するが、一価であり、F c 部分を有さない抗体構造の断片を指し、例えば、酵素パパイニンによって消化された抗体は、2 つの F (a b) 断片および F c 断片（例えば、重 (H) 鎖定常領域；抗原に結合しない F c 領域）をもたらす。

【0052】

本明細書で使用される場合、「F (a b')₂」とは、全 I g G 抗体のペプシン消化によって生成した抗体断片を指し、この断片は、2 つの抗原結合性 (a b') (二価) 領域を有し、各 (a b') 領域は、2 つの別個のアミノ酸鎖、抗原に結合するための S-S 結合によって連結された H 鎖および軽 (L) 鎖の一部を含み、残りの H 鎖部分は一緒に連結される。「F (a b')₂」断片は、2 つの個々の F a b' 断片に分けることができる。

【0053】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、任意の遺伝エレメント、例えば、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなどを指し、適切な制御エレメントと関連付けられると複製可能であり、遺伝子配列を細胞中に移入することができる。したがって、この用語は、クローニングおよび発現ビヒクルならびにウイルスベクターおよびプラスミドベクターを含む。

【0054】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、所望のコード配列および特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適当な核酸配列を含有する組換え核酸配列、例えば、組換え DNA 分子を指す。原核生物における発現に必要な核酸配列は、普通、プロモーター、オペレーター（必要に応じた）およびリボソーム結合部位を、多くは、他の配列とともに含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサーおよび終結およびポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。

【0055】

本明細書で使用される場合、「C D R」は、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領

10

20

30

40

50

域である抗体の相補性決定領域アミノ酸配列と定義される。例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)を参照されたい。一般に、抗体は、可変領域中に3つの重鎖および3つの軽鎖CDRまたはCDR領域を含む。CDRは、抗体の、抗原またはエピトープへの結合のための接触残基の大部分を提供する。ある特定の実施形態では、CDR領域は、Kabatシステムを使用して描写される(Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。

【0056】

本明細書で使用される場合、「親和性」という用語は、結合力の尺度を意味する。理論に捉われようとは思わないが、親和性は、抗体結合部位と抗原決定基の間の立体化学的適合の近さに、それらの間の接触の区域の大きさに、および荷電基および疎水基の分布に依存する。親和性はまた、「アビディティ」という用語を含み、これは、可逆的複合体の形成後の抗原抗体結合の力を指す。抗体の抗原に対する親和性を算出する方法は、当技術分野で公知であり、親和性を算出する結合実験の使用を含む。機能アッセイ（例えば、フローサイトメトリーアッセイ）における抗体活性もまた、抗体親和性を反映する。抗体および親和性は、表現型で特徴付けられる場合があり、機能アッセイ（例えば、フローサイトメトリーアッセイ）を使用して比較される。

【0057】

本開示の主題において有用な核酸分子として、ポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子が挙げられる。ある特定の実施形態では、本開示の主題において有用な核酸分子として、抗体またはその抗原結合性部分をコードする核酸分子が挙げられる。このような核酸分子は、内因性核酸配列と100%同一である必要はないが、通常、実質的同一性を示す。内因性配列に対する「実質的相同性」または「実質的同一性」を有するポリヌクレオチドは、通常、二本鎖核酸分子の少なくとも1つの鎖とハイブリダイズ可能である。「ハイブリダイズする」とは、ストリンジェンシーの種々の条件下で相補的ポリヌクレオチド配列（例えば、本明細書において記載される遺伝子）またはその部分の間の二本鎖分子を形成する対を意味する（例えば、Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399、Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507を参照されたい）。

【0058】

「実質的に相同の」または「実質的に同一の」という用語は、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書において記載されるアミノ酸配列のいずれか1つ）または核酸配列（例えば、本明細書において記載される核酸配列のいずれか1つ）と少なくとも50%の相同性または同一性を示すポリペプチドまたは核酸分子を意味する。例えば、このような配列は、比較のために使用される配列に対して、アミノ酸レベルまたは核酸で少なくとも約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%またはさらに約99%相同（例えば、同一）である。

【0059】

配列相同性または配列同一性は、通常、配列分析ソフトウェア（例えば、Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705の配列分析ソフトウェアパッケージ、BLAST、BESTFIT、GAPまたはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を使用して測定される。このようなソフトウェアは、種々の置換、欠失および／または他の改変の程度を割り当てることによって同一または同様の配列に一致させる。同一性の程度を決定する例示的アプローチでは、BLASTプログラムが使用されてもよく、 e^{-3} から e^{-100} の間の確率スコアは密接に関連する配列を示す。

【0060】

ある特定の実施形態では、「交差競合する」または「競合する」という用語は、本開示の C A R の細胞外抗原結合性ドメインの、所与の抗原への結合が、例えば、本開示の s c F v のいずれか 1 つの V_H および V_L C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列または V_H および V_L 配列を含む参照抗体またはその抗原結合性部分の、同一抗原への結合を減少させるか、または低減する状況を指す。「交差競合する」または「競合する」という用語はまた、参照抗体またはその抗原結合性部分の、所与の抗原への結合が、本開示の C A R の細胞外抗原結合性ドメインの同一抗原への結合を減少させるか、または低減する状況を指す。ある特定の実施形態では、「交差競合性」または「競合性」細胞外抗原結合性ドメインは、参照抗体またはその抗原結合性部分と同一または実質的に同一のエピトープ、重複エピトープまたは隣接エピトープに結合する。

10

【0061】

本明細書で使用される場合、「アナログ」という用語は、参照ポリペプチドまたは核酸分子の機能を有する構造的に関連するポリペプチドまたは核酸分子を指す。

【0062】

本明細書で使用される場合、「リガンド」という用語は、受容体に結合する分子を指す。特に、リガンドは、別の細胞上の受容体に結合し、細胞対細胞の認識および／または相互作用を可能にする。

【0063】

本明細書で使用される場合、「疾患」という用語は、細胞、組織または臓器の正常機能に損傷を与えるか、またはそれに干渉する任意の状態または障害を指す。疾患の例として、新生物または細胞の病原体感染が挙げられる。

20

【0064】

「有効量」（または「治療有効量」）とは、処置の際に有益な、または所望の臨床結果に影響を及ぼすのに十分な量である。有効量は、対象に 1 回または複数回用量で投与され得る。処置の観点から、有効量は、疾患（例えば、新生物）の進行を緩和する、改善する、安定化する、逆転させる、または減速させる、そうでなければ、疾患（例えば、新生物）の病理学的帰結を低減するのに十分な量である。有効量は、一般に、ケースバイケースで医師によって決定され、当技術分野のスキルの範囲内である。有効量を達成する適当な投与量を決定する場合には、いくつかの因子が、通常、考慮される。これらの因子として、対象の年齢、性別および体重、処置されている状態、状態の重症度ならびに投与される免疫応答性細胞の形態および有効濃度が挙げられる。

30

【0065】

本明細書において、「新生物」という用語は、細胞または組織の病的増殖および他の組織または臓器へのその後の遊走またはその浸潤で特徴付けられる疾患を指す。新生物成長は、通常、制御されず、進行性であり、正常細胞の増殖を誘発しないか、またはその停止を引き起こす条件下で生じる。新生物は、それだけには限らないが、膀胱、結腸、骨、脳、乳房、軟骨、神経膠、食道、卵管、胆嚢、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、神経組織、卵巣、胸膜、脾臓、前立腺、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿生殖路、尿管、尿道、子宮および膣からなる群から選択される臓器またはその組織もしくは細胞型を含む様々な細胞型、組織または臓器に影響を及ぼし得る。新生物は、がん、例えば、肉腫、癌または形質細胞腫（形質細胞の悪性腫瘍）を含む。

40

【0066】

本明細書で使用される場合、「異種核酸分子またはポリペプチド」という用語は、細胞または細胞から得られた試料中に普通は存在しない核酸分子（例えば、c D N A、D N A または R N A 分子）またはポリペプチドを指す。この核酸は、別の生物から得たものである場合もあり、例えば、細胞もしくは試料において普通は発現されない m R N A 分子である場合もある。

【0067】

本明細書で使用される場合、「免疫応答性細胞」という用語は、免疫応答において機能する細胞またはその前駆体もしくは後代を指す。

50

【0068】

本明細書で使用される場合「モジュレートする」という用語は、正にまたは負に変更することを指す。例示的モジュレーションは、約1%、約2%、約5%、約10%、約25%、約50%、約75%または約100%の変化を含む。

【0069】

本明細書で使用される場合、「増加する」という用語は、少なくとも約5%正に変更することを指し、それだけには限らないが、約5%、約10%、約25%、約30%、約50%、約75%または約100%正に変更することを含む。

【0070】

本明細書で使用される場合、「低減する」という用語は、少なくとも約5%負に変更することを指し、それだけには限らないが、約5%、約10%、約25%、約30%、約50%、約75%または約100%負に変更することを含む。

【0071】

本明細書で使用される場合、「単離された細胞」という用語は、細胞に天然に付随する分子構成成分および／または細胞構成成分から分離されている細胞を指す。

【0072】

本明細書で使用される場合、「単離された」、「精製された」または「生物学的に純粋な」という用語は、その天然状態で見出されるようなそれに普通付随する構成成分を程度の差こそあれ含まない材料を指す。「単離する」は、元の供給源または周囲のものからの分離の程度を示す。「精製する」は、単離よりも高い分離の程度を示す。「精製された」または「生物学的に純粋な」タンパク質は、どのような不純物もタンパク質の生物学的特性に実質的に影響を及ぼさないし、他の悪影響も引き起こさないように、他の材料を十分に含まない。すなわち、本開示の主題の核酸またはポリペプチドは、組換えDNA技術によって生成された場合に細胞性材料、ウイルス性材料もしくは培養培地を、または化学合成された場合に化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない場合に精製されている。純度および均一性は、通常、分析的化学技術、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを使用して決定される。「精製された」という用語は、核酸またはタンパク質が、電気泳動ゲルにおいて本質的に1つのバンドを生じさせることを示し得る。改変、例えば、リン酸化またはグリコシル化に付され得るタンパク質については、異なる改変によって、異なる単離タンパク質を生じさせてもよく、それを別個に精製できる。

【0073】

本明細書で使用される場合、「分泌された」という用語は、小胞体、ゴルジ装置を通り、細胞原形質膜で一過性に融合し、細胞の外側にタンパク質を放出する小胞として分泌経路によって細胞から放出されるポリペプチドを意味する。

【0074】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」または「に特異的に結合する」または「特異的に標的とする」という用語は、試料中の、例えば、ヒトシアリルルイスAを含むか、または発現する生物学的試料中の、目的の生体分子（例えば、ポリペプチド）を認識し、結合するが、他の分子を実質的に認識せず、結合しないポリペプチドまたはその断片を意味する。例えば、一部の実施形態では、他の潜在的標的が存在する場合にある特定の標的（例えば、シアリルルイスA）と相互作用する本明細書において記載されるCARの細胞外抗原結合性ドメインが、相互作用する標的（例えば、シアリルルイスA）に「特異的に結合する」といわれる。一部の実施形態では、特異的結合は、標的結合性部分とそのパートナーの間の会合の程度を検出または決定することによって評価され、一部の実施形態では、特異的結合は、標的結合性部分－パートナー複合体の解離の程度を検出または決定することによって評価され、一部の実施形態では、特異的結合は、標的結合性部分の、そのパートナーと別の実体の間の代替相互作用と競合する能力を検出または決定することによって評価される。一部の実施形態では、特異的結合は、このような検出または決定を、濃度の範囲にわたって実施することによって評価される。

【0075】

本明細書で使用される場合、「処置すること」または「処置」という用語は、処置されている個体または細胞の疾患の過程を変更しようとする臨床的介入を指し、防止のため、または臨床病理の過程の間のいずれかで実施され得る。処置の治療効果として、限定するものではないが、疾患の発生または再発の防止、症状の軽減、疾患の直接的または間接的病理学的帰結の減少、転移の防止、疾患進行速度の低下、疾患状態の寛解または緩和および予後の緩解または改善が挙げられる。疾患または障害の進行を防ぐことによって、処置は、罹患した対象もしくは診断された対象または障害を有すると疑われる対象における障害による悪化を防ぐことができるだけでなく、処置は、障害のリスクにある対象または障害を有すると疑われる対象において障害または障害の症状の開始を防ぐ場合もある。

10

【0076】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、それだけには限らないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類などを含む（例えば、特定の処置のレシピエントである、または細胞が収集された）任意の動物（例えば、哺乳動物）を指す。

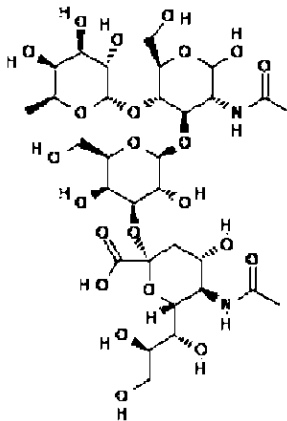
【0077】

II. シアリルルイスA

シアリルルイスA (Le^A 、シアリル Le^A および $SL e^A$ 、CAS番号 92448-22-1としても知られる) とは、 $NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)[Fuc(a1-4)]GlcNAc$ の糖配列を含む四糖である。ある特定の実施形態では、 Le^A は、次式を含む。

20

【化1】



30

【0078】

Le^A は、ある特定の細胞の表面に存在し、細胞対細胞認識プロセスに関与する。 Le^A は、腫瘍、例えば、膵腫瘍の75～90%で発現されるが、正常ヒト組織でのその発現は相対的に低い表面抗原である。

【0079】

III. キメラ抗原受容体 (CAR)

本開示は、がん抗原を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) を提供する。多数の実施形態では、本開示は、膵臓がん抗原、例えば、シアリルルイスAを標的とするCARを提供する。

40

【0080】

CARは、目的の特異性を免疫エフェクター細胞に移植または付与する操作された受容体である。CARは、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に移植するために使用でき、レトロウイルスベクターによって促進されるそのコード配列の移入を伴う。

【0081】

3世代のCARがある。「第1世代」のCARは、通常、T細胞受容体鎖の細胞質／細胞内ドメインに融合された、膜貫通ドメインに融合された細胞外抗原結合性ドメイン（例えば、一本鎖可変断片 (scFv)）から構成される。「第1世代」のCARは、通常、

50

内因性TCRからのシグナルの主伝達物質であるCD3と鎖に由来する細胞内ドメインを有する。「第1世代」のCARは、*de novo*抗原認識を提供し、HLA媒介性抗原提示とは独立に、単一融合分子中のそのCD3と鎖シグナル伝達ドメインを介してCD4⁺およびCD8⁺T細胞両方の活性化を引き起こすことができる。「第2世代」のCARは、種々の共刺激分子（例えば、CD28、4-1BB、ICOS、OX40）に由来する細胞内ドメインを、CARの細胞質尾部に付加して、T細胞にさらなるシグナルを提供する。「第2世代」のCARは、共刺激（例えば、CD28または4-1BB）および活性化（CD3と鎖）の両方を提供するものを含む。前臨床研究によって、「第2世代」のCARはT細胞の抗腫瘍活性を改善できることが示された。例えば、「第2世代」のCARによって改変されたT細胞の頑強な有効性が、慢性リンパ芽球性白血病（CLL）および急性リンパ芽球性白血病（ALL）を有する患者におけるCD19分子を標的とする臨床試験において実証された。「第3世代」のCARは、複数の共刺激（例えば、CD28および4-1BB）および活性化（CD3と鎖）を提供するものを含む。本開示を読む当業者であれば、本明細書において提供されるCAR構築物は、第1世代、第2世代または第3世代の構築物（複数可）であり得るということは認識する。

【0082】

ある特定の限定されない実施形態では、本開示のCARの細胞外抗原結合性ドメインは、ヒトシアリルルイスAに対して高い結合特異性ならびに高い結合親和性を有する。例えば、このような実施形態では、CARの細胞外抗原結合性ドメイン（例えば、ヒトscFvまたはそのアナログにおいて具体化される）は、ヒトシアリルルイスAに約 2×10^{-7} Mまたはそれ未満の解離定数（ K_d ）で結合する。ある特定の実施形態では、 K_d は、約 2×10^{-7} Mもしくはそれ未満、約 1×10^{-7} Mもしくはそれ未満、約 5×10^{-8} Mもしくはそれ未満、約 2×10^{-8} Mもしくはそれ未満、約 1×10^{-8} Mもしくはそれ未満、約 9×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 8×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 7×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 6×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 5×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 4×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 3×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 2×10^{-9} Mもしくはそれ未満または約 1×10^{-9} Mもしくはそれ未満である。ある特定の限定されない実施形態では、 K_d は、約 2×10^{-8} Mまたはそれ未満である。ある特定の限定されない実施形態では、 K_d は、約 1×10^{-8} M～約 2×10^{-8} Mである。ある特定の限定されない実施形態では、 K_d は、約 1.3×10^{-8} Mまたはそれ未満である。ある特定の限定されない実施形態では、 K_d は、約 1.8×10^{-8} Mまたはそれ未満である。ある特定の限定されない実施形態では、 K_d は、約 1×10^{-9} M～約 1×10^{-8} Mである。

【0083】

本開示のシアリルルイスA標的化CARの細胞外抗原結合性ドメイン（例えば、ヒトscFvまたはそのアナログにおける実施形態）の結合は、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、FACS解析、バイオアッセイ（例えば、成長阻害）またはウエスタンブロットアッセイによって確認できる。これらのアッセイの各々は、一般に、目的の複合体に対して特異的な標識された試薬（例えば、抗体またはscFv）を使用することによって特に目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えば、scFvを放射性標識し、ラジオイムノアッセイ（RIA）において使用できる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい）。放射性同位元素は、 γ カウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用のような手段によって、またはオートラジオグラフィーによって検出され得る。ある特定の実施形態では、シアリルルイスA標的化CARの細胞外抗原結合性ドメインは、蛍光マーカーで標識される。蛍光マーカーの限定されない例として、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（例えば、EBFP、EBFP2、AzuriteおよびmKalamal）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ECFP、CeruleanおよびCyPet）および黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、Citrine、VenusおよびYPet）が挙げ

られる。ある特定の実施形態では、本開示のシアリルルイスA標的化CARのヒトscFvは、GFPで標識される。

【0084】

本開示の主題によれば、CARは、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスA（例えば、ヒトシアリルルイスA）に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、scFvである。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、必要に応じて架橋されるFabである。ある特定の実施形態では、細胞外結合ドメインは、F(ab)₂である。ある特定の実施形態では、前記の分子のいずれも、異種配列との融合タンパク質中に含まれて、細胞外抗原結合性ドメインを形成してもよい。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、ヒトシアリルルイスAに特異的に結合するヒトscFvを含む。ある特定の実施形態では、scFvは、scFvファージライブラリーをスクリーニングすることによって同定される。

【0085】

CARの細胞外抗原結合性ドメイン

ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARの細胞外抗原結合性ドメインは、その内容が本明細書において記載される目的のためにその全体が参照により組み込まれる米国特許第9,475,874号（「'874特許」）に開示されるような、抗シアリルルイスA抗体またはその抗体結合性断片の1、2または3つのCDR（例えば、CDR1、CDR2および／またはCDR3）を含む重可変領域を含む。さらに、またはあるいは、ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARの細胞外抗原結合性ドメインは、その内容が本明細書において記載される目的のためにその全体が参照により組み込まれる'874特許に開示されるような、抗シアリルルイスA抗体またはその抗体結合性断片の1、2または3つのCDR（例えば、CDR1、CDR2および／またはCDR3）を含む軽可変領域を含む。例えば、'874特許の表2は、このような抗シアリルルイスA抗体またはその抗体結合性断片の重鎖および軽鎖中のCDRのアミノ酸および核酸配列を示す。本開示を読む当業者ならば、このような配列のいずれも、本開示に従って使用され得るということは理解する。

【0086】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載されるCARの細胞外抗原結合性ドメインは、(i)その内容が本明細書において記載される目的のためにその全体が参照により組み込まれる'874特許に開示されるような抗シアリルルイスA抗体もしくはその抗体結合性断片の重鎖可変領域および／または(ii)'874特許に開示されるような抗シアリルルイスA抗体もしくはその抗体結合性断片の軽鎖可変領域を含む。例えば、'874特許の図1～10は、このような抗シアリルルイスA抗体またはその抗体結合性断片のV_HおよびV_Lのアミノ酸配列を示す。本開示を読む当業者ならば、このような配列のいずれも、本開示に従って使用され得るということは理解する。当業者ならば、得られた配列が、対応する親配列と少なくとも70%またはそれよりも多く（例えば、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれよりも多く）同一であり、シアリルルイスAに特異的に結合する能力を保持する限り、適当な置換（例えば、保存的置換）、欠失、挿入および／または改変もこのような配列に行われてもよいということも理解する。

【0087】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメイン（例えば、ヒトscFv）は、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。配列番号7のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、配列番号9に示されている。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメイン（例えば、ヒトscFv）は、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。配列番号8のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、配列番号10に示されている。配列番号1～10の配列は、以下の表1に記載されている。

【0088】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、ヒト s c F v であり、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）に特異的に結合し、s c F v 5 B 1 と名付けられる。

【0089】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、ヒト s c F v である。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、必要に応じて、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の間に (i i i) リンカー配列、例えば、リンカーペプチドを有する。ある特定の実施形態では、リンカーは、配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、V_H および V_L 領域もしくは表 1 から選択される C D R を有する、ヒト s c F v - F c 融合タンパク質または全長ヒト I g G である。

【0090】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、表 1 に示されるような、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80%（例えば、少なくとも約 85%、少なくとも約 90% または少なくとも約 95%）相同である（例えば、同一である）アミノ酸配列を含む V_H を含む。例えば、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列に約 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 相同である（例えば、同一である）アミノ酸配列を含む V_H を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む V_H を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、表 1 に示されるような、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80%（例えば、少なくとも約 85%、少なくとも約 90% または少なくとも約 95%）相同である（例えば、同一である）アミノ酸配列を含む V_L を含む。例えば、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列に約 80%、約 81%、約 82%、約 83%、約 84%、約 85%、約 86%、約 87%、約 88%、約 89%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98% または約 99% 相同である（例えば、同一である）アミノ酸配列を含む V_L を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む V_L を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80%（例えば、少なくとも約 85%、少なくとも約 90% または少なくとも約 95%）相同である（例えば、同一である）アミノ酸配列を含む V_H および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80%（例えば、少なくとも約 85%、少なくとも約 90% または少なくとも約 95%）相同である（例えば、同一である）アミノ酸配列を含む V_L を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む V_H および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む V_L を含む。

【0091】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される C A R の細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A を特異的に標的とする少なくとも 1 つまたは複数（例えば、1、2 または 3 つ）の重鎖可変領域（V_H）C D R を含む。例えば、一部の実施形態では、本明細書において記載される C A R の細胞外抗原結合性ドメインは、以下のうち少なくとも 1 つまたは複数（例えば、1、2 または 3 つ）を含む：表 1 に示されるような、(i) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む V_H C D R 1 またはその保存的改変、(i i) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む V_H C D R 2 またはその保存的改変および (i i i) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む V_H C D R 3 またはその保存的改変。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、表 1 に示されるような、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む V_H C D R 1 またはその保存的改変、配列番号

2 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 2 またはその保存的改変および配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 3 またはその保存的改変を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 2 および配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 3 を含む。

【0092】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A を特異的に標的とする少なくとも 1 つまたは複数（例えば、1、2 または 3 つ）の軽鎖可変領域（ V_L ）CDR を含む。例えば、一部の実施形態では、本明細書において記載される CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、以下のうち少なくとも 1 つまたは複数（例えば、1、2 または 3 つ）を含む：表 1 に示されるような、（i）配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 1 またはその保存的改変、（ii）配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 2 またはその保存的改変および（iii）配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 3 またはその保存的改変。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、表 1 に示されるような、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 1 またはその保存的改変、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 2 またはその保存的改変および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 3 またはその保存的改変を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 1、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 2 および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 3 を含む。

【0093】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 1 またはその保存的改変および配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 1 またはその保存的改変を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 2 またはその保存的改変および配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 2 またはその保存的改変を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 3 またはその保存的改変および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 3 またはその保存的改変を含む。

【0094】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 1 またはその保存的改変、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 2 またはその保存的改変、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 3 またはその保存的改変、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 1 またはその保存的改変、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 2 またはその保存的改変および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 3 またはその保存的改変を含む。

【0095】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 2、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR 3、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 1、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 2 および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR 3 を含む。

【0096】

ある特定の実施形態では、CDR は、以下に提示される（例えば、Kabat 番号付けに従って）。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

抗原	シアリルルイス A		
CDRs	1	2	3
V _H	GFTFEAYA [配列番号 1]	INWNSGRI [配列番号 2]	AKDIRRFSTGGAEFEY [配列番号 3]
V _L	SSNIGSNF [配列番号 4]	RNN [配列番号 5]	AAWDDSLGGHYV [配列番号 6]
V _H ポリ ペプチド	MEFGLSWLFL YAMHWVRQPP QMNSLRLEDT [配列番号 7]	VAILKGVQCQ GKGLEWVSSI AFYYCAKDIR RFSTGGAEFE YWGQGLTVTV SS	VQLVESGGGS VQPGRLRLS DSVKGRETIS RDNARNSLYL
V _H ポリ ペプチド をコード する 核酸	ATGGAGTTTG ACAGTGCCAG GCAGGTCCCT TATGCCATGC CTCAAGTATT AGGGCCGATT CAAATGAACA AGATATACGG AGGGAACCTT GGTCACCGTC	GGCTGAGCTG GTGCAGCTGG GAGACTCTCC ACTGGGTCCG AATTGGAATA CACCATCTCC GTCTGAGACT AGTTTAGTA AGGGGGGGGC TCCTCA	GCTTTTTCTT TGGAGTCTGG TGTGAAGCCT GCAACCTCCA GTGGTCGCAT AGAGACAACG TGAGGACACG CCGGGGGGGC [配列番号 9]
V _L ポリ ペプチド	MAGFPLLLTL NFVYWYQQLP EDEADYYCAA	LTHCAGSWAQ GTAPKLLIYR WDDSLGGHYV	SVLTQPPSAS NNQRPSGVPD FGTGKVTVL [配列番号 8]
V _L ポリ ペプチド をコード する 核酸	ATGGCCGGCT TTGGGCCCCG GGCAGAGGGT AATTTTGTAT CATATATAGG GCTCCAGGTC GAGGATGAGG CCATTATGTC	TCCCTCTCCT TCTGTGCTGA CACCATCTCT ACTGGTACCA AATAATCAGC TGGCACCTCA CTGATTATTA TTCGGAACCTG	CCTCACCTTC CTCAGCCGCC TGTTCTGGAA GCAGCTCCCA GGCCCTCAGG GCCTCCCTGG CTGTGCAGCA GGACCAAGGT CACCGTCCTT [配列番号 10]

10

20

【0097】

本明細書で使用される場合、「保存的改変」または「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含む本開示のCAR（例えば、CARの細胞外抗原結合性ドメイン）の結合特徴（例えば、特異性および／または親和性）に有意に影響を及ぼさず、変更もしないアミノ酸改変を指す。保存的改変は、アミノ酸置換、付加および欠失を含み得る。改変は、当技術分野で公知の標準技術、例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発によって本開示のCARのヒトscFv中に導入され得る。アミノ酸は、その物理化学的特性、例えば、電荷および極性に従って群に分類できる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同一群内のアミノ酸で置き換えられるものである。例えば、アミノ酸は、電荷によって分類できる：正電荷を有するアミノ酸として、リシン、アルギニン、ヒスチジンが挙げられ、負電荷を有するアミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸が挙げられ、中性電荷アミノ酸として、アラニン、アスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリンが挙げられる。さらに、アミノ酸は、極性によって分類できる：極性アミノ酸として、アルギニン（塩基性極性）、アスパラギン、アスパラギン酸（酸性極性）、グルタミン酸（酸性極性）、グルタミン、ヒスチジン（塩基性極性）、リシン（塩基性極性）、セリン、トレオニンおよびチロシンが挙げられ、非極性アミノ酸として、アラニン、システイン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファンおよびバリンが挙げられる。したがって、CDR領域内の1個または複数のアミノ酸残基を、同一群からの他のアミノ酸残基で置き換えることができ、変更された抗体を、本明細書において記載される機能アッセイを使用して保持された機能（すなわち、上記の(c)から(l)に示された機能）について試験できる。ある特定の実施形態では、指定の配列またはCDR領域内の1個以下、

30

40

50

2 個以下、3 個以下、4 個以下、5 個以下の残基が変更される。

【0098】

例えば、一部の実施形態では、本明細書において記載される C A R 中に含まれる V_H および／または V_L アミノ酸配列（例えば、表 1 に示されるような配列番号 1～10）の保存的改変は、指定の配列（複数可）に対して少なくとも 1 つまたは複数の（例えば、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10 またはそれよりも多い）置換（例えば、保存的置換）、挿入および／または欠失を含有するが、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）に結合する能力を保持する、指定の配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90% または少なくとも約 95%（例えば、約 81%、約 82%、約 83%、約 84%、約 85%、約 86%、約 87%、約 88%、約 89%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98% または約 99%）の相同性または同一性を有するアミノ酸配列である。一部の実施形態では、本明細書において記載される C A R 中に含まれる V_H および／または V_L アミノ酸配列（例えば、表 1 に示されるような配列番号 1～10）のこのような保存的改変は、対応する改変されていない V_H および／または V_L アミノ酸配列のシアリルルイス A に対する結合親和性の、例えば、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95% またはそれよりも多く、最大 100% を含む、少なくとも 70% またはそれよりも多くを保持する。例えば、ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）に、約 3×10^{-8} またはそれ未満の結合親和性（ K_d ）で特異的に結合する。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）に、約 2×10^{-8} またはそれ未満の結合親和性（ K_d ）で特異的に結合する。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）に、約 1.3×10^{-8} またはそれ未満の結合親和性（ K_d ）で特異的に結合する。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）に、約 1.8×10^{-8} またはそれ未満の結合親和性（ K_d ）で特異的に結合する。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）に約 1×10^{-9} ～約 1×10^{-7} の結合親和性（ K_d ）で結合する。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）に、約 1×10^{-8} ～約 2×10^{-8} の結合親和性（ K_d ）で結合する。ある特定の実施形態では、配列番号 7 または 8 において合計 1～10 個のアミノ酸が、置換、挿入および／または欠失される。ある特定の実施形態では、置換、挿入または欠失は、細胞外抗原結合性ドメインの C D R の外側の領域中（例えば、F R 中）に生じる。本明細書において提示される表 1 を読む当業者ならば、提供された配列情報に基づいてフレームワーク領域（F R）のアミノ酸および／または核酸配列を同定および決定できる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、その配列（配列番号 7 または 8）の翻訳後改変を含む、配列番号 7 および 8 からなる群から選択される V_H および／または V_L 配列を含む。

【0099】

本明細書で使用される場合、2 つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、2 つの配列間の同一性パーセントと同等である。2 つの配列間の同一性パーセントは、2 つの配列の最適アラインメントのために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一である位置の数の関数である（すなわち、相同性% = 同一である位置の数 / 位置の総数 × 100）。2 つの配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

【0100】

2 つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、A L I G N プログラム（バージョン 2.0）中に組み込まれている E. M e y e r s および W. M i l l e r のアルゴリズム（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17（1988））を使用して、P A M 1 2 0 重み残基表、1

10

20

30

40

50

2のギャップ長ペナルティーおよび4のギャップペナルティーを使用して決定され得る。さらに、2つのアミノ酸配列間の相溶性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム中に組み込まれているNeedlemanおよびWunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) アルゴリズム (www.gcg.comで入手可能) を使用して、Blossum 62マトリックスまたはPAM 250マトリックスのいずれかおよび16、14、12、10、8、6または4のギャップ重みおよび1、2、3、4、5または6の長さ重みを使用して決定され得る。

【0101】

さらに、またはあるいは、本開示の主題のアミノ酸配列は、例えば、関連配列を同定するために公開データベースに対して検索を実施するための「クエリー配列」としてさらに使用され得る。このような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のXBLASTプログラム (バージョン2.0) を使用して実施され得る。本明細書において開示される指定の配列 (例えば、scFv m903、m904、m905、m906およびm900の重鎖および軽鎖可変領域配列) と相同であるアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索が、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実施され得る。比較目的のためにギャップ付きアラインメントを得るために、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載されるようにギャップ付きBLASTが利用され得る。BLASTおよびギャップ付きBLASTプログラムを利用する場合には、それぞれのプログラム (例えば、XBLASTおよびNBLAST) のデフォルトパラメーターが使用され得る。

【0102】

ある特定の実施形態では、本開示のCARの細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスA (例えば、ヒトシアリルルイスA) への結合について、例えば、本開示のscFvのいずれか1つのV_H CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびにV_L CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合する。ある特定の実施形態では、本開示のCARの細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスA (例えば、ヒトシアリルルイスA) への結合について、例えば、本開示のscFvのいずれか1つのV_HおよびV_L配列を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合する。

【0103】

ある特定の実施形態では、本開示のCARの細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスA (例えば、ヒトシアリルルイスA) への結合について、scFv 5B1のV_H CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびにV_L CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合する。例えば、本開示のCARの細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスA (例えば、ヒトシアリルルイスA) への結合について、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR2、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR3、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR1、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR2および配列番号6に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合する。ある特定の実施形態では、本開示のCARの細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAへの結合について、scFv 5B1のV_HおよびV_L配列を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合する。例えば、本開示のCARの細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAへの結合について、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含むV_Hおよび配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合する。

【0104】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、参照抗体またはその抗原結合性部分と同一または重複する、シアリルルイスA (例えば、ヒトシアリルルイスA) 上のエピトープに結合する。例えば、本開示のCARの細胞外抗原結合性ドメインは、例えば

、本開示の $s c F v$ のいずれか 1 つの V_H CDR1、CDR2 および CDR3 配列ならびに V_L CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と同一または重複する、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）上のエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、本開示の CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、例えば、本開示の $s c F v$ のいずれか 1 つの V_H および V_L 配列を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と同一または重複する、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）上のエピトープに結合する。

【0105】

ある特定の実施形態では、本開示の CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、 $s c F v$ 5B1 の V_H CDR1、CDR2 および CDR3 配列ならびに V_L CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と同一または重複する、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）上のエピトープに結合する。例えば、本開示の CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR2、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む V_H CDR3、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR1、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR2 および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む V_L CDR3 を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と同一または重複する、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）上のエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、本開示の CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、 $s c F v$ 5B1 の V_H および V_L 配列を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と同一または実質的に同一の、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）上のエピトープに結合する。例えば、本開示の CAR の細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む V_H および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む V_L を含む参照抗体またはその抗原結合性部分と同一または重複する、シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）上のエピトープに結合する。

【0106】

シアリルルイス A（例えば、ヒトシアリルルイス A）への結合について参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合または競合する細胞外抗原結合性ドメインは、それだけには限らないが、ELISA、ラジオイムノアッセイ（RIA）、Biacore、フローサイトメトリー、ウエスタンブロッティングおよび任意の他の適した定量的または定性的抗体-結合アッセイを含む当技術分野で公知の日常的方法を使用することによって同定され得る。競合 ELISA は、その全体が参照により組み込まれる、J. Walker によって編集された Morris, "Epitope Mapping of Protein Antigens by Competition ELISA", The Protein Protocols Handbook (1996), pp 595-600 に記載されている。ある特定の実施形態では、抗体結合アッセイは、参照抗体のシアリルルイス A への最初の結合を測定すること、参照抗体を試験細胞外抗原結合性ドメインと混合すること、試験細胞外抗原結合性ドメインの存在下で参照抗体のシアリルルイス A への第 2 の結合を測定することおよび参照抗体の最初の結合を第 2 の結合と比較することを含み、最初の結合と比較して減少した、参照抗体のシアリルルイス A への第 2 の結合が、試験細胞外抗原結合性ドメインが、シアリルルイス A への結合について参照抗体と交差競合すること、例えば、同一または実質的に同一のエピトープ、重複エピトープまたは隣接エピトープを認識するものを示す。ある特定の実施形態では、参照抗体は例えば、蛍光色素、ビオチンまたはペルオキシダーゼで標識される。ある特定の実施形態では、シアリルルイス A は、例えば、フローサイトメトリー試験において細胞において発現される。ある特定の実施形態では、シアリルルイス A は、Biacore シップ (ship)（例えば、Biacore 試験において）または表面プラズモン共鳴分析に適した他の媒体を含む表面上に固定化される。完全に無関係の抗体（シアリルルイス A に結合しない）の存在下での参照抗体の結合は、対照高値として役立ち得る。対照低値は、標識された参照抗体を未標識参照抗体とともにインキュベートすることによって得ることができ、標識された参照抗体の競合および結合の低減が生じる。ある特定の実施形態では、参照抗体のシアリルルイス A への結合を

少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または少なくとも約95%低減する試験細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAへの結合について参照抗体と交差競合する細胞外抗原結合性ドメインであると考えられる。ある特定の実施形態では、アッセイは室温で実施される。

【0107】

ある特定の実施形態では、抗体-結合アッセイは、試験細胞外抗原結合性ドメインのシアリルルイスAへの最初の結合を測定すること、試験細胞外抗原結合性ドメインを参照抗体と混合すること、参照抗体の存在下で試験細胞外抗原結合性ドメインのシアリルルイスAポリペプチドへの第2の結合を測定することおよび試験細胞外抗原結合性ドメインの最初の結合を第2の結合と比較することを含み、最初の結合と比較して減少した、試験細胞外抗原結合性ドメインのシアリルルイスAへの第2の結合が、試験細胞外抗原結合性ドメインがシアリルルイスAへの結合について参照抗体と交差競合すること、例えば、同一または実質的に同一のエピトープ、重複エピトープまたは隣接エピトープを認識するものを示す。ある特定の実施形態では、試験細胞外抗原結合性ドメインは、例えば、蛍光色素、ビオチンまたはペルオキシダーゼで標識される。ある特定の実施形態では、シアリルルイスAは、例えば、フローサイトメトリー試験において細胞において発現される。ある特定の実施形態では、シアリルルイスAは、Biacoreチップ（例えば、Biacore試験において）または表面プラズモン共鳴分析に適した他の媒体を含む表面上に固定化される。完全に無関係の抗体（シアリルルイスAに結合しない）の存在下での試験細胞外抗原結合性ドメインの結合は、対照高値として役立ち得る。対照低値は、標識された試験細胞外抗原結合性ドメインを未標識試験細胞外抗原結合性ドメインとともにインキュベートすることによって得ることができ、標識試験細胞外抗原結合性ドメインの競合および結合の低減が生じる。ある特定の実施形態では、参照抗体の存在下で、シアリルルイスAへの結合が少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または少なくとも約95%減少される試験細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAへの結合について参照抗体と交差競合する細胞外抗原結合性ドメインであると考えられる。ある特定の実施形態では、アッセイは室温で実施される。

【0108】

CDR3ドメインが、CDR1および／またはCDR2ドメイン（複数可）とは独立して、単独で、コグネイト抗原に対する抗体またはその抗原結合性部分の結合特異性を決定できることおよび共通のCDR3配列に基づいて同一の結合特異性を有する複数の抗体を予想通りに作製できることは当技術分野で周知である。例えば、Klimka et al., *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000)（マウス抗CD30抗体Ki-4の重鎖可変ドメインCDR3のみを使用する、ヒト化抗CD30抗体の生成を記載する）、Beiboor et al., *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000)（親マウスMOC-31抗-EGP-2抗体の重鎖CDR3配列のみを使用する組換え上皮糖タンパク質-2（EGP-2）抗体を記載する）、Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998)（マウス抗インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 抗体LM609の重鎖および軽鎖可変CDR3ドメインを使用するヒト化抗インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 抗体のパネルを記載し、各メンバー抗体は、CDR3ドメインの外側の別個の配列を含み、親マウス（muring）抗体と同一のエピトープと結合可能であり、親マウス抗体と同程度に高いか、またはそれより高い親和性を有する）、Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994)（CDR3ドメインが、抗原結合への最も顕著な寄与を提供することを開示する）、Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995)（抗テタヌストキソイドFabの重鎖への、ヒト胚盤DNAに対する3つのFab（SI-1、SI-40およびSI-32）の重鎖CDR3配列のグラフィング、それによって、既存の重鎖CDR3を置き換えることを記載し、CDR3ドメインが単独で結合特異性を付与したことを実証する）、およびDitzel et al., *J. Immunol.* 157:739-749 (1996)（単一特

10

20

30

40

50

異性 I g G テタヌストキソイド結合性 F a b p 3 1 3 抗体の重鎖への親の多特異性 F a b L N A 3 の重鎖 C D R 3 のみの移入が、親 F a b の結合特異性を保持するのに十分であったグラフティング研究を記載する)を参照されたい。これらの参考文献の各々は、その全体がこれにより参照により組み込まれる。

【0109】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される C A R の細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 3 の保存的改変および／または配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 またはその保存的改変を含む。一部のこのような実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインはまた、(i) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2 もしくはその保存的改変および配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2 もしくはその保存的改変を含み、ならびに／または(ii) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1 もしくはその保存的改変および配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1 もしくはその保存的改変も含み得る。

10

【0110】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む V_H C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む V_H C D R 2、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む V_H C D R 3、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む V_L C D R 1、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む V_L C D R 2、および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む V_L C D R 3 を含む。

20

【0111】

さらに、ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 またはその保存的改変および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 またはその保存的改変を含む。

【0112】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 またはその保存的改変および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 またはその保存的改変を含む。

【0113】

細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2 またはその保存的改変および配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2 またはその保存的改変をさらに含む。

30

【0114】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2 またはその保存的改変および配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2 またはその保存的改変を含む。

【0115】

細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1 またはその保存的改変および配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1 またはその保存的改変をさらに含む。

40

【0116】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1 またはその保存的改変および配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1 またはその保存的改変を含む。

【0117】

ある特定の限定されない実施形態では、本開示の C A R の細胞外抗原結合性ドメインは、細胞外抗原結合性ドメインの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を接続するリンカーを含み得る。本明細書で 사용되는場合、「リンカー」という用語は、互いに接続されるように 2 つのまたはそれよりも多くのポリペプチドまたは核酸を共有結合によって付着させる官能基(例えば、化学物質またはポリペプチド)を指す。本明細書で 사용되는場合、「

50

ペプチドリinker」とは、2つのタンパク質と一緒に結合するために（例えば、V_HおよびV_Lドメインを結合するために）使用される1個またはそれよりも多いアミノ酸を指す。ある特定の実施形態では、リンカーは、配列番号11に示される配列を有するアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、配列番号11のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が、配列番号12に示されている。

【0118】

さらに、細胞外抗原結合性ドメインは、新生タンパク質を小胞体に向けるリーダーまたはシグナルペプチドを含み得る。シグナルペプチドまたはリーダーは、CARがグリコシル化され、細胞膜に固定される場合には必須であり得る。シグナル配列またはリーダーは、その侵入を分泌経路へ向ける、新しく合成されたタンパク質のN末端に存在するペプチド配列（約5、約10、約15、約20、約25または約30個のアミノ酸長）であり得る。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、細胞外抗原結合性ドメインの5'末端に共有結合によって繋がれる。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、以下に提供されるような配列番号13に示されるアミノ酸配列を含むCD8ポリペプチドを含む。TAMALPVTALLLPLALLLHAARP [配列番号13]

【0119】

配列番号13のアミノ酸配列をコードする例示的ヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号14に示される：

ACTGCCATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGC
AGCCAGGCCT [配列番号14]

【0120】

CARの膜貫通ドメイン

ある特定の限定されない実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、少なくとも膜の部分に広がる疎水性アルファヘリックスを含む。異なる膜貫通ドメインは、異なる受容体安定性をもたらす。抗原認識後、受容体は密集しシグナルは、細胞に伝達される。本開示の主題に従って、CARの膜貫通ドメインは、CD8ポリペプチド、CD28ポリペプチド、CD3ζポリペプチド、CD40ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、CD84ポリペプチド、CD166ポリペプチド、CD8aポリペプチド、CD8bポリペプチド、ICOSポリペプチド、ICAM-1ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、CD27ポリペプチド、CD40/My88ポリペプチド、NKGD2ポリペプチド、合成ポリペプチド（免疫応答と関連するタンパク質をベースとしない）の天然または改変された膜貫通ドメインまたはそれらの組合せを含み得る。

【0121】

ある特定の実施形態では、本開示のCARの膜貫通ドメインは、CD28ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、本開示のCARの膜貫通ドメインは、ヒトCD28ポリペプチド（例えば、ヒトCD28の膜貫通ドメインまたはその部分）を含む。CD28ポリペプチドは、NCBI参照番号P10747またはNP_006130を有する配列（配列番号15）またはその断片と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは100%相同である（例えば、同一である）、および／または必要に応じて、最大1つもしくは最大2つもしくは最大3つの保守的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。ある特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、少なくとも20または少なくとも30または少なくとも40または少なくとも50および最大220個のアミノ酸長である配列番号15の連続部分であるアミノ酸配列を有し得る。あるいはまたはさらに、限定されない種々の実施形態では、CD28ポリペプチドは、配列番号15のアミノ酸1~220、1~50、50~100、100~150、114~220、150~200または200~220のアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、本開示のCARは、CD28ポリペプチドを含む膜貫通ドメイン、CD28ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む細胞内ドメインを含む。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン中に含まれるCD28ポリペプチドは、配列番号15のアミノ酸114~220を含むか、または有する。

【0122】

配列番号15は、以下に提供される：

【化2】

1 MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61 SAVEVCVVYV NYSQQLQVYS KTGFCNDGKL GNEVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLEPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
181 SKRSRLHSD YNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [配列番号 15]

【0123】

本開示の主題に従って、「CD28核酸分子」とは、CD28ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。配列番号15のアミノ酸114～220をコードする例示的ヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号16に示される。

【化3】

attgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccatta
tccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtccttatttcccgaccttctaagcc
cttttggtgctggtggtggtggtggtgagtcctggcttgctatagcttgctagtaaca
gtggcctttattattttctggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgact
acatgaacatgactccccgccgccccgggccccaccgcgaagcattaccagccctatgc
cccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc [配列番号 16]

【0124】

ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8ポリペプチド（例えば、CD28の膜貫通ドメインまたはその部分）を含む。CD8ポリペプチドは、配列番号17またはその断片と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは約100%相同である、および／または必要に応じて、最大1つもしくは最大2つもしくは最大3つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、少なくとも20または少なくとも30または少なくとも40または少なくとも50および最大235個のアミノ酸長である、配列番号17の連続部分であるアミノ酸配列を有し得る。あるいはまたはさらに、限定されない種々の実施形態では、CD8ポリペプチドは、配列番号17のアミノ酸1～235、1～50、50～100、100～150、150～200または200～235を含むか、または有する。

【化4-1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLL
YLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPA

【化4-2】

PREPTFAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRR
VCKCPRPVVKS GDKPSLSARYV [配列番号 17]

【0125】

本開示の主題に従って、「CD8核酸分子」とは、CD8ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

【0126】

ある特定の実施形態では、本開示のCARの膜貫通ドメインは、CD166ポリペプチドの天然または改変された膜貫通ドメインを含む。CD166ポリペプチドは、NCBI参照番号NP_001618.2を有する配列（配列番号18）またはその断片と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは100%相同である、および／または必要に応じて、最大1つもしくは最大2つもしくは最大3つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。限定されないある特定の実施形態では、CD166ポリペプチドは、少なくとも20または少なくとも30ま

たは少なくとも40または少なくとも50および最大583個のアミノ酸長である、配列番号18の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、限定されない種々の実施形態では、CD166ポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸1～583、1～50、50～100、100～150、150～200、150～200、200～250、250～300、300～350、350～400、400～450、450～500、528～553、500～550または550～583のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、本開示のCARの膜貫通ドメイン中に含まれるCD166ポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸528～553を含むか、または有する。

【0127】

配列番号18は、以下に提供される：

【化5】

```
MESKGASSCRLLFCLLISATVFRPGLGWYTVNSAYGDTIIIPCRLDVPQNLNMFQKWKYEKPDGSPV
FIAFRSSTKKSQYDDVPEYKDRNLNLSNYTLNISNARISDEKRFVCMVLTEDNVFEAPTIVKVFKQPSKP
EIVSKALFLETEQLKKLGDCISEDSPDGNITWYRNGKVLHPLEGAVVIFKKEMDPVTQLYTMSTLEYK
TTKADIQMPFTCSVTYYGSPGQKTIHSEQAVFDIYYPTQVTLQVLPKNAIKEGDNITLKLGNNGNPPPE
EFLFYLPQGPEGIRSSNTYTLTDVRRNATGDYKCSLIDKKSMIASAITVHYLDLSLNPSGEVTRQIGDAL
PVSCTISASRNATVVMKDNIRLRSSPSFSSLHYQDAGNYVCETALQVEGLKKRESLTILIVEGKPKIKMT
KKTDPGSLSKTIICHVEGFKPAIQWTITGSGSVINQTEESPYINGRYYSKIIISPEENVTLTCTAENQLE
RTVNSLNVSAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWLYMKKSKTASKHVNK
DLGNMEENKKLENNHKTEA[ 配列番号 18]
```

【0128】

本開示の主題に従って、「CD166核酸分子」とは、CD166ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。配列番号18のアミノ酸528～553をコードする例示的ヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号19に示される。

CTAATTGTGGGAATCGTTGTTGGTCTCCTCCTTGCTGCCCTTGTTGCTGGTGTCTGCTCTAC
TGGCTGTACATGAAGAAG [配列番号19]

【0129】

ヒンジ／スペーサー領域

ある特定の限定されない実施形態では、CARはまた、細胞外抗原結合性ドメインを膜貫通ドメインに連結するヒンジ／スペーサー領域を含み得る。ヒンジ／スペーサー領域は、CARの活性化活性を保ちながら抗原認識を容易にするために、抗原結合性ドメインを種々の方向に方向付けることを可能にするほど十分に可動性であり得る。ある特定の限定されない実施形態では、ヒンジ／スペーサー領域は、IgG1由来のヒンジ領域、免疫グロブリンのCH₂CH₃領域およびCD3の部分、CD28ポリペプチド（例えば、配列番号15）の部分、CD8ポリペプチド（例えば、配列番号17）の部分、CD166ポリペプチド（例えば、配列番号18）の部分、それと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%相同である前記のもののいずれかの変形形態または合成スペーサー配列であり得る。ある特定の限定されない実施形態では、ヒンジ／スペーサー領域は、約1～50（例えば、5～25、10～30または30～50）個のアミノ酸の間の長さを有し得る。

【0130】

ある特定の実施形態では、本開示のCARのヒンジ／スペーサー領域は、本明細書において記載されるようなCD166ポリペプチドの天然または改変された（例えば、保存的改変を有する）ヒンジ領域を含む。ある特定の実施形態では、本開示のCARのヒンジ／スペーサー領域中に含まれるCD166ポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸489～527のアミノ酸配列を含むか、または有する。配列番号18のアミノ酸489～527をコードする例示的ヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号20に示される。

ACCAACTGGAGAGAACAGTAACTCCTTGAATGTCTCTGCTATAAGTATTCCAGAACAC
GATGAGGCAGACGAGATAAGTGATGAAAACAGAGAAAAGGTGAATGACCAGGCAAAA [配列番号 20]

【0131】

CARの細胞内ドメイン

ある特定の限定されない実施形態では、本明細書において記載されるCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞（例えば、リンパ系列の細胞、例えば、T細胞）を活性化または刺激できるCD3ζポリペプチドを含む。野生型（「天然」）CD3ζは、3つの免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（「ITAM」）（例えば、ITAM1、ITAM2およびITAM3）、3つの塩基性豊富ストレッチ（BRS）領域（BRS1、BRS2およびBRS3）を含み、抗原が結合された後に活性化シグナルを細胞（例えば、リンパ系列の細胞、例えば、T細胞）に伝達する。天然CD3ζ鎖の細胞内シグナル伝達ドメインは、内因性TCRからのシグナルの主伝達物質である。本明細書における実施形態において使用される場合CD3ζは、天然CD3ζではなく、改変されたCD3ζである。ある特定の実施形態では、本開示のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、その内容が本明細書において記載される目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる2018年12月31日に出願された国際特許出願番号PCT/US2018/068134（国際公開番号WO2019/133969に対応する）において開示されるCD3ζポリペプチドを含む。

【0132】

ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、NCBI参照番号NP_932170を有する配列（配列番号21）またはその断片と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%相同であるアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の限定されない実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、少なくとも20または少なくとも30または少なくとも40または少なくとも50または少なくとも100または少なくとも110または少なくとも113および最大163個のアミノ酸長である配列番号21の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、限定されない種々の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、配列番号21のアミノ酸1~50、50~100、100~150、50~164、55~164または150~164のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、配列番号21のアミノ酸52~164のアミノ酸配列を含むか、または有する。

【0133】

配列番号21は、以下に提供される：

【化6】

```
1  MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
61  APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGY YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [ 配列番号 21]
```

【0134】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、改変されたヒトCD3ζポリペプチドを含む。改変されたヒトCD3ζポリペプチドは、配列番号22またはその断片と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%もしくは約99%もしくは約100%相同である（例えば、同一である）、および／または必要に応じて、最大1つもしくは最大2つもしくは最大3つの保守的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含み得るか、または有し得る。配列番号22は、以下に提供される：

```
RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR RKN
PQEGLYN
ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDT YDALHMQALP PR
[配列番号 22]
```

【0135】

配列番号22のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号23に示される。

【化7-1】

AGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCCAGCTCTATAACGAGCT
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAA

【化7-2】

AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [配列番号 23]

10

【0136】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、改変されたヒトCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、配列番号24またはその断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%、少なくとも約100%相同である（例えば、同一である）、および／または必要に応じて、最大1つもしくは最大2つもしくは最大3つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むか、または有する。配列番号24は以下に提供される：

20

RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR RKN
PQEGLFN
ELQKDKMAEA FSEIGMKGER RRGKGDGLF QGLSTATKDT FDALHMQALP PR [配列番号 24]

【0137】

配列番号24のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号25に示される。

【化8】

agagtgaagtttcagcaggagcgcagacgcccccgcgctaccagcagggccagaaccagctctataacgagct
caatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaa
agccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtTcaatgaaactgcagaaagataagatggcggaggcctTc
agtgagattgggatgaaaggcgagcgcgggaggggcaaggggcacgatggcctttTccaggggctcagtac
agccaccaaggacacctTcgacgcctttcacatgcaggccctgccccctcgc [配列番号 25]

30

【0138】

免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）

ある特定の限定されない実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、1、2または3つのITAMを含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、配列番号26に示されるアミノ酸配列を含む天然ITAM1を含む。

40

QNQLYNELNLGRREEYDVLDKR [配列番号 26]

【0139】

配列番号26のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号27に示される。

cagaaccagctctataacgagctcaatctagga cgaagagaggagtacgatgttttggacaagaga [配列番号 27]

【0140】

ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、1つまたは複数の機能

50

欠失変異を含む I T A M 1 バリエーションを含む。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、2つの機能欠失変異を含む I T A M 1 バリエーションを有する。ある特定の実施形態では、機能欠失変異は、I T A M 1 中のチロシン残基の変異を含む。ある特定の実施形態では、2つの機能欠失変異からなる I T A M 1 バリエーションは、以下に提供される配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を含む。

QNQLFNELNLGRREEFDVLDKR [配列番号 28]

【0141】

配列番号 28 のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号 29 に示される。

cagaaccagctctTtaacgagctcaatctagga cgaagagaggagtTcgatgttttgacaagaga [配列番号 29]

【0142】

ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、以下に提供される配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を含む天然 I T A M 2 を含む。

QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK [配列番号 30]

【0143】

配列番号 30 のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号 31 に示される。

caggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaa [配列番号 31]

【0144】

ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、1つまたは複数の機能欠失変異を含む I T A M 2 バリエーションを含む。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、2つの機能欠失変異を含む I T A M 2 バリエーションを有する。ある特定の実施形態では、機能欠失変異は、I T A M 2 中のチロシン残基の変異を含む。ある特定の実施形態では、2つの機能欠失変異からなる I T A M 2 バリエーションは、以下に提供される配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を含む。

QEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMK [配列番号 32]

【0145】

配列番号 32 のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号 33 に示される。

caggaaggcctgtTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTcagtgagattgggatgaaa [配列番号 33]

【0146】

ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、以下に提供される配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を含む天然 I T A M 3 を含む。

HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ [配列番号 34]

【0147】

配列番号 34 のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号 35 に示される。

cacgatggcctttaccagggtctcagtagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcag [配列番号 35]

【0148】

ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、1つまたは複数の機能欠失変異を含む I T A M 3 バリエーションを含む。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、2つの機能欠失変異を含む I T A M 3 バリエーションを有する。ある特定の実施形態では、機能欠失変異は、I T A M 3 中のチロシン残基の変異を含む。ある特定の実施形態では、2つの機能欠失変異からなる I T A M 3 バリエーションは、以下に提供される配列番号 36 に示されるアミノ酸配列を含む。

HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ [配列番号 36]

10

20

30

40

50

【0149】

配列番号36のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号37に示される。

cacgatggcctttTccaggggctcagtagccaccaaggacacctTcgacgcccttcacatgcag [配列番号37]

【0150】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、1つもしくは複数の機能欠失変異を含むITAM1バリエーション、1つもしくは複数の機能欠失変異を含むITAM2バリエーション、1つもしくは複数の機能欠失変異を含むITAM3バリエーションまたはそれらの組合せを含む、または本質的にそれからなる、またはそれからなる改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、1つまたは複数の（例えば、2つの）機能欠失変異を含むITAM2バリエーションおよび1つまたは複数の（例えば、2つの）機能欠失変異を含むITAM3バリエーションを含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、天然ITAM1、2つの機能欠失変異を含むか、または有するITAM2バリエーションおよび2つの機能欠失変異を含むか、または有するITAM3バリエーションを含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号26に示されるアミノ酸配列を有する天然ITAM1、配列番号32に示されるアミノ酸配列を有するITAM2バリエーションおよび配列番号36に示されるアミノ酸配列を有するITAM3バリエーションを含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、配列番号24に示されるアミノ酸配列を含むか、または有する。

【0151】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、1つまたは複数の（例えば、2つの）機能欠失変異を含むITAM1バリエーションおよび1つまたは複数の（例えば、2つの）機能欠失変異を含むITAM3バリエーションを含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、2つの機能欠失変異を含むITAM1バリエーション、天然ITAM2および2つの機能欠失変異を含むITAM3バリエーションを含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号28に示されるアミノ酸配列を有するITAM1バリエーション、配列番号30に示されるアミノ酸配列を有する天然ITAM2および配列番号36に示されるアミノ酸配列を有するITAM3バリエーションを含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。

【0152】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、1つまたは複数の（例えば、2つの）機能欠失変異を含むITAM1バリエーションおよび1つまたは複数の（例えば、2つの）機能欠失変異を含むITAM2バリエーションを含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、2つの機能欠失変異を含むITAM1バリエーション、2つの機能欠失変異を含むITAM2バリエーションおよび天然ITAM3を含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号28に示されるアミノ酸配列を有するITAM1バリエーション、配列番号32に示されるアミノ酸配列を有するITAM2バリエーションおよび配列番号34に示されるアミノ酸配列を有する天然ITAM3を含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。

【0153】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、1つまたは複数の（例えば、2つの）機能欠失変異を含むITAM1バリエーションを含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、2つの機能欠失変異を含むITAM1バリエーション、天然ITAM2および天然ITAM3を含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細

胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を有する ITAM1 バリエーション、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を有する天然 ITAM2 および配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を有する天然 ITAM3 を含む改変された CD3ζ ポリペプチドを含む。

【0154】

ある特定の実施形態では、CAR の細胞内シグナル伝達ドメインは、天然 ITAM1、天然 ITAM2 および 1 つまたは複数の（例えば、2 つの）機能欠失変異を含む ITAM3 バリエーションを含む改変された CD3ζ ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CAR の細胞内シグナル伝達ドメインは、天然 ITAM1、天然 ITAM2 および 2 つの機能欠失変異を含む ITAM1 バリエーションを含む改変された CD3ζ ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CAR の細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を有する天然 ITAM1、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を有する天然 ITAM2 および配列番号 36 に示されるアミノ酸配列を有する ITAM3 バリエーションを含む改変された CD3ζ ポリペプチドを含む。

10

【0155】

ある特定の実施形態では、CAR の細胞内シグナル伝達ドメインは、天然 ITAM1、1 つまたは複数の（例えば、2 つの）機能欠失変異を含む ITAM2 バリエーションおよび天然 ITAM3 を含む改変された CD3ζ ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CAR の細胞内シグナル伝達ドメインは、天然 ITAM1、2 つの機能欠失変異を含む ITAM2 バリエーションおよび天然 ITAM3 を含む改変された CD3ζ ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CAR の細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を有する天然 ITAM1、配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を有する ITAM2 バリエーションおよび配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を有する天然 ITAM3 を含む改変された CD3ζ ポリペプチドを含む。

20

【0156】

ある特定の実施形態では、CAR の細胞内シグナル伝達ドメインは、1 つまたは 2 つの ITAM の欠失を含む改変された CD3ζ ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、改変された CD3ζ ポリペプチドは、ITAM1 および ITAM2 の欠失を含む、例えば、改変された CD3ζ ポリペプチドは、天然 ITAM3 または ITAM3 バリエーションを含み、ITAM1 および ITAM2 を含まない。ある特定の実施形態では、改変された CD3ζ ポリペプチドは、配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を有する天然 ITAM3 を含み、ITAM1（天然もしくは改変された）および ITAM2（天然もしくは改変された）を含まない。

30

【0157】

ある特定の実施形態では、改変された CD3ζ ポリペプチドは、ITAM2 および ITAM3 の欠失を含み、例えば、改変された CD3ζ ポリペプチドは、天然 ITAM1 または ITAM1 バリエーションを含み、ITAM2 および ITAM3 を含まない。ある特定の実施形態では、改変された CD3ζ ポリペプチドは、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を有する天然 ITAM1 を含み、ITAM2（天然もしくは改変された）および ITAM3（天然もしくは改変された）を含まない。

40

【0158】

ある特定の実施形態では、改変された CD3ζ ポリペプチドは、ITAM1 および ITAM3 の欠失を含み、例えば、改変された CD3ζ ポリペプチドは、天然 ITAM2 または ITAM2 バリエーションを含み、ITAM1 および ITAM3 を含まない。ある特定の実施形態では、改変された CD3ζ ポリペプチドは、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を有する天然 ITAM2 を含み、ITAM1（天然もしくは改変された）および ITAM3（天然もしくは改変された）を含まない。

【0159】

ある特定の実施形態では、改変された CD3ζ ポリペプチドは、ITAM1 の欠失を含み、例えば、改変された CD3ζ ポリペプチドは、天然 ITAM2 または ITAM2 バリ

50

アントおよび天然ITAM3またはITAM3バリエーションを含み、ITAM1（天然もしくは改変された）を含まない。ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、ITAM2の欠失を含み、例えば、改変されたCD3ζポリペプチドは、天然ITAM1またはITAM1バリエーションおよび天然ITAM3またはITAM3バリエーションを含み、ITAM2（天然もしくは改変された）を含まない。ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、ITAM3の欠失を含み、例えば、改変されたCD3ζポリペプチドは、天然ITAM1またはITAM1バリエーションおよび天然ITAM2またはITAM2バリエーションを含み、ITAM3（天然もしくは改変された）を含まない。

【0160】

塩基性豊富ストレッチ（BRS）領域

ある特定の限定されない実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、1、2または3つのBRS領域（すなわち、BRS1、BRS2およびBRS3）を含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。BRS領域は、天然BRSまたは改変されたBRS（例えば、BRSバリエーション）であり得る。ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、以下に提供される配列番号38に示されるアミノ酸配列を含む天然BRS1領域を含む。

KRRGR [配列番号38]

【0161】

配列番号38のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号39に示されている。

aagagacgtggccgg [配列番号39]

【0162】

ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、1つまたは複数の機能欠失変異を含むBRS1バリエーションを含む。

【0163】

ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、配列番号40に示されるアミノ酸配列を含む天然BRS2を含む。

KPRRK [配列番号40]

【0164】

配列番号40のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号41に示されている。

aagccgagaaaggaa [配列番号41]

【0165】

ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、1つまたは複数の機能欠失変異を含むBRS2バリエーションを含む。

【0166】

ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、配列番号42に示されるアミノ酸配列を含む天然BRS3を含む。

KGERRRGK [配列番号42]

【0167】

配列番号42のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号43に示されている。

aaaggcgagcgccggaggggcagg [配列番号43]

【0168】

ある特定の実施形態では、改変されたCD3ζポリペプチドは、1つまたは複数の機能欠失変異を含むBRS3バリエーションを含む。

【0169】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、3つのBRS領域すべて、すなわちBRS1領域、BRS2領域およびBRS3領域を含む改変されたCD3ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメイ

10

20

30

40

50

ンは、天然 B R S 1、天然 B R S 2 および天然 B R S 3 を含む改変された C D 3 ζ ポリペプチドを含む。

【 0 1 7 0 】

ある特定の実施形態では、C A R の細胞内シグナル伝達ドメインは、1 つまたは 2 つであるが 3 つすべてではない B R S 領域を含む改変された C D 3 ζ ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 1 領域および B R S 2 領域を含み、B R S 3 領域を含まない。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 1 領域および B R S 3 領域を含み、B R S 2 領域を含まない。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 2 領域および B R S 3 領域を含み、B R S 1 領域を含まない。

10

【 0 1 7 1 】

ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 1 領域を含み、B R S 2 領域および B R S 3 領域を含まない。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 2 領域を含み、B R S 1 領域および B R S 3 領域を含まない。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 3 領域を含み、B R S 1 領域および B R S 2 領域を含まない。

【 0 1 7 2 】

ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチド、例えば、構築物 D 1 2 中に含まれる改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 領域（天然または改変された B R S 1、B R S 2 および B R S 3）を含まない、例えば、3 つの B R S すべてが欠失されている。

20

【 0 1 7 3 】

ある特定の限定されない実施形態では、C A R は、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび改変された C D 3 ζ ポリペプチドを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（I T A M）のすべてまたは一部を欠き、I T A M は、I T A M 1、I T A M 2 および I T A M 3 である。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、I T A M 2 またはその部分を欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、I T A M 3 またはその部分をさらに欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、I T A M 1 またはその部分をさらに欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、I T A M 1 またはその部分を欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、I T A M 3 またはその部分をさらに欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、I T A M 3 またはその部分を欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、塩基性豊富ストレッチ（B R S）領域のすべてまたは一部を欠き、B R S 領域は、B R S 1、B R S 2 および B R S 3 である。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 2 またはその部分を欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 3 またはその部分をさらに欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 1 またはその部分をさらに欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 1 またはその部分を欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 3 またはその部分をさらに欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 3 またはその部分を欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 1 またはその部分を欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、B R S 2 またはその部分および B R S 3 またはその部分を欠く。ある特定の実施形態では、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、I T A M 2、I T A M 3、B R S 2 および B R S 3 を欠く。ある特定の実施形態では、C A R は、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび改変された C D 3 ζ ポリペプチドを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、改変された C D 3 ζ ポリペプチドは、塩基性豊富ストレッチ（B R S）領域のすべてまたは一部を欠き、B R S 領域は、B R S 1、B R S 2 および B R S 3 である。ある特定の実施形態では、C A R は、細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび改

30

40

50

変されたCD3 ζ ポリペプチドを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、改変されたCD3 ζ ポリペプチドは、BRS1バリエーション、BRS2バリエーションおよびBRS3バリエーションから選択されるBRSバリエーションを含み、BRSバリエーションは、1つまたは複数の機能欠失変異を含む。

【0174】

共刺激ドメイン

ある特定の限定されない実施形態では、CARの細胞内ドメインは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域をさらに含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、最適リンパ球活性化を提供し得る、少なくとも1つの共刺激分子またはその部分を含む。本明細書で使用される場合、「共刺激分子」とは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答にとって必要である、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子を指す。少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域は、CD28ポリペプチド（例えば、CD28の細胞内ドメインまたはその部分）、4-1BBポリペプチド（例えば、4-1BBの細胞内ドメインまたはその部分）、OX40ポリペプチド（例えば、OX40の細胞内ドメインまたはその部分）、ICOSポリペプチド（例えば、ICOSの細胞内ドメインまたはその部分）、DAP-10ポリペプチド（例えば、DAP-10の細胞内ドメインまたはその部分）またはそれらの組合せを挙げることができる。共刺激分子は、細胞表面に発現されるタンパク質である共刺激リガンドに結合でき、これは、その受容体への結合の際に、共刺激応答、すなわち、抗原がそのCAR分子に結合する場合に提供される刺激を引き起こす細胞内応答をもたらす。共刺激リガンドとして、それだけには限らないが、CD80、CD86、CD70、OX40L、4-1BBL、CD48、TNFRSF14およびPD-L1が挙げられる。一例として、4-1BBLリガンド（すなわち、4-1BBL）は、CARシグナルと組み合わせて、CAR⁺T細胞のエフェクター細胞機能を誘導する細胞内シグナルを提供するために4-1BB（「CD137」としても知られる）に結合し得る。4-1BB、ICOSまたはDAP-10を含む共刺激シグナル伝達領域を含む細胞内ドメインを含むCARが、その全体が参照により本明細書に組み込まれるU.S. 7, 446, 190に開示されている（例えば、U.S. 7, 446, 190では、4-1BBをコードするヌクレオチド配列は、配列番号15に示され、ICOSをコードするヌクレオチド配列は、配列番号16に示され、DAP-10をコードするヌクレオチド配列は、配列番号17に示されている）。ある特定の実施形態では、CARの細胞内ドメインは、CD28ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内ドメインは、2つの共刺激分子：CD28および4-1BBまたはCD28およびOX40を含む共刺激シグナル伝達領域を含む。

【0175】

4-1BBは、腫瘍壊死因子（TNF）リガンドとして作用し、刺激活性を有し得る。4-1BBポリペプチドは、NCBI参照番号P41273またはNP_001552を有する配列（配列番号44）またはその断片と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または100%相同である（例えば、同一である）、および／または必要に応じて、最大1つもしくは最大2つしくは最大3つの保守的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。

【0176】

配列番号44は、以下に提供される：

【化9】

```
1  MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
61  TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTIRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
241 CSCRFPEEEEE GGCEL [ 配列番号 44]
```

【0177】

本開示の主題に従って、「４－１ＢＢ核酸分子」とは、４－１ＢＢポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

【０１７８】

ＯＸ４０ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号Ｐ４３４８９またはＮＰ__００３３１８を有する配列（配列番号４５）またはその断片と少なくとも約８５％、約９０％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％または１００％相同である（例えば、同一である）、および／または必要に応じて、最大１つもしくは最大２つしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。

【０１７９】

配列番号４５は、以下に提供される：

【化１０】

```
1   MCVGARRLGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCECRPGN GMVSRCSRSQ
61  NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK
121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ
181 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL
241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI [ 配列番号 45]
```

【０１８０】

本開示の主題に従って、「ＯＸ４０核酸分子」とは、ＯＸ４０ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

【０１８１】

ＩＣＯＳポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号ＮＰ__０３６２２４を有する配列（配列番号４６）またはその断片と少なくとも約８５％、約９０％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％または１００％相同である（例えば、同一である）、および／または必要に応じて、最大１つしくは最大２つしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。

【０１８２】

配列番号４６は、以下に提供される：

【化１１】

```
1   MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGQ
61  ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFCN LSIFDPPPFK
121 VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY
181 MEMRAVNTAK KSRLTDVTL [ 配列番号 46]
```

【０１８３】

本開示の主題に従って、「ＩＣＯＳ核酸分子」とは、ＩＣＯＳポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

【０１８４】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ２８の細胞内ドメインまたはその部分を含む。ＣＤ２８ポリペプチドは、配列番号１５に示されるアミノ酸配列もしくはその断片と少なくとも約８５％、約９０％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％もしくは１００％相同である（例えば、同一である）、および／または、必要に応じて、最大１つしくは最大２つしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含み得る、または有し得る。限定されないある特定の実施形態では、ＣＤ２８ポリペプチドは、少なくとも２０または少なくとも３０または少なくとも４０または少なくとも５０および最大２２０個のアミノ酸長である配列番号１５の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらには、限定されない種々の実施形態では、ＣＤ２８ポリペプチドは、配列番号１５のアミノ酸１～２２０、１～５０、５０～１００、１００～１５

10

20

30

40

50

0、114～220、150～200または200～220のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号15のアミノ酸180～220のアミノ酸配列を含むか、または有するCD28ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む。

【0185】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、マウスCD28またはその部分の細胞内ドメインを含む。ある特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、NCBI参照番号NP_031668.3を有する配列（配列番号47）またはその断片と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは約100%相同である、および／または必要に応じて、最大1つもしくは最大2つもしくは最大3つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むか、または有する。限定されないある特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、少なくとも約20または少なくとも約30または少なくとも約40または少なくとも約50および最大218個のアミノ酸長である配列番号47の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらには、限定されない種々の実施形態では、CD28ポリペプチドは、配列番号47のアミノ酸1～218、1～50、50～100、100～150、114～220、150～200、178～218または200～220のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、本開示のCARの共刺激シグナル伝達領域は、配列番号47のアミノ酸178～218を含むか、または有するCD28ポリペプチドを含む。

【0186】

配列番号47、以下に提供される：

【化12】

```
1  MTLRLLEFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSL S CRYSYNLLAK EFRASLYKGV
61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FDNETVTFR L WNLHVNHTDI YFCKIEFMYF
121 PPYLDNERSN GTIIHIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV ALCVIWTNSR
181 RNRLQLSDYM NMTPRRPGLT RKPYQPYAPA RDEAAYRP [ 配列番号 47]
```

【0187】

本開示の主題に従って、「CD28核酸分子」とは、CD28ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。配列番号47）のアミノ酸178～218をコードする例示的ヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号48に示される。

【化13】

```
aat agtagaagga acagactcct tcaaagtgac tacatgaaca tgactccccg
gaggcctggg ctactcgaa agccttacca gccctacgcc cctgccagag actttgcagc
gtaccgcccc [ 配列番号 48]
```

【0188】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、マウスCD28の細胞内ドメインまたはその部分を含む。マウスCD28の細胞内ドメインは、配列番号49またはその断片と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは約100%相同である（例えば、同一である）、および／または必要に応じて、最大1つもしくは最大2つもしくは最大3つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含み得るか、または有し得る。配列番号49は、以下に提供される：NSRRNRLQLS DYMNMTPRRP GLTRKPYQPY APARDEAAYR P [配列番号49]

【0189】

配列番号49のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号50に示される。

```
AATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGGAGGCC
TGGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCAGAGACTTTGCAGCGTACC
```

GCCCC [配列番号 50]

【0190】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD28の細胞内ドメインまたはその部分を含む。ヒトCD28の細胞内ドメインは、配列番号51またはその断片と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは約100%相同である（例えば、同一である）、および／または必要に応じて、最大1つもしくは最大2つもしくは最大3つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含み得るか、または有し得る。配列番号51は、以下に提供される；

RSKRSRLLS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAAYR S [配列番号 51]

【0191】

配列番号51のアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、以下に提供される配列番号52に示される。

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC [配列番号 52]

【0192】

ある特定の実施形態では、異なるタンパク質に由来するCARのドメイン／モチーフ／領域間の変異部位および／または接合部が、脱免疫化される。異なるCAR部分の間の接合部の免疫原性は、NetMHC4.0サーバーを使用して予測され得る。次の部分からの少なくとも1つのアミノ酸を含有する各ペプチドについて、HLA A、BおよびCに対する結合親和性をすべての対立遺伝子について予測できる。各ペプチドについて各ペプチドの免疫原性のスコアを割り当てることができる。免疫原性スコアは、式 免疫原性スコア = [(50 - 結合親和性) * HLA 頻度]ⁿ を使用して算出できる。nは、各ペプチドの予測数である。

【0193】

ある特定の実施形態では、CARは、ヒトシアリルルイスAに特異的に結合するヒトscFvを含む細胞外抗原結合性領域、CD28ポリペプチド、CD8ポリペプチドまたはCD166ポリペプチドを含む膜貫通ドメインならびに野生型または改変されたCD3ζポリペプチドおよびCD28ポリペプチドまたは4-1BBポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む細胞内ドメインを含む。CARはまた、細胞外抗原結合性ドメインの5'末端に共有結合によって繋がれたシグナルペプチドまたはリーダーも含む。シグナルペプチドは、配列番号13に示される配列を有するアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、ヒトscFvは、scFv 5B1であり、その可変領域配列は、表1に提供される。

【0194】

一部の実施形態では、本開示の主題のCARは、ヒト細胞において核酸配列を発現するための誘導性プロモーターをさらに含む。CAR遺伝子の発現において使用するためのプロモーターは、構成的プロモーター、例えば、ユビキチンC (Ub i C) プロモーターであり得る。

【0195】

本開示の主題はまた、本明細書において記載されるシアリルルイスA標的化CARまたはその機能的部分をコードする核酸分子を提供する。ある特定の実施形態では、核酸分子は、ヒトシアリルルイスAに特異的に結合するヒトscFvを含む本開示のシアリルルイスA標的化CAR、CD28ポリペプチド、CD8ポリペプチドまたはCD166ポリペプチドを含む膜貫通ドメインならびに野生型または改変されたCD3ζポリペプチドおよびCD28ポリペプチドまたは4-1BBポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む細胞内ドメインをコードする。

【0196】

ある特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および重鎖可変領域と

10

20

30

40

50

軽鎖可変領域の間に位置する配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を有するリンカーを含むヒト scFv を含むシアリルルイス A 標的化 CAR、CD28 ポリペプチド、CD8 ポリペプチドまたは CD166 ポリペプチドを含む膜貫通ドメインならびに野生型または改変された CD3 ζ ポリペプチドおよび CD28 ポリペプチドまたは 4-1BB ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む細胞内ドメインをコードする。

【0197】

ある特定の実施形態では、核酸分子は、本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR の機能的部分をコードする。本明細書で使用される場合、「機能的部分」という用語は、シアリルルイス A 標的化 CAR（親 CAR）の生物活性を保持する、本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR の任意の部分、一部または断片を指す。例えば、機能的部分は、親 CAR と同様、同一またはさらにはそれよりも高い程度に、標的細胞を認識する、疾患を処置する能力を保持する、本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR の部分、一部または断片を包含する。ある特定の実施形態では、本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR の機能的部分をコードする単離核酸分子は、親 CAR の例えば、約 10%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90% および約 95% またはそれより多くを含むタンパク質をコードし得る。

【0198】

V. 免疫応答性細胞

本開示の主題は、本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR を含む細胞および悪性成長を処置するために、例えば、がん、例えば膵臓がんを処置するためにこのような細胞を使用する方法を提供する。例えば、一部の実施形態では、本明細書において開示されるシアリルルイス A を認識するキメラ抗原受容体を含む T 細胞が、本明細書において提供される。このような細胞は、腫瘍、例えば、固形腫瘍、例えば、膵臓がんの悪性成長を処置および／または防止するためにそれを必要とするヒト対象に投与される。

【0199】

一部の実施形態では、本明細書において記載される CAR は、当業者に公知の適当な手段によって免疫応答性細胞に送達され得る。例えば、一部の実施形態では、本明細書において記載される CAR は、ベクターまたは他の送達ビヒクルによって免疫応答性細胞に送達され得る。一部の実施形態では、本明細書において記載される CAR は、RNA（例えば、mRNA）構築物の形態で免疫応答性細胞に送達され得る。一部の実施形態では、免疫応答性細胞は、細胞が CAR を発現するように、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター）によって本開示の CAR を用いて形質導入され得る。本開示の主題はまた、腫瘍または固形腫瘍、例えば、膵臓がんの処置のためにこのような細胞を使用する方法も提供する。

【0200】

本開示の主題の免疫応答性細胞は、リンパ系列の細胞であり得る。B、T およびナチュラルキラー（NK）細胞を含むリンパ系列は、抗体の生成、細胞性免疫系の調節、血液中の外来物質の検出、宿主に対して外来である細胞の検出などを提供する。リンパ系列の免疫応答性細胞の限定されない例として、T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、胚性幹細胞および多能性幹細胞（例えば、リンパ球様細胞がそれから分化し得るもの）が挙げられる。T 細胞は、胸腺において成熟し、細胞媒介性免疫に主に関与するリンパ球であり得る。T 細胞は、適応免疫系に関与している。本開示の主題の T 細胞は、それだけには限らないが、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、記憶 T 細胞（セントラルメモリー T 細胞、幹細胞様記憶 T 細胞（または幹様記憶 T 細胞）および 2 種類のエフェクター記憶 T 細胞：例えば、T_{EM} 細胞および T_{EMRA} 細胞、制御性 T 細胞（サプレッサー T 細胞としても知られる）、ナチュラルキラー T 細胞、粘膜関連インバリアント T 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞を含む T 細胞の任意の種類であり得る。細胞傷害性 T 細胞（CTL またはキラー T 細胞）は、感染体細胞または腫瘍細胞の死を誘導可能な T リンパ球のサブセットである。患者自身の T 細胞が、本明細書において開示される任意のポリペプチドまたはシステムの導入によ

10

20

30

40

50

って特定の抗原を標的とするように遺伝子改変され得る。T細胞は、CD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞であり得る。ある特定の実施形態では、T細胞は、CD4⁺T細胞である。ある特定の実施形態では、T細胞は、CD8⁺T細胞である。

【0201】

ある特定の実施形態では、CARを発現するT細胞は、Foxp3を発現して、T制御性表現型を達成および維持する。

【0202】

ある特定の実施形態では、細胞は、ナチュラルキラー細胞である。ナチュラルキラー（NK）細胞は、細胞媒介性免疫の一部であり、自然免疫応答の際に作用するリンパ球であり得る。NK細胞は、標的細胞に対するその細胞傷害性効果を発揮するために事前の活性化を必要としない。

【0203】

本開示の主題の免疫応答性細胞は、がん、例えば、膵臓がんの処置のための、シアリルルイスA（例えば、ヒトシアリルルイスA）に特異的に結合する細胞外抗原結合性ドメイン（例えば、ヒトscFV、必要に応じて架橋されるFabまたはF(ab)₂）を発現し得る。このような免疫応答性細胞は、がんの処置のためにそれを必要とする対象（例えば、ヒト対象）に投与され得る。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、T細胞である。T細胞は、CD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞であり得る。ある特定の実施形態では、T細胞は、CD4⁺T細胞である。ある特定の実施形態では、T細胞は、CD8⁺T細胞である。

【0204】

本開示の免疫応答性細胞は、少なくとも1つの組換えまたは外因性共刺激リガンドをさらに含み得る。例えば、本開示の免疫応答性細胞は、免疫応答性細胞が、シアリルルイスA標的化CARおよび少なくとも1つの共刺激リガンドを共発現するように、または共発現するように誘導されるように、少なくとも1つの共刺激リガンドを用いてさらに形質導入され得る。シアリルルイスA標的化CARと少なくとも1つの共刺激リガンドとの間の相互作用は、免疫応答性細胞（例えば、T細胞）の完全活性化にとって重要な非抗原特異的シグナルを提供する。共刺激リガンドとして、それだけには限らないが、腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリーおよび免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーリガンドのメンバーが挙げられる。TNFは、全身炎症に関与するサイトカインであり、急性期反応を刺激する。その主な役割は、免疫細胞の調節にある。TNFスーパーファミリーのメンバーは、いくつかの共通の特徴を共有する。TNFスーパーファミリーメンバーの大部分は、短い細胞質セグメントおよび比較的長い細胞外領域を含有するII型膜貫通タンパク質（細胞外C末端）として合成される。TNFスーパーファミリーメンバーとして、限定するものではないが、神経成長因子（NGF）、CD40L（CD40L）／CD154、CD137L／4-1BBL、TNF-α、CD134L／OX40L／CD252、CD27L／CD70、Fasリガンド（FasL）、CD30L／CD153、腫瘍壊死因子ベータ（TNFβ）／リンホトキシン-α（LTα）、リンホトキシン-β（LTβ）、CD257／B細胞活性化因子（BAFF）／Blys／THANK／Tall-1、グルココルチコイド誘導性TNF受容体リガンド（GITRL）およびTNF関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL）、LIGHT（TNFSF14）が挙げられる。免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーは、細胞の認識、結合または接着プロセスに関与する細胞表面および可溶性タンパク質の大きな群である。これらのタンパク質は、免疫グロブリンと構造的特徴を共有する—それらは免疫グロブリンドメイン（フォールド）を有する。免疫グロブリンスーパーファミリーリガンドとして、それだけには限らないが、両方ともCD28のリガンドであるCD80およびCD86、PD-1のリガンドであるPD-L1／（B7-H1）が挙げられる。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激リガンドは、4-1BBL、CD80、CD86、CD70、OX40L、CD48、TNFRSF14、PD-L1およびそれらの組合せからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、4-1BBLである1

10

20

30

40

50

つの組換え共刺激リガンドを含む。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、4-1 BBLおよびCD80である2つの組換え共刺激リガンドを含む。CARおよび少なくとも1つの組換え共刺激リガンドを含む免疫応答性細胞は、米国特許第8,389,282号および米国特許公開番号第2016/0045551号に記載されており、その両方ともその全体が参照により組み込まれる。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、本開示のシアリルルイスA標的化CARおよび組換えサイトカイン（例えば、IL-12）を含む。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、本開示のシアリルルイスA標的化CARおよび組換えCD40Lポリペプチドを含む。

【0205】

さらに、本開示の免疫応答性細胞は、少なくとも1つの外因性サイトカインをさらに含み得る。例えば、本開示の免疫応答性細胞は、免疫応答性細胞が、少なくとも1つのサイトカインを分泌し、ならびにシアリルルイスA標的化CARを発現するように、少なくとも1つのサイトカインでさらに形質導入され得る。ある特定の実施形態では、少なくとも1つのサイトカインは、IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17およびIL-21からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、サイトカインは、IL-12である。

【0206】

末梢ドナーリンパ球において使用され得るシアリルルイスA特異的またはシアリルルイスA標的化ヒトリンパ球、例えば、Sadelain, M., et al. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45に開示されるもの（CARを発現するように遺伝子改変された末梢ドナーリンパ球を開示する）、Morgan, R.A., et al. 2006 Science 314:126-129に開示されるもの（ α および β ヘテロ二量体を含む全長腫瘍抗原認識性T細胞受容体複合体を発現するように遺伝子改変された末梢ドナーリンパ球を開示する）、Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:495-504、Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:4382-4392に開示されるもの（腫瘍生検における腫瘍浸潤リンパ球（TIL）に由来するリンパ球培養物を開示する）およびDupont, J., et al. 2005 Cancer Res 65:5417-5427、Papanicolaou, G.A., et al. 2003 Blood 102:2498-2505に開示されるもの（人工抗原提示細胞（AAPC）またはパルス樹状細胞を使用する選択的に *in vitro* 増大した（expanded）抗原特異的末梢血白血球を開示する）。免疫応答性細胞（例えば、T細胞）は、自己、非自己（例えば、同種異系の）である場合も、操作された前駆体もしくは幹細胞から *in vitro* で誘導される場合もある。

【0207】

ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答性細胞（例えば、T細胞）は、約1～約5、約1～約4、約2～約5、約2～約4、約3～約5、約3～約4、約4～約5、約1～約2、約2～約3、約3～約4または約4～約5のベクターコピー数／本開示のシアリルルイスA標的化CARの細胞を発現する。

【0208】

さらに、免疫応答性細胞は、シアリルルイスA（例えば、ヒトシアリルルイスA）とは異なる第2の抗原に結合する抗原認識性受容体を含み、発現し得る（例えば、天然に発現する、または発現するように改変される）。免疫応答性細胞上に本開示のCARに加えて抗原認識性受容体を含むことによって、CARまたは標的とした細胞上にそれを含む免疫応答性細胞のアビディティが増加し得る、特に、CARは、シアリルルイスA（例えば、ヒトシアリルルイスA）に対して低い結合親和性、例えば、約 2×10^{-8} Mもしくはそれより大きい、約 5×10^{-8} Mもしくはそれより大きい、約 8×10^{-8} Mもしくはそれより大きい、約 9×10^{-8} Mもしくはそれより大きい、約 1×10^{-7} Mもしくはそれより大きい、約 2×10^{-7} Mもしくはそれより大きい、または約 5×10^{-7} Mもしくはそれより大きい K_D を有するものである。

【0209】

ある特定の実施形態では、抗原認識性受容体は、キメラ共刺激受容体（CCR）である。本明細書で使用される場合、「キメラ共刺激受容体」または「CCR」という用語は、

抗原と結合し、共刺激シグナルを提供するが、T細胞活性化シグナルを提供しないキメラ受容体を指す。CCRは、Krause, et al., J. Exp. Med. (1998);188(4):619-626およびUS20020018783に記載されており、それらの内容は、その全体が参照により組み込まれる。CCRは、共刺激シグナルを模倣するが、CARとは異なり、T細胞活性化シグナルを提供しない、例えば、CCRは、CD3ζポリペプチドを欠く。CCRは、抗原提示細胞上の天然共刺激リガンドの不在下で、共刺激、例えば、CD28様シグナルを提供する。コンビナトリアル抗原認識、すなわち、CARと組み合わせたCCRの使用は、二重抗原発現T細胞に対するT細胞反応性を増強し、それによって、選択的腫瘍標的化を改善できる。Kloss et al.は、コンビナトリアル抗原認識、分割シグナル伝達および重要なことに、T細胞活性化と共刺激のバランスのとれた力を統合して、各抗原を個々に発現する細胞を温存しながら、抗原の組合せを発現する標的細胞を排除するT細胞を生成する戦略を記載している(Kloss et al., Nature Biotechnology (2013); 31(1):71-75、その内容はその全体が参照により組み込まれる)。このアプローチを用いる場合、T細胞活性化は、ある抗原(例えば、シアリルルイスA)のCARによって媒介される認識を必要とするが、共刺激は、第2の抗原に特異的なCCRによって独立に媒介される。腫瘍選択性を達成するために、コンビナトリアル抗原認識アプローチは、T細胞活性化の効率を、第2の抗原の同時CCR認識によって提供されるレスキューなしには無効であるレベルに減少させる。ある特定の実施形態では、CCRは、シアリルルイスAとは異なる抗原に結合する細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインならびにそれだけに限らないが、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、CTLA-4、LAG-3、2B4およびBTLAを含む少なくとも1つの共刺激分子を含む共刺激シグナル伝達領域を含む。ある特定の実施形態では、CCRの共刺激シグナル伝達領域は、1つの共刺激シグナル伝達分子を含む。ある特定の実施形態では、1つの共刺激シグナル伝達分子は、CD28である。ある特定の実施形態では、1つの共刺激シグナル伝達分子は、4-1BBである。ある特定の実施形態では、CCRの共刺激シグナル伝達領域は、2つの共刺激シグナル伝達分子を含む。ある特定の実施形態では、2つの共刺激シグナル伝達分子は、CD28および4-1BBである。第2の抗原は、シアリルルイスAおよび第2の抗原両方の発現が標的とした細胞(例えば、がん性組織またはがん性細胞)に制限されるように選択される。CARと同様に、細胞外抗原結合性ドメインは、scFv、Fab、F(ab)₂または細胞外抗原結合性ドメインを形成する異種配列との融合タンパク質であり得る。ある特定の実施形態では、CCRは、膵臓がん特異的抗原に結合する。

【0210】

ある特定の実施形態では、抗原認識性受容体は、切断型CARである。「切断型CAR」は、細胞内シグナル伝達ドメインを欠くことでCARとは異なる。例えば、切断型CARは、細胞外抗原結合性ドメインおよび膜貫通ドメインを含み、細胞内シグナル伝達ドメインを欠く。本開示の主題に従って、切断型CARは、標的とした細胞(例えば、膵臓がん細胞)で発現される第2の抗原、例えば、膵臓がん特異的抗原に対して高い結合親和性を有する。切断型CARは、本開示のCAR、特に、シアリルルイスAに対して低い結合親和性を有するCARのアビディティを増強し、それによって本開示のCARまたはそれを含む免疫応答性細胞(例えば、T細胞)の有効性を改善する接着分子として機能する。ある特定の実施形態では、本開示のT細胞は、シアリルルイスAを標的とする本開示のCARおよび膵臓がん特異的抗原を標的とする切断型CARを含むか、またはそれを発現するように形質導入される。

【0211】

VI. 核酸組成物およびベクター

本開示の主題は、本明細書において開示されるCARをコードするポリヌクレオチドを含む核酸組成物を提供する。またこのような核酸組成物を含む細胞も提供される。

【0212】

免疫応答性細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の遺伝子改変は、CARをコードする組換えDNAまたはRNA構築物を実質的に均一な細胞組成の標的細胞へと送達することに

よって達成され得る。一部の実施形態では、このような組換えDNAまたはRNA構築物は、ベクターを使用して免疫応答性細胞中に送達され得る。一部の実施形態では、このようなベクターは、DNAまたはRNA構築物の宿主細胞ゲノムへの導入のために使用されるレトロウイルスベクター（例えば、ガンマレトロウイルスの）であり得る。例えば、シアリルルイスA標的化CARをコードするポリヌクレオチドを、レトロウイルスベクター中にクローニングでき、発現を、その内因性プロモーターから、レトロウイルスの長鎖末端反復配列から、または代替内部プロモーターから駆動できる。

【0213】

非ウイルスベクターまたはRNAも同様に使用され得る。ランダムな染色体の組込みまたは標的化された組込み（例えば、ヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を使用する、および／またはクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）または導入遺伝子発現（例えば、天然または化学的に改変されたRNAを使用する）が使用され得る。

【0214】

シアリルルイスA標的化CARを発現する細胞を提供するための細胞の最初の遺伝子改変のためには、一般に、レトロウイルスベクターが、形質導入のために使用されるが、任意の他の適したウイルスベクターまたは非ウイルス送達系も使用され得る。少なくとも2つの共刺激リガンドを含む複合体を提示する抗原を含む細胞を提供するための細胞のその後の遺伝子改変のためには、レトロウイルス遺伝子導入（形質導入）が同様に有効であることが判明する。カプシドタンパク質がヒト細胞に感染するために機能的である場合には、レトロウイルスベクターと適当なパッケージングラインの組合せも適している。それだけには限らないが、PA12 (Miller, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437)、PA317 (Miller, et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902)、およびCRIP (Danos, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464) を含む種々の両種指向性ウイルス生成細胞系が公知である。非両種指向性粒子、例えば、VSVG、RD114またはGALVエンベロープでシュードタイプ化された粒子および当技術分野で公知の任意の他のものも適している。

【0215】

可能性ある形質導入の方法にはまた、例えば、Bregni, et al. (1992) Blood 80:1418-1422の方法による細胞とプロデューサー細胞の直接共培養、または例えば、Xu, et al. (1994) Exp. Hemat. 22:223-230、およびHughes, et al. (1992) J. Clin. Invest. 89:1817の方法によるウイルス上清単独もしくは適当な成長因子およびポリカチオンを伴う、もしくは伴わない濃縮ベクターストックとともに培養することも含まれる。

【0216】

免疫応答性細胞において共刺激リガンドを発現および／またはサイトカイン（例えば、4-1BBおよび／またはIL-12）を分泌するために、形質導入ウイルスベクターが使用され得る。好ましくは、選択されたベクターは、高い感染効率および安定な組込みおよび発現を示す（例えば、Cayouette et al., Human Gene Therapy 8:423-430, 1997、Kido et al., Current Eye Research 15:833-844, 1996、Bloomer et al., Journal of Virology 71:6641-6649, 1997、Naldini et al., Science 272:263-267, 1996、およびMiyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997を参照されたい）。使用できる他のウイルスベクターとして、例えば、アデノウイルス、レンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルス、ウシ乳頭腫ウイルスまたはヘルペスウイルス、例えば、エプスタインバーウイルス（例えば、Miller, Human Gene Therapy 15:14, 1990、Friedman, Science 244:1275-1281, 1989、Eglitis et al., BioTechniques 6:608-614, 1988、Tolstoshev et al., Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990、Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991、Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987、Anderson, Science 226:401-409, 1984、Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991、Miller et al., Bio

10

20

30

40

50

technology 7:980-990, 1989、Le Gal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993、およびJohnson, Chest 107:77S- 83S, 1995のベクターも参照されたい)が挙げられる。レトロウイルスベクターは、特に十分に開発されており、臨床実践場面において使用されてきた(Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990、Anderson et al., 米国特許第5, 399, 346号)。

【0217】

ある特定の限定されない実施形態では、本開示のシアリルルイスA標的化CARを発現するベクターは、レトロウイルスベクター、例えば、オンコレトロウイルスベクターである。

【0218】

細胞におけるタンパク質の発現のために非ウイルスアプローチも使用され得る。例えば、核酸分子は、リポフェクション(Feigner et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S. A. 84:7413, 1987、Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990、Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989、Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983)、アジアロオロソムコイドーポリリシンコンジュゲーション(Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988、Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989)の存在下で核酸を投与することによって、または外科的条件下でのマイクロインジェクションによって(Wolff et al., Science 247:1465, 1990)細胞中に導入され得る。遺伝子導入のための他の非ウイルス手段として、リン酸カルシウムを使用する*in vitro*でのトランスフェクション、DEAEデキストラン、電気穿孔およびプロトプラスト融合が挙げられる。リポソームも、細胞へのDNAの送達にとって潜在的に有益であり得る。正常遺伝子の対象の罹患組織への移植はまた、正常核酸を*ex vivo*の培養可能な細胞型(例えば、自己または異種一次細胞またはその後代)へ移入し、その後、細胞(またはその子孫)を標的とした組織へと注射するか、または全身に注射することによって達成され得る。組換え受容体はまた、トランスポサゼまたは標的化ヌクレアーゼ(例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼまたはTALEヌクレアーゼ)を使用して誘導するか、または得ることができる。一過性の発現は、RNA電気穿孔によって得ることができる。

【0219】

ポリヌクレオチド療法の方法において使用するためのcDNA発現は、任意の適したプロモーター(例えば、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)、サルウイルス40(SV40)またはメタロチオネインプロモーター)から指示され、任意の適当な哺乳動物調節エレメントまたはイントロン(例えば、伸長因子1 α エンハンサー／プロモーター／イントロン構造)によって調節され得る。例えば、必要に応じて、核酸の発現を指示するために、特定の細胞型における遺伝子発現を選択的に指示することが知られているエンハンサーが使用され得る。使用されるエンハンサーとして、限定するものではないが、組織—または細胞—特異的エンハンサーとして特徴付けられるものを挙げることができる。あるいは、治療用構築物としてゲノムクローンが使用される場合には、調節は、同族調節配列によって、必要に応じて、上記のプロモーターまたは調節エレメントのいずれかを含む異種供給源に由来する調節配列によって媒介され得る。得られた細胞は、未改変細胞のものと同様の条件下で成長させることができ、それによって改変された細胞を増大させ、様々な目的のために使用できる。

【0220】

VII. 免疫応答性細胞へのゲノム組込み

ある特定の実施形態では、本開示のシアリルルイスA標的化CARは、免疫応答性細胞のゲノムの選択された遺伝子座へと組み込まれ得る。免疫応答性細胞のゲノムの選択された遺伝子座中にCARを組み込むために、任意の標的化ゲノム編集法が使用され得る。ある特定の実施形態では、本開示のシアリルルイスA標的化CARの発現は、遺伝子座内またはその付近の内因性プロモーター／エンハンサーによって駆動される。ある特定の実施

10

20

30

40

50

形態では、本開示のシアリルルイスA標的化CARの発現は、遺伝子座へと組み込まれた外因性プロモーターによって駆動される。本開示のシアリルルイスA標的化CARが組み込まれる遺伝子座は、遺伝子座内の遺伝子の発現レベルおよび遺伝子座内の遺伝子の遺伝子発現のタイミングに基づいて選択される。発現レベルおよびタイミングは、細胞分化の異なる段階およびマイトジェン／サイトカイン微小環境下で変わる場合があり、これらは、選択を行う場合に考慮されるべき要因の一つである。

【0221】

ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞のゲノムの選択された遺伝子座中に本開示のシアリルルイスA標的化CARを組み込むために、CRISPRシステムが使用される。クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）システムは、原核細胞において発見されたゲノム編集ツールである。ゲノム編集のために使用される場合には、このシステムは、Cas9（crRNAをそのガイドとして利用してDNAを改変可能なタンパク質）、CRISPR RNA（crRNAは、宿主DNAの修正セクションへそれをガイドするCas9によって使用されるRNAを、Cas9と活性複合体を形成するtracrRNAに結合する領域（一般に、ヘアピンループ形態で）とともに含有する）、トランス活性化crRNA（tracrRNAは、crRNAに結合し、Cas9と活性複合体を形成する）およびDNA修復鋳型の最適セクション（特定のDNA配列の挿入を可能にする細胞性修復プロセスをガイドするDNA）を含む。CRISPR／Cas9は、プラスミドを標的細胞にトランスフェクトするために使用することが多い。crRNAは、細胞において標的DNAを同定し、直接結合するためにCas9が使用する配列であるので、各適用のために設計される必要がある。CAR発現カセットを保持する修復鋳型も、切断のいずれかの側の配列と重複しなくてはならず、挿入配列をコードするので、各適用のために設計される必要がある。複数のcrRNAおよびtracrRNAは、一緒にパッケージングされて、単一ガイドRNA（sgRNA）を形成し得る。このsgRNAを、Cas9遺伝子と一緒に結合させ、プラスミドへと作製して、細胞にトランスフェクトすることができる。CRISPRシステムを使用する方法は、例えば、WO2014093661A2、WO2015123339A1およびWO2015089354A1に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0222】

ある特定の実施形態では、亜鉛フィンガーヌクレアーゼを使用して、本開示のシアリルルイスA標的化CARを免疫応答性細胞のゲノムの選択された遺伝子座中に組み込む。亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、人工制限酵素であり、亜鉛フィンガーDNA結合ドメインを、DNA切断ドメインと組み合わせることによって生成される。亜鉛フィンガードメインを、特異的DNA配列を標的とするように操作することができ、これによって、亜鉛フィンガーヌクレアーゼがゲノム内の所望の配列を標的とすることが可能になる。個々のZFNのDNA結合ドメインは、通常、複数の個々の亜鉛フィンガーリピートを含有し、複数の塩基対を各々認識できる。新規亜鉛フィンガードメインを生成する最も一般的な方法は、公知の特異性のより小さい亜鉛フィンガー「モジュール」を組み合わせることである。ZFN中の最も一般的な切断ドメインは、IIs型制限エンドヌクレアーゼFokI由来の非特異的切断ドメインである。内因性相同組換え（HR）機構およびCAR発現カセットを保持する相同DNA鋳型を使用し、ZFNを使用してCAR発現カセットをゲノム中に挿入することができる。標的とした配列が、ZFNによって切断された場合に、HR機構が、損傷を受けた染色体と相同DNA鋳型の間の相同性について探索し、次いで、染色体の2つの破壊された末端の間の鋳型の配列をコピーし、それによって相同DNA鋳型がゲノム中に組み込まれる。ZFNシステムを使用する方法は、例えば、WO2009146179A1、WO2008060510A2およびCN102174576Aに記載されており、それらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0223】

ある特定の実施形態では、TALENシステムを使用して、免疫応答性細胞のゲノムの選択された遺伝子座中に本開示のシアリルルイスA標的化CARを組み込む。転写活性化

因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) は、DNA の特定の配列を切断するように操作され得る制限酵素である。TALEN システムは、ZFN とほとんど同一の原理で作動する。それらは、転写活性化因子様エフェクター DNA 結合ドメインを、DNA 切断ドメインと組み合わせることによって生成する。転写活性化因子様エフェクター (TALE) は、特定のヌクレオチドに対する強力な認識を有する 2 つの可変位置を有する 33 ~ 34 個のアミノ酸反復モチーフから構成される。これらの TALE のアレイをアSEMBL することによって、TALE DNA 結合ドメインは、所望の DNA 配列に結合し、それによって、ヌクレアーゼをガイドして、ゲノム中の特定の位置で切断するように操作され得る。TALEN システムを使用する方法は、例えば、WO2014134412 A1、WO2013163628 A2 および WO2014040370 A1 に記載されており、それらは、その全体が参照により組み込まれる。ゲノム編集物質を送達する方法は、必要に応じて変わり得る。ある特定の実施形態では、選択されたゲノム編集方法の構成成分は、1 つまたは複数のプラスミド中の DNA 構築物として送達される。ある特定の実施形態では、構成成分はウイルスベクターを介して送達される。一般的な送達方法として、それだけには限らないが、電気穿孔、マイクロインジェクション、遺伝子銃、インペールフェクション (impalefection)、静水圧、連続注入、超音波処理、マグネトフェクション、アデノ随伴ウイルス、ウイルスベクターのエンベロープタンパク質シュールドタイピング、複製コンピテントベクターシスおよびトランス作用性エレメント、単純ヘルペスウイルスおよび化学的ビヒクル (例えば、オリゴヌクレオチド、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、デンドリマー、無機ナノ粒子および細胞透過性ペプチド) が挙げられる。

【0224】

改変は、選択された遺伝子座内のどの場所でも、または組み込まれたシアリルルイス A 標的化 CAR の遺伝子発現に影響を及ぼし得るどの場所でも行われ得る。ある特定の実施形態では、改変は、組み込まれたシアリルルイス A 標的化 CAR の転写開始部位の上流に導入される。ある特定の実施形態では、改変は、組み込まれたシアリルルイス A 標的化 CAR の転写開始部位とタンパク質コーディング領域の間に導入される。ある特定の実施形態では、改変は、組み込まれた本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR のタンパク質コーディング領域の下流に導入される。

【0225】

VIII. ポリペプチドおよびアナログおよびポリヌクレオチド

シアリルルイス A (例えば、scFv (例えば、ヒト scFv)、Fab または (Fab)₂)、CD3ζ、CD8、CD28 などに特異的に結合する細胞外抗原結合性ドメインも、本開示の主題に含まれる。ポリペプチドまたはその断片およびそれをコードするポリヌクレオチドは、免疫応答性細胞において発現された場合にその抗腫瘍活性を増強する方法で改変される。本開示の主題は、配列中に変更をもたらすことによってアミノ酸配列または核酸配列を最適化する方法を提供する。このような変更は、ある特定の変異、欠失、挿入または翻訳後改変を含み得る。本開示の主題は、本開示の主題の任意の天然に存在するポリペプチドのアナログをさらに含む。アナログは、アミノ酸配列相違によって、翻訳後改変によって、または両方によって本開示の主題の天然に存在するポリペプチドから異なり得る。本開示の主題のアナログは、一般に、本開示の主題の天然に存在するアミノ酸配列のすべてまたは一部と少なくとも約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99% またはそれよりも多い同一性または相同性を示し得る。配列比較の長さは、少なくとも約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 50、約 75、約 100 またはそれよりも多いアミノ酸残基である。再度、同一性の程度を決定する例示的アプローチでは、BLAST プログラムが使用されてもよく、 e^{-3} から e^{-100} の間の確率スコアは密接に関連する配列を示す。改変は、ポリペプチドの *in vivo* および *in vitro* 化学的誘導体化、例えば、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化またはグリコシル化を含み、このような改変は、単離された改変酵素を用いてポリペプチド合成またはプロセッシングまたは以下の処置の間に生

じ得る。アナログはまた、一次配列の変更によって本開示の主題の天然に存在するポリペプチドから異なり得る。これらとして、天然および誘導された両方の遺伝的バリエーション（例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), CSH Press, 1989またはAusubel et al、上記に記載されるような、照射またはエタンメチルスルフェートに対する曝露によるランダム変異誘発に起因する、または部位特異的変異誘発による）。また、L-アミノ酸（L-amino acid）以外の残基、例えば、D-アミノ酸または天然に存在しないまたは合成アミノ酸、例えば、ベータ（ β ）またはガンマ（ γ ）アミノ酸を含有する環化ペプチド、分子およびアナログも含まれる。

【0226】

全長ポリペプチドに加えて、本開示の主題はまた、本開示の主題のポリペプチドまたはペプチドドメインのいずれか1つの断片を提供する。断片は、少なくとも約5、約10、約13または約15個のアミノ酸であり得る。一部の実施形態では、断片は、少なくとも約20個の連続アミノ酸、少なくとも約30個の連続アミノ酸または少なくとも約50個の連続アミノ酸である。一部の実施形態では、断片は、少なくとも約60〜約80、約100、約200、約300またはそれより多い連続アミノ酸である。本開示の主題の断片は、当業者に公知の方法によって生成できる、または正常タンパク質プロセッシング（例えば、生物活性にとって必要ではない新生ポリペプチドからのアミノ酸の除去または選択的mRNAスプライシングもしくは選択的タンパク質プロセッシング事象によるアミノ酸の除去）に起因し得る。

【0227】

非タンパク質アナログは、本発明のタンパク質の機能活性を模倣するように設計された化学構造を有する。このようなアナログは、本開示の主題の方法に従って投与される。このようなアナログは、元のポリペプチドの生理学的活性を超える場合がある。アナログ設計の方法は、当技術分野で周知であり、アナログの合成は、化学構造を改変することによってこのような方法に従って実施でき、その結果、得られたアナログは、免疫応答性細胞において発現されると元のポリペプチドの抗生物活性を増加させる。これらの化学的改変として、それだけには限らないが、代替R基を置換することおよび参照ポリペプチドの特定の炭素原子で飽和度を変えることが挙げられる。タンパク質アナログは、in vivo分解に対して比較的耐性であり得、投与の際により長期の治療効果をもたらす。機能活性を測定するアッセイとして、それだけには限らないが、以下の実施例において記載されるものが挙げられる。

【0228】

本開示の主題に従って、シアリルルイスA（例えば、ヒトシアリルルイスA）（例えば、s c F v（例えば、ヒトs c F v）、F a bまたは（F a b）₂）、C D 3 ζ、C D 8、C D 2 8）に特異的に結合する細胞外抗原結合性ドメインをコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化によって改変され得る。コドン最適化により天然に存在するおよび組換え遺伝子配列の両方を変更して、任意の所与の発現系において考えられる最高レベルの生産性を達成することができる。タンパク質発現の異なる段階に因する因子として、転写および翻訳におけるコドン適応性、mRNA構造ならびに種々のシスエレメントが挙げられる。本開示の主題のポリヌクレオチドを改変するために、それだけには限らないが、OptimumGene（商標）、Encor最適化およびBlue Heronを含む当業者に公知である任意の適したコドン最適化法または技術が使用され得る。

【0229】

IX. 投与

本開示の主題のシアリルルイスA標的化CARおよびそれを含む免疫応答性細胞は、新生物の処置または防止のために全身的に、または直接的に対象に提供されてもよい。ある特定の形態では、シアリルルイスA標的化CARおよびそれを含む免疫応答性細胞は、目的の臓器（例えば、新生物に冒された臓器）中に直接的に注射される。あるいはまたはさらに、シアリルルイスA標的化CARおよびそれを含む免疫応答性細胞は、例えば、

循環系（例えば、腫瘍脈管構造）への投与によって目的の臓器に間接的に提供される。 *in vitro* または *in vivo* での T 細胞の生成を増加させるために、細胞および組成物の投与の前、その間またはその後に、増大および分化剤（*expansion and differentiation agent*）が提供され得る。

【0230】

本開示の主題のシアリルルイス A 標的化 CAR およびそれを含む免疫応答性細胞は、任意の生理学的に許容されるビヒクル中で、普通、血管内に投与され得るが、それらはまた、骨または細胞が再生および分化に適当な部位を見出し得る他の好都合な部位（例えば、胸腺）に導入されてもよい。ある特定の実施形態では、少なくとも 1×10^5 個の細胞が投与されてもよく、最終的に 1×10^{10} 個またはそれより多くの細胞に達する。ある特定の実施形態では、少なくとも 1×10^6 個の細胞が投与され得る。本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR を含む免疫応答性細胞を含む細胞集団は、細胞の精製された集団を含み得る。当業者ならば、種々の周知の方法、例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）を使用して細胞集団中の免疫応答性細胞のパーセンテージを容易に決定できる。本開示の抗シアリルルイス A 特異的 CAR を含む免疫応答性細胞を含む細胞集団における純度の範囲は、約 50%～約 55%、約 55%～約 60%、約 65%～約 70%、約 70%～約 75%、約 75%～約 80%、約 80%～約 85%、約 85%～約 90%、約 90%～約 95% または 約 95%～約 100% であり得る。投与量は、当業者によって容易に調整され得る（例えば、純度の低下は、投与量の増加を必要とし得る）。免疫応答性細胞は、注射、カテーテルなどによって導入され得る。必要な場合には、それだけには限らないが、インターロイキン、例えば、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21 ならびに他のインターロイキン、コロニー刺激因子、例えば、G-CSF、M-CSF および GM-CSF、インターフェロン、例えば γ -インターフェロンを含む因子もまた含まれ得る。

【0231】

ある特定の実施形態では、本開示の主題の組成物は、本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR を含む免疫応答性細胞を含む医薬組成物および薬学的に許容される担体を含む。投与は、自己または非自己であり得る。例えば、本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR を含む免疫応答性細胞およびそれを含む組成物を、ある対象から得、同一対象または異なる、適合する対象に投与することができる。本開示の主題の末梢血由来 T 細胞またはその後代（例えば、*in vivo*、*ex vivo* または *in vitro* 由来）は、カテーテル投与を含む局所注射、全身注射、局所注射、静脈内注射または非経口投与によって投与され得る。本開示の主題の医薬組成物（例えば、本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR を含む免疫応答性細胞を含む医薬組成物）を投与する場合、注射用単位剤形（液剤、懸濁剤、乳剤）に製剤化されてもよい。

【0232】

ある特定の実施形態では、本開示の主題の組成物は、1 種または複数種の抗原結合性タンパク質、例えば、本明細書において開示される抗シアリルルイス A 抗体またはその抗原結合性断片および薬学的に許容される担体を含み得る。

【0233】

XI. 製剤

本開示の主題の本開示のシアリルルイス A 標的化 CAR を含む免疫応答性細胞およびそれを含む組成物は、選択された pH に緩衝され得る、滅菌液体調製物、例えば、等張性水性液剤、懸濁剤、乳剤、分散液剤または粘稠性組成物として好都合に提供され得る。液体調製物は、普通、ゲル剤、他の粘稠性組成物および固体組成物よりも調製するのが容易である。さらに、液体組成物は、特に注射によって投与するのに幾分かより好都合である。他方、粘稠性組成物は、特定の組織とのより長い接触期間を提供するために適当な粘度範囲内で製剤化され得る。液体または粘稠性組成物は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）および適したそれらの混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る担体

を含み得る。

【0234】

滅菌注射用液剤は、本開示の主題の組成物、例えば、本開示のシアリルルイスA標的化CARを発現する免疫応答性細胞を含む組成物を、必要な量の適当な溶媒に要求のとおり種々の量の他の成分とともに組み込むことによって調製され得る。このような組成物は、適した担体、希釈剤または賦形剤、例えば、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどとの混合物であり得る。組成物はまた、凍結乾燥されてもよい。組成物は、投与経路および所望の調製物に応じて、補助物質、例えば、湿潤剤、分散剤または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、pH緩衝剤、ゲル化もしくは粘稠性増強添加物、保存料、香味剤、着色剤などを含有し得る。過度の実験を行うことなく適した調製物を調製するために、標準教本、例えば、参照により本明細書に組み込まれる"REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985が参考にされ得る。

10

【0235】

抗菌保存料、抗酸化物質、キレート化剤およびバッファーを含む、組成物の安定性および無菌性を増強する種々の添加物が添加されてもよい。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって保証され得る。注射用医薬品形態の長期吸収が、吸収を遅延する剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム (aluminum monostearate) およびゼラチンの使用によってもたらされ得る。しかし、本開示の主題に従って、使用される任意のビヒクル、希釈剤または添加物は、一般に本開示の主題のシアリルルイスA標的化CARを発現する免疫応答性細胞と適合性でなくてはならない。

20

【0236】

組成物は、等張性であり得る、すなわち、血液および涙液と同じ浸透圧を有し得る。本開示の主題の組成物の所望の等張性は、塩化ナトリウムまたは他の薬学的に許容される剤、例えば、デキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコールまたは他の無機もしくは有機溶質を使用して達成され得る。ナトリウムイオンを含有するバッファーについては塩化ナトリウムが特に好ましい。

【0237】

組成物の粘稠性は、必要な場合には、薬学的に許容される増粘剤を使用して選択されたレベルで維持され得る。メチルセルロースは、容易でかつ経済的に利用可能であり、それを使って作業するのが容易であるので、それを使用することができる。他の適した増粘剤として、例えば、キサントガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが挙げられる。増粘剤の濃度は、選択された剤に応じて変わり得る。重要な点は、選択された粘稠性を達成する量を使用することである。適した担体および他の添加物の選択は正確な投与経路および特定の剤形、例えば、液体剤形の性質（例えば、組成物が液剤、懸濁剤、ゲル剤または別の液体形態、例えば、持続放出形態または液体充填形態に製剤化されるかどうか）に応じて変わるということは明らかである。

30

【0238】

本開示の主題において記載されるように、組成物の構成成分は、化学的に不活性であって、免疫応答性細胞の生存力または有効性に影響を及ぼさないように選択されるべきであることは当業者ならば認識する。化学および薬学の原理に精通したものにとってこれは問題ではなく、または問題は、本開示および本明細書に引用される文書から、標準教本を参照することによって、もしくは簡単な実験によって（過度の実験を含まない）容易に避けることができる。

40

【0239】

本開示の主題の免疫応答性細胞の治療的使用に関する1つの考慮事項は、最適効果を達成するために必要な細胞の量である。投与されるべき細胞の量は、処置されている対象によって変わる。ある特定の実施形態では、本開示の主題の約 10^4 ～約 10^{10} 、約 10^5 ～約 10^9 または約 10^6 ～約 10^8 個の免疫応答性細胞が、対象に投与される。より有効な細胞は、さらに少ない数で投与されてもよい。一部の実施形態では、少なくとも約 $1 \times$

50

10^8 、約 2×10^8 、約 3×10^8 、約 4×10^8 および約 5×10^8 個の本開示の主題の免疫応答性細胞が、ヒト対象に投与される。有効用量と考えられるものの正確な決定は、特定の対象のサイズ、年齢、性別、体重および状態を含む各対象に個別の因子に基づいたものであり得る。投与量は、本開示および当技術分野における知識から当業者によって容易に確認され得る。

【0240】

当業者ならば、組成物中の、本開示の主題の方法において投与されるべき細胞の量および最適添加物、ビヒクルおよび／または担体を容易に決定できる。通常、任意の添加物（活性細胞（複数可）および／または剤（複数可）に加えて）が、リン酸緩衝食塩水中の液剤に約0.001重量%～約50重量%の量で存在し、有効成分は、マイクログラム～ミリグラムのオーダー、例えば、約0.0001重量%～約5重量%、約0.0001重量%～約1重量%、約0.0001重量%～約0.05重量%、約0.001重量%～約20重量%、約0.01重量%～約10重量%または約0.05重量%～約5重量%で存在する。動物またはヒトに投与されるべき任意の組成物について、投与の任意の特定の方法について、毒性は、適した動物モデル、例えば、げっ歯類、例えば、マウスにおける致死用量（LD）およびLD50、適した応答を誘発する、組成物（複数可）の投与量、その中の構成成分の濃度および組成物（複数可）を投与するタイミングを決定することなどによって決定されるべきである。このような決定は、当業者の知識、本開示および本明細書において引用される文書から過度の実験を必要としない。また、逐次投与の時間は過度の実験を行わずに確認できる。

【0241】

XII. 処置の方法

対象において悪性成長を処置する方法が本明細書において提供される。方法は、本明細書において記載される1つまたは複数のCARを含む本開示の細胞を、既存の状態の緩和または再発の防止である所望の効果を達成するのに有効な量で投与することを含む。処置のために、投与される量は、所望の効果をもたらすのに有効な量である。有効量は、1回または一連の投与で提供されてもよい。有効量は、ボラスで、または連続灌流によって提供されてもよい。

【0242】

抗原特異的T細胞を使用する養子免疫療法については、約 10^6 ～約 10^{10} 個（例えば、約 10^9 または約 10^6 個）の範囲の細胞用量が、通常注入される。対象への免疫応答性細胞の投与およびその後の分化の際に、1つの特異的抗原（例えば、シアリルルイスA）に対して特異的に向けられた免疫応答性細胞が誘導される。T細胞の「誘導」は、欠失またはアネルギーなどによる抗原特異的T細胞の不活性化を含み得る。不活性化は、自己免疫障害などにおいて耐容性（tolerance）を確立または再確立するために特に有用である。本開示の主題の免疫応答性細胞は、それだけには限らないが、胸膜投与、静脈内投与、皮下投与、結節内投与、腫瘍内投与、髄腔内投与、胸膜内投与、腹腔内投与および胸腺への直接投与を含む当技術分野で公知の任意の方法によって投与され得る。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞およびそれを含む組成物は、必要とする対象に静脈内に投与される。

【0243】

本開示の主題は、本開示のシアリルルイスA標的化CARを含む免疫応答性細胞（例えば、T細胞）を使用する種々の方法を提供する。例えば、本開示の主題は、対象において腫瘍負荷を低減する方法を提供する。ある特定の限定されない例では、腫瘍負荷を低減する方法は、有効量の本開示の免疫応答性細胞を対象に投与することを含む。本開示の免疫応答性細胞は、腫瘍細胞の数を低減、腫瘍サイズを低減および／または対象において腫瘍を根絶できる。

【0244】

本開示の主題はまた、新生物を有する対象の生存を増加させるまたは延長する方法も提供する。ある特定の限定されない例では、新生物を有する対象の生存を増加させるまたは

延長する方法は、有効量の本開示の免疫応答性細胞を対象に投与することを含む。方法は、対象において腫瘍負荷を低減または根絶できる。

【0245】

本開示の主題は、対象において新生物を処置および／または防止する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、方法は、有効量の本開示の免疫応答性細胞を対象に投与することを含む。

【0246】

本開示の主題の免疫応答性細胞を使用して成長が阻害され得るがんは、免疫療法に対して通常応答性であるがんを含む。処置のための新生物、がんおよび／または腫瘍の限定されない例として膵臓がんが挙げられる。

【0247】

さらに、本開示の主題は、対象におけるがん細胞に応じて免疫活性化サイトカイン生成を増加させる方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本開示の免疫応答性細胞を対象に投与することを含む。免疫活性化サイトカインは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、インターフェロン調節因子7（IRF7）およびそれらの組合せであり得る。ある特定の実施形態では、本開示の主題のシアリルルイスA特異的CARを含む免疫応答性細胞は、GM-CSF、IFN- γ および／またはTNF- α の生成を増加させる。

【0248】

療法のための適したヒト対象は、通常、臨床基準によって区別され得る2つの処置群を含む。「進行した疾患」または「高い腫瘍負荷」を有する対象は、臨床的に測定可能な腫瘍を有するものである。臨床的に測定可能な腫瘍は、腫瘍量に基づいて検出され得るものである（例えば、触診、CATスキャン、超音波画像、マンモグラムまたはX線によって；陽性の生化学的または病理組織学的マーカーはそれ自体では、この集団を同定するには不十分である）。本開示の主題において具体化される医薬組成物は、その状態を緩和する目的で抗腫瘍応答を誘発するためにこれらの対象に投与される。理想的には、腫瘍量の低減が結果として生じるが、任意の臨床的改善は利益を構成する。臨床的改善は、リスクもしくはは進行速度の減少または腫瘍の病理学的帰結の低減を含む。

【0249】

適した対象の第2の群は、「アジュバント群」として当技術分野で公知である。これらは、新生物の病歴を有していたが、別の治療様式に対して応答性であった個体である。前の療法は、外科的切除、放射線療法および従来の化学療法を含み得るが、それに制限されていない。結果として、これらの個体は、臨床的に測定可能ではない腫瘍を有する。しかし、それらは、元の腫瘍部位付近のまたは転移による疾患の進行のリスクにあると疑われる。この群は、ハイリスクおよびローリスク個体にさらに細分され得る。細分は、最初の処置の前または後に観察される特徴に基づいて行われる。これらの特徴は、臨床の技術分野では公知であり、異なる新生物各々について適宜定義されている。ハイリスクサブグループに特有の特徴として、腫瘍が隣接組織に浸潤したものまたはリンパ節の関与を示すものがある。別の群は、新生物に対する遺伝的素因を有するが、新生物の臨床的徴候をまだ証明していない。例えば、乳がんに関連する遺伝子変異について検査で陽性であるが、まだ妊娠可能年齢の女性は、予防的手術を実施するのに適するまで、新生物の出現を予防的に防ぐ処置において本明細書において記載される抗原結合性断片のうち1つまたは複数の投与を希望できる。

【0250】

対象は、進行形態の疾患を有する場合があります、この場合には、処置目的は、疾患進行の軽減または逆転および／または副作用の寛解を含み得る。対象は、すでに処置されている状態の病歴を有する場合があります、この場合には、治療目的は、通常、再発のリスクの減少または遅延を含むこととなる。

【0251】

免疫学的合併症（「悪性Ｔ細胞形質転換」として知られる）、例えば、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）のリスクを防ぐか、もしくは最小化するために、または健常組織が、腫瘍細胞と同一の標的抗原を発現し、ＧｖＨＤと同様のアウトカムにつながる場合には、シアリルルイスＡ標的化ＣＡＲを発現する免疫応答性細胞（例えば、Ｔ細胞）にさらなる改変が導入されてもよい。この問題に対する潜在的な解決策は、シアリルルイスＡ標的化ＣＡＲを発現するＴ細胞に自殺遺伝子を操作して入れることである。適した自殺遺伝子として、それだけには限らないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（*hsv-tk*）、誘導性カスパーゼ９自殺遺伝子（*iCasp-9*）および切断型ヒト上皮成長因子受容体（*EGFRt*）ポリペプチドが挙げられる。ある特定の実施形態では、自殺遺伝子は、*EGFRt*ポリペプチドである。*EGFRt*ポリペプチドは、抗*EGFR*モノクローナル抗体（例えば、セツキシマブ）を投与することによってＴ細胞排除を可能にできる。*EGFRt*は、シアリルルイスＡ標的化ＣＡＲの細胞内ドメインの３'末端に共有結合によって繋がれ得る。自殺遺伝子は、本開示のシアリルルイスＡ標的化ＣＡＲをコードする核酸を含むベクター内に含まれ得る。このようにして、悪性Ｔ細胞形質転換（例えば、ＧＶＨＤ）の際の自殺遺伝子を活性化するように設計されたプロドラッグ（例えば、プロドラッグ（例えば、*iCasp-9*）を活性化できるＡＰ１９０３）の投与は、自殺遺伝子によって活性化されるＣＡＲを発現するＴ細胞においてアポトーシスを引き起こす。本開示のシアリルルイスＡ標的化ＣＡＲ中に自殺遺伝子を組み込むことは、極めて短い期間内にＣＡＲ Ｔ細胞の大部分を排除する能力を備えた付加されたレベルの安全性を与える。自殺遺伝子を組み込まれた本開示の免疫応答性細胞（例えば、Ｔ細胞）は、ＣＡＲ Ｔ細胞注入後の所与の時点で先制して排除され得るか、または毒性の最も早い徴候で根絶され得る。

【０２５２】

ＸＩＩＩ．キット

本開示の主題は、新生物の処置または防止のためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、単位剤形中に、本開示のシアリルルイスＡ標的化ＣＡＲを含む免疫応答性細胞の有効量を含む治療用または予防用組成物を含む。特定の実施形態では、細胞は、少なくとも１つの共刺激リガンドをさらに発現する。一部の実施形態では、キットは、治療用または予防用ワクチンを含む減菌容器を含み、このような容器は、箱、アンブル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、ブリスターパックまたは当技術分野で公知の他の適した容器形態であり得る。このような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属箔または医薬を保持するのに適した他の材料で作製され得る。

【０２５３】

必要な場合には、免疫応答性細胞は、新生物の発生を有するか、またはそのリスクにある対象に細胞を投与するための指示と一緒に提供され得る。指示は、一般に、新生物の処置および／または防止のための組成物の使用に関する情報を含む。他の実施形態では、指示は、以下のうち少なくとも１つを含む：治療剤の説明、新生物またはその症状の処置または防止のための投与量スケジュールおよび投与、警告、適応症、禁忌、過量投与情報、有害反応、動物薬理学、臨床研究および／または参考文献。指示は、容器に直接印刷されている場合もあり（存在する場合には）、容器につけられたラベルとして、または容器中にもしくは容器とともに供給された別個のシート、パンフレット、カードもしくはホルダーとして印刷される場合もある。

【実施例】

【０２５４】

本発明の実践は、別段の指示がない限り、分子生物学（組換え技法を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技法を用い、これらは十分に当業者の範囲内である。そのような技法は、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989)、"Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984)、"Animal Cell Culture" (Freshney, 1987)、"Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996)、"Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987)、"Current Protocols in

Molecular Biology" (Ausubel, 1987)、"PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994)、"Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)等の文献において完全に説明されている。これらの技法は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの生産に適用可能であり、したがって、本発明を実施および実践する際に考慮されてもよい。特定の実施形態に特に有用な技法は続く節において考察される。

【0255】

以下の実施例は、当業者に本発明の組成物、ならびにアッセイ、スクリーニングおよび治療方法を作製および使用する方法に関する完全な開示および説明を提供するために記載され、本発明者らが本発明と考えるものの範囲を限定することを意図するものではない。

【0256】

(実施例1)

序論

抗原提示を改善する戦略は、エピトープ拡大を誘導するか、または既存の抗腫瘍T細胞応答が腫瘍抗原逃避と戦う見込みを保持することを永続させる。例えば、がんワクチンおよび「免疫原性」放射線(RT)は、抗原提示細胞(APC)を活性化させて、内因性T細胞への腫瘍新抗原表示を改善する(Spiotto et al., Sci Immunol (2016); 1)。しかしながら、それでもなお、完全奏効を得るためには、同じ新抗原がすべてではないにせよ大半の腫瘍細胞において発現し、提示されなければならない。遺伝子変異量と関連する既存の腫瘍反応性T細胞を有する患者では、免疫チェックポイント阻害剤はT細胞疲弊を軽減し、持続した応答を実現することができる。しかしながら、チェックポイント阻害は、CARがCAR標的を欠いている腫瘍細胞に対する応答を導くことができないのと同様に、認識された抗原を提示しない腫瘍細胞に対するT細胞応答を回復することができない。

【0257】

増加したAPC活性化、改善したT細胞浸潤、および腫瘍における増強したHLAまたはCAR標的発現によって媒介される、電離放射線への曝露後に生じ得る改善した腫瘍認識(Spiotto et al., Sci Immunol (2016); 1、Weiss et al., Cancer Res (2018); 78:1031-1043)は、抗原消失に起因する抗原逃避という同じ課題に直面している。しかしながら、低線量照射に曝露された腫瘍は、CAR標的を欠く腫瘍細胞を含め、CAR T細胞活性に対してより感受性が鋭くなることを見出された。この機構を理解することは固形腫瘍抗原逃避を克服することにおいて特に価値がある。

【0258】

CAR T細胞媒介排除に対する腫瘍感受性が放射線前処置によって増強し、これを活用してCAR T細胞の適用範囲を標的とした抗原以外にも拡大するこの代替機序を特徴付けた。膵臓がんは、改善がほとんどない予後不良を過去数十年にわたって伴い続け、一様に発現する治療標的抗原を確立しておらず、罹患率が増加している。部分的に抗原陰性である同所膵臓がんモデルにおいて、低線量放射線とCAR療法とを組み合わせることによってクローン抗原不均一性の課題に取り組む新規手段を実現した。

【0259】

結果

シアリルルイスA (Le^A) 特異的CAR T細胞は*in vitro*において膵臓腫瘍細胞に対して活性である

100%の腫瘍細胞に発現し、重要な正常組織には発現しない固形腫瘍標的を同定することは困難である。膵臓がんはこの問題の好例であり、いくつかの魅力的な標的を有するが、そのうちすべての腫瘍細胞に明確に発現するものは1つもない(Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428)。75~90%の膵臓腫瘍に発現し(Viola-Villegas et al., J Nucl Med (2013); 54:1876-1882)、正常ヒト組織では低発現(Viola-Villegas et al., J Nucl Med (2013); 54:1876-1882)の表面抗原であるシアリルルイスA (Le^A) は、臨床試験における有効な抗体標的である(NCT03118349、NCT02672917、NCT02687230)。Le^Aを標的とするヒ

10

20

30

40

50

トモノクローナル5B1抗体は、*in vitro*および*in vivo*における膵臓がんに対する特異性 (Viola-Villegas et al., J Nucl Med (2013); 54:1876-1882)、ならびに生物学的活性用量での膵臓がん患者における安全性および忍容性 (O'Reilly et al., Journal of Clinical Oncology (2017); 35:4110-4110) を実証している。したがって、このLe^A特異的scFvを使用して進行膵管腺癌 (APDAC) 標的CARを構築した。Le^A特異的LBBz CARは、Le^Aを発現する複数の膵臓がん腫瘍系に対する効果的な細胞傷害性を示したが、Le^A陰性PC3前立腺がん細胞に対しては示さなかった (図6A~6C)。Capan2 PDACは中間レベルのLe^Aを発現し (図6A~6C)、さらなる実験のために選択された。

【0260】

低線量放射線は標的抗原発現を誘導することなく腫瘍細胞をCAR T細胞による殺滅に対して感受性にする

放射線療法 (RT) はLe^A発現を誘導し、異種標的抗原発現を有する腫瘍を排除するCAR T細胞の能力を改善し得るという最初の仮説を試験するために、腫瘍細胞に2 Gy RTを照射し、2日後、残っている生存細胞に対する細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) アッセイおよび表面標的抗原発現のFACS解析を実施した。より高いRT線量は、少ないが有意な腫瘍細胞死を誘導したが、2 Gyは腫瘍生存率において検出可能な差を生じなかったために、2 Gyを選択した (図1A)。2 Gy (以降「低線量RT」と称す) は、あらゆるエフェクター：標的比においてCAR T細胞殺滅に対する腫瘍細胞の感受性を増加させるが (図1B)、驚くべきことに標的抗原発現を増加させない (図1C) ことが見

【0261】

低線量放射線はTRAIL媒介死に対する感受性と関連する遺伝子セットに影響を及ぼす
低線量RTが腫瘍細胞をCAR T細胞による殺滅に対して感受性にする潜在的な機構に対する洞察を得るために、RNAseq解析を低線量RTの前後に腫瘍細胞に対して実施した。RT自体は致死量以下であったが、遺伝子セット解析は多くのアポトーシス経路が低線量RTによって有意に影響を受けることを明らかにした (図1D)。特に、TRAIL媒介死に対して感受性である腫瘍細胞とそうでない腫瘍細胞とを識別する遺伝子セット (Hamai et al., Oncogene (2006); 25:7618-7634)¹ は最も低い偽発見率を有することが明らかとなった (それぞれに関してFDR<0.0000001; 492の陽性経路メンバーのうち429が誘導され、128の陰性経路メンバーのうち114が下方調節された) (図1D)。

【0262】

CAR T細胞は標的抗原遭遇の際にTRAILを産生する
TRAILとは、2つの異なる受容体、および感受性に影響を与えるいくつかの下流シグナル伝達分子を介して死を誘導する三量体タンパク質であり、腫瘍細胞は一般に正常細胞よりもTRAIL誘導アポトーシスに対して感受性であるが、様々な程度がある (Walczak et al., Nat Med (1999); 5:157-163)。遺伝子セット解析は低線量RTが腫瘍細胞をTRAIL媒介死に対して転写プライミングし得ることを示唆したが、これは死リガンドが局所的に十分なレベルで存在した場合にのみ関連するものであった。Le^A特異的CAR T細胞からのTRAIL産生を解析し、CAR T細胞はベースラインでは低レベルのTRAILを産生するが、標的抗原遭遇の際ではTRAIL mRNAおよびタンパク質を有意に誘導することが見出された (図1E)。対照的に、シグナル伝達ドメインを欠く切断型CAR (Ldel) を発現するT細胞による腫瘍認識後にTRAILは誘導されず、CARシグナル伝達へのTRAIL誘導の依存性が確立された (図1F)。

【0263】

低線量RTに曝露された抗原陰性腫瘍細胞はCAR T細胞TRAIL媒介死を受け易い
低線量RTに曝露された抗原陰性腫瘍に関する、活性化CAR T細胞によって産生されたTRAILの機能的有意性を試験するために、腫瘍細胞を抗原陽性 (Ag⁺) および抗原陰性 (Ag⁻) 集団にFACS選別した。Ag⁻細胞にホタルルシフェラーゼ (Lu

c) を形質導入し、A g⁻細胞は経時的に安定に抗原陰性のままであった (図 7)。75% の A g⁺腫瘍細胞と 25% の A g⁻L u c⁺腫瘍細胞とを混合し、低線量 R T に曝露させるかまたは R T に曝露させず、T R A I L を C R I S P R によって破壊した C A R T 細胞とともにインキュベートした (図 2 A ~ 2 B および図 7)。T R A I L^{w t} またはノックアウト C A R T 細胞を、T R A I L 産生を誘導する 3 日前に静止するかまたは標的抗原によって刺激した。L u c 活性を使用して A g⁻細胞殺滅をモニタリングし、R T 曝露腫瘍細胞に関して予備刺激した w t C A R T 細胞が最大規模の A g⁻腫瘍細胞死を生じ、この A g⁻腫瘍細胞死が C A R T 細胞における T R A I L の非存在または腫瘍に対する増感 R T の非存在によって有意に減少することが見出された (図 2 B)。標的細胞を認識するが T R A I L を誘導しない L (d e l) C A R T 細胞は、T R A I L を構成的に発現させた場合、有意により多くの R T 増感 A g⁻腫瘍細胞を死滅させた (図 2 C)。

【0264】

T R A I L は、腫瘍細胞と T 細胞の両方のアポトーシスおよびネクロプトーシスを含むいくつかの文脈依存効果、または腫瘍細胞 N F k B 活性化を介した骨髄由来抑制細胞動員 (Hartwig et al., Mol Cell (2017); 65:730-742 e735) もしくは腫瘍内の R a c 1 および A k t 活性化を介した生存、侵襲および転移 (von Karstedt et al., Cancer Cell (2015); 27:561-573) を含む腫瘍促進効果を発揮する。R T 増感腫瘍が C A R T 細胞によって提供される増加した T R A I L 刺激にどのように応答し得るかをより良好に理解するために、様々な下流 T R A I L シグナル伝達経路の公知のメディエーターを調査した。多くの経路メディエーターは、転写、切断、リン酸化、ユビキチン化または他の事象を介して調節されるが、遺伝子発現解析は全体的な経路活性化状態に関する全般的な情報を提供することができる。とりわけ、増感 R T の前後の R N A s e q データからの遺伝子発現変化は、T R A I L の下流の腫瘍促進メディエーターと抗腫瘍メディエーターの両方の大多数の個々のメンバーが増感 R T によって有意に変更されることを明らかにした (図 3 A ; 赤色または緑色は有意な変化を表し、灰色は有意ではない変化を表す)。生存促進、遊走、転移および腫瘍支持炎症 T R A I L 経路メンバーはほとんど一様に下方調節されたが、アポトーシス促進分子は圧倒的に誘導され、増感 R T により腫瘍細胞が T R A I L 媒介アポトーシスを引き起こしやすくなり得ることを示唆した (図 3 A および図 9)。アポトーシスおよびネクロプトーシスレベルは細胞膜におけるホスファチジルセリン (P S) 発現によってモニタリングすることができるため、蛍光アネキシン V 抗体を含有する培養物の生ビデオ顕微鏡検査を使用して、C A R T 細胞によって産生された T R A I L が A g⁻細胞において検出可能な膜 P S 変化を経時的に誘導するかどうかを試験した。R T 増感 A g⁻腫瘍細胞を、C e l l T r a c e V i o l e t (C T V) で標識した後に非標識 A g⁺腫瘍細胞、および T R A I L^{w t} または T R A I L^{-/-} C A R T 細胞と混合した。アポトーシスを受ける A g⁻腫瘍細胞の自動定量は、T R A I L^{-/-} C A R T 細胞は A g⁻腫瘍アポトーシスを経時的に誘導することができないが、T R A I L^{w t} C A R T 細胞は一定かつ有意な A g⁻腫瘍細胞アポトーシスをもたらすことを実証した (p < 0.0001、図 3 B)。

【0265】

耐性 A g⁻集団を含有する脾臓腫瘍は i n v i v o において、増感 R T 後、C A R T 細胞によって排除することができる

次に、標的抗原を部分的に欠いている異種固形腫瘍の困難だが一般的な臨床シナリオのためにマウスモデルを確立した。25% A g⁻細胞からなる P D A C をマウス脾臓において定着させ、9 日後に C A R T 細胞を用いて処置した (図 4 A)。A g⁺同所 P D A C を一貫して排除した C A R T 細胞はいかなる異種腫瘍も完全には排除することができなかった (図 4 B ~ 4 E)。次に、増感 R T が i n v i v o において C A R T 細胞を用いて処置した異種腫瘍に対する何らかの有意な利益をもたらしたかどうかを試験した。増感 R T とその後の C A R T 細胞とを用いて処置した、定着した異種 P D A C を有するマウスは、イメージング、剖検検査および病理学によってより多くの C R および P R を達成した (図 4 B および 4 F)。C A R 非依存性 T 細胞殺滅の主要な公知の機構は T 細胞受容

10

20

30

40

50

体 (TCR) を介し、RT は標的細胞にHLA 発現を誘導することができるため、TCR 依存性腫瘍殺滅が増感RT 後に有意な役割を果たすかどうかを試験した。TCR を欠く (TCR^{-/-}) CAR T 細胞 (図10) は、RT 増感異種腫瘍を排除する能力を維持した (図4G)。RT は最初に、初めの2週間にわたって腫瘍内に中程度に増加したT細胞蓄積をもたらした (図4I~4K)。有意な腫瘍流入 (図11) にもかかわらず、TRAIL^{-/-} CAR T 細胞はRT 増感腫瘍保有マウスにおいて完全奏効を一貫して達成することができず、これは死亡 (GVHD または腫瘍進行のいずれかから生じた) 時の応答のウォーターフォールプロット (図4B) と毎週の生物発光イメージング (図4H) の両方によって実証された。再発/進行した腫瘍を有するマウスは、FACS によって評価されるように血液、脾臓および腫瘍にCAR T 細胞を依然として所有し、IHC によって腫瘍に侵入する有意なT細胞を呈したが、Ag⁻腫瘍細胞という副産物を実証した (図4L および図12A~12B)。

【0266】

TRAIL の効果とCAR の効果とを切り離すために、RT 増感マウスを、腫瘍と結合するが認識の際にCAR 細胞傷害性もTRAIL も誘導しないL (del) CAR T 細胞、および腫瘍と結合しTRAIL を構成的に発現するがCAR 媒介細胞傷害性を発揮しないL (del) -TRAIL CAR T 細胞を用いて処置した。第1の戦略は局所的なT細胞蓄積にもかかわらず応答を生じなかったが (図4M)、外部CARDメインを使用して構成的TRAIL 発現T細胞を腫瘍にターゲティングすることは奏効率を適度に増加させた (図4M)。

【0267】

局所的RT はその後のCAR T 細胞投与のために腫瘍を効果的に前処置する

全身RT がCAR T 細胞による増感に必要なとされるかどうか、または腫瘍に対する局所RT が十分であるかどうかを決定するために、同所PDAC を所有するマウスを、全身または脾臓腫瘍のみに対するRT と、それに続くCAR T 細胞投与とを用いて処置した (図5A)。総身RT 処置マウスは早期時点においてより多いT細胞腫瘍浸潤を有する傾向があったが (図13)、両方の戦略は類似した腫瘍応答をもたらした (図5B~5D)。したがって、全身低線量RT と局所低線量RT の間の潜在的に異なる宿主効果にもかかわらず、いずれのアプローチも異種腫瘍をCAR T 細胞による殺滅に対して効果的に感受性にする。

【0268】

異種腫瘍を有する患者におけるRT およびCAR T 細胞処置：症例報告

RT をCAR T 細胞と組み合わせる経験は限定されている。TRAIL 媒介殺滅のためにRT によって転写プライミングした腫瘍細胞が細胞培養およびマウス研究においてCAR T 細胞に応答した有意により多くの死を呈したのと同様に、類似した増感がRT 後の近傍の抗原陰性正常組織細胞において生じ得ることが考えられる。サンプリングした腫瘍塊において大きな割合のCD19⁺腫瘍細胞を保有する難治性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) を有する患者 (図5E~5F) はCD19 CAR 療法のために来院した (NCT02631044)。この患者は下腿、特に右側の下腿の皮膚に浸透する痛みを伴う疾患を有していた。緩和的RT を患者の右下肢に与え (4 Gy × 5 回)、次いで患者は計画通りにCD19 CAR T 細胞を受けた。CAR T 細胞療法の数日および数週間後、患者は照射範囲内に傷害性の徴候も症状も呈しなかった。患者は神経学的症状を伴わずにグレード2のCRS を呈した。CAR T 細胞の1か月後、患者はPET-CT イメージングに基づいて優れた応答を有した (図5G)。CAR T 細胞注入の2か月後、腫瘍は、緩和的RT とその後のCAR T 細胞とを受けた患部を除いて、以前の場所および新たな場所においてCD19 低/陰性発現を伴ってリバウンドした。処置の1年後の現在、緩和的RT とそれに続くCAR T 細胞とに供した抗原異種腫瘍の領域はCR のままである (図5G)。

【0269】

考察

B細胞悪性腫瘍においてCD19を標的とする最初の選択は主として、白血病およびリンパ腫におけるCD19の上昇した比較的同種の発現、ならびに正常組織におけるその発現のB細胞系列への制限によって推進された (Brentjens et al., Nat Med (2003); 9:279-286、Maher et al., Nat Biotechnol (2002); 20:70-75)。第I相ALL試験患者中70~90%という注目すべき完全寛解率に基づいて (Sadelain, J Clin Invest (2015); 125:3392-3400)、CAR療法を幅広い範囲のがんに拡大する見通しが立ちつつある。CAR療法は近年やっと固形腫瘍に取り組み始めたが (Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428、Morello et al., Cancer Discov (2016); 6:133-146、Jindal et al., Med Oncol (2018); 35:87)、結果はこれまでのところ控えめであり、大奏効の発生はほとんどない (Louis et al., Blood (2011); 118:6050-6056、Brown et al., N Engl J Med (2016); 375:2561-2569)。抗原陰性腫瘍細胞の逃避および再成長は今では十分に立証されたCAR療法に耐性の機構であるため (Brown et al., N Engl J Med (2016); 375:2561-2569、Gardner et al., Blood (2016); 127:2406-2410、Jackson and Brentjens, Cancer Discov (2015); 5:1238-1240)、CAR T細胞が抗原逃避を効果的に防止することを可能にする新規なアプローチが必要である。

【0270】

CAR T細胞からの抗原逃避を克服する初期のアプローチは、2つの異なる抗原を標的とすることである (Hegde et al., J Clin Invest (2016); 126:3036-3052)。別のアプローチは、IL-18等の活性化サイトカインの分泌 (Avanzi et al., Cell Rep (2018); 23: 2130-2141) または共刺激リガンドの発現 (Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428) を介して内因性T細胞を動員する「武装化CAR」を使用する。その後、CAR T細胞と内因性腫瘍反応性T細胞の両方を再活性化することを目的として、チェックポイント阻害剤療法がCAR T細胞に加えられた (Suarez et al., Oncotarget (2016); 7:34341-34355、Cherkassky et al., J Clin Invest (2016); 126:3130-3144)。しかしながら、これらのアプローチのすべては、CARまたはTCRのいずれかによって認識される腫瘍特異的抗原を発現する腫瘍細胞に依存する。これらのアプローチのいずれも、CAR標的と免疫原性TCRエピトープの両方を欠く腫瘍細胞がT細胞によって排除され得る機構を提供しない。

【0271】

ここで報告されるアプローチは、腫瘍細胞が免疫原性と無関係に従前通りCAR T細胞によってトランスに排除される機構を描写する。したがって、このアプローチは、抗原逃避を獲得することと関連し、新抗原提示および認識の確率が低い低変異量 (low mutational burden) の腫瘍において特に有益であり得る。

【0272】

ここで達成される空間的および時間的特異性は、CAR T細胞の生理応答および標的発現と無関係な腫瘍細胞の放射線増感に依拠する。TRAILが腫瘍遭遇後のCAR T細胞において誘導されるという観察は、腫瘍微小環境内における活発かつ最大の産生を確実にする。標的化RTを介してAg⁺およびAg⁻腫瘍細胞にTRAIL受容体を誘導できることは、異種腫瘍に対する部位特異的CAR T細胞有効性を増強する絶好の機会を提供する。この相互作用の効果は多数の意義を有する。全身RTと局所的RTの両方が腫瘍をCAR T細胞による殺滅に対して感受性に見出された。最も重要なことに、抗原異種臓器がん (antigen-heterogeneous pancreatic cancer) において、他の場合であればCAR認識から逃避するAg⁻腫瘍細胞が*in vivo*において、低線量RT後、CAR T細胞によって排除することができることが示された。全身疾患の場合、低線量総身照射は腫瘍細胞を効果的に感受性にする場合があり、より低いCAR T細胞用量で排除をもたらし、有効性を高めると同時にサイトカイン放出症候群のリスクを潜在的に低減する。

【0273】

腫瘍細胞が正常細胞と比較してTRAIL誘導アポトーシスに対して高度に感受性であ

るという初期の観察 (Walczak et al., Nat Med (1999); 5:157-163) は、組換え T R A I L またはアゴニスト T R A I L 受容体に基づく療法に対する強い関心を生み出した。残念なことに、この療法は、T R A I L タンパク質の短い半減期 (Ichikawa et al., Nat Med (2001); 7: 954-960)、二価抗体の低下したアポトーシス能 (Wajant, Cell Death Differ (2015); 22:1727-1741)、全身投与した場合の限定的な局所腫瘍浸透、および腫瘍遺伝子発現変化による下流のアポトーシスに対する耐性 (Ichikawa et al., Nat Med (2001); 7: 954-960) を含む複数の制限に直面している。T R A I L の起源としての C A R T 細胞は、いくつかの潜在的な利点、例えば腫瘍内での濃縮 T R A I L 合成、腫瘍および T 細胞が存在する限りでの継続的な産生、ならびに潜在的により低いアポトーシス性の二価抗体ではなく天然の三量体タンパク質の供給 (Wajant, Cell Death Differ (2015); 22:1727-1741) を提供する。T R A I L はデスレセプター 5 を介して C A R T 細胞に対するアポトーシス促進効果を発揮し得るが (Tschumi et al., J Immunother Cancer (2018); 6:71)、この活性は C A R T 細胞注入前の放射線前処置によって増加しない。

【0274】

免疫療法のいくつかの他の形態は、一般的にある特定の状況下で R T と組み合わせられる。「免疫原性」切除的高線量の放射線は、腫瘍死を誘導し、一部の文脈では、増加した抗原提示、その後の T 細胞活性化、および潜在的に、非照射腫瘍に対する「アブスコパル」または二次的免疫応答を生じる (Spiotto et al., Sci Immunol (2016); 1)。臨床診療におけるアブスコパル効果の低頻度のために、この現象を予測可能に利用することは依然として調査の活発な領域である。内因性 T 細胞と異なり、C A R T 細胞は抗原提示に依存せず、放射線が特定の C A R 標的分子の発現を誘導しない限り (Weiss et al., Cancer Res (2018); 78:1031-1043)、放射線が C A R T 細胞療法に対して免疫原性効果を有するか、免疫抑制効果を有するか、または無関係な効果を有するかは直観的ではない。C A R T 細胞療法の文脈において根本的に異なる種類の「免疫原性放射線」を、すなわち、致死量以下の、低線量の放射線が腫瘍を C A R T 細胞による殺滅に対して局所的にトランスに感受性にする免疫原性放射線を記載した。切除対応物 (ablative counterpart) と異なり、増感放射線は、疾患の場所によってもサイズによっても限定されず、またはるかに低い線量を考慮すると、R T 関連副作用に関するより小さい懸念のため、びまん性転移を有する患者のためにより広域に適用され得る。

【0275】

C A R T 細胞療法の前に緩和的 (非治癒的) R T を用いて処置した異種腫瘍を有する患者は、過剰な傷害性の徴候を伴わず、マウスデータと一致した結果を呈した。この臨床的相関は動物所見と合致するが、仮説を試験するものではない。特に、患者の異種腫瘍の持続的な完全奏効に対する R T 単独の効果は無視することができない。しかしながら、投与した放射線量は、患者の腫瘍を e x v i v o において排除することができず、この種のアグレッグリンパ腫における肉眼的疾患のための 4 5 G y 超という標準的な局所治療的線量の概ね半分と一致した (Ng et al., International journal of radiation oncology, biology, physics (2018); 100:652-669)。さらに、傷害性は下肢の R T 範囲に観察されなかったが、G I 系等の他の正常組織が活性化 C A R T 細胞産生 T R A I L に対する高められた R T 感受性を呈し得る可能性はある (Finnberg et al., Cancer Res (2016); 76:700-712)。R T を C A R T 細胞とともに組み込む臨床試験を計画し、クローン抗原不均一性に対する効果、R T 前処置の安全性、および局所 R T の C A R T 細胞媒介疾患応答に対する全身効果を評価する。

【0276】

R T は現在、約半分の転移性がん患者の処置において緩和のためにある時点で使用され、ほとんどすべての非転移性がんの種類においては局所制御を向上するために外科的処置の代替としてまたはそれに加えて一般的に利用されている (Miller et al., CA Cancer J Clin (2016); 66:271-289)。現在の R T レジメンに C A R 療法を実装することは局所および全身腫瘍制御をさらに向上し得る。所見は、これらの 2 種類の療法の統合され

た送達が疾患管理チーム間の協調を保証することを示唆する。

【0277】

所見は、RT前処置を伴うマルチモダリティCAR療法が固形腫瘍における応答を改善し得るという考えを支持する。最も重要なことに、操作されたT細胞を、クローン的に異種の固形腫瘍を排除するようにさらに増強することができる機構プラットフォームを実現した。

【0278】

材料および方法

細胞培養

ホタルルシフェラーゼ-GFPを発現する腫瘍細胞は以前に記載された (Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428)。293T細胞系、H29およびレトロウイルスパッケージング細胞系を、10% FCSを補充したDMEM中で培養した (Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428)。Capan-2細胞はJason S. Lewis (MSKCC) によって厚意により提供され、これを、10% FCSを補充したRPMI中で成長させた。細胞を、MycobAlertマイコプラズマ検出キット (Lonza) を使用してマイコプラズマに関して試験した後に動物に注射した。

【0279】

健常なボランティアドナーからのバフィーコートをニューヨーク血液センターから取得した。末梢血単核細胞を密度勾配遠心分離によって単離し、次いで細胞を、PHA (Sigma) を用いて刺激し、以前に記載されたように培養した (Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428)。

【0280】

放射線

放射線量：PDACを使用したすべての実験は、別段の指定がない限り2 Gyを使用した。in vitroにおけるRT研究に関して、すべてのRT増感実験は、別段の定めのない限り、RTを腫瘍分析またはT細胞との共培養の2日前に腫瘍細胞に投与して実施した。

【0281】

照射方法：脾臓に対する局所RTは、高精度コンビームCTイメージングを全身麻酔下での3D画像誘導放射線処置と組み合わせるX-Rad 225Cx装置において、腹腔内造影コンビームCTイメージングを使用して脾臓腫瘍を同定することによって実施した。局所RTは、前後ビームまたは前後および左右ビームのいずれかを使用して送達した。より低い標的精度（総身RT）を必要とする実験は、AP方向に開放した顎部 (open jaw) を備える小動物照射装置を使用して実施した。

【0282】

フローサイトメトリー

CD3 (UCHT1)、CD4 (S3.5)、CD8 (3B5)、DR5 (DJR2-4、PEコンジュゲート、BioLegend)、CD95 (DX2、PE-Cy7コンジュゲート、BD Biosciences)、LeA (7LE、AF405コンジュゲート (conjugated)、Novus)、CD19 (SJ25C1)、41BBL (5F4) およびグランザイムB (FGB12、Invitrogen) に対する蛍光色素コンジュゲート抗体を使用した。Alexa647コンジュゲートヤギ抗ヒトFc (ThermoFisher) を使用してCARを検出した。フローサイトメトリーをBD LSRIIにおいて実施し、データをFlowJoソフトウェアバージョン9.5.2 (TreeStar) を用いて解析した。ヒトFc受容体結合阻害剤抗体 (eBioscience) を使用してFc受容体を遮断した。場合によっては、CountBrightビーズ (Invitrogen) を試料に添加して細胞数を計数した。

【0283】

TRAIL測定

RNAおよびELISA実験のために、CAR T細胞を、標的抗原を発現するCap

10

20

30

40

50

【 0 2 8 4 】

【 0 2 8 5 】

【 0 2 8 6 】

【 0 2 8 7 】

100% Ag + 腫瘍細胞を使用したCTL: CARを形質導入したT細胞の細胞傷害性を標準的なルシフェラーゼベースアッセイによって決定した。ルシフェラーゼベースアッセイに関して、ホタルルシフェラーゼ-GFPを発現する腫瘍細胞は標的細胞として役立った。エフェクター細胞および腫瘍細胞を、示されたE/T比(ration)で黒壁96また

は384ウェルプレートにおいて3連で共培養した。標的細胞単独を同じ細胞密度で播種して、ベースラインルシフェラーゼ発現を決定した(T細胞無し対照)。18時間後、ルシフェラーゼ基質(Bright-Glo、Promega)を各ウェルに直接添加した。放出された光を発光プレートリーダー、またはイメージングデータセットの獲得のためのLiving Imageソフトウェア(Xenogen)を備えるXenogen IVISイメージングシステム(Xenogen)によって測定した。溶解を $[1 - (RLUsample) / (RLUmax)] \times 100$ として決定した。アッセイを、前の週以内に形質導入されたCAR T細胞を使用して実施した。

【0288】

75% Ag⁺、25% Ag⁻腫瘍細胞を使用したCTL: 予備刺激したCAR T細胞を伴う実験において、すべてのCAR T細胞を20U/mlのIL-2の存在下100万個細胞/mlの一定濃度で10~12日間成長させ、1日おきに再構成した。細胞を、実験の1日前に標的抗原を含有する接着細胞(Le^A+Capan2)にCAR T細胞を添加することによってCTL前に刺激し、実験の当日、T細胞を吸引によって除去した。次いで、CAR T細胞を、RT増感75% Ag⁺Capan2 PDACとともに1:3のE:T比で48ウェルプレート中において共培養した。残っているAg⁺およびAg⁻腫瘍細胞の相対数に加えて、無処置対照と比較した殺滅パーセントを、LBBz CAR T細胞培養に関しては4日間、L(del) CAR T細胞培養に関しては5日間のうちの予め規定した時点において決定した。Ag⁻細胞殺滅を特異的に定量した実験では、Ag⁻細胞のみがルシフェラーゼを発現した。

【0289】

RTを使用したすべての細胞傷害性アッセイでは、腫瘍細胞(Capan2)にRTを与え、培養中で2日間成長させ、次いで生細胞をCAR T細胞とともにインキュベートした。

【0290】

ビデオ顕微鏡検査

CTV(CellTrace Violet、Fisher C34571)で標識したAg⁻細胞を、8ウェル顕微鏡検査スライドにおけるCAR T細胞、およびアネキシンV595(Fisher A13203)に加えて、非標識Ag⁺細胞と75% LeA⁺の比で混合した。共焦点画像を、LSM880共焦点顕微鏡(Carl Zeiss)を用いて最適なイメージングパラメーターにおいて培養中で18時間にわたって7分ごとに獲得した。データを、Imaris(Bitplane)を使用して3Dレンダリングし、可視化した。LeA⁻細胞の殺滅パーセントを、総Ag⁻細胞(青色細胞)ならびに死/瀕死Ag⁻細胞(赤色および青色二重陽性)を自動的に定量するImageJ/FIJI(NIH)において作成したカスタムマクロを使用してすべての時点で決定した。

【0291】

遺伝子破壊

T細胞活性化を開始した48時間後、AgilePulse MAXシステム(Harvard Apparatus)を使用したCas9 mRNAおよびgRNAの電気泳動転写によって細胞にトランスフェクトした。3×10⁶個の細胞を5μgのCas9および5μgのgRNAと混合して0.2cmキュベットに入れた。電気穿孔後、細胞を培養培地に希釈し、37℃、5%CO₂でインキュベートした。TCR陰性T細胞を取得するために、TCR陽性T細胞を、gRNAトランスフェクションの3~5日後に磁気ビオチン抗TCRαβおよび抗ビオチンマイクロビーズならびにLSカラム(Miltenyi Biotech)を使用して除去した。TRAIL陰性細胞を取得するために、TRAIL陽性T細胞を、磁気PE-抗TRAIL(R&D、FAB687P)および抗PEマイクロビーズをLSカラム(Miltenyi Biotech)中で使用して除去した。DR5陰性細胞を取得するために、FACS選別を、PE-抗DR5染色を使用して実施した。

【0292】

TCRノックアウトに関して、TCR α および β をアSEMBルし細胞表面に所在させるために必要とされるTCR α 遺伝子の定常鎖 (TRAC) の第1のエクソンにおける配列を標的とするgRNAを、以前に記載されたように使用した⁴²。TRAILを、合成改変gRNAキット (Synthego) を使用して実施した。ガイドRNAを、cytoporationバッファー (Harvard Apparatus) 中 $1\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ で再構成した。Cas9 mRNAをTriLink Biotechnologiesによって合成した。

【0293】

膵臓がん腫瘍モデル

8~12週齢NOD/SCID/IL-2R γ -ヌル (NSG) 雄マウス (Jackson Laboratory) を、MSKCC動物実験委員会によって承認されたプロトコルに従って使用した。規定の比のLeA+およびLeA- FACS選別Capan2 PDAC腫瘍細胞を、IRB承認マウスプロトコルに従って、マウスを外科的に切開し膵臓を露出させた後、NSGマウスの膵臓に注射した。マウス1匹当たり50%マトリゲル中75,000個の腫瘍細胞を注射した。マウスを処置に対して無作為化し、処置群を、処置および腫瘍評価を実施する人員に対して盲検化した。腫瘍を膵臓において9日間定着させ、次いでマウスを、RTとそれに続くT細胞とを用いて処置した。腫瘍体積を、後眼窩D-ルシフェリン注射とそれに続くIVISイメージングとを使用して、生物発光イメージング (BLI) によって測定した。各マウスの腫瘍負荷を、処置の開始時のそのマウスのベースライン腫瘍BLIと比較して経時的に表した。

【0294】

T細胞イメージング

Gaussiaルシフェラーゼを含有するCAR T細胞を、後眼窩注射したセレンテラジン (3031-10 Coelenterazine-SOL in vivo, Nanolight) を使用してイメージングした。

【0295】

トランスクリプトーム解析

細胞をTrizol LS (Invitrogen) に溶解し、次いでRNA抽出のためにMSKCCのIntegrated Genomics Operationに提出した。バイオアナライザーにおけるribogreen定量および品質管理後、500ngの総RNAは、Truseq Stranded Total RNAライブラリー調製化学 (Illumina) を使用して6サイクルのPCRによりライブラリー調製を受けた。試料をバーコード化し、TruSeq SBSキットv3 (Illumina) を使用して50bp/50bpペアエンドランにおいてHiSeq2500 1Tにかけた。試料1つ当たり平均で5100万のペアリードが生成され、mRNA塩基のパーセントは平均して58%であった。

【0296】

出力されたFASTQデータファイルを、リードをゲノムマッピングしてスプライスジャンクションにわたるリードを解明するrnaStarアライナーを使用して、標的ゲノムにマッピングした。リードを2回マッピングする2パスマッピング法を使用した。1回目のマッピングパスは、Ensembleからの公知のアノテートされたジャンクションの一覧表を使用する。次いで、1回目のパスにおいて見出された新規ジャンクションを公知のジャンクションに追加し、2回目のマッピングパスを行う (2回目のパスに関してはRemoveNoncanonicalフラグを使用する)。マッピング後、出力されたSAMファイルを、PICARDツール、例えばリード群を追加するツール、すなわちファイルをさらに並べ替えて圧縮BAMフォーマットに変換するAddOrReplaceReadGroupsを使用して後処理した。マッピングされたリードからの発現カウントマトリックスを、HTSeq (www-huber-embl.de) およびいくつかの使用され得る遺伝子モデルデータベースのうち1つを使用して計算した。次いで、HTSeqによって生成した生カウントマトリックスを、完全データセットを正規化すること

と試料群間の差次的発現を解析することの両方のために使用するR/BioconductorパッケージDESeq (www-huber.embl.de) を使用して処理する。

【0297】

GSAに関してBioconductorパッケージPIANOを使用した(bioconductor.org)。正確なコールは、gsa.res<-runGSA(fc、geneSetStat='mean'、gsc=gsc、gsSizeLim=c(min.gns、max.gns)、nPerm=nPerm)であり、ここでfc==倍率変化、min.gns==5、max.gns==1000、nPerm==1e4である。遺伝子セットに関してはBroadからのMSigDbを使用した(software.broadinstitute.org)。以下のコレクションを使用した:「c1.all.v4.0.symbols.gmt」、「c2.all.v4.0.symbols.gmt」、「c3.all.v4.0.symbols.gmt」、「c5-1.all.v4.0.symbols.gmt」、「c6-1.all.v4.0.symbols.gmt」、「c7.all.v4.0.symbols.gmt」。

【0298】

統計

すべての実験データは平均±s.e.mとして表される。統計的方法は、試料サイズを予め決定するためには使用しなかった。群は対応のない両側t検定を使用して比較した。統計分析はGraphPad Prism7ソフトウェアにおいて実施した。

【0299】

本開示の主題の実施形態

前述の記載から、本開示の主題を様々な使用法および条件に採用するために、本開示の主題に対して変形および修正を行うことができることは明らかである。そのような実施形態もまた以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【0300】

本明細書中の変量の任意の定義における要素の列挙の記載は、その変量の定義を任意の単一の要素または列挙された要素の組合せ(もしくは部分的組合せ)として含む。本明細書中のある実施形態の記載は、その実施形態を任意の単一の実施形態または任意の他の実施形態もしくはその部分との組合せとして含む。

【0301】

本明細書で言及したすべての特許および刊行物は、独立した各特許および刊行物が参照により組み込まれることが具体的かつ個別的に指示される場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)であって、前記細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイスAへの結合について、参照抗体またはその抗原結合性部分と交差競合し、前記参照抗体またはその抗原結合性部分は、

配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2および配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む、キメラ抗原受容体(CAR)。

(項目2)

細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)であって、前記細胞外抗原結合性ドメインは、参照抗体またはその抗原結合性部分と同一の、シアリルルイスA上のエピトープに結合し、前記参照抗体またはその抗原結合性部分は、

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2 および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 を含む、キメラ抗原受容体 (C A R)。

(項目 3)

細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、前記細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A に特異的に結合し、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 またはその保存的改変および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 またはその保存的改変を含む、キメラ抗原受容体 (C A R)。

10

(項目 4)

前記細胞外抗原結合性ドメインが、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2 またはその保存的改変および配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2 またはその保存的改変を含む、項目 3 に記載の C A R。

(項目 5)

前記細胞外抗原結合性ドメインが、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1 またはその保存的改変および配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1 またはその保存的改変を含む、項目 3 または 4 に記載の C A R。

(項目 6)

細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、前記細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A に特異的に結合し、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2 および配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、キメラ抗原受容体 (C A R)。

20

(項目 7)

細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、前記細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A に特異的に結合し、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2 および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 を含む、キメラ抗原受容体 (C A R)。

30

(項目 8)

前記細胞外抗原結合性ドメインが、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2 および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 を含む、項目 3 から 7 のいずれか一項に記載の C A R。

(項目 9)

細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、前記細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A に特異的に結合し、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80 % 相同 (例えば、少なくとも約 80 % 同一) であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、キメラ抗原受容体 (C A R)。

40

(項目 10)

前記細胞外抗原結合性ドメインが、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、項目 9 に記載の C A R。

(項目 11)

細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、前記細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A に特異的

50

に結合し、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80 % 相同（例えば、少なくとも約 80 % 同一）であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、キメラ抗原受容体（CAR）。

（項目 12）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、項目 13 に記載の CAR。

（項目 13）

細胞外抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）であって、前記細胞外抗原結合性ドメインは、シアリルルイス A に特異的に結合し、

a) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80 % 相同（例えば、少なくとも約 80 % 同一）であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

b) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80 % 相同（例えば、少なくとも約 80 % 同一）であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、キメラ抗原受容体（CAR）。

（項目 14）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、項目 13 に記載の CAR。

（項目 15）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80 % 相同（例えば、少なくとも約 80 % 同一）であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 80 % 相同（例えば、少なくとも約 80 % 同一）であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、項目 13 または 14 に記載の CAR。

（項目 16）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、項目 13 から 15 のいずれか一項に記載の CAR。

（項目 17）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、一本鎖可変断片（scFv）を含む、項目 1 から 16 のいずれか一項に記載の CAR。

（項目 18）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、ヒト scFv を含む、項目 1 から 17 のいずれか一項に記載の CAR。

（項目 19）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、必要に応じて架橋される Fab を含む、項目 1 から 16 のいずれか一項に記載の CAR。

（項目 20）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、F(ab)₂ を含む、項目 1 から 16 のいずれか一項に記載の CAR。

（項目 21）

前記 scFv、Fab および F(ab)₂ のうち 1 つまたは複数が、異種配列との融合タンパク質中に含まれて、前記細胞外抗原結合性ドメインを形成する、項目 17 から 20 のいずれか一項に記載の CAR。

（項目 22）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、前記細胞外抗原結合性ドメインの重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間にリンカーを含む、項目 1 から 21 のいずれか一項に記載の CAR。

（項目 23）

前記細胞外抗原結合性ドメインが、前記細胞外抗原結合性ドメインの 5' 末端に共有結合

10

20

30

40

50

によって繋がるシグナルペプチドを含む、項目 1 から 22 のいずれか一項に記載の C A R。

(項目 24)

前記膜貫通ドメインが、C D 8 ポリペプチド、C D 28 ポリペプチド、C D 3 ζ ポリペプチド、C D 4 ポリペプチド、4-1 B B ポリペプチド、O X 40 ポリペプチド、I C O S ポリペプチド、C T L A-4 ポリペプチド、P D-1 ポリペプチド、L A G-3 ポリペプチド、2 B 4 ポリペプチド、B T L A ポリペプチド、合成ペプチド（免疫応答と関連するタンパク質をベースとしない）またはそれらの組合せを含む、項目 1 から 23 のいずれか一項に記載の C A R。

(項目 25)

前記細胞内ドメインが、少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達領域をさらに含む、項目 1 から 24 のいずれか一項に記載の C A R。

(項目 26)

前記少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達領域が、C D 28 ポリペプチド、4-1 B B ポリペプチド、O X 40 ポリペプチド、I C O S ポリペプチド、D A P-10 ポリペプチドまたはそれらの組合せを含む、項目 25 に記載の C A R。

(項目 27)

前記少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達領域が、C D 28 ポリペプチドを含む、項目 26 に記載の C A R。

(項目 28)

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、野生型 C D 3 ζ ポリペプチドまたは改変された C D 3 ζ ポリペプチドを含み、前記改変された C D 3 ζ ポリペプチドが、a) 免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (I T A M) のすべてもしくは一部を欠き、前記 I T A M が、I T A M 1、I T A M 2 および I T A M 3 であり、ならびに／または塩基性豊富ストレッチ (B R S) 領域のすべてもしくは一部を欠き、前記 B R S 領域が、B R S 1、B R S 2 および B R S 3 である、項目 1 から 27 のいずれか一項に記載の C A R。

(項目 29)

前記改変された C D 3 ζ ポリペプチドが、
 a) I T A M 2 もしくはその部分を欠き、必要に応じて、i) I T A M 3 もしくはその部分および／または i i) I T A M 1 もしくはその部分をさらに欠き、
 b) I T A M 1 もしくはその部分を欠き、必要に応じて、I T A M 3 もしくはその部分をさらに欠き、
 c) I T A M 3 もしくはその部分を欠き、
 d) I T A M 2 もしくはその部分の欠失を含み、必要に応じて、i) I T A M 3 もしくはその部分の欠失および／または i i) I T A M 1 もしくはその部分の欠失をさらに含み、
 e) I T A M 1 もしくはその部分の欠失を含み、必要に応じて、I T A M 3 もしくはその部分の欠失をさらに含み、ならびに／または
 f) I T A M 3 もしくはその部分の欠失を含む、項目 28 に記載の C A R。

(項目 30)

前記改変された C D 3 ζ ポリペプチドが、
 a) B R S 2 もしくはその部分を欠き、必要に応じて、i) B R S 3 もしくはその部分および／または i i) B R S 1 もしくはその部分をさらに欠き、
 b) B R S 1 もしくはその部分を欠き、必要に応じて、B R S 3 もしくはその部分をさらに欠き、
 c) B R S 3 もしくはその部分を欠き、ならびに／または
 d) B R S 1 もしくはその部分、B R S 2 もしくはその部分および B R S 3 もしくはその部分を欠き、
 e) B R S 2 もしくはその部分の欠失を含み、必要に応じて、i) B R S 3 もしくはその部分の欠失および／または i i) B R S 1 もしくはその部分の欠失をさらに含み、
 f) B R S 1 もしくはその部分の欠失を含み、必要に応じて、B R S 3 もしくはその部

10

20

30

40

50

分の欠失をさらに含み、

g) B R S 3もしくはその部分の欠失を含み、ならびに／または

h) B R S 1もしくはその部分、B R S 2もしくはその部分およびB R S 3もしくはその部分の欠失を含む、項目28または29に記載のC A R。

(項目31)

前記改変されたC D 3 ζポリペプチドが、I T A M 2、I T A M 3、B R S 2およびB R S 3を欠くか、または、I T A M 2、I T A M 3、B R S 2およびB R S 3の欠失を含む、項目28から30のいずれか一項に記載のC A R。

(項目32)

ヒンジ／スパーサー領域をさらに含み、前記ヒンジ／スパーサー領域が、必要に応じて、C D 8ポリペプチド、C D 2 8ポリペプチド、C D 3 ζポリペプチド、C D 4ポリペプチド、4－1 B Bポリペプチド、O X 4 0ポリペプチド、C D 1 6 6ポリペプチド、C D 1 6 6ポリペプチド、C D 8 aポリペプチド、C D 8 bポリペプチド、I C O Sポリペプチド、I C A M－1ポリペプチド、C T L A－4ポリペプチド、C D 2 7ポリペプチド、C D 4 0／M y 8 8ペプチド、N K G D 2ペプチドまたはそれらの組合せからなる群から選択される分子の天然または改変されたヒンジ／スパーサー領域であり、前記膜貫通ドメインが、C D 8ポリペプチド、C D 2 8ポリペプチド、C D 3 ζポリペプチド、C D 4ポリペプチド、4－1 B Bポリペプチド、O X 4 0ポリペプチド、C D 1 6 6ポリペプチド、C D 1 6 6ポリペプチド、C D 8 aポリペプチド、C D 8 bポリペプチド、I C O Sポリペプチド、I C A M－1ポリペプチド、C T L A－4ポリペプチド、C D 2 7ポリペプチド、C D 4 0／M y 8 8ペプチド、N K G D 2ペプチドまたはそれらの組合せからなる群から選択される分子の天然または改変された膜貫通ドメインである、項目1から31のいずれか一項に記載のC A R。

(項目33)

前記ヒンジ／スパーサー領域が、前記膜貫通ドメインが由来するものと同一の分子に由来する、項目32に記載のC A R。

(項目34)

a) C D 2 8ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域およびC D 2 8ポリペプチドの膜貫通ドメイン、

b) C D 8 4ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域およびC D 8 4ポリペプチドの膜貫通ドメイン、

c) C D 1 6 6ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域およびC D 1 6 6ポリペプチドの膜貫通ドメイン、

d) C D 8 aポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域およびC D 8 aポリペプチドの膜貫通ドメイン、または

e) C D 8 bポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域およびC D 8 bポリペプチドの膜貫通ドメイン

を含む、項目33に記載のC A R。

(項目35)

C D 1 6 6ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域およびC D 1 6 6ポリペプチドの膜貫通ドメインを含む、項目34に記載のC A R。

(項目36)

前記膜貫通ドメインおよび前記ヒンジ／スパーサー領域が、異なる分子に由来する、項目35に記載のC A R。

(項目37)

C D 2 8ポリペプチドのヒンジ／スパーサー領域およびI C O Sポリペプチドの膜貫通ドメインを含む、項目36に記載のC A R。

(項目38)

組換え発現されるか、またはベクターから発現される、項目1から37のいずれか一項に記載のC A R。

10

20

30

40

50

(項目 3 9)

前記ベクターが、レトロウイルスベクター（例えば、 γ -レトロウイルスベクター）である、項目 3 8 に記載の C A R。

(項目 4 0)

前記項目のいずれか一項に記載の C A R を含む免疫応答性細胞。

(項目 4 1)

前記 C A R を含む組成物（例えば、ベクター）を使用して改変される、項目 4 0 に記載の免疫応答性細胞。

(項目 4 2)

前記 C A R が、前記免疫応答性細胞の表面で構成的に発現される、項目 4 0 または 4 1 に記載の免疫応答性細胞。

10

(項目 4 3)

T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ヒト胚性幹細胞、リンパ球様前駆細胞、T 細胞前駆体細胞およびリンパ球様細胞が分化し得る多能性幹細胞からなる群から選択される、項目 4 0 から 4 2 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

(項目 4 4)

T 細胞である、項目 4 3 に記載の免疫応答性細胞。

(項目 4 5)

前記 T 細胞が、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）、制御性 T 細胞およびセントラルメモリー T 細胞からなる群から選択される、項目 4 4 に記載の免疫応答性細胞。

20

(項目 4 6)

項目 1 から 3 9 のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体（C A R）をコードする核酸（nucleic）配列を含む核酸分子。

(項目 4 7)

項目 4 6 に記載の核酸分子を含むベクター。

(項目 4 8)

レトロウイルスベクター（例えば、 γ -レトロウイルスベクター）である、項目 4 7 に記載のベクター。

(項目 4 9)

項目 4 7 もしくは 4 8 に記載のベクターを含む、または項目 4 6 に記載の核酸分子を発現する、宿主細胞。

30

(項目 5 0)

T 細胞である、項目 4 9 に記載の宿主細胞。

(項目 5 1)

シアリルルイス A に結合する免疫応答性細胞を生成するための方法であって、前記免疫応答性細胞中に、項目 1 から 3 9 のいずれか一項に記載の C A R をコードする核酸配列を含む核酸分子を導入することを含む、方法。

(項目 5 2)

項目 4 0 から 4 5 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞を含む組成物。

(項目 5 3)

医薬組成物であり、薬学的に許容される担体をさらに含む、項目 5 2 に記載の組成物。

40

(項目 5 4)

対象において悪性成長を処置または防止する方法であって、前記対象に有効量の項目 4 0 から 4 5 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞または項目 5 2 もしくは 5 3 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

(項目 5 5)

前記悪性成長が、膵臓がんである、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記対象において腫瘍負荷を低減または根絶する、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

50

前記対象がヒトである、項目54から56のいずれか一項に記載の方法。

(項目58)

前記対象を、前記投与の前に低線量の照射に曝露することをさらに含む、項目54から57のいずれか一項に記載の方法。

(項目59)

悪性成長を処置または防止するためのキットであって、項目40から45のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞を含み、必要に応じて、新生物を有する対象を処置するために前記免疫応答性細胞を使用するための指示書をさらに含む、キット。

(項目60)

前記悪性成長が、膵臓がんである、項目59に記載のキット。

10

【図面】

【図1-1】

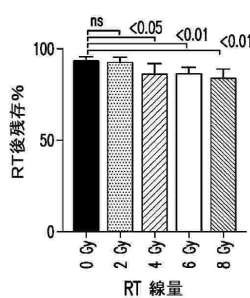


FIG. 1A

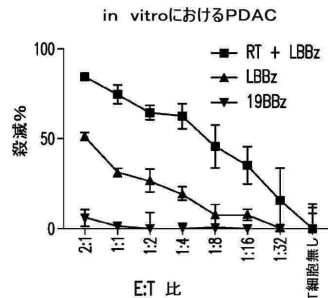


FIG. 1B

【図1-2】

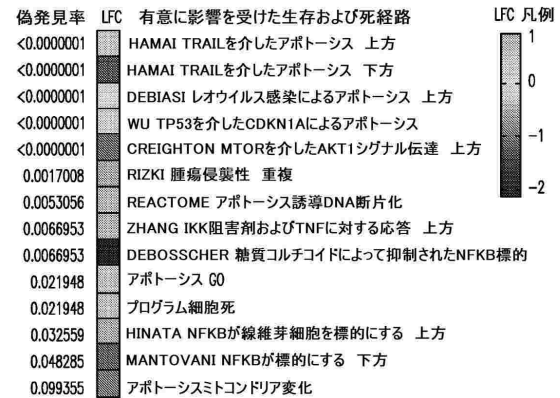


FIG. 1D

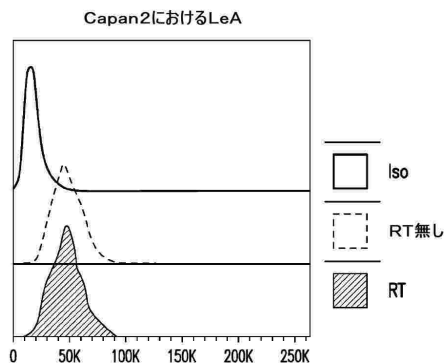


FIG. 1C

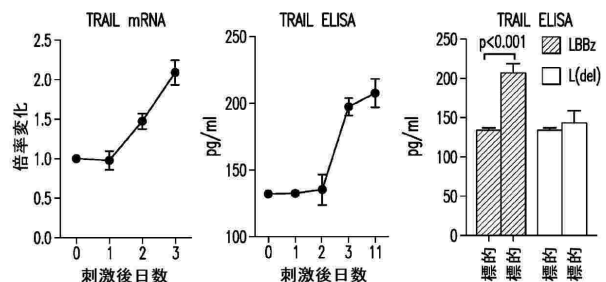


FIG. 1E

FIG. 1F

20

30

40

50

【図 2】

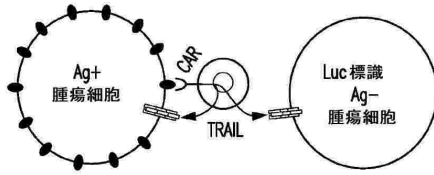


FIG. 2A

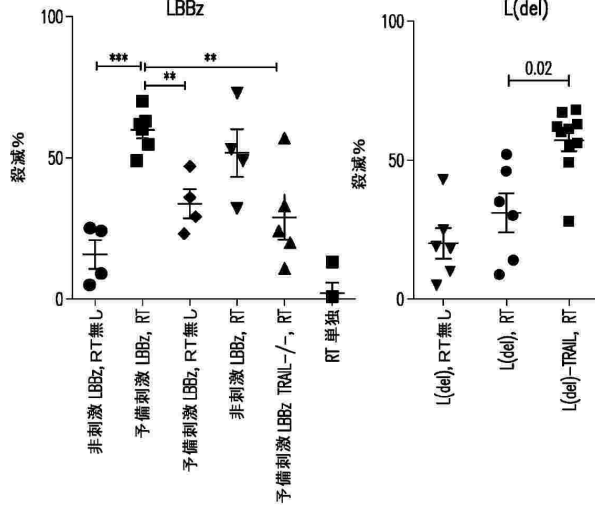


FIG. 2B

FIG. 2C

【図 3 - 1】

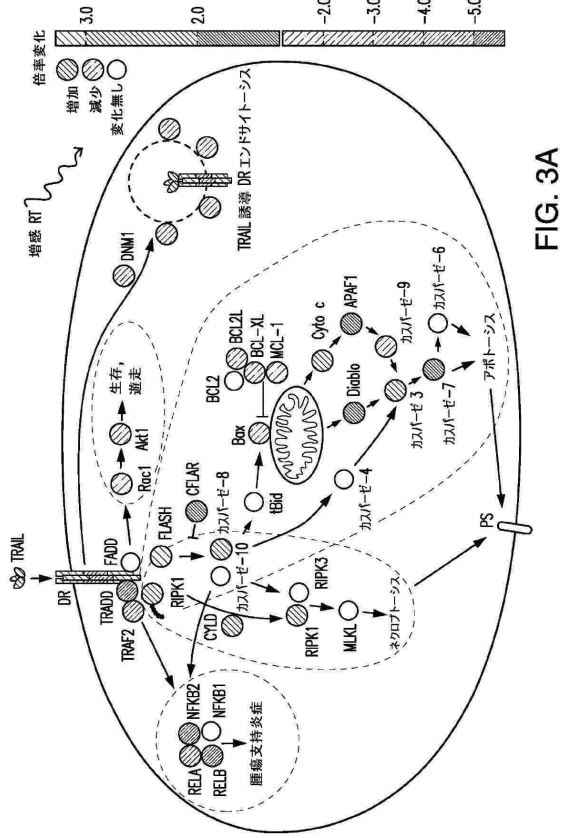


FIG. 3A

【図 3 - 2】

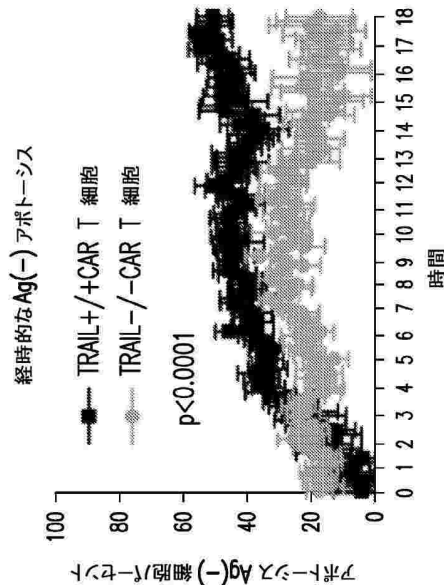
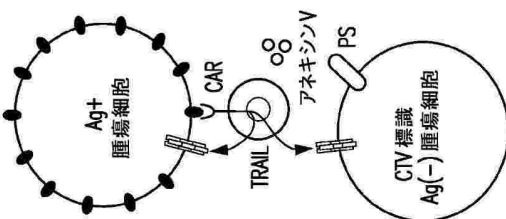


FIG. 3B



【図 4 - 1】

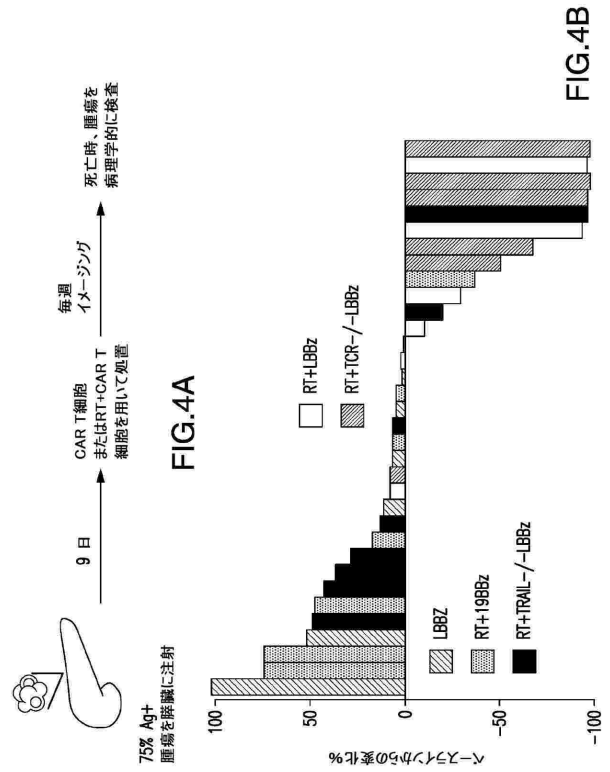


FIG. 4B

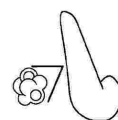


FIG. 4A

10

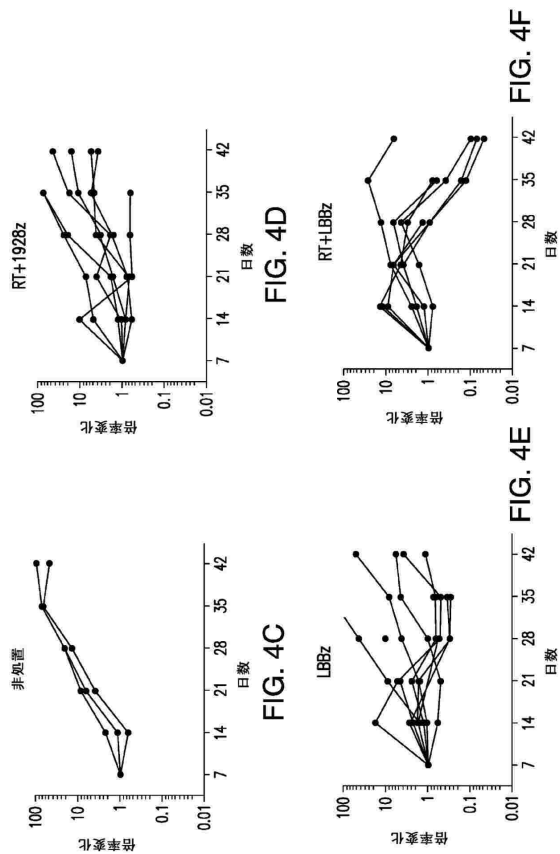
20

30

40

50

【図 4 - 2】



【図 4 - 3】

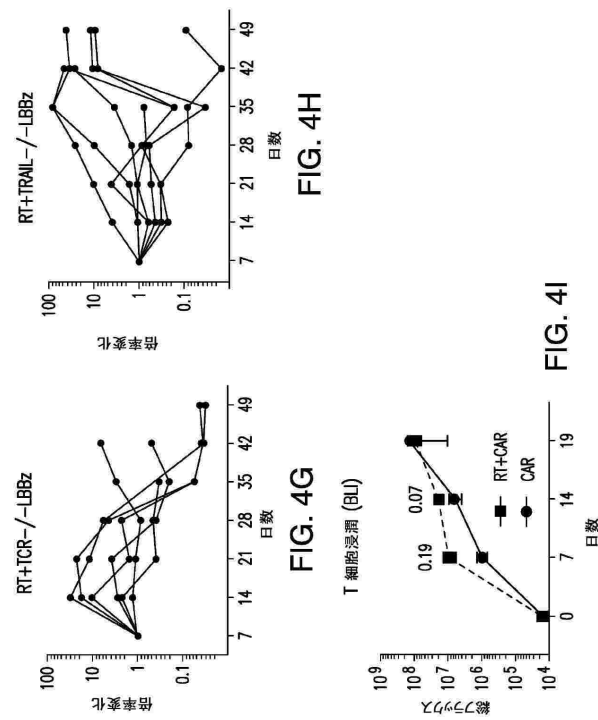
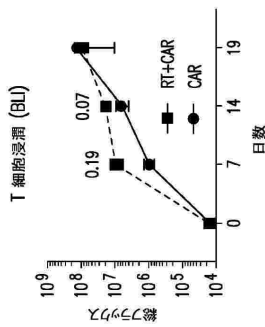
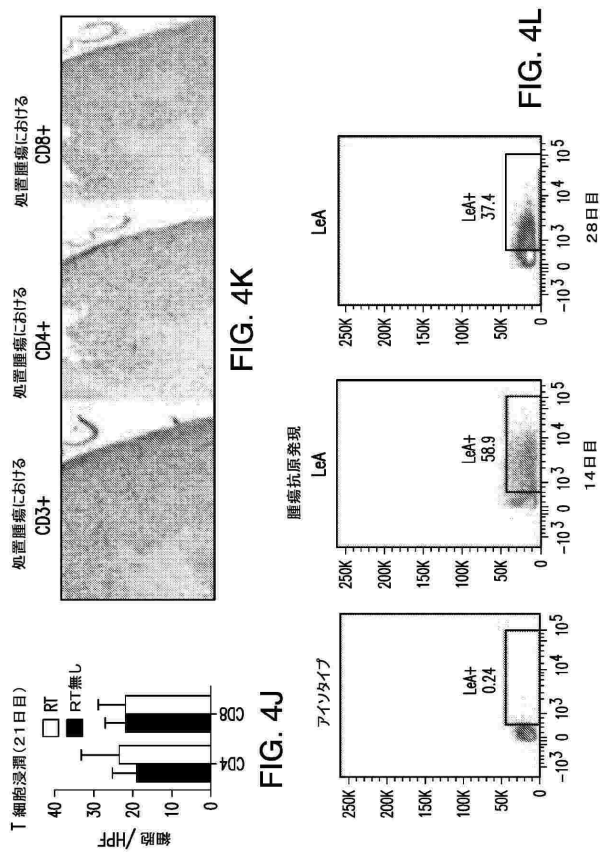


FIG. 4I



【図 4 - 4】



【図 4 - 5】

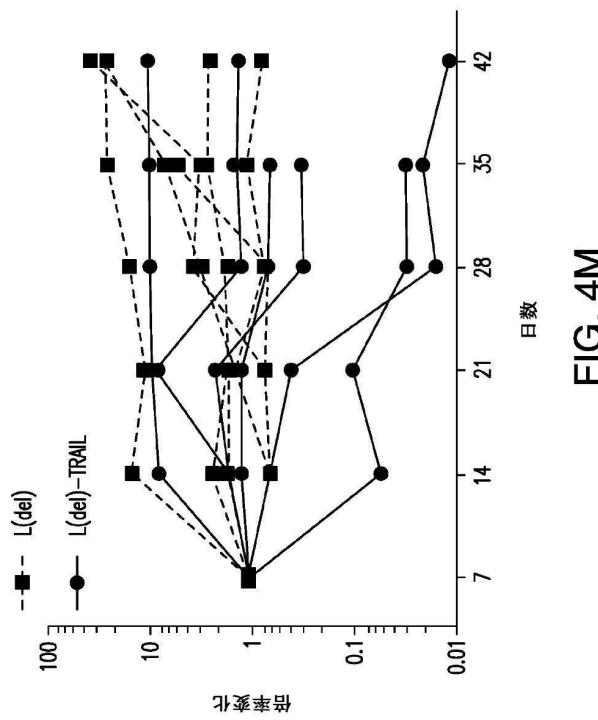


FIG. 4M

10

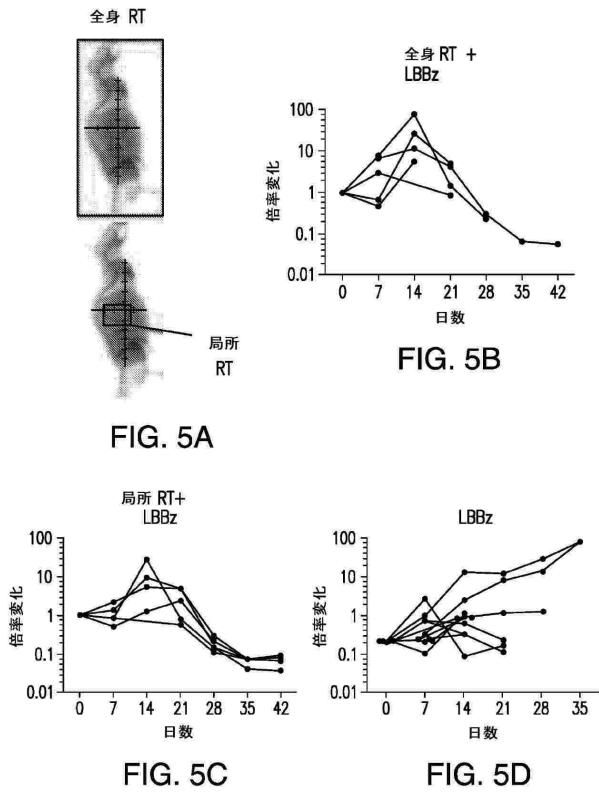
20

30

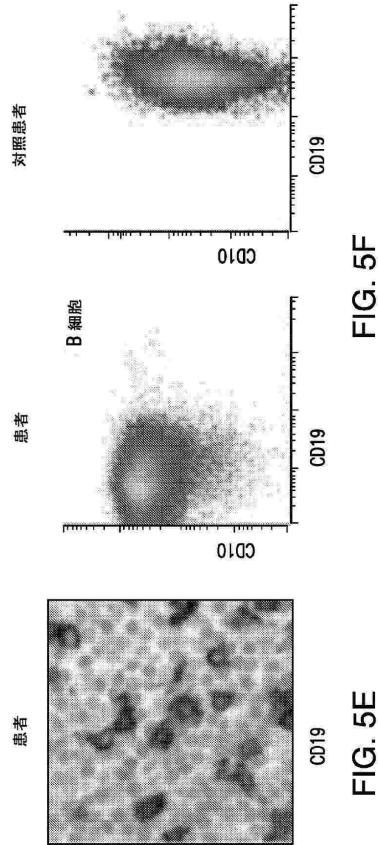
40

50

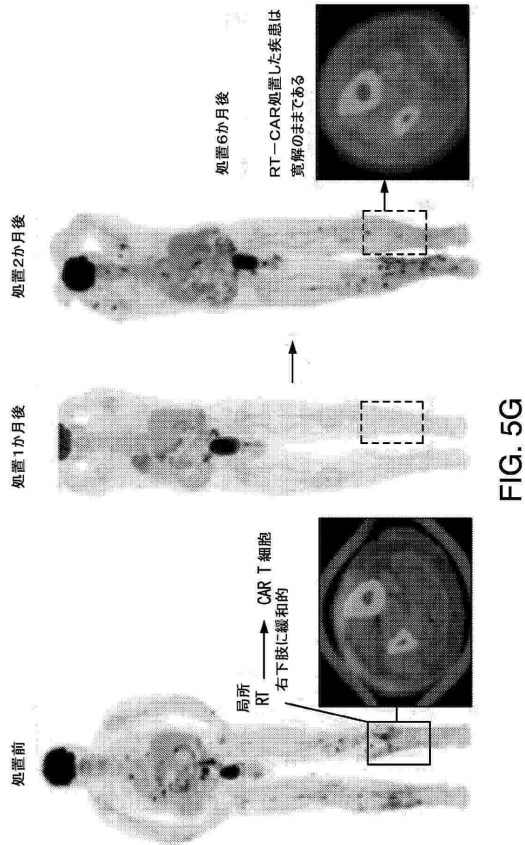
【図 5 - 1】



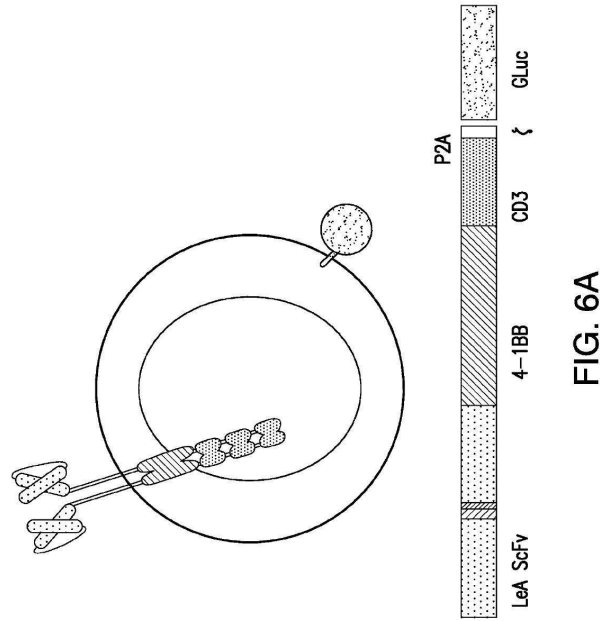
【図 5 - 2】



【図 5 - 3】



【図 6 - 1】



10

20

30

40

50

【図 6 - 2】

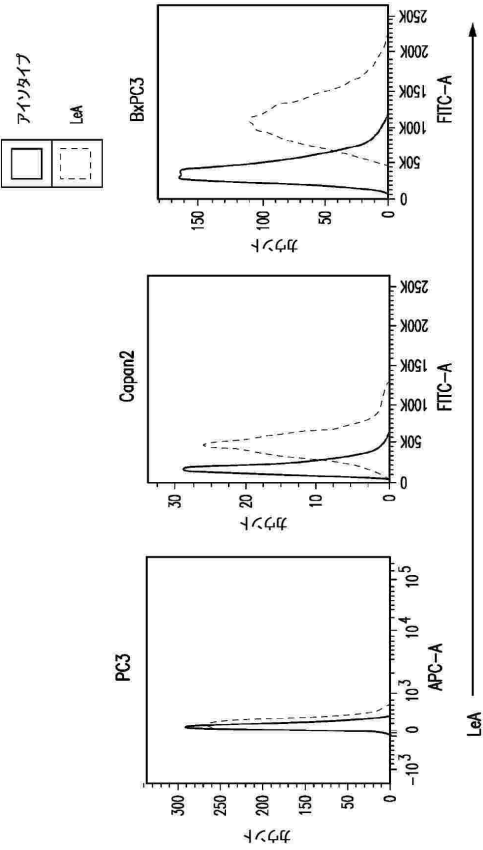


FIG. 6B

【図 6 - 3】

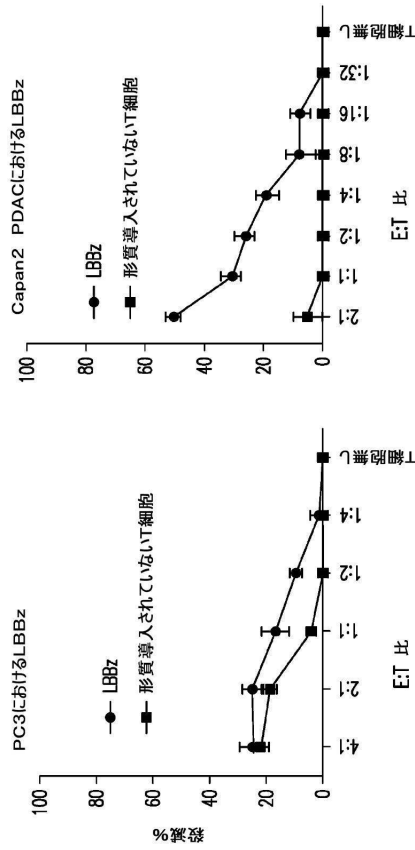


FIG. 6C

【図 6 - 4】

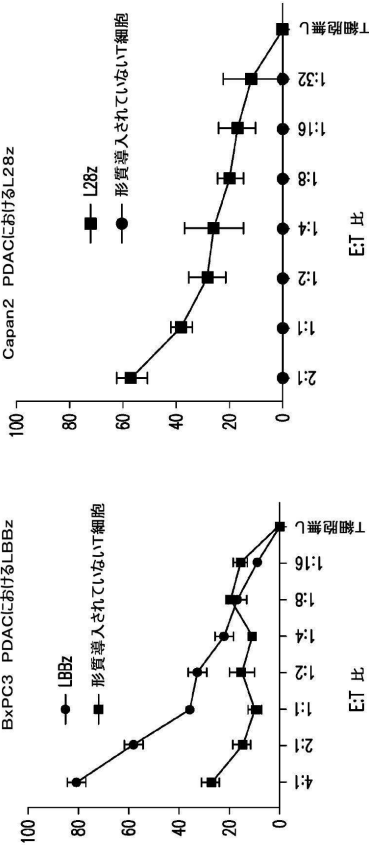


FIG. 6C 続き

【図 7】

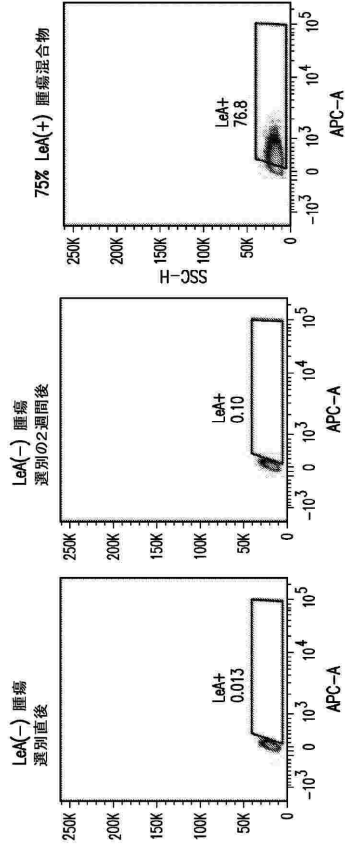


FIG. 7

【図 8】

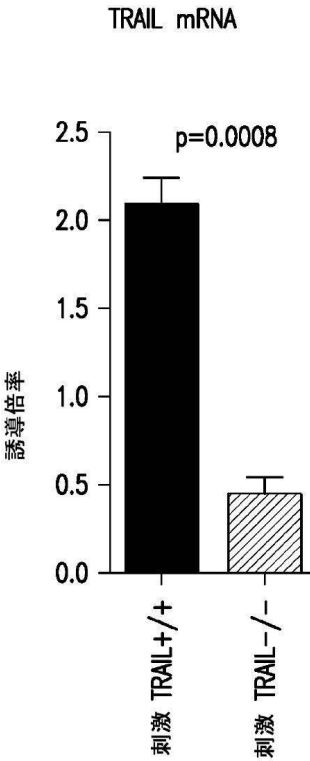


FIG. 8

【図 9】

遺伝子記号	遺伝子ID	倍率変化	調整P値
CYCS	ENSG00000172115.4	2.02	2.51E-18
CASP3	ENSG00000164305.13	1.73	1.28E-09
CYLD	ENSG00000083799.13	1.63	1.27E-08
CASP8	ENSG00000064012.17	1.47	5.40E-05
RIPK1	ENSG00000137275.9	1.44	4.26E-05
APAF1	ENSG00000120868.9	1.43	1.12E-04
CASP7	ENSG00000165806.15	1.38	1.57E-03
DIABLO	ENSG00000184047.11	1.34	3.77E-03
CFLAR	ENSG00000003402.14	1.27	1.64E-02
BCL2L13	ENSG00000099968.13	0.83	1.73E-02
MCL1	ENSG00000143384.8	0.82	2.28E-02
RAC1	ENSG00000136238.13	0.76	1.19E-04
CASP9	ENSG00000132906.13	0.69	4.37E-04
BCL2L12	ENSG00000126453.5	0.52	2.43E-06
BCL2L1	ENSG00000171552.8	0.50	2.73E-20
AKT1	ENSG00000142208.11	0.49	6.29E-07
BAX	ENSG00000087088.15	0.48	9.93E-10
TRAF2	ENSG00000127191.13	0.42	3.79E-05
DNM1	ENSG00000106976.14	0.35	6.30E-10
NFKBIB	ENSG00000104825.12	0.35	3.13E-07
NFKBIE	ENSG00000146232.10	0.33	2.19E-17
RELA	ENSG00000173039.14	0.33	2.17E-19
NFKBIL1	ENSG00000204498.6	0.29	1.94E-40
TRADD	ENSG00000102871.11	0.25	8.80E-42
NFKB2	ENSG00000077150.13	0.20	4.02E-29
RELB	ENSG00000104856.9	0.18	1.34E-58

FIG. 9

【図 10】

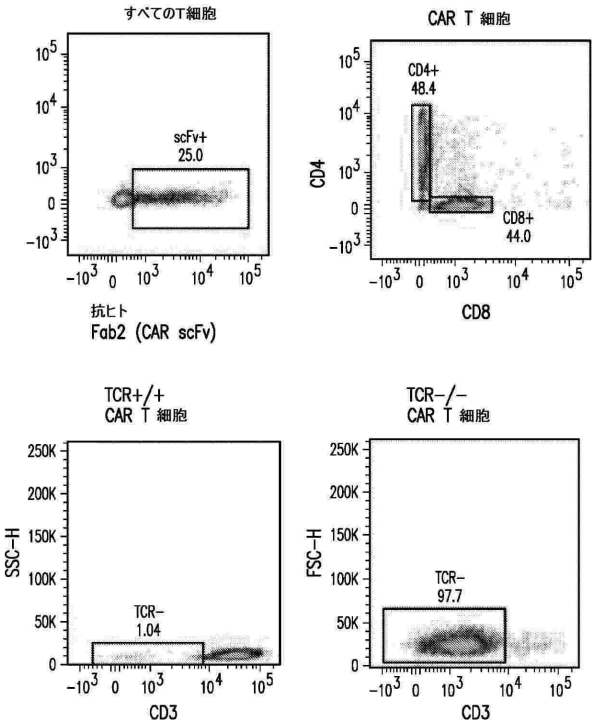


FIG. 10

【図 11】

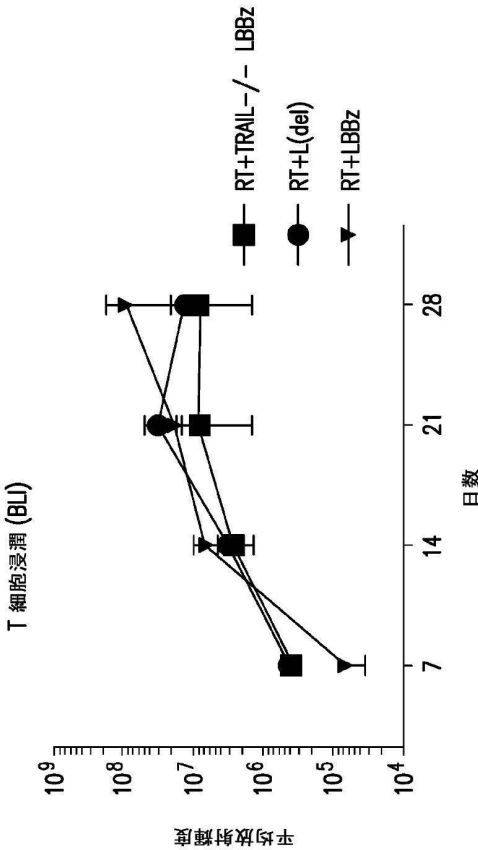
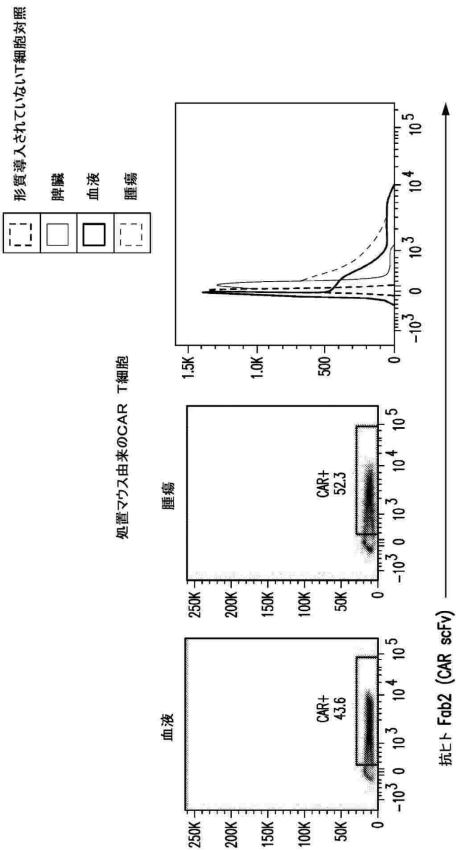
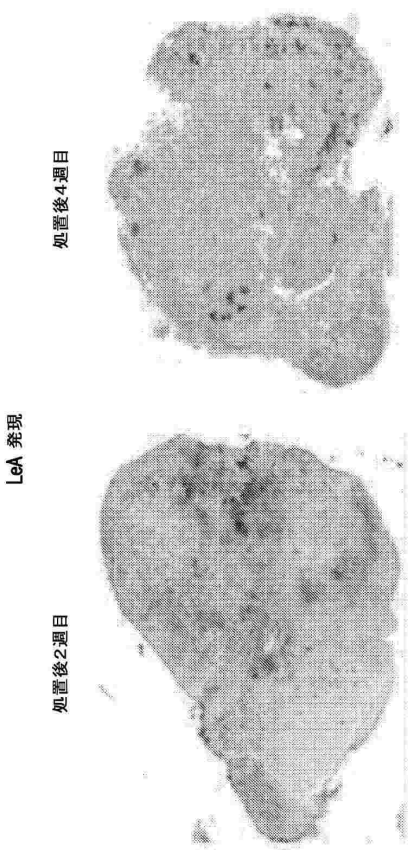


FIG. 11

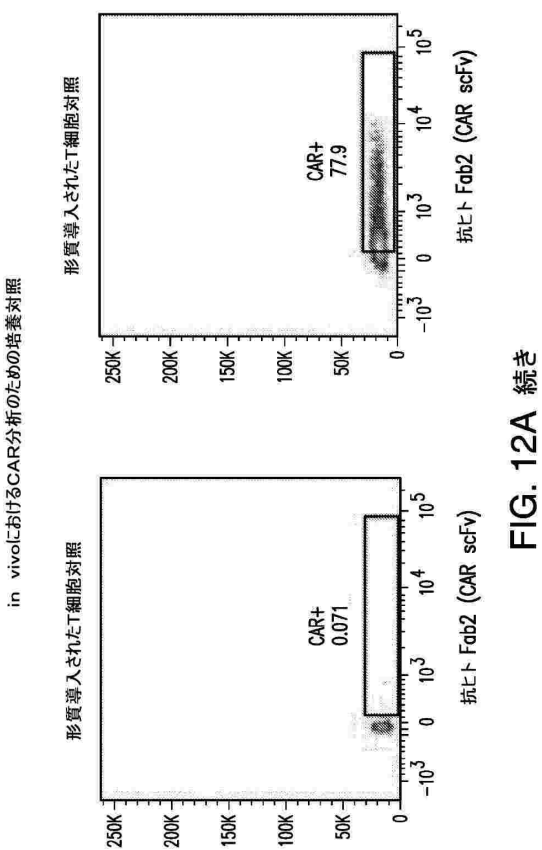
【図 1 2 - 1】



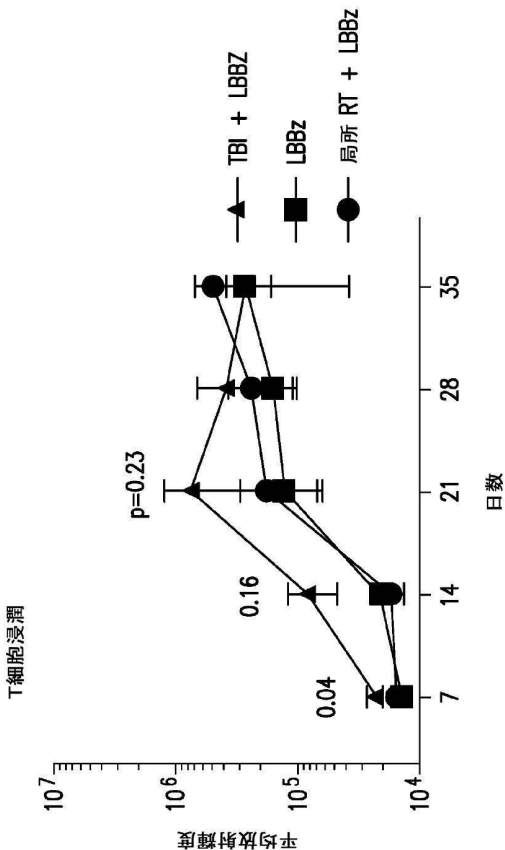
【図 1 2 - 3】



【図 1 2 - 2】



【図 1 3】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007672340000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/18	
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 サデレイン, マイケル
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10024, ニューヨーク, ウエスト 84ティーエイチ ストリート 15, アpartment 2シー

(72)発明者 ハンセン, ジェイ. デイビッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92026, エスコンディード, アルプス ウェイ 11657

審査官 坂井田 京

(56)参考文献 特表2017-513818 (JP, A)
特表2016-534735 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C07K 1/00 - 19/00
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)