

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-500882

(P2021-500882A)

(43) 公表日 令和3年1月14日(2021.1.14)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/62 (2006.01)	C 12 N 15/62	Z	4 B 0 6 4
C 07 K 19/00 (2006.01)	C 07 K 19/00	Z N A	4 B 0 6 5
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28		4 C 0 8 5
C 07 K 14/705 (2006.01)	C 07 K 14/705		4 C 0 8 7
C 12 N 15/13 (2006.01)	C 12 N 15/13		4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 114 頁) 最終頁に続く

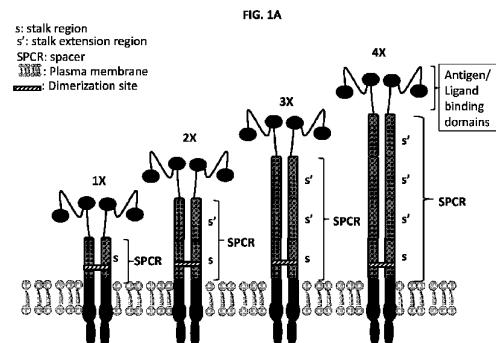
(21) 出願番号	特願2020-521861 (P2020-521861)	(71) 出願人	508087044 プレシゲン, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 バージニア州 2406 0, ブラックスバーグ, クラフト ドライ ブ 1750, スイート 1400
(86) (22) 出願日	平成30年10月17日 (2018.10.17)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(85) 翻訳文提出日	令和2年6月12日 (2020.6.12)	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(86) 國際出願番号	PCT/US2018/056334	(74) 代理人	100141195 弁理士 西澤 恵美子
(87) 國際公開番号	W02019/079486	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(87) 國際公開日	平成31年4月25日 (2019.4.25)		
(31) 優先権主張番号	62/574, 061		
(32) 優先日	平成29年10月18日 (2017.10.18)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】スペーサーを含むポリペプチド組成物

## (57) 【要約】

本明細書では、ストーク領域およびストーク伸長領域を含む抗原結合ポリペプチドを含む方法および組成物が開示される。一部の場合では、ストーク伸長領域を含む抗原結合組成物は、細胞表面上での発現を増加させ、一部の場合では、抗原結合効率を増加させた。対象の抗原結合ポリペプチドは、キメラ抗原受容体(CAR)であり得る。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

i ) 抗原結合領域、  
i i ) 膜貫通領域、および  
i i i ) 前記膜貫通領域を前記抗原結合領域と接続するスペーサー領域を含むキメラポリペプチドであって、前記スペーサー領域は、少なくとも1つの二量体化部位を含むストーク領域(複数可)、およびストーク伸長領域(s'-n)を含み、前記ストーク伸長領域は、前記ストーク領域と比較してより少ない二量体化部位を含む、キメラポリペプチド。

**【請求項 2】**

i ) 抗原結合領域、  
i i ) 膜貫通領域、および  
i i i ) 前記膜貫通領域を前記抗原結合領域と接続するスペーサー領域を含むキメラポリペプチドであって、前記スペーサー領域は、長さが約20～約60アミノ酸であり、少なくとも1つの二量体化部位を含むストーク領域、およびアミノ酸の数で測定した場合、前記ストーク領域の長さの約1倍から約5倍を含むストーク伸長領域を含む、キメラポリペプチド。

**【請求項 3】**

i ) 抗原結合領域、  
i i ) 膜貫通領域、および  
i i i ) 前記膜貫通領域を前記抗原結合領域と接続するスペーサー領域を含むキメラポリペプチドであって、前記スペーサー領域は、「s」で表されるストーク領域、および「s'-n」で表される少なくとも1つのストーク伸長領域を含み、nは、前記スペース領域にあるs'の単位数を表し、およびnは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20である、キメラポリペプチド。

**【請求項 4】**

少なくとも1つのストーク伸長領域が、前記ストーク領域の二量体化部位を除いて、前記ストーク領域と相同な配列を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

**【請求項 5】**

前記スペーサー領域が前記膜領域の近位にある、請求項1～4のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

**【請求項 6】**

前記スペーサー領域が前記膜領域の遠位にある、請求項1～4のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

**【請求項 7】**

細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

**【請求項 8】**

前記キメラポリペプチドが細胞内シグナル伝達ドメインを含まない、請求項1～6のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

**【請求項 9】**

前記ストーク伸長領域が、前記ストーク領域と比較して少なくとも1つ少ない二量体化部位を含む、請求項2～6のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

**【請求項 10】**

前記キメラポリペプチドが、前記ストーク伸長領域を欠くが、他の点では同一である抗原結合ポリペプチドと比較して、改善された機能的活性を有する、請求項1～9のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

**【請求項 11】**

10

20

30

40

50

前記キメラポリペプチドが、前記ストーク伸長領域を欠くが、他の点では同一であるポリペプチドと比較して、細胞表面上での発現が増加している、請求項1～10のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項12】

前記ストーク伸長領域が二量体化部位を欠いている、請求項1～11のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項13】

前記ストーク伸長領域の各々が約20～約60アミノ酸の長さであり、nが1、2、3または4である、請求項1～11のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項14】

前記ストーク伸長領域の各々が、前記ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有する、請求項13に記載のキメラポリペプチド。

【請求項15】

少なくとも1つの前記ストーク伸長領域が、前記ストーク領域と比較して少なくとも1つ少ない二量体化部位を含む配列を有する、請求項14に記載のキメラポリペプチド。

【請求項16】

前記ストーク伸長領域の各々が、前記ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有し、nが2である、請求項13～15のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項17】

前記ストーク伸長領域の各々が、前記ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有し、nが3である、請求項13～15のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項18】

前記ストーク伸長領域の各々が、前記ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有し、nが4である、請求項13～15のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項19】

前記ストーク伸長領域の各々が、前記ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有し、nが少なくとも5である、請求項13～15のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項20】

前記ストーク領域が、CD8アルファヒンジドメイン、CD28ヒンジドメインおよびCTLA-4ヒンジドメインのうちの少なくとも1つに対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の同一性を有する配列を含む、請求項1～19のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項21】

前記ストーク領域が、配列番号1に示される配列を有するCD8アルファヒンジドメインである、請求項20に記載のキメラポリペプチド。

【請求項22】

前記ストーク領域が、配列番号7に示される配列を有するCD28ヒンジドメインである、請求項20に記載のキメラポリペプチド。

【請求項23】

前記ストーク領域が、配列番号12に示される配列を有するCTLA-4ヒンジドメインである、請求項20に記載のキメラポリペプチド。

【請求項24】

前記キメラポリペプチドの鎖間二量体化が、システイン残基間の少なくとも1つのジスルフィド結合によって媒介される、請求項1～23のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項25】

10

20

30

40

50

前記抗原結合領域が C D 1 9 上のエピトープに結合する、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 2 6】

前記抗原結合領域が C D 3 3 上のエピトープに結合する、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 2 7】

前記抗原結合領域が、 C D 1 9 、 B C M A 、 C D 4 4 、 - 葉酸受容体、 C A I X 、 C D 3 0 、 R O R 1 、 C E A 、 E G P - 2 、 E G P - 4 0 、 H E R 2 、 H E R 3 、 葉酸結合タンパク質、 G D 2 、 G D 3 、 I L - 1 3 R - a 2 、 K D R 、 E D B - F 、 メソセリン、 C D 2 2 、 E G F R 、 葉酸受容体 、 ムチン、 M U C - 1 、 M U C - 1 6 、 G P C 3 、 C S P G 4 、 H E R 1 / H E R 3 、 H E R 2 、 C D 4 4 v 6 、 C D 4 4 v 7 / v 8 、 C D 2 0 、 C D 1 7 4 、 C D 1 3 8 、 L 1 - C A M 、 F A P 、 c - M E T 、 P S C A 、 C S 1 、 C D 3 8 、 I L - 1 1 R 、 E p h A 2 、 C L L - 1 、 M A G E - A 1 、 h 5 T 4 、 P S M A 、 T A G - 7 2 、 E G F R 、 C D 2 0 、 E G F R V I I I 、 C D 1 2 3 および V E G F - R 2 のうちの少なくとも 1 つ上のエピトープに結合する、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド

【請求項 2 8】

前記キメラポリペプチドがキメラ抗原受容体 ( C A R ) を含む、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 2 9】

前記 C A R が少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、請求項 2 8 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3 0】

前記少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメインが、 C D 2 7 、 C D 2 8 、 4 - 1 B B 、 I C O S 、 O X 4 0 、 D A P 1 0 、 D A P 1 2 、 C D 1 3 4 、 C D 3 - ゼータもしくはその断片またはその組合せに由来するシグナル伝達ドメインを含む、請求項 2 9 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3 1】

前記少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメインが、 4 - 1 B B 、 C D 2 8 またはそれらの組合せに由来するシグナル伝達ドメインを含む、請求項 2 9 または請求項 3 0 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3 2】

前記 C A R が、 C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインおよび C D 3 - ゼータをさらに含む、請求項 2 8 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3 3】

前記 C A R が C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3 4】

前記細胞内の細胞シグナル伝達ドメインが、 T 細胞、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞、細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) 、または調節性 T 細胞と相互作用する、請求項 7 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3 5】

前記キメラポリペプチドが、操作された T 細胞受容体 ( T C R ) を含む、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3 6】

前記操作された T C R が T C R である、請求項 3 5 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3 7】

前記操作された T C R が T C R である、請求項 3 5 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3 8】

前記抗原結合領域が、 N Y - E S O - 1 、タイチン、 M A R T - 1 、 H P V 、 H B V 、

10

20

30

40

50

M A G E - A 4、M A G E - A 1 0、M A G E A 3 / A 6、g p 1 0 0、M A G E - A 1、またはP R A M Eのうちの少なくとも1つ上のエピトープに結合する、請求項1～24および35～37のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項39】

請求項1～38のいずれか一項に記載のキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項40】

請求項39に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項41】

前記ベクターが、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項40に記載のベクター。 10

【請求項42】

前記ベクターがS l e e p i n g B e a u t yベクターである非ウイルスベクターである、請求項41に記載のベクター。

【請求項43】

請求項38～42のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む操作された(engineered)細胞。

【請求項44】

S l e e p i n g B e a u t yトランスポザーゼをさらに含む、請求項43に記載の操作された細胞。 20

【請求項45】

前記S l e e p i n g B e a u t yトランスポザーゼが、S B 1 1、S B 1 0 0 XまたはS B 1 1 0である、請求項44に記載の操作された細胞。

【請求項46】

前記操作された細胞が動物細胞である、請求項43～45のいずれか一項に記載の操作された細胞。

【請求項47】

前記動物細胞がヒト細胞である、請求項46に記載の操作された細胞。

【請求項48】

前記ヒト細胞がT細胞またはN K細胞である、請求項47に記載の操作された細胞。 30

【請求項49】

細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドをさらに発見する、請求項43～48のいずれか一項に記載の操作された細胞。

【請求項50】

抗原結合領域、膜貫通領域、ストーク領域およびストーク伸長領域を含むキメラ抗原受容体(C A R)であって、前記ストーク伸長領域は、前記ストーク領域に相同であり、前記ストーク領域に対して少なくとも1つのアミノ酸置換を含むキメラ抗原受容体。

【請求項51】

前記ストーク領域が、第2のC A Rの相同ストーク領域と二量体化することができる、請求項50に記載のC A R。 40

【請求項52】

前記ストーク伸長領域が二量体化することができない、請求項50～51のいずれか一項に記載のC A R。

【請求項53】

前記ストーク領域が前記膜貫通領域に接続されている、請求項50～52のいずれか一項に記載のC A R。

【請求項54】

前記抗原結合領域がs c F vを含む、請求項50～53のいずれか一項に記載のC A R。 50

【請求項55】

前記 s c F v が、 C D 1 9 、 B C M A 、 C D 4 4 、 - 葉酸受容体、 C A I X 、 C D 3 0 、 R O R 1 、 C E A 、 E G P - 2 、 E G P - 4 0 、 H E R 2 、 H E R 3 、 葉酸結合タンパク質、 G D 2 、 G D 3 、 I L - 1 3 R - a 2 、 K D R 、 E D B - F 、 メソセリン、 C D 2 2 、 E G F R 、 葉酸受容体 、 ムチン、 M U C - 1 、 G P C 3 、 C S P G 4 、 H E R 1 / H E R 3 、 H E R 2 、 C D 4 4 v 6 、 C D 4 4 v 7 / v 8 、 C D 2 0 、 C D 1 7 4 、 C D 1 3 8 、 L 1 - C A M 、 F A P 、 c - M E T 、 P S C A 、 C S 1 、 C D 3 8 、 I L - 1 1 R 、 E p h A 2 、 C L L - 1 、 M U C - 1 6 、 M A G E - A 1 、 h 5 T 4 、 P S M A 、 T A G - 7 2 、 E G F R 、 C D 2 0 、 E G F R v I I I 、 C D 1 2 3 または V E G F - R 2 上のエピトープに結合する、請求項 5 4 に記載の C A R 。

## 【請求項 5 6】

ストーク伸長領域 ( s ' - n ) であって、 n は 2 つ以上を含み、それにより第 1 のストーク伸長領域および第 2 のストーク伸長領域を含む、請求項 5 0 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の C A R 。

## 【請求項 5 7】

前記第 1 のストーク伸長領域は、前記第 2 のストーク伸長領域と相同である、請求項 5 6 に記載の C A R 。

## 【請求項 5 8】

前記第 1 のストーク伸長領域が、前記ストーク領域と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸残基置換を含む、請求項 5 6 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の C A R 。

## 【請求項 5 9】

前記第 1 のストーク伸長領域は、 C A R のストーク領域に二量体化することができない、請求項 5 6 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の C A R 。

## 【請求項 6 0】

前記第 2 のストーク伸長領域が、前記ストーク領域と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸残基置換を含む、請求項 5 6 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の C A R 。

## 【請求項 6 1】

前記第 2 のストーク伸長領域は、別のストーク伸長領域に二量体化することができない、請求項 5 6 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の C A R 。

## 【請求項 6 2】

第 3 のストーク伸長領域をさらに含む、請求項 5 6 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の C A R 。

## 【請求項 6 3】

第 4 のストーク伸長領域をさらに含む、請求項 6 2 に記載の C A R 。

## 【請求項 6 4】

5 つ以上のストーク伸長領域を含む、請求項 6 3 に記載の C A R 。

## 【請求項 6 5】

少なくとも 1 つのストーク伸長領域は、ジスルフィド結合を形成することができない、請求項 5 6 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の C A R 。

## 【請求項 6 6】

前記ストーク領域が、 C D 8 アルファヒンジドメイン、 C D 2 8 ヒンジドメインおよび C T L A - 4 ヒンジドメインのうちの少なくとも 1 つに対して少なくとも約 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % または 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 5 0 ~ 6 5 のいずれか一項に記載の C A R 。

## 【請求項 6 7】

前記ストーク領域が、 C D 8 アルファヒンジドメイン、 C D 2 8 ヒンジドメインまたは C T L A - 4 ヒンジドメインである、請求項 6 6 に記載の C A R 。

## 【請求項 6 8】

請求項 5 0 ~ 6 7 のいずれかに記載の C A R を発現する T 細胞または N K 細胞。

## 【請求項 6 9】

配列番号 5 3 ~ 6 8 として示される配列、または少なくとも 8 0 % の配列同一性を有す

10

20

30

40

50

るが、抗原結合能力を保持するその変異体を含む、請求項 50～67 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 70】

請求項 50～67 のいずれか一項に記載の C A R をコードする核酸配列。

【請求項 71】

配列番号 147～162 として示される配列、または少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95% または 99% の配列同一性を有するその変異体を含む、請求項 70 に記載の核酸配列。

【請求項 72】

請求項 70 または 71 に記載の核酸配列を含むベクター。

10

【請求項 73】

前記ベクターが、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、Sleeping Beauty ランスボゾンまたは非ウイルスベクターである、請求項 72 に記載のベクター。

【請求項 74】

請求項 64 に記載の T 細胞または N K 細胞を作製する方法であって、請求項 70 または 71 に記載の核酸配列を T 細胞または N K 細胞に導入するステップを含む方法。

【請求項 75】

前記 T 細胞がポイント・オブ・ケアの場で修飾され、増殖誘導 (propagation) および活性化を受けることなく、それを必要とする対象に投与される、請求項 74 に記載の方法。

20

【請求項 76】

前記 T 細胞が、少なくとも 0、1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30 日間またはそれより長い間刺激される、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 77】

前記 T 細胞が、少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 日間またはそれより長い間刺激される、請求項 74 に記載の方法。

30

【請求項 78】

前記 T 細胞が、少なくとも 7、14、21、28、35、42、49、56、63 日間またはそれより長い間刺激される、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 79】

請求項 72 または 73 のいずれか一項に記載のベクター；および  
請求項 68 に記載の T 細胞または請求項 68 に記載の N K 細胞；および薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤  
のうちの少なくとも 1 つを含む医薬組成物。

【請求項 80】

請求項 50～67 のいずれか一項に記載の C A R を含む細胞の集団。

【請求項 81】

対象における T 細胞媒介免疫応答を刺激する方法であって、前記対象と、C A R を発現するように遺伝子修飾された細胞の有効量を接触させることを含み、前記 C A R が請求項 50～67 のいずれか一項の C A R を含む、方法。

40

【請求項 82】

細胞表面上のキメラ抗原受容体 (C A R) の発現を増加させる方法であって、ストーク伸長ドメインを含むように前記 C A R をコードする核酸を操作し、それにより操作された C A R を生成することを含む方法。

【請求項 83】

キメラポリペプチドを発現する操作された T 細胞の拡大 (expansion) を増加させる方法であって、ストーク伸長ドメインを含むように前記キメラポリペプチドをコードする核酸を操作し、それにより操作された T 細胞を生成することを含む方法。

50

**【請求項 8 4】**

前記 C A R が、請求項 5 0 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の C A R を含む、請求項 8 2 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【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、2017年10月18日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 5 7 4 , 0 6 1 号明細書の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

**【0 0 0 2】**

配列表への参照

本出願は、A S C I I フォーマット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り本明細書に組み入れられる。前記 A S C I I コピーは、2018年10月11日に作成され、名称は 5 0 4 7 1 - 7 0 4 \_ 6 0 1 \_ S L . t x t であり、サイズは 3 4 4 , 0 2 2 バイトである。

**【背景技術】****【0 0 0 3】**

キメラポリペプチドなどの組換えポリペプチドは、研究、診断、製造および治療への応用に価値がある。確かに、キメラ抗原受容体 (C A R) および T 細胞受容体 (T C R) を使用した適応 T 細胞免疫療法は、腫瘍細胞の殺傷を成功裏に導くことが示されている。C A R などの抗原結合ポリペプチドを発現する修飾されたエフェクター細胞は、自己免疫障害およびがんなどの疾患および障害の治療に有用である。この革新的な技術をさらに発展させるために、細胞表面における C A R 発現を増加させ、および / または抗原結合効率を増加させる方法を考案することには価値がある。

20

**【0 0 0 4】**

参照による組み込み

本明細書において言及されているすべての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許、または特許出願が具体的であり、個別に参照により組み込まれることが示されたのと同程度に参照により本明細書に組み込まれる。

30

**【発明の概要】****【0 0 0 5】**

本明細書では、( i ) 抗原結合領域、( i i ) 膜貫通領域、および( i i i ) 前記膜貫通領域を前記抗原結合領域と接続するスペーサー領域を含むキメラポリペプチドが提供され、前記スペーサー領域は、少なくとも 1 つの二量体化部位を含むストーク領域 (複数可) 、およびストーク伸長領域 ( s ' - n ) を含み、前記ストーク伸長領域は、前記ストーク領域と比較してより少ない二量体化部位を含む。

**【0 0 0 6】**

本明細書では、( i ) 抗原結合領域、( i i ) 膜貫通領域、および( i i i ) 前記膜貫通領域を前記抗原結合領域と接続するスペーサー領域を含むキメラポリペプチドが提供され、前記スペーサー領域は、長さが約 2 0 ~ 約 6 0 アミノ酸であり、少なくとも 1 つの二量体化部位を含むストーク領域、およびアミノ酸の数で測定した場合、ストーク領域の長さの約 1 ~ 約 5 倍を含むストーク伸長領域を含む。

40

**【0 0 0 7】**

本明細書では、( i ) 抗原結合領域、( i i ) 膜貫通領域、および( i i i ) 前記膜貫通領域を抗原結合領域と接続するスペーサー領域を含むキメラポリペプチドが提供され、スペーサー領域は、「 s 」で表されるストーク領域、および「 s ' - n 」で表される少なくとも 1 つのストーク伸長領域を含み、n は、スペース領域にある s ' の単位数を表し、n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 2 0 であり得る。

50

## 【0008】

一部の実施形態では、キメラポリペプチドにおける少なくとも1つのストーク伸長領域は、ストーク領域の二量体化部位を除いて、ストーク領域と相同な配列を有する。一部の実施形態では、キメラポリペプチドにおけるスペーサー領域は、膜領域の近位にある。一部の実施形態では、キメラポリペプチドにおけるスペーサー領域は、膜領域の遠位にある。一部の実施形態では、キメラポリペプチドは、細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、キメラポリペプチドは、細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。

## 【0009】

一部の実施形態では、キメラポリペプチドのストーク伸長領域は、ストーク領域と比較して、少なくとも1つ少ない二量体化部位を含む。一実施形態では、キメラポリペプチドは、ストーク伸長領域を欠くが、他には同一である抗原結合ポリペプチドと比較して、改善された機能的活性を有する。他の実施形態では、キメラポリペプチドは、ストーク伸長領域を欠くが、他には同一であるポリペプチドと比較して、細胞表面における発現が増加している。別の実施形態では、ストーク伸長領域は二量体化部位を欠く。さらに別の実施形態では、ストーク伸長領域の各々は、約20から約60アミノ酸長であり、nは1、2、3または4である。さらに別の実施形態では、ストーク伸長領域は、ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有する。いくつかの場合では、キメラポリペプチドの少なくとも1つのストーク伸長領域は、ストーク領域と比較して少なくとも1つ少ない二量体化部位を含む配列を有する。一部の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有し、nは2である。別の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有し、nは3である。さらに別の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有し、nは4である。さらに別の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも約80%の同一性を有する配列を有し、nは少なくとも5である。

## 【0010】

一部の場合では、本明細書に提供されるキメラポリペプチドのストーク領域は、CD8アルファヒンジドメイン、CD28ヒンジドメインおよびCTL A-4ヒンジドメインのうちの少なくとも1つに対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、ストーク領域は、配列番号1に示される配列を有するCD8アルファヒンジドメインである。他の実施形態では、ストーク領域は、配列番号7に示される配列を有するCD28ヒンジドメインである。別の実施形態では、ストーク領域は、配列番号12に示される配列を有するCTL A-4ヒンジドメインである。

## 【0011】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるキメラポリペプチドの鎖間二量体化は、システイン残基間の少なくとも1つのジスルフィド結合によって媒介される。一部の実施形態では、キメラポリペプチドの抗原結合領域は、CD19上のエピトープに結合する。一部の実施形態では、キメラポリペプチドの抗原結合領域は、CD33上のエピトープに結合する。一部の実施形態では、キメラポリペプチドの抗原結合領域は、CD19、BCMA、CD44、-葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソセリン、CD22、EGFR、GPC3、CSPG4、HER1/HER3、HER2、CD44v6、CD44v7/v8、CD20、CD174、CD138、L1-CAM、FAP、c-MET、PSCA、CS1、CD38、IL-11R、EphA2、CLL-1、葉酸受容体、ムチン、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFR、CD20、EGFRVIII、CD123 VEGF-R2、NY-ESO-1、タイチン、MART-1、HPV、HBV、MAGE-A4、MAGE-A10、MAGE-A3/A6

10

20

30

40

50

、gp100、MAGE-A1、またはPRAMEのうちの少なくとも1つの上のエピトープに結合する。

#### 【0012】

一部の実施形態では、キメラポリペプチドは、キメラ抗原受容体（CAR）を含む。一部の実施形態では、CARは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、DAP10、DAP12、CD134、CD3-ゼータもしくはその断片または組合せからのシグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインは、4-1BB、CD28またはそれらの組合せからのシグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、CD28共刺激シグナル伝達ドメインおよびCD3-ゼータをさらに含む。一部の実施形態では、CARは、CD28共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、細胞内細胞シグナル伝達ドメインは、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、または調節性T細胞と相互作用する。10

#### 【0013】

一部の実施形態では、キメラポリペプチドは、操作された(engineered)T細胞受容体（TCR）を含む。一部の実施形態では、操作されたTCRはTCRである。一部の実施形態では、操作されたTCRはTCRである。一部の実施形態では、操作されたTCRの抗原結合領域は、CD19、BCMA、CD44、-葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソセリン、CD22、EGFR、GPC3、CSPG4、HER1/HER3、HER2、CD44v6、CD44v7/v8、CD20、CD174、CD138、L1-CAM、FAP、c-MET、PSCA、CS1、CD38、IL-11R、EphA2、CLL-1、葉酸受容体、ムチン、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFR、CD20、EGFRvIII、CD123、VEGF-R2、NY-ESO-1、タイチン、MART-1、HPV、HBV、MAGE-A4、MAGE-A10、MAGE-A3/A6、gp100、MAGE-A1、またはPRAMEのうちの少なくとも1つの上のエピトープに結合する。一部の実施形態では、操作されたTCRの抗原結合領域は、NY-ESO-1、タイチン、MART-1、HPV、HBV、MAGE-A4、MAGE-A10、MAGE-A3/A6、gp100、MAGE-A1、またはPRAMEのうちの少なくとも1つの上のエピトープに結合する。20

#### 【0014】

また、本明細書に記載されるキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。本明細書では、ポリヌクレオチドを含む発現ベクターが提供される。一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたは非ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、Sleeping Beautyベクターである非ウイルスベクターである。

#### 【0015】

さらに、本明細書に記載されるキメラポリペプチドをコードするポリペプチドを含む発現ベクターを含む操作された細胞が提供される。一部の場合では、操作された細胞は、Sleeping Beautyトランスポザーゼをさらに含む。一部の場合では、Sleeping Beautyトランスポザーゼは、SB11、SB100XまたはSB110である。一部の場合では、操作された細胞は動物細胞である。一部の場合では、動物細胞はヒト細胞である。一部の場合では、ヒト細胞はT細胞またはNK細胞である。一部の場合では、本明細書に記載される操作された細胞は、細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドをさらに発現する。40

#### 【0016】

抗原結合領域、膜貫通領域、ストーク領域およびストーク伸長領域を含むキメラ抗原受容体（CAR）が本明細書に提供され、ストーク伸長領域は、ストーク領域と相同であり

10

20

30

40

50

、ストーク領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、ストーク領域は、第2のCARの相同的なストーク領域と二量体化することができる。一部の実施形態では、ストーク伸長領域は二量体化することができない。一部の実施形態では、ストーク領域は膜貫通領域に接続されている。一部の実施形態では、抗原結合領域はscFvを含む。一部の実施形態では、scFvは、CD19、BCMA、CD44、-葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソセリン、CD22、GPC3、CSPG4、HER1/HER3、HER2、CD44v6、CD44v7/v8、CD20、CD174、CD138、L1-CAM、FAP、c-MET、PSCA、CS1、CD38、IL-11R、EphA2、CLL-1、EGFR、葉酸受容体、ムチン、MUC-1、MUC-16、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFR、CD20、EGFRvIII、CD123またはVEGFR2の上のエピトープに結合する。

#### 【0017】

一部の実施形態では、CARのストーク伸長領域は、s'-nで表され、nは2以上を含み、それにより、第1のストーク伸長領域および第2のストーク伸長領域を含む。一部の実施形態では、第1のストーク伸長領域は、第2のストーク伸長領域と相同である。一部の実施形態では、第1のストーク伸長領域は、ストーク領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸残基置換を含む。一部の実施形態では、第1のストーク伸長領域は、CARのストーク領域に二量体化(dimerizing to)することができない。一部の実施形態では、第2のストーク伸長領域は、ストーク領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸残基置換を含む。一部の実施形態では、第2のストーク伸長領域は、別のストーク伸長領域に二量体化することができない。一部の実施形態では、CARは、第3のストーク伸長領域をさらに含む。一部の実施形態では、CARは、第4のストーク伸長領域をさらに含む。一部の実施形態では、CARは、5つ以上のストーク伸長領域を含む。一部の実施形態では、CARにおける少なくとも1つのストーク伸長領域は、ジスルフィド結合を形成することができない。一部の実施形態では、ストーク領域は、CD8アルファヒンジドメイン、CD28ヒンジドメイン、CTLA-4ヒンジドメインのうちの少なくとも1つに対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、ストーク領域は、CD8アルファヒンジドメイン、CD28ヒンジドメインまたはCTLA-4ヒンジドメインである。

#### 【0018】

一部の場合では、T細胞またはNK細胞は、本明細書に記載されるCARを発現する。一部の場合では、CARは、配列番号53～68として示される配列、または少なくとも80%の配列同一性を有するが、抗原結合能力を保持するその変異体を含む。

#### 【0019】

本明細書では、ここに記載されるCARをコードする核酸配列が提供される。一部の場合では、核酸配列は、配列番号147～162として示される配列、または少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の配列同一性を有するその変異体を含む。

#### 【0020】

本明細書では、ここに記載されるCARをコードする核酸配列を含むベクターが提供される。一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、Sleeping Beautyトランスポゾンまたは非ウイルスベクターである。

#### 【0021】

本明細書では、T細胞またはNK細胞を作製する方法が提供され、この方法は、ここに記載されるCARをコードする核酸配列をT細胞またはNK細胞に導入するステップを含む。一部の実施形態では、T細胞は、ポイント・オブ・ケアの場で修飾され、増殖誘導(propagation)および活性化を受けることなしに、それを必要とする対象に投与される。

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、T細胞は、少なくとも0、1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30日またはそれを超えて刺激される。一部の実施形態では、T細胞は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60日またはそれを超えて刺激される。一部の実施形態では、T細胞は、少なくとも7、14、21、28、35、42、49、56、63日またはそれを超えて刺激される。

#### 【0022】

本明細書では、ここに記載されるCARをコードする核酸配列を含むベクター；およびここに記載されるCARを発現するT細胞またはNK細胞；および薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤のうちの少なくとも1つを含む医薬組成物が提供される。

10

#### 【0023】

本明細書では、ここに記載されるCARを含む細胞の集団が提供される。

#### 【0024】

本明細書では、対象におけるT細胞媒介性免疫応答を刺激する方法であって、ここに記載されるCARを発現するように遺伝子修飾された有効量の細胞と対象を接触させることを含む方法が提供される。

#### 【0025】

本明細書では、細胞表面上のキメラ抗原受容体(CAR)の発現を増加させる方法であって、ストーク伸長ドメインを含むように、CARをコードする核酸を操作し、それにより操作されたCARを生成することを含む方法が提供される。

20

#### 【0026】

本明細書では、キメラポリペプチドを発現する操作されたT細胞の拡大(expansion)を増加させる方法であって、ストーク伸長ドメインを含むように、キメラポリペプチドをコードする核酸を操作し、それにより操作されたT細胞を生成することを含む方法が提供される。

#### 【0027】

本開示の特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本開示の特徴および利点のよりよい理解は、本開示の原理が利用される例示的な実施形態を説明する以下の詳細な説明および添付の図面を参照することによって得られる。

#### 【図面の簡単な説明】

30

#### 【0028】

【図1A】図1Aは、ストークおよび様々な数のストーク伸長領域(s'-1、s'-2、s'-3)を組み込んでいるスペーサーを有するポリペプチドの図を示す。図1Bは、ストーク、および様々な数のストーク伸長領域(s'-1、s'-2、s'-3)を組み込んでいるスペーサーを有するポリペプチドの図を示す。図はまた、例示的な二量体化部位を示す。

#### 【図1B】同上。

【図2A】図2Aは、様々なスペーサー長を有する、キメラ抗原受容体などの例示的なポリペプチドの図を示す。図2Bは、様々なスペーサー長を有する、キメラ抗原受容体などの例示的なポリペプチドの図を示す。この例示は、ストーク、および1つ、2つ、または3つのストーク伸長領域を組み込む、スペーサーを有するキメラ抗原受容体を示す。

40

#### 【図2B】同上。

【図3A】図3A～3Bは、エクスピボ培養において様々なスペーサー長のCARを発現するCD19-CAR-T細胞の拡大を示す例示的なデータを示す。図3Aは、Sleeping Beauty修飾されたCD19-CAR-T細胞が、表面上にCD19抗原を発現する活性化および増殖誘導細胞(AAPC)の存在下、エクスピボで増殖誘導されたことを示す。1つ、2つ、または3つのストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー(CD8-2X、CD8-3XおよびCD8-4X)を有するCARを発現するCAR-T細胞は、CD8ストークを組み込んでいるスペーサーを有するCARと比較して、同様の増殖能を示した。CD8-3Xと比較して、ストーク伸長領域におけるアミノ酸置換を

50

含むストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー CD 8 - 3 X v 2 を有する CAR を発現する T 細胞は、エクスピボで拡大することができなかった。図 3 B は、CD 8 ヒンジストークを組み込んでいるスペーサー (CD 8 - 1 X ) を有する CD 19 CAR と比較して、2 つのストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー (CD 8 - 3 X ) を有する CD 19 CAR のより高い発現 (MFI) を示す。

【図 3 B】同上。

【図 4】図 4 は、ウエスタンプロット分析によって測定された、T 細胞における様々なスペーサー長の CD 19 特異的 CAR の発現を示す。

【図 5】図 5 A ~ 5 B は、様々なスペーサー長を有する CD 19 - CAR を発現する T 細胞が、CD 19 を発現する標的細胞に対して特異的な細胞毒性効果を発揮し得ることを示す。図 5 A は、様々なエフェクター細胞対標的細胞 (E : T) の比で CD 19 (K 562 / CD 19) 抗原を発現するように操作された K 562 細胞株に対して、様々なスペーサー長を有する CD 19 - CAR を発現する T 細胞の細胞傷害活性を示す。1 つ、2 つ、または 3 つのストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー (CD 8 - 2 X, CD 8 - 3 X および CD 8 - 4 X ) を有する CAR を発現する T 細胞は、10 : 1 の E : T 比で同様の細胞毒性を発揮し、CD 8 ヒンジストークのみを有するスペーサー (CD 8 - 1 X ) を組み込んでいる CAR を発現する T 細胞と比較して、K 562 / CD 19 細胞株のより低い E : T 比で細胞毒性を改善した。図 5 B は、CD 19 陰性 K 562 または EL 4 細胞株、ならびに CD 19 陽性 K 562 / CD 19 細胞株に対する、10 : 1 の E : T 比で、様々なスペーサー長を有する CD 19 - CAR を発現する T 細胞の細胞毒性応答を示す。1 つ、2 つ、または 3 つのストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー (CD 8 - 2 X, CD 8 - 3 X および CD 8 - 4 X ) を有する CD 19 - CAR を発現する T 細胞は、CD 8 ヒンジストーク (CD 8 - 1 X ) を有する CAR を発現する T 細胞と比較して、K 562 / CD 19 細胞株に対して同様の細胞毒性効果を発揮した。しかしながら、伸長されたストーク長の領域 (CD 8 - 2 X, CD 8 - 3 X および CD 8 - 4 X ) を有する CAR を発現する T 細胞は、CD 19 陰性 K 562 および EL 4 細胞株の非特異的細胞毒性の低下を示した。

【図 6】図 6 A ~ 6 C は、様々なスペーサー長を有する CD 19 - CAR を発現する T 細胞が、CD 19 抗原を発現する細胞に応答してサイトカインを生成する能力を示す。CD 19 陰性細胞株 (K 562 および EL 4 ) に応答して放出されるサイトカインのレベルは検出することができないか、または非常に低い、CD 19 抗原に対する CD 19 CAR - T 細胞の特異性が示された。図 6 A は、1 つ、2 つまたは 3 つのストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー (CD 8 - 2 X, CD 8 - 3 X および CD 8 - 4 X ) を有する CD 19 特異的 CAR を発現する T 細胞が、10 : 1 の E : T 比で CD 19 陽性 K 562 / CD 19 細胞株とともに培養した場合、CD 8 ヒンジストーク (CD 8 - 1 X ) を有する CAR を発現する T 細胞と比較して、IFN サイトカインの放出の増大を示したことを示す。図 6 B は、1 つ、2 つまたは 3 つのストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー (CD 8 - 2 X, CD 8 - 3 X および CD 8 - 4 X ) を有する CD 19 特異的 CAR を発現する T 細胞が、10 : 1 の E : T 比で CD 19 陽性 K 562 / CD 19 細胞株とともに培養した場合、CD 8 ヒンジストークを有するが、ストーク伸長領域を有しない (CD 8 - 1 X ) CAR を発現する T 細胞と比較して、TNF サイトカインの放出の増大を示したことを示す。図 6 C は、1 つ、2 つまたは 3 つのストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー (CD 8 - 2 X, CD 8 - 3 X および CD 8 - 4 X ) を有する CD 19 特異的 CAR を発現する T 細胞が、10 : 1 の E : T 比で CD 19 陽性 K 562 / CD 19 細胞株とともに培養した場合、CD 8 ヒンジストーク (CD 8 - 1 X ) を有する CAR を発現する T 細胞と比較して、グランザイム B サイトカインの放出の増大を示したことを示す。

【図 7 A】図 7 A は、a APC における連続的なラウンドの刺激後の様々なスペーサー長を有する ROR - 1 CAR の発現データを示す。図 7 B は、a APC における連続ラウンドの刺激後の様々なスペーサー長を有する ROR - 1 CAR の発現データを示す。デ

10

20

30

40

50

ータから分かるように、ストーク伸長領域の組み込みは、発現の改善をもたらした。

【図 7 B】同上。

【図 8】図 8 A は、CD107a 発現および IFN 放出によって測定された、様々なスペーサー長を有する ROR-1 CAR を発現する T 細胞の脱顆粒を測定するための機能的活性アッセイからの例示的なデータを示す。図 8 B は、CD107a 発現および IFN 放出によって測定された、様々なスペーサー長を有する CAR を発現する T 細胞の脱顆粒を測定するための機能的活性アッセイからの例示的なデータを表す。

【図 9】図 9 は、T 細胞の表面上の様々なスペーサー長を有する CD33 特異的 CAR の発現を示す。ヒト PBMC は、1つ、2つまたは3つのストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー (CD8-2X、CD8-3X および CD8-4X) を有する CD33 特異的 CAR をエンコードする Sleeping Beauty ランスボゾンでエレクトロポレーションされ、CAR-T 細胞のエクスピボ増殖のために、CD33 抗原を発現する APC とともに共培養された。CD33 特異的 CAR の発現は、CD33-Fc タンパク質を用いたフローサイトメトリーによって測定された。2つまたは3つのストーク伸長領域を組み込んでいるスペーサー (CD8-3X および CD8-4X) を有する CD33 特異的 CAR は、CD8 ヒンジストーク (CD8-1X) を有する CD33 特異的 CAR と比較すると、7日目に発現および CAR-T 細胞増殖の改善を示した。

【図 10 A】図 10 A は、ストーク（複数可）、および様々な数のストーク伸長領域 (s'-1、s'-2) を組み込むスペーサーを有する操作された T 細胞受容体 (TCR) の図を示す。図 10 B は、ストーク（複数可）、および様々な数のストーク伸長領域 (s'-1、s'-2) を組み込むスペーサーを有する操作された T 細胞受容体 (TCR) の図を示す。図はまた、ジスルフィド結合を介した例示的な二量体化部位を示す。

【図 10 B】同上。

【図 11 A】図 11 A は、aAPC におけるあるラウンドの刺激後の様々なスペーサー長を有する、EGFRVII に特異的な MR1-1 および huMR1-1 CAR の発現データを示す。図 11 B は、aAPC における3ラウンドの刺激後の様々なスペーサー長を有する、EGFRVII に特異的な MR1-1 および huMR1-1 CAR の発現データを示す。データから分かるように、ストーク伸長領域の組み込みは、発現の改善をもたらした。図 11 C ~ D は、CAR+T 細胞の総数、および連続ラウンドの aAPC 刺激後の様々なスペーサーを有する huMR1-1 CAR+T 細胞の倍数拡大を示す。図 11 E は、ユーロピウム放出アッセイによって測定された、様々なスペーサーを有する huMR1-1 CAR+T 細胞を発現する T 細胞の細胞毒性活性を測定する例示的なデータを示す。

【図 11 B】同上。

【図 11 C】同上。

【図 11 D】同上。

【発明を実施するための形態】

【0029】

開示の詳細な説明

他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、請求される主題が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。詳細な説明は、例示的であり、説明的なものにすぎず、主張されるいかなる主題も制限するものではないことを理解されたい。本出願では、特に他に記述がない限り、単数形の使用には複数形が含まれる。本明細書において使用する場合、単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」、および「その (the)」は、文脈が明確に他のことを指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。本出願では、他に記述がない限り、「または」の使用は「および / または」を意味する。さらに、「含んでいる (including)」という用語ならびに「含む (include)」、「含む (includes)」および「含まれる (included)」などの他の形態の使用は、限定的ではない。

【0030】

10

20

30

40

50

本明細書において使用されるセクションの見出しあは、組織化の目的のみのためであり、記載された主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0031】

様々な特徴を单一の実施形態との関連で説明することはできるが、これらの特徴は、別個にまたは任意の適切な組合せで提供することもできる。逆に、本開示は、明確にするために別個の実施形態との関連で本明細書において説明することができるが、単一の実施形態において実行することもできる。

【0032】

本明細書における「一部の実施形態」、「実施形態」、「一実施形態」または「他の実施形態」への言及は、実施形態に関連して説明された特定の特徴、構造、または特性が少なくとも一部の実施形態に含まれるが、必ずしも、本明細書に記載されたすべての実施形態ではないことを意味する。

10

【0033】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、用語「含んでいる（comprising）」（ならびに「含む（comprise）」および「含む（comprises）」などの「含んでいる」の任意の形態）、「有している（having）」（ならびに「有する（have）」および「有する（has）」などの「有している」の任意の形態）、「含んでいる（including）」（ならびに「含む（includes）」および「含む（include）」などの「含んでいる」の任意の形態）、または「含んでいる（containing）」（ならびに「含む（contains）」および「含む（contain）」などの「含んでいる」の任意の形態）は、包括的または制限がなく、追加の、列挙されていない要素または方法のステップを除外しない。本明細書において検討されている任意の実施形態は、本明細書に記載される任意の方法または組成物に関して実行され得、逆もまた同様であることが企図される。さらに、本明細書に記載される組成物は、本明細書に記載される方法を達成するために使用され得る。

20

【0034】

本明細書において使用する場合、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表すことができる。約はまた正確な量も含む。したがって、「約5μL」は、「約5μL」および「5μL」を意味する。一般的に、「約」という用語には、実験誤差の範囲内であることが予想される量が含まれる。

30

【0035】

「単離された」またはその文法的同等物とは、その自然環境から核酸を除去することを意味する。「精製された」またはその文法的同等物とは、自然界から除去されたもの（ゲノムDNAおよびmRNAを含む）または合成（cDNAを含む）および/または実験室条件下で増幅されたものであっても、特定の核酸の純度が増加したことを意味し、ここでは、「純度」は相対的な用語であり、「絶対的な純度」ではない。しかしながら、核酸およびタンパク質は、希釈剤またはアジュバントとともに処方され得、なお実用的な目的のために単離され得ることが理解されたい。例えば、核酸は、典型的には、細胞への導入に使用される場合、許容される担体または希釈剤とともに混合される。

40

【0036】

本明細書において使用される「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。この用語は、分子の一次構造のみを指す。したがって、この用語には、二本鎖および一本鎖DNA、三重鎖DNA、ならびに二本鎖および一本鎖RNAが含まれる。それはまた、例えば、メチル化および/またはキャッピングにより修飾されたポリヌクレオチドの形態、ならびにポリヌクレオチドの非修飾形態を含む。この用語はまた、天然に存在しないかまたは合成のヌクレオチド、ならびにヌクレオチド類似体を含む分子を含むことを意味する。

【0037】

「ポリペプチド（poly peptide）」は、用語「ポリペプチド（polype

50

p t i d e s ) 」、「ペプチド（複数可）」、および「タンパク質（複数可）」と交換可能に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。「成熟タンパク質」は、完全長のタンパク質であり、任意選択で、所与の細胞環境におけるタンパク質に典型的なグリコシル化または他の修飾を含む。

#### 【0038】

核酸および／または核酸配列は、それらが、共通の祖先の核酸または核酸配列から天然または人工的に由来する場合、「相同」である。タンパク質および／またはタンパク質配列は、それらをコードするDNAが、共通の祖先の核酸または核酸配列から天然または人工的に由来する場合、相同である。相同的な分子は、同族体と呼ばれることがある。例えば、本明細書に記載されるように、任意の天然に存在するタンパク質は、任意の利用可能な突然変異誘発方法によって修飾され得る。発現された場合、この突然変異誘発された核酸は、元の核酸によってコードされたタンパク質と相同であるポリペプチドをコードする。相同性は、一般的に、2つ以上の核酸またはタンパク質（またはそれらの配列）間の配列同一性から推論される。相同性の確立に役立つ配列間の同一性の正確なパーセンテージは、問題の核酸およびタンパク質によって変化するが、わずか25%の配列同一性が、相同性を確立するために日常的に使用されている。より高いレベルの配列同一性、例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくは99%、またはそれを超えるものを使用して、相同性を確立することもできる。

10

#### 【0039】

ポリペプチドの2つの核酸配列またはアミノ酸配列との関連で「同一である」または「配列同一性」という用語は、特定の比較ウィンドウにわたって最大の対応について整列させた場合と同じである、2つの配列中の残基を指す。

20

#### 【0040】

1つのクラスの実施形態では、本明細書におけるポリペプチドは、例えば、デフォルトパラメーターを使用したBLASTP（もしくはCLUSTAL、または任意の他の利用可能なアライメントソフトウェア）によって測定した場合、参照ポリペプチドまたはその断片に対して少なくとも80%、85%、90%、98%、99%または100%同一である。同様に、核酸はまた、開始核酸を参照して説明することができる。例えば、それは、例えば、デフォルトパラメーターを使用したBLASTN（もしくはCLUSTAL、または任意の他の利用可能なアライメントソフトウェア）によって測定した場合、参照核酸またはその断片に対して50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、98%、99%または100%同一であり得る。1つの分子が大きな分子と特定の割合の配列同一性を有すると言われる場合、2つの分子が最適に整列されている場合に、2つの分子が最適に整列されている順序に従って、より小さな分子における残基の割合がより大きな分子における一致した残基を見つけることを意味する。

30

#### 【0041】

本明細書に開示されるタンパク質（それらの機能的部分および機能的変異体を含む）は、1つ以上の天然に存在するアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含み得る。このような合成アミノ酸は当該技術分野において公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、-アミノn-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、トランス-3-およびトランス-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、-フェニルセリン-ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、-ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチル-リジン、N',N'-ジベンジル-リジン、6-ヒドロキシリジン、オルニチン、-アミノシクロペプタンカルボン酸、-アミノシクロヘキサンカルボン酸、-アミノシクロヘプタンカルボン酸、-(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、-ジアミノ酪酸、-ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、および-tert-

40

50

t - ブチルグリシンを含む。

【 0 0 4 2 】

「トランスポゾン」または「転位エレメント」( T E )は、ゲノム内でのその位置を変化させることができるベクター D N A 配列であり、突然変異を生成し、または突然変異からの復帰をもたらし、細胞のゲノムサイズを変更する場合がある。多くの場合、転位は、T E の重複をもたらす。クラス I T E は 2 段階でコピーされる：最初に、それらが D N A から R N A に転写され、次に、生成された R N A が D N A に逆転写される。その後、このコピーされた D N A は、ゲノム内の新しい位置に挿入される。逆転写ステップは、T E 自体によってコードされ得る逆転写酵素によって触媒される。レトロトランスポゾンの特徴は、H I V などのレトロウイルスに類似する。クラス II T E のカットアンドペースト転位機構には、R N A 中間体は関与しない。転位は、いくつかのトランスポザーゼ酵素によって触媒される。一部のトランスポザーゼは、D N A の任意の標的部位に非特異的に結合するが、一方、他は特定の D N A 配列標的に結合する。トランスポザーゼは、標的部位で互い違いに切断され、一本鎖の 5' または 3' の D N A オーバーハング ( 付着末端 ) をもたらす。このステップは D N A トランスポゾンを切り出し、次に、新しい標的部位にライゲートする：このプロセスは、ギャップを埋める D N A ポリメラーゼの活性、および糖 - リン酸骨格を閉じる D N A リガーゼの活性を伴う。これは、標的部位の重複をもたらす。D N A トランスポゾンの挿入部位は、標的 D N A における互い違いの切断と D N A ポリメラーゼによる埋め込みによって作製され得る短い直接反復、続く、トランスポザーゼによる T E の切り出しに重要な一連の逆方向反復によって同定され得る。ドナー部位が既に複製されているが、標的部位はまだ複製されていない細胞周期の S 期中に転位が行われる場合、カットアンドペースト T E は複製され得る。転位は、クラス I とクラス II の両方の T E で「自律型」または「非自律型」に分類することができる。自律型 T E は、それ自体で移動することができるが、非自律型 T E は、移動するために別の T E の存在を必要とする。これは、多くの場合、非自律型 T E がトランスポザーゼ ( クラス II の場合 ) または逆転写酵素 ( クラス I の場合 ) を欠損しているためである。

【 0 0 4 3 】

「トランスポザーゼ」とは、トランスポゾンの末端に結合し、カットアンドペースト機構または複製転位機構によってゲノムの別の部分へのトランスポゾンの移動を触媒する酵素を指す。一部の実施形態では、トランスポザーゼの触媒活性を利用して、遺伝子 ( 複数可 ) をベクターからゲノムに移動させることができる。

【 0 0 4 4 】

一部の例では、本明細書に記載される C A R および / または T C R を発現するための遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、脊椎動物の染色体に D N A 配列を導入するための合成 D N A トランスポゾンシステムを指す、「 S l e e p i n g B e a u t y ( S B ) トランスポゾンシステム」などの非ウイルスベースの送達システムを使用して T 細胞に導入することができる。このシステムの一部の例示的な実施形態は、例えば、米国特許第 6 , 4 8 9 , 4 5 8 号明細書；米国特許第 8 , 2 2 7 , 4 3 2 号明細書；米国特許第 9 , 2 2 8 , 1 8 0 号明細書および国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 5 1 4 6 号パンフレットに記載されている。 S l e e p i n g B e a u t y トランスポゾンシステムは、 S l e e p i n g B e a u t y ( S B ) トランスポザーゼおよび S B トランスポゾンで構成される。実施形態では、 S l e e p i n g B e a u t y トランスポゾンシステムは、 S B 1 1 トランスポゾンシステム、 S B 1 0 0 X トランスポゾンシステム、または S B 1 1 0 トランスポゾンシステムを含むことができる。

【 0 0 4 5 】

本明細書に開示または企図される核酸配列およびベクターは、「トランسفェクション」、「形質転換」、または「形質導入」によって細胞に導入することができる。本明細書において使用される「トランسفェクション」、「形質転換」、または「形質導入」は、物理的または化学的方法を使用することによる、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入を指す。多くのトランسفェクション技術が当該技術分野において公知で

10

20

30

40

50

あり、例えば、リン酸カルシウムDNA共沈法（例えば、Murray E. J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)）；DEAE-デキストラン；エレクトロポレーション；カチオン性リポソーム媒介によるトランスフェクション；タングステン粒子で促進される微粒子衝突（Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)）；およびリン酸ストロンチウムDNA共沈法（Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)）が含まれる。ファージまたはウイルスベクターは、それらの多くが市販されている、適切なパッケージング細胞における感染性粒子の増殖後、宿主細胞に導入することができる。

#### 【0046】

「プロモーター」とは、コード配列の転写を開始するポリヌクレオチドの領域を指す。  
プロモーターは、遺伝子の転写開始部位の近くであって、同じ鎖上にあり、およびDNAの上流（センス鎖の5'領域に向かって）に位置される。一部のプロモーターは構成的であり、それらは細胞内のすべての環境において活性であるが、一方、他のプロモーターは、特定の刺激に応答して活性になるように調節される（例えば、誘導性プロモーター）。

10

#### 【0047】

「プロモーター活性」という用語は、その活性が測定されているプロモーターに作動可能に連結されているヌクレオチド配列の発現の程度を指す。プロモーター活性は、例えば、ノーザンプロット分析により、生成されたRNA転写物の量を決定することにより直接的に測定され得るか、またはプロモーターに連結されたレポーター核酸配列などの連結された核酸配列によってコードされる生成物の量を決定することにより間接的に測定され得る。

20

#### 【0048】

本明細書で使用される「誘導性プロモーター」とは、転写調節因子、例えば、生物的または非生物的因素の存在または不存在によって活性化に誘導されるプロモーターを指す。誘導性プロモーターは、それらに作動可能に連結された遺伝子の発現を、生物の発生の特定の段階でまたは特定の組織においてオンまたはオフにすることができるため、有用である。誘導性プロモーターの例は、アルコール調節プロモーター、テトラサイクリン調節プロモーター、ステロイド調節プロモーター、金属調節プロモーター、病因調節プロモーター、温度調節プロモーターおよび光調節プロモーターである。一実施形態では、誘導性プロモーターは遺伝子スイッチの一部である。

30

#### 【0049】

本明細書で使用される「エンハンサー」という用語は、例えば、それが作動可能に連結されている核酸配列の転写を増加させるDNA配列を指す。エンハンサーは、核酸配列のコード領域から数キロベース離れた場所に位置することができ、調節因子の結合、DNAメチル化のパターン、またはDNA構造の変化を媒介することができる。様々な異なる供給源からの多数のエンハンサーが当該技術分野において周知であり、クローン化ポリヌクレオチドとしてまたはその中で（例えば、ATCCなどの寄託機関ならびに他の商業的または個々の供給源から）入手可能である。プロモーター（一般的に使用されるCMVプロモーターなど）を含む多数のポリヌクレオチドもまたエンハンサー配列を含む。エンハンサーは、コード配列の上流、内部、または下流に位置し得る。「Igエンハンサー」という用語は、免疫グロブリン（Ig）遺伝子座内にマッピングされたエンハンサー領域に由来するエンハンサーエレメントを指す（このようなエンハンサーには、例えば、重鎖（ミューチ）5'エンハンサー、軽鎖（カッパ）5'エンハンサー、カッパおよびミューアントロンエンハンサー、および3'エンハンサーを指す（一般には、Paul W. E. (ed), *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, Raven Press, New York (1993), pages 353-363；米国特許第5,885,827号明細書を参照されたい）。

40

#### 【0050】

「発現ベクター」または「ベクター」は、任意の遺伝学的エレメント、例えば、プラスミド、染色体、ウイルス、トランスポゾンであり、それは、細胞内のポリヌクレオチド複製の自律ユニットとして振る舞う（すなわち、それ自身の制御下で複製することができる

50

)か、または付着したセグメントの複製および／または発現をもたらすように別のポリヌクレオチドセグメントをそれに付着している宿主細胞染色体への挿入により複製が可能になる。適切なベクターには、限定されないが、プラスミド、トランスポゾン、バクテリオファージおよびコスミドが含まれる。ベクターは、所望の宿主細胞へのベクターのライゲートまたは挿入をもたらすために、および付着したセグメントの発現をもたらすために必要とされるポリヌクレオチド配列を含み得る。このような配列は、宿主生物によって異なる；それらには、転写をもたらすプロモーター配列、転写を増加させるエンハンサー配列、リボソーム結合部位配列、ならびに転写および翻訳の終結配列が含まれる。あるいは、発現ベクターは、宿主細胞DNA配列へのベクターのライゲートおよび組み込みなしに、そこにコードされる核酸配列産物を直接発現することが可能であり得る。

10

### 【0051】

ベクターはまた、「選択マーカー遺伝子」を含み得る。本明細書において使用される「選択マーカー遺伝子」という用語は、対応する選択剤の存在下で、核酸配列を発現する細胞を特異的にまたは反対に選択することを可能にする核酸配列を指す。適切な選択マーカー遺伝子は、当該技術分野において公知であり、例えば、国際特許出願公開第1992/08796号パンフレットおよび同第1994/28143号パンフレット；Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567 (1980)；O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527 (1981)；Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072 (1981)；Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1 (1981)；Santerre et al., Gene, 30: 147 (1984)；Kent et al., Science, 237: 901-903 (1987)；Wigler et al., Cell, 11: 223 (1977)；Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026 (1962)；Lowy et al., Cell, 22: 817 (1980)；米国特許第5,122,464号明細書および同第5,770,359号明細書に記載されている。

20

### 【0052】

一部の実施形態では、ベクターは、宿主細胞において複製することができ、適切な選択圧の存在下で宿主細胞内のDNAの染色体外セグメントとして存続する「エピソーム発現ベクター」または「エピソーム」である（例えば、Conese et al., Gene Therapy, 11:1735-1742 (2004)を参照されたい）。代表的な市販のエピソーム発現ベクターには、限定されないが、エプスタイン・バー核抗原1（EBNA1）およびエプスタイン・バーウィルス（EBV）複製起点（oriP）を利用するエピソームプラスミドが含まれる。In vitro（Carlsbad, Calif.）からのベクターpREP4、pCEP4、pREP7、およびpCDNA3.1、ならびにStratagene（La Jolla, Calif.）からのpBK-CMVは、EBNA1およびoriPの代わりに、T抗原およびSV40複製起点を使用するエピソームベクターの非限定的な例を表す。

30

### 【0053】

本明細書において使用される「抗体」とは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を指す。本明細書において使用される「モノクローナル抗体」という用語は、B細胞の単一のクローニングによって生成され、同じエピトープに結合する抗体を指す。対照的に、「ポリクローナル抗体」とは、異なるB細胞によって生成され、同じ抗原の異なるエピトープに結合する抗体の集団を指す。抗体全体は、典型的には、4つのポリペプチド：重（H）鎖ポリペプチドの2つの同一コピーと軽（L）鎖ポリペプチドの2つの同一コピーからなる。重鎖の各々は、1つのN末端可変（VH）領域および3つのC末端定常（CH1、CH2およびCH3）領域を含み、軽鎖の各々は、1つのN末端可変（VL）領域および1つのC末端定常（CL）領域を含む。軽鎖および重鎖の各対の可変領域は、抗体の抗原結合部位を形成する。VHおよびVL領域は類似した一般的な構造を有し、各々の領域は4つのフレームワーク領域を含み、それらの配列は比較的保存されている。フレームワーク領域は、3つの相補性決定領域（CDR）によって接続される。CDR1、CDR2、およびCDR3として公知である3つのCDRは、抗原結合に関与する抗体の「超可変領域」を形成する。

40

50

## 【0054】

「抗体の断片」、「抗体断片」、「抗体の機能的断片」、および「抗原結合部分」という用語は、本明細書において互換的に使用され、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片または部分を意味する（一般的に、Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9):1126-1129 (2005)を参照されたい）。抗体断片は、例えば、1つ以上のCDR、可変領域（またはその一部）、定常領域（またはその一部）、またはそれらの組合せを含むことが望ましい。抗体断片の例には、限定されないが、以下：(i) VL、VH、CL、およびCH1ドメインからなる1価の断片であるFab断片；(ii)ストーク領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む2価の断片であるFab'2断片；(iii)抗体の單一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片；(iv)2つのドメインを單一のポリペプチド鎖として合成することができるようにする合成リンカーで接合されたFv断片の2つのドメイン（すなわち、VLおよびVH）からなる1価の分子である一本鎖Fv(scfv)（例えば、Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988)；Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)；Osbourne et al., Nat. Biotechnol., 16: 778 (1998)を参照されたい）；ならびに(v)ポリペプチド鎖の二量体であるダイアボディが挙げられ、各々のポリペプチド鎖は、同じポリペプチド鎖のVHとVLの間で、短すぎて対形成することができないペプチドリンカーよりV Lに接続されたV Hを含み、それにより、異なるV H - V Lポリペプチド鎖の相補ドメイン間の対形成を駆動して、2つの機能的な抗原結合部位を有する二量体分子を生成する。抗体断片は当該技術分野において公知であり、例えば、米国特許出願公開2009/0093024A1号明細書にさらに詳細に記載されている。10  
20

## 【0055】

「機能的部分」という用語は、CARに関して使用される場合、本明細書に記載されるCARの任意の部分または断片を指し、その部分または断片は、それが一部であるCAR（親CAR）の生物活性を保持する。親CARをコードする核酸配列と比較して、CARの機能部分をコードする核酸配列は、例えば、約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%、またはそれを超える親CARを含むタンパク質をコードすることができる。30

## 【0056】

本明細書において使用される「機能的変異体」という用語は、参照ポリペプチドと実質的もしくは有意な配列同一性または類似性を有するポリペプチドまたはタンパク質を指し、それが変異体である参照ポリペプチドの生物活性を保持する。機能的変異体は、例えば、本明細書に記載されるCAR（親CAR）と類似した程度、同程度、またはより高い程度に標的細胞を認識する能力を保持する、親CARのそれらの変異体を包含する。親CARをコードする核酸配列と比較して、CARの機能的変異体をコードする核酸配列は、例えば、親CARをコードする核酸配列と約10%同一、約25%同一、約30%同一、約50%同一、約65%同一、約80%同一、約90%同一、約95%同一、または約99%同一であり得る。30

## 【0057】

本明細書において言及される「増殖性疾患」とは、細胞の過剰な増殖および細胞マトリックスの代謝回転が、がんを含むいくつかの疾患の病因に有意に寄与するという統一された概念が提示されることを意味する。40

## 【0058】

「投与すること」とは、本明細書において、本明細書に記載される組成物を患者に提供することを指す。例としてあって、限定されないが、組成物の投与、例えば、注射は、静脈内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹腔内(i.p.)注射、または筋肉内(i.m.)注射によって行うことができる。1つ以上のこのような経路を使用することができる。非経口投与は、例えば、ボーラス注射によるか、または時間をかけて徐々に灌流することによるものであり得る。あるいは、または同時に、投与は経口経路によるものであり得る。さらに、投与は、細胞のボーラスもしくはペレッ50

トの外科的沈着、または医療デバイスの配置によるものであり得る。

【0059】

本明細書に記載される修飾または操作された細胞組成物は、本明細書に記載される1つ以上の核酸配列を発現する宿主細胞、または本明細書に記載される1つ以上の核酸配列を含むベクターを、増殖性疾患の治療または予防に有効な量で含み得る。本明細書において使用する場合、「治療」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的および／または生理学的效果を得ることを指す。実施形態では、効果は治療的であり、すなわち、効果は、疾患および／または疾患に起因する有害な症状を部分的もしくは完全に治癒する。この目的のために、本発明の方法は、本発明の核酸配列を発現する宿主細胞、または本発明の核酸配列を含むベクターを含む、ある「量」の組成物を投与することを含む。

10

【0060】

「量」または「用量」とは、所望の治療結果を達成するために必要とされる用量および期間での有効な量を指す。量は、個体の病状、年齢、性別、および体重、ならびに本発明の核酸配列が個体において所望の応答を発揮する能力などの要因に応じて変動し得る。

【0061】

あるいは、薬理学的および／または生理学的效果は、「予防的」であり得る、すなわち、効果は、疾患またはその症状を完全にもしくは部分的に予防する。

【0062】

「予防的有効量」とは、所望の予防的結果（例えば、疾患の発症の予防）を達成するために必要とされる用量および期間での有効な量を指す。

20

【0063】

本明細書において使用する場合、用語「個体（複数可）」、「対象（複数可）」および「患者（複数可）」は、任意の哺乳動物を意味する。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、哺乳動物は非ヒトである。いずれの用語も、医療従事者（例えば、医師、登録看護師、正看護師、医師のアシスタント、秩序あるまたはホスピスの労働者）の監督（例えば、一定または断続的である）によって特徴付けられる状況を必要としないかまたはこれらに限定されない。

【0064】

スペーサー

本明細書では、本明細書に記載されるポリペプチド構築物の2つの領域を接続するスペーサーが記載される。例えば、本明細書に記載されるスペーサーは、ポリペプチドの膜貫通領域をポリペプチドの抗原またはリガンド結合領域に接続することができる。一部の場合では、ポリペプチドはキメラポリペプチドであり得る。本明細書に記載されるキメラポリペプチドまたはキメラタンパク質は、元々は別々のタンパク質をコードしていた、2つ以上の遺伝子もしくはその一部または誘導体の接合により作製されたポリペプチドまたはタンパク質を含む。様々なスペーサーの例示的な記述は、図1および2に見出すことができる。一部の実施形態では、スペーサーは、キメラポリペプチドの異なるドメイン間の距離を拡張し、スペーサーを欠くが、他には同一であるポリペプチドと比較して、ポリペプチドの発現または機能活性の改善をもたらす。一部の例では、スペーサーは、膜貫通領域を、キメラポリペプチドの細胞外領域または細胞質領域のいずれかに連結するように機能する任意のポリペプチドを含む。一部の実施形態では、スペーサーは、抗原またはリガンド結合領域が、異なる配向に整列して抗原またはリガンド受容体の認識を容易にし得るのに十分なほど柔軟である。他の実施形態では、スペーサーは、キメラポリペプチドの異なるドメイン間の距離を拡張し、スペーサーを欠くが、他には同一であるポリペプチドを発現する細胞（複数可）と比較して、キメラポリペプチドを発現する細胞（複数可）の拡大または増殖誘導の改善をもたらす。

30

【0065】

スペーサーは、ストーク領域およびストーク伸長領域（複数可）を含むことができる。一部の実施形態では、スペーサーは、単一のストーク領域を含むことができる。別の実施形態では、スペーサーは、ストーク領域（「s」で表される）および本明細書において「s」

40

50

$s' - n$ 」で表されるストーク伸長領域を含み得る。例えば、スペーサーは、1つのストーク領域および $s' - n$ を含むことができ、 $n$ は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20であり得る。さらなる実施形態では、ストーク領域は、リンカーを介してストーク伸長領域 $s' - n$ に連結することができる。本明細書に記載されるリンカーは、例えば、GSGリンカー（配列番号9および配列番号115）、SGSGリンカー（配列番号10および配列番号116）、（G4S）3リンカー（配列番号11および配列番号117）、（G4S）4リンカー（配列番号255）および/またはホイットローリンカー（配列番号8および配列番号114）を含むことができる。特定の場合では、ストーク領域とストーク伸長領域を連結させるための任意の長さまたはサイズのペプチドリンカー。例えば、一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、ストーク領域とストーク伸長領域の間に所望のまたは最適な距離を維持するようなサイズである。一部の実施形態は、異なるサイズのG4Sリンカー（配列番号256）（G4S） $n$ （ $n$ は0、1、2、3、4、5である）（配列番号257）である。

10

## 【0066】

一部の実施形態では、ストーク領域は、長さが約20から約300アミノ酸であり得、少なくとも1つの二量体化部位を含み、ストーク伸長領域は、アミノ酸の数で測定した場合、ストーク領域の長さの約1から約10倍を含み得る。

20

## 【0067】

一部の場合では、ストーク領域は、長さが約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60またはそれを超えるアミノ酸であり得る。他の場合では、ストーク領域は、長さが約100、125、150、175、200、225、250、275または300アミノ酸であり得る。一部の場合では、ストーク領域は、長さが20アミノ酸未満であり得る。

20

## 【0068】

一部の場合では、ストーク伸長領域は、アミノ酸の数によって測定した場合、ストーク領域の約1～約10倍の長さを含むことができる。例えば、ストーク伸長領域は、アミノ酸の数で測定した場合、ストーク領域の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10倍の長さを含むことができる。一部の場合では、ストーク伸長領域は、アミノ酸の数で測定した場合、ストーク領域の10倍を超える長さを含むことができる。一部の例では、ストーク伸長領域は、アミノ酸の数で測定した場合、ストーク領域の最大2倍の長さを含むことができるが、ストーク領域よりも少ない二量体化部位を含む。

30

## 【0069】

主題の抗原結合ポリペプチドのストーク伸長領域は、ストーク領域と比較して、少なくとも1つ少ない二量体化部位を含み得る。例えば、ストーク領域が2つの二量体化部位を含む場合、ストーク伸長領域は、1つまたはゼロの二量体化部位を含むことができる。別の例として、ストーク領域が1つの二量体化部位を含む場合、ストーク伸長領域はゼロの二量体化部位を含むことができる。一部の例では、ストーク伸長領域は、二量体化部位を欠いている。一部の例では、ストーク伸長領域は、アミノ酸の数で測定した場合、ストーク領域の最大2倍の長さを含むことができるが、二量体化部位を含まない。一部の例では、ストーク伸長領域は、アミノ酸の数で測定した場合、ストーク領域の最大3倍の長さを含むことができるが、二量体化部位を含まない。一部の例では、ストーク伸長領域は、アミノ酸の数で測定した場合、ストーク領域の最大4倍の長さを含むことができるが、二量体化部位は含まない。一部の場合では、1つ以上の二量体化部位（複数可）が膜の近位にあり得る。他の場合では、1つ以上の二量体化部位（複数可）が膜の遠位にあり得る。

40

## 【0070】

ストーク伸長領域の各々は、一部の例では、長さが約20から約60アミノ酸であり得る。他の例では、ストーク伸長領域は、長さが約10、15、20、25、30、35、

50

40、45、50、55、60、65、より長いアミノ酸、またはその範囲内もしくは範囲外の任意の整数であり得る。一部の場合では、各々のストーク伸長領域は、ストーク領域に対して少なくとも約60%の同一性を有する配列を有する。一部の例では、各々のストーク伸長領域は、ストーク領域に対して少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超える同一性を有する配列を有する。

#### 【0071】

一実施形態では、図1Aに示されるように、ストーク領域は膜領域の近位にある。別の実施形態では、図1Bに示されるように、ストーク領域は膜領域の遠位にある。

#### 【0072】

一実施形態では、ストーク領域およびストーク伸長領域（複数可）は、天然または合成起源のポリペプチドから誘導または設計することができる。ストーク領域および/またはストーク伸長領域は、細胞表面タンパク質またはその誘導体もしくは変異体に由来するヒンジドメインを含み得る。一部の実施形態では、ストーク領域および/またはストーク伸長領域は、CD28またはCD8アルファ（CD8<sup>+</sup>）に由来するヒンジドメインを含み得る。一部の実施形態では、ストーク領域およびストーク伸長領域の各々は、CD8アルファヒンジドメイン、CD28ヒンジドメイン、CTL A-4ヒンジドメイン、LNGFR細胞外ドメイン、IgG1ヒンジ、IgG4ヒンジおよびCH2-CH3ドメインのうちの少なくとも1つに由来し得る。ストーク領域およびストーク伸長領域（複数可）は、CD8アルファヒンジドメイン、CD28ヒンジドメイン、CTL A-4ヒンジドメイン、LNGFR細胞外ドメイン、IgG1ヒンジ、IgG4ヒンジまたはCH2-CH3ドメインの任意の組合せから個別に由来し得る。例として、ストーク領域は、CD8アルファヒンジドメインに由来し得、少なくとも1つのストーク伸長領域は、CD28ヒンジドメインに由来し得、このようにしてハイブリッドスペーサーを作製する。別の例として、ストーク領域は、IgG1ヒンジまたはIgG4ヒンジに由来し得、少なくとも1つのストーク伸長領域は、IgGのCH2-CH3ドメインに由来し得る。

#### 【0073】

特定の実施形態では、ストーク領域は、ホモまたはヘテロ二量体化キメラポリペプチドを形成するために1つ以上の二量体化部位を含み得る。他の実施形態では、ストーク領域または1つ以上のストーク伸長領域は、二量体化部位を完全に排除する突然変異を含み得る。一部の実施形態では、ストーク伸長領域（複数可）は、ストーク領域と比較して、少なくとも1つ少ない二量体化部位を含むことができる。例えば、ストーク領域が2つの二量体化部位を含む場合、ストーク伸長領域は1つまたはゼロの二量体化部位を含むことができる。別の例として、ストーク領域が1つの二量体化部位を含む場合、ストーク伸長領域はゼロの二量体化部位を含むことができる。一部の例では、ストーク伸長領域は二量体化部位を欠いている。

#### 【0074】

##### ポリペプチド

本明細書では、本明細書に記載されるスペーサーとともに使用され得るポリペプチドが開示される。一実施形態では、本明細書に記載されるスペーサーを含むこのようなポリペプチドは、細胞膜表面上に発現しないポリペプチド、または近接性もしくは立体障害の欠如のためにそれらの標的に結合することができないポリペプチドである。ポリペプチドの例には、限定されないが、リガンド、リガンド結合受容体、ペプチド、抗体、またはこれらの抗原結合断片、例えば、Fab、Fab'、F(ab)2、およびFv断片、1つ以上のCDRで構成される断片、一本鎖抗体（例えば、一本鎖Fv断片（scFv））、ジスルフィド安定化(dsFv)Fv断片、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二重特異性抗体）、pFv断片、重鎖一量体または二量体、軽鎖一量体または二量体、および1つの重鎖と1つの軽鎖からなる二量体、キメラ抗原受容体（CAR）が含まれる。また、抗原結合領域には、リガンド領域、例えば、増殖誘導性リガンド（APRIL）、B細胞活性化因子（BAFF）、膜貫通型活性化因子およびカルシウムモジュレーターおよびシク

ロフィリンリガンド相互作用因子（TACI）、または合成由来のペプチドが含まれる。

【0075】

一部の実施形態では、ポリペプチドはキメラポリペプチドである。特定の例では、本明細書に記載されるキメラポリペプチドは、抗原結合ポリペプチドである。一部の実施形態では、ポリペプチドはキメラ抗原受容体（CAR）である。本明細書に記載されるCARなどのポリペプチドは、抗原結合領域、膜貫通領域、および前記膜貫通領域を前記抗原結合領域と接続するスペーサーを含む。一実施形態では、スペーサーは、少なくとも1つの二量体化部位を含むストーク領域、およびストーク伸長領域を含む。他の実施形態では、前記ストーク伸長領域は、前記ストーク領域と比較して、より少ない二量体化部位を含むことができる。特定の場合では、本明細書に記載されるキメラポリペプチドはまた、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の場合では、キメラポリペプチドは細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。特定の場合では、細胞内シグナル伝達ドメインは、本明細書に記載されるキメラポリペプチドを発現する操作された細胞において別個のポリペプチドとして発現される。

10

【0076】

さらに、本明細書では、抗原結合領域、膜貫通領域、および前記膜貫通領域を前記抗原結合領域と接続するスペーサー領域を含む抗原結合ポリペプチドが開示され、前記スペーサー領域は、ストーク領域（「s」で表される）および本明細書で検討されるように、本明細書において「s-n」で表されるストーク伸長領域（複数可）を含むことができる。

20

【0077】

スペーサーを含む抗原結合ポリペプチドが開示され、スペーサーは、ストーク領域および1つのストーク伸長領域、すなわち、s'-n（n=1である）を含む。一部の場合では、ストーク伸長領域は、ストーク領域に対して少なくとも60%の同一性を有する配列を有する。他の例では、ストーク伸長領域は、他の例では、ストーク伸長領域は、ストーク領域に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える同一性を有する配列を有する。

20

【0078】

スペーサーを含む抗原結合ポリペプチドが開示され、スペーサーは、ストーク領域および2つのストーク伸長領域、すなわち、s'-n（n=2である）を含む。一部の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも60%の同一性を有する配列を有する。他の例では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える同一性を有する配列を有する。

30

【0079】

スペーサーを含む抗原結合ポリペプチドが開示され、スペーサーは、ストーク領域および3つのストーク伸長領域、すなわち、s'-n（n=3である）を含む。一部の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも60%の同一性を有する配列を有する。他の例では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える同一性を有する配列を有する。

40

【0080】

スペーサーを含む抗原結合ポリペプチドが開示され、スペーサーは、ストーク領域および4つのストーク伸長領域、すなわち、s'-n（n=4である）を含む。一部の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも60%の同一性を有する配列を有する。他の例では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える同一性を有する配列を有する。

【0081】

スペーサーを含む抗原結合ポリペプチドが開示され、スペーサーは、ストーク領域および5つのストーク伸長領域、すなわち、s'-n（n=5である）を含む。一部の場合で

50

は、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも 60 % の同一性を有する配列を有する。他の例では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超える同一性を有する配列を有する。

#### 【0082】

スペーサーを含む抗原結合ポリペプチドが開示され、スペーサーは、ストーク領域およびストーク伸長領域を含み、ストーク伸長領域は、5つより多くのストーク伸長領域、すなわち  $s' - n$  ( $n > 5$  である) を含む。このような場合には、ストーク伸長領域は、 $n = 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20$ 、またはそれを超えるストーク伸長領域を含むことができる。一部の場合では、前記ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも 60 % の同一性を有する配列を有する。他の例では、前記ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超える同一性を有する配列を有する。一部の場合では、スペーサーは、配列番号 1 に示される C D 8 配列に対して少なくとも約 10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、40 %、50 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超える同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、スペーサーは、配列番号 107 に示される C D 8 ヌクレオチド配列に対して少なくとも約 10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、40 %、50 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。

#### 【0083】

本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、対象の抗原結合ポリペプチドのストーク領域は、C D 8 アルファヒンジドメインに対して少なくとも約 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超える同一性を有する配列を含む。C D 8 ヒンジドメインは、配列番号 3 に示される配列に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、または配列番号 109 に示される配列に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むことができる。一部の場合では、ストーク伸長領域は、配列番号 2 に示される配列に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、または配列番号 108 に示される配列に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号 4、5、6 または 7 に示される配列に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、あるいは配列番号 110、111、112 または 113 に示される配列に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むことができる。

#### 【0084】

一部の実施形態では、ストーク領域およびストーク伸長領域は、ホイットローリンカー（配列番号 8 および配列番号 114）、G S G リンカー（配列番号 9 および配列番号 115）、S G S G リンカー（配列番号 10）または（G 4 S）3 リンカー（配列番号 11 および配列番号 117）などのリンカーを介して接続され得る。一実施形態では、（G 4 S

10

20

30

40

50

) 3 リンカー (配列番号 11) に接続された C D 8 ヒンジドメインは、配列番号 12 に示されるペプチド配列、または配列番号 118 に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。別の実施形態では、ホイットローリンカーに接続された C D 8 ヒンジドメインは、配列番号 13 に示されるペプチド配列、または配列番号 119 に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。さらに別の実施形態では、ホイットローリンカー (2X) に接続された C D 8 ヒンジドメインは、配列番号 14 に示されるペプチド配列、または配列番号 120 に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。別の態様では、ホイットローリンカー (2X) に接続された C D 8 ヒンジドメインは、配列番号 15 に示されるペプチド配列、または配列番号 121 に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。

10

#### 【0085】

一部の場合では、スペーサーは、配列番号 31 に示される C D 28 配列に対して少なくとも約 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% またはそれを超える同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、スペーサーは、配列番号 137 に示される C D 28 ヌクレオチド配列に対して少なくとも約 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% またはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。本明細書に開示される少なくとも 1 つの実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるポリペプチドのストーク領域は、C D 28 ヒンジドメインに対して少なくとも約 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える同一性を有する配列を含む。C D 28 ヒンジドメインは、配列番号 32 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、または配列番号 138 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号 33、34 または 35 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、あるいは配列番号 139、配列番号 140 または配列番号 141 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。

20

30

#### 【0086】

本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるポリペプチドのストーク領域は、C T L A - 4 細胞外ドメインに対して少なくとも約 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える同一性を有する配列を含む。一部の態様では、C T L A - 4 細胞外ドメインは部分配列を含み得る。一部の場合では、C T L A - 4 部分配列は、配列番号 36 に示される C T L A - 4 配列に対して少なくとも約 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% またはそれを超える同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、スペーサーは、配列番号 142 に示される C T L A - 4 ヌクレオチド配列に対して少なくとも約 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% またはそれを超える同一性を有するペプチド配列を含み得る。

40

50

6 %、25%、26%、27%、28%、29%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える同一性を有するヌクレオチドによってコードされるペプチド配列を含む。C T L A - 4 細胞外ドメインは、配列番号 37 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える同一性を有する配列を含み得る。一部の場合では、ストーク伸長領域は、配列番号 37 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える同一性を有する配列を含む。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号 38、配列番号 39 または配列番号 40 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える同一性を有する配列を含み得る。

10

#### 【0087】

本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるポリペプチドのストーク領域またはストーク伸長領域は、完全長の L N G F R 細胞外ドメイン (E C D) に対して少なくとも約 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える同一性を有する配列を含む。一部の場合では、L N G F R E C D は二量体化することができない。L N G F R E C D は、配列番号 16 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、または配列番号 122 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコード化されるペプチド配列を含み得る。一部の場合では、ストーク伸長領域は、配列番号 16 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、または配列番号 122 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22 または配列番号 23 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、あるいは配列番号 123、配列番号 124、配列番号 125、配列番号 126、配列番号 127、配列番号 128 または配列番号 129 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。

20

#### 【0088】

一部の場合では、ストーク伸長領域は、配列番号 72 または配列番号 73 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくはそれを超える同一性を有する配列、あるいは配列番号 166 または配列番号 167 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号 77、配列番号 78 または配列番号 79 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、あるいは配列番号 171、配列番号 172 または配列番号 173 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むことができる。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号 80、配列番号 81 または配列番号 82 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、あるいは配列番号 174、配列番号 175 または配列番号 1

30

40

50

76に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むことができる。

#### 【0089】

一部の実施形態では、ストーク領域およびストーク伸長領域は、ホイットローリンカー(配列番号8および配列番号114)、GSGリンカー(配列番号9および配列番号115)、SGSGリンカー(配列番号10)または(G4S)3リンカー(配列番号11および配列番号117)などのリンカーを介して接続され得る。一実施形態では、(G4S)3リンカー(配列番号11)に接続されたTCRヒンジドメインは、配列番号74に示されるペプチド配列、または配列番号168に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。一実施形態では、(G4S)3リンカー(配列番号11)に接続されたTCRヒンジドメインは、配列番号75に示されるペプチド配列、または配列番号169に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。さらに別の実施形態では、ホイットローリンカーに接続されたTCRヒンジドメインは、配列番号76に示されるペプチド配列、または配列番号170に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。

10

#### 【0090】

一部の場合では、ストーク伸長領域は、配列番号86もしくは配列番号87に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える同一性を有する配列、あるいは配列番号180もしくは配列番号181に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号91、配列番号92または配列番号93に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、あるいは配列番号185、配列番号186または配列番号187に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むことができる。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号94、配列番号95または配列番号96に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、あるいは配列番号188、配列番号189または配列番号190に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むことができる。

20

30

#### 【0091】

一部の実施形態では、ストーク領域およびストーク伸長領域は、ホイットローリンカー(配列番号8および配列番号114)、GSGリンカー(配列番号9および配列番号115)、SGSGリンカー(配列番号10)または(G4S)3リンカー(配列番号11および配列番号117)などのリンカーを介して接続され得る。一実施形態では、(G4S)3リンカー(配列番号11)に接続されたTCRヒンジドメインは、配列番号88に示されるペプチド配列または配列番号182に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。一実施形態では、(G4S)3リンカー(配列番号11)に接続されたTCRヒンジドメインは、配列番号89に示されるペプチド配列または配列番号183に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。さらに別の実施形態では、ホイットローリンckerに接続されたTCRヒンジドメインは、配列番号90に示されるペプチド配列または配列番号184に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。

40

#### 【0092】

本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、二量体化部位はシステインを含む。

50

一部の場合は、本明細書に記載されるストーク領域の二量体化部位は、2つのシスティンを含む。一部の態様では、二量体化部位はリガンドにより誘導され得る。

#### 【0093】

本明細書ではさらに、本明細書に開示されるポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド、ならびに前記ポリヌクレオチドの1つ以上を含むベクターが開示される。ベクターは、クローニングベクター、送達ベクター、発現ベクター、またはそれらの任意の組合せであり得る。このようなベクターは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターであり得る。例えば、ベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、Sleeping Beautyトランスポゾン、AttSint(商標)リコンビナーゼ、Piggly Bac(商標)トランスポゾンまたは他の非ウイルスベクターであり得る。10

#### 【0094】

一部の場合は、本明細書に開示されるストーク伸長領域(複数可)を有するスペーサーを含む抗原結合ポリペプチドは、ストーク伸長領域(複数可)を欠くが、他の点では同一である抗原結合ポリペプチドと比較して、増加した抗原結合を有し得る。ストーク伸長領域(複数可)を含む抗原結合ポリペプチドの抗原結合は、ストーク伸長領域を欠くが、他の点では同一である抗原結合ポリペプチドと比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、500%、1000%またはそれを超えて増加し得る。20

#### 【0095】

抗原結合は、フローサイトメトリーもしくは細胞ベースのアッセイまたは任意の他の同等のアッセイによって評価することができる。細胞ベースのアッセイは、表面上で目的的抗原を発現する細胞型を利用して、抗原結合を評価することができる。可溶性タンパク質として発現される抗原またはその断片を利用して、フローサイトメトリーまたは同様のアッセイを使用して抗原結合を評価することができる。抗原結合の改善は、抗原結合ポリペプチドまたはキメラ受容体の機能測定によって間接的に評価することができる。例えば、キメラ受容体またはCARの改善された抗原結合は、本明細書に記載されるように、抗原を発現する標的細胞に対する、増加した特異的細胞毒性によって測定することができる。30

#### 【0096】

一部の場合は、本明細書に開示されるポリペプチドは、1つ以上のストーク伸長領域(複数可)を欠くが、他の点では同一であるポリペプチドと比較して、細胞表面上で増加した発現を有し得る。ストーク伸長領域(複数可)を含むポリペプチドの細胞表面発現は、ストーク伸長領域を欠くが、他の点では同一であるポリペプチドと比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、500%、1000%またはそれを超えて増加することができる。30

#### 【0097】

本開示のポリペプチドの細胞表面発現レベルは、例えば、フローサイトメトリーベースのアッセイを使用して評価することができる。抗原結合ポリペプチドの改善された発現は、前記抗原結合ポリペプチドを発現する分析された細胞のパーセンテージとして、あるいは細胞の表面上の前記抗原結合ポリペプチドの平均密度として測定することができる。本明細書に記載される抗原結合ポリペプチドの細胞表面発現を評価するために使用することができるさらなる適切な方法は、ウエスタンプロットティングまたは任意の他の同等のアッセイを含む。40

#### 【0098】

##### キメラ受容体

本明細書に開示されるポリペプチドは、修飾されたエフェクター細胞において発現され得る。一部の実施形態では、修飾されたエフェクター細胞は、細胞の表面上に発現されるキメラ受容体を含む。一部の例では、キメラ受容体は、腫瘍抗原、例えば、腫瘍関連抗原50

または腫瘍特異的抗原の認識および結合を可能にする抗原結合領域を含む。一部の場合では、抗原結合領域は、抗体または結合断片、例えば、F<sub>a</sub>b、F<sub>a</sub>b'、F(a<sub>b</sub>')<sub>2</sub>、F(a<sub>b</sub>')<sub>3</sub>、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、dsFv、ダイアボディ、ミニボディ、およびナノボディまたはそれらの結合断片を含む。一部の場合では、抗原結合領域はscFvを含む。一部の場合では、抗原結合ポリペプチドは、抗原結合ドメインとしてscFvを含むキメラ抗原受容体(CAR)である。一部の例では、キメラ抗原受容体は、パターン認識受容体を含む。他の場合では、キメラ受容体は、操作されたT細胞受容体(TCR)を含む。

#### 【0099】

##### キメラ抗原受容体(CAR)

本明細書に開示されるポリペプチドは、キメラ抗原受容体(CAR)を含み得る。CARは、外因性の特異性を免疫エフェクター細胞に移植する操作された受容体である。

#### 【0100】

一部の場合では、本明細書に開示されるCARは、膜貫通領域を抗原結合領域と接続するスペーサー領域を含む。一部の場合では、場合では、本明細書に開示されるCARのスペーサー領域は、1)ストーク領域、および2)ストーク領域に隣接するストーク伸長領域(複数可)を含む。例示的な実施形態は、図1および2に記載される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるCARは、ストーク領域およびストーク伸長領域(s'-n、n=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20である)を含むスペーサーを組み込む。

#### 【0101】

一部の例では、CARは、抗原結合領域を含む細胞外領域(エクトドメイン)、ストーク領域、ストーク伸長領域、膜貫通領域、および任意選択で細胞内(エンドドメイン)領域を含む。一部の例では、細胞内領域は、1つ以上の細胞内シグナル伝達領域またはドメインをさらに含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、抗原結合領域、ストーク領域、ストーク伸長領域、膜貫通領域、1つ以上の共刺激領域またはドメイン、およびT細胞活性化のためのシグナル伝達領域を含む。

#### 【0102】

抗原結合領域は、モノクローナル抗体の相補性決定領域、モノクローナル抗体の可変領域、および/またはそれらの抗原結合断片を含み得る。相補性決定領域(CDR)は、抗原を補完し、したがって、特定の抗原に対する特異性を受容体に提供する、抗原受容体(例えば、免疫グロブリンおよびT細胞受容体)タンパク質の可変ドメインに見出される短いアミノ酸配列である。抗原受容体の各ポリペプチド鎖は、3つのCDR(CDR1、CDR2、およびCDR3)を含むことができる。一部の場合では、抗原結合領域は、F(a<sub>b</sub>')<sub>2</sub>、F<sub>a</sub>b'、F<sub>a</sub>b、Fv、またはscFvを含む。一部の場合では、抗原結合領域はscFvである。一部の場合では、抗原結合領域はF<sub>a</sub>bである。一部の場合では、抗原結合領域はF<sub>a</sub>b'である。一部の場合では、抗原結合領域はF(a<sub>b</sub>')<sub>2</sub>である。一部の場合では、抗原結合領域はFvである。

#### 【0103】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるCARまたはキメラ受容体または抗原結合ポリペプチドは、CD19、BCMA、CD44、-葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合タンパク質、GD2、GD3、IL-13Ra2、KDR、EDB-F、メソセリン、GPC3、CSPG4、HER1/HER3、HER2、CD44v6、CD44v7/v8、CD20、CD174、CD138、L1-CAM、FAP、c-MET、PSCA、CS1、CD38、IL-11R、EphA2、CLL-1、CD22、EGFR、葉酸受容体、ムチン、例えば、MUC-1またはMUC-16、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、EGFR、CD20、EGFRvIII、CD123またはVEGF-R2上のエピトープに結合する抗原結合領域を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるCARまたはキメラ受容体または抗原結合ポリペプチドは、CD19、

10

20

30

40

50

C D 3 3 、 B C M A 、 C D 4 4 、 - 葉酸受容体、 C A I X 、 C D 3 0 、 R O R 1 、 C E A 、 E G P - 2 、 E G P - 4 0 、 H E R 2 、 H E R 3 、 葉酸結合タンパク質、 G D 2 、 G D 3 、 I L - 1 3 R a 2 、 K D R 、 E D B - F 、 メソセリン、 G P C 3 、 C S P G 4 、 H E R 1 / H E R 3 、 H E R 2 、 C D 4 4 v 6 、 C D 4 4 v 7 / v 8 、 C D 2 0 、 C D 1 7 4 、 C D 1 3 8 、 L 1 - C A M 、 F A P 、 c - M E T 、 P S C A 、 C S 1 、 C D 3 8 、 I L - 1 1 R 、 E p h A 2 、 C L L - 1 、 C D 2 2 、 E G F R 、 ムチン、 例えば、 M U C - 1 または M U C - 1 6 、 M A G E - A 1 、 h 5 T 4 、 P S M A 、 T A G - 7 2 、 E G F R v I I I 、 C D 1 2 3 および V E G F - R 2 上のエピトープに結合する抗原結合領域を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C A R またはキメラ受容体または抗原結合ポリペプチドは、 C D 1 9 または C D 3 3 上のエピトープに結合する抗原結合領域を含む。一部の例では、本明細書に記載される C A R またはキメラ受容体または抗原結合ポリペプチドは、 C D 1 9 上のエピトープに結合する抗原結合領域を含む。一部の場合では、本明細書に記載される C A R またはキメラ受容体または抗原結合ポリペプチドは、 C D 3 3 上のエピトープに結合する抗原結合領域を含む。一部の場合では、本明細書に記載される C A R またはキメラ受容体または抗原結合ポリペプチドは、 R O R - 1 上のエピトープに結合する抗原結合領域を含む。一部の場合では、本明細書に記載される C A R またはキメラ受容体または抗原結合ポリペプチドは、 E G F R v I I I 上のエピトープに結合する抗原結合領域を含む。さらなる実施形態では、本明細書に記載される C A R またはキメラ受容体または抗原結合ポリペプチドは、 H L A - A 2 、 ミエリンオリゴデンロサイト糖タンパク質 (M O G ) 、 第 V I I I 因子 (F V I I I ) 、 M A d C A M 1 、 S D F 1 、 または I I 型コラーゲン上のエピトープに結合する自己抗原または抗原結合領域を含む。

#### 【 0 1 0 4 】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび方法は、過剰増殖性疾患、 例えば、がん、自己免疫疾患の治療、または感染症、 例えば、ウイルス、細菌もしくは寄生虫の感染の治療に使用することができる。一部の態様では、抗原は、がん細胞、自己免疫細胞、またはウイルス、細菌もしくは寄生虫に感染した細胞で上昇する抗原である。標的とされ得る病原体には、限定されないが、プラスモジウム (P l a s m o d i u m) 、トリパノソーマ、アスペルギルス (A s p e r g i l l u s) 、カンジダ (C a n d i d a) 、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、H S V 、H P V 、R S V 、E B V 、C M V 、J C ウィルス、B K ウィルス、またはエボラ病原体が含まれる。自己免疫疾患には、移植片対宿主病、関節リウマチ、狼瘡、セリアック病、クローン病、シェーゲレン症候群、多発性筋痛リウマチ、多発性硬化症、視神経脊髄炎、強直性脊椎炎、1型糖尿病、円形脱毛症、血管炎、側頭動脈炎、類天疱瘡、乾癬、尋常性天疱瘡または自己免疫性ブドウ膜炎が含まれ得る。

#### 【 0 1 0 5 】

C A R によって認識される病原体は、本質的に任意の種類の病原体であり得るが、一部の実施形態では、病原体は、真菌、細菌、またはウイルスである。例示的なウイルス性病原体には、アデノウイルス科 (Adenoviridae) のファミリーのウイルス、エブスタイン・バーウイルス (E B V) 、サイトメガロウイルス (C M V) 、R S ウィルス (R S V) 、J C ウィルス、B K ウィルス、H P V 、H S V 、H H V ファミリーのウイルス、肝炎ファミリーのウイルス、ピコナウイルス科 (Picornaviridae) 、ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae) 、ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) 、フラビウイルス科 (Flaviviridae) 、レトロウイルス科 (Retroviridae) 、オルトミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae) 、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) 、パポバウイルス科 (Papovaviridae) 、ポリオーマウイルス、ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae) 、およびトガウイルス科 (Togaviridae) が含まれる。例示的な病原性ウイルスは、天然痘、インフルエンザ、おたふく風邪、麻疹、水痘、エボラおよび風疹を引き起こす。例示的な病原菌には、カンジダ (Candida) 、アスペルギルス (Aspergillus) 、クリプトコッカス (Cryptococcus) 、ヒストプラズマ (Histoplasma) 、ニューモシスチス (Pneumocystis) 、およびスタキボトリス (S t a c h y b o t r y s) が含まれる。例示的な病原性細菌には、連鎖球菌 (Streptococcus) 、シユ

10

20

30

40

50

ードモナス (*Psuedomonas*)、赤痢菌 (*Shigella*)、カンピロバクター (*Campylobacter*)、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*)、ヘリコバクター (*Helicobacter*)、大腸菌 (*E.coli*)、リケッチャ (*Rickettsia*)、バチルス (*Bacillus*)、ボルデテラ (*Bordetella*)、クラミジア (*Chlamydia*)、スピロケテス (*Spirochete*)、およびサルモネラ (*Salmonella*)が含まれる。一部の実施形態では、病原体受容体デクチン-1を使用して、アスペルギルス (*Aspergillus*)などの真菌の細胞壁上の炭水化物構造を認識するCARを生成することができる。別の実施形態では、CARは、ウイルス決定因子(例えば、CMVおよびエボラ由来の糖タンパク質)を認識する抗体に基づいて作製され、ウイルス感染および病状を妨害することができる。

## 【0106】

10

一部の実施形態では、本明細書に記載されるスペーサー領域を使用して、抗原結合領域をCARの膜貫通領域に連結することができる。一部の例では、スペーサーは、膜貫通領域を細胞外領域またはポリペプチド鎖の細胞質領域のいずれかに連結するように機能する任意のオリゴヌクレオチドまたはポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、スペーサーは、抗原結合領域が異なる方向に配向して抗原認識を促進するのに十分なほど柔軟である。

## 【0107】

20

本明細書に記載されるように、スペーサー領域は、ストーク領域およびストーク伸長領域(複数可)を含み得る。一部の例では、ストーク領域は、IgG1からのヒンジ領域を含むか、またはストーク領域は、IgG1からのヒンジ領域に対して少なくとも80%の相同性を有する配列を含む。代替の例では、ストーク領域は、IgG3ヒンジ領域、またはIgG3ヒンジ領域(配列番号41)に対して少なくとも80%の相同性を有する配列を含む。他の場合は、ストーク領域は、配列番号43、44、45、46、47、または48に示されるペプチド配列に対して少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える相同性を有するペプチド配列を含む。別のケースでは、ストーク領域は、配列番号144に示される配列に対して少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。一部の場合では、ストーク領域は、CD8ヒンジ領域、またはCD8のヒンジ領域に対して少なくとも80%の相同性を有する配列を含む。例えば、ストーク領域は、CD8のヒンジ領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、またはそれを超える相同性を有する配列を含み得る。一部の場合では、ストーク領域は、CD28ヒンジ領域、またはCD28のヒンジ領域に対して少なくとも80%の相同性を有する配列を含む。例えば、ストーク領域は、CD28のヒンジ領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、またはそれを超える相同性を有する配列を含むことができる。一部の場合では、ストーク領域は、国際公開第2016/073755号パンフレットに記載されているように、IgG4-12アミノ酸ヒンジ領域(ESKYGP CPCP(配列番号43))またはIgG4ヒンジ領域(配列番号42)を含む。

30

## 【0108】

40

一部の実施形態では、ストーク領域は二量体化部位を含む。二量体化部位は、ジスルフィド結合形成部位を含み得る。二量体化部位は、システイン残基(複数可)を含み得る。ストーク領域は、ジスルフィド結合を形成することができる。このようなジスルフィド結合は、ジスルフィド結合形成部位または二量体化部位で形成され得る。一部の例では、二量体化は、第1のCARのストーク領域と相同的第2のCARの相同ストーク領域の間で起こる。

## 【0109】

50

一部の実施形態では、ストーク伸長領域は、抗原結合領域をストーク領域に連結するために使用される。追加の実施形態では、ストーク伸長領域は、ストーク領域をCARの膜

貫通領域に連結するために使用される。例えば、ストーク領域が I g G に由来するヒンジドメインを含む場合、非 F c C H 2 または C H 3 ドメインをストーク伸長領域として使用することができる。別の実施形態では、ストーク領域およびストーク伸長領域（複数可）は、リンカーを介して接続することができる。他の実施形態では、リンカーを介して、1つのストーク伸長領域を別のストーク伸長領域に接続することができる。このようなリンカーの例は、グリシン - セリンリッチリンカーを含み得る。一実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドのストーク領域またはストーク伸長領域は、配列番号 4 9 に示される I g G 4 ヒンジ - C H 2 - C H 3 スペーサー配列に対して少なくとも約 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % またはそれを超える同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、本明細書に記載されるポリペプチドのストーク領域またはストーク伸長領域は、配列番号 1 4 5 に示される I g G 4 ヒンジ - C H 2 - C H 3 スペーサーヌクレオチド配列に対して少なくとも約 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % またはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。一実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドのストーク領域またはストーク伸長領域は、配列番号 5 0 に示される I g G 4 ヒンジ - C H 3 スペーサー配列に対して少なくとも約 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % またはそれを超える同一性を有するペプチド配列を含む。

10

## 【 0 1 1 0 】

一部の例では、ストーク伸長ドメインは、ストーク領域に部分的に相同である配列を含む。一部の例では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク伸長領域がストーク領域の二量体化部位を欠いていることを除いて、ストーク領域と相同である配列を含む。一部の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域と同一である配列を含む。他の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも 1 つのアミノ酸残基置換を有する、ストーク領域と同一の配列を含む。一部の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ジスルフィド結合を形成することができないか、または相同的のストーク伸長領域と二量体化することができない。

20

## 【 0 1 1 1 】

本明細書に記載される実施形態では、ポリペプチドは、天然または合成の供給源のいずれかに由来し得る膜貫通領域または膜貫通ドメインを含むことができる。供給源が天然である場合、その領域は、膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来することができる。適切な膜貫通領域には、限定されないが、T 細胞受容体のアルファ、ベータもしくはゼータ鎖の膜貫通領域（複数可）；または、C D 2 8、C D 3 イプシロン、C D 3 、C D 4 5、C D 4 、C D 5 、C D 8 アルファ、C D 9 、C D 1 6 、C D 2 2 、C D 3 3 、C D 3 7 、C D 6 4 、C D 8 0 、C D 8 6 、C D 1 3 4 、C D 1 3 7 、C D 1 5 2 ( C T L A - 4 ) もしくは C D 1 5 4 からの膜貫通領域が含まれ得る。あるいは、膜貫通領域またはドメインは、合成であり得、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含み得る。一部の実施形態では、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットは、合成膜貫通ドメインの一方または両方の末端に見られる。任意選択で、一部の実施形態では、長さが 2 ~ 1 0 アミノ酸の短いオリゴヌクレオチドまたはポリペプチドリンクは、C A R の膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインの間の連結を形成し得る。一部の実施形態では、リンクは、グリシン - セリンリンクである。

30

## 【 0 1 1 2 】

一部の実施形態では、膜貫通領域は、C D 8 膜貫通ドメイン、C D 1 5 2 ( C T A L - 4 ) 、T C R 1 、T C R または C D 3 膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、膜貫通領域は、C D 8 膜貫通ドメイン（配列番号 2 4 および配列番号 1 3 0 ）を含む。他の実施形態では、膜貫通領域は、C D 3 膜貫通ドメインを含む。別の実施形態では、膜貫通領域は、C D 1 5 2 ( C T L A - 4 ) 膜貫通ドメイン（配列番号 2 5 および配列番号 1 3 1 ）を含む。さらに別の実施形態では、膜貫通領域は、T C R 膜貫通ドメイン（配列番号 7 1 および配列番号 1 6 5 ）、T C R 膜貫通ドメイン（配列番号 8 5 およ

40

50

び配列番号 179)、T C R 1 膜貫通ドメイン(配列番号 101 および配列番号 195)を含む。一部の実施形態では、膜貫通領域は、T C R 膜貫通ドメイン(配列番号 106 および配列番号 200)を含む。

#### 【0113】

細胞内領域または細胞内ドメインは、1つ以上の共刺激ドメインを含むことができる。例示的な共刺激ドメインには、限定されないが、CD3、CD8、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40(CD134)もしくはその断片または組合せが含まれる。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、CD3、CD8、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40(CD134)もしくはその断片または組合せから選択される1つ以上、または2つ以上の共刺激ドメインを含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、CD3、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、ICOS、OX40(CD134)もしくはその断片または組合せから選択される1つ以上、または2つ以上の共刺激ドメインを含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、CD3、CD28、4-1BB(CD137)もしくはその断片または組合せから選択される1つ以上、または2つ以上の共刺激ドメインを含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、共刺激ドメイン CD3、CD28 および 4-1BB(CD137)またはそれらのそれぞれの断片を含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、共刺激ドメイン CD28 および OX40(CD134)またはそれらのそれぞれの断片を含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、共刺激ドメイン CD8 および CD28 またはそれらのそれぞれの断片を含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、共刺激ドメイン CD28(配列番号 26 および配列番号 132)またはその断片を含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、共刺激ドメイン 4-1BB(CD137)(配列番号 27 および配列番号 133)またはその断片を含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、共刺激ドメイン OX40(CD134)またはその断片を含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、共刺激ドメイン CD8 またはその断片を含む。一部の例では、本明細書に記載されるCARは、共刺激ドメイン CD3(配列番号 28 および配列番号 134)またはその断片を含む。

#### 【0114】

一部の実施形態では、細胞内領域または細胞内ドメインは、T細胞活性化のためのシグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の例では、T細胞活性化のためのシグナル伝達ドメインは、T C R ゼータ、FcR ガンマ、FcR ベータ、CD3 ガンマ、CD3 デルタ、CD3 イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b または CD66d に由来するドメインを含む。一部の場合では、T細胞活性化のためのシグナル伝達ドメインは、CD3 に由来するドメインを含む。

#### 【0115】

CD19特異的CAR

CD19は、免疫グロブリンスーパーファミリーの細胞表面糖タンパク質であり、主に悪性B系統細胞に見られる。一部の例では、CD19はまた、脾臓がん、肝臓がん、および前立腺がんなどの固形腫瘍において検出されている。

#### 【0116】

一部の実施形態では、本明細書では、抗原結合領域が F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、または scFv を含む、CD19特異的CARを含む。一部の例では、抗原結合領域は CD19 上のエピトープを認識する。

#### 【0117】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドによって包含される抗原結合領域は、JCAR014、JCAR015、JCAR017、または 19-28z CAR

10

20

30

40

50

R ( Juno Therapeutics ) によっても認識される CD19 上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、CD19 は、配列番号 51 に示される CD19 配列に対して少なくとも 80 % の相同性を有するペプチド配列を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるように、T 細胞などのエフェクター細胞上に発現される CD19 特異的 CAR を含み、その抗原結合領域は、JCAR014、JCAR015、JCAR017、または 19 - 28z CAR ( Juno Therapeutics ) でも認識される CD19 上のエピトープを認識する。一部の例では、CD19 特異的 CAR は、CD8 アルファ膜貫通ドメイン ( 配列番号 24 および配列番号 130 ) もしくは CD3 膜貫通ドメインから選択される膜貫通領域または膜貫通ドメイン ; CD27、CD28、4 - 1BB ( CD137 ) 、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 ( CD134 ) もしくはその断片または組合せから選択される 1 つ以上の共刺激ドメイン ; および CD3 からのシグナル伝達領域またはシグナル伝達ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の例では、CD19 特異的 CAR は、本明細書に開示されるストーク領域およびストーク伸長領域をさらに含むポリペプチドの一部として発現される。例えば、CD19 特異的 CAR を含むポリペプチドは、CD8 ヒンジ領域を含むストーク領域、およびストーク伸長領域 ( s' - n ) をさらに含むことができ、n = 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 であり、各ストーク伸長領域は、二量体化部位が欠いていることを除いて、CD8 ヒンジ領域と相同である。

10

20

30

40

## 【 0118 】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドによって包含される CD19 特異的 CAR は、scFv 抗原結合領域を含み、抗原結合領域は、JCAR014、JCAR015、JCAR017、または 19 - 28z CAR ( Juno Therapeutics ) によっても認識される CD19 上のエピトープを認識する。一部の例では、CD19 特異的 CAR は、CD8 アルファ膜貫通ドメイン ( 配列番号 24 および配列番号 130 ) または CD3 膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン ; CD27、CD28、4 - 1BB ( CD137 ) 、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 ( CD134 ) もしくはその断片または組合せから選択される 1 つ以上の共刺激ドメイン ; および CD3 からのシグナル伝達ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の場合では、CD19 特異的 CAR は、CD152 ( CTLA-4 ) 膜貫通ドメイン ( 配列番号 25 および配列番号 131 ) 、TCR 膜貫通ドメイン ( 配列番号 71 および配列番号 165 ) 、TCR 膜貫通ドメイン ( 配列番号 85 および配列番号 179 ) 、TCR 1 膜貫通ドメイン ( 配列番号 101 および配列番号 195 ) または TCR 膜貫通ドメイン ( 配列番号 106 および配列番号 200 ) から選択される膜貫通ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の例では、CD19 特異的 CAR 細胞を含むポリペプチドは、本明細書に開示されるストーク領域およびストーク伸長領域をさらに含む。例えば、ポリペプチドは、CD8 ヒンジ領域を含むストーク領域、およびストーク伸長領域 ( s' - n ) をさらに含むことができ、n = 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 であり、各ストーク伸長領域は、二量体化部位が欠いていることを除いて、CD8 ヒンジ領域と相同である。

40

## 【 0119 】

一部の実施形態では、本明細書に記載される T 細胞などのエフェクター細胞上で発現される CD19 特異的 CAR は、米国特許出願公開第 2016 / 0152723 号明細書に記載される抗 CD19 抗体を含む。

50

## 【 0120 】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドに包含される抗原結合領域は、KTE-C19 ( Kite Pharma, Inc. ) によっても認識される CD19 上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるように、抗原結合領域が、KTE-C19 によっても認識される CD19 上のエピトープを認識する CD

19 特異的 CAR - T 細胞を含む。いくつか場合では、CD19 特異的 CAR は、CD8 アルファ膜貫通ドメイン（配列番号 24 および配列番号 130）または CD3 膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 (CD134) もしくはその断片または組合せから選択される 1 つ以上の共刺激ドメイン；および CD3 からのシグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の場合では、CD19 特異的 CAR は、CD152 (CTLA-4) 膜貫通ドメイン（配列番号 25 および配列番号 131）、TCR 膜貫通ドメイン（配列番号 71 および配列番号 165）、TCR 膜貫通ドメイン（配列番号 85 および配列番号 179）、TCR 1 膜貫通ドメイン（配列番号 101 および配列番号 195）または TCR 膜貫通ドメイン（配列番号 106 および配列番号 200）から選択される膜貫通ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。

10

#### 【0121】

一部の実施形態は、本明細書に記載されるように、scFv 抗原結合領域を含む CD19 特異的 CAR を含み、抗原結合領域は、KTE-C19 によっても認識される CD19 上のエピトープを認識する。一部の例では、CD19 特異的 CAR - T 細胞は、CD8 アルファ膜貫通ドメイン（配列番号 24 および配列番号 130）または CD3 膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 (CD134) もしくはその断片または組合せから選択される 1 つ以上の共刺激ドメイン；および CD3 からのシグナル伝達ドメインをさらに含む。

20

#### 【0122】

一部の実施形態では、本明細書に記載される CD19 特異的 CAR は、国際公開第 2015 / 187528 号パンフレットに記載されている抗 CD19 抗体またはその断片もしくは誘導体を含む。

#### 【0123】

一部の実施形態では、抗原結合領域は、CTL019 (Novartis) によっても認識される CD19 上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、抗原結合領域は、UCART19 (Celllectis) によっても認識される CD19 上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、抗原結合領域は、BPX-401 (Bellincum) によっても認識される CD19 上のエピトープを認識する。一部の場合では、抗原結合領域は、ブリナツモマブ (Amgen)、コルツキシマブラブタンシン (Immunogen Inc. / Sanofi-aventis)、MOR208 (Morphosys AG / Xencor Inc.)、MED1-551 (Medimmune)、デニンツズマブマフォドチン (Seattle Genetics)、B4 (または DI-B4) (Merck Seono)、タプリツモマバブトックス (国立がん研究所)、XmAb 5871 (Amgen / Xencor, Inc.)、MDX-1342 (Medarex) または AFM11 (Affimed) でも認識される CD19 上のエピトープを認識する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるように、抗原結合領域が CTL019 によっても認識される CD19 上のエピトープを認識する、T 細胞などのエフェクター細胞上で発現される CD19 特異的 CAR を含む。一部の例では、CD19 特異的 CAR は、CD8 アルファ膜貫通ドメイン（配列番号 24 および配列番号 130）または CD3 膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40 (CD134) もしくはその断片または組合せから選択される 1 つ以上の共刺激ドメイン；および CD3 からのシグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の場合では、CD19 特異的 CAR は、CD152 (CTLA-4) 膜貫通ドメイン（配列番号 25 および配列番号 131）、TCR 膜貫通ドメイン（配列番号 71 および配列番号 165）、TCR 膜貫通ドメイン（配列番号 85 および配列番号 179）、TCR 1 膜貫通ドメイン（配列番号 101 および配列番号 195）または TCR 膜貫通ドメイン（配列番号 106 および配列番号 200）から選択される膜貫通ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の例では、

30

40

50

CD19特異的CARは、本明細書に開示されるストーク領域およびストーク伸長領域をさらに含むポリペプチドの一部としてコードされる。例えば、CD19特異的CARは、CD8ヒンジ領域を含むストーク領域、およびストーク伸長領域(s'-n)をさらに含むポリペプチドによって包含され得、n=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20であり、各ストーク伸長領域は、二量体部位を欠いていることを除いて、CD8ヒンジ領域と相同である。

#### 【0124】

一部の実施形態は、本明細書に記載されるように、scFv抗原結合領域を含むT細胞などのエフェクター細胞上に発現されるCD19特異的CARを含み、抗原結合領域は、CTL019、BPX-401、ブリナツモマブ(Amgen)、コルツキシマプラブタンシン(ImmunoGen Inc./Sanofi-aventis)、MOR208(Morphosys AG/Xencor Inc.)、MED1-551(Medimmune)、デニンツズマブマフォドチン(Seattle Genetics)、B4(またはDI-B4)(Merck Serono)、タプリツモマバップトックス(国立がん研究所)、XmAb 5871(Amgen/Xencor, Inc.)、MDX-1342(Medarex)およびAFM11(Affimed)のうちの少なくとも1つによって認識されるCD19上のエピトープを認識する。一部の例では、CD19特異的CARは、CD8アルファ膜貫通ドメイン(配列番号24および配列番号130)またはCD3膜貫通ドメインから選択される膜貫通ドメイン；CD27、CD28、4-1BB(CD137)、ICOS、DAP10、DAP12、OX40(CD134)もしくはその断片または組合せから選択される1つ以上の共刺激ドメイン；およびCD3からのシグナル伝達ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の場合では、CD19特異的CARは、CD152(CTLA-4)膜貫通ドメイン(配列番号25および配列番号131)、TCR膜貫通ドメイン(配列番号71および配列番号165)、TCR膜貫通ドメイン(配列番号85および配列番号179)、TCR1膜貫通ドメイン(配列番号101および配列番号195)またはTCR膜貫通ドメイン(配列番号106および配列番号200)から選択される膜貫通ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の場合では、CD19特異的CARは、DAP10シグナルドメイン(配列番号29および配列番号135)またはDAP12シグナル伝達ドメイン(配列番号30および配列番号136)から選択されるシグナル伝達ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の例では、CD19特異的CARを含むポリペプチドは、本明細書に開示されるストーク領域およびストーク伸長領域をさらに含む。例えば、ポリペプチドは、CD8ヒンジ領域を含むストーク領域、およびストーク伸長領域(s'-n)をさらに含むことができ、n=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20であり、各ストーク伸長領域は、二量体化部位を欠いていることを除いて、CD8ヒンジ領域と相同である。

#### 【0125】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるCD19特異的CARは、配列番号53に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号147に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗CD19モノクローナル抗体可変鎖を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるCD19特異的CARは、配列番号54に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号148に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗CD19モノクローナル抗体可変鎖を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるCD19特異的CARは、配列番号55に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号149に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコ-

10

20

30

40

50

ドされるペプチド配列を含むホイットローリンカーを有する抗 C D 1 9 s c F v を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 1 9 特異的 C A R は、配列番号 5 6 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 0 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 C D 8 - 1 X スペーサーを有する C D 1 9 特異的キメラ抗原受容体 ( C D 1 9 - C D 8 - C D 2 8 - C D 3 ) を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 1 9 特異的 C A R は、配列番号 5 7 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 1 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 C D 8 - 2 X スペーサーを有する C D 1 9 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 1 9 特異的 C A R は、配列番号 5 8 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 2 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 C D 8 - 3 X スペーサーを有する C D 1 9 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 1 9 特異的 C A R は、配列番号 5 9 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 3 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 C D 8 - 3 X v 2 スペーサーを有する C D 1 9 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 1 9 特異的 C A R は、配列番号 6 0 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 4 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 C D 8 - 4 X スペーサーを有する C D 1 9 特異的キメラ抗原受容体を含む。

10

20

30

30

40

50

## 【 0 1 2 6 】

## C D 3 3 特異的 C A R

C D 3 3 / S i g l e c - 3 は、骨髄系細胞において特異的に発現される制限された白血球抗原である。一部の例では、 C D 3 3 はまた、リンパ系細胞において検出されている。

## 【 0 1 2 7 】

一部の実施形態では、本明細書における開示は、 C D 3 3 特異的 C A R を含み、抗原結合領域は、 C D 3 3 に結合する F ( a b ' )<sub>2</sub> 、 F a b ' 、 F a b 、 F v 、または s c F v を含む。

## 【 0 1 2 8 】

一部の実施形態では、抗原結合領域は、リンツズマブ ( S e a t t l e G e n e t i c s ) 、 B I 8 3 6 8 5 8 ( B o e h r i n g e r I n g e l h e i m ) によって認識される C D 3 3 上のエピトープを認識する。一部の例では、本明細書に記載されるポリペプチドは、 C D 3 3 特異的 C A R を含み、 C D 8 アルファ膜貫通ドメイン ( 配列番号 2 4 および配列番号 1 3 0 ) もしくは C D 3 膜貫通ドメインから選択される膜貫通領域または膜貫通ドメイン； C D 2 7 、 C D 2 8 、 4 - 1 B B ( C D 1 3 7 ) 、 I C O S 、 D A P 1 0 、 D A P 1 2 、 O X 4 0 ( C D 1 3 4 ) 、 C D 3 - ゼータもしくはその断片または組合せから選択される 1 つ以上の共刺激ドメイン；および C D 3 からのシグナル伝達領域またはシグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の場合では、 C D 3 3 特異的 C A R は、 C D 1 5 2 ( C T L A - 4 ) 膜貫通ドメイン ( 配列番号 2 5 および配列番号 1 3 1 ) 、 T C R 膜貫通ドメイン ( 配列番号 7 1 および配列番号 1 6 5 ) 、 T C R 膜貫通ドメイン ( 配列番号 8 5 および配列番号 1 7 9 ) 、 T C R 1 膜貫通ドメイン ( 配列番号 1 0 1 および配列番号 1 9 5 ) または T C R 膜貫通ドメイン ( 配列番号 1 0 6 および配列番号 2 0 0 ) から選択される膜貫通ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。いくらか場合で、 C D 3 3 特異的 C A R は、 D A P 1 0 シグナル伝達ドメイン ( 配列番号 2 9 および配列番号 1 3 5 ) 、または D A P 1 2 シグナル伝達ドメイン ( 配列番号 3 0 および配列番号 1 3 6 ) から選択されるシグナル伝達ドメインをさらに含むポリペプチド

によって包含される。いくらか場合では、C D 3 3 特異的 C A R は、D A P 1 0 シグナル伝達ドメイン（配列番号 2 9 および配列番号 1 3 5 ）、または D A P 1 2 シグナル伝達ドメイン（配列番号 3 0 および配列番号 1 3 6 ）から選択されるシグナル伝達ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の例では、C D 3 3 特異的 C A R は、本明細書に開示されるストーク領域およびストーク伸長領域をさらに含む。例えば、C D 3 3 特異的 C A R は、スペーサーをさらに含むことができ、スペーサーは、C D 8 ヒンジ領域を含むストーク領域、およびストーク伸長領域（複数可）、s' - n (n = 0, 1, 2, 3 または 4 である) を含む。

#### 【0129】

一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 3 3 特異的 C A R は、配列番号 6 1 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 5 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗 C D 3 3 モノクローナル抗体可変軽鎖を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 3 3 特異的 C A R は、配列番号 6 2 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 6 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗 C D 3 3 モノクローナル抗体可変重鎖を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 3 3 特異的 C A R は、配列番号 6 3 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 7 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗 C D 3 3 モノクローナル抗体 S c F v を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 3 3 特異的 C A R は、配列番号 6 4 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 8 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、C D 8 1 X スペーサーを有する C D 3 3 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 3 3 特異的 C A R は、配列番号 6 5 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 5 9 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、C D 8 2 X スペーサーを有する C D 3 3 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 3 3 特異的 C A R は、配列番号 6 6 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 6 0 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、C D 8 3 X スペーサーを有する C D 3 3 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 3 3 特異的 C A R は、配列番号 6 7 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 6 1 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、C D 8 3 X v 2 スペーサーを有する C D 3 3 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される C D 3 3 特異的 C A R は、配列番号 6 8 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 1 6 2 に示される配列に対して少なくとも 8 0 % の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、C D 8 4 X スペーサーを有する C D 3 3 特異的キメラ抗原受容体を含む。

#### 【0130】

##### E G F R v I I I 特異的 C A R

別の実施形態では、本明細書に記載される C A R は、E G F R v I I I 特異的 C A R である。「E G F R v I I I 」、「E G F R 変異体 I I I 」、「E G F R タイプ I I I 突然変異体」、「E G F R . D 2 - 7 」または「d e 2 - 7 E G F R 」は、ヒトおよび非ヒト対象における細胞外タンパク質リガンドの上皮細胞増殖因子 (E G F ) ファミリーのメンバーの受容体である膜貫通タンパク質である上皮細胞増殖因子受容体 (E G F R ; E r b

10

20

30

40

50

B - 1 ; HER 1 ) の突然変異型である。EGFRvIIIは、野生型EGFR遺伝子のエクソン2～7の欠失によって特徴付けられ、これは、完全長の野生型EGFRタンパク質の細胞外ドメインにおいて267アミノ酸のインフレーム欠失をもたらす。EGFRvIIIはまた、野生型EGFRと比較して、融合接合部に挿入された新規なグリシン残基を含む。切断型受容体EGFRvIIIは、いずれもの公知のEGFRリガンドに結合することができない；しかしながら、それは構成的チロシンキナーゼ活性を示す。この構成的活性化は、その発癌促進効果にとって重要である。キナーゼ欠損EGFRvIIIは、同様の発癌性の優位性を与えることができない。EGFRvIIIは、膠芽腫(GBM)において高度に発現し、他の一部の固形腫瘍タイプでは検出することができるが、正常組織では検出することができない。

10

## 【0131】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるCARの抗原結合部分は、EGFRvIII (EGFRvIII CAR) に特異的である。EGFRvIII特異CARは、細胞表面上に発現した場合、T細胞の特異性をヒトEGFRvIIIへと再方向付けする。実施形態では、抗原結合ドメインは、グリシン-セリンリンカーまたはホイットローリンカーなどの可撓性リンカーによって接合された標的抗原特異的モノクローナル抗EGFRvIII抗体の可変ドメイン軽鎖(VL)および可変ドメイン重鎖(VH)を含む一本鎖抗体断片(scFv)を含む。実施形態では、scFvは、クローン139(配列番号221および222)である。一部の実施形態では、scFvは、抗EGFRvIII scFvクローンMR1(配列番号223；配列番号224)、抗EGFRvIII scFvクローンMR1-1(配列番号225；配列番号226)、抗EGFRvIII scFvクローンhuMR1-1(配列番号227；配列番号228)、抗EGFRvIII scFvクローンhuMR1-2(配列番号229；配列番号230)である。一部の実施形態では、抗原結合部分は、例えば、N末端からC末端の方向で連結されたVHおよびVL、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VHを含み得る。

20

## 【0132】

実施形態では、本明細書に記載されるCARは、配列番号204(抗EGFRvIIIクローン139VL)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するVLポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。実施形態では、本明細書に記載されるCARは、配列番号202(抗EGFRvIIIクローン139VH)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するVHポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。

30

## 【0133】

実施形態では、本明細書に記載されるCARは、配列番号208(抗EGFRvIIIクローンMR1 VL)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するVLポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。実施形態では、本明細書に記載されるCARは、配列番号206(抗EGFRvIIIクローンMR1 VH)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するVHポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。実施形態では、本明細書に記載されるCARは、配列番号212(抗EGFRvIIIクローンMR1-1 VL)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するVLポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。実施形態では、本明細書に記載されるCARは、配列番号210(抗EGFRvIIIクローンMR1-1 VH)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するVHポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。

40

50

## 【0134】

実施形態では、本明細書に記載されるC A Rは、配列番号216（抗E G F R v I I Iクローンh u m M R 1 - 1 V L）のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するV Lポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。実施形態では、本明細書に記載されるC A Rは、配列番号214（抗E G F R v I I Iクローンh u m M R 1 - 1 V H）のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するV Hポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。実施形態では、本明細書に記載されるC A Rは、配列番号220（抗E G F R v I I Iクローンh u m M R 1 - 2 V L）のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するV Lポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。実施形態では、本明細書に記載されるC A Rは、配列番号218（抗E G F R v I I Iクローンh u m M R 1 - 2 V H）のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するV Hポリペプチドを含む抗原結合部分を含む。

10

## 【0135】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるE G F R v I I I特異的C A Rは、配列番号222に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号221に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗E G F R v I I Iモノクローナル抗体s c F v（クローン139）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるE G F R v I I I特異的C A Rは、配列番号224に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号223に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗E G F R v I I Iモノクローナル抗体s c F v（M R 1）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるE G F R v I I I特異的C A Rは、配列番号226に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号225に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗E G F R v I I Iモノクローナル抗体s c F v（M R 1 - 1）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるE G F R v I I I特異的C A Rは、配列番号228に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号227に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗E G F R v I I Iモノクローナル抗体s c F v（h u M R 1 - 1）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるE G F R v I I I特異的C A Rは、配列番号230に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号229に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む抗E G F R v I I Iモノクローナル抗体s c F v（h u M R 1 - 2）を含む。

20

30

## 【0136】

40

一部の例では、本明細書に記載されるポリペプチドは、E G F R v I I I特異的C A Rを含み、C D 8アルファ膜貫通ドメイン（配列番号24および配列番号130）もしくはC D 3 膜貫通ドメインから選択される膜貫通領域または膜貫通ドメイン；C D 2 7、C D 2 8、4 - 1 B B（C D 1 3 7）、I C O S、D A P 1 0、D A P 1 2、O X 4 0（C D 1 3 4）、C D 3 もしくはその断片または组合せから選択される1つ以上の共刺激ドメイン；およびC D 3 からのシグナル伝達領域またはシグナル伝達ドメインをさらに含む。いくつかの場合では、E G F R v I I I特異的C A Rは、C D 1 5 2（C T L A - 4）膜貫通ドメイン（配列番号25および配列番号131）、T C R 膜貫通ドメイン（配列番号71および配列番号165）、T C R 膜貫通ドメイン（配列番号85および配列番号179）、T C R 1膜貫通ドメイン（配列番号101および配列番号195）またはT

50

C R 膜貫通ドメイン（配列番号 106 および配列番号 200）から選択される膜貫通ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の場合では、EGFRvIII 特異的 CAR は、DAP10 シグナル伝達ドメイン（配列番号 29 および配列番号 135）、または DAP12 シグナル伝達ドメイン（配列番号 30 および配列番号 136）から選択されるシグナル伝達ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の場合では、EGFRvII 特異的 CAR は、DAP10 シグナル伝達ドメイン（配列番号 29 および配列番号 135）、または DAP12 シグナル伝達ドメイン（配列番号 30 および配列番号 136）から選択されるシグナル伝達ドメインをさらに含むポリペプチドによって包含される。一部の例では、EGFRvII 特異的 CAR は、本明細書に開示されるストーク領域およびストーク伸長領域をさらに含む。例えば、EGFRvIII 特異的 CAR は、スペーサーをさらに含むことができ、スペーサーは、CD8 ヒンジ領域を含むストーク領域、およびストーク伸長領域、s' - n を含み、n = 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 であり、各ストーク伸長領域は、二量体化部位を欠いていることを除いて CD8 ヒンジ領域に相同である。

#### 【0137】

一部の実施形態では、本明細書に記載される EGFRvIII 特異的 CAR は、配列番号 232 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 231 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、CD8 - 1 X スペーサーを有する EGFRvIII 特異的キメラ抗原受容体（クローン 139scFv - CD8 - 4 - 1BB - CD3）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される EGFRvII 特異的 CAR は、配列番号 234 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 233 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、CD8 - 1 X スペーサーを有する EGFRvII 特異的キメラ抗原受容体（クローン MR1scFv - CD8 - 4 - 1BB - CD3）を含む。

#### 【0138】

一部の実施形態では、本明細書に記載される EGFRvIII 特異的 CAR は、配列番号 236 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 235 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、CD8 - 1 X スペーサーを有する EGFRvIII 特異的キメラ抗原受容体（クローン MR1 - 1scFv - CD8 - 4 - 1BB - CD3）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される EGFRvII 特異的 CAR は、配列番号 242 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 241 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、CD8 - 2 X スペーサーを有する EGFRvII 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される EGFRvII 特異的 CAR は、配列番号 244 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 243 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、CD8 - 3 X スペーサーを有する EGFRvII 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される EGFRvIII 特異的 CAR は、配列番号 246 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 245 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、CD8 - 4 X スペーサーを有する EGFRvIII 特異的キメラ抗原受容体を含む。

#### 【0139】

一部の実施形態では、本明細書に記載される EGFRvIII 特異的 CAR は、配列番号 238 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、また

10

20

30

40

50

は配列番号 237 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 CD8 - 1 X スペーサーを有する EGF R v I I I 特異的キメラ抗原受容体 (h u M R 1 - 1 - C D 8 - 4 - 1 B B - C D 3 ) を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される EGF R v I I I 特異的 CAR は、配列番号 248 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 247 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 CD8 - 3 X スペーサーを有する EGF R v I I I 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される EGF R v I I I 特異的 CAR は、配列番号 250 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 249 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 CD8 - 4 X スペーサーを有する EGF R v I I I 特異的キメラ抗原受容体を含む。

#### 【 0140 】

一部の実施形態では、本明細書に記載される EGF R v I I I 特異的 CAR は、配列番号 240 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 239 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 CD8 - 1 X スペーサーを有する EGF R v I I I 特異的キメラ抗原受容体 (h u M R 1 - 2 - C D 8 - 4 - 1 B B - C D 3 ) を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される EGF R v I I I 特異的 CAR は、配列番号 252 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 251 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 CD8 - 3 X スペーサーを有する EGF R v I I I 特異的キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される EGF R v I I I 特異的 CAR は、配列番号 254 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するペプチド配列、または配列番号 253 に示される配列に対して少なくとも 80% の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む、 CD8 - 4 X スペーサーを有する EGF R v I I I 特異的キメラ抗原受容体を含む。

#### 【 0141 】

修飾されたエフェクター細胞

一部の実施形態では、ポリペプチドを発現する修飾されたエフェクター細胞が本明細書に記載され、本明細書に記載される CAR などの抗原結合ポリペプチドが含まれる。一部の実施形態では、修飾されたエフェクター細胞は、T 細胞および / またはナチュラルキラー細胞を含む修飾された免疫細胞である。T 細胞または T リンパ球は、細胞性免疫に関する白血球のサブタイプである。例示的な T 細胞には、T ヘルパー細胞、細胞傷害性 T 細胞、TH17 細胞、幹メモリー T 細胞 (stem memory T cells) (T<sub>SCM</sub>) 、ナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞、エフェクター T 細胞、調節性 T 細胞、またはナチュラルキラー T 細胞が含まれる。

#### 【 0142 】

T ヘルパー細胞 (T H 細胞) は、形質細胞およびメモリー B 細胞への B 細胞の成熟、ならびに細胞傷害性 T 細胞およびマクロファージの活性化を含む、免疫学的プロセスにおいて他の白血球を補助する。一部の例では、T H 細胞は、細胞表面上における CD4 糖タンパク質の発現により、CD4 + T 細胞として公知である。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞 (APC) の表面上に発現する MHC クラス II 分子によってペプチド抗原が提示された場合に活性化されるようになる。活性化されると、それらは急速に分裂し、サイトカインと呼ばれる小さなタンパク質を分泌して、活発な免疫応答を調節または補助する。これらの細胞は、TH1 、 TH2 、 TH3 、 TH17 、 Th9 、または TFH を含むいくつかのサブタイプの 1 つに分化し、異なるサイトカインを分泌して、異なるタイプの免疫応答を促進する。APC からのシグナル伝達は、T 細胞を特定のサブタイプへと方向付ける。

40

APC からのシグナル伝達は、T 細胞を特定のサブタイプへと方向付ける。

50

## 【0143】

細胞傷害性T細胞（T<sub>C</sub>細胞またはCTL）は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、また、移植拒絶に関係する。これらの細胞はまた、それらの表面上でCD8糖タンパク質を発現するため、CD8+T細胞としても公知である。これらの細胞は、すべての有核細胞の表面上に存在するMHCクラスI分子に関連する抗原に結合することによって、それらの標的を認識する。IL-10、アデノシン、および調節性T細胞によって分泌される他の分子を介して、CD8+細胞を不活性化してアネルギー状態にし、自己免疫疾患を防ぐことができる。

## 【0144】

メモリーT細胞は、感染が解消した後に、長期間持続する抗原特異的T細胞のサブセットである。それらは、それらの同族の抗原への再曝露の際に大多数のエフェクターT細胞に急速に拡大し、したがって、免疫系に過去の感染に対する「メモリー」を提供する。メモリーT細胞は、サブタイプ：幹メモリーT細胞（T<sub>SCM</sub>）、セントラルメモリーT細胞（T<sub>CM</sub>細胞）、および2種類のエフェクターメモリーT細胞（T<sub>EM</sub>細胞およびT<sub>EMRA</sub>細胞）を含む。メモリー細胞は、CD4+またはCD8+のいずれかであり得る。メモリーT細胞は、細胞表面タンパク質CD45RO、CD45RA、および/またはCCR7を発現し得る。

10

## 【0145】

以前はサプレッサーT細胞として知られていた調節性T細胞（T<sub>reg</sub>細胞）は、免疫学的寛容の維持において役割を果たす。それらの主な役割は、免疫反応の終わりに向けてT細胞性免疫を停止し、胸腺におけるネガティブ選択のプロセスから逃れた自己反応性T細胞を抑制することである。

20

## 【0146】

ナチュラルキラーT細胞（NKT細胞）は、適応免疫系と自然免疫系を橋渡しする。主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子によって提示されるペプチド抗原を認識する従来のT細胞とは異なり、NKT細胞は、CD1dと呼ばれる分子によって提示される糖脂質抗原を認識する。活性化されると、これらの細胞は、Th細胞とTc細胞の両方に起因する機能（すなわち、サイトカイン生成、および細胞溶解性/細胞殺傷分子の放出）を行うことができる。それらはまた、一部の腫瘍細胞、およびヘルペスウイルスに感染した細胞を認識し、排除することができる。

30

## 【0147】

ナチュラルキラー（NK）細胞は、自然免疫系の細胞傷害性リンパ球の一種である。一部の例では、NK細胞は、ウイルス感染および/または腫瘍形成に対する第一線の防御を提供する。NK細胞は、感染した細胞またはがん細胞に提示されたMHCを検出し、サイトカインの放出を引き起こし、続いて溶解およびアポトーシスを誘導することができる。NK細胞はさらに、抗体および/またはMHCの非存在下でストレスを受けた細胞を検出することができ、それにより迅速な免疫応答を可能にする。

## 【0148】

## 操作されたT細胞受容体（TCR）

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、操作されたT細胞受容体を含む。T細胞受容体（TCR）は、T細胞の表面上で対形成して、ヘテロ二量体受容体を形成する2つの鎖（または）で構成されている。一部の例では、TCRは体内的ほとんどのT細胞上に発現し、特定のMHC制限抗原の認識に関与していることが公知である。各および鎖は、2つのドメイン：タンパク質を細胞膜に固定し、CD3シグナル伝達装置の不变サブユニットと会合している定常ドメイン（C）；および相補性決定領域（CDR）と呼ばれる、6つのループを通じて抗原認識を付与する可変ドメイン（V）で構成されている。一部の例では、Vドメインの各々は、3つのCDR；例えば、超可変領域としてCDR3を伴うCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。これらのCDRは、主要組織適合遺伝子複合体（pepMHC）によってコードされるタンパク質に結合した抗原ペプチド間で形成される複合体（例えば、HLA-A、HLA-B、HL

40

50

A - C、HLA - DPA1、HLA - DPB1、HLA - DQA1、HLA - DQB1、HLA - DRA、またはHLA - DRB1複合体)と相互作用する。一部の例では、定常ドメインは、定常ドメインを可変ドメインに接続する接合領域をさらに含む。一部の場合では、ベータ鎖はさらに、接続領域の一部を構成する短い多様性領域を含む。

#### 【0149】

一部の場合では、このようなTCRは、特定の腫瘍抗原、例えば、NY-ESO、タイチン、MART-1、HPV、HBV、MAGE-A4、MAGE-A10、MAGE-A3/A6、gp100、MAGE-A1、またはPRAMEに反応性である。他のケースでは、このようなTCRは、患者の腫瘍(すなわち、腫瘍によって発現される患者特異的、体性、非同義突然変異)内で発現する特定の新生抗原に反応性である。一部の場合は、操作されたTCRは、親和性を高めることができる。10

#### 【0150】

一部の実施形態では、TCRは、国際免疫遺伝学(IMGT)TCR命名法を使用して説明され、TCR配列のIMGト公開データベースにリンクする。例えば、それらのフレームワーク、CDR1、CDR2、およびCDR3配列によって区別されるいくつかのタイプのアルファ鎖可変(V)領域およびいくつかのタイプのベータ鎖可変(V)領域が存在し得る。そのため、Vタイプは、IMGト命名法では一意のTRA V番号で参照することができる。例えば、「TRA V21」は、固有のフレームワークならびにCDR1およびCDR2配列を有するTCRV領域、ならびにTCRからTCRに保存されているが、TCRからTCRに変化するアミノ酸配列も含む、アミノ酸配列によって部分的に定義されるCDR3配列を定義する。同様に、「TRBV5-1」は、独自のフレームワークならびにCDR1およびCDR2配列を有するが、部分的に定義されたCDR3配列のみを含む、TCR V領域を定義する。20

#### 【0151】

一部の場合では、ベータ鎖多様性領域は、省略形TRBDによってIMGト命名法で呼ばれる。

#### 【0152】

一部の例では、IMGト命名法によって定義される固有の配列は広く公知であり、TCR分野で働いている人々にとってアクセス可能である。例えば、それらは、IMGト公開データベース、および「T cell Receptor Factsbook」(2001年)Le FrancおよびLe Franc、Academic Press、ISBN 0-12-441352-8に見出すことができる。30

#### 【0153】

一部の実施形態では、ヘテロ二量体TCRは、例えば、細胞質ドメインと膜貫通ドメインの両方を有する全長鎖としてトランスフェクトされる。一部の場合では、TCRは、例えば、国際公開第2006/000830号パンフレットに記載されているように、それぞれの定常ドメインの残基間に導入されたジスルフィド結合を含む。

#### 【0154】

一部の例では、本明細書に記載されるTCRは、一本鎖形式であり、例えば、国際公開第2004/033685号パンフレットを参照されたい。一本鎖フォーマットには、V-L-V、V-L-V、V-C-L-V、V-L-V-C、V-C-L-V-CタイプのTCRポリペプチドが含まれ、VおよびVは、それぞれTCRおよび可変領域であり、CおよびCは、それぞれTCRおよび定常領域であり、Lはリンカー配列である。特定の実施形態では、本発明の一本鎖TCRは、国際公開第2004/033685号パンフレットに記載されているように、それぞれの定常ドメインの残基間に導入されたジスルフィド結合を有し得る。40

#### 【0155】

本明細書に記載されるTCRには、検出可能な標識、治療薬またはPK修飾部分が付隨し得る。

#### 【0156】

10

20

30

40

50

診断目的のための例示的な検出可能な標識には、限定されないが、蛍光標識、放射性標識、酵素、核酸プローブおよび造影剤が含まれる。

#### 【0157】

一部の場合では、本明細書に開示されるT C R の各鎖、例えば、またはは、T C R 鎖の定常領域を膜貫通領域に接続する修飾されたスペーサー領域を含む。

#### 【0158】

一部の場合では、本明細書に開示されるT C R の各鎖のスペーサー領域は、1)ストーク領域、および2)前記ストーク領域に隣接するストーク伸長領域(複数可)( $s' - n$ 、ここで、 $n = 0, 1, 2, 3$ またはそれを超える)を含む。例示的な実施形態は、図1Aおよび図1Bに記載される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるT C R の各鎖は、ストーク領域(複数可)およびストーク伸長領域( $s' - n$ 、ここで、 $n = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19$ または20である)を含むスペーサーを組み込む。10

#### 【0159】

本明細書に記載されるように、スペーサー領域は、ストーク領域およびストーク伸長領域(複数可)を含み得る。一部の例では、ストーク領域は、T C R もしくはT C R 鎖からの細胞外ヒンジ領域を含むか、またはストーク領域は、T C R もしくはT C R 鎖からの細胞外ヒンジ領域に対して少なくとも80%の相同性を有する配列を含む。例えば、ストーク領域は、T C R またはT C R 鎖の細胞外領域のヒンジ領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、または95%を超える相同性を有する配列を含み得る。代替の例では、ストーク領域は、それぞれT C R またはT C R 定常領域の細胞外領域に対して少なくとも80%の相同性を有するT C R またはT C R 定常領域の細胞外領域の任意の部分を含む。例えば、ストーク領域は、T C R またはT C R 定常領域の細胞外領域の任意の部分に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、または95%を超える相同性を有する配列を含み得る。20

#### 【0160】

T C R 鎖二量体は、鎖および鎖の細胞外ヒンジ領域における鎖間ジスルフィド結合によって形成される。一部の実施形態では、ストーク領域は二量体化部位を含む。二量体化部位は、ジスルフィド結合形成部位を含み得る。二量体化部位は、システイン残基(複数可)を含み得る。ストーク領域は、ジスルフィド結合を形成することができる。このようなジスルフィド結合は、ジスルフィド結合形成部位または二量体化部位で形成され得る。一部の例では、二量体化は、T C R の鎖と鎖の間で生じる。30

#### 【0161】

一部の実施形態では、ストーク伸長領域が使用される。一部の実施形態では、ストーク伸長領域を使用して、ストーク領域を膜貫通領域のT C R 鎖および鎖に連結する。追加の実施形態では、ストーク伸長領域を使用して、ストーク領域をT C R および鎖の定常領域に連結する。別の実施形態では、ストーク領域およびストーク伸長領域は、リンカーを介して接続することができる。

#### 【0162】

一部の例では、ストーク伸長ドメインは、ストーク領域と部分的に相同である配列を含む。一部の例では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク伸長領域がストーク領域の二量体化部位を欠いていることを除いて、ストーク領域と相同である配列を含む。一部の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域と同一である配列を含む。他の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ストーク領域に対して少なくとも1つのアミノ酸残基置換を有するストーク領域と同一である配列を含む。一部の場合では、ストーク伸長領域の各々は、ジスルフィド結合を形成することができないか、または相同なストーク伸長領域と二量体化することができない。40

#### 【0163】

他の実施形態では、1つのストーク伸長領域は、リンカーを介して、別のストーク伸長領域に接続することができる。このようなリンカーの例には、グリシン-セリンリッチリ50

ンカーが含まれ得る。

【0164】

一部の実施形態では、ストーク伸長領域（複数可）の追加は、遺伝子修飾されたT細胞によって発現される天然のTCR および鎖と、トランスジェニックTCR および鎖の誤った対形成を防止する。

【0165】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるTCRは、配列番号69に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号163に示される配列に対して少なくとも80%のヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むTCR鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるTCRは、配列番号83に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号177に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むTCR1鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるTCRは、配列番号97に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号191に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むTCR2鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるTCRは、配列番号99に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号193に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むTCR1鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるTCRは、配列番号102に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号196に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むTCR2鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるTCRは、配列番号104に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するペプチド配列、または配列番号198に示される配列に対して少なくとも80%の相同性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含むTCR鎖定常領域を含む。

【0166】

本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるポリペプチドのストーク領域またはストーク伸長領域は、配列番号70に示されるヒトTCR鎖定常領域配列の細胞外領域に対して少なくとも約10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%以上またはそれを超える同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、本明細書に記載されるポリペプチドのストーク領域またはストーク伸長領域は、配列番号164に示されるヒトTCR鎖定常領域ヌクレオチド配列に対して少なくとも約10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。一部の場合では、ストーク伸長領域は、配列番号72または配列番号73に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくはそれを超える同一性を有する配列、あるいは配列番号166または配列番号167に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号77、配列番号78または配列番号79に示される配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくはそれを超え

10

20

30

40

50

る同一性を有するペプチド配列、あるいは配列番号 171、配列番号 172 または配列番号 173 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。一部の例では、ストーク領域およびストーク伸長領域はともに、配列番号 80、配列番号 81 または配列番号 82 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくはそれを超える同一性を有するペプチド配列、あるいは配列番号 174、配列番号 175 または配列番号 176 に示される配列に対して少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくはそれを超える同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。

10

### 【0167】

一部の実施形態では、ストーク領域およびストーク伸長領域（複数可）は、ホイットローリンカー（配列番号 8 および配列番号 114）、GSG リンカー（配列番号 9 および配列番号 115）、SGSG リンカー（配列番号 10）または（G4S）3 リンカー（配列番号 11 および配列番号 117）などのリンカーを介して接続され得る。一実施形態では、（G4S）3 リンカー（配列番号 11）に接続された TCR ヒンジドメインは、配列番号 74 に示されるペプチド配列、または配列番号 168 に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。一実施形態では、（G4S）3 リンカー（配列番号 11）に接続された TCR ヒンジドメインは、配列番号 75 に示されるペプチド配列、または配列番号 169 に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。さらに別の実施形態では、ホイットローリンカーに接続された TCR ヒンジドメインは、配列番号 76 に示されるペプチド配列、または配列番号 170 に示されるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含み得る。

20

### 【0168】

本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるヒト TCR 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 70 に示されるペプチド配列に対して少なくとも 80% 以上の同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、本明細書に記載されるヒト TCR 1 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 164 に示されるヒト TCR 1 鎮定常領域ヌクレオチド配列に対して少なくとも約 80% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるヒト TCR 1 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 84 に示されるペプチド配列に対して少なくとも 80% 以上の同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、本明細書に記載される TCR 1 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 178 に示されるヒト GCR 1 鎮定常領域ヌクレオチド配列に対して少なくとも約 80% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるヒト TCR 2 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 98 に示されるペプチド配列に対して少なくとも 80% 以上の同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、本明細書に記載されるヒト TCR 2 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 192 に示されるヒト TCR 1 鎮定常領域ヌクレオチド配列に対して少なくとも約 80% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるヒト TCR 1 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 100 に示されるペプチド配列に対して少なくとも 80% 以上の同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、本明細書に記載されるヒト TCR 1 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 194 に示されるヒト TCR 1 鎮定常領域ヌクレオチド配列に対して少なくとも約 80% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるヒト TCR 2 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 103 に示されるペプチド配列に対して少なくとも 80% 以上の同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、本明細書に記載されるヒト TCR 2 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 197 に

30

40

50

示されるヒト T C R 1 鎮定常領域ヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。本明細書に開示される実施形態の一部の態様では、本明細書に記載されるヒト T C R 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 105 に示されるペプチド配列に対して少なくとも 80 % 以上の同一性を有するペプチド配列を含む。一部の場合では、本明細書に記載されるヒト T C R 鎮定常領域の細胞外領域は、配列番号 199 に示されるヒト T C R 1 鎮定常領域ヌクレオチド配列に対して少なくとも約 80 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。

〔 0 1 6 9 〕

## 修飾されたエフェクター細胞用量

一部の実施形態では、ある量の修飾されたエフェクター細胞が、それを必要とする対象に投与され、その量は、有効性およびサイトカイン関連の毒性を誘発する可能性に基づいて決定される。一部の場合では、修飾された免疫エフェクター細胞の量は、約 $10^2$ ～約 $10^9$ 個の修飾された免疫エフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾された免疫エフェクター細胞の量は、約 $10^3$ ～約 $10^9$ 個の修飾された免疫エフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^4$ ～約 $10^9$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^5$ ～約 $10^9$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^5$ ～約 $10^8$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^5$ ～約 $10^7$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^6$ ～約 $10^9$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^6$ ～約 $10^9$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^5$ ～約 $10^6$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^6$ ～約 $10^7$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^7$ ～約 $10^8$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^8$ ～約 $10^9$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の例では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^9$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の例では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^8$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の例では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^7$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の例では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^8$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の例では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^5$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。一部の例では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約 $10^4$ 個の修飾されたエフェクター細胞/ $\text{kg}$ を含む。

【 0 1 7 0 】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドを発現する修飾されたエフェクター細胞は、修飾されたT細胞である。一部の例では、修飾されたT細胞はCAR-T細胞である。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^2$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^3$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^4$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^5$ ～約 $10^8$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^5$ ～約 $10^7$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^6$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^6$ ～約 $10^8$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合で

は、CAR-T細胞の量は、約 $10^7$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^5$ ～約 $10^6$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^6$ ～約 $10^7$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^7$ ～約 $10^8$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CAR-T細胞の量は、約 $10^8$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の例では、CAR-T細胞の量は、約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の例では、CAR-T細胞の量は、約 $10^8$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の例では、CAR-T細胞の量は、約 $10^7$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の例では、CAR-T細胞の量は、約 $10^6$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の例では、CAR-T細胞の量は、約 $10^5$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の例では、CAR-T細胞の量は、約 $10^4$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の例では、CAR-T細胞の量は、約 $10^3$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の例では、CAR-T細胞の量は、約 $10^2$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。

#### 【0171】

一部の実施形態では、CAR-T細胞は、CD19特異的CAR-T細胞である。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^2$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^3$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^4$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^5$ ～約 $10^8$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^5$ ～約 $10^7$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^6$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^6$ ～約 $10^8$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^7$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^5$ ～約 $10^6$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^6$ ～約 $10^7$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^7$ ～約 $10^8$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^8$ ～約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^9$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^8$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^7$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^5$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^4$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^3$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。一部の場合では、CD19特異的CAR-T細胞の量は約 $10^2$ 個のCAR-T細胞/kgを含む。

#### 【0172】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、操作されたTCR-T細胞である修飾されたT細胞において発現される。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^2$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^3$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^4$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^5$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^5$ ～約 $10^8$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^5$ ～約 $10^7$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^6$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^6$ ～約 $10^7$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^6$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^7$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^8$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR-T細胞の量は約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。

10

20

30

40

50

約 $10^6$ ～約 $10^8$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は、約 $10^7$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は、約 $10^5$ ～約 $10^6$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は、約 $10^6$ ～約 $10^7$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は、約 $10^7$ ～約 $10^8$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は、約 $10^8$ ～約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は約 $10^9$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は約 $10^8$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は約 $10^7$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は約 $10^6$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は約 $10^5$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は約 $10^4$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は約 $10^3$ 個のTCR細胞/kgを含む。一部の場合では、操作されたTCR細胞の量は約 $10^2$ 個のTCR細胞/kgを含む。

#### 【0173】

##### 適応症

一部の実施形態では、本明細書では、本明細書に記載されるポリペプチドを含む修飾されたエフェクター細胞を、障害、例えば、がんを有する対象に投与する方法が開示される。一部の場合では、がんは、CD19、CD20、CD33、CD44、BCMA、CD123、EGFRvIIII、-葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソセリン、GPC3、CSPG4、HER1/HER3、HER2、CD44v6、CD44v7/v8、CD20、CD174、CD138、L1-CAM、FAP、c-MET、PSCA、CS1、CD38、IL-11R、EphA2、CLL-1、CD22、EGFR、葉酸受容体、ムチン、例えば、MUC-1またはMUC-16、MAGE-A1、h5T4、PSMA、CSPG4、TAG-72またはVEGF-R2の発現に関連付けられるがんである。

#### 【0174】

一部の実施形態では、本明細書では、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドをコードする修飾されたエフェクター細胞を、CD19の過剰発現に関連付けられるがんを有する対象に投与する方法が開示される。一部の実施形態では、本明細書では、CD33の過剰発現に関連付けられるがんを有する対象に修飾されたエフェクター細胞を投与する方法が開示される。一部の実施形態では、本明細書では、CD44、CD19、BCMA、CD123、EGFRvIIII、-葉酸受容体、CAIX、CD30、ROR1、CEA、EGP-2、EGP-40、HER2、HER3、葉酸結合タンパク質、GD2、GD3、IL-13R-a2、KDR、EDB-F、メソセリン、GPC3、CSPG4、HER1/HER3、HER2、CD44v6、CD44v7/v8、CD20、CD174、CD138、L1-CAM、FAP、c-MET、PSCA、CS1、CD38、IL-11R、EphA2、CLL-1、CD22、EGFR、ムチン、例えば、MUC-1またはMUC-16、MAGE-A1、h5T4、PSMA、TAG-72、またはVEGF-R2の過剰発現に関連付けられるがんを有する対象に修飾されたエフェクター細胞を投与する方法が開示される。一部の場合では、がんは転移性がんである。他の場合では、がんは再発性または難治性のがんである。

#### 【0175】

一部の場合では、がんは固形腫瘍または血液悪性腫瘍である。一部の例では、がんは固形腫瘍である。他の例では、がんは血液悪性腫瘍である。一部の場合では、がんは転移性がんである。一部の場合では、がんは再発性または難治性のがんである。

#### 【0176】

一部の例では、がんは固形腫瘍である。例示的な固形腫瘍には、限定されないが、肛門がん；虫垂がん；胆管がん（すなわち、胆管癌）；膀胱がん；脳腫瘍；乳がん；子宮頸が

10

20

30

40

50

ん；大腸がん；原発不明がん（C U P）；食道がん；眼がん；卵管がん；消化器がん；腎臓がん；肝臓がん；肺がん；髓芽腫；黒色腫；口腔がん；卵巣がん；脾臓がん；副甲状腺疾患；陰茎がん；下垂体腫瘍；前立腺がん；直腸がん；皮膚がん；胃がん；精巣腫瘍；咽喉がん；甲状腺がん；子宮がん；膣がん；または外陰がんが含まれる。

#### 【0177】

一部の例では、がんは血液悪性腫瘍である。一部の場合では、血液悪性腫瘍は、リンパ腫、白血病、骨髄腫、またはB細胞悪性腫瘍を含む。一部の場合では、血液悪性腫瘍は、リンパ腫、白血病または骨髄腫を含む。一部の例では、例示的な血液悪性腫瘍には、慢性リンパ性白血病（C L L）、小リンパ球性リンパ腫（S L L）、高リスクC L L、非C L L / S L Lリンパ腫、前リンパ球性白血病（P L L）、濾胞性リンパ腫（F L）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（D L B C L）、マントル細胞リンパ腫（M C L）、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、多発性骨髄腫、節外辺縁帯B細胞リンパ腫、節辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、非バーキット高悪性度B細胞リンパ腫、原発性縦隔B細胞リンパ腫（P M B L）、免疫芽球性大細胞リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、B細胞前リンパ性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、形質細胞骨髄腫、形質細胞腫、縦隔（胸腺）大B細胞リンパ腫、血管内大B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、またはリンパ腫様肉芽腫症が含まれる。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は骨髓性白血病を含む。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、急性骨髓性白血病（A M L）または慢性骨髓性白血病（C M L）を含む。

10

#### 【0178】

一部の例では、本明細書では、慢性リンパ性白血病（C L L）、小リンパ球性リンパ腫（S L L）、高リスクC L L、非C L L / S L Lリンパ腫、前リンパ球性白血病（P L L）、濾胞性リンパ腫（F L）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（D L B C L）、マントル細胞リンパ腫（M C L）、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、多発性骨髄腫、節外辺縁帯B細胞リンパ腫、節辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、非バーキット高悪性度B細胞リンパ腫、原発性縦隔B細胞リンパ腫（P M B L）、免疫芽球性大細胞リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、B細胞前リンパ性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、形質細胞骨髄腫、形質細胞腫、縦隔（胸腺）大B細胞リンパ腫、血管内大B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、またはリンパ腫様肉芽腫症から選択される血液悪性腫瘍を有する対象に、本明細書に記載される修飾されたエフェクター細胞を投与する方法が開示される。一部の例において、本明細書では、A M LまたはC M Lから選択される血液悪性腫瘍を有する対象に、修飾されたエフェクター細胞を対象に投与する方法が本明細書に開示される。

20

#### 【0179】

##### ウイルスベースの送達システム

本明細書に開示される特定の実施形態はまた、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸が挿入される、ウイルスベースのシステムなどの送達システムを提供する。代表的なウイルス発現ベクターには、限定されないが、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベースのベクター（例えば、C r u c e l l , I n c . (Le i d e n, T he N e t h e r l a n d s) から入手可能なアデノウイルスベースのP e r . C 6システム）、レンチウイルスベースのベクター（例えば、L i f e T e c h n o l o g i e s (C a r l s b a d, C a l i f . ) のレンチウイルスベースのp L P I）、レトロウイルスベースのベクター（例えば、p F B - E R V + p C F B - E G S H）、およびヘルペスウイルスベースのベクターが含まれる。一実施形態では、ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターは、導入遺伝子の長期間の安定した組み込み、および娘細胞におけるその増殖誘導を可能にするため、長期間の遺伝子移入を達成するための適切なツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖細胞を形質導入することができるという点において、マウス白血病ウイルスなどの腫瘍レトロウイルスに由来するベクターよりも付加された利点を有する。それらはまた、免疫原性が低いという付加された利点を有する。追加の実施形態では、ウ

30

40

50

イルスペクターはアデノ随伴ウイルスペクターである。さらなる実施形態では、ウイルスペクターはレトロウイルスペクターである。一般的に、および実施形態では、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つ以上の選択マーカーを含む（例えば、国際公開第01/96584号パンフレット；国際公開第01/29058号パンフレット；および米国特許第6,326,193号明細書）。

#### 【0180】

追加の適切なベクターは、宿主細胞のDNAにランダムに組み込まれ得る組み込み発現ベクターを含むか、または発現ベクターと宿主細胞の染色体の間の特定の組換えを可能にする組換え部位を含み得る。このような組み込み発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を利用して、所望のタンパク質の発現をもたらすことができる。部位特異的な方法で組み込むベクターの例には、例えば、*In vitro* gene (Carlsbad, Calif.)からのflp-inシステムの成分（例えば、pcDNA（商標）5/FRT）、またはcre-loxシステム、例えば、Stratagene (La Jolla, Calif.)からのpExchange-6コアベクターに見出されるものが含まれる。宿主細胞の染色体にランダムに組み込まれるベクターの例には、例えば、*In vitro* gene (Carlsbad, Calif.)からのpcDNA3.1 (T抗原の非存在下で導入される場合)、およびPromega (Madison, Wis.)からのpCIまたはpFN10A (ACT) FLEXI（商標）が含まれる。追加のプロモーターエレメント、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは、開始部位の30~110bp上流にある領域に位置されるが、多数のプロモーターは、最近、同様に開始部位の下流に機能的エレメントを含むことが示されている。多くの場合、プロモーターエレメント間の間隔は柔軟であり、そのため、エレメントが互いに反転するかまたは移動する場合、プロモーター機能は保存される。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターでは、活性が低下し始める前に、プロモーターエレメント間の間隔を50bpまで広げることができる。プロモーターに応じて、個々のエレメントが協調的にまたは独立に機能して、転写を活性化することができると考えられる。

10

20

30

30

#### 【0181】

適切なプロモーターの一例は、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに機能的に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる強力な構成的プロモーター配列である。

#### 【0182】

適切なプロモーターの別の例は、ヒト伸長増殖因子1アルファ1(hEF1a1)である。実施形態では、本明細書に記載されるCARおよび/またはTCRを含むベクター構築物は、hEF1a1機能的変異体を含む。

#### 【0183】

しかしながら、他の構成的プロモーター配列もまた使用され得、限定されないが、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)長い末端反復LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウィルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびにヒト遺伝子プロモーター、例えば、限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およびクレアチンキナーゼプロモーターが含まれる。細胞型特異的プロモーター、例えば、T細胞特異的プロモーターもまた使用することができる。さらに、開示された実施形態は、構成的プロモーターの使用に限定されなければならない。誘導性プロモーターはまた、本明細書に開示される1つ以上の実施形態の一部として企図される。誘導性プロモーターの使用は、このような発現が望まれる場合に作動可能に連結されているポリヌクレオチド配列の発現をオンにするか、または発現が望まれない場合に発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例には、限定されないが、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモ

40

50

ーター、およびテトラサイクリンプロモーターが含まれる。一態様では、誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチリガンド誘導性プロモーターであり得る。一部の場合では、誘導性プロモーターは、RHEOSWITCH（登録商標）遺伝子スイッチなどの低分子リガンド誘導性2ポリペプチドエクジソン受容体ベースの遺伝子スイッチであり得る。

#### 【0184】

CARもしくはTCRポリペプチドまたはその一部の発現を評価するために、細胞に導入される発現ベクターはまた、選択マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子のいずれかまたは両方を含み、ウイルスベクターを介してトランスフェクトまたは感染することが求められている細胞の集団から発現細胞の同定および選択を促進することができる。他の態様では、選択マーカーは、別個のDNA片上にあり、同時トランスフェクション手法において使用され得る。選択マーカーとレポーター遺伝子の両方に、適切な調節配列を隣接させて、宿主細胞における発現を可能にすることができる。有用な選択マーカーには、例えば、抗生物質耐性遺伝子、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子(neo)およびアンピシリン耐性遺伝子などが含まれる。一部の実施形態では、切断型上皮細胞増殖因子受容体(HER1t)タグを選択マーカー遺伝子として使用することができる。

#### 【0185】

レポーター遺伝子は、潜在的にトランスフェクトされた細胞を同定するため、および調節配列の機能を評価するために使用され得る。一般的に、レポーター遺伝子は、レシピエントの生物または組織に存在しないかまたは発現しない遺伝子であり、その発現が、いくつかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によって明らかにされるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞に導入された後の適切な時期にアッセイされる。適切なレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子が含まれ得る(例えば、Ui-Tei et al., FEBS Letters 479: 79-82 (2000))。適切な発現系は周知であり、公知の技術を使用して調製されるか、または商業的に入手することができる。一般的に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小の5'フランкиング領域を有する構築物は、プロモーターとして同定される。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結され、プロモーターにより駆動される転写を調節する能力について薬剤を評価するために使用され得る。

#### 【0186】

一部の実施形態では、ベクターは、導入遺伝子の発現を駆動するhEF1a1プロモーター、転写を増強するウシ成長ホルモンポリア配列、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)、ならびにpFUGWプラスミドに由来するLTR配列を含む。

#### 【0187】

細胞に遺伝子を導入および発現する方法は、当該技術分野において公知である。発現ベクターとの関連で、ベクターは、当該技術分野における任意の方法によって、宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、細菌、酵母、または昆虫細胞に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、または生物学的手段によって宿主細胞に移入することができる。

#### 【0188】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。ベクターおよび/または外因性核酸を含む細胞を生成する方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Sambrook (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001))を参照されたい。実施形態では、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションまたはポリエチレンイミン(PEI)トランスフェクションである。

#### 【0189】

10

20

30

40

50

目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する生物学的方法には、DNAおよびRNAベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使用されている方法になっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許第5,350,674号明細書および同第5,585,362号明細書を参照されたい。

## 【0190】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段には、コロイド分散系、例えば、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、ならびに脂質ベース系、例えば、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームが含まれる。インビトロおよびインビボでの送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

10

## 【0191】

特定の実施形態では、例示的な送達ビヒクルはリポソームである。脂質製剤の使用は、（インビトロ、エクスピボまたはインビボにおける）宿主細胞への核酸の導入のために企図される。別の態様では、核酸は脂質と会合していてもよい。脂質と会合している核酸は、リポソームの水性内部に封入され、リポソームの脂質二重層内に散在され、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方と会合している連結分子を介してリポソームに付着され、リポソームに封入され、リポソームと複合化され、脂質を含む溶液に分散され、脂質と混合され、脂質と組み合わされ、脂質の懸濁液として含まれ、ミセルに含まれるかもしくは複合化され、または脂質と会合している。脂質、脂質/DNA、または脂質/発現ベクター会合組成物は、溶液中のいずれもの特定の構造に限定されない。例えば、それらは、ミセルとしてまたは「崩壊した」構造を有する二層構造で存在し得る。それらはまた、単に溶液中に散在し、おそらくサイズまたは形状が均一でない凝集体を形成する場合がある。脂質は、天然に存在するまたは合成の脂質である脂肪物質である。例えば、脂質には、細胞質で天然に存在する脂肪滴、ならびに長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体、例えば、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、アルデヒドを含む化合物のクラスが含まれる。

20

## 【0192】

使用に適した脂質は、商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリストルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma、St. Louis、Moから入手することができる；リン酸ジセチル（「DCP」）は、K&K Laboratories（Plainview, N.Y.）から入手することができる；コレステロール（「Choi」）はCalbiochem-Behringから入手することができる；ジミリストルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.（Birmingham, Ala.）から入手することができる。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質のストック溶液は、約-20で保存され得る。メタノールよりも蒸発しやすいため、クロロホルムを唯一の溶媒として使用する。「リポソーム」は、封入された脂質二重層または凝集体の生成によって形成される、様々な単一および多層の脂質ビヒクルを包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部水性媒体を有する小胞構造を有するものとして特徴付けることができる。多重膜リポソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁される場合に自然に形成される。脂質成分は、閉じた構造が形成される前に自己再構成を受け、脂質二重層の間に水と溶解した溶質を閉じ込める（Ghosh et al., Glycobiology 5: 505-10 (1991)）。しかしながら、通常の小胞構造とは異なる溶液中の構造を有する組成物もまた含まれる。例えば、脂質は、ミセル構造をとるか、または単に脂質分子の不均一な凝集体として存在する場合がある。リポフェクタミン-核酸複合体もまた企図される。

40

## 【0193】

50

## 非ウイルスベースの送達システム

一部の例では、本明細書に記載されるポリペプチドはまた、脊椎動物の染色体にDNA配列を導入するために、合成DNAトランスポゾンシステムを指す「Sleeping Beauty (SB)トランスポゾンシステム」などの非ウイルスベースの送達システムを使用して、T細胞などのエフェクター細胞に導入することができる。このシステムは、例えば、米国特許第6,489,458号明細書および同第8,227,432号明細書に記載されている。

### 【0194】

Sleeping Beautyトランスポゾンシステムは、Sleeping Beauty (SB)トランスポザーゼおよびSBトランスポゾンで構成される。DNAトランスポゾンは、1つのDNA部位から別の部位に、単純なカットアンドペーストで移行する。転位は、定義されたDNAセグメントが1つのDNA分子から切り出され、同じかもしくは異なるDNA分子またはゲノムの別の部位に移動する正確なプロセスである。他のTc1/marinerタイプのトランスポザーゼと同様に、SBトランスポザーゼは、トランスポゾンをレシピエントのDNA配列におけるTAジヌクレオチド塩基対に挿入する。挿入部位は、同じDNA分子内の別の場所であるか、または別のDNA分子（もしくは染色体）であり得る。ヒトを含む哺乳動物のゲノムでは、約2億個のTA部位がある。TA挿入部位は、トランスポゾン組み込みのプロセスで複製される。TA配列のこの複製は、転位の特徴であり、いくつかの実験においてその機構を確認するために使用される。トランスポザーゼは、トランスポゾン内でコードされるか、またはトランスポザーゼを別の供給源から供給することができ、その場合、トランスポゾンは非自律的エレメントになる。非自律的トランスポゾンは、挿入後、独立して切り出しあり再挿入を続けることができないため、遺伝的ツールとして最も有用である。SBトランスポゾンは、脊椎動物のゲノムへの遺伝子の導入および遺伝子治療のための非ウイルスベクターとして使用することが想定される。

10

20

30

40

### 【0195】

簡単に述べれば、Sleeping Beauty (SB)システム (Hackett et al., Mol Ther 18:674-83, (2010)) は、T細胞を遺伝的に修飾するように適合された (Cope et al., Blood 105:1622-31, (2005))。これには、2つのステップが伴う：(i) SBトランスポゾン [すなわち、T細胞特異性を再方向付けするためのキメラ抗原受容体 (CAR) (Jin et al., Gene Ther 18:849-56, (2011); Kebriaei et al., Hum Gene Ther 23:444-50, (2012)) およびSBトランスポザーゼを発現するDNAプラスミドの電気的導入、および(ii) K562細胞株に由来するデザイナー人工抗原提示細胞 (AAAPC) (AAAPC (Activating and Propagating Cell) としても公知である) 上での、組み込み体を安定に発現するT細胞の増殖および拡大。一実施形態では、SBトランスポゾンシステムは、mbl-15、細胞タグおよび/またはキメラ抗原受容体をコードするコード配列を含む。一実施形態では、SBトランスポゾンシステムは、mbl-15、細胞タグおよび/またはT細胞受容体 (TCR) をコードするコード配列を含む。別の実施形態では、第2のステップ (ii) が排除され、遺伝子修飾されたT細胞が凍結保存されるかまたは直ちに患者に注射される。特定の実施形態では、遺伝子修飾されたT細胞は、患者に注射される前に凍結保存されない。

30

### 【0196】

このようなシステムは、例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Hudecek et al., Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 52:4, 355-380 (2017), Singh et al., Cancer Res (8):68 (2008). April 15, 2008 and Maiti et al., J Immunother. 36(2): 112-123 (2013)に記載されている。

### 【0197】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド、およびIL-2、IL-22またはIL-15などのサイトカイン、例えば、膜結合型IL-15 (mbl-15) を発現する修飾されたエフェクター細胞（例えば、CARエフェクター細胞またはTC

50

R エフェクター細胞)は、トランスポゾンDNAプラスミドベクターにコードされ、SBトランスポザーゼは別のベクターにコードされる。特定の実施形態では、CARは、トランスポゾンDNAプラスミドベクターにコードされ、mbIL-15は、第2のトランスポゾンDNAプラスミドベクターにコードされ、SBトランスポザーゼは、第3のDNAプラスミドベクターにコードされる。一部の実施形態では、mbIL-15は、切断型上皮細胞増殖因子受容体タグでコードされる。

#### 【0198】

外因性核酸を宿主細胞に導入するか、または他には細胞を本明細書に記載されるポリペプチドに曝露するために使用される方法に関係なく、宿主細胞において組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイを行うことができる。このようなアッセイには、例えば、当業者に周知である分子アッセイ、例えば、ササンプロッティングおよびノーザンプロッティング、RT-PCRおよびPCR;「生化学的」アッセイ、例えば、免疫学的手段(ELISAおよびウエスタンプロット)によって、または本開示の範囲内に入る薬剤を同定するために本明細書に記載されるアッセイによって、特定のペプチドの存在または非存在を検出するものが含まれる。

10

#### 【0199】

実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび他の遺伝的エレメントを含む修飾されたエフェクター細胞は、SB11トランスポゾンシステム、SB100Xトランスポゾンシステム、SB110トランスポゾンシステム、piggyBacトランスポゾンシステム(例えば、参照により全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第9,228,180号明細書、Wilson et al., "PiggyBac Transposon-mediated Gene Transfer in Human Cells," Molecular Therapy 15:139-145 (2007)を参照されたい)、および/またはpiggyBatトランスポゾンシステム(例えば、Mitra et al., "Functional characterization of piggyBat from the bat Myotis lucifugus unveils an active mammalian DNA transposon," Proc. Natl. Acad. Sci USA 110:234-239 (2013)を参照されたい)を使用して細胞に送達される。追加のトランスポザーゼおよびトランスポゾンシステムは、各々が、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第7,148,203号明細書;同第8,227,432号明細書;米国特許出願公開第2011/01117072号明細書;Mates et al., Nat Genet, 41(6):753-61 (2009). doi: 10.1038/ng.343. Epub 2009 May 3, Gene Ther., 18(9):849-56 (2011). doi: 10.1038/gt.2011.40. Epub 2011 Mar 31およびIvics et al., Cell. 91(4):501-10, (1997)に提供される。

20

#### 【0200】

他の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド、およびサイトカイン、例えば、mbIL-15および/またはタグなどの他の遺伝エレメントを、リコンビナーゼおよび組み込み発現ベクターを介して免疫エフェクター細胞のDNAに組み込むことができる。このようなベクターは、宿主細胞のDNAにランダムに組み込むことができるか、または組換え部位を含めて、発現ベクターと宿主細胞の染色体の間の特定の組換えを可能にすることができる。このような組み込み発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を利用して、所望のタンパク質の発現をもたらすことができる。一部の実施形態では、標的化された組み込みは、組み込み部位に隣接する配列に相同であるドナーポリヌクレオチド上の配列の存在によって促進される。例えば、本明細書に記載されるドナーポリヌクレオチドを使用した標的化された組み込みは、従来のトランسفエクション技術、例えば、相同組換えにより遺伝子ノックアウトまたはノックインを作製するために使用される技術に従って達成され得る。他の実施形態では、標的化された組み込みは、組み込み部位に隣接する配列に相同であるドナーポリヌクレオチド上の配列の存在によって、および部位特異的リコンビナーゼの存在下で細胞をドナーポリヌクレオチドと接触させることによって促進される。部位特異的リコンビナーゼ、または単にリコンビナーゼとは、その互換性のある組換え部位間の保存的な部位特異的組換えを触媒するポリペプチドを意味する。本明細書において使用する場合、部位特異的リコンビナーゼには、天然ポリペプチド、

30

40

50

ならびに活性を保持する誘導体、変異体および／または断片、ならびに活性を保持するリコンビナーゼをコードする天然ポリヌクレオチド、誘導体、変異体および／または断片が含まれる。

#### 【0201】

リコンビナーゼは、標的化ベクターの導入の前、それと同時、または後に標的細胞に導入することができる。リコンビナーゼは、例えば、リポソーム、被覆された粒子、またはマイクロインジェクションを使用して、タンパク質として細胞に直接導入することができる。あるいは、適切な発現ベクターを使用して、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチド（DNAまたはメッセンジャーRNAのいずれか）を細胞に導入することができる。上記の標的化ベクター成分は、目的のリコンビナーゼをコードする配列を含む発現カセットの構築に有用である。しかしながら、リコンビナーゼの発現は、例えば、リコンビナーゼの発現を、調節可能なプロモーター（すなわち、その発現が選択的に誘導または抑制され得るプロモーター）の制御下に配置することによって、他の方法で調節され得る。10

#### 【0202】

リコンビナーゼは、インテグラーゼまたはリゾルバーゼファミリーに由来し得る。リコンビナーゼのインテグラーゼファミリーには100以上のメンバーがあり、例えば、FLP、Cre、およびラムダインテグラーゼが含まれる。インテグラーゼファミリーは、チロシンファミリーまたはラムダインテグラーゼファミリーとも呼ばれ、触媒チロシンのヒドロキシル基を使用して、DNAのホスホジエステル結合に対する求核攻撃を行う。典型的には、チロシンファミリーのメンバーは、最初にDNAにニックを入れ、後に二本鎖切断を形成する。チロシンファミリーインテグラーゼの例には、Cre、FLP、SSV1、およびラムダ（）インテグラーゼが含まれる。セリンリコンビナーゼファミリーとしても公知であるレゾルバーゼファミリーでは、保存されたセリン残基が、DNA標的部位への共有結合を形成する（Grindley, et al., (2006) Ann Rev Biochem 16:16）。20

#### 【0203】

一実施形態では、リコンビナーゼは、SP c 2リコンビナーゼ、S F 370 . 1リコンビナーゼ、B x b 1リコンビナーゼ、A 118リコンビナーゼおよびR v 1リコンビナーゼからなる群から選択されるリコンビナーゼをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド配列である。セリンリコンビナーゼの例は、全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第9,034,652号明細書に詳細に記載されている。30

#### 【0204】

本発明の実施において使用するためのリコンビナーゼは、組換えにより生成されるか、または精製され得る。所望のリコンビナーゼ活性を有するポリペプチドは、タンパク質硫酸アンモニウム沈殿、精製の分野において公知である方法、例えば、限定されないが、サイズ分画、アフィニティクロマトグラフィー、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンアガロースアフィニティクロマトグラフィー（例えば、Thorpe & Smith, Proc. Nat. Acad. Sci. 95:5505-5510, 1998）によって、所望の純度に精製することができる。

#### 【0205】

一実施形態では、リコンビナーゼは、任意の適切な方法によって組換えが望まれる組換え付着部位を含む真核細胞に導入することができる。例えば、マイクロインジェクションまたは他の方法により、機能性タンパク質を細胞に導入する方法は、当該技術分野において周知である。精製されたリコンビナーゼタンパク質の導入は、タンパク質およびその機能の一時的な存在を保証し、これはしばしば好ましい実施形態である。あるいは、リコンビナーゼをコードする遺伝子は、細胞を形質転換するために使用される発現ベクターに含まれ得、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドは、真核細胞におけるポリヌクレオチドの発現を媒介するプロモーターに作動可能に連結される。リコンビナーゼポリペプチドはまた、リコンビナーゼポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAにより真核細胞に導入することができる。一般的には、リコンビナーゼは、修飾されるゲノムへの核酸断片の挿入に必要な時間だけ存在することが好ましい。したがって、ほとんどの発現ベ40

10

20

30

40

50

クターに関連付けられる永続性の欠如は、有害であるとは予想されない。目的の外因性ポリヌクレオチドの導入の前、後、またはそれと同時に、リコンビナーゼ遺伝子を細胞に導入することができる。一実施形態では、リコンビナーゼ遺伝子は、挿入されるべきポリヌクレオチドを有するベクター内に存在する；リコンビナーゼ遺伝子は、ポリヌクレオチド内に含めることさえできる。

#### 【0206】

一実施形態では、部位特異的組換えのための方法は、第1の組換え部位および第2の組換え部位を与え；第1および第2の組換え部位を原核生物のリコンビナーゼポリペプチドと接触させ；組換え部位間で組換えをもたらすことを含み、リコンビナーゼポリペプチドは、第1および第2の組換え部位間の組換えを媒介することができ、第1の組換え部位は a t t P または a t t B であり、第2の組換え部位は a t t B または a t t P 、およびリコンビナーゼは、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) ファージリコンビナーゼ、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) ファージリコンビナーゼ、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) ファージリコンビナーゼ、ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) ファージリコンビナーゼ、またはスメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) ファージリコンビナーゼであり得、ただし、第1の組換え付着部位が a t t B である場合、第2の組換え付着部位は a t t P であり、および第1の組換え付着部位が a t t P である場合、第2の組換え付着部位は a t t B である。

10

#### 【0207】

さらなる実施形態は、ゲノムが修飾されるべき細胞への部位特異的リコンビナーゼの導入を提供する。一実施形態は、真核細胞において部位特異的な組換えを得るための方法に関し、第1の組換え付着部位および第2の組換え付着部位を含む真核細胞を用意し；第1および第2の組換え付着部位を原核生物のリコンビナーゼポリペプチドと接触させ、組換え付着部位間で組換えをもたらすことを含み、リコンビナーゼポリペプチドは、第1および第2の組換え付着部位間の組換えを媒介することができ、第1の組換え付着部位はファージゲノムの組換え付着部位 ( a t t P ) または細菌ゲノムの組換え付着部位 ( a t t B ) であり、第2の組換え付着部位は a t t B または a t t P であり、リコンビナーゼは、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) ファージリコンビナーゼ、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) ファージリコンビナーゼ、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) ファージリコンビナーゼ、ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) ファージリコンビナーゼ、およびスメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) ファージリコンビナーゼからなる群から選択され、ただし、第1の組換え付着部位が a t t B である場合、第2の組換え付着部位は a t t P であり、および第1の組換え付着部位が a t t P である場合、第2の組換え付着部位は a t t B である。一実施形態では、リコンビナーゼは、A 1 1 8 リコンビナーゼ、S F 3 7 0 . 1 リコンビナーゼ、S P c 2 リコンビナーゼ、R v 1 リコンビナーゼ、およびB x b 1 リコンビナーゼからなる群から選択される。一実施形態では、組換えは、組込みをもたらす。

20

30

#### 【0208】

外因性核酸を宿主細胞に導入するために使用される方法に關係なく、宿主細胞における組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイを行うことができる。このようなアッセイには、例えば、当業者に周知である「分子生物学的アッセイ」、例えば、サザンブロッティングおよびノーザンブロッティング、RT - PCR およびPCR ; 「生化学的」アッセイ、例えば、免疫学的手段 (ELISA およびウエスタンプロット) によって、または本発明の範囲内に入るペプチドもしくはタンパク質もしくは核酸を同定するために本明細書に記載されるアッセイによって、特定のペプチドの存在または非存在を検出するものが含まれる。

40

#### 【0209】

##### 免疫エフェクター細胞供給源

特定の態様では、本明細書に記載される実施形態は、本明細書に記載されるポリペプチドを発現する抗原特異的に再方向付けされる免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、N

50

K細胞またはNK（T細胞）を作製しおよび／または拡大する方法を含み、この方法は、ポリペプチドをコードするDNA（またはRNA）構築物を含む発現ベクターで細胞をトランスフェクトし、次に、任意選択で、フィーダー細胞、組換え抗原、または受容体に対する抗体で細胞を刺激して、細胞を増殖させることを含む。特定の態様では、CARまたはTCRを発現するように操作された細胞（または細胞集団）は、幹細胞、iPS細胞、免疫エフェクター細胞またはこれらの細胞の前駆体である。

#### 【0210】

免疫エフェクター細胞の供給源は、同種供給源と自家供給源の両方を含み得る。一部の場合では、免疫エフェクター細胞は、幹細胞または人工多能性幹細胞（iPSC）から分化され得る。したがって、実施形態に従って操作するための細胞は、臍帯血、末梢血、ヒト胚性幹細胞、またはiPSCから単離することができる。例えば、同種異系T細胞は、キメラ抗原受容体を含むように（および、任意選択で、機能的TCRを欠くように）修飾され得る。一部の態様では、免疫エフェクター細胞は、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）に由来するT細胞などの初代ヒトT細胞である。PBMCは、末梢血から、またはG-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）による刺激後の骨髄から、または臍帯血から回収することができる。一部の実施形態では、G-CSFは、配列番号52に示される配列に対して少なくとも80%相同であるペプチド配列、または配列番号146に示される配列に対して少なくとも80%相同であるヌクレオチド配列によってコードされるペプチド配列を含む。

10

#### 【0211】

トランスフェクションまたは形質導入（例えば、CAR発現構築物による）後、細胞は、直ちに注射され得るかまたは凍結保存され得る。特定の態様では、トランスフェクション後、細胞は、細胞への遺伝子移入後の約1、2、3、4、5日またはそれを超える日以内にバルク集団としてエクスピボで数日、数週間、または数ヶ月間、増殖誘導され得る。さらなる態様では、トランスフェクション後、トランスフェクタントがクローニングされ、单一の組み込まれたかもしくはエピソームで維持された発現カセットまたはプラスミドの存在を示すクローラン、およびキメラ抗原受容体の発現がエクスピボで拡大される。拡大用に選択されたクローランは、抗原発現標的細胞を特異的に認識し、溶解する能力を示す。

20

#### 【0212】

組換えT細胞は、IL-2、または共通のガンマ鎖に結合する他のサイトカイン（例えば、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21など）による刺激によって拡大され得る。組換えT細胞は、人工抗原提示細胞による刺激によって拡大され得る。組換えT細胞は、人工抗原提示細胞上で、またはT細胞表面上のCD3を架橋するOKT3などの抗体を用いて拡大され得る。組換えT細胞のサブセットは、磁気ビーズベースの単離方法および／または蛍光活性化細胞選別技術を使用してさらに選択され、AaPCとともにさらに培養され得る。さらなる態様では、遺伝子修飾された細胞は、凍結保存され得る。

30

#### 【0213】

T細胞はまた、多数の供給源から得ることができ、末梢血、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍（腫瘍浸潤リンパ球）が挙げられる。本明細書に記載される特定の実施形態では、当該技術分野において利用可能な任意の数のT細胞株を使用することができる。特定の実施形態では、T細胞は、Ficoll（登録商標）分離などの当業者に公知である任意の数の技術を使用して、対象から回収された一群の血液から得ることができる。実施形態では、個体の循環血液由来の細胞は、アフェレーシスによって得られる。アフェレーシス生成物には、リンパ球、例えば、T細胞、单球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板が含まれる。一実施形態では、アフェレーシスによって回収された細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、その後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地に入れることができる。一実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄される。代替の実施形態では、洗浄溶液はカルシウムを欠き、マグネシウムを欠く場合があるかまたはすべてではないにしても多くの二価カチオンを欠く場合がある。カルシウムの非存在下での

40

50

最初の活性化ステップは、活性化の拡大をもたらす。当業者が容易に理解するように、洗浄ステップは、半自動化された「フロースルー」遠心分離機（例えば、Cobe 2991 細胞プロセッサー、Baxter Cytomat e、またはHaemonetics Cell Saver 5）を製造元の指示に従って使用することなどの、当業者に公知である方法によって達成され得る。洗浄後、細胞は、様々な生体適合性緩衝液、例えば、Ca<sup>2+</sup>不含PBS、Mg<sup>2+</sup>不含PBS、Plasmalyte A、または緩衝液ありまたはなしの他の生理食塩水に再懸濁され得る。あるいは、アフェレーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁することができる。

#### 【0214】

別の実施形態では、T細胞は、例えば、PERCOLL（登録商標）勾配による遠心分離によって、または向流遠心分離溶出によって、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることによって、末梢血リンパ球から単離される。CD3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、およびCD45RO<sup>+</sup>T細胞などのT細胞の特定の亜集団は、ポジティブまたはネガティブ選択技術によってさらに分離することができる。例えば、一実施形態では、T細胞は、所望のT細胞のポジティブ選択に十分な時間、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3 / CD28 Tなどの抗CD3 / 抗CD28（すなわち、3×28）結合ビーズとのインキュベーションにより単離される。一実施形態では、時間は約30分である。さらなる実施形態では、時間は30分から36時間またはそれを超える範囲であり、その間のすべての整数値である。さらなる実施形態では、時間は少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。さらに別の実施形態では、時間は10~24時間である。一実施形態では、インキュベーション時間は24時間である。白血病を有する患者からT細胞を分離するために、24時間などの長いインキュベーション時間を使用が細胞収量を増加させることができる。腫瘍組織から、または免疫不全の個体から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を分離する場合など、他の細胞型と比較してT細胞が少ない任意の状況においては、より長いインキュベーション時間を使用して、T細胞を分離することができる。さらに、より長いインキュベーション時間の使用は、CD8+T細胞の捕捉効率を増加させることができる。したがって、時間を単に短くするかもしくは長くすることによって、T細胞は、CD3 / CD28ビーズに結合することができ、および/またはビーズ対T細胞の比（本明細書においてさらに記載される）を増加もしくは減少させることによって、T細胞の亜集団は、培養開始時にまたはプロセス中の他の時間点で優先的にまたは反対に選択され得る。さらに、ビーズまたは他の表面上の抗CD3および/または抗CD28抗体の比を増加または減少させることによって、T細胞の亜集団は、培養開始時または他の所望の時間点で優先的にまたは反対に選択され得る。当業者は、複数回の選択もまた本明細書において使い得ることを認識する。特定の実施形態では、選択手法を行い、「選択されていない」細胞を活性化および拡大プロセスで使用することが望ましい場合がある。「選択されていない」細胞は、さらなる回の選択に供され得る。

#### 【0215】

ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブに選択された細胞に特有の表面マーカーに対する抗体の組合せを用いて達成することができる。1つの方法は、ネガティブに選択された細胞に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用するネガティブ磁気免疫付着またはフローサイトメトリーによる細胞の選別および/または選択である。例えば、ネガティブ選択によってCD4<sup>+</sup>細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルには、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体が含まれる。特定の実施形態では、典型的にはCD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、CD62L<sup>hi</sup>、GITR<sup>+</sup>、およびFoxP3<sup>+</sup>を発現する調節性T細胞を濃縮するかまたはポジティブに選択することが望ましい場合がある。あるいは、特定の実施形態では、T調節細胞は、抗CD25結合ビーズまたは他の類似した選択方法によって枯渇される。

#### 【0216】

ポジティブ選択またはネガティブ選択によって所望の細胞集団を単離するために、細胞

10

20

30

40

50

および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変化させることができる。特定の実施形態では、細胞とビーズの最大の接触を確実にするために、ビーズおよび細胞がともに混合される体積を著しく減少させる（すなわち、細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば、一実施形態では、20億個の細胞 / m<sup>1</sup> の濃度が使用される。一実施形態では、10億個の細胞 / m<sup>1</sup> の濃度が使用される。さらなる実施形態では、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個の細胞 / m<sup>1</sup> の細胞濃度が使用される。さらに別の実施形態では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個の細胞 / m<sup>1</sup> の細胞の濃度が使用される。さらなる実施形態では、1億2500万個または1億5000万個の細胞 / m<sup>1</sup> の濃度が使用され得る。高濃度の使用は、細胞収量、細胞活性化、および細胞拡大の増加をもたらすことができる。さらに、高細胞濃度の使用は、C D 2 8 陰性T細胞などの目的的抗原を弱く発現する可能性がある細胞、または多くの腫瘍細胞が存在する試料（すなわち、白血病血液、腫瘍組織など）からの細胞をより効率的に捕捉することができる。このような細胞の集団は、治療的価値を有する場合があり、得ることが望ましい。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常、C D 2 8 発現が弱いC D 8<sup>+</sup> T細胞をより効率的に選択することができる。

10

#### 【0217】

関連する実施形態では、より低い濃度の細胞を使用することが望ましい場合がある。T細胞と表面（例えば、ビーズなどの粒子）の混合物を有意に希釈することによって、粒子と細胞間の相互作用を最小限にする。これは、粒子に結合される所望の抗原を大量に発現する細胞を選択する。例えば、C D 4<sup>+</sup> T細胞は、より高いレベルのC D 2 8 を発現し、希釈濃度においてC D 8<sup>+</sup> T細胞よりも効率的に捕捉される。一実施形態では、使用される細胞の濃度は、 $5 \times 10^6 / m^1$  である。他の実施形態では、使用される濃度は、約 $1 \times 10^5 / m^1 \sim 1 \times 10^6 / m^1$  、およびその間の任意の整数値であり得る。

20

#### 【0218】

他の実施形態では、細胞は、2～10または室温のいずれかで、様々な速度で様々な長さの時間、ローター上でインキュベートされ得る。

#### 【0219】

刺激のためのT細胞はまた、洗浄ステップ後に凍結され得る。血漿および血小板を除去する洗浄ステップの後、細胞は、凍結溶液中に懸濁され得る。多くの凍結溶液およびパラメーターが当該技術分野において公知であり、これに関連して有用である一方、1つの方法は、20%DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含むPBS、または10%デキストラン40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミンおよび7.5%DMSO、または31.25%Plasmalyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45%NaCl、10%デキストラン40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミン、および7.5%DMSOを含む培養培地、または、例えば、HespanおよびPlasmalyte-Aを含む他の適切な細胞凍結培地を使用することを伴い、次に、細胞は1/分の速度で-80に凍結され、液体窒素貯蔵タンクの気相に貯蔵される。制御されていた凍結の他の方法、ならびに即座に-20でまたは液体窒素中で、制御されていない凍結の方法を使用することができる。

30

#### 【0220】

特定の実施形態では、凍結保存された細胞は、本明細書に記載されるように解凍および洗浄され、本明細書に記載される方法を使用する活性化の前に、室温で1時間静置される。

40

#### 【0221】

また、本明細書に記載されるような拡大された細胞が必要とされる場合の前の期間で、対象由来の血液試料またはアフェレーシス生成物の回収が企図される。したがって、拡大されるべき細胞の供給源は、必要な任意の時間点で回収することができ、T細胞などの所望の細胞を単離および凍結して、後に、本明細書に記載されるものなどのT細胞療法から

50

恩恵を受ける、任意の数の疾患または状態に対するT細胞療法において使用することができる。一実施形態では、血液試料またはアフェレーシスは、一般的に健康な対象から採取される。いまだ疾患を発症していない一般的に健康な対象から採取され、目的の細胞は、後に使用するために単離および凍結される。特定の実施形態では、T細胞は、拡大され、凍結され、後の時間で使用され得る。特定の実施形態では、試料は、本明細書に記載される特定の疾患の診断の直後であるが、任意の治療前に患者から回収される。さらなる実施形態では、細胞は、限定されないが、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスボリン、アザチオブリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸、およびFK506、抗体、または他の免疫除去剤(immunoab10  
tive agent)、例えば、CAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスボリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、および放射線を含む、任意の数の関連する治療様式の前に、対象からの血液試料またはアフェレーシスから単離される。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリン(シクロスボリンおよびFK506)、または増殖因子により誘導されるシグナル伝達に重要なp70S6キナーゼ(ラパマイシン)のいずれかを阻害する(Liu et al., Cell 66:807-815, (1991); Henderson et al., Immun 73:316-321, (1991); Bierer et al., Curr. Opin. Immun 5:763-773, (1993))。さらなる実施形態では、細胞は、患者のために単離され、骨髄または幹細胞移植、化学療法剤、例えば、フルダラビン、外照射療法(XRT)、シクロホスファミド、または抗体、例えば、OKT3もしくはCAMPATHのいずれかを用いたT細胞除去療法と(例えば、前、同時または後に)併用した、後の使用のために凍結される。別の実施形態では、細胞は、CD20と反応する薬剤、例えばリツキサンなどのB細胞除去療法前に単離され、治療のために後の使用のために凍結することができる。

#### 【0222】

さらなる実施形態において、T細胞は、治療の直後に患者から得られる。これに関して、特定のがん治療、特に免疫系を損傷する薬物による治療後、患者が通常治療から回復している期間中の治療直後に、得られるT細胞の質が最適であり、エクスピボでそれらが拡大する能力を向上させ得ることが観察されている。同様に、本明細書に記載される方法を用いたエクスピボでの操作後、これらの細胞は、増強された生着およびインビボ拡大にとって好ましい状態であり得る。したがって、この回復期の間に、T細胞、樹状細胞、または造血系統の他の細胞を含む血液細胞を収集することが企図される。さらに、特定の実施形態では、動員(例えば、GM-CSFによる動員)および条件付け計画を使用して、特に治療後の定義された時間枠の間、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生、および/または拡大が好まれる対象における状態を作り出すことができる。例示的な細胞型には、T細胞、B細胞、樹状細胞、および免疫系の他の細胞が含まれる。

#### 【0223】

##### エフェクター細胞の活性化および拡大

本明細書に記載される望ましいポリペプチドを発現するためのエフェクター細胞、例えば、T細胞の遺伝子修飾の前または後のいずれであっても、細胞は、一般的には、例えば、米国特許第6,352,694号明細書；同第6,534,055号明細書；同第6,905,680号明細書；同第6,692,964号明細書；同第5,858,358号明細書；同第6,887,466号明細書；同第6,905,681号明細書；同第7,144,575号明細書；同第7,067,318号明細書；同第7,172,869号明細書；同第7,232,566号明細書；同第7,175,843号明細書；同第5,883,223号明細書；同第6,905,874号明細書；同第6,797,514号明細書；同第6,867,041号明細書；および米国特許出願公開第2006/0121005号明細書に記載される方法を用いて活性化および拡大され得る。

#### 【0224】

一般的に、本明細書に記載されるエフェクター細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する薬剤、および細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドを付着した表

10

20

30

40

50

面との接触によって拡大される。特に、エフェクター細胞集団は、本明細書に記載されるように、例えば、抗 C D 3 抗体、もしくはその抗原結合断片、または表面に固定化された抗 C D 2 抗体との接触によって、あるいはカルシウムイオノフォアと組み合わせたプロテインキナーゼ C 活性化因子（例えば、ブリオスタチン）との接触によって刺激され得る。細胞の表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子を結合するリガンドが使用される。例えば、エフェクター細胞の集団、例えば、T 細胞は、T 細胞の増殖を刺激するのに適切な条件下で、抗 C D 3 抗体および抗 C D 2 8 抗体と接触させることができ。C D 4<sup>+</sup> T 細胞または C D 8<sup>+</sup> T 細胞の増殖を刺激するために、抗 C D 3 抗体および抗 C D 2 8 抗体。抗 C D 2 8 抗体の例には、9 . 3、B - T 3、X R - C D 2 8 (D i a c l o n e、B e s a n c o n、F r a n c e) が含まれ、当該技術分野において一般的に公知である他の方法と同様に使用することができる (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, (1998); Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, (1999); Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, (1999))。

10

## 【0225】

特定の実施形態では、エフェクター細胞の一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、異なるプロトコールによって提供され得る。例えば、各シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるかまたは表面に結合され得る。表面に結合される場合、薬剤は、同じ表面に（すなわち、「シス」形成で）または別個の表面に（すなわち、「rans」形成で）結合され得る。あるいは、一方の薬剤を表面に結合させ、他方の薬剤を溶液中で結合され得る。一実施形態では、共刺激シグナルを提供する薬剤は細胞表面に結合され、一次活性化シグナルを提供する薬剤は溶液中にあるかまたは表面に結合される。特定の実施形態では、両方の薬剤が溶液中にあり得る。別の実施形態では、可溶性形態であり得、次に、Fc 受容体もしくは抗体を発現する細胞、または薬剤に結合する他の結合剤などの薬剤が表面に架橋され得る。これに関して、例えば、T 細胞の活性化および拡大における使用が企図される人工抗原提示細胞 (a A P C) については、米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 0 1 5 1 9 号明細書および同第 2 0 0 6 / 0 0 3 4 8 1 0 号明細書を参照されたい。

20

## 【0226】

一実施形態では、2つの薬剤は、同じビーズ、すなわち「シス」上、または別個のビーズ、すなわち「rans」上のいずれかのビーズ上に固定化される。例として、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、抗 C D 3 抗体またはその抗原結合断片であり、共刺激シグナルを提供する薬剤は、抗 C D 2 8 抗体またはその抗原結合断片であり；両方の薬剤は、同等の分子量で同じビーズに同時に固定化される。一実施形態では、C D 4<sup>+</sup> T 細胞拡大および T 細胞増殖のためにビーズに結合した各抗体の 1 : 1 の比が使用される。本明細書に記載される特定の態様では、ビーズに結合したある比の抗 C D 3 : C D 2 8 抗体を使用して、1 : 1 の比を使用して観察される拡大と比較して T 細胞拡大の増加が観察される。1つの特定の実施形態では、1 : 1 の比を使用して観察される拡大と比較して、約 1 ~ 約 3 倍の増加が観察される。一実施形態では、ビーズに結合した C D 3 : C D 2 8 抗体の比は、1 0 0 : 1 から 1 : 1 0 0 の範囲およびそれらの間のすべての整数値である。本明細書に記載される一態様では、抗 C D 3 抗体よりも多くの抗 C D 2 8 抗体が粒子に結合し、すなわち、C D 3 : C D 2 8 の比は 1 未満である。本明細書に記載される特定の実施形態では、ビーズに結合された抗 C D 2 8 抗体対抗 C D 3 抗体の比は 2 : 1 より大きい。特定の一実施形態では、ビーズに結合した抗体の 1 : 1 0 0 の C D 3 : C D 2 8 比が使用される。別の実施形態では、ビーズに結合した抗体の 1 : 7 5 の C D 3 : C D 2 8 比が使用される。さらなる実施形態では、ビーズに結合した抗体の 1 : 5 0 の C D 3 : C D 2 8 比が使用される。別の実施形態では、ビーズに結合した抗体の 1 : 3 0 の C D 3 : C D 2 8 比が使用される。実施形態では、ビーズに結合した抗体の 1 : 1 0 の C D 3 : C D 2 8 比が使用される。別の実施形態では、ビーズに結合した抗体の 1 : 3 の C D 3 : C D 2 8 比が使用される。さらに別の実施形態では、ビーズに結合した抗体の 3 : 1 の C D 3 : C D 2 8 比が使用される。

30

## 【0227】

40

50

粒子と細胞の 1 : 500 ~ 500 : 1 の比、およびその間の任意の整数値を使用して、T 細胞または他の標的細胞などのエフェクター細胞を刺激することができる。当業者が容易に理解できるように、粒子対細胞の比は、標的細胞に対する粒子サイズに依存し得る。例えば、小さいサイズのビーズは、少数の細胞にのみ結合することができるが、一方、大きなビーズは多くの細胞に結合することができる。特定の実施形態では、細胞対粒子の比は 1 : 100 から 100 : 1 の範囲、およびその間の任意の整数値であり、さらなる実施形態では、比は 1 : 9 から 9 : 1 、およびその間の任意の整数値を含み、また、エフェクター細胞を刺激するために使用することができる。T 細胞刺激をもたらす抗 CD3 および抗 CD28 結合粒子対 T 細胞の比は、上記のように変化する場合があるが、しかしながら、特定の値には、1 : 100 、 1 : 50 、 1 : 40 、 1 : 30 、 1 : 20 、 1 : 10 、 1 : 9 、 1 : 8 、 1 : 7 、 1 : 6 、 1 : 5 、 1 : 4 、 1 : 3 、 1 : 2 、 1 : 1 、 2 : 1 、 3 : 1 、 4 : 1 、 5 : 1 、 6 : 1 、 7 : 1 、 8 : 1 、 9 : 1 、 10 : 1 、および 15 : 1 が含まれ、1 つの比は T 細胞あたり少なくとも 1 : 1 の粒子である。一実施形態では、1 : 1 以下の粒子対細胞の比が使用される。特定の一実施形態では、粒子 : 細胞比は 1 : 5 である。さらなる実施形態では、粒子対細胞の比は、刺激の日に応じて変化させることができる。例えば、一実施形態では、粒子対細胞の比は、1 日目に 1 : 1 から 10 : 1 であり、追加の粒子は、最終的な比で、毎日または一日おきに、その後、最大 10 日間、1 : 1 から 1 : 10 の最終の比（添加の日の細胞数に基づく）で細胞に添加される。特定の一実施形態では、粒子対細胞の比は、刺激の 1 日目に 1 : 1 であり、刺激の 3 日目および 5 日目に 1 : 5 に調整される。別の実施形態では、粒子は、毎日または一日おきベースで、刺激の 1 日目における 1 : 1 、ならびに 3 日目および 5 日目における 1 : 5 の最終比まで添加される。別の実施形態では、粒子対細胞の比は、刺激の 1 日目に 2 : 1 であり、刺激の 3 日目および 5 日目に 1 : 10 に調整される。別の実施形態では、粒子は、毎日または一日おきベースで、刺激の 1 日目における 1 : 1 、ならびに 3 日目および 5 日目における 1 : 10 の最終比まで添加される。当業者は、様々な他の比が本明細書における使用に適切であり得ることを理解する。特に、比は、粒子サイズおよび細胞のサイズとタイプに依存して変化する。

#### 【 0228 】

本明細書に記載されるさらなる実施形態では、T 細胞などの細胞は、薬剤で被覆されたビーズと組み合わせられ、その後、ビーズおよび細胞は分離され、次に、細胞が培養される。別の実施形態では、培養前に、薬剤で被覆されたビーズおよび細胞は分離されず、ともに培養される。さらなる実施形態では、ビーズおよび細胞は、磁力などの力を提供することによって最初に濃縮され、その結果、細胞表面マーカーのライゲーションが増加し、それにより細胞刺激が誘導される。

#### 【 0229 】

一例として、細胞表面タンパク質は、抗 CD3 および抗 CD28 が付着している常磁性ビーズ（ 3 × 28 ビーズ）を T 細胞に接触させることによって、ライゲートされ得る。一実施形態では、細胞（例えば、 10<sup>4</sup> ~ 10<sup>9</sup> 個の T 細胞）およびビーズ（例えば、1 : 1 の比の DYNABEADS (登録商標) M - 450 CD3 / CD28 T 常磁性ビーズ、または Miltenyi Biotec からの MACS (登録商標) Microbeads ）は、緩衝液、例えば、 PBS (カルシウムおよびマグネシウムなどの二価カチオンを含まない）中に組み合わせられる。再び、当業者は、任意の細胞濃度が使用され得ることを容易に理解することができる。例えば、標的細胞は、試料中に非常に稀であり、試料の 0.01 % のみを含み得るか、または試料全体（すなわち、 100 % ）は目的の標的細胞を含み得る。したがって、いずれもの細胞数は、本明細書に記載されている文脈内にある。特定の実施形態では、細胞および粒子の最大の接触を確実にするために、粒子および細胞がともに混合される体積を有意に減少させる（すなわち、細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば、一実施形態では、約 20 億個の細胞 / m<sup>1</sup> の濃度が使用される。別の実施形態では、1 億個を超える細胞 / m<sup>1</sup> が使用される。さらなる実施形態では、1000 万、 1500 万、 2000 万、 2500 万、 3000 万、 3500

10

20

30

40

50

万、4000万、4500万、または5000万個の細胞 / m<sup>1</sup> の細胞濃度が使用される。さらに別の実施形態では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個の細胞 / m<sup>1</sup> の細胞の濃度が使用される。さらなる実施形態では、1億2500万個または1億5000万個の細胞 / m<sup>1</sup> の濃度を使用することができる。高濃度の使用は、細胞収量、細胞活性化、および細胞拡大の増加をもたらすことができる。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの、目的の標的抗原を弱く発現する可能性のある細胞をより効率的に捕捉することができる。このような細胞の集団は、治療的価値を有する可能性があり、特定の実施形態において得ることが望ましい。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常、CD28発現が弱いCD8+T細胞をより効率的に選択することができる。

10

### 【0230】

本明細書に記載される一実施形態では、混合物は、数時間（約3時間）から約14日間、またはその間の任意の時間の整数値で培養され得る。別の実施形態において、混合物は、21日間培養され得る。本明細書に記載される一実施形態では、ビーズおよびT細胞は、約8日間、ともに培養される。別の実施形態では、ビーズおよびT細胞は、2~3日間、ともに培養される。T細胞の培養時間が60日以上になるように、刺激の数サイクルが望ましい場合もある。T細胞培養に適した条件には、増殖および生存に必要な因子、例えば、血清（例えば、ウシ胎児血清またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN-ガンマ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGFベータ、およびTNF-アルファ、または当業者に公知である細胞の増殖のための任意の他の添加剤を含み得る適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640、またはX-vivo 15（Lonza））が含まれる。細胞の増殖のための他の添加剤には、限定されないが、界面活性剤、プラズマネット、および還元剤、例えば、N-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールが含まれる。培地には、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、アルファ-MEM、F-12、X-vivo 15、およびX-vivo 20、オプティマイザーを含めることができ、アミノ酸、ビルビン酸ナトリウム、およびビタミンが添加され、血清を含まないかまたは適切な量の血清（もしくは血漿）のいずれか、または規定されたセットのホルモン、ならびに/あるいはT細胞の増殖および拡大に十分な量のサイトカイン（複数可）が補足され得る。抗生物質、例えば、ペニシリンやストレプトマイシンは、実験培養物にのみ含まれ、対象に注射されるべき細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件下、例えば、適切な温度（例えば、37）および雰囲気（例えば、空気+5%CO<sub>2</sub>）で維持される。

20

30

40

### 【0231】

エフェクター細胞、例えば、様々な刺激時間に曝露されたT細胞は、異なる特徴を示し得る。例えば、典型的な血液またはアフェレーシスされた末梢血単核細胞生成物は、細胞毒性またはサブレッサーT細胞集団（TC、CD8<sup>+</sup>）よりも多いヘルパーT細胞集団（TH、CD4<sup>+</sup>）を有する。CD3およびCD28受容体を刺激することによるT細胞のエクスピボ拡大は、約8~9日より前は主にTH細胞からなるT細胞の集団を生成し、一方、約8~9日後は、T細胞の集団はより多くの増加したTC細胞を含む。したがって、治療の目的に応じて、主にTH細胞を含むT細胞集団を対象に注射することは有利であり得る。同様に、TC細胞の抗原特異的なサブセットが単離されている場合は、このサブセットをさらに拡大することが有益な場合がある。

### 【0232】

さらに、CD4およびCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーは、細胞拡大プロセスのプロセスで、有意に変動するが、大部分は再現可能である。したがって、このような再現性は、特定の目的のために、活性化されたT細胞生成物を調整する能力を可能にする。

### 【0233】

一部の場合では、実施形態の免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、細胞拡大を

50

助けるために、活性化および増殖誘導細胞（A a P C）と共に培養される。A a P Cはまた、人工抗原提示細胞（a A P C）とも呼ばれ得る。例えば、抗原提示細胞（A P C）は、実施形態の治療用組成物および細胞治療用製品を調製するのに有用である。一態様では、A a P Cは、トランスジェニックK 5 6 2細胞であり得る。抗原提示システムの調製および使用に関する一般的なガイダンスについては、例えば、各々が参照により組み込まれる、米国特許第6,225,042号明細書、同第6,355,479号明細書、同第6,362,001号明細書および同第6,790,662号明細書；米国特許出願公開第2009/001700号明細書および同第2009/0004142号明細書；および国際公開第2007/103009号パンフレットを参照されたい。実施形態のなおさらなる態様では、トランスジェニックC A R細胞を培養することには、樹状細胞、またはC A Rを発現する免疫エフェクター細胞の拡大を刺激する活性化および増殖誘導細胞（A a P C）の存在下でトランスジェニックC A R細胞を培養することが含まれる。なおさらなる態様では、A a P Cは、A a P Cの表面上に発現されるC A R結合抗体またはその断片を含む。A a P Cは、一部の場合においてT細胞を活性化または共刺激する追加の分子を含み得る。追加の分子は、一部の場合では、膜結合C サイトカインを含み得る。なおさらなる態様では、A a P Cは、不活性もしくは照射されているか、または感染性物質がないことについて試験され、確認されている。なおさらなる態様では、A a P Cの存在下でトランスジェニックC A R細胞を培養することには、I L - 1 5、I L - 2 1および／またはI L - 2などの可溶性サイトカインを含む培地中でトランスジェニックC A R細胞を培養することが含まれる。細胞は、約10：1から約1：10；約3：1から約1：5；約1：1から約1：3（免疫エフェクター細胞対A a P C）の比；またはそこから導き出せる任意の範囲で培養され得る。例えば、T細胞とA a P Cの共培養は、約1：1、約1：2または約1：3の比であり得る。  
10

#### 【0234】

一態様では、A a P Cは、C D 1 3 7 Lを発現し得る。他の態様では、A a P Cは、C D 1 9、C D 6 4、C D 8 6、またはm I L 1 5（もしくはm b I L - 1 5）をさらに発現し得る。特定の態様では、A a P Cは、例えば、O K T 3および／またはU C H T 1などの、少なくとも1つの抗C D 3抗体クローニングまたはその断片を発現し得る。一態様では、A a P Cは不活性化（例えば、照射またはマイトマイシンC処理）され得る。一態様では、A a P Cは、感染物質がないことについて試験され、確認されている場合がある。このようなA a P Cを作製する方法は当該技術分野において公知である。一態様では、A a P CとともにC A R修飾されたT細胞集団を培養することには、約10：1から約1：10；約3：1から約1：5；約1：1から約1：3（T細胞対A a P C）；またはそこから導き出せる範囲の比で細胞を培養することが含まれ得る。例えば、T細胞とA a P Cの共培養は、約1：1、約1：2または約1：3の比であり得る。一態様では、培養ステップは、アミノビスホスホネート（例えば、ゾレドロン酸）を用いた培養がさらに含まれ得る。  
20

#### 【0235】

さらなる態様では、C A Rを発現するエフェクター細胞の集団は、7、14、21、28、35、42日、49、56、63または70日以下の間培養および／または刺激される。一部の実施形態では、C A R-T細胞の集団は、少なくとも0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30日間またはそれを超えて、培養および／または刺激される。一部の実施形態では、C A R-T細胞の集団は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60日間またはそれを超えて、培養および／または刺激される。一部の実施形態では、C A Rを発現するエフェクター細胞の集団は、少なくとも7、14、21、28、35、42、49、56、63日間またはそれを超えて、培養および／または刺激される。他の実施形態では、刺激は、C A R陽性細胞の増殖を促進させるための、C A Rを発する現エフェクター細胞とA a P Cとの共培養を含む。別の態様では、トランスジェニックC A R細胞の集団は、1×刺激、2×刺激、3×刺激、4×刺激、5×刺激、6×刺激、7×  
30

刺激、8×刺激、9×刺激または10×刺激以下で刺激される。一部の例では、トランジエニック細胞は、A a P Cの存在下ではエクスピボで培養されない。一部の特定の例では、実施形態の方法は、トランスフェクションおよび/または培養ステップの後に、C A Rを発現する免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）について細胞集団を濃縮することをさらに含む。濃縮は、蛍光活性化細胞選別（F A C S）およびC A R発現細胞の選別を含み得る。さらなる態様では、C A R発現細胞の選別は、C A R結合抗体の使用を含む。濃縮はまた、C D 5 6 + 細胞の枯渇を含み得る。実施形態のなおさらなる態様では、本方法は、トランジエニックC A R細胞の集団の試料を凍結保存することをさらに含む。

### 【0236】

一部の場合では、A a P Cは、追加の処理なしにM H C分子へのペプチドの直接結合を可能にする最適な長さのペプチドとともにインキュベートされる。あるいは、細胞は、目的の抗原を発現することができる（すなわち、M H C非依存性抗原認識の場合）。さらに、一部の場合では、A P Cは、一般的に、特定のC A RポリペプチドまたはC A Rポリペプチドのいずれかに結合する抗体を発現することができる（例えば、普遍的な活性化および増殖細胞（u A P C））。このような方法は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/190273号パンフレットに開示されている。目的のペプチド-M H C分子または抗原に加えて、A a P Cシステムはまた、少なくとも1つの外因性補助分子を含むことができる。補助分子の任意の適切な数および組合せを使用することができる。補助分子は、共刺激分子および接着分子などの補助分子から選択され得る。例示的な共刺激分子には、C D 7 0 およびB 7 . 1（以前はB 7として知られており、C D 8 0としても公知であった）が含まれ、とりわけ、T細胞の表面上にあるC D 2 8および/またはC T L A - 4分子に結合し、それにより、例えば、T細胞の拡大、T h 1分化、短期T細胞の生存、およびインターロイキン（I L）- 2などのサイトカイン分泌などに影響を与える。接着分子には、炭水化物結合糖タンパク質、例えば、セレクチン、膜貫通結合糖タンパク質、例えば、インテグリン、カルシウム依存性タンパク質、例えば、カドヘリン、および1回膜貫通免疫グロブリン（I g）スーパーファミリータンパク質、例えば、細胞間接着分子（I C A M）が含まれ得、例えば、細胞同士の接触または細胞-マトリックスの接触を促進する。例示的な接着分子には、L F A - 3およびI C A M、例えば、I C A M - 1が含まれる。共刺激分子および接着分子を含む、例示的な補助分子の選択、クローニング、調製、および発現に有用な技術、方法、および試薬は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,225,042号明細書、同第6,355,479号明細書、および同第6,362,001号明細書に例示されている。

### 【0237】

A a P Cになるように選択された細胞は、好ましくは、細胞内抗原プロセシング、細胞内ペプチド輸送、および/または細胞内M H CクラスIもしくはクラスII分子-ペプチドローディングに欠陥があるか、あるいは変温性(poikilothermic)（すなわち、哺乳動物細胞株よりも温度チャレンジに対して感受性が低い）、または欠陥と変温特性の両方を有する。好ましくは、A a P Cになるように選択された細胞はまた、外因性M H CクラスIまたはクラスII分子に対する少なくとも1つの内因性対応物（例えば、上記の内因性M H CクラスIもしくはクラスII分子および/または内因性補助分子）、および細胞に導入される補助分子成分を発現する能力を欠いている。さらに、A a P Cは、好ましくは、A a P Cを生成するためのそれらの修飾前に、細胞が有していた欠陥および変温特性を保持する。例示的なA a P Cは、昆虫細胞株などの抗原プロセシング(T A P)欠損細胞株に関連するトランスポーターを構成するかまたはそれに由来する。例示的な変温性の昆虫細胞株は、S chne i d e r 2細胞株などのショウジョウバエ細胞株である（例えば、Schneider 1972を参照されたい）。S chne i d e r 2細胞の調製、増殖、および培養の例示的な方法は、米国特許第6,225,042号明細書、同第6,355,479号明細書、および同第6,362,001号明細書に提供されている。

### 【0238】

一実施形態では、A a P Cはまた、凍結-融解サイクルに供される。例示的な凍結-融

10

20

30

40

50

解サイクルでは、A a P C を含む適切な容器を適切な量の液体窒素、固体二酸化炭素（すなわちドライアイス）、または同様の低温材料と接触させることによりA a P C を凍結して、急速に凍結を生じさせることができる。次に、凍結したA P C は、低温材料からA a P C を取り出し、周囲の室温条件に曝露するか、またはぬるい水浴もしくは暖かい手を用いて融解時間の短縮を促進する、促進された融解プロセスによって融解される。さらに、融解前にA a P C を凍結して長期間保存することができる。凍結したA a P C はまた、融解され、次に、さらなる使用の前に凍結乾燥され得る。好ましくは、ジメチルスルホキシド（D M S O ）、ポリエチレングリコール（P E G ）、および他の防腐剤などの凍結・融解手法に悪影響を与える可能性のある防腐剤は、凍結・融解サイクルを経るA a P C を含む培地にはないか、または本質的に除去される、あるいは本質的にこのような防腐剤を欠いている培地へのA a P C の転送などによって本質的に除かれる。

10

#### 【 0 2 3 9 】

さらなる実施形態では、異種核酸およびA a P C に内因性の核酸は、架橋によって不活性化され得、そのため、不活性化後に細胞増殖、複製または核酸の発現が本質的には起こらない。一実施形態では、A a P C は、外因性M H C および補助分子の発現、A a P C の表面上でのこのような分子の提示、および選択された1つまたは複数のペプチドの提示されたM H C 分子へのローディングに続く時点で不活性化される。したがって、このような不活性化され、選択されたペプチドがローディングされたA a P C は、本質的に増殖または複製できないようにされているが、選択されたペプチド提示機能を保持している。好ましくは、架橋はまた、A a P C の抗原提示細胞機能を実質的に低下させることなく、細菌およびウイルスなどの汚染微生物を本質的に含まないA a P C ももたらす。したがって、架橋は、A a P C を使用して開発された細胞治療製品の安全性に関する懸念を緩和するのに役立つと同時に、重要なA a P C 機能を維持する。架橋およびA a P C に関連する方法については、例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2009/0017000号明細書を参照されたい。

20

#### 【 0 2 4 0 】

特定の実施形態では、操作された抗原提示細胞（A P C ）がさらに提供される。このような細胞は、例えば、上記のように、エクスピボで免疫エフェクター細胞を増殖誘導するために使用され得る。さらなる態様では、操作されたA P C は、それ自体が患者に投与され得、それにより、インビボで免疫エフェクター細胞の拡大を刺激し得る。実施形態の操作されたA P C は、それ自体、治療薬として使用され得る。他の実施形態では、操作されたA P C は、標的抗原に特異的な内因性免疫エフェクター細胞の活性化を刺激し、および/または標的抗原に特異的である、養子移入された免疫エフェクター細胞の活性または持続性を増加させることができる治療薬として使用することができる。

30

#### 【 0 2 4 1 】

本明細書において使用する場合、「操作されたA P C 」という用語は、少なくとも第1の導入遺伝子を含む細胞（複数可）を指し、第1の導入遺伝子はH L A をコードする。このような操作されたA P C は、抗原がH L A と複合体でA P C の表面上に提示されるように、抗原を発現させるための第2の導入遺伝子をさらに含み得る。一部の態様では、操作されたA P C は、抗原を提示した細胞型（例えば、樹状細胞）であり得る。さらなる態様では、操作されたA P C は、T 細胞またはT 細胞前駆体（「T - A P C 」と呼ばれる）などの、通常は抗原を提示しない細胞型から生成することができる。したがって、一部の態様では、実施形態の操作されたA P C は、標的抗原をコードする第1の導入遺伝子、およびヒト白血球抗原（H L A ）をコードする第2の導入遺伝子を含み、そのため、H L A は、標的抗原のエピトープと複合体で、操作されたA P C の表面上に発現される。特定の具体的な態様では、操作されたA P C で発現されるH L A はH L A - A 2 である。

40

#### 【 0 2 4 2 】

一部の態様では、実施形態の操作されたA P C は、少なくとも第3の導入遺伝子をコードする共刺激分子をさらに含み得る。共刺激分子は、膜結合C サイトカインであり得る共刺激サイトカインであり得る。特定の態様では、共刺激サイトカインは、I L - 1 5 、

50

例えば、膜結合IL-15である。一部のさらなる態様では、操作されたAPCは、編集された（または削除された）遺伝子を含み得る。例えば、阻害遺伝子、例えば、PD-1、LIM-3、CTLA-4またはTCRを編集して、遺伝子の発現を低減または排除することができる。実施形態の操作されたAPCは、目的の任意の標的抗原をコードする導入遺伝子をさらに含み得る。例えば、標的抗原は、感染症抗原または腫瘍関連抗原（TA）であり得る。

#### 【0243】

##### ポイント・オブ・ケア

本開示の一実施形態では、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞は、ポイント・オブ・ケアの場で修飾される。本開示の一実施形態では、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞は、ポイント・オブ・ケアの場でまたはその近くで修飾される。一部の場合では、修飾された免疫エフェクター細胞はまた、操作されたT細胞と呼ばれる。一部の場合では、ポイント・オブ・ケアの場は、治療を必要とする対象の近くの病院または施設（例えば、医療施設）にある。対象はアフェレーシスを受け、末梢血単核細胞（PBMC）またはPBMCの亜集団は、例えば、溶出、ビーズ選択またはフィコール勾配分離によって濃縮することができる。濃縮されたPBMCまたはPBMCの亜集団は、さらに処理する前に、任意の適切な凍結保存溶液中で凍結保存され得る。一例では、溶出プロセスは、ヒト血清アルブミンを含む緩衝液を用いて行われる。T細胞などの免疫エフェクター細胞は、本明細書に記載される選択方法によって単離することができる。一例では、T細胞の選択方法は、T細胞上のCD3に特異的なビーズまたはCD4およびCD8に特異的なビーズを含む。ある場合には、ビーズは常磁性ビーズであり得る。回収した免疫エフェクター細胞は、修飾前に適切な凍結保存液で凍結保存することができる。免疫エフェクター細胞は、注射前に最大24時間、36時間、48時間、72時間または96時間融解することができる。融解した細胞は、修飾前に、細胞培養、例えば、ウシ胎児血清（FBS）もしくはヒト血清ABを補足した細胞培養（RPMIなど）を行うことができ、またはIL-2もしくはIL-21などのサイトカインを含む緩衝液に入れることができる。別の態様において、回収された免疫エフェクター細胞は、凍結保存の必要なしに修飾され得る。

#### 【0244】

一部の場合では、免疫エフェクター細胞は、キメラ受容体、1つ以上の細胞タグ（複数可）、および/またはサイトカイン（複数可）を免疫エフェクター細胞に操作/導入することによって修飾され、次に、対象に迅速に注射される。一部の場合では、免疫エフェクター細胞の供給源は、同種と自家の供給源の両方を含み得る。ある場合では、免疫エフェクター細胞は、T細胞またはNK細胞であり得る。別の場合では、サイトカインは、mbIL-15もしくはIL-12またはそれらの変異体であり得る。さらなる場合では、サイトカインは、本明細書に記載されるリガンド誘導性の遺伝子スイッチ発現系によって調節され得る。例えば、ベレジメクスなどのリガンドを対象に送達して、mbIL-15またはIL-12の発現を調節することができる。

#### 【0245】

別の態様では、ベレジメクスは、5mg、10mg、15mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mgまたは100mgで提供される。さらなる態様では、ベレジメクスのより低い用量、例えば、0.5mg、1mg、5mg、10mg、15mgまたは20mgが提供される。一実施形態では、ベレジメクスは、修飾された免疫エフェクター細胞の注射の0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、19、20、または21日前に対象に投与される。さらなる実施形態では、ベレジメクスは、修飾された免疫エフェクター細胞の注射後の有効期間、約12時間ごとに約1回、約24時間ごとに約1回、約36時間ごとに約1回または約48時間ごとに約1回、対象に投与される。1つの実施形態では、ベレジメクス投与の有効期間は、例えば、免疫エフェクター細胞投与後の約7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30日である。他の実施

10

20

30

40

50

形態では、ベレジメクスは、休薬期間の後、休薬日の後、または対象が再発を経験したときに再投与することができる。

【0246】

対象への悪影響が観察される特定の場合、または治療が必要でない場合、細胞タグは、本明細書に記載される切断型上皮細胞増殖因子受容体タグなどの細胞タグを含む修飾された免疫エフェクター細胞の条件付きインビボアブレーションのために、例えば、セツキシマブを介して活性化され得る。

【0247】

一部の実施形態では、このような免疫エフェクター細胞は、エレクトロポレーションを介して、本明細書に記載される構築物によって修飾される。一例では、エレクトロポレーションは、LonzaのNucleofector（商標）デバイスなどのエレクトロポレーターを用いて行われる。他の実施形態では、上記の構築物を含むベクターは、非ウイルスまたはウイルスベクターである。一つ場合では、非ウイルスベクターは、Sleeping Beautyトランスポゾン-トランスポザーゼシステムを含む。一例では、免疫エフェクター細胞は、特定の配列を使用してエレクトロポレーションされる。例えば、免疫エフェクター細胞は、1つのトランスポゾン、続くSleeping BeautyトランスポザーゼをコードするDNA、続く第2のトランスポゾンを用いてエレクトロポレーションされ得る。別の例では、免疫エフェクター細胞は、すべてのトランスポゾンおよびトランスポザーゼを用いて同時にエレクトロポレーションされ得る。別の例では、免疫エフェクター細胞は、トランスポザーゼ、続く、一度に両方のトランスポゾンまたは1つのトランスポゾンを用いてエレクトロポレーションされ得る。連続したエレクトロポレーションが行われている間、免疫エフェクター細胞は、次のエレクトロポレーションのステップの前に一定期間休止することができる。

10

20

30

【0248】

一部の場合では、修飾された免疫エフェクター細胞は、増殖誘導および活性化のステップを受けない。一部の場合では、修飾された免疫エフェクター細胞は、インキュベーションまたは培養のステップ（例えば、エクスピボ増殖誘導）を受けない。特定の場合では、修飾された免疫エフェクター細胞は、注射前にIL-2およびIL-21を含む緩衝液に入れられる。他の例では、修飾された免疫エフェクター細胞は、注射前に、細胞培養緩衝液、例えば、ウシ胎児血清（FBS）が補足された細胞培養緩衝液（例えば、RPMI）に入れられるか、または休止される。注射前に、修飾された免疫エフェクター細胞を回収し、洗浄し、対象への注射に備えて生理食塩水緩衝液に配合することができる。

【0249】

一例では、対象は、注射前にリンパ球枯渇を受けている。例示的なリンパ球枯渇計画は、フルダラビンもしくはシクロホスファミドまたはそれらの組合せの投与を含み得る。

【0250】

他の例では、リンパ球枯渇は必要とされず、修飾された免疫エフェクター細胞が対象に迅速に注射される。

【0251】

さらなる例では、対象は、最小限のリンパ球枯渇を受ける。本明細書における最小限のリンパ球枯渇とは、リンパ球枯渇計画後の1日、2日または3日以内に、対象に注射することができるように減少したリンパ球枯渇プロトコールを指す。一例において、減少したリンパ球枯渇プロトコールは、低用量のフルダラビンおよび／またはシクロホスファミドを含み得る。別の例では、減少したリンパ球枯渇プロトコールは、リンパ球枯渇の期間の短縮、例えば、1日または2日を含むことができる。

40

【0252】

一実施形態では、免疫エフェクター細胞は、キメラ受容体およびサイトカインを前記免疫エフェクター細胞に操作／導入することによって修飾され、次に、対象に迅速に注射される。他の場合では、免疫エフェクター細胞は、キメラ受容体およびサイトカインを前記細胞に操作／導入することによって修飾され、次に、少なくとも0、0.5、1、2、3

50

、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50時間内に対象に注射される。他の場合では、免疫エフェクター細胞は、キメラ受容体およびサイトカインを免疫エフェクター細胞に操作/導入することによって修飾され、次に、0日、1日未満、2日未満、3日未満、4日未満、5未満、6日未満、7日未満または8日未満で対象に注射される。

#### 【0253】

一部の実施形態では、修飾されたエフェクター細胞の量は、それを必要とする対象に投与され、その量は、有効性、およびサイトカイン関連毒性を誘発する潜在性に基づいて決定される。別の実施形態では、修飾されたエフェクター細胞は、CAR<sup>+</sup>およびCD3<sup>+</sup>細胞である。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約10<sup>4</sup>～約10<sup>9</sup>個の修飾されたエフェクター細胞/kgを含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約10<sup>4</sup>～約10<sup>5</sup>個の修飾されたエフェクター細胞/kgを含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約10<sup>5</sup>～約10<sup>6</sup>個の修飾されたエフェクター細胞/kgを含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、約10<sup>6</sup>～約10<sup>7</sup>個の修飾されたエフェクター細胞/kgを含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、>10<sup>4</sup>個であるが10<sup>5</sup>個の修飾エフェクター細胞/kgを含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、>10<sup>5</sup>個であるが10<sup>6</sup>個の修飾されたエフェクター細胞/kgを含む。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の量は、>10<sup>6</sup>個であるが10<sup>7</sup>個の修飾されたエフェクター細胞/kgを含む。

10

20

30

40

#### 【0254】

一実施形態では、修飾された免疫エフェクター細胞は、腫瘍組織への直接的な局所送達を介してがんを標的とする。例えば、卵巣がんでは、修飾された免疫エフェクター細胞は、腹腔内(IP)で腹部または腹腔に送達され得る。このようなIP送達は、化学療法薬の送達用に配置されたポートまたは既存のポートを介して行うことができる。修飾された免疫エフェクター細胞の局所送達の他の方法には、切除腔へのカテーテル注射、超音波誘導腫瘍内注射、肝動脈注射または胸膜内送達が含まれ得る。

#### 【0255】

一実施形態では、それを必要とする対象は、IPを介して送達される修飾された免疫エフェクター細胞の第1の用量、続いてIVを介して送達される修飾された免疫エフェクター細胞の第2の用量で治療を開始することができる。さらなる実施形態では、修飾された免疫エフェクター細胞の第2の用量の後に、IVまたはIPを介して送達され得るその後の用量が続き得る。一実施形態では、第1および第2またはさらなる後続の用量の間の期間は、約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30日であり得る。一実施形態では、第1および第2またはさらなる後続の用量の間の期間は、約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、または36か月であり得る。別の実施形態では、第1および第2またはさらなる後続の用量の間の期間は、約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10年であり得る。

#### 【0256】

別の実施形態では、修飾された免疫エフェクター細胞の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回の用量のさらなる投与のために、カテーテルを腫瘍または転移部位に配置することができる。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の用量は、約10<sup>2</sup>～約10<sup>9</sup>個の修飾エフェクター細胞/kgを含むことができる。毒性が観察される場合、修飾されたエフェクター細胞の用量は、約10<sup>2</sup>～約10<sup>5</sup>個の修飾されたエフェクター細胞/kgを含み得る。一部の場合では、修飾されたエフェクター細胞の用量は、約10

50

<sup>2</sup> 個の修飾されたエフェクター細胞 / kg で開始することができ、その後の用量は、約 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup> または 10<sup>9</sup> 個の修飾されたエフェクター細胞 / kg まで増加させることができる。

#### 【 0 2 5 7 】

他の実施形態では、操作された細胞の増殖および / または生存を刺激する方法は、対象から細胞の試料を得、および細胞の試料の細胞を 1 つ以上のトランスポゾンを含む 1 つ以上のポリヌクレオチドでトランスフェクトすることを含む。一実施形態では、トランスポゾン（複数可）は、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体（C A R）、サイトカイン、1 つ以上の細胞タグ、および前記 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを前記細胞のゲノムに組み込むのに有効なトランスポザーゼをコードし、操作された細胞の集団を提供する。実施形態では、トランスポゾン（複数可）は、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体（C A R）、サイトカイン、1 つ以上の細胞タグ、サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、および前記 1 つ以上のポリヌクレオチドを前記細胞のゲノムに組み込むのに有効なトランスポザーゼをコードし、操作された細胞の集団を提供する。一実施形態では、遺伝子スイッチポリペプチドは、i ) 第 1 の核内受容体リガンド結合ドメインに融合した D N A 結合ドメインを含む第 1 の遺伝子スイッチポリペプチド、および i i ) 第 2 の核内受容体リガンド結合ドメインに融合したトランス活性化ドメインを含む第 2 の遺伝子スイッチポリペプチドを含む。一部の実施形態では、第 1 の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第 2 の遺伝子スイッチポリペプチドは、リンカーによって接続されている。一例では、操作された細胞を対象に投与する前に、リンパ球枯渇は必要とされない。

10

20

30

40

50

#### 【 0 2 5 8 】

一例では、操作された細胞をインビボで拡大または増殖誘導する方法は、対象から細胞の試料を得、および本明細書に記載されるキメラポリペプチドを含む 1 つ以上のトランスポゾンを含む 1 つ以上のポリヌクレオチドで細胞の試料の細胞をトランスフェクトすることを含む。一実施形態では、トランスポゾンは、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体（C A R）、サイトカイン、1 つ以上の細胞タグ、および前記 1 つ以上のポリヌクレオチドを前記細胞のゲノムに組み込むのに有効なトランスポザーゼをコードし、操作された細胞の集団を提供する。一実施形態では、トランスポゾン（複数可）は、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体（C A R）、サイトカイン、1 つ以上の細胞タグ、サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、および前記 1 つ以上のポリヌクレオチドを前記細胞のゲノムに組み込むのに有効なトランspoザーゼをコードし、操作された細胞の集団を提供する。一実施形態では、遺伝子スイッチポリペプチドは、i ) 第 1 の核内受容体リガンド結合ドメインに融合した D N A 結合ドメインを含む第 1 の遺伝子スイッチポリペプチド、および i i ) 第 2 の核内受容体リガンド結合ドメインに融合したトランス活性化ドメインを含む第 2 の遺伝子スイッチポリペプチドを含む。一部の実施形態では、第 1 の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第 2 の遺伝子スイッチポリペプチドは、リンカーによって接続されている。一例では、操作された細胞を対象に投与する前に、リンパ球枯渇は必要とされない。

#### 【 0 2 5 9 】

別の実施形態では、それを必要とする対象における操作された細胞のインビボでの持続性を増強する方法は、対象からの細胞の試料を得、および細胞の試料の細胞を、本明細書に記載されるキメラポリペプチドを含む 1 つ以上のトランスポゾンを含む 1 つ以上のポリヌクレオチドでトランスフェクトすることを含む。一部の場合では、1 つ以上のトランスポゾンは、キメラ抗原受容体（C A R）、サイトカイン、1 つ以上の細胞タグ、および D N A を前記細胞のゲノムに組み込むのに有効なトランspoザーゼをコードし、操作された細胞の集団を提供する。一部の場合では、1 つ以上のトランスポゾンは、キメラ抗原受容体（C A R）、サイトカイン、1 つ以上の細胞タグ、サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、および D N A を前記細胞のゲノムに組み込むのに有効なトランspoザーゼをコードし、操作された細胞の集団を提供する。一部の場合では

、遺伝子スイッチポリペプチドは、i) 第一の核内受容体リガンド結合ドメインに融合したDNA結合ドメインを含む第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii) 第2の核内受容体リガンド結合ドメインに融合したトランス活性化ドメインを含む第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、第1の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第2の遺伝子スイッチポリペプチドは、リンカーによって接続されている。一例では、操作された細胞を対象に投与する前に、リンパ球枯渇は必要とされない。

#### 【0260】

別の実施形態において、腫瘍を有する対象を治療する方法は、対象からの細胞の試料を得、本明細書に記載されるキメラポリペプチドを含む1つ以上のトランスポゾンを含む1つ以上のポリヌクレオチドで試料の細胞をトランスフェクトし、および操作された細胞の集団を対象に投与することを含む。一部の場所では、1つ以上のトランスポゾンは、キメラ抗原受容体(CAR)、サイトカイン、1つ以上の細胞タグ、およびDNAを細胞のゲノムに組み込むのに有効なトランスポザーゼをコードする。一部の場所では、1つ以上のトランスポゾンは、キメラ抗原受容体(CAR)、サイトカイン、1つ以上の細胞タグ、サイトカインのリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、およびDNAを細胞のゲノムに組み込むのに有効なトランスポザーゼをコードする。一部の場所では、遺伝子スイッチポリペプチドは、i) 第1の核内受容体リガンド結合ドメインに融合したDNA結合ドメインを含む第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびii) 第2の核内受容体リガンド結合ドメインに融合したトランス活性化ドメインを含む第2の遺伝子スイッチポリペプチドを含み、第1の遺伝子スイッチポリペプチドおよび第2の遺伝子スイッチポリペプチドは、リンカーによって接続されている。一部の場所では、細胞は、エレクトロポレーションを介してトランスフェクトされる。一部の場所では、遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、プロモーターによって調節される。一部の場所では、プロモーターは、組織特異的プロモーターもしくはEF1Aプロモーターまたはそれらの機能的変異体である。一部の場所では、組織特異的プロモーターは、T細胞特異的応答エレメントまたはNFAT応答エレメントを含む。一部の場所では、サイトカインは、IL-1、IL-2、IL-15、IL-12、IL-21、IL-15の融合体、IL-15RアルファまたはIL-15変異体のうちの少なくとも1つを含む。一部の場所では、サイトカインは分泌型である。一部の場所では、サイトカインは膜結合型である。一部の場所では、細胞は、NK細胞、NKT細胞、T細胞またはT細胞前駆細胞である。一部の場所では、細胞は、対象に投与される(例えば、操作された細胞を対象に注射することによる)。一部の場所では、本方法は、サイトカインの発現を誘導するために有効量のリガンド(例えば、ベレジミクス)を投与することをさらに含む。一部の場所では、CARは、少なくともRORIに結合することができる。一部の場所では、トランスポザーゼは、サケ科のタイプのTC1様トランスポザーゼである。一部の場所では、トランスポザーゼは、SB11またはSB100×トランスポザーゼである。他の場所では、トランスポザーゼは、PigglyBacである。一部の場所では、細胞タグは、HER1切断型変異体またはCD20切断型変異体のうちの少なくとも1つを含む。

#### 【0261】

##### 治療への応用

本明細書に記載される実施形態では、Sleeping Beautyトランスポゾン(複数可)およびSleeping Beautyトランスポザーゼで形質導入された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞)である。例えば、Sleeping Beautyトランスポゾンまたは複数のSleeping Beautyトランスポゾンは、抗原認識ドメインとCD8アルファヒンジのスペーサーを組み合わせるCARを含むことができ、スペーサー領域は、「s」で表されるストーク領域、および「s'-n」(nは、スペース領域にあるs'の単位数を表し、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20であり得る)で表される少なくとも1つのストーク伸長領域、CD3-ゼータの細胞内ドメイン、CD

10

20

30

40

50

28、4-1BB、またはそれらの任意の組合せ、および細胞内ドメインCD3-ゼータ、1つ以上の細胞タグ、1つ以上のサイトカイン、ならびに任意選択で本明細書に記載される遺伝子スイッチシステムの成分を含む。したがって、一部の例では、形質導入されたT細胞は、CARを介したT細胞応答を誘発することができる。

#### 【0262】

本明細書に記載される実施形態では、CARの使用は、初代T細胞の特異性を表面抗原に再方向付けするために提供される。したがって、本発明はまた、哺乳動物の標的細胞集団または組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激する方法であって、CARを発現するT細胞を哺乳動物に投与するステップを含む方法を提供し、CARは、抗原と特異的に相互作用する結合部分、スペーサー、例えば、ヒトCD3-ゼータの細胞内ドメインを含むゼータ鎖部分、および共刺激シグナル伝達領域を含む。

10

#### 【0263】

一実施形態では、本開示は、T細胞が本発明の抗原特異的CARを発現するように遺伝子修飾され、CAR-T細胞がそれを必要とするレシピエントに注射される細胞療法を含む。注射された細胞は、レシピエントにおいて抗原を過剰発現する細胞を死滅させることができる。抗体療法とは異なり、本明細書に記載されるCAR-T細胞は、インビポで複製することができ、腫瘍細胞に対する持続的効果をもたらすことができる長期間の持続をもたらす。

#### 【0264】

本発明はさらに、対象における抗原の過剰発現を含む疾患を検出する方法を提供し、a) i) 対象からの試料、およびii) 本明細書に記載される抗体、または抗原結合断片の任意の1つ以上を提供し、b) 抗体とその抗原とを特異的に結合させるための条件下で、試料を抗体と接触させ、およびc) 疾患がない対照飼料と比較して、試料への抗体の結合レベルの増加を検出して、それにより対象における疾患を検出することを含む。一実施形態では、疾患はがんである。好ましい実施形態では、がんは、卵巣がんおよび乳がんの群から選択される。検出方法を限定する意図はないが、一実施形態では、試料への抗体の結合の検出は、免疫組織化学的な酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、蛍光活性化細胞選別(FACS)、ウエスタンプロット、免疫沈降、および/または放射線画像である。

20

#### 【0265】

また、本明細書では、抗原の過剰発現を含む疾患を治療する方法が提供され、疾患有する対象に、本明細書に記載される任意の1つ以上のポリペプチドの治療有効量を投与することを含む。

30

#### 【0266】

本明細書に記載される修飾されたT細胞はまた、哺乳動物におけるエクスピボ免疫化および/またはインビポ治療のための一種のワクチンとして役立ち得る。実施形態では、哺乳動物はヒトである。エクスピボ免疫化に関して、免疫エフェクター細胞を哺乳動物に投与する前に、インビトロで以下のうちの少なくとも1つが起こる：i) 細胞の拡大、ii) CARをコードする核酸の細胞への導入、および/またはiii) 細胞の凍結保存。

40

#### 【0267】

エクスピボ手法は周知であり、以下でより十分に検討される。簡単に述べれば、細胞は、哺乳動物(例えば、ヒト)から単離され、本明細書に開示されるCARを発現するベクターで遺伝子修飾(すなわち、インビトロで形質導入またはトランスフェクト)される。CAR修飾細胞を、哺乳動物のレシピエントに投与して、治療上の利点を提供することができる。哺乳動物のレシピエントはヒトであり得、CAR修飾細胞はレシピエントに関して自家であり得る。あるいは、細胞は、レシピエントに関して同種、同系または異種であり得る。

#### 【0268】

造血幹細胞および前駆細胞のエキソビボ拡大のための手法は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,199,942号明細書に記載され、本発明の細胞に適用する

50

ことができる。他の適切な方法は、当該技術分野において公知であり、したがって、本発明は、細胞のエクスピボ拡大の任意の特定の方法に限定されない。簡単に述べれば、T細胞のエクスピボ培養および拡大は：(1)末梢血採取または骨髄外植片から哺乳動物由来のCD34+造血幹細胞および前駆細胞を収集し；および(2)このような細胞をエクスピボで拡大することを含む。米国特許第5,199,942号明細書に記載されている細胞増殖因子に加えて、flt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドなどの他の因子を細胞の培養および拡大に使用することができる。

#### 【0269】

エクスピボ免疫化に関して細胞ベースのワクチンを使用することに加えて、本発明はまた、患者において抗原に対して方向付けられた免疫応答を誘発するためにインビボ免疫化のための組成物および方法を提供する。10

#### 【0270】

一般的に、本明細書に記載されるように活性化および拡大された細胞は、免疫無防備状態の個体に生じる疾患の治療および予防に利用することができる。特に、本発明の修飾されたT細胞は、悪性腫瘍の治療に使用される。特定の実施形態では、本発明の細胞は、悪性腫瘍を発症するリスクのある患者の治療に使用される。したがって、悪性腫瘍を治療または予防する方法は、それを必要とする対象に、本発明の修飾されたT細胞の治療的有効量を投与することを含む。実施形態では、本明細書に記載されるように活性化および拡大された細胞は、悪性腫瘍の治療に利用することができる。

#### 【0271】

簡単に述べれば、本明細書に記載される医薬組成物は、本明細書に記載される標的細胞集団を、1つ以上の医薬的もしくは生理学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせて含むことができる。このような組成物は、緩衝液、例えば、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水など；炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール；タンパク質；ポリペプチドまたはアミノ酸、例えば、グリシン；抗酸化剤；キレート剤、例えば、EDTAまたはグルタチオン；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および防腐剤を含むことができる。実施形態では、本発明の組成物は、静脈内投与用に製剤化される。20

#### 【0272】

本明細書に記載される医薬組成物は、治療（または予防）される疾患に適切な方法で投与することができる。投与の量および頻度は、患者の状態、患者の疾患の種類および重症度などの要因によって決定されるが、適切な投薬量は臨床試験によって決定され得る。30

#### 【0273】

「免疫学的有効量」または「治療量」が示される場合、投与される本明細書に記載される組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、および状態の個人差を考慮して医師によって決定され得る。本明細書に記載されるT細胞を含む医薬組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞 / kg 体重、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞 / kg 体重（これらの範囲内のすべての整数値を含む）の投薬量で投与することができると一般的に述べることができる。T細胞組成物はまた、これらの投薬量で複数回投与することができる。細胞は、免疫療法において一般的に公知である注射技術を使用することによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, (1988)を参照されたい）。特定の患者のための最適な投薬量および治療計画は、疾患の兆候について患者を監視し、それに応じて治療を調整することにより、医学の当業者によって容易に決定され得る。40

#### 【0274】

特定の実施形態では、活性化T細胞を対象に投与し、次に、血液を再採取し（またはアフェレーシスを行い）、そこからのT細胞を活性化し、これらの活性化および拡大されたT細胞を患者に再注射することが望ましい場合がある。このプロセスは、数週間ごとに複数回実行することができる。特定の実施形態では、T細胞は、10ccから400ccの採血から活性化することができる。特定の実施形態では、T細胞は、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、または100ccの50

採血から活性化される。理論にとらわれることなく、この複数回の採血／複数回の再注射プロトコールの使用は、T細胞の特定の集団を選択するのに役立つことが可能である。別の実施形態では、放射線または化学療法のいずれかによって患者のリンパ球枯渇後に、対象組成物の活性化T細胞を投与することが望ましい場合がある。

#### 【0275】

本明細書に記載される組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸血、移植(*implantation*)または移植(*transplantation*)によるなどの任意の好都合な方法で行うことができる。本明細書に記載される組成物は、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内(*i.v.*)注射、または腹腔内で患者に投与することができる。一実施形態では、本発明のT細胞組成物は、皮内または皮下注射によって患者に投与される。別の実施形態では、本発明のCAR-T細胞組成物は、*i.v.*注射により投与される。T細胞の組成物は、リンパ節、または原発腫瘍もしくは転移の部位に直接注射することができる。

10

#### 【0276】

患者に投与される上記の治療の投薬量は、治療される状態の正確な性質および治療のレシピエントによって変化する。ヒトへの投薬量のスケーリングは、当該技術分野において認められている慣行に従って行うことができる。例えば、上記の治療の用量は、 $1 \times 10^4$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$  ~  $5 \times 10^6$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$  の範囲であり得る。例示的な用量は、 $1 \times 10^2$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$ 、 $1 \times 10^3$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$ 、 $1 \times 10^4$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$ 、 $1 \times 10^5$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$ 、 $3 \times 10^5$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$ 、 $1 \times 10^6$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$ 、 $5 \times 10^6$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$ 、 $1 \times 10^7$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$ 、 $1 \times 10^8$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$  または $1 \times 10^9$  個のCAR+細胞/ $\text{kg}$  であり得る。適切な用量は、成人または小児患者に応じて適宜調整することができる。

20

#### 【0277】

あるいは、哺乳動物(例えば、ヒト)に投与される免疫エフェクター細胞の典型的な量は、例えば、100、1000、10000、100000、100万から1000億個の細胞の範囲であり得る；しかしながら、この例示的な範囲より下または上の量は、本発明の範囲内である。例えば、本発明の宿主細胞の用量は、約100万～約500億細胞(例えば、約500万細胞、約2500万細胞、約5億細胞、約10億細胞、約50億細胞、約200億細胞、約300億細胞、約400億細胞、または前述の値のいずれか2つによって定義される範囲)、約1000万～約1000億細胞(例えば、約2000万細胞、約3000万細胞、約4000万細胞、約6000万細胞、約7000万細胞、約8000万細胞、約9000万細胞、約100億細胞、約250億細胞、約500億細胞、約750億細胞、約900億細胞、または前述の値のいずれか2つによって定義される範囲)、約1億細胞～約500億細胞(例えば、約1億2000万細胞、約2億5000万細胞、約3億5000万細胞、約4億5000万細胞、約6億5000万細胞、約8億細胞、約9億細胞、約30億細胞、約300億細胞、約450億細胞、または前述の値のいずれか2つによって定義される範囲)であり得る。

30

#### 【0278】

治療的または予防的有効性は、治療された患者の定期的な評価によって監視することができる。数日またはそれより長い反復投与の場合、状態に応じて、疾患症状の望ましい抑制が起こるまで治療が繰り返される。しかしながら、他の投薬計画が有用であり得、本発明の範囲内である。所望の投薬量は、組成物の単回ボーラス投与により、組成物の複数回ボーラス投与により、または組成物の連続注射投与により送達することができる。

40

#### 【0279】

開示された核酸配列を発現する免疫エフェクター細胞を含む組成物、またはそれらの核酸配列を含むベクターは、哺乳動物に同時投与することができる1つ以上の追加の治療薬とともに投与することができる。「同時投与」とは、1つ以上の追加の治療薬と、および1つ以上の追加の治療薬の効果を増強するのに十分に近い時間に本発明の宿主細胞または

50

本発明のベクターを含む組成物とを投与すること、またはその逆を意味する。これに関して、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞または本明細書に記載されるベクターを含む組成物は、1つ以上の追加の治療薬と同時に投与することができ、または第1に投与し、1つ以上の追加の治療薬を第2に投与することができ、またはその逆で投与することができる。あるいは、本明細書に記載される開示された免疫エフェクター細胞またはベクターを含む組成物および1つ以上の追加の治療薬を同時に投与することができる。

#### 【0280】

本発明の宿主細胞および／または本発明のベクターを含む組成物に含まれ得るか、またはそれと同時投与され得る（もしくはキットに含まれ得る）治療薬の例は、インターロイキン、サイトカイン、インターフェロン、アジュvantおよび化学療法剤である。実施形態では、追加の治療薬は、IFN-アルファ、IFN-ベータ、IFN-ガンマ、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、LT-ベータ、TNF-アルファ、増殖因子、およびhGH、ヒトToll様受容体TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、およびTLR10のリガンドである。10

#### 【0281】

「消泡剤」は、水性分散液の凝固、完成したフィルム中の気泡をもたらすか、または一般的には処理を損なう場合がある処理中の発泡を低減する。例示的な消泡剤には、シリコンエマルジョンまたはセスキオレイン酸ソルビタンが含まれる。

#### 【0282】

「抗酸化剤」には、例えば、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウムおよびトコフェロールが含まれる。特定の実施形態では、抗酸化剤は、必要な場合、化学的安定性を高める。20

#### 【0283】

本明細書に記載される製剤は、抗酸化剤、金属キレート剤、チオール含有化合物および他の一般的な安定剤から利益を得ることができる。このような安定剤の例には、限定されないが、(a) 約0.5%～約2%w/vのグリセロール、(b) 約0.1%～約1%w/vのメチオニン、(c) 約0.1%～約2%w/vのモノチオグリセロール、(d) 約1mM～約10mMのEDTA、(e) 約0.01%～約2%w/vのアスコルビン酸、(f) 0.003%～約0.02%w/vのポリソルベート80、(g) 0.001%～約0.05%w/vのポリソルベート20、(h) アルギニン、(i) ヘパリン、(j) 硫酸デキストラン、(k) シクロデキストリン、(l) ペントサンポリサルフェートおよび他のヘパリノイド、(m) マグネシウムおよび亜鉛などの2価カチオン；または(n) それらの組合せが含まれる。30

#### 【0284】

「結合剤」は、凝集性を付与し、例えば、アルギン酸およびその塩；セルロース誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース（例、Methocel（登録商標））、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース（例えば、Klucone（登録商標））、エチルセルロース（例えば、Ethocel（登録商標））、および微結晶性セルロース（例えば、Avicel（登録商標））；微結晶性デキストロース；アミロース；ケイ酸アルミニウムマグネシウム；多糖類酸；ペントナイト；ゼラチン；ポリビニルピロリドン／酢酸ビニル共重合体；クロスボビドン；ポビドン；デンプン；化デンプン；トラガカント、デキストリン、糖、例えば、スクロース（例えば、Dipac（登録商標））、グルコース、デキストロース、糖蜜、マンニトール、ソルビトール、キシリトール（例えば、Xylitol（登録商標））、およびラクトース；天然または合成ゴム、例えば、アカシア、トラガカント、ガッヂゴム、イサポール皮の粘液、ポリビニルピロリドン（例えば、Polyvidone（登録商標）CL、Kollidon（登録商標）CL、Polyplasdone（登録商標）XL-10）、カラマツアラボガラクタン、Veegum（登録商標）、ポリエチレングリコール、ワックス、アルギン酸ナトリウムが含まれる。40

#### 【0285】

10

20

30

40

50

「担体」または「担体材料」は、薬剤学において一般的に使用される任意の賦形剤を含み、イブルチニブおよび抗がん剤の化合物などの本明細書に開示される化合物との適合性、ならびに望ましい剤形の放出プロファイル特性に基づいて選択されるべきである。例示的な担体材料には、例えば、結合剤、懸濁剤、崩壊剤、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定剤、潤滑剤、湿潤剤、希釈剤などが含まれる。「医薬適合性担体材料」には、限定されないが、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン（PVP）、コレステロール、コレステロールエステル、カゼイン酸ナトリウム、大豆レシチン、タウロコール酸、ホスホジルコリン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸二カリウム、セルロースおよびセルロース結合体、糖ステアロイル乳酸ナトリウム、カラギーナン、モノグリセリド、ジグリセリド、アルファ化デンプンなどが含まれ得る。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; およびPharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999)を参照されたい。

#### 【0286】

「分散剤」および/または「粘度調整剤」は、液体媒体または造粒法または混和法により薬物の拡散および均一性を制御する材料を含む。一部の実施形態では、これらの薬剤はまた、コーティングまたは侵食マトリックスの有効性を促進する。例示的な拡散促進剤/分散剤としては、例えば、親水性ポリマー、電解質、Tween（登録商標）60または80、PEG、ポリビニルピロリドン（PVP；Plasdone（登録商標）として商業的に公知である）、および炭水化物ベースの分散剤、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース（例えば、HPC、HPC-SL、およびHPC-L）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（例えば、HPMC K100、HPMC K4M、HPMC K15M、およびHPMC K100M）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、酢酸ステアリン酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMCAS）、非結晶性セルロース、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、トリエタノールアミン、ポリビニルアルコール（PVA）、ビニルピロリドン/酢酸ビニル共重合体（S630）、エチレンオキシドとホルムアルdehyドを含む4-（1,1,3,3-テトラメチルブチル）-フェノールポリマー（チロキサポールとしても公知である）、ポロキサマー（例えば、酸化エチレンと酸化プロピレンのブロック共重合体であるPluronics F68（登録商標）、F88（登録商標）、およびF108（登録商標））；およびポロキサミン（例えば、Tetronic 908（登録商標）、ポロキサミン908（登録商標））としても公知であり、エチレンジアミンへのプロピレンオキシドおよびエチレンオキシドの逐次付加から誘導される四官能性ブロック共重合体である）（BASF Corporation, Parsippany, N.J.）、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、またはポリビニルピロリドンK30、ポリビニルピロリドン/酢酸ビニル共重合体（S-630）、ポリエチレングリコール（例えば、ポリエチレングリコールは、約300～約6000、または約3350～約4000、または約7000～約5400の分子量を有することができる）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ポリソルベート-80、アルギン酸ナトリウム、ゴム、例えば、トラガカントゴムおよびアカシアゴム、グーゴム、キサンタン、例えば、キサンタンゴム、糖、セルロース系物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリソルベート-80、アルギン酸ナトリウム、ポリエトキシリ化ソルビタンモノラウレート、ポリエトキシリ化ソルビタンモノラウレート、ポビドン、カルボマー、ポリビニルアルコール（PVA）、アルギン酸塩、キトサンおよびそれらの組合せが挙げられる。

10

20

30

40

50

セルロースまたはトリエチルセルロースなどの可塑剤はまた分散剤として使用することができる。リボソーム分散剤および自己乳化分散剤において特に有用な分散剤は、ジミリストイルホスファチジルコリン、卵由来の天然ホスファチジルコリン、卵由来の天然ホスファチジルグリセロール、コレステロールおよびミリスチン酸イソプロピルである。

## 【0287】

1つ以上の侵食促進剤と1つ以上の拡散促進剤との組合せが、本発明の組成物において使用され得る。

## 【0288】

「希釈剤」という用語は、送達前に目的の化合物を希釈するために使用される化学化合物を指す。希釈剤はまた、より安定した環境を提供することができるため、化合物の安定化にも使用することができる。緩衝液に溶解した塩（これはまた、pH制御または維持を提供することができる）は、限定されないが、リン酸緩衝食塩水を含む、当該技術分野において希釈剤として利用される。特定の実施形態では、希釈剤は、組成物のかさを増加させて、圧縮を促進するか、またはカプセル充填のための均質な混和に十分なかさを作り出す。このような化合物には、例えば、ラクトース、デンプン、マンニトール、ソルビトール、デキストロース、微結晶性セルロース、例えば、Avicel（登録商標）；リン酸二カルシウム、リン酸二カルシウム二水和物；リン酸三カルシウム、リン酸カルシウム；無水ラクトース、噴霧乾燥されたラクトース；アルファ化デンプン、圧縮性糖、例えば、Di-Pac（登録商標）（Amstar）；マンニトール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、酢酸ステアリン酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロースベースの希釈剤、製菓用糖；一塩基性硫酸カルシウム一水和物、硫酸カルシウム二水和物；乳酸カルシウム三水和物、デキストレート；加水分解された穀物固体物、アミロース；粉末セルロース、炭酸カルシウム；グリシン、カオリン；マンニトール、塩化ナトリウム；イノシトール、ベントナイトなどが含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0289】

「充填剤」には、ラクトース、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、二塩基性リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、微結晶性セルロース、セルロース粉末、デキストロース、デキストレート、デキストラン、デンプン、アルファ化デンプン、スクロース、キシリトール、ラクチトール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、ポリエチレングリコールなどの化合物が含まれる。

## 【0290】

「潤滑剤」および「滑剤」は、材料の付着または摩擦を防止、低減または阻害する化合物である。例示的な潤滑剤には、例えば、ステアリン酸、水酸化カルシウム、タルク、ステアリルフル酸ナトリウム、炭化水素、例えば、鉛油、または水素化植物油、例えば、水素化大豆油（Sterotex（登録商標））、高級脂肪酸ならびにそれらのアルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩、例えば、アルミニウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、ステアリン酸、ステアリン酸ナトリウム、グリセロール、タルク、ワックス、Stearowet（登録商標）、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ポリエチレングリコール（例えば、PEG-4000）またはメトキシポリエチレングリコール、例えば、Carbowax（商標）、オレイン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、ベヘン酸グリセリル、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸マグネシウムまたはラウリル硫酸ナトリウム、コロイドシリカ、例えば、Sylloid（商標）、Cabil-O-Sil（登録商標）、デンプン、例えば、コーンスター、シリコーンオイル、界面活性剤などが含まれる。

## 【0291】

「可塑剤」は、マイクロカプセル化材料またはフィルムコーティングを軟化させて、それらをより脆くしないようにするために使用される化合物である。適切な可塑剤には、例えば、ポリエチレングリコール、例えば、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1450、PEG3350、およびPEG800、ステアリン酸、プロピレングリコール、オレイン酸、トリエチルセルロースおよびトリアセチンが含まれる。一部の実施

形態では、可塑剤はまた、分散剤または湿潤剤として機能することができる。

【0292】

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

【0293】

10

「安定剤」は、任意の抗酸化剤、緩衝剤、酸、防腐剤などの化合物を含む。

【0294】

「懸濁剤」には、ポリビニルピロリドン、例えば、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、またはポリビニルピロリドンK30、ビニルピロリドン／酢酸ビニル共重合体(S630)、ポリエチレングリコール(例えば、ポリエチレングリコールは、約300～約6000、または約3350～約4000、または約7000～約5400の分子量を有することができる)、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、酢酸ステアリン酸ヒドロキシメチルセルロース、ポリソルベート-80、ヒドロキシエチセルロース、アルギン酸ナトリウム、ゴム、例えば、ゴムトラガカントおよびゴムアカシアゴム、グーゴム、キサンタン、例えば、キサンタンゴム、糖、セルロース系物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチセルロース、ポリソルベート-80、アルギン酸ナトリウム、モノラウリン酸ポリエトキシリ化ソルビタン、モノラウリン酸ポリエトキシリ化ソルビタン、ポビドンなどの化合物を含む。

20

【0295】

「界面活性剤」には、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクシン酸ナトリウム、Tween60または80、トリアセチン、ビタミンE TPGS、モノオレイン酸ソルビタン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ポリソルベート、ポラキソマー、胆汁酸塩、モノステアリン酸グリセリル、エチレンオキシドとプロピレンオキシドの共重合体、例えば、ブルロニック(登録商標)(BASF)などの化合物が含まれる。他のいくつかの界面活性剤には、ポリオキシエチレン脂肪酸グリセリドおよび植物油、例えば、ポリオキシエチレン(60)硬化ヒマシ油；ならびにポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびアルキルフェニルエーテル、例えば、オクトキシノール10、オクトキシノール40が含まれる。一部の実施形態では、界面活性剤は、物理的安定性を高めるために、または他の目的のために含まれ得る。

30

【0296】

「粘度増強剤」には、例えば、メチルセルロース、キサンタンゴム、カルボキシメチセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、酢酸ステアリン酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボマー、ポリビニルアルコール、アルギン酸塩、アカシア、キトサンおよびそれらの組合せが含まれる。

40

【0297】

「湿潤剤」には、オレイン酸、モノステアリン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ドクセートナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクセート(docusate)ナトリウム、トリアセチン、Tween80、ビタミンE TPGS、アンモニウム塩などの化合物が含まれる。

50

【0298】

## キット / 製品

本明細書では、特定の実施形態において、本明細書に記載される1つ以上の方法で使用するためのキットおよび製品が開示される。このようなキットには、バイアル、チューブなどの1つ以上の容器を受け入れるように区画化された担体、パッケージ、または容器を含み、各容器（複数可）は、本明細書に記載される方法で使用される別個の要素の1つを含む。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管が含まれる。一実施形態では、容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成される。

### 【0299】

本明細書で提供される製品は、包装材料を含む。医薬品包装材料の例には、限定されないが、プリスター・パック、ボトル、チューブ、バッグ、容器、ボトル、ならびに選択された製剤、および意図される投与および治療の様式に適した任意の包装材料が含まれる。

### 【0300】

例えば、容器（複数可）は、本明細書に記載されるCAR-T細胞（例えば、CD19 CAR-T細胞）を含み、任意選択で、本明細書に開示されるサイトカインおよび/または化学療法剤をさらに含む。このようなキットは、任意選択で、本明細書に記載される方法におけるその使用に関する識別説明またはラベルまたは指示を任意に含む。

### 【0301】

キットは、典型的には、内容を列挙するラベルおよび/または使用説明書、ならびに使用説明書を含む添付文書を含む。一連の説明書もまた典型的には含まれる。

### 【0302】

一部の実施形態では、ラベルは、容器上にあるか、または容器に付随する。一実施形態では、ラベルを形成する文字（letter）、数字、または他の文字（character）が容器自身に取り付けられ、成形されまたはエッチングされる場合、ラベルは容器上にあり；例えば、添付文書として容器も保持するレセプタクルまたはキャリア内に存在する場合、ラベルは容器に付随する。一実施形態では、ラベルは、内容物が特定の治療用途に使用されることを示すために使用される。ラベルは、本明細書に記載される方法などにおける内容物の使用説明書も示す。

### 【0303】

#### 配列

本明細書において提供される実施形態に含まれる特定の配列の代表的なリストを以下に提供する。

### 【0304】

10

20

30

【表1-1】

	核酸配列 配列番号	アミノ酸配列 配列番号
CD8α (ヒト)	<b>107</b>	<b>1</b>
CD8α (C164S, C181S) ヒンジ	<b>108</b>	<b>2</b>
CD8α ヒンジ(CD8α 1X スペーサー)	<b>109</b>	<b>3</b>
CD8α 2X スペーサー	<b>110</b>	<b>4</b>
CD8α 3X スペーサー	<b>111</b>	<b>5</b>
CD8α 3X V2 スペーサー	<b>112</b>	<b>6</b>
CD8α 4X スペーサー	<b>113</b>	<b>7</b>
ホイットローリンカー	<b>114</b>	<b>8</b>
GSG リンカー	<b>115</b>	<b>9</b>
SGSG リンカー	<b>116</b>	<b>10</b>
(G4S)3 リンカー	<b>117</b>	<b>11</b>
(G4S)3.CD8α ヒンジスペーサー	<b>118</b>	<b>12</b>
ホイットローリンカ一.CD8α ヒンジスペーサー	<b>119</b>	<b>13</b>
ホイットローリンカ一(2x).CD8α ヒンジスペーサー	<b>120</b>	<b>14</b>
ホイットローリンカ一.CD8α ヒンジ(2x)スペーサー	<b>121</b>	<b>15</b>
LNGFR 細胞外ドメイン(LNGFR 1X スペーサー)	<b>122</b>	<b>16</b>

【0305】

【表1-2】

LNGFR 2X スペーサー	<b>123</b>	<b>17</b>	
LNGFR Cys 2,3,4 スペーサー	<b>124</b>	<b>18</b>	
LNGFR Cys 2,3,4 2X スペーサー	<b>125</b>	<b>19</b>	10
LNGFR Cys3,4 スペーサー	<b>126</b>	<b>20</b>	
LNGFR Cys3,4 2X スペーサー	<b>127</b>	<b>21</b>	
LNGFR Cys3,4 3X スペーサー	<b>128</b>	<b>22</b>	
LNGFR Cys3,4 4X スペーサー	<b>129</b>	<b>23</b>	20
CD8α 膜貫通ドメイン	<b>130</b>	<b>24</b>	
細胞傷害性 T-リンパ球タンパク質 4 膜貫通ドメイン	<b>131</b>	<b>25</b>	
CD28 共刺激エンドドメイン	<b>132</b>	<b>26</b>	30
4-1BB (CD137)共刺激エンドドメイン	<b>133</b>	<b>27</b>	
CD3 ゼータ刺激エンドドメイン	<b>134</b>	<b>28</b>	
DNAX-活性化タンパク質 10(DAP 10)シグナル伝達ドメイン	<b>135</b>	<b>29</b>	40

【0306】

【表1-3】

DNAX-活性化タンパク質 12(DAP12)シグナル伝達 ドメイン	<b>136</b>	<b>30</b>
ヒト CD28	<b>137</b>	<b>31</b>
CD28 ヒンジ(CD28 1X スペーサー)	<b>138</b>	<b>32</b>
CD28 2X スペーサー	<b>139</b>	<b>33</b>
CD28 3X スペーサー	<b>140</b>	<b>34</b>
CD28 4X スペーサー	<b>141</b>	<b>35</b>
ヒト細胞傷害性T-リンパ球タンパク質4(CTLA-4)	<b>142</b>	<b>36</b>
CTLA-4 1X スペーサー		<b>37</b>
CTLA-4 2X スペーサー		<b>38</b>
CTLA-4 3X スペーサー		<b>39</b>
CTLA-4 4X スペーサー		<b>40</b>
ヒトIgG3 ヒンジ		<b>41</b>
ヒトIgG4 ヒンジ		<b>42</b>
ヒトIgG4 ヒンジ(S108P) (IgG4 1X スペーサー)	<b>144</b>	<b>43</b>
IgG4 2X スペーサー		<b>44</b>
IgG4 3X スペーサー		<b>45</b>
IgG4 4X スペーサー		<b>46</b>
IgG4 5X スペーサー		<b>47</b>
IgG4 6X スペーサー		<b>48</b>
ヒトIgG4 ヒンジ(S108P)- CH2-CH3 スペーサー	<b>145</b>	<b>49</b>
ヒトIgG4 ヒンジ(S108P)- CH3 スペーサー		<b>50</b>

【0307】

【表1-4】

ヒトB-リンパ球抗原 CD19		<b>51</b>	
顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体アルファシグナルペプチド	<b>146</b>	<b>52</b>	10
抗-CD19モノクロナル抗体クローンFMC63可変軽鎖	<b>147</b>	<b>53</b>	
抗-CD19モノクロナル抗体クローンFMC63可変重鎖	<b>148</b>	<b>54</b>	
ホイットローリンカーを有する抗-CD19クローンFMC63一本鎖断片可変(scFv)	<b>149</b>	<b>55</b>	20
CD8-1Xスペーサー(CD19-CD8a-CD28-CD3z)を有するCD19-特異的キメラ抗原受容体	<b>150</b>	<b>56</b>	30
CD8-2Xスペーサーを有するCD19-特異的キメラ抗原受容体	<b>151</b>	<b>57</b>	
CD8-3Xスペーサーを有するCD19-特異的キメラ抗原受容体	<b>152</b>	<b>58</b>	40
CD8-3X v2スペーサーを有するCD19-特異的キメラ抗原受容体	<b>153</b>	<b>59</b>	

【0308】

【表1-5】

CD8-4X スペーサーを有する CD19-特異的キメラ抗原受容体	<b>154</b>	<b>60</b>	
抗-CD33 モノクロナル抗体クローン hM195 可変軽鎖	<b>155</b>	<b>61</b>	10
抗-CD33 モノクロナル抗体クローン hM195 可変重鎖	<b>156</b>	<b>62</b>	
抗-CD33 モノクロナル抗体クローン hM195 scFv	<b>157</b>	<b>63</b>	
CD8α ヒンジ(CD8 1X)スペーサーを有する CD33-特異的キメラ抗原受容体	<b>158</b>	<b>64</b>	20
CD8 2X スペーサーを有する CD33-特異的キメラ抗原受容体	<b>159</b>	<b>65</b>	
CD8 3X スペーサーを有する CD33-特異的キメラ抗原受容体	<b>160</b>	<b>66</b>	30
CD8 3X V2 スペーサーを有する CD33-特異的キメラ抗原受容体	<b>161</b>	<b>67</b>	
CD8 4X スペーサーを有する CD33-特異的キメラ抗原受容体	<b>162</b>	<b>68</b>	40
ヒト T-細胞受容体アルファ(TCRα)鎖定常(C)領域	<b>163</b>	<b>69</b>	

【0309】

【表1-6】

ヒトT細胞受容体アルファ(TCRα)鎖定常(C)領域の細胞外領域	<b>164</b>	<b>70</b>	
TCRα TM ドメイン	<b>165</b>	<b>71</b>	10
<b>TCRα ヒンジ(1Xスペーサー)</b>	<b>166</b>	<b>72</b>	
TCRα (C96S)ヒンジ	<b>167</b>	<b>73</b>	
TCRα ヒンジ.(G4S)3スペーサー	<b>168</b>	<b>74</b>	
(G4S)3.TCRα ヒンジスペーサー	<b>169</b>	<b>75</b>	
ホイットローリンカースペーサー.TCRα ヒンジスペーサー	<b>170</b>	<b>76</b>	20
<b>TCRα 2X スペーサー</b>	<b>171</b>	<b>77</b>	
<b>TCRα 3X スペーサー</b>	<b>172</b>	<b>78</b>	
<b>TCRα 4X スペーサー</b>	<b>173</b>	<b>79</b>	30
<b>TCRα 2X V2 スペーサー</b>	<b>174</b>	<b>80</b>	
<b>TCRα 3X V2 スペーサー</b>	<b>175</b>	<b>81</b>	
<b>TCRα 4X V2 スペーサー</b>	<b>176</b>	<b>82</b>	
ヒトT細胞受容体ベータ-1(TCRβまたはTCRβ1)鎖定常(C)領域	<b>177</b>	<b>83</b>	
ヒトT細胞受容体ベータ-1(TCRβ1)鎖定常(C)領域の細胞外領域	<b>178</b>	<b>84</b>	40
TCRβ TM ドメイン	<b>179</b>	<b>85</b>	

【0310】

【表1-7】

TCRβ ヒンジ(1X スペーサー)	<b>180</b>	<b>86</b>
TCRβ (C131S)ヒンジ	<b>181</b>	<b>87</b>
TCRβ ヒンジ.(G4S)3 スペーサー	<b>182</b>	<b>88</b>
(G4S)3.TCRβ ヒンジスペーサー	<b>183</b>	<b>89</b>
ホイットローリンカ ー.TCRβ ヒンジスペーサー	<b>184</b>	<b>90</b>
TCRβ 2X スペーサー	<b>185</b>	<b>91</b>
TCRβ 3X スペーサー	<b>186</b>	<b>92</b>
TCRβ 4X スペーサー	<b>187</b>	<b>93</b>
TCRβ 2X V2 スペーサー	<b>188</b>	<b>94</b>
TCRβ 3X V2 スペーサー	<b>189</b>	<b>95</b>
TCRβ 4X V2 スペーサー	<b>190</b>	<b>96</b>
ヒトT細胞受容体ベータ -2(TCRβ2)鎖定常(C)領域	<b>191</b>	<b>97</b>
ヒトT細胞受容体ベータ -2(TCRβ2)鎖定常(C)領域 の細胞外領域	<b>192</b>	<b>98</b>
ヒトT細胞受容体ガンマ -1(TCRγ1)鎖定常(C)領域 1	<b>193</b>	<b>99</b>
ヒトT細胞受容体ガンマ -1(TCRγ1)鎖定常(C)領域 1 の細胞外領域	<b>194</b>	<b>100</b>
TCRγ1 膜貫通ドメイン	<b>195</b>	<b>101</b>

10

20

30

40

【0311】

【表1-8】

ヒトT細胞受容体ガンマ-2(TCRγ2)鎖定常(C)領域	<b>196</b>	<b>102</b>
ヒトT細胞受容体ガンマ-2(TCRγ2)鎖定常(C)領域の細胞外領域	<b>197</b>	<b>103</b>
ヒトT細胞受容体デルタ(TCRδ)鎖C領域	<b>198</b>	<b>104</b>
ヒトT細胞受容体デルタ(TCRδ)鎖C領域の細胞外領域	<b>199</b>	<b>105</b>
TCRδ膜貫通ドメイン	<b>200</b>	<b>106</b>
抗-EGFRvIII クローン 139 VH	<b>201</b>	<b>202</b>
抗-EGFRvIII クローン 139 VL	<b>203</b>	<b>204</b>
抗-EGFRvIII クローン MR1 VH	<b>205</b>	<b>206</b>
抗-EGFRvIII クローン MR1 VL	<b>207</b>	<b>208</b>
抗-EGFRvIII クローン MR1-1 VH	<b>209</b>	<b>210</b>
抗-EGFRvIII クローン MR1-1 VL	<b>211</b>	<b>212</b>
抗-EGFRvIII クローン humMR1-1 VH	<b>213</b>	<b>214</b>
抗-EGFRvIII クローン humMR1-1 VL	<b>215</b>	<b>216</b>
抗-EGFRvIII クローン humMR1-2 VH	<b>217</b>	<b>218</b>

10

20

30

40

【0312】

【表1-9】

抗-EGFRvIII クローン humMR1-2 VL	<b>219</b>	<b>220</b>	
抗-EGFRvIII scFv クロー ン 139	<b>221</b>	<b>222</b>	
抗-EGFRvIII scFv クロー ン MR1	<b>223</b>	<b>224</b>	10
抗 EGFRvIII scFv クロー ン MR1-1	<b>225</b>	<b>226</b>	
抗-EGFRvIII scFv クロー ン huMR1-1	<b>227</b>	<b>228</b>	
抗-EGFRvIII scFv クロー ン huMR1-2	<b>229</b>	<b>230</b>	20
EGFRvIII CAR(クローン 139 scFv.CD8 アルファヒ ンジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>231</b>	<b>232</b>	
EGFRvIII CAR (MR1 scFv.CD8 アルファヒンジ &TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>233</b>	<b>234</b>	30
EGFRvIII CAR (MR1-1 scFv.CD8 アルファヒンジ &TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>235</b>	<b>236</b>	
EGFRvIII CAR (humMR1- 1 scFv.CD8 アルファヒン ジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>237</b>	<b>238</b>	
EGFRvIII CAR (humMR1- 2 scFv.CD8 アルファヒン ジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>239</b>	<b>240</b>	40

【0313】

## 【表 1 - 1 0】

EGFRvIII CAR (MR1-1 scFv.CD8 アルファ 2x ヒ ンジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>241</b>	<b>242</b>
EGFRvIII CAR (MR1-1 scFv.CD8 アルファ 3x ヒ ンジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>243</b>	<b>244</b>
EGFRvIII CAR (MR1-1 scFv.CD8 アルファ 4x ヒ ンジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>245</b>	<b>246</b>
EGFRvIII CAR (huMR1-1 scFv.CD8 アルファ 3x ヒ ンジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>247</b>	<b>248</b>
EGFRvIII CAR (huMR1-1 scFv.CD8 アルファ 4x ヒ ンジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>249</b>	<b>250</b>
EGFRvIII CAR (huMR1-2 scFv.CD8 アルファ 3x ヒ ンジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>251</b>	<b>252</b>
EGFRvIII CAR (huMR1-2 scFv.CD8 アルファ 4x ヒ ンジ&TM.4-1BB.CD3 $\zeta$ )	<b>253</b>	<b>254</b>

## 【実施例】

## 【0314】

これらの実施例は、例示の目的でのみ提供され、本明細書に提供される特許請求の範囲を限定するものではない。

## 【0315】

## [実施例1]

様々な長さのCD8由来のスペーサーを有するキメラ抗原受容体

ストーク領域およびストーク伸長領域を含むスペーサーを組み込んだキメラ抗原受容体(複数可)を生成した。ストーク領域は、CD8ヒンジ領域の配列(配列番号3)を含み、およびストーク伸長領域(複数可)は、1、2、または3つの領域を含んだ。各ストーク伸長領域は、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基(表1における太字の残基)がセリン(表1における下線の付いた残基)に変換された、変更されたCD8ヒンジ領域配列(配列番号2)を含んだ。図2に記述される2X、3X、および4Xバージョンでは、CD8ヒンジ配列を含むストーク領域は、ジスルフィド結合を形成するシステイ

10

20

30

40

50

ンを保持した。このストーク領域は、システインを欠く改変領域の下流であった。2番目のバージョンの3Xストーク(3X v2)を生成し、ジスルフィド結合を形成するシステインを保持するストーク伸長領域は、ストーク領域およびストーク伸長領域の上流にあり、どちらの領域にもシステインを欠いていた。生成された1X、2X、3X、4X、および3X v2のストークのアミノ酸配列を表1に列挙する。

【0316】

【表2】

表1

CD8αスペーサーの用語	CD8αの説明	アミノ酸配列 配列番号
1X	ストークのみ	3
2X	ストークおよび1つのストーク伸長領域;s'-1	4
3X	ストークおよび2つのストーク伸長領域;s'-2	5
4X	ストークおよび3つのストーク伸長領域;s'-3	7
3X v2	ストークおよび2つのストーク伸長領域;s'-2	6

10

20

30

40

【0317】

【実施例2】

様々な長さのCD8由来スペーサーを有するCD19-CAR-T細胞を生成するためのSBシステムによるPBM Cのヌクレオフェクション(nucleofection)

スペーサー長が変化するCD19特異的CARを発現するためのDNAプラスミドをSBトランスポゾンベクターにクローニングした。SBトランスポゾンは、T細胞の特異性を再方向付けするために、ヌクレオフェクションを介して末梢血単核細胞(PBMC)にトランスフェクトされた。

50

## 【0318】

0日目に、2000万個のPBM Cは、計 $15\mu g$ のトランスポゾンおよび $5\mu g$ のトランスポザーゼ(SB11)と混合してエレクトロポレーションした $100\mu L$ のAma x a Human T細胞Nucleofector溶液(Lonza、Basel、Switzerland)に再懸濁された。

## 【0319】

翌日(1日目)の細胞をカウントし、CAR発現をフローサイトメトリーで測定した。CAR-T細胞は、線照射( $100\text{Gy}$ )またはマイトイシンCで処理したAAPECを1:1の比で刺激した。使用したAAPEC細胞は、CD19抗原を発現するK562-AAPECであった。培養物には、刺激の初回でのみIL-21( $30\text{ng}/\text{ml}$ )を補足し、その後、残りの刺激のために組換えヒトIL-2( $50\text{IU}/\text{ml}$ )およびIL-21( $30\text{ng}/\text{ml}$ )(Protech)を補足した。CAR-T細胞培養物は、典型的には、7日間続けた各刺激サイクルの終わりに表現型分類された。培養物は、プロテインL、またはCD19特異的CARを認識する抗イディオタイプ抗体のいずれかを利用してマルチパラメーターフローサイトメトリーにより、CAR発現の表現型を決定された。培養物はまたNK細胞(CD3<sup>neg</sup>CD56<sup>+</sup>集団として定義される)の成長について綿密に監視され、製造元の指示に従って、CD56に特異的な磁気ビーズ(Stem Cell Technologiesおよび/またはMiltenyi Biotech)を使用して、割合が全細胞集団の10%を超えた場合にCAR-T細胞培養物から削除された。

10

20

30

40

## 【0320】

## [実施例3]

様々な長さのCD8由来のスペーサーを有するCD19特異的CARの発現

表1に列挙される、CD19特異的な抗原結合領域およびCD8由来のスペーサーを有するCARを発現するT細胞を生成した。

## 【0321】

様々なスペーサー長のCD19特異的CARの発現レベルは、実施例2に記載されるように、AAPECとの共培養による刺激を連続回行った後に決定された。CAR発現レベルは、フローサイトメトリーにより決定された。フローサイトメトリー実験では、細胞を穏やかに再懸濁し、Countess機器でトリパンブルー排除法を使用して細胞数および生存率を測定した。各試料の $5 \times 10^5$ 細胞を $330 \times g$ で4分間回収した。回収された細胞を氷上でHBSS中の10%ヒトAB血清とともに少なくとも15分間インキュベートした。蛍光結合抗体を含む抗体カクテルには、HBSS+0.1%BSA+2mM EDTA中のCD4(クローンRPA-T4)、CD8(クローンSK1)、CD3(クローンUCHT1)、CD56、およびCD19特異的CAR(抗イディオタイプ抗体)に特異的な1つ以上の抗体が含まれる。調製した抗体カクテルおよび関連する蛍光マイナス1つの/アイソタイプ対照を加えて、細胞試料を染色し、次に、試料を氷上で30分間インキュベートした。次に、試料をFACS緩衝液(HBSS+0.5%BSA+2mM EDTA)で洗浄し、Fixable Viability Dye(eBiosciences)を用いて氷上で30分間染色した。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、次に、4%パラホルムアルデヒド溶液(BD Cytofix; BD Biosciences)で固定した。すべての試料をLSR IIフローサイトメーター、Fortessa X-20フローサイトメーター(BD Biosciences)またはiQue Screener Plus(Intellicyt)で作動し、FlowJo V10(TreeStar、Ashland、OR)またはiQue Screenerソフトウェアを使用してデータを分析した。2つの例示的な実験からのデータを表2にまとめる。エクスピボ拡大からのT細胞カウントもまた追跡し、対応するデータを図3に記述する。

## 【0322】

表2に示されるように、スペーサーがストーク領域のみを含む場合(CD8-1X)と比較して、スペーサーがストーク伸長領域を含む場合(CD8-2X、CD8-3Xおよ

50

び C D 8 - 4 X )、同等の可溶性蛍光色素の分子 (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome) (M E S F ) および C A R を発現する T 細胞の % によって測定すると、改善された C D 1 9 特異的 C A R 発現が観察された。図 3 に示されるように、様々な長さのスペーサーを有する C D 1 9 - C A R - T 細胞の同様のレベルの拡大が観察された。C D 8 - 3 X v 2 スペーサーを有する C D 1 9 - C A R - T 細胞は、細胞表面上で C A R を発現することができず、A a P C との共培養時にエクスピボで拡大することができなかった。C D 8 - 3 X と C D 8 - 3 X v 2 スペーサー間の違いは、鎖間ジスルフィド結合を破壊するアミノ酸置換の位置である。このデータは、様々な長さのスペーサーを使用する場合、二量体化部位のアミノ酸置換の配置がタンパク質の発現に重要であることを示唆する。

10

### 【 0 3 2 3 】

別の健康なドナーの P B M C に由来するヒト T 細胞において、ストーク伸長領域を有する (C D 8 - 3 X ) またはストーク伸長領域を有しない (C D 8 - 1 X ) C D 1 9 特異的 C A R の発現を比較した。C D 1 9 特異的 C A R は、S B システムを使用して導入され、C D 1 9 - C A R - T 細胞は、実施例 2 に記載されるように、エクスピボで 2 8 日間、A a P C と共に培養することにより増殖誘導された。T 細胞は、ヌクレオフェクション後の 1 、 1 4 、 2 1 および 2 8 日目にフローサイトメトリーにより分析され、C D 1 9 特異的 C A R の発現を測定した。図 3 B は、C D 1 9 特異的 C A R に陽性であった培養中の T 細胞の % を捕捉し、図 3 B は、C D 1 9 特異的 C A R の生の平均蛍光強度 (M F I ) を捕捉する。図 3 B に示されているデータは、このドナーの C A R - T 細胞のエクスピボ拡大期を通じて、T 細胞の同様の割合が C D 1 9 特異的 C A R 発現を示したことを示す。しかしながら、M F I は、ストーク伸長領域なしの場合 (C D 8 - 1 X ) と比較して、ストーク伸長領域 (C D 8 - 3 X ) を有する C D 1 9 特異的 C A R の場合に有意に高く、これは、ストーク伸長領域を利用したときに C A R の発現レベルが改善されたことを意味した。

20

### 【 0 3 2 4 】

様々な長さのスペーサーを有する C D 1 9 特異的 C A R の発現もまた、ウエスタンプロット分析を介して確認された (図 4) 。

### 【 0 3 2 5 】

様々なスペーサー長の C D 1 9 特異的 C A R を発現させるために、P B M C を S l e e p i n g B e a u t y システムのプラスミドでヌクレオフェクトした。ヌクレオフェクトされた細胞は、実施例 2 に記載されるように、A a P C の存在下で培養された。

30

### 【 0 3 2 6 】

4 回の刺激後、細胞溶解物をウエスタンプロット分析のために調製した。N u P A G E 1 0 % B i s - T r i s ゲルの約 1 0  $\mu$  g 溶解物 / レーンをロードした。タンパク質は、i B l o t (登録商標) (L i f e T e c h n o l o g i e s ) セミドライ転写装置を使用して、ゲルからポリフッ化ビニリデン (P V D F ) 膜に転写された。膜は、P B S + Tween - 2 0 (P B S T ; 1 × P B S + 0 . 0 5 % Tween - 2 0 ) 溶液中の 5 % (w / v) 粉乳溶液を使用してブロックされ、ヤギ抗ヒト C D 3 一次抗体およびウサギ抗ヤギ I g G H R P (K P L L a b o r a t o r i e s ) 二次抗体で染色された。増強された化学発光 (E C L ) 検出用の Super S i g n a l (商標) W e s t P i c o 化学発光基質 (Thermo Fisher S c i e n t i f i c ) を使用した。

40

### 【 0 3 2 7 】

ウエスタンプロットの画像は、D i g i t a l D a r k r o o m ソフトウェアおよび A l p h a V i e w (登録商標) ソフトウェア (P r o t e i n S i m p l e ) を使用して、F l u o r C h e m (商標) E イメージャー (P r o t e i n S i m p l e , S a n J o s e , C A ) システムで捕捉された。図 4 は、ウエスタンプロットの画像を示す。図 4 の矢印で示すように、ストーク伸長領域からのスペーサー長の増加に対応する抗 C D 3 抗体によって、ますますより高分子量のバンドが検出された。予期される分子量のネイティブ C D 3 バンドもまた検出された。

### 【 0 3 2 8 】

50

【表3】

表2

	1日目		7日目		14日目		21日目		28日目	
CD19 CAR	% CAR	MESF	% CAR	MESF	% CAR	MESF	% CAR	MESF	% CAR	MESF
CD8-1X	42.00	28845	39.90	34068	51.30	20984	77.80	21118	86.00	33611
CD8-2X	6.63	14595	76.90	178206	90.10	69583	93.90	69875	97.50	94415
CD8-3X	12.50	10846	60.60	145928	86.30	44231	91.30	54830	97.20	87394
CD8-4X	6.98	7319	63.50	158301	87.00	31716	91.00	45239	97.20	57106
CD8-3X V2	0.17	123	0.41	236	1.16	460				

【0329】

## [実施例4]

長さの異なるCD8由来スペーサーを用いたCD19-CAR-T細胞の細胞毒性 CD19抗原(K562/CD19)を発現するように修飾されたK562細胞株に対する様々な長さのCD8由来スペーサーを有するCD19-CAR-T細胞の細胞毒性を、2時間のユーロピウム放出アッセイにおいて測定された。K562/CD19標的細胞株は、DELFIA BATDA試薬(DELFIA EutDA細胞毒性アッセイ; Perkin Elmer)を使用して標識された。CD19-CAR-Tエフェクター(E)細胞は、標識されたK562/CD19標的(T)細胞と10:1、5:1、2:2または1:1の(E:T)比で共培養された。2時間後、共培養からの上清を回収し、DELFIAユーロピウムアッセイを追加して発色させ、時間分解蛍光装置で読み取って、標的細胞の細胞毒性を測定した。例示的な実験の結果を図5Aに記述する。

【0330】

図5Aに示されるように、様々な長さのスペーサーを有するCD19-CAR-T細胞は、K562/CD19標的細胞の用量依存的な細胞毒性を示した。ストーク伸長領域(複数可)を有するCD8由来スペーサー(CD8-2X、CD8-3XおよびCD8-4X)を有するCD19-CAR-T細胞は、伸長されたストーク領域を欠く(CD8-1X)CD19-CAR-T細胞と比較して、K562/CD19細胞の類似したまたは改善した細胞毒性を示した。より長いCD8由来スペーサー(CD8-2X、CD8-3XおよびCD8-4X)を有するCD19-CAR-T細胞によって発揮される細胞毒性は、特により低いE:T比(2:1および1:1)で改善され、ストーク伸長領域を欠く(CD8-1X)CAR-T細胞と比較した、これらのCAR-T細胞の効力の増加を示唆する。

【0331】

さらに、様々な長さのスペーサーを有するCD19-CAR-T細胞の特異性は、K562/CD19細胞株、ならびに親K562(CD19<sup>neg</sup>)およびCD19<sup>neg</sup>EL4細胞株との共培養アッセイにより実証された。すべての標的細胞株は、DELFIA BATDA試薬(DELFIA EutDA細胞毒性アッセイ; Perkin Elmer)を使用して標識された。CD19-CAR-Tエフェクター(E)細胞は、CD19<sup>+</sup>またはCD19<sup>neg</sup>標識された標的(T)細胞と10:1の(E:T)比で共培養された。2時間後、共培養物の上清を回収し、DELFIAユーロピウムアッセイを添加して発色させ、時間分解蛍光測定装置で読み取って、標的細胞の細胞毒性を測定した。アッセイの結果を図5Bに示す。

【0332】

図5Bに示されるように、CD8-1Xスペーサーを有するCD19-CAR-T細胞

10

20

30

40

50

と比較して、K 5 6 2 / C D 1 9 細胞株の同様の（C D 8 - 2 X およびC D 8 - 3 X）または幾分低い（C D 8 - 4 X）細胞毒性が、スペーサーが伸長されたC D 1 9 - C A R - T 細胞によって観察された。しかしながら、C D 8 - 1 X スペーサーを有するC D 1 9 - C A R - T 細胞は、このアッセイにおいてC D 1 9<sup>n e g</sup> 親K 5 6 2 細胞株の非特異的な細胞毒性を示した。一方、ストーク伸長領域を有するC D 1 9 - C A R - T 細胞は、C D 1 9<sup>n e g</sup> 親K 5 6 2 細胞株の非特異的な細胞毒性を示さなかった。これは、伸長されたスペーサーを有するC D 1 9 - C A R - T 細胞で観察されたK 5 6 2 / C D 1 9 細胞の細胞毒性がわずかに低いことを説明している可能性がある。重要なことに、伸長されたスペーサーを有するC D 1 9 - C A R - T 細胞は、より高いC D 1 9 標的特異性を示した。

## 【0333】

要約すると、図5は、特により低いE : T比でのC D 1 9<sup>+</sup> 標的細胞株の細胞毒性の改善、ならびにC D 1 9 抗原に対する特異性の改善により示されるように、ストーク伸長領域を欠くC D 1 9 - C A R - T 細胞と比較して、ストーク伸長領域を有するC D 1 9 - C A R - T 細胞が優れた機能性を示したことを示す。

## 【0334】

## [実施例5]

C D 1 9 抗原を発現する細胞に応答するC D 1 9 - C A R - T 細胞による特異的サイトカイン生成

サイトカイン生成は、C D 1 9<sup>+</sup> またはC D 1 9<sup>n e g</sup> 腫瘍細胞へのC D 8 由来スペーサー長を変化させたC D 1 9 - C A R - T 細胞の共培養後に測定された。簡単に述べれば、C D 8 由来スペーサーが異なるC D 1 9 - C A R - T 細胞は、K 5 6 2 / C D 1 9 (C D 1 9<sup>+</sup>) またはK 5 6 2 (C D 1 9<sup>n e g</sup>) またはE L 4 (C D 1 9<sup>n e g</sup>) 細胞株と10 : 1のE : T比で一晩共培養された。Q B e a d s (登録商標) (I n t e l i c y t) を使用して、多重サイトカイン分析のために培養上清を回収した。多重分析は、回収された培養培地中に存在するヒトI F N 、I L - 2 およびT N F の発現について行われた。例示的な実験のデータを図6A ~ 6Cに示す。

## 【0335】

C D 8 ヒンジストーク領域のみを含むC D 1 9 特異的C A R と比較して、C D 1 9 特異的C A R がC D 8 由来ストーク伸長領域を含む場合、K 5 6 2 / C D 1 9 細胞株との共培養後に有意に高いレベルのI F N 、I L - 2 およびT N F サイトカインが検出された。C D 1 9<sup>n e g</sup> 細胞株がサイトカイン応答を誘導できなかつたため、試験されたすべてのC D 1 9 - C A R - T 細胞のサイトカイン応答の上昇は、K 5 6 2 / C D 1 9 細胞株の表面上に存在するC D 1 9 抗原に特異的に応答した。プロットされた値は、二重にして試験された試料の平均±S Dを表す。

## 【0336】

要約すると、図6は、ストーク伸長領域を有するC D 1 9 - C A R - T 細胞が、C D 1 9 を発現する腫瘍細胞に応答してストーク伸長領域を欠くC D 1 9 - C A R - T 細胞と比較して優れたサイトカイン分泌を示したことを示す。

## 【0337】

## [実施例6]

様々な長さのC D 8 由来のスペーサーを有するC D 3 3 - C A R - T 細胞の特徴付け  
表1に列挙されたC D 3 3 特異的な抗原結合領域およびC D 8 由来スペーサーを有するC A R を発現するT 細胞をS B システムによって生成した。

## 【0338】

簡単に述べれば、C D 3 3 特異的C A R ベクターは、トランスポゾンのゲノム組み込みを媒介するためにS l e e p i n g B e a u t y ベースのトランスポゾンシステムを使用して、エレクトロポレーションを介してP B M C に導入された。0日目に、2,000万個のP B M C を100 μLのA m a x a ヒトT 細胞N u c l e o f e c t o r 液（カタログ番号V P A - 1 0 0 2 ; L o n z a 、B a s e l 、S w i t z e r l a n d ）に懸濁し、15 μgのC A R トランスポゾンおよび5 μgのS B トランスポザーゼと混合し、

10

20

30

40

50

エレクトロボレーションした。翌日(1日目)の細胞数および生存率を測定し、続いて、フローサイトメトリーでCARの発現を定量化した。CAR-T細胞は、線照射(100Gy)またはマイトイシンCで処理したAaPCを1:1の比で刺激した。使用したAaPC細胞は、CD33抗原を発現するK562細胞株であった。CD33-CAR-T細胞は、AaPCを1:1の比で週1回刺激することにより、エクスピボで拡大された。培養物をIL-2(50IU/ml)および/またはIL-21(30ng/ml)で維持した。CD33特異的CAR発現は、マルチパラメーターフローサイトメトリーによって検出された組換えCD33/Fcタンパク質染色を使用して測定された。

#### 【0339】

2人の健康なドナー由来のT細胞からのスペーサー長が変化するCD33特異的CARの発現レベルは、表3および図9に要約される。

#### 【0340】

表3に示すように、スペーサーがCD8ストーク領域のみを含む場合(CD8-1X)と比較して、スペーサーがCD8由来のストーク伸長領域を含む場合(CD8-3X)、CARを発現するT細胞の%によって測定すると、改善されたCD33特異的CAR発現が遺伝子移入後に観察された。CD19CAR-T細胞で観察されたように、CD8-3X v2スペーサーを有するCD33-CAR-T細胞は、T細胞表面上での有意なCAR発現を示すことができず、AaPCとの共培養で拡大することができなかった。CD8-3XとCD8-3X v2スペーサーの違いは、鎖間ジスルフィド結合を破壊するアミノ酸置換の位置である。このデータは、アミノ酸置換の配置が、様々な長さのスペーサーを使用したタンパク質の発現に重要であることを示唆する。

#### 【0341】

#### 【表4】

表3

	ドナー #1	ドナー #2
CD33 CAR スペーサー長さ	% CD3 <sup>+</sup> CAR <sup>+</sup>	% CD3 <sup>+</sup> CAR <sup>+</sup>
CD8-1X	50.4	74.3
CD8-2X	29.3	82.9
CD8-3X	63.5	80.0
CD8-4X	63.6	80.7
CD8-3X V2	19.5	9.03

#### [実施例7]

##### 様々な長さのスペーサーを有するROR-1CAR-T細胞の特徴付け

ROR-1特異的抗原結合領域および表1に列挙されるCD8由来スペーサー、ならびにLNGFR ECDスペーサー(表4)を有するCARを発現するT細胞は、実施例2で説明される方法を使用するSBシステムを用いて生成された。

#### 【0342】

様々なストーク長を有するROR-1CARの発現レベルは、実施例6において説明されたものと同様の方法を使用して、ROR-1-Fc融合タンパク質で染色することによるフローサイトメトリーを使用して決定された。2つの異なる健常なドナー細胞からのデータを図7A~Bに記述する。図7Aおよび7Bに示されるように、ストーク伸長領域を有しない(CD8-1X)ROR-1CARは、T細胞の表面上で発現させることができなかった。ストーク伸長領域を有しない(CD8-1X)ROR-1CARはまた、エクスピボ培養で拡大させることができなかった(データを示さず)。ストーク伸長領域(CD8-2X、CD8-3XおよびCD8-4X)を有するROR-1CARは、細胞表面上で高レベルのCAR発現を示した。要約すると、ROR-1CARは、T細

10

20

30

40

50

胞表面上での C A R の発現を可能にするためにストーク伸長領域（複数可）を必要とする。

#### 【 0 3 4 3 】

実施例 2 で説明される方法を使用する S B システムを用いて、表 1 に列挙される C D 8 由来のストークおよび C D 2 8 - C D 3 ゼータ共刺激ドメインを有する、 R O R - 1 特異的な抗原結合領域を有する C A R を発現する T 細胞を生成した。これらの C A R - T 細胞は、 R O R - 1 を発現する腫瘍細胞に対するそれらの機能的活性について評価された。

#### 【 0 3 4 4 】

リソソーム関連膜タンパク質 - 1 ( L A M P - 1 ) としても公知である C D 1 0 7 a は、細胞の後期エンドソーム - リソソームで構成的に発現されるが、脱顆粒細胞の細胞表面上で一時的に発現される。脱顆粒アッセイは、 C D 8 - 3 X スペーサーを有する R O R - 1 C A R - T 細胞が、細胞ごとを基準に、同時に細胞内 I F N 検出を伴う、 R O R - 1 発現の有無にかかわらず標的細胞を認識する能力を評価するために確立された。 R O R - 1 C A R - T 細胞を 1 0 : 1 の E : T 比で標的細胞と共に培養した。標的細胞には、 E L 4 ( R O R - 1 <sup>neg</sup> ) 、 E L 4 - R O R - 1 ( R O R - 1 <sup>+</sup> ) が含まれた。共培養の開始時に、蛍光を結合させた C D 1 0 7 a またはアイソタイプ抗体を輸送阻害剤カクテル（モネンシンおよびブレフェルディンを含む、 1 X ; e B i o s c i e n c e ）とともに添加し、 3 7 ℃ で 4 時間インキュベートした。インキュベーション期間の最後に、細胞をプレート中でペレット化し、 C A R 発現および T 細胞マーカーを検出するために細胞表面抗原を染色した。細胞表面染色後、製造元の指示に従って、細胞を F i x a b l e C e 1 1 生存率色素 ( e B i o s c i e n c e ) で染色し、次に、洗浄した後、 F i x / P e r m 溶液 ( B D B i o s c i e n c e s ) で固定した。試料を固定した後、細胞を P e r m / W a s h 溶液 ( B D B i o s c i e n c e s ) で洗浄し、次に、蛍光を結合させた抗ヒト I F N 抗体で細胞内染色した。試料を洗浄し、次に、適切な染色バッファーに再懸濁し、データは、 L S R I I フローサイトメーター ( B D B i o s c i e n c e s ) で取得した。例示的な実験のデータを図 8 A ~ 8 B に記述する。 C D 8 - 3 X スペーサーを有する R O R - 1 C A R - T 細胞は、抗原特異的脱顆粒および I F N 発現を示した。

#### 【 0 3 4 5 】

#### [ 実施例 8 ]

様々な長さの L N G F R 由来のスペーサーを有するキメラ抗原受容体ストーク領域およびストーク伸長領域を含むキメラ抗原受容体を生成した。表 4 に示されるように、スペーサー領域は、 L N G F R E C D ( 配列番号 1 7 ) 、 L N G F R C y s 2 、 3 、 4 ( 配列番号 1 8 ) または C y s 3 、 4 ( 配列番号 1 9 ) の配列を含んだ。

#### 【 0 3 4 6 】

#### 【 表 5 】

表 4

LNGFR スペーサー	アミノ酸配列
	配列番号:
ECD	16
Cys 2, 3, 4	18
Cys 3,4	20

#### 【 0 3 4 7 】

#### [ 実施例 9 ]

様々な長さの C D 2 8 由来のスペーサーを有するキメラ抗原受容体

10

20

30

40

50

ストーク領域およびストーク伸長領域を含むキメラ抗原受容体を生成した。ストーク領域は、C D 2 8 ヒンジ領域の配列（配列番号 3 2）、およびストーク伸長領域（ $s' - n$ ）（ $n = 1, 2$ 、または 3 である）を含み、各ストーク伸長領域は、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基（表 5 における太字の残基）がセリン（表 5 における下線の付いた残基）に変換された、変更された C D 2 8 ヒンジ領域を含んだ。2 X（配列番号 3 3）、3 X（配列番号 3 4）、および 4 X（配列番号 3 5）バージョンでは、ジスルフィド結合を形成するシステインを保持する C D 2 8 ヒンジ領域は、システインを欠く変更された領域の下流であった。（ $s' - n$ ）（ $n = 0, 1, 2$ 、および 3 である）を含む、生成された C D 2 8 由来の 1 X、2 X、3 X、および 4 X のストークは、それぞれ表 5 に列挙される。

10

【 0 3 4 8 】

【表 6】

表 5

CD28 スペーサー	アミノ酸配列 配列番号:
1X	32
2X	33
3X	34
4X	35

20

【 0 3 4 9 】

[実施例 1 0 ]

様々な長さの C T L A - 4 由来のスペーサーを有するキメラ抗原受容体

ストーク領域およびストーク伸長領域を含むキメラ抗原受容体を生成した。ストーク領域は、C T L A - 4 ヒンジ領域（配列番号 3 7）の配列、およびストーク伸長領域（ $s' - n$ ）（ $n = 1, 2$ 、または 3 である）を含み、各ストーク伸長領域は、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基（表 6 における太字の残基）がセリン（表 6 における下線の付いた残基）に変換された、変更された C T L A - 4 ヒンジ領域を含んだ。2 X（配列番号 3 8）、3 X（配列番号 3 9）、および 4 X（配列番号 4 0）バージョンでは、ジスルフィド結合を形成するシステインを保持する C T L A - 4 ヒンジ領域は、システインを欠く変更された領域の下流であった。（ $s' - n$ ）（それぞれ  $n = 0, 1, 2$ 、および 3 である）を含む、生成された C T L A - 4 - 由来の 1 X、2 X、3 X、および 4 X ストークは、それぞれ表 6 に列挙される。

30

【 0 3 5 0 】

【表7】

表6

CTLA-4 スペーサー	アミノ酸配列 配列番号:
1X	37
2X	38
3X	39
4X	40

10

## [実施例10]

様々な長さのTCR および TCR ヒンジドメイン由来のスペーサーを有するT細胞受容体（TCR）

## 【0351】

ストーク領域およびストーク伸長領域を含むT細胞受容体（TCR） および 鎖を生成した。TCR 鎖のストーク領域は、TCR ヒンジ領域（配列番号72）の配列、およびストーク伸長領域（s' - n）（n = 1、2、または3である）を含み、各ストーク伸長領域は、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基（表7における太字の残基）がセリン（表7における下線の付いた残基）に変換された変更されたTCR ヒンジ領域を含んだ。表7に示される2X（配列番号77）、3X（配列番号78）、および4X（配列番号79）バージョンでは、ジスルフィド結合を形成するシステインを保持するTCR ヒンジ領域は、システインを欠く変更された領域の下流（C末端）にあった。（s' - n）（それぞれn = 0、1、2、および3である）を含む、生成されたTCR ヒンジ領域由来の1X、2X、3X、および4Xのストークは、表7に列挙される。

20

## 【0352】

## 【表8】

30

表7

TCRa スペーサー	アミノ酸配列 配列番号:
1X	72
2X	77
3X	78
4X	79

40

## 【0353】

TCR 鎖のストーク領域は、TCR ヒンジ領域（配列番号86）の配列、およびストーク伸長領域（s' - n）（n = 1、2、または3である）を含み、各ストーク伸長領域は、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基（表8における太字の残基）がセリン（表8における下線の付いた残基）に変換された、変更されたTCR ヒンジ領域を含んだ（配列番号87）。表8に示される2X（配列番号91）、3X（配列番号92）、および4X（配列番号93）バージョンでは、ジスルフィド結合を形成するシステインを保持するTCR ヒンジ領域は、システインを欠く変更された領域の下流（C末端）であった。生成されたTCR ヒンジ領域に由来する、（s' - n）（それぞれn = 0、1、2

50

、および3である)を含む1X、2X、3X、および4Xのストークは、表8に列挙される。

#### 【0354】

#### 【表9】

表8

TCRβ スペーサー	アミノ酸配列 配列番号	
1X	86	10
2X	91	
3X	92	
4X	93	

#### 【0355】

#### [実施例11]

様々な長さのCD8由来のスペーサーを有するEGFRvIII特異的CARの発現  
表1に列挙される、EGFRvIII特異的な抗原結合領域(MR1-1およびhMR1-1)およびCD8由来のスペーサーを有するCARを発現するT細胞をSBシステムによって生成した。

#### 【0356】

簡単に述べれば、EGFRvIII特異的CARベクターは、トランスポゾンのゲノム組み込みを媒介するために、Sleeping Beautyベースのトランスポゾンシステムを使用して、エレクトロポレーションを介して導入された。0日目に、PBM Cは、CARトランスポゾンおよびSBトランスポザーゼと混合され、エレクトロポレーションされた。翌日(1日目)、細胞数および生存率を測定し、続いて、フローサイトメトリーでCARの発現を定量化した。CAR-T細胞は、線照射またはマイトイシンC処理されたAaPCとの共培養により刺激された。使用されたAaPC細胞は、EGFRvIII抗原を発現するK562細胞株であった。EGFRvIII-CAR-T細胞は、AaPCで週1回刺激することによってエクスピボで拡大された。培養物は、IL-2(および/またはIL-21)が補足された培地内で維持された。EGFRvIII特異的CAR発現は、マルチパラメーターフローサイトメトリーで検出した場合、組換えEGFRvIII/Fcタンパク質染色を使用して測定された。

#### 【0357】

2人の健康なドナー由来のT細胞からの異なるスペーサー長を有するEGFRvIII特異的CARの発現レベルは、図11A~Bに要約される。スクレオフェクションの1日後、異なるCD8スペーサー長のEGFRvIII特異的CARの同様のレベルが、MR1-1またはhMR1-1ベースのCARを使用して観察された(図11A)。しかしながら、より長いCD8スペーサー長(3Xおよび4X)を有するEGFRvIII特異的CARを発現するCAR-T細胞のみが、AaPC共培養を使用してEGFRvIII抗原特異的刺激によって濃縮することができ(図11B)、AaPCの表面上でEGFRvIII抗原との相互作用にとってより長いスペーサーが重要であることを示した。

#### 【0358】

#### [実施例12]

様々な長さのCD8由来のスペーサーを含むEGFRvIII特異的CARの拡大  
CAR-T細胞は、CARが認識する抗原を発現する腫瘍細胞の認識時に、注射後にインビボでの拡大を受ける。CAR-T細胞のインビボでの拡大は、抗腫瘍活性にとって非常に重要である。抗原特異的細胞株、例えば、AaPCとの共培養によるエクスピボ拡大

10

20

30

40

50

は、腫瘍細胞が存在しない場合のCAR-T細胞の増殖を刺激する。CAR-T細胞のエクスピボ拡大は、患者の治療のために十分なCAR<sup>+</sup>T細胞を得るために、製造中にしばしば行われる。

#### 【0359】

EGFRvII特異的CAR-T細胞は、実施例11に記載されるように、SB由来のトランスポゾン/トランスポザーゼによる遺伝子移入後、EGFRvII抗原を発現するAaPC細胞株との共培養を使用する繰り返しの刺激により、インビトロで拡大された。EGFRvII特異的CAR<sup>+</sup>T細胞の総数および各AaPC刺激後のエクスピボ培養におけるそれらの拡大倍数を測定した。図11Cに示されるように、より長いCD8

スペーサー長(3Xおよび4X)を有するEGFRvII特異的CARを発現するCAR-T細胞は、4つのAaPC刺激後に強力な拡大を示した。しかしながら、1XCD8スペーサーを有するEGFRvII特異的CARを発現するCAR-T細胞は、拡大することができなかった。より長いCD8スペーサー長(3Xおよび4X)を有するCAR-T細胞の強力な拡大はさらに明白であり、4つのAaPC刺激で200倍を超えて拡大する(図11D)。

#### 【0360】

##### [実施例13]

様々な長さのスペーサーによるEGFRvII特異的CAR-T細胞の細胞毒性

EGFRvII抗原を発現するように修飾されたK562細胞株に対する様々な長さのCD8由来スペーサーを有するh u M R 1 - 1 EGFRvII特異的CAR-T細胞(K562-EGFRvII)の細胞毒性を2時間のユーロピウム放出アッセイにおいて測定した。EGFRvIIを発現しないK562親細胞株を対照として使用した。K562およびK562-EGFRvII標的細胞株は、DELFIA BATDA試薬を使用して標識された。EGFRvII特異的CAR-Tエフェクター(E)細胞は、標識されたK562-EGFRvII標的(T)細胞と10:1、5:1または1:1(E:T)比で共培養された。2時間後、共培養物の上清を回収し、DELFIAユーロピウムアッセイを追加して、発色させ、時間分解蛍光測定装置で読み取り、標的細胞の細胞毒性を測定した。例示的な実験の結果を図11Eに記述する。

#### 【0361】

図11Eに示されるように、様々な長さのスペーサーを有するEGFRvII特異的CAR-T細胞は、K562-EGFRvII標的細胞の用量依存的な細胞毒性を示した。存在するエフェクター細胞の濃度が高いためである可能性がある最大の10:1のE:T比を除いて、EGFRvIIを発現しないK562細胞の非常に低いバックグラウンド細胞毒性が観察された。ストーク伸長領域を有するCD8由来のスペーサー(CD8-3XおよびCD8-4X)を有するEGFRvII特異的CAR-T細胞は、伸長されたストーク領域を欠く(CD8-1X)EGFRvII特異的CAR-T細胞と比較してK562-EGFRvII細胞の細胞毒性の改善を示した。より長いCD8由来のスペーサー(CD8-3XおよびCD8-4X)を有するEGFRvII特異的CAR-T細胞によって発揮される細胞毒性は、特に、より低いE:T比(5:1および1:1)で改善され、これは、ストーク伸長領域を欠く(CD8-1X)CAR-T細胞と比較した、これらのCAR-T細胞の効力の増加を示唆した。

#### 【0362】

本開示の好ましい実施形態が本明細書に示され、説明されたが、このような実施形態が例としてのみ提供されていることは当業者には明らかである。ここで、本開示から逸脱することなく、多数の変形、変更、および置換が当業者に想到される。本明細書に記載された実施形態の様々な代替、またはそれらに記載されたこれらの実施形態もしくは態様の1つ以上の組合せが、本開示を実施する際に使用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方針および構造ならびにそれらの同等物がそれによってカバーされることが意図されている。

【図 1 A】

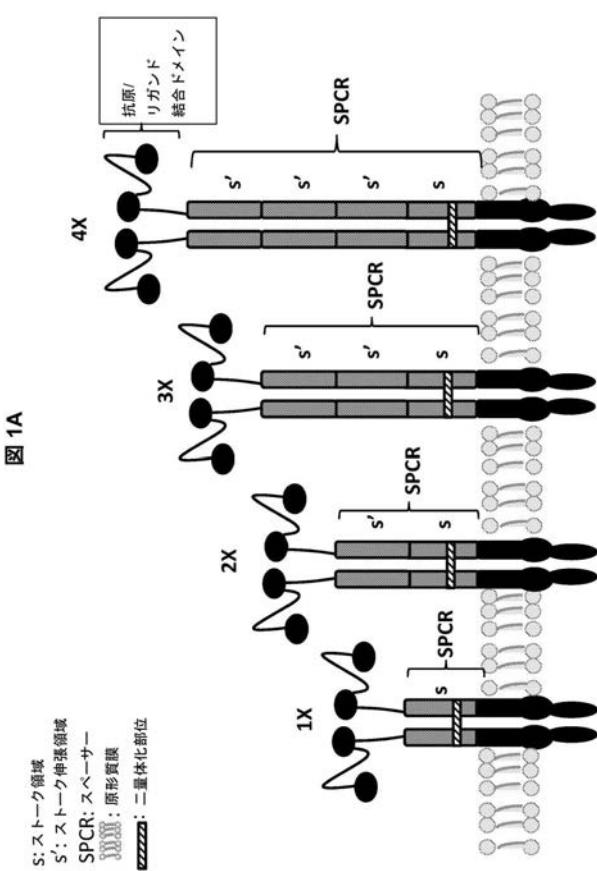
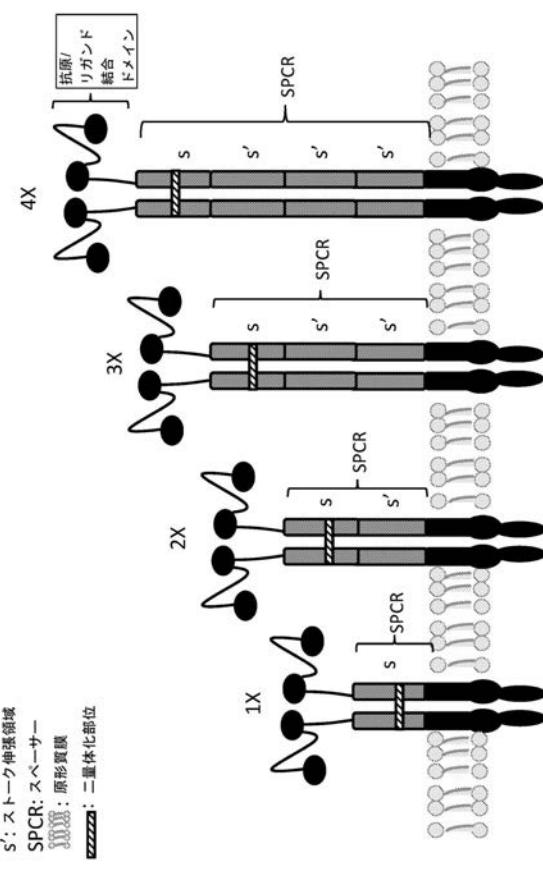


図 1A

【図 1 B】



【図 2 A】

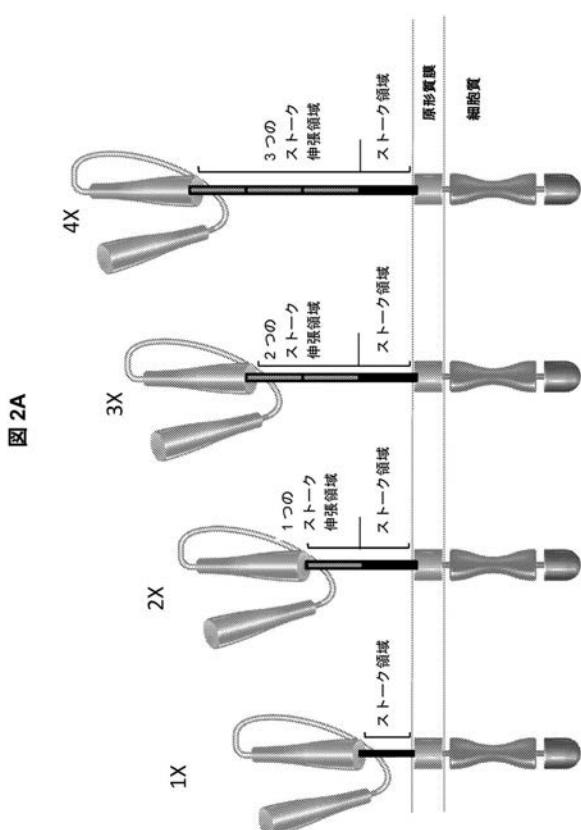


図 2A

【図 2 B】

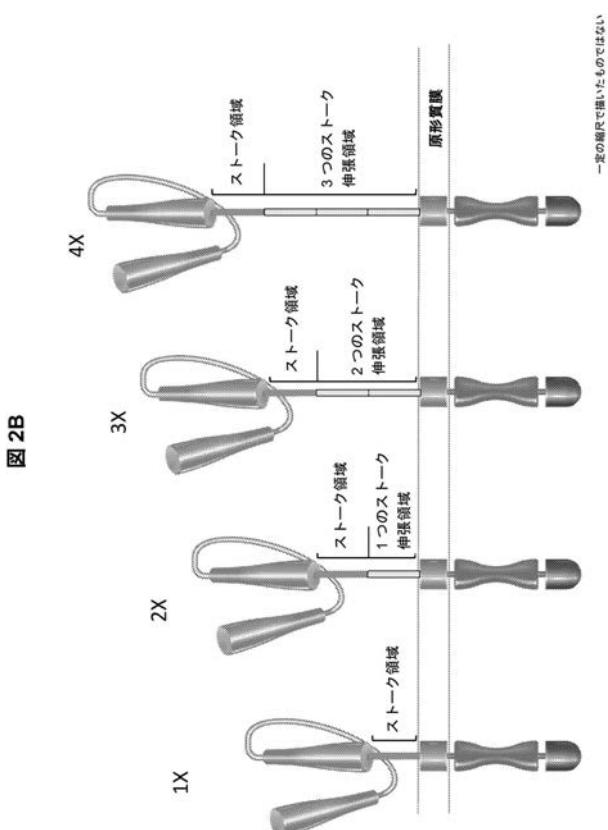
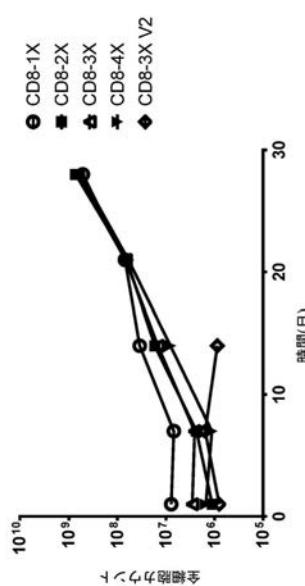


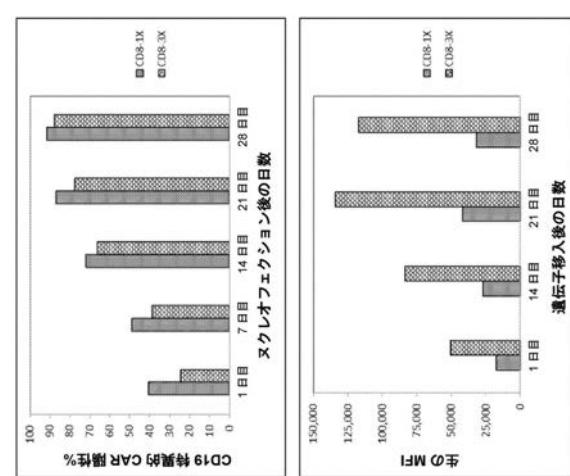
図 2B

【図3A】

図3A

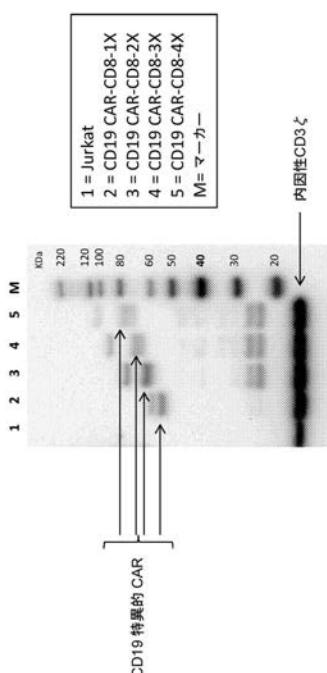


【図3B】



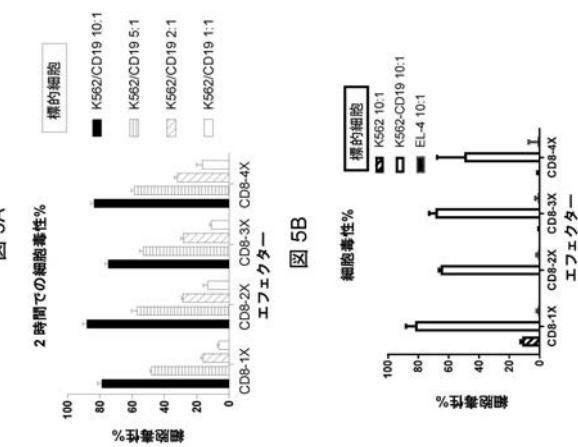
【図4】

図4

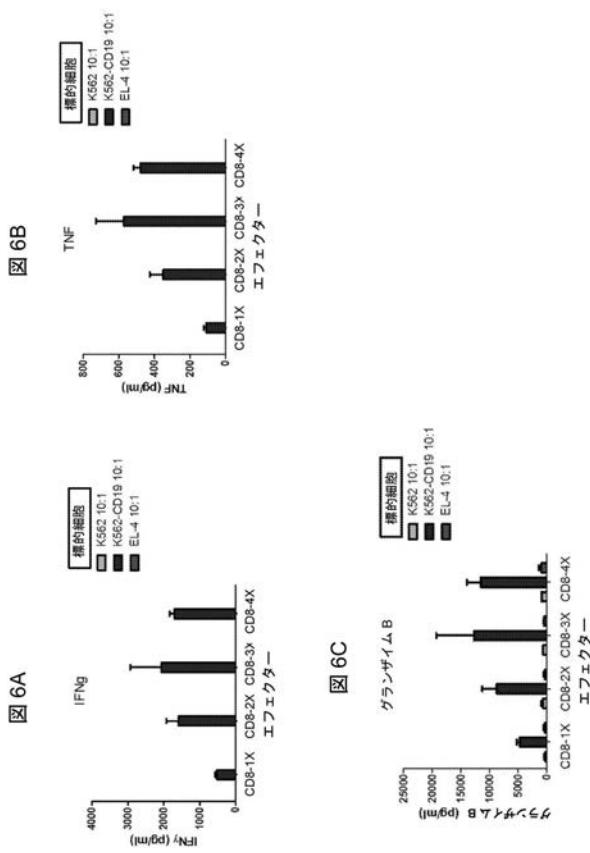


【図5】

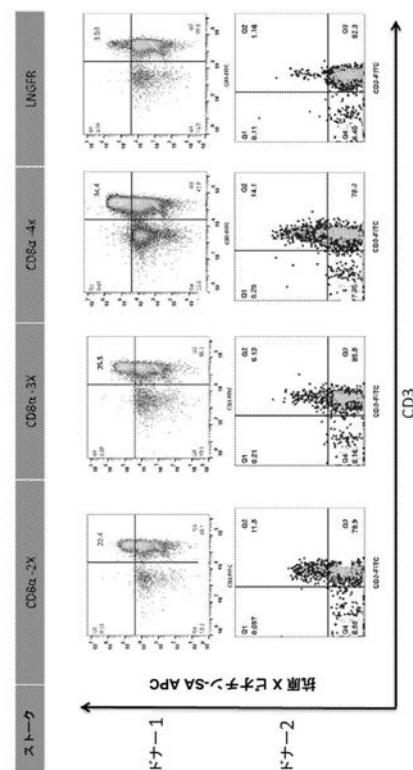
図5



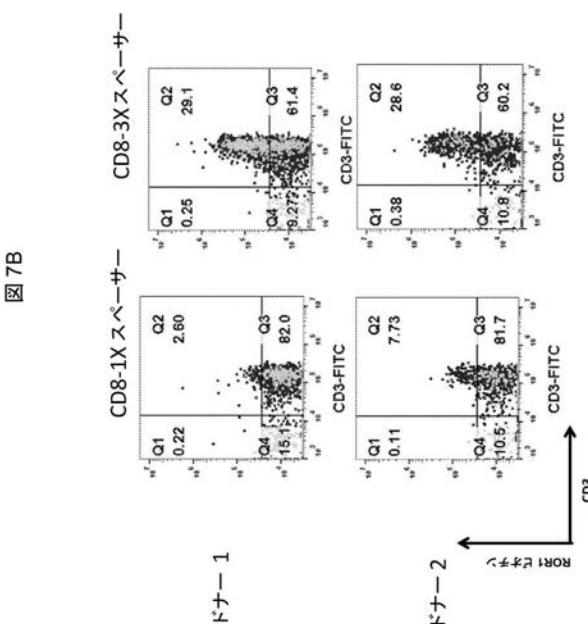
【図6】



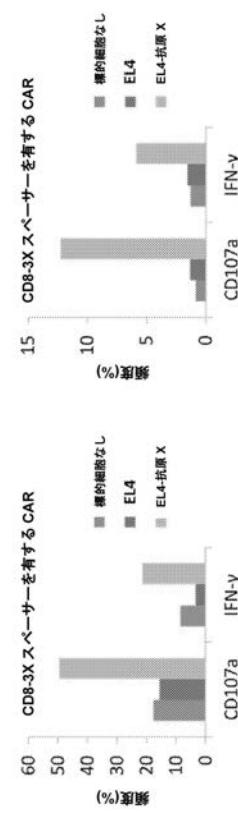
【 図 7 A 】



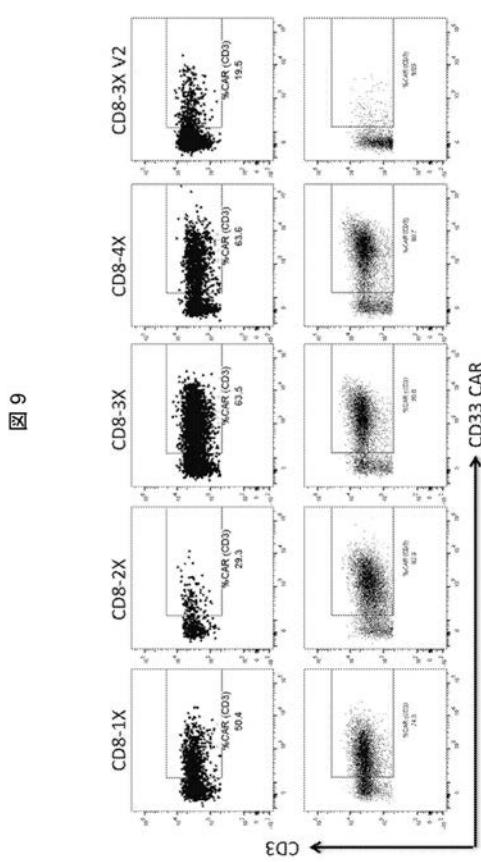
【図7B】



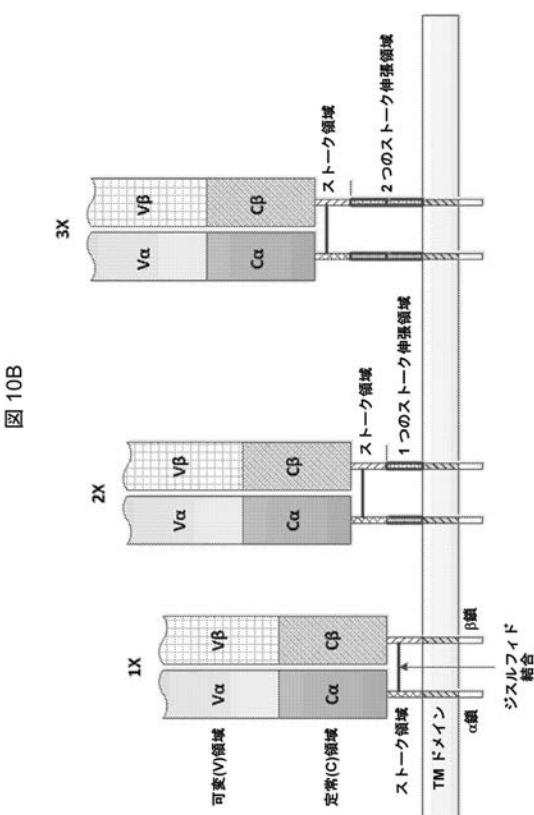
【 四 8 】



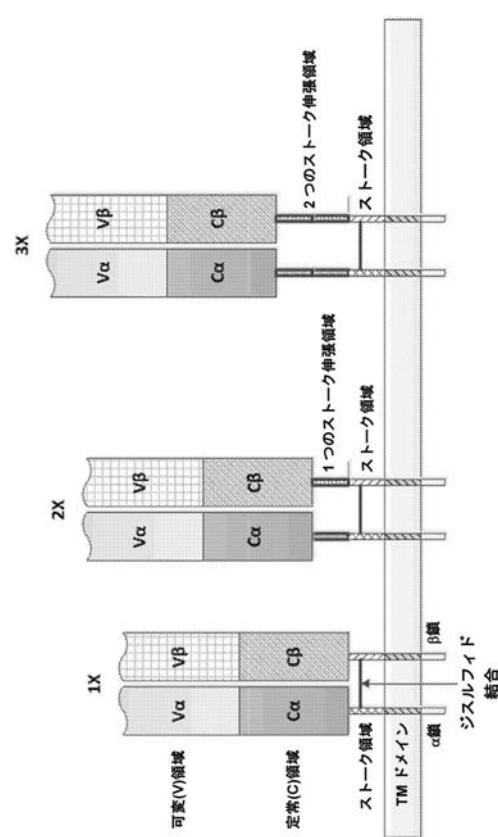
【図 9】



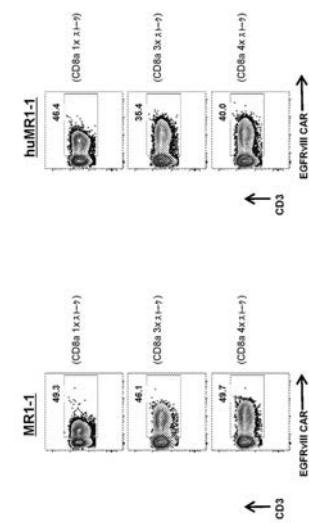
【図 10B】



【図 10A】



【図 11A】



【図 11B】

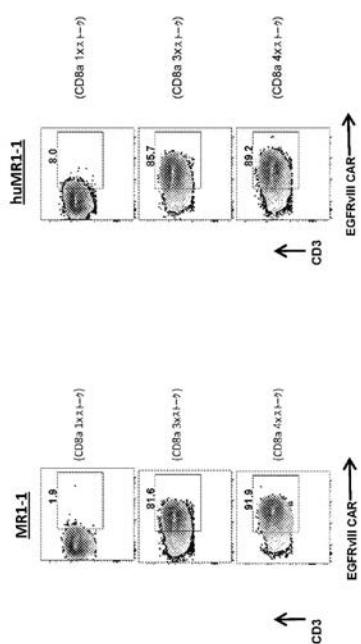


図 11B

【図 11C】

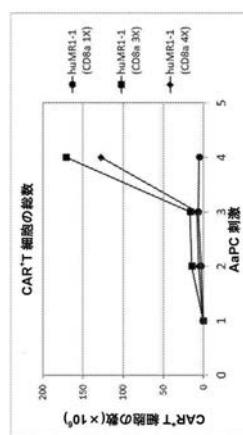


図 11C

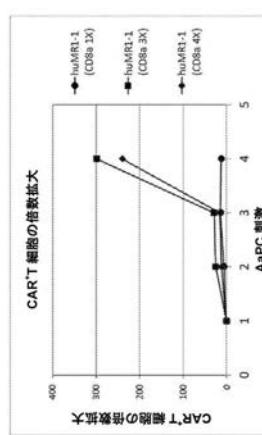


図 11D

【図 11D】

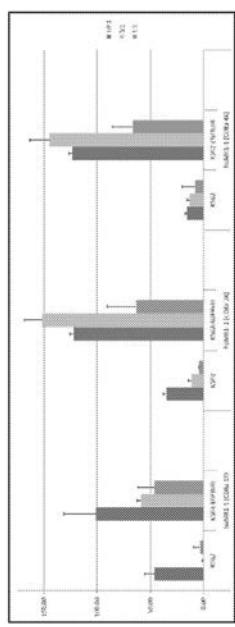


図 11E

【配列表】

2021500882000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/56334
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter</i>.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter</i>.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter</i>.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>		

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		<b>International application No.</b> <b>PCT/US 18/56334</b>						
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>								
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li>      <li>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</li>      <li>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 5-49, 53-81, 84 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>								
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>								
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.</p> <p>Group I, claims 1-4, directed to a chimeric polypeptide.</p> <p>Group II, claims 50-52, directed to a chimeric antigen receptor (CAR).</p> <p>Group III, claims 82-83, directed to a method of increasing expansion of a CAR or an engineered T cell expressing a CAR.</p> <p>---Please see continuation on extra sheet---</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li>      <li>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-4</li> </ol>								
<p><b>Remark on Protest</b></p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/56334									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/00, A61P 35/00, C07K 14/705, C07K 14/71, C07K 14/725 (2019.01) CPC - A61K 2039/505, C07K 14/7051, C07K 14/70517, C07K 2317/24											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 2017/088012 A1 (CARTHERICS PTY. LTD.) 01 June 2017 (01.06.2017) para [00129], [00182], [00193]</td> <td style="padding: 2px;">1,2 ----- 3,4</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 2017/0008951 A1 (GLIKNIK INC.) 12 January 2017 (12.01.2017) para [0023]</td> <td style="padding: 2px;">3,4</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2017/088012 A1 (CARTHERICS PTY. LTD.) 01 June 2017 (01.06.2017) para [00129], [00182], [00193]	1,2 ----- 3,4	Y	US 2017/0008951 A1 (GLIKNIK INC.) 12 January 2017 (12.01.2017) para [0023]	3,4
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 2017/088012 A1 (CARTHERICS PTY. LTD.) 01 June 2017 (01.06.2017) para [00129], [00182], [00193]	1,2 ----- 3,4									
Y	US 2017/0008951 A1 (GLIKNIK INC.) 12 January 2017 (12.01.2017) para [0023]	3,4									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.									
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search  30 January 2019		Date of mailing of the international search report  27 FEB 2019									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>									

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US 18/56334

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

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

**Special technical features:**

Group I has the special technical feature of a spacer region connecting said trans-membrane region with said antigen binding region, wherein said spacer region comprises a stalk region(s) comprising at least one dimerization site, that is not required by Group II or III.

Group II has the special technical feature of wherein said stalk extension region is homologous to the stalk region and comprises at least one amino acid substitution relative to said stalk region, that is not required by Group I or III.

Group III has the special technical feature of engineering a nucleic acid encoding the chimeric polypeptide to comprise a stalk extension domain, thereby generating an engineered T cell, that is not required by Group I or II.

**Common technical features:**

Groups I-III share the common technical feature of a chimeric polypeptide or CAR comprising an antigen binding region, a transmembrane region, a stalk region, and a stalk extension region. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is taught by an article by Kunkle et al., entitled "Functional Tuning of CARs Reveals Signaling Threshold above Which CD8+ CTL Antitumor Potency Is Attenuated due to Cell Fas-FasL-Dependent AICD" (Cancer Immunol Res. April 2015, Vol 3, No 4, pages 368-379) (hereinafter Kunkle).

Kunkle teaches a CAR polypeptide comprising: i) an antigen-binding region, ii) a transmembrane region, and iii) a spacer region comprising a stalk region and a stalk extension region (pg 369 col 1 para 2 "CD171-specific CARs were constructed using (G4S)3 peptide-linked VL and VH segments of the CE7-IgG2 monoclonal antibody (18). The scFv was codon optimized and subsequently linked to variable spacer length domains based on 12AA [short spacer (SS)/"hinge-only"], 119AA [medium spacer (MS)/"hingeCH3"] or 229AA [long spacer (LS)/"hinge-CH2-CH3"] derived from human IgG4-Fc. All spacers were linked to the transmembrane domain of human CD28 and to signaling modules ...". Note, applicant specification defines stalk region and stalk extension region in para [0080] "The stalk region and/or stalk extension region(s) can comprise hinge domain(s) derived from a cell surface protein or derivatives or variants thereof...").

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

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

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 7
	A 6 1 P 43/00	1 0 5
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,J0,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TT,TN,TR,TT

(72)発明者 シャー , ルトウル アール .

アメリカ合衆国 バージニア州 2 4 0 6 0 , ブラックスバーグ , クラフト ドライブ 1 7 5 0

F ターム(参考) 4B064 AG20 AG27 CA19 CC24 DA01 DA05

4B065 AA93Y	AA94X	AA94Y	AB01	AC14	AC20	BA02	CA24	CA25	CA44
4C085 AA14	AA16	BB01	BB17	BB18	CC21	DD62	EE01	GG01	
4C087 AA01	AA02	AA03	BB37	BB63	BB65	BC83	CA04	CA12	DA20
NA05	NA14	ZB02	ZB05	ZB09	ZB21	ZB22	ZB26	ZC02	ZC41
4H045 AA10	AA11	AA20	AA30	BA41	CA40	DA50	DA76	EA20	EA28

FA74