

(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2021-513347
(P2021-513347A)

(43) 公表日 令和3年5月27日(2021.5.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/62 (2006.01)	C12N 15/62 Z	4B064
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B065
C07K 14/725 (2006.01)	C07K 14/725	4C084
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C085
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4C087

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-542884 (P2020-542884)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月11日 (2019.2.11)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月2日 (2020.10.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/017525
 (87) 国際公開番号 WO2019/157454
 (87) 国際公開日 令和1年8月15日 (2019.8.15)
 (31) 優先権主張番号 62/629,072
 (32) 優先日 平成30年2月11日 (2018.2.11)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

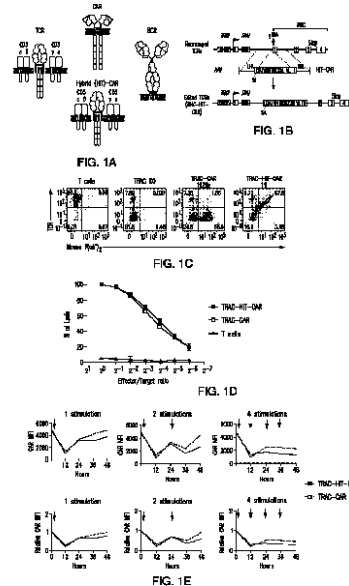
(71) 出願人 500213834
 メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 サデレイン, マイケル
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10024, ニューヨーク, ウェスト 84 ティーエイチ ストリート 15, アパートメント 2シー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非HLA制限T細胞受容体およびその使用

(57) 【要約】

本開示の主題は、がんおよび病原体に対する免疫応答を増強するための方法および組成物を提供する。本開示の主題は、T細胞受容体(TCR)の新規設計、およびそれを含む操作された免疫応答性細胞に関する。新規TCRは、HLA非依存的に抗原に結合する。ある特定の実施形態では、新規TCRは、低い発現レベルを有する標的遺伝子に対する増強された感受性をもたらす。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞外抗原結合ドメインおよび定常ドメインを含む抗原結合鎖を含む組換え T 細胞受容体 (T C R) であって、前記組換え T C R が、 H L A 非依存的に抗原に結合し、前記定常ドメインが、天然もしくは改変 T R A C ペプチドおよび / または天然もしくは改変 T R B C ペプチドを含む、組換え T C R 。

【請求項 2】

免疫応答性細胞の内因性 T R A C 遺伝子座および / または T R B C 遺伝子座に配置された発現カセットから発現される、請求項 1 に記載の組換え T C R 。

【請求項 3】

前記組換え T C R 発現カセットの配置が、前記免疫応答性細胞における天然 T C R 鎖および / または天然 T C R 鎖を含む T C R の内因性発現を破壊または無効化する、請求項 2 に記載の組換え T C R 。

【請求項 4】

前記組換え T C R 発現カセットの配置が、前記免疫応答性細胞における前記組換え T C R と、天然 T C R 鎖および / または天然 T C R 鎖との間の誤対合を防止または排除する、請求項 2 に記載の組換え T C R 。

【請求項 5】

前記定常ドメインが、別の定常ドメインとホモ二量体またはヘテロ二量体を形成することができる、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組換え T C R 。

【請求項 6】

前記抗原結合鎖が、 C D 3 ポリペプチドと会合することができる、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の組換え T C R 。

【請求項 7】

前記抗原結合鎖が、抗原に結合すると、前記抗原結合鎖に会合した前記 C D 3 ポリペプチドを活性化することができる、請求項 6 に記載の組換え T C R 。

【請求項 8】

前記 C D 3 ポリペプチドの活性化が、免疫応答性細胞を活性化することができる、請求項 7 に記載の組換え T C R 。

【請求項 9】

前記 C D 3 ポリペプチドが、内因性であり、天然 C D 3 複合体に一体化されている、請求項 6 に記載の組換え T C R 。

【請求項 10】

前記 C D 3 ポリペプチドが、外因性であり、 C D 2 8 ポリペプチド、 4 - 1 B B ポリペプチド、 O X 4 0 ポリペプチド、 I C O S ポリペプチド、 D A P - 1 0 ポリペプチド、およびその任意の組合せからなる群より選択される共刺激分子と必要に応じて一体化されている、請求項 6 に記載の組換え T C R 。

【請求項 11】

前記抗原結合鎖が、共刺激領域をさらに含み、前記組換え T C R が、抗原に結合すると、免疫応答性細胞を刺激することができる、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の組換え T C R 。

【請求項 12】

前記共刺激領域が、 C D 2 8 ポリペプチド、 4 - 1 B B ポリペプチド、 O X 4 0 ポリペプチド、 I C O S ポリペプチド、 D A P - 1 0 ポリペプチド、およびその任意の組合せからなる群より選択される共刺激分子を含む、請求項 11 に記載の組換え T C R 。

【請求項 13】

前記共刺激領域が、 C D 2 8 ポリペプチドを含む、請求項 12 に記載の組換え T C R 。

【請求項 14】

C D 3 複合体と一体化し、 H L A 非依存的抗原認識をもたらすことができる、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の組換え T C R 。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

前記 CD3 複合体が、内因性である、請求項 14 に記載の組換え TCR。

【請求項 16】

CD3 / TCR 複合体における内因性 TCR に置き換わる、請求項 15 に記載の組換え TCR。

【請求項 17】

前記細胞外抗原結合ドメインが、別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化することができる、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の組換え TCR。

【請求項 18】

前記細胞外抗原結合ドメインが、細胞表面受容体のリガンド、細胞表面リガンドの受容体、抗体の抗原結合部分もしくはその断片、または TCR の抗原結合部分を含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の組換え TCR。

10

【請求項 19】

前記細胞外抗原結合ドメインが、1個または2個の免疫グロブリン可変領域を含む、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の組換え TCR。

【請求項 20】

前記細胞外抗原結合ドメインが、抗体の重鎖可変領域 (V_H) を含む、請求項 18 に記載の組換え TCR。

【請求項 21】

前記細胞外抗原結合ドメインが、抗体の軽鎖可変領域 (V_L) を含む、請求項 18 に記載の組換え TCR。

20

【請求項 22】

前記細胞外抗原結合ドメインが、別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化することができる、請求項 18 に記載の組換え TCR。

【請求項 23】

前記細胞外抗原結合ドメインが、抗体の V_H を含み、前記 V_H が、前記抗体の V_L を含む別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化し、可変断片 (Fv) を形成することができる、請求項 20 に記載の組換え TCR。

【請求項 24】

前記細胞外抗原結合ドメインが、抗体の V_L を含み、前記 V_L が、前記抗体の V_H を含む別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化し、可変断片 (Fv) を形成することができる、請求項 21 に記載の組換え TCR。

30

【請求項 25】

腫瘍抗原に結合する、請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の組換え TCR。

【請求項 26】

前記腫瘍抗原が、CD19、MUC16、MUC1、CA1X、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EPCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、葉酸受容体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、K-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、ERBB2、MAGEA3、p53、MART1、GP100、プロテイナーゼ3 (PR1)、チロシナーゼ、サバイピン、hTERT、EphA2、NKG2Dリガンド、NY-ES0-1、癌胎児性抗原 (h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD123、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIIIおよびCD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、LILRB4、PRAMEおよびERBBからなる群より選択される、請求項 25 に記載の組換え TCR。

40

【請求項 27】

前記腫瘍抗原が、CD19である、請求項 25 または 26 に記載の組換え TCR。

50

【請求項 28】

同じ抗原を標的とする C A R よりも大きい抗原感受性を示す、請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の組換え T C R。

【請求項 29】

腫瘍細胞の表面に低密度で存在する抗原に結合すると、免疫応答を誘導することができる、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の組換え T C R。

【請求項 30】

前記細胞表面に低密度で存在する前記抗原が、細胞 1 個当たり約 10,000 分子未満の密度を有する、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の組換え T C R。

【請求項 31】

請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の組換え T C R を含む免疫応答性細胞。

10

【請求項 32】

前記組換え T C R の少なくとも 1 種の抗原結合鎖の前記発現カセットが、前記免疫応答性細胞の内因性遺伝子座に配置されている、請求項 31 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 33】

前記組換え T C R の 2 種の抗原結合鎖の発現カセットが、前記免疫応答性細胞の内因性遺伝子座に配置され、前記 2 種の抗原結合鎖が、二量体化することができる、請求項 32 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 34】

前記内因性遺伝子座が、C D 3 遺伝子座、C D 3 遺伝子座、C D 2 4 7 遺伝子座、B 2 M 遺伝子座、T R A C 遺伝子座、T R B C 遺伝子座、T R D C 遺伝子座および / または T R G C 遺伝子座である、請求項 31 から 33 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

20

【請求項 35】

前記内因性遺伝子座が、T R A C 遺伝子座および / または T R B C 遺伝子座である、請求項 34 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 36】

前記組換え T C R の前記発現カセットの配置が、前記免疫応答性細胞における天然 T C R 鎖および / または天然 T C R 鎖を含む T C R の内因性発現を破壊または無効化し、それによって、前記免疫応答性細胞における前記組換え T C R と、天然 T C R 鎖および / または天然 T C R 鎖との間の誤対合を防止または排除する、請求項 35 に記載の免疫応答性細胞。

30

【請求項 37】

前記内因性遺伝子座が、改変された転写ターミネーター領域を含む、請求項 32 から 36 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 38】

前記改変された転写ターミネーター領域が、T K 転写ターミネーター、G C S F 転写ターミネーター、T C R A 転写ターミネーター、H B B 転写ターミネーター、ウシ成長ホルモン転写ターミネーター、S V 40 転写ターミネーターおよび P 2 A エlement からなる群より選択されるゲノムElementを含む、請求項 37 に記載の免疫応答性細胞。

40

【請求項 39】

細胞における 1 個の内因性 T 細胞受容体遺伝子座が、前記組換え T C R の前記少なくとも 1 種の抗原結合鎖を発現するように改変されている場合、前記細胞における 1 個または複数の他の内因性 T 細胞受容体遺伝子座が、内因性 T C R 鎖の発現を排除するように改変されている、請求項 32 から 38 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 40】

前記 1 個または複数の他の内因性 T 細胞受容体遺伝子座が、目的の遺伝子を発現するようにさらに改変されている、請求項 39 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 41】

前記目的の遺伝子が、抗腫瘍サイトカイン、共刺激分子リガンド、追跡用遺伝子または

50

自殺遺伝子である、請求項 40 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 42】

T 細胞、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)、調節性 T 細胞、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞、ヒト胚性幹細胞、およびリンパ系細胞に分化し得る多能性幹細胞からなる群より選択される、請求項 31 から 41 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 43】

自己のものである、請求項 31 から 42 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 44】

少なくとも 1 種の外因性共刺激リガンドをさらに含む、請求項 31 から 43 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

10

【請求項 45】

前記外因性共刺激リガンドが、CD80、CD86、41BBL、CD275、CD40L、OX40L およびその任意の組合せからなる群より選択される、請求項 44 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 46】

1 種の外因性共刺激リガンドをさらに含む、またはそれからなる、請求項 44 または 45 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 47】

前記 1 種の外因性共刺激リガンドが、CD80 または 4-1BBL である、請求項 46 に記載の免疫応答性細胞。

20

【請求項 48】

2 種の外因性共刺激リガンドをさらに含む、またはそれからなる、請求項 44 または 45 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 49】

前記 2 種の外因性共刺激リガンドが、CD80 および 4-1BBL である、請求項 48 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 50】

少なくとも 1 種のキメラ共刺激受容体 (CCR) をさらに含む、請求項 31 から 49 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 51】

前記 CCR が、CD28 ポリペプチド、4-1BB ポリペプチド、OX40 ポリペプチド、ICOS ポリペプチド、DAP-10 ポリペプチド、およびその任意の組合せからなる群より選択される共刺激分子を含む、請求項 50 に記載の免疫応答性細胞。

30

【請求項 52】

有効量の請求項 31 から 47 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 53】

新生物を処置するための、請求項 52 に記載の医薬組成物。

【請求項 54】

被験体における腫瘍負荷を低減させる方法であって、前記被験体に、有効量の請求項 31 から 51 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞または請求項 52 もしくは 53 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

40

【請求項 55】

新生物を処置または防止する方法であって、前記被験体に、有効量の請求項 31 から 51 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞または請求項 52 もしくは 53 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 56】

前記新生物が、血液がん、B 細胞白血病、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫、腺癌からなる群より選択される、請求項 55 に記載の方法。

50

【請求項 57】

前記新生物が、B細胞白血病、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病または非ホジキンリンパ腫であり、組換えTCRが、CD19に結合する、請求項55または56に記載の方法。

【請求項 58】

前記新生物が、B細胞白血病、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病または非ホジキンリンパ腫であり、組換えTCRが、BCMA、ADGRE2、CCR1、CD22、CD70またはその組合せに結合する、請求項55または56に記載の方法。

【請求項 59】

前記新生物が、CD19⁺ALLである、請求項55から58のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 60】

抗原特異的免疫応答性細胞を産生するための方法であって、免疫応答性細胞に、請求項1から30のいずれか一項に記載の組換えTCRをコードする核酸配列を導入することを含む、方法。

【請求項 61】

前記核酸配列が、ベクター中に含まれる、請求項60に記載の方法。

【請求項 62】

前記組換えTCRの少なくとも1種の抗原結合鎖の発現カセットが、前記免疫応答性細胞の内因性遺伝子座に配置されている、請求項60または61に記載の方法。

20

【請求項 63】

前記組換えTCRの2種の抗原結合鎖の前記発現カセットが、前記免疫応答性細胞の内因性遺伝子座に配置され、前記2種の抗原結合鎖が、二量体化することができる、請求項62に記載の方法。

【請求項 64】

前記内因性遺伝子座が、CD3 遺伝子座、CD3 遺伝子座、CD247 遺伝子座、B2M 遺伝子座、TRAC 遺伝子座、TRBC 遺伝子座、TRDC 遺伝子座および/またはTRGC 遺伝子座である、請求項62または63に記載の方法。

【請求項 65】

前記内因性遺伝子座が、TRAC 遺伝子座および/またはTRBC 遺伝子座である、請求項64に記載の方法。

30

【請求項 66】

前記組換えTCRの前記発現カセットの配置が、前記免疫応答性細胞における天然TCR 鎖および/または天然TCR 鎖を含むTCRの内因性発現を破壊または無効化し、それによって、前記免疫応答性細胞における前記組換えTCRと、天然TCR 鎖および/または天然TCR 鎖との間の誤対合を防止または排除する、請求項63から65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 67】

前記内因性遺伝子座が、改変された転写ターミネーター領域を含む、請求項62から66のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 68】

前記改変された転写ターミネーター領域が、TK転写ターミネーター、GCSF転写ターミネーター、TCRA転写ターミネーター、HBB転写ターミネーター、ウシ成長ホルモン転写ターミネーター、SV40転写ターミネーターおよびP2Aエレメントからなる群より選択されるゲノムエレメントを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項 69】

細胞における1個の内因性T細胞受容体遺伝子座が、前記組換えTCRの前記少なくとも1種の抗原結合鎖を発現するように改変されている場合、前記細胞における1個または複数の他の内因性T細胞受容体遺伝子座が、内因性TCR鎖の発現を排除するように改変

50

されている、請求項 6 2 から 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記 1 個または複数の他の内因性 T 細胞受容体遺伝子座が、目的の遺伝子を発現するようにさらに改変されている、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記目的の遺伝子が、抗腫瘍サイトカイン、共刺激分子リガンド、追跡用遺伝子または自殺遺伝子である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

新生物を有する被験体の生存を延ばす方法であって、前記被験体に、有効量の請求項 3 1 から 5 1 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞または請求項 5 2 もしくは 5 3 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

10

【請求項 7 3】

請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の組換え T C R をコードする核酸。

【請求項 7 4】

請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の組換え T C R を含む核酸組成物。

【請求項 7 5】

前記核酸配列が、ベクター中に含まれる、請求項 7 4 に記載の核酸組成物。

【請求項 7 6】

請求項 7 4 または 7 5 に記載の核酸組成物を含むベクター。

【請求項 7 7】

請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の組換え T C R、請求項 3 1 から 5 1 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞、請求項 5 2 もしくは 5 3 に記載の医薬組成物、請求項 7 4 もしくは 7 5 に記載の核酸組成物、または請求項 7 6 に記載のベクターを含むキット。

20

【請求項 7 8】

新生物、病原体感染、自己免疫障害または同種異系移植を処置および / または防止するための書面での指示をさらに含む、請求項 7 7 に記載のキット。

【請求項 7 9】

治療における使用のための、請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の組換え T C R。

【請求項 8 0】

治療における使用のための、請求項 5 1 または 5 2 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 8 1】

治療における使用のための、請求項 3 1 から 5 1 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 8 2】

被験体における腫瘍負荷を低減させるための、請求項 3 1 から 5 1 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞または請求項 5 2 もしくは 5 3 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 8 3】

新生物を処置または防止するための、請求項 3 1 から 5 1 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞または請求項 5 2 もしくは 5 3 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 8 4】

新生物（例えば、がん）を有する被験体の生存を延ばすための、請求項 3 1 から 5 1 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞または請求項 5 2 もしくは 5 3 に記載の医薬組成物の使用。

40

【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、2 0 1 8 年 2 月 1 1 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 6 2 9 , 0 7 2

50

号の優先権を主張し、その内容はその全体が参照により組み込まれ、それに対して優先権を主張する。

【0002】

序論

本開示の主題は、がんおよび病原体に対する免疫応答を増強するための方法および組成物を提供する。それは、T細胞受容体(TCR)およびそれを含む操作された免疫応答性細胞の新規設計に関する。新規TCRを含む操作された免疫応答性細胞は、抗原指向性である。

【背景技術】

【0003】

抗原認識受容体(例えば、キメラ抗原受容体(CAR))を使用した養子免疫療法は、白血病の処置において注目すべき臨床結果を示しており、がんを処置するための最も有望な新たな戦略の1つである。CAR療法を生成するために、現在の臨床プロトコールは、自己T細胞、ならびにガンマ-レトロウイルス、レンチウイルスおよびトランスポゾンを含むランダム組込みベクターを用い、これらは全て、導入遺伝子多様化(variegation)のため、CARの半ランダム組込みおよび可変的発現をもたらす。要するに、自己細胞調達およびランダムベクター組込みの協同は、可変的な効力を有する細胞産物を生成する傾向がある。したがって、低レベルの標的抗原を検出するための一貫した効力および増加した能力を有する抗原認識受容体の新規設計の必要がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示の主題は、一般に、HLA非依存的に目的の抗原に結合する、HLA非依存的(または非HLA制限)T細胞受容体(「HI-TCR」と称される)、およびそれを含む免疫応答性細胞を提供する。本開示の主題は、また、標的抗原に対する免疫応答を誘導および/もしくは増強する、ならびに/または新生物もしくは他の疾患/障害を処置および/もしくは防止するために、そのような細胞を使用する方法であって、抗原特異的免疫応答の増加が望ましい、方法を提供する。

【0005】

本開示の主題は、細胞外抗原結合ドメインおよび定常ドメインを含む抗原結合鎖を含む、組換えT細胞受容体(TCR)であって、HLA非依存的に抗原に結合する、組換えTCRを提供する。

【0006】

ある特定の実施形態では、定常ドメインは、天然もしくは改変TRACペプチドおよび/または天然もしくは改変TRBCペプチドを含む。ある特定の実施形態では、定常ドメインは、別の定常ドメインとホモ二量体またはヘテロ二量体を形成することができる。

【0007】

ある特定の実施形態では、組換えTCRは、免疫応答性細胞の内因性TRAC遺伝子座および/またはTRBC遺伝子座に配置された発現カセットから発現される。ある特定の

実施形態では、組換えTCR発現カセットの配置は、免疫応答性細胞における天然TCR鎖および/または天然TCR鎖を含むTCRの内因性発現を破壊または無効化する。ある特定の実施形態では、組換えTCR発現カセットの配置は、免疫応答性細胞における組換えTCRと、天然TCR鎖および/または天然TCR鎖との間の誤対合を防止または排除する。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、CD3ポリペプチドと会合することができる。抗原結合鎖は、抗原に結合すると、抗原結合鎖に会合したCD3ポリペプチドを活性化することができる。CD3ポリペプチドの活性化は、免疫応答性細胞を活性化することができる。CD3ポリペプチドは、内因性または外因性であってもよい。ある特定の実施形態では、CD3ポリペプチドは、内因性であり、天然CD3複合体に一体化(integrate)される。ある特定の実施形態では、CD3ポリペプチドは、外因性であり、CD28ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド

10

20

30

40

50

、ICOSポリペプチド、DAP-10ポリペプチド、およびその任意の組合せからなる群より選択される共刺激分子と必要に応じて一体化されている。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、共刺激領域をさらに含み、組換えTCRは、抗原に結合すると、免疫応答性細胞を刺激することができる。共刺激領域は、CD28ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、ICOSポリペプチド、DAP-10ポリペプチド、およびその任意の組合せからなる群より選択される共刺激分子を含むことができる。ある特定の実施形態では、共刺激領域は、CD28ポリペプチドを含む。

【0008】

ある特定の実施形態では、組換えTCRは、CD3複合体と会合することができる。ある特定の実施形態では、組換えTCRは、CD3複合体と一体化し、HLA非依存的抗原認識をもたらすことができる。ある特定の実施形態では、CD3複合体は、内因性である。ある特定の実施形態では、組換えTCRは、CD3/TCR複合体における内因性TCRに置き換わる。

10

【0009】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化することができる。細胞外抗原結合ドメインは、細胞表面受容体のリガンド、細胞表面リガンドの受容体、抗体の抗原結合部分もしくはその断片、またはTCRの抗原結合部分を含むことができる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、抗体の重鎖可変領域(V_H)、またはラクダ科V_Hのみ抗体由来のV_Hおよび/もしくは抗体の軽鎖可変領域(V_L)を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化することができる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、抗体のV_Hを含み、ヒト、マウスまたはラクダ科V_Hは、抗体のV_Lを含む別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化し、可変断片(fragment variable)(F_v)を形成することができる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、抗体のV_Lを含み、V_Lは、抗体のV_Hを含む別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化し、可変断片(F_v)を形成することができる。

20

【0010】

ある特定の実施形態では、組換えTCRは、腫瘍抗原に結合する。腫瘍抗原は、CD19、MUC16、MUC1、CALX、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EPCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、葉酸受容体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、K-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、ERBB2、MAGEA3、p53、MART1、GP100、プロテイナーゼ3(PR1)、チロシナーゼ、サバイピン、hTERT、EphA2、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、癌胎児性抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD123、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIIIおよびCD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、LILRB4、PRAMEおよびERBBからなる群より選択することができる。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、CD19である。

30

40

【0011】

ある特定の実施形態では、組換えTCRは、同じ抗原を標的とするCARよりも高い抗原感受性を示す。ある特定の実施形態では、組換えTCRは、腫瘍細胞の表面に低密度で存在する抗原に結合すると、免疫応答を誘導することができる。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する抗原は、細胞1個当たり約2,000分子を下回る。

【0012】

本開示の主題は、さらに、本明細書に記載の組換えTCRを含む免疫応答性細胞を提供する。ある特定の実施形態では、組換えTCRの少なくとも1種の抗原結合鎖の発現カセットは、免疫応答性細胞の内因性遺伝子座に配置されている。ある特定の実施形態では、

50

組換えTCRの2種の抗原結合鎖の発現カセットは、免疫応答性細胞の内因性遺伝子座に配置され、2種の抗原結合鎖は、二量体化することができる。組換えTCRの発現カセットの配置は、免疫応答性細胞における天然TCR鎖および/または天然TCR鎖を含むTCRの内因性発現を破壊または無効化し、それによって、免疫応答性細胞における組換えTCRと、天然TCR鎖および/または天然TCR鎖との間の誤対合を防止または排除することができる。内因性遺伝子座は、CD3遺伝子座、CD3遺伝子座、CD247遺伝子座、B2M遺伝子座、TRAC遺伝子座、TRBC遺伝子座またはTRGC遺伝子座またはTRDC遺伝子座であってもよい。ある特定の実施形態では、内因性遺伝子座は、TRAC遺伝子座および/またはTRBC遺伝子座である。内因性遺伝子座は、改変された転写ターミネーター領域を含むことができる。ある特定の実施形態では、改変された転写ターミネーター領域は、TK転写ターミネーター、GCSF転写ターミネーター、TCRA転写ターミネーター、HBB転写ターミネーター、ウシ成長ホルモン転写ターミネーター、SV40転写ターミネーターおよびP2Aエレメントからなる群より選択されるゲノムエレメントを含み；P2Aエレメントは、標的化される遺伝子の内因性転写ターミネーターの使用を可能にする。ある特定の実施形態では、細胞における1個の内因性T細胞受容体遺伝子座が、組換えTCRの少なくとも1種の抗原結合鎖を発現するように改変されている場合、細胞における1個または複数の他の内因性T細胞受容体遺伝子座は、内因性TCR鎖の発現を排除するように改変されている。ある特定の実施形態では、1個または複数の他の内因性T細胞受容体遺伝子座は、目的の遺伝子を発現するようにさらに改変されている。目的の遺伝子は、抗腫瘍サイトカイン、共刺激分子リガンド、追跡用遺伝子または自殺遺伝子であり得る。ある特定の実施形態では、1個または複数の内因性TCR遺伝子座は、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする配列を取り込んで、カルボキシ末端にそのようなシグナル伝達ドメインを含有するTCR鎖を生成するようにさらに改変されている。

【0013】

ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、調節性T細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、ヒト胚性幹細胞、およびリンパ系細胞を分化させることができる多能性幹細胞からなる群より選択される。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、自己のものである。

【0014】

ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、少なくとも1種の外因性共刺激リガンドをさらに含む。ある特定の実施形態では、共刺激リガンドは、CD80、CD86、41BBL、CD275、CD40L、OX40Lおよびその任意の組合せからなる群より選択される。ある特定の実施形態では、細胞は、1種の外因性共刺激リガンドをさらに含む、またはそれからなる。ある特定の実施形態では、1種の外因性共刺激リガンドは、CD80または4-1BBLである。ある特定の実施形態では、細胞は、2種の外因性共刺激リガンドをさらに含む、またはそれからなる。ある特定の実施形態では、2種の外因性共刺激リガンドは、CD80および4-1BBLである。

【0015】

ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、少なくとも1種のキメラ共刺激受容体（CCR）をさらに含む。ある特定の実施形態では、CCRは、CD28ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、ICOSポリペプチド、DAP-10ポリペプチド、およびその任意の組合せからなる群より選択される共刺激分子を含む。

【0016】

本開示の主題は、また、本明細書に開示される免疫応答性細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。医薬組成物は、新生物の処置に使用することができる。

【0017】

被験体における腫瘍負荷を低減させる方法がさらに提供される。加えて、本開示の主題は、新生物（例えば、がん）を有する被験体の生存を延ばす方法を提供する。ある特定の

10

20

30

40

50

実施形態では、方法は、被験体に、有効量の本明細書に記載の免疫応答性細胞または本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む。

【0018】

本開示の主題は、また、新生物を処置または防止する方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、被験体に、有効量の本明細書に記載の免疫応答性細胞または本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む。新生物は、血液がん、B細胞白血病、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫、および腺癌からなる群より選択することができる。ある特定の実施形態では、新生物は、B細胞白血病、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病、または非ホジキンリンパ腫であり、組換えTCRは、CD19に結合する。ある特定の実施形態では、新生物は、B細胞白血病、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病、腺癌、または非ホジキンリンパ腫であり、組換えTCRは、CD19、MUC16、MUC1、CALX、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、葉酸受容体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、K-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン（MSLN）、ERBB2、MAGEA3、p53、MART1、GP100、プロテインナーゼ3（PR1）、チロシナーゼ、サバイピン、hTERT、EphA2、NKG2Dリガンド、NY-ES0-1、癌胎児性抗原（h5T4）、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD123、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、LILRB4、PRAME、およびERBBに結合する。ある特定の実施形態では、新生物は、CD19+ALLである。

10

20

【0019】

本開示の主題は、抗原特異的免疫応答性細胞を産生するための方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、方法は、免疫応答性細胞に、本明細書に記載の組換えTCRをコードする核酸配列を導入することを含む。核酸配列は、ベクター中に含まれ得る。ある特定の実施形態では、組換えTCRの少なくとも1種の抗原結合鎖の発現カセットは、免疫応答性細胞の内因性遺伝子座に配置されている。ある特定の実施形態では、組換えTCRの2種の抗原結合鎖の発現カセットは、免疫応答性細胞の内因性遺伝子座に配置され、2種の抗原結合鎖は、二量体化することができる。内因性遺伝子座は、CD3 遺伝子座、CD3 遺伝子座、CD247 遺伝子座、B2M 遺伝子座、TRAC 遺伝子座、TRBC 遺伝子座、TRDC 遺伝子座および/またはTRGC 遺伝子座であってもよい。ある特定の実施形態では、内因性遺伝子座は、TRAC 遺伝子座またはTRBC 遺伝子座である。ある特定の実施形態では、組換えTCRの発現カセットの配置は、免疫応答性細胞における天然TCR 鎖および/または天然TCR 鎖を含むTCRの内因性発現を破壊または無効化し、それによって、免疫応答性細胞における組換えTCRと、天然TCR 鎖および/または天然TCR 鎖との間の誤対合を防止または排除する。ある特定の実施形態では、内因性遺伝子座は、改変された転写ターミネーター領域を含む。ある特定の実施形態では、改変された転写ターミネーター領域は、TK転写ターミネーター、GCSF転写ターミネーター、TCRA転写ターミネーター、HBB転写ターミネーター、ウシ成長ホルモン転写ターミネーター、SV40転写ターミネーターおよびP2Aエレメントからなる群より選択されるゲノムエレメントを含む。ある特定の実施形態では、細胞における1個の内因性T細胞受容体遺伝子座が、組換えTCRの少なくとも1種の抗原結合鎖を発現するように改変されている場合、細胞における1個または複数の他の内因性T細胞受容体遺伝子座は、内因性TCR鎖の発現を排除するように改変されている。ある特定の実施形態では、1個または複数の他の内因性T細胞受容体遺伝子座は、目的の遺伝子を発現するようにさらに改変されている。ある特定の実施形態では、目的の遺伝子は、抗腫瘍サイ

30

40

50

トカイン、共刺激分子リガンド、追跡用遺伝子または自殺遺伝子である。

【0020】

本開示の主題は、さらに、本明細書に記載の組換えTCRをコードする核酸(nucleotide acid)、および本明細書に記載の組換えTCRを含む核酸組成物を提供する。ある特定の実施形態では、核酸配列は、ベクター中に含まれる。本開示の主題はまた、本明細書に記載の核酸組成物を含むベクターを提供する。本明細書に記載の組換えTCR、本明細書に記載の免疫応答性細胞、本明細書に記載の医薬組成物、本明細書に記載の核酸組成物、または本明細書に記載のベクターを含むキットがさらに提供される。ある特定の実施形態では、キットは、新生物、病原体感染、自己免疫障害、または同種異系移植を処置および/または防止するための書面での指示をさらに含む。

10

【0021】

本開示の主題を使用することができる例示的な新生物として、白血病(例えば、急性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄球性白血病、慢性リンパ球性白血病)、真性多血症、リンパ腫(ホジキン病、非ホジキン病)、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、ならびに肉腫および癌腫などの固形腫瘍(例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫(lymphangioendotheliosarcoma)、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌(nileduct carcinoma)、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸部がん、子宮がん、精巣がん、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫(oligodendroglioma)、シュワン腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫および網膜芽腫)が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0022】

本開示の主題は、さらに、治療における使用のための、本明細書に開示されるいずれかの組換えTCR、いずれかの医薬組成物またはいずれかの免疫応答性細胞の使用を提供する。

30

【0023】

以下の詳細な説明は、例として示されるが、本開示の主題を記載の特定の実施形態に限定することを意図せず、添付の図面と共に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1-1】図1A~図1Eは、HLA非依存的なTCRに基づくキメラ抗原受容体HIT(HIT-CAR、すなわち、HI-TCRまたはHIT)、およびヒトT細胞におけるTRAC遺伝子座における遺伝子標的化戦略を示す。(A)T細胞受容体(TCR)、B細胞受容体(BCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、およびHLA非依存的なTCRに基づくキメラ抗原受容体(HIT-CAR、すなわち、HI-TCRまたはHIT)の略図。(B)TRAC遺伝子座への3種の受容体のCRISPR/Cas9により標的化された組込み。上:TRAC遺伝子座;中央:相同性アームに挟まれた異なる受容体カセットを含有するrAAV6。(C)TRAC標的化の4日後の、代表的TCR/マウスF(ab')₂フローサイトメトリープロット。TCR抗体エピトープは、TCRアルファおよびベータの定常鎖を認識する。(D)標的細胞としてホタルルシフェラーゼ(FFL)発現NALM-6を使用した、18時間生物発光アッセイを使用した細胞傷害活性(n=3)。(E)CD19陽性標的細胞における1、2または4回(矢印)刺激後の、CAR T細胞の相対CAR MFI(1=0時間でのMFI)。

40

【図1-2】同上。

【図1-3】同上。

50

【0025】

【図2】図2A～図2Bは、HI-TCRの発現および治療有効性を示す。(A)TRAC標的化の4日後の、代表的TCR/マウスF(ab')₂フローサイトメトリープロット。(B)NALM-6を有するマウスが、 5×10^5 個のCAR T細胞で処置された場合の、マウス生存のカプラン・マイヤー解析。

【0026】

【図3-1】図3A～図3Eは、NYESO TCRの遺伝子標的化戦略および発現を示す。(A)TCRアルファまたはベータ鎖に組み込まれたNYESO TCR遺伝子の略図。(B)TRACまたはTRBC標的化の4日後の、代表的TCR-V-ベータ-1フローサイトメトリープロット。(C)標的細胞としてホタルルシフェラーゼ(FFL)発現PC3を使用した、18時間生物発光アッセイを使用した細胞傷害活性($n=3$)。(D)TCRアルファおよびTCRベータの両方への同時標的化の略図。(E)TRACおよびTRBC同時標的化の4日後の、代表的TCR-V-ベータ-1/4-1BBLフローサイトメトリープロット。

10

【図3-2】同上。

【0027】

【図4-1】図4A～図4Cは、TRAC遺伝子座へのCAR組み込み戦略、および様々な転写終結シグナル/3'非翻訳領域(3'UTR)による発現のモジュレーションを示す。(A)TRAC遺伝子座に組み込まれた1928z CAR遺伝子の略図。ポリA(黒いボックス)は、異なるウイルスおよび哺乳動物3'UTRを検査するために改変されたCARカセットのセグメントに対応する。(B)TRACの3日後の、代表的CARフロープロット(左パネル)、ならびにCAR発現集団の幾何平均蛍光強度(gMFI)、MFIおよび中央値(右パネル)。ウシ成長ホルモンポリAの本来の3'UTR配列をボックスで囲む。(C)CD19陽性標的細胞における1、2回刺激後のCAR T細胞の絶対(上)および相対(下)CAR MFI(1=0時間でのMFI)(図1に示す通り)。

20

【図4-2】同上。

【図4-3】同上。

【0028】

【図5-1】図5Aおよび図5Bは、異なる3'UTR配列を有する遺伝的に組み込まれたCARの有効性を示す。(A)FFL-NALM-6を有するマウスを、 1×10^5 個のCAR T細胞で処置し、この場合、腫瘍負荷は、T細胞注射後14日目の動物1匹当たりで定量化される生物発光シグナルとして示される。1群当たり $n=6$ 匹のマウス。(B)T細胞注射後7、14および21日目に定量化された、 1×10^5 個のCAR T細胞で処置されたNALM-6を有するマウスの腫瘍負荷(平均ラジアンズ)($n=6$;線=1匹のマウス)。

30

【図5-2】同上。

【0029】

【図6】図6A～図6Cは、ヒトT細胞におけるTRAC遺伝子座におけるHIT遺伝子標的化を示す。(A)TRAC遺伝子座への、CRISPR/Cas9により標的化されたCARまたはHIT遺伝子組み込み。上、TRAC遺伝子座;中央、相同性アームに挟まれたCARカセットを含有するrAAV6;下、相同性アームに挟まれたHITカセットを含有するrAAV6。(B)Cas9 mRNAおよびTRAC gRNAによるT細胞のトランスフェクション、ならびにAAV6の添加の4日後の、代表的CAR/HITフロープロット。ヤギ抗マウスIgGを使用して、CARおよびHIT表面タンパク質を検出した。(C)形質導入の4日後にFACSによって解析された平均CAR/HIT平均蛍光強度(MFI)($n=6$ 回の独立した実験)。

40

【0030】

【図7】図7A～図7Bは、低い抗原レベルを発現する標的細胞の死滅において、HIT T細胞が、CAR T細胞よりも優れていることを示す。NALM6細胞系(ホタルル

50

シフェラーゼを発現する)を、CRISPR/Cas9を使用してCD19遺伝子座において遺伝子編集し、異なるCD19レベルを発現するクローンを生成した。(A)各CD19発現レベル群の代表的NALM6クローンのFACS解析(Neg=陰性)。(B)異なるCD19レベルを発現する標的細胞としてのNALM6、およびCAR(赤い四角)またはHIT(青い丸)T細胞を1:1エフェクター(E):標的(T)比で使用した、4時間生物発光アッセイを使用した細胞傷害活性。

【0031】

【図8】図8A~図8Cは、低い抗原レベルを発現する標的細胞の死滅において、HIT T細胞が、CAR T細胞よりも優れていることを示す。異なるエフェクター(E):標的(T)比で、形質導入されていないT細胞(A)、CAR T細胞(B)およびHIT T細胞(C)と共にインキュベートした、異なるCD19レベル(右に示す)を発現する標的細胞としてのNALM6を使用した、18時間生物発光アッセイを使用した細胞傷害活性。

10

【0032】

【図9】図9A~図9Dは、非常に低いCD19レベルを有する確立されたB-ALL腫瘍の制御において、共刺激リガンドを発現するHIT T細胞が、CAR T細胞よりも優れていることを示す。NALM-6を有するマウスを、 4×10^5 個の形質導入されていない(NT)、CARまたはHIT T細胞で処置した。BLIを使用して、54日間の期間にわたって毎週、腫瘍負荷を定量化した。定量化は、所与の全時点における動物1匹当たりの腹側および背側取得の平均光子数である。各線は、1匹のマウスを表し、1群当たり $n = 5$ 匹のマウスである。(A)形質導入されていない(黒)対CAR(赤)T細胞。(B)CAR(赤)対HIT(緑)T細胞。(C)HIT単独(緑)、HIT+CD80共刺激リガンド(橙)、HIT+41BBL共刺激リガンド(桃)またはHIT+CD80+41BBL共刺激リガンド(青)を発現するT細胞。(D)マウス生存解析。

20

【0033】

【図10】図10A~図10Cは、抗原遭遇後の細胞表面補完動態に影響を与えることなく、別個の3'UTR配列によってベースラインTRAC-CAR発現を制御することができることを示す。(A)TRAC遺伝子座への、CRISPR/Cas9により標的化されたCAR遺伝子組込み。標的化構築物(AAV)は、TRAC遺伝子座に相同な配列(LHAおよびRHA、左および右相同性アーム)に挟まれた、1928z CARコード配列と、それに続く3'UTR配列を含有する。(B)各3'UTR配列は、異なるCAR表面レベルをもたらす(FACSによって測定)。TK:チミジンキナーゼ(短いバージョン);GCSF:pEF-BOSプラスミドに由来するヒトGCSF;TCRa:TCRアルファ、エクソン4;HBB:ヒトB-グロビン;RBG:ウサギB-グロビン;SV40:サルウイルス40ポリA;P2A:ブタテッショウウイルス-1自己切断2A配列;これは、内因性TRACポリA配列の使用を可能にした。(C)CAR T細胞を、CD19発現3T3細胞により1回刺激し(赤い矢印で示す)、3日間の期間にわたって24時間毎にCAR MFIを測定した。全CAR T細胞が、同様のCAR発現調節を示す。

30

40

【発明を実施するための形態】

【0034】

本開示の主題は、HLA非依存的に目的の抗原に結合する、HLA非依存的(または非HLA制限)T細胞受容体(「HI-TCR」と称される)を提供する。ある特定の実施形態では、HI-TCRは、TCR可変ドメインが抗体由来の可変ドメイン(Fv)によって置き換えられてFvTCRをもたらす、TCR分子である。ある特定の非限定的な実施形態では、HI-TCRは、腫瘍抗原または病原体抗原に結合することができる。本開示の主題は、また、本開示のHI-TCRを含む遺伝子改変された免疫応答性細胞(例えば、T細胞、NK細胞またはCTL細胞)を含む細胞を提供する。ある特定の非限定的な実施形態では、HI-TCRによる抗原の結合は、免疫応答性細胞を活性化することが

50

できる。本開示の主題は、また、標的抗原に対する免疫応答を誘導および／もしくは増強する、ならびに／または抗原特異的免疫応答の増加が望まれる新生物もしくは他の疾患／障害を処置および／もしくは防止するために、そのような細胞を使用する方法を提供する。

【 0 0 3 5 】

1 . 定義

別段の定義のない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。以下の参考文献は、本開示の主題において使用される多くの用語の一般的定義を当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(2nd ed. 1994) ; The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker ed.,1988) ; The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), SpringerVerlag (1991) ; およびHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。本明細書で使用される場合、以下の用語は、別段の特定のない限り、以下のものに帰する意味を有する。

10

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される場合、用語「約」または「およそ」は、当業者によって決定される特定の値に関する許容される誤差の範囲内であることを意味し、その値がどのように測定または決定されるか、すなわち、測定系の限界に一部依存するであろう。例えば、「約」は、当技術分野における実務あたり、3標準偏差以内または3を超える標準偏差以内を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の約20%まで、例えば、約10%まで、約5%まで、または約1%までの範囲を意味してもよい。あるいは、特に生物システムまたはプロセスに関して、この用語は、ある値の1桁の範囲内、例えば、約5倍以内または約2倍以内を意味してもよい。

20

【 0 0 3 7 】

「免疫応答性細胞を活性化する」とは、免疫応答の開始をもたらす細胞中でのシグナル伝達の誘導またはタンパク質の変化を意味する。例えば、CD3鎖が、リガンド結合および免疫受容抑制性チロシンモチーフ(ITAM)に反応してクラスター化する場合、シグナル伝達カスケードが産生される。ある特定の形態では、内因性TCRまたは外因性CARが抗原に結合する場合、結合した受容体(例えば、CD4またはCD8、CD3 / / / など)の近くで多くの分子のクラスター化を含む免疫学的シナプスの形成が起こる。膜結合型シグナル伝達分子のこのクラスター化により、CD3鎖内に含有されるITAMモチーフはリン酸化されるようになる。このリン酸化は次に、T細胞活性化経路を開始させ、最終的にはNF- κ BおよびAP-1などの転写因子を活性化する。これらの転写因子は、T細胞の全体的な遺伝子発現を誘導して、マスター調節性T細胞タンパク質の増殖および発現のためのIL-2産生を増加させ、T細胞媒介性免疫応答を開始させる。

30

【 0 0 3 8 】

「免疫応答性細胞を刺激する」とは、ロバストかつ持続的な免疫応答をもたらすシグナルを意味する。様々な形態では、これは、免疫細胞(例えば、T細胞)活性化後に起こるか、または限定されるものではないが、CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40およびICOSを含む受容体を介して同時に媒介される。複数の刺激シグナルを受け取ることが、ロバストかつ長期間のT細胞媒介性免疫応答を開始させるのに重要であり得る。T細胞は、急速に阻害され、抗原に対して非応答性になり得る。これらの共刺激シグナルの効果は変化してもよいが、それらは一般的には、完全かつ持続的な根絶のために抗原にロバストに反応する、長期に生存し、増殖し、抗アポトーシス性のT細胞を生成するために遺伝子発現の増加をもたらす。

40

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用される用語「抗原認識受容体」とは、抗原へのその結合に反応して免疫または免疫応答性細胞(例えば、T細胞)を活性化することができる受容体を指す。抗原認識受容体の非限定例としては、天然または内因性のT細胞受容体(「TCR」)、およ

50

びキメラ抗原受容体(「CAR」)が挙げられる。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、無傷抗体分子だけでなく、免疫原結合能力を保持する抗体分子の断片も意味する。そのような断片もまた当技術分野で周知であり、*in vitro*と*in vivo*の両方で通常用いられる。したがって、本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、無傷免疫グロブリン分子だけでなく、周知の活性断片F(ab')₂、およびFabも意味する。F(ab')₂、および無傷抗体のFc断片を欠くFab断片は、循環からより急速に消失し、無傷抗体の低い非特異的組織結合を有してもよい(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983))。本明細書で使用される場合、抗体は、天然抗体全体、二重特異性抗体；キメラ抗体；Fab、Fab'、単鎖V領域断片(scFv)、融合ポリペプチド、および非定型抗体を含む。ある特定の実施形態では、抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重鎖(H)および2つの軽鎖(L)を含む糖タンパク質である。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域(本明細書でV_Hと省略)および重鎖定常(C_H)領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3から構成される。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書でV_Lと省略)および軽鎖定常C_L領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C_Lから構成される。V_HおよびV_L領域を、より保存された、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域が散在する、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変領域にさらに細分することができる。それぞれのV_HおよびV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下の順序で配置された3個のCDRと4個のFRとをから構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1の成分(C1q)を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

10

20

30

40

50

【0041】

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

【0042】

本明細書で使用される場合、用語「単鎖可変断片」または「scFv」は、V_H：：V_Lヘテロ二量体を形成するように共有結合的に連結された免疫グロブリンの重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)の可変領域の融合タンパク質である。V_HおよびV_Lは、直接連結されるか、またはV_HのN末端を、V_LのC末端と接続する、もしくはV_HのC末端を、V_LのN末端と接続する、ペプチドをコードするリンカー(例えば、10、15、20、25個のアミノ酸)によって連結される。リンカーは通常、可撓性のためにグリシンに富み、可溶性のためにセリンまたはトレオニンに富む。定常領域の除去およびリンカーの導入にも拘わらず、scFvタンパク質は、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。単鎖Fvポリペプチド抗体を、Huston, et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)によって記載されたV_HおよびV_Lをコードする配列を含む核酸から発現させることができる。また、米国特許第5,091,513号、第5,132,405号および第4,956,778号；ならびに米国特許出願公開第20050196754号および第20050196754号も参照されたい。阻害活性を有するアンタゴニストscFvが記載されている(例えば、Zhao et al., Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et

al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40を参照されたい)。刺激活性を有するアゴニスト s c F v が記載されている (例えば、Peter et al., J Biochem 2003 25278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66を参照されたい)。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、結合強度の尺度を意味する。親和性は、抗体結合部位と抗原決定基との間の立体化学的適合の近さ、それらの間の接触領域のサイズ、ならびに / または荷電した基および疎水性の基の分布に依存してもよい。本明細書で使用される場合、用語「親和性」はまた、可逆性複合体の形成後の抗原 - 抗体結合の強度を指す「アビディティ」も含む。抗原に対する抗体の親和性を算出するための方法は、当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、様々な抗原結合実験、例えば、機能的アッセイ (例えば、フローサイトメトリーアッセイ) が挙げられる。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される用語「キメラ抗原受容体」または「CAR」は、免疫応答性細胞を活性化または刺激することができる細胞内シグナル伝達ドメインに融合された細胞外抗原結合ドメイン、および膜貫通ドメインを含む分子を指す。ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは、s c F vを含む。s c F vを、抗体の可変重鎖および軽鎖領域を融合することから誘導することができる。あるいは、またはさらに、s c F vは、F a b ' に由来してもよい (抗体に由来する代わりに、例えば、F a b ライブラリーから得られる)。ある特定の実施形態では、s c F vを膜貫通ドメインに融合した後、細胞内シグナル伝達ドメインに融合する。ある特定の実施形態では、CARは、抗原に対する高い結合親和性またはアビディティを有する。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される場合、用語「核酸分子」は、目的のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子を含む。そのような核酸分子は、内因性核酸配列と100%相同または同一である必要はないが、実質的な同一性を示してもよい。内因性配列に対して「実質的な同一性」または「実質的な相同性」を有するポリヌクレオチドは、典型的には、二本鎖核酸分子の少なくとも一方の鎖とハイブリダイズすることができる。「ハイブリダイズする」とは、様々なストリンジェンシー条件下で、相補的ポリヌクレオチド配列 (例えば、本明細書に記載の遺伝子)、またはその一部との間で二本鎖分子を形成する対を意味する。(例えば、Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507を参照されたい)。

【 0 0 4 6 】

例えば、ストリンジェントな塩濃度は、通常、約750 mM未満のNaClおよび75 mM未満のクエン酸三ナトリウム、例えば、約500 mM未満のNaClおよび50 mM未満のクエン酸三ナトリウム、または約250 mM未満のNaClおよび25 mM未満のクエン酸三ナトリウムであろう。低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは、有機溶媒、例えば、ホルムアミドの非存在下で得られるが、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは、少なくとも約35%のホルムアミド、例えば、少なくとも約50%のホルムアミドの存在下で得られる。ストリンジェントな温度条件は、通常、少なくとも約30 °C、少なくとも約37 °C、または少なくとも約42 °Cの温度を含むであろう。ハイブリダイゼーション時間、界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の濃度、および担体DNAの含有または排除などの、変化する追加のパラメーターは、当業者には周知である。必要に応じてこれらの様々な条件を組み合わせることによって、様々なレベルのストリンジェンシーが達成される。ある特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションは、750 mM NaCl、75 mMクエン酸三ナトリウム、および1% SDS中

10

20

30

40

50

、30で行われる。ある特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションは、500mM NaCl、50mMクエン酸三ナトリウム、1%SDS、35%ホルムアミド、および100 μ g/ml変性サケ精子DNA(ssDNA)中、37で行われる。ある特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションは、250mM NaCl、25mMクエン酸三ナトリウム、1%SDS、50%ホルムアミド、および200 μ g/ml ssDNA中、42で行われる。これらの条件に対する有用な変形形態は、当業者には容易に明らかとなるであろう。

【0047】

多くの適用について、ハイブリダイゼーション後の洗浄ステップも、ストリンジェンシーが変化するであろう。洗浄ストリンジェンシー条件を、塩濃度によっておよび温度によって定義することができる。上述のように、洗浄ストリンジェンシーを、塩濃度を低下させることによって、または温度を上昇させることによって増加させることができる。例えば、洗浄ステップのためのストリンジェントな塩濃度は、約30mM未満のNaClおよび3mM未満のクエン酸三ナトリウム、例えば、約15mM未満のNaClおよび1.5mM未満のクエン酸三ナトリウムであってよい。洗浄ステップのためのストリンジェントな温度条件は通常、少なくとも約25、少なくとも約42、または少なくとも約68

の温度を含むであろう。ある特定の実施形態では、洗浄ステップは、30mM NaCl、3mMクエン酸三ナトリウム、および0.1%SDS中、25で行われる。ある特定の実施形態では、洗浄ステップは、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム、および0.1%SDS中、42で行われる。ある特定の実施形態では、洗浄ステップは、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム、および0.1%SDS中、68で行われる。これらの条件に対する追加の変形形態は、当業者には容易に明らかとなるであろう。ハイブリダイゼーション技術は、当業者には周知であり、例えば、Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Rogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

【0048】

「実質的に同一」または「実質的に相同」とは、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか1つ）または核酸配列（例えば、本明細書に記載の核酸配列のいずれか1つ）に対して少なくとも約50%の相同性または同一性を示すポリペプチドまたは核酸分子を意味する。ある特定の実施形態では、そのような配列は、比較のために使用されるアミノ酸または核酸の配列と少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、または少なくとも約100%相同または同一である。

【0049】

配列同一性を、配列分析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705、BLAST、BESTFIT、GAP、またはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を使用することによって測定することができる。そのようなソフトウェアは、様々な置換、欠失、および/または他の改変に対して相同性の程度を割り当てることによって、同一の、または類似する配列を一致させる。保存的置換は、典型的には、以下の群：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン内の置換を含む。同一性の程度を決

10

20

30

40

50

定するための例示的な手法では、BLASTプログラムを、密接に関連する配列を示す e - 3 ~ e - 100 の確率スコアと共に使用することができる。

【0050】

「アナログ」とは、参照ポリペプチドまたは核酸分子の機能を有する構造的に関連するポリペプチドまたは核酸分子を意味する。

【0051】

本明細書で使用される用語「リガンド」とは、受容体に結合する分子を指す。ある特定の実施形態では、リガンドは、別の細胞上の受容体に結合し、細胞間認識および/または相互作用を可能にする。

【0052】

本明細書で使用される用語「構成的発現」または「構成的に発現される」とは、あらゆる生理的条件下での発現または発現されることを指す。

【0053】

「疾患」とは、細胞、組織、または臓器の正常な機能を損傷または妨害する任意の状態、疾患または障害、例えば、新生物、および細胞の病原体感染を意味する。

【0054】

「有効量」とは、治療効果を有するのに十分な量を意味する。ある特定の実施形態では、「有効量」は、新生物の継続的な増殖、成長、または転移（例えば、侵入、または遊走）を停止、改善または阻害するのに十分な量である。

【0055】

「寛容を強制すること」とは、移植された臓器または組織を標的とする自己反応性細胞または免疫応答性細胞の活性を防止することを意味する。

【0056】

「内因性」とは、細胞または組織中で通常発現される核酸分子またはポリペプチドを意味する。

【0057】

「外因性」とは、細胞中に内因性に存在しない、または過剰発現されたとき得られる機能的効果を達成するのに十分なレベルで存在しない核酸分子またはポリペプチドを意味する。したがって、用語「外因性」は、外来の、異種の、過剰発現される核酸分子およびポリペプチドなどの、細胞中で発現される任意の組換え核酸分子またはポリペプチドを包含する。「外因性」核酸とは、天然の野生型細胞中には存在しない核酸を意味し；例えば、外因性核酸は、配列によって、位置/場所によって、またはその両方によって内因性対応物と異なってもよい。明確性のために、外因性核酸は、その天然の内因性対応物と比較して同じか、または異なる配列を有してもよく；それを、遺伝子操作によって、細胞自体またはその前駆細胞に導入することができ、必要に応じて、非天然プロモーターまたは分泌配列などの、代替的な制御配列に連結してもよい。

【0058】

「異種核酸分子またはポリペプチド」とは、細胞または細胞から得られた試料中に通常は存在しない核酸分子（例えば、cDNA、DNAもしくはRNA分子）またはポリペプチドを意味する。この核酸は、別の生物に由来してもよいが、またはそれは例えば、細胞もしくは試料中で通常は発現されないmRNA分子であってもよい。

【0059】

「免疫応答性細胞」は、免疫応答において機能する細胞、またはその前駆細胞もしくは子孫を意味する。

【0060】

「モジュレートする」とは、正または負に変更することを意味する。例示的なモジュレーションとしては、約1%、約2%、約5%、約10%、約25%、約50%、約75%、または約100%の変化が挙げられる。

【0061】

「増加」とは、少なくとも約5%正に変更することを意味する。変更は、約5%、約1

10

20

30

40

50

0%、約25%、約30%、約50%、約75%、約100%またはそれより高くてもよい。

【0062】

「減少」とは、少なくとも約5%負に変更することを意味する。変更は、約5%、約10%、約25%、約30%、約50%、約75%、またはさらには約100%であってもよい。

【0063】

「単離された細胞」とは、細胞に天然に付随する分子および/または細胞成分から分離された細胞を意味する。

【0064】

用語「単離された」、「精製された」または「生物学的に純粋な」とは、その天然状態で見出されるような通常はそれに伴う成分を変化する程度で含まない材料を指す。「単離する」は、元の供給源またはその周囲のものからの分離の程度を示す。「精製する」は、単離よりも高い分離の程度を示す。「精製された」または「生物学的に純粋な」タンパク質は、不純物がタンパク質の生物学的特性に実質的に影響しない、または他の有害な結果を引き起こさないように十分に、他の材料を含まない。すなわち、核酸またはペプチドは、それが組換えDNA技術によって生産される場合には細胞材料、ウイルス材料、もしくは培養培地、または化学的に合成される場合には化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない場合、精製されている。純度および均一性は、典型的には、分析化学技術、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを使用して決定される。用語「精製された」は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲル中で本質的には1つのバンドを生じることを示してもよい。改変、例えば、リン酸化またはグリコシル化にかけることができるタンパク質については、異なる改変は、別々に精製することができる、異なる単離されたタンパク質を生じてもよい。

【0065】

本明細書で使用される用語「抗原結合ドメイン」とは、細胞上に存在する特定の抗原決定基または抗原決定基のセットに特異的に結合することができるドメインを指す。

【0066】

本明細書で使用される場合、「リンカー」は、2つまたはそれより多いポリペプチドまたは核酸を、それらが互いに接続されるように共有結合的に結合させる官能基（例えば、化学物質またはポリペプチド）を意味するべきである。本明細書で使用される場合、「ペプチドリンカー」とは、2つのタンパク質を一緒にカップリングさせる（例えば、 V_H および V_L ドメインをカップリングさせる）ために使用される1つまたは複数のアミノ酸を指す。ある特定の実施形態では、リンカーは、GGGGSGGGGS（配列番号31）に記載の配列を含む。

【0067】

「新生物」とは、細胞または組織の病理学的増殖および他の組織または臓器へのその後の遊走または侵入を特徴とする疾患を意味する。新生物増殖は、典型的には、制御されず、進行性であり、正常細胞の複製を惹起しない、またはその停止を引き起こす条件下で起こる。新生物は、限定されるものではないが、膀胱、骨、脳、乳房、軟骨、グリア、食道、卵管、胆嚢、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、神経組織、卵巣、膵臓、前立腺、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿生殖路、尿管、尿道、子宮、および腔からなる群より選択される臓器、またはその組織もしくは細胞型を含む、様々な細胞型、組織、または臓器に影響し得る。新生物は、肉腫、癌腫、または形質細胞腫（形質細胞の悪性腫瘍）などのがんを含む。ある特定の実施形態では、新生物は、固形腫瘍である。

【0068】

本開示の主題を使用することができる例示的な新生物として、白血病（例えば、急性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢

10

20

30

40

50

性骨髄球性白血病、慢性リンパ球性白血病)、真性多血症、リンパ腫(ホジキン病、非ホジキン病)、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、ならびに肉腫および癌腫などの固形腫瘍(例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸部がん、子宮がん、精巣がん、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、シュワン腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫および網膜芽腫)が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0069】

「受容体」とは、1つまたは複数のリガンドに選択的に結合する細胞膜上に存在するポリペプチド、またはその一部を意味する。

【0070】

「認識する」とは、標的に選択的に結合することを意味する。腫瘍を認識するT細胞は、腫瘍抗原に結合する受容体(例えば、TCRまたはCAR)を発現することができる。

【0071】

「参照」または「対照」とは、比較の基準を意味する。例えば、CARおよびscFvを発現する細胞によるscFv-抗原結合のレベルを、CARのみを発現する対応する細胞中でのscFv-抗原結合のレベルと比較することができる。

20

【0072】

「分泌される」とは、小胞体、ゴルジ体を通る分泌経路によって、および細胞形質膜で一過的に融合する小胞として細胞から放出され、タンパク質を細胞の外部に放出するポリペプチドを意味する。

【0073】

「シグナル配列」または「リーダー配列」とは、分泌経路へのその進入を指令する新しく合成されたタンパク質のN末端に存在するペプチド配列(例えば、5、10、15、20、25または30アミノ酸)を意味する。例示的なリーダー配列としては、限定されるものではないが、IL-2シグナル配列:MYRMQLLSCLALSLLAVTNS(配列番号12)(ヒト)、MYSMQLASCVTLLVLLVNS(配列番号13)(マウス);カップリーダー配列:METPAQLFLLLWLPD TTG(配列番号14)(ヒト)、METDTLLLVVLLLVVPGSTG(配列番号15)(マウス);CD8リーダー配列:MALPVTALLLPLALLLHARP(配列番号16)(ヒト);トランケートされたヒトCD8シグナルペプチド:MALPVTALLLPLALLLHAA(配列番号28)(ヒト);アルブミンシグナル配列:MKWVTFISLLFSSAYS(配列番号29)(ヒト);およびプロラクチンシグナル配列:MDSKGSSQKGSRLLLLVVSNLLLCQGVVS(配列番号30)(ヒト)が挙げられる。「可溶性」とは、水性環境中で自由に拡散し得る(例えば、膜に結合していない)ポリペプチドを意味する。

30

40

【0074】

「特異的に結合する」とは、目的の生体分子(例えば、ポリペプチド)を認識し、これに結合するが、試料、例えば、本開示のポリペプチドを天然に含む生体試料中の他の分子を実質的に認識せず、これに結合しないポリペプチドまたはその断片を意味する。

【0075】

本明細書で使用される用語「腫瘍抗原」とは、正常な、または非IS新生物細胞と比較して腫瘍細胞上でユニークに、または示差的に発現される抗原(例えば、ポリペプチド)を指す。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、抗原認識受容体を介して免疫応答を活性化もしくは誘導することができる(例えば、CD19、MUC-16)または受容体-リガンド結合を介して免疫応答を抑制することができる(例えば、CD47、PD-L1/

50

L 2、B 7 . 1 / 2) 腫瘍によって発現される任意のポリペプチドを含む。

【 0 0 7 6 】

用語「含む (c o m p r i s e s)」、「含む (c o m p r i s i n g)」は、米国特許法においてそれらに帰する広い意味を有することが意図され、「含む (i n c l u d e s)」、「含む (i n c l u d i n g)」などを意味してもよい。

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用される場合、「処置」とは、処置される個体または細胞の疾患経過を変更する試みにおける臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の経過中に実施することができる。処置の治療効果としては、限定されるものではないが、疾患の発症または再発の防止、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の縮小、転移の防止、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後の改善が挙げられる。疾患または障害の進行を防止することによって、処置は、罹患した、もしくは診断された被験体または障害を有することが疑われる被験体における障害に起因する悪化を防止することができるだけでなく、処置は、障害のリスクがある、または障害を有することが疑われる被験体における障害または障害の症状の開始を防止することもできる。

10

【 0 0 7 8 】

本明細書における「個体」または「被験体」は、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、哺乳動物などの脊椎動物である。哺乳動物としては、これらに限定されないが、ヒト、霊長類、家畜、競技用動物 (s p o r t a n i m a l)、齧歯類およびペットが挙げられる。非ヒト動物被験体の非限定的な例としては、マウス、ラット、ハムスターおよびモルモットなどの齧歯類、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、ならびに類人猿およびサルなどの非ヒト霊長類が挙げられる。

20

【 0 0 7 9 】

用語「免疫無防備状態の」は、本明細書で使用される場合、免疫不全である被験体を指す。この被験体は、健康な免疫系を有する人物において疾患を通常は引き起こさないが、不十分に機能するまたは抑制された免疫系を有する人々を冒すことができる生物に起因する感染である、日和見感染に対して非常に脆弱である。

【 0 0 8 0 】

本開示の主題の他の態様は、以下の開示に記載され、本開示の主題の範囲内にある。

30

【 0 0 8 1 】

2 . H L A 非依存的 T 細胞受容体 (H I - T C R)

本開示は、H L A 非依存的に目的の抗原に結合する H I - T C R を提供する。ある特定の非限定的な実施形態では、抗原の結合は、H I - T C R を含む免疫応答性細胞を活性化することができる。ある特定の非限定的な実施形態では、H I - T C R は、抗原結合鎖を含む。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、細胞外抗原結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、マウス、ヒトまたはラクダ科 (例えば、ラマ) 起源の s c F v 、 F a b または抗体に由来する。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、定常ドメインをさらに含む。

40

【 0 0 8 2 】

2 . 1 . 抗原

ある特定の実施形態では、H I - T C R は、腫瘍抗原に結合する。任意の腫瘍抗原 (抗原性ペプチド) を、本明細書に記載の腫瘍関連実施形態において使用することができる。抗原の供給源としては、限定されるものではないが、がんタンパク質が挙げられる。抗原を、ペプチドとして、または無傷タンパク質もしくはその一部として発現させることができる。無傷タンパク質またはその一部は、天然であっても、または変異誘発されていてもよい。腫瘍抗原の非限定例としては、炭酸脱水酵素 I X (C A I X)、がん胎児抗原 (C E A)、C D 8、C D 7、C D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C L L 1、C D 3 4、C D 3 8、C D 4 1、C D 4 4、C D 4 9 f、C D 5 6、C D 7 4、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 1 2 3、C D 4 4 V 6、サイトメガロウイルス (C

50

MV)に感染した細胞の抗原(例えば、細胞表面抗原)、上皮糖タンパク質-2(EGP-2)、上皮糖タンパク質-40(EGP-40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、受容体チロシンタンパク質キナーゼerb-B2、3、4(erb-B2、3、4)、葉酸結合タンパク質(FBP)、胎児アセチルコリン受容体(ACHR)、葉酸受容体、ガングリオシドG2(GD2)、ガングリオシドG3(GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER-2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2(IL-13R2)、軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体(KDR)、Lewis Y(LeY)、L1細胞接着分子(L1CAM)、黒色腫抗原ファミリーA、1(MAGE-A1)、ムチン16(MUC16)、ムチン1(MUC1)、メソテリン(MSLN)、ERBB2、MAGEA3、p53、MART1、GP100、プロテインナーゼ3(PR1)、チロシナーゼ、サバイピン、hTERT、EphA2、NKGD2リガンド、がん精巢抗原NY-ESO-1、がん胎児抗原(h5T4)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、ROR1、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72)、血管内皮増殖因子R2(VEGF-R2)、およびウィルムス腫瘍タンパク質(WT-1)、BCMA、NKCS1、EGFR、EGFR-VIII、CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、LILRB4、PRAMEおよびERBBが挙げられる。

10

【0083】

ある特定の実施形態では、HI-TCRは、CD19に結合する。ある特定の実施形態では、HI-TCRは、ヒトCD19ポリペプチドに結合する。ある特定の実施形態では、ヒトCD19ポリペプチドは、配列番号11に記載のアミノ酸配列を含む。

20

【0084】

【化1】

PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQM
GGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDR
PEIWEGEPPCLPPRDSLNSQLSODLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDPRP
ARDMWMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWK [配列番号

11]

【0085】

ある特定の実施形態では、HI-TCRは、CD19タンパク質の細胞外ドメインに結合する。

30

【0086】

ある特定の実施形態では、HI-TCRは、例えば、免疫無防備状態の被験体における、病原体感染または他の感染症の処置および/または防止における使用のために、病原体抗原に結合する。病原体の非限定例としては、疾患を引き起こし得るウイルス、細菌、真菌、寄生生物および原生動物が挙げられる。

【0087】

ウイルスの非限定的な例としては、Retroviridae(例えば、HIV-1(HDTV-III、LAVEまたはHTLV-III/LAVとも称される)またはHIV-III、およびHIV-LPなどの他の単離菌など、ヒト免疫不全ウイルス); Picornaviridae(例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス; エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス)、Calciviridae(例えば、胃腸炎を引き起こす株)、Togaviridae(例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス)、Flaviridae(例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス)、Coronaviridae(例えば、コロナウイルス)、Rhabdoviridae(例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス)、Filoviridae(例えば、エボラウイルス)、Paramyxoviridae(例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルス)、Orthomyxoviridae(例えば、インフルエンザウイルス)、B

40

50

unyaviridae (例えば、ハンタンウイルス、ブニヤ (bunga) ウイルス、フレボウイルスおよびナイロ (Nairo) ウイルス)、Arenaviridae (出血熱ウイルス)、Reoviridae (例えば、レオウイルス、オルビウイルス (orbiviruses) およびロタウイルス)、Birnaviridae、Hepadnaviridae (B型肝炎ウイルス)、Parvoviridae (パルボウイルス)、Papovaviridae (パピローマウイルス、ポリオーマウイルス)、Adenoviridae (大部分のアデノウイルス)、Herpesviridae (単純ヘルペスウイルス (HSV) 1 および 2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、ヘルペスウイルス)、Poxviridae (痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス)、および Iridoviridae (例えば、アフリカブタ熱ウイルス)、ならびに未分類ウイルス (例えば、デルタ肝炎の病原因子 (B型肝炎ウイルスの欠損サテライトであると考えられる)、非A、非B型肝炎の病原因子 (クラス1 = 内部的に伝染、クラス2 = 非経口的に伝染 (すなわち、C型肝炎)、ノーウォークおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス) が挙げられる。

10

【0088】

細菌の非限定的な例としては、Pasteurella、Staphylococci、Streptococcus、Escherichia coli、Pseudomonas 種および Salmonella 種が挙げられる。感染性細菌の具体例としては、これらに限定されないが、Helicobacter pylori、Borrelia burgdorferi、Legionella pneumophila、Mycobacteria sps (例えば、M. tuberculosis、M. avium、M. intracellulare、M. kansasii、M. goodii)、Staphylococcus aureus、Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Listeria monocytogenes、Streptococcus pyogenes (A群連鎖球菌)、Streptococcus agalactiae (B群連鎖球菌)、Streptococcus (緑色連鎖球菌 (viridans) 群)、Streptococcus faecalis、Streptococcus bovis、Streptococcus (嫌気性 sps.)、Streptococcus pneumoniae、病原性 Campylobacter sp.、Enterococcus sp.、Haemophilus influenzae、Bacillus anthracis、Corynebacterium diphtheriae、Corynebacterium sp.、Erysipelothrix rhusiopathiae、Clostridium perfringens、Clostridium tetani、Enterobacter aerogenes、Klebsiella pneumoniae、Pasteurella multocida、Bacteroides sp.、Fusobacterium nucleatum、Streptobacillus moniliformis、Treponema pallidum、Treponema pertenue、Leptospira、Rickettsia および Actinomyces israelii が挙げられる。

20

30

40

【0089】

ある特定の実施形態では、病原体抗原は、サイトメガロウイルス (CMV) に存在するウイルス抗原、エプスタイン・バーウイルス (EBV) に存在するウイルス抗原、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に存在するウイルス抗原、またはインフルエンザウイルスに存在するウイルス抗原である。

【0090】

2.2. 細胞外抗原結合ドメイン

ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、細胞外抗原結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、抗原、例えば、腫瘍抗原または病原体抗原、例えば、節 2.1 に開示されている抗原に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、

50

細胞外抗原結合ドメインは、別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化する（例えば、可変断片（Fv）を形成する）ことができ、二量体化された抗原結合ドメイン（例えば、Fv）は、抗原、例えば、腫瘍抗原または病原体抗原に特異的に結合する。

【0091】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、細胞表面受容体のリガンドを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、細胞表面リガンドの受容体を含む。

【0092】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、抗原、例えば、腫瘍抗原または病原体抗原に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、別の抗原結合鎖と二量体を形成することができる。ある特定の実施形態では、HI-TCRは、2個の異なる抗原結合鎖を含むヘテロ二量体を含む。ある特定の実施形態では、HI-TCRは、2個の同一の抗原結合鎖を含むホモ二量体を含む。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、1個または複数のジスルフィド連結を介して二量体化する。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、1個または複数の同一のまたは異なる抗原結合鎖と三量体またはオリゴマーを形成することができる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化する（例えば、可変断片（Fv）を形成する）ことができ、二量体化された抗原結合ドメイン（例えば、Fv）は、抗原、例えば、腫瘍抗原または病原体抗原に特異的に結合する。

10

【0093】

ある特定の非限定的な実施形態では、HI-TCRの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、Fvまたはそのアナログ）は、約 2×10^{-7} Mまたはそれ未満の解離定数（ K_d ）で抗原に結合する。ある特定の実施形態では、 K_d は、約 2×10^{-7} Mもしくはそれ未満、約 1×10^{-7} Mもしくはそれ未満、約 9×10^{-8} Mもしくはそれ未満、約 1×10^{-8} Mもしくはそれ未満、約 9×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 5×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 4×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 3×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 2×10^{-9} Mもしくはそれ未満、または約 1×10^{-9} Mもしくはそれ未満である。ある特定の非限定的な実施形態では、 K_d は、約 3×10^{-9} Mまたはそれ未満である。ある特定の非限定的な実施形態では、 K_d は、約 1×10^{-9} M ~ 約 3×10^{-7} Mである。ある特定の非限定的な実施形態では、 K_d は、約 1.5×10^{-9} M ~ 約 3×10^{-7} Mである。ある特定の非限定的な実施形態では、 K_d は、約 1.5×10^{-9} M ~ 約 2.7×10^{-7} Mである。

20

30

【0094】

細胞外抗原結合ドメインの結合（例えば、Fvまたはそのアナログ中での）を、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、FACS分析、バイオアッセイ（例えば、増殖阻害）、またはウェスタンブロットアッセイによって確認することができる。これらのアッセイはそれぞれ、一般的には、目的の複合体に特異的な標識された試薬（例えば、抗体、またはFv）を用いることによって、特定の目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えば、Fvを放射標識し、ラジオイムノアッセイ（RIA）において使用することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれるWeintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい）。放射性アイソトープを、カウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用などの手段によって、またはオートラジオグラフィーによって検出することができる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、蛍光マーカを用いて標識される。蛍光マーカ-非限定例としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、およびmKalamal）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ECFP、Cerulean、およびCypet）、および黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、Citrine、Venus、およびYPet）が挙げられる。

40

50

【0095】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、TCRの抗原結合部分を含む。

【0096】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、抗体の抗原結合部分またはその断片を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、抗体の重鎖可変領域(V_H)および/または軽鎖可変領域(V_L)を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、単鎖可変断片(scFv)を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、重鎖のみの抗体(VHH)を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、必要に応じて架橋されているFabを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、F(ab)₂を含む。ある特定の実施形態では、前記の分子のいずれかが、異種配列との融合タンパク質に含まれて、細胞外抗原結合ドメインを形成することができる。

10

【0097】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、抗体の重鎖可変領域(V_H)および/または軽鎖可変領域(V_L)を含み、V_HまたはV_Lは、VLまたはVHを含む別の細胞外抗原結合ドメインと二量体化する(例えば、可変断片(Fv)を形成する)ことができる。ある特定の実施形態では、Fvは、ヒトFvである。ある特定の実施形態では、Fvは、ヒト化Fvである。ある特定の実施形態では、Fvは、マウスFvである。ある特定の実施形態では、Fvは、抗原-Fc融合タンパク質によりFvファージライブラリーをスクリーニングすることにより同定される。

20

【0098】

関心のある抗原を標的とする追加的な細胞外抗原結合ドメインは、同じ抗原を標的とする既存のscFvまたは既存の抗体のFab領域を配列決定することにより得ることができる。

【0099】

ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRの二量体化された細胞外抗原結合ドメインは、マウスFvである。ある特定の実施形態では、二量体化された細胞外抗原結合ドメインは、ヒトCD19ポリペプチドに結合するFvである。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号9のアミノ酸配列を含み、ヒトCD19ポリペプチド(例えば、配列番号11に記載のアミノ酸配列を含むヒトCD19ポリペプチド)に特異的に結合するFvである。ある特定の実施形態では、配列番号9のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号10に記載されている。

30

【0100】

ある特定の実施形態では、Fvは、配列番号7に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H)を含む。ある特定の実施形態では、Fvは、配列番号8に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L)を含む。ある特定の実施形態では、Fvは、配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むV_Hおよび配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号7と少なくとも約80%(例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%)相同であるか、または同一アミノ酸配列を含むV_Hを含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号7と少なくとも約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%相同であるかまたは同一アミノ酸配列を含むV_Hを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むV_Hを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号8と少なくとも約80%(例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%)相同であるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号8と少なくとも約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約9

40

50

6%、約97%、約98%、または約99%相同であるかまたは同一であるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号7と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%）相同であるアミノ酸配列を含むV_H、および配列番号8と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%）相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むV_H、および配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。

【0101】

ある特定の実施形態では、Fvは、配列番号44に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_H）を含む。ある特定の実施形態では、Fvは、配列番号45に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_L）を含む。ある特定の実施形態では、Fvは、配列番号44に記載のアミノ酸配列を含むV_H、および配列番号45に記載のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号44と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%）相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Hを含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号44と少なくとも約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Hを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号44に記載のアミノ酸（amino）配列を含むV_Hを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号45と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%）相同であるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号45と少なくとも約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号45に記載のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号44と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%）相同であるアミノ酸配列を含むV_H、および配列番号45と少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%）相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号44に記載のアミノ酸配列を含むV_H、および配列番号45に記載のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。

【0102】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号1に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR1、配列番号2に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR2、および配列番号3に記載のアミノ酸配列、その保存的改変を含むV_H CDR3を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含むV_H CDR1、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むV_H CDR2、および配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むV_H CDR3を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号4に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR1、配列番号5に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR2、および配列番号6に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR3を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むV_L CDR1、配列番号5に記載のアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、

10

20

30

40

50

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む V_H CDR 1 またはその保存的改変、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む V_H CDR 2 またはその保存的改変、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含む V_H CDR 3 またはその保存的改変、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む V_L CDR 1 またはその保存的改変、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を含む V_L CDR 2 またはその保存的改変、および配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む V_L CDR 3 またはその保存的改変を含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号 1 に記載の配列を有するアミノ酸を含む V_H CDR 1、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む V_H CDR 2、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含む V_H CDR 3、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む V_L CDR 1、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を含む V_L CDR 2、および配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む V_L CDR 3 を含む。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

		抗ヒト CD19 scFv (SJ25C1)		
CDR		1	2	3
V _H	a.a.	GYAFSS [配列番号 1]	YPGDGD [配列番号 2]	KTISSVVDF [配列番号 3]
V _L	a.a.	KASQNVGTNVA [配列番号 4]	SATYRN [配列番号 5]	QQYNRYPYT [配列番号 6]
完全 V _H		EVKLQQSGAE LVRPGSSVKI SCKASGYAFS SYWMNWVKQR PGQGLEWIGQ IYPGDGDTNY NGKFKGQATL TADKSSSTAY MQLSGLTSED SAVYFCARKT ISSVVDFYFD YWQGGTTVTV SS [配列番号 7] EVKLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDT NYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWQGGT TVTV [配列番号 44]		
完全 V _L		DIELTQSPKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVG TNVAWYQQKP GQSPKPLIYS ATYRNSGVDP RFTGSGSGTD FTLTITNVQS KDLADYFCQQ YNRYPYTSGG GTKLEIKR [配列番号 8] DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGV PDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEI [配列番号 45]		
scFv		MALPVTALLL PLALLLHAEV KLQQSGAELV RPGSSVKISC KASGYAFSSY WMNWVKQRPG QGLEWIGQIY PGDGDNTYNG KFKGQATLTA DKSSSTAYMQ LSGLTSEDSA VYFCARKTIS SVVDFYFDYW GQGTTVTVSS GGGGSGGGGS GGGGSDIELT QSPKFMSTSV GDRVSVTCKA SQNVGTNVAW YQQKPGQSPK PLIYSATYRN SGVPDRFTGS GSGTDFTLTI TNVQSKDLAD YFCQQYNRY YTSGGGTKLE IKR [配列番号 9]		
DNA		ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGG TGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCCTCAGTGAAGATTTC CTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTACTGACTGATGAAGTGGTGAAGCAGAGG CCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACT ACAATGGAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGC CTACATGCAGCTCAGCGGCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGA AAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATC TGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTC AGCGTCACTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGA AACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGT CCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAAC GTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACA CGTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGG [配列番号 10]		

【0103】

本明細書で使用される場合、用語「保存的配列改変」とは、アミノ酸配列を含む本開示の HI - TCR の結合特性に有意に影響も変更もしないアミノ酸改変を指す。保存的改変は、アミノ酸置換、付加および欠失を含んでもよい。改変を、部位特異的変異誘発および

PCR 媒介性変異誘発などの、当技術分野で公知の標準的な技術によって本開示の H I - T C R の F V 中に導入することができる。アミノ酸を、電荷および極性などのその物理化学的特性に従って群に分類することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同じ群内のアミノ酸で置き換えられるものである。例えば、アミノ酸を電荷によって分類することができる：正に荷電したアミノ酸は、リシン、アルギニン、ヒスチジンを含み、負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸を含み、中性荷電アミノ酸は、アラニン、アスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンを含む。さらに、アミノ酸を、極性によって分類することができる：極性アミノ酸は、アルギニン（塩基性極性）、アスパラギン、アスパラギン酸（酸性極性）、グルタミン酸（酸性極性）、グルタミン、ヒスチジン（塩基性極性）、リシン（塩基性極性）、セリン、トレオニン、およびチロシンを含み；非極性アミノ酸は、アラニン、システイン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、およびバリンを含む。したがって、C D R 領域内の 1 つまたは複数のアミノ酸を、同じ群に由来する他のアミノ酸残基と置き換え、変更された抗体を、本明細書に記載の機能アッセイを使用して、保持された機能（すなわち、上の（c）から（l）に記載の機能）について試験することができる。ある特定の実施形態では、特定の配列または C D R 領域内の 1 個以下、2 個以下、3 個以下、4 個以下、5 個以下の残基が変更される。

10

20

30

40

50

【0104】

特定の配列（例えば、配列番号 7 および配列番号 8）に対する少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%（例えば、約 81%、約 82%、約 83%、約 84%、約 85%、約 86%、約 87%、約 88%、約 89%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、または約 99%）の相同性を有する V_H および / または V_L アミノ酸配列は、特定の配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有してもよいが、標的抗原（例えば、C D 19）に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計 1 ~ 10 個のアミノ酸が、特定の配列（例えば、配列番号 7 および配列番号 8）において置換、挿入および / または欠失される。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、細胞外抗原結合ドメインの C D R の外部の領域中（例えば、F R 中）に存在する。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、その配列（配列番号 7 および配列番号 8）の翻訳後改変を含む、配列番号 7 および配列番号 8 からなる群より選択される V_H および / または V_L 配列を含む。

【0105】

本明細書で使用される場合、2つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、2つの配列間の同一性パーセントと等価である。2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要がある、ギャップの数、およびそれぞれのギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一の位置の数の関数（すなわち、相同性% = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100）である。配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントの決定を、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。

【0106】

2つのアミノ酸配列間の相同性パーセントを、P A M 1 2 0 残基重み付け表、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを使用して、A L I G N プログラム（バージョン 2.0）に組み込まれた E . M e y e r s および W . M i l l e r のアルゴリズム（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)）を使用して決定することができる。さらに、2つのアミノ酸配列間の相同性パーセントを、B l o s s u m 6 2 マトリクスまたは P A M 2 5 0 マトリクスのいずれか、および 16、14、12、10、8、6 または 4 のギャップ重みおよび 1、2、3、4、5、または 6 の長さ重みを使用して、N e e d l e m a n および W u n s c h のアルゴリズム（J.Mol.Biol. 48:444-453 (1970)）を使

用して決定することができる。

【0107】

さらに、またはあるいは、本開示の主題のアミノ酸配列を、例えば、関連する配列を同定するために、公共データベースに対する検索を実行するための「クエリー配列」としてさらに使用することができる。そのような検索を、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して実行することができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実行して、本明細書に開示される特定の配列（例えば、scFv m903、m904、m905、m906、およびm900の重鎖および軽鎖可変領域配列）と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較のためのギャップ付きアラインメントを得るために、Gapped BLASTを、Altschuletal., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載のように使用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターを使用することができる。

10

【0108】

2.3. 定常ドメイン

ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、定常ドメインをさらに含む。ある特定の実施形態では、定常ドメインは、ヒンジ/スパー領域および膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態では、定常ドメインは、別の定常ドメインとホモ二量体またはヘテロ二量体を形成することができる。ある特定の実施形態では、定常ドメインは、1個または複数のジスルフィド連結を介して二量体化する。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、1個または複数の同一のまたは異なる定常ドメインと三量体またはオリゴマーを形成することができる。

20

【0109】

ある特定の非限定的な実施形態では、定常ドメインは、T細胞受容体定常領域、例えば、T細胞受容体アルファ定常領域（TRAC）、T細胞受容体ベータ定常領域（TRBC、例えば、TRBC1またはTRBC2）、T細胞受容体ガンマ定常領域（TRGC、例えば、TRGC1またはTRGC2）、T細胞受容体デルタ定常領域（TRDC）、またはその任意のバリエーションもしくは機能的断片を含む。

30

【0110】

ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRの定常ドメインは、天然または改変TRACペプチドを含む。ある特定の実施形態では、TRACポリペプチドは、以下に提供される配列番号38に記載のアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくは少なくとも約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含む、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

【化2】

IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFAC
ANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

40

[配列番号 38]

【0111】

ある特定の実施形態では、TRACポリペプチドは、NCBI Genbank ID: 28755、NG_001332.3、範囲925603~930229（以下に提供される配列番号29）の遺伝子によって発現される転写物によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくは少なくとも約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を有する、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくはは

50

3 個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

【化 3】

```

1  ataccagaa cctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt
61 ctgtctgcct attcaccgat tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg
121 atgtgtatat cacagacaaa actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca
181 gtgctgtggc ctggagcaac aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca
241 ttattccaga agacaccttc tccccagcc caggtaaggg cagctttggg gccttcgcag
301 gctgtttcct tgcttcagga atggccaggt tctgcccaga gctctggtca atgatgtcta
361 aaactcctct gattgggtggc ctggcctta tocattgcca ccaaaacctt cttttacta
421 agaaacagtg agccttgttc tggcagtcca gagaatgaca cgggaaaaaa gcagatgaag
481 agaaggtggc aggagagggc acgtggcca gectcagtct ctccaactga gttcctgcct
541 gcctgccttt gctcagactg tttgcccctt actgctcttc taggcctcat tctaagcccc
601 ttctccaagt tgctctcctt tttttctccc tgtctgcaa aaaatctttc ccagctcact
661 aagtcaagtct cacgcagtca ctcatatacc caccaatcac tgattgtgcc ggcacatgaa
721 tgcaccaggt gttgaagtgg aggaattaaa aagtcaagtg aggggtgtgc ccagaggaag
781 caccattcta gttgggggag cccatctgtc agctgggaaa agtccaaata acttcagatt
841 ggaatgtgtt ttaactcagg gttgagaaaa cagctacctt caggacaaaa gtcagggaag
901 ggctctctga agaaatgcta cttgaagata ccagccctac caagggcagg gagaggacc
961 tatagaggcc tgggacagga gctcaatgag aaaggagaag agcagcaggc atgagttgaa
1021 tgaaggaggc agggccgggt cacagggcct tctaggccat gagagggtag acagtattct
1081 aaggacgcca gaaagctggt gatcggcttc aagcagggga gggacaccta atttgctttt
1141 cttttttttt tttttttttt tttttttttt tgagatggag ttttgcctct gttgcccagg
1201 ctggagtgca atgggtgcac ttggctcact gcaacctccg cctcccaggt tcaagtgatt
1261 ctctgcctc agcctcccga gtagctgaga ttacaggcac ccgccaccat gcctggctaa
1321 ttttttgtat ttttagtaga gacaggggtt cactatgttg gccaggctgg tctcgaactc
1381 ctgacctcag gtgatccacc cgtctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggcgtgagc
1441 caccacacc ccgctgcttt tcttaaagat caatctgagt gctgtacgga gagtgggttg
1501 taagccaaga gtagaagcag aaagggagca gttgcagcag agagatgatg gaggcctggg
1561 cagggtggtg gcagggaggt aaccaacacc attcaggttt caaaggtaga accatgcagg
1621 gatgagaaaag caaagagggg atcaaggaag gcagctggat tttggcctga gcagctgagt
1681 caatgatagt gccgtttact aagaagaaac caaggaaaaa atttgggggt cagggatcaa
1741 aacttttttg aacatatgaa agtacgtggt tatactcttt atggcccttg tcatatgta
1801 tgctcgtctg cctccattgg actctagaat gaagccaggc aagagcaggg tctatgtgtg
1861 atggcacatg tggccagggt catgcaacat gtactttgta caaacagtgt atattgagta
1921 aatagaaatg gtgtccagga gccagaggtat oggtcctgcc agggccaggg gctctccta
1981 gcaggtgctc atatgctgta agttccctcc agatctctcc acaaggaggc atggaaaggc
2041 tgtagtgtgt cacctgccc aagaactagga ggtctggggg gggagagtca gcctgctctg
2101 gatgctgaaa gaatgtctgt ttttctttt agaaagtcc tgtgatgtca agctggtcga
2161 gaaaagcttt gaaacaggta agacaggggt ctagcctggg tttgcacagg attgcggaag
2221 tgatgaacc gcaataacc tgcctggatg agggagtggg aagaaattag tagatgtggg
2281 aatgaatgat gaggaatgga aacagcgggt caagacctgc ccagagctgg gtgggtctc
2341 tctgaatcc ctctcaccat ctctgacttt ccattctaag cactttgagg atgagtttct
2401 agcttcaata gaccaaggac tctctcctag gcctctgtat tcttttcaac agctccactg
2461 tcaagagagc cagagagagc ttctgggtgg ccagctgtg aaatttctga gtccttagg
2521 gatagcccta aacgaaccag atcatcctga ggacagccaa gaggttttgc cttcttcaa
2581 gacaagcaac agtactcaca taggtgtgg gcaatgggtcc tgtctctcaa gaatcccctg
2641 ccaactcctca caccaccctt gggccatata tcatttccat ttgagttgtt cttattgagt
2701 catccttctc gtggtagcgg aactcaactaa ggggcccata tggaccgag gtattgtgat

```

10

20

30

【化4】

2761 gataaattct gagcacctac cccatcccca gaagggctca gaaataaaat aagagccaag
 2821 tctagtcggg gtttcctgtc ttgaaacaca atactgttg ccttggaga atgcacagaa
 2881 tctgtttgta aggggatatg cacagaagct gcaagggaca ggaggtgcag gagctgcagg
 2941 cctccccac ccagcctgct ctgecttggg gaaaaccgtg ggtgtgtcct gcaggccatg
 3001 caggcctggg acatgcaagc ccataaccgc tgtggcctct tggttttaca gatacgaacc
 3061 taaactttca aaacctgtca gtgattgggt tccgaatcct cctcctgaaa gtggccgggt
 3121 ttaatctgct catgacgctg cggctgtggg ccagctgagg tgaggggctc tgaagctggg
 3181 agtgggggtt agggacgagg gtctctgggt gcacccaaag ctctgagagc aaacctccct
 3241 gcagggtcct gcttttaagt ccaaagcctg agcccaccaa actctcctac ttcttctgt
 3301 tacaaaattc tcttgtgcaa taataatggc ctgaaacgct gtaaaatatc ctcatttcag
 3361 ccgectcagt tgcacttctc ccctatgagg taggaagaac agttgtttag aaacgaagaa
 3421 actgaggccc cacagcta atgagtggagga agagagacac ttgtgtacac cacatgcctt
 3481 gtgttgact tctctcaccg tgtaacctcc tcatgtctc tctccccagt acggtctct
 3541 tagctcagta gaaagaagac attacactca tattacacc caatcctggc tagagtctcc
 3601 gcaccctcct cccccagggt cccagtcgt cttgtgaca actgcatctc gttccatcac
 3661 catcaaaaaa aaactccagg ctgggtgagg gggctcacac ctgtaatccc agcactttgg
 3721 gaggcagagg caggaggagc acaggagctg gagaccagcc tgggcaacac agggagacc
 3781 cgcctctaca aaaagtgaaa aaattaacca ggtgtggtgc tgcacacctg tagtcccagc
 3841 tacttaagag gctgagatgg gaggatcgtc tgagccctgg aatggtgagg ctacaatgag
 3901 ctgtgattgc gtcactgcac tccagcctgg aagacaaagc aagatcctgt ctcaaataat
 3961 aaaaaaata agaactccag ggtacatttg ctctagaac tctaccacat agccccaaac
 4021 agagccatca ccatcacatc cctaacagtc ctgggtcttc ctcaagtgtc agcctgactt
 4081 ctgttcttcc tcattccaga tctgcaagat tgtaagacag cctgtgctcc ctgctcctt
 4141 cctctgcatt gccctcttc tccctctcca aacagaggga actctcctac cccaaggag
 4201 gtgaaagctg ctaccacctc tgtgcccc cggcaatgcc accaactgga tctacccca
 4261 atttatgatt aagattgctg aagagctgcc aaactgct gccacccct ctgttccctt
 4321 attgctgctt gtcactgcct gacattcac gcagaggcaa ggctgctgca gctccctg
 4381 gctgtgcaca tccctcctg ctcccagag actgctccg ccattccaca gatgatggat
 4441 cttcagtggt ttctctggg ctctaggtcc tgcagaatgt tgtgaggggt ttatttttt
 4501 ttaatagtgt tcataaagaa atacatagta ttcttctct caagacgtgg ggggaaatta
 4561 tctcattatc gaggcctgc tatgctgtgt atctgggct gttgtatgtc ctgctgccga
 4621 tgccttc [配列番号 29]

10

20

【0112】

本開示の主題によれば、「TRAC核酸分子」は、TRACポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

【0113】

ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRの定常ドメインは、天然または改変TRBCペプチドを含む。ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRの定常ドメインは、天然または改変TRBC2ペプチドを含む。ある特定の実施形態では、TRBC2ポリペプチドは、以下に提供される配列番号39に記載のアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくは少なくとも約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含む、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保守的アミノ酸置換を含んでもよい。

30

【化5】

DLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSR
 YCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAPV TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSA
 TILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG [配列番号 39]

40

【0114】

ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRの定常ドメインは、天然または改変TRBC1ペプチドを含む。ある特定の実施形態では、TRBC1ポリペプチドは、以下に提供される配列番号40に記載のアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくは少なくとも約100%相同もし

50

くは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含む、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

【化6】

DLNKVFPEV AVFEPSEAEI SHTQKATLVC LATGFFPDHV ELSWWVNGKE
VHSGVSTDPQ PLKEQPALND SRYCLSSRLR VSATFWQNPR NHFRCVQVQFY
GLSENDEWTQ DRAKPVTQIV SAEAWGRADC GFTSVSYQQG VLSATILYEI
LLGKATLYAV LVSALVLMAM VKRKDF [配列番号 40]

【0115】

ある特定の実施形態では、TRBCポリペプチドは、NCBI Genbank ID : 28639、NG_001333.2、範囲645749~647196 (TRBC1、配列番号30)、NCBI Genbank ID : 28638、NG_001333.2 範囲655095~656583 (TRBC2、配列番号31)の遺伝子によって発現される転写物によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくは少なくとも約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を有する、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

【化7】

1 aggacctgaa caaggtgttc ccacccgagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga
61 tctcccacac ccaaaaggcc acactgggtg gcctggccac aggettcttc cccgaccacg
121 tggagctgag ctggtgggtg aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acagaccgcg
181 agcccctcaa ggagcagccc gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga
241 ggggtctcggc caccttctgg cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct
301 acgggctctc ggagaatgac gagtggacc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg
361 tcagcgccga ggccctgggt agagcaggtg agtggggcct ggggagatgc ctggaggaga
421 ttaggtgaga ccagctacca gggaaaatgg aaagatccag gtagcagaca agactagatc
481 caaaaagaaa ggaaccagcg cacaccatga aggagaattg ggcacctgtg gttcattctt
541 ctcccagatt ctacgcccac cagagccaag cagctgggtc ccctttctat gtggcctgtg
601 taactctcat ctgggtgggt cccccatcc cctcagtgcc tgccacatgc catggattgc
661 aaggacaatg tggctgacat ctgcatggca gaagaaagga ggtgctgggc tgtcagagga
721 agctggtctg ggccctgggag tctgtgccc ctgcaaatct gactttactt ttaattgcct
781 atgaaaataa ggtctctcat ttatcttctc ctccctgctt tctttcagac tgtggcttta
841 cctcgggtaa gtaagccctt ccttttcttc tccctctctc atggttcttg acctagaacc
901 aaggcatgaa gaactcacag acactggagg gtggagggtg ggagagacca gagctacctg
961 tgcacaggta cccacctgtc cttcctccgt gccaacagtg tcctaccagc aaggggtcct
1021 gtctgccacc atcctctatg agatcctgct agggaaggcc accctgtatg ctgtgctggt
1081 cagcgccctt gtgttgatgg ccatggtaag caggagggca ggatggggcc agcaggctgg
1141 aggtgacaca ctgacaccaa gcaaccagaa gtatagagtc cctgccagga ttggagctgg
1201 gcagtaggga gggaaagat ttcattcagg tgcctcagaa gataacttgc acctctgtag
1261 gatcacagtg gaagggatc gctgggaagg agaagctgga gtcaccagaa aacccaatgg
1321 atgttgtgat gagccttact atttgtgtgg tcaatgggcc ctactacttt ctctcaatcc
1381 tcacaactcc tggctcttaa taacccccaa aactttctct tctgcaggtc aagagaaagg
1441 atttctga [配列番号 30]

1 aggacctgaa aaactgttcc ccacccgagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga
61 tctcccacac ccaaaaggcc acactgggtg gcctggccac aggettctac cccgaccacg
121 tggagctgag ctggtgggtg aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acagaccgcg
181 agcccctcaa ggagcagccc gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga
241 ggggtctcggc caccttctgg cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct

【化 8】

301 acgggctctc ggagaatgac gagtggaccc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg
 361 tcagcgccga ggccctgggggt agagcagggtg agtggggcct ggggagatgc ctggaggaga
 421 ttaggtgaga ccagctacca gggaaaatgg aaagatccag gtacgggaca agactagatc
 481 cagaagaaag ccagagtgga caaggtggga tgatcaaggt tcacagggtc agcaaagcac
 541 ggtgtgcact tccccacca agaagcatag aggctgaatg gagcacctca agctcattct
 601 tccttcagat cctgacacct tagagctaag ctttcaagtc tccctgagga ccagccatac
 661 agctcagcat ctgagtgggtg tgcattccat tctcttctgg ggtcctgggt tcctaagatc
 721 atagtgacca ctctgctggc actggagcag catgaggag acagaaccag ggctatcaaa
 781 ggaggctgac tttgtaactat ctgatatgca tgtgtttgtg gcctgtgagt ctgtgatgta
 841 aggtcaatg tccttataaaa gcagcattct ctcattcatt tttcttcccc tgttttcttt
 901 cagactgtgg ctccacctcc ggtaagttag tctctctttt ttctctctat cttctgacct
 961 ctctgctctc gaaccagggc atggagaatc cacggacaca ggggcgtgag ggaggccaga
 1021 gccacctgtg cacaggtgcc tacatgctct gttcttgtca acagagtctt accagcaagg
 1081 ggtcctgtct gccaccatcc tctatgagat cttgctaggg aaggccacct tgtatgccgt
 1141 gctggtcagt gccctcgtgc tgatggccat ggtaaggagg aggggtggat agggcagatg
 1201 atgggggagc gggatggaac atcacacatg gccataaagg aatctcagag ccagagcaca
 1261 gcctaataata tctatcacc tcaatgaaac cataatgaag ccagactggg gagaaaatgc
 1321 agggaatata acagaatgca tcatgggagg atggagaaa ccagcgagcc ctactcaaat
 1381 taggcctcag agcccgctc cctgcctc ctctgctgt gccatagccc ctgaaacct
 1441 gaaaatgttc tctcttccac aggtcaagag aaaggattcc agaggctag

【配列番号 31】

10

【0116】

本開示の主題によれば、「TRBC 核酸分子」は、TRBC ポリペプチドをコードする
 ポリヌクレオチドを指す。

20

【0117】

ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRの定常ドメインは、天然または改変
 TRGC ペプチドを含む。ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRの定常ドメイン
 は、天然または改変TRGC 1 ペプチドを含む。ある特定の実施形態では、TRGC 1
 ポリペプチドは、以下に提供される、配列番号42に記載のアミノ酸配列と少なくとも約8
 5%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%
 相同または同一であるアミノ酸配列を有する。

【化 9】

DKQLDADVSP KPTIFLPSIA ETKLQKAGTY LCLLEKFFPD VIKIHWQEEK
 SNTILGSQEG NTMKTNDTYM KFSWLTVPEK SLDKEHRCIV RHENNKNGVD
 QEIIFFPIKT DVITMDPKDN CSKDANDTLL LQLTNTSAYY MYLLLLLKS
 VYFAIITCCL LRRTAFCCNG EKS

【配列番号 42】

30

【0118】

ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRの定常ドメインは、天然または改変
 TRGC 2 ペプチドを含む。ある特定の実施形態では、TRGC 2 ポリペプチドは、以下に
 提供される、配列番号43に記載のアミノ酸配列と少なくとも約85%、約90%、約9
 5%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%相同または同一である
 アミノ酸配列を有する。

40

【化 10】

DKQLDADVSP KPTIFLPSIA ETKLQKAGTY LCLLEKFFPD IIKIHWQEEK
 SNTILGSQEG NTMKTNDTYM KFSWLTVPEE SLDKEHRCIV RHENNKNGID
 QEIIFFPIKT DVITVDPKYN YSKDANDVIT MDPKDNWSKD ANDTLLLQLT
 NTSAYTYTLL LLLKSVYFA IITCCLLRRT AFCCNGEKS

【配列番号 43】

【0119】

ある特定の実施形態では、TRGC ポリペプチドは、NCBI Genbank ID
 : 6966、NG_001336.2、範囲108270~113860 (TRGC 1、
 配列番号32)、NCBI Genbank ID: 6967、NG_001336.2

50

、範囲 1 2 4 3 7 6 ~ 1 3 3 9 2 4 (T R G C 2、配列番号 3 3) の遺伝子によって発現される転写物によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 % または 1 0 0 % 相同または同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を有する、および / または必要に応じて、1 個まで、もしくは 2 個まで、もしくは 3 個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

【化 1 1】

```

1 ataaacaact tgatgcagat gtttccccca agcccactat ttttcttctt tcaattgctg
61 aaacaaagct ccagaaggct ggaacatacc tttgtcttct tgagaaatct ttcctgatg
121 ttattaagat acattggcaa gaaaagaaga gcaacacgat tctgggatcc caggaggga
181 acaccatgaa gactaacgac acatacatga aatttagctg gttaacgggtg ccagaaaagt
241 cactggacaa agaacacaga tgtatcgtca gacatgagaa taataaaaaac ggagttgatc
301 aagaaattat ctttctctca ataaagacag gtatgtgttt acgcatatca tctgtcagaa
361 cacttctttg aaagtgaatg ctgcattttt tcttttcagt attaatgaaa aacaaacata
421 aatctttctt aaatattggt acatttaatg gtagcataaa tgccctgcta cttttctata
481 gaattaaaat ggtatagggt ttggagaaaa caaaattgaa aaagttactg aaggtttgtc
541 agcctcagct ccattatcca aaataagaaa gtcacgtgct ggtttttagg gttgttagat
601 ggattaaaga aacaacatac acagaagcat ctagcaacgt gacacgtggt aaacgctcaa
661 aaagtgttct cccttctttt gatgacttta ctgatcagg aaataacata tatatgtctt
721 tcaggaatgt tctgcccagg caggagagtc actcacctca atcttgctac ccacaaagt
781 taacctaaaa acaacgggtt cattgttgag aaaatgatgt ttatctgttg ttgacagaat
841 gatgtttatc taaaaacagt tccaattttc tatttctttt gctgagacac aaaggggagg
901 caaatgtgca aagcttgagg gtatgcttac cactgtgctt aagtgttctg attttctag
961 tgatcagggc aaaataaaaa gtatagtaag ttccaaggca gtgaatatta tacaggagag
1021 aagttacagt ttataatgt gtttctctt acactaaatt ctaaaagtaa aaagtctttt
1081 tttttttttg acagagtttc actcttggtg cccaagcagg tgtgctatgg tatgatctca
1141 gctcactgca acctccacct cccgggttca agtgattctc ttacttcagc ctcccagacag
1201 gctgggattg caggcgctg ccaccacacc tggctaattt ttgtgtttt agtagagatg
1261 gggtttccac atgttggcca ggctggtctc aaattcctga cctcaagtga tccatccacc
1321 tcggcctcca agtgetggga ttatggcggt cagccactgt gccagccta aaagtaaat
1381 gtctttcatg agcttcccaa ggcagctacg ttaaggagga cacttctctt aatgtcattc
1441 tacagtagat ttctaattgt ctttcttggg agtttgtttt tctgagaaaa gctaaaaata
1501 taacatggaa gtgatcatat tatataatca atgaagtgtt tttcaaggag ataaaaactaa
1561 tctggtccac acttgcaacc aaccttgatt gagagagaga gagaactcag gatacacttg
1621 aagattttat tatggggaac agttacttta ttctttttac ctcaatcaat gcatggaat
1681 aagtgatagt catttctatt tatcttttaa taaatgaagt caccatgagg aaaaataaaa
1741 gacattgaaa acccattaaa gtcagccctt aaagatattt ggacatgcag acttgataac
1801 taacgtttgc attcttgaga cttaccctaaa acccatacct caagtccaag tttttagaat
1861 tcatgaaata aagatctcag tgagtgcata aaattgogca ccagaatcat atccgtatag
1921 acaagaacac atctactaga aaaataataa accaacacac caatgcaact gtgttttctt
1981 ctgtttttaa gtatgttgtc tttgtatgca tgtttgcttc ttctttttt tttttaacat
2041 cacagataaa tccaactctc acctcagggt ttattgagag aactgtcaat gtgacttggc
2101 ctctgtcttt ctagtcccag aaagaattgc actgaaatct gagctcctgt aataaaaaca
2161 accatttgcg gagagtaatt aacatactga aagagatttt cttagagtac acaatggtga
2221 catttatattg cctctttata aataactttc tatctatttc tgtggattat tectacaaag
2281 tacttttcat atgtccaatt tcttttcttc cctacaact actgtctgaa tactggctct
2341 gctatttgcg gatatgatcc tcggcaaggt gctgtcactt tttaaacttt atttctcat
2401 tcagaacatg gggccataca taatacaact cacttcagtg ttattgggga attaaacaaa
2461 aaatgcatgg gaagcattta acatagtgcc tgacacaata atgagtactc agtagatgtt
2521 agcttttatt aatattgttg ttgttatgtc cagaaacact atacctccag aaaatcatgg
2581 gtacttgctg gggacattgg ggatatgcat gatttgaaa agaatgactg ctttttttgc
2641 ttagatgaga aatttttcta agccagactc cttcaaata gtaagattct gttgtggatt
2701 caaggactga aagaattctt ggccgagtgt ggtggcttat cctgtaatc ccagcatttt
2761 gtgaggacaa ggcaggaaga ttgcttgagt ccaggagttt gaaaccagcc tgcgcaacat
2821 ggcgaaaccc tgtctctaca aaaaatacaa acattagctc ggagtgagt ctgacatgtg

```

【化 1 2】

2881 cctgtactcc cagctactca gaaggctgag atgggaggat ctcatgagcc tggggagttt
2941 gaggcttcag tgagccgtga tgacaccgta ctatactcca ctccagcctg ggtgacagtg
3001 agaccctgcc tcaaaaaaca aacaaacaaa caaacaaaac aaaattaatc tttttgctga
3061 tgtcatgtca gcagtggtgt ttgaaggctg taaagcagcc atttgttcag tttatTTTTc
3121 cattgaacaa gtatTTatca aaaacatact ttgtggcagt cactatgcta ggagctatga
3181 atacagaagg aaaagtaaat gctcttggat actacactcc agttgtgata aaaaagaaaa
3241 aatgtattct tcaccaactt caacatcttg atgtgcaaaa acataatata tgaattagat
3301 ctacctaatt acacagaatt agaccaattg tttctggaat tgtgggctca ttttttaatt
3361 aactgtcctc ctgcctctct gtgcagcagg tttataaata ttcatTTaat tacacacaca
3421 cacacgaaca attgactagt acttgcctctc attcttctag atgtcatcac aatggatccc
3481 aaagacaatt gttcaaaaaga tgcaaatggt aagctTTTTgt gtttttccct tccctctgat
3541 ctttttgttt tgaacttctc tggcttgaaa aatcagggaa tggattttgc taggttggat
3601 gctgcagaat ggacctagt atattTTaaa ttagtccctc attttctagg agttgtatta
3661 acaaacctaa ctactgcttt ggggtatgag atgactgtaa attagagagg gtacagtgg
3721 atagtgatat gcttttaatt atttcaaaaa aaagattTTa ttcatTcatg tgtctTTTTt
3781 ctttttcttt tctttttttt ttttttttgg acagagtctt gctctgtcac ccaggttga
3841 gtgcggtggc agtatctcag ctaccacaaa cctccgcctc ccggttcaa gtgattctcc
3901 tgcctcagct tctcgagtag ctgggactac aggcggtgc caccatgcc ggctaatttt
3961 tgtatTTta gttagttgg gtttccacca tgttggccag gatggctcg aatttgtgac
4021 ctctgtatct gccctctgc cctccgcaac tgttgggatt acagcgtga gtcactgtgc
4081 ccggcctcct gtctgtctt ttgtttaatg actgggaaaa acatgatacc atgttgcctc
4141 tgcagttggt ttgttttagt ctttggctct tgcctagtagc taataacacg aactagtgtt
4201 tatcaagtgc tttttacaca gaaggccttg ggctgtgttc tgcattttct tgtttaacc
4261 tcttaaaact cctataaaat ggtacatatt tttctccca tttacagtcc ctttaagca
4321 aataattata aaaatcccta tacatgtcac acagctagat ctgggatttc aaatcaggcc
4381 atcaacaaa gagtttatgt acttagtaag tttctgttc ttttctaca atagagtcat
4441 atagcaagaa attaccaagc caggaacctg aaacaaaacg gacatcatgt ggggtgggt
4501 ggggtgatgg gctttgcaga ctggactttc actccagctc ttttaatgat taggtgtaag
4561 tgacctacat tttgtgagca acagttttct catcagccaa caaagaataa ttacaccaga
4621 ttcacagtta ttgaagagat aaaggcatga atgtgagatg tctggcatat ggcattctat
4681 ttgacagaca cagaatgagt acttgtttct ggctttttct ctctacatat gcaccaagaa
4741 tgcgactaga agcatgggct ctagccctgc tcaactttcc tctatttoca ataccaaggg
4801 gctctgactt aggtctccac accagcaag gagggcagta ccacctcact tgaccaaggg
4861 cagggagtca cggacacatc acttcttgag atccttttcc acaccaagga ctgatgtttc
4921 tggatttctc actttatgaa gacaaaacat ataaatggaa attttctcag gttagagctc
4981 actctttagt ctcatTtagt aggacttagt ggtccacccc cactgtcttt acttattcct
5041 tgacatcaca tatctcttgc aaaacctcaa ataataTTaa atgcaatcac ccaataatag
5101 catagccata attagaggca tttaggaag acaggtgagt gtgccacaac tacctaacac
5161 atcagcaaat ctggattaac cactttcttt gattttccac aatgcaacct tactttttaa
5221 tagttgggaa tgttctaagt gaatttagca gaggttgtta atcaacttga aagctgaatt
5281 ctgacttgtc tgactcttgg tgggtctggt agcagtagat gtttactttt aggttttgg
5341 ggtggtggaa tatcacttca acgtaaatca tcagaaataa gtatttTtga accctctctg
5401 cattaatgta tcttattctg taaaaagaac atgtgcaatt tctcttagat aactactgc
5461 tgcagctcac aaacacctc gcatattaca tgtacctctc cctgctcctc aagagtgtgg
5521 tctattttgc catcatcacc tctgtctgc ttagaagaac ggctttctgc tgaattggag
5581 agaaatcata a [配列番号 32]

10

20

30

1 ataacaact tgatgcagat gtttcccca agcccactat ttttcttctc tgcattgtg
61 aaacaaaact ccagaaggct ggaacatacc tttgtcttct tgagaaattt tccagata
121 ttattaagat acattggcaa gaaaagaaga gcaacacgat tctgggatcc caggagggga
181 acaccatgaa gactaacgac acatacatga aatttagctg gttaacggtg ccagaagagt
241 cactggacaa agaacacaga tgtatcgtca gacatgagaa taataaaaac ggaattgatc
301 aagaaattat ctttctcca ataaagacag gtatgtgttt acacatatca tctgtcagaa
361 cacttctttg aaagtgaatg ctgcattttt tctttcagat ataatgaaa aacataaatc
421 tttcttaaaa attgttacat ttaatggtag cgtaaatgcc ctgctacttt tctatagaat
481 taaaatggta taggttttgg agaaaacaaa attgaaaaag ttgctgaagg tttgtcagcc
541 tcagctccat tatccaaaat aagaaagtca cgtgctggtt tttagggttg tttagatggat
601 taaagaaaca acatacacag aagcatctag caacgtgaca cgtggtaaac cgtcaaaaag
661 tgttctccct tctttttagt actttacttg atcaggaaat aacatatata tgtctttcag
721 gaatgttctg cccaagcagg agagtcactc acctcaatct tgcacctcac aaagtTTaac
781 ctaaaaacaa cgggttcatt gttgacaaaa taatgtttat ctgaagataa ctgtagatca

40

【化 1 3】

841 tatttatctg tagataatgt ttatctgtgg agtgtggctc tacaaaaacat agaatagtct
901 tggctactgc agttttatag aggccttggg tttttcagag tttcatttta tatatcacca
961 taaagtaaca tttcataatt acaggttggg aaggcttaca tgtacaaaca tttctccatt
1021 ttccataata aatgcatttc ctgccattgg tgaatgcagc tcaataaaca tttattgtac
1081 aattatgaca cgccaggctt agtggaaatg tggatgaaca gacaaggatg agttactgtc
1141 ctaaggatga tgcattgacag tgcagagaaat atactctctt cctgatcact cagggtcact
1201 catgattcat ggcgagggtc ccaaaacagt gcccttgatg cagattctgt acatctctag
1261 acgattggtc caagggctga atgtgctctg gcccagtggg ccagtctgtc actatatgtc
1321 aacatcctga atatgaacat aacagtccaa catctcaaga gtgggcatga aaaggactca
1381 ttttgtgctt tttcctgtgg ttaacaagtc ctttttagcc tgggggaaca agcattaaca
1441 aaatgtttga agatctttgc caogtaccat tccaaatctc tagggtaagt ctttagcttt
1501 tcagatcctg agtttctgca atgatcaaat gtgatttggg cagttgctgt gactttctcc
1561 tggggctata atggagtgca aaggaaacaa tggcagggaa aatgcttgct ttcaaatgg
1621 tagcatggat gtgttcattc gtgtagttac tgtattaggt atagccttcc ctgaaactaa
1681 ctgaaagtgg gttataaaaa cagtcccaat tttctatctc ctttgctgag acacaaagag
1741 gagacaaaag agcaaagctt gagggtagtt ttaccactgt gcttaagtgt tctgattttt
1801 ccagtgatca ggggtgaaata aaaagcatag taagtccag ggcagtgaat accatacagg
1861 agacaagtta cagttttata atgtgtttta ctttactata aattctaaaa gtaaatgtc
1921 tttttttttt tccgagacag agtttactc ttgtagocca ggcaggagtg ctatgggtg
1981 atctcggtc acagcaacct ccacctccca gtttcaagcg attcttctgc ctcagcctcc
2041 cgagaagttg aaattacagg tgccctggc acatctctgc taattattct atttttagta
2101 gagatcgggt tttaccatgt tggccaggct ggtctcgaac tctgacttc aagtgatcca
2161 cccgctcag cctcccaag tgctgggatt acaggtgtga gtcactgtgc cggacctaac
2221 agtaaaatgt ctttcatgtg cttctcaagg caactacatt aaggaggaca catctcttaa
2281 tgtcattcta cagtagattt ctaatgctct ttcttgggag tttgttttcc tgagaagagc
2341 taaaaatata ataacatgga agtgatcata ttatataatc aatgaagtgc tttcaaagga
2401 gataaaacta acctggtctg catttgcaac cagccttgat tgagagagag agaactcagg
2461 atacacttag agattttatt atggggaata gttactttat tcattttacc tcaatcaatg
2521 catggaaaa agtgacagtc attttctatt atcttttaat aaataaagtc accatgagga
2581 aatgaaaaac ccattaaagt cagctcttaa agatatttgg acatgcagac atgataacta
2641 acatttccat tctgtgagact taccacaaac ctatacctca agtccatttc ttagaataca
2701 tgaataaaag atctcagtga gtgtataaaa ctgcacacca gaatcatatc cgtatagaca
2761 agaatacatc tactagaaaa atataaacca aaacaccaag gtgactctgt tttttctgt
2821 tttaaaatat gttgtctttg tatgcatggt tgcttcttcc tttttttttt taaacatcgc
2881 agataaattc aactctcacc tcagttgaga gagaactgtc aatgtgactt ggcctctctc
2941 tttctagtcc cagaaagaat tgcactgaaa tgctgagctc ctgtaataaa aatgaccatt
3001 tgctgagagt aattaacata ctgaaagaga ttttcttaga atagtgcaca atggccaat
3061 ggtgacatta tattgtctct ttataaatta ttttctatct atttctgtgg attatttcta
3121 caaagcactt ttcatatgtc caattccttt tattccctca caagtactga ctgactactg
3181 gctctgctgt tcaactgatat gactttcggc aagttgctg cactttttta acgttatttc
3241 ctcatcaga acatggggcc atacaaaata caactcactt cagtgttatt ggggaattaa
3301 acaataaaat gcatgggaag catttaacat agtgctgac acaataatga gcactcagta
3361 gatgttagct tttattaata ttgttgttgc tatgtccaga aacactatac ctccagaaaa
3421 tcatgggtac ttgctgggga cgttggggat atgcatgatt ttgaaaggag tgactgctct
3481 ttactgctca gatgagaaat ttttctaagc cagactcctt caaacatgta agattctgtt
3541 gtggattcta ggactgaaag aattcttggc cgagtgtggg ggcttatcct ggtaatctca
3601 tcatttggga ggacaaggca ggaagattgc ttgagcccag gagttggaaa caagcctgga
3661 caacatggcg aaacctgtc tctacaaaa atacaaacat tagctggtca tgggagttag
3721 tgctgtact cccagctact caggaggcta agataggagg atcacctgag cctgggcagt
3781 ttgaggttcc agtgagccgt gatgacacca tactatactc cactccagcc tgggtgacag
3841 tgacatcctg cctcaaaaaa acccccaaaa ttattctttt tgctgatttc atgtcagcag
3901 tgtgtgctga aggtgtaaa gtagccactt gttctgttta tttttccatt gaacaagtat
3961 ttatcaaaaa cgtactttgt ggaaggcact gtgctaggaa ctatgcatac agaaggaaaa
4021 ccaaatgttc ttggatacta cactccagtt gtgataaaaa agaaaaaagt attcttcaca
4081 aacttcaaca tttttagatg caaaaacata atatatgaat tagactctacc taactacaca
4141 gaattagacc aattatttct gggattatgg gctcatattt ttaataactg tctctctacc
4201 tctctgttga caggttttat aaatattcat ttaattacac acagtcacag acacactcag
4261 acacacacac atacacacac acacacacct tgacaaataa tgggcatgaa caattgactg
4321 gtacttgtct tcattcttct agatgtcacc acagtggatc ccaaatataa ttattcaaag
4381 gatgcaaatg gtaagttttt gtgtttttta tttctctctg atcattttta gttttgact
4441 tctctggctt gaaaaatcag ggaatggatt ttgctaggtt ggatgctgca gaatggacct

10

20

30

40

【化 1 4】

4501 aatcatatatt taaattagtc cctctttttc taggagttgt attaacaac ctaactactg
4561 cttcatgtaa gagatgactg taaattgaag ggtacagtga tatgctttca gttatttcaa
4621 aaaacagact ttactcatcc atgtgtcttt tttcttttct tttttttctt ttttgagacg
4681 gagtctcgct ctggtgaaca ggctggattg cagtgcgcg atctcacctc actacaacct
4741 ccgctctgg agttcaagcg attctccagc ctcagcttct caagtagctg ggactacagg
4801 cacatgccac catgtccggg tcatctttgt atttttagca gagaccgggt ttcactatgt
4861 tggccaggct ggtctagaat tctgacttc gtgatctgcc cctcagccc tccgaagtgc
4921 tgggattaca gacgtgagtc actgtgccc gcctaacagt aaaatgtctt tcatgctctt
4981 ctcaaggcaa ctacgttaag gaggacactt ctcttaatgt cattctacag tagatttcta
5041 atgctctttc ttggaagttt gtttttctga gaaaagctaa aaatataaca tgggaagtga
5101 catattgtat aatcaatgaa gtgcttttca aggagataaa actaatctgg tccacgtttg
5161 caaccaacct tgattgagag agagagagaa ctcaggatac acttggagat tttattatgg
5221 ggaatagtta ctttattctt ttttctcaa tcaattcatg gaaataagtg atagtcatat
5281 tcatttatct ttttaataat gaagtacca tgaggaaaat aaaaagacat tgaaaccca
5341 ttaaagttag cctttaaaga tatttggaca tgcagacttg ataactaacg tttgcatctt
5401 tgagacttac ccaaaaccca tacctcaagt ccatgtttt agaattcatg aaataaagat
5461 ctcagtgagt gcataaaatt gcgcaccaga atcatatccg tatagacaag aacacatcta
5521 ctagaaaaat aataaaccaa cacaccaatg caactgtgtt ttcttctgtt ttaaaatag
5581 ttgtctttgt atgcatgttt gcttcttct tttttttt taacatcaca gataaaatg
5641 actctcacct caggttttat tgagagaact gtcaatgtga cttggcctct gtcttctag
5701 tcccagaaaag aatcgactg aaatgctgag ctctgtaat aaaaatgacc atttgctgag
5761 agtaattaac atactgaaag agattttctt agagtacaca atggtgacat tatattgtct
5821 ctttataaat aactttctat ctatttctgt ggattattcc taaaagtac ttttcatatg
5881 tccagtttct ttttctccc tacaactacc gtctgaatac tggctctgct atttgctgat
5941 atgattctcg gcaagttgcc tgcacttttt aaactttatt tctctattca gaacatgggg
6001 ccatgtaata ctcagtacg tgagtattac gtaataatgc tcaactaagt gttactgggg
6061 aattaaacaa aaaaatgcat ggcaagcatt taacatagtg cctgacacaa taatgagcac
6121 tcagtagatg ttagatttta ttaatattgt tgttgttatg tccggaaaca ctatacctcc
6181 agaaaatcat gggactttgc ttgggatgtt ggggatatgc atgatttggg aaggatgac
6241 tgcttttttc tgcttagatg agaaattttt ctaagccaga ctcttcaaa tatgtaagat
6301 tctgttgtgg attctaggac ggaaagaatt cttggtcagg tgtggtttct tatcctgta
6361 atcccagaat tttgggagga caaggcagga agattgcttg agcccaggag tttgaaacca
6421 gcctgggcaa caagcgaaa cctgtctct acaaaagtac ataaattagc ttggcttggg
6481 ggtgtgtgcc tgtattacca gctattcggg agactgagat gggaggatct cctgaacctg
6541 tgaagtttga ggcttcagtg agccgtgatg acaccatact atactcgact ccagcctgtg
6601 cgacagtgag actctgcgtc aaaaaaaaa ccccaaaatt atgtttttg ctgatttcag
6661 gtcagcagtg tgtgctgaag ggtgtaaagt agccacttga tcagtttatt tttccactga
6721 acaagtattt atcaaaaaca tactttgtgg tctgtttttg ataaataaaa aggcactgtg
6781 ctaggagcca tgaatacaga aggaaaacca aatgttcttg gatactacac tccagttgtg
6841 ataaaaaaga aaaatgtatt ctcaacgaac tcaacattt tgatatgcaa aaacatagta
6901 tataaattag atctacctga ttacgtagaa tcagaccaat ttttctgga attgagggct
6961 catattttta ataactgtcc tctgcctct ctgttgacag gttttataaa tattcattta
7021 attacacaca cacacacaca caccttgaca aataatggac atgaacaatt gactagtact
7081 tgctctcatt cttctagatg tcatcacaat ggatcccaa gacaattggg caaaagatgc
7141 aaatggtaag cttttgtgtt tttcctttcc tctgatcat ttttaagttt gaacttctct
7201 ggcttgaaaa atcaggggat gggcgggtg cgggtggctca cgcctgtaat cccagcactt
7261 tgggagggcg aggcgggcg atcacgaggt caggagatcg agaccatccc ggctaaaacg
7321 gtgaaacccc gtctctacta aaaatacaaa aaattagccg ggcttagtgg cggcgcctg
7381 tagtcccagc tacttgggag gctgaggcag gagaatggcg tgaaccggg aggggagct
7441 tgcagtgagc cgagattgag ccaactgcact ccaactccagc ctgggcgaca gagcgagact
7501 ccgtctcaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aagaaaaatc agggaatgga ttttgctagg
7561 ttggatgctg cagaatggac ctagtgatat tttaaattag tccctcttt tctaggagt
7621 gtattaacaa acctaactac tgcttcgggt atgagatgac tgtaaattag agggtagagt
7681 gatatgcttt cagttatttc aaaaaacaga ctttattcat ccgtctgtct tttttttt
7741 ttttttttt tttttttgag acggaggagt ctcactctat caccaggct ggagtgcagt
7801 ggcgcgatct cggtcacca taacctccgc cttactgggt caagcgatc tccagcctca
7861 gcttctcaag tagctggagc tacaggtgca caccaccata cctggccta ttttgtatt
7921 ttaabagaga tggggtttca ccacgttggc caggatggc ttgaattctt gacctcgtga
7981 tctgcccct cgggttccca aactctggg attataggcg tgagccactg tgcccggcct
8041 tctgtctttt gttataatga ctgggaaaa catgatacca tgttgcttct tgagttgtt
8101 tgttttagtc tttggctctt gctagtagct aataaacgca actagtgtt atcaagtgc

10

20

30

40

【化 1 5】

```

8161 ttttacacag aagggcttgt totgcatttt ctagttaaata catcttaata ctccataaaa
8221 gtagtacaat atatttttctc ccatatttaca gtcctttaa agtaaataac tataaaaaatc
8281 ccttatacat gtcacacagc taggtctggc atttcaaatac aggacatcaa acaaagaatt
8341 cgtgcagtta ctaagtctc tattttttct acaatagaaa aaatagcaag aattacagat
8401 agcaagacat tacaaggcag gaatctgaaa cgaaagggac ataatgtggg gctgggtggg
8461 tgcattgagct ttgcagacta gactttcatt ccagctcttt taatgattag gtgtaagtga
8521 cctacatttt gtgagtaaca gttttctcat cagccaacta agaataatta caccagattc
8581 acagttattg aagagataag ggcattgaatg tgagatgtct ggcgtagggt atctcattta
8641 gcagacacag aatgaatact tgtttctggc tttttctctc tacatatgca caaagaatgt
8701 gactagaagc attggtctca gccctgctca actttcctct attccaata ccaaggggct
8761 ctgacttagg ctgccacacc aggcaaggag gggcagtacc acctcacttg accaagggca
8821 gggagtacag gacacatcac ttctgagat ccttttccac accaaggact gatgtttctg
8881 gaattctcac tttatgaaga caaacatat aaatggaaat ttctgcagga agagactcac
8941 tctttagctc cattgagtag gcaactagtg tccaccccca ctgtctttac ttattccttg
9001 acatcacata tctctttaa aacctcaaat aatgttaaata gcaatcacc aataatagca
9061 tagccataat tagaggcatt taggaaagac aggtgagtg gccacaacta cctaacacat
9121 cagcaaatct ggattaacca ctttctttga ttttccaca tgcaacctta ctttttaata
9181 gttgggaatg ttctaagtga attttagcaga ggttgtaaata caacttgaaa gctgaattct
9241 gacttgtctg actcttggtg gtgctgtag cagtagatgt ttacttttag gttttggtgg
9301 tgggtgaata tcacttcaac gtaaatacat agaaataagt atttgtgaac ccctctgca
9361 ttaatatatc ttattctgta aaaagaacat gtgcaatttc tcttagatac actactgctg
9421 cagctcaca acacctctgc atattacacg tacctctcc tgctcctcaa gactgtgctc
9481 tattttgcca tcatcacctg ctgtctgctt agaagaacgg ctttctgctg caatggagag
9541 aaatcataa [ 配列番号 33]

```

10

20

【 0 1 2 0】

本開示の主題によれば、「TRGC核酸分子」は、TRGCポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

【 0 1 2 1】

ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRの定常ドメインは、天然または改変TRDCペプチドを含む。ある特定の実施形態では、TRDCポリペプチドは、以下に提供される配列番号41に記載のアミノ酸配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%相同または同一であるアミノ酸配列を有する。

30

【化 1 6】

```

SQPHTKPSVF VMKNGTNVAC LVKEFYPKDI RINLVSSKKI TEFDPALIVIS
PSGKYNAVKL GKYEDSNSVT CSVQHDNKTV HSTDFEVKTD STDHVKPKET
ENTKQPSKSC HKPKAIVHTE KVNMSLTVL GLRMLFAKTV AVNFLLLTAKL
FFL [ 配列番号 41]

```

【 0 1 2 2】

ある特定の非限定的な実施形態では、T細胞受容体定常領域は、細胞外抗原結合ドメインを定常ドメインに連結するヒンジ/スパー領域を含む。ヒンジ/スパー領域は、抗原認識を容易にするために抗原結合ドメインを異なる向きに方向付けるのに十分な可撓性を有してもよい。ある特定の非限定的な実施形態では、ヒンジ/スパー領域は、IgG1、もしくは免疫グロブリンのCH₂CH₃領域、およびCD3の部分、CD28ポリペプチドの部分、CD8ポリペプチドの部分由来のヒンジ領域、それらと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%相同または同一である前記のいずれかの変形形態、または合成スパー配列であってもよい。ある特定の非限定的な実施形態では、CARのヒンジ/スパー領域は、CD3ポリペプチド、CD40ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、CD166ペプチド、CD166ペプチド、CD8aペプチド、CD8bペプチド、ICOSポリペプチド、ICAM-1ペプチド、CTLA-4ペプチド、合成ペプチド（免疫応答に関連するタンパク質に基づかない）、またはその組合せの天然または改変ヒンジ領域

40

50

を含んでもよい。

【0123】

2.4. 細胞内シグナル伝達ドメイン

ある特定の非限定的な実施形態では、本開示のH I - T C Rは、細胞内ドメインを含まない抗原結合鎖を含む。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、C D 3 ポリペプチドと会合することができる。ある特定の実施形態では、抗原結合鎖は、C D 3 ポリペプチドと会合することができる定常ドメインを含む。ある特定の実施形態では、C D 3 ポリペプチドは、内因性である。ある特定の実施形態では、C D 3 ポリペプチドは、外因性である。ある特定の実施形態では、抗原への抗原結合鎖の結合は、抗原結合鎖に会合したC D 3 ポリペプチドを活性化することができる。ある特定の実施形態では、外因性C D 3 ポリペプチドは、本明細書に開示されている共刺激分子に融合されているまたはこれと一体化されている。

10

【0124】

ある特定の非限定的な実施形態では、本開示のH I - T C Rは、細胞内ドメインを含む抗原結合鎖を含む。ある特定の実施形態では、細胞内ドメインは、C D 3 ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、抗原への抗原結合鎖の結合は、抗原結合鎖のC D 3 ポリペプチドを活性化することができる。

【0125】

活性化されたC D 3 ポリペプチドは、免疫応答性細胞（例えば、リンパ系系列の細胞、例えば、T細胞）を活性化および/または刺激することができる。C D 3 は、3個の免疫受容活性化チロシンモチーフ（I T A M 1、I T A M 2およびI T A M 3）、3個のベーシック・リッチ・ストレッチ（basic-rich stretch）（B R S 1、B R S 2およびB R S 3）を含み、抗原が抗原結合鎖に結合された後に、細胞（例えば、リンパ系系列の細胞、例えば、T細胞）に活性化シグナルを伝達する。C D 3 - 鎖の細胞内シグナル伝達ドメインは、内因性T C R由来のシグナルの一次伝達物質である。ある特定の実施形態では、C D 3 ポリペプチドは、N C B I参照番号：N P _ 9 3 2 1 7 0（配列番号17）、N C B I参照番号：N P _ 0 0 0 7 2 5 . 1（配列番号18）を有する配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%相同であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むか、もしくは有する、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。ある特定の非限定的な実施形態では、C D 3 ポリペプチドは、少なくとも20、または少なくとも30、または少なくとも40、または少なくとも50、および最大164アミノ酸長である、配列番号17の連続する部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいは、またはさらに、非限定的な様々な実施形態では、C D 3 ポリペプチドは、配列番号17のアミノ酸1~164、1~50、50~100、100~150、または150~164のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、C D 3 ポリペプチドは、配列番号17のアミノ酸52~164のアミノ酸配列を含むか、または有する。

20

30

配列番号17は、以下に提供される：

【化17】

40

```
1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
61 APAYQQGQNG LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGL YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [配列番号 17]
```

【0126】

ある特定の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトC D 3 ポリペプチドを含む。ヒトC D 3 ポリペプチドは、配列番号18と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むか、もしくはこれを有してもよい、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、最大3個までの保存的アミノ

50

酸置換を含んでもよい。配列番号 18 は、以下に提供される：

【0127】

【化18】

RVKFSRSADA PAYQQGQNL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPENGGKPR RKNPQEGLYN
ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDT YDALHMQUALP PR [配列番号
18]、

【0128】

配列番号 18 のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号 19 に記載される。

【0129】

【化19】

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC
AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAG
CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC
ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [配列番号 19]

【0130】

2.4.1. 共刺激領域

ある特定の非限定的な実施形態では、本開示の H I - T C R は、細胞内ドメインを含む抗原結合鎖を含み、細胞内ドメインは、共刺激領域を含む。ある特定の実施形態では、細胞内ドメインは、共刺激領域および C D 3 ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、細胞内ドメインは、共刺激領域を含み、C D 3 ポリペプチドを含まない。

【0131】

ある特定の実施形態では、共刺激領域は、最適なリンパ球活性化をもたらすことができる少なくとも 1 個の共刺激分子を含む。本明細書で使用される場合、「共刺激分子」とは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答にとって必要とされる抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子を指す。少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達領域は、C D 2 8
ポリペプチド、4 - 1 B B ポリペプチド、O X 4 0 ポリペプチド、I C O S ポリペプチド、D A P - 1 0
ポリペプチド、またはその組合せを含んでもよい。共刺激分子は、その受容体への結合時に、共刺激応答、すなわち、抗原がその C A R 分子に結合するときに提供される刺激をもたらす細胞内応答を生成する細胞表面上に発現されるタンパク質である共刺激リガンドに結合することができる。共刺激リガンドとしては、限定されるものではないが、C D 8 0、C D 8 6、C D 7 0、O X 4 0 L、および 4 - 1 B B L が挙げられる。一例として、4 - 1 B B リガンド（すなわち、4 - 1 B B L）は、C A R シグナルと共に、C A R + T 細胞のエフェクター細胞機能を誘導する細胞内シグナルを提供するために 4 - 1 B B（「C D 1 3 7」としても知られる）に結合し得る。4 - 1 B B、I C O S または D A P - 1 0 を含む共刺激シグナル伝達領域を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む C A R は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 7, 4 4 6, 1 9 0 号に開示されている。

【0132】

ある特定の実施形態では、H I - T C R の抗原結合鎖の共刺激領域は、C D 2 8 ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む。C D 2 8 ポリペプチドは、N C B I 参照番号：P 1 0 7 4 7 もしくは N P _ 0 0 6 1 3 0（配列番号 20）を有する配列と少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 %、または 1 0 0 % 相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むか、もしくは有してもよい、および/または必要に応じて、1 個まで、もしくは 2 個まで、もしくは 3 個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。非限定的なある特定の実施形態では、C D 2 8

10

20

30

40

50

ポリペプチドは、少なくとも20、または少なくとも30、または少なくとも40、または少なくとも50、および最大で220アミノ酸長である、配列番号20の連続する部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいは、またはさらに、非限定的な様々な実施形態では、CD28ポリペプチドは、配列番号20のアミノ酸1~220、1~50、50~100、100~150、114~220、150~200、または200~220のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、共刺激領域は、配列番号20のアミノ酸180~220のアミノ酸配列を含むか、または有するCD28ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む。

【化20】

1 MLRLLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61 SAVEVCVVYV NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNEVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNQ TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLLVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
181 SKRSRLHSD YMNMPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [配列番号 20]

10

【0133】

ある特定の実施形態では、共刺激領域は、CD28のヒト細胞内シグナル伝達ドメインを含む。CD28のヒト細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号21と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むか、もしくは有してもよい、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。配列番号21は、以下に提供される：

20

【0134】

【化21】

RSKRSRLHSD YMNMPRRPG PTRKHYQPY APPRDFAAAYRS [配列番号 21]

【0135】

配列番号21のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号22に記載される。

【化22】

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGC
AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGGACTTCGCAGCCTATCGCTCC [配列番号 22]

30

【0136】

ある特定の実施形態では、共刺激領域は、2個の共刺激分子を含む共刺激シグナル伝達領域、例えば、CD28および4-1BBの共刺激シグナル伝達領域、またはCD28およびOX40の共刺激シグナル伝達領域を含む。

【0137】

4-1BBは、腫瘍壊死因子(TNF)リガンドとして作用することができ、刺激活性を有する。4-1BBポリペプチドは、NCBI参照番号：P41273もしくはNP_001552(配列番号23)を有する配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むか、もしくはこれを有してもよい、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を必要に応じて含んでもよい。

40

配列番号23は、以下に提供される：

【化 2 3】

1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
 61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGG ELTKKGCKDC
 121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPPAPARE
 181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
 241 CSCRFPEEEEE GGCEL [配列番号 23]

【0 1 3 8】

本開示の主題によれば、「4 - 1 B B 核酸分子」は、4 - 1 B B ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。 10

【0 1 3 9】

ある特定の実施形態では、共刺激領域は、4 - 1 B B の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。4 - 1 B B の細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号 2 4 と少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 %、もしくは約 1 0 0 % 相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むもしくはこれを有してもよい、および/または必要に応じて、1 個まで、もしくは 2 個必要に応じて、もしくは 3 個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。配列番号 2 4 は、以下に提供される：

【0 1 4 0】

【化 2 4】

KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEGGC EL [配列番号 24] 20

【0 1 4 1】

配列番号 2 4 のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号 2 7 に記載される。

【化 2 5】

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCA
 AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG [配列番号
 27] 30

【0 1 4 2】

O X 4 0 ポリペプチドは、NCBI 参照番号：P 4 3 4 8 9 もしくは NP__0 0 3 3 1 8 (配列番号 2 5) を有する配列と少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 %、もしくは約 1 0 0 % 相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むか、もしくはこれを有してもよい、および/または必要に応じて、1 個まで、もしくは 2 個まで、もしくは 3 個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

配列番号 2 5 は、以下に提供される：

【化 2 6】

1 MCVGARRLGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ
 61 NTVCRPCGPG FYNDVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK
 121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ
 181 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL
 241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSR TPIQEEQADA HSTLAKI [配列番号 25] 40

【0 1 4 3】

本開示の主題によれば、「O X 4 0 核酸分子」は、O X 4 0 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

【0 1 4 4】

I C O S ポリペプチドは、NCBI 参照番号：NP__0 3 6 2 2 4 (配列番号 2 6) を 50

有する配列と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% 相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むか、もしくはこれを有してもよい、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

配列番号 26 は、以下に提供される：

【化 27】

```
1  MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGGO
61  ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYYFCN LSIFDPPPFK
121 VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY
181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL [配列番号 26]
```

10

【0145】

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

【0146】

ある特定の実施形態では、異なるタンパク質に由来する CAR のドメイン / モチーフ / 領域の間の変異部位および/または接合部は、脱免疫化される。異なる CAR 部分間の接合部の免疫原性を、NetMHC4.0 サーバーを使用して予測することができる。次の部分に由来する少なくとも 1aa を含有するそれぞれのペプチドについて、全対立遺伝子に関する HLA A、B および C に対する結合親和性を予測することができる。それぞれのペプチドの免疫原性のスコアを、それぞれのペプチドに割り当てることができる。免疫原性スコアを、式：免疫原性スコア = [(50 - 結合親和性) * HLA 頻度]_n を使用して計算することができる。n はそれぞれのペプチドに関する予測数である。

20

【0147】

2.5. CD3 複合体

ある特定の実施形態では、本開示の HI - TCR は、CD3 複合体と会合することができる（「T 細胞共受容体」としても公知）。ある特定の実施形態では、HI - TCR および CD3 複合体は、天然 TCR / CD3 複合体と同様の抗原認識受容体複合体を形成する。ある特定の実施形態では、CD3 複合体は、内因性である。ある特定の実施形態では、CD3 複合体は、外因性である。ある特定の実施形態では、本開示の HI - TCR は、CD3 / TCR 複合体における天然および/または内因性 TCR に置き換わる。ある特定の実施形態では、CD3 複合体は、CD3 鎖、CD3 鎖、および 2 個の CD3 鎖を含む。

30

【0148】

ある特定の実施形態では、CD3 鎖は、NCBI 参照番号：NP__000064.1（以下に提供される配列番号 34）と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% 相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むか、もしくはこれを有してもよい、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

40

【化 28】

```
1 meqgkglavl ilaiillqgt laqsikgnhl vkvydyqedg svlltcdaea knitwfkdgk
61 migfltedkk kwnlgsnakd prgmyqckgs qnkskplqvy yrmcnciel naatisgflf
121 aeivsifvla vgvfyiagqd gvrqsrasdq qtllpndqly qplkdreddq yshlqgnqlr
181 rn [配列番号 34]
```

【0149】

ある特定の実施形態では、CD3 鎖は、NCBI 参照番号：NP__000723.1（以下に提供される配列番号 35）、NP__001035741.1（以下に提供される配列番号 36）と少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% 相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはそ

50

の断片を含むか、もしくはこれを有してもよい、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

【化29】

1 mehstflsgl vlatllsqvs pkipieele drfvncnts itwvegtvgt llsditrldl
61 gkrildprgi yrcngtdiyk dkestvqvyh rmcqscveld patvaglivt dviatlallal
121 gvfcfaghet grlsgaadtq allrndqvyq plrdrrdaqy shlggnwarn k [配列番号
35]

1 mehstflsgl vlatllsqvs pkipieele drfvncnts itwvegtvgt llsditrldl
61 gkrildprgi yrcngtdiyk dkestvqvyh rtadtqallr ndqvyqplrd rddaqyshlg
121 gnwarnk [配列番号 36]

10

【0150】

ある特定の実施形態では、CD3 鎖は、NCBI参照番号：NP_000724.1 (以下に提供される配列番号37)と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、もしくはその断片を含むか、もしくはこれを有する、および/または必要に応じて、1個まで、もしくは2個まで、もしくは3個までの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。

【化30】

1 mqsgthwrvl glcllsvgvw gqdgneemgg itqtpykvsi sgttviltcp qypgseilwq
61 hndkniggde ddknigsded hlslkefsel eqsgyyvcyp rgskpedanf ylylrarvce
121 ncmemdvmvsv ativivdici tggllllvyy wsknrkakak pvtrgagagg rqrqgnkerp
181 ppvpnpdyep irkgqrdlys glnqrri [配列番号 37]

20

【0151】

ある特定の実施形態では、組換えTCRは、同じ抗原を標的とするCARよりも大きい抗原感受性を示す。ある特定の実施形態では、組換えTCRは、腫瘍細胞の表面に低密度で存在する抗原に結合すると、免疫応答を誘導することができる。ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRを含む免疫応答性細胞を使用して、例えば、疾患の再発により、低い発現レベルの表面抗原を有する腫瘍細胞を有する被験体を処置することができ、被験体は、残存腫瘍細胞をもたらす処置を受けたことがある。ある特定の実施形態では、腫瘍細胞は、腫瘍細胞の表面に低密度の標的分子を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞1個当たり約5,000分子未満、細胞1個当たり約4,000分子未満、細胞1個当たり約3,000分子未満、細胞1個当たり約2,000分子未満、細胞1個当たり約1,500分子未満、細胞1個当たり約1,000分子未満、細胞1個当たり約500分子未満、細胞1個当たり約200分子未満、または細胞1個当たり約100分子未満の密度を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞1個当たり約2,000分子未満の密度を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞1個当たり約1,500分子未満の密度を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞1個当たり約1,000分子未満の密度を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞1個当たり約4,000分子~細胞1個当たり約2,000分子の間、細胞1個当たり約2,000分子~細胞1個当たり約1,000分子、細胞1個当たり約1,500分子~細胞1個当たり約1,000分子、細胞1個当たり約2,000分子~細胞1個当たり約500分子、細胞1個当たり約1,000分子~細胞1個当たり約200分子、または細胞1個当たり約1,000分子~細胞1個当たり約100分子の密度を有する。

30

40

【0152】

2.6.HI-TCR 19

ある特定の実施形態では、本開示のHI-TCRは、二量体化することができる2個の抗原結合鎖、例えば、VL-TRACおよびVH-TRBCを含み、HI-TCRは、C

50

ルをもたらす。共刺激リガンドとして、腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーおよび免疫グロブリン (Ig) スーパーファミリーリガンドのメンバーが挙げられるがこれらに限定されない。TNFは、全身性炎症に関与するサイトカインであり、急性期反応を刺激する。その主要な役割は、免疫細胞の調節にある。TNFスーパーファミリーのメンバーは、多数の共通特色を共有する。TNFスーパーファミリーメンバーの大部分は、短い細胞質セグメントおよび相対的に長い細胞外領域を含有するII型膜貫通タンパク質 (細胞外C末端) として合成される。TNFスーパーファミリーメンバーとして、神経成長因子 (NGF)、CD40L (CD40L) / CD154、CD137L / 4-1BBL、TNF- α 、CD134L / OX40L / CD252、CD27L / CD70、Fasリガンド (FasL)、CD30L / CD153、腫瘍壊死因子ベータ (TNF β) / リンホトキシン-アルファ (LT α)、リンホトキシン-ベータ (LT β)、CD257 / B細胞活性化因子 (BAFF) / BlyS / THANK / Tall-1、グルコシルチコイド誘導性TNF受容体リガンド (GITRL) およびTNF関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL)、LIGHT (TNFSF14) が挙げられるがこれらに限定されない。免疫グロブリン (Ig) スーパーファミリーは、細胞の認識、結合または接着プロセスに関与する、細胞表面および可溶性タンパク質の大きい群である。これらのタンパク質は、免疫グロブリンと構造的特色を共有し、それらは、免疫グロブリンドメイン (フォールド) を保有する。免疫グロブリンスーパーファミリーリガンドとして、両者ともCD28のリガンドである、CD80およびCD86が挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、少なくとも1種の共刺激リガンドは、4-1BBL、CD275、CD80、CD86、CD70、OX40L、CD48、TNFRSF14、およびその組合せからなる群より選択される。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、1種の外因性または組換え共刺激リガンドを含む、またはそれからなる。ある特定の実施形態では、1種の外因性または組換え共刺激リガンドは、4-1BBLまたはCD80である。ある特定の実施形態では、1種の外因性または組換え共刺激リガンドは、4-1BBLである。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、2種の外因性または組換え共刺激リガンドを含む、またはそれからなる。ある特定の実施形態では、2種の外因性または組換え共刺激リガンドは、4-1BBLおよびCD80である。

【0158】

ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、少なくとも1種のキメラ共刺激受容体 (CCR) を含む、または形質導入することができる。本明細書で使用される場合、用語「キメラ共刺激受容体」または「CCR」は、抗原に結合し、それが抗原に結合することにより、CCRを含む細胞 (例えば、T細胞) に共刺激シグナルをもたらすが、単独では細胞に活性化シグナルをもたらさない、キメラ受容体を指す。CCRは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Krause, et al., J. Exp. Med. (1998);188(4):619-626およびUS20020018783に記載されている。CCRは、共刺激シグナルを模倣するが、CARとは異なり、T細胞活性化シグナルをもたらさず、例えば、CCRは、CD3ポリペプチドを欠如する。CCRは、抗原提示細胞における天然共刺激リガンドの非存在下で、共刺激、例えば、CD28様シグナルをもたらす。コンビナトリアル抗原認識、すなわち、CARと組み合わせたCCRの使用は、二重抗原発現T細胞に対するT細胞反応性を増大させ、これにより、選択的腫瘍標的化を改善することができる。その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2014/055668を参照されたい。Klossら、各抗原を個々に発現する細胞を温存しつつ、抗原の組合せを発現する標的細胞を排除するT細胞を生成するために、コンビナトリアル抗原認識、別々のシグナル伝達、ならびに重大な意味を持つことに、平衡を保たれた強度のT細胞活性化および共刺激を統合する戦略について記載する (その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるKloss et al., Nature Biotechnology (2013);31(1):71-75)。このアプローチにより、T細胞活性化は、ある1種の抗原のCAR媒介性認識を要求する一方、共刺激は、独立して、第2の抗原に特異的なCCRによって媒介される。腫瘍選択性を達成するために、コンビナトリアル抗原認識アプローチは、第2の抗原の同時CCR認識によってもたらされるレス

10

20

30

40

50

キューなしで無効となるレベルまで、T細胞活性化の効率を縮小する。

【0159】

ある特定の実施形態では、CCRは、第2の抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および少なくとも1個の共刺激分子を含む共刺激シグナル伝達領域を含む。ある特定の実施形態では、CCRは、単独では、細胞に活性化シグナルを送達しない。共刺激分子の非限定的な例として、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10およびその任意の組合せが挙げられる。ある特定の実施形態では、CCRの共刺激シグナル伝達領域は、1個の共刺激シグナル伝達分子を含む。ある特定の実施形態では、1個の共刺激シグナル伝達分子は、CD28である。ある特定の実施形態では、1個の共刺激シグナル伝達分子は、4-1BBである。ある特定の実施形態では、CCRの共刺激シグナル伝達領域は、2個の共刺激シグナル伝達分子を含む。ある特定の実施形態では、2個の共刺激シグナル伝達分子は、CD28および4-1BBである。第2の抗原は、第1の抗原および第2の抗原の両方の発現が、標的化された細胞（例えば、がん性組織またはがん性細胞）に制限されるように選択される。CARと同様に、細胞外抗原結合ドメインは、scFv、Fab、F(ab)₂、または細胞外抗原結合ドメインを形成するための異種配列を有する融合タンパク質であり得る。

10

【0160】

ある特定の実施形態では、CCRは、CCRが結合する抗原とは異なる抗原に結合するHI-TCRと同時発現され、例えば、HI-TCRは、第1の抗原に結合し、CCRは、第2の抗原に結合する。

20

【0161】

本開示の主題のヒトリンパ球のタイプには、限定されずに、末梢ドナーリンパ球、例えば、Sadelain, M., et al. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45 (CARを発現するように遺伝子改変された末梢ドナーリンパ球を開示する)、Morgan, R.A., et al. 2006 Science 314:126-129 (および ヘテロ二量体を含む完全長腫瘍抗原認識T細胞受容体複合体を発現するように遺伝子改変された末梢ドナーリンパ球を開示する)、Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:4382-4392 (腫瘍生検における腫瘍浸潤リンパ球(TIL)に由来するリンパ球培養を開示する)、およびDupont, J., et al. 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A., et al. 2003 Blood 102:2498-2505 (人工抗原提示細胞(AAPC)またはパルス処理樹状細胞を用いた選択的に*in vitro*増大させた抗原特異的末梢血白血球を開示する)に開示されるものが含まれる。免疫応答性細胞(例えば、T細胞)は、自己、非自己(例えば、同種異系)であってよく、または操作された前駆細胞もしくは幹細胞から*in vitro*で誘導することができる。

30

【0162】

本開示の免疫応答性細胞は、腫瘍微小環境をモジュレートすることが可能である。腫瘍は、免疫認識および排除からそれ自身を保護するための悪性細胞による一連の機構を含む、宿主免疫応答に敵対する微小環境を有する。この「敵対的な腫瘍微小環境」は、浸潤調節CD4⁺T細胞(Treg)、骨髄由来のサプレッサー細胞(MDSC)、腫瘍関連マクロファージ(TAM)、TGF- β を含む免疫抑制サイトカインを含む様々な免疫抑制因子、および、活性化T細胞(CTLA-4およびPD-1)によって発現される免疫抑制受容体を標的にするリガンドの発現を含む。免疫抑制のこれらの機構は、寛容の維持および不適当な免疫応答の抑制において役割を果たすが、腫瘍微小環境の中では、これらの機構は有効な抗腫瘍免疫応答を妨げる。まとめると、これらの免疫抑制因子は、標的化腫瘍細胞との遭遇の際に養子的に導入されるCAR改変T細胞の顕著なアナジーまたはアポトーシスを誘導することができる。

40

【0163】

CTLの精製されていない供給源は、当技術分野で公知の任意のもの、例えば、骨髄、胎児、新生児または成人または他の造血細胞供給源、例えば、胎児の肝臓、末梢血またはさい帯血であってよい。細胞を分離するために、様々な技術を用いることができる。例え

50

ば、負の選択方法は、最初に非CTLを除去することができる。正と負の両方の選択のための、特定の細胞系統および/または分化のステージに関連したマーカーを同定するために、mAbは特に有用である。

【0164】

比較的粗い分離によって、大きな割合の最終分化細胞を最初に除去することができる。例えば、磁気ビーズ分離を最初に使用して多数の無関係な細胞を除去することができる。ある特定の実施形態では、全造血細胞の少なくとも約80%、通常少なくとも約70%が細胞単離の前に除去される。

【0165】

分離の手順には、限定されずに、密度勾配遠心分離；再凝固(resetting)；細胞密度を改変する粒子とのカップリング；抗体でコーティングされた磁気ビーズによる磁気分離；親和性クロマトグラフィー；補体および細胞毒素を限定されずに含む、mAbに連結されるかもしくはそれと併用される細胞傷害剤；ならびに、固体マトリックス、例えばプレート、チップに付着した抗体によるパニング、エラトリエーションまたは任意の他の便利な技術が含まれる。

10

【0166】

分離および分析の技術には、限定されずにフローサイトメトリーが含まれ、それは様々な程度の洗練度、例えば、複数のカラーチャネル、低角度および鈍角の光散乱検出チャネル、インピーダンスチャネルを有することができる。

【0167】

ヨウ化プロピジウム(PI)などの死細胞に関連した色素を用いることによって、細胞を死細胞に対して選択することができる。ある特定の実施形態では、2%ウシ胎仔血清(FCS)もしくは0.2%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む培地、または任意の他の好適な、例えば、無菌の、等張性の培地で細胞は収集される。

20

【0168】

4. ベクター

免疫応答性細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の遺伝子改変は、組換えDNA構築物によって実質的に均一な細胞組成物を形質導入することによって達成することができる。ある特定の実施形態では、細胞へのDNA構築物の導入のために、レトロウイルスベクター(ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルスのいずれか)が用いられる。例えば、HI-TCRをコードするポリヌクレオチドをレトロウイルスベクターにクローニングすることができ、その内因性のプロモーターから、レトロウイルスの末端反復配列から、または目的の標的細胞型に特異的であるプロモーターから発現を引き起こすことができる。非ウイルスベクターを、同様に使用することができる。

30

【0169】

最初に免疫応答性細胞を、HI-TCRを含むように遺伝子改変する場合、レトロウイルスベクターを一般的に形質導入のために使用するが、他の任意の適したウイルスベクターまたは非ウイルス送達系を使用することができる。HI-TCRは、単一の多シストロン発現カセットにおいて、単一のベクターの複数の発現カセットにおいて、または複数のベクターにおいて補助分子(例えば、サイトカイン)と共に構築することができる。ポリシストロニック発現カセットを作製するエレメントの例には、様々なウイルスおよび非ウイルスの配列内リボソーム進入部位(IRES、例えば、FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF-B IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、A型肝炎IRES、C型肝炎IRES、ペスチウイルスIRES、アフトウイルスIRES、ピコルナウイルスIRES、ポリオウイルスIRES、および脳心筋炎ウイルスIRES)、および切断可能リンカー(例えば、2Aペプチド、例えば、P2A、T2A、E2AおよびF2Aペプチド)が挙げられるがこれらに限定されない。キャプシドタンパク質がヒト細胞に感染するために機能的である場合には、レトロウイルスベクターと適切なパッケージング系の組合せもまた適している。PA12 (Miller, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437) ; PA317 (Mill

40

50

er,etal.(1986)Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902) ; およびC R I P (Danos, et al. (1988) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 85:6460-6464) が挙げられるがこれらに限定されない様々な両栄養性ウイルス産生細胞株が公知である。非両栄養性粒子、例えばV S V G、R D 1 1 4またはG A L Vエンベロープによってシュードタイプ化した粒子、および当技術分野で公知の他の任意の粒子もまた適している。

【 0 1 7 0 】

形質導入の可能な方法には、例えば、Bregni, et al.(1992)Blood 80:1418-1422の方法による産生細胞との細胞の直接の共培養、または、例えば、Xu, et al. (1994) Exp.Hemat.22:223-230 ; およびHughes, et al. (1992) J. Clin. Invest. 89:1817の方法による、ウイルス上清だけとのもしくは適当な増殖因子およびポリカチオンを伴うまたは伴わない濃縮ベクターストックとの培養が含まれる。

10

【 0 1 7 1 】

免疫応答性細胞を改変するために、他の形質導入ウイルスベクターを使用することができる。ある特定の実施形態では、選択されるベクターは、高効率の感染と安定した組入れおよび発現を示す(例えば、Cayouette et al., Human Gene Therapy 8:423-430, 1997 ; Kido et al., Current Eye Research 15:833-844, 1996 ; Bloomer et al., Journal of Virology 71:6641-6649, 1997 ; Naldini et al., Science 272:263-267, 1996およびMiyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997を参照)。使用することができる他のウイルスベクターには、例えば、アデノウイルス、レンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルス、ウシパピローマウイルスまたはヘルペスウイルス、例えばエプスタインバーウイルスが含まれる(例えば、Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990 ; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989 ; Eglitis et al., BioTechniques 6:608-614, 1988 ; Tolstoshev et al., Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990 ; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991 ; Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987 ; Anderson, Science 226:401-409, 1984 ; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991 ; Miller et al., Biotechnology 7:980-990, 1989 ; LeGal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993およびJohnson, Chest 107:77S- 83S, 1995のベクターも参照)。レトロウイルスのベクターは特によく開発され、臨床場面で使用されている(Rosenberget al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990 ; Anderson et al., 米国特許第5, 399, 346号)。

20

30

【 0 1 7 2 】

免疫応答性細胞の遺伝子改変のために、非ウイルスアプローチを用いることもできる。例えば、リポフェクションの存在下で核酸を投与することによって(Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987 ; Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990 ; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989 ; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983)、アシアロオロソムコイド - ポリリシンコンジュゲーション(Wuet al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988 ; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989)、または外科的条件下のマイクロインジェクション(Wolff et al., Science 247:1465, 1990)によって、核酸分子を免疫応答性細胞に導入することができる。遺伝子導入のための他の非ウイルス手段には、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、電気穿孔法およびプロトプラスト融合を使用した*in vitro*トランスフェクションが含まれる。細胞へのDNAの送達のために、リポソームも潜在的に有益であり得る。被験体の罹患組織への正常な遺伝子の移植は、培養可能な細胞型(例えば、自己または異種初代細胞またはその後代)に正常な核酸を*ex vivo*で導入することによって達成することもでき、その後、細胞(または、その後代)は、標的化組織に注射されるか、全身的に注射される。組換え受容体は、トランスポザーゼまたは標的化ヌクレアーゼ(例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼまたはTALENヌクレアーゼ、CRISPR)を使用して誘導するか得ることもできる。RNA電気穿孔法によって、一時的な発現を得ることができる。ある特定の実施形態では、組換え受容体は、トランスポゾンに基づくベクターによって導入することができる。ある特定

40

50

の実施形態では、トランスポゾンに基づくベクターは、トランスポゾン（別名、転移因子）を含む。ある特定の実施形態では、トランスポゾンは、トランスポサーゼによって認識することができる。ある特定の実施形態では、トランスポサーゼは、Sleeping Beautyトランスポサーゼである。

【0173】

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）システムは、原核細胞で発見されたゲノム編集ツールである。ゲノム編集のために利用される場合、このシステムはCas9（そのガイドとしてcrRNAを利用してDNAを改変することができるタンパク質）、CRISPR RNA（crRNA、Cas9と活性複合体を形成するtracrRNA（一般的にヘアピンループの形態）に結合する領域とともにそれを宿主DNAの正しい部分に誘導するためにCas9によって使用されるRNAを含有する）、トランス活性化crRNA（tracrRNA、crRNAに結合してCas9と活性複合体を形成する）、およびDNA修復鑄型（特異的DNA配列の挿入を可能にする細胞修復プロセスを誘導するDNA）の必要に応じた部分を含む。CRISPR/Cas9は、標的細胞をトランスフェクトするために、プラスミドをしばしば用いる。crRNAは、Cas9が細胞の中の標的DNAを同定し、それに直接的に結合するために使用する配列であるので、各適用のために設計する必要がある。CAR発現カセットを有する修復鑄型もまた、切断のいずれかの側の配列と重複し、挿入配列をコードしなければならないので、各適用のために設計する必要がある。複数のcrRNAおよびtracrRNAと一緒にパッケージして、単一ガイドRNA（sgRNA）を形成することができる。細胞にトランスフェクトさせるために、このsgRNAをCas9遺伝子と一緒に連結させ、プラスミドにすることができる。

10

20

【0174】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は人工制限酵素であり、それは、ジンクフィンガーDNA結合性ドメインをDNA切断ドメインと組み合わせることによって生成される。ジンクフィンガードメインは、ジンクフィンガーヌクレアーゼがゲノムの中の所望の配列を標的にすることを可能にする特異的DNA配列を標的にするように操作することができる。個々のZFNのDNA結合性ドメインは、複数の個々のジンクフィンガー反復配列を一般的に含有し、複数の塩基対を各々認識することができる。新しいジンクフィンガードメインを生成する最も一般的な方法は、公知の特異性のより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。ZFNにおける最も一般的な切断ドメインは、タイプII制限エンドヌクレアーゼFokIからの非特異的切断ドメインである。内因性相同組換え（HR）機構およびCAR発現カセットを有する相同性DNA鑄型を使用して、CAR発現カセットをゲノムに挿入するためにZFNを使用することができる。標的化配列がZFNによって切断される場合、HR機構は損傷染色体と相同性DNA鑄型の間の相同性を検索し、次に、染色体の2つの切断末端の間の鑄型の配列をコピーし、それによって相同性DNA鑄型をゲノムに組み入れる。

30

【0175】

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）は、DNAの特異的配列を切断するように操作することができる制限酵素である。TALENシステムは、ZFNとほとんど同じ原理で作動する。それらは、転写活性化因子様エフェクターDNA結合性ドメインをDNA切断ドメインと組み合わせることによって生成される。転写活性化因子様エフェクター（TALE）は、特異的ヌクレオチドのために強力な認識を有する2つの可変位置を有する33～34アミノ酸の反復モチーフで構成される。これらのTALEのアレイをアSEMBLすることによって、所望のDNA配列に結合し、それによってゲノムの特異的位置で切断するようにヌクレアーゼを誘導するように、TALE DNA結合性ドメインを操作することができる。ポリヌクレオチド療法で使用するためのcDNA発現は、任意の好適なプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）、シミアンウイルス40（SV40）またはメタロチオネインプロモーター）から誘導することができる。任意の適当な哺乳動物の調節エレメントまたはイントロン（例えば、伸長因子1aエ

40

50

ンハンサー/プロモーター/イントロン構造)によって調節することができる。例えば、所望により、核酸の発現を誘導するために、特異的細胞型において遺伝子発現を優先的に誘導することが公知のエンハンサーを使用することができる。使用されるエンハンサーには、限定されずに、組織または細胞特異的エンハンサーとして特徴付けられるものを含めることができる。あるいは、ゲノムクローンが治療構築物として使用される場合、同族の調節配列によって、または、所望により、上記のプロモーターまたは調節エレメントのいずれかを含む、異種供給源に由来する調節配列によって調節を媒介することができる。

【0176】

結果として生じる細胞は未変更の細胞のためのものと類似した条件の下で成長させることができ、それによって、変更された細胞を様々な目的のために増大させ、使用することができる。

10

【0177】

6. ゲノム編集方法

ある特定の非限定的な実施形態では、本明細書に開示されているHI-TCR、共刺激リガンド、CCRまたは他のいずれかの分子/導入遺伝子は、変更されたゲノム遺伝子座を介して、免疫応答性細胞によって発現される。ある特定の実施形態では、導入遺伝子の発現カセットは、標的化されたゲノム編集方法により、免疫応答性細胞の標的化されたゲノム遺伝子座に組み込まれる。ある特定の実施形態では、標的化されたゲノム遺伝子座は、CD3、CD3、CD247、B2M、TRAC、TRBC1、TRBC2、TRGC1および/またはTRGC2遺伝子座であり得る。

20

【0178】

6.1. T細胞受容体遺伝子座の操作

ある特定の実施形態では、HI-TCRは、変更された内因性T細胞受容体遺伝子座を介して、免疫応答性細胞によって発現される。ある特定の実施形態では、HI-TCR発現カセットは、内因性T細胞受容体遺伝子座に組み込まれる。ある特定の実施形態では、HI-TCR発現カセットは、T細胞受容体アルファ遺伝子座(TRA、GenBank ID: 6955)内に組み込まれる。ある特定の実施形態では、HI-TCR発現カセットは、T細胞受容体ベータ遺伝子座(TRB、GenBank ID: 6957)内に組み込まれる。ある特定の実施形態では、HI-TCR発現カセットは、T細胞受容体ガンマ遺伝子座(TRG、GenBank ID: 6965)内に組み込まれる。

30

【0179】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインおよびTCR定常ドメインが、HI-TCRの1個の抗原結合鎖に含まれるように、HI-TCR発現カセットは、TCR定常ドメイン遺伝子座の第1のエクソンに組み込まれる細胞外抗原結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、TCR定常ドメイン遺伝子座は、TRAC、TRBC1、TRBC2、TRGC1またはTRGC2であり得る。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインおよびTRACペプチドが、HI-TCRの第1の抗原結合鎖に含まれるように、HI-TCR発現カセットは、TRAC遺伝子座の第1のエクソンに組み込まれる細胞外抗原結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、HI-TCR発現カセットは、細胞外抗原結合ドメインおよびTRBCペプチドを必要に応じて含む第2の抗原結合鎖をさらに含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインおよびTRBCペプチドが、HI-TCRの第1の抗原結合鎖に含まれるように、HI-TCR発現カセットは、TRBC遺伝子座の第1のエクソンに組み込まれる細胞外抗原結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、HI-TCR発現カセットは、細胞外抗原結合ドメインおよびTRACペプチドを必要に応じて含む第2の抗原結合鎖をさらに含む。ある特定の実施形態では、発現カセットは、ポリシストロニック発現カセットを作成するエレメント、例えば、切断可能ペプチド、例えば、2Aペプチドを含む。

40

【0180】

ある特定の実施形態では、組換えTCRは、免疫応答性細胞の内因性TRAC遺伝子座および/またはTRBC遺伝子座に配置された発現カセットから発現される。ある特定の

50

実施形態では、組換えTCR発現カセットの配置は、免疫応答性細胞における天然TCR鎖および/または天然TCR鎖を含むTCRの内因性発現を破壊または無効化する。ある特定の実施形態では、組換えTCR発現カセットの配置は、免疫応答性細胞における組換えTCRと、天然TCR鎖および/または天然TCR鎖との間の誤対合を防止または排除する。

【0181】

任意の適した遺伝的編集方法および系を、内因性T細胞受容体遺伝子座の改変に使用することができる。節4に開示されるゲノム編集方法を、内因性T細胞受容体遺伝子座の改変に使用することができる。ある特定の実施形態では、CRISPR系が、T細胞受容体遺伝子座の改変に使用される。ある特定の実施形態では、CRISPR系は、ヒトTRAC遺伝子座のエクソン1を標的とする。ある特定の実施形態では、CRISPR系は、ヒトTRAC遺伝子座のエクソン1を標的とするガイドRNA (gRNA) を含む。

10

【0182】

ある特定の実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼが、内因性T細胞受容体遺伝子座の改変に使用される。ある特定の実施形態では、TALEN系が、内因性T細胞受容体遺伝子座の改変に使用される。

【0183】

ある特定の実施形態では、細胞における1個の内因性T細胞受容体遺伝子座が、HI-TCRの1種または複数の抗原結合鎖を発現するように改変されている場合、細胞における1個または複数の他の内因性T細胞受容体遺伝子座は、内因性TCR鎖の内因性発現を排除するように改変されている。ある特定の実施形態では、1個または複数の他の内因性T細胞受容体遺伝子座は、目的の遺伝子、例えば、抗腫瘍サイトカイン(例えば、IL-2、IL-12、TNF およびINF)、共刺激分子リガンド(例えば、4-1BBL)、追跡用遺伝子(例えば、eGFP)または自殺遺伝子を発現するようにさらに改変されている。

20

【0184】

6.2. プロモーターまたは転写ターミネーターのゲノム編集による遺伝子発現の改変
ある特定の非限定的な実施形態では、標的化されたゲノム遺伝子座に組み込まれたHI-TCR発現カセットの発現は、ゲノム遺伝子座の内因性プロモーター/エンハンサーによって駆動される。ある特定の実施形態では、標的化されたゲノム遺伝子座に組み込まれたHI-TCR発現カセットの発現は、ゲノム遺伝子座に導入された改変されたプロモーター/エンハンサーによって駆動される。任意の標的化されたゲノム編集方法を使用して、標的化されたゲノム遺伝子座のプロモーター/エンハンサー領域を改変し、これにより、免疫応答性細胞におけるHI-TCRの発現を増強または改変することができる。ある特定の実施形態では、改変は、構成的プロモーターもしくは誘導性プロモーターによる内因性プロモーターの置換え、または標的化されたゲノム遺伝子座のプロモーター領域への構成的プロモーターもしくは誘導性プロモーターの挿入を含む。ある特定の実施形態では、構成的プロモーターが、標的化されたゲノム遺伝子座に設置されて、HI-TCRの遺伝子発現を駆動する。適格の構成的プロモーターとして、CMVプロモーター、EF1aプロモーター、SV40プロモーター、PGK1プロモーター、Ubcプロモーター、ベータ-アクチンプロモーターおよびCAGプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。あるいは、またはさらに、条件的または誘導性(inducible)プロモーターが、標的化されたゲノム遺伝子座に設置されて、HI-TCRの遺伝子発現を駆動する。条件的プロモーターの非限定的な例として、テトラサイクリン応答エレメント(TRE)プロモーターおよびエストロゲン応答エレメント(ERE)プロモーターが挙げられる。加えて、エンハンサーエレメントを、プロモーター領域以外の領域に配置することができる。

30

40

【0185】

ある特定の非限定的な実施形態では、標的化されたゲノム遺伝子座に組み込まれたHI-TCR発現カセットの発現は、ゲノム遺伝子座の内因性転写ターミネーターによって調節される。ある特定の実施形態では、標的化されたゲノム遺伝子座に組み込まれたHI-

50

T C R 発現カセットの発現は、ゲノム遺伝子座に導入された改変された転写ターミネーターによって調節される。任意の標的化されたゲノム編集方法を使用して、標的化されたゲノム遺伝子座の転写ターミネーター領域を改変し、これにより、免疫応答性細胞における H I - T C R の発現を改変することができる。ある特定の実施形態では、改変は、代替転写ターミネーターによる内因性転写ターミネーターの置換え、または標的化されたゲノム遺伝子座の転写ターミネーター領域への代替転写ターミネーターの挿入を含む。ある特定の実施形態では、代替転写ターミネーターは、遺伝子の 3' U T R 領域またはポリ (p l o y) A 領域を含む。ある特定の実施形態では、代替転写ターミネーターは、内因性である。ある特定の実施形態では、代替転写ターミネーターは、外因性である。ある特定の実施形態では、代替転写ターミネーターとして、T K 転写ターミネーター、G C S F 転写ターミネーター、T C R A 転写ターミネーター、H B B 転写ターミネーター、ウシ成長ホルモン転写ターミネーター、S V 4 0 転写ターミネーターおよび P 2 A エlement が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【 0 1 8 6 】

いずれかの標的化されたゲノム編集方法を、標的化されたゲノム遺伝子座のプロモーター/エンハンサー領域および/または転写ターミネーター領域の改変に使用することができる。ある特定の実施形態では、C R I S P R 系が、標的化されたゲノム遺伝子座のプロモーター/エンハンサー領域および/または転写ターミネーター領域の改変に使用される。ある特定の実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼが、標的化されたゲノム遺伝子座のプロモーター/エンハンサー領域および/または転写ターミネーター領域の改変に使用される。ある特定の実施形態では、T A L E N 系が、標的化されたゲノム遺伝子座のプロモーター/エンハンサー領域および/または転写ターミネーター領域の改変に使用される。

20

【 0 1 8 7 】

ゲノム編集剤/システムを送達するための方法は、必要性によって異なってもよい。ある特定の実施形態では、選択されるゲノム編集方法の構成成分は、1つまたは複数のプラスミドの中の D N A 構築物として送達される。ある特定の実施形態では、構成成分は、ウイルスベクターを通して送達される。一般的な送達方法には、限定されずに、電気穿孔法、マイクロインジェクション、遺伝子銃、インパレフェクション (i m p a l e f e c t i o n)、静水圧、連続的注入、超音波処理、マグネトフェクション、アデノ随伴ウイルス、ウイルスベクターのエンベロープタンパク質シュードタイプ化、複製能のあるベクターのシスおよびトランス作用性Element、単純ヘルペスウイルス、および化学的ビヒクル (例えば、オリゴヌクレオチド、リボプレックス、ポリマーソーム (p o l y m e r s o m e)、ポリプレックス、 dendri m e r、無機ナノ粒子および細胞透過性ペプチド) が含まれる。

30

【 0 1 8 8 】

改変は、標的化されたゲノム遺伝子座内のいずれかの箇所で、または標的化されたゲノム遺伝子座の遺伝子発現に影響し得るいずれかの箇所で為すことができる。ある特定の実施形態では、改変は、標的化されたゲノム遺伝子座の転写開始部位の上流に発生する。ある特定の実施形態では、改変は、標的化されたゲノム遺伝子座の転写開始部位およびタンパク質コード領域の間に発生する。ある特定の実施形態では、改変は、標的化されたゲノム遺伝子座のタンパク質コード領域の下流に発生する。ある特定の実施形態では、改変は、標的化されたゲノム遺伝子座の転写開始部位の上流に発生し、この場合、改変は、新たな転写開始部位を産生する。

40

【 0 1 8 9 】

7. ポリペプチドおよびアナログ

免疫応答性細胞において発現された場合に、その抗新生物活性を増強するように改変された、ポリペプチド (例えば、C D 1 9、C D 8、C D 2 8、C D 3、C D 4 0、4 - 1 B B、O X 4 0、C D 8 4、C D 1 6 6、C D 8 a、C D 8 b、I C O S、I C A M - 1、T R A C、T R B C 1、T R B C 2、T R G C 1、T R G C 2、C D 3、C D 3

50

、CD3、およびCTLA-4)またはその断片もまた、本開示の主題に含まれる。本開示の主題は、配列において変化を生じることによってアミノ酸配列または核酸配列を最適化するための方法を提供する。そのような変化は、ある特定の変異、欠失、挿入、または翻訳後改変を含み得る。本開示の主題は、本明細書に開示の任意の天然に存在するポリペプチド(CD19、CD8、CD28、CD3、CD40、4-1BB、OX40、CD84、CD166、CD8a、CD8b、ICOS、ICAM-1、TRAC、TRBC1、TRBC2、TRGC1、TRGC2、CD3、CD3、CD3、およびCTLA-4を含むがこれらに限定されない)のアナログをさらに含む。アナログは、本明細書に開示の天然に存在するポリペプチドとはアミノ酸配列の差によって、翻訳後改変によって、またはその両方によって異なり得る。アナログは、本開示の主題の天然に存在するアミノ酸配列の全てまたは一部と少なくとも約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれより高い相同性(homologous)を示すことができる。配列比較の長さは、少なくとも5、10、15もしくは20アミノ酸残基、例えば、少なくとも25、50もしくは75アミノ酸残基であり、または100アミノ酸残基よりも長い。この場合も、同一性の程度を決定する例示的なアプローチにおいて、BLASTプログラムを、近縁の配列を示す e^{-3} から e^{-100} の間の確率スコアで使用してもよい。改変は、ポリペプチドの*in vivo*および*in vitro*化学的誘導体化、例えば、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、またはグリコシル化を含み、そのような改変は、ポリペプチド合成もしくはプロセッシングの間に、または単離された改変酵素による処理後に起こり得る。アナログはまた、一次配列の変化によって天然に存在するポリペプチドとは異なり得る。これらには、天然および誘導型の両方の遺伝子バリエーション(例えば、放射線照射もしくはエタンメチルスルフェートに対する曝露によるランダム変異誘発に起因する、またはSambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), CSH Press, 1989もしくはAusubel et al., 前記参照に記載される部位特異的変異誘発による)が含まれる。Lアミノ酸(amino acid)以外の残基、例えばDアミノ酸または天然に存在しないもしくは合成アミノ酸、例えば、アミノ酸を含有する、環化ペプチド、分子およびアナログも含まれる。

【0190】

完全長ポリペプチドに加えて、本開示の主題はまた、本明細書に開示のポリペプチドまたはペプチドドメインのいずれか1つの断片も提供する。本明細書で使用される場合、用語「断片」は、少なくとも5、10、13、または15アミノ酸を意味する。ある特定の実施形態では、断片は、少なくとも20連続アミノ酸、少なくとも30連続アミノ酸、または少なくとも50連続アミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、断片は、少なくとも60~80、100、200、300、またはそれより多くの連続アミノ酸を含む。断片は、当業者に公知の方法によって生成することができるか、または通常のプロセッシングに起因し得る(例えば、生物活性にとって必要ではないアミノ酸の新生ポリペプチドからの除去、または選択的mRNAスプライシングもしくは選択的タンパク質プロセッシング事象によるアミノ酸の除去)。

【0191】

非タンパク質アナログは、本明細書に開示のタンパク質の機能的活性を模倣するように設計された化学構造を有する。そのようなアナログは、元のポリペプチドの生理的活性を超えてもよい。アナログの設計方法は当技術分野で周知であり、アナログの合成は、得られたアナログが、免疫応答性細胞において発現された場合に元のポリペプチドの抗新生物活性を増加させるように化学構造を改変することによって、そのような方法に従って実施することができる。これらの化学的改変は、代替のR基を置換すること、および基準ポリペプチドの特定の炭素原子の飽和の程度を変化させることを含むがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、タンパク質アナログは、*in vivo*での分解に対して比較的抵抗性であり、投与した場合、より持続的な治療効果をもたらす。機能的活性を測定するためのアッセイは、以下の実施例に記載されるアッセイを含むがこれに限定されない

10

20

30

40

50

。

【0192】

8. 投与

本開示の免疫応答性細胞を含む組成物は、抗原に対する免疫応答を誘導および/もしくは増強するために、ならびに/または新生物、病原体感染もしくは感染性疾患を処置および/もしくは防止するために、被験体に全身にまたは直接提供することができる。ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答性細胞またはそれを含む組成物は、目的の臓器（例えば、新生物に罹患している臓器）に直接注射される。あるいは、本開示の免疫応答性細胞またはそれを含む組成物は、例えば循環器系（例えば、腫瘍の血管系）に投与することによって、目的の臓器に間接的に提供される。増大および分化剤を、細胞または組成物の投与の前、間、または後に提供して、*in vitro*または*in vivo*でT細胞、NK細胞、またはCTL細胞の産生を増加させることができる。

10

【0193】

本開示の免疫応答性細胞は、任意の生理的に許容されるビヒクル中で、通常、血管内に投与することができるが、それらはまた、細胞が再生および分化のための適切な部位を見つけ得る、骨または他の都合のよい部位（例えば、胸腺）に導入してもよい。通常、少なくとも約 1×10^5 個の細胞を投与し、最終的に約 1×10^{10} 個またはそれよりも多くに達する。本開示の免疫応答性細胞は、精製細胞集団を含み得る。当業者は、様々な周知の方法、例えば蛍光活性化細胞選別（FACS）を使用して、集団における本開示の免疫応答性細胞のパーセンテージを容易に決定することができる。本開示の免疫応答性細胞を含む集団における適した純度範囲は、約50%～約55%、約5%～約60%および約65%～約70%である。ある特定の実施形態では、純度は、約70%～約75%、約75%～約80%、または約80%～約85%である。ある特定の実施形態では、純度は、約85%～約90%、約90%～約95%、および約95%～約100%である。投薬量は、当業者によって容易に調整することができる（例えば、純度の減少は投薬量の増加を必要とし得る）。細胞は、注射、カテーテルなどによって導入することができる。

20

【0194】

本開示の組成物は、本開示の免疫応答性細胞またはその前駆体、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であり得る。投与は、自己または異種であり得る。例えば、免疫応答性細胞または前駆体を1つの被験体から得、これを同じ被験体または異なる適合性の被験体に投与することができる。末梢血由来の免疫応答性細胞またはその子孫（例えば、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*由来）を、カテーテル投与、全身注射、局所注射、静脈内注射または非経口的投与を含む、局所注射を介して投与することができる。本開示の主題の治療組成物（例えば、本開示の免疫応答性細胞を含む医薬組成物）を投与する場合、これは単位投薬注射形態（溶液、懸濁物、エマルジョン）として製剤化することができる。

30

【0195】

9. 製剤

本開示の免疫応答性細胞を含む組成物は、滅菌液体調製物、例えば選択されたpHとなるように緩衝され得る等張水溶液、懸濁物、エマルジョン、分散物または粘性組成物として簡便に提供することができる。液体調製物は通常、ゲル、他の粘性組成物および固体組成物より容易に調製される。加えて、液体組成物は、特に注射によって投与するためにいくぶんより簡便である。一方、粘性組成物は、適切な粘度範囲内で製剤化され、特定の組織とのより長い接触期間を提供することができる。液体または粘性組成物は、担体を含むことができ、これは、例えば水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、およびその適した混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。

40

【0196】

滅菌注射可能溶液は、望ましければ、他の成分の様々な量と共に適切な溶媒の必要量に遺伝子改変免疫応答性細胞を組み込むことによって調製することができる。そのような組

50

成物は、適した担体、希釈剤、または賦形剤、例えば滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどと混合することができる。組成物はまた、凍結乾燥することもできる。組成物は、望ましい投与経路および調製物に応じて、補助物質、例えば湿潤剤、分散剤、または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、pH緩衝化剤、ゲル化または粘度増強添加剤、保存剤、矯味矯臭剤、着色料などを含有することができる。過度の実験法を行うことなく、適切な調製物を調製するために、標準的なテキスト、例えば参照により本明細書に組み込まれている、"REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985を参照してもよい。

【0197】

抗菌保存剤、抗酸化剤、キレート化剤、および緩衝液を含む、組成物の安定性および無菌性を増強する様々な添加剤を添加することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって確保することができる。注射可能な医薬形態の持続的な吸収は、吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらすことができる。しかし、本開示の主題によれば、使用されるいかなるビヒクル、希釈剤、または添加剤も、遺伝子改変された免疫応答性細胞またはその子孫と適合性でなければならない。

10

【0198】

組成物は、等張性であり得る、すなわちそれらは血液および涙液と同じ浸透圧を有し得る。組成物の所望の等張性は、塩化ナトリウム、または他の薬学的に許容される作用物質、例えばデキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコール、または他の無機もしくは有機溶質を使用して達成され得る。塩化ナトリウムは、特に、ナトリウムイオンを含有する緩衝液のためであり得る。

20

【0199】

組成物の粘度は、望ましければ、薬学的に許容される増粘剤を使用して選択されるレベルで維持することができる。例えば、メチルセルロースは、容易で安価に入手ことができ、作業が容易である。他の適した増粘剤には、例えばキサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが挙げられる。増粘剤の濃度は、選択される薬剤に依存し得る。重要な点は、選択された粘度を達成する量を使用することである。明らかに、適した担体および他の添加剤の選択は、正確な投与経路および特定の剤形の性質、例えば、液体剤形（例えば、組成物を溶液、懸濁物、ゲルまたは別の液体形態、例えば時限放出形態または液体充填形態に製剤化するか否か）に依存する。

30

【0200】

投与される細胞の量は、処置される被験体に関して変化する。一実施形態では、約 10^4 ~ 約 10^{10} 個、約 10^5 ~ 約 10^9 個、または約 10^6 ~ 約 10^8 個の本開示の免疫応答性細胞がヒト被験体に投与される。より有効な細胞は、さらに少数で投与され得る。ある特定の実施形態では、少なくとも約 1×10^8 、約 2×10^8 、約 3×10^8 、約 4×10^8 、または約 5×10^8 個の本開示の免疫応答性細胞が、ヒト被験体に投与される。有効用量と見なされる量の正確な決定は、特定の被験体のサイズ、年齢、性別、体重および状態を含む、各々の被験体に関して個別の要因に基づき得る。投薬量は、本開示および当技術分野での知識から当業者が容易に確認することができる。

40

【0201】

当業者は、組成物中のおよび方法において投与される、細胞ならびに必要な応じた添加剤、ビヒクル、および/または担体の量を容易に決定することができる。典型的には、任意の添加剤（活性な細胞および/または薬剤に加えて）は、リン酸緩衝食塩水中に0.001 ~ 50%（重量）溶液の量で存在し、活性成分は、マイクログラムからミリグラムのオーダーで、例えば約0.0001 ~ 約5重量%、約0.0001 ~ 約1重量%、約0.0001 ~ 約0.05重量%または約0.001 ~ 約20重量%、約0.01 ~ 約10重量%、または約0.05 ~ 約5重量%で存在する。動物またはヒトに投与される任意の組成物に関して、以下を決定することができる：適した動物モデル、例えばマウスなどの醫

50

歯類における致死用量 (LD) および LD50 の決定などによる毒性 ; 適切な応答を誘発する組成物の投薬量、その中の構成要素の濃度、および組成物の投与時期。そのような決定は、当業者の知識、本開示、および本明細書に引用した文書により、過度の実験を必要としない。そして逐次投与の時間は、過度の実験を行うことなく確認することができる。

【0202】

10 . 処置方法

本開示の主題は、それを必要とする被験体における免疫応答を誘導および / または増加させるための方法を提供する。本開示の免疫応答性細胞およびそれを含む組成物は、被験体における新生物を処置および / または防止するために使用することができる。本開示の免疫応答性細胞およびそれを含む組成物は、新生物に罹患している被験体の生存を延長させるために使用することができる。本開示の免疫応答性細胞およびそれを含む組成物は、被験体、例えば免疫無防備状態のヒト被験体における病原体感染または他の感染性疾患を処置および / または防止するためにも使用することができる。そのような方法は、既存の状態の緩和であれ、再発の防止であれ、所望の効果を達成するために有効な量の本開示の免疫応答性細胞、またはそれを含む組成物 (例えば、医薬組成物) を投与することを含む。処置の場合、投与される量は、所望の効果を生じるために有効な量である。有効量は、1つまたは一連の投与で提供することができる。有効量は、ボラスでまたは連続注入によって提供することができる。

10

【0203】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される HI - TCR を含む免疫応答性細胞を使用して、例えば、疾患の再発により、低い発現レベルの表面抗原を有する腫瘍細胞を有する被験体を処置することができ、被験体は、残存腫瘍細胞をもたらす処置を受けたことがある。ある特定の実施形態では、腫瘍細胞は、腫瘍細胞の表面に低密度の標的分子を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞 1 個当たり約 5 , 0 0 0 分子未満、細胞 1 個当たり約 4 , 0 0 0 分子未満、細胞 1 個当たり約 3 , 0 0 0 分子未満、細胞 1 個当たり約 2 , 0 0 0 分子未満、細胞 1 個当たり約 1 , 5 0 0 分子未満、細胞 1 個当たり約 1 , 0 0 0 分子未満、細胞 1 個当たり約 5 0 0 分子未満、細胞 1 個当たり約 2 0 0 分子未満、または細胞 1 個当たり約 1 0 0 分子未満の密度を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞 1 個当たり約 2 , 0 0 0 分子未満の密度を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞 1 個当たり約 1 , 5 0 0 分子未満の密度を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞 1 個当たり約 1 , 0 0 0 分子未満の密度を有する。ある特定の実施形態では、細胞表面に低密度で存在する標的分子は、細胞 1 個当たり約 4 , 0 0 0 分子 ~ 細胞 1 個当たり約 2 , 0 0 0 分子、細胞 1 個当たり約 2 , 0 0 0 分子 ~ 細胞 1 個当たり約 1 , 0 0 0 分子、細胞 1 個当たり約 1 , 5 0 0 分子 ~ 細胞 1 個当たり約 1 , 0 0 0 分子、細胞 1 個当たり約 2 , 0 0 0 分子 ~ 細胞 1 個当たり約 5 0 0 分子、細胞 1 個当たり約 1 , 0 0 0 分子 ~ 細胞 1 個当たり約 2 0 0 分子、または細胞 1 個当たり約 1 , 0 0 0 分子 ~ 細胞 1 個当たり約 1 0 0 分子の密度を有する。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される HI - TCR を含む免疫応答性細胞を使用して、疾患の再発を有する被験体を処置することができ、被験体は、4 - 1 B B ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む CAR (例えば、4 - 1 B B z CAR) を含む免疫応答性細胞 (例えば、T 細胞) を受けたことがある。ある特定の実施形態では、腫瘍細胞は、腫瘍細胞の表面に低密度の腫瘍特異的抗原を有する。ある特定の実施形態では、疾患は、CD19⁺ ALL である。ある特定の実施形態では、腫瘍細胞は、腫瘍細胞上に低密度の CD19 を有する。そのような方法は、有効な量の本開示の免疫応答性細胞またはそれを含む組成物 (例えば、医薬組成物) を投与して、所望の効果、既存の状態の軽減または再発の防止を達成することを含む。

20

30

40

【0204】

「有効量」 (または「治療有効量」) は、処置によって有益なまたは所望の臨床結果をもたらすために十分な量である。有効量は、1つまたは複数の用量で被験体に投与するこ

50

とができる。処置に関して、有効量は、疾患を緩和する、好転させる、安定化する、逆転させる、もしくはその進行を遅らせるために十分であるか、またはそうでなければ疾患の病理学的帰結を低減させるために十分である量である。有効量は、一般的に症例毎に医師によって決定され、当業者の技能の範囲内である。有効量を達成するための適切な投薬量を決定する場合、典型的にいくつかの要因を考慮に入れる。これらの要因は、被験体の年齢、性別、および体重、処置される状態、状態の重症度、ならびに投与される免疫応答性細胞の形態および有効濃度を含む。

【0205】

抗原特異的T細胞を使用する養子免疫療法の場合、約 $10^6 \sim 10^{10}$ 個（例えば、約 10^9 個）の範囲の細胞用量を典型的に注入する。本開示の細胞を宿主に投与してその後分化させると、特定の抗原に対して特異的に方向付けられたT細胞が誘導される。改変された細胞は、静脈内、皮下、節内、腫瘍内、髄腔内、胸膜内、腹腔内および胸腺への直接投与を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の方法によって投与することができる。

10

【0206】

本開示の主題は、被験体における新生物を処置および/または防止するための方法を提供する。方法は、新生物を有する被験体に、有効量の本開示の免疫応答性細胞またはそれを含む組成物を投与することを含み得る。

【0207】

新生物の非限定的な例には、血液がん（例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫）、卵巣がん、乳がん、膀胱がん、脳がん、結腸がん、腸がん、肝臓がん、肺がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、神経膠芽腫、咽頭がん、黒色腫、神経芽腫、腺癌、神経膠腫、軟部組織肉腫、および様々な癌腫（前立腺および小細胞肺癌を含む）が挙げられる。適した癌腫はさらに、星状細胞腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、乏突起神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、未分化神経外胚葉性腫瘍（PNET）、軟骨肉腫、骨原性肉腫、膵管腺癌、小細胞および大細胞肺腺癌、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、扁平上皮癌、気管支肺癌、上皮腺癌およびその肝臓転移、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、肝癌、胆管細胞癌、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、横紋筋肉腫、結腸癌、基底細胞癌、汗腺癌、乳頭状癌、皮脂腺癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、神経芽腫、網膜芽腫、白血病、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、および重鎖病、乳管腺癌および小葉腺癌などの乳房腫瘍、子宮頸部の扁平上皮および腺癌、子宮および卵巣の上皮癌、前立腺腺癌、膀胱の移行扁平上皮癌、BおよびT細胞リンパ腫（結節性およびびまん性）、形質細胞腫、急性および慢性白血病、悪性黒色腫、軟部組織肉腫、ならびに平滑筋肉腫を含むがこれらに限定されない、腫瘍学の分野で公知の任意の癌腫を含む。ある特定の実施形態では、新生物は、血液がん（例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫）、卵巣がん、前立腺がん、乳がん、膀胱がん、脳がん、結腸がん、腸がん、肝臓がん、肺がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、神経膠芽腫、および咽頭がんからなる群より選択される。ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答性細胞およびそれを含む組成物は、通常の治療介入を受けることができない血液がん（例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫）または卵巣がんを処置および/または防止するために使用することができる。ある特定の実施形態では、新生物は、固形腫瘍である。

20

30

40

【0208】

被験体は、進行した形態の疾患を有し得、この場合、処置の目的は、疾患進行の緩和もしくは逆転および/または副作用の好転を含み得る。被験体は、それに対して既に処置されている状態の既往を有し得、この場合、治療目的は、典型的には、再発リスクの減少または遅延を含む。

【0209】

治療に適したヒト被験体は、典型的には、臨床基準によって区別することができる2つ

50

の処置群を含む。「進行疾患」または「高い腫瘍負荷」を有する被験体は、臨床的に測定可能な腫瘍を有する被験体である。臨床的に測定可能な腫瘍は、腫瘍質量に基づいて検出することができる腫瘍である（例えば、触診、C A Tスキャン、ソノグラム、マンモグラム、またはX線によって；生化学または組織病理学マーカー陽性は、単独ではこの集団を同定するために不十分である）。医薬組成物は、その状態を緩和する目的で、抗腫瘍応答を誘発するためにこれらの被験体に投与される。理想的には、腫瘍質量の低減が結果として起こるが、いかなる臨床的改善も利益を構成する。臨床的改善は、腫瘍の進行のリスクもしくは速度の減少、またはその病理学的帰結の低減を含む。

【0210】

適した被験体の第2の群は、「アジュバント群」として当技術分野で公知である。これらは、新生物の既往を有するが、治療の別の様式に応答性であった個体である。以前の治療は、外科的切除、放射線療法、および従来の化学療法を含み得るこれらに限定されない。その結果として、これらの個体は、臨床的に測定可能な腫瘍を有しない。しかし、それらは、元の腫瘍部位近傍で、または転移によって、疾患の進行のリスクがあると疑われる。この群を、高リスク個体と低リスク個体にさらに細分することができる。細分は、初回処置の前または後で観察された特色に基づいて行われる。これらの特色は、臨床技術分野で公知であり、各々の異なる新生物について適切に定義される。高リスク亜群に典型的な特色は、腫瘍が隣接組織に浸潤するもの、またはリンパ節の関与を示すものである。

10

【0211】

別の群は、新生物に対して遺伝的素因を有するが、まだ新生物の臨床徴候を示していない。例えば、乳がんに関連する遺伝子変異に関して試験陽性の女性で、まだ妊娠可能年齢の女性は、希望すれば、予防手術を実施することが適切となるまで、新生物の発生を防止するための予防的処置において本明細書に記載の免疫応答性細胞の1つまたは複数を受けることができる。

20

【0212】

加えて、本開示の主題は、被験体、例えば免疫無防備状態の被験体において病原体感染（例えば、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、寄生生物感染、または原生生物感染）を処置および/または防止するための方法を提供する。方法は、病原体感染を有する被験体に、有効量の本開示の免疫応答性細胞またはそれ（thereof）を含む組成物を投与することを含み得る。処置に対して感受性がある例示的なウイルス感染には、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、およびインフルエンザウイルス感染が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0213】

免疫学的合併症（「悪性のT細胞形質転換」として公知）、例えば移植片対宿主病（GvHD）のリスクを防ぐもしくは最小限にするために、または健康な組織が腫瘍細胞と同じ標的抗原を発現して、GvHDと類似の転帰をもたらす場合には、さらなる改変を、本開示の免疫応答性細胞（例えば、T細胞）に導入することができる。この問題の可能性のある解決策は、本開示の免疫応答性細胞へと自殺遺伝子を操作することである。適した自殺遺伝子には、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV-TK）、誘導型カスパーゼ9自殺遺伝子（iCasp-9）、および切断型ヒト上皮増殖因子受容体（EGFRt）ポリペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、自殺遺伝子は、EGFRtポリペプチドである。EGFRtポリペプチドは、抗EGFRモノクローナル抗体（例えば、セツキシマブ）の投与によってT細胞の排除を可能し得る。EGFRtは、本開示のCARの抗原認識受容体の上流に共有結合により接合することができる。自殺遺伝子は、本開示のCARをコードする核酸を含むベクター内に含めることができる。このようにして、悪性T細胞形質転換（例えばGvHD）の際に自殺遺伝子を活性化するように設計されたプロドラッグ（例えばプロドラッグ（例えば、iCasp-9を活性化することができるAP1903）の投与は、自殺遺伝子活性化CAR発現T細胞においてアポトーシスを誘発する。自殺遺伝子を本開示のCARに組み込むことは、非常に短期間でCAR T細胞の大多数を排除することができ、追加の安全性レベルを与える

40

50

。自殺遺伝子を組み込んだ本開示の免疫応答性細胞（例えば、T細胞）は、CAR T細胞注入後の所与の時点で予め先制して排除することができるか、または毒性の最も早期の徴候時に根絶することができる。

【0214】

11. キット

本開示の主題は、被験体において免疫応答を誘導および/もしくは増強する、ならびに/または新生物もしくは病原体感染を処置および/もしくは防止するためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、有効量の本開示の免疫応答性細胞またはそれを含む医薬組成物を含む。ある特定の実施形態では、キットは、滅菌容器を含み；そのような容器は、箱、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、プリスターパック、または当技術分野で公知の他の適した容器形態であり得る。そのような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属ホイル、または医薬を保持するために適した他の材料で作製することができる。ある特定の非限定的な実施形態では、キットは、必要に応じて1つまたは複数のベクターに含まれ得る、発現可能な(expressible)形態で、目的の抗原に対する本明細書に開示されるHI-TCRをコードする単離核酸分子を含む。

10

【0215】

望ましければ、免疫応答性細胞および/または核酸分子は、新生物または病原体または免疫障害を有するまたは発症するリスクがある被験体に、細胞または核酸分子を投与するための指示と共に提供される。指示は一般的に、新生物または病原体感染の処置および/または防止のための組成物の使用に関する情報を含む。ある特定の実施形態では、指示は、以下の少なくとも1つを含む：治療剤の説明；新生物、病原体感染または免疫障害、またはその症状の処置または防止のための投薬スケジュールおよび投与；注意事項；警告；適応；禁忌；過量の情報；有害反応；動物の薬理学；臨床研究；および/または参考文献。指示は、容器（存在する場合）に直接印刷してもよく、または容器に貼付されたラベルとして、または容器の中にもしくは容器と共に供給される個別のシート、パンフレット、カード、もしくはフォルダーとして存在してもよい。

20

【実施例】

【0216】

本開示の実施は、特に示していない限り、十分に当業者の技能範囲内である分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の通常の技術を使用する。そのような技術は、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition(Sambrook, 1989)；"Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984)；"Animal Cell Culture" (Freshney, 1987)；"Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996)；"GeneTransfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987)；"Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987)；"PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994)；"Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)などの文献に十分に説明されている。これらの技術は、本明細書に開示のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生に応用可能であり、そのため、本開示の主題の作製および実施において考慮され得る。特定の実施形態に関して特に有用な技術を、続く節で考察する。

30

40

【0217】

以下の実施例は、本開示の細胞および組成物を作製および使用方法に関する完全な開示および説明を当業者に提供するために述べられており、本発明者らが本発明であると思わず範囲を限定することを意図しない。

【0218】

（実施例1 内因性非HLA制限T細胞受容体/CD3複合体によるT細胞の標的化）
緒言

T細胞活性化を生理学的に制御および調節するそのCD3複合体を破壊または迂回することなく、ヒトT細胞の抗原特異性を変更するように設計されたTCR遺伝子座における特異的な改変を行った。このアプローチにおいて、T細胞は、その内因性T細胞受容体を

50

失い、CARを使用する際の他の事例では迂回されるそのCD3複合体を活用して、HLAから独立して抗原を認識する能力を獲得した。これは、天然CD3複合体の全ての構成要素をその天然の構造で保存するような仕方での、TRAC遺伝子座への抗原結合ドメインの導入と組み合わせた、内因性TCRの標的化された破壊により達成された。組換えTCR様分子(すなわち、HIT-TCR、FvTCRまたはHIT-CAR)は、抗原認識を方向付けるための、免疫グロブリン遺伝子に由来する可変ドメインまたは代替リガンドを有することができる。CD3複合体を介した組み換えられた受容体シグナルは、無傷であっても(すなわち、その生理学的組成である)、または共刺激ドメインの非共有結合的取込みにより増大されていてもよい。

【0219】

結果

所定の抗原のための別個の可変ドメインを有するTCRまたはTCR様遺伝子を組み込むことにより、TCRおよびTCR様T細胞の一段階生成のための新規戦略を開発した。これは、内因性TCRの表面発現の付随する破壊により、内因性TCRプロモーター(アルファ、ベータまたはその両方)の制御下での新たなTCR/TCR様遺伝子の発現をもたらした。

【0220】

TCRアルファ定常鎖(TRAC)第1のエクソンにおけるプロモーター不含(less)CAR遺伝子カセットの組み込みを標的化することにより、ユニバーサルCAR T細胞の一段階生成のための戦略を開発した。これは、細胞表面におけるTCR発現の欠如をもたらすTCRアルファ遺伝子発現の付随する破壊により、内因性TCRアルファプロモーターの制御下でのCAR発現をもたらした。TRAC遺伝子座におけるCAR遺伝子標的化は、部位特異的ヌクレアーゼ(例えば、CRISPR/Cas9)およびAAVドナー鋳型を使用することにより相同組換え(HR)により達成された。HRに基づく遺伝子標的化を使用して、本戦略は、特異的抗原結合ドメインを含有するキメラTCR受容体によってコードされた、特有の特異性を有するT細胞の生成を可能にした。抗原結合ドメインは、免疫グロブリン(すなわち、Fv断片)、細胞表面受容体のリガンドまたはTCR(または)のいずれかに由来した。ハイブリッド免疫グロブリン-TCRキメラ抗原受容体(すなわち、HIT-CAR、FvTCRまたはHI-TCR)または TCRは、T細胞が、HLA非依存的に標的細胞を認識することを可能にした。新たな TCRの挿入は、同じようにして達成することができたが、HLA制限抗原認識をもたらすであろう。

【0221】

例えば、図1Aは、T細胞受容体(TCR)、B細胞受容体(BCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、およびHLA非依存的なTCRに基づくキメラ抗原受容体(すなわち、HIT-CAR、FvTCRまたはHI-TCR)の略図を示す。TRAC遺伝子座への3種の受容体のCRISPR/Cas9により標的化された組み込みを図1Bに示す。操作されたHIT-CARは、CD19を標的とする。TRAC遺伝子座からのHIT-CAR(すなわち、HI-TCR)の細胞表面発現を図1Cに示す。HIT-CAR(すなわち、HI-TCRまたはFvTCR)T細胞の細胞溶解効果および増殖をそれぞれ図1Dおよび図1Eに示す。

【0222】

図2Aに示す通り、単一ステップにおける標的遺伝子破壊およびHIT-CAR(すなわち、HI-TCRまたはFvTCR)標的化挿入を組み合わせ、最大65%のHIT-CAR(すなわち、HI-TCRまたはFvTCR)T細胞を得るための条件を確立した。これらのT細胞は、図2Bに示す通り、1928z CARを発現する以前に特徴付けされたTRAC-CAR T細胞と同様の*in vitro*および*in vivo*腫瘍溶解活性を示した。加えて、抗原相互作用は、HIT-CAR(すなわち、HI-TCRまたはFvTCR)T細胞の下方調節を誘導し、これは、抗原依存性刺激の数に依存した。内因性TCR発現は、細胞表面において排除されるため、これらのHIT-CAR(す

10

20

30

40

50

なわち、H I - T C R または F v T C R) T 細胞は、既製の (off - the - shelf) 免疫療法の開発に有用であった。

【 0 2 2 3 】

C D 1 9 以外の標的を免疫療法に用いることができる。T C R アルファまたはベータ鎖に組み込まれた N Y E S O T C R 遺伝子の略図を図 3 A に示す。T R A C - N Y E S O - T C R および T R B C - N Y E S O - T C R (すなわち、H I - T C R または F v T C R) の細胞表面発現を図 3 B に示す。T R A C または T R B C 標的化の 4 日後の、代表的 T C R - V - ベータ - 1 フローサイトメトリープロットを図 3 B に示す。操作された T 細胞の細胞傷害活性を図 3 C に示す。T C R アルファおよび T C R ベータの両方への同時標的化の代替設計の略図を図 3 D に示し、それによると、N Y E S O - H I - T C R は、T R A C 遺伝子座に配置され、4 - 1 B B L 発現カセットは、T R B C 遺伝子座に配置された。T R A C - N Y E S O - T C R および T R B C - 4 - 1 B B L の細胞表面発現を図 3 E に示す。

10

【 0 2 2 4 】

超生理学的抗原感知および活性化をもたらす、共刺激ドメインが C D 3 複合体に非共有結合により挿入された、パリアントアプローチも提供された。これは、共刺激ドメインを一方または両方の T C R 鎖に融合することにより達成される。さらに、共刺激ドメインを一方または両方の改変 T C R 鎖 (すなわち、抗原結合鎖) のいずれかに融合することにより、2 種の共刺激投薬量が可能である。

20

【 0 2 2 5 】

さらに、H I - T C R は、C A R と比較してより優れた感受性を示した。内因性 T C R を H I - T C R に置き換えるように編集されたヒト T 細胞は、より低い抗原密度に係合し、そのような細胞を死滅させる能力を獲得した。例えば、表 2 は、H I - T C R 細胞の *i n v i t r o* 細胞傷害活性を示す。H I - T C R または C D 1 9 - C A R を、C R I S P R / C a s 9 媒介性遺伝子編集および A A V 6 ドナーベクターにより、ヒト末梢 T 細胞の内因性 T R A C 遺伝子座に導入した。遺伝子標的化 5 日後に、T 細胞 (6 千、3 万または 1 5 万個) を、異なる C D 1 9 レベル (非常に低い ~ 高いレベル) を発現する 2 5 万個の N a 1 m 6 白血病細胞と共にインキュベートした。細胞を、血清を含有する (I L 2 なし) 5 0 0 u l の X - V i v o 培地において 2 2 時間インキュベートした。計数ビーズの存在下で F A C S によって共培養物を解析して、N a 1 m 6 細胞の総数を決定した。細胞傷害活性は、死滅した N a 1 m 6 のパーセンテージとして示す。E / T : エフェクター (T 細胞) の標的 (N a 1 m 6) に対する比。データは、H I - T C R が、C A R よりも低いレベルの C D 1 9 抗原を検出することができることを明らかに実証する。この特色は、C D 2 2、B C M A、C C R 1、C D 7 0 など、中等度または低い発現を有する抗原に非常に有用であり得、再発腫瘍細胞は、その表面に低下した抗原密度を高頻度で示すため、いずれかの抗原に対する C A R 療法後の再発の処置に有用であり得る。

30

【表 2】

表2. 腫瘍細胞死滅パーセンテージ

E/T	HI-TCR	CD19 CAR	CD19 レベル
0.024	0	0	非常に低い
	22.53	16.32	低い
	29.19	17.18	中間
	38.3	32	高い
0.12	15.48	0.4	非常に低い
	51.46	53.31	低い
	54.14	63.58	中間
	63.28	63.38	高い
0.6	30.36	8.37	非常に低い
	68.32	77.2	低い
	77.01	79.38	中間
	78.72	84.37	高い

10

20

【0226】

さらに、外因性および内因性3'非翻訳領域(3'UTR)のパネルは、TCR遺伝子座における正確かつ予測可能な遺伝子発現を調節することができることを見出された。例えば、図4Aは、TRAC遺伝子座に組み込まれたCD28ζCAR遺伝子の略図を示す。ポリA(黒いボックス)は、異なるウイルスおよび哺乳動物3'UTRを検査するために改変されたCARカセットのセグメントに対応する。モデルとしてCD28ζCARを発現するTRAC-CAR-T細胞を使用して、ある特定の3'UTRは、ウシ成長ホルモン(bGH)ポリA配列と比較してCAR発現を低減することが示され(図4Bおよび図4C)、これは、*in vivo*細胞傷害活性が損なわれたCAR-T細胞を生じた(図5Aおよび図5B)。内因性TRAC3'UTRを含むある特定の他の3'UTRは、CAR表面発現レベルを増加させることが示され(図4Bおよび図4C)、これは、*in vivo*細胞傷害活性が改善されたCAR-T細胞を産生した(図5Aおよび図5B)。これらの3'UTRを使用して、本明細書に開示されているいずれかのHI-TCRの正確かつ予測可能な遺伝子発現を調節することもできる。

30

【0227】

TRAC遺伝子座における上述の遺伝子改変は、生理学的TCRに似ているがCARとは異なる最適レベルのHI-TCRを発現するT細胞の生成を可能にし、内因性T細胞活性化機構(CD3複合体および下流シグナル伝達エレメント)を活用する。このアプローチは、自己および同種異系T細胞療法の両方を進歩させることができる。

40

【0228】

TCR遺伝子編集が関連する適用を有する別の関連する分野は、T-iPS由来のT細胞である。T-iPS細胞は、末梢Tリンパ球のリプログラミングにより得られる多能性幹細胞である。したがって、これらのT-iPS細胞は、遺伝子編集技術を使用して改変することができる、またはTCRのいずれかである再編成されたT細胞受容体含有する。方向付けられた分化によりT-iPS細胞から得られるT細胞は、検出および配列決定することができる、再編成されたTCRを発現する。この配列を使用して、T-iPS細胞のゲノムにおける再編成された可変ドメインの正確な場所を決定することがで

50

きる。この再編成された可変ドメインを特異的に標的とするヌクレアーゼおよび特異性が既知のTCR可変ドメインを含有するドナーDNAを使用して、内因性可変ドメインを新たな可変ドメインに置き換えることができる。このアプローチは、2ステップの遺伝子編集を要求する：一方は、（または）鎖を標的とし、他方は、（または）鎖を標的とする。アプローチは、2個の対立遺伝子のみが改変される必要があるため、単一ステップで実施することができる。加えて、初代ヒトT細胞について記載された戦略と同様の戦略を使用して、本明細書に開示されるいずれかのHI-TCRを発現するようにTCR鎖を改変することができる。

【0229】

（実施例2）

TRAC遺伝子座への3種の受容体のCRISPR/Cas9により標的化された組み込みを図1Aに示す。操作されたHIT-CARは、CD19を標的とする。TRAC遺伝子座からのHIT-CAR（すなわち、HI-TCR）の細胞表面発現を図6Bおよび図6Cに示す。HIT-CAR（すなわち、HI-TCRまたはFvTCR）T細胞の細胞溶解効果および増殖を図7A、図7Bおよび図8A～図8Cに示す。特に、これらのデータは、低い抗原レベルを発現する標的細胞の死滅において、HIT T細胞が、CAR-T細胞よりも優れていたことを示す。

【0230】

さらに、図9A～図9Dに示す通り、HI-TCR T細胞は、共刺激リガンドを同時発現するように操作された。この特異的な実験において、TRAC遺伝子座へのHI-TCRの標的化の翌日に、T細胞に、CD80、41BBLまたはその両方をコードするレトロウイルスSFGベクターを移入した。これらの細胞をex vivoで増やしてから5日後に、4e5個のTRAC-CARまたはTRAC-HI-TCR陽性T細胞を、非常に低いレベルのCD19を発現するNALM6細胞を有するNSGマウスに注射した。TRAC-HI-TCR T細胞は、CD80、41BBLもしくは両方のリガンドを発現していたまたはいずれも発現していなかった。生物発光を使用して、腫瘍負荷を毎週評価し、マウスの生存を追跡した。

【0231】

TRAC-CAR T細胞が、非常に低いレベルのCD19を有する腫瘍を制御することができず、30日目までに全マウスが病状末期となったことが観察された。この低い用量では、HI-TCR T細胞は、腫瘍負荷を初期に制御したが、マウスは、10日目までに再発し、40日目までに病状末期となった。HI-TCR T細胞が、CD80および4-1BBLを同時発現した場合、HI-TCR T細胞への共刺激リガンドの添加は、最適応答による抗腫瘍活性を改善した。この改善された活性は、非常に低いレベルのCD19を発現するNALM6の長期制御をもたらした。

【0232】

図10A～図10Cは、抗原遭遇後の細胞表面補充動態に影響を与えることなく、別個の3'UTR配列によってベースラインTRAC-CAR発現を制御することができることをさらに実証する。全構築物が、TRAC内因性プロモーターの転写制御下に置かれるように、以前に記載されたものと同じように、TRAC-CAR T細胞を操作した。3'UTR（ポリAシグナルを含む）を改変することにより、ベースライン発現レベルがモジュレートされたことが観察された（図10B）。これらの異なるTRAC-CAR T細胞が、CD19発現腫瘍細胞の上で培養された場合、CAR細胞表面発現の低減と、それに続く補充がフローサイトメトリーによって観察された（図10C）。異なる3'UTRは、ベースライン発現レベルを変化させたが、同じ補充動態を保持し、最終発現レベルは、ベースラインと同様であった。

【0233】

さらに、CD70を標的とするHI-TCRおよびCD22を標的とするHI-TCRも作製した。同じ抗原を標的とする既存の抗体の既存のscFvまたはFab領域を配列決定して、細胞外抗原結合ドメインを得ることにより、関心のある抗原を標的とするHI

10

20

30

40

50

【 図 1 - 3 】

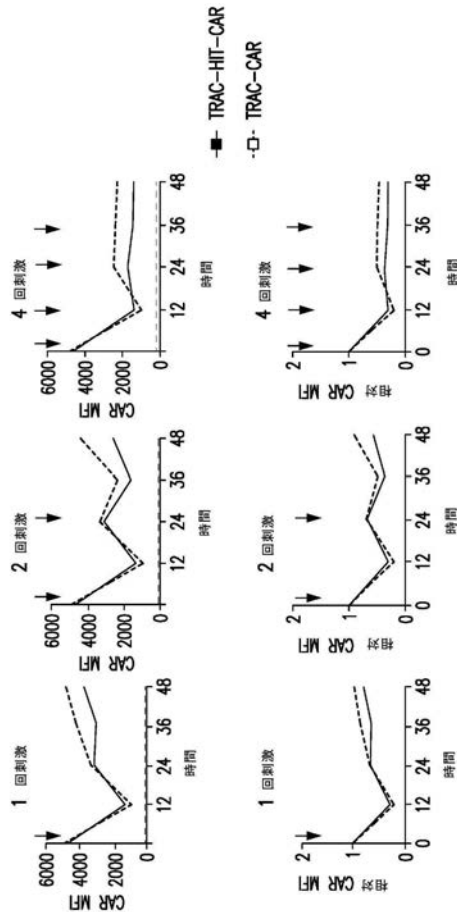


FIG. 1E

【 図 2 】

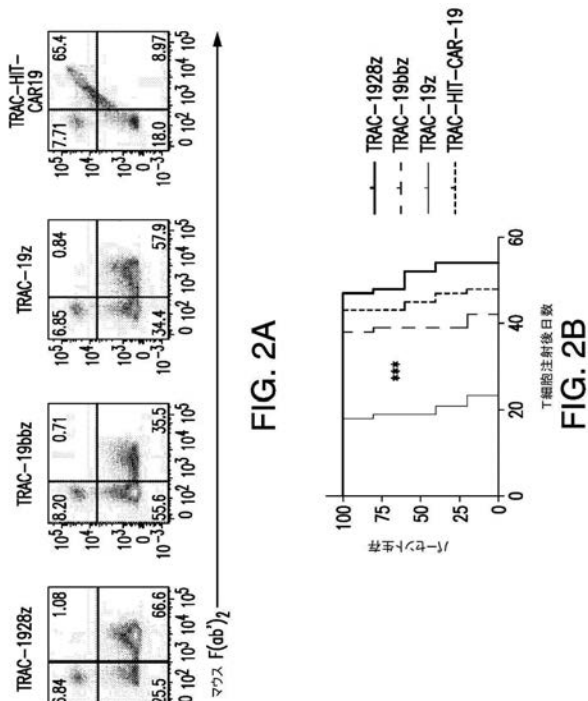


FIG. 2A

FIG. 2B

【 図 3 - 1 】

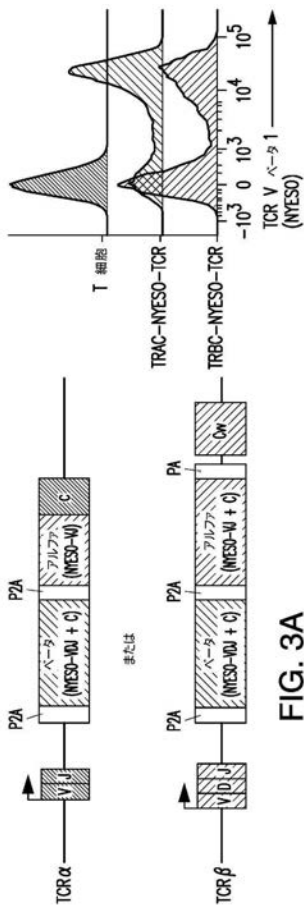


FIG. 3A

FIG. 3B

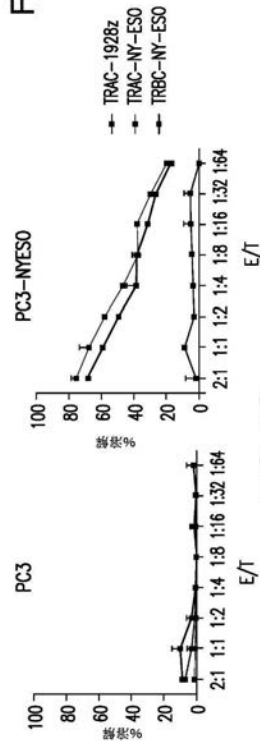


FIG. 3C

【 図 3 - 2 】

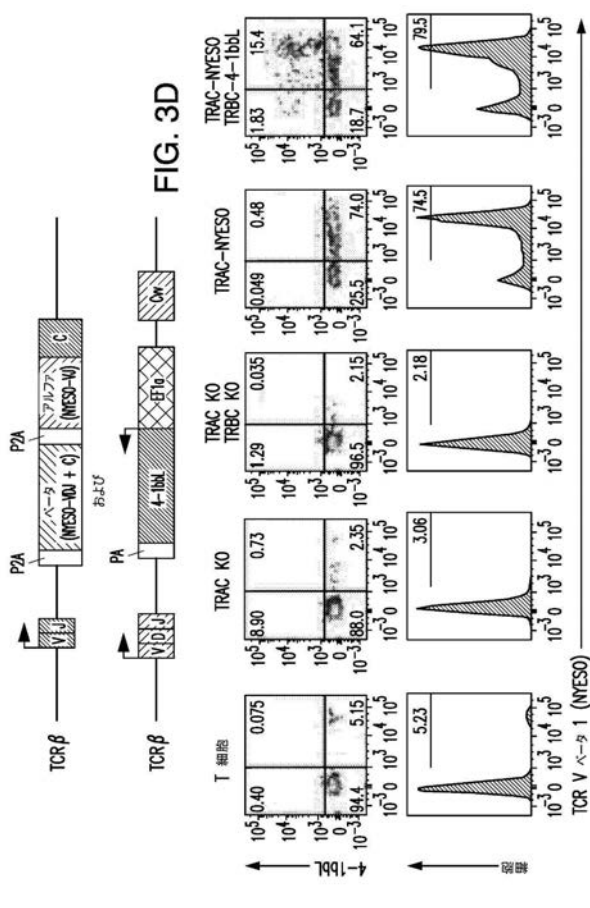


FIG. 3E

【 図 4 - 1 】

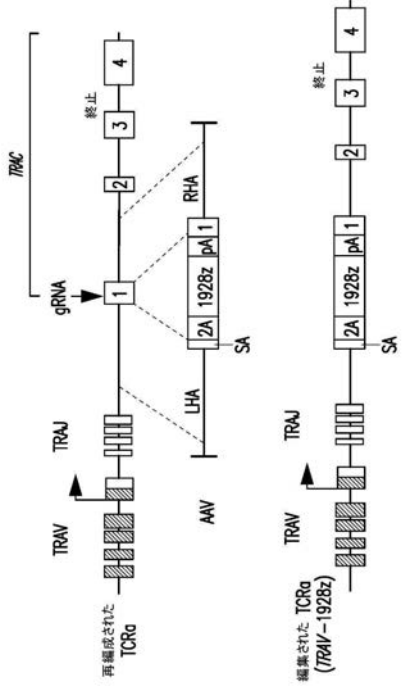


FIG. 4A

【 図 4 - 2 】

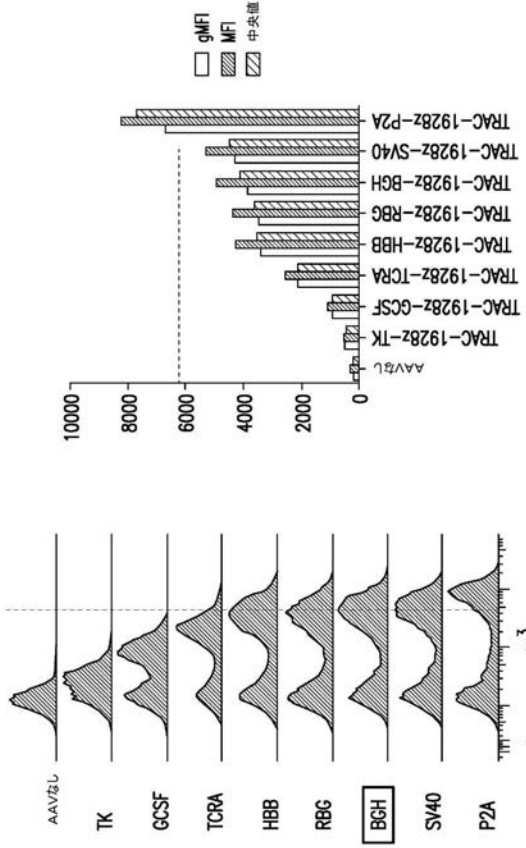


FIG. 4B

【 図 4 - 3 】

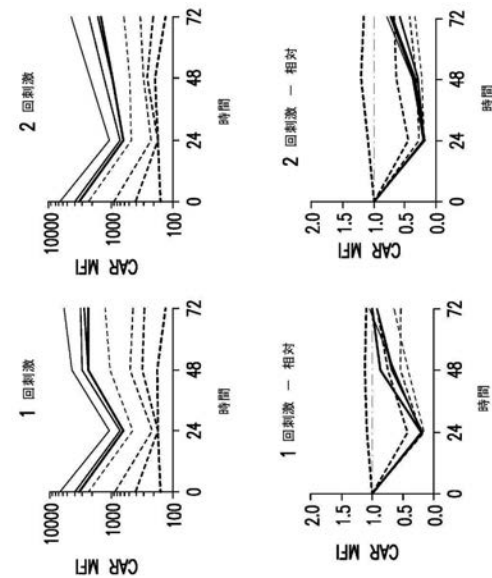


FIG. 4C

【 図 5 - 1 】

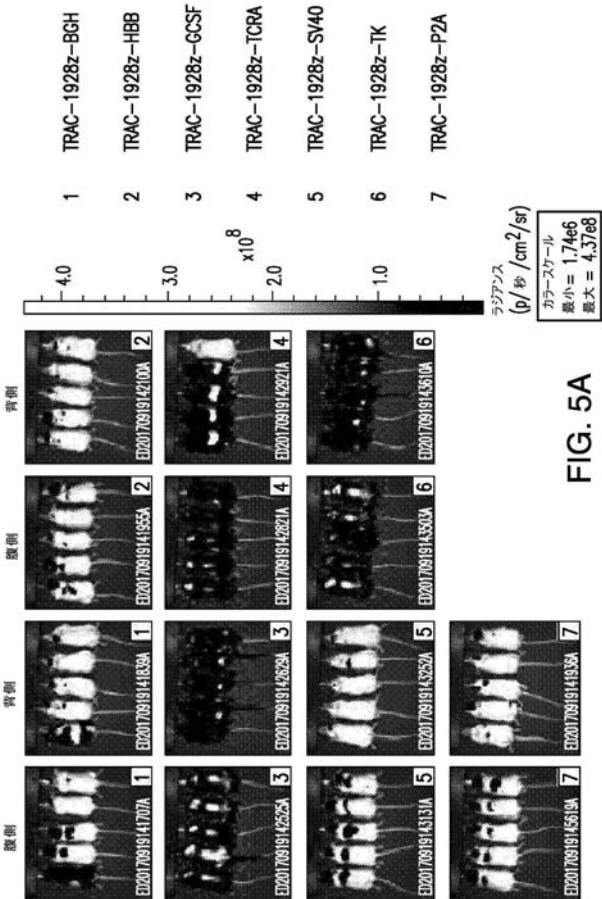


FIG. 5A

ラグジュアンス
(p/秒/cm²/sr)

最小 = 1.7466
最大 = 4.3768

【 図 5 - 2 】

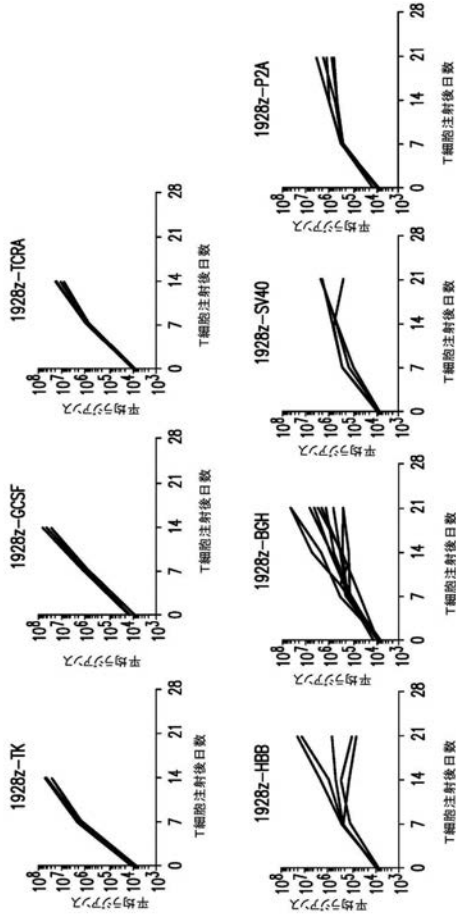


FIG. 5B

【 図 6 】

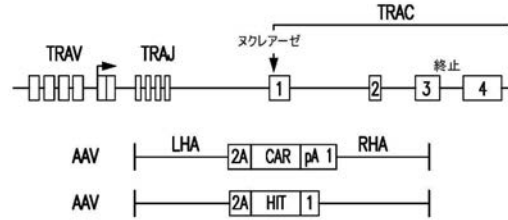


FIG. 6A

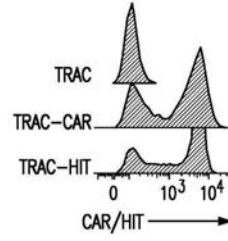


FIG. 6B

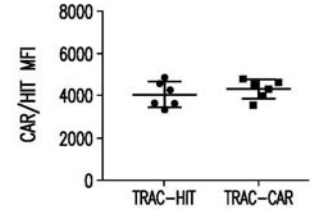


FIG. 6C

【 図 7 】

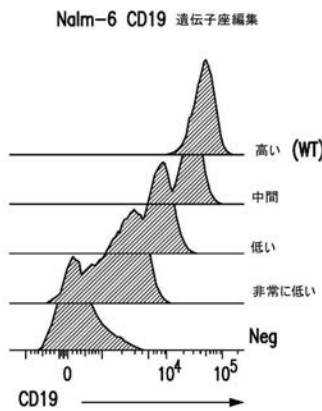


FIG. 7A

【 図 8 】

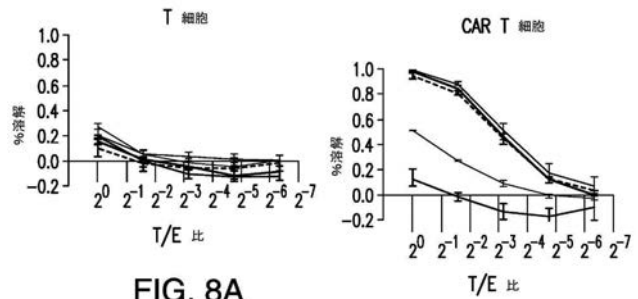


FIG. 8A

FIG. 8B

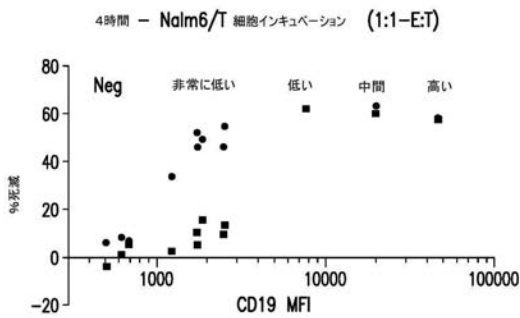


FIG. 7B

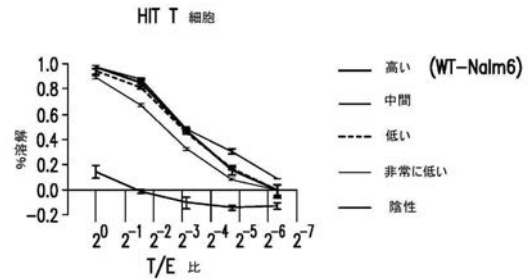
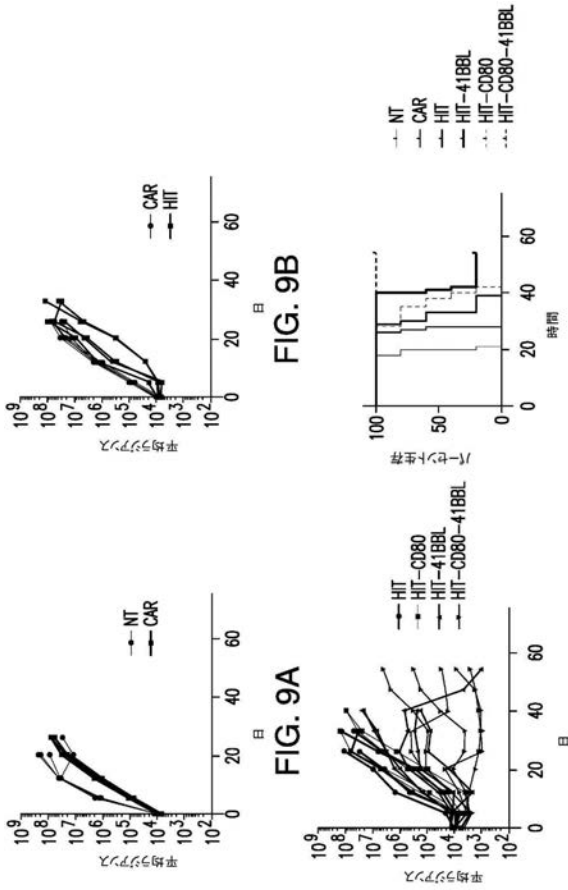


FIG. 8C

【 図 9 】



【 図 10 】

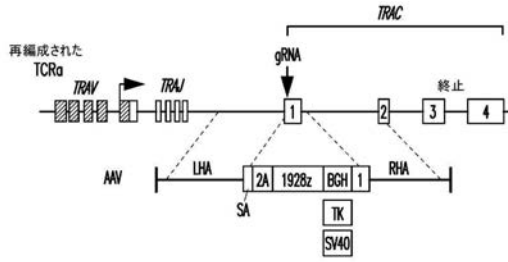


FIG. 10A

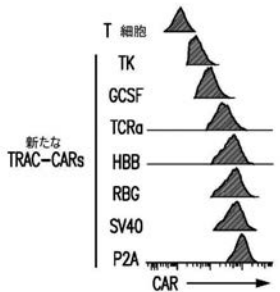


FIG. 10B

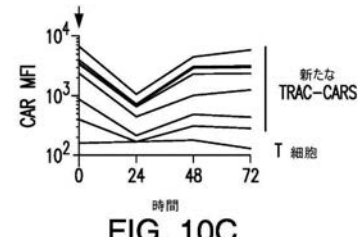


FIG. 10C

【 配列表 】

2021513347000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/17525

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

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

- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter. I(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter. I(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter. I(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. 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.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/17525

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 6-84
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/17525

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C07K 14/705, 14/725; A61K 35/17, 35/15, 35/545; C12N 5/10, 5/0735, 5/0783, 5/0789 (2019.01) CPC - C07K 14/7051, 14/705, 14/70503; A61K 35/17, 35/15, 35/545; A61P 35/00; C12N 5/10, 5/0636, 5/0637, 5/0638, 5/0646, 5/0647, 5/0606		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/091034 A1 (UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ, et al.) 19 June 2014; abstract; page 5, 5th paragraph; page 10, 2nd paragraph; page 27, 1st paragraph	1, 5/1 ----- 2-4, 5/2-4
Y	(EYQUEM, J et al.) Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. Nature. 2 March 2017, Epub 22 February 2017, Vol. 543, No. 7653; pages 113-117; abstract; page 2, 1st paragraph; DOI: 10.1038/nature21405	2-4, 5/2-4
A	US 2017/0312350 A1 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH) 2 November 2017; entire document	1-4, 5/1-4
A	(CHMIELEWSKI, M et al.) Antigen-specific T-cell activation independently of the MHC: chimeric antigen receptor-redirected T cells. Frontiers in Immunology. 11 November 2013, Vol. 4, No. 371; DOI: 10.3389/fimmu.2013.00371	1-4, 5/1-4
<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		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 May 2019 (16.05.2019)	Date of mailing of the international search report 30 MAY 2019	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

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 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 K 39/395	T

(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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, 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, JO, 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, TM, TN, TR, TT

(72) 発明者 マンシラ - ソト , ジョージ エー .

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 1 3 7 5 , フォレスト ヒルズ , 1 1 2 ティーエイチ ストリート 7 2 - 7 2 , アパートメント 3 エー

(72) 発明者 エイクム , ジャスティン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5 , ニューヨーク , ヨーク アベニュー 1 2 7 5

(72) 発明者 ドブリン , アントン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 2 1 , ニューヨーク , イースト 7 1 エスティー ストリート 3 0 3 , アパートメント 4 エフ

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

4B065 AA93Y AA94X AA94Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA13 MA17 MA22 MA23 MA52 MA66 NA14 ZB261 ZB262 ZB271

ZB272

4C085 AA13 AA14 AA16 CC22 CC23 DD62 EE01 GG01 GG02 GG08

4C087 AA01 AA02 BB43 NA14 ZB26 ZB27

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA28 FA74