(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2025-505933
(P2025-505933A)
(43)公表日　令和7年3月5日(2025.3.5)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/28	*(2006.01)*	C07K	16/28	ZNA	4B065
C12N 15/13	*(2006.01)*	C12N	15/13		4C084
C12N 15/62	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4C085
C12N 15/63	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4C087
C12N 15/867	*(2006.01)*	C12N	15/867	Z	4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全50頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-540577(P2024-540577)
(86)(22)出願日　令和5年1月6日(2023.1.6)
(85)翻訳文提出日　令和6年8月29日(2024.8.29)
(86)国際出願番号　PCT/CN2023/070928
(87)国際公開番号　WO2023/131276
(87)国際公開日　令和5年7月13日(2023.7.13)
(31)優先権主張番号　202210011545.7
(32)優先日　令和4年1月6日(2022.1.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(31)優先権主張番号　202210018557.2
(32)優先日　令和4年1月7日(2022.1.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　520358863
オリセル セラピューティクス カンパニー リミテッド
中華人民共和国 ２０１２０３ シャンハイ、プードン ニュー エリア、チャンヘン ロード ナンバー１２２７、 ビルディング １、フロア ３、ルーム ３０３
(74)代理人　110000796
弁理士法人三枝国際特許事務所
(72)発明者　ワン ホァジン
中華人民共和国 ２０１２０３ シャンハイ、プードン、チャンヘン ロード ナンバー １２２７、ビルディング １、ルーム ３０３
(72)発明者　ヂョン ヂェンウェイ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＭＳＬＮを標的とする抗原結合タンパク質及びその使用

(57)【要約】
本願は、ＭＳＬＮを標的とすることができる単離された抗原結合タンパク質に関し、上記単離された抗原結合タンパク質は、抗体重鎖可変領域ＶＨ中の少なくとも１つのＣＤＲを含み、上記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。本願は、上記抗原結合タンパク質を含むキメラ抗原受容体、及び腫瘍の治療におけるその使用を更に提供する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
メソテリン（Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ、ＭＳＬＮ）に特異的に結合することができる単離された抗原結合タンパク質であって、前記単離された抗原結合タンパク質は、抗体重鎖可変領域ＶＨ中の少なくとも１つのＣＤＲを含み、前記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
抗原結合タンパク質。
【請求項２】
ＨＣＤＲ３を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号１、配列番号９、配列番号６５、及び配列番号６６の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項３】
前記ＨＣＤＲ３は、配列番号１、配列番号９、配列番号１４、配列番号１９、配列番号２４、配列番号２９、及び配列番号３４の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
請求項２に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項４】
ＨＣＤＲ２を含み、且つ前記ＨＣＤＲ２は、配列番号６７に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１～３の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項５】
前記ＨＣＤＲ２は、配列番号２、配列番号１０、配列番号１５、配列番号２０、配列番号２５、配列番号３０、及び配列番号３５の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
請求項４に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項６】
ＨＣＤＲ１を含み、且つ前記ＨＣＤＲ１は、配列番号６８（$X_1X_2X_3$ＭＧ、そのうち、X_1はＮ、Ｒ、Ｓ、Ｔ又はＹであり、X_2はＮ又はＹであり、X_3はＡ、Ｎ又はＶである）に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１～５の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項７】
前記ＨＣＤＲ１は、配列番号３、配列番号１１、配列番号１６、配列番号２１、配列番号２６、配列番号３１、及び配列番号３６の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
請求項６に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項８】
ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含む、請求項１～７の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質であって、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３は、
（１）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号３に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号２に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号１に示されるアミノ酸配列を含み、
（２）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号１１に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号１０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号９に示されるアミノ酸配列を含み、
（３）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号１６に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号１４に示されるアミノ酸配列を含み、
（４）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含み、
（５）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号２６に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号２５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号２４に示されるアミノ酸配列を含み、

（６）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号３１に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号３０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号２９に示されるアミノ酸配列を含み、及び
（７）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号３６に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号３５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号３４に示されるアミノ酸配列を含み、
からなる群より選ばれるアミノ酸配列の何れか１つを含む、
請求項１～７の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項９】
Ｈ－ＦＲ１を含み、前記Ｈ－ＦＲ１のＣ末端が前記ＨＣＤＲ１のＮ末端に直接的又は間接的に連結されており、且つ前記Ｈ－ＦＲ１は、配列番号４、配列番号１２、配列番号１７、配列番号２２、配列番号２７、配列番号３２、及び配列番号３７の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１～８の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１０】
Ｈ－ＦＲ２を含み、前記Ｈ－ＦＲ２は、前記ＨＣＤＲ１と前記ＨＣＤＲ２との間に位置し、且つ前記Ｈ－ＦＲ２は、配列番号５に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１～９の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１１】
Ｈ－ＦＲ３を含み、前記Ｈ－ＦＲ３は、前記ＨＣＤＲ２と前記ＨＣＤＲ３との間に位置し、且つ前記Ｈ－ＦＲ３は、配列番号６に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１～１０の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１２】
Ｈ－ＦＲ４を含み、前記Ｈ－ＦＲ４のＮ末端が前記ＨＣＤＲ３のＣ末端に直接的又は間接的に連結されており、且つ前記Ｈ－ＦＲ４は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１～１１の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１３】
抗体重鎖可変領域ＶＨを含み、且つ前記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１～１２の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１４】
抗体重鎖可変領域ＶＨを含み、且つ前記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２３、配列番号２８、配列番号３３、及び配列番号３８の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１～１３の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１５】
抗体又はその抗原結合断片を含む、
請求項１～１４の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１６】
前記抗原結合断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｖ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、ｄｉ－ｓｃＦｖ、ＶＨＨ及び／又はｄＡｂを含む、
請求項１５に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１７】
前記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び完全ヒト抗体からなる群より選ばれる、
請求項１５～１６の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１８】
前記抗原結合断片はＶＨＨであり、且つ前記ＶＨＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、

請求項１５～１７の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１９】
前記ＶＨＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２３、配列番号２８、配列番号３３、及び配列番号３８の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
請求項１８に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項２０】
ＭＳＬＮ（Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ、メソテリン）タンパク質への結合について参照抗体と競合することができる、請求項１～１９の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質であって、前記参照抗体は、抗体重鎖可変領域ＶＨを含み、前記参照抗体のＶＨは、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含み、且つ前記参照抗体は、
（１）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号３に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号２に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号１に示されるアミノ酸配列を含み、
（２）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号１１に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号１０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号９に示されるアミノ酸配列を含み、
（３）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号１６に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号１４に示されるアミノ酸配列を含み、
（４）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含み、
（５）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号２６に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号２５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号２４に示されるアミノ酸配列を含み、
（６）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号３１に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号３０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号２９に示されるアミノ酸配列を含み、及び
（７）前記ＨＣＤＲ１は、配列番号３６に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＨＣＤＲ２は、配列番号３５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ前記ＨＣＤＲ３は、配列番号３４に示されるアミノ酸配列を含み、
からなる群より選ばれるアミノ酸配列の何れか１つを含む、
請求項１～１９の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項２１】
抗体重鎖定常領域を含み、前記抗体重鎖定常領域はＩｇＧに由来する、
請求項１～２０の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項２２】
抗体重鎖定常領域を含み、前記抗体重鎖定常領域はヒトＩｇＧに由来する、
請求項１～２１の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項２３】
抗体重鎖定常領域を含み、前記抗体重鎖定常領域はヒトＩｇＧ１に由来する、
請求項１～２２の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項２４】
前記抗体重鎖定常領域は、ＩｇＧのＦｃ領域を含む、
請求項２１～２３の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項２５】
前記Ｆｃ領域は、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項２４に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項２６】
標的部分を含み、前記標的部分は請求項１～２５の何れか一項に記載の抗原結合タンパ

ク質を含む、
キメラ抗原受容体。
【請求項２７】
共刺激ドメインを含み、前記共刺激ドメインは、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＣＤ２７、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ８、ＯＸ４０、ＣＤ２２６、ＤＲ３、ＳＬＡＭ、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、２Ｂ４、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＰＤ－１、ＬＦＡ－１、ＬＩＧＨＴ、ＪＡＭＬ、ＣＤ２４４、ＣＤ１００、ＩＣＯＳ、ＣＤ８３のリガンド、ＣＤ４０、及びＭｙＤ８８からなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来する共刺激ドメインを含む、
請求項２６に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項２８】
前記共刺激ドメインは、４－１ＢＢに由来する細胞内共刺激シグナル領域である、
請求項２７に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項２９】
前記共刺激ドメインは、配列番号３９に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項２７～２８の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３０】
細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζ、ＣＤ３δ、ＣＤ３γ、ＣＤ３ε、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＦｃεＲＩγ、ＦｃεＲＩβ、ＦｃγＲＩＩａ、ウシ白血病ウイルスｇｐ３０、Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス（ＥＢＶ）ＬＭＰ２Ａ、サル免疫不全ウイルスＰＢｊ１４　Ｎｅｆ、カポジ肉腫ヘルペスウイルス（ＨＳＫＶ）、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ－１２、及び少なくとも１つのＩＴＡＭを含むドメインからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む、
請求項２６～２９の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３１】
前記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζに由来するシグナル伝達ドメインである、
請求項３０に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３２】
前記細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号４１に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項３１に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３３】
膜貫通領域を含み、前記膜貫通領域は、ＣＤ８、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＣＤ４、ＣＤ２７、ＣＤ７、ＰＤ－１、ＴＲＡＣ、ＴＲＢＣ、ＣＤ３ε、ＣＤ３ζ、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＤ５、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、ＮＫＧ２Ｄ、２Ｂ４、ＣＤ２４４、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＣＤ３０、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ、ＤＡＰ１０、ＣＤ２、ＮＫＧ２Ｃ、ＬＩＧＨＴ、ＤＡＰ１２、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＣＤ２２６、ＤＲ３、ＣＤ４５、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、及びＳＬＡＭからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来する膜貫通ドメインを含む、
請求項２６～３２の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３４】
前記膜貫通領域は、ＣＤ８に由来する膜貫通領域である、
請求項３３に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３５】
前記膜貫通領域は、配列番号４０に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項３４に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３６】

標的部分と膜貫通領域との間にヒンジ領域を含み、前記ヒンジ領域は、ＣＤ２８、ＩｇＧ１、ＩｇＧ４、ＩｇＤ、４－１ＢＢ、ＣＤ４、ＣＤ２７、ＣＤ７、ＣＤ８、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＧＩＴＲ、ＤＡＰ１０、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＣＤ２２６、ＳＬＡＭ、ＣＤ３０、及びＬＩＧＨＴからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来するヒンジ領域を含む、
請求項２６～３５の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３７】
前記ヒンジ領域は、ＣＤ８に由来するヒンジ領域である、
請求項３６に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３８】
前記ヒンジ領域は、配列番号４２に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項３７に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項３９】
シグナルペプチドを更に含む、
請求項２６～３８の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項４０】
前記シグナルペプチドは、ＣＤ８タンパク質のシグナルペプチドに由来する、
請求項３９に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項４１】
前記シグナルペプチドは、配列番号４３に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項４０に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項４２】
低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片を更に含む、
請求項２６～４１の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項４３】
前記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１～１２及びそれらの機能的断片からなる群より選ばれる１つ又は複数を含む、
請求項４２に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項４４】
前記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質５及び／又は６或いはその断片である、
請求項４２～４３の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項４５】
前記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、配列番号４４に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項４２～４４の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項４６】
配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、及び配列番号５３の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む、
請求項２６～４５の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項４７】
請求項１～２５の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質を含む、
ポリペプチド。
【請求項４８】
１つ又は複数の単離された核酸分子であって、請求項１～２５の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質及び／又は請求項２６～４６の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体をコードする、
核酸分子。
【請求項４９】

プロモーターを更に含む、
請求項４８に記載の核酸分子。
【請求項５０】
前記プロモーターは、構成的プロモーターである、
請求項４９に記載の核酸分子。
【請求項５１】
前記プロモーターは、ＥＦ１αプロモーターである、
請求項４９～５０の何れか一項に記載の核酸分子。
【請求項５２】
請求項４８～５１の何れか一項に記載の核酸分子を含む、
ベクター。
【請求項５３】
ウイルスベクターを含む、
請求項５２に記載のベクター。
【請求項５４】
レンチウイルスベクターを含む、
請求項５２～５３の何れか一項に記載のベクター。
【請求項５５】
請求項１～２５の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質、請求項２６～４６の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体、請求項４７に記載のポリペプチド、請求項４８～５１の何れか一項に記載の核酸分子、及び／又は請求項５２～５４の何れか一項に記載のベクターを含む、
細胞。
【請求項５６】
免疫エフェクター細胞である、
請求項５５に記載の細胞。
【請求項５７】
Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、マクロファージ、ＮＫＴ細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球、リンパ球、白血球、末梢血単核細胞、胚性幹細胞、リンパ球前駆細胞、及び／又は多能性幹細胞を含む、
請求項５５～５６の何れか一項に記載の細胞。
【請求項５８】
Ｔ細胞である、
請求項５５～５７の何れか一項に記載の細胞。
【請求項５９】
低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質若しくはその断片を更に含む及び／又は発現する、
請求項５５～５８の何れか一項に記載の細胞。
【請求項６０】
前記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１～１２及びそれらの機能的断片からなる群より選ばれる１つ又は複数を含む、
請求項５９に記載の細胞。
【請求項６１】
前記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質５及び／又は６或いはその断片である、
請求項５９～６０の何れか一項に記載の細胞。
【請求項６２】
前記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、配列番号４４に示されるアミノ酸配列を含む、

請求項５９～６１の何れか一項に記載の細胞。
【請求項６３】
請求項１～２５の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質及び／又は請求項２６～４６の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体を製造する方法であって、請求項１～２５の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質及び／又は請求項２６～４６の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体を発現可能な条件下で、請求項５１～５８の何れか一項に記載の細胞を培養することを含む、
方法。
【請求項６４】
免疫エフェクター細胞中に、請求項５２～５４の何れか一項に記載のベクターを導入することを含む、
修飾された免疫エフェクター細胞を製造する方法。
【請求項６５】
請求項１～２５の何れか一項に記載の単離された抗原結合タンパク質、請求項２６～４６の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体、請求項４７に記載のポリペプチド、請求項４８～５１の何れか一項に記載の核酸分子、請求項５２～５４の何れか一項に記載のベクター、及び／又は請求項５５～６２の何れか一項に記載の細胞、並びに任意選択的に薬学的に許容される担体を含む、
医薬組成物。
【請求項６６】
薬物の製造における、請求項１～２５の何れか一項に記載の単離された抗原結合タンパク質、請求項２６～４６の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体、請求項４７に記載のポリペプチド、請求項４８～５１の何れか一項に記載の核酸分子、請求項５２～５４の何れか一項に記載のベクター、請求項５５～６２の何れか一項に記載の細胞、及び／又は請求項６５に記載の医薬組成物の使用であって、前記薬物は、ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状を予防、治療及び／又は緩和するために用いられる、
使用。
【請求項６７】
前記ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状は、腫瘍を含む、
請求項６６に記載の使用。
【請求項６８】
前記腫瘍は、固形腫瘍を含む、
請求項６７に記載の使用。
【請求項６９】
前記腫瘍は、非固形腫瘍を含む、
請求項６７に記載の使用。
【請求項７０】
前記腫瘍は、ＭＳＬＮ抗原を発現する腫瘍を含む、
請求項６７～６９の何れか一項に記載の使用。
【請求項７１】
前記腫瘍は、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、中皮細胞癌（ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｏｍａ）、胆管癌、トリプルネガティブ乳癌、及び／又は子宮内膜癌を含む、
請求項６７～７０の何れか一項に記載の使用。
【請求項７２】
ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状を予防、治療及び／又は緩和する方法であって、それを必要とする対象に、請求項１～２５の何れか一項に記載の抗原結合タンパク質、請求項２６～４６の何れか一項に記載のキメラ抗原受容体、請求項４７に記載のポリペプチド、請求項４８～５１の何れか一項に記載の核酸分子、請求項５２～５４の何れか一項に記載のベクター、請求項５５～６２の何れか一項に記載の細胞、及び／又は請求項６５に記載の医薬組成物を投与することを含む、

方法。
【請求項７３】
前記ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状は、腫瘍を含む、
請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
前記腫瘍は、固形腫瘍を含む、
請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
前記腫瘍は、非固形腫瘍を含む、
請求項７３に記載の方法。
【請求項７６】
前記腫瘍は、ＭＳＬＮ抗原を発現する腫瘍を含む、
請求項７３～７５の何れか一項に記載の方法。
【請求項７７】
前記腫瘍は、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、中皮細胞癌、胆管癌、トリプルネガティブ乳癌、及び／又は子宮内膜癌を含む、
請求項７３～７６の何れか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、生物医薬分野に関し、具体的には、ＭＳＬＮを標的とする抗原結合タンパク質、上記抗原結合タンパク質を含むキメラ抗原受容体、及びその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
メソテリン（Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ、ＭＳＬＮ）は、グリコシルホスファチジルイノシトールにより細胞膜にアンカーされる、細胞表面に位置する糖タンパク質である。メソテリン遺伝子は６９ｋＤａの前駆体タンパク質をコードし、フーリン（フューリン、ｆｕｒｉｎ）様インベルターゼにより２本の鎖に加水分解され、Ｃ末端の約４０ＫＤの膜結合タンパク質が即ち成熟メソテリンとなり、Ｎ末端の約３０ＫＤの巨核球促進因子（ＭＰＦ）と呼ばれる断片が脱落し、且つ細胞外に放出される。ＭＰＦ及び膜アンカーＭＳＬＮは、両方ともＮ－グリコシル化であり、ＭＰＦはインビトロで巨核球クローンの形成を促進することができ、膜アンカーＭＳＬＮはＭＵＣ１６と相互作用し、細胞接着プロセスにおいて重要な役割を果たすことができ、したがって、現在の標的治療では、何れも膜アンカーＭＳＬＮを標的として選択するため、現在のＭＳＬＮはＭＳＬＮのＣ末端４０ＫＤ断片、即ち膜アンカーＭＳＬＮを専門的に指す。
【０００３】
メソテリンは、腹膜、胸膜及び心膜腔の中皮細胞系の細胞表面に存在する糖タンパク質である。メソテリンは、中皮腫、即ち、癌／腫瘍細胞、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、肺癌、及び子宮内膜癌において、優勢に発現（過剰発現）する。対照的に、その発現は、正常細胞、例えば中皮細胞において制限される。
【発明の概要】
【０００４】
本願は、ＭＳＬＮに特異的に結合することができる単離された抗原結合タンパク質を提供する。本願は、上記抗原結合タンパク質を含むキメラ抗原受容体、並びに当該キメラ抗原受容体を含む及び／又は発現する細胞を更に提供し、上記細胞は以下の１つ又は複数の特徴を有する：（１）増幅能力が高いこと、（２）ＭＳＬＮを発現する標的細胞を殺傷することができること、（３）標的細胞の刺激下でサイトカインを分泌すること、（４）腫瘍細胞の増殖を阻害すること。
【０００５】
一態様では、本願は、抗体重鎖可変領域ＶＨ中の少なくとも１つのＣＤＲを含む、単離

された抗原結合タンパク質を提供し、上記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。

【０００６】

幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質はＨＣＤＲ３を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１、配列番号９、配列番号６５、及び配列番号６６の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。

【０００７】

幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質はＨＣＤＲ３を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１、配列番号９、配列番号１４、配列番号１９、配列番号２４、配列番号２９、及び配列番号３４の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。

【０００８】

幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質はＨＣＤＲ２を含み、且つ上記ＨＣＤＲ２は、配列番号６７に示されるアミノ酸配列を含む。

【０００９】

幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質はＨＣＤＲ２を含み、且つ上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２、配列番号１０、配列番号１５、配列番号２０、配列番号２５、配列番号３０、及び配列番号３５の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。

【００１０】

幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質はＨＣＤＲ１を含み、且つ上記ＨＣＤＲ１は、配列番号６８（$X_1X_2X_3$ＭＧ、そのうち、X_1はＮ、Ｒ、Ｓ、Ｔ又はＹであり、X_2はＮ又はＹであり、X_3はＡ、Ｎ又はＶである）に示されるアミノ酸配列を含む。

【００１１】

幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質はＨＣＤＲ１を含み、且つ上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３、配列番号１１、配列番号１６、配列番号２１、配列番号２６、配列番号３１、及び配列番号３６の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。

【００１２】

幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含み、且つ上記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３は、

（１）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１に示されるアミノ酸配列を含み、

（２）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号１１に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号１０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号９に示されるアミノ酸配列を含み、

（３）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号１６に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１４に示されるアミノ酸配列を含み、

（４）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含み、

（５）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号２６に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号２４に示されるアミノ酸配列を含み、

（６）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３１に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号３０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号２９に示されるアミノ酸配列を含み、及び

（７）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３６に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号３５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号３４に示されるアミノ酸配列を含み、

からなる群より選ばれるアミノ酸配列の何れか１つを含む。
【００１３】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、Ｈ－ＦＲ１を含み、上記Ｈ－ＦＲ１のＣ末端が上記ＨＣＤＲ１のＮ末端に直接的又は間接的に連結されており、且つ上記Ｈ－ＦＲ１は、配列番号４、配列番号１２、配列番号１７、配列番号２２、配列番号２７、配列番号３２、及び配列番号３７の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。
【００１４】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、Ｈ－ＦＲ２を含み、上記Ｈ－ＦＲ２は、上記ＨＣＤＲ１と上記ＨＣＤＲ２との間に位置し、且つ上記Ｈ－ＦＲ２は、配列番号５に示されるアミノ酸配列を含む。
【００１５】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、Ｈ－ＦＲ３を含み、上記Ｈ－ＦＲ３は、上記ＨＣＤＲ２と上記ＨＣＤＲ３との間に位置し、且つ上記Ｈ－ＦＲ３は、配列番号６に示されるアミノ酸配列を含む。
【００１６】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、Ｈ－ＦＲ４を含み、上記Ｈ－ＦＲ４のＮ末端が上記ＨＣＤＲ３のＣ末端に直接的又は間接的に連結されており、且つ上記Ｈ－ＦＲ４は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含む。
【００１７】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、抗体重鎖可変領域ＶＨを含み、且つ上記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。
【００１８】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、抗体重鎖可変領域ＶＨを含み、且つ上記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２３、配列番号２８、配列番号３３、及び配列番号３８の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。
【００１９】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、抗体又はその抗原結合断片を含む。
【００２０】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｖ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、ｄｉ－ｓｃＦｖ、ＶＨＨ及び／又はｄＡｂを含む。
【００２１】
幾つかの実施形態において、上記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び完全ヒト抗体からなる群より選ばれる。
【００２２】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合断片はＶＨＨであり、且つ上記ＶＨＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。
【００２３】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合断片はＶＨＨであり、且つ上記ＶＨＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２３、配列番号２８、配列番号３３、及び配列番号３８の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。
【００２４】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、ＭＳＬＮ（Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ、メソテリン）タンパク質への結合について参照抗体と競合することができ、そのうち、上記参照抗体は、抗体重鎖可変領域ＶＨを含み、上記参照抗体のＶＨは、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含み、且つ上記参照抗体は、
（１）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１に示

されるアミノ酸配列を含み、
（２）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号１１に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号１０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号９に示されるアミノ酸配列を含み、
（３）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号１６に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１４に示されるアミノ酸配列を含み、
（４）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含み、
（５）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号２６に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号２４に示されるアミノ酸配列を含み、
（６）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３１に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号３０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号２９に示されるアミノ酸配列を含み、及び
（７）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３６に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号３５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号３４に示されるアミノ酸配列を含み、
からなる群より選ばれるアミノ酸配列の何れか１つを含む。

【００２５】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、抗体重鎖定常領域を含み、上記抗体重鎖定常領域はＩｇＧに由来する。

【００２６】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、抗体重鎖定常領域を含み、上記抗体重鎖定常領域はヒトＩｇＧに由来する。

【００２７】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質は、抗体重鎖定常領域を含み、上記抗体重鎖定常領域はヒトＩｇＧ１に由来する。

【００２８】
幾つかの実施形態において、上記抗原結合タンパク質の重鎖定常領域は、ＩｇＧのＦｃ領域を含む。

【００２９】
幾つかの実施形態において、上記Ｆｃ領域は、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含む。

【００３０】
別の態様では、本願は、標的部分を含むキメラ抗原受容体を更に提供し、上記標的部分は上記抗原結合タンパク質を含む。

【００３１】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体は共刺激ドメインを含み、上記共刺激ドメインは、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＣＤ２７、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ８、ＯＸ４０、ＣＤ２２６、ＤＲ３、ＳＬＡＭ、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、２Ｂ４、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＰＤ－１、ＬＦＡ－１、ＬＩＧＨＴ、ＪＡＭＬ、ＣＤ２４４、ＣＤ１００、ＩＣＯＳ、ＣＤ８３のリガンド、ＣＤ４０、及びＭｙＤ８８からなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来する共刺激ドメインを含む。

【００３２】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の上記共刺激ドメインは、４－１ＢＢに由来する細胞内共刺激シグナル領域である。

【００３３】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体中の上記共刺激ドメインは、配列番号３９に示されるアミノ酸配列を含む。
【００３４】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体は、細胞内シグナル伝達ドメインを含み、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζ、ＣＤ３δ、ＣＤ３γ、ＣＤ３ε、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＦｃεＲＩγ、ＦｃεＲＩβ、ＦｃγＲＩＩａ、ウシ白血病ウイルスｇｐ３０、Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス（ＥＢＶ）ＬＭＰ２Ａ、サル免疫不全ウイルスＰＢｊ１４　Ｎｅｆ、カポジ肉腫ヘルペスウイルス（ＨＳＫＶ）、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ－１２、及び少なくとも１つのＩＴＡＭを含むドメインからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。
【００３５】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の上記細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζに由来するシグナル伝達ドメインである。
【００３６】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の上記細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号４１に示されるアミノ酸配列を含む。
【００３７】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体は、膜貫通領域を含み、上記膜貫通領域は、ＣＤ８、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＣＤ４、ＣＤ２７、ＣＤ７、ＰＤ－１、ＴＲＡＣ、ＴＲＢＣ、ＣＤ３ε、ＣＤ３ζ、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＤ５、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、ＮＫＧ２Ｄ、２Ｂ４、ＣＤ２４４、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＣＤ３０、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ、ＤＡＰ１０、ＣＤ２、ＮＫＧ２Ｃ、ＬＩＧＨＴ、ＤＡＰ１２、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＣＤ２２６、ＤＲ３、ＣＤ４５、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、及びＳＬＡＭからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来する膜貫通ドメインを含む。
【００３８】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の上記膜貫通領域は、ＣＤ８に由来する膜貫通領域である。
【００３９】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の上記膜貫通領域は、配列番号４０に示されるアミノ酸配列を含む。
【００４０】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体は、標的部分と膜貫通領域との間にヒンジ領域を含み、上記ヒンジ領域は、ＣＤ２８、ＩｇＧ１、ＩｇＧ４、ＩｇＤ、４－１ＢＢ、ＣＤ４、ＣＤ２７、ＣＤ７、ＣＤ８、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＧＩＴＲ、ＤＡＰ１０、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＣＤ２２６、ＳＬＡＭ、ＣＤ３０、及びＬＩＧＨＴからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来するヒンジ領域を含む。
【００４１】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の上記ヒンジ領域は、ＣＤ８に由来するヒンジ領域である。
【００４２】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の上記ヒンジ領域は、配列番号４２に示されるアミノ酸配列を含む。
【００４３】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体は、シグナルペプチドを更に含む。
【００４４】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の上記シグナルペプチドは、ＣＤ８

タンパク質のシグナルペプチドに由来する。
【００４５】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体の上記シグナルペプチドは、配列番号４３に示されるアミノ酸配列を含む。
【００４６】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片を更に含む。
【００４７】
幾つかの実施形態において、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１～１２及びそれらの機能的断片からなる群より選ばれる１つ又は複数を含む。
【００４８】
幾つかの実施形態において、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質５及び／又は６或いはその断片である。
【００４９】
幾つかの実施形態において、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、配列番号４４に示されるアミノ酸配列を含む。
【００５０】
幾つかの実施形態において、上記キメラ抗原受容体は、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、及び配列番号５３の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。
【００５１】
別の態様では、本願は、上記抗原結合タンパク質を含むポリペプチドを更に提供する。
【００５２】
別の態様では、本願は、上記単離された抗原結合タンパク質及び／又は上記キメラ抗原受容体をコードする１つ又は複数の単離された核酸分子を更に提供する。
【００５３】
幾つかの実施形態において、上記核酸分子は、プロモーターを含む。
【００５４】
幾つかの実施形態において、上記プロモーターは、構成的プロモーターである。
【００５５】
幾つかの実施形態において、上記プロモーターは、ＥＦ１αプロモーターである。
【００５６】
別の態様では、本願は、上記核酸分子を含むベクターを更に提供する。
【００５７】
幾つかの実施形態において、上記ベクターは、ウイルスベクターを含む。
【００５８】
幾つかの実施形態において、上記ベクターは、レンチウイルスベクターを含む。
【００５９】
別の態様では、本願は、上記抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記核酸分子及び／又は上記ベクターを含む細胞を更に提供する。
【００６０】
幾つかの実施形態において、上記細胞は、免疫エフェクター細胞である。
【００６１】
幾つかの実施形態において、上記細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、マクロファージ、ＮＫＴ細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球、リンパ球、白血球、末梢血単核細胞、胚性幹細胞、リンパ球前駆細胞、及び／又は多能性幹細胞を含む。
【００６２】
幾つかの実施形態において、上記細胞はＴ細胞である。

【００６３】
幾つかの実施形態において、上記細胞は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片を含む及び／又は発現する。
【００６４】
幾つかの実施形態において、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１～１２及びそれらの機能的断片からなる群より選ばれる１つ又は複数を含む。
【００６５】
幾つかの実施形態において、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質５及び／又は６或いはその断片である。
【００６６】
幾つかの実施形態において、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、配列番号４４に示されるアミノ酸配列を含む。
【００６７】
別の態様では、本願は、修飾された免疫エフェクター細胞を製造する方法を更に提供し、上記方法は、上記抗原結合タンパク質及び／又は上記キメラ抗原受容体を発現させる条件下で、上記細胞を培養することを含む。
【００６８】
別の態様では、本願は、免疫エフェクター細胞中に、上記ベクターを導入することを含む、修飾された免疫エフェクター細胞を製造する方法を更に提供する。
【００６９】
別の態様では、本願は、上記単離された抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記ポリペプチド、上記核酸分子、上記ベクター及び／又は上記細胞、並びに任意選択的に薬学的に許容されるベクターを含む医薬組成物を更に提供する。
【００７０】
別の態様では、本願は、薬物の製造における、上記単離された抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記ポリペプチド、上記核酸分子、上記ベクター、上記細胞、及び／又は上記医薬組成物の使用を更に提供し、上記薬物は、ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状を予防、治療及び／又は緩和するために用いられる。
【００７１】
幾つかの実施形態において、上記ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状は、腫瘍を含む。
【００７２】
幾つかの実施形態において、上記腫瘍は、固形腫瘍を含む。
【００７３】
幾つかの実施形態において、上記腫瘍は、非固形腫瘍を含む。
【００７４】
幾つかの実施形態において、上記腫瘍は、ＭＳＬＮ抗原を発現する腫瘍を含む。
【００７５】
幾つかの実施形態において、上記腫瘍は、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、中皮細胞癌、胆管癌、トリプルネガティブ乳癌、及び／又は子宮内膜癌を含む。
【００７６】
別の態様では、本願は、ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状を予防、治療及び／又は緩和する方法を更に提供し、上記方法は、それを必要とする対象に、上記単離された抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記ポリペプチド、上記核酸分子、上記ベクター、上記細胞、及び／又は上記医薬組成物を投与することを含む。
【００７７】
幾つかの実施形態において、上記ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状は、腫瘍を含む。

【００７８】
幾つかの実施形態において、上記腫瘍は、固形腫瘍を含む。
【００７９】
幾つかの実施形態において、上記腫瘍は、非固形腫瘍を含む。
【００８０】
幾つかの実施形態において、上記腫瘍は、ＭＳＬＮ抗原を発現する腫瘍を含む。
【００８１】
幾つかの実施形態において、上記腫瘍は、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、中皮細胞癌、胆管癌、トリプルネガティブ乳癌、及び／又は子宮内膜癌を含む。
【００８２】
当業者は、以下の詳細な説明から本願の他の態様及び利点を容易に洞察することができる。以下の詳細な説明には、本願の例示的な実施形態のみを示して説明する。当業者に明らかなように、本願の内容により、当業者は、本願にかかる発明の精神及び範囲から逸脱することなく、開示された具体的な実施形態を変更することができる。それに応じて、本願の図面及び明細書における説明は、限定的なものではなく、単に例示的なものである。
【図面の簡単な説明】
【００８３】
本願にかかる発明の具体的な特徴は、添付される特許請求の範囲に記載される通りである。以下に詳細に説明する例示的な実施形態及び図面を参照することで、本願にかかる発明の特徴及び利点をよりよく理解することができる。図面の簡単な説明は以下の通りである。
【図１】ファージＰｏｏｌ　ＥＬＩＳＡの結果を示す。
【図２】陽性クローンの選択を示す。
【図３Ａ－３Ｄ】本願の抗原結合タンパク質とＭＳＬＮとの親和性の検出を示す。
【図４】本願の抗原結合タンパク質と、ヒトＭＳＬＮを過剰発現する２９３Ｔとの結合活性のフローサイトメトリー検証を示す。
【図５】本願の抗原結合タンパク質と、２９３Ｔ、ＫＥＲＡ、ＬＯ２、Ａ５４９及びＨＡＣＡＴ細胞との非特異的結合のフローサイトメトリー検証を示す。
【図６】ＣＡＲ－Ｔ細胞のインビトロ反復刺激増殖実験の結果を示す。
【図７】ＣＡＲ－Ｔ細胞のインビトロ殺傷の結果を示す。
【図８】ＣＡＲ－Ｔ細胞のインビトロでのサイトカイン放出の検出の結果を示す。
【図９】ＣＡＲ－Ｔ細胞のインビトロでのサイトカイン放出の検出の結果を示す。
【図１０】ＣＡＲ－Ｔ細胞のインビトロでのサイトカイン放出の検出の結果を示す。
【図１１】ＳＫ－ＯＶ３腫瘍モデルマウスのインビボ薬効実験結果を示す。
【発明を実施するための形態】
【００８４】
以下、特定の具体的な実施例により、本願の発明の実施形態を説明し、当業者は、本明細書に開示された内容から本願の発明の他の利点及び効果を容易に理解することができる。
【００８５】
用語の定義
本願において、「ＭＳＬＮ」という用語は、メソテリン、又はＣＡＫ１抗原若しくはプレプロ巨核球増強因子とも呼ばれ、正常な中皮細胞上に存在するタンパク質であり、且つ幾つかの腫瘍細胞において過剰発現される。本願において、当該用語は、ＭＳＬＮタンパク質又はその機能的に活性な断片を含んでもよい。本願において、当該用語は、ＭＳＬＮタンパク質のホモログ、類似体、又は変異体を更に含んでもよい。例えば、上記ＭＳＬＮは、ヒトＭＳＬＮを含んでもよい。
【００８６】
本願において、「単離された抗原結合タンパク質」という用語は、一般に、その天然に存在する状態から離脱した抗原結合能を有するタンパク質を指す。上記「単離された抗原

結合タンパク質」は、抗原に結合する部分、及び任意選択的に、抗原結合部分が抗原へのその結合を促進する立体構造を採用することを可能にするフレームワーク又はフレームワーク部分を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、例えば、抗体由来のタンパク質フレームワーク領域（ＦＲ）、又は移植された可変領域（ＣＤＲ）若しくはＣＤＲ誘導体を有する候補のタンパク質フレームワーク領域若しくは人工フレームワーク領域を含んでもよい。例えば、上記抗原結合タンパク質は、抗体又はその抗原結合断片を含んでもよい。例えば、上記抗原結合タンパク質は、ＭＳＬＮタンパク質に結合することができる。例えば、上記抗原結合タンパク質は、ＭＳＬＮタンパク質への結合について、参照抗体と競合することができる。例えば、上記抗原結合タンパク質は、抗体重鎖可変領域ＶＨを含んでもよい。例えば、上記抗原結合タンパク質は、抗体重鎖可変領域ＶＨに由来する少なくとも１つのＣＤＲを含んでもよい。例えば、上記ＶＨは、ＨＣＤＲ３、ＨＣＤＲ２及び／又はＨＣＤＲ１を含んでもよい。例えば、上記ＶＨは、フレームワーク領域Ｈ－ＦＲ１を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ１のＣ末端が上記ＨＣＤＲ１のＮ末端に直接的又は間接的に連結されている。例えば、上記ＶＨは、フレームワーク領域Ｈ－ＦＲ２を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ２は、上記ＨＣＤＲ１と上記ＨＣＤＲ２との間に位置する。例えば、上記ＶＨは、フレームワーク領域Ｈ－ＦＲ３を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ３は、上記ＨＣＤＲ２と上記ＨＣＤＲ３との間に位置する。例えば、上記ＶＨは、フレームワーク領域Ｈ－ＦＲ４を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ４のＮ末端が上記ＨＣＤＲ３のＣ末端に連結されている。例えば、上記抗原結合タンパク質はＶＨＨであってもよい。例えば、上記抗原結合タンパク質は、抗体重鎖定常領域を含んでもよく、上記抗体重鎖定常領域はＩｇＧに由来し得る。例えば、上記抗体重鎖定常領域はヒトＩｇＧに由来し得る。例えば、上記抗体重鎖定常領域はヒトＩｇＧ１に由来し得る。

【００８７】

使用される「抗体」という用語は、完全な抗体及びその結合断片を含む。一般に、断片は、抗原に特異的に結合することについて、その断片が由来する完全な抗体と競合する。任意選択的に、抗体又はその結合断片は、他のタンパク質に化学的に結合し得るか、又は他のタンパク質と融合タンパク質の形態で発現され得る。例えば、上記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び完全ヒト抗体であってもよい。例えば、上記抗体又はその結合断片の結合タンパク質は、ＭＳＬＮを含んでもよい。例えば、上記抗体又はその結合断片は、ＭＳＬＮに対して特異性を有することができる。

【００８８】

「抗原結合断片」という用語は、完全な抗体の一部を指し、且つ完全な抗体の抗原決定可変領域を指す。例えば、上記抗原結合断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｖ断片と一本鎖Ｆｖ断片、タンデムＦｖ断片、ＶＨＨ、二重特異性抗体を含んでもよい。例えば、上記抗原結合断片はＶＨＨであってもよい。例えば、上記抗原結合断片は、ＭＳＬＮに結合することができる。例えば、上記抗原結合断片は、ＭＳＬＮに対して特異性を有することができる。

【００８９】

本願において、「ＶＨＨ」という用語は、一般に、重鎖抗体の可変抗原結合ドメインを含む抗体を指す。ＶＨＨは、ナノボディ（Ｎａｎｏｂｏｄｙ）（Ｎｂ）及び／又は単一ドメイン抗体とも呼ばれる。例えば、上記ＶＨＨは、ＭＳＬＮに結合することができる。例えば、上記ＶＨＨは、ＭＳＬＮに対して特異性を有することができる。

【００９０】

本願において、上記抗体は、ジスルフィド結合によって互いに連結された少なくとも２本の重（Ｈ）鎖と２本の軽（Ｌ）鎖を含んでもよい。各重鎖は、重鎖可変領域（ＶＨ）及び重鎖定常領域からなる。「重鎖定常領域」という用語は、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３という３つのドメインからなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ＶＬ）及び軽鎖定常領域からなる。「軽鎖定常領域」という用語は、１つのドメインＣＬからなる。ＶＨ及びＶＬ領域は更に、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変領域に細かく分けられてもよく、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれるより保存的な領域が散在する。それぞれのＶＨ及びＶ

Ｌは、アミノ末端からカルボキシ末端まで、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４という順で配列された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲからなる。重鎖と軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンと宿主組織又は因子との結合を媒介することができる。

【００９１】

本願において、「参照抗体」という用語は、ＭＳＬＮの同じエピトープへの結合について、上記単離された抗原結合タンパク質と競合することができる抗体を指す。上記参照抗体は、重鎖可変領域ＶＨを含んでもよい。例えば、上記参照抗体は、３つのＣＤＲ配列を有することができる。例えば、上記参照抗体のＶＨは、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含んでもよい。例えば、上記ＣＤＲ配列は、上記単離された抗原結合タンパク質のＣＤＲ配列と一致してもよい。

【００９２】

本願において、「ＩｇＧ」という用語は、基本的に公知の免疫グロブリンγ遺伝子によってコードされる抗体クラスに属するポリペプチドを指す。ヒトでは、このクラスには、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４が含まれる。マウスでは、このクラスには、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、及びＩｇＧ３が含まれる。

【００９３】

本願において、「キメラ抗原受容体」（ＣＡＲ）という用語は、一般に、少なくとも抗原又は標的に特異的に結合する細胞外ドメイン、膜貫通領域、及び細胞内ドメインを含む組換えポリペプチドを指す。例えば、上記細胞外ドメインと上記膜貫通領域との間にヒンジ領域が含まれる。例えば、上記キメラ抗原受容体は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片を更に含んでもよい。例えば、上記キメラ抗原受容体は、シグナルペプチドを含んでもよい。ＣＡＲの細胞外ドメインが標的細胞の表面上の標的抗原に結合することにより、ＣＡＲクラスタリングが生じ、且つＣＡＲ含有細胞に活性化刺激が送達される。ＣＡＲは、免疫エフェクター細胞の特異性をリダイレクトし、且つ増殖、サイトカイン産生、主要組織適合性（ＭＨＣ）に依存せずに標的抗原を発現する細胞の死亡を媒介することができる分子の食作用及び／又は産生を誘発する。例えば、上記細胞外構造は、上記抗原結合タンパク質を含んでもよい。例えば、上記細胞外構造は、ＭＳＬＮに特異的に結合することができる。

【００９４】

本願において、「細胞内ドメイン」という用語は、活性化シグナルを形質導入するのに十分な任意の切断部分を含む細胞内ドメインを意味する。上記細胞内ドメインは、細胞内シグナル領域及び／又は共刺激シグナル領域を含んでもよい。「細胞内シグナル領域」という用語は、ＣＡＲ含有細胞（例えば、ＣＡＲＴ細胞又はＣＡＲ発現ＮＫ細胞）の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを産生することができる細胞内領域を指す。例えば、上記細胞内シグナル領域は、ＣＤ３ζ、ＣＤ３δ、ＣＤ３γ、ＣＤ３ε、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＦｃεＲＩγ、ＦｃεＲＩβ、ＦｃγＲＩＩａ、ウシ白血病ウイルスｇｐ３０、Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス（ＥＢＶ）ＬＭＰ２Ａ、サル免疫不全ウイルスＰＢｊ１４　Ｎｅｆ、カポジ肉腫ヘルペスウイルス（ＨＳＫＶ）、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ－１２、及び少なくとも１つのＩＴＡＭを含むドメインからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質の細胞内シグナル領域を含んでもよい。例えば、上記細胞内シグナル領域は、ＣＤ３ζに由来するシグナル伝達ドメインであってもよい。「共刺激シグナル領域」という用語は、上記細胞内シグナル領域内の、エフェクターシグナルを形質導入することができるＣＡＲの一部を指す。例えば、上記共刺激シグナル領域は、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＣＤ２７、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ８、ＯＸ４０、ＣＤ２２６、ＤＲ３、ＳＬＡＭ、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、２Ｂ４、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＰＤ－１、ＬＦＡ－１、ＬＩＧＨＴ、ＪＡＭＬ、ＣＤ２４４、ＣＤ１００、ＩＣＯＳ、ＣＤ８３のリガンド、ＣＤ４０、及びＭｙＤ８８からなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内共刺激シグナル領域を含んでもよい。例えば、上記

共刺激シグナル領域は、４－１ＢＢに由来する細胞内共刺激シグナル領域であってもよい。

【００９５】

本願において、「膜貫通領域」という用語は、細胞質膜を横断することができることができるペプチド、ポリペプチド又はタンパク質のドメインを指す。これらのドメインを用いて、細胞外ドメインを細胞膜にアンカーすることができる。例えば、上記膜貫通領域は、ＣＤ８、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＣＤ４、ＣＤ２７、ＣＤ７、ＰＤ－１、ＴＲＡＣ、ＴＲＢＣ、ＣＤ３ε、ＣＤ３ζ、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＤ５、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、ＮＫＧ２Ｄ、２Ｂ４、ＣＤ２４４、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＣＤ３０、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ、ＤＡＰ１０、ＣＤ２、ＮＫＧ２Ｃ、ＬＩＧＨＴ、ＤＡＰ１２、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＣＤ２２６、ＤＲ３、ＣＤ４５、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、及びＳＬＡＭからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質の膜貫通ドメインを含んでもよい。例えば、上記膜貫通領域はＣＤ８の膜貫通領域に由来し得る。

【００９６】

本願において、「ヒンジ領域」という用語は、抗体重鎖ポリペプチドにおいて、ＣＨ１ドメインとＣＨ２ドメインを連結する一部、例えば、ＫａｂａｔによるＥＵ番号付けシステムの約２１６位～約２３０位を表す。ヒンジ領域は通常、同じアミノ酸配列を有する２本のポリペプチドからなる二量体分子である。ヒンジ領域は、一般に、約２５個のアミノ酸残基を含み、フレキシブルであり、抗原結合領域の独立した移動を可能にする。ヒンジ領域は、上部、中間、下部ヒンジドメインという３つのドメインに細かく分けられてもよい。例えば、上記ヒンジ領域は、ＣＤ２８、ＩｇＧ１、ＩｇＧ４、ＩｇＤ、４－１ＢＢ、ＣＤ４、ＣＤ２７、ＣＤ７、ＣＤ８、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＧＩＴＲ、ＤＡＰ１０、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＣＤ２２６、ＳＬＡＭ、ＣＤ３０、及びＬＩＧＨＴからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来するヒンジ領域を含んでもよい。例えば、上記ヒンジ領域はＣＤ８のヒンジ領域に由来し得る。

【００９７】

本願において、「低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（Ｌｏｗ－ｄｅｎｓｉｔｙ　ｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎｒｅｃｅｐｔｏｒ－ｒｅｌａｔｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ）」という用語は、エンドサイトーシス受容体に属する細胞表面タンパク質を指し、生体内に広く分布し、且つ非常に大きな組織間の差異性を有し、主な機能は細胞増殖並びにステロイドホルモン及び胆汁酸塩の合成のために、コレステロールを細胞内に摂取することである。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質は、任意の脊椎動物に由来してもよい。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、上記細胞内シグナル領域のＣ末端に位置してもよい。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１～１２及びそれらの機能的断片からなる群より選ばれる１つ又は複数を含んでもよい。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質６又はその断片であってもよい。

【００９８】

本願において、「シグナルペプチド」という用語は、翻訳時又は翻訳後に新生タンパク質を小胞体に誘導し、続いて表面発現する、新生ＣＡＲタンパク質のアミノ末端（Ｎ－末端）にあるリーダー配列を指す。例えば、上記シグナルペプチドは、ＣＤ８タンパク質のシグナルペプチドに由来する。

【００９９】

本願において、「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本明細書では互換可能であり、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、１つ又は複数のアミノ酸残基がその対応する天然アミノ酸の人工合成化学模倣物であるアミノ酸ポリマーを指すために使用されてもよく、天然アミノ酸ポリマー、修飾残基を含むそれらのアミ

ノ酸ポリマー、及び非天然アミノ酸ポリマーを指すために使用されてもよい。例えば、上記ポリペプチドは、上記抗原結合タンパク質を含んでもよい。

【０１００】

本願において、「核酸分子」という用語は、ＤＮＡ分子及びＲＮＡ分子を含む。１つの核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。「プロモーター」という用語は、一般に、プロモーターに操作的に連結された選択されたＤＮＡ配列の発現を調節し、それによって細胞中の選択されたＤＮＡ配列の発現に影響を及ぼすことができる１つのＤＮＡ配列を指す。例えば、上記核酸分子は、上記抗原結合タンパク質及び／又は上記キメラ抗原受容体を含むものをコードすることができる。例えば、上記核酸分子は、プロモーターを含んでもよい。例えば、上記プロモーターは、構成的プロモーターであってもよい。例えば、上記プロモーターは、ＥＦ１αプロモーターであってもよい。

【０１０１】

本願において、「ベクター」という用語は、一般に、本願の１つ又は複数の核酸分子に付着することができる分子を指す。例えば、上記ベクターは、ウイルスベクターであってもよい。例えば、上記ベクターは、レンチウイルスベクターであってもよい。

【０１０２】

本願において、「細胞」という用語は、核酸がトランスフェクトされ得る細胞を指し、「細胞」という用語は、プラスミド増殖のための原核細胞、並びに核酸発現及びポリペプチド産生のコーディングのための真核細胞を含む。例えば、細胞は、上記抗原結合タンパク質、上記核酸分子、及び／又は上記ベクターを含んでもよい。例えば、上記細胞は、免疫エフェクター細胞であってもよい。本願において、「免疫エフェクター細胞」という用語は、一般に、免疫応答に関与し、エフェクター機能を果たす免疫細胞を指す。例えば、上記エフェクター機能を果たすことは、異物抗原の除去又は免疫エフェクター応答の促進などを含んでもよい。例えば、免疫エフェクター細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、マクロファージ、ＮＫＴ細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球、リンパ球、白血球、末梢血単核細胞、胚性幹細胞、リンパ球前駆細胞、及び／又は多能性幹細胞を含んでもよい。例えば、免疫エフェクター細胞は、Ｔ細胞であってもよい。

【０１０３】

本願において、「医薬組成物」という用語は、一般に、哺乳動物個体への投与に適した化学的又は生物学的組成物を指す。例えば、上記医薬組成物は、上記抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記ポリペプチド、上記核酸分子、上記ベクター、及び／又は上記細胞、並びに任意選択的に薬学的に許容されるベクターを含んでもよい。上記医薬組成物は、ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状を予防、治療及び／又は緩和するために用いられ得る。例えば、上記ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患又は病状は、腫瘍を含んでもよい。例えば、上記腫瘍は、固形腫瘍及び／又は非固形腫瘍を含んでもよい。

【０１０４】

本願において、「特異的に結合する」又は「特異的」という用語は、一般に、標的と抗体との間の結合などの測定可能且つ再現可能な相互作用を指し、分子（生体分子を含む）の不均一集団の存在下で標的の存在を決定することができる。例えば、標的（エピトープであってもよい）に特異的に結合する抗体は、他の標的に結合するよりも高い親和性、親和力、より容易、及び／又はより長い持続時間で当該標的に結合する抗体であってもよい。幾つかの実施形態において、抗体は、タンパク質上のエピトープに特異的に結合し、上記エピトープは異なる種のタンパク質において保存されている。幾つかの実施形態において、特異的な結合は、排他的な結合を含んでもよいが、これを必要とされない。

【０１０５】

本願において、「対象」という用語は、一般に、ヒト又は非ヒト動物を指し、ネコ、イヌ、ウマ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラット又はサルを含むが、これらに限定されない。

【０１０６】

本願において、かかるタンパク質、ポリペプチド及び／又はアミノ酸配列はまた、少なくとも、上記タンパク質又はポリペプチドと同じ又は類似の機能を有する変異体又はホモログを含むと理解されるべきである。

【０１０７】

本願において、上記変異体は、例えば、上記タンパク質及び／又は上記ポリペプチド（例えば、ＭＳＬＮに特異的に結合する）のアミノ酸配列において、１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたタンパク質又はポリペプチドであってもよい。例えば、上記機能的変異体は、既に少なくとも１個、例えば１～３０個、１～２０個若しくは１～１０個、また例えば１個、２個、３個、４個若しくは５個のアミノ酸の置換、欠失及び／又は挿入によってアミノ酸改変を有するタンパク質又はポリペプチドを含んでもよい。上記機能的変異体は、改変（例えば、置換、欠失又は付加）前の上記タンパク質又は上記ポリペプチドの生物学的特性を基本的に保持することができる。例えば、上記機能的変異体は、改変前の上記タンパク質又は上記ポリペプチドの少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の生物学的活性（例えば、抗原結合能）を保持することができる。例えば、上記置換は、保存的置換であってもよい。

【０１０８】

本願において、上記ホモログは、上記タンパク質及び／又は上記ポリペプチド（例えば、ＭＳＬＮに特異的に結合する）のアミノ酸配列と少なくとも約８５％（例えば、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％、又はそれ以上）の配列相同性を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。

【０１０９】

本願において、上記相同性は、一般に、２つ以上の配列の間の類似性、類似又は関連を指す。以下の方法により、「配列相同性パーセント」を計算することができる：２つのアラインメントされる配列を比較ウィンドウで比較し、２つの配列中に同じ核酸塩基（例えば、Ａ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、Ｉ）又は同じアミノ酸残基（例えば、Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、及びＭｅｔ）が存在する位置の数を決定して、一致する位置の数を得、一致する位置の数を比較ウィンドウ中の全位置の数（即ち、ウィンドウのサイズ）で割り、且つ結果に１００を掛けて、配列相同性パーセントを生成する。配列相同性パーセントを決定するためのアラインメントは、当技術分野で既知の種々の方法、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより実現することができる。当業者は、比較されている全長配列の範囲内又は標的配列の領域内での最大のアラインメントを実現するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントのための適切なパラメータを決定することができる。上記相同性は、ＦＡＳＴＡ及びＢＬＡＳＴの方法によって測定することもできる。ＦＡＳＴＡアルゴリズムについての説明は、Ｗ．Ｒ．ＰｅａｒｓｏｎとＤ．Ｊ．Ｌｉｐｍａｎの「生物学的配列比較のための改良されたツール」，米国科学院院刊（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．），８５：２４４４－２４４８，１９８８、及びＤ．Ｊ．ＬｉｐｍａｎとＷ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎの「迅速で高感度なタンパク質類似性検索」，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２７：１４３５－１４４１，１９８９を参照することができる。ＢＬＡＳＴアルゴリズムについての説明は、Ｓ．Ａｌｔｓｃｈｕｌ、Ｗ．Ｇｉｓｈ、Ｗ．Ｍｉｌｌｅｒ、Ｅ．Ｗ．Ｍｙｅｒｓ及びＤ．Ｌｉｐｍａｎの「基本的な局所的アラインメント（ａｌｉｇｎｍｅｎｔ）検索ツール」，分子生物学雑誌，２１５：４０３－４１０，１９９０を参照することができる。

【０１１０】

本願において、「含む」という用語は、一般に、包含すること、まとめること、含有すること又はカバーすることの意味を指す。幾つかの場合において、「である」、「……からなる」の意味も表す。

【０１１１】
本願において、「約」という用語は、一般に、指定値の０．５％～１０％以上又は以下の範囲内の変化、例えば、指定値の０．５％、１％、１．５％、２％、２．５％、３％、３．５％、４％、４．５％、５％、５．５％、６％、６．５％、７％、７．５％、８％、８．５％、９％、９．５％、又は１０％以上又は以下の範囲内の変化を指す。
【発明の詳細な説明】
【０１１２】
単離された抗原結合タンパク質
本願において、上記抗原結合タンパク質は、抗体又はその抗原結合断片を含んでもよい。本願において、上記抗原結合断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｖ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、ｄｉ－ｓｃＦｖ、ＶＨＨ及び／又はｄＡｂを含んでもよい。本願において、上記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び完全ヒト抗体を含んでもよい。
【０１１３】
ＣＤＲ
抗体のＣＤＲは、相補性決定領域とも呼ばれ、可変領域の一部である。当該領域のアミノ酸残基は、抗原又は抗原エピトープと接触することができる。抗体ＣＤＲは、例えば、ＣＣＧ、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、総合的に考察すればＫａｂａｔ／Ｃｈｏｔｈｉａなどの様々な番号付けシステムによって決定することができる。これらの番号付けシステムは、当該技術分野において既知であり、具体的には、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆ．ｏｒｇ．ｕｋ／ａｂｓ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ＃ｋａｂａｔｎｕｍを参照することができる。当業者は、抗体の配列及び構造に応じて、異なる番号付けシステムを用いてＣＤＲ領域を決定することができる。異なる番号付けシステムを用いると、ＣＤＲ領域に違いが生じる可能性がある。本願において、上記ＣＤＲは、任意のＣＤＲ分割方式に従って分割されたＣＤＲ配列をカバーし、またその変異体もカバーし、上記変異体は、上記ＣＤＲのアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸の置換、欠失、及び／又は付加を含む。例えば、１～３０個、１～２０個又は１～１０個、更に例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個又は９個のアミノ酸の置換、欠失及び／又は挿入であり、またそのホモログもカバーし、上記ホモログは、上記ＣＤＲのアミノ酸配列と少なくとも約８５％（例えば、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％、又はそれ以上）の配列相同性を有するアミノ酸配列であってもよい。本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、Ｋａｂａｔ番号付けシステムによって定義される。
【０１１４】
本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、抗体重鎖可変領域ＶＨ中の少なくとも１つのＣＤＲを含んでもよく、例えば、上記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。
【０１１５】
本願において、上記抗原結合タンパク質はＨＣＤＲ３を含んでもよく、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１、配列番号９、配列番号６５、及び配列番号６６の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含む。
【０１１６】
例えば、上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１、配列番号９、配列番号１４、配列番号１９、配列番号２４、配列番号２９、及び配列番号３４の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。
【０１１７】
本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、ＨＣＤＲ２を含んでもよく、且つ上記ＨＣＤＲ２は、配列番号６７に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２、配列番号１０、配列番号１５、配列番号２０、配列番号２５、配列番号３０、及び配列番号３５の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよ

い。
【０１１８】
本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、ＨＣＤＲ１を含んでもよく、且つ上記ＨＣＤＲ１は、配列番号６８（$X_1X_2X_3$ＭＧ、そのうち、X_1はＮ、Ｒ、Ｓ、Ｔ又はＹであり、X_2はＮ又はＹであり、X_3はＡ、Ｎ又はＶである）に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３、配列番号１１、配列番号１６、配列番号２１、配列番号２６、配列番号３１、及び配列番号３６の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。
【０１１９】
本願において、上記単離された抗原結合タンパク質はＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含んでもよく、上記ＨＣＤＲ１は、配列番号６８（$X_1X_2X_3$ＭＧ、そのうち、X_1はＮ、Ｒ、Ｓ、Ｔ又はＹであり、X_2はＮ又はＹであり、X_3はＡ、Ｎ又はＶである）に示されるアミノ酸配列を含んでもよく、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号６７に示されるアミノ酸配列を含んでもよく、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１、配列番号９、配列番号６５、及び配列番号６６の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。
【０１２０】
本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含んでもよく、且つ上記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３は、
（１）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１に示されるアミノ酸配列を含み、
（２）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号１１に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号１０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号９に示されるアミノ酸配列を含み、
（３）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号１６に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１４に示されるアミノ酸配列を含み、
（４）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含み、
（５）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号２６に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号２５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号２４に示されるアミノ酸配列を含み、
（６）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３１に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号３０に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号２９に示されるアミノ酸配列を含み、及び
（７）上記ＨＣＤＲ１は、配列番号３６に示されるアミノ酸配列を含み、上記ＨＣＤＲ２は、配列番号３５に示されるアミノ酸配列を含み、且つ上記ＨＣＤＲ３は、配列番号３４に示されるアミノ酸配列を含み、
からなる群のアミノ酸配列の何れか１つを含んでもよい。
【０１２１】
ＦＲ
本願において、抗体フレームワーク領域ＦＲは、抗体可変領域中の、より分岐性の高い（即ち、超可変）ＣＤＲの間に存在する部分を指す。そのようなフレームワーク領域は、典型的にフレームワーク１～４（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）と呼ばれ、且つ抗原結合表面を形成するために、３次元空間において６つのＣＤＲ（重鎖から３つ、且つ軽鎖から３つ）を提示するための骨格を提供する。
【０１２２】
本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、Ｈ－ＦＲ１を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ１は、配列番号４、配列番号１２、配列番号１７、配列番号２２、配列番号２

７、配列番号３２、及び配列番号３７の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１２３】

本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、Ｈ－ＦＲ２を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ２は、配列番号５に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１２４】

本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、Ｈ－ＦＲ３を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ３は、配列番号６に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１２５】

本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、Ｈ－ＦＲ４を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ４は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１２６】

本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、Ｈ－ＦＲ１、Ｈ－ＦＲ２、Ｈ－ＦＲ３及びＨ－ＦＲ４を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ１は、配列番号４、配列番号１２、配列番号１７、配列番号２２、配列番号２７、配列番号３２、及び配列番号３７の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ２は、配列番号５に示されるアミノ酸配列を含んでもよく、上記Ｈ－ＦＲ３は、配列番号６に示されるアミノ酸配列を含んでもよく、且つ上記Ｈ－ＦＲ４は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１２７】

ＶＨ／ＶＨＨ

本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は抗体重鎖可変領域ＶＨを含んでもよく、且つ上記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記ＶＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２３、配列番号２８、配列番号３３、及び配列番号３８の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１２８】

本願において、上記抗原結合断片はＶＨＨであってもよく、且つ上記ＶＨＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号６９、及び配列番号７０の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記ＶＨＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２３、配列番号２８、配列番号３３、及び配列番号３８の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１２９】

重鎖定常領域

本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、重鎖定常領域を含んでもよい。上記重鎖定常領域は、少なくともＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３という３つの重鎖定常ドメインを含む領域を指す。非限定的な例示的な重鎖定常領域は、γ、δ、及びαを含む。非限定的な例示的な重鎖定常領域は、εとμを更に含む。各重鎖定常領域は、１つの抗体アイソタイプに対応する。例えば、γ定常領域を含む抗体はＩｇＧ抗体であり、δ定常領域を含む抗体はＩｇＤ抗体であり、α定常領域を含む抗体はＩｇＡ抗体である。更に、μ定常領域を含む抗体はＩｇＭ抗体であり、ε定常領域を含む抗体はＩｇＥ抗体である。幾つかのアイソタイプは、更にサブクラスに細かく分けられてもよい。例えば、ＩｇＧ抗体は、ＩｇＧ１（γ_1定常領域を含む）、ＩｇＧ２（γ_2定常領域を含む）、ＩｇＧ３（γ_3定常領域を含む）、及びＩｇＧ４（γ_4定常領域を含む）抗体を含むが、これらに限定されなく、ＩｇＡ抗体は、ＩｇＡ１（α_1定常領域を含む）とＩｇＡ２（α_2定常領域を含む）抗体を含むが、これらに限定されなく、ＩｇＭは、ＩｇＭ１とＩｇＭ２を含むが、これらに限定されない。

【０１３０】

本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、抗体重鎖定常領域を含んでもよく、上記抗体重鎖定常領域はＩｇＧに由来し得る。本願において、上記単離された抗原結

合タンパク質は、抗体重鎖定常領域を含んでもよく、上記抗体重鎖定常領域はヒトＩｇＧに由来し得る。本願において、上記単離された抗原結合タンパク質は、抗体重鎖定常領域を含んでもよく、上記抗体重鎖定常領域はヒトＩｇＧ１に由来し得る。本願において、上記抗原結合タンパク質の重鎖定常領域は、ＩｇＧのＦｃ領域を含んでもよい。例えば、上記Ｆｃ領域は、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１３１】

キメラ抗原受容体

別の態様では、本願は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を更に提供し、上記キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、ＭＳＬＮタンパク質に結合する標的部分を含んでもよく、例えば、ＭＳＬＮタンパク質に結合する標的部分は、本願に記載の抗原結合タンパク質であってもよい。

【０１３２】

例えば、本願のＣＡＲはＶＨＨを含んでもよく、上記ＶＨＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２３、配列番号２８、配列番号３３、及び配列番号３８の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１３３】

本願において、上記ＣＡＲは、ＭＳＬＮタンパク質に結合する細胞外の標的部分を含むだけでなく、細胞内ドメインを含んでもよい。

【０１３４】

本願において、上記ＣＡＲは、刺激シグナルを提供することができる細胞内の共刺激シグナル領域を含んでもよい。例えば、上記共刺激シグナル領域は、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＣＤ２７、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ８、ＯＸ４０、ＣＤ２２６、ＤＲ３、ＳＬＡＭ、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、２Ｂ４、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＰＤ－１、ＬＦＡ－１、ＬＩＧＨＴ、ＪＡＭＬ、ＣＤ２４４、ＣＤ１００、ＩＣＯＳ、ＣＤ８３のリガンド、ＣＤ４０、及びＭｙＤ８８からなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質の細胞内共刺激シグナル領域を含んでもよい。

【０１３５】

例えば、上記共刺激シグナル領域は、４－１ＢＢに由来する細胞内共刺激シグナル領域であってもよい。例えば、上記共刺激シグナル領域は、配列番号３９に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１３６】

幾つかの場合において、上記ＣＡＲは、少なくとも１つのＩＴＡＭモチーフを有するドメインを含み得る細胞内シグナル領域を含んでもよい。上記細胞内シグナル伝達ドメインは、活性化シグナルを細胞の内部に伝達することができる。例えば、上記細胞内シグナル領域は、ＣＤ３ζ、ＣＤ３δ、ＣＤ３γ、ＣＤ３ε、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＦｃεＲＩγ、ＦｃεＲＩβ、ＦｃγＲＩＩａ、ウシ白血病ウイルスｇｐ３０、Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス（ＥＢＶ）ＬＭＰ２Ａ、サル免疫不全ウイルスＰＢｊ１４　Ｎｅｆ、カポジ肉腫ヘルペスウイルス（ＨＳＫＶ）、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ－１２、及び少なくとも１つのＩＴＡＭを含む他のドメインからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来する細胞内シグナル領域を含んでもよい。

【０１３７】

例えば、上記細胞内シグナル領域は、ＣＤ３ζに由来するシグナル伝達ドメインであってもよい。例えば、上記細胞内シグナル領域は、配列番号４１に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１３８】

幾つかの場合において、上記ＣＡＲは、膜貫通ドメインを含んでもよく、上記膜貫通ドメインは、疎水性ａｌｐｈａヘリックスを含んでもよい、細胞表面タンパク質中の細胞膜を跨がる１つの断片の配列である。上記膜貫通ドメインは、任意のＩ型膜貫通タンパク質に由来し得る。膜貫通ドメインは、疎水性ヘリックスを形成すると予測される合成配列で

あってもよい。例えば、上記膜貫通領域は、ＣＤ８、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＣＤ４、ＣＤ２７、ＣＤ７、ＰＤ－１、ＴＲＡＣ、ＴＲＢＣ、ＣＤ３ε、ＣＤ３ζ、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＤ５、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、ＮＫＧ２Ｄ、２Ｂ４、ＣＤ２４４、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＣＤ３０、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ、ＤＡＰ１０、ＣＤ２、ＮＫＧ２Ｃ、ＬＩＧＨＴ、ＤＡＰ１２、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＣＤ２２６、ＤＲ３、ＣＤ４５、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、及びＳＬＡＭからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質に由来する膜貫通ドメインを含んでもよい。

【０１３９】

例えば、上記膜貫通領域は、ＣＤ８に由来する膜貫通領域であってもよい。例えば、上記膜貫通領域は、配列番号４０に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１４０】

幾つかの場合において、上記ＣＡＲは、ヒンジ領域を含んでもよく、上記ヒンジ領域は、上記細胞外の標的部分と上記膜貫通ドメインとの間に位置することができる。例えば、上記ヒンジ領域は、ＣＤ２８、ＩｇＧ１、ＩｇＧ４、ＩｇＤ、４－１ＢＢ、ＣＤ４、ＣＤ２７、ＣＤ７、ＣＤ８、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｃ、ＦｃεＲＩγ、ＢＴＬＡ、ＧＩＴＲ、ＤＡＰ１０、ＣＤ４０Ｌ、ＴＩＭ１、ＣＤ２２６、ＳＬＡＭ、ＣＤ３０、及びＬＩＧＨＴからなる群より選ばれる１つ又は複数のタンパク質のヒンジ領域を含んでもよい。

【０１４１】

例えば、上記ヒンジ領域は、ＣＤ８に由来するヒンジ領域であってもよい。例えば、上記ヒンジ領域は、配列番号４２に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１４２】

本願において、上記ＣＡＲは、上記ＭＳＬＮタンパク質に結合する標的部分のＮ末端にシグナルペプチドを更に含んでもよい。例えば、上記シグナルペプチドは、ＣＤ８タンパク質に由来するシグナルペプチドであってもよい。例えば、上記シグナルペプチドは、配列番号４３に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１４３】

本願において、上記ＣＡＲは、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片を更に含んでもよい。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、上記ＣＡＲのＣ末端に位置してもよい。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１～１２及びそれらの機能的断片を含んでもよい。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質５及び／又は６或いはその断片であってもよい。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、配列番号４４に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片をコードする核酸分子は、配列番号４５に示されるヌクレオチド配列を含んでもよい。

【０１４４】

本願において、上記ＣＡＲ中の上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片の配列は、自己切断ペプチド（例えば、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、Ｅ２Ａなどの２Ａペプチド）を介して、ＣＡＲのＣ末端配列に連結され得る。例えば、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片は、Ｔ２Ａを介して細胞内シグナル領域のＣ末端に連結され得る。例えば、上記切断ペプチドは、配列番号４６に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１４５】

本願において、Ｎ末端からＣ末端まで、上記ＣＡＲは順に、ＭＳＬＮタンパク質に結合する標的部分（例えば、上記抗原結合タンパク質、また例えば、本願に記載のＶＨＨ）、上記ヒンジ領域、上記膜貫通ドメイン、上記共刺激シグナル領域、及び上記細胞内シグナル領域を含んでもよい。例えば、Ｎ末端からＣ末端まで、上記ＣＡＲは順に、上記ＶＨＨ

、ＣＤ８に由来するヒンジ領域、ＣＤ８に由来する膜貫通領域、４－１ＢＢに由来する共刺激シグナル領域、及びＣＤ３ζに由来する細胞内シグナル領域を含んでもよく、且つ上記ＶＨＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２３、配列番号２８、配列番号３３、及び配列番号３８の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１４６】

本願において、Ｎ末端からＣ末端まで、上記ＣＡＲは順に、ＭＳＬＮタンパク質に結合する標的部分（例えば、上記抗原結合タンパク質、また例えば、本願に記載のＶＨＨ）、上記ヒンジ領域、上記膜貫通ドメイン、上記共刺激シグナル領域、上記細胞内シグナル領域、及び上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片を含んでもよい。例えば、Ｎ末端からＣ末端まで、上記ＣＡＲは順に、上記ＶＨＨ、ＣＤ８に由来するヒンジ領域、ＣＤ８に由来する膜貫通領域、４－１ＢＢに由来する共刺激シグナル領域、ＣＤ３ζに由来する細胞内シグナル領域、及び配列番号４４に示されるアミノ酸配列を含む低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片を含んでもよく、且つ上記ＶＨＨは、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２３、配列番号２８、配列番号３３、及び配列番号３８の何れか１つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１４７】

本願において、Ｎ末端からＣ末端まで、上記ＣＡＲは順に、シグナルペプチド、ＭＳＬＮタンパク質に結合する標的部分（例えば、上記抗原結合タンパク質、また例えば、本願に記載のＶＨＨ）、上記ヒンジ領域、上記膜貫通ドメイン、上記共刺激シグナル領域、及び上記細胞内シグナル領域を含んでもよい。

【０１４８】

本願において、Ｎ末端からＣ末端まで、上記ＣＡＲは順に、シグナルペプチド、ＭＳＬＮタンパク質に結合する標的部分（例えば、上記抗原結合タンパク質、また例えば、本願に記載のＶＨＨ）、上記ヒンジ領域、上記膜貫通ドメイン、上記共刺激シグナル領域、上記細胞内シグナル領域、及び上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片を含んでもよい。

【０１４９】

例えば、上記キメラ抗原受容体は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記キメラ抗原受容体は、配列番号４８に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記キメラ抗原受容体は、配列番号４９に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記キメラ抗原受容体は、配列番号５０に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記キメラ抗原受容体は、配列番号５１に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記キメラ抗原受容体は、配列番号５２に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、上記キメラ抗原受容体は、配列番号５３に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【０１５０】

<u>核酸分子</u>

別の態様では、本願は、１つ又は複数の核酸分子を更に提供し、上記核酸分子は、任意の長さの単離形態のヌクレオチド、デオキシヌクレオチド及び／リボヌクレオチドであってもよく、上記単離された抗原結合タンパク質及び／又は上記キメラ抗原受容体をコードすることができる。

【０１５１】

例えば、上記核酸分子は、プロモーターを含んでもよい。例えば、上記プロモーターは、構成的プロモーターであってもよい。例えば、上記プロモーターは、ＥＦ１αプロモーターであってもよい。

【０１５２】

別の態様では、本願は、１つ又は複数の核酸分子を更に提供し、上記核酸分子は、細胞において上記キメラ抗原受容体及び上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片を発現することができる配列を含む。本願において、上記キメラ抗原タンパク質をコードする核酸配列は、上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質又はその断片

をコードする核酸配列と、切断ペプチドを介して連結することができる。
【０１５３】
ベクター
別の態様では、本願は、上記核酸分子を含んでもよいベクターを更に提供する。上記ベクターは、その保有する遺伝物質要素を宿主細胞内で発現させるように、宿主細胞を形質転換、形質導入、又はトランスフェクトすることができる。例えば、ベクターは、プロモーター、転写物、エンハンサー、レプリコン、選択要素、及びレポーター遺伝子を含んでもよい。例えば、ベクターは、細胞への進入を補助する成分を含んでもよい。上記核酸分子をベクター中で複製させるために、上記核酸分子の５’末端及び３’末端は、長い末端反復配列を更に含んでもよい。
【０１５４】
例えば、上記ベクターは、ウイルスベクターであってもよい。例えば、上記ベクターは、レンチウイルスベクターであってもよい。
【０１５５】
細胞
別の態様では、本願は、細胞を更に提供し、上記細胞は、上記単離された抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記核酸分子及び／又は上記ベクターを含んでもよい。上記細胞は、単一の細胞の子孫を含んでもよい。天然の、偶然の、又は意図的な突然変異のために、子孫は、（全ＤＮＡ相補体の形態又はゲノムで）必ずしも元の母細胞と完全に同じであるとは限らない。
【０１５６】
幾つかの実施形態において、上記細胞は、免疫エフェクター細胞であってもよい。幾つかの実施形態において、上記細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、マクロファージ、ＮＫＴ細胞、単核細胞、樹状細胞、顆粒球、リンパ球、白血球、末梢血単核細胞、胚性幹細胞、リンパ球前駆細胞、及び／又は多能性幹細胞を含んでもよい。例えば、
幾つかの実施形態において、上記細胞は、Ｔ細胞であってもよい。
【０１５７】
本願において、上記細胞は、上記ＣＡＲを含んでもよく、及び／又は発現してもよい。本願において、上記細胞は、上記ＣＡＲ及び上記低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質若しくはその断片を含んでもよく、及び／又は発現してもよい。
【０１５８】
医薬組成物
別の態様では、本願は、上記単離された抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記核酸分子、上記ベクター及び／又は上記細胞、並びに任意選択的に薬学的に許容されるアジュバントを含んでもよい医薬組成物を更に提供する。
【０１５９】
幾つかの実施形態において、上記医薬組成物は、１つ又は複数の（薬学的に有効な）キャリア剤、安定剤、賦形剤、希釈剤、可溶化剤、界面活性剤、乳化剤、及び／又は防腐剤の適切な製剤を更に含んでもよい。組成物の許容される成分は、好ましくは、使用される用量及び濃度下で受容者に対して毒性がない。本発明の医薬組成物は、液体、凍結及び凍結乾燥組成物を含んでもよい。
【０１６０】
幾つかの実施形態において、上記薬学的に許容されるアジュバントは、医薬投与に適合性があり、一般に安全で、非毒性であり、生物学的にも他の点でも望ましくないものではない、任意の及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、等張化剤、及び吸収遅延剤を含んでもよい。
【０１６１】
幾つかの実施形態において、上記医薬組成物は、非経口、経皮、腔内、動脈内、髄腔内及び／又は鼻内投与、或いは組織への直接注射を含んでもよい。例えば、上記医薬組成物

は、注入又は注射によって患者又は対象に投与され得る。幾つかの実施形態において、上記医薬組成物の投与は、異なる手段、例えば静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所又は真皮内投与によって行うことができる。

【０１６２】

製造方法

別の態様では、本願は、上記単離された抗原結合タンパク質及び／又は上記キメラ抗原受容体を製造する方法を更に提供する。上記方法は、上記抗原受容体及び／又は上記キメラ抗原受容体を発現させる条件下で、上記細胞を培養することを含んでもよい。

【０１６３】

本願は、修飾された免疫エフェクター細胞を製造する方法を更に提供し、上記方法は、免疫細胞中に上記ベクターを導入することを含んでもよい。

【０１６４】

使用

別の態様では、本願は、薬物の製造における、上記単離された抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記核酸分子、上記ベクター、上記細胞、及び／又は上記医薬組成物の使用を更に提供し、上記薬物は、疾患及び／又は病状を予防、緩和及び／又は治療するために用いられる。

【０１６５】

別の態様では、本願は、疾患及び／又は病状を予防、緩和及び／又は治療する方法を更に提供し、上記方法は、対象に、上記単離された抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記核酸分子、上記ベクター、上記細胞、及び／又は上記医薬組成物を投与することを含んでもよい。

【０１６６】

別の態様では、本願は、疾患及び／又は病状を予防、緩和及び／又は治療するための、上記単離された抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記核酸分子、上記ベクター、上記細胞、及び／又は上記医薬組成物を更に提供する。

【０１６７】

本願において、上記疾患及び／又は病状は、ＭＳＬＮの異常発現に関連する疾患及び／又は病状を含んでもよい。

【０１６８】

本願において、上記疾患及び／又は病状は、腫瘍を含んでもよい。

【０１６９】

本願において、上記腫瘍は、固形腫瘍及び／又は非固形腫瘍を含んでもよい。

【０１７０】

本願において、上記腫瘍は、血液腫瘍及び／又はリンパ腫を含んでもよい。

【０１７１】

本願において、上記腫瘍は、ＭＳＬＮ抗原を発現する腫瘍を含んでもよい。

【０１７２】

本願において、上記腫瘍は、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、中皮細胞癌、胆管癌、トリプルネガティブ乳癌、及び／又は子宮内膜癌を含んでもよい。

【０１７３】

本願において、上記対象は、ヒト又は非ヒト動物を含んでもよい。

【０１７４】

別の態様では、本願は、上記単離された抗原結合タンパク質を含むポリペプチドを提供する。

【０１７５】

別の態様では、本願は、上記単離された抗原結合タンパク質、上記キメラ抗原受容体、上記核酸分子、上記ベクター、上記細胞、及び／又は上記医薬組成物を含む試薬キット又は投与装置を提供する。

【０１７６】

いかなる理論によっても限定されることを意図するものではなく、以下の実施例は、本願の発明の各技術案を例示するためのものに過ぎず、本願の発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【０１７７】

実施例１　ＭＳＬＮ－Ｈｉｓを標的とするナノボディのスクリーニング

１．１　ＭＳＬＮ－Ｈｉｓを標的とするパンニング

全長のＭＳＬＮ、及びそれぞれＭＳＬＮ－Ｄ１（ＡＡ２９６－３９０）、ＭＳＬＮ－Ｄ２（ＡＡ３９１－４８６）、及びＭＳＬＮ－Ｄ３（４８７－５９８）であるその３つのｄｏｍａｉｎを構築及び発現し、ＩｇＧ－Ｆｃ及びＭＳＬＮ－Ｈｉｓタンパク質１０μｇ／ｍＬでプレートをコーティングし、４℃で一晩放置した。１日おきに１×ＰＢＳＴ（ＰＢＳ中に０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含有する）で３回洗浄した後、０．５％のＢＳＡで室温で２時間ブロッキングし、１×ＰＢＳＴで３回洗浄し、ＩｇＧ１－Ｆｃウェルに１００μＬのファージライブラリー（社内の人工合成ナノボディライブラリーＮａｎｏＯｒｉ＿１．０）を加えてネガティブセレクションを行い、１時間後にＩｇＧ１－Ｆｃ中のファージをＭＳＬＮ－Ｈｉｓのウェルに移してポジティブセレクションを行い、１．５時間後に１×ＰＢＳＴで１０回洗浄して抗原に結合しないファージを洗い流し、最後にｐＨ＝２．２のＧｌｙｃｉｎｅ－ＨＣｌで溶離し、１００μＬ／ｗｅｌｌであり、次にｐＨ＝８．０のＴｒｉｓ－ＨＣｌで中和し、溶離されたファージの半分を取って対数増殖期にあるＴＧ１に感染させ、半時間後にＭ１３ＫＯ７に重感染させ、一晩培養した。１日おきに、次のラウンドのスクリーニングのためにファージを沈殿させた。類似のスクリーニング過程を４回繰り返し、第２ラウンドのポジティブセレクションの後、１×ＰＢＳＴで２０回洗浄し、第３ラウンドで３０回洗浄し、第４ラウンドで４０回洗浄した。

【０１７８】

１．２　Ｐｏｏｌ　ＥＬＩＳＡ

１日前に、２μｇ／ｍＬのＭＳＬＮ－Ｈｉｓ、ＩｇＧ１－Ｆｃ及び０．５％のＢＳＡで９６ウェルプレートをコーティングし、一晩静置した。１日おきに１×ＰＢＳＴで３回洗浄した後、０．５％のＢＳＡで２時間ブロッキングした。ブロッキング終了後、１×ＰＢＳＴで３回洗浄し、３０μＬの各ラウンドのファージライブラリーを加え、室温で１時間振とうしてインキュベートし、１×ＰＢＳＴで３回洗浄した後、二次抗体Ａｎｔｉ－Ｍ１３－ＨＲＰ（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、製品番号：１１９７３－ＭＭ０５Ｔ－Ｈ）とＡｎｔｉ－Ｆｌａｇ－ＨＲＰ（ａｂｃａｍ、製品番号：ａｂ１１６２）を加え、室温で３０～６０分間インキュベートし、１×ＰＢＳＴで７回洗浄した後にＴＭＢ発色液を加え、３～５分後に２Ｍのリン酸を加えて反応を停止させ、４５０ｎｍの波長の吸収値を読み取った。

【０１７９】

結果を図１に示し、結果は、第２ラウンドから、ＭＳＬＮ－Ｈｉｓを標的とする特異的抗体が濃縮され始めることを示すが、ａｎｔｉ－Ｆｌａｇ－ＨＲＰ二次抗体の曲線は、第３ラウンドと第４ラウンドの濃縮がより明らかであることを示した。従って、第３ラウンドと第４ラウンドの菌液からそれぞれ９６個の単一クローンを採取した。

【０１８０】

１．３　ファージ酵素結合免疫法（ＥＬＩＳＡ）による特異的陽性単一クローンの同定

４ラウンドのパンニングの後、第４ラウンドの予備のｏｕｔｐｕｔを２ＹＴ／ｃａｒｂにプレーティングし、１日おきに１９２個の単一コロニーをランダムに採取して８００μＬの２ＹＴ／ｃａｒｂ／Ｍ１３ＫＯ７中に入れ、一晩振とうして培養し、ファージを産生した。１日前に、２μｇ／ｍＬのＭＳＬＮ－ＨｉｓとＩｇＧ１－Ｆｃで３８４ウェルプレートをコーティングし、一晩静置した。１日おきに１×ＰＢＳＴで３回洗浄した後、０．５％のＢＳＡで２時間ブロッキングし、同時に遠心分離してファージ上清を収集した。ブロッキング終了後、１×ＰＢＳＴで３回洗浄し、３０μＬのファージ上清を加え、室温で１時間振とうしてインキュベートし、１×ＰＢＳＴで３回洗浄した後、二次抗体Ａｎｔｉ

－Ｍ１３－ＨＲＰを加え、室温で３０～６０分間インキュベートし、１×ＰＢＳＴで７回洗浄した後にＴＭＢ発色液を加え、３～５分後に２Ｍのリン酸を加えて反応を停止させ、４５０ｎｍの波長の吸収値を読み取った。サンプルウェルのＯＤ値が対照ウェル（０．５％のＢＳＡ又はＩｇＧ１－Ｆｃ）よりも２倍以上大きい場合、陽性と判定した。最後に、陽性ファージをＴＧ１に再感染させ、配列決定した。配列アラインメントソフトウェアＢｉｏＥｄｉｔに従って各クローンのアミノ酸配列を分析した。ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３配列が同一のクローンを同一抗体株とみなした。

【０１８１】

結果を図２に示し、全部で１９２個の単一クローンを採取し、ＭＳＬＮ／Ｆｃ＞５のウェルを陽性とみなし、その後全ての１３０個以上の陽性クローンを配列決定した。

【０１８２】

配列決定の結果を図３Ａ～３Ｄに示し、配列決定の結果は、４２本の特異的ナノボディ配列があることを示し、ファージＥＬＩＳＡによる検証の後、２１本の配列を保持し、全てＶＨＨ－Ｆｃ融合タンパク質の形態で発現して精製した後にＥＬＩＳＡを行い、５％のＭｉｌｋを非特異的結合の対照とし、Ｐ４は陽性クローン（Ｐ４のＶＨは配列番号５８に示され、Ｐ４のＶＬは配列番号６２に示される）であり、Ｃａｐｌａｃｉｚｕｍａｂは陰性対照である。結果は、ＭＳＬＮ１、ＭＳＬＮ２、ＭＳＬＮ３、ＭＳＬＮ１０、ＭＳＬＮ１１、ＭＳＬＮ１６、ＭＳＬＮ１８、ＭＳＬＮ２７、ＭＳＬＮ３６、ＭＳＬＮ３９、ＭＳＬＮ４１、ＭＳＬＮ４２の合計１２つの高特異性、高親和性結合ＭＳＬＮは、ＥＣ５０が陽性抗体Ｐ４と類似しており、ＭＳＬＮ５、ＭＳＬＮ６、ＭＳＬＮ７、ＭＳＬＮ１４、ＭＳＬＮ２９、ＭＳＬＮ３５の合計６つの抗体の特異性は比較的悪く、４、１５の特異性は非常に悪いが、３０番は全く結合しないことを示した。

【０１８３】

実施例２　３つのＭＳＬＮドメインを標的とするナノボディの結合活性の同定

２．１　真核細胞におけるＶＨＨ－Ｆｃ融合タンパク質の発現及び精製

配列決定の結果から特異的な抗体配列を選択し、それをベクターｐｃＤＮＡ３．４にクローニングし、組換えプラスミドを大腸菌ＤＨ５α（天根生化科技有限公司、製品番号：ＣＢ１０１－０２）に形質転換し、次に１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを含む２ＹＴ固体培地に菌液を均一に塗布し、３７℃で一晩静置した。１日おきに単一クローンを採取し、３７℃でシェーカーで６時間程度培養し、半分の菌液を取って配列決定し、残りの半分を４℃で保存した。配列決定が正確なクローンを拡大培養し、プラスミドから抽出した。ＰＥＩトランスフェクションの方法を用いて発現プラスミドをＥＸＰＩ２９３にトランスフェクトし、３７℃の細胞インキュベーターで５日間発現させ、その後に細胞上清を収集し、ＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィーカラムにより抗体を精製した。最終的に純度が９０％以上に達する抗体タンパク質を得た。

【０１８４】

２．２　酵素結合免疫吸着アッセイによるヒトＭＳＬＮタンパク質及びその３つのドメインに対するＶＨＨ－Ｆｃの特異的結合の検出

２μｇ／ｍＬのＭＳＬＮ－Ｈｉｓ及び３つのＭＳＬＮ－Ｄｏｍａｉｎタンパク質で高吸着９６ウェルプレートをコーティングし、４℃で一晩静置し、１×ＰＢＳＴで３回洗浄し、０．５％のＢＳＡで室温で２時間ブロッキングし、１×ＰＢＳＴで３回洗浄し、１００ｎＭのＶＨＨ－Ｆｃを加え、室温で１時間振とうしてインキュベートし、１×ＰＢＳＴで３回洗浄した後、二次抗体Ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　Ｆｃ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　ＨＲＰ（ａｂｃａｍ、製品番号：ａｂ９９７５９）を加え、室温で３０～６０分間インキュベートし、１×ＰＢＳＴで７回洗浄した後にＴＭＢ発色液を加え、３～５分後に２Ｍのリン酸を加えて反応を停止させ、４５０ｎｍの波長の吸収値を読み取った。

【０１８５】

２．３　フローサイトメトリーによるヒトＭＳＬＮトランスフェクト２９３Ｔ及びＯＶＣＡＲ３に対する二価ＶＨＨ－Ｆｃの結合活性の同定

ＯＶＣＡＲ３及び２９３Ｔ－ＭＳＬＮ細胞を蘇生して継代し、実験当日に細胞を収穫し

、計数した後に細胞密度を１×１０^{6}／ｍＬに調整し、１ウェル当たり３０μＬ（３×１０^{4}／ｗｅｌｌ）であった。代表的なＭＳＬＮナノボディ及び陽性抗体Ｐ４、陰性抗体Ｃａｐｌａｃｉｚｕｍａｂを、１００ｎＭを最高濃度とし、３倍比、７つの勾配で、ＰＢＳ対照を設置し、１ウェルあたり３０μＬで、均一に混合した後に４℃で１時間インキュベートした。０．１％のＢＳＡを含むＰＢＳで２回洗浄し、５００ｇ、５ｍｉｎ、４℃で脱水した。蛍光二次抗体Ｇｏａｔ　ｐＡｂ　ｔｏ　Ｈｕ　ＩｇＧ［ＤｙＬｉｇｈｔ　６５０］（ａｂｃａｍ、製品番号：ａｂ９８５９３）を１：２００で希釈して、１ウェル当たり３０μＬであり、均一に混合した後に４℃で３０分間インキュベートした；０．１％のＢＳＡを含むＰＢＳで２回洗浄し、５００ｇ、５ｍｉｎ、４℃で脱水し、３０μＬ／ｗｅｌｌで再懸濁し、ハイスループットフローサイトメトリー検出器（ＩＱｕｅ）で値を読み取り、収集したデータをＧｒａｐｈｐａｄを用いて３パラメーターフィッティング曲線を作成した。結果を図４に示し、図中、図示の数字はＭＳＬＮ　ＶＨＨに対応する配列番号を示す。結果は、ＭＳＬＮ１、ＭＳＬＮ２、ＭＳＬＮ３、ＭＳＬＮ４、ＭＳＬＮ５、ＭＳＬＮ６、ＭＳＬＮ１０、ＭＳＬＮ１１、ＭＳＬＮ１６、ＭＳＬＮ１８、ＭＳＬＮ２７、ＭＳＬＮ３６、ＭＳＬＮ３９、ＭＳＬＮ４１、ＭＳＬＮ４２は、ＭＳＬＮを高発現する卵巣癌細胞株ＯＶＣＡＲ３及び過剰発現細胞株２９３－ＭＳＬＮとのフローサイトメトリー結合活性が比較的高いことを示した。

【０１８６】

２．４　フローサイトメトリーによる組織細胞に対する二価ＶＨＨ－Ｆｃの非特異的結合の同定

２９３Ｔ、ＬＯ２、ＫＥＲＡ、Ａ５４９、ＨＡＣＡＴ、及びＫ５６２－ＭＳＬＮ細胞を蘇生して継代し、実験当日に細胞を収穫し、計数した後に細胞密度を１×１０^{6}／ｍＬに調整し、１ウェル当たり３０μＬ（３×１０^{4}／ｗｅｌｌ）であった。代表的なＭＳＬＮナノボディ及び陽性抗体Ｐ４を、２０μｇ／ｍＬの濃度、１ウェル当たり３０μＬで、均一に混合した後に４℃で１時間インキュベートした。０．１％のＢＳＡを含むＰＢＳで２回洗浄し、５００ｇ、５ｍｉｎ、４℃で脱水した。蛍光二次抗体Ｇｏａｔ　ｐＡｂ　ｔｏ　Ｈｕ　ＩｇＧ［ＤｙＬｉｇｈｔ　６５０］（ａｂｃａｍ、製品番号：ａｂ９８５９３）を１：２００で希釈して、１ウェル当たり３０μＬであり、均一に混合した後に４℃で３０分間インキュベートした；０．１％のＢＳＡを含むＰＢＳで２回洗浄し、５００ｇ、５ｍｉｎ、４℃で脱水し、３０μＬ／ｗｅｌｌで再懸濁し、ハイスループットフローサイトメトリー検出器（ＩＱｕｅ）で値を読み取った。結果を図５に示し、結果は、ＭＳＬＮ１、ＭＳＬＮ４、ＭＳＬＮ５、ＭＳＬＮ６、ＭＳＬＮ１１、ＭＳＬＮ３６、ＭＳＬＮ４２番の配列は何れも２９３Ｔ、ＬＯ２、ＫＥＲＡ、Ａ５４９、ＨＡＣＡＴ細胞と非特異的結合活性を有することを示した。

【０１８７】

実施例３　ＣＡＲ－Ｔレンチウイルスのパッケージの検出

３．１　レンチウイルスのパッケージング

本発明のレンチウイルスプラスミドベクターを構築するためのベクターシステムは、第三世代レンチウイルスベクターシステムに属し、当該システムは、Ｇａｇ－Ｐｏｌタンパク質及びＲｅｖタンパク質をコードするパッケージングプラスミドｐｓＰＡＸ２と、エンベロープタンパク質ＶＳＶ－ＧをコードするｐＭＤ２．Ｇプラスミドと、目的遺伝子ＣＡＲをコードするコアプラスミドとの合計３つのプラスミドを含む。ＢＢｚ／Ｌ６プラットフォームコアプラスミド中のＣＡＲをコードする遺伝子に基づいて、伸長因子－１α（ＥＦ－１α）プロモーターによって発現が調節された。ウイルスのパッケージング過程は、以下の通りである：１×１０^{6}の２９３ＦＴ細胞を２ｍＬのＤＭＥＭ（１０％のＦＢＳ）培地に懸濁し、６ウェルプレートにプレーティングし、細胞を十分に均一に分散させ、５％のCO_2、３７℃で約２４ｈ培養した；プラスミド、試薬を室温に平衡した；１００μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地は、４．５μｇ（ｐｓＰＡＸ２：ｐＭＤ２．Ｇ：コアプラスミド＝３：２：４）及び１３．５μＬ（プラスミド：ＦｕＧＥＮＥＨＤ＝１：３）のトランスフェクション試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ、製品番号：Ｅ２３１１）を含み、パッケージング

プラスミドを十分に均一に混合し、その後トランスフェクション試薬をゆっくりと１滴ずつ加え、全てを加えた後、１つずつ軽く十分に均一に混合し、室温で１５ｍｉｎ静置した；元の４００μＬの培地ＤＭＥＭ（１０％のＦＢＳ）を吸い取り、分割してリポソームカチオン複合体（１００μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ＋ＰＳＨ１＋ＰＭＨ２＋コアプラスミド＋ＦｕＧＥＮＥＨＤ）を１滴ずつ加え、５％のCO_2、３７℃で約１７時間培養した；プラスミド含有培地（約２００μＬ、Ｏｎｅ　ｂｙ　ｏｎｅ）を除去し、５％のＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地２．５ｍＬ（３７℃で３０ｍｉｎ予熱する）に交換し、５％のCO_2、３７℃で約２４～２６時間培養した；ウイルス上清を収集し、３０００ｒｐｍ、１０ｍｉｎで、約７２０μＬを凍結保存管に分注して－８０℃で凍結保存し、更に適量を取ってレンチウイルス力価測定に用いた。

【０１８８】

３．２　レンチウイルス力価滴定

状態が良好な２９３Ｔ細胞を取り、１×ＰＢＳで洗浄し、１．５ｍＬの０．２５％のパンクレアチンで３７℃で消化し、１１ｍＬの培地で停止させた。細胞系を2×10^5ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ／２．５ｍＬに調整した；細胞系培地に１：１０００で１０μｇ／ｍＬのｐｏｌｙｂｒｅｎｅを加え、十分に均一に混合した；１２ウェルプレートの各ウェルに１ｍＬの細胞懸濁液を加えた；分割して５μＬの得られたウイルス原液を１滴ずつ加え、各ウェルに２．５ｍＬを補足し、十分に均一に混合した；ウイルス細胞を含まない懸濁液をフローサイトメトリー検出のブランク対照と設置した；５％のCO_2、３７℃で約４２～４８ｈ培養した；上清を除去し、ＰＢＳで洗浄し、４００μＬの０．２５％のパンクレアチン（ｇｉｂｃｏ、製品番号：２５２０００７２）で、３７℃で約１ｍｉｎ消化し、２．５ｍＬの完全培地で消化を停止させた；１ｍＬのピペットで細胞が完全に分散するまで軽く吹き、１．５ｍＬのＥＰチューブに移し、細胞を計数した；5×10^5の細胞量を取って、フローサイトメトリー検出に用いた。

【０１８９】

実施例４　Ｔ細胞の感染及び増幅

ＰＢＭＣ細胞を蘇生し、１１ｍＬのＸ－ＶＩＶＯを加え、５００ｇで５ｍｉｎ遠心分離した；１２ｍＬのＸ－ＶＩＶＯを加え、４００ｇで５ｍｉｎ遠心分離した；１２ｍＬのＸ－ＶＩＶＯを加え、３００ｇで５ｍｉｎ遠心分離した；１ｍＬのＸ－ＶＩＶＯ懸濁液を計数した；細胞密度を1×10^6ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、１：３の比率（細胞：磁気ビーズ）でＣＤ３／ＣＤ２８（4×10^8／ｍＬ）磁気ビーズ（サーモフィッシャーサイエンティフィック、製品番号：１１１３１Ｄ）を加えてＴ細胞を活性化し、十分に均一に混合し、１２ウェルプレートで、１ウェルあたり７００μＬの細胞懸濁液（7×10^5ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ／７００μＬ）であった；活性化されたＰＢＭＣ、３７℃、CO_2インキュベーター、１８ｈであった；ＭＯＩが４～５の比率でウイルス上清を加え、ｐｏｌｙｂｒｅｎｅを最終濃度５μｇ／ｍＬ（１：２０００、最終体積に基づく）にし、対応する培地を添加して補足し、細胞を均一に混合し、ブランク対照を設置し、水平遠心分離機、１２００ｒｐｍ、１ｈであった；３７℃、５％のCO_2インキュベーター、２４ｈであった；軽く均一に混合し、１．５ｍＬのＥＰチューブに細胞を収集し、３００ｇ、５ｍｉｎであり、上清を除去し（約５０～１００μＬの培地が残る）、１ｍＬのＸ－ＶＩＶＯ培地を１２－ｗｅｌｌ－ｐｌａｔｅに再懸濁し、５００μＬの培地を追加し、３７℃、５％のCO_2インキュベーターで４８ｈ培養した；培地の色を観察し、適量のＸ－ＶＩＶＯ培地（８００μＬ－１ｍＬ）を加え、３７℃、５％のCO_2であった；２日ごとに細胞を計数し、細胞密度を7×10^5／ｍＬ、６－Ｗｅｌｌ－ｐｌａｔｅ／３ｍＬに調整した；総細胞数が2.1×10^6であり、３７℃、５％のCO_2インキュベーターで２４ｈ培養した；適量の培地（１ｍＬ）を２４ｈ観察して加えた；軽く均一に混合し、計数した；計数に基づいて細胞総数を前の総細胞数２．１Ｅ＋６で割ると増幅倍数Ｔ２であることを得た；細胞密度を7×10^5／ｍＬ、６－Ｗｅｌｌ－ｐｌａｔｅ／３ｍＬに調整し、総細胞数が2.1×10^6であり、継代した；全細胞数２．１ｍＬの調整し；6×10^5の細胞数を取ってＣＡＲ－Ｔ陽性率、ＣＤ２５／ＣＤ６９　ＣＡＲ検出（磁気ビーズを１ｍｉｎ除去

する）に用いた；３７℃、５％のCO_2インキュベーターで２４ｈ培養した；適量の培地（１ｍＬ）を２４ｈ観察して加えた；軽く均一に混合し、計数した；計数に基づいて細胞総数を前の総細胞数２．１×10^6で割ると増幅倍数Ｔ３であることを得た；細胞密度を７×10^5／ｍＬ、６－Ｗｅｌｌ－ｐｌａｔｅ／３ｍＬに調整し、総細胞数が２．１×10^6であり、継代した；９Ｅ５の細胞数を取ってＣＡＲ－Ｔ陽性率、ＰＤ－Ｌ１／ＴＩＭ３／ＬＡＧ３　ＣＡＲ検出（磁気ビーズを１ｍｉｎ除去する）に用いた；適量の細胞数を取ってインビトロ腫瘍殺傷活性実験に用いた；３７℃、５％のCO_2インキュベーターで２４ｈ培養した；適量の培地（１ｍＬ～２．５ｍＬ）を４８ｈ観察して加えた；軽く均一に混合し、計数した；計数に基づいて細胞総数を前の総細胞数２．１×10^6で割ると増幅倍数Ｔ４であることを得た；対応する細胞を取ってＣＡＲ－Ｔ反復刺激実験に用いた；適量の細胞数を取ってＣＡＲ－Ｔ陽性率、ＣＤ２５／ＣＤ６９、ＰＤ－１／ＴＩＭ３／ＬＡＧ３　ＣＡＲ検出（磁気ビーズを１ｍｉｎ除去する）に用いた；増幅倍数：Ｔ１＊Ｔ２＊Ｔ３＊Ｔ４であった。

【０１９０】

結果を図６に示し、図中、図示の数字はＭＳＬＮ　ＶＨＨに対応する配列番号を示し、ＭＳＬＮ３（ＶＨＨ配列は配列番号１３に示される）、ＭＳＬＮ１０（ＶＨＨ配列は配列番号１８に示される）、ＭＳＬＮ１６（ＶＨＨ配列は配列番号８に示される）、ＭＳＬＮ２７（ＶＨＨ配列は配列番号２３に示される）、ＭＳＬＮ３６（ＶＨＨ配列は配列番号２８に示される）、ＭＳＬＮ４１（ＶＨＨ配列は配列番号３３に示される）、ＭＳＬＮ４２（ＶＨＨ配列は配列番号３８に示される）を選択し、そのうち、ＭＳＬＮ０は陰性対照Ｃａｐｌａｃｉｚｕｍａｂであり、Ｐ４は陽性対照（ＶＨ配列は配列番号５８に示され、ＶＬ配列は配列番号６２に示される）であり、Ｔは標的細胞を加えないブランク対照である。結果は、全ての抗体が陽性抗体と類似の増殖速度を有することを示した。

【０１９１】

実施例５　ＣＡＲ－Ｔ細胞のインビトロ腫瘍殺傷活性の検出

ＣｙｔｏＴｏｘ９６(登録商標)非放射性細胞毒性の検出

ＬＤＨは安定な細胞質酵素であり、細胞が溶解する時に放出され、放出方式は５１Ｃｒの放射性分析における放出方式と基本的に同じであり、放出されたＬＤＨは培地上清において、カップリング酵素反応によって検出され、酵素反応においてＬＤＨはテトラゾリウム塩（ＩＮＴ）を赤色のホルマザンに変換することができ、生成された赤色生成物の量は溶解した細胞の数に正比例した（Ｐｒｏｍｅｇａ、製品番号：Ｇ１７８０）。ＣＡＲ－Ｔ陽性率を検出し、未感染ブランクＴ細胞で感染ＣＡＲ群間の比率が一致し、各群の総細胞数が一致するように調整した；標的細胞の数は、２×10^4／９６－ｗｅｌｌ－ｐｌａｔｅ／ｗｅｌｌであり、エフェクター細胞：標的細胞（Ｅ：Ｔ）＝３：１、１：１、１：３、１：９であった；実験群と等量のエフェクター細胞のみを含むウェルをエフェクター細胞自己放出ＬＤＨバックグラウンド群として設置した；実験群と等量のブランクＴ細胞のみを含むウェルをＴ細胞自己放出ＬＤＨブランク対照群として設置した；実験群と同じエフェクター細胞と標的細胞との比のブランクＴ細胞のみを含むウェルをＴ＋標的細胞陰性対照群として設置した；実験群と等量の標的細胞のみを含むウェルを標的細胞自己放出ＬＤＨバックグラウンド群として設置した；実験群と等量の標的細胞のみを含むウェルを標的細胞最大放出ＬＤＨバックグラウンド群として設置した；２００μＬの細胞培地のみを含む単独ウェルを培地バックグラウンドＬＤＨ対照ウェルとして設置した；２００μＬの細胞培地のみを含む単独ウェルを体積補正対照ウェルとして設置した；対応するエフェクター細胞と標的細胞を２００μＬのＸ－ＶＩＶＯ（ＦＢＳなし）培地に共インキュベートし、３７℃、５％のCO_2インキュベーターで２０～２４ｈ培養した；消化し、計数して対応する量の標的細胞を取って、１００μＬのＸ－ＶＩＶＯを再懸濁して９６ウェルプレートにプレーティングした；エフェクター細胞と標的細胞との比に応じて対応する量のエフェクター細胞を取って、対応するブランクＴ細胞を補足し、５００ｇ、５ｍｉｎであった；１００μＬのＸ－ＶＩＶＯを再懸濁して標的細胞と９６ウェルプレートに均一に混合した；３７℃、５％のCO_2、２０～２４ｈであった；約４５ｍｉｎ早めに、体積補正対

照ウェル及び標的細胞最大放出ＬＤＨバックグラウンドウェルに２０μＬの溶解液（１０Ｘ）を加え、３７℃、５％のCO_2インキュベーター、４５ｍｉｎであった；２５０ｘｇ，４ｍｉｎであった；５０μＬの上清液を酵素分析プレートに取り、５０μＬ／ウェルで調製された基質（検出緩衝液で調製する）を加え、遮光で、室温で２０～３０ｍｉｎインキュベートした；５０μＬ／ウェルで停止液を加えた；色を観察した（気泡を回避する）；ＯＤ４９０測定値であった。

【０１９２】

１ｘ１０^{4}の腫瘍細胞ＳＫ－ＯＶ３－Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ－ＧＦＰ及び例示的なＭＳＬＮ－ＣＡＲ－Ｔ細胞を、異なるエフェクター細胞と標的細胞との比に応じて１８ｈと７２ｈ共培養した後、ＣＡＲ－Ｔ細胞の腫瘍細胞に対する殺傷作用を検出し、結果を図７に示し、結果は、ＭＳＬＮ－ＣＡＲ－１０１（そのうち、キメラ抗原受容体の標的部分のアミノ酸配列は配列番号１３に示され、膜貫通領域のアミノ酸配列は配列番号４０に示され、共刺激ドメインのアミノ酸配列は配列番号３９に示され、細胞内シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列は配列番号４１に示され、ヒンジ領域のアミノ酸配列は配列番号４２に示され、上記ＭＳＬＮ－ＣＡＲ－１０１細胞は更に配列番号４４に示される外来タンパク質断片を発現する）の殺傷作用は陽性配列Ｐ４と類似の殺傷作用を有することを示した。

【０１９３】

実施例６　サイトカインの検出

実施例４におけるＴ細胞の感染及び増幅方法に従ってＣＡＲ－Ｔを製造し、上清を適量のＥ：Ｔ＝１：１とともにインキュベートし、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γなどのサイトカイン検出に用いられた。ＣＡＲ－Ｔ陽性率を検出し、未感染ブランクＴ細胞で感染ＣＡＲ群間の比率が一致し、各群の総細胞数が一致するように調整した（必要なＣＡＲ－Ｔ細胞数、最低ＣＡＲ陽性比率は基数である）；Ｔ細胞の総数が一致した；ＶＴ（Ｔ＋ＣＥＬＬ群）＝ＣＡＲＴ＋Ｔであった；ブランクＴ細胞が実験群と等量のウェルをＴ細胞単独群として設置した；エフェクター細胞が実験群と等量のウェルをエフェクター細胞単独群として設置した；標的細胞の数は１×１０^4／９６－ｗｅｌｌ／ｗｅｌｌであり、エフェクター細胞：標的細胞（Ｅ：Ｔ）＝１：１であり、対応するエフェクター細胞と標的細胞との比が１：１に従って共インキュベートし、エフェクター細胞（ＣＡＲ－Ｔ陽性細胞１Ｅ４を含む）と標的細胞（１Ｅ４）とを混合し、最終体積が２００μＬになるまで血清なしｌ　Ｘ－ＶＩＶＯ培地を補足した；軽く均一に混合し、３７℃、５％のCO_2インキュベーター、２４ｈであった；４００ｘｇ、５ｍｉｎであり、５０μＬの細胞上清を取ってサイトカイン検出に用いた。

【０１９４】

結果を図８～１０に示し、そのうち、ＫＥＲＡはＭＳＬＮ陰性細胞であり、ＳＫ－ＯＶ３はＭＳＬＮ陽性細胞である。ＣＡＲ－Ｔ細胞をＳＫ－ＯＶ３と共培養する場合、ＣＡＲ－Ｔ細胞は活性化され、大量のサイトカインＩＬ－２、ＴＮＦ－α、及びＩＦＮ－γを産生した。そのうち、ＭＳＬＮ－ＣＡＲ－１０１は、陽性配列Ｐ４と同量のサイトカイン放出を有する。更に、ＣＡＲ－Ｔ細胞をＫＥＲＡと共培養する場合、ＣＡＲ－Ｔ細胞は何れも活性化されず、サイトカインの放出はなかった。

【０１９５】

実施例７　ＮＳＧマウス動物の薬効試験

マウスに３×１０^{6}のＳＫＯＶ３腫瘍細胞系を皮下注射し、２週間後に腫瘍体積の大きさが１００～２００ｍｍ^{3}である時にランダムに群分けし、１日おきにＣＡＲ－Ｔ静脈再注入を行い、細胞量は５×１０^{6}であり、腫瘍を週に３回測定し、試験で４７日を観察した。最後に、Ｇｒａｐｈｐａｄを用いて腫瘍増殖曲線をプロットした。そのうち、５Ｅ６は、５＊１０＾６のＳＫ－ＯＶ３を接種した卵巣癌細胞を表す。

【０１９６】

結果を図１１に示し、それによりＭＳＬＮ－ＣＡＲ－１０１は腫瘍の増殖を顕著に阻害したことが示された。

【０１９７】

上記詳細な説明は、説明及び例示のために提供され、添付される特許請求の範囲を限定するものではない。現在、本願の例示的な実施形態に対する様々な変更は、当業者にとって明らかであり、添付される特許請求の範囲及びその均等物の範囲内に保持される。

【図面】

【図１】

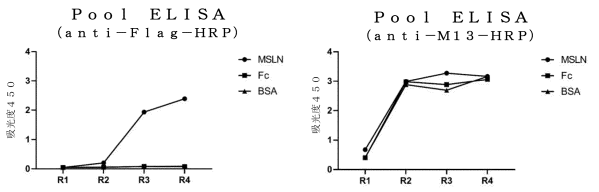


図１

【図２】

MSLN/FC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	37.9375	34.65306	27.27083	23.28302	1	36.5	1.390476	1.898058	9.125	5.877551	1.897959	2.491071
B	31.75	25.10204	4.18	35.05882	0.886792	32.78431	27.8	2.311688	1.584906	25.42857	42.16981	7.54
C	18.125	1.39726	23.77358	1.208333	1.028986	39.71154	0.980769	1	1	1.620968	2.387755	20.6087
D	2.346939	9.639706	1.196078	26.13725	42.44	8.587302	37.88	1.322034	25.79592	2.303738	1.16	1.295082
E	2.363636	35.5625	1.02	2.169811	35.34615	37.31373	40.34694	22.66667	1.573034	30.02	7.259259	23.5
F	2.632653	1.602837	2.113636	9.072464	1.305085	1.991379	23.08	2.037383	4.546584	12.73077	1.414286	28.1
G	11.34694	1.984375	11.63158	29.18	50.33333	21.22353	41.22222	9.192308	24.04	1.777778	1.134615	20.27451
H	28.36735	30.78	33.3125	41.17308	1.375	1.339623	1.3	1.074074	9.555556	31.92157	32.08772	31.34615

MSLN-FC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	27.77193	14.82243	25.71154	12.04673	28	27.73333	1.516129	2.356383	35.35185	3.875	2.641509	28.63768
B	38.09615	25.28302	21.92857	31.32692	9.24	29.17647	34.72727	34.41818	8.435185	18.55769	1.417391	5.230769
C	28.88462	1.275862	24.92857	12.55128	21.02247	27.29825	6.32	30.2963	14.82759	16.5625	12.04902	23.01667
D	19.57692	6.75	27.33962	13.82143	22.81818	6.763636	32.48333	38.69811	33.66071	23.28302	10.24074	8.753425
E	29.33333	26.5098	21.22368	33.34615	25.03704	31.05769	20.09375	21.7377	1.735294	9.142857	16.67797	7.415094
F	33.50943	2.59799	13.48193	30.83929	6.818182	37	28.9	36.92857	8.007353	16.03774	30.94444	26.38596
G	14.05455	30.12281	19.81818	27.31818	26.49057	28.0303	2.285714	27.11111	34.48214	12.53211	28.26786	1.5
H	25.40385	34.90385	32.53571	1.375	37.56364	8.053571	32.31481	18.4375	29.65574	22.59259	1.176923	30.60714

図２

【図３Ａ】

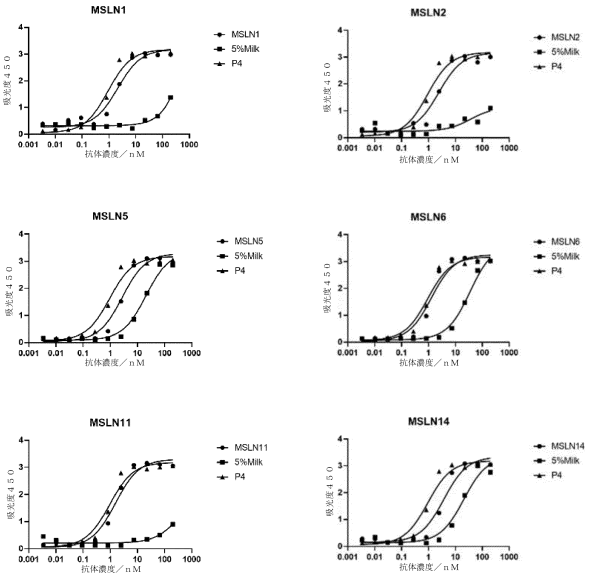


図３Ａ

【図３Ｂ】

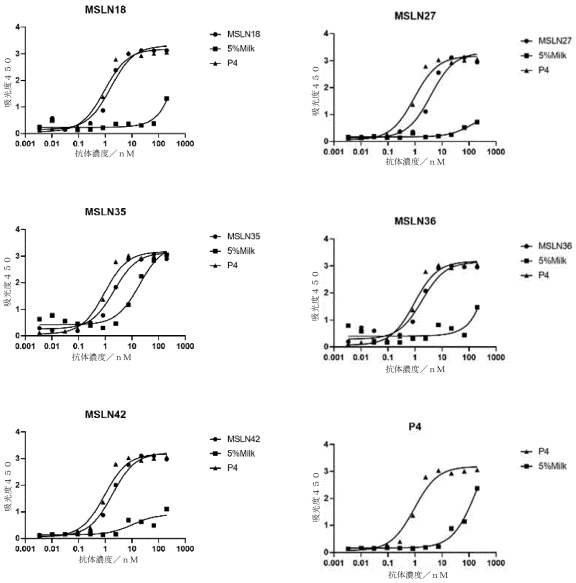


図３Ｂ

【図３Ｃ】

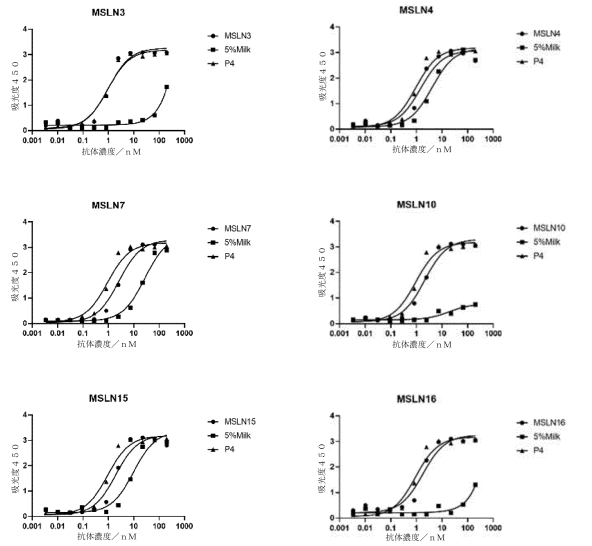


図３Ｃ

【図３Ｄ】

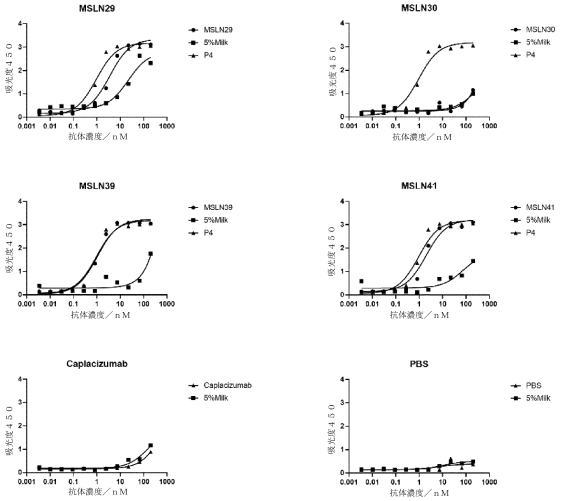


図３Ｄ

【図４】

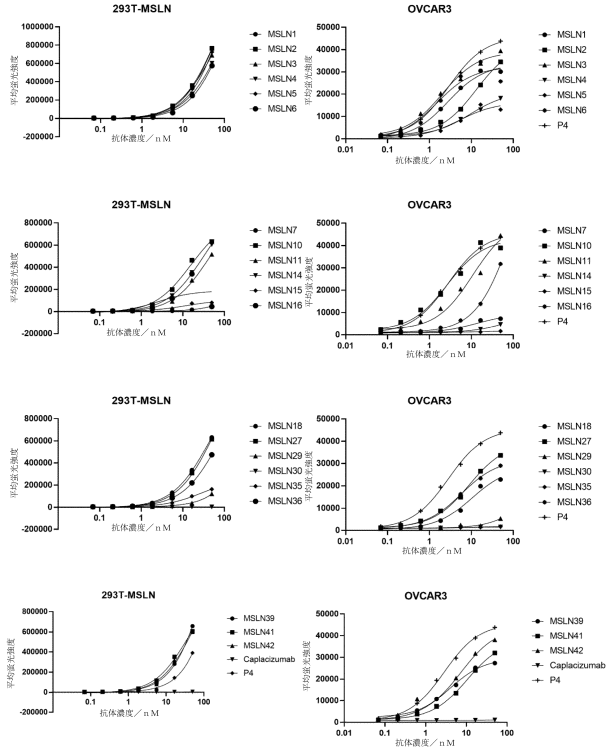


図４

【図５】

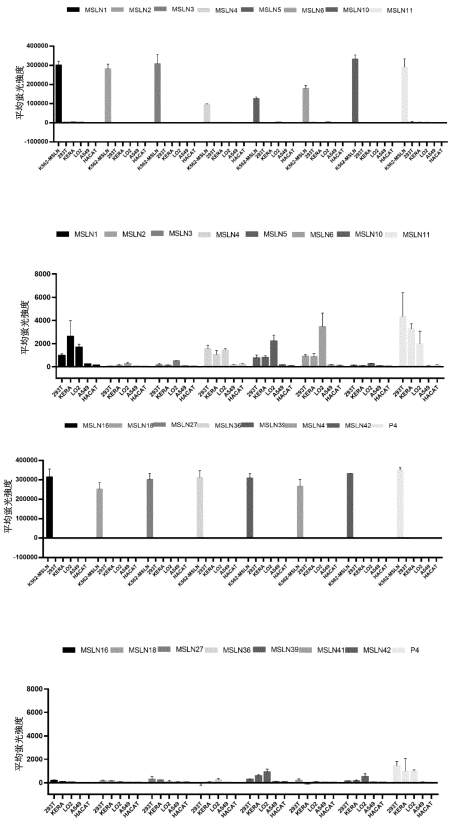


図５

【図６】

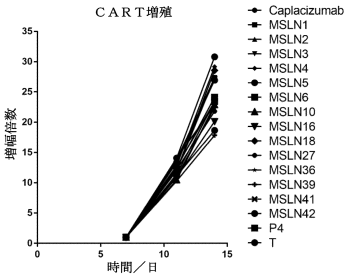


図６

【図７】

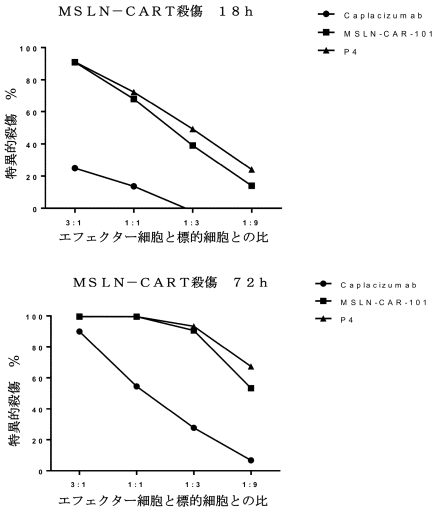


図７

【図８】

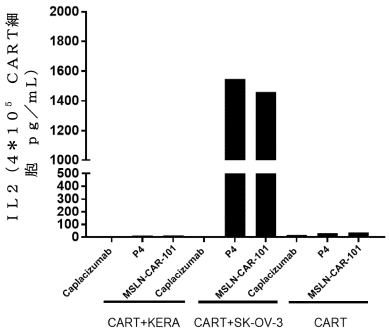


図８

【図９】

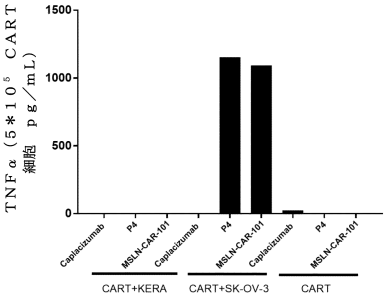


図９

【図１０】

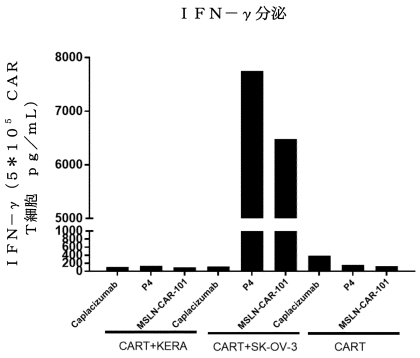


図１０

【図１１】

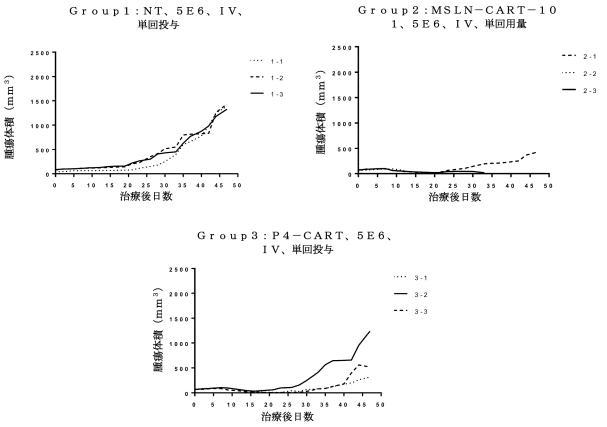


図１１

【配列表】

<u>２０２５０５９３３０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/070928

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i;C07K16/30(2006.01)i;C07K19/00(2006.01)i;C12N15/85(2006.01)i

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)

IPC:C07K; C12N

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

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

CNKI, CNTXT, DWPI, ENTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System, Genbank, EMBL, STN, 抗体, 抗原, 抗原结合蛋白, 单克隆抗体, 单抗, 纳米抗体, 单域抗体, 间皮素, 嵌合抗原受体, CAR, antibody, McAb, monoclonal antibody, humanized antibody, nanobody, VHH, CDR, MSLN, mesothelin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2017267755 A1 (SRI INTERNATIONAL) 21 September 2017 (2017-09-21) claims 1-2, specific embodiments, sequence listing	1-77
A	CN 109111528 A (HANGZHOU POOLINGMED BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 01 January 2019 (2019-01-01) specific embodiments, sequence table	1-77
A	CN 103819559 A (WUHAN INSTITUTE OF VIROLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 28 May 2014 (2014-05-28) entire document	1-77
A	CN 111560072 A (SHANGHAI HRAIN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 21 August 2020 (2020-08-21) entire document	1-77
A	CN 111349165 A (NANJING LANDUN BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 30 June 2020 (2020-06-30) entire document	1-77

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 March 2023	**17 March 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/070928

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110698562 A (ZHEJIANG BLUE SHIELD PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 17 January 2020 (2020-01-17) entire document	1-77
A	CN 112225811 A (SHANGHAI HRAIN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 15 January 2021 (2021-01-15) entire document	1-77
A	CN 107840891 A (SHANGHAI GENBASE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 27 March 2018 (2018-03-27) entire document	1-77
A	US 2018002439 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECH MEDICALE (INSERM) et al.) 04 January 2018 (2018-01-04) entire document	1-77
A	CN 111848819 A (GUANGDONG ZHAOTAI TINEI BIOMEDICAL TECH CO., LTD.) 30 October 2020 (2020-10-30) entire document	1-77
A	CN 112210008 A (SHANGHAI HENGRUN DASHENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 12 January 2021 (2021-01-12) entire document	1-77
A	CN 108129566 A (WUHAN INSTITUTE OF VIROLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 08 June 2018 (2018-06-08) entire document	1-77
A	US 2020262928 A1 (GREEN CROSS CO. et al.) 20 August 2020 (2020-08-20) entire document	1-77

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/070928

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/070928

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.: **72-77**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 72-77 relate to a method for treating diseases, which falls within the subject matter for which no search is required as defined in PCT Rule 39.1(iv). In the present report, a search is carried out on the basis of "the use of the antigen-binding protein of any one of claims 1-25, the chimeric antigen receptor of any one of claims 26-46, the polypeptide of claim 47, the nucleic acid molecule of any one of claims 48-51. the vector of any one of claims 52-54, the cell of any one of claims 55-62, and/or the pharmaceutical composition of claim 65 in the preparation of a drug for preventing, treating and/or alleviating diseases or conditions related to abnormal expression of MSLN".

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/070928

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2017267755	A1	21 September 2017	None			
CN	109111528	A	01 January 2019	None			
CN	103819559	A	28 May 2014	None			
CN	111560072	A	21 August 2020	None			
CN	111349165	A	30 June 2020	None			
CN	110698562	A	17 January 2020	None			
CN	112225811	A	15 January 2021	None			
CN	107840891	A	27 March 2018	None			
US	2018002439	A1	04 January 2018	None			
CN	111848819	A	30 October 2020	None			
CN	112210008	A	12 January 2021	None			
CN	108129566	A	08 June 2018	None			
US	2020262928	A1	20 August 2020	EP	3699199	A2	26 August 2020
				EP	3699199	A4	30 June 2021
				EA	202090945	A1	14 July 2020
				CA	3077009	A1	25 April 2019
				WO	2019078698	A2	25 April 2019
				WO	2019078698	A3	04 July 2019
				KR	101966362	B1	05 April 2019
				US	11401343	B2	02 August 2022
				IL	274008	A	31 May 2020
				BR	112020007739	A2	20 October 2020
				MX	2020003943	A	13 August 2020
				AU	2018351417	A1	28 May 2020
				AU	2018351417	B2	23 December 2021
				JP	2021507678	A	25 February 2021
				JP	6978598	B2	08 December 2021
				SG	11202003278	RA	28 May 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/070928

A. 主题的分类

C07K16/28(2006.01)i;C07K16/30(2006.01)i;C07K19/00(2006.01)i;C12N15/85(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C07K; C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNKI, CNTXT, DWPI, ENTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN,抗体，抗原，抗原结合蛋白，单克隆抗体，单抗，纳米抗体，单域抗体，间皮素，嵌合抗原受体，CAR, antibody, McAb, monoclonal antibody, humanized antibody, nanobody, VHH,CDR, MSLN,mesothelin

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2017267755 A1 (SRI INTERNATIONAL) 2017年9月21日 (2017-09-21) 权利要求1-2，具体实施方式，序列表	1-77
A	CN 109111528 A (杭州普略生物科技有限公司) 2019年1月1日 (2019-01-01) 具体实施方式，序列表	1-77
A	CN 103819559 A (中国科学院武汉病毒研究所) 2014年5月28日 (2014-05-28) 全文	1-77
A	CN 111560072 A (上海恒润达生生物科技有限公司) 2020年8月21日 (2020-08-21) 全文	1-77
A	CN 111349165 A (南京蓝盾生物科技有限公司) 2020年6月30日 (2020-06-30) 全文	1-77
A	CN 110698562 A (浙江蓝盾药业有限公司) 2020年1月17日 (2020-01-17) 全文	1-77
A	CN 112225811 A (上海恒润达生生物科技有限公司) 2021年1月15日 (2021-01-15) 全文	1-77

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。　☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
"D" 申请人在国际申请中引证的文件
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年3月13日	2023年3月17日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 刘宝 电话号码 (+86) 010-53962038

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/070928

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107840891 A（上海吉倍生物技术有限公司）2018年3月27日（2018-03-27） 全文	1-77
A	US 2018002439 A1（INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECH MEDICALE (INSERM) 等）2018年1月4日（2018-01-04） 全文	1-77
A	CN 111848819 A（广东昭泰体内生物医药科技有限公司）2020年10月30日（2020-10-30） 全文	1-77
A	CN 112210008 A（上海恒润达生生物科技有限公司）2021年1月12日（2021-01-12） 全文	1-77
A	CN 108129566 A（中国科学院武汉病毒研究所）2018年6月8日（2018-06-08） 全文	1-77
A	US 2020262928 A1（GREEN CROSS CO.等）2020年8月20日（2020-08-20） 全文	1-77

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/070928

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的;
b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/070928

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 72-77
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求72-77涉及疾病的治疗方法，属于细则第39.1（iv）规定的不进行检索主题。本报告基于“权利要求1-25 中任一项所述的抗原结合蛋白，权利要求26-46中任一项所述的嵌合抗原受体，权利要求47所述的多肽，权利要求48-51中任一项所述的核酸分子，权利要求52-54 中任一项所述的载体，权利要求55-62 中任一项所述的细胞，和/或权利要求65所述的药物组合物在制备预防、治疗和/或缓解与MSLN异常表达相关的疾病或病症的药物中的用途”进行了检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/070928

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
US	2017267755	A1	2017年9月21日	无			
CN	109111528	A	2019年1月1日	无			
CN	103819559	A	2014年5月28日	无			
CN	111560072	A	2020年8月21日	无			
CN	111349165	A	2020年6月30日	无			
CN	110698562	A	2020年1月17日	无			
CN	112225811	A	2021年1月15日	无			
CN	107840891	A	2018年3月27日	无			
US	2018002439	A1	2018年1月4日	无			
CN	111848819	A	2020年10月30日	无			
CN	112210008	A	2021年1月12日	无			
CN	108129566	A	2018年6月8日	无			
US	2020262928	A1	2020年8月20日	EP	3699199	A2	2020年8月26日
				EP	3699199	A4	2021年6月30日
				EA	202090945	A1	2020年7月14日
				CA	3077009	A1	2019年4月25日
				WO	2019078698	A2	2019年4月25日
				WO	2019078698	A3	2019年7月4日
				KR	101966362	B1	2019年4月5日
				US	11401343	B2	2022年8月2日
				IL	274008	A	2020年5月31日
				BR	112020007739	A2	2020年10月20日
				MX	2020003943	A	2020年8月13日
				AU	2018351417	A1	2020年5月28日
				AU	2018351417	B2	2021年12月23日
				JP	2021507678	A	2021年2月25日
				JP	6978598	B2	2021年12月8日
				SG	11202003278	RA	2020年5月28日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00	
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2025.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｅ
		Ｃ１２Ｎ	5/0783	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

中華人民共和国 ２０１２０３ シャンハイ、プードン、チャンヘン ロード ナンバー １２２７、ビルディング １、ルーム ３０３

(72)発明者 チョン チャオ
中華人民共和国 ２０１２０３ シャンハイ、プードン、チャンヘン ロード ナンバー １２２７、ビルディング １、ルーム ３０３

(72)発明者 シエ アルミン
中華人民共和国 ２０１２０３ シャンハイ、プードン、チャンヘン ロード ナンバー １２２７、ビルディング １、ルーム ３０３

(72)発明者 チェン シャオルイ
中華人民共和国 ２０１２０３ シャンハイ、プードン、チャンヘン ロード ナンバー １２２７、ビルディング １、ルーム ３０３

(72)発明者 フー シャオウェン
中華人民共和国 ２０１２０３ シャンハイ、プードン、チャンヘン ロード ナンバー １２２７、ビルディング １、ルーム ３０３

Ｆターム（参考） 4B065 AA94X AB01 AC14 AC20 BA02 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA16 BB01 BB11 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA04 CA12 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74 GA26