

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-539126

(P2024-539126A)

(43)公表日 令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A 4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全64頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-523582(P2024-523582)	(71)出願人	500039463 ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州, オースティン, ウェスト 7 番 ストリート 2 1 0 2 1 0 West 7 th Street Austin, Texas 7 8 7 0 1 U . S . A .
(86)(22)出願日	令和4年10月19日(2022.10.19)	(74)代理人	110000729 弁理士法人ユニアス国際特許事務所
(85)翻訳文提出日	令和6年5月24日(2024.5.24)	(72)発明者	レズヴァニ、ケイティ
(86)国際出願番号	PCT/US2022/078331		
(87)国際公開番号	WO2023/069969		
(87)国際公開日	令和5年4月27日(2023.4.27)		
(31)優先権主張番号	63/257,608		
(32)優先日	令和3年10月20日(2021.10.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 最適なシグナル伝達を有する C A R 構築物による N K 細胞の操作

(57)【要約】

本開示の実施形態は、任意選択でヒンジ、C D 2 8 膜貫通ドメインまたはD A P 1 0 膜貫通ドメインのうちの一つ、D A P 1 0 共刺激ドメイン、およびC D 3 ゼータを含む特定のキメラ抗原受容体構築物を包含する。特定の実施形態では、キメラ抗原受容体は、ナチュラルキラー(N K)細胞によって発現され、一部の 경우에는、N K 細胞は、例えば1 つまたは複数のサイトカインおよび任意選択で自殺遺伝子を発現するようにさらに改変される。

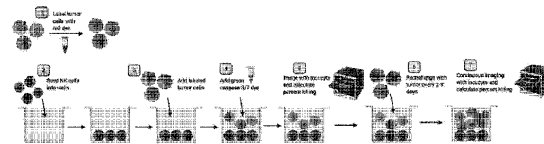


FIG. 3A

【選択図】 図 3 A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、該融合タンパク質が、

- (a) 任意選択でヒンジ、および
- (b 1) C D 2 8 膜貫通ドメインまたは
- (b 2) D A P 1 0 の膜貫通ドメイン、
- (c) D A P 1 0 共刺激ドメイン；および
- (d) C D 3 ゼータ

を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

10

前記融合タンパク質が、キメラ抗原受容体 (C A R) としてさらに定義される、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記 C A R の細胞外ドメインが、 s c F v を含み、前記 C A R がヒンジを含む、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記 C A R の細胞外ドメインが、受容体の細胞外ドメインの一部またはすべてを含み、前記 C A R がヒンジを欠く、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記 C A R の細胞外ドメインが、受容体の細胞外ドメインの一部またはすべてを含み、前記 C A R がヒンジを含む、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 6】

前記 C A R が、1 つまたは複数の抗原結合ドメインをさらに含む、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

抗原結合ドメインが、腫瘍抗原または感染因子を標的とする、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記 C D 3 ゼータが、配列番号 3 を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 9】

前記 C D 2 8 膜貫通ドメインが、配列番号 1 を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記 C A R が、1 つまたは複数の追加の共刺激ドメインをさらに含む、請求項 2 から 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記 1 つまたは複数の追加の共刺激ドメインが、C D 2 8、D A P 1 2、4 - 1 B B、N K G 2 D、2 B 4、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 10 に記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 12】

前記 C A R が、シグナルペプチドをさらに含む、請求項 2 から 11 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記シグナルペプチドが、C D 8、C D 2 7、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体 (G M S C F - R)、I g 重鎖 (I g H)、C D 3、または C D 4 由来のシグナルペプチドである、請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

目的の追加のポリペプチドをさらにコードする、請求項 2 から 13 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

50

【請求項 15】

目的の前記追加のポリペプチドをコードする配列と前記CARをコードする配列が、2Aエレメントによって前記ポリヌクレオチド上で分離されている、請求項14に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

目的の前記追加のポリペプチドが、治療用タンパク質または細胞の活性、拡大、および/もしくは持続性を増強するタンパク質である、請求項14または15に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 17】

目的の前記追加のポリペプチドが、自殺遺伝子産物、1つもしくは複数のサイトカイン、または増殖、発現および/もしくは代謝適性を増強する1つもしくは複数のヒトもしくはウイルスのタンパク質である、請求項14から16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項 18】

前記サイトカインが、IL-15、IL-2、IL-12、IL-18、IL-21、IL-23、またはIL-7である、請求項17に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

前記サイトカインがIL-15である、請求項17または18に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

IL-15の配列が、配列番号8を含む、請求項18または19に記載のポリヌクレオチド。 20

【請求項 21】

請求項1から20のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 22】

ウイルスベクターである、請求項21に記載のベクター。

【請求項 23】

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターである、請求項22に記載のベクター。 30

【請求項 24】

非ウイルスベクターである、請求項21に記載のベクター。

【請求項 25】

前記非ウイルスベクターがプラスミドである、請求項24に記載のベクター。

【請求項 26】

請求項1から20のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、または請求項21から25のいずれか一項に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 27】

免疫細胞である、請求項26に記載の細胞。

【請求項 28】

ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、ガンマデルタT細胞、アルファベータT細胞、不変NKT(iNKT)細胞、B細胞、マクロファージ、間葉系間質細胞、または樹状細胞である、請求項27に記載の免疫細胞。 40

【請求項 29】

NK細胞である、請求項27に記載の免疫細胞。

【請求項 30】

前記NK細胞が、臍帯血、末梢血、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、骨髄由来、細胞株由来である、請求項29に記載の免疫細胞。

【請求項 31】

前記NK細胞が細胞株に由来し、NK細胞株がNK-92である、請求項30に記載の 50

免疫細胞。

【請求項 3 2】

前記 N K 細胞が、臍帯血単核球に由来する、請求項 3 0 に記載の免疫細胞。

【請求項 3 3】

前記 N K 細胞が C D 5 6 + N K 細胞である、請求項 2 8 から 3 2 のいずれか一項に記載の免疫細胞。

【請求項 3 4】

前記 N K 細胞が、組換えサイトカインを発現する、請求項 2 8 から 3 3 のいずれか一項に記載の免疫細胞。

【請求項 3 5】

前記サイトカインが、I L - 1 5、I L - 2、I L - 1 2、I L - 1 8、I L - 2 1、I L - 7、または I L - 2 3 である、請求項 3 4 に記載の免疫細胞。

【請求項 3 6】

請求項 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載の免疫細胞を含む免疫細胞の集団。

【請求項 3 7】

個体におけるがん細胞を死滅させる方法であって、個体に、請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを保有する細胞または請求項 2 1 から 2 5 のいずれか一項に記載のベクターを保有する細胞の有効量を投与することを含む方法。

【請求項 3 8】

前記ポリヌクレオチドを保有する前記細胞が、免疫細胞である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記免疫細胞が、N K 細胞、T 細胞、ガンマデルタ T 細胞、アルファベータ T 細胞、i N K T 細胞、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞、またはこれらの混合物である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記免疫細胞が N K 細胞を含み、該 N K 細胞が、臍帯血、末梢血、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、骨髄由来、細胞株、またはこれらの混合物由来である、請求項 3 8 または 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記 N K 細胞が、臍帯血単核球に由来する、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記免疫細胞が、前記個体に関して同種である、請求項 3 8 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記免疫細胞が、前記個体に関して自家である、請求項 3 8 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記ポリヌクレオチドを保有する前記細胞または前記ベクターを保有する前記細胞が、前記個体に 1 回または 2 回以上投与される、請求項 3 7 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記個体への前記ポリヌクレオチドを保有する前記細胞の投与間の期間は、1 ~ 2 4 時間、1 ~ 7 日、1 ~ 4 週間、1 ~ 1 2 か月、または 1 年以上である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

追加療法の有効量を前記個体に提供するステップをさらに含む、請求項 3 7 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記追加療法が、手術、放射線、遺伝子療法、免疫療法、またはホルモン療法を含む、

10

20

30

40

50

請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記ポリヌクレオチドを保有する前記細胞および/または前記ベクターを保有する前記細胞が、注入、注射、静脈内、動脈内、腹腔内、気管内、腫瘍内、筋肉内、内視鏡的、病巣内、頭蓋内、経皮的、皮下、局所的、灌流により、腫瘍微小環境中、またはこれらの組合せによって前記個体に投与される、請求項 3 7 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2021年10月20日に出願された米国仮特許出願第63/257,608号に対する優先権を主張する。

【0002】

本出願は、XML形式で提出された配列表を含み、それは、参照によりその全体が本出願に組み込まれる。2022年10月11日に作成された前記XMLコピーは、MDAC__1299WO__Sequence__Listing__ST26.xmlという名称であり、サイズは13,926バイトである。

I. 技術分野

【0003】

本開示の実施形態は、少なくとも細胞生物学、分子生物学、免疫学、および癌医学を含む医学の分野を含む。

II. 背景

【0004】

近年、キメラ抗原受容体(CAR)で形質導入された自家T細胞を使用する養子細胞療法は、がんの処置にとって非常に強力なアプローチであることが証明されており、B細胞白血病/リンパ腫においてFDAの承認を得るに至った¹⁻³。しかしながら、腫瘍細胞に対する細胞傷害性を全身毒性から切り離すこと、標的抗原陰性の再発に対する解決策を見出すこと、および同種T細胞生成物で生じる問題を管理しながら自家生成物を生成するためのロジスティックな障壁を回避するために普遍的な既製細胞療法生成物を開発することなどの課題が残っている⁴。ナチュラルキラー(NK)細胞は、腫瘍細胞に対する効果的な細胞傷害性を媒介し、T細胞とは異なり、同種異系の設定において移植片対宿主病(GVHD)を引き起こす可能性がないため、CAR操作にとって魅力的な候補である⁵。よって、NK細胞は、即時臨床使用のための既製の細胞療法生成物として利用することができる。CAR-NK細胞は、その本来の受容体を介して腫瘍細胞を認識し、標的とする内在的能力も保持しているため、原理としては、CAR標的抗原の下方調節による疾患からの回避は、CAR-T細胞で観察されるよりも起こりにくい⁶。臍帯血(CB)は、CD48、4-1BB、および膜結合型IL-21(mbiL21)を発現するように操作されたK562細胞であるGMP準拠のユニバーサル抗原提示細胞(uAPC)を使用して、大量かつ高度に機能的な用量まで拡大され得る同種NK細胞(一例として)の容易に利用可能な「既製の」供給源である⁷。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本開示は、養子細胞療法の技術分野で、特定のCAR構成によって所望の抗原を標的とすることができる、非常に有効なNK細胞を提供するという長年のニーズを満たすものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示の実施形態は、それを必要とする個体のための養子細胞療法に関連する方法および組成物であって、細胞が改変されたNK細胞である細胞療法を含む方法および組成物を含む。改変されたNK細胞は、特定の病状の処置に特に有効とされる特定の合成タンパク

10

20

30

40

50

質を発現し、例えば、合成タンパク質を標的とする細胞に対するNK細胞の有効性の増強を可能にする。

【0007】

特定の実施形態では、本開示は、DAP10共刺激ドメイン（これは、T細胞生物学と比較して、NK細胞生物学により関連する）を、DAP10膜貫通ドメインまたはCD28膜貫通ドメインのいずれかと組み合わせて、および/または任意選択でCD28ヒンジと組み合わせて含むキメラ抗原受容体構築物に関する。このようなDAP10を含むCAR構築物は、T細胞生物学に対してより特異的なCD28共刺激ドメインなどの他の共刺激ドメインと比較して、CAR-NK細胞抗腫瘍活性の増強をもたらす。具体的な実施形態では、このような構築物は養子CAR-NK細胞療法を改善するために利用され、効力を増強することにより、毒性のリスクを低減するために、それを必要とする個体に対してより少ない数のCAR-NK（または代替的な場合には、CAR-T細胞）の使用を可能にする。

10

【0008】

本開示の特定の実施形態は、あらゆる種類の血液悪性腫瘍、固形がん、および/または感染症を有する患者を処置するために、CAR-NK細胞（または他の代替CARビヒクル）を用いる養子細胞療法を包含する。

【0009】

本開示の実施形態は、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記融合タンパク質は、(a)任意選択でCD28ヒンジ；および(b1)CD28膜貫通ドメインまたは(b2)DAP10膜貫通ドメイン；および(c)DAP10共刺激ドメインを含む。具体的な実施形態では、融合タンパク質は、キメラ抗原受容体(CAR)としてさらに定義される。一部の 경우에는、CARは、1つまたは複数の抗原結合ドメインをさらに含み、抗原結合ドメインは、がん抗原（固形腫瘍または血液悪性腫瘍）または感染因子を標的とする場合を含む。具体的な場合には、CARは、配列番号3を含むものなどのCD3ゼータをさらに含む。ポリヌクレオチドは、配列番号1に含まれるCD28膜貫通ドメインをコードしてもよい。ある特定の実施形態では、CARは、1つまたは複数の追加の共刺激ドメイン、例えばCD28、DAP12、4-1BB、NKGD2、2B4、およびこれらの組合せからなる群から選択される1つまたは複数の追加の共刺激ドメインをさらに含む。CARは、例として、CD8、CD27、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体(GM-CSF-R)、Ig重鎖(IgH)、CD3、またはCD4由来のシグナルペプチドなどのシグナルペプチドをさらに含んでいても、含んでいなくてもよい。

20

30

【0010】

特定の実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、1つまたは複数の目的の追加のポリペプチドをさらにコードするものを含む。1つまたは複数の目的の追加のポリペプチドをコードする配列とCARをコードする配列とは、2AエレメントまたはIRESによってポリヌクレオチド上で分離されていてもよい。ある特定の場合には、目的の追加のポリペプチドは、1つまたは複数の治療用タンパク質ならびに/または細胞活性、拡大、細胞傷害性、および/もしくは持続性を増強するタンパク質である。一部の 경우에는、目的の追加のポリペプチドは、自殺遺伝子産物、1つもしくは複数のサイトカイン（例えば、IL-15、IL-2、IL-12、IL-18、IL-21、IL-23、および/またはIL-7）、ならびに/または増殖、拡大、および/もしくは代謝適性を増強する1つもしくは複数のヒトもしくはウイルスのタンパク質である。サイトカインがIL-15である場合には、IL-15配列は配列番号8を含んでもよい。

40

【0011】

特定の実施形態では、任意の種類の変換体は、アデノウイルス変換体、アデノ随伴ウイルス変換体、レンチウイルス変換体、もしくはレトロウイルス変換体などのウイルス変換体、またはプラスミドなどの非ウイルス変換体を含む、本開示の任意のポリヌクレオチドを含む。また、本開示に包含されるのは、本明細書に包含される任意のポリヌクレオチドおよび/または本明細書に包含される任意の変換体を含む任意の種類

50

細胞である。細胞は、幹細胞であっても免疫細胞であって、またはこれらの混合物であってもよい。具体的な免疫細胞としては、以下のものが挙げられる：ナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞、ガンマデルタT細胞、アルファベータT細胞、不変NK T（iNK T）細胞、B細胞、マクロファージ、間葉系間質細胞、樹状細胞、またはこれらの混合物。免疫細胞がNK細胞である場合、NK細胞は、臍帯血、末梢血、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、骨髄由来であっても、またはNK-92細胞株由来のNK細胞などの細胞株由来であってもよい。NK細胞は、臍帯血単核球由来であってもよい。NK細胞は、CD56+ NK細胞であってもよい。具体的な実施形態では、NK細胞は、IL-15、IL-2、IL-12、IL-18、IL-21、IL-7、および/またはIL-23などの組換えサイトカインを発現する。また、本明細書に含まれるのは、本開示の1つまたは複数のCAR分子を発現する免疫細胞または幹細胞の集団である。2種以上のCAR分子が細胞によって発現される場合、CARは、異なる抗原を標的とすることができ、意図された細胞に特異的に結合する能力を増強する。集団は、あらゆる種類の細胞の混合物から構成されてもよいし、構成されていなくてもよい。

10

【0012】

本開示の実施形態は、個体におけるがん細胞を死滅させる方法であって、本明細書に含まれる任意のポリヌクレオチドを保有する任意の細胞および/または本明細書に含まれる任意のベクターを保有する任意の細胞の有効量を個体に投与することを含む方法を含む。具体的な実施形態では、ポリヌクレオチドを保有する細胞は、免疫細胞、例えば、NK細胞、T細胞、ガンマデルタT細胞、アルファベータT細胞、iNK T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、またはこれらの混合物である。免疫細胞はNK細胞を含んでもよく、NK細胞は、臍帯血（CB単核球を含む）、末梢血、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、骨髄由来、細胞株、またはこれらの混合物由来である。免疫細胞は、個体に関して自家でも同種でもよい。方法の特定の実施形態では、ポリヌクレオチドを保有する細胞および/またはベクターを保有する細胞は、個体に1回または2回以上投与され、個体へのポリヌクレオチドを保有する細胞の投与間の期間は、1～24時間、1～7日、1～4週間、1～12か月、または1年以上であってもよい。方法は、手術、放射線、遺伝子療法、免疫療法、またはホルモン療法などの追加療法の有効量を個体に提供するステップをさらに含んでもよい。ポリヌクレオチドを保有する細胞および/またはベクターを保有する細胞は、注入、注射、静脈内、動脈内、腹腔内、気管内、腫瘍内、筋肉内、内視鏡的、病巣内、頭蓋内、経皮的、皮下、局所的、灌流により、腫瘍微小環境中、またはこれらの組合せによって個体に投与されてもよい。

20

30

【0013】

以上、本開示の特徴および技術的利点をやや大まかに概説したが、これは、以下の詳細な説明をよりよく理解できるようにするためである。以下、本明細書の特許請求の範囲の主題を形成する追加の特徴および利点を説明する。開示された着想および具体的な実施形態は、本意匠と同じ目的を遂行するための他の構造を修正または設計するための基礎として容易に利用され得ることが、当業者には認識されるべきである。また、このような等価な構造は、添付の特許請求の範囲に規定された趣旨および範囲から逸脱しないことも、当業者には理解されるはずである。本明細書に開示された設計の特徴と考えられる新規な特徴は、組織および操作方法の両方に関して、さらなる目的および利点とともに、添付の図と関連して考慮される場合、以下の説明からよりよく理解されるであろう。しかしながら、各図は、例示および説明の目的のみのために提供されており、本開示の限界の定義として意図されていないことを明示的に理解されたい。

40

【0014】

次に、本開示をより完全に理解するために、添付の図面と併せて以下の説明を参照する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】図1A - 図1B。マスサイトメトリーパネルを使用する表現型解析。1A . 非

50

形質導入NT（左）とCD5CAR-NK CD28TM DAP10 CD3 α 形質導入NK細胞における異なるクラスターを示すTSNEフォノグラフプロット。フォノグラフの下に示したように、クラスターにはカラーコードの凡例とともに番号が付されている。CARCD5NK細胞で発現した2つの新しいクラスター（#8および#11）は、丸と四角で強調されている。

【図1B】1B．各クラスター（Y軸に示される）における様々なマーカー（X軸に示される）の正規化された発現を示すヒートマップ。クラスター#8と#11で高発現している活性化、細胞傷害性、成熟マーカーを長方形で強調表示する。

【0016】

【図2A】図2A - 図2C。DAP10共刺激ドメインを有するCD5CAR-NK細胞の多機能性を示すIsoplexiss単一細胞シークレームデータ。2A．非形質導入（NT）NK細胞と比較した、異なるCD5CAR-NK細胞の多機能性のパーセントを示す棒グラフ。

10

【図2B】2B．非形質導入（NT）NK細胞と比較した、異なるCD5CAR-NK細胞間の多機能性強度指数を示す棒グラフ。

【図2C】2Cどの構築物が単一細胞レベルでサイトカインの様々な順列を分泌する能力が最も高いかを示す多機能性ヒートマップ。

【0017】

【図3A】図3A - 図3C。複数の腫瘍再負荷によるIncucyteの殺滅アッセイ実験。3A．Incucyteの殺滅アッセイ再負荷実験の実験設計および方法論の一実施形態を示す概略図。

20

【図3B】3B．様々なCD5CAR-NK細胞条件間での各腫瘍再負荷（矢印で示される）後の赤色の数（y軸；生きた腫瘍数の尺度）を示すグラフ。

【図3C】3C．各腫瘍再負荷（矢印で示される）後のコンフルエンスパーセント（腫瘍量の尺度）を示すグラフ。

【0018】

【図4A】図4A - 図4B。様々なCD5CAR-NK細胞の酸素消費率（OCR）と細胞外酸性化率（ECAR）を測定するツノオトシゴの代謝アッセイ。4A．非形質導入（NT）NK細胞と比較した、様々なCD5CAR-NK細胞設計間のOCRを示すグラフ。

30

【図4B】4B．非形質導入（NT）NK細胞と比較した、様々なCD5CAR-NK細胞設計間のECARを示すグラフ。

【0019】

【図5A - C】図5A - 図5C。DAP10共刺激ドメインを有するCD5CAR-NK細胞は、マントル細胞リンパ腫のPDXマウスモデルにおいて良好な活性を示す。5A．腫瘍単独（左）と腫瘍+CD5CAR-NK（右）を皮下腫瘍に受けたマウスの皮下腫瘍におけるCD45+CD5+細胞の絶対数を示す棒グラフ。5B．腫瘍単独（左）と腫瘍+CD5CAR-NK（右）を脾臓に受けたマウスの皮下腫瘍におけるCD45+CD5+細胞の絶対数を示す棒グラフ。5C．腫瘍単独（左）と腫瘍+CD5CAR-NK（右）を骨髄に受けたマウスの皮下腫瘍におけるCD45+CD5+細胞の絶対数を示す棒グラフ。

40

【0020】

【図6A】図6A - 図6B。DAP10共刺激ドメインを有するCD27CAR-NK細胞は、急性骨髄性白血病のNSGマウスモデル（ホタルルシフェラーゼ（FFLuc）が形質導入されたTHP-1）における腫瘍制御および生存を改善する。6A．一連のバイオルミネッセンス（bioluminescent）イメージング（BLI）により、様々なマウス群間での腫瘍負荷をTHP-1FFLucの発光として示す。

【図6B】6B．各群のマウスの経時的生存率を示す生存曲線。

【0021】

【図7A - B】図7A - 図7B。図7Aは、様々な構築物の同定および対応する形質導入

50

効率（図7B）を例示する。CB-NK細胞に、図7Aに示されるように、様々なCD5 CAR構築物で形質導入し、形質導入効率をフローサイトメトリーによって測定した。形質導入効率は、陽性細胞のパーセントに基づく（図7B）。図7Bにおいて、棒グラフの左から右への棒は、上から下に読むと凡例の棒に対応する。

【0022】

【図8】様々なCD5構築物をマウスに注射する実験計画の一例と、それに対応するタイムラインを提供する。この概略図は、標的としてのTリンパ芽球様細胞株CCRF-CEMに対する様々なCD5 CAR NK細胞の*in vivo*抗腫瘍活性の試験を示す。

【0023】

【図9A】図9A - 図9B。図9Aおよび図9Bは、IgG1ヒンジ細胞を有する抗CD5 CAR NKで処置したマウスが、NT NK細胞および腫瘍単独よりも有意に長く生存することを示す。各群のマウスのバイオルミネッセンス画像を示す（図9A）。

10

【図9B】ルシフェラーゼシグナルの定量化を図9Bに示す。

【0024】

【図10A】図10A - 図10B。図10Aおよび図10Bは、CD28ヒンジを有する抗CD5 CAR NKで処置したマウスが、腫瘍単独、NT NK細胞、およびIgG1ヒンジを有するCD5 CAR NK細胞と比較して、腫瘍負荷を有意に低減することを実証する。各群のマウスのバイオルミネッセンス画像を図10Aに提供する。

【図10B】ルシフェラーゼシグナルの定量化を図10Bに示す。

【0025】

【図11】図11. DAP10シグナル伝達を有するCD5 CAR-NK細胞は、単一細胞のトランスクリプトームレベルで高い増殖利益と代謝利益の証拠を示す。CD5 CAR-DAP10-CD3z、CD5 CAR-CD3zとNT NK細胞とを比較したscRNAseqデータのパスウェイエンリッチメント解析を示すヒートマップ。N = 2。

20

【0026】

【図12】図12. DAP10シグナル伝達を有するCD5 CAR-NK細胞は、単一細胞のエピジェネティックレベルでAP1複合体とBATFファミリーに関連するTFのエンリッチメントを示す。CD5 CAR-DAP10-CD3zとCD5 CAR-CD3zとを比較したscATACseqデータのTFエンリッチメント解析を示すボルケーノプロット。N = 2。

30

【0027】

【図13A】図13A - 図13B。DAP10シグナル伝達を有するCD5 CAR-NK細胞は、RPPAによるプロテオミクスレベルでの活性化の増強を示す。13A. 刺激前（unstim）ならびにCD5標的抗原による2分間および15分間の刺激後のNT NK細胞に対して正規化したCD5 CAR-DAP10-CD3zおよびCD5 CAR-CD3zのLog2タンパク質発現データを示すRPPA解析のヒートマップ。

【図13B】13B. 増殖、幹細胞性、代謝活性、免疫シナプス形成および記憶の特徴に関連する様々なタンパク質経路間の相互作用を示す経路ネットワーク解析。N = 2。

【0028】

【図14】図14A - 図14B。DAP10シグナル伝達を有するCD5 CAR-NK細胞は、*in vivo*での腫瘍再負荷後も持続し、リコール応答を開始する能力を有する。14A. 照射のタイミング、CD5+CCRF腫瘍の注入のタイミング、CD5 CAR-NK細胞の注入のタイミング、およびCD5+CCRF腫瘍（FFLuc-GFPで形質導入された）の再負荷のタイミングを示す、*in vivo*マウスモデルの実験計画の詳細を示す模式図。14B. 再負荷前（左側のパネル）および再負荷後のフローサイトメトリーデータ（右側のパネル）を示すFACSプロットは、ヒトCD45+ゲートに続いてNK細胞ゲート（CD56+およびGFP-）を示す。これは、CD5 CAR-NK細胞が腫瘍再負荷後に拡大し、CD5+CCRF腫瘍に対してリコール応答を開始し得ることを示す。

40

【発明を実施するための形態】

50

【0029】

詳細な説明 定義の例

長年の特許法の慣例に従い、特許請求の範囲を含め、comprisingという単語と合わせて本明細書において使用される場合、「1つの(a)」および、「1つの(an)」という単語は、「1つまたは複数」を示す。本開示の一部の実施形態は、本開示の1つまたは複数の要素、方法ステップ、および/または方法からなっても、または本質的にこれらからなってもよい。本明細書に記載の任意の方法または組成物を、本明細書に記載の任意の他の方法または組成物に関して実施することができ、異なる実施形態を組み合わせてもよいことが企図される。

【0030】

本明細書を通して、文脈上別段の定めがない限り、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、および「含む(comprising)」という単語は、記載されたステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を含むことを意味するが、他のいずれかのステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を排除することを意味しないことが理解される。「からなる(consisting of)」とは、「からなる(consisting of)」という語句の後に続くものを含み、かつそれらに限定されることを意味する。よって、「からなる(consisting of)」という語句は、列挙された要素が必要であるかまたは必須であり、他の要素が存在しない可能性があることを示す。「本質的に~からなる(consisting essentially of~)」とは、その語句の後に列挙された任意の要素を含み、かつ他の要素は列挙された要素について本開示で指定された活性もしくは作用を妨げないか、またはそれに寄与しないものに限定されることを意味する。よって、「本質的に~からなる(consisting essentially of~)」という表現は、列挙された要素が必要または必須であるが、他の要素は任意選択であり、列挙された要素の活性または作用に影響を及ぼすかどうかに応じて、存在してもしなくてもよいことを示す。

【0031】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「ある特定の実施形態」、「追加の実施形態」、もしくは「さらなる実施形態」、またはこれらの組合せへの言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造または特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。よって、本明細書を通して様々な箇所に前述の語句が現れるが、必ずしもすべてが同じ実施形態を指すわけではない。さらに、特定の特徴、構造、または特性は、1つまたは複数の実施形態において任意の適切な方法で組み合わせることができる。

【0032】

本明細書で使用される場合、「または(or)」および「および/または(and/or)」という用語は、複数の構成成分を組み合わせ、または互いに排他的に記載するために利用される。例えば、「x、y、および/またはz」は、「x」単独、「y」単独、「z」単独、「x、y、およびz」、「(xおよびy)もしくはz」、「xもしくは(yおよびz)」、または「xもしくはyもしくはz」を指すことができる。x、y、またはzは、実施形態から具体的に除外されてもよいことが具体的に企図されている。

【0033】

本出願を通して、「約(about)」という用語は、細胞生物学および分子生物学の分野におけるその平易かつ通常の意味に従って使用され、値が、その値を決定するために採用されるデバイスまたは方法についての誤差の標準偏差を含むことを示す。

【0034】

「操作された(engineered)」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞、核酸、ポリペプチド、ベクターなどを含む、人の手によって作製された実体を指す。少なくとも一部の場合には、操作された実体は、合成されたものであり、天然には存在しないか、または本開示において利用される方法で構成されない要素を含む。

【0035】

10

20

30

40

50

「単離された」という用語は、本明細書で使用される場合、他の物質を実質的に含まない分子または生物学的もしくは細胞物質を指す。一態様では、「単離された」という用語は、天然源に存在するような、それぞれ他のDNAもしくはRNA、またはタンパク質もしくはポリペプチド、または細胞もしくは細胞小器官、または組織もしくは器官から分離された、DNAもしくはRNAのような核酸、またはタンパク質もしくはポリペプチド、または細胞もしくは細胞小器官、または組織もしくは器官を指す。「単離された」という用語は、組換えDNA技術によって産生された場合には細胞材料、ウイルス材料、培養培地、または化学合成された場合には化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない核酸またはペプチドを指す。さらに、「単離された核酸」は、断片として天然に存在せず、天然の状態では見出されない核酸断片を含むことを意味する。「単離された」という用語はまた、他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチドを指すために本明細書で使用され、精製ポリペプチドと組換えポリペプチドの両方を包含することを意味する。「単離された」という用語はまた、他の細胞または組織から単離された細胞または組織を指すために本明細書で使用され、培養された細胞または組織と操作された細胞または組織の両方を包含することを意味する。

10

【0036】

本明細書で使用される場合、「予防する」、および「予防した」、「予防すること」などの類似語は、疾患または状態、例えばがんを予防、阻害、または発生もしくは再発の可能性を低減するためのアプローチを示す。疾患もしくは病態の発症もしくは再発を遅延させること、または疾患もしくは病態の症状の発生もしくは再発を遅延させることも指す。本明細書で使用される場合、「予防」および類似語は、疾患または状態の発症または再発の前に、疾患または状態の強度、影響、症状および/または負担を低減することも含む。

20

【0037】

「試料」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に生体試料を指す。試料は、個体由来の組織または細胞から採取することができる。一部の例では、試料は、組織生検、血液（例えば、全血）、血漿、細胞外液、乾燥血斑、培養細胞、廃棄組織を含むか、またはそれに由来し得る。試料は、採取前に供給源から単離されていてもよい。非限定的な例としては、血液、脳脊髄液、胸水、羊水、リンパ液、唾液、尿、便、涙、汗、または粘膜排泄物、および採取前に一次供給源から単離された他の体液が挙げられる。一部の例では、試料は、試料調製中にその一次供給源（細胞、組織、血液などの体液、環境試料など）から単離される。試料は、その一次供給源から精製されても精製されなくてもよく、または濃縮されても濃縮されなくてもよい。一部の例では、一次供給源はさらなる処理の前にホモジナイズされる。試料は、パフィーコート、脂質、または粒子状物質を除去するために、ろ過または遠心分離されてもよい。試料はまた、核酸について精製もしくは濃縮されてもよく、またはRNAseで処理されてもよい。試料は、無傷の組織もしくは細胞、断片化した組織もしくは細胞、または部分的に分解された組織もしくは細胞を含有し得る。

30

【0038】

「対象」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、処理または分析中の生物学的試料を有する個体であって、特定の場合には、がんを有するかまたはがんを有する疑いのある個体を指す。対象は、哺乳動物、例えばヒト、実験動物（例えば、霊長類、ラット、マウス、ウサギ）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、七面鳥、およびニワトリ）、家庭用ペット（例えば、イヌ、ネコ、およびげっ歯類）、ウマ、およびトランスジェニック非ヒト動物を含む、方法または材料の対象である任意の生物または動物対象であり得る。対象は、例えば、良性もしくは悪性の新生物、またはがんなどの疾患（病状と称される場合がある）を有するか、または有する疑いのある患者であり得る。対象は、処置を受けていてもまたは処置を受けたことがあってもよい。対象は、無症状の場合もある。対象は、健康であるが、がんの予防を希望している個体であってもよい。「個体」という用語は、少なくとも一部の例では互換的に使用され得る。「対象」または「個体」は、本明細書で使用される場合、医療施設に収容されていてもいなくてもよく、医療施設の

40

50

外来患者として処置されていてもよい。個体は、インターネットを介して1つまたは複数の医療用組成物を受け取ってもよい。個体は、任意の年齢のヒトまたは非ヒト動物を含んでもよく、したがって、成人と若年（すなわち、小児）および乳児との両方を含み、胎内の個体も含む。この用語が医学的処置の必要性を意味することは意図されておらず、個体は、臨床的であるかまたは基礎科学研究を支援するものであるかにかかわらず、自発的または非自発的に実験に参加することができる。

【0039】

本明細書で使用される場合、「処置 (treatment)」または「処置すること (treating)」には、疾患または病理学的状態の症状または病理に対する任意の有益なまたは望ましい効果が含まれ、処置される疾患または状態、例えばがんの1つまたは複数の測定可能なマーカーにおける最低限の低減さえも含まれ得る。処置は、疾患もしくは状態の1つもしくは複数の症状の低減もしくは軽快、または疾患もしくは状態の進行の遅延のいずれかを任意選択で含み得る。「処置」は、疾患もしくは状態、またはそれらに関連する症状の完全な根絶または治癒を必ずしも示すものではない。

10

【0040】

治療的、診断的、または生理学的な目的または効果の文脈において、あらゆる方法は、記載された治療的、診断的、または生理学的な目的または効果を達成または実施するための、本明細書で議論される任意の化合物、組成物、または薬剤の「使用」などの「使用」クレームの文言においても記載され得る。

【0041】

本開示は、キメラ抗原受容体構築物が、T細胞を含む他の免疫細胞に適している生物学とは対照的に、NK細胞への関連性がより高い1つまたは複数の構成成分を有するため、少なくとも一部の場合には、NK細胞での使用により適している方法および組成物に関する。一例では、CD28がT細胞生物学に関連する共刺激分子であり、NK細胞には存在しないことを考慮して、本発明者らは、例として、DAP10、DAP12、NKG2Dおよび/または4-1BBなど、NK細胞生物学により関連する代替共刺激分子を有する他のCARベクターを開発した。本明細書に包含されるように、抗原結合ドメインとしてCD5 s c F vまたはCD27細胞外ドメインのいずれかを用いて、様々な共刺激分子を有する異なるCAR設計が特徴付けられたが、これらは単なる例に過ぎない。DAP10共刺激ドメインは、DNAM、NKG2D、CD3zおよびZAP70などの活性化マーカー、TRAIL、グランザイムB、およびパーフォリンなどの細胞傷害性マーカー、ならびにEomes、T-betなどの成熟マーカーの発現増加を示す、マスマイトメトリで同定された特定のクラスターとともに、CAR-NK細胞に対するより活性化された表現型を与える（図1）。さらに、DAP10共刺激ドメインとDAP10またはCD28膜貫通ドメインのいずれかを持つCAR-NK細胞は、他の共刺激ドメインを持つCAR-NK細胞と比較して高い多機能性を示した（図2）。重要なことに、DAP10共刺激ドメインを有するCD5を対象とするCAR-NK細胞は、複数回の腫瘍再負荷後もCCRF T-ALL細胞株を死滅させる能力を有していたのに対し、他の共刺激分子を有するCAR-NK細胞は、機能消耗のためと思われるが、後の腫瘍再負荷でCCRFを死滅させる能力を失っていた（図3）。代謝の観点から、DAP10共刺激ドメインを有するCAR-NK細胞は、高い酸素消費率（OCR）と高い解糖能、および高い細胞外酸性化率（ECAR）によって証明されるように、高い酸化リン酸化を伴う高い代謝適性を示した（図4）。これは、特定の実施形態では、その増強された効力と相関し得る。このことは、CD5 CAR-NK細胞の有効性を試験するマントル細胞リンパ腫のPDxマウスモデル（図5）およびCD70 CAR-NK細胞の有効性を試験する急性骨髄性白血病（THP-1）のNSGマウスモデル（図6）におけるDAP10構築物の抗腫瘍活性の増強につながった。本明細書で示されているように、NK活性化受容体NKG2Dの下流にある重要なアダプター分子であるDAP10は、CAR-NK細胞の強力な共刺激ドメインとして作用し、in vitroおよびin vivoにおいて、その代謝適性および抗腫瘍活性を増強することができる。

20

30

40

50

I. 遺伝子操作された受容体

【0042】

本開示は、特定の構成成分を利用する遺伝子操作された受容体に関し、これは、特定の構成成分を欠く他の遺伝子操作された受容体よりも効力が増強されている。特定の実施形態では、受容体はヒンジを任意選択で含む。受容体が細胞外ドメインの少なくとも一部として s c F v を含む場合には、受容体は s c F v と膜貫通ドメインとの間にヒンジを含み得る。具体例な例では、受容体の細胞外ドメインが s c F v を欠く、例えば内因性受容体または他の受容体の細胞外ドメインの少なくとも一部を含む場合、受容体はヒンジを含んでも含まなくてもよい。特定の場合には、受容体は少なくとも C D 2 8 ヒンジを含む。一部の 경우에는、受容体は少なくとも C D 2 8 膜貫通ドメインを含む。ある特定の場合には、受容体は少なくとも D A P 1 0 膜貫通ドメインを含む。特定の場合には、受容体は少なくとも D A P 1 0 共刺激ドメインを含む。

10

【0043】

具体的な実施形態では、増強された受容体は、以下を含む（融合タンパク質の形態を含む）：

【0044】

(a) 任意選択でヒンジ、および

【0045】

(b 1) C D 2 8 膜貫通ドメインまたは

【0046】

(b 2) D A P 1 0 の膜貫通ドメイン、

20

【0047】

(c) D A P 1 0 共刺激ドメイン；および

【0048】

(d) C D 3 ゼータ。

【0049】

このように、特定の場合には、受容体は、C D 2 8 ヒンジ（または例として、C D 8 アルファヒンジ、I g G 1 ヒンジ）、C D 2 8 膜貫通ドメイン、および D A P 1 0 共刺激ドメインを含む。他の場合には、受容体は、C D 2 8 ヒンジ、D A P 1 0 膜貫通ドメイン、および D A P 1 0 共刺激ドメインを含む。具体的な実施形態では、(a)（任意選択）、(b 1) または (b 2)、(c) および (d) という構成要素は、融合タンパク質の形態であり、N 末端から C 末端方向に、(a)（任意選択）、(b 1) または (b 2)、(c) および (d) の順である。特定の場合には、融合タンパク質は (a) を欠く。

30

【0050】

具体的な実施形態では、融合タンパク質の形態の (a)（任意選択）、(b 1) または (b 2)、(c) および (d) という構成成分は、C A R の立体配置としてを含む、1 つまたは複数の抗原結合ドメインをさらに含む。具体的な実施形態では、N 末端から C 末端方向における 1 つまたは複数の抗原結合ドメインは、(a)（任意選択）、(b 1) または (b 2)、(c) および (d)（この順で）の N 末端側にある。具体的な実施場合では、遺伝子操作された受容体としての融合タンパク質は、1 つまたは複数の抗原結合ドメイン、(a)（任意選択）、(b 1) または (b 2)、(c) および (d) から本質的になるか、またはこれらからなる。すなわち、特定の場合には、遺伝子操作された受容体は、D A P 1 0 以外のいずれの他の共刺激ドメインも欠くが、代替的な場合には、遺伝子操作された受容体は、D A P 1 0 以外の 1 つまたは複数の共刺激ドメインを含む。遺伝子操作された受容体が D A P 1 0 以外の 1 つまたは複数の共刺激ドメインを含むこのような代替的な場合には、他の共刺激ドメインは、T 細胞ではなく N K 細胞に天然に見られるタンパク質に存在する共刺激ドメインであってもなくてもよい。具体例としては、C D 2 8、D A P 1 2、4 - 1 B B、N K G 2 D、2 B 4、これらの組合せなどが挙げられる。

40

【0051】

(a)（任意選択）、(b 1) または (b 2)、(c) および (d) の構成成分は、融

50

合タンパク質として単一のポリヌクレオチド上で発現されてもよく、特定の実施形態では、融合タンパク質は、1つまたは複数の抗原結合ドメインを含む。ポリヌクレオチドは、単離されていてもよく、またはウイルス性もしくは非ウイルス性を含む任意の種類のベクター中に含まれていてもよい。具体的な実施形態では、ベクターは、NK細胞、T細胞、ガンマデルタT細胞、アルファベータT細胞、iNK細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、またはこれらの混合物などの免疫細胞を含むあらゆる種類の細胞中に存在する。細胞の改変についての好適な方法は当技術分野で知られている。例えば、前掲の S a m b r o o k および A u s u b e l を参照されたい。例えば、H e e m s k e r k ら、2008 および J o h n s o n ら、2009 に記載の遺伝子導入技法を使用して、がん抗原または感染因子の抗原に対する抗原特異性を有する遺伝子操作された受容体を発現するよう

10

【0052】

一部の実施形態では、細胞は、1つまたは複数の遺伝子操作された受容体をコードする遺伝子操作を介して導入された1つまたは複数の核酸を含み、このような核酸の遺伝子操作された産物を発現する。特定の実施形態では、核酸は、異種、すなわち、通常、細胞または細胞から得られた試料中に存在しないものであり、例えば、操作される細胞および/またはこのような細胞が由来する生物中に通常見られない、別の生物または細胞から得られたものなどである。一部の実施形態では、核酸は、自然界に見られない核酸（例えば、キメラ）などの天然に存在しない核酸である。それらは人の手による産物であってもよい。

20

【0053】

CARを含む例示的な抗原受容体、ならびに受容体を操作して細胞に導入するための方法としては、例えば、国際特許出願公開番号WO200014257、WO2013126726、WO2012/129514、WO2014031687、WO2013/166321、WO2013/071154、WO2013/123061、米国特許出願公開番号US2002131960、US2013287748、US20130149337、米国特許第6,451,995号、同第7,446,190号、同第8,252,592号、同第8,339,645号、同第8,398,282号、同第7,446,179、6,410,319号、同第7,070,995号、同第7,265,209号、同第7,354,762号、同第7,446,191号、同第8,324,353号、

30

【0054】

特定の実施形態では、遺伝子操作された受容体は、1つまたは複数の抗原結合ドメインならびに(a)、(b1)または(b2)、および(c)という構成要素を含む。具体的な実施形態では、遺伝子操作された受容体はCARであり、一部の実施形態では、抗原結合ドメインは抗体またはその機能的断片である。他の場合には、CARの抗原結合ドメインは抗体またはその機能的断片ではなく、代わりに、受容体に対する天然のリガンドである。CARは、2つ以上の抗原結合ドメインを含むことによって二重特異性である単一ポリペプチドであってもよく、そのうちの一方は所望の抗原と結合し、他方は別の非同ー抗原と結合する。

40

【0055】

一部の実施形態では、操作された抗原受容体は、活性化CARもしくは刺激性CAR、または共刺激性CARを含むCARを含む(WO2014/055668を参照されたい)。CARは一般に、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達構成成分に連結された細胞外抗原(またはリガンド)結合ドメインを含み、一部の場合には、(a)、(b1)または

50

(b2)、および(c)という構成成分を介する。このような分子は、典型的には、天然抗原受容体を介したシグナル、共刺激受容体と組み合わせたこのような受容体を介したシグナル、および/または共刺激受容体単独を介したシグナルを模倣または近似する。

【0056】

キメラ構築物は、ネイキッドDNAとして、または好適なベクター中で免疫細胞に導入され得ることが企図される。ネイキッドDNAを使用する電気穿孔により細胞に安定にトランスフェクトする方法は当技術分野で公知である。例えば、米国特許第6,410,319号を参照されたい。ネイキッドDNAは一般に、発現のために適切な向きでプラスミド発現ベクターに含有されるキメラ受容体をコードするDNAを指す。

【0057】

あるいは、キメラCAR構築物を免疫細胞に導入するために、ウイルスベクター(例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはレンチウイルスベクター)を使用することもできる。本開示の方法に従って使用するのに好適なベクターは、免疫細胞において非複製性である。例えば、HIV、SV40、EBV、HSV、またはBPVに基づくベクターなど、細胞内に維持されるウイルスのコピー数が細胞の生存能力を維持するのに十分低い、ウイルスに基づくベクターが多数知られている。

【0058】

本開示のある特定の実施形態は、(a)(任意選択)、(b1)または(b2)、(c)および(d)という構成成分を含む特定のCARポリペプチドをコードする核酸を含む核酸の使用に関し、一部の 경우에는、免疫原性を低下させるためにヒト化されたCAR(hCAR)を含む。ある特定の実施形態では、CARは、1つまたは複数の抗原間の共有空間を含むエピトープを認識し得る。ある特定の実施形態では、結合領域は、モノクローナル抗体の相補的決定領域、モノクローナル抗体の可変領域、および/またはそれらの抗原結合断片を含み得る。別の実施形態では、その特異性は、受容体に結合するペプチド(例えば、サイトカイン)に由来する。

【0059】

ヒトCAR核酸は、ヒト患者に対する細胞免疫療法を強化するために使用されるヒト遺伝子であってもよいことが企図される。具体的な実施形態では、本開示は、全長抗原特異的CAR cDNAまたはコード領域を含む。抗原結合領域またはドメインは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,109,304号に記載されているような、特定のヒトモノクローナル抗体由来の一本鎖可変断片(scFv)のV_H鎖およびV_L鎖の断片を含み得る。断片は、ヒト抗原特異的抗体の任意の数の異なる抗原結合ドメインでもあり得る。より具体的な実施形態では、断片は、ヒト細胞での発現のためにヒトのコドン利用に対して最適化された配列によってコードされる抗原特異的scFvである。

【0060】

一部の実施形態では、抗原特異的CARは、抗原が罹患細胞型(がん細胞または感染因子に感染した細胞)に発現しているなど、抗原に対する特異性を伴って構築される。よって、CARは、典型的には、その細胞外部分に、1つまたは複数の抗原結合分子、例えば、1つまたは複数の抗原結合断片、ドメイン、抗体可変ドメイン、リガンド、受容体、および/またはあらゆる種類の抗体分子を含む。当業者であれば、少なくともポリペプチドに関する知識および日常的な慣行に基づいて、抗原に対するscFvを含む抗体を生成することができるが、多数の抗抗原scFvおよびモノクローナル抗体は当技術分野において既に存在している可能性がある。一部の実施形態では、抗原特異的scFvは、1つまたは複数の抗体クローンからのscFvである。

【0061】

一部の実施形態では、抗原特異的CARは、モノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)に由来する一本鎖抗体断片(scFv)などの抗体分子の抗原結合部分または一部を含む。具体的な実施形態では、抗体またはその機能的断片は、公知の抗体であるか、またはそれに由来する。抗体はまた、抗原に対してdenov

10

20

30

40

50

oで生成されるものであってもよく、s c F v配列は、このようなd e n o v o抗体から得られるか、またはそれに由来するものであってもよい。

【0062】

ある特定の実施形態では、C A Rは、標的抗原または受容体に対する天然リガンドまたは天然受容体であるか、またはそれを含む細胞外ドメインを含む。一部の実施形態では、C A Rは、抗原を標的とする抗体由来のV Hおよび/またはV Lであるか、またはそれらを含む細胞外ドメインを含む。

【0063】

キメラ受容体をコードするオープンリーディングフレームの配列は、ゲノムD N A供給源、c D N A供給源から得ることができるか、または合成され得るか(例えば、P C Rによって)、またはこれらの組合せであり得る。ゲノムD N Aのサイズおよびイントロンの数に応じて、イントロンがm R N Aを安定化させることが分かっているので、c D N Aまたはその組合せを使用することが望ましい場合がある。また、m R N Aを安定化させるために、内因性または外因性の非コード領域を使用することがさらに有利な場合もある。

【0064】

一部の態様では、抗原特異的結合ドメインはC D 2 8またはD A P 1 0膜貫通ドメインに連結され、特定の場合にはD A P 1 0共刺激ドメインにも連結される。一部の例では、C D 2 8またはD A P 1 0膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限にするために、同一または異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのこのようなドメインの結合を避けるようにアミノ酸置換によって改変される。膜貫通ドメインは、一部の実施形態では、天然由来または合成由来のいずれかに由来する。あるいは、膜貫通ドメインは、一部の実施形態では、合成である。一部の態様では、合成膜貫通ドメインは、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含む。一部の態様では、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットが、合成C D 2 8またはD A P 1 0膜貫通ドメインの各両端に見られることがある。

【0065】

一部の実施形態では、C A R核酸は、D A P 1 0および任意選択でC D 3ゼータ以外をコードする配列を含む。C D 3 および/またはF c R I によって開始され得るような一次T細胞活性化シグナルに加えて、D A P 1 0以外に、キメラ受容体と標的抗原との係合に続く免疫エフェクター細胞の増殖およびエフェクター機能のための追加の刺激シグナルが利用され得る。例えば、細胞の活性化を増強するヒト共刺激受容体の一部またはすべてを利用することができ、インビボでの持続性を改善し、養子免疫療法の治療の成功を改善することができる。例としては、D A P 1 2、N K G 2 D、2 B 4、C D 2、C D 2 8、C D 2 7、4 - 1 B B、O X 4 0、I C O S、(C D 2 7 8)、C D 3 0、H V E M、C D 4 0、L F A - 1 (C D 1 1 a / C D 1 8)、および/またはI C A M - 1などの分子からの共刺激ドメインが挙げられるが、特定の代替的な実施形態では、列挙されたこれらのいずれか1つをC A Rでの使用から除外してもよい。

I I . 具体的なC A R実施形態の例

【0066】

特定の実施形態では、具体的なC A R分子は、本明細書に包含され、(a) 任意選択で、ヒンジ、および(b 1) C D 2 8膜貫通ドメインまたは(b 2) D A P 1 0膜貫通ドメイン、(c) D A P 1 0共刺激ドメイン、および(d) C D 3ゼータを含む。一部の場合には、C A Rは、任意の種類抗原結合ドメインをさらに含み、それは任意の種類s c F vであってもよい。C A Rの細胞外ドメインにs c F vが利用される場合には、特定のs c F vの変重鎖および変軽鎖は、N末端からC末端方向に任意の順序であってもよい。例えば、変重鎖は変軽鎖のN末端側にあってもよく、その逆であってもよい。C A Rにおいて抗原と結合するs c F vは、コドン最適化されていてもされていなくてもよい。特定の実施形態では、ベクターは、(a) (任意選択)、(b 1) または(b 2)、(c) および(d) を含む抗原特異的C A Rをコードし、1つまたは複数の他の分子もコードする。例えば、ベクターは、このようなC A Rをコードし、1つまたは複数の他の操作

10

20

30

40

50

された抗原受容体、自殺遺伝子、および/または1つもしくは複数の特定のサイトカインなどの、目的の別のタンパク質をコードしてもよい。

【0067】

同じ分子上で、CARは、2つの異なる抗原を標的とするような1つまたは複数の抗原特異的細胞外ドメインを含んでもよく、2つの抗原特異的細胞外ドメインの間にリンカーが存在してもよい。

【0068】

具体的なCAR分子の特定の実施形態では、CARはDAP10を利用するが、CD28、DAP12、4-1BB、NKGD2、または本明細書に包含されるものを含む他の共刺激ドメイン（本明細書では細胞質内ドメインと称する場合がある）も利用する。

10

【0069】

CARの具体的な配列実施形態の例を、順不同で以下に示す：

【0070】

CD28膜貫通ドメインのアミノ酸配列：

FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV（配列番号1）

【0071】

本開示に包含される任意のポリペプチドは、配列番号1、または配列番号1と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99%、もしくはそれ以上の%同一である配列を含み得る。

【0072】

1つまたは複数の細胞内ドメイン（適切な場合には、本明細書ではシグナル活性化ドメインまたは共刺激ドメインと称する場合がある）は、本開示の具体的なCARにおいて利用されても利用されなくてもよい。具体例としては、DAP10由来の細胞内ドメイン、特定の場合にはCD3ゼータが挙げられる。

20

【0073】

本開示のCARにおいて使用され得る特定の細胞内ドメインの例を以下に示す：

【0074】

DAP10細胞内ドメインアミノ酸配列の一例：

LCARPRRSPAQEDGKQVYINMPGRG（配列番号2）

本開示に包含される任意のポリペプチドは、配列番号2、または配列番号2と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99%、もしくはそれ以上の%同一である配列を含み得る。

30

【0075】

CD3zeita細胞内ドメインアミノ酸配列の一例：

【0076】

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG（配列番号3）

【0077】

本開示に包含される任意のポリペプチドは、配列番号3、または配列番号3と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99%、もしくはそれ以上の%同一である配列を含み得る。

40

【0078】

一部の場合には、CARは、以下のものなどのDAP10（および一部の場合にはCD3ゼータ）以外の細胞内ドメインをさらに含む：

【0079】

4-1BB細胞内ドメインのアミノ酸配列：

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL（配列番号4）

本開示に包含される任意のポリペプチドは、配列番号4、または配列番号4と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99%、もしくはそれ以上の

50

% 同一である配列を含み得る。

【 0 0 8 0 】

D A P 1 2 細胞内ドメインのアミノ酸配列：

YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (配列番号 5)

本開示に包含される任意のポリペプチドは、配列番号 5、または配列番号 5 と少なくとも 7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 %、もしくはそれ以上の % 同一である配列を含み得る。

【 0 0 8 1 】

N K G 2 D 細胞内ドメインのアミノ酸配列：

SANERCKSKVVPCRQKQWRTSFDSKLLDLNYNHFESMEWSHRSRGRIGWGM (配列番号 6)

【 0 0 8 2 】

C D 2 8 細胞内ドメインのアミノ酸配列：

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAAYRS (配列番号 1 4)

【 0 0 8 3 】

本開示に包含される任意のポリペプチドは、配列番号 6、または配列番号 6 と少なくとも 7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 %、もしくはそれ以上の % 同一である配列を含み得る。

【 0 0 8 4 】

C A R の一部の実施形態では、1 つまたは複数の細胞外抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間にヒンジ領域が存在し、具体的な場合において、C A R において s c F v が使用される場合に存在するが、C A R において s c F v が欠失している場合には存在しない。具体的な実施形態では、ヒンジは、特定の長さのものであり、例えば、1 0 ~ 2 0、1 0 ~ 1 5、1 1 ~ 2 0、1 1 ~ 1 5、1 2 ~ 2 0、1 2 ~ 1 5、または 1 5 ~ 2 0 アミノ酸長などのものである。具体的な実施形態では、ヒンジは C D 2 8 ヒンジである。具体的な場合には、C A R の有効性を増強するために、C D 2 8 ヒンジの同一性または長さを改変することができる。例えば、H u d e c e k ら (2 0 1 4) および J o n n a l a g a d d a ら (2 0 1 5) を参照されたい。具体的な実施形態では、ヒンジは、C D 2 8、C D 8 アルファまたは I g G 1 由来である。

【 0 0 8 5 】

C D 2 8 ヒンジアミノ酸配列の例としては、以下が挙げられる：

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP (配列番号 7)

【 0 0 8 6 】

本開示に包含される任意のポリペプチドは、配列番号 7、または配列番号 7 と少なくとも 7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 %、もしくはそれ以上の % 同一である配列を含み得る。

【 0 0 8 7 】

具体的な実施形態では、C A R の発現構築物についての以下の例を利用することができる。これらの C A R は C D 5 を標的とするが、他の抗原が標的とされてもよい。

【 0 0 8 8 】

C D 5 # 1 は、I g G ヒンジと D A P 1 2 膜貫通ドメイン、D A P 1 2 共刺激ドメイン、および C D 3 ゼータを含む。

【 0 0 8 9 】

C D 5 # 2 は、I g G ヒンジと C D 2 8 膜貫通ドメイン、D A P 1 2 共刺激ドメイン、および C D 3 ゼータを含む。

【 0 0 9 0 】

C D 5 # 3 は、I g G ヒンジと C D 2 8 膜貫通ドメイン、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、および C D 3 ゼータを含む。

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

50

CD5#4は、IgGヒンジとDAP10膜貫通ドメイン、DAP10共刺激ドメイン、およびCD3ゼータを含む。

【0092】

CD5#5は、IgGヒンジとCD28膜貫通ドメイン、DAP10共刺激ドメイン、およびCD3ゼータを含む。

【0093】

CD5#7は、IgGヒンジとCD28膜貫通ドメイン、NKG2D共刺激ドメイン、およびCD3ゼータを含む。

【0094】

CD5#8は、IgGヒンジとCD28膜貫通ドメイン、およびCD3ゼータを含む。

10

【0095】

CD5#9は、IgG1ヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメイン、およびCD3ゼータを含む。

【0096】

CD5#10は、CD28ヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、DAP10共刺激ドメイン、およびCD3ゼータを含む。

【0097】

CD5#11は、CD28ヒンジ、DAP10膜貫通ドメイン、DAP10共刺激ドメイン、およびCD3ゼータを含む。

【0098】

CD5#12は、CD28ヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、DAP12共刺激ドメイン、およびCD3ゼータを含む。

20

【0099】

CD5#13は、CD28ヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメイン、およびCD3ゼータを含む。

【0100】

本方法では、任意の適切な抗原を標的とすることができる。抗原は、一部の場合には、ある特定のがん細胞には関連するが、非がん細胞には関連しない場合がある。例示的な抗原としては、感染因子由来の抗原分子、自家/自己抗原、腫瘍/がん関連抗原、腫瘍ネオ抗原が挙げられるが、これらに限定されない(Linnemannら、2015)。

30

【0101】

特定の態様では、抗原はがんに関連し、CD19、EBNA、CD123、HER2、CA-125、TRAIL/DR4、CD20、CD70、CD38、CD123、CLL1、がん胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、CD56、AKT、Her3、上皮腫瘍抗原、CD319(CS1)、ROR1、葉酸結合タンパク質、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp41、CD5、CD23、CD30、HERV-K、IL-11Ralpha、カップ鎖、ラムダ鎖、CSPG4、CD33、CD47、CLL-1、U5snRNP200、CD200、BAFF-R、BCMA、CD70、TROP-2、CD99、p53、変異p53、Ras、変異ras、c-Myc、細胞質セリン/スレオニンキナーゼ(例えば、A-Raf、B-Raf、およびC-Raf、サイクリン依存性キナーゼ)、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MART-1、黒色腫関連抗原、BAGE、DAM-6、-10、GAGE-1、-2、-8、GAGE-3、-4、-5、-6、-7B、NA88-A、MC1R、mda-7、gp75、Gp100、PSA、PSM、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、ホスホイノシチド3キナーゼ(PI3K)、TRK受容体、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、ウィルムス腫瘍抗原(WT1)、AFP、-カテニン/m、カスパーゼ-8/m、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HAGE、HSP70-2

40

50

M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、アネキシンII、CDC27/m、TPI/mbc r-abl、BCR-ABL、インターフェロン調節因子4(IRF4)、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質1(TACSTD1)TACSTD2、受容体チロシンキナーゼ(例えば、上皮成長因子受容体(EGFR)(特に、EGFRvIII)、血小板由来成長因子受容体(PDGR)、血管内皮成長因子受容体(VEGFR)、VEGFR2、細胞質チロシンキナーゼ(例えば、srcファミリー、syk-ZAP70ファミリー)、インテグリン結合キナーゼ(ILK)、転写のシグナル伝達物質および活性化因子STAT3、STAT5、およびSTATE、低酸素誘導因子(例えば、HIF-1およびHIF-2)、Nuclear Factor-Kappa B(NF-B)、Notch受容体(例えば、Notch1-4)、NYSEO1、c-Met、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)、WNT、細胞外シグナル調節キナーゼ(ERKs)、およびそれらの調節サブユニット、PMSA、PR-3、MDM2、メソセリン、腎細胞癌-5T4、SM22-アルファ、炭酸脱水酵素I(CAI)およびIX(CAIX)(G250としても公知)、STEAD、TEL/AML1、GD2、プロテイナーゼ3、hTERT、肉腫転座切断点、EphA2、ML-IAP、EpCAM、ERG(TMPPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、ALK、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、ポリシアル酸、MYCN、RhoC、GD3、フコシルGM1、メソセリアン、PSCA、sLe、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GloboH、NY-BR-1、RGS5、SAGE、SART3、STn、PAX5、OY-TE51、精子タンパク質17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE1、B7H3、レグマイン、TIE2、Page4、MAD-CT-1、FAP、MAD-CT-2、fos関連抗原1、CBX2、CLDN6、SPANX、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、SUNC1、およびLRRN1が含まれる。抗原の配列の例は、例えばGENBANK(登録商標)のデータベースにおいて、当技術分野で公知である：CD19(受託番号NG__007275.1)、EBNA(受託番号NG__002392.2)、WT1(受託番号NG__009272.1)、CD123(受託番号NC__000023.11)、NY-ESO(受託番号：NC__000023.11)、EGFRvIII(受託番号：NG__007726.3)、MUC1(受託番号：NG__029383.1)、HER2(受託番号：NG__007503.1)、CA-125(受託番号NG__055257.1)、WT1(受託番号NG__009272.1)、Mage-A3(受託番号NG__013244.1)、Mage-A4(受託番号NG__013245.1)、Mage-A10(受託番号NC__000023.11)、TRAIL/DR4(受託番号NC__000003.12)、および/またはCEA(受託番号NC__000019.10)。

【0102】

腫瘍関連抗原は、例として、前立腺がん、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、膵臓がん、腎臓がん、中皮腫、卵巣がん、肝臓がん、脳腫瘍、骨がん、胃がん、脾臓がん、精巣がん、子宮頸がん、肛門がん、胆嚢がん、甲状腺がん、または黒色腫がん由来し得る。例示的な腫瘍関連抗原または腫瘍細胞由来抗原には、MAGE1、3、およびMAGE4(または国際特許公開第WO99/40188号に開示されているものなどの他のMAGE抗原)；PRAME；BAGE；RAGE、Lage(NY-ESO1としても公知)；SAGE；およびHAGEまたはGAGEが含まれる。腫瘍抗原のこれらの非限定的な例は、黒色腫、肺癌、肉腫、および膀胱癌などの広範囲の腫瘍型で発現される。例えば、米国特許第6,544,518号を参照されたい。前立腺がん腫瘍関連抗原としては、例えば、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、前立腺特異的抗原(PSA)、前立腺酸性リン酸塩、NKX3.1、および前立腺の6回膜上皮抗原(STEAP)が挙げられる。

【0103】

他の腫瘍関連抗原としては、Plu-1、HASH-1、Hash-2、Cripto

および *Criptin* が挙げられる。さらに、腫瘍抗原は、自己ペプチドホルモン、例えば、多くのがんの処置に有用である 10 アミノ酸長の短いペプチドである全長ゴナドトロフィンホルモン放出ホルモン (*GnRH*) であってもよい。

【0104】

抗原には、正常細胞と比較して、腫瘍細胞において変異した遺伝子または腫瘍細胞において異なるレベルで転写された遺伝子に由来するエピトープ領域またはエピトープペプチド、例えば、テロメラーゼ酵素、サバイピン、メソセリン、変異型 *ras*、*bcr/abl* 再配列、*Her2/neu*、変異型または野生型 *p53*、チトクローム *P450 1B1*、および *N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V* などの異常発現イントロン配列；骨髄腫および B 細胞リンパ腫において固有のイディオタイプを生成する免疫グロブリン遺伝子のクローン性再配列；ヒト乳頭腫ウイルスタンパク質 *E6* および *E7* などの腫瘍ウイルスプロセスに由来するエピトープ領域またはエピトープペプチドを含む腫瘍抗原；エプスタインバーウイルスタンパク質 *LMp2*；癌胎児抗原およびアルファ-フェトプロテインなどの腫瘍選択的発現を有する変異していない癌胎児タンパク質が含まれ得る。

10

【0105】

他の実施形態では、抗原は、ウイルス、真菌、寄生虫、原虫、および細菌などの病原性微生物または日和見病原性微生物（本明細書において感染症微生物とも呼ばれる）を含む感染因子から得られるか、またはそれに由来する。ある特定の実施形態では、このような微生物由来の抗原は、全長タンパク質を含む。

20

【0106】

本明細書に記載の方法においてその抗原の使用が企図される例示的な病原性生物としては、ヒト免疫不全ウイルス (*HIV*)、単純ヘルペスウイルス (*HSV*)、呼吸器合胞体ウイルス (*RSV*)、サイトメガロウイルス (*CMV*)、エプスタイン-バーウイルス (*EBV*)、インフルエンザ A、B および C、水疱性口内炎ウイルス (*HSV*)、水疱性口内炎ウイルス (*HSV*)、ポリオマウイルス（例えば、*BK* ウイルスおよび *JC* ウイルス）、アデノウイルス、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*MRSA*) を含むブドウ球菌種、ならびに肺炎球菌を含む連鎖球菌種が挙げられる。当業者に理解されるように、本明細書に記載されている抗原として使用するための、これらおよび他の病原性微生物由来のタンパク質ならびにそのタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、刊行物および *GENBANK*（登録商標）、*SWISS-PROT*（登録商標）および *TREMBL*（登録商標）などの公開データベースにおいて同定され得る。

30

【0107】

ヒト免疫不全ウイルス (*HIV*) 由来の抗原には、*HIV* ビリオンの構造タンパク質（例えば、*gp120*、*gp41*、*p17*、*p24*）、プロテアーゼ、逆転写酵素、または *tat*、*rev*、*nef*、*vif*、*vpr* および *vpu* によってコードされる *HIV* タンパク質のいずれかが含まれる。

【0108】

単純ヘルペスウイルス（例えば、*HSV1* および *HSV2*）由来の抗原には、*HSV* 後期遺伝子から発現されるタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。後期遺伝子群は主にビリオン粒子を形成するタンパク質をコードする。このようなタンパク質には、ウイルスキャプシドを形成する (*UL*) からの 5 つのタンパク質が含まれる：*UL6*、*UL18*、*UL35*、*UL38*、および主要カプシドタンパク質 *UL19*、*UL45*、および *UL27* であり、これらの各々は、本明細書に記載されている抗原として使用することができる。本明細書において抗原として使用するために企図される他の例示的な *HSV* タンパク質としては、*ICP27* (*HI*、*H2*)、糖タンパク質 *B* (*gB*) および糖タンパク質 *D* (*gD*) タンパク質が挙げられる。*HSV* ゲノムは、少なくとも 74 の遺伝子を含み、それぞれが抗原として使用される可能性のあるタンパク質をコードする。

40

【0109】

サイトメガロウイルス (*CMV*) 由来の抗原には、*CMV* 構造タンパク質、*vims* 複

50

製の前初期および初期に発現されるウイルス抗原、糖タンパク質 I および I I I、キャプシドタンパク質、コートタンパク質、下部マトリックスタンパク質 p p 6 5 (p p U L 8 3)、p 5 2 (p p U L 4 4)、I E 1 および 1 E 2 (U L 1 2 3 および U L 1 2 2)、U L 1 2 8 ~ U L 1 5 0 の遺伝子クラスターからのタンパク質産物 (R y k m a n ら、2 0 0 6)、エンベローブ糖タンパク質 B (g B)、g H、g N、ならびに p p 1 5 0 が含まれる。当業者に理解されるように、本明細書に記載の抗原として使用するための C M V タンパク質は、G E N B A N K (登録商標)、S W I S S - P R O T (登録商標)、および T R E M B L (登録商標) などの公開データベースにおいて同定され得る (例えば、B e n n e k o v ら、2 0 0 4、L o e w e n d o r f ら、2 0 1 0、M a r s c h a l l ら、2 0 0 9 を参照されたい)。

10

【0110】

ある特定の実施形態では、使用が企図されるエプスタイン - バーンウイルス (E B V) 由来の抗原には、E B V 溶解タンパク質 g p 3 5 0 および g p 1 1 0、エプスタイン - バーン核抗原 (E B N A) - 1、E B N A - 2、E B N A - 3 A、E B N A - 3 B、E B N A - 3 C、E B N A リーダータンパク質 (E B N A - L P)、および潜在膜タンパク質 (L M P) - 1、L M P - 2 A および L M P - 2 B を含む潜伏サイクルの感染中に生じる E B V タンパク質が含まれる (例えば、L o c k e y ら、2 0 0 8 を参照されたい)。

【0111】

本明細書で使用が企図される呼吸器合胞体ウイルス (R S V) 由来の抗原には、R S V ゲノムによってコードされる 1 1 種類のタンパク質のいずれか、またはその抗原断片：N S 1、N S 2、N (ヌクレオキャプシドタンパク質)、M (マトリックスタンパク質) S H、G および F (ウイルスコートタンパク質)、M 2 (第 2 のマトリックスタンパク質)、M 2 - 1 (伸長因子)、M 2 - 2 (転写調節因子)、R N A ポリメラーゼ、およびリンタンパク質 P が含まれる。

20

【0112】

使用が企図される水疱性口内炎ウイルス (V S V) 由来の抗原には、V S V ゲノムによってコードされる 5 つの主要タンパク質のいずれか 1 つ、およびその抗原断片：ラージタンパク質 (L)、糖タンパク質 (G)、核タンパク質 (N)、リンタンパク質 (P)、およびマトリックスタンパク質 (M) が含まれる (例えば、R i e d e r ら、1 9 9 9 を参照されたい)。

30

【0113】

ある特定の実施形態では、使用が企図されるインフルエンザウイルス由来の抗原には、ヘマグルチニン (H A)、ノイラミニダーゼ (N A)、核タンパク質 (N P)、マトリックスタンパク質 M 1 および M 2、N S 1、N S 2 (N E P)、P A、P B 1、P B 1 - F 2、および P B 2 が含まれる。

【0114】

例示的なウイルス抗原としては、以下に限定されないが、アデノウイルスポリペプチド、アルファウイルスポリペプチド、カリシ v i m s ポリペプチド (例えば、カリシ v i m s キャプシド抗原)、コロナウイルスポリペプチド、ジステンパーウイルスポリペプチド、エボラウイルスポリペプチド、エンテロウイルスポリペプチド、フラビウイルスポリペプチド、肝炎 v i m s (A E) ポリペプチド (B 型肝炎コアまたは表面抗原、C 型肝炎 v i m s E 1 または E 2 糖タンパク質、コア、または非構造的タンパク質)、ヘルペスウイルスポリペプチド (単純ヘルペスウイルスまたは水痘帯状疱疹ウイルスの糖タンパク質を含む)、感染性腹膜炎 v i m s ポリペプチド、白血病 v i m s ポリペプチド、マールブルグ v i m s ポリペプチド、オルソミクソウイルスポリペプチド、パピローマ v i m s ポリペプチド、パラインフルエンザ v i m s ポリペプチド (例えば、ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼポリペプチド)、パラミクソウイルスポリペプチド、パルボウイルスポリペプチド、ペステイ v i m s ポリペプチド、ピコルナ v i m s ポリペプチド (例えば、p o l i o v i m s キャプシドポリペプチド)、ポックス v i m s ポリペプチド (例えば、ワクシニア v i m s ポリペプチド)、狂犬病 v i m s ポリペプチド (例えば、狂犬病 v i

40

50

msの糖タンパク質G)、reovirusポリペプチド、レトロウイルスポリペプチド、およびロタウイルスポリペプチドも挙げられる。

【0115】

ある特定の実施形態では、抗原は細菌抗原であってもよい。ある特定の実施形態では、目的の細菌抗原は、分泌されたポリペプチドであってもよい。他のある特定の実施形態では、細菌抗原は、細菌の外細胞表面上に露出したポリペプチドの一部（複数可）を有する抗原を含む。

【0116】

使用が企図されるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を含むブドウ球菌種由来の抗原には、Agr系、SarおよびSae、Arl系、Sar相同体(Rot、MgrA、SarS、SarR、SarT、SarU、SarV、SarX、SarZおよびTcaR)、Srr系およびTRAPなどの病原性調節因子が含まれる。抗原として作用し得る他のブドウ球菌のタンパク質には、Clpタンパク質、HtrA、MsrR、アコニターゼ、CcpA、SvrA、Msa、CfvAおよびCfvBが含まれる(例えば、Staphylococcus: Molecular Genetics、2008 Caister Academic Press、Jodi Lindsay編を参照されたい)。黄色ブドウ球菌の2種(N315およびMu50)のゲノムは配列決定されており、例えばPATRIC(PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center、Snyderら、2007)で公開されている。当業者に理解されるように、抗原として使用するブドウ球菌タンパク質は、GenBank(登録商標)、Swiss-Prot(登録商標)、およびTREMBL(登録商標)などの他の公開データベースでも同定され得る。

【0117】

本明細書に記載のある特定の実施形態では、使用が企図される肺炎球菌由来の抗原としては、ニューモリシン、PspA、コリン結合タンパク質A(CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht、およびピリンタンパク質(RrgA、RrgB、RrgC)が挙げられる。肺炎球菌の抗原タンパク質も当技術分野で公知であり、一部の実施形態では、抗原として使用され得る(例えば、Zyskら、2000を参照されたい)。肺炎球菌の病原性株の全ゲノム配列が配列決定されており、当業者に理解されるように、本明細書で使用する肺炎球菌タンパク質は、GENBANK(登録商標)、SWISS-PROT(登録商標)、およびTREMBL(登録商標)などの他の公開データベースでも同定され得る。

【0118】

本開示による抗原として特に関心のあるタンパク質には、病原性因子および肺炎球菌の表面に露出すると予測されるタンパク質が含まれる(例えば、Froletら、2010を参照されたい)。

【0119】

抗原として使用することができる細菌抗原の例としては、以下に限定されないがActinomyces属のポリペプチド、Bacillus属のポリペプチド、Bacteroides属のポリペプチド、Bordetella属のポリペプチド、Bartone11a属のポリペプチド、Borrelia属のポリペプチド(例えば、B.burgdorferiのOspA)、Brucella属のポリペプチド、Campylobacter属のポリペプチド、Capnocytophaga属のポリペプチド、Chlamydia属のポリペプチド、Corynebacterium属のポリペプチド、Coxiella属のポリペプチド、Dermatophilus属のポリペプチド、Enterococcus属のポリペプチド、Ehrlichia属のポリペプチド、Escherichia属のポリペプチド、Francisella属のポリペプチド、Fusobacterium属のポリペプチド、Haemobartone11a属のポリペプチド、Haemophilus polyptides(例えば、H.influenzae b型の外膜タンパク質)、Helicobacter属のポリペプチド、Kleb

10

20

30

40

50

siella 属のポリペプチド、*L* 型細菌属のポリペプチド、*Leptospira* 属のポリペプチド、*Listeria* 属のポリペプチド、*Mycobacteria* 属のポリペプチド、*Mycoplasma* 属のポリペプチド、*Neisseria* 属のポリペプチド、*Neorickettsia* 属のポリペプチド、*Nocardia* 属のポリペプチド、*Pasteurella* 属のポリペプチド、*Peptococcus* 属のポリペプチド、*Peptostreptococcus* 属のポリペプチド、*Pneumococcus* 属のポリペプチド（すなわち、*S. pneumoniae* のポリペプチド）（本明細書の記載を参照されたい）、*Proteus* 属のポリペプチド、*Pseudomonas* 属のポリペプチド、*Rickettsia* 属のポリペプチド、*Rochalimaea* 属のポリペプチド、*Salmonella* 属のポリペプチド、*Shigella* 属のポリペプチド、*Staphylococcus* 属のポリペプチド、群 A の *streptococcus polypeptides*（例えば、*S. pyogenes* の M タンパク質）、群 B の *streptococcus (S. agalactiae)* 属のポリペプチド、*Treponema* 属のポリペプチド、および *Yersinia* 属のポリペプチド（例えば、*Y. pestis* の FI 抗原および V 抗原）が挙げられる。

【0120】

真菌抗原の例としては、以下に限定されないが、*Absidia* 属のポリペプチド、*Cremonium* 属のポリペプチド、*Alternaria* 属のポリペプチド、*Aspergillus* 属のポリペプチド、*Basidiobolus* 属のポリペプチド、*Bipolaris* 属のポリペプチド、*Blastomyces* 属のポリペプチド、*Candida* 属のポリペプチド、*Coccidioides* 属のポリペプチド、*Conidiobolus* 属のポリペプチド、*Cryptococcus* 属のポリペプチド、*Curvularia* 属のポリペプチド、*Epidermophyton* 属のポリペプチド、*Exophiala* 属のポリペプチド、*Geotrichum* 属のポリペプチド、*Histoplasma* 属のポリペプチド、*Madurella* 属のポリペプチド、*Malassezia* 属のポリペプチド、*Microsporium* 属のポリペプチド、*Moniliella* 属のポリペプチド、*Mortierella* 属のポリペプチド、*Mucor* 属のポリペプチド、*Paecilomyces* 属のポリペプチド、*Penicillium* 属のポリペプチド、*Phialemonium* 属のポリペプチド、*Phialophora* 属のポリペプチド、*Prototheca* 属のポリペプチド、*Pseudallescheria* 属のポリペプチド、*Pseudomicrodochium* 属のポリペプチド、*Pythium* 属のポリペプチド、*Rhinosporidium* 属のポリペプチド、*Rhizopus* 属のポリペプチド、*Scolecobasidium* 属のポリペプチド、*Sporothrix* 属のポリペプチド、*Stemphylium* 属のポリペプチド、*Trichophyton* 属のポリペプチド、*Trichosporon* 属のポリペプチド、*Xylohypha* 属のポリペプチドが挙げられる。

【0121】

原虫寄生生物抗原の例としては、以下に限定されないが、*Babesia* 属のポリペプチド、*Balantidium* 属のポリペプチド、*Besnoitia* 属のポリペプチド、*Cryptosporidium* 属のポリペプチド、*Eimeria* 属のポリペプチド、*Encephalitozoon* 属のポリペプチド、*Entamoeba* 属のポリペプチド、*Giardia* 属のポリペプチド、*Hammondia* 属のポリペプチド、*Hepatozoon* 属のポリペプチド、*Isospora* 属のポリペプチド、*Leishmania* 属のポリペプチド、*Microsporidia* 属のポリペプチド、*Neospora* 属のポリペプチド、*Nosema* 属のポリペプチド、*Pentatrichomonas* 属のポリペプチド、*Plasmodium* 属のポリペプチドが挙げられる。蠕虫寄生生物抗原の例としては、以下に限定されないが、*Acanthocheilonema* 属のポリペプチド、*Aelurostrongylus* 属のポリペプチド、*Ancylostoma* 属のポリペプチド、*Angiostrongylus* 属のポリペプチド、*Ascaris* 属のポリペプチド、*Brugia* 属のポリペプチド、*Bunostomum* 属の

ポリペプチド、*Capillaria*属のポリペプチド、*Chabertia*属のポリペプチド、*Cooperia*属のポリペプチド、*Crenosoma*属のポリペプチド、*Dictyocaulus*属のポリペプチド、*Diocetophyme*属のポリペプチド、*Dipetalonema*属のポリペプチド、*Diphyllobothrium*属のポリペプチド、*Diplydium*属のポリペプチド、*Dirofilaria*属のポリペプチド、*Dracunculus*属のポリペプチド、*Enterobius*属のポリペプチド、*Filaroides*属のポリペプチド、*Haemonchus*属のポリペプチド、*Lagochilascaris*属のポリペプチド、*Loa*属のポリペプチド、*Mansonella*属のポリペプチド、*Muellerius*属のポリペプチド、*Nanophyetus*属のポリペプチド、*Necator*属のポリペプチド、*Nematodirus*属のポリペプチド、*Oesophagostomum*属のポリペプチド、*Onchocerca*属のポリペプチド、*Opisthorchis*属のポリペプチド、*Ostertagia*属のポリペプチド、*Parafilaria*属のポリペプチド、*Paragonimus*属のポリペプチド、*Parascaris*属のポリペプチド、*Physaloptera*属のポリペプチド、*Protostrongylus*属のポリペプチド、*Setaria*属のポリペプチド、*Spirocercapolyptides* *Spirometra*属のポリペプチド、*Stephanofilaria*属のポリペプチド、*Strongyloides*属のポリペプチド、*Strongylus*属のポリペプチド、*Thelazia*属のポリペプチド、*Toxascaris*属のポリペプチド、*Toxocara*属のポリペプチド、*Trichinella*属のポリペプチド、*Trichostrongylus*属のポリペプチド、*Trichuris*属のポリペプチド、*Uncinaria*属のポリペプチド、および*Wuchereria*属のポリペプチドが挙げられる。(例えば、*P.falciparum*のスポロゾイト周囲(*PfCSP*)、スポロゾイト表面タンパク質2(*PfSSP2*)、肝状態抗原1のカルボキシル末端(*PfLSALC-term*)、およびエクスポートされるタンパク質(*exported protein*)1(*PfExp-1*)、*Pneumocystis*属のポリペプチド、*Sarcocystis*属のポリペプチド、*Schistosoma*属のポリペプチド、*Theileria*属のポリペプチド、*Toxoplasma*属のポリペプチド、および*Trypanosoma*属のポリペプチド。

【0122】

外部寄生虫抗原の例としては、以下に限定されないが、ノミ；カタダニおよびヒメダニを含むマダニ；ハエ、例えばユスリカ、カ、スナバエ、クロバエ、ウマバエ、ツノバエ、シカバエ、ツエツエバエ、サシバエ、ハエウジ病を引き起こすハエおよび刺すブユ；アリ；クモ、シラミ；ダニ；ならびにトコジラミおよびオオサシガメ(*kissing bug*)のような半翅目の昆虫(*true bug*)由来のポリペプチド(抗原およびアレルゲンを含む)が挙げられる。

III. 任意選択のタンパク質

【0123】

一部の実施形態では、1つまたは複数の他のタンパク質が、本開示の特定のCARとともに利用される。1つまたは複数の他のタンパク質は、CAR自体の有効性を促進するため、および/またはCARを発現するあらゆる種類の細胞の有効性を促進するためを含む、あらゆる理由で利用され得る。一部の場合には、他のタンパク質は、他のタンパク質(複数可)がCARまたは細胞の活性に直接的または間接的に影響を及ぼすか否かにかかわらず、治療としてCARを発現する細胞を受ける個体の処置を促進する。一部の場合には、他のタンパク質は、自殺遺伝子、1つもしくは複数のサイトカイン、またはその両方である。具体的な実施形態では、1つまたは複数の他のタンパク質はベクターから産生され、最終的に2つの別々のポリペプチドとして産生される。例えば、CARと他のタンパク質は、例えば2A配列またはIRESによって分離され得る。

【0124】

具体的な実施形態では、IL-15などの1つまたは複数のサイトカインがCARと併

せて利用される。

【 0 1 2 5 】

I L - 1 5 のアミノ酸配列：

ISKPHLRISISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFI LGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIE
DLIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILAN
NSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHVIVQMFINTS (配列番号 8)

本開示に包含される任意のポリペプチドは、配列番号 8、または配列番号 8 と少なくとも 7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 %、もしくはそれ以上の % 同一である配列を含み得る。

【 0 1 2 6 】

具体的な実施形態では、カスパーゼ 9 (例えば、誘導性カスパーゼ 9) などの自殺遺伝子産物が C A R と併せて利用される。

【 0 1 2 7 】

カスパーゼ 9 のアミノ酸配列の例：

MLEGVQVETISPGDGR TFPKRGQTCVVHYTG MLEDGKKVDSSRDRNKPFKFM LGKQ
EVIRGWEEGVAQMSV GQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL KLESGG
GSGVDGFGDVGAL ESLRGNADLAYILSMEPCGHCL IINN VNF CRESGLRTRTGSNIDC
EKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLE LAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASH
LQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKD HGF EVAST
SPEDESPGSNPEP DATPFQEGLRTFDQLDAISS LPTPSDIFVSYSTFP GFVSWRDPKS
GSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTS
AS (配列番号 9)

本開示に包含される任意のポリペプチドは、配列番号 9、または配列番号 9 と少なくとも 7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 %、もしくはそれ以上の % 同一である配列を含み得る。

【 0 1 2 8 】

同じベクター内の C A R と別のタンパク質が 2 つの異なるポリペプチドへと生成されることが意図される場合には、特定の 2 A 配列を利用することができる。

【 0 1 2 9 】

E 2 A アミノ酸配列は以下のように利用され得る：

QCTNYALLKLAGDVESNPGP (配列番号 1 0)

【 0 1 3 0 】

他の 2 A の例を利用することができ、以下の通りである：

【 0 1 3 1 】

T 2 A : EGRGSLLTCGDVEENPGP (配列番号 1 1)

【 0 1 3 2 】

P 2 A : ATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 1 2)

【 0 1 3 3 】

F 2 A : VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 1 3)

【 0 1 3 4 】

本開示は、あらゆる種類の免疫エフェクター細胞における発現を含む、特定の C A R 分子も包含する。

【 0 1 3 5 】

ベクターでは、C A R は I L - 1 5 とともに発現されてもよく、例えば 2 A 配列によって C A R から分離されてもよい。

A . サイトカイン

【 0 1 3 6 】

(a) 任意選択でヒンジ、および (b 1) C D 2 8 膜貫通ドメインまたは (b 2) D A P 1 0 膜貫通ドメイン、および (c) D A P 1 0 共刺激ドメインを含む C A R などの、本開示の遺伝子操作された受容体の 1 つまたは複数とともに、1 つまたは複数のサイトカイ

10

20

30

40

50

ンを利用することができる。一部の 경우에는、1つまたは複数のサイトカインは、操作された受容体と同じベクター分子上に存在するが、他の場合には、それらは別々のベクター分子上に存在する。特定の実施形態では、1つまたは複数のサイトカインは、操作された受容体と同じベクターから同時に発現される。1つまたは複数のサイトカインは、抗原特異的受容体とは別のポリペプチドとして産生されてもよい。一例として、インターロイキン-15 (IL-15) が利用される。IL-15 が用いられる理由は、例えば、IL-15 は組織限定的であり、病理学的条件下でのみ血清中、または全身的にあらゆるレベルで観察されるからである。IL-15 は養子療法に望ましいいくつかの特性を有する。IL-15 は恒常性サイトカインであり、ナチュラルキラー細胞の発生および細胞増殖を誘導し、腫瘍常在細胞の機能的抑制を緩和することにより、定着腫瘍の根絶を促進し、活性化誘導性細胞死を阻害する。IL-15 に加えて、他のサイトカインも想定される。これには、サイトカイン、ケモカイン、およびヒトへの適用に使用される細胞の活性化および増殖に寄与する他の分子が含まれるが、これらに限定されない。一例として、1つまたは複数のサイトカインは、IL-15、IL-12、IL-2、IL-18、IL-21、IL-23、IL-7、またはこれらの組合せである。IL-15 を発現するNK細胞は、利用することができ、支持的サイトカインシグナル伝達を継続することが可能であり、これは注入後の生存に有用である。

10

【0137】

具体的な実施形態では、NK細胞は、外因的に供給された1つまたは複数のサイトカインを発現する。サイトカインは、細胞内の発現ベクターから発現されるため、および/または細胞の培養培地に供給されるため、NK細胞に外因的に供給される場合がある。代替的な場合には、細胞内の内因性サイトカインは、サイトカインのプロモーター部位における遺伝子組換えなどの内因性サイトカインの発現調節の操作により上方調節される。サイトカインが発現構築物上で細胞に供給される場合には、サイトカインは、自殺遺伝子と同じベクターからコードされ得る。サイトカインは、自殺遺伝子とは別個のポリペプチド分子として、また細胞の操作された受容体とは別個のポリペプチドとして発現され得る。一部の実施形態では、本開示は、CARおよび/またはTCRベクターとIL-15との同時利用、特にNK細胞における同時利用に関する。

20

B. 自殺遺伝子

【0138】

特定の実施形態では、自殺遺伝子は、その使用を制御し、所望の事象および/または時間で細胞療法を終了できるようにするために、任意の種類 of 細胞療法と併せて利用される。自殺遺伝子は、必要な時に形質導入細胞の死を誘発する目的で形質導入細胞において用いられる。本開示に包含されるベクターを保有するように改変された本開示の抗原標的細胞は、1つまたは複数の自殺遺伝子を含み得る。一部の実施形態では、「自殺遺伝子」という用語は、本明細書で使用される場合、プロドラッグまたは他の薬剤の投与の際に、遺伝子産物の、その宿主細胞を死滅させる化合物への遷移をもたらす遺伝子として定義される。他の実施形態では、自殺遺伝子は、所望の場合、自殺遺伝子産物を標的とする薬剤 (例えば、抗体) によって標的とされる遺伝子産物をコードする。「自殺遺伝子産物」は、自殺遺伝子によってコードされたタンパク質またはポリペプチドについて記載する。

30

40

【0139】

使用され得る自殺遺伝子/プロドラッグの組合せの例は、単純ヘルペスウイルス-チミジンキナーゼ (HSV-tk) とガンシクロビル、アシクロビル、またはFIAU; 酸化還元酵素とシクロヘキシミド; シトシンデアミナーゼと5-フルオロシトシン; チミジンキナーゼチミジル酸キナーゼ (Tdk::Tmk) とAZT; およびデオキシシチジンキナーゼとシトシンアラビノシドである。プロドラッグの6-メチルプリンデオキシリボシドを毒性のプリン6-メチルプリンに変換する、いわゆる自殺遺伝子であるE.coliのプリンヌクレオシドホスホリラーゼが使用され得る。プロドラッグ療法とともに使用される自殺遺伝子の他の例は、E.coliのシトシンデアミナーゼ遺伝子およびHSVのチミジンキナーゼ遺伝子である。

50

【0140】

例示的な自殺遺伝子には、CD20、CD52、EGFRv3、または誘導性カスパーゼ9も含まれる。一実施形態では、EGFRバリエーションIIIの切断バージョン(EGFRv3)が、セツキシマブによって切除され得る自殺抗原として使用され得る。本開示において使用され得る当技術分野で公知のさらなる自殺遺伝子としては、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNP)、チトクロームp450酵素(CYP)、カルボキシペプチダーゼ(CP)、カルボキシエステラーゼ(CE)、ニトロレダクターゼ(NTR)、グアニリボシルトランスフェラーゼ(XGRTP)、グリコシダーゼ酵素、メチオニン-リアーゼ(MET)、およびチミジンホスホリラーゼ(TP)が挙げられる。一部の実施形態では、誘導性カスパーゼ9(iC9)が使用される。例としてのiC9は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Yagyu Sら Mol Ther. 2015年9月; 23(9): 1475~85頁に記載されている。

【0141】

特定の実施形態では、CARをコードするベクター、または本明細書に包含されるNK細胞中の任意のベクターは、1つまたは複数の自殺遺伝子を含む。自殺遺伝子は、CARと同じベクター上にあってもなくてもよい。自殺遺伝子がCARと同じベクター上に存在する場合には、自殺遺伝子とCARとは、例えばIRESまたは2Aエレメントによって分離されていてもよい。

C. 他の受容体

【0142】

一部の実施形態では、CARを含む細胞は、本明細書に包含される任意の1つもしくは複数の構成成分を含んでも含まなくてもよい他のCAR分子、1つもしくは複数のサイトカイン受容体、1つもしくは複数のケモカイン受容体(例えば、CXCL8産生腫瘍へのトラフィックを増強するためにCXCR1およびCXCR2などの腫瘍部位へのトラフィックおよびホーミングを増強する改変として)、および/または1つもしくは複数の合成TCRを含む、1つまたは複数の他の受容体を発現し得る。他の受容体のがん抗原などの抗原を標的とする場合には、他の受容体は本開示のCARと同じ抗原を標的としてもしなくてもよい。

IV. ベクター

【0143】

(a) CD28ヒンジ、および(b1) CD28膜貫通ドメインまたは(b2) DAP10膜貫通ドメイン、および(c) DAP10共刺激ドメインを含むCARは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを含む任意の好適なベクターによってレシピエント免疫細胞に送達され得る。ウイルスベクターの例には、少なくともレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルスのベクターが含まれる。非ウイルスベクターの例には、少なくともプラスミド、トランスポゾン、脂質、ナノ粒子などが含まれる。

【0144】

免疫細胞が遺伝子操作された受容体をコードするベクターで形質導入され、さらに、自殺遺伝子および/またはサイトカインおよび/または任意選択の治療遺伝子産物などの別の遺伝子(複数可)の細胞内への形質導入が必要な場合には、抗原標的受容体、自殺遺伝子、サイトカインおよび任意選択の治療遺伝子は、同じベクター上で、または同じベクターとともに含まれていても含まれていなくてもよい。一部の場合には、CAR、自殺遺伝子、サイトカイン、および任意選択の治療遺伝子は、同一のベクター分子、例えば同一のウイルスベクター分子から発現される。このような場合には、CAR、自殺遺伝子、サイトカイン、および任意選択の治療遺伝子の発現は、同じ調節エレメント(複数可)によって調節されて調節されなくてもよい。CAR、自殺遺伝子、サイトカイン、および任意選択の治療遺伝子が同じベクター上に存在する場合、これらは別々のポリペプチドとして発現されても発現されなくてもよい。これらは、別々のポリペプチドとして発現される場合には、例えば、2AエレメントまたはIRESエレメントによってベクター上で分離され

てもよい（または、両方の種類が同じベクター上で1回または2回以上使用されていてもよい）。

A. 一般的な実施形態

【0145】

当業者であれば、本開示の抗原受容体を発現させるための標準的な組換え技法（例えば、いずれも参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら、2001およびAusubelら、1996を参照されたい）によりベクターを構築するのに十分であろう。

1. 調節性エレメント

【0146】

本開示において有用なベクターに含まれる発現カセットは、特に、タンパク質コード配列に作動可能に連結された真核生物転写プロモーター、介在配列を含むスプライスシグナル、および転写終結/ポリアデニル化配列を含有する（5'から3'方向に）。真核細胞においてタンパク質をコードする遺伝子の転写を制御するプロモーターおよびエンハンサーは、複数の遺伝的エレメントから構成されてもよい。細胞機構は、各エレメントによって伝達される調節の情報を収集し、統合することができ、異なる遺伝子が転写調節の別個の、しばしば複雑なパターンを進化させることができる。本開示の文脈で使用されるプロモーターには、例えば、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、および組織特異的プロモーターが含まれる。ベクターががん治療の生成に利用される場合には、プロモーターは低酸素条件下で有効であり得る。

2. プロモーター/エンハンサー

【0147】

本明細書で提供される発現構築物は、抗原受容体および他のシストロン遺伝子産物の発現を駆動するためのプロモーターを含む。プロモーターは一般に、RNA合成の開始部位の位置を定めるために機能する配列を含む。この最もよく知られた例はTATAボックスであるが、例えば哺乳動物末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターおよびSV40後期遺伝子のプロモーターなどの、TATAボックスを欠くいくつかのプロモーターでは、開始部位自体に重なる離散的なエレメントが開始場所の固定を助ける。追加のプロモーターエレメントは転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは開始部位の上流領域に位置するが、いくつかのプロモーターは開始部位の下流にも機能的エレメントを含有することが示されている。コード配列をプロモーターの「制御下に」置くためには、転写リーディングフレームの転写開始部位の5'末端を、選択されたプロモーターの「下流」（すなわち、3'）に配置する。「上流」のプロモーターはDNAの転写を刺激し、コードされたRNAの発現を促進する。

【0148】

プロモーターエレメント間の間隔は、エレメントが互いに反転するかまたは移動した場合に、プロモーター機能が保存されるように、フレキシブルであることが多い。例えば、tkプロモーターでは、活性が下降し始める前に、プロモーターエレメント間の間隔を50bpまで広げることができる。プロモーターに応じて、個々のエレメントが転写を活性化するために協調的にも独立的にも機能することができるようである。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用型調節配列を指す「エンハンサー」と併用してもしなくてもよい。

【0149】

プロモーターは、コードセグメントおよび/またはエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得ることができるような、核酸配列に天然に付随するものであり得る。このようなプロモーターは「内因性」と称することができる。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列に天然に付随するものであり得る。あるいは、コード核酸セグメントを組換えプロモーターまたは異種プロモーターの制御下に位置させることによって、ある特定の利点を得られ、これは、その天然環境において核酸配列に通常付随しないエンハンサーを指す。組換えエンハンサー

10

20

30

40

50

または異種エンハンサーは、その天然環境において核酸配列に通常付随しないエンハンサーを指す。このようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および任意の他のウイルス、または原核細胞もしくは真核細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在し」ないプロモーターまたはエンハンサー、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、および/または発現を変化させる変異を含有するプロモーターまたはエンハンサーが含まれ得る。例えば、組換えDNA構築において最も一般的に使用されるプロモーターには、*-ラクタマーゼ*（ペニシリナーゼ）、*ラクトース*および*トリプトファン*（*trp-*）プロモーター系が含まれる。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成的に生成することに加えて、配列は、本明細書に開示される組成物に関連して、PCR（商標）を含む組換えクロニングおよび/または核酸増幅技術を使用して生成され得る。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などのような非核小器官内の配列の転写および/または発現を指示する制御配列が同様に採用され得ることが企図される。

10

【0150】

当然のことながら、発現のために選択されたオルガネラ、細胞型、組織、器官、または生物においてDNAセグメントの発現を効果的に誘導するプロモーターおよび/またはエンハンサーを採用することが重要であろう。分子生物学の当業者は一般に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサーおよび細胞型の組合せの使用を知っている（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、*Sambrook*ら1989を参照されたい）。用いられるプロモーターは、構成的であり、組織特異的であり、誘導性であり、ならびに/または組換えタンパク質および/もしくはペプチドの大規模生産において有利であるような、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指示するために適切な条件下で有用である。プロモーターは異種であっても内因性であってもよい。

20

【0151】

さらに、任意のプロモーター/エンハンサーの組合せ（例えば、*Eukaryotic Promoter Data Base EPDB*、*epd.isb-sib.ch*/のワールドワイドウェブによる）も、発現を駆動するために使用され得る。T3、T7またはSP6細胞質発現系の使用は別の可能な実施形態である。真核細胞は、適切な細菌ポリメラーゼが送達複合体の一部として、または追加の遺伝子発現構築物として提供される場合、ある特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持することができる。

30

【0152】

プロモーターの非限定的な例としては、初期または後期ウイルスプロモーター、例えば、最小TATAボックス近傍の、SV40初期または後期プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）即時初期プロモーター、Rous Sarcoma Virus（RSV）初期プロモーター；真核細胞プロモーター、例えば、ベータアクチンプロモーター、GADPHプロモーター、メタロチオネインプロモーター；および連結応答エレメントプロモーター、例えば、サイクリックAMP応答エレメントプロモーター（*cre*）、血清応答エレメントプロモーター（*sre*）、ホルボールエステルプロモーター（TPA）および応答エレメントプロモーター（*tre*）が挙げられる。また、ヒト成長ホルモンプロモーター配列（例えば、GenBank（登録商標）、受託番号X05244、ヌクレオチド283~341に記載のヒト成長ホルモン最小プロモーター）またはマウス乳腺腫瘍プロモーター（ATCC、カタログ番号ATCC 45007から入手可能）を使用することも可能である。ある特定の実施形態では、プロモーターは、CMV IE、デクチン-1、デクチン-2、ヒトCD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、AdMLP、ベータ-アクチン、MHCクラスIまたはMHCクラスIIプロモーターであるが、治療遺伝子の発現を駆動するのに有用な任意の他のプロモーターが、本開示の実践に適用可能である。

40

【0153】

ある特定の態様では、本開示の方法はまた、エンハンサー配列、すなわち、プロモーターの活性を増加させ、比較的長い距離（標的プロモーターから最大数千ベース離れてい

50

る)であっても、シスで、その配向に関係なく作用する可能性を有する核酸配列に関する。しかしながら、エンハンサーの機能は必ずしもこのような長距離に限定されるものではなく、所与のプロモーターに近接して機能することもある。

3. 開始シグナルおよび関連する発現

【0154】

特定の開始シグナルもまた、コード配列の効率的な翻訳のために、本開示において提供される発現構築物において使用され得る。これらのシグナルは、A T G開始コドンまたは隣接配列を含む。A T G開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルは、提供される必要があり得る。当業者であれば、このことを容易に判断し、必要なシグナルを提供することができるであろう。インサート全体の翻訳を確実にするために、開始コドンは所望のコード配列のリーディングフレームと「インフレーム」でなければならないことは周知である。外因性の翻訳制御シグナルと開始コドンは、天然であっても合成であってもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含めることによって増強され得る。

10

【0155】

ある特定の実施形態では、配列内リボソーム進入部位(IRES)エレメントの使用が、多遺伝子、またはポリシストロニックメッセージを作成するために使用される。IRESエレメントは、5'メチル化Cap依存性翻訳のリボソームスキャンモデルを迂回し、配列内部で翻訳を開始することができる。ピコルナウイルスファミリーの2つのメンバー(ポリオおよび脳心筋炎)からのIRESエレメント、および哺乳動物メッセージからのIRESエレメントが記載されている。IRESエレメントは異種オープンリーディングフレームに連結され得る。複数のオープンリーディングフレームが一緒に転写され、それぞれがIRESで分離され、ポリシストロニックメッセージを作成することができる。IRESエレメントのおかげで、各オープンリーディングフレームは効率的な翻訳のためにリボソームにアクセスできる。1つのメッセージを転写するために、1つのプロモーター/エンハンサーを使用して、複数の遺伝子を効率的に発現させることができる。

20

【0156】

本明細書の他の箇所で詳述されるように、ある特定の2A配列エレメントは、本開示において提供される構築物において遺伝子の連結発現または同時発現をもたらすために使用され得る。例えば、切断配列を使用して、オープンリーディングフレームを連結させ、単一のシストロンを形成することによって遺伝子を同時発現させることができる。例示的な切断配列は、ウマ鼻炎Aウイルス(E2A)またはF2A(口蹄疫ウイルス2A)または「2A様」配列(例えば、Thos ea a s i g n aウイルス2A; T2A)またはブタテスコウイルス-1(P2A)である。具体的な実施形態では、単一のベクターにおいて、複数の2A配列は非同一であるが、代替的な実施形態では、同じベクターは2つ以上の同じ2A配列を利用する。2A配列の例は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるUS 2011/0065779に提供される。

30

4. 複製起点

【0157】

宿主細胞内にベクターを伝播させるために、ベクターは、例えば、上記のようなEBVのoriPに対応する核酸配列、または複製が開始される特定の核酸配列であるプログラミングにおいて類似の、または上昇した機能を有する遺伝子操作されたoriPである、複製部位(「ori」と称されることが多い)の1つまたは複数の起点を含有し得る。あるいは、上記のような染色体外複製ウイルスの複製起点、または自律複製配列(ARS)を用いることもできる。

40

5. 選択マーカーおよびスクリーニング可能なマーカー

【0158】

一部の実施形態では、本開示の受容体構築物を含むNK細胞は、発現ベクターにマーカーを含めることにより、in vitroまたはin vivoで同定され得る。このようなマーカーは、発現ベクターを含有する細胞の容易な同定を可能にする同定可能な変化を細胞に付与するものである。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする性質を付与す

50

るものである。正の選択マーカーは、そのマーカーの存在によって選択が可能になるものであり、負の選択マーカーは、そのマーカーの存在によって選択が妨げられるものである。正の選択マーカーの例は薬物耐性マーカーである。

【0159】

通常、薬物選択マーカーを含むことにより、形質転換のクローニングおよび同定の助けとなり、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシンおよびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は有用な選択マーカーである。条件の実施に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、比色分析を基礎とするGFPなどのスクリーニング可能なマーカーを含む他の種類のマーカーも企図される。あるいは、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（tk）またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）などの負の選択マーカーとしてスクリーニング可能な酵素を利用することもできる。当業者であれば、おそらくFACS分析と組み合わせて、免疫学的マーカーを用いる方法も知っているであろう。遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現できる限り、使用されるマーカーは重要ではないと考えられる。選択マーカーおよびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

10

B. マルチシストロニックベクター

【0160】

特定の実施形態では、(a) CD28 ヒンジ、(b1) CD28 膜貫通ドメインまたは (b2) DAP10 膜貫通ドメイン、および (c) DAP10 共刺激ドメインを含む遺伝子操作された受容体をコードするベクターは、マルチシストロニックベクターから発現されるものを含む、任意選択の自殺遺伝子、任意選択のサイトカイン、および/または任意選択の治療遺伝子をコードする配列も含む（「シストロン」という用語は、本明細書で使用される場合、遺伝子産物が産生され得る核酸配列を指す）。具体的な実施形態では、マルチシストロニックベクターは、受容体、自殺遺伝子、および少なくとも1つのサイトカイン、ならびに/またはT細胞受容体および/もしくは追加のCARなどの操作された受容体をコードする。一部の場合には、マルチシストロニックベクターは、少なくとも1つのCAR、少なくとも1つの非分泌性TNF-アルファ変異体、および少なくとも1つのサイトカインをコードする。サイトカインは、ヒトまたはマウスまたは任意の種などの特定のタイプのサイトカインであってもよい。特定の場合には、サイトカインは、IL15、IL12、IL2、IL18、および/またはIL21である。

20

30

【0161】

ある特定の実施形態では、本開示は、実質的に同一のレベルで複数のシストロンを発現する能力を有するポリシストロニックベクターを利用する、柔軟なモジュラーシステム（「モジュラー」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、標準的な組換え技法を使用することによって、シストロン全体またはシストロンの構成成分をそれぞれ除去および置き換えることにより、それらの交換可能性を可能にするシストロンまたはシストロンの構成成分を指す）を提供する。このシステムは、複数の遺伝子のコンビナトリアル発現（過剰発現を含む）を可能にする細胞工学に使用することができる。具体的な実施形態では、ベクターによって発現される遺伝子の1つまたは複数には、1つ、2つ、またはそれより多い抗原受容体が含まれる。複数の遺伝子は、CAR、TCR、サイトカイン、ケモカイン、ホーミング受容体、CRISPR/Cas9 媒介性遺伝子変異、デコイ受容体、サイトカイン受容体、キメラサイトカイン受容体などを含み得るが、これらに限定されない。ベクターはさらに：(1) 1つもしくは複数のレポーター、例えば細胞アッセイおよび動物イメージング用などの蛍光または酵素レポーター、(2) 1つもしくは複数のサイトカインまたは他のシグナル伝達分子、ならびに/または(3) 自殺遺伝子を含んでもよい。

40

【0162】

特定の場合には、ベクターは、任意の種類切断部位、例えば2A切断部位によって分離された少なくとも4つのシストロンを含み得る。ベクターは、pUC19骨格中にps

50

i パッケージング配列を有する3'および5'LTRを含むモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV または MMLV) ベースであってもよく、そうでなくてもよい。ベクターは、3つ以上の2A切断部位を有する4つ以上のシストロンと、遺伝子スワッピングのための複数のORFを含んでもよい。この系は、サブクローニングによる迅速な組込みのための制限部位に挟まれた複数の遺伝子(7つ以上)のコンビナトリアル過剰発現を可能にし、この系はまた、一部の実施形態では、少なくとも3つの2A自己切断部位を含む。よって、このシステムは、複数のCAR、TCR、シグナル伝達分子、サイトカイン、サイトカイン受容体、および/またはホーミング受容体の発現を可能にする。このシステムはまた、レンチウイルス、アデノウイルスAAV、および非ウイルスプラスミドを含むがこれらに限定されない、他のウイルスおよび非ウイルスベクターにも適用することができる。

10

【0163】

この系のモジュラー性質はまた、ポリシストロン発現ベクター内の4つのシストロンそれぞれに遺伝子を効率よくサブクローニングすることができ、迅速な試験など遺伝子のスワッピングも可能である。ポリシストロニック発現ベクターに戦略的に配置された制限部位により、効率的な遺伝子のスワッピングが可能である。

【0164】

本開示の実施形態は、ポリシストロニックベクターを利用する系を包含し、ここで、ベクターの少なくとも一部は、例えば、1つまたは複数のシストロン(または1つもしくは複数のシストロンの構成成分)の除去および置き換えを可能にすることによって、例えば、ベクターのモジュラー使用を容易にするために、その同一性および位置が特異的に選択される1つまたは複数の制限酵素部位を利用することによって、モジュラーである。ベクターはまた、複数のシストロンが単一のポリペプチドに翻訳され、別々のポリペプチドにプロセッシングされる実施形態を有し、それによってベクターが別々の遺伝子産物を実質的に等モル濃度で発現する利点を付与する。

20

【0165】

本開示のベクターは、ベクターの1つもしくは複数のシストロンを変更できるように、および/または1つもしくは複数の特定のシストロンの1つもしくは複数の構成成分を変更できるように、モジュール性に構成される。ベクターは、1つもしくは複数のシストロンの末端に隣接する、および/または特定のシストロンの1つもしくは複数の構成成分の末端に隣接する、固有の制限酵素部位を利用するように設計され得る。

30

【0166】

本開示の実施形態には、1つまたは複数の制限酵素部位に挟まれた少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのシストロンをそれぞれ含むポリシストロニックベクターが含まれ、少なくとも1つのシストロンは少なくとも1つの抗原受容体をコードする。一部の 경우에는、シストロンのうちの2つ、3つ、4つまたはそれより多くが単一のポリペプチドに翻訳され、別々のポリペプチドに切断されるが、他の場合には、シストロンうちの複数個が単一のポリペプチドに翻訳され、別々のポリペプチドに切断される。ベクター上の隣接するシストロンは、2A自己切断部位などの自己切断部位によって分離されてもよい。一部の場合には、シストロンはそれぞれ、ベクターから別々のポリペプチドを発現する。特定の場合には、ベクター上の隣接するシストロンはIRESエレメントによって分離される。

40

【0167】

ある特定の実施形態では、本開示は、例えば、1つ、2つ、またはそれより多い抗原受容体を含み得る複数のシストロンの、過剰発現を含むコンビナトリアル発現を可能にする細胞工学のためのシステムを提供する。特定の実施形態では、本明細書に記載されているポリシストロニックベクターの使用は、ベクターが同じmRNAから等モルレベルの複数の遺伝子産物を産生することを可能にする。複数の遺伝子は、CAR、TCR、サイトカイン、ケモカイン、ホーミング受容体、CRISPR/Cas9媒介性遺伝子変異、デコイ受容体、サイトカイン受容体、キメラサイトカイン受容体などを含み得るが、これらに限定されない。ベクターは、細胞アッセイおよび動物イメージングなどのための1つまた

50

は複数の蛍光レポーターまたは酵素レポーターをさらに含み得る。ベクターはまた、ベクターを保有する細胞がもはや必要とされなくなった場合、またはベクターが提供された宿主にとって有害になった場合に、ベクターを保有する細胞を終息させるための自殺遺伝子産物を含んでもよい。

【0168】

具体的な実施形態では、ベクターは、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはアデノ随伴ウイルスベクター）または非ウイルスベクターである。ベクターは、モロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) の 5'LTR、3'LTR、および/または psi パッケージングエレメントを含んでもよい。具体的な場合には、psi パッケージングは、5'LTR と抗原受容体コード配列との間に組み込まれる。ベクターは pUC19 配列を含んでも含んでいても含んでいなくてもよい。ベクターの一部の態様では、少なくとも1つのシストロンは、サイトカイン（例えば、IL-15、IL-7、IL-21、IL-23、IL-18、IL-12、またはIL-2）、ケモカイン、サイトカイン受容体、および/またはホーミング受容体をコードする。

【0169】

2A切断部位がベクター中で利用される場合、2A切断部位は、P2A、T2A、E2A および/またはF2A部位を含み得る。

【0170】

制限酵素部位は任意の種類のものであってもよく、その認識部位に任意の数の塩基、例えば4~8塩基を含んでもよく；認識部位の塩基数は少なくとも4、5、6、7、8、またはそれより多くてもよい。切断が生じ得る部位は、ブラント切断または粘着性末端を生じる。制限酵素は、例えば、I型、II型、III型、またはIV型であってよい。制限酵素部位は、Integrated relational Enzyme database (IntEnz) または BRENDA (The Comprehensive Enzyme Information System) などの利用可能なデータベースから得ることができる。

【0171】

例示的なベクターは、円形で、慣例により、位置1（円の頂上の12時の位置で、配列の残りの部分は時計回り方向）が5'LTRの開始点に設定される。

【0172】

自己切断型2Aペプチドが利用される実施形態では、2Aペプチドは、真核細胞における翻訳の間にポリペプチドの「切断」を媒介する、18~22アミノ酸(aa)長のウイルスオリゴペプチドであり得る。「2A」という表記はウイルスゲノムの特定の領域を指し、異なるウイルス2Aは一般にそのウイルスに由来する名前が付けられている。最初に発見された2Aは、F2A（口蹄疫ウイルス）で、その後E2A（ウマ鼻炎Aウイルス）、P2A（ブタテスコウイルス-1 2A）、およびT2A（those a assign ウイルス2A）も同定された。2Aが媒介する「自己切断」のメカニズムは、2AのC末端でグリシル-プロリルペプチド結合の形成をスキップするリボソームであることが発見された。

【0173】

具体的な場合には、ベクターは - レトロウイルス移入ベクターであってもよい。レトロウイルス移入ベクターは、pUC19 プラスミドなどのプラスミドに基づく骨格 (HindIII 制限酵素部位と EcoRI 制限酵素部位の間の大きな断片 (2.63 kb)) を含んでいてもよい。骨格は、5'LTR、psi パッケージング配列、および3'LTR を含むモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) からのウイルス構成成分を運ぶことができる。LTRは、レトロウイルスプロウイルスの両側に見られる長い末端反復であり、移入ベクターの場合には、(a) CD28 ヒンジ、(b1) CD28 膜貫通ドメインまたは (b2) DAP10 膜貫通ドメイン、および (c) DAP10 共刺激ドメイン、および任意選択で関連する構成成分を含むCARなどの、目的の遺伝子カーゴを括る。ヌクレ

オキャプシドによるパッケージングの標的部位である p s i パッケージング配列も、5' L T R と C A R コード配列に挟まれたシスに組み込まれている。よって、移入ベクターの一例の基本構造は、p U C 1 9 配列 - 5' L T R - p s i パッケージング配列 - 目的の遺伝子カーゴ - 3' L T R - p U C 1 9 配列のように構成することができる。このシステムはまた、レンチウイルス、アデノウイルス A A V、および非ウイルスプラスミドを含むがこれらに限定されない、他のウイルスおよび非ウイルスベクターにも適用することができる。

V. 細胞

【0174】

本開示は、(a) C D 2 8 ヒンジ、(b 1) C D 2 8 膜貫通ドメインまたは (b 2) D A P 1 0 膜貫通ドメイン、および (c) D A P 1 0 共刺激ドメインを含む遺伝子改変受容体をコードする少なくとも1つのベクターを保有し、少なくとも1つのサイトカインおよび/または少なくとも1つの自殺遺伝子もコードし得る、あらゆる種類の免疫細胞または幹細胞を包含する。一部の場合には、異なるベクターが自殺遺伝子および/またはサイトカインをコードするのに対し、C A R をコードする。N K 細胞を含む免疫細胞は、臍帯血(複数の供給源からプールされた臍帯血を含む)、末梢血、人工多能性幹細胞 (i P S C)、造血幹細胞(造血幹細胞)、骨髄、またはこれらの混合物に由来し得る。N K 細胞は、例えば、N K - 9 2 細胞などの細胞株由来であってもよいが、これらに限定されない。N K 細胞は、C D 5 6 + N K 細胞などの臍帯血単核球であってもよい。

10

【0175】

本開示は、従来 of T 細胞、ガンマ - デルタ T 細胞、N K T および不変 N K T 細胞、調節性 T 細胞、マクロファージ、B 細胞、樹状細胞、間葉系間質細胞 (M S C)、またはこれらの混合物を含む、あらゆる種類の免疫細胞または他の細胞を包含する。

20

【0176】

一部の場合には、細胞は、有効量のユニバーサル抗原提示細胞 (U A P C) の存在下で、任意の好適な比率を含めて拡大した。細胞は、例えば 1 : 2 の比率を含む、1 0 : 1 ~ 1 : 1 0、9 : 1 ~ 1 : 9、8 : 1 ~ 1 : 8、7 : 1 ~ 1 : 7、6 : 1 ~ 1 : 6、5 : 1 ~ 1 : 5、4 : 1 ~ 1 : 4、3 : 1 ~ 1 : 3、2 : 1 ~ 1 : 2、または 1 : 1 の比率で、U A P C とともに培養することができる。一部の場合には、N K 細胞は、I L - 2 の存在下、例えば 1 0 ~ 5 0 0、1 0 ~ 4 0 0、1 0 ~ 3 0 0、1 0 ~ 2 0 0、1 0 ~ 1 0 0、1 0 ~ 5 0、1 0 0 ~ 5 0 0、1 0 0 ~ 4 0 0、1 0 0 ~ 3 0 0、1 0 0 ~ 2 0 0、2 0 0 ~ 5 0 0、2 0 0 ~ 4 0 0、2 0 0 ~ 3 0 0、3 0 0 ~ 5 0 0、3 0 0 ~ 4 0 0、または 4 0 0 ~ 5 0 0 U / m L の濃度で拡大した。

30

【0177】

ベクターによる遺伝子改変後に、N K 細胞は直ちに融合されてもよいし、保存されてもよい。ある特定の態様では、遺伝子改変後に、細胞への遺伝子移入後約 1、2、3、4、5 日またはそれ以上の間に、バルク集団として数日間、数週間または数か月間、e x v i v o で細胞を伝播させることができる。さらなる態様では、トランスフェクタントはクローン化され、クローンは単一の組込み発現カセットもしくはエピソーム的に維持された発現カセットまたはプラスミドの存在を示し、C A R の発現が e x v i v o で拡大される。拡大のために選択されたクローンは、抗原発現標的細胞を特異的に認識し、溶解する能力を示す。組換え免疫細胞は、I L - 2、または共通のガンマ鎖に結合する他のサイトカイン(例えば、I L - 7、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 8、I L - 2 1、I L - 2 3 など)で刺激することによって拡大され得る。組換え免疫細胞は、人工抗原提示細胞による刺激によって拡大され得る。さらなる態様では、遺伝子改変された細胞は凍結保存することができる。

40

【0178】

本開示の実施形態は、本明細書に包含されるように、1つまたは複数の C A R および 1つまたは複数の自殺遺伝子を発現する細胞を包含する。N K 細胞は、具体的な実施形態では、1つまたは複数の C A R および 1つまたは複数の操作された非分泌性の膜結合 T N F

50

- アルファ変異ポリペプチドをコードする組換え核酸を含む。具体的な実施形態では、1つまたは複数のCARおよびTNF-アルファ変異ポリペプチドの発現に加えて、細胞は1つまたは複数の治療遺伝子産物をコードする核酸も含む。

【0179】

細胞は個体から直接得てもよく、寄託施設または他の保存施設から得てもよい。治療としての細胞は、細胞が治療として提供される個体に関して自家または自己であってもよい。

【0180】

細胞は、病状に対する治療を必要とする個体由来のものであってもよく、CAR、任意選択の自殺遺伝子、任意選択のサイトカイン、および任意選択の治療遺伝子産物を発現するように操作された後（例えば、養子細胞治療のための形質導入および拡大に関する標準的な技法を使用する）、その細胞の元の供給源である個体に戻ることができる。一部の場合には、その細胞は、後にその個体や別の個体に使用するために保存される。

10

【0181】

免疫細胞は細胞の集団に含まれてもよく、その集団は、大多数が、1つもしくは複数の受容体および/または1つもしくは複数の自殺遺伝子および/または1つもしくは複数のサイトカインで形質導入されていてもよい。細胞集団は、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%の、1つもしくは複数のCARおよび/または1つもしくは複数の自殺遺伝子および/または1つもしくは複数のサイトカインで形質導入された免疫細胞を含み得る。1つもしくは複数のCARおよび/または1つもしくは複数の自殺遺伝子および/または1つもしくは複数のサイトカインは、別々のポリペプチドであってもよい。

20

【0182】

免疫細胞は、特定の目的に関してモジュラーであることを意図して、1つもしくは複数のCARおよび/または1つもしくは複数の自殺遺伝子および/または1つもしくは複数のサイトカインを用いて産生されてもよい。例えば、CARおよび/または1つもしくは複数の自殺遺伝子および/または1つもしくは複数のサイトカインを発現する（または、その後の形質導入のために変異体をコードする核酸とともに流通した）細胞を、商業的流通のためも含めて作製してもよく、使用者は、意図する目的に応じて、1つまたは複数の目的の他の遺伝子（治療遺伝子を含む）を発現するようにそれらを改変してもよい。例えば、抗原陽性のがんまたは感染因子に感染した細胞を含む、抗原陽性の細胞を処置することに関心のある個人は、自殺遺伝子発現細胞（または異種サイトカイン発現細胞）を入手または作製し、それらを抗原特異的scFvを含む受容体を発現するように改変することができ、逆もまた可能である。

30

【0183】

特定の実施形態では、NK細胞が利用され、1つもしくは複数のCARおよび/または1つもしくは複数の自殺遺伝子および/または1つもしくは複数のサイトカインを発現する形質導入されたNK細胞のゲノムが改変されてもよい。ゲノムは、任意の方法で改変されてよいが、具体的な実施形態では、ゲノムは、例えば、CRISPR遺伝子編集によって改変される。細胞のゲノムは、任意の目的で細胞の有効性を増強するために改変されてもよい。

40

VI. 処置方法

【0184】

様々な実施形態では、罹患細胞または表面に所望のものを発現している他の細胞は、病状を有する個体における病状を改善する目的で、あるいは個体における病状のリスクを低減するかまたは重症度および/もしくは発症を遅延させる目的で、標的とされる。具体的な場合には、内因性抗原を発現しているがん細胞は、がん細胞を死滅させる目的で標的と

50

される。他の場合には、感染細胞を死滅させる目的で、感染因子に感染した細胞が標的とされる。

【0185】

特定の実施形態では、本明細書で企図されるようなCAR構築物、核酸配列、ベクター、免疫細胞など、および/またはそれらを含む医薬組成物は、がん性疾患などの疾患の予防、処置または改善のために使用される。特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、例えば、特定の抗原を発現し、固形腫瘍であってもなくてもよいがんを含む、がんを予防、改善および/または処置するのに特に有用であり得る。

【0186】

受容体が利用される免疫細胞は、特定の実施形態では、NK細胞、T細胞、ガンマデルタT細胞、アルファベータT細胞、またはNKTもしくは不変NKT(iNKT)、もしくは哺乳類の細胞療法用に操作された不変NKT細胞であってよい。細胞がNK細胞であるこのような場合には、NK細胞療法はいかなる種類のものであってもよく、NK細胞はいかなる種類のものであってもよい。特定の実施形態では、細胞は、1つもしくは複数のCARおよび/または1つもしくは複数の自殺遺伝子および/または1つもしくは複数のサイトカインを発現するように操作されたNK細胞である。具体的な実施形態では、細胞は、CARで形質導入されたNK細胞である。

10

【0187】

特定の実施形態では、本開示は、部分的に、標準的なベクターおよび/または遺伝子送達システムを使用して、単独または任意の組合せで投与され得、少なくとも一部の場合には、薬学的に許容される担体または賦形剤とともに投与され得る、CAR発現細胞、CAR構築物、CAR核酸分子およびCARベクターを企図する。特定の実施形態では、投与後に、核酸分子またはベクターは、対象のゲノムに安定的に組み込まれ得る。

20

【0188】

具体的な実施形態では、ある特定の細胞または組織に特異的でNK細胞において持続するウイルスベクターを使用することができる。好適な医薬担体および賦形剤は、当技術分野で周知である。本開示に従って調製された組成物は、上記の同定された疾患の予防または処置または遅延のために使用することができる。

【0189】

さらに、本開示は、腫瘍性疾患の予防、処置または改善のための方法であって、本明細書で企図されるCAR、核酸配列、ベクター、および/または本明細書で企図されるプロセスによって産生されるCARを発現する細胞の有効量を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法に関する。

30

【0190】

例示的なCAR細胞の組成物の投与のための可能な適応症は、例えば、B細胞悪性腫瘍、多発性骨髄腫、乳がん、膠芽腫、腎がん、膵臓がん、または肺がんを含む腫瘍性疾患を含むがん性疾患である。抗原標的化CAR細胞の組成物の投与の例示的な適応症は、抗原を発現するあらゆる悪性腫瘍を含むがん性疾患である。本開示の組成物の投与は、例えば、微小残存病変、早期がん、進行がん、および/または転移性がん、および/または難治性がんを含む、がんのすべてのステージ(I、II、III、またはIV)および種類に有用である。

40

【0191】

本開示は、免疫細胞を介して作用する他の化合物、例えば二重特異性抗体構築物、標的毒素または他の化合物との同時投与プロトコルをさらに包含する。本発明化合物の同時投与のための臨床レジメンは、他の構成成分の投与の前または後に、同時に同時投与することを包含し得る。特定の併用療法としては、化学療法、放射線、手術、ホルモン療法、他の種類の免疫療法が挙げられる。

【0192】

実施形態は、本明細書で定義されるCAR構築物、または本明細書に包含される構成成分、本明細書で定義される核酸配列、本明細書で定義されるベクター、および/または本

50

明細書で定義される宿主細胞（免疫細胞など）を含むキットに関する。特定の実施形態では、キットは、（a）CD28ヒンジ、（b1）CD28膜貫通ドメインまたは（b2）DAP10膜貫通ドメイン、および/または（c）DAP10共刺激ドメインをコードする核酸、またはこれらを増幅させるための好適なプライマーを含む。本開示のキットが、単独でまたはさらなる医薬と組み合わせ、医学的処置または介入を必要とする個体に投与される、本明細書で上記されている医薬組成物を含むこともまた企図される。

VII. 医薬組成物

【0193】

本開示の医薬組成物は、薬学的に許容される担体中に分散されたNK細胞を含む有効量の組成物を含む。「薬学的または薬理的に許容される」という語句は、例えばヒトなどの動物に投与された場合に、有害な、アレルギー性または他の望ましくない反応を生じない分子実体および組成物を適宜指す。本組成物を含む医薬組成物の調製は、参照により本明細書に組み込まれる、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第21版 Lippincott Williams and Wilkins、2005に例示されているように、本開示に照らして当業者に公知であろう。さらに、動物（例えば、ヒト）への投与のために、調製物が、FDA Office of Biological Standardsによって要求される無菌性、発熱原性、一般的な安全性および純度の基準を満たすべきであることが理解されるであろう。

【0194】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」には、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤（例えば、抗細菌剤、抗真菌剤）、等張化剤、吸収遅延剤、塩、防腐剤、薬物、薬物安定化剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、香味剤、染料、このような材料、およびこれらの組合せであって、当業者に公知のもの（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版 Mack Printing Company、1990、1289～1329頁を参照されたい）が含まれる。任意の従来のもので担体が有効成分と不適合である場合を除き、医薬組成物におけるその使用が企図される。

【0195】

医薬組成物は、固体、液体またはエアロゾルの形態で投与されるかどうか、および注射のような投与経路のために無菌である必要があるかどうかに応じて、異なる種類の担体を含むことができる。現在開示されている組成物は、静脈内、皮内、経皮、髄腔内、動脈内、腹腔内、経鼻、腔内、直腸内、局所、筋肉内、皮下、粘膜、経口的、局所的、局在的、吸入（例えば、エアロゾル吸入）、注射、注入、持続注入、局在化灌流により標的細胞を直接的に浸すこと、カテーテル経路、洗浄経路、クリーム中、脂質組成物（例えば、リポソーム）中、または当業者に公知であろう他の方法もしくはこれらの任意選択の組合せにより投与することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版 Mack Printing Company、1990を参照されたい）。

【0196】

NK細胞を含む組成物は、遊離塩基、中性または塩の形態で組成物に製剤化することができる。適切な場合、薬学的に許容される塩には、酸付加塩、例えば、タンパク質性組成物の遊離アミノ基で形成されるもの、例えば、塩酸もしくはリン酸のような無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸もしくはマンデル酸などの有機酸で形成されるものが含まれる。遊離カルボキシル基で形成される塩はまた、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムもしくは水酸化第二鉄などの無機塩基、またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジンもしくはプロカインなどの有機塩基から誘導することができる。製剤化されると、溶液は、剤形に適合した方法で、治療上有効な量だけ投与される。製剤は、注射溶液などの非経口投与用に製剤化されたもの、肺に送達するためのエアロゾル

10

20

30

40

50

、または薬物放出カプセルなどの食事性投与用に製剤化されたものなど、種々の剤形で容易に投与される。

【0197】

さらに本開示に従って、投与に好適な本開示の組成物は、不活性希釈剤を含むかまたは含まずに、薬学的に許容される担体中で提供される。担体は、同化可能であるべきであり、液体、半固体、すなわちペースト、または固体担体を含む。任意の従来の媒体、薬剤、希釈剤または担体が、レシピエントまたはそこに含有される組成物の治療効果に有害である場合を除き、本発明の方法を実践する際に使用するための投与可能な組成物におけるその使用は適切である。担体または希釈剤の例としては、脂肪、油、水、生理食塩水、脂質、リポソーム、樹脂、結合剤、充填剤など、またはこれらの組合せが挙げられる。組成物はまた、1つまたは複数の構成成分の酸化を遅らせるための種々の酸化防止剤を含んでもよい。さらに、微生物の作用の防止は、パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルまたはこれらの組合せを含むがこれらに限定されない、様々な抗細菌剤および抗真菌剤などの防腐剤によってもたらされ得る。

10

【0198】

本開示に従って、組成物は、任意の便利で実践的な方法、すなわち、溶液、懸濁液、乳化、混和、カプセル化、吸収などによって、担体と組み合わせられる。このような手順は、当業者にとって日常的である。

【0199】

本開示の具体的な実施形態では、組成物は、半固体または固体担体と組み合わせられるか、または十分に混合される。混合は、粉碎などの任意の便利な方法で行われ得る。治療活性の損失、すなわち胃での変性から組成物を保護するために、混合ステップで安定化剤を添加することもできる。組成物中で使用するための安定化剤の例としては、緩衝剤、グリシンおよびリジンなどのアミノ酸、デキストロース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトース、ソルビトール、マンニトールなどの炭水化合物などが挙げられる。

20

【0200】

さらなる実施形態では、本開示は、NK細胞および任意選択で水性溶媒を含む組成物を含む医薬脂質ビヒクル組成物の使用に関し得る。本明細書で使用される場合、「脂質」という用語は、特徴的に水に不溶性であり、有機溶媒で抽出可能な広範な物質のいずれかを含むように定義される。この広範なクラスの化合物は当業者に周知であり、「脂質」という用語は、本明細書で使用される場合、特定の構造に限定されるものではない。例としては、長鎖脂肪族炭化水素およびその誘導体を含む化合物が挙げられる。脂質は、天然に存在するものであっても、合成されたもの（すなわち、人為的に設計または生成されたもの）であってもよい。しかし、脂質は通常、生体物質である。生物学的脂質は当技術分野で周知であり、例えば、中性脂肪、リン脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン、リゾ脂質、グリコスフィンゴ脂質、糖脂質、スルファチド、エーテルおよびエステル結合脂肪酸を有する脂質、重合性脂質、およびこれらの組合せを含む。当然のことながら、本明細書に具体的に記載された化合物以外の化合物であって、当業者には脂質と理解されるものも、本発明の組成物および方法に包含される。

30

40

【0201】

当業者であれば、脂質ビヒクル中に組成物を分散させるために用いることができる様々な技法に精通しているであろう。例えば、NK細胞および抗体を含む組成物は、当業者に公知の任意の手段により、脂質を含む溶液中に分散されても、脂質と溶解させても、脂質と乳化させても、脂質と混合しても、脂質と組み合わせても、脂質と共有結合させても、脂質中に懸濁液として含有させても、ミセルもしくはリポソームを含有させるかもしくはそれと複合化させるか、またはそうでなければ脂質もしくは脂質構造と会合させてもよい。分散液は、リポソーム形成をもたらしてももたらさなくてもよい。

【0202】

50

動物患者に投与される本開示の組成物の実際の投与量は、体重、状態の重症度、処置される疾患の種類、以前のまたは同時の治療介入、患者の特質、および投与経路などの身体的および生理学的因子によって決定することができる。投与量および投与経路に応じて、好ましい投与量および/または有効量の投与回数は、対象の応答に応じて変化し得る。投与を担当する医師は、いずれにせよ、組成物中の有効成分の濃度および個々の対象に対する適切な用量を決定する。

【0203】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、少なくとも約0.1%の活性化合物を含んでもよい。他の実施形態では、活性化合物は、例えば、約2%~約75%の単位重量、または約25%~約60%、およびそこから誘導可能な任意の範囲を含んでもよい。当然のことながら、各治療上有益な組成物中の活性化合物の量は、化合物の任意の所与の単位用量において好適な用量が得られるように調製され得る。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品の貯蔵寿命、および他の薬理学的懸念などの因子は、このような医薬製剤を調製する当業者によって企図され、このようなものとして、種々の投与量および処置レジメンが望ましくあり得る。

10

【0204】

他の非限定的な例では、用量は、投与ごとに約1マイクログラム/kg/体重、約5マイクログラム/kg/体重、約10マイクログラム/kg/体重、約50マイクログラム/kg/体重、約100マイクログラム/kg/体重、約200マイクログラム/kg/体重、約350マイクログラム/kg/体重、約500マイクログラム/kg/体重、約1ミリグラム/kg/体重、約5ミリグラム/kg/体重、約10ミリグラム/kg/体重、約50ミリグラム/kg/体重、約100ミリグラム/kg/体重、約200ミリグラム/kg/体重、約350ミリグラム/kg/体重、約500ミリグラム/kg/体重~1000mg/kg/体重またはそれより多く、およびそこから誘導可能な任意の範囲も含み得る。本明細書に列挙された数から誘導可能な範囲の非限定的な例では、約5mg/kg/体重~約100mg/kg/体重、約5マイクログラム/kg/体重~約500ミリグラム/kg/体重などの範囲が、上記数に基づいて投与され得る。

20

【0205】

本開示のNK細胞を含む治療用組成は、注入、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、軌道内、移植、吸入、髄腔内、脳室内、または経鼻により投与できる。適切な投薬量は、処置される疾患の種類、疾患の重症度および経過、個体の臨床状態、個体の臨床歴および処置に対する応答、ならびに主治医の裁量に基づいて決定され得る。

30

【0206】

処置には様々な「単位用量」が含まれ得る。単位用量は、所定量の治療用組成物を含有することとして定義される。投与される量、ならびに特定の経路および製剤は、臨床技術に携わる者の判断能力の範囲内である。単位用量は、1回の注射として投与される必要はないが、一定期間にわたる連続注入を含んでいてもよい。一部の実施形態では、単位用量は、単回投与可能な用量を含む。

【0207】

特定の実施形態において、それを必要とする個体への送達のための用量は、少なくとも注入による場合を含め、105~1010細胞/kg/用量/週、及びそこから誘導可能な任意の範囲である。

40

【0208】

投与される量、すなわち、処置回数と単位用量の両方は、望まれる処置効果に依存する。有効用量は、特定の効果を達成するのに必要な量を指すと理解される。ある特定の実施形態における実践において、10mg/kg~200mg/kgの範囲の用量が、これらの薬剤の保護能力に影響を及ぼし得ることが企図される。よって、用量には、約0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、1

50

75、180、185、190、195、および200、300、400、500、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 mg/kg 、 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、または $\text{mg}/\text{日}$ 、またはそこから誘導可能な任意の範囲の用量が含まれることが企図される。さらに、このような用量は、1日の間に複数回、および/または複数日、複数週、または複数月に投与することができる。

【0209】

ある特定の実施形態では、医薬組成物の有効量は、約 $1\ \mu\text{M}$ ～ $150\ \mu\text{M}$ の血中レベルを提供し得るものである。別の実施形態では、有効用量は、約 $4\ \mu\text{M}$ ～ $100\ \mu\text{M}$ ；または約 $1\ \mu\text{M}$ ～ $100\ \mu\text{M}$ ；または約 $1\ \mu\text{M}$ ～ $50\ \mu\text{M}$ ；または約 $1\ \mu\text{M}$ ～ $40\ \mu\text{M}$ ；または約 $1\ \mu\text{M}$ ～ $30\ \mu\text{M}$ ；または約 $1\ \mu\text{M}$ ～ $20\ \mu\text{M}$ ；または約 $1\ \mu\text{M}$ ～ $10\ \mu\text{M}$ ；または約 $10\ \mu\text{M}$ ～ $150\ \mu\text{M}$ ；または約 $10\ \mu\text{M}$ ～ $100\ \mu\text{M}$ ；または約 $10\ \mu\text{M}$ ～約 $50\ \mu\text{M}$ ；または約 $25\ \mu\text{M}$ ～約 $150\ \mu\text{M}$ ；または約 $25\ \mu\text{M}$ ～約 $100\ \mu\text{M}$ ；または約 $25\ \mu\text{M}$ ～約 $50\ \mu\text{M}$ ；または約 $50\ \mu\text{M}$ ～約 $150\ \mu\text{M}$ ；または約 $50\ \mu\text{M}$ ～約 $100\ \mu\text{M}$ （またはそこから誘導可能な任意の範囲）の血中レベルを提供する。他の実施形態では、用量は、対象に投与される治療剤から生じる薬剤の以下の血中レベルを提供し得る：約、少なくとも約、または最大約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは $100\ \mu\text{M}$ 、またはそこから誘導可能な任意の範囲。ある特定の実施形態では、対象に投与される治療剤は、体内で代謝され、代謝治療剤となり、この場合、血中レベルはその薬剤の量を指す場合がある。あるいは、治療剤が対象によって代謝されない程度まで、本明細書で議論される血中レベルが、代謝されない治療剤を指す場合がある。

A．食事性組成物および製剤

【0210】

本開示の特定の実施形態では、NK細胞および抗体を含む組成物は、食事性経路を介して投与されるように製剤化される。食事性経路には、組成物が消化管と直接接触するすべての可能な投与経路が含まれる。具体的には、本明細書に開示される医薬組成物は、経口、頬側、直腸、または舌下に投与され得る。このようなものとして、これらの組成物は、不活性希釈剤とともに、または同化可能な食用担体とともに処方され得るか、またはハードもしくはソフトゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤に圧縮され得るか、または食餌に直接組み込まれ得る。

【0211】

ある特定の実施形態では、活性化合物は、賦形剤とともに組み込むことができ、摂取可能な錠剤、頬剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエハース剤などの形態で使用され得る（Mathiowitzら、1997；Hwangら、1998；米国特許第5,641,515号；同第5,580,579号および同第5,792,451号、それぞれ、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる）。錠剤、トローチ剤、残材、カプセル剤などはまた、以下を含有する場合がある：例えば、トラガントガム、アカシア、コーンスターチ、ゼラチンまたはこれらの組合せなどの結合剤；例えば、リン酸ニカルシウム、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムまたはこれらの組合せなどの賦形剤；崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸またはこれらの組合せ；滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム；甘味剤、例えばスクロース、ラクトース、サッカリンまたはこれらの組合せ；香味剤、例えばペパーミント、ウィンターグリーン油、チェリー香料、オレンジ香料など。投与単位形態がカプセルである場合、上記のタイプの材料に加えて、液体担体を含有してもよい。コーティン

グとして、またはそうでなければ投与単位の物理的形態を変更するために、様々な他の材料が存在してもよい。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセル剤は、シエラック、砂糖、またはその両方でコーティングされていてもよい。剤形がカプセル剤である場合、上記の種類の材料に加えて、液体担体などの担体を含み得る。ゼラチンカプセル、錠剤、または丸剤は腸溶性コーティングされていてもよい。腸溶性コーティングは、pHが酸性である胃または腸上部での組成物の変性を防止する。例えば、米国特許第5,629,001号を参照されたい。小腸に到達すると、そこでの塩基性pHがコーティングを溶解し、組成物が放出され、特殊な細胞、例えば、上皮性腸細胞およびパイエル板M細胞によって吸収されることを可能にする。エリキシルのシロップは、甘味剤としての活性化化合物スクロース、防腐剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、染料および香料、例えばチェリーまたはオレンジフレーバーを含み得る。当然のことながら、いずれかの剤形を調製する際に使用される任意の材料は、薬学的に純粋であり、用いられる量において実質的に無毒であるべきである。さらに、活性化化合物を徐放性調製物または製剤に組み込むことができる。

10

【0212】

経口投与のために、本開示の組成物は、代替的に、洗口剤、歯磨剤、頬錠剤、口腔スプレー、または舌下経口投与製剤の形態で、1つまたは複数の賦形剤とともに組み込まれ得る。例えば、ホウ酸ナトリウム溶液(Dobell's Solution)などの適切な溶媒に必要な量の有効成分を組み込んで、洗口剤を調製することができる。あるいは、有効成分を、ホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび炭酸水素カリウムを含むものなどの口腔溶液に組み込むか、または歯磨剤に分散させるか、または水、結合剤、研磨剤、香味剤、発泡剤および保湿剤を含み得る組成物に治療有効量で添加してもよい。あるいは、組成物を錠剤または溶液の形態にして、舌の下に置くか、またはそうでなければ口の中で溶かすこともできる。

20

【0213】

他の食事性投与様式に好適な追加の製剤としては、坐剤が挙げられる。坐剤は、直腸に挿入するための様々な重量および形状の固体剤形で、通常は薬用である。挿入後、坐剤は腔液中で軟化、融解または溶解する。一般に、坐薬の場合、従来の担体としては、例えば、ポリアルキレングリコール、トリグリセリドまたはこれらの組合せが挙げられる。ある特定の実施形態では、坐剤は、例えば、約0.5%~約10%、好ましくは約1%~約2%の範囲の有効成分を含む混合物から形成され得る。

30

B. 非経口組成物および製剤

【0214】

さらなる実施形態では、組成物は、非経口経路を介して投与され得る。本明細書で使用される場合、「非経口」という用語は、消化管を迂回する経路を含む。具体的には、本明細書に開示される医薬組成物は、例えば、静脈内、皮内、筋肉内、動脈内、髄腔内、皮下、または腹腔内に投与され得るが、これらに限定されない。米国特許第6,613,308号、同第5,466,468号、同第5,543,158号、同第5,641,515号、および同第5,399,363号(それぞれ、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる)。

40

【0215】

遊離塩基または薬理的に許容される塩としての活性化化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水中で調製することができる。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびこれらの混合物、および油中で調製することもできる。通常の保存および使用条件下では、これらの調製物は微生物の成長を防ぐために防腐剤を含む。注射用に好適な医薬形態としては、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液を即時に調製するための滅菌粉末が挙げられる(米国特許第5,466,468号、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる)。すべての場合には、その形態は無菌でなければならず、容易に注射できる程度に流動性でなければならず、製造および保存の条件下で安定でなければならず、細

50

菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（すなわち、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および/または植物油を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には必要な粒子径の維持により、および界面活性剤の使用により維持され得る。微生物の作用の防止は、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、チメロサルなどの様々な抗細菌剤および抗真菌剤によってもたらされ得る。多くの場合には、等張剤、例えば糖類または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、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組成物への使用によってもたらされ得る。

10

【0216】

例えば、水溶液での非経口投与では、必要であれば溶液を適切に緩衝化し、液体希釈剤を十分な生理食塩水またはグルコースでまず等張にする必要がある。これらの特定の水溶液は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、および腹腔内投与に特に好適である。これに関連して、用いることができる滅菌水性媒体は、本開示に照らして当業者に公知であろう。例えば、1回の投与量を等張NaCl溶液に溶解し、皮下注射液を加えるか、または注入予定部位に注射することができる（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1035～1038頁および1570～1580頁を参照されたい）。投与量は、処置を受ける対象の状態により、必然的に多少変動する。投与を担当する医師は、いずれにせよ、個々の対象に適切な用量を決定する。さらに、ヒトへの投与のために、調製物は、FDA Office of Biological Standardsによって要求される無菌性、発熱原性、一般的な安全性および純度の基準を満たすべきである。

20

【0217】

上記で列挙される様々な他の成分を用いて、適切な溶媒中に必要な量の活性化化合物を組み込み、必要に応じて、続いてる過滅菌することにより、滅菌注射用溶液を調製することができる。一般的に、分散液は、基本的な分散媒を含有する滅菌ビヒクルおよび上記に列記されたものからの必要とされる他の成分へと様々な滅菌された有効成分を組み込むことにより、調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合には、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥技法であり、これにより、事前に滅菌る過されたその溶液から有効成分プラスいずれかの追加の所望の成分の粉末が得られる。粉末組成物は、安定化剤の有無にかかわらず、例えば水または生理食塩水などの液体担体と組み合わせられる。

30

C. 種々の医薬組成物および製剤

【0218】

本開示の他の特定の実施形態では、NK細胞および抗体を含む活性化化合物組成物は、種々多様な経路、例えば、局所（すなわち、経皮）投与、粘膜投与（鼻腔内、膈内など）および/または吸入を介した投与のために製剤化され得る。

【0219】

局所投与のための医薬組成物は、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤または散剤などの薬用適用のために製剤化された活性化化合物を含み得る。軟膏剤には、局所適用のためのすべての油脂性、吸着性、エマルジョンおよび水溶性ベースの組成物が含まれ、一方、クリーム剤およびローション剤は、エマルジョンベースのみを含む組成物である。局所投与薬は、皮膚からの有効成分の吸着を促進するために、浸透促進剤を含有し得る。好適な浸透促進剤としては、グリセリン、アルコール、アルキルメチルスルホキシド、ピロリドンおよびルアロカプラムが挙げられる。局所調製物のための組成物に使用できる基剤としては、ポリエチレングリコール、ラノリン、コールドクリームおよびワセリン、ならびに任意の他の好適な吸収剤、エマルジョンまたは水溶性軟膏基剤が挙げられる。局所調製物には、有効成分を保存し、均質な混合物を提供するために、必要に応じて乳化剤、ゲル化剤、抗菌防腐剤も含まれ得る。本発明の経皮投与は、「パッチ」の使用からなることもある。例

40

50

えば、パッチは、1つまたは複数の活性物質を所定の速度で、一定期間にわたって連続的に供給することができる。本発明の経皮投与は、「パッチ」の使用も含み得る。例えば、パッチは、1つまたは複数の活性物質を所定の速度で、一定期間にわたって連続的に供給することができる。

【0220】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、点眼、鼻腔内スプレー、吸入、および/または他のエアロゾル送達ビヒクルによって送達され得る。鼻エアロゾルスプレーを介して組成物を肺に直接送達するための方法は、例えば、米国特許第5,756,353号および同第5,804,212号(それぞれ、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる)に記載されている。同様に、経鼻微粒子樹脂(Takenagaら、1998)およびリゾホスファチジルグリセロール化合物(米国特許第5,725,871号、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる)を使用する薬物の送達もまた、製薬技術において周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックスの形態での経粘膜薬物送達は、米国特許第5,780,045号(参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる)に記載されている。

10

【0221】

エアロゾルという用語は、液化または加圧されたガス推進剤中に分散された、細かく分割された固体の液体粒子のコロイド系を指す。吸入用の本発明の典型的なエアロゾルは、液体推進剤中の有効成分の懸濁液、または液体推進剤と好適な溶媒の混合物からなる。好適な推進剤には、炭化水素および炭化水素エーテルが含まれる。好適な容器は、推進剤の圧力要件によって異なる。エアロゾルの投与は、対象の年齢、体重ならびに症状の重症度および応答によって異なる。

20

VIII. 併用療法

【0222】

ある特定の実施形態では、本実施形態の組成物および方法は、免疫細胞集団(NK細胞集団を含む)を少なくとも1つの追加療法と組み合わせて含む。追加療法は、放射線療法、手術(例えば、乳腺腫瘍摘出術および乳房切除術)、化学療法、遺伝子療法、DNA療法、ウイルス療法、RNA療法、免疫療法、骨髄移植、ナノ療法、モノクローナル抗体療法、ホルモン療法、腫瘍溶解性ウイルス、またはこれらの組合せであり得る。追加療法はアジュバント療法またはネオアジュバント療法の形態であり得る。

30

【0223】

一部の実施形態では、追加療法は、低分子酵素阻害剤または抗転移剤の投与である。一部の実施形態では、追加療法は、副作用制限剤(例えば、抗悪心剤などの治療の副作用の発生および/または重症度を軽減することを意図した薬剤)の投与である。一部の実施形態では、追加療法は放射線療法である。一部の実施形態では、追加療法は手術である。一部の実施形態では、追加療法は放射線療法と手術との組合せである。一部の実施形態では、追加療法はガンマ線照射である。一部の実施形態では、追加療法は、PBK/AKT/mTOR経路、HSP90阻害剤、チュープリン阻害剤、アポトーシス阻害剤、および/または化学予防剤を標的とする療法である。追加療法は、当技術分野で公知の化学療法剤の1つまたは複数であってもよい。

40

【0224】

特定の実施形態では、本開示の本発明の細胞療法に加えて、個体は、外科手術、放射線、免疫療法(本開示の細胞療法以外)、ホルモン療法、遺伝子療法、化学療法などのうちの1つまたは複数を含む、がんに対する特定の追加療法を提供されてもよく、提供されてもよく、および/または提供される予定であってもよい。

【0225】

免疫細胞療法は、追加的ながん療法の前、その間、その後、または様々な組合せで投与することができる。投与間隔は、同時から、数分、数日、数週間と幅がある。免疫細胞療法が追加的治療剤とは別に患者に提供される実施形態では、一般に、各送達時期の間にかかりの期間が経過しないようにし、2つの化合物が依然として患者に有利な併用効果を発

50

揮できるようにする。このような例では、患者に抗体療法と抗がん治療を互いに約 12 ~ 24 時間または 72 時間以内、より詳細には互いに約 6 ~ 12 時間以内に提供し得ることが企図される。状況によっては、それぞれの投与の間に数日 (2、3、4、5、6、または 7) から数週間 (1、2、3、4、5、6、7、または 8) が経過するような処置の間を大幅に延長することが望ましい場合がある。

【0226】

様々な組合せを採用することができる。以下の例では、免疫細胞療法を「A」、抗がん剤療法を「B」とする：

A / B / A	B / A / B	B / B / A	A / A / B	A / B / B	B /
A / A	A / B / B / B	B / A / B / B			10
B / B / B / A	B / B / A / B	A / A / B / B	A / B / A / B	A	
/ B / B / A	B / B / A / A				
B / A / B / A	B / A / A / B	A / A / A / B	B / A / A / A	A	
/ B / A / A	A / A / B / A				

【0227】

本実施形態の任意の化合物または細胞療法の患者への投与は、もしあれば薬剤の毒性を考慮しながら、このような化合物の投与に関する一般的なプロトコルに従う。したがって、一部の実施形態では、併用療法に起因する毒性をモニタリングするステップが存在する。

A . 化学療法

20

【0228】

本実施形態に従って、多種多様な化学療法剤を使用することができる。「化学療法」という用語は、がんを処置するための薬物の使用を指す。「化学療法剤」は、がんの処置において投与される化合物または組成物を意味するために使用される。これらの薬剤または薬物は、細胞内での活性様式、例えば細胞周期に影響を及ぼすかどうか、またどの段階で影響を及ぼすかによって分類される。あるいは、DNAを直接架橋する能力、DNAにインターカレートする能力、核酸合成に影響を与えることによって染色体異常および有糸分裂異常を誘導する能力に基づいて、薬剤を特徴付けることができる。

【0229】

化学療法剤の例としては、チオテパおよびシクロホスファミドなどのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンなどのアルキルスルホネート；ベンゾドパ、カルボクオン、メツレドーパ (meturedopa)、およびウレドーパ (uredopa) などのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンエチオホスホルアミド、およびトリメチロールメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン (methylamelamine)；アセトゲニン (特に、プラタシンおよびプラタシノン)；カンプトテシン (合成類似体トポテカンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン；CC - 1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびピゼレシン合成類似体を含む)；クリプトフィシン (特に、クリプトフィシン 1 およびクリプトフィシン 8)；ドラスタチン；デュオカルマイシン (合成類似体、KW - 2189 および CB1 - TM1 を含む)；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、およびウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチンなどのニトロソ尿素；エネジイン系抗生物質 (例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシガンマ I I およびカリケアマイシンオメガ I I) などの抗生物質；ダイネマイシン A などのダイネマイシン；クロドロネートなどのビスホスホネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連するクロモプロテインエネジイン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウストラマイシ

50

ン (a u t h r a r n y c i n)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン (モルホリノ - ドキシソルピシン、シアノモルホリノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシン C、ミコフェノール酸、ノガラルニシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、およびゾルピシン；メトトレキサートおよび 5 - フルオロウラシル (5 - F U) などの代謝拮抗薬；デノプテリン、プテロプテリン、およびトリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、およびチオグアニンなどのプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、およびフロクスウリジンなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、およびテストラクトンなどのアンドロゲン；ミトタン、およびトリロスタンなどの抗アドレナリン薬；フロリン酸などの葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキセート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルホルミチン；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシンおよびアンサミトシンなどのメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K 多糖複合体；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2 , 2 ' , 2 " - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類 (特に、T - 2 毒素、ベラクリン A、ロリジン A およびアングイジン)；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド (「 A r a - C 」)；シクロホスファミド；タキソイド、例えば、バクリタキセルおよびドセタキセルゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチンなどの白金配位錯体；ピンブラスチン；白金；エトポシド (V P - 1 6)；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン (例えば、C P T - 1 1)；トポイソメラーゼ阻害剤 R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチルオルニチン (D M F O)；レチノイン酸などのレチノイド；カペシタピン；カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン、ゲムシタビエン、ナベルピン、ファルネシル - タンパク質転移酵素阻害剤、トランスプラチナム、および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。

B . 放射線療法

【 0 2 3 0 】

D N A 損傷を引き起こし、広く使用されてきた他の因子としては、一般に線として公知のもの、X 線、および / または腫瘍細胞への放射性同位体の方向付けられた送達が挙げられる。マイクロ波、陽子線照射 (米国特許第 5 , 7 6 0 , 3 9 5 号および同第 4 , 8 7 0 , 2 8 7 号) および U V 照射などの他の形態の D N A 損傷因子もまた企図される。これらの因子はすべて、D N A、D N A の前駆体、D N A の複製および修復、ならびに染色体のアセンブリーおよび維持に対して広範な範囲の損傷をもたらす可能性が最も高い。X 線の線量範囲は、長期の期間 (3 ~ 4 週) にわたる 1 日当たり 5 0 ~ 2 0 0 レントゲンの線量から単回の 2 0 0 0 ~ 6 0 0 0 レントゲンの線量の範囲に及ぶ。放射性同位体の線量範囲は広範に変動し、同位体の半減期、放出される放射線の強度および種類、ならびに新生物細胞による取込みに依存する。

10

20

類

30

40

50

C. 免疫療法

【0231】

当業者は、追加の免疫療法が、実施形態の方法と組み合わせて、または併用して使用され得ることを理解するであろう。がん処置の文脈において、免疫治療薬は、一般に、がん細胞を標的として破壊するための免疫エフェクター細胞および分子の使用に依拠する。リツキシマブ（RITUXAN（登録商標））はこのような例である。免疫エフェクターは、例えば腫瘍細胞表面の一部のマーカに特異的な抗体であり得る。抗体は単独で治療のエフェクターとして機能することもあれば、他の細胞を動員して実際に細胞殺滅に影響を及ぼすこともある。抗体はまた、薬物または毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）とコンジュゲートし、標的化剤として作用し得る。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞の標的と直接的または間接的に相互作用する表面分子を有するリンパ球であってもよい。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が含まれる。

10

【0232】

抗体-薬物コンジュゲートは、がん治療薬の開発における画期的なアプローチとして登場した。がんは世界の主要な死因の1つである。抗体-薬物コンジュゲート（ADC）は、殺細胞薬と共有結合により連結させたモノクローナル抗体（MAb）を含む。このアプローチでは、抗原標的に対するMAbの高い特異性と、非常に強力な細胞傷害性薬物が組み合わされ、その結果、抗原レベルが濃縮された腫瘍細胞にペイロード（薬物）を送達する「武装」MAbが得られる。薬物の標的送達はまた、正常組織における薬物曝露を最小限にし、毒性を減少させ、治療指数を向上させる。2011年にADCETRIS（登録商標）（ブレンツキシマブベドチン）、2013年にKADCYLA（登録商標）（トラスツマブエムタンシンまたはT-DM1）という2つのADC薬物がFDAから承認されたことで、このアプローチが有効であることが証明された。現在、がん処置のための様々な臨床試験段階にあるADC薬物候補は30を超える（Lealら、2014年）。抗体工学とリンカー-ペイロードの最適化がますます成熟するにつれて、新しいADCの発見と開発は、このアプローチにとって好適な新しい標的の同定および検証、ならびに標的化MAbの生成にますます依存している。ADC標的の2つの基準は、腫瘍細胞における発現レベルの上方調節/高水準化および強固な内在化である。

20

【0233】

免疫療法の一態様では、腫瘍細胞は、標的化に適する、すなわち、他の細胞の大部分には存在しない何らかのマーカを有していなければならない。多くの腫瘍マーカが存在し、これらのいずれもが本実施形態の文脈における標的化に対して好適であり得る。一般的な腫瘍マーカとしては、CD20、癌胎児抗原、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニン受容体、erbB、p155が挙げられる。免疫療法の代替的な態様は、抗がん作用と免疫刺激作用を組み合わせることである。IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、ガンマ-IFNなどのサイトカイン、MIP-1、MCP-1、IL-8などのケモカイン、FLT3リガンドなどの成長因子を含む免疫刺激分子も存在する。

30

【0234】

現在研究中または使用中の免疫療法の例は、免疫アジュバント、例えば、Mycobacterium bovis、Plasmodium falciparum、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物（米国特許第5,801,005号および同第5,739,169号；HuiおよびHashimoto、1998；Christodoulidesら1998）；サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、およびIL-1、GM-CSFおよびTNF（Bukowskiら、1998；Davidsonら、1998；Hellsstrandら、1998）；遺伝子療法、例えば、TNF、IL-1、IL-2、およびp53（Qinら、1998；Austin-WardおよびVillaseca、1998；米国特許第5,830,880号および同第5,846,945号）；ならびにモノクローナル抗体、例えば、抗CD20、抗ガングリオン

40

50

ドGM2、および抗p185 (Hollander、2012; Hanibuchiら、1998; 米国特許第5,824,311号)である。本明細書に記載の抗体療法とともに、1つまたは複数の抗がん治療が用いられ得ることが企図される。

【0235】

一部の実施形態では、免疫療法は免疫チェックポイント阻害剤である。免疫チェックポイントは、シグナル(例えば、共刺激分子)を上げるか、シグナルを下げるかのいずれかである。免疫チェックポイント阻害剤の標的となりうる抑制性免疫チェックポイントとしては、アデノシンA2A受容体(A2AR)、B7-H3(CD276としても公知)、BおよびTリンパ球減弱因子(BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4、CD152としても公知)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)、キラー細胞免疫グロブリン(KIR)、リンパ球活性化遺伝子-3(LAG3)、プログラム死1(PD-1)、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3(TIM-3)、およびT細胞活性化のVドメインIgサプレッサー(VISTA)。特に、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1軸および/またはCTLA-4を標的とする。

【0236】

免疫チェックポイント阻害剤は、低分子、組換え形態のリガンドまたは受容体などの薬物であってもよく、または特に、ヒト抗体などの抗体である(例えば、いずれも参照により本明細書に組み込まれる、国際特許公開WO2015016718; Pardoll、Nat Rev Cancer、12(4)、252~64頁、2012)。免疫チェックポイントタンパク質の公知の阻害剤またはその類似体を使用してもよく、特にキメラ化、ヒト化またはヒト形態の抗体を使用してもよい。当業者であれば分かるように、本開示で言及されるある特定の抗体には、代替および/または同等の名称が使用され得る。このような代替および/または同等の名は、本開示の文脈において交換可能である。例えば、ラムプロリズマブは、MK-3475およびペムプロリズマブという代替および同等の名でも公知であることが知られている。

【0237】

一部の実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1とそのリガンド結合パートナーとの結合を阻害する分子である。具体的な態様では、PD-1リガンド結合パートナーは、PDL1および/またはPDL2である。別の実施形態では、PDL1結合アンタゴニストは、PDL1とその結合パートナーとの結合を阻害する分子である。具体的な態様では、PDL1結合パートナーは、PD-1および/またはB7-1である。別の実施形態では、PDL2結合アンタゴニストは、PDL2とその結合パートナーとの結合を阻害する分子である。具体的な態様では、PDL2結合パートナーはPD-1である。アンタゴニストは、抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、またはオリゴペプチドであり得る。例示的な抗体は、米国特許US8735553号、同第US8354509号、および同第US8008449号に記載されており、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で提供される方法において使用するための他のPD-1軸アンタゴニストは、米国特許出願第US20140294898号、同第US2014022021号、および同第US20110008369号(すべて参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように当技術分野で公知である。

【0238】

一部の実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、抗PD-1抗体(例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体)である。一部の実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、およびCT-011からなる群より選択される。一部の実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、イムノアドヘシン(例えば、定数領域(例えば、免疫グロブリン配列のFc領域)に融合したPDL1またはPDL2の細胞外部分またはPD-1結合部分を含むイムノアドヘシン)である。一部の実施形態では、PD-1結合アンタゴニストはAMP-224である。ニボルマブ(MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558、およびOPDIVO

10

20

30

40

50

(登録商標)としても知られる)は、WO 2006/121168に記載の抗PD-1抗体である。MK-3475、Merck 3475、ランプロリズマブ、KEYTRUDA(登録商標)、SCH-900475としても知られるペンプロリズマブは、WO 2009/114335に記載の抗PD-1抗体である。hBATまたはhBAT-1としても公知のCT-011は、WO 2009/101611に記載されている抗PD-1抗体である。AMP-224は、B7-DCIgとしても公知であり、WO 2010/027827およびWO 2011/066342に記載のPDL2-Fc融合可溶性受容体である。

【0239】

本明細書で提供される方法で標的とすることができる別の免疫チェックポイントは、CTLA-4として公知の細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4)である。ヒトCTLA-4の完全なcDNA配列は、Genbank受託番号L15006を有する。CTLA-4はT細胞の表面に見られ、抗原提示細胞表面のCD80またはCD86に結合すると「オフ」スイッチとして働く。CTLA-4は免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ヘルパーT細胞の表面で発現し、T細胞に阻害性シグナルを伝達する。CTLA-4はT細胞の共刺激タンパク質であるCD28と類似しており、両分子とも抗原提示細胞上のCD80およびCD86(それぞれB7-1およびB7-2とも呼ばれる)に結合する。CTLA-4はT細胞に阻害性シグナルを伝達し、一方、CD28は刺激性シグナルを伝達する。細胞内のCTLA-4は調節性T細胞にも見られ、その機能にとって重要である可能性がある。T細胞受容体とCD28を介したT細胞の活性化は、B7分子に対する阻害性受容体であるCTLA-4の発現増加をもたらす。

【0240】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体(例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体)、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、またはオリゴペプチドである。

【0241】

本方法での使用に好適な抗ヒトCTLA-4抗体(またはそれに由来するVHおよび/またはVLドメイン)は、当技術分野で周知の方法を用いて生成することができる。あるいは、当技術分野で認識される抗CTLA-4抗体を使用することができる。例えば、以下に開示されている抗CTLA-4抗体:US 8,119,129、WO 01/14424、WO 98/42752;WO 00/37504(CP 675,206、トレメリムマブとしても公知;旧チチリムマブ)、米国特許第6,207,156号;Hurwitzら(1998)Proc Natl Acad Sci USA 95(17):10067~10071頁;Camachoら(2004)J Clin Oncology 22(145):抄録番号2505(抗体CP-675206);およびMokyrら(1998)Cancer Res 58:5301~5304頁は、本明細書に開示される方法において使用することができる。前述の各刊行物の教示は、参照により本明細書に組み込まれる。CTLA-4への結合についてこれらの当技術分野で認識された抗体のいずれかと競合する抗体もまた、使用することができる。例えば、ヒト化CTLA-4抗体は、国際特許出願第WO 2001014424号、同第WO 2000037504号、および米国特許第8,017,114号に記載されており、すべては参照により本明細書に組み込まれる。

【0242】

例示的な抗CTLA-4抗体は、イピリムマブ(10D1、MDX-010、MDX-101、およびYervoy(登録商標)としても公知)またはその抗原結合断片およびバリエーションである(例えば、WO 01/14424を参照されたい)。他の実施形態では、抗体は、イピリムマブの重鎖および軽鎖CDRまたはVRを含む。したがって、一実施形態では、抗体は、イピリムマブのVH領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインと、イピリムマブのVL領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインとを含む。別の実施形態では、抗体は、上述の抗体と同様に、CTLA-4上の同じエピトープ

と結合するために競合する、および/またはそれに結合する。別の実施形態では、抗体は、上述の抗体と少なくとも約90%の変領域アミノ酸配列同一性を有する(例えば、イピリムマブと少なくとも約90%、95%、または99%の変領域同一性)。

【0243】

CTLA-4をモジュレートするための他の分子には、米国特許第US5844905号、同第US5885796号、および国際特許出願第WO1995001994号および同第WO1998042752号(すべて参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているようなCTLA-4リガンドおよび受容体、ならびに参照により本明細書に組み込まれる米国特許第US8329867号に記載されているようなイムノアドヘンシが含まれる。

D. 手術

【0244】

がんを有する患者のおよそ60%が何らかの種類の手術を受けるが、これには予防手術、診断手術または病期分類手術、根治手術、および緩和手術が含まれる。治癒的手術には、がん性組織の全部または一部を物理的に除去、切除、および/または破壊する切除術が含まれ、本実施形態の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、および/または代替療法などの他の療法と組み合わせて使用することができる。腫瘍切除は、腫瘍の少なくとも一部を物理的に除去することを指す。腫瘍切除に加えて、手術による処置には、レーザー手術、冷凍手術、電気手術、および顕微鏡制御手術(Mohs'手術)が含まれる。

【0245】

がん性細胞、組織、または腫瘍の一部または全部を切除すると、体内に空洞が形成されることがある。灌流、直接注入、またはその領域への追加の抗がん治療などの局所適用によって処置が遂行され得る。このような処置は、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日ごと、または1、2、3、4、および5週間ごと、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12か月ごとに繰り返すことができる。これらの処置は、投与量も様々であり得る。

E. 他の薬剤

【0246】

処置の治療有効性を向上させるために、他の薬剤を本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用することができる。これらの追加の薬剤には、細胞表面受容体およびGAP接合部の上方調節に影響を及ぼす薬剤、細胞賦活剤および分化剤、細胞接着の阻害剤、アポトーシス誘導剤に対する増殖亢進細胞の感受性を高める薬剤、または他の生物剤が含まれる。GAP接合部の数を増加させることによる細胞間シグナリング伝達の増加は、隣接する過剰増殖細胞集団への抗過剰増殖効果を増加させるであろう。他の実施形態では、処置の抗過剰増殖有効性を改善するために、細胞賦活剤または分化剤を本実施形態のある態様と組み合わせて使用することができる。細胞接着の阻害剤は、本実施形態の有効性を改善するために企図される。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ(FAK)阻害剤およびロバスタチンである。抗体c225などの、アポトーシスに対する過剰増殖細胞の感受性を増加させる他の薬剤を、処置の有効性を改善するために本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用し得ることがさらに企図される。

IX. 本開示のキット

【0247】

本明細書に記載される組成物のいずれもがキットに含まれ得る。非限定的な例では、細胞、細胞を産生するための試薬、ベクター、ならびにベクターおよび/またはそれらの構成成分を産生するための試薬が、キットに含まれ得る。ある特定の実施形態では、NK細胞はキット中に含まれ得、それらは、(a)CD28ヒンジ、(b1)CD28膜貫通ドメインまたは(b2)DAP10膜貫通ドメイン、および(c)DAP10共刺激ドメイン、任意選択のサイトカイン、または任意選択の自殺遺伝子を含むCARを発現しているもよく、または未だ発現していなくてもよい。このようなキットは、細胞を操作するため

10

20

30

40

50

の1つまたは複数の試薬を有していても有していなくてもよい。このような試薬には、例えば、低分子、タンパク質、核酸、抗体、緩衝剤、プライマー、ヌクレオチド、塩、および/またはこれらの組合せが含まれる。1つもしくは複数のCAR、自殺遺伝子産物、および/またはサイトカインをコードするヌクレオチドをキットに含めることができる。モノクローナル抗体を含むサイトカインまたは抗体などのタンパク質がキットに含まれてもよい。操作されたCAR受容体の構成成分またはすべてをコードするヌクレオチドは、同じものを生成するための試薬を含め、キットに含まれてもよい。

【0248】

特定の態様では、キットは、本開示のNK細胞療法に加えて、別のがん療法も含む。一部の 경우에는、キットは、細胞療法の実施形態に加えて、例えば化学療法、ホルモン療法、および/または免疫療法などの第2のがん療法も含む。キットは、個人の特定のがんに合わせて調整することができ、個人のためのそれぞれの第2のがん療法を含む。

【0249】

キットは、本開示の組成物を好適にアリコートしたものを含んでもよい。キットの構成成分は、水性媒体中または凍結乾燥形態のいずれかでパッケージングされ得る。キットの容器手段は、一般に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジまたは他の容器手段を含み、その中に構成成分を入れることができ、好ましくは、好適にアリコートされ得る。キット中に2つ以上の構成成分が含まれる場合、キットは一般的に第2、第3または他の追加の容器を含み、そこに追加の構成成分を別々に入れることができる。しかし、構成成分の様々な組合せがバイアルに含まれていてもよい。本発明のキットはまた、典型的には、商業的販売のために、組成物および任意選択の他の試薬容器を密閉して含有するための手段を含む。このような容器には、所望のバイアルが保持される射出成形またはブロー成形プラスチック容器が含まれ得る。

X. 実施例

【実施例】

【0250】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下に続く実施例において開示される技術は、本発明の実践において良好に機能することが本発明者によって発見された技法を表すものであり、よって、その実践のための好ましい方式を構成するものと考えられることができることを、当業者は認識すべきである。しかしながら、当業者は、本開示に照らして、開示されている特定の実施形態で多くの変更を加えることができ、それでもなお、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、同様または類似の結果を得ることができることを認識すべきである。

実施例 1

【0251】

シグナル伝達が改善されたCAR構築物構成成分

図1A~図1Bは、DAP10シグナル伝達ドメインがCD5 CAR-NK細胞に活性化型表現型を付与することを実証し、マスサイトメトリーパネルを使用して表現型を示した。各データポイントに2次元または3次元マップ内の位置を与えることによって高次元データを可視化するための統計的方法であるt分布型確率的近傍埋め込み法(TSNE)を使用すると、非形質導入NK細胞(左)と、IgGヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、DAP10、およびCD3ゼータを含むCD5 CARを発現するNK細胞(CD5 CAR-NK CD28 TMDAP10 CD3z)と比較して、異なるクラスターが生成される(図1A)。CARCD5 NK細胞で発現した2つの新しいクラスター、クラスター8および11は、丸と長方形で強調されている。図1Bのヒートマップは、各クラスター(Y軸に示される)における様々なマーカー(X軸に示される)の正規化された発現を示す。クラスター#8と#11で高発現している活性化、細胞傷害性、成熟マーカーを青色の長方形で強調表示した。これは、DAP10を形質導入したNK細胞が、非形質導入NK細胞には存在しない2つの集団またはクラスターを有することを示す。これらのクラスターは、例えばグランザイムB、パーフォリンなどの活性化の高いマーカーを発現するN

K細胞を含有する。

【0252】

図2A～図2Cは、DAP10共刺激ドメインを有するCD5 CAR-NK細胞が、複数のエフェクターサイトカインおよびケモカインを産生することが可能であり、強化された多機能性を示すことを実証する。図2Aは、異なるCD5 CAR-NK細胞と非形質導入(NT)NK細胞とを比較した、DAP10共刺激ドメインを有するCD5 CAR-NK細胞の多機能性を示すアイソプレクシス単一細胞シークレームデータを実証する。CD5 CAR#5(IgGヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、DAP10、およびCD3zを含む)は、一度に2、3、4、または5+のタンパク質を分泌する単一細胞のパーセンテージが最も高く、最も高い多機能性を示す。図2Bは、非形質導入(NT)NK細胞と比較した、異なるCD5 CAR-NK細胞間の多機能性強度指数を示す棒グラフを提供する。ここで、CD5 CAR#5も、エフェクターおよび化学誘引性サイトカインの割合が最も高く、最も高い多機能性を示す。多機能性のヒートマップは、DAP10共刺激ドメインを有するCD5 CAR-NK細胞が、単一細胞レベルでサイトカインの様々な組合せを分泌する能力が最も高いことを例証する(図2C)。

10

【0253】

DAP10 TMとDAP10共刺激ドメインの両方を有するCD5 CAR-NK細胞は、Incucyteの殺滅アッセイにおいて複数回の再負荷を行った後も、CD5+T-ALL細胞株(CCRF)を死滅させ続ける(図3A～図3C)。Incucyteの殺滅アッセイの再負荷試験の1つの概略図を図3Aに提供する。様々なCD5 CAR-NK細胞条件間の各腫瘍再負荷(ピンク色の矢印で示す)後の赤色の数(生きた腫瘍数の指標)の測定値を図3Bに提供する。各腫瘍再負荷(ピンクの矢印で示したタイミング)後の、腫瘍量の尺度であるパーセントコンフルエンスを図3Cに提供する。これらのデータは、DAP10 TMおよびDAP10共刺激ドメインを有するCD5 CAR-NK細胞(四角を付した赤線で表される)が、他のCD5 CAR-NK細胞の設計と比較して、およびNT-NK細胞と比較して、および無関係なCD19 CAR-NK細胞と比較して、複数回の再負荷後もCD5+T-ALL細胞株(CCRF)を死滅させ続けることを示す。

20

【0254】

DAP10 TMおよびDAP10共刺激ドメインを有するCD5 CAR-NK細胞は、様々なCD5 CAR-NK細胞の酸素消費率(OCR)および細胞外酸性化率(ECAR)を測定するツツノオトシゴ代謝アッセイに基づいて、他の構築物設計と比較して高い代謝適合性を示す(図4A～4C)。図4Aでは、様々なCD5 CAR-NK細胞設計間のOCRを、非形質導入(NT)NK細胞と比較した。様々なCD5 CAR-NK細胞設計間のECARを非形質導入(NT)NK細胞と比較した(図4B)。これらのデータは、DAP10 TMおよびDAP10共刺激ドメインを有するCD5 CAR-NK細胞について、他の設計と比較して、またNT-NK細胞と比較して、有意に高いOCRを示し、さらに同じ構築物は、より高い代謝適合性を付与する最も高いECARを有する。

30

【0255】

図5A～図5Cは、DAP10共刺激ドメインを有するCD5 CAR-NK細胞が、CD5+マントル細胞リンパ腫のPDXマウスモデルにおいて腫瘍制御を改善することを示す。腫瘍単独(左)と腫瘍+CD5 CAR-NK(右)を皮下腫瘍に受けたマウスの皮下腫瘍におけるCD45+CD5+細胞の絶対数が示される(図5A)。図5Bは、腫瘍単独(左)と腫瘍+CD5 CAR-NK(右)を脾臓に受けたマウスの皮下腫瘍におけるCD45+CD5+細胞の絶対数を示す棒グラフを提供する。腫瘍単独(左)と腫瘍+CD5 CAR-NK(右)を骨髄に受けたマウスの皮下腫瘍におけるCD45+CD5+細胞の絶対数が示される(図5C)。

40

【0256】

図6A～図6BはDAP10共刺激ドメインを有するCD27 CAR-NK細胞は、

50

急性骨髄性白血病のNSGマウスモデル（ホタルルシフェラーゼ（FFLuc）が形質導入されたTHP-1）における腫瘍制御および生存を改善することを実証する。図6Aでは、一連のバイオルミネッセンスイメージング（BLI）により、様々なマウス群間での腫瘍負荷をTHP-1 FFLucの発光として示す。DAP10共刺激ドメインがCD27 CAR-NK細胞のin vivo効力を改善することを示す、マウスの様々な群の経時的生存を示す生存曲線が図6Bに提供される。

実施例 2

【0257】

CD28ヒンジ-CD28膜貫通ドメイン-DAP10共刺激ドメインCARの優位性
本実施例は、CD28ヒンジを含む様々な構築物、CD28膜貫通ドメインを含む構築物、およびDAP10共刺激ドメインを含む構築物を含む、特徴付けのための特定のCAR構築物に関する。特定の一実施形態では、CD28ヒンジ、CD28膜貫通ドメイン、およびDAP10共刺激ドメインを含んでなるCAR構築物について活性が提供される。

10

【0258】

図7Aは、様々な構築物の同定および対応する形質導入効率（図7B）を例示する。CB-NK細胞に、図7Aに示されるように、様々なCD5 CAR構築物で形質導入し、形質導入効率をフローサイトメトリーによって測定した。導入効率は、陽性細胞のパーセントに基づく（図7B）。

【0259】

図8は、様々なCD5構築物をマウスに注射する実験計画の一例と、それに対応するタイムラインを提供する。この概略図は、標的としてのTリンパ芽球様細胞株CCRF-CEMに対する様々なCD5 CAR NK細胞のin vivo抗腫瘍活性の試験を示す。

20

【0260】

図9Aおよび図9Bは、IgG1ヒンジ細胞を有する抗CD5 CAR NKで処置したマウスが、NT NK細胞および腫瘍単独よりも有意に長く生存することを示す。CD5 CAR NK細胞は、T-急性リンパ性白血病のマウスモデルにおいて腫瘍負担を低減した。ホタルルシフェラーゼ（FFLuc）を形質導入したCCRF-CEM細胞に、 1×10^5 / マウスでマウスに注射し、各群間でバイオルミネッセンスイメージングでモニターした。処置群のマウスに、腫瘍注射の2日後にそれぞれのNK CAR細胞3Mを注射した。各群のマウスのバイオルミネッセンスイメージ（図9A）、およびルシフェラーゼシグナルの定量化（図9B）は、IgG1ヒンジを有する様々なCD5 NK CARを受けたマウスが、腫瘍単独、NT NK細胞と比較して、CCRF-CEM腫瘍制御の増強を示したが、NK細胞の持続性がないため、時間経過とともに腫瘍に屈したことを示す。

30

【0261】

図10Aおよび図10Bは、CD28ヒンジを有する抗CD5 CAR NKで処置したマウスが、腫瘍単独、NT NK細胞、およびIgG1ヒンジを有するCD5 CAR NK細胞と比較して、腫瘍負荷を有意に低減することを実証する。CD5 CAR NK細胞は、T-急性リンパ性白血病のマウスモデルにおいて腫瘍負担を低減した。ホタルルシフェラーゼ（FFLuc）を形質導入したCCRF-CEM細胞に、 1×10^5 / マウスでマウスに注射し、各群間でバイオルミネッセンスイメージングでモニターした。処置群のマウスに、腫瘍注射の2日後にそれぞれのNK CAR細胞3Mを注射した。各群のマウスのバイオルミネッセンスイメージ（図10A）、およびルシフェラーゼシグナルの定量化（図10B）は、CD28ヒンジを有する様々なCD5 NK CARを受けたマウスが、腫瘍単独、NT NK細胞およびIgG1ヒンジを有するCD5 NK CARと比較して、CCRF-CEM腫瘍制御の増強を示したことを示す。さらに、DAP10共刺激ドメインのCD5 NK CARは、他の共刺激ドメインと比較して、腫瘍制御を有意に改善した。

40

実施例 3

【0262】

50

DAP10シグナル伝達を有するCD5 CAR-NK細胞は、トランスクリプトーム、エピジェネティック、およびプロテオミクスレベルで、高い増殖能力、代謝活性およびメモリー特徴のシグネチャーを示す。

CD28膜貫通(TM)ドメインおよびDAP10共刺激ドメインとCD3zシグナル伝達ドメインを含むCD5 CAR構築物(CD28TMDAP10CD3)は、他の共刺激分子を組み込んだCD5 CAR-NK細胞構築物の他の例よりも優れた性能を示し、優れた*in vitro*および*in vivo*抗腫瘍活性、多機能性および代謝適性の増強、ならびに*in vitro*での複数回の腫瘍再負荷後の機能消耗の少なさを示す。DAP10シグナル伝達がなぜCAR-NK細胞にこのような有意な利点をもたらしているのかをさらに特徴付けるために、本発明者らは、DAP10-CD3シグナル伝達を有するCD5 CAR-NK細胞を、共刺激ドメインなしで設計されたCD5 CAR-NK細胞(CD3シグナルのみ)および同じドナーから生成された非形質導入(NT)NK細胞と比較して、単一細胞RNA配列決定(scRNAseq)、単一細胞ATAC配列決定(scATACseq)および逆相タンパク質アレイ(RPPA)を行った。単一細胞のトランスクリプトームレベルでは、scRNAseqデータのパスウェイエンリッチメント解析により、DAP10シグナル伝達がCAR-NK細胞に、E2F標的およびG2Mチェックポイント経路、ならびにIL-2/STAT5シグナル伝達によって証明された優れた増殖能、ならびにMyc、mTORC1、および酸化リン酸化などの代謝経路のエンリッチメントによって証明された代謝活性の増強を付与することが示された(図11)。エピジェネティックなレベルでは、scATACseqデータから、DAP10-CD3zシグナルドメインを有するCD5 CAR-NK細胞が、それぞれ記憶形成と消耗抵抗性に関連するAP-1複合体およびBATF転写因子のエンリッチメントを示すことが示される(図12)。プロテオミクスレベルでは、RPPAデータのパスウェイエンリッチメント解析により、CD5標的抗原で刺激した後に、DAP10シグナルがCAR-NK細胞の増殖能とサイトカイン産生能(ITGAおよびINSRタンパク質経路)を高めることが示され、トランスクリプトームの結果が裏付けられ、幹細胞の可能性を提供し(COP5経路)、解糖系とミトコンドリアの両レベルで代謝活性を増強し(GAPDHおよびPARK7経路)、膜の分極化と標的細胞により免疫シナプスを形成する能力を強化し(Cav1経路)、記憶の可能性を付与する(FOXO1経路)(図13Aおよび図13B)。

実施例 4

【0263】

DAP10シグナル伝達を有するCD5 CAR-NK細胞は腫瘍再負荷後も持続し、IN VIVOでメモリー応答の証拠を示す。

CAR-NK細胞は、腫瘍の再負荷後、*in vivo*でメモリー反応を開始する能力を評価された。CD5+ T-ALL細胞株であるCCRF-CEMの十分に確立されたNSGマウスモデルを使用した。CCRF-CEM腫瘍細胞株に、ホタルルシフェラーゼとGFPを形質導入し(CCRF-Ffluc-GFP)、それぞれバイオルミネセンスイメージング(BLI)とフローによって腫瘍成長をモニターできるようにした。マウスに-1日目に放射線照射し(225cGy)、0日目に、マウスごとにCCRF-Ffluc腫瘍細胞10万個を静脈内注射した。2日目に、処置群は、DAP10シグナル伝達を有するCD5 CAR-NK細胞 5×10^6 個の静脈内注射を受けた。CCRF-CEM腫瘍注射後93日目に採血し、ヒトNK細胞(hCD45+CD56+GFP-)のパーセンテージを評価した。100日目に、治癒し、BLIまたはフローで腫瘍の証拠を示さなかったマウスに、50,000個のCCRF-CEM腫瘍細胞を再負荷した。1週間後(107日目)に、ヒトNK細胞のパーセンテージをチェックするために再び採血した。図14Aおよび14Bに見られるように、腫瘍の再負荷後、血液中のヒトNK細胞(hCD45+CD56+GFP-)のパーセンテージは13%から91%に増加し、CAR-NK細胞が*in vivo*で腫瘍の再負荷に対してメモリー応答を開始することができることを示している。

10

20

30

40

50

参照文献

【0264】

以下の参照文献は、それらが本明細書に記載されたものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する限りにおいて、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

【0265】

1. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439~448頁。

【0266】

2. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531~2544頁。

【0267】

3. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380(1):45~56頁。

【0268】

4. Hartmann J, Schussler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells - challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med*. 2017;9(9):1183~1197頁。

【0269】

5. Daher M, Rezvani K. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering. *Curr Opin Immunol*. 2018;51:146~153頁。

【0270】

6. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:283頁。

【0271】

7. Liu E, AS, Kerbaui L, et al. GMP-compliant universal antigen presenting cells (uAPC) promote the metabolic fitness and antitumor activity of armored cord blood CAR-NK cell. *Front Immunol* doi:10.3389/fimmu.2021.626098. 2021。

【0272】

本明細書において開示され、特許請求される方法のすべては、本開示に照らして過度の実験を行うことなくなされ、実行され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態の観点から記載されてきたが、本発明の概念、趣旨および範囲から逸脱することなく、本方法におよび本明細書に記載の方法のステップまたはステップの順序に、変形を適用し得ることは当業者には明らかであろう。より詳細には、化学的および生理学的に関連するある特定の薬剤を、本明細書に記載の薬剤の代わりに使用しても、同じまたは類似の結果が得られることは明らかであろう。当業者に明らかなこのような類似の代替物および改

10

20

30

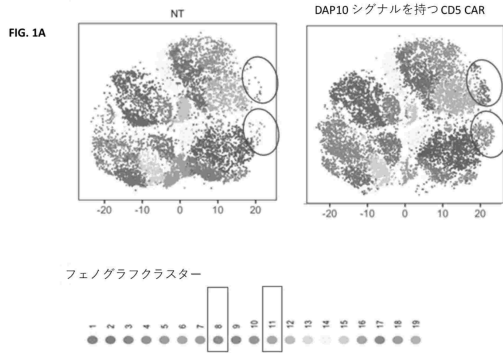
40

50

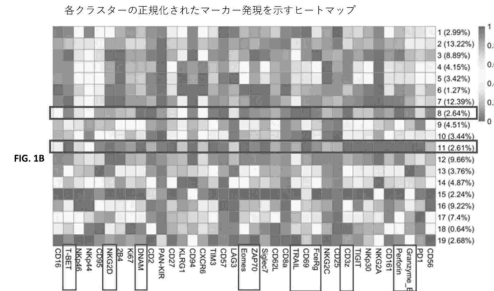
変はすべて、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨、範囲および概念の範囲内であるとみなされる。

【 図面 】

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



10

【 図 2 A 】

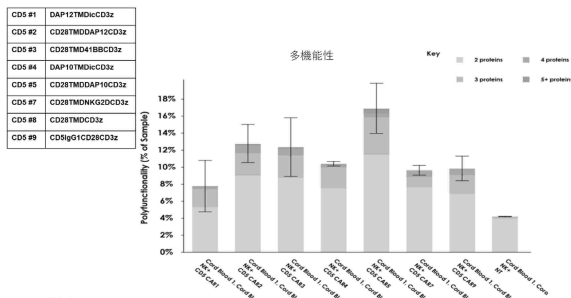


FIG. 2A

【 図 2 B 】

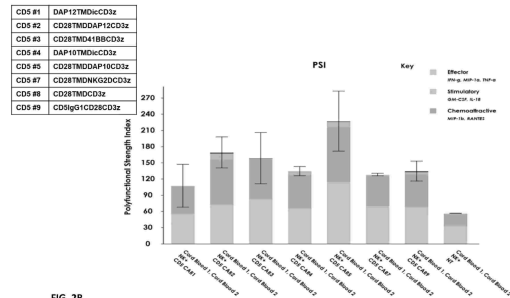


FIG. 2B

20

【 図 2 C 】

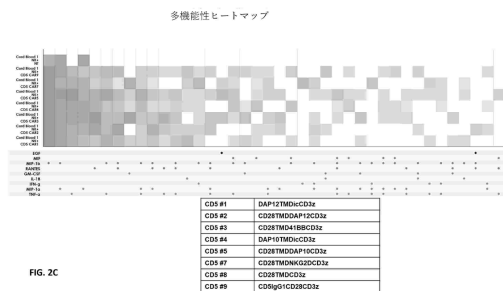


FIG. 2C

【 図 3 A 】

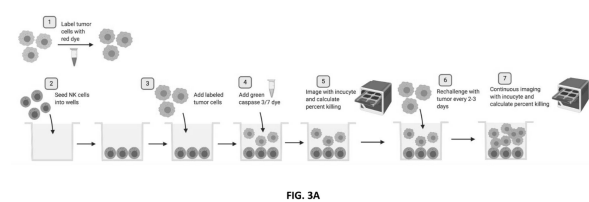


FIG. 3A

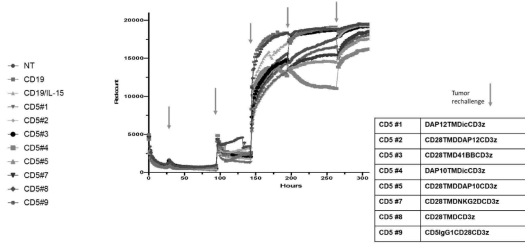
30

40

50

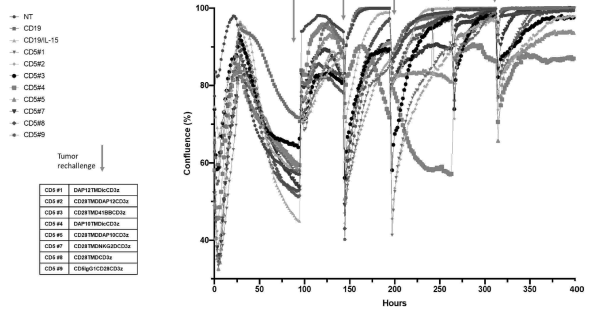
【 3 B 】

FIG. 3B



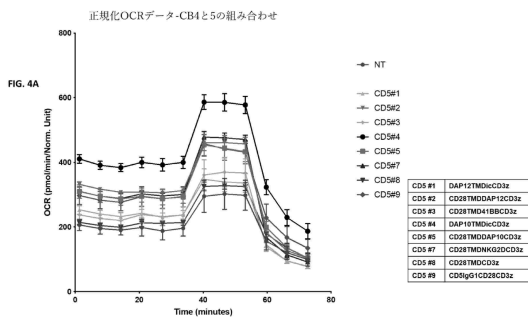
【 3 C 】

FIG. 3C

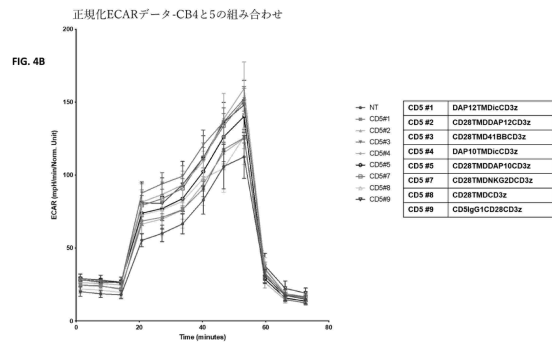


10

【 4 A 】



【 4 B 】



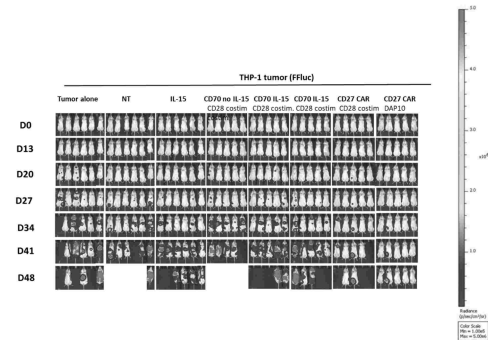
20

【 5 A - C 】



【 6 A 】

FIG. 6A



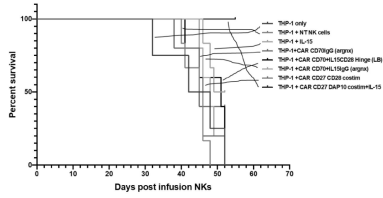
30

40

50

【 6 B 】

FIG. 6B



【 7 A - B 】

ID	Hinge	TM	Costim
LTR-SP-IgG1-CDS41	igG1	DAP12	DAP12 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS42	igG1	CD28	CD28 DAP12 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS43	igG1	DAP12	DAP12 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS44	igG1	DAP12	DAP12 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS45	igG1	DAP12	DAP12 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS46	igG1	DAP12	DAP12 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS47	igG1	CD28	CD28 NKGD2 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS48	igG1	CD28	CD28 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS49	igG1	CD28	CD28 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS510	CD28	CD28	DAP10 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS511	CD28	DAP10	DAP10 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS512	CD28	CD28	DAP12 CD28 2A IL-15 LTR
LTR-SP-IgG1-CDS513	CD28	CD28	CD28 2A IL-15 LTR

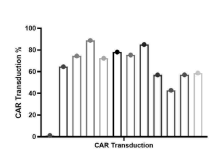


FIG. 7B

FIG. 7A

10

【 8 】

Experiment #1-CCR-F-CEM

Groups	Conditions-IgG1 Hinge	Groups	Conditions-CD28 Hinge
1	CCR-F-CEM-FFluo alone	10	CCR-F-CEM-FFluo + CDS41 (CD28TMDAP12Costim)
2	CCR-F-CEM-FFluo + NT	11	CCR-F-CEM-FFluo + CDS41 (DAP10TMDAP12Costim)
3	CCR-F-CEM-FFluo + CDS41 (DAP12TMDAP12Costim)	12	CCR-F-CEM-FFluo + CDS412 (CD28TMDAP12Costim)
4	CCR-F-CEM-FFluo + CDS42 (CD28TMDAP12Costim)	13	CCR-F-CEM-FFluo + CDS413 (CD28TMDAP12Costim)
5	CCR-F-CEM-FFluo + CDS43 (CD28TMDAP12Costim)		
6	CCR-F-CEM-FFluo + CDS44 (DAP10TMDAP12Costim)		
7	CCR-F-CEM-FFluo + CDS45 (CD28TMDAP12Costim)		
8	CCR-F-CEM-FFluo + CDS46 (CD28TMDAP12Costim)		
9	CCR-F-CEM-FFluo + CDS49 (CD28TMDAP12Costim)		

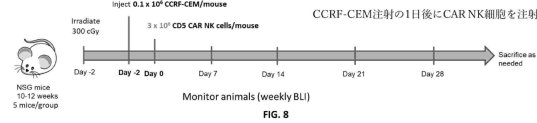


FIG. 8

【 9 A 】

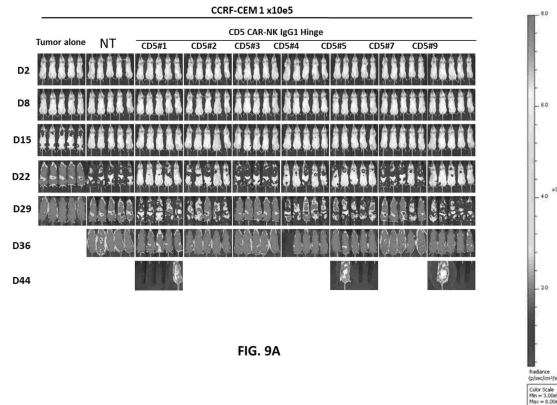
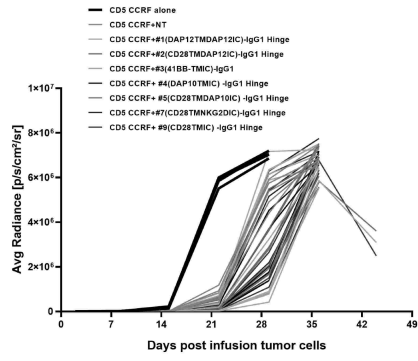


FIG. 9A

20

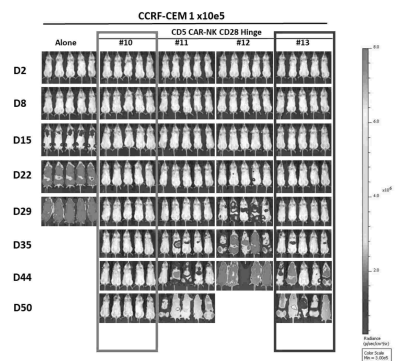
【 9 B 】

FIG. 9B



【 10 A 】

FIG. 10A



30

40

50

【 図 1 3 B 】

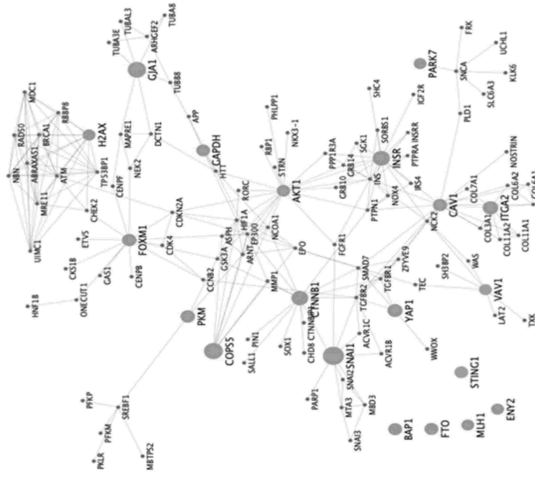
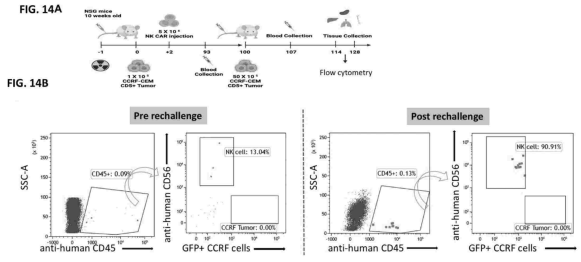


FIG. 13B

【 配列表 】

2024539126000001.xml

【 図 1 4 】



10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/78331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC - INV. A61K 38/17; A61P 35/00; C07K 14/705; C07K 16/30 (2022.01) ADD. CPC - INV. A61K 38/1774; A61P 35/00; C07K 14/70503; C07K 14/70521; C07K 16/30 ADD. C07K 2317/53; C07K 2317/622; C07K 2319/02	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document	
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	WO 2019/036724 A2 (CELDARA MEDICAL LLC) 21 February 2019; paragraphs [23, 112, 165, 197, 218]; SEQ ID NO: 146, page 175; SEQ ID NO: 147, page 176
Y	WO 2021/055349 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 25 March 2021; abstract; SEQ ID NO: 78
E,Y	WO 2022/251504 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 01 December 2022
E,Y	WO 2022/221548 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 20 October 2022
	Relevant to claim No.
	1-7
	8
	8
	1-8
	1-8
<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	"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
"D" document cited by the applicant in the international application	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 21 December 2022 (21.12.2022)	Date of mailing of the international search report FEB 23 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/78331

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 13ter.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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/78331

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: 10

- 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.: 9-48
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

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. 30
- 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. 40
 - 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.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	

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,N
E,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,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,I
T,JM,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,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5、ユ
ー・ディー・エム・ディー・アンダーソン キャンサー センター内

(72)発明者 ダハール、メイ
アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5、ユ
ー・ディー・エム・ディー・アンダーソン キャンサー センター内

(72)発明者 バサール、ラフェット
アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5、ユ
ー・ディー・エム・ディー・アンダーソン キャンサー センター内

(72)発明者 アチャリヤ、スニル
アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5、ユ
ー・ディー・エム・ディー・アンダーソン キャンサー センター内

(72)発明者 ウプレティ、ナディマ
アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5、ユ
ー・ディー・エム・ディー・アンダーソン キャンサー センター内

(72)発明者 ヌニェス コルテス、アナ カレン
アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5、ユ
ー・ディー・エム・ディー・アンダーソン キャンサー センター内

(72)発明者 エンスリー、エミリー
アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5、ユ
ー・ディー・エム・ディー・アンダーソン キャンサー センター内

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 BA02 CA43 CA44
4C087 AA01 BB65 NA14 ZB09 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 DA01 DA50 DA76 EA20 FA74