

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7170394号

(P7170394)

(45)発行日 令和4年11月14日(2022.11.14)

(24)登録日 令和4年11月4日(2022.11.4)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/17

Z

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

請求項の数 20 (全68頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-540269(P2017-540269)

(86)(22)出願日 平成27年10月30日(2015.10.30)

(65)公表番号 特表2018-504910(P2018-504910
A)

(43)公表日 平成30年2月22日(2018.2.22)

(86)国際出願番号 PCT/US2015/058192

(87)国際公開番号 WO2016/122738

(87)国際公開日 平成28年8月4日(2016.8.4)

審査請求日 平成30年10月23日(2018.10.23)

審査番号 不服2021-1181(P2021-1181/J1)

審査請求日 令和3年1月28日(2021.1.28)

(31)優先権主張番号 62/110,489

(32)優先日 平成27年1月31日(2015.1.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 500429103

ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ
ティ オブ ペンシルバニアアメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ
ニア州 フィラデルフィア シビック センター プールバード 3 6 0 0 ナインス
フロア

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 治療用分子のT細胞送達のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

スイッチ分子をコードする核酸を含む改変T細胞であって、
該スイッチ分子が、

トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- -R) の細胞外ドメイン；および
インターロイキン-12受容体 (IL-12R) の細胞内ドメイン

を含み、

該T細胞が、該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとTGF-
との相互作用が、該改変T細胞による活性化因子の分泌を誘導する、前記改変T細胞。

【請求項2】

活性化因子が、IFN- である、

前記相互作用が、改変T細胞による標的部位での該活性化因子の分泌を誘導し、該標的
部位が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リン
パ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣が
ん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホ
ジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される腫瘍で
ある、

改変T細胞が活性化される、かつ/または

改変T細胞が、固形腫瘍部位および/もしくは腫瘍抗原へ向かい、腫瘍抗原が、腫瘍関連
抗原 (TAA)、ウイルス抗原、抗体により認識される抗原、およびそれらの任意の断片、

ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択され、任意で、TAAが、p53、Ras、 β -カテニン、CDK4、 β -アクチニン-4、チロシナーゼ、TRP1/gp75、TRP2、gp100、メラノ-A/MART1、ガングリオシド、PSMA、HER2、WT1、EphA3、EGFR、CD20、MAGE、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、テロメラゼ、サバイピン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、

請求項1記載の改変T細胞。

【請求項3】

第1の結合ドメインと第2の結合ドメインを含む可溶性組換え融合タンパク質をコードする核酸をさらに含み、該可溶性組換え融合タンパク質を分泌する、請求項1または2記載の改変T細胞。

【請求項4】

可溶性組換え融合タンパク質が、標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体である、請求項3記載の改変T細胞。

【請求項5】

標的細胞抗原が、腫瘍関連抗原(TAA)、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原、およびそれらの任意の断片からなる群より選択される、請求項4記載の改変T細胞。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか一項記載の改変T細胞を含む細胞の集団を含み、任意で、該細胞の集団が、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、精製されたT細胞集団、およびT細胞株からなる群より選択され、

該細胞の集団が末梢血単核細胞を含み、かつ/または

該細胞の集団が精製されたT細胞を含む、

活性化因子を標的部位に送達するための薬学的組成物。

【請求項7】

改変T細胞が腫瘍抗原に結合し、任意で、腫瘍抗原が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるがんに関連する抗原である、請求項6記載の薬学的組成物。

【請求項8】

請求項1～5のいずれか一項記載の改変T細胞を含む細胞の集団を含む、疾患または状態を処置するための薬学的組成物。

【請求項9】

疾患または状態が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるがんである、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項10】

薬学的組成物の投与が、標的の細胞または組織の溶解を誘導する、請求項6～9のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項11】

その必要のある対象における疾患または状態の処置のための医薬の製造における、請求項1～5のいずれか一項記載の改変T細胞の使用。

【請求項12】

スイッチ分子をコードする核酸をT細胞の集団中に導入する段階を含み、それにより改変T細胞が作製される、インビトロで改変T細胞を作製するための方法であって、該スイッチ分子が、

トランスフォーミング成長因子-受容体(TGF- β -R)の細胞外ドメイン；および、

10

20

30

40

50

インターロイキン-12受容体 (IL-12R) の細胞内ドメイン

を含み、

該改変T細胞が、該スイッチ分子を発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとTGF- との相互作用が、該改変T細胞による活性化因子の分泌を誘導する、方法。

【請求項 13】

第1の結合ドメインと第2の結合ドメインを含む可溶性組換え融合タンパク質をコードする核酸をT細胞の集団中に導入する段階をさらに含む、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

可溶性組換え融合タンパク質が、標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体である、請求項13記載の方法。

10

【請求項 15】

標的細胞抗原が、腫瘍関連抗原 (TAA)、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原、およびそれらの任意の断片からなる群より選択される、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

標的部位で活性化因子を分泌するように、インビトロで改変T細胞を活性化する段階をさらに含む、請求項12～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

T細胞の集団が、末梢血単核細胞もしくは臍帯血細胞に由来する、

T細胞の集団が、T細胞株である、かつ/または

T細胞の集団が、精製されたT細胞の集団である、

請求項12～16のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 18】

T細胞の集団が凍結保存されており、任意で、方法が、凍結保存されたT細胞を融解する段階をさらに含む、請求項12～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 19】

請求項12～18のいずれか一項記載の方法に従って作製された改変T細胞を含み、任意で、薬学的に許容される担体をさらに含む、組成物。

【請求項 20】

請求項12～18のいずれか一項記載の方法に従って作製された改変T細胞を含む、活性化因子を標的部位に送達するための薬学的組成物であって、スイッチ分子をコードする核酸の導入前に、T細胞の集団が活性化されて増大しており、任意で、T細胞の集団が、抗CD3抗体および抗CD28抗体で活性化されている、薬学的組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願には、米国特許法第119(e)条(35 U.S.C. § 119(e))の下で、2015年1月31日に提出された米国仮特許出願第62/110,489号への優先権が与えられており、その出願はこれにより、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0002】

連邦政府の資金援助を受けて行われた研究または開発に関する陳述

本発明は、米国国立衛生研究所(National Institute of Health)によって授与されたCA120409号の下に、政府の援助を受けて行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

遺伝子操作されたT細胞が、がんを処置するため、および免疫応答を誘導するために使用されている。しかし、CARで改変されたT細胞のみでは、がん、特に固形がんを効率的

50

に処置するには十分でない場合がある。有効な腫瘍免疫療法は、免疫学的障害、例えば、有効な免疫応答を相殺するように協力して作用しうる、抵抗性を有する微小環境を育成する腫瘍の能力、および多量の免疫抑制機構の活性化によって妨害される。明らかな臨床戦略は、抗腫瘍機構を支援することであるが、臨床的成功の達成は限定されている。これらの臨床的失敗の基となる可能性がある機構には、免疫抑制活性、例えば、 $CD8^+$ 細胞傷害性Tリンパ球（CTL）またはナチュラルキラー（NK）細胞による悪性細胞殺傷の鈍化、同時に、悪性細胞の生存、浸潤、および伝播を促進する腫瘍誘発性（protumor）活性の両方を有しうる、いくつかの免疫細胞タイプの正当に評価されない特性が含まれる。

【0004】

固形腫瘍発生を育成する多様な細胞機構についての認識の拡大にもかかわらず、抗がん療法は、腫瘍内の急速に増殖する（新生物性）細胞を殺傷する、化学療法（CTX）および放射線療法（RT）を含む細胞傷害性様相に大幅に依存したままである。そのため、当技術分野には、T細胞ベースの養子免疫療法として、インビボでがんを処置し、免疫応答を誘導することができるT細胞を作製するための改良された方法に対する需要が存在する。

【発明の概要】

【0005】

1つの局面において、本発明は、スイッチ分子をコードする核酸を含む改変T細胞であって、該スイッチ分子が、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメイン、または、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞外ドメインを含み、該T細胞が、該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する、前記改変T細胞を含む。

【0006】

1つの局面において、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインは、トランスフォーミング成長因子- α 受容体（TGF- α -R）、プログラム細胞死1（PD1）、プログラム細胞死リガンド1（PDL1）、インターフェロン- γ 受容体（IFN- γ ）、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。もう1つの局面において、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインは、インターロイキン-2受容体（IL-2R）、インターロイキン-12受容体（IL-12R）、CD3、CD28、CD137、CD27、ICOS、OX40、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。さらなる局面において、活性化因子は、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TNF、TGF、IFN、ならびにそれらの機能的断片およびバリエーションからなる群より選択される可溶性サイトカインである。さらにもう1つの局面において、核酸は、インビトロ転写されたRNAまたは合成RNAを含む。他の局面において、標的部位は、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される腫瘍である。またさらなる局面において、T細胞は、固形腫瘍部位または腫瘍抗原へ向かう。もう1つの局面において、腫瘍抗原は、腫瘍関連抗原（TAA）、ウイルス抗原、抗体により認識される抗原、およびそれらの任意の断片、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。さらなる態様において、腫瘍抗原は、p53、Ras、 β -カテニン、CDK4、 β -アクリニン-4、チロシナーゼ、TRP1/gp75、TRP2、gp100、メラニン-A/MART1、ガングリオシド、PSMA、HER2、WT1、EphA3、EGFR、CD20、MAGE、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、テロメラーゼ、サバイピン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。さらにもう1つの局面において、T細胞は活性化される。

【0007】

本発明はまた、スイッチ分子をコードする核酸を含む改変T細胞であって、該スイッチ

分子が、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- -R) またはその断片を含む細胞外ドメインと、IL-12Rまたはその断片を含む細胞内ドメインとを含む、前記改変T細胞を特徴とする。

【0008】

さらに、スイッチ分子をコードする核酸を含む改変T細胞の集団であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子のそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する前記改変T細胞の集団が含まれる。

【0009】

本発明はまた、可溶性融合タンパク質をコードする核酸を含む改変T細胞であって、該可溶性融合タンパク質が、抗CD28 scFvを含む第1の結合ドメインと、抗PD-L1 scFvまたは抗TGFBRII scFvを含む第2の結合ドメインとを含む、前記改変T細胞も含む。1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、第1の結合ドメインと第2の結合ドメインとの間にスペーサドメインをさらに含む。

【0010】

追加的に、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子をコードする核酸；および、標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸を含む改変T細胞であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、かつ該二重特異性抗体を分泌する、前記改変T細胞が含まれる。

【0011】

1つの局面において、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインは、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される。もう1つの局面において、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインは、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- -R)、プログラム細胞死1 (PD1)、プログラム細胞死リガンド1 (PDL1)、インターフェロン- 受容体 (IFN-)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。さらにもう1つの局面において、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインは、インターロイキン-2受容体 (IL-2R)、インターロイキン-12受容体 (IL-12R)、CD3、CD28、CD137、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。1つの態様において、標的細胞抗原は、腫瘍関連抗原 (TAA)、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原、およびそれらの任意の断片からなる群より選択される。他の態様において、標的細胞抗原は、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- -R)、プログラム細胞死1 (PD1)、プログラム細胞死リガンド1 (PDL1)、インターフェロン- 受容体 (IFN-) からなる群より選択される。さらなる態様において、活性化T細胞抗原は、CD3、CD4、CD8、T細胞受容体 (TCR)、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83特異的結合リガンド、およびそれらの任意の断片からなる群より選択される。さらに追加的な態様において、T細胞は、リガンドに対するスイッチ分子の結合によって活性化され、活性化は、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。追加的に、T細胞は、二重特異性抗体に対する結合によって活性化され、活性化は、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。追加的な態様において、活性化因子は、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TNF、TGF、IFN、ならびにそれらの機能的断片およびバリエーションからなる群より選択される可溶性サイトカインである。さらなる態様において、標的部位は、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される腫瘍である。追加的に、他の態様において、T細胞は、固形腫瘍部位または腫瘍抗原へ向かう。腫瘍抗原は、腫瘍関連抗原 (TAA)、ウイルス抗原、

10

20

30

40

50

抗体により認識される抗原、およびそれらの任意の断片、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるか、または、腫瘍抗原は、p53、Ras、 β -カテニン、CDK4、 β -アクチニン-4、チロシナーゼ、TRP1/gp75、TRP2、gp100、メラニン-A/MART1、ガングリオシド、PSMA、HER2、WT1、EphA3、EGFR、CD20、MAGE、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、テロメラーゼ、サバイピン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。これらの態様および他の態様において、前記核酸のいずれか1つは、インビトロ転写されたRNAまたは合成RNAを含みうる。

【0012】

本発明は、追加的に、スイッチ分子をコードする核酸、ならびに、可溶性融合タンパク質をコードする核酸および二重特異性抗体をコードする核酸のうちの少なくとも1つを含む改変T細胞の集団であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、かつ該可溶性融合タンパク質および/または二重特異性抗体を分泌する、前記改変T細胞の集団を含む。

【0013】

本発明は、さらに、因子を標的部位に送達するための方法を含む。方法は、スイッチ分子をコードする核酸を、改変T細胞を含む細胞の集団中に導入する段階を含む。スイッチ分子は、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを含む。細胞の集団が、その必要のある対象に投与され、ここで、T細胞はスイッチ分子を一過性に発現し、スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用は、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。1つの態様において、核酸を導入する段階は、核酸のエレクトロポレーションを含む。1つの局面において、細胞の集団は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、精製されたT細胞集団、およびT細胞株からなる群より選択される。もう1つの局面において、細胞の集団は、末梢血単核細胞を含む。もう1つの局面において、細胞の集団は、精製されたT細胞を含む。他の局面において、方法は、核酸を導入する段階の前に、T細胞を活性化および増大させる段階をさらに含む。1つの態様において、T細胞は、抗CD3抗体および抗CD28抗体で活性化される。さらなる局面において、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインは、トランスフォーミング成長因子-受容体(TGF- β -R)、プログラム細胞死1(PD1)、プログラム細胞死リガンド1(PDL1)、インターフェロン- γ 受容体(IFN- γ)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。追加的な態様において、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインは、インターロイキン-2受容体(IL-2R)、インターロイキン-12受容体(IL-12R)、CD3、CD28、CD137、CD27、ICOS、OX40、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。他の態様において、核酸は、インビトロ転写されたRNAまたは合成RNAを含む。他の態様において、活性化因子は、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TNF、TGF、IFN、ならびにそれらの機能的断片およびバリエーションからなる群より選択される可溶性サイトカインである。さらなる態様において、T細胞は腫瘍抗原に結合する。追加的な態様において、腫瘍抗原は、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるがんに関連する抗原である。

【0014】

また、因子を標的部位に送達するための方法も、本発明に含まれる。方法は、細胞の集団を、その必要のある対象に投与する段階であって、T細胞がスイッチ分子を一過性に発現する前記段階を含む。スイッチ分子は、トランスフォーミング成長因子- β 受容体(TGF- β -R)またはその断片を含む細胞外ドメインと、IL-12Rまたはその断片を含む細胞内ドメインとを含む。スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用は、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。

【0015】

10

20

30

40

50

本発明は、追加的に、因子を標的部位に送達するための方法を含む。方法は、T細胞を含む細胞の集団を、その必要のある対象に投与する段階であって、該T細胞が標的部位へ向かい、かつスイッチ分子を一過性に発現する前記段階を含む。スイッチ分子は、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメイン、および、標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体を含み、T細胞は、標的部位で活性化され、活性化因子を分泌するように誘導される。1つの態様において、T細胞を活性化する段階は、スイッチ分子の細胞外ドメインへのリガンドの結合を含む。もう1つの態様において、T細胞を活性化する段階は、T細胞上の活性化T細胞抗原への二重特異性抗体の結合を含む。

【0016】

10

また、疾患または状態を処置する方法も、本発明に含まれる。方法は、改変T細胞の集団を対象に投与する段階であって、該T細胞が、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを含むスイッチ分子をコードする核酸を含む前記段階を含む。T細胞はスイッチ分子を一過性に発現し、スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用は、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導して、それにより疾患または状態を処置する。

【0017】

20

また、対象において疾患または状態を処置する方法も、本発明に含まれる。方法は、対象に、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子をコードする核酸、ならびに、可溶性融合タンパク質をコードする核酸、および標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸のうちの少なくとも1つを含む改変T細胞の集団を投与する段階を含む。T細胞は、スイッチ分子ならびに可溶性融合タンパク質および/または二重特異性抗体を一過性に発現し、T細胞の活性化が標的部位での活性化因子の分泌を誘導して、それにより疾患または状態を処置する。ある態様において、疾患または状態は、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるがんである。他の態様において、疾患または状態は、後天性免疫不全症候群（AIDS）、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、内耳自己免疫病（AIED）、自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、ベーチェット病、心筋症、セリアック病-疱疹状皮膚炎（celiac sprue-dermatitis hepetiformis）；慢性疲労免疫機能不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発神経炎（CIPD）、癰痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、ドゴー病、若年性皮膚筋炎、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性慢性関節炎（スティル病）、若年性関節リウマチ、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症（進行性全身性硬化症（PSS）、これは全身性硬化症（SS）としても知られる）、シェーグレン症候群、ステッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑、ヴェーゲナー肉芽腫症、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される自己免疫疾患である。ある特定の態様において、T細胞の投与は標的の細胞または組織の溶解の誘導を含む。

30

40

50

【 0 0 1 8 】

さらに、スイッチ分子を一過性に発現するT細胞を作製するための方法が、本発明に含まれる。方法は、スイッチ分子をコードする核酸をT細胞の集団中に導入する段階であって、該スイッチ分子が、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを含む前記段階を含む。T細胞はスイッチ分子を一過性に発現し、スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導して、それによりT細胞を作製する。

【 0 0 1 9 】

加えて、スイッチ分子および二重特異性抗体を一過性に発現するT細胞を作製するための方法が含まれる。方法は、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメイン、または、シグナル伝達受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子をコードする核酸、ならびに、可溶性融合タンパク質をコードする核酸、および標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸のうちの少なくとも1つを導入する段階を含む。T細胞は、スイッチ分子ならびに可溶性融合タンパク質および/または二重特異性抗体を一過性に発現し、T細胞の活性化が、標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。ある態様において、T細胞は標的部位へ向かい、該T細胞は、標的部位で活性化因子を分泌する。他の態様において、T細胞の集団は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、精製されたT細胞集団、およびT細胞株からなる群より選択される細胞内に含まれる。他の態様において、末梢血単核細胞は、T細胞の集団を含む。さらなる態様において、精製されたT細胞は、T細胞の集団を含む。他の態様において、T細胞の集団は凍結保存され、本明細書に開示されるある方法において、凍結保存されたT細胞が融解される。

[本発明1001]

スイッチ分子をコードする核酸を含む改変T細胞であって、
該スイッチ分子が、

サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメイン、または、シグナル伝達受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびにシグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメイン
を含み、

該T細胞が、該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する、前記改変T細胞。

[本発明1002]

膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインが、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- R)、プログラム細胞死1 (PD1)、プログラム細胞死リガンド1 (PDL1)、インターフェロン- 受容体 (IFN-)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1001の改変T細胞。

[本発明1003]

シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインが、インターロイキン-2受容体 (IL-2R)、インターロイキン-12受容体 (IL-12R)、CD3、CD28、CD137、CD27、ICOS、OX40、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1001の改変T細胞。

[本発明1004]

活性化因子が、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TNF、TGF、IFN、ならびにそれらの機能的断片およびバリエーションからなる群より選択される

可溶性サイトカインである、本発明1001の改変T細胞。

[本発明1005]

前記核酸が、インビトロ転写されたRNAまたは合成RNAを含む、本発明1001の改変T細胞。

[本発明1006]

標的部位が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される腫瘍である、本発明1001の改変T細胞。

10

[本発明1007]

固形腫瘍部位へ向かう、本発明1001の改変T細胞。

[本発明1008]

腫瘍抗原へ向かう、本発明1001の改変T細胞。

[本発明1009]

腫瘍抗原が、腫瘍関連抗原(TAA)、ウイルス抗原、抗体により認識される抗原、およびそれらの任意の断片、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1008の改変T細胞。

[本発明1010]

腫瘍抗原が、p53、Ras、-カテニン、CDK4、-アクチニン-4、チロシナーゼ、TRP1/gp75、TRP2、gp100、メラニン-A/MART1、ガングリオシド、PSMA、HER2、WT1、EphA3、EGFR、CD20、MAGE、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、テロメラーゼ、サバイビン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1008の改変T細胞。

20

[本発明1011]

活性化される、本発明1001の改変T細胞。

[本発明1012]

可溶性融合タンパク質をコードする核酸を含む改変T細胞であって、該可溶性融合タンパク質が、抗CD28 scFvを含む第1の結合ドメインと、抗PD-L1 scFvまたは抗TGFβRII scFvを含む第2の結合ドメインとを含む、前記改変T細胞。

30

[本発明1013]

可溶性融合タンパク質が、第1の結合ドメインと第2の結合ドメインとの間にスペーサードメインをさらに含む、本発明1012の改変T細胞。

[本発明1014]

膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子をコードする核酸；ならびに

標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸

を含む改変T細胞であって、

該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、かつ該二重特異性抗体を分泌する、前記改変T細胞。

40

[本発明1015]

膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインが、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される、本発明1014の改変T細胞。

[本発明1016]

膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインが、トランスフォーミング成長因子-受容体(TGF- β -R)、プログラム細胞死1(PD1)、プログラム細胞死リガンド1(PDL1)、インターフェロン- γ 受容体(IFN- γ -R)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1015の改変T細胞。

50

[本発明1017]

シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインが、インターロイキン-2受容体 (IL-2R)、インターロイキン-12受容体 (IL-12R)、CD3、CD28、CD137、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1014の改変T細胞。

[本発明1018]

標的細胞抗原が、腫瘍関連抗原 (TAA)、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原、およびそれらの任意の断片からなる群より選択される、本発明1014の改変T細胞。

[本発明1019]

標的細胞抗原が、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- -R)、プログラム細胞死1 (PD1)、プログラム細胞死リガンド1 (PDL1)、インターフェロン- 受容体 (IFN-) からなる群より選択される、本発明1014の改変T細胞。

10

[本発明1020]

活性化T細胞抗原が、CD3、CD4、CD8、T細胞受容体 (TCR)、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83特異的結合リガンド、およびそれらの任意の断片からなる群より選択される、本発明1014の改変T細胞。

[本発明1021]

前記T細胞が、リガンドに対するスイッチ分子の結合によって活性化され、活性化が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する、本発明1014の改変T細胞。

[本発明1022]

前記T細胞が、二重特異性抗体に対する結合によって活性化され、活性化が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する、本発明1014の改変T細胞。

20

[本発明1023]

活性化因子が、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TNF、TGF、IFN、ならびにそれらの機能的断片およびバリエーションからなる群より選択される可溶性サイトカインである、本発明1020または1021のいずれかの改変T細胞。

[本発明1024]

標的部位が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される腫瘍である、本発明1020または1021のいずれかの改変T細胞。

30

[本発明1025]

固形腫瘍部位へ向かう、本発明1014の改変T細胞。

[本発明1026]

腫瘍抗原へ向かう、本発明1014の改変T細胞。

[本発明1027]

腫瘍抗原が、腫瘍関連抗原 (TAA)、ウイルス抗原、抗体により認識される抗原、およびそれらの任意の断片、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1026の改変T細胞。

40

[本発明1028]

腫瘍抗原が、p53、Ras、 -カテニン、CDK4、 -アクチニン-4、チロシナーゼ、TRP1/gp75、TRP2、gp100、メラニン-A/MART1、ガングリオシド、PSMA、HER2、WT1、EphA3、EGFR、CD20、MAGE、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、テロメラーゼ、サバイビン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1026の改変T細胞。

[本発明1029]

前記核酸のいずれか1つが、インビトロ転写されたRNAまたは合成RNAを含む、本発明1013の改変T細胞。

[本発明1030]

50

スイッチ分子をコードする核酸、ならびに、

可溶性融合タンパク質をコードする核酸および二重特異性抗体をコードする核酸のうちの少なくとも1つ

を含む改変T細胞であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、かつ該可溶性融合タンパク質および/または二重特異性抗体を分泌する、前記改変T細胞。

[本発明1031]

スイッチ分子をコードする核酸を、改変T細胞を含む細胞の集団中に導入する段階であって、該スイッチ分子が、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを含む、前記段階；ならびに

10

該細胞の集団を、その必要のある対象に投与する段階であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する、前記段階を含む、因子を標的部位に送達するための方法。

[本発明1032]

核酸を導入する段階が、核酸のエレクトロポレーションを含む、本発明1031の方法。

[本発明1033]

前記細胞の集団が、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、精製されたT細胞集団、およびT細胞株からなる群より選択される、本発明1031の方法。

20

[本発明1034]

前記細胞の集団が末梢血単核細胞を含む、本発明1033の方法。

[本発明1035]

前記細胞の集団が精製されたT細胞を含む、本発明1034の方法。

[本発明1036]

前記核酸を導入する段階の前に、T細胞を活性化および増大させる段階をさらに含む、本発明1031の方法。

[本発明1037]

T細胞が、抗CD3抗体および抗CD28抗体で活性化される、本発明1036の方法。

[本発明1038]

膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインが、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- β -R)、プログラム細胞死1 (PD1)、プログラム細胞死リガンド1 (PDL1)、インターフェロン- γ 受容体 (IFN- γ -R)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1031の方法。

30

[本発明1039]

シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインが、インターロイキン-2受容体 (IL-2R)、インターロイキン-12受容体 (IL-12R)、CD3、CD28、CD137、CD27、ICOS、OX40、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1031の方法。

[本発明1040]

前記核酸が、インビトロ転写されたRNAまたは合成RNAを含む、本発明1031の方法。

40

[本発明1041]

活性化因子が、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TNF、TGF、IFN、ならびにそれらの機能的断片およびバリエーションからなる群より選択される可溶性サイトカインである、本発明1031の方法。

[本発明1042]

T細胞が腫瘍抗原に結合する、本発明1031の方法。

[本発明1043]

腫瘍抗原が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、

50

卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるがんに関連する抗原である、本発明1031の方法。

[本発明1044]

細胞の集団を、その必要のある対象に投与する段階であって、T細胞がスイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子が、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- -R) またはその断片を含む細胞外ドメインと、IL-12Rまたはその断片を含む細胞内ドメインとを含む、前記段階

を含む方法であって、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する、因子を標的部位に送達するための方法。

10

[本発明1045]

T細胞を含む細胞の集団を、その必要のある対象に投与する段階であって、該T細胞が標的部位へ向かい、かつ、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子、および、標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体を一過性に発現する、前記段階；ならびに

該T細胞を標的部位で活性化する段階であって、該T細胞が活性化因子を分泌するように誘導される、前記段階

を含む、因子を標的部位に送達するための方法。

20

[本発明1046]

T細胞を活性化する段階が、スイッチ分子の細胞外ドメインへのリガンドの結合を含む、本発明1045の方法。

[本発明1047]

T細胞を活性化する段階が、T細胞上の活性化T細胞抗原への二重特異性抗体の結合を含む、本発明1045の方法。

[本発明1048]

膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインが、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- -R)、プログラム細胞死1 (PD1)、プログラム細胞死リガンド1 (PDL1)、インターフェロン- 受容体 (IFN-)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1044または本発明1045の方法。

30

[本発明1049]

シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインが、インターロイキン-2受容体 (IL-2R)、インターロイキン-12受容体 (IL-12R)、CD3、CD28、CD137、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、本発明1044または本発明1045の方法。

[本発明1050]

標的細胞抗原が、腫瘍関連抗原 (TAA)、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原、およびそれらの任意の断片からなる群より選択される、本発明1045の方法。

[本発明1051]

標的細胞抗原が、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- -R)、プログラム細胞死1 (PD1)、プログラム細胞死リガンド1 (PDL1)、インターフェロン- 受容体 (IFN-) からなる群より選択される、本発明1045の方法。

40

[本発明1052]

活性化T細胞抗原が、CD3、CD4、CD8、T細胞受容体 (TCR)、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83特異的結合リガンド、およびそれらの任意の断片からなる群より選択される、本発明1045の方法。

[本発明1053]

活性化因子が、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TNF

50

、TGF、IFN、ならびにそれらの機能的断片およびバリエーションからなる群より選択される可溶性サイトカインである、本発明1044または本発明1045の方法。

[本発明1054]

対象に、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを含むスイッチ分子をコードする核酸を含む改変T細胞の集団を投与する段階であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導して、それにより疾患または状態を処置する、前記段階を含む、疾患または状態を処置する方法。

10

[本発明1055]

対象に、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子をコードする核酸、ならびに、可溶性融合タンパク質をコードする核酸、および標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸のうちの少なくとも1つを含む改変T細胞の集団を投与する段階であって、該T細胞が、該スイッチ分子ならびに可溶性融合タンパク質および/または二重特異性抗体を一過性に発現し、該T細胞の活性化が、標的部位での活性化因子の分泌を誘導して、それにより疾患または状態を処置する、前記段階を含む、疾患または状態を処置する方法。

20

[本発明1056]

疾患または状態が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるがんである、本発明1054または本発明1055の方法。

[本発明1057]

疾患または状態が、後天性免疫不全症候群(AIDS)、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、内耳自己免疫病(AIED)、自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)、自己免疫性血小板減少性紫斑病(ATP)、ベーチェット病、心筋症、セリアック病-疱疹状皮膚炎(celiac sprue-dermatitis hepetiformis)；慢性疲労免疫機能不全症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIPD)、癩痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、ドゴー病、若年性皮膚筋炎、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性慢性関節炎(スティル病)、若年性関節リウマチ、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症(進行性全身性硬化症(PSS)、これは全身性硬化症(SS)としても知られる)、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑、ヴェーゲナー肉芽腫症、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される自己免疫疾患である、本発明1054または本発明1055の方法。

30

40

[本発明1058]

T細胞を投与する段階が、標的細胞または組織の溶解の誘導を含む、本発明1054または本発明1055の方法。

50

[本発明1059]

その必要のある対象における疾患または状態の処置のための医薬の製造における、本発明1001、1012、または1014のいずれかの改変T細胞の使用。

[本発明1060]

スイッチ分子をコードする核酸をT細胞の集団中に導入する段階であって、
該スイッチ分子が、

サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメイン、または、シグナル伝達受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、

シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメイン
を含み、

該T細胞が、該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導して、それにより該T細胞を作製する、前記段階
を含む、スイッチ分子を一過性に発現するT細胞を作製するための方法。

[本発明1061]

膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子をコードする核酸、ならびに、

可溶性融合タンパク質をコードする核酸、および標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸のうちの少なくとも1つを導入する段階であって、該T細胞が、該スイッチ分子ならびに可溶性融合タンパク質および/または二重特異性抗体を一過性に発現し、該T細胞の活性化が標的部位での活性化因子の分泌を誘導する、前記段階

を含む、スイッチ分子および二重特異性抗体を一過性に発現するT細胞を作製するための方法。

[本発明1062]

標的部位へ向かうようにT細胞を活性化する段階であって、該T細胞が該標的部位で活性化因子を分泌する、前記段階

をさらに含む、本発明1060または本発明1061の方法。

[本発明1063]

T細胞の集団が、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、精製されたT細胞集団、およびT細胞株からなる群より選択される細胞内に含まれる、本発明1060または本発明1061の方法。

[本発明1064]

末梢血単核細胞がT細胞の集団を含む、本発明1063の方法。

[本発明1065]

精製されたT細胞がT細胞の集団を含む、本発明1063の方法。

[本発明1066]

T細胞の集団が凍結保存されている、本発明1060または本発明1061の方法。

[本発明1067]

凍結保存されたT細胞を融解する段階をさらに含む、本発明1066の方法。

[本発明1068]

核酸がインビトロ転写されたRNAまたは合成RNAを含む、本発明1060または本発明1061の方法。

[本発明1069]

本発明1060または本発明1061に従って作製された改変T細胞を含む、組成物。

[本発明1070]

薬学的に許容される担体をさらに含む、本発明1069の組成物。

【図面の簡単な説明】

【0020】

10

20

30

40

50

本発明の好ましい態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことにより、さらに良く理解されるであろう。本発明を実例で説明するために、現時点で好ましい態様を図面において示している。しかし、本発明は、図面中に示されている態様の厳密な配置および手段には限定されないことが理解されるべきである。

【 0 0 2 1 】

【図 1】TGF- 受容体からIL-12受容体へスイッチングする、スイッチ分子の構築を示す説明図である。

【図 2】T細胞中にエレクトロポレーションされた、PD1から4-1BBへのスイッチ分子RNA構築物の説明図を示す。

【図 3】PD1-4-1BBスイッチ分子およびCD19 CAR RNAのT細胞中へのコエレクトロポレーション後の、T細胞におけるPD1スイッチ分子の発現およびCAR発現を示すフローグラフのパネルである。

10

【図 4】OKT3刺激された、TGF- β R-IL-12Rスイッチ分子RNAのエレクトロポレーションを受けたT細胞のIFN- γ 分泌を示すグラフである。IL-12シグナル伝達が、TGF β R-IL-12Rスイッチ分子RNAのT細胞中へのエレクトロポレーションによって誘導された。

【図 5】K562によって刺激されたNK細胞のIFN- γ 分泌を示す。IL-12シグナル伝達が、TGF β R-IL12Rスイッチ分子RNAのNK細胞中へのエレクトロポレーションによって誘導された。

【図 6】TGF- β の存在下での、TGF β R-IL-12Rスイッチ分子を含有するRNA構築物をT細胞にエレクトロポレーションした後の、pStat4の上方制御によるTGF β からIL-12へのシグナル活性化のスイッチを示すグラフである。

20

【図 7】スイッチ分子RNA構築物をT細胞にエレクトロポレーションした後の、TGF β で刺激されたT細胞のpSmadの下方制御による、TGF β からCD28への(aTGF β RII-1412)シグナル、およびTGF β からIL-12への(TGF β R-IL-12R)シグナルのスイッチを示すグラフである。ドミナントネガティブTGF- 受容体(DNTGF β)のRNAを、対照として使用した。

【図 8】TGF β R-IL-12Rが、ドミナントTGF β RII(DNTGF β R)のように効率的に、TGF-シグナル伝達を遮断したことを示すグラフのパネルである。

【図 9】二重特異性scFv TGF β R-CD28(aTGF β RII-1-1412)が、ドミナントTGF β RII(DNTGF β R)のように効率的に、TGF-シグナル伝達を遮断したことを示すグラフのパネルである。

30

【図 10】TGF β R-CD28スイッチ分子(aTGF β R-1-1412)を発現するT細胞の、Treg抑制に対する抵抗性の増加を示すグラフのパネルである。

【図 11】誘導されたTreg(iTreg)におけるFoxp3発現を示すグラフのパネルである。

【図 12】iTreg(PMA刺激)のサイトカイン産生の減少を示すグラフのパネルである。

【図 13】iTregによるエフェクターT細胞(Teff)の増殖の抑制を示すグラフのパネルである。

【図 14】Foxp3発現の減少によって証明された、aTGF β R-3-1412またはTGF β R-IL-12Rのいずれかを発現するT細胞のTreg誘導の低減を示すグラフのパネルである。

【図 15】Foxp3発現の減少によって証明された、aTGF β R-3-1412またはTGF β R-IL-12Rのいずれかを発現するT細胞から誘導されたTregの抑制性機能の低減を示すグラフのパネルである。

40

【図 16 A】Bis-RNAのエレクトロポレーションを受けたT細胞の、T細胞活性化および腫瘍殺傷能力の増加を示すフローグラフのパネルである。T細胞に、指定通りのさまざまな量(μ g RNA / 0.1 ml T細胞)のブリナツモマブBis-RNA(Bis-RNA)またはCD19 CAR RNA(CAR RNA)のいずれかをエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの18時間後に、Bis-RNAまたはCAR RNAのいずれかを有するT細胞を、同等数のGFP RNAのエレクトロポレーションを受けたT細胞(GFP-T)の添加を伴うかまたは伴わずに、CD19陽性細胞株で刺激し、CD107a発現について評価した。

【図 16 B】Bis-RNAエレクトロポレーション後の、IFN- γ およびグランザイムBの発現を示すグラフのパネルである。上記のT細胞のエレクトロポレーションの18時間後に、エ

50

レクトロポレーションを受けたT細胞を、IFN- γ およびグランザイムBの細胞内染色に供した（図2B）。

【図16C】IFN- γ のELISA検出を示すグラフである。IFN- γ についてのELISAを、CD19陽性細胞（NaIm6、K562-CD19、およびRaji）またはCD19陰性（K562）細胞株でのT細胞の一晩刺激後に行った。

【図16D】Bis-RNAのエレクトロポレーションおよび発現後の、T細胞の特異性を示すグラフである。T細胞に、プリナツモマBis-RNA（Bis-RNA）またはCD19bbz CAR RNA（CAR RNA）のいずれかを、1、5、もしくは10 μ g / 0.1 mlのT細胞のRNA用量でエレクトロポレーションするか、または、5 μ gの各Bis-RNAおよびCAR RNA（Bis-RNA + CAR RNA）をコエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの18時間後に、溶解活性を、指定されたエフェクター：標的比で、4時間のフローベース細胞傷害性Tリンパ球アッセイで評価した。

10

【図17】T細胞中にエレクトロポレーションした可溶性融合タンパク質RNAを列挙する表である。

【図18】抗PD-L1 scFvおよび抗CD28 scFvを用いた二重特異性抗体の構築を示す説明図である。

【図19A】図3および図5に示されたさまざまなRNAのエレクトロポレーションを受け、腫瘍細胞とのインキュベーションによって活性化されたT細胞による、IL-2産生を示すグラフである。

【図19B】図3および図5に示されたさまざまなRNAのエレクトロポレーションを受け、腫瘍細胞とのインキュベーションによって活性化されたT細胞による、IFN- γ 産生を示すグラフである。

20

【図20】抗TGF β 受容体II scFvおよび抗CD28 scFvを用いた二重特異性抗体の構築を示す説明図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

詳細な説明

定義

別に定める場合を除き、本明細書で用いる技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書中に記載されたものと同様または同等な任意の方法および材料を本発明の試験のために実地に用いることができるが、本明細書では好ましい材料および方法について説明する。本発明の説明および特許請求を行う上では、以下の専門用語を用いる。

30

【0023】

また、本明細書中で用いる専門用語は、特定の態様を説明することのみを目的とし、限定的であることは意図しないことも理解される必要がある。

【0024】

「1つの(a)」および「1つの(an)」という冠詞は、本明細書において、その冠詞の文法的目的語の1つまたは複数（すなわち、少なくとも1つ）を指して用いられる。一例として、「1つの要素」は、1つの要素または複数の要素を意味する。

40

【0025】

量、時間的長さなどの測定可能な値に言及する場合に本明細書で用いる「約」は、特定された値からの $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 1\%$ 、なおより好ましくは $\pm 0.1\%$ のばらつきを範囲に含むものとするが、これはそのようなばらつきが、開示された方法を実施する上で妥当なためである。

【0026】

「活性化因子」という用語は、免疫モジュレート分子のことを指す。活性化因子は、T細胞または他の免疫細胞を結合、活性化、または刺激して、それらの活性をモジュレートする。活性化因子は、さらに、膜貫通領域を欠如するなど、細胞からの分泌が可能な形態である。いくつかの態様において、活性化因子は、抗体、可溶性サイトカイン、可溶性

50

ケモカイン、成長因子、またはそれらの機能的断片もしくはバリエーションから選択される。

【0027】

「抗体」という用語は、本明細書で用いる場合、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子のことを指す。抗体は、天然供給源または組換え供給源に由来するインタクトな免疫グロブリンであってもよく、インタクトな免疫グロブリンの免疫応答部分であってもよい。抗体は典型的には、免疫グロブリン分子のテトラマーである。テトラマーは天然に存在してもよく、または一本鎖抗体もしくは抗体断片から再構築されてもよい。抗体にはダイマーも含まれ、それらは天然に存在してもよく、または一本鎖抗体もしくは抗体断片から構築されてもよい。本発明における抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab')₂、さらには一本鎖抗体 (scFv)、ヒト化抗体およびヒト抗体を含む、種々の形態で存在しうる (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。

10

【0028】

「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体のある領域のことを指し、インタクトな抗体の抗原決定可変領域のことも指す。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、直鎖状抗体、scFv抗体、標的に対する十分な親和性を示すVLドメインまたはVHドメインのいずれかで構成される単ドメイン抗体、例えばラクダ科動物 (camelid) 抗体 (Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38) など、および抗体断片から形成される多重特異性抗体が非限定的に含まれる。抗体断片はまた、ヒト抗体もしくはヒト化抗体、またはそのヒト抗体もしくはヒト化抗体の断片も含む。

20

【0029】

「抗体重鎖」とは、本明細書で用いる場合、その天然型高次構造にあるすべての抗体分子に存在する2種類のポリペプチドのうち、長い方のことを指す。

【0030】

「抗体軽鎖」とは、本明細書で用いる場合、その天然型高次構造にあるすべての抗体分子に存在する2種類のポリペプチドのうち、短い方のことを指す。軽鎖および軽鎖とは、2種の主要な抗体軽鎖アイソタイプのことを指す。

30

【0031】

「合成抗体」とは、本明細書で用いる場合、組換えDNA技術を用いて作製される抗体、例えば、本明細書に記載されたようなバクテリオファージによって発現される抗体などを意味する。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子の合成によって作製される抗体であって、そのDNA分子が抗体タンパク質またはその抗体を指定するアミノ酸配列を発現し、そのDNA配列またはアミノ酸配列が、利用可能であって当技術分野において周知であるDNA配列またはアミノ酸配列の合成技術を用いて得られるような抗体も意味するとみなされるべきである。

【0032】

「抗原」または「Ag」という用語は、本明細書で用いる場合、免疫応答を誘発する分子と定義される。この免疫応答には、抗体産生、または特異的免疫適格細胞の活性化のいずれかまたは両方が含まれる。当業者は、事実上すべてのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原としての役を果たしうることを理解するであろう。その上、抗原が組換えDNAまたはゲノムDNAに由来してもよい。当業者は、免疫応答を惹起するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、それ故に、本明細書中でその用語が用いられる通りの「抗原」をコードすることを理解するであろう。その上、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列のみによってコードされる必要はないことも理解するであろう。本発明が複数の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を非限定的に含むこと、およびこれらのヌクレオチド配列が所望の免疫応答を惹起するさまざまな組み合わせで並べられていることは直ちに明らかである。さらに、当業

40

50

者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要が全くないことも理解するであろう。抗原を合成して作製することもでき、または生物試料から得ることもできることは直ちに明らかである。そのような生物試料には、組織試料、腫瘍試料、細胞または生体液が非限定的に含まれる。

【0033】

本明細書で用いる場合、「自己」という用語は、後にその個体に再び導入される、同じ個体に由来する任意の材料を指すものとする。

【0034】

「同種」とは、同じ種の異なる動物に由来する移植片のことを指す。

【0035】

「異種」とは、異なる種の動物に由来する移植片のことを指す。

【0036】

「二重特異性抗体」とは、本明細書で用いる場合、少なくとも2種の異なる抗原エピトープに対して結合特異性を有する抗体のことを指す。1つの態様において、エピトープは、同じ抗原由来である。もう1つの態様において、エピトープは、2種の異なる抗原由来である。二重特異性抗体を作製するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、二重特異性抗体は、2種の免疫グロブリン重鎖/軽鎖ペアの共発現を用いて組み換え生産することができる。例えば、Milstein et al. (1983) Nature 305: 537-39を参照されたい。あるいは、二重特異性抗体は、化学的連結を用いて調製することができる。例えば、Brennan et al. (1985) Science 229:81を参照されたい。二重特異性抗体は、二重特異性抗体断片を含む。例えば、Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48、Gruber et al. (1994) J. Immunol. 152:5368を参照されたい。

【0037】

「二重特異性」とは、本明細書で用いる場合、少なくとも2種の異なる結合エピトープに対して結合特異性を有する分子のことを指す。1つの態様において、エピトープは、同じ結合パートナー由来である。もう1つの態様において、エピトープは、2種の異なる結合パートナー由来である。異なるエピトープに対して二重特異性を有する分子は、二重特異性抗体を含みうる。

【0038】

「がん」という用語は、本明細書で用いる場合、異常細胞の急速かつ制御不能な増殖を特徴とする疾患と定義される。がん細胞は局所的に広がることもあれば、または血流およびリンパ系を通じて身体の他の部分に広がることもある。さまざまながんの例には、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、大腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がん、甲状腺がんなどが非限定的に含まれる。

【0039】

本明細書で用いる場合、「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に有意に影響することもそれを有意に変化させることもないアミノ酸改変を指すことを意図している。そのような保存的改変には、アミノ酸の置換、付加および欠失が含まれる。改変は、当技術分野において公知の標準的な手法、例えば部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介性突然変異誘発などによって、本発明の抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えられるもののことである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において明確に定められている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。このため

10

20

30

40

50

、本発明の抗体のCDR領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基によって置き換えることができ、改変された抗体を、本明細書に記載の機能アッセイを用いて、抗原と結合する能力に関して試験することができる。

【0040】

「共刺激リガンド」とは、この用語が本明細書で用いられる場合、T細胞上のコグネイト共刺激分子と特異的に結合し、それにより、例えば、ペプチドが負荷されたMHC分子のTCR/CD3複合体への結合によって与えられる一次シグナルに加えて、増殖、活性化、分化などを非限定的に含むT細胞応答を媒介するシグナルも与えることのできる、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上の分子が含まれる。共刺激リガンドには、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド（ICOS-L）、細胞内接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンボトキシン受容体、3/ TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3と特異的に結合するリガンドが非限定的に含まれる。共刺激リガンドはまた、とりわけ、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3などの、ただしこれらに限定されない、T細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体、およびCD83と特異的に結合するリガンドも範囲に含む。

10

【0041】

「共刺激分子」とは、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、増殖などの、ただしこれに限定されない、T細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上のコグネイト結合パートナーのことを指す。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受容体が非限定的に含まれる。

20

【0042】

「～に由来する」という用語は、由来する物質が供給源と関連付けられるように、特定の供給源から生成される、合成される、または生じることを指す。由来する物質はその特定の供給源と同一である必要はない。1つの態様において、ある抗原はあるタンパク質に由来する。もう1つの態様において、ある一本鎖可変断片はあるモノクローナル抗体に由来する。

【0043】

「エレクトロポレーションを行う」、「エレクトロポレーション」、「エレクトロポレーションを受けた」という用語は、細胞原形質膜に対してその透過性を高めるために電場が印加される過程のことを指す。特定の持続時間および形状のパルスが細胞の細胞膜に印加されて、核酸が細胞に導入される。

30

【0044】

「有効量」または「治療的有效量」は、本明細書において互換的に用いられ、特定の生物学的結果を達成するために有効な、本明細書に記載するような化合物、製剤、材料または組成物の量のことを指す。そのような結果には、当技術分野における好適な任意の手段によって判定される、ウイルス感染の阻害が非限定的に含まれる。

【0045】

「コードする」とは、所定のヌクレオチド配列（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）または所定のアミノ酸配列のいずれか、およびそれに起因する生物学的特性を有する、生物過程において他のポリマーおよび高分子の合成のためのテンプレートとして働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAなどのポリヌクレオチド中の特定のヌクレオチド配列の固有の特性のことを指す。すなわち、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によって細胞または他の生体系においてタンパク質が産生される場合、そのタンパク質をコードする。mRNA配列と同一であって通常は配列表として提示されるヌクレオチド配列を有するコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のためのテンプレートとして用いられる非コード鎖の両方を、タンパク質、またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードすると称することができる。

40

50

【 0 0 4 6 】

本明細書で用いる場合、「内因性」とは、生物体、細胞、組織もしくは系の内部に由来するか、またはそれらの内部で産生される、任意の材料のことを指す。

【 0 0 4 7 】

本明細書で用いる場合、「外因性」という用語は、生物体、細胞、組織もしくは系の外部から導入されるか、またはそれらの外部で産生される、任意の材料のことを指す。

【 0 0 4 8 】

「膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン」という語句は、細胞の外側の膜受容体の断片または一部分のことを指す。膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインは、リガンド結合ドメインまたはリガンド認識ドメインを含む。細胞外ドメインは、膜受容体の膜貫通ドメインを含んでもよいし、または含まなくてもよい。

10

【 0 0 4 9 】

本明細書で用いる場合、「増大させる」および「増大」という用語は、T細胞などの細胞の増殖または増加のことを指す。

【 0 0 5 0 】

「発現」という用語は、本明細書で用いる場合、そのプロモーターによって作動する特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳と定義される。

【 0 0 5 1 】

「発現ベクター」とは、発現させようとするヌクレオチド配列と機能的に連結した発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターのことを指す。発現ベクターは、発現のために十分なシス作用エレメントを含む；発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、またはインビトロ発現系において供給されうる。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを組み入れたコスミド、プラスミド（例えば、裸のもの、またはリポソーム中に含まれるもの）およびウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）といった、当技術分野において公知であるすべてのものが含まれる。

20

【 0 0 5 2 】

「相同な」とは、本明細書で用いる場合、2つのポリマー分子の間、例えば、2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子などの2つの核酸分子の間、または2つのポリペプチド分子の間のサブユニット配列同一性を指す。2つの分子の両方においてあるサブユニット位置が同じ単量体サブユニットで占められているならば；例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおいてある位置がアデニンによって占められているならば、それらはその位置で相同である。2つの配列間の相同性は、一致するかまたは相同な位置の数の直接的な関数である；例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、長さが10サブユニットであるポリマーにおける5つの位置）が相同であるならば、2つの配列は50%相同である；位置の90%（例えば、10のうち9）が一致するかまたは相同であるならば、2つの配列は90%相同である。

30

【 0 0 5 3 】

「同一性」とは、本明細書で用いる場合、2つのポリマー分子の間、特に、2つのポリペプチド分子の間などの2つのアミノ酸分子の間の、サブユニット配列同一性を指す。2つのアミノ酸配列が、同じ位置に同じ残基を有する場合；例えば、2つのポリペプチド分子のそれぞれにおいてある位置がアルギニンによって占められているならば、それらはその位置で同一である。2つのアミノ酸配列がアラインメントにおいて同じ位置で同じ残基を有する同一性または程度は、しばしばパーセンテージとして表現される。2つのアミノ酸配列間の同一性は、一致するかまたは同一の位置の数の直接的な関数である；例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、長さが10アミノ酸であるポリマーにおける5つの位置）が同一であるならば、2つの配列は50%同一である；位置の90%（例えば、10のうち9）が一致するかまたは同一であるならば、2つのアミノ酸配列は90%同一である。

40

【 0 0 5 4 】

50

「免疫学的有効量」、「抗免疫応答有効量」、「免疫応答阻害有効量」または「治療量」という語句は、対象に投与されることになる本発明の組成物の量のことを指し、この量は、対象（患者）の年齢、体重、免疫応答、疾患／状態の種類、および健康状態の個々の違いを考慮して、その対象において所望の結果が得られるように、任意で科学者と相談した上で、医師によって決定される。

【 0 0 5 5 】

「シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメイン」という語句は、少なくとも1つのエフェクター機能の活性化の原因である、細胞の内側の活性化受容体の断片または一部分のことを指す。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特化した機能のことを指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であろう。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達して、細胞が特化した機能を遂行するように導く、タンパク質の一部分のことを指す。シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインは、シグナル伝達ドメイン、タンパク質相互作用ドメイン、酵素ドメイン、またはそれらの組み合わせを含みうる。通常は細胞内シグナル伝達ドメインの全体が使用されるが、多くの場合には、その鎖全体を用いることは必要でない。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮部分が用いられる範囲内において、そのような短縮部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、無傷の鎖の代わりに用いることができる。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、それ故に、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの任意の短縮部分を含むものとする。細胞内ドメインは、活性化受容体の膜貫通ドメインを含んでもよいし、または含まなくてもよい。

【 0 0 5 6 】

本明細書で用いる場合、「説明材料 (instructional material)」には、本発明の組成物および方法の有用性を伝えるために用いる、刊行物、記録、略図または他の任意の表現媒体が含まれる。本発明のキットの説明材料は、例えば、本発明の核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物を含む容器に添付してもよく、または核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物を含む容器と一緒に出荷してもよい。または、説明材料および化合物がレシピエントによって一体として用いられることを意図して、説明材料を容器と別に出荷してもよい。

【 0 0 5 7 】

「単離された」とは、天然の状態から変更されるかまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きた動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離されて」いないが、その天然の状態で共存する物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは、「単離されて」いる。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することもでき、または例えば宿主細胞などの非ネイティブ性環境で存在することもできる。

【 0 0 5 8 】

「膜受容体」という語句は、T細胞またはNK細胞の表面上に見出される任意の受容体のことを指す。膜受容体には、ホルモン、サイトカイン、成長因子、細胞認識分子に対する受容体、または他のシグナル伝達受容体が含まれうる。膜受容体の例示的な例には、トランスフォーミング成長因子- 受容体 (TGF- β -R)、プログラム細胞死1 (PD1)、プログラム細胞死リガンド1 (PDL1)、インターフェロン- 受容体 (IFN- γ)、インターロイキン-2受容体 (IL-2R)、インターロイキン-12受容体 (IL-12R)、CD3、CD4、CD8、CD28、およびCD137が非限定的に含まれる。

【 0 0 5 9 】

「改変された」という用語は、本明細書で用いる場合、本発明の分子または細胞の状態または構造が変化していることを意味する。分子は、化学的、構造的および機能的を含む、多くの方法で改変することができる。細胞は核酸の導入によって改変することができる。

【 0 0 6 0 】

「モジュレートすること」という用語は、本明細書で用いる場合、処置もしくは化合物

10

20

30

40

50

の非存在下でのその対象における反応のレベルと比較して、および／または他の点では同一であるが処置を受けていない対象における反応のレベルと比較して、対象における反応のレベルの検出可能な増加または減少を媒介することを意味する。この用語は、対象、好ましくはヒトにおいて、ネイティブ性のシグナルまたは反応を擾乱させるか、および／またはそれに影響を及ぼして、それにより、有益な治療反応を媒介することを範囲に含む。

【0061】

本発明に関連して、一般的に存在する核酸塩基に関しては以下の略号を用いる。「A」はアデノシンを指し、「C」はシトシンを指し、「G」はグアノシンを指し、「T」はチミジン

【0062】

別に指定する場合を除き、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、相互に縮重型であって、同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチドが含まれる。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という語句には、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が一部の型においてイントロンを含みうる限り、イントロンも含まれうる。

【0063】

「機能的に連結した」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間の、後者の発現を結果的にもたらず機能的連結のことを指す。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列との機能的関係の下で配置されている場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と機能的に連結している。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼすならば、プロモーターはコード配列と機能的に連結している。一般に、機能的に連結したDNA配列は連続しており、2つのタンパク質コード領域を連結することが必要な場合には、同一のリーディングフレーム内にある。

【0064】

免疫原性組成物の「非経口的」投与には、例えば、例えば、皮下(s.c)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)または胸骨内の注射法または注入法が含まれる。

【0065】

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で用いる場合、ヌクレオチドの連鎖と定義される。その上、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書で用いる核酸およびポリヌクレオチドは互換的である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、それらはモノマー性「ヌクレオチド」に加水分解されうるという一般知識を有する。モノマー性ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解されうる。本明細書で用いるポリヌクレオチドには、組換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCR(商標)などを用いて組換えライブラリーまたは細胞ゲノムから核酸配列をクローニングすること、および合成手段を非限定的に含む、当技術分野で利用可能な任意の手段によって得られる、すべての核酸配列が非限定的に含まれる。

【0066】

本明細書で用いる場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は互換的に用いられ、ペプチド結合によって共有結合したアミノ酸残基で構成される化合物のことを指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成しうるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって相互に結合した2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書で用いる場合、この用語は、例えば、当技術分野において一般的にはペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短鎖、ならびに当技術分野において一般にタンパク質と称される長鎖の両方のことを指し、それらには多くの種類がある。「ポリペプチド」には、いくつか例を挙げると、例えば、生物学的活性断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

「プロモーター」という用語は、本明細書で用いる場合、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるために必要な、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列と定義される。

【 0 0 6 8 】

本明細書で用いる場合、「プロモーター／調節配列」という用語は、プロモーター／調節配列と機能的に連結した遺伝子産物の発現のために必要とされる核酸配列を意味する。ある場合には、この配列はコアプロモーター配列であってよく、また別の場合には、この配列が、遺伝子産物の発現に必要とされるエンハンサー配列および他の制御エレメントをも含んでもよい。プロモーター／調節配列は、例えば、組織特異的な様式で遺伝子産物を発現させるものであってもよい。

10

【 0 0 6 9 】

「構成性」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、細胞のほとんどまたはすべての生理学的条件下で、その遺伝子産物が細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

【 0 0 7 0 】

「誘導性」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、実質的にはそのプロモーターに対応する誘導物質が細胞内に存在する場合にのみ、その遺伝子産物が細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

20

【 0 0 7 1 】

「組織特異的」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、実質的には細胞がそのプロモーターに対応する組織型の細胞である場合にのみ、その遺伝子産物が細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

【 0 0 7 2 】

「シグナル伝達経路」とは、細胞の1つの部分から細胞の別の部分へのシグナルの伝達に役割を果たす種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係のことを指す。「細胞表面受容体」という語句は、シグナルを受け取って、細胞の原形質膜をまたいでシグナルを伝達することができる分子および分子の複合体のことを指す。「細胞表面受容体」の一例はヒトCD3またはCD28である。

30

【 0 0 7 3 】

「シグナル伝達受容体」という用語は、本明細書で用いる場合、リガンドと相互作用して、シグナル伝達、タンパク質相互作用、酵素活性、またはそれらの組み合わせなどの応答を創出する、細胞内部のイベントの生化学的連鎖を引き起こす、膜受容体のことを指す。シグナル伝達受容体の例示的な例には、インターロイキン-2受容体 (IL-2R)、インターロイキン-12受容体 (IL-12R)、CD3、CD28、およびCD137が非限定的に含まれる。

【 0 0 7 4 】

「可溶性融合タンパク質」という用語は、本明細書で用いる場合、異なる結合特異性を有する2種の異なる結合ドメインをもつ融合物のことを指す。可溶性融合タンパク質は、2種の異なるリガンド、受容体、抗原、または分子に結合することができる。例示的な態様において、可溶性融合タンパク質は、活性化T細胞上の少なくとも1つの分子に結合する特異性を有する1つの結合ドメイン、および標的細胞上の少なくとも1つの分子に結合する特異性を有する第2の結合ドメインを含む。

40

【 0 0 7 5 】

「特異的に結合する」という用語は、本明細書で用いる場合、試料中に存在するコグネイト結合パートナー（例えば、T細胞上に存在する刺激分子および／または共刺激分子）タンパク質を認識してそれと結合する抗体またはリガンドが、試料中の他の分子を実質的に認識せず、それと結合することもないことを意味する。

【 0 0 7 6 】

50

「刺激」という用語は、刺激分子（例えば、TCR / CD3複合体）がそのコグネイトリガンドと結合して、それにより、TCR / CD3複合体を介するシグナル伝達などの、ただしこれには限定されないシグナル伝達イベントを媒介することによって誘導される、一次応答のことを意味する。刺激は、TGF- の下方制御、および / または細胞骨格構造の再構築などのような、ある種の分子の発現の改変を媒介することができる。

【 0 0 7 7 】

「刺激分子」とは、この用語が本明細書で用いられる場合、抗原提示細胞上および / または腫瘍細胞上に存在するコグネイト刺激リガンドに特異的に結合する、T細胞上の分子のことを意味する。

【 0 0 7 8 】

「刺激リガンド」は、本明細書で用いる場合、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上または腫瘍細胞上に存在する場合に、T細胞上のコグネイト結合パートナー（本明細書では「刺激分子」と称する）と特異的に結合して、それにより、活性化、免疫応答の開始、増殖などを非限定的に含む、T細胞による一次応答を媒介することができるリガンドのことを意味する。刺激リガンドは当技術分野において周知であり、とりわけ、ペプチドが負荷されたMHCクラスI分子、抗CD3抗体、スーパーアゴニスト抗CD28抗体、およびスーパーアゴニスト抗CD2抗体を範囲に含む。

【 0 0 7 9 】

「対象」という用語は、免疫応答を惹起させることができる、生きている生物（例えば、哺乳動物）を含むことを意図している。「対象」または「患者」は、その中で用いる場合、ヒトまたは非ヒト哺乳動物であってよい。非ヒト哺乳動物には、例えば、家畜および愛玩動物、例えばヒツジ、ウシ科動物、ブタ、イヌ科動物、ネコ科動物およびネズミ科の哺乳動物などが含まれる。好ましくは、対象はヒトである。

【 0 0 8 0 】

本明細書で用いる場合、「実質的に精製された」細胞とは、他の細胞型を本質的に含まない細胞のことである。また、実質的に精製された細胞は、その天然の状態に本来付随する他の細胞型から分離された細胞のことも指す。場合によっては、実質的に精製された細胞の集団とは、均一な細胞集団のことを指す。また別の場合には、この用語は、単に、天然の状態において本来付随する細胞から分離された細胞のことを指す。いくつかの態様において、細胞はインビトロで培養される。他の態様において、細胞はインビトロでは培養されない。

【 0 0 8 1 】

「スイッチ分子」という用語は、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含む、操作された受容体のことを指す。スイッチ分子を、T細胞またはNK細胞などの細胞において発現させると、スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを活性化する。細胞内ドメインは、シグナル伝達受容体シグナルの伝達、エフェクター分子の活性化、活性化因子の分泌、またはそれらの任意の組み合わせなど、シグナル伝達受容体に特異的である細胞内のシグナルを伝える。

【 0 0 8 2 】

「標的部位」または「標的配列」とは、結合が起こるのに十分な条件下で結合分子が特異的に結合しうる核酸の領域を明確に定めるゲノム核酸配列のことを指す。

【 0 0 8 3 】

本明細書で用いる場合、「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、抗原の提示に応答したT細胞の活性化に関与する膜タンパク質の複合体のことを指す。TCRは主要組織適合複合体分子と結合した抗原を認識する原因となる。TCRは、アルファ（ ）およびベータ（ ）鎖のヘテロダイマーで構成されるが、一部の細胞では、TCRはガンマおよびデルタ（ / ）鎖からなる。TCRは / 形態および / 形態で存在することもあり、これらは構造的に類似しているが、解剖学的な部位および機能は異なる。各鎖は2つの細胞外ドメイン、1つの可変ドメインおよび1つの定常ドメインからなる。いくつかの態様に

10

20

30

40

50

において、TCRは、例えば、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、および T細胞を含む、TCRを含む任意の細胞上で改変することができる。

【0084】

「治療的」という用語は、本明細書で用いる場合、処置および/または予防を意味する。治療効果は、疾病状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。

【0085】

「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、本明細書で用いる場合、外因性核酸が宿主細胞内に移入または導入される過程のことを指す。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞とは、外因性核酸によってトランスフェクトされた、形質転換された、または形質導入されたもののことである。この細胞には初代対象細胞およびその子孫が含まれる。

10

【0086】

「腫瘍抗原」という用語は、本明細書で用いる場合、腫瘍、または特定の過剰増殖障害に共通する抗原のことを指す。いくつかの局面において、本発明の腫瘍抗原は、原発性または転移性メラノーマ、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺がん、肝臓がん、非ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、白血病、子宮がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がん、および、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がんなどのような腺癌を非限定的に含むがん由来してもよい。

20

【0087】

「転写制御下」または「機能的に連結した」という語句は、本明細書で用いる場合、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するために正しい位置および向きにあることを意味する。

【0088】

「ベクター」とは、単離された核酸を含み、かつその単離された核酸を細胞の内部に送達するために用いる組成物のことである。直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と会合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを非限定的に含む数多くのベクターが、当技術分野において公知である。したがって、「ベクター」という用語は、自律複製性プラスミドまたはウイルスを含む。この用語は、例えばポリリジン化合物、リポソームなどのような、細胞内への核酸の移入を容易にする非プラスミド性および非ウイルス性の化合物も含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが非限定的に含まれる。

30

【0089】

範囲：本開示の全体を通じて、本発明のさまざまな局面を、範囲形式で提示することができる。範囲形式による記載は、単に便宜上かつ簡潔さのためであって、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定とみなされるべきではないことが理解される必要がある。したがって、ある範囲の記載は、その範囲内におけるすべての可能な部分的範囲とともに、個々の数値も具体的に開示されていると考慮されるべきである。例えば、1~6などの範囲の記載は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などの部分的範囲とともに、その範囲内の個々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6も、具体的に開示されていると考慮されるべきである。これは範囲の幅広さとは関係なく適用される。

40

【0090】

説明

T細胞は、新規のT細胞RNAエレクトロポレーション技術を用いた際に、理想的な送達媒体であることができる。外因的に投与される薬物の標的化送達は、現在の治療法の限界である。本明細書に記載のRNAエレクトロポレーションを受けたT細胞は、外因的に投与される薬物を用いるこの限界を潜在的に克服して、腫瘍微小環境において抗腫瘍活性を調整する分子を送達することができる。

50

【0091】

T細胞のウイルス形質導入を用いる限界もまた、T細胞のRNAエレクトロポレーションを用いて克服することができる。RNAエレクトロポレーションは、T細胞のウイルス形質導入とは異なり、T細胞に対する一過性の、ベクターを伴わない改変である。さらに、RNAの宿主細胞ゲノム中への組み込みは可能性が低い。T細胞は、PD1またはTGF- β のようなT細胞の負のシグナルを、CD28のような正のシグナルに変換するスイッチ分子などの、標的腫瘍細胞のT細胞特異的殺傷を開始し、T細胞の抗腫瘍活性を増強する分子をコードするRNAのエレクトロポレーションを受けることができる。

【0092】

本発明は、一過性に発現して、因子を標的部位に分泌するための送達媒体として作用するように、T細胞を改変することを含む。1つの態様において、因子を送達部位に送達するための方法は、T細胞を含む細胞の集団に、スイッチ分子をコードするmRNAをエレクトロポレーションする段階であって、該T細胞が、該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する前記段階を含む。

10

【0093】

記載の発明に従ってT細胞のエレクトロポレーションを行い、投与することによって、T細胞は標的部位へ向かうことができる。T細胞は、スイッチ分子を一過性に発現し、標的部位で活性化因子を分泌する。したがって、本発明は、スイッチ分子の発現、および活性化因子の標的部位への送達を容易にして、免疫活性をモジュレートする。

【0094】

20

スイッチ分子

本発明は、エレクトロポレーションされたスイッチ分子をコードする核酸を含む、改変T細胞を含む。1つの局面において、本発明は、スイッチ分子を一過性に発現するT細胞を作製するための方法を含む。スイッチ分子は、一般に、膜受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメイン、または、シグナル伝達受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインから構成される。

【0095】

スイッチ分子をコードする核酸を、T細胞またはNK細胞などの細胞において発現させると、スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、スイッチ分子またはその断片を含む細胞内ドメインを活性化する。細胞内ドメインは、シグナル伝達受容体シグナルの伝達、エフェクター分子の活性化、活性化因子の分泌、またはそれらの任意の組み合わせなど、細胞内ドメインに特異的である細胞内のシグナルを伝える。

30

【0096】

1つの局面において、本発明は、エレクトロポレーションされたスイッチ分子をコードする核酸を含む、改変T細胞を含む。スイッチ分子は、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメイン、または、シグナル伝達受容体もしくはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを含む。T細胞はスイッチ分子を一過性に発現し、スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用は、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。

40

【0097】

細胞外ドメイン

膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインは、リガンド結合ドメインまたはリガンド認識ドメインを含む。1つの態様において、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインは、トランスフォーミング成長因子- β 受容体(TGF- β -R)、プログラム細胞死1(PD1)、プログラム細胞死リガンド1(PDL1)、インターフェロン- γ 受容体(IFN- γ -R)、またはそれらの任意の組み合わせの断片またはドメインである。

【0098】

1つの局面において、スイッチ分子は、トランスフォーミング成長因子- β 受容体(TGF- β -R)

50

-R) またはその断片を含む細胞外ドメインを含む。

【0099】

細胞内ドメイン

細胞内ドメインは、共刺激シグナル伝達領域を含む。共刺激シグナル伝達領域とは、シグナル伝達受容体の細胞内ドメインまたはその断片のことを指す。シグナル伝達受容体は、リンパ球の効率的な活性化のために必要とされる共刺激分子または細胞表面分子を非限定的に含む。もう1つの態様において、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインは、活性化受容体の断片またはドメインを含む。シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインは、シグナル伝達ドメイン、タンパク質相互作用ドメイン、酵素ドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含みうる。さらにもう1つの態様において、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインは、インターロイキン-2受容体 (IL-2R)、インターロイキン-12受容体 (IL-12R)、CD3、CD28、CD137、CD27、ICOS、OX40、T細胞受容体 (TCR)、共刺激分子、これらの配列の任意の誘導体またはバリエーション、同じ機能的能力を有する任意の合成配列、およびそれらの任意の組み合わせ由来の、細胞内ドメインの任意の断片またはドメインを含む。

10

【0100】

1つの局面において、スイッチ分子は、IL-12Rまたはその断片を含む細胞内ドメインを含む。

【0101】

他のドメイン

20

いくつかの態様において、スイッチ分子は、膜貫通ドメインをさらに含む。いくつかの態様において、スイッチ分子は、ヒンジドメインをさらに含む。1つの態様において、スイッチ分子をコードする核酸は、CD28膜貫通ドメインをコードする核酸およびCD8- ヒンジドメインをコードする核酸などの、膜貫通ドメインをコードする核酸およびヒンジドメインをコードする核酸をさらに含む。細胞外ドメインおよび/または細胞内ドメインはまた、細胞外ドメインまたは細胞内ドメインのいずれかの同じ受容体分子由来の膜貫通ドメインも含みうる。

【0102】

スイッチ分子の細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、またはスイッチ分子の細胞内ドメインと膜貫通ドメインとの間には、スペーサドメインがあってもよい。本明細書で用いる場合、「スペーサドメイン」という用語は、一般に、ポリペプチド鎖において膜貫通ドメインを細胞外ドメインまたは細胞内ドメインのいずれかに連結するように機能する、任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドのことを意味する。スペーサドメインは、最大で300アミノ酸、好ましくは10~100アミノ酸、最も好ましくは25~50アミノ酸を含みうる。

30

【0103】

二重特異性抗体

本発明はまた、二重特異性抗体も含む。二重特異性抗体は、2種の異なる結合特異性を含み、したがって2種の異なる抗原に結合する。1つの態様において、二重特異性抗体は、第1の抗原に結合する第1の抗原結合ドメイン、および第2の抗原に結合する第2の抗原結合ドメインを含む。もう1つの態様において、二重特異性抗体は、第1および第2の一本鎖可変断片 (scFv) 分子を含む抗原結合ドメインを含む。1つの態様において、第1および第2の抗原結合ドメインは、標的細胞上の抗原および活性化T細胞上の抗原に結合する。

40

【0104】

1つの態様において、二重特異性抗体は、活性化T細胞上の少なくとも1つの抗原に対する特異性を含む。活性化T細胞抗原は、別の細胞を活性化することができる、T細胞の表面上に見出される抗原を含む。活性化T細胞抗原は、共刺激分子に結合しうる。共刺激分子とは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答のために必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子のことである。活性化T細胞抗原の例には、CD3、CD4、CD8、T細胞受容体 (TCR)、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40

50

、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83特異的結合リガンド、またはそれらの任意の断片が非限定的に含まれる。他の共刺激エレメントもまた、本発明の範囲内である。これらの例において、二重特異性抗体は、T細胞抗原を認識し、Bispecific T Cell Engager (BiTE) と呼ばれる。しかし、本発明は、いずれかの特定の二重特異性抗体の使用によっては限定されない。むしろ、任意の二重特異性抗体またはBiTEを使用することができる。二重特異性抗体またはBiTE分子はまた、少なくとも1つの標的細胞関連抗原に対する特異性を有する可溶性タンパク質として発現させてもよい。

【0105】

1つの態様において、二重特異性抗体は、1つより多い抗原結合ドメインを含む。この態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、合成抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖可変断片、単ドメイン抗体、それらの抗原結合性断片、およびそれらの任意の組み合わせを含む。ヒト抗体およびヒト化抗体を作製するための手法は、本明細書の他所に記載している。

【0106】

もう1つの態様において、標的細胞抗原は、T細胞受容体が結合するのと同じ抗原であってもよいし、または異なる抗原であってもよい。標的細胞抗原は、任意の腫瘍関連抗原 (TAA)、またはウイルス抗原、細菌抗原、および寄生虫抗原、またはそれらの任意の断片を含む。標的細胞抗原は、標的細胞を規定する任意のタイプのリガンドを含みうる。例えば、標的細胞抗原は、特定の疾患状態と関連する標的細胞上の細胞マーカーとして作用するリガンドを認識するように、選択されてもよい。このように、細胞マーカーは、ウイルス、細菌、および寄生虫の感染症、自己免疫疾患、ならびにがん細胞と関連するものを含む、二重特異性抗体中の抗原結合ドメインに対するリガンドとして作用しうる。

【0107】

もう1つの態様において、標的細胞抗原は、CD3、CD4、CD8、T細胞受容体 (TCR)、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83特異的結合リガンド、およびそれらの断片を非限定的に含む、活性化T細胞抗原と同じ抗原である。1つの局面において、本発明は、標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸を含み、ここで、該T細胞は二重特異性抗体を一過性に分泌する。二重特異性抗体を操作および発現するための手法は、異なる特異性を有する2種の免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアの組み換え共発現 (Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)、第WO 93/08829号、およびTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照されたい)、ならびに「knob-in-hole」工学 (例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい) を非限定的に含む。多重特異性抗体もまた、抗体Fc-ヘテロダイマー分子を作製するための静電的ステアリング効果の操作 (第WO 2009/089004A1号) ; 2種以上の抗体または断片の架橋 (例えば、米国特許第4,676,980号、およびBrennan et al., Science 229:81 (1985)を参照されたい) ; 二重特異性抗体を産生するためのロイシンジッパーの使用 (例えば、Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)を参照されたい) ; 二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術の使用 (例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照されたい) ; および一本鎖Fv (scFv) ダイマーの使用 (例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい) ; ならびに、例えばTut et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されている三重特異性抗体の調製によっても作製される。「Octopus抗体」を含む、3種以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる (例えば、米国特許出願公開第2006/0025576A1号を参照されたい)。二重特異性抗体は、2種の異なる抗体またはその一部分を連結することによって構築することができる。例えば、二重特異性抗体は、2種の異なる抗体由来のFab、F(ab')₂、Fab'、scFv、およびsdAbを含むことができる。

【0108】

10

20

30

40

50

可溶性融合タンパク質

本発明はまた、スイッチ分子を伴うかまたは伴わずに、可溶性融合タンパク質を発現するように改変されたT細胞も含む。可溶性融合タンパク質は、2種の異なる結合特異性を含み、したがって、2種の異なるリガンドまたは受容体または抗原または分子に結合する。1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、第1のリガンド、受容体、抗原、またはそれらの断片に結合する第1の結合ドメインと、第2のリガンド、受容体、抗原、またはそれらの断片に結合する第2の結合ドメインとを含む。もう1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、第1の一本鎖可変断片(scFv)分子を含む第1の結合ドメインと、第2の一本鎖可変断片(scFv)分子を含む第2の結合ドメインとを含む。1つの態様において、第1の結合ドメインおよび第2の結合ドメインは、それぞれ、標的細胞上の受容体および活性化T細胞上の受容体に結合する。

10

【0109】

1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、活性化T細胞上の少なくとも1つの分子に結合する特異性を有する、少なくとも1つの結合ドメインを含む。活性化T細胞分子は、T細胞上に見出される任意の表面分子を含む。活性化T細胞分子は、共刺激分子に結合する。共刺激分子とは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答のために必要とされる細胞表面分子のことである。活性化T細胞分子の例には、CD3、CD4、CD8、T細胞受容体(TCR)、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83特異的結合リガンド、またはそれらの任意の断片が非限定期に含まれる。他の共刺激エレメントもまた、本発明の範囲内である。しかし、本発明は、抗体の使用によっては限定されない。むしろ、任意のリガンド、受容体、抗原、またはそれらの断片を、可溶性融合タンパク質の一部として使用することができる。1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、リガンド、抗体、またはそれらの任意の断片などの、ただしこれらに限定されない、CD28に結合する特異性を有する少なくとも1つの結合ドメインを含む。特定の態様において、可溶性融合タンパク質は、抗CD28 scFvを含む結合ドメインを含む。

20

【0110】

1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、合成抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖可変断片、単一ドメイン抗体、それらの抗原結合性断片、およびそれらの任意の組み合わせを含む、少なくとも1つの結合ドメインを含む。ヒト抗体およびヒト化抗体を作製するための手法は、本明細書の他所に記載している。

30

【0111】

もう1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、任意の腫瘍関連抗原(TAA)、またはウイルス抗原、細菌抗原、および寄生虫抗原、またはそれらの任意の断片に結合する特異性を有する、少なくとも1つの結合ドメインを含む。結合ドメインは、標的細胞を規定する任意のタイプのリガンドに結合する特異性を有する。例えば、結合ドメインは、特定の疾患状態と関連するような標的細胞を認識するために、選択された標的細胞上の分子に特異的に結合してもよい。1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、リガンド、抗体、またはそれらの任意の断片などの、ただしこれらに限定されない、TGFbRIIに結合する特異性を有する少なくとも1つの結合ドメインを含む。特定の態様において、可溶性融合タンパク質は、抗TGFbRII scFvを含む第2の結合ドメインを含む。もう1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、リガンド、抗体、またはそれらの任意の断片などの、ただしこれらに限定されない、PD-L1に結合する特異性を有する少なくとも1つの結合ドメインを含む。特定の態様において、可溶性融合タンパク質は、抗PD-L1 scFvを含む結合ドメインを含む。

40

【0112】

もう1つの態様において、可溶性融合タンパク質は、標的細胞抗原上の少なくとも1つの分子に結合する特異性を有する少なくとも1つの結合ドメインを含む。結合ドメインは、CD3、CD4、CD8、T細胞受容体(TCR)、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGH

50

T、NKG2C、B7-H3、CD83特異的結合リガンド、およびそれらの断片を非限定的に含む、活性化T細胞上の同じ分子に結合してもよい。

【0113】

可溶性融合タンパク質は、結合ドメインの間にスペーサドメインをさらに含んでもよい。本明細書で用いる場合、「スペーサドメイン」という用語は、一般に、ポリペプチド鎖において第1の結合ドメインと第2の結合ドメインとを連結するように機能する、任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドのことを意味する。スペーサドメインは、最大で100アミノ酸、好ましくは2～50アミノ酸、最も好ましくは5～10アミノ酸を含みうる。

【0114】

ヒト抗体

ヒトにおける抗体のインビボ使用のためには、ヒト抗体を用いることが好ましいと考えられる。ヒト対象の治療的処置のためには、完全ヒト抗体が特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いるファージディスプレイ法を、これらの手法の改良法と併せて含む、当技術分野において公知の種々の方法によって作製することができる。また、米国特許第4,444,887号および第4,716,111号；ならびにPCT公開第WO 98/46645号、第WO 98/50433号、第WO 98/24893号、第WO 98/16654号、第WO 96/34096号、第WO 96/33735号、および第WO 91/10741号も参照されたい；これらはそれぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる。ヒト抗体はまた、重鎖および軽鎖がヒトDNAの1つまたは複数の供給源に由来するヌクレオチド配列によってコードされている抗体であることもできる。

【0115】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンを発現する能力はないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて産生させることもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体を、無作為に、または相同組換えによって、マウス胚性幹細胞中に導入してもよい。あるいは、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域、および多様性領域を、マウス胚性幹細胞中に導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別々にまたは同時に、非機能性にされうる。例えば、キメラマウスおよび生殖系列突然変異型マウスにおける抗体重鎖連結領域（JH）遺伝子のホモ接合性欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。改変された胚性幹細胞を増大させ、胚盤胞に微量注入してキメラマウスを生じさせる。続いて、キメラマウスを交配させて、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を生じさせる。トランスジェニックマウスに対して、通常の様式で、選択された抗原、例えば、本発明のポリペプチドの全体または一部分による免疫処置を行う。最適な標的に対する抗体を、従来のハイブリドーマ技術を用いて、免疫処置を行ったトランスジェニックマウスから入手することができる。トランスジェニックマウスによって保有されるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の際に再編成され、その後にクラススイッチおよび体細胞突然変異を起こす。したがって、そのような手法を用いて、IgG1（1）およびIgG3を非限定的に含む、治療的に有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を産生させることが可能である。ヒト抗体を産生させるためのこの技術の概略については、Lonberg and Huszar (Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)) を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生させるためのこの技術の詳細な考察、ならびにそのような抗体を産生させるためのプロトコールについては、例えば、PCT公開第WO 98/24893号、第WO 96/34096号、および第WO 96/33735号；ならびに米国特許第5,413,923号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,569,825号；第5,661,016号；第5,545,806号；第5,814,318号；および第5,939,598号を参照されたい。これらはそれぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) および Genpharm (San Jose, Calif.) などの会社と、上記のものに類似した技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体を提供する契約を結ぶことができる。抗原負荷刺激時にヒト抗体の産生をもたらすことになる、生殖系列突然変異型マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリ

10

20

30

40

50

ン遺伝子アレイの移入に関する具体的な考察については、例えば、Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); および Ducho sal et al., *Nature*, 355:258 (1992)を参照されたい。

【0116】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから導き出すこともできる (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Vaughan et al., *Nature Biotech.*, 14:309 (1996))。ファージディスプレイ技術 (McCafferty et al., *Nature*, 348:552-553 (1990)) は、免疫処置を受けていないドナー由来の免疫グロブリン可変 (V) ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体および抗体断片を産生させるために用いることができる。この手法によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、M13またはfdなどの糸状バクテリオファージの主要コートタンパク質遺伝子またはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかの中にインフレームでクローニングして、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示させる。糸状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有するため、抗体の機能特性に基づく選択により、それらの特性を呈する抗体をコードする遺伝子の選択ももたらされる。このため、ファージは、B細胞の特性のうちのいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、種々のフォーマットで行うことができる; それらの概説については、例えば、Johnson, Kevin S, and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)を参照されたい。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイに用いることができる。Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)は、免疫処置を受けていないマウスの脾臓に由来するV遺伝子の小規模なランダムコンビナトリアルライブラリーから、抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。免疫処置を受けていないヒトドナーからV遺伝子のレパートリーを構築することができ、抗原 (自己抗原を含む) の多様なアレイに対する抗体を、本質的にはMarks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)、またはGriffith et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993)に記載されている手法に従って単離することができる。米国特許第5,565,332号および第5,573,905号も参照されたく、これらはそれぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0117】

ヒト抗体はまた、インビトロ活性化B細胞によって作製されてもよい (米国特許第5,567,610号および第5,229,275号を参照されたく、これらはそれぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。ヒト抗体はまた、Roder et al. (*Methods Enzymol.*, 121:140-167 (1986)) によって記載されているものなどの、ただしこれに限定されない、ハイブリドーマ手法を用いてインビトロで作製されてもよい。

【0118】

ヒト化抗体

あるいは、いくつかの態様において、非ヒト抗体をヒト化し、この場合には、抗体の特定の配列または領域を、ヒトにおいて天然に産生される抗体との類似性を高めるように改変する。1つの態様において、抗原結合ドメインをヒト化する。

【0119】

「ヒト化」抗体は、元の抗体と類似の抗原特異性を保っている。しかし、あるヒト化方法を用いると、ヒト抗原に対する抗体の結合の親和性および/または特異性が、その内容の全体が参照により本明細書に組み入れられる、Wu et al., *J. Mol. Biol.*, 294:151 (1999)により記載されているような「定方向進化」の方法を用いて高められうる。

【0120】

ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からその中に導入された、1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と称され、典型的には「インポート」可変ドメインから採られる。したがって、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリン分子由来の1つまたは複数のCDR、およびヒト由来のフレームワーク

領域を含む。抗体のヒト化は、当技術分野において周知であり、本質的にはWinterらの方法 (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)) に従って、ヒト抗体の対応する配列を齧歯動物のCDRまたはCDR配列へと置換すること、すなわち、CDRグラフィング (EP 239,400号; PCT公開公報第WO 91/09967号; および米国特許第4,816,567号; 第6,331,415号; 第5,225,539号; 第5,530,101号; 第5,585,089号; 第6,548,640号、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる) によって行うことができる。そのようなヒト化キメラ抗体では、実質的にインタクトではないヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。實際上、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基およびおそらくはいくつかのFR残基が、齧歯動物抗体における類似部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。抗体のヒト化はまた、ペニヤリングもしくはリサーフェイシング (EP 592,106号; EP 519,596号; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); およびRoguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) またはチェーンシャッフリング (米国特許第5,565,332号) によって達成することもでき、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0121】

ヒト化抗体を作製する上で用いられる、軽鎖および重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低減させることを目的とする。いわゆる「ベストフィット」法に従って、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。続いて、齧歯動物のものに最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク (FR) として受け入れる (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。もう1つの方法では、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを用いる。同じフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体に用いることができる (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

【0122】

抗体は、標的抗原に対する高い親和性および他の有利な生物学的特性を保ったままでヒト化することができる。本発明の1つの局面によれば、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いた、親配列およびさまざまな概念上のヒト化産物の分析の過程によって調製される。免疫グロブリンの三次元モデルは、一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列に関して可能性のある三次元立体構造を図示および表示するコンピュータプログラムが、利用可能である。これらの表示の検討により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の考えられる役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンが標的抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、標的抗原に対する親和性の増加などの所望の抗体特性が達成されるように、FR残基を、レシピエント配列およびインポート配列から選択して、組み合わせることができる。一般に、CDR残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接かつ最も実質的に関与している。

【0123】

共刺激分子

1つの態様において、本発明の改変T細胞または細胞は、改変T細胞または細胞中にエレクトロポレーションされる、共刺激分子をコードする核酸などの、共刺激分子をコードする核酸を導入する段階をさらに含む。核酸は、形質導入、トランスフェクション、またはエレクトロポレーションによってT細胞または細胞中に導入されうる。もう1つの態様において、共刺激ドメインは、CD3、CD27、CD28、CD83、CD86、CD127、4-1BB、4-1

10

20

30

40

50

BBL、PD1、およびPD1Lから選択される。さらにもう1つの態様において、CD3は、CD3鎖およびCD3鎖などの、少なくとも2つの異なるCD3鎖を含む。例示的な態様において、CD3などの共刺激分子をコードするRNAを、T細胞または細胞中にエレクトロポレーションする。もう1つの態様において、CD3 RNAなどの共刺激分子をコードする核酸を、スイッチ分子をコードする核酸またはRNAなどの、別の核酸とコエレクトロポレーションする。

【0124】

活性化因子

本発明は、免疫モジュレート分子などの活性化因子を含む。1つの局面において、スイッチ分子のそれぞれのリガンドとの相互作用は、T細胞が活性化因子を分泌するように誘導する。活性化因子は、T細胞または他の免疫細胞を結合、活性化、または刺激して、それらの活性をモジュレートする。活性化因子はまた、T細胞からの分泌が可能な形態でもあり、そのような活性化因子は膜貫通領域を欠如している。いくつかの態様において、活性化因子は、抗体、可溶性サイトカイン、可溶性ケモカイン、成長因子、またはそれらの機能的断片もしくはバリエーションから選択される。活性化因子が可溶性サイトカインである態様において、可溶性サイトカインは、非限定的に、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TNF、TGF、IFN、ならびにそれらの機能的断片およびバリエーションでありうる。活性化因子が抗体またはその機能的断片もしくはバリエーションである場合、抗体またはその機能的断片もしくはバリエーションは、別のT細胞または標的細胞上の受容体に、アゴニスティックまたはアンタゴニスティックに結合しうる。

【0125】

標的部位での活性化因子の分泌は、標的部位における他の免疫細胞の活性化を促進する。例えば、スイッチ分子を発現するT細胞によるインターフェロンの分泌は、重要な免疫刺激効果および免疫モジュレート効果をT細胞に提供しながら、マクロファージおよびNK細胞を活性化する。

【0126】

T細胞およびその組成物

本発明の1つの局面は、エレクトロポレーションされたスイッチ分子をコードするmRNAを含むT細胞であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現して、該スイッチ分子とそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する、前記T細胞を含む。

【0127】

本発明はまた、スイッチ分子、可溶性融合タンパク質、および二重特異性抗体を有する改変T細胞も含む。1つの局面において、本発明は、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子をコードする核酸；ならびに、可溶性融合タンパク質をコードする核酸、および標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸のうちの少なくとも1つを含む改変T細胞であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、かつ該可溶性融合タンパク質または二重特異性抗体を分泌する、前記改変T細胞を含む。

【0128】

もう1つの局面において、本発明は、スイッチ分子をコードする核酸、ならびに、可溶性融合タンパク質をコードする核酸、および二重特異性抗体をコードする核酸のうちの少なくとも1つを含む改変T細胞の集団であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、かつ該可溶性融合タンパク質または二重特異性抗体を分泌する、改変T細胞の集団を含む。

【0129】

1つの態様において、改変T細胞は、リガンドに対するスイッチ分子の結合によって活性化され、活性化は、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。もう1つの態様において、改変T細胞は、二重特異性抗体に対する結合によって活性化され、活性化は

、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。

【0130】

標的部位は、固形腫瘍などの腫瘍を含みうる。1つの態様において、T細胞は、固形腫瘍へ向かう。腫瘍の例には、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、甲状腺がん、およびそれらの組み合わせが含まれる。

【0131】

T細胞は、特異的な抗原へ向かいうる。例えば、T細胞は、腫瘍抗原へ向かいうる。1つの態様において、T細胞は、腫瘍抗原に結合しうる。腫瘍抗原は、腫瘍関連抗原（TAA）、ウイルス抗原、抗体により認識される抗原、それらの任意の断片、またはそれらの任意の組み合わせでありうる。もう1つの態様において、腫瘍抗原は、p53、Ras、 β -カテニン、CDK4、 β -アクチニン-4、チロシナーゼ、TRP1/gp75、TRP2、gp100、メラニン-A/MART1、ガングリオシド、PSMA、HER2、WT1、EphA3、EGFR、CD20、MAGE、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、テロメラーゼ、サバイビン、またはそれらの任意の組み合わせでありうる。

【0132】

もう1つの局面において、本発明は、エレクトロポレーションされたスイッチ分子をコードする核酸を含む改変T細胞の集団であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子とそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する前記改変T細胞の集団を含む。本発明のもう1つの局面は、スイッチ分子を一過性に発現するT細胞を作製するための方法を含む。方法は、スイッチ分子をコードする核酸をT細胞の集団中に導入する段階であって、該スイッチ分子が、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを含み、該T細胞が、該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導して、それにより該T細胞を作製する、前記段階を含む。1つの態様において、方法は、標的部位へ向かうようにT細胞を活性化する段階であって、該T細胞が該標的部位で活性化因子を分泌する前記段階をさらに含む。

【0133】

さらにもう1つの局面において、本発明は、スイッチ分子、および可溶性融合タンパク質または二重特異性抗体を一過性に発現するT細胞を作製するための方法を含む。方法は、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子をコードする核酸、ならびに、可溶性融合タンパク質をコードする核酸、および標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸のうちの少なくとも1つを導入する段階を含む。1つの局面において、T細胞は、スイッチ分子、および可溶性融合タンパク質または二重特異性抗体を一過性に発現することができ、T細胞の活性化は、標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。

【0134】

T細胞の供給源

スイッチ分子をコードする核酸の導入前に、T細胞の供給源を対象から入手する。対象の非限定的な例には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が含まれる。好ましくは、対象はヒトである。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、臍帯血、および腫瘍を含む、数多くの供給源から入手することができる。1つの態様において、T細胞の供給源は、末梢血単核細胞である。もう1つの態様において、細胞の集団は、精製されたT細胞を含む。

【0135】

ある態様において、T細胞は、フィコール分離などの、当業者に公知である多数の手法を用いて、対象から収集された血液ユニットから入手することができる。1つの態様において、個体の循環血由来の細胞は、アフエーシスまたは白血球搬出法によって入手される。アフエーシス産物は、典型的には、T細胞を含むリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含有する。アフエーシスによって収集された細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、細胞を適切な緩衝液または培地中に置くことができ、その後の処理段階のために、例えば、リン酸緩衝食塩水（PBS）または洗浄溶液は、カルシウムを欠如し、かつマグネシウムを欠如することができるか、またはすべてではないものの多くの二価カチオンを欠如することができる。洗浄後に、細胞を、例えば、Ca非含有、Mg非含有PBSなどの、種々の生体適合性緩衝液中に再懸濁させることができる。あるいは、アフエーシス試料の望ましくない成分を除去して、細胞を培養培地中に直接再懸濁させることができる。

10

【0136】

もう1つの態様において、赤血球を溶解させ、例えば、PERCOLL（商標）勾配での遠心分離により単球を枯渇化することによって、T細胞を末梢血から単離する。あるいは、T細胞を、臍帯血から単離することができる。いずれの場合にも、T細胞の特定の部分集団を、ポジティブ選択またはネガティブ選択の手法によって、さらに単離することができる。

【0137】

臍帯血単核細胞、またはT細胞を含む細胞の他の供給源のいずれかから、CD34、CD8、CD14、CD19、およびCD56を非限定的に含む、ある特定の抗原を発現する非T細胞を枯渇化することができる。これらの細胞の枯渇化は、単離された抗体、腹水などの、抗体を含む生体試料、物理的支持体に結合した抗体、および細胞に結合した抗体を用いて実現することができる。

20

【0138】

ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブ選択される細胞に特有の表面マーカーに対する抗体の組み合わせを用いて実現することができる。好ましい方法は、ネガティブ選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを用いる、ネガティブ磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる細胞ソーティングおよび/または選択である。例えば、ネガティブ選択によってCD4+細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。

30

【0139】

ポジティブ選択またはネガティブ選択による所望の細胞集団の単離のために、細胞および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変化させることができる。ある態様において、細胞とビーズの最大接触を確実にするために、ビーズおよび細胞と一緒に混合される容積を有意に減少させる（すなわち、細胞の濃度を増加させる）ことが望ましい場合がある。例えば、1つの態様において、1 ml当たり細胞20億個の濃度を用いる。1つの態様において、1 ml当たり細胞10億個の濃度を用いる。さらなる態様において、1 ml当たり細胞1億個よりも多くを用いる。さらなる態様において、1 ml当たり細胞1000万個、1500万個、2000万個、2500万個、3000万個、3500万個、4000万個、4500万個、または5000万個の細胞濃度を用いる。さらにもう1つの態様において、1 ml当たり細胞7500万個、8000万個、8500万個、9000万個、9500万個、または1億個からの細胞濃度を用いる。さらなる態様において、1 ml当たり細胞1億2500万個または1億5000万個の濃度を用いることができる。高濃度を用いることにより、増加した細胞収量、細胞活性化、および細胞増大を生じることができる。

40

【0140】

T細胞はまた、洗浄段階後に凍結することもでき、これは、単球除去段階を必要としない。理論に拘束されることは望まないが、凍結およびそれに続く融解の段階は、細胞集団における顆粒球およびある程度の単球を除去することによって、より均一な産物を提供す

50

る。血漿および血小板を除去する洗浄段階後に、細胞を、凍結液中に懸濁させてもよい。多くの凍結液およびパラメーターが当技術分野において公知であり、かつこの状況において有用であるが、非限定的な例において、1つの方法は、20%DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または他の適した細胞凍結培地の使用を伴う。続いて、細胞を、1分間に1 の速度で-80 に凍結し、液体窒素貯蔵タンクの気相中に貯蔵する。他の制御された凍結法、および、-20 でまたは液体窒素中で即時の制御されない凍結を用いてもよい。

【0141】

1つの態様において、細胞の集団は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、精製されたT細胞集団、およびT細胞株を含みうる。もう1つの態様において、細胞の集団は、末梢血単核細胞を含む。さらにもう1つの態様において、細胞の集団は、精製されたT細胞を含む。

【0142】

核酸の導入

核酸を細胞に導入する方法には、物理的、生物学および化学的方法が含まれる。宿主細胞にRNAなどのポリヌクレオチドを導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション、微粒子銃法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。RNAは、エレクトロポレーション (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)) またはGene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany) を含む、市販の方法を用いて、標的細胞に導入することができる。また、RNAを、リポフェクションを用いるカチオン性リポソーム媒介性トランスフェクションを用いて、ポリマーカプセル封入を用いて、ペプチド媒介性トランスフェクションを用いて、または「遺伝子銃」などのバイオリスティック (biolistic) 粒子送達システムを非限定的に含む市販の方法 (例えば、Nishikawa, et al. Hum Gen Ther., 12(8):861-70 (2001)を参照) を用いて、細胞に導入することもできる。

【0143】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNAベクターおよびRNAベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞に遺伝子を挿入するために最も広く使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ボックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI型、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来しうる。例えば、米国特許第5,350,674号および第5,585,362号を参照されたい。

【0144】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段には、コロイド分散系、例えば高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズなど、ならびに、水中油型エマルション、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質ベースの系が含まれる。インビトロおよびインビボで送達媒体として用いるための例示的なコロイド系の1つは、リポソーム (例えば、人工膜小胞) である。

【0145】

使用に適した脂質は、販売元から入手することができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン (「DMPC」) はSigma, St. Louis, MOから入手することができ; ジアセチルホスファート (「DCP」) はK & K Laboratories (Plainview, NY) から入手することができ; コレステロール (「Chol」) はCalbiochem-Behringから入手することができ; ジミリスチルホスファチジルグリセロール (「DMPG」) および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL) から入手することができる。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中にある脂質の貯蔵溶液は、約-20 で保存することができる。クロロホルムはメタノールよりも容易に蒸発するので、それを唯一の溶媒として用いることが好ましい。「リポソーム」とは、閉じた脂質二重層または凝集物の生成によって形成される、種々の単層および多重層の脂質媒体を包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜による小胞構造および内部の水性媒質を有するものとして特徴づける

10

20

30

40

50

ことができる。多重層リポソームは、水性媒質によって隔てられた複数の脂質層を有する。それらはリン脂質を過剰量の水性溶液中に懸濁させると自発的に形成される。脂質成分は自己再配列を起こし、その後に閉鎖構造の形成が起こり、水および溶解溶質を脂質二重層の間に封じ込める (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5:505-10)。しかし、溶液中で通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物も想定している。例えば、脂質がミセル構造をとってもよく、または単に脂質分子の不均一な凝集物として存在してもよい。また、リポフェクタミン-核酸複合体も想定している。

【0146】

宿主細胞における核酸の存在を確かめる目的で、宿主細胞に外因性核酸を導入するため、または他の様式で細胞を本発明の阻害因子に曝露させるために用いられる方法にかかわらず、種々のアッセイを用いることができる。そのようなアッセイには、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば、サザンブロット法およびノーザンブロット法、RT-PCRおよびPCRなど；「生化学的」アッセイ、例えば、免疫学的手段 (ELISAおよびウエスタンブロット) または本発明の範囲内にある作用物質を同定するための本明細書に記載のアッセイによって、特定のペプチドの有無を検出すること、などが含まれる。

【0147】

RNA

1つの態様においては、RNAがT細胞に導入される。もう1つの態様において、核酸は、インビトロ転写されたRNAまたは合成RNAなどのmRNAである。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により生成されるテンプレートをを用いるインビトロ転写によって生成される。任意の供給源からの関心対象のDNAを、PCRによって、適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを用いるインビトロmRNA合成のためのテンプレートに直接変換することができる。DNAの供給源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列、またはDNAの他の任意の適切な供給源でありうる。インビトロ転写のための望ましいテンプレートは、分泌可能な因子である。一例を挙げると、テンプレートは、抗体、可溶性サイトカイン、可溶性ケモカイン、成長因子、またはそれらの機能的断片もしくはバリエーションをコードする。

【0148】

PCRは、トランスフェクションに用いられるmRNAのインビトロ転写のためのテンプレートを作製するために用いられる。PCRを行うための方法は、当技術分野において周知である。PCRに用いるためのプライマーは、PCRのためのテンプレートとして用いようとするDNAの領域に対して実質的に相補的な領域を有するように設計される。「実質的に相補的な」とは、本明細書で用いる場合、プライマー配列中の塩基の大半もしくはすべてが相補的であるか、または1つもしくは複数の塩基が非相補的もしくはミスマッチ性である、ヌクレオチドの配列のことを指す。実質的に相補的な配列は、PCRのために用いられるアニーリング条件下で、意図したDNA標的とアニールまたはハイブリダイズすることができる。プライマーは、DNAテンプレートの任意の部分に対して実質的に相補的であるように設計することができる。例えば、プライマーを、5'および3' UTRを含めて、細胞において通常転写される遺伝子の部分 (オープンリーディングフレーム) を増幅するように設計することができる。また、プライマーを、関心対象の特定のドメインをコードする遺伝子の一部分を増幅するように設計することもできる。1つの態様において、プライマーは、5'および3'UTRの全体または部分を含めて、ヒトcDNAのコード領域を増幅するように設計される。PCRのために有用なプライマーは、当技術分野において周知である合成法によって作製される。「順方向プライマー」とは、増幅させようとするDNA配列の上流にある、DNAテンプレート上のヌクレオチドに対して実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーのことである。「上流」とは、本明細書において、コード鎖を基準として、増幅させようとするDNA配列の5'側にある場所 (location 5) を指して用いられる。「逆方向プライマー」とは、増幅させようとするDNA配列の下流にある、二本鎖DNAテンプレートに対して実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含むプライマーのことである。「下流」とは、本明細書において、コード鎖を基準として、増幅させようとするDNA配列の3'側

10

20

30

40

50

にある場所のことを指す。

【0149】

RNAの安定性および/または翻訳効率を高める能力を有する化学構造を用いることもできる。RNAは5'および3' UTRを有することが好ましい。1つの態様において、5' UTRは長さが0~3000ヌクレオチドである。コード領域に付加される5'および3' UTR配列の長さは、UTRの異なる領域とアニールするPCR用のプライマーを設計することを非限定的に含む、異なる方法によって変化させることができる。このアプローチを用いて、当業者は、転写されたRNAのトランスフェクション後に最適な翻訳効率を達成するために必要な5'および3' UTRの長さを改変することができる。

【0150】

5'および3' UTRは、関心対象の遺伝子の天然の内因性5'および3' UTRであってよい。または、UTR配列を順方向および逆方向プライマーに組み入れることによって、またはテンプレートの他の任意の改変によって、関心対象の遺伝子にとって内因性でないUTR配列を付加することもできる。関心対象の遺伝子にとって内因性でないUTR配列の使用は、RNAの安定性および/または翻訳効率を改変するために有用な可能性がある。例えば、3' UTR配列中のAURリッチエレメントはmRNAの安定性を低下させうることが知られている。このため、当技術分野において周知であるUTRの特性に基づき、転写されたRNAの安定性が高まるように3' UTRを選択または設計することができる。

【0151】

1つの態様において、5' UTRは内因性遺伝子のKozak配列を含みうる。または、関心対象の遺伝子にとって内因性でない5' UTRを上記のようにPCRによって付加する場合には、5' UTR配列を付加することによってコンセンサスKozak配列を設計し直すこともできる。Kozak配列はある種のRNA転写物の翻訳の効率を高めることができるが、すべてのRNAで効率的な翻訳が可能になるのに必要なわけではないように思われる。多くのmRNAに対するKozak配列の必要性は、当技術分野において公知である。他の態様においては、5' UTRを、そのRNAゲノムが細胞内で安定しているRNAウイルスから導き出すことができる。他の態様においては、mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨げるために、さまざまなヌクレオチド類似体を3'または5' UTRに用いることができる。

【0152】

遺伝子クローニングと必要とせずにDNAテンプレートからのRNAの合成を可能にするためには、転写のプロモーターが、転写させようとする配列の上流でDNAテンプレートと結びつく必要がある。RNAポリメラーゼに対するプロモーターとして機能する配列を順方向プライマーの5'末端に付加すると、RNAポリメラーゼプロモーターが、転写させようとするオープンリーディングフレームの上流でPCR産物に組み入れられるようになる。1つの好ましい態様において、本明細書の他所に記載したように、プロモーターはT7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターには、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが非限定的に含まれる。T7、T3およびSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は当技術分野において公知である。

【0153】

1つの態様において、mRNAは5'末端のキャップおよび3'ポリ(A)尾部の両方を有し、それらがリボソーム結合、翻訳の開始および細胞におけるmRNA安定性を決定づける。環状DNAテンプレート、例えばプラスミドDNA上では、RNAポリメラーゼは真核細胞における発現には適さない長いコンカテマー産物を生成させる。3' UTRの末端で線状化されたプラスミドDNAの転写では、転写後にポリアデニル化されたとしても真核生物トランスフェクションには有効でない、正常サイズのmRNAがもたらされる。

【0154】

線状DNAテンプレート上で、ファージT7 RNAポリメラーゼは、転写物の3'末端をテンプレートの最終塩基を越えて伸長させることができる (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003))。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 5 】

DNAテンプレートへのポリA/T連鎖の従来の組み込み方法は分子クローニングである。しかし、プラスミドDNAに組み込まれたポリA/T配列はプラスミド不安定性を引き起こす恐れがあり、このことが、細菌細胞から得られたプラスミドDNAテンプレートに欠失および他の異常がしばしば高度に混入する理由となっている。このためにクローニング手順は面倒で時間がかかるだけでなく、往々にして信頼性も損なわれる。これがクローニングを伴わずにポリA/T 3'連鎖を有するDNAテンプレートの構築を可能にする方法が非常に望まれる理由である。

【 0 1 5 6 】

転写DNAテンプレートのポリA/Tセグメントは、ポリT尾部、例えば100T尾部など（サイズは50～5000 Tでありうる）を含む逆方向プライマーを用いることによってPCR中に、またはDNA連結もしくはインビトロ組換えを非限定的に含む他の任意の方法によってPCRの後に生成させることができる。ポリ（A）尾部はまた、RNAに安定性を与え、それらの分解も低下させる。一般に、ポリ（A）尾部の長さは、転写されたRNAの安定性と正の相関関係にある。1つの態様において、ポリ（A）尾部は100～5000個のアデノシンである。

10

【 0 1 5 7 】

RNAのポリ（A）尾部は、インビトロ転写後に、ポリ（A）ポリメラーゼ、例えば大腸菌ポリAポリメラーゼ（E-PAP）などを用いることによって、さらに伸長させることができる。1つの態様においては、ポリ（A）尾部の長さを100ヌクレオチドから300～400ヌクレオチドに増やすことにより、RNAの翻訳効率が約2倍に高くなる。さらに、異なる化学基を3'末端に結びつけることもmRNA安定性を高める可能性がある。そのような付属物（attachment）は、改変/人工ヌクレオチド、アプタマーおよび他の化合物を含みうる。例えば、ポリ（A）ポリメラーゼを用いて、ATP類似体をポリ（A）尾部に組み入れることができる。ATP類似体は、RNAの安定性をさらに高めることができる。

20

【 0 1 5 8 】

5'キャップもまた、RNA分子に安定性を与える。1つの好ましい態様において、本明細書に開示された方法によって生成されたRNAは5'キャップを含む。5'キャップは、当技術分野において公知であって本明細書に記載された手法を用いて付与される（Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:146-155 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)）。

30

【 0 1 5 9 】

本明細書で開示された方法によって生成されたRNAはまた、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列も含みうる。IRES配列は、mRNAに対するキャップ非依存的なリボソーム結合を開始させて翻訳開始を助長する、任意のウイルス配列、染色体配列または人工的に設計された配列であってよい。細胞の透過性および生存能力を高める因子、例えば糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化物質および界面活性剤などを含みうる、細胞エレクトロポレーションのために適した任意の溶質を含めることができる。

【 0 1 6 0 】

いくつかの態様においては、スイッチ分子をコードする核酸は、mRNAである。1つの態様において、スイッチ分子をコードする核酸は、インビトロ転写されたmRNAである。別の態様において、該核酸は細胞中にエレクトロポレーションされる。さらに別の態様において、該mRNAは細胞中にエレクトロポレーションされる。

40

【 0 1 6 1 】

開示される方法は、遺伝的に改変されたT細胞が標的がん細胞を死滅させる能力の評価を含め、基礎研究および治療法において、がん、幹細胞、急性および慢性感染症、ならびに自己免疫疾患の分野で、T細胞活性のモジュレーションのために適用することができる。

【 0 1 6 2 】

本方法はまた、例えばプロモーターまたは投入RNAの量を変化させることによって、発

50

現のレベルを広範囲にわたって制御する能力も提供し、そのため発現レベルを個別に調節することが可能になる。その上、PCRに基づくmRNA生成の手法は、種々の構造およびそれらのドメインの組み合わせを有するスイッチ分子mRNAの設計を非常に容易にする。例えば、同じ細胞において複数のスイッチ分子を誘導することにより、病変細胞に対してT細胞を活性化するか、T細胞機能を増強するか、または他の標的細胞の免疫応答をモジュレートし得る複数の活性化因子の分泌が可能になる。

【0163】

本発明のRNAトランスフェクション法の1つの利点は、RNAトランスフェクションが本質的に一過性であり、かつベクターを用いないことである。RNA導入遺伝子をリンパ球に送達し、短時間のインビトロ細胞活性化の後に、その中で、いかなる別のウイルス配列も必要としない最小発現カセットとして発現させることができる。これらの条件下では、宿主細胞ゲノム中への導入遺伝子の組み込みが起こる可能性は低い。RNAのトランスフェクションの効率の高さ、およびそれがリンパ球集団全体を均質に改変させる能力があることから、細胞のクローニングは必要でない。

【0164】

インビトロで転写されたRNA (IVT-RNA) を用いるT細胞の遺伝的改変では、両者ともにさまざまな動物モデルで継続的に検討されてきた2種類の戦略を利用する。これらは細胞に対して、インビトロで転写されたRNAを、リポフェクションまたはエレクトロポレーションによってトランスフェクトさせる。好ましくは、移入されたIVT-RNAの長期間にわたる発現を達成するために、さまざまな改変を用いてIVT-RNAを安定化することが望ましい。

【0165】

インビトロ転写のためのテンプレートとして標準化された様式で利用され、安定化されたRNA転写物が産生されるように遺伝的に改変されている、いくつかのIVTベクターが文献で公知である。現在、当技術分野で用いられるプロトコルは、以下の構造を有するプラスミドベクターに基づく：RNA転写を可能にする5' RNAポリメラーゼプロモーターと、それに続いて、3'および/または5'側に非翻訳領域 (UTR) が隣接している関心対象の遺伝子、ならびに50~70ヌクレオチドを含む3'ポリアデニルカセット。インビトロ転写の前に、環状プラスミドはII型制限酵素 (認識配列は切断部位に対応する) によってポリアデニルカセットの下流で線状化される。したがって、ポリアデニルカセットは転写物における後のポリ (A) 配列に対応する。この手順の結果として、いくつかのヌクレオチドは、線状化の後に酵素切断部位の一部として残存し、伸長するか、または3'末端でポリ (A) 配列を覆い隠す。この非生理的な突出部が、そのような構築物から細胞内で産生されるタンパク質の量に影響を及ぼすか否かは不明である。

【0166】

RNAには、より従来のプラスミドまたはウイルスによるアプローチを上回るいくつかの利点がある。RNA供給源からの遺伝子発現は転写を必要とせず、トランスフェクション後にタンパク質産物が迅速に産生される。さらに、RNAは核ではなく細胞質に到達さえすればよく、そのため、典型的なトランスフェクション法によって、極めて高率でのトランスフェクションがもたらされる。加えて、プラスミドに基づくアプローチは、関心対象の遺伝子の発現を作用させるプロモーターが、試験中の細胞において活性があることを必要とする。

【0167】

もう1つの局面において、RNA構築物はエレクトロポレーションによって細胞内に送達することができる。例えば、US 2004/0014645号、US 2005/0052630A1号、US 2005/0070841A1号、US 2004/0059285A1号、US 2004/0092907A1号に教示されているような、哺乳動物細胞への核酸構築物のエレクトロポレーションの処方物および方法を参照されたい。任意の既知の細胞型のエレクトロポレーションのために必要な電場強度を含むさまざまなパラメーターは、関連研究文献ならびに当技術分野における数多くの特許および出願において一般に公知である。例えば、米国特許第6,678,556号、米国

10

20

30

40

50

特許第7,171,264号および米国特許第7,173,116号を参照されたい。エレクトロポレーションの治療的適用のための装置は市販されており、これには例えば、MedPulser (商標) DNA Electroporation Therapy System (Inovio / Genetronics, San Diego, Calif) があり、米国特許第6,567,694号；米国特許第6,516,223号、米国特許第5,993,434号、米国特許第6,181,964号、米国特許第6,241,701号および米国特許第6,233,482号などの特許に記載されている；また、エレクトロポレーションを、例えばUS20070128708A1号に記載されたように、インピトロでの細胞のトランスフェクションのために用いることもできる。また、エレクトロポレーションを、インピトロで細胞に核酸を送達するために利用することもできる。このように、当業者に公知の多くの利用可能なデバイスおよびエレクトロポレーションシステムのいずれかを利用した、発現構築物を含む核酸の細胞へのエレクトロポレーション媒介性投与は、関心対象のRNAを標的細胞に送達するための素晴らしい新たな手段となる。

10

【0168】

T細胞の活性化および増大

T細胞が核酸の導入の前に活性化される際には、T細胞上の共刺激分子が活性化されうる。T細胞の活性化の例には、例えばCD3および/またはCD28に対する抗体による、CD3および/またはCD28の刺激が含まれうる。T細胞を培養するために使用される培地は、T細胞を活性化することができる作用物質を含みうる。例えば、CD3を刺激することができる作用物質は、CD3に対する抗体であり、CD28を刺激することができる作用物質は、CD28に対する抗体である。

20

【0169】

もう1つの態様において、T細胞は、核酸の導入の前に活性化および/または増大されうる。一般に、T細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する作用物質、およびT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドをそれに付着している表面との接触によって増大されうる。あるいは、T細胞は、T細胞が集団内に含有されるように、培養または他の方法によって増大されうる。

【0170】

1つの局面において、T細胞を作製する方法は、T細胞を単離して、引き続いてエレクトロポレーションを行い、その後に培養を行う段階をさらに含むことができる。単離後に、T細胞を、培養装置において細胞培地中で、ある期間にわたって、または細胞が、別の培養装置への継代を行う前に最適な継代のためにコンフルエントもしくは高い細胞密度に達するまで、インキュベートすることができる。培養装置は、インピトロで細胞を培養するために一般的に用いられる任意の培養装置であることができる。期間は、インピトロでの細胞の培養に適する任意の時間であることができる。T細胞培地は、T細胞の培養中に、任意の時間に交換してもよい。好ましくは、T細胞培地を約2~3日毎に交換する。続いて、T細胞を培養装置から採取し、その上でT細胞を核酸導入のために直ちに用いるか、または凍結保存して後の使用のために貯蔵することができる。1つの態様において、方法は、核酸の導入の前にT細胞を凍結保存する段階をさらに含む。もう1つの態様において、方法は、T細胞を凍結保存する段階をさらに含む。さらにもう1つの態様において、凍結保存されたT細胞を、スイッチ分子核酸の導入、スイッチ分子を一過性に発現し、活性化因子を分泌するための組成物への製剤化、または対象への投与の前に、融解する。

30

40

【0171】

細胞は、米国特許第5,199,942号(参照により本明細書に組み入れられる)に記載されている方法を用いて、エクスピボで増大させることができる。米国特許第5,199,942号に記載されているような増大は、本明細書に記載の他の増大方法の代替であることができ、またはそれに加えることができる。簡潔に言うと、T細胞のエクスピボ培養および増大は、米国特許第5,199,942号に記載されているものなどの細胞成長因子、または、例えば、Rapid Expansion Protocol (REP) に関してDudley et al., J. Immunol., 26(4):332-342, 2003に記載されているもののような、flt3-L、IL-1、IL-2、IL-3、およびc-kitリガンドなどの他の因子への添加を含む。1つの態様において、T細胞を増大させる段階は、

50

flt3-L、IL-1、IL-3、およびc-kitリガンドからなる群より選択される因子とのT細胞の培養を含む。

【0172】

本明細書において記載されるような培養段階（本明細書において記載されるような作用物質との接触）は、極めて短くてもよく、例えば、24時間未満、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23時間未満などであってよい。本明細書において記載されるような培養段階（本明細書において記載されるような作用物質との接触）は、より長くてもよく、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、またはそれを上回る日数であってもよい。

10

【0173】

培養下にある細胞を記述するために、さまざまな用語を用いる。細胞培養物とは、一般に、生体から採取して、制御された条件下で増殖させた細胞のことを指す。初代細胞培養物とは、生物体から直接採取した、初回継代培養の前の細胞、組織または器官の培養物のことである。細胞は、それらが細胞の増殖および/または分裂を助長する条件下で増殖培地中に置かれた場合に、培養下で増大して、その結果、より大きな細胞集団となる。細胞が培養下で増大する場合、細胞増殖の速度は典型的には、細胞の数が2倍になるのに要する時間、別名では倍加時間としても知られる時間によって測定される。

【0174】

継代培養の各回は継代と称される。細胞を継代培養する場合、それらは継代されたと称される。細胞または細胞株の特定の集団は、時に、それが継代された回数によって称されるか、または特徴付けられることがある。例えば、10回継代された培養細胞集団はP10培養物と称することができる。初代培養物、すなわち、組織からの細胞の単離後の最初の培養物はP0と名付けられる。初回の継代培養後に、細胞は二次培養物（P1または継代1）と記載される。2回目の継代培養後、細胞は三次培養物（P2または継代2）となり、以後も同様である。継代の期間中には集団の倍加が数多く起こりうるのが当業者には理解されよう。したがって、培養物の集団の倍加回数は継代数よりも大きい。継代間の期間中の細胞の増大（すなわち、集団倍加の回数）は多くの要因に依存し、これには播種密度、基質、培地、および継代間の時間が非限定的に含まれる。

20

【0175】

1つの態様においては、細胞を数時間（約3時間）～約14日間、またはその間の任意の整数値単位の時間にわたって培養することができる。T細胞の培養に適する条件には、血清（例えば、ウシ胎仔血清またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β およびTNF- α 、または当業者に公知である細胞増殖のための他の添加物を含む、増殖および生存のために必要な因子を含みうる適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640または、X-vivo 15（Lonza））が含まれる。細胞の増殖のための他の添加物には、界面活性剤、プラスマネート、および還元剤、例えばN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどが非限定的に含まれる。培地には、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウムおよびビタミンが添加された、血清非含有であるか、またはT細胞の増殖および増大のために十分な、適量の血清（または血漿）もしくは規定されたホルモンのセットおよび/もしくは一定量のサイトカインが加えられた、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20、Optimizerが含まれる。ペニシリンおよびストレプトマイシンなどの抗生物質は実験培養物のみを含められ、対象に注入しようとする細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、増殖を支えるために必要な条件下、例えば適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5% CO₂）の下で維持される。

30

40

【0176】

T細胞を培養するために用いられる培地は、T細胞を共刺激する作用物質を含んでもよい。例えば、CD3を刺激する作用物質はCD3に対する抗体であり、CD28を刺激する作用物質はCD28に対する抗体である。これこそが、本明細書において開示されるデータ

50

によって実証されているように、本明細書において開示される方法によって単離された細胞が、およそ10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれを上回って増大することができる理由である。1つの態様において、T細胞は、エレクトロポレーションを受けた集団を培養することによって、約20倍～約50倍の範囲で、またはそれを上回って増大する。

【0177】

もう1つの態様において、T細胞を作製する方法は、さらなる適用のためにエレクトロポレーションを受けたT細胞を単離する段階をさらに含むことができる。さらにもう1つの態様において、T細胞を作製する方法は、エレクトロポレーションを受けたT細胞に引き続いてエレクトロポレーションを行い、その後に培養する段階をさらに含むことができる。この引き続いてのエレクトロポレーションは、追加のスイッチ分子、またはT細胞を刺激する作用物質をコードするmRNAをエレクトロポレーションする段階を含んでもよい。作用物質は、さらなる増大、エフェクター機能、または別のT細胞機能を刺激することなどによって、T細胞を刺激しうる。1つの態様において、作用物質mRNAを、スイッチ分子mRNAとコエレクトロポレーションする。もう1つの態様において、T細胞は、スイッチ分子のmRNA、続いて作用物質のmRNAで、連続的にエレクトロポレーションを受ける。さらにもう1つの態様において、T細胞を、エレクトロポレーション段階の間に培養するか、または回復時間を与える。

【0178】

もう1つの態様において、方法は、CD3、CD27、CD28、CD83、CD86、CD127、4-1BBL、およびPD1からなる群より選択される少なくとも1種の共刺激分子で、エレクトロポレーションを受けたT細胞を刺激する段階をさらに含む。

【0179】

治療法

本明細書に記載のT細胞は、治療法のための組成物中に含まれてもよい。組成物は、薬学的組成物を含んでもよく、かつ、薬学的に許容される担体をさらに含む。T細胞を含む治療的有効量の薬学的組成物が、投与されうる。

【0180】

1つの局面において、本発明は、因子を標的部位に送達するための方法を含み、該方法は、スイッチ分子をコードする核酸を、改変T細胞を含む細胞の集団中に導入する段階であって、該スイッチ分子が、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを含む前記段階；ならびに、該細胞の集団を、その必要のある対象に投与する段階であって、該T細胞が該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用が、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する前記段階を含む。

【0181】

そのような局面において、細胞の集団は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、精製されたT細胞集団、およびT細胞株のいずれかを含みうる。集団中のT細胞はまた、本明細書に記載されたように活性化および増大されてもよい。

【0182】

もう1つの局面において、本発明は、細胞の集団を、その必要のある対象に投与する段階であって、T細胞がスイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子が、トランスフォーミング成長因子- β 受容体(TGF- β -R)またはその断片を含む細胞外ドメインと、IL-12Rまたはその断片を含む細胞内ドメインとを含む前記段階を含む、因子を標的部位に送達するための方法を含み、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用は、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。

【0183】

さらにもう1つの局面において、本発明は、因子を標的部位に送達するための方法を含み、該方法は、細胞の集団を、その必要のある対象に投与する段階を含む。方法のT細胞は、スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子は、トランスフォーミング成長因子-受容体 (TGF- β R) またはその断片を含む細胞外ドメインと、IL-12Rまたはその断片を含む細胞内ドメインとを含む。スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用は、T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。さらにもう1つの局面において、本発明は、因子を標的部位に送達するための方法を含む。方法は、T細胞を含む細胞の集団を、その必要のある対象に投与する段階を含む。T細胞は、標的部
10 位へ向かい、かつ、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子、および、標的細胞上の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体を一過性に発現する。方法は、T細胞を標的部位で活性化する段階であって、該T細胞が活性化因子を分泌するように誘導される前記段階をさらに含む。1つの態様において、T細胞を活性化する段階は、スイッチ分子の細胞外ドメインへのリガンドの結合を含む。もう1つの態様において、T細胞を活性化する段階は、T細胞上の活性化T細胞抗原への二重特異性抗体の結合を含む。

【0184】

もう1つの局面において、本発明は、スイッチ分子をコードする核酸を含む改変T細胞の集団を投与する段階を含む、疾患または状態を処置する方法を含む。例示的な態様において、T細胞は、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、成長因子受容体、ホルモン受容
20 体、および他のシグナル伝達受容体からなる群より選択される膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメイン；ならびに、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインを含むスイッチ分子をコードする核酸を含み、該T細胞は該スイッチ分子を一過性に発現し、該スイッチ分子の細胞外ドメインとそのそれぞれのリガンドとの相互作用は、該T細胞による標的部位での活性化因子の分泌を誘導する。T細胞は、標的の細胞または組織の溶解を誘導するために投与されうる。

【0185】

さらにもう1つの局面において、本発明は、疾患または状態を処置する方法を含む。方法は、膜受容体またはその断片を含む細胞外ドメインと、シグナル伝達受容体またはその断片を含む細胞内ドメインとを含むスイッチ分子をコードする核酸、および、標的細胞上
30 の抗原と活性化T細胞上の抗原に対する二重特異性を含む二重特異性抗体をコードする核酸を含む改変T細胞の集団を投与する段階を含む。そのような局面において、T細胞は、スイッチ分子および二重特異性抗体を一過性に発現し、T細胞の活性化は、標的部位での活性化因子の分泌を誘導して、それにより疾患または状態を処置する。

【0186】

本明細書において記載されたように作製されたT細胞は概して均一であり、かつT細胞機能を保有する。さらに、該T細胞を、哺乳動物、好ましくはヒトに対して、糖尿病、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、GVHDなどの自己免疫疾患、同種免疫寛容誘導強化、移植拒絶反応などに共通するものなどの免疫反応を抑制するために投与することができる。加えて、本発明の細胞を、免疫応答、特に細胞媒介性免疫応答の減弱化または他の様式
40 の障害が、疾患を治療または軽減するために望まれる、任意の状態の治療のために用いることもできる。

【0187】

また、本明細書において記載されたように作製された改変T細胞を、自己免疫疾患である疾患または状態を治療するために用いることもできる。自己免疫疾患の例には、後天性免疫不全症候群 (AIDS、これは自己免疫性要素を伴うウイルス性疾患である)、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、内耳自己免疫病 (AIED)、自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS)、自己免疫性血小板減少性紫斑病 (ATP)、ベーチェット病、心筋症、セリアック病-疱疹状皮膚炎；慢性疲労免疫機能不全症候群 (CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIPD)

10

20

30

40

50

）、癬痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、ドゴー病、若年性皮膚筋炎、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性慢性関節炎（ステイル病）、若年性関節リウマチ、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症（進行性全身性硬化症（PSS）、これは全身性硬化症（SS）としても知られる）、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑、ならびにヴェーゲナー肉芽腫症が非限定的に含まれる。

10

【0188】

また、本明細書において記載されたように作製された改変T細胞を、炎症性障害である疾患または状態を治療するために用いることもできる。炎症性障害の例には、慢性および急性の炎症性障害が非限定的に含まれる。炎症性障害の例には、アルツハイマー病、喘息、アトピー性アレルギー、アレルギー、アテローム性動脈硬化、気管支喘息、湿疹、糸球体腎炎、移植片対宿主病、溶血性貧血、骨関節炎、敗血症、脳卒中、組織および臓器の移植、血管炎、糖尿病性網膜症および人工呼吸器誘発肺損傷が非限定的に含まれる。

【0189】

20

本明細書に記載されたように作製された、エレクトロポレーションを受けたT細胞はまた、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組み合わせなどの、がんである疾患または状態を処置するために用いることもできる。

【0190】

もう1つの態様において、本明細書に記載のT細胞を、その必要のある対象における疾患または状態の治療のための医薬の製造のために用いることもできる。

【0191】

30

本発明の細胞は、適切な前臨床的および臨床的な実験および試験で決定される投与量および経路ならびに回数で投与することができる。細胞組成物は、これらの範囲内にある投与量で複数回投与することができる。本発明の細胞の投与を、当業者による判断で、所望の疾患または状態を治療するために有用な他の方法と組み合わせてもよい。

【0192】

投与される本発明の細胞は、治療法を受ける対象にとって、自己性、同種性または異種性であってよい。

【0193】

本発明の細胞の投与は、当業者に公知である任意の好都合な様式で実施することができる。本発明の細胞は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、植え込みまたは移植によって対象に投与することができる。本明細書に記載の組成物は、患者に対して、経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、結節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内（i.v.）注射または腹腔内に投与することができる。また別の場合には、本発明の細胞は、対象における炎症の部位、対象における局所的疾患部位、リンパ節、臓器、腫瘍などに直接的に注射される。

40

【0194】

また、本明細書に記載の細胞を、いくつかのマトリックスを用いて投与することもできる。本発明では、そのようなマトリックスを、典型的にはT細胞のモジュレーションを通じて免疫系を支援し、維持し、またはモジュレートするための人工リンパ系器官として作用させる新しい状況で利用する。したがって、本発明は、組織工学において有用性が実証されているそのようなマトリックス組成物および製剤を利用することができる。したがっ

50

て、本発明の組成物、装置、および方法に用いるマトリックスの種類は事実上制限がなく、生体マトリックスおよび合成マトリックスの両方が含まれてよい。1つの具体例では、米国特許第5,980,889号；第5,913,998号；第5,902,745号；第5,843,069号；第5,787,900号；または第5,626,561号によって記載された組成物および装置が利用され、そのためこれらの特許はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。マトリックスは、哺乳動物宿主に投与した場合に生体適合性であることに一般的に関連する特徴を含む。マトリックスは、天然材料および/または合成材料で形成してよい。マトリックスは、インプラントのように永続的構造または除去可能な構造を動物の体内に残すことが望ましい場合には非生分解性であってもよく；または生分解性であってもよい。マトリックスは、スポンジ、インプラント、管、テルファパッド (telfa pad)、繊維、中空糸、凍結乾燥成分、ゲル、粉末、多孔性組成物、またはナノ粒子の形態をとりうる。加えて、マトリックスを、播種された細胞または産生されたサイトカインもしくは他の活性物質の持続放出が可能になるように設計することもできる。ある態様において、本発明のマトリックスは可撓性および伸縮性であり、無機塩、水性液、および酸素を含む溶存気体状物質などの物質を透過させる半固体スカフォールドとして記載することもできる。

10

【0195】

マトリックスは、本明細書において生体適合性物質の一例として用いられる。しかし、本発明はマトリックスには限定されないため、マトリックスという用語が出てきた場合、これらの用語はいずれも、細胞の保持または細胞の移動を可能にし、生体適合性であり、かつその物質自体が半透過性膜であるようにその物質中を直接高分子が移動するかまたは特定の半透過性物質とともに用いて高分子が移動することを可能にする、装置または他の物質を含むと解釈されるべきである。

20

【0196】

薬学的組成物

本発明の薬学的組成物は、本明細書に記載されたような改変T細胞または改変T細胞の集団を、1つまたは複数の薬学的または生理的に許容される担体、希釈剤または添加剤と組み合わせて含む。そのような組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液；ブドウ糖、マンノース、ショ糖またはデキストラン、マンニトールなどの糖質；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；酸化防止剤；EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；ならびに保存剤を含有してもよい。本発明の組成物は、静脈内投与用に製剤されることが好ましい。

30

【0197】

本発明の薬学的組成物は、治療（または予防）される疾患に適した方法で投与することができる。投与量および投与回数は、患者の状態、並びに患者の疾患の種類および重症度などの因子により決定されるが、適量は臨床試験により決定され得る。

【0198】

一般に、本明細書に記載のT細胞を含む薬学的組成物は、細胞 $10^4 \sim 10^9$ 個/kg体重、好ましくは細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg体重であって、これらの範囲内のすべての整数値を含む投与量で投与することができる。また、T細胞組成物をこれらの用量で複数回投与することもできる。細胞は、免疫療法において一般的に公知である輸注手法を用いることによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照されたい）。個々の患者に関する最適な投与量および治療レジメンは、疾患の徴候に関して患者をモニタリングして、それに応じて治療を調節することによって、医療の当業者によって容易に決定されうる。

40

【0199】

ある態様においては、改変T細胞を対象に投与し、続いてその後に血液を再び採取して（またはアフエレーシスを行って）、それ由来のT細胞を本発明に従って活性化した上で、これらの改変および活性化されたT細胞を患者に再び輸注することが望ましいと考えられる。この過程を数週間毎に複数回行うことができる。ある態様において、T細胞は10ml ~ 400mlの採取血から活性化させることができる。ある態様において、T細胞は20ml、3

50

0ml、40ml、50ml、60ml、70ml、80ml、90mlまたは100mlの採取血から再活性化される。理論に拘束されるわけではないが、この複数回の採血 / 複数回の再輸注プロトコルを用いることは、T細胞のある特定の集団を選別するために役立つ可能性がある。

【0200】

本発明のある態様において、本明細書に記載の方法、またはT細胞が治療レベルまで増大される当技術分野において公知の他の方法を用いて改変および活性化された細胞は、MS患者に対する抗ウイルス療法、シドホビルおよびインターロイキン-2、シタラビン（ARA-Cとしても知られる）もしくはナタリズマブ治療、乾癬患者に対するエファリズマブ治療、またはPML患者に対する他の治療などの薬剤による治療を非限定的に含む、任意のさまざまな妥当な治療様式とともに（例えば、その前、それと同時に、またはその後に）患者に投与される。さらなる態様において、本発明のT細胞は、化学療法、放射線照射、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレートおよびFK506など、抗体、またはCAMPATHなどの他の免疫除去薬、抗CD3抗体または他の抗体療法、サイトキシン、フルダリピン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および照射と組み合わせて用いてもよい。これらの薬物は、カルシウム依存型ホスファターゼのカルシニューリンを阻害するか（シクロスポリンおよびFK506）、または成長因子が誘導したシグナル伝達に重要であるp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）かのいずれかである（Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993）。1つのさらなる態様において、本発明の細胞組成物は、骨髓移植、フルダラピンなどの化学療法薬、外部ビーム照射（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体のいずれかを用いるT細胞除去療法と組み合わせて（例えば、その前、それと同時に、またはその後に）、患者に投与される。もう1つの態様において、本発明の細胞組成物は、CD20と反応する薬剤、例えばリツキサンなどによるB細胞除去療法の後に投与される。例えば、1つの態様において、対象は、高用量の化学療法薬に続いて末梢血幹細胞移植を行う標準治療を受けることができる。ある態様においては、移植後に、対象は本発明の免疫細胞の輸注を受ける。1つの追加的な態様において、T細胞は、手術の前または後に投与される。

【0201】

患者に投与される上記の治療の投与量は、治療される状態および治療のレシピエントの厳密な性質と応じて異なると考えられる。ヒトへの投与に関する投与量の増減は、当技術分野において許容される実践に従って行うことができる。例えば、CAMPATHの用量は、一般に成人患者について1～約100mgの範囲であり、通常は1～30日の期間にわたって毎日投与される。好ましい一日量は1～10mg/日であるが、場合によっては、最大40mg/日までのより多くの用量を用いることもできる（米国特許第6,120,766号に記載）。

【0202】

本発明において有用であると考えられる方法および組成物は、実施例に示された特定の製剤に限定されないことが理解される必要がある。以下の実施例は、当業者に対して、本発明の細胞、増大および培養の方法、ならびに治療法の作製および使用の行い方の徹底した開示および説明を行う目的で述べられ、本発明者らが自分たちの発明とみなしていることの範囲を限定することを意図するものではない。

【0203】

本発明の実施には、別段の表示がある場合を除き、当技術分野の技能の範囲内にある分子生物学（組換え手法を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来の手法が用いられる。そのような手法は、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", fourth edition (Sambrook, 2012); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002); "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications a

nd Troubleshooting", (Babar, 2011); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002)などの文献中に十分に説明されている。これらの手法は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作製に適用可能であり、そのため、本発明の策定および実施において考慮されている。特定の態様のために特に有用な手法について、以下の項において考察する。

【実施例】

【0204】

実験的实施例

本発明を、以下の実験的实施例を参照することによってさらに詳細に説明する。これらの実施例は例示のみを目的として提供されるものであり、別に指定のある場合を除き、限定的であることは意図していない。したがって、本発明は、以下の実施例に限定されるとは全くみなされるべきではなく、そうではなくて、本明細書において提供される教示の結果として明らかになる任意かつすべての変更も範囲に含むとみなされるべきである。

【0205】

それ以上の説明がなくても、当業者は、前記の説明および以下の例示的な実施例を用いて、本発明の化合物を作製して利用し、請求される方法を実施することができると考えられる。以下の実施例は、このため、本発明の好ましい態様を具体的に指摘したものであり、本開示のそれ以外の部分を限定するものとは全くみなされるべきでない。

【0206】

本明細書において開示される実験の実施に用いられる材料および方法について以下に説明する。

【0207】

インビトロ転写 (IVT) mRNAベクターの構築

PD1-CD28、PD1-41BB、およびTGFβR-IL12Rのスイッチ分子、ならびにBis-RNAはすべて、関連する公開特許から提供される配列情報に基づいて、合成するか、および/またはPCRによって増幅して組み立てた。PCR産物を、pGEM-GFP.64AのGFPを置き換えることによってpGEM.64Aベースのベクター中にサブクローニングして、pGEM.64Aベースのベクターを作製した。

【0208】

RNAのインビトロ転写 (IVT)

mMESSAGE mMACHINE (登録商標) T7 Ultra (Ambion, Inc) を用いて、Anti-Reverse Cap Analog (ARCA、7-メチル(3'-O-メチル)GpppG)m7G(5')ppp(5')G) を有するIVT RNAを作製した。IVT RNA産物を、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) を用いて精製し、精製されたRNAを、RNase非含有水中に1~2mg/mlで溶出させた。

【0209】

T細胞のRNAエレクトロポレーション

精製された静止T細胞またはCD3/CD28ビーズで刺激されたT細胞に、BTX EM830 (Harvard Apparatus BTX, Holliston, MA, USA) を用いてエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションに供したT細胞を、OPTI-MEM (Invitrogen) で3回洗浄し、OPTI-MEM中に最終濃度 $1 \sim 3 \times 10^8$ 個/mlで再懸濁させた。その後、0.1mlの細胞を、10 μgのIVT RNA (または指定通り) と混合して、2-mmキュベットにおいてエレクトロポレーションを行った。

【0210】

エレクトロポレーションを受けたT細胞上のCAR検出

細胞を洗浄して、FACS緩衝液 (PBS + 0.1% アジ化ナトリウムおよび0.4% BSA) 中に懸濁させた。ビオチン標識ポリクローナルヤギ抗マウスF(ab)2抗体 (マウスscFvに対して) または抗ヒト抗F(ab)2 (ヒトscFvに対して) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) をチューブに添加し、細胞を4 で25分間インキュベートして、2回洗浄した。続いて、細胞を、フィコエリトリン標識ストレプトアビジン (BD Pharmingen, San Die

10

20

30

40

50

go, CA) で染色した。

【0211】

ELISA

標的細胞を洗浄して、R10中に 10^6 細胞/mLで懸濁させた。10万個の各標的細胞タイプを、96ウェル丸底プレート(Corning)の2つのウェルのそれぞれに添加した。エフェクターT細胞培養物を洗浄して、R10中に 10^6 細胞/mLで懸濁させた。10万個のエフェクターT細胞を、96ウェルプレートの指定されたウェルにおいて標的細胞と合わせた。加えて、T細胞のみを含有するウェルを用意した。プレートを、37℃で18~20時間インキュベートした。インキュベーション後に、上清を採取して、標準的な方法を用いるELISAアッセイ(Pierce, Rockford, IL)に供した。

10

【0212】

CD107a染色

細胞を、96ウェルプレートにおいて160 μ lの完全RPMI培地中に、1:1のE:T(エフェクター 10^5 個:標的 10^5 個)でプレATINGした。20 μ lのフィコエリトリン標識抗CD107a Ab(BD Pharmingen, San Diego, CA)を添加し、プレートを37℃で1時間インキュベートして、その後にGolgi Stopを添加し、さらに2.5時間インキュベートした。2.5時間後に、10 μ lのFITC-抗CD8およびAPC-抗CD3を添加して、37℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後に、試料をFACS緩衝液で1回洗浄した。フローサイトメトリー取得をBD FACS Calibur(BD Biosciences)で行い、FlowJo(Treestar Inc, Ashland, OR)で分析を行った。

20

【0213】

CFSEベースのT細胞増殖アッセイ

PBS中 10×10^6 個/mLの濃度のT細胞を、3 μ MのCFSEで3分30秒間、室温で標識した。標識を、5%FBS(PBS中)で停止させ、R10で2回洗浄して、10 IU/ml IL2を含むR10中で培養した。一晚培養後に、CFSE標識されたT細胞にエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションの2~4時間後に、T細胞を、放射線照射された腫瘍またはK562細胞株で、1:1のT:刺激物質で刺激した。CFSE希釈をフローサイトメトリーによって検討し、指定通りの時間に細胞数を計数した。

【0214】

本明細書に開示された実験の結果を、以下に説明する。

30

【0215】

TGF β 受容体IおよびTGF β 受容体IIの細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを、それぞれ、IL-12受容体b1およびb2の細胞内ドメインと融合させて、TGF β R-IL-12R1 TGF β R-IL-12R2を作製した。これらの構築物を、pGEM.64AベースのRNAインビトロ転写ベクター中にクローニングした。図1を参照されたい。

【0216】

図2に列挙されたような複数のPD1および4-1BBのスイッチ分子を、4-1BB細胞外ドメインの構造に基づいて構築した。PD1-41BBスイッチ分子およびCAR分子が、PD1-41BBおよびCD19Z RNAをコエレクトロポレーションしたT細胞において検出された。図2に列挙されたようなPD1スイッチ分子構築物を、スイッチ分子RNAをCD19Z RNAとコエレクトロポレーションして、それらの発現について試験した。図3を参照されたい。

40

【0217】

TGF β シグナル伝達を、T細胞およびNK細胞の両方においてIL-12シグナル伝達にスイッチさせた。T細胞に、指定通りの5 μ g RNAをエレクトロポレーションして、10 ng/mlのTGF β -1の添加を伴うかまたは伴わずに、さまざまな量のOKT3抗体で刺激した。IFN- γ 分泌を、一晚刺激後にELISAによってアッセイした。IFN γ R-IL-12Rスイッチ分子を、陽性対照として使用した(図4)。正常PBMCドナーから単離されたCD56+ NK細胞に、指定通りのRNAをエレクトロポレーションして、10 ng/mlのTGF β -1の添加を伴うかまたは伴わずに、K562で刺激した。IFN- γ 分泌を、4時間刺激後にELISAによってアッセイした。IFN γ R-IL12Rスイッチ分子を、陽性対照として使用した(図4)。

50

【0218】

さまざまなTGFbスイッチ分子をエレクトロポレーションし、さまざまな濃度のOKT3抗体で刺激し、可溶性TGF β の存在下で培養したT細胞におけるIFN- γ 産生。図4は、TGFbR-IL-12Rを有するT細胞におけるTGFbの存在下（TGFbR-IL-12および可溶性TGFb）でのIFN- γ 産生の増加を示し、TGFbシグナルがIL-12シグナルにスイッチされ、IFN- γ 産生の増加をもたらしたことを示す。これは、さらに、TGFbR-IL12Rスイッチ分子をエレクトロポレーションした、TGFbの存在下でのNK細胞からのIFN- γ 分泌の増加によって確認された（図5）。

【0219】

Stat4は、IL-12シグナル伝達にとって決定的な転写因子である。TGFbR-IL12Rのエレクトロポレーションを受けた、TGF β の存在下のT細胞のみが、検出可能なリン酸化Stat4（pStat4）を示したことが見出された（図6）。T細胞に、指定通りの5 μ g RNAをエレクトロポレーションした。4時間後に、10ng/mL TGFb1を添加して、30分後、pStat4（IL-12シグナル）を、pStat4の細胞内染色によって検討した。

10

【0220】

TGFbR-IL-12RおよびaTGFbII-1412の両方が、ドミナントネガティブTGF β （DNTGFb）としてT細胞におけるTGF β シグナルに負の影響を及ぼすかどうかを試験するために、T細胞に、図7における指定通りのRNAをエレクトロポレーションして、5ng/ml TGFbで30分間刺激した。リン酸化Smad（pSmad）を、フローサイトメトリーによって測定した。対照RNA（IFNgR-IL-12R）およびエレクトロポレーションなし（EPなし）と比較して、TGFbR-IL12RまたはTGFbII-3-1412をエレクトロポレーションしたT細胞、およびドミナントネガティブTGFb（DNTGFb）を有するT細胞について、pSmadが抑制されたことが見出された。TGFbR-IL-12RまたはaTGFbII-3-1412のいずれかを有するT細胞は、pSmadの有意な減少を示し、これらのスイッチ分子の両方が、TGFbシグナルをIL-12またはCD28にスイッチングしただけではなく、TGFbに対するドミナントネガティブ分子として働く能力も有していたことを示唆した。

20

【0221】

図8および図9は、TGFbR-IL-12RのRNA 5ugまたはTGFbR-1412のRNA 5ugをエレクトロポレーションしたT細胞が、ドミナントTGFbRII（DNTGFbR）のように効率的にTGF β シグナル伝達を遮断したことを示す。4時間後に、10ng/mL TGFb1を添加して、30分後、pSmad（TGF β シグナル）を、pStat4の細胞内染色によって検討した。IFNgR-IL12Rを対照として使用し、pSmadの上方制御が示された。

30

【0222】

制御性T細胞（Treg）は、腫瘍免疫に負の影響を及ぼす非常に重要な役割を果たす。RNAエレクトロポレーションを受けたT細胞による抗Treg活性を有する送達分子は、Treg誘導に抵抗することによって、養子移入されたT細胞の抗腫瘍活性を潜在的に改善することができる。T細胞を、CFSEで標識して、Her2 CAR（4D5-BBZ）および指定通りのスイッチ分子をコエレクトロポレーションした。4時間後に、エレクトロポレーションを受けたT細胞を、放射線照射されたHer2/neu発現K562で、Teff：Treg = 8：1の新しく単離された天然Tregの存在下で刺激した。CFSE希釈を、刺激後6日目および8日目に、フローサイトメトリーを用いて追跡した。有意なT細胞増殖が、スイッチ分子であるaTGFbII-3-1412およびTGFbR-IL12Rのエレクトロポレーションによって誘導された。T細胞は、aTGFbR-CD28スイッチ分子（aTGFbR-1412）を発現するT細胞の、Treg抑制に対する抵抗性の増加を示した（図10）。

40

【0223】

制御性T細胞（Treg）を、ソーティングされたナイーブT細胞から誘導した。3種の異なる方法を用いた：1.) Ab：10%FBSを含むX-Vivo-15中、ビーズ、65U/mL IL-2、32U/mL TGF-b1、4500 U/mL IL-15、10ug/mL 抗IL-12、20ug/mL 抗IFN-g。2.) 20*ビーズ：AIM-V中、ビーズ（20ビーズ：1細胞）、20U/mL IL-2、2ng/mL TGF-b1。3.) 1/10ビーズ：10mM Hepes緩衝液およびストレプトマイシンを含むAIM-V中、ビ

50

ーズ（1ピース：10細胞）、100U/mL IL-2、5ng/mL TGF- β 1 + 100nM atRA。

【0224】

図11は、誘導されたTreg（iTreg）におけるFoxp3発現を示し、図12は、iTreg（PMA刺激）におけるiTregのサイトカイン産生の減少を示すが、エフェクター細胞における減少は示さない。エフェクターT細胞（Teff）の増殖もまた、iTregによって抑制された（図13）。

【0225】

Foxp3発現が減少し（図14）、これは、CFSE希釈アッセイにおけるT細胞増殖を抑制する能力の低減をもたらした（図15）。ソーティングされたナイーブCD4 T細胞に、指定通りのRNAをエレクトロポレーションして、指定通りの3種の異なるTreg誘導系に添加した。5日後に、Foxp3発現を、フローサイトメトリーによって検討した。T細胞を、CFSEで標識して、her2 CAR（4eD5-BBZ）および指定通りのスイッチ分子をコエレクトロポレーションした。4時間後に、エレクトロポレーションを受けたT細胞を、放射線照射されたHer2/neu発現K562で、Teff：Treg = 8：1の、指定通りのRNAを移入されたナイーブCD4 T細胞から誘導された5日目のTregの存在下で刺激した。CFSE希釈を、刺激後4日目に、フローサイトメトリーを用いて追跡した。

【0226】

腫瘍認識についてのBis-RNA T細胞の感受性を試験するために、T細胞に、さまざまな用量のBis-RNAをエレクトロポレーションして、CD19 CAR RNAと比較した。類似した結果が、CD107aの上方制御から得られた（図16A）。

【0227】

IFN- γ / グランザイムB細胞内染色（図16B）およびELISAによってアッセイされたIFN- γ 産生（図16C）の実験において、有意なT細胞活性化が、0.5 μ g Bis-RNAのような少量が用いられた際に観察された。さらに、1～2 μ gのBis-RNAは、5～10 μ g CD19 CAR RNAに匹敵したままであった。Bis-RNAが0.5 μ gの低用量であるにもかかわらず、Bis-RNA T細胞およびコインキュベートされたGFP-RNA T細胞は、依然として効率的な抗腫瘍活性を示した。

【0228】

4時間の細胞傷害性Tリンパ球アッセイにおいて、ブリナツモマBis-RNAまたはCD19 BBZ CAR RNAのいずれかの1、5、および10 μ gの用量の、異なる量のRNAを有するT細胞の溶解能力を比較した。図16Dに示されるように、T細胞の殺傷能力は、Bis-RNAおよびCAR RNAの両方について、RNA用量との相関を示した。

【0229】

ブリナツモマBis-RNAをエレクトロポレーションしたT細胞の機能的継続を試験するために、CD19 CAR RNAとの比較において、増加する用量のRNAをT細胞中にエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後のさまざまな時間にT細胞をCD19+腫瘍株で刺激することによる抗原特異的なT細胞再活性化を、CD107aの上方制御レベルを見ることによって追跡した。エレクトロポレーションの1日後について、図16Aに既に示されるように、RNA用量が1 μ gより上である限り、Bis-RNA T細胞を、5～10 μ g CD19-CAR-T細胞のように効率的に活性化することができた。

【0230】

PD-L1を遮断することができるscFv（特許第AU2006265108A1号）および抗CD28 scFv（1412、米国特許第7,585,960 B2号）を用いた4種の二重特異性抗体を設計し、PCRによって遺伝子を合成した（図17）。シークエンシングにより、DNAがpGEM.64AベースのRNAインビトロ転写ベクター中に正確にクローニングされて、pGEM.10A5-1-1412、pGEM.13G4-1412、pGEM.1b12-1412、およびpGEM.12A4-1412を作製したことを検証した。図18を参照されたい。

【0231】

ELIAにより検出されたサイトカインIL2（図19A）およびIFN- γ （図19B）の産生により、PD1-CD28スイッチ分子である10A5-1412（aPDL1-aCD28 bi-RNA）および13G4

10

20

30

40

50

-1412 (aPDL1-aCD28 bi-RNA) は、IL-2およびIFN- の両方の分泌を増加させることによってT細胞機能を有意に改善できたことが示された。この機能のスイッチは、PD1の負のシグナルがCD28の正のシグナルにスイッチされたことを示唆した。Bis-RNAスイッチ10A5-1412 (aPDL1-aCD28 bi-RNA) および13G4-1412 (aPDL1-aCD28 bi-RNA) を有するT細胞は、サイトカイン産生の増加を示し、これらの操作されたT細胞が、T細胞機能を正に改善するであろう活性化分子を送達できたことを示唆した。

【0232】

aTGFbRII-1およびaTGFbRII-3 (米国特許第8,147,834,B2号由来) ならびに抗CD28 scFv (1412、米国特許第7,585,960 B2号) を設計し、PCRによって遺伝子を合成した。シーケンシングにより、DNAがpGEM.64AベースのRNAインビトロ転写ベクター中に正確にクローニングされて、pGEM.aTGFbR-1-1412およびpGEM.aTGFbR-3-1412を作製したことを検証した。図20を参照されたい。

10

【0233】

本明細書に引用された特許、特許出願および刊行物のそれぞれおよびすべての開示内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。具体的な態様を参照しながら本発明を開示してきたが、本発明の真の趣旨および範囲を逸脱することなく、本発明の他の態様および変形物も当業者によって考案されうることは明らかである。添付された特許請求の範囲は、そのようなすべての態様および等価な変形物を含むことを意図している。

【0234】

配列表

20

30

40

50

TGFbR-IL12R1, SEQ ID NO:1

Atggaggcggcggtcgtcgtcccgctccccggtcgtcctcctcgtgctggcggcgcgcgcgcgcgcgcgcgct
gtccccggggcgacggcggttacagtgtttctgccacctctgtacaaaagacaattttacttgtgtgacagatgggctctgctttgtc
tctgtcacagagaccacagacaaagtatacacaacagcatgtgtatagctgaaattgacttaattcctcgagataggccgtttgtat
gtgcacctcttcaaaaactgggtctgtgactacaacatattgtgcaatcaggaccattgcaataaaatagaacttccaactactgt
aaagtcacacctggccttggctcgtgtggaactggcagctgtcattgtggaccagtgtgcttcgtctgcattcactcatgttgatg
gtctatatcagggccgcacggcacctgtgcccgcgctgccacacctgtgccagctccgccattgagttccctggaggga
ggagacttggcagtggatcaaccagtggaactccaggaagaggcatccctgcaggaggccctgggtgtagagatgtcctggg
acaaaggcgagaggactgagcctctcgagaagacagagctacctgagggtgccctgagctggccctggatacagagttgtc
cttggaggatggagacaggtgcaaggccaagatgtga

10

TGFbR-IL12R2, SEQ ID NO:2

Atgggtcgggggctcaggggctgtggccgctgcacatcgtcctgtggacgcgtatgccagcacgatcccaccgcacg
ttcagaagtcggtaataacgacatgatagtcactgacaacaacggcgagtcaggttccacaactgtgtaattttgtgatgtgag
atfttcacctgtgacaaccagaaatcctgcatgagcaactgcagcatcacctccatctgtgagaagccacaggaaagtctgtgtgg
ctgtatggagaaagaatgacgagaacataacactagagacagtttccatgaccccaagctcccctaccatgactttattctggaa
gatgtgcttctcaaaagtgcattatgaaggaaaaaaaagcctggtgagactttctcatgtgttcctgtagctctgatgagtga
atgacaacatcatcttctcagaagaatataacaccagcaatcctgacttgttctgtagtcataattcaagtacaggcatcagcctct
gccaccactgggagttgccatactgtcatcatcatcttctaccagcaaaagggtgtttgttctcctagcagccctcagacctcagtgg
ttagcagagaaattccagatccagcaaatagcacttgcgctaagaaatatccattgcagaggagaagacacagctgcccttg
gacaggctcctgatagactggccacgcctgaagatcctgaaccgctggatcatcagtgaagtccttcatcaagtaccccagttt
cagacatccccctgtccaactggccacaaagggaaggaatccaaggatcagggcctctgagaaagacatgatgcaca
gtgcctcaagcccaccacctccaagagcttccaagctgagagcagacaactggtggatctgtacaagggtgctggagagcagg
ggctccgacccaaaggcagaaaaccagcctgtccctggacggtgctccagcaggtgaccttcccacccatgatggctactta
ccctccaacatagatgacctcccctcacatgaggcacctctcgtgactctctggaagaactggagcctcagcacatctcccttct
gttttcccctcaagttcttctcaccactcaccttctctgtggtgataagctgactctggatcagftaaagatgaggtgtgactccctc
atgctctga

20

30

40

50

aTGFbR-1-1412, SEQ ID NO:3

atgggttggtcctgcatcatcctgtttctcgtggccaccgccaccggcgtgcactccgaaattgtgttgacacagtctccagccac
cctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttcgcagctacttagcctggtagcaaacag
aaacctggccagggtcccagggtcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccagggtcagtgccagtgagg
tctgggacagacttactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcct
ccgacgttcggccaagggaaggtggaaatcaaaagtggagggggcggttcacagctgcaggtgcaggagtcggggccca
ggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcaacagttatttctcctggggctg
gatccgccagccccaggggaaggactggagtggtgggtttctattatggtgaaaaaacctactacaacccgtccctcaa
gagccgagccaccataccattgacacgtccaagagccagtttccctgaagctgagctctgtgaccgccgagacacggctgt
gtattactgtccgagagggcctactatgattcggggagttagactcctggggccagggaaccctggtgACGgtgTCGT
CGGGGGGCGGGGGGAGTcagGTGcagCTGgtgcagTCCGGAgccgagGTAaagaagCCA
gcGCTTCCGTCAAGgtgTCATGCaagGCCTCAGGCTACACcttACAAGCtattacatccact
gggtgcgcaaGCTCCCGGTcagGGCTTGgagtggatcGGGtgATttacCCAGGGaacGTCAA
CACaaactacaacgagAAGttcaagGATcggGCAaccctgaccGTGgacACATCCatcTCTaccGCC
tacatgGAGCTGTCACGCCTGCGCTCTgatGACaccGCAgtgtacttctgtaccAGGAGTcactac
GGCCTGgactggAACTTTgatgtctggGCCAGGGAaccaccgtgACGgtgtccAGTGTGGAG
GGCGGTAGTggcggcTCTGGTGGGtccGGAGGCTCAggcGGCgtgatgGATgacATTcaga
tgaccagAGTCCCTCCtccCTCtccGCTTCCgtcggGACCGCgtgaccatcACTTGTcagccT
CACagaatatctagtgtggCTGAACtggtacCAAcagaagCCCGGCaaggcccccAAGctgCTTATC
TATAAAGCGTCCaacCTCCACACGGGAGTCCCTTCCCGcttTCCGGATCCGGCA
GTGGGACGGACTTCACACTCacaatcTCGtcgCTGcagCCAGAGgacTTTGCGacgTACT
actgccagcagGGCCAGacctaccaTATACTttcGGCGGCgggACCaaggtggagATTaagtaa

10

20

aTGFbR-3-1412, SEQ ID NO:4

atgggttggtcctgcatcatcctgtttctcgtggccaccgccaccggcgtgcactccgaaattgtgttgacacagtctccagccac
cctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagaagttttagcctggtagcaaacaga
aacctggccagggtcccagggtcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccagggtcagtgccagtgagg
gtctgggacagacttactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcc
tccgacgttcggccaagggaaggtggaaatcaaaagtggagggggcggttcacagctacagctgcaggagtcggggccc
aggactggtgaagccttcggagaccctatccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagtagtagtactcctggggct
ggatccgccagccccaggggaaggcctggagtggtgggtttctattacagtggtgacacctactacagcccgtccctcaa
gagtcgaattatcatatccgaagacagtcgaagaaccagttcctcgaagctgagttctgtgaccgccgagacacggctgtg
tattactgtgcgagcgggttactatgattcggggagcccttgactactggggccagggaaccctggtgACGgtgTCGTC

30

40

50

GGGGGGCGGGGGGAGTcagGTGcagCTGgtgcagTCCGGAgccgagGTAaagaagCCAgg
cGCTTCCGTCAAGgtgTCATGCaagGCCTCAGGCTACACcttACAAGCtattacatccactg
ggtgcgccaGCTCCCGGTcagGGCTTGgagtgatcGGGtgcATTtacCCAGGGaacGTCAAC
ACAaactacaacgagAAGttcaagGATcggGCAaccctgaccGTGgacACATCCatcTCTaccGCCta
catgGAGCTGTACGCCTGCGCTCTgatGACaccGCAgtgtacttctgtaccAGGAGTcactacG
GCCTGgactggAACTTTgatgtctggGGCCAGGGAaccaccgtgACGgtgtccAGTGTGGAGG
GCGGTAGTgggggcTCTGGTGGGtccGGAGGCTCAggcGGCgtgatGATgacATTcagatg
accagAGTCCCTCCtccCTCtccGCTTCCgtcggGACCGCgtgaccatcACTTGTcagccTC
AcagaatatctacgtgtggCTGAACtggtagCAAcagaagCCCGGCaaggcccccAAGctgCTTATCT
ATAAAGCGTCCaacCTCCACACGGGAGTCCCTTCCCGCttcTCCGGATCCGGCAG
TGGGACGGACTTCACACTCacaatcTCGtcgCTGcagCCAGAGgacTTTGCGacGTACta
ctgccagcagGGCCAGacctaccaTATACTttcGGCGGCgggACCaaggtggagATTaagtaa

10

CD86-PD-L1, SEQ ID NO:5

Atggatccccagtgactatgggactgagtaacattctcttgtgatggccttctgctctctgtgctgctctctgaagattcaag
cttatttcaatgagactgcagacctgccatgccaaattgcaaactctcaaaacaaagcctgagtgagctagtagtatttggcagg
accaggaaaacttggtctgaatgaggtatacttaggcaaagagaaattgacagtggttattccaagtatatggccgcacaagt
ttgattcggacagttggacctgagacttcacaattctcatagcaaggacaaggcctgtatcaatgtatcatccatcacaaaaagc
ccacaggaatgattcgcacccaccagatgaattctgaactgtcagtgcttgaacttcagtaacctgaaatagtagcaatttctaa
tataacagaaaatgtgtacataaaattgacctgctcatctatacacggttaccagaacctaaagaagatgagtggtttgctaagaacc
aagaattcaactatcagtgatgatggattatgcagaaatcgaataatgtcacagaactgtacgacgtttccatcagcttgctgt
ttcattccctgatgttacgagcaatatgaccttctgtattctggaactgacaagacgcggctttatcttcacctttctctatagag
cttgaggacctcagctccccagaccattcctggcGGAGGGGGAAgtggcGGGGGTgggtccGGCgg
cGGCggcTCGttactgtcacggttcccaaggacctatatgtggtagagttagcaatatgacaattgaatgcaattccc
agtagaaaaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaaatggaggataagaacattattcaatttgcagtgaggaga
agacctgaagggtcagcatagtagctacagacagagggcccgctgttgaaggaccagctctccctgggaaatgctgcacttca
gatcacagatgtgaaattgcaggatgcagggtgtaccgctgcatgacgctatggtggtgccgactacaagcgaattactgtg
aaagtcaatgccccatacaaaaaatcaacaaagaatttgggttgatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggc
tgagggtaccccaaggccgaagtcatctggacaagcagtgaccatcaagtcctgagtggaagaccaccaccaccaattcca
agagagaggagaagcttttcaatgtgaccagcacactgagaatcaacacaacaactaatgagattttctactgcacttttaggaga
ttgatcctgaggaaaaccatacagctgaattggcatcccagaactacctctggcacatcctccaaatgaaaggTAA

20

30

CD86-PD-L2, SEQ ID NO:6

Atggatccccagtgactatgggactgagtaacattctcttgtgatggccttctgctctctgtgctgctctctgaagattcaag

40

50

cttatttcaatgagactgcagacctgccatgccaatttgcaaactctcaaaaccaaagcctgagtgcctagtagtattttggcagg
accaggaaaacttggttctgaatgaggtatacttaggcaaagagaaatttgacagtggttcattccaagtatatggccgcacaagt
ttgattcggacagttggacctgagacttcacaatcttcagatcaaggacaaggcgttgatcaatgtatcatccatcacaaaaagc
ccacaggaaatgattcgcatccaccagatgaattctgaactgtcagtgcttgtaacttcagtaacctgaaatagtaccaatttctaa
tataacagaaaaatgtgtacataaaatttgacctgctcatctatacacggftaccagaacctaaagaagatgagtggtttgctaagaacc
aagaattcaactatcgagtatgatgggtattatgcagaaatctcaagataatgtcacagaactgtacgacgtttccatcagcttgctgt
ttcattccctgatgttacgagcaatatgaccatcttctgtattctggaaactgacaagacgcggctttatcttcacctttctctatagag
cttgaggacctcagcctccccagaccacattcctggcGGAGGGGGAagtggcGGGGTgggtccGGCgg
cGGCggcTCGTtattcacagtgacagtccttaaggaaactgtacataatagagcatggcagcaatgtgacctggaaatgcaa
ctttgacactggaagtcatgtgaaccttggagcaataacagccagtttgcaaaaggtggaaatgatacatccccacaccgtgaa
agagccacttctggaggagcagctgccccctagggaaggcctggtccacatactcaagtccaagtgagggagcaaggaca
gtaccaatgcataatcatctatggggtcgctgggactacaagtacctgactctgaaagtcaaaacttctacaggaaaataaaca
ctcacatcctaaaggttcagaacacagatgaggtagagctcacctgccaggctacaggttatcctctggcagaagtatcctggcc
aaacgtcagcgttctgccaacaccagccactccaggaccctgaaggcctctaccaggtcaccagtggttctgcgcctaaagcc
acccccctggcagaaacttcagctgtgtgttctggaatactcacgtgagggaaacttactttggccagcattgacctcaaagtcatg
ggaacccaggacccatccaactTAA

10

20

CD80-PD-L1, SEQ ID NO:7

atgggccacacacggaggcaggaacatcaccatccaagtgcatacctcaatttcttcagctcttggtgctggtggtttct
cacttctgttcaggtgtatccacgtgaccaaggaaagtgaagaagtggcaacgctgctgtggtcacaatgtttctgtgaagag
ctggcacaactcgcactactggcaaaaggagaagaaatgggtgctgactatgatgtctggggacatgaatatatggcccgagt
acaagaacccgaccttctgatatcactaataacctctccattgtgatcctggcttgcgccatctgacgagggcacatacagat
gtgtgttctgaaagtataaaaaagacgtttcaagcgggaacacctggctgaagtacgttatcagtaaaagctgacttccctaca
cctagtatatctgactttgaaattccaacttctaataatagaaggataatttgcacacctctggagggtttccagagcctcactctct
gggtggaaaatggagaagaattaaatgccatcaacacaacagttccaagatcctgaaactgagctctatgctgttagcagcaaa
ctggatttcaatgacaaccaaccacagcttcatgtgtctcatcaagatggacatttaagagtgaatcagaccttcaactggaata
caaccaagcaagagcatttctgataacggcGGAGGGGGAagtggcGGGGTgggtccGGCggcGGCg
gcTCGttactgtcacgggtcccaaggacctatatgtggtagagtatggttagcaatatgacaattgaatgcaattccagtagaa
aaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaaatggaggataagaacatttcaatttgcacatggagaggaagacctg
aaggttcagcatagtagtacagacagagggcccgctgttgaaggaccagctctccctgggaaatgctgcacttcagatcaca
gatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatgatcagctatggtggtgccgactacaagcgaattactgtgaaagtca
atgccccatacaacaaaatcaacaaaagaatttgggtgtggtatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggtgagggc
taccacaaggccgaagtcatctggacaagcagtgacctcaagtcctgagtggtgaagaccaccaccaattccaagagaga
ggagaagcctttcaatgtgaccagcacactgagaatcaacacaacactaatgagatttctactgcacttttaggagattagatcct

30

40

50

gaggaaaaccatacagctgaattggtcatcccagaactacctctggcacatcctccaaatgaaaggTAA

CD80-PD-L2, SEQ ID NO:8

atgggccacacacggaggcagggaaacatcacatccaagtgtccatcacctcaatttcttccagctcttgggtgctggctgggtctttct
cacttctgttcagggtgttatccacgtgaccaagggaagtgaagaagtggcaacgctgctctgggtcacaatgtttctgttgaagag
ctggcacaactcgcacttactggcaaaaggagaagaaatgggtgctgactatgatgtctggggacatgaatatatggcccgagt
acaagaaccggaccatcttggatatacctaataacctctccattgtgatcctggctctgcgccatctgacgagggcacatacagagt
gtgtgttctgaagtatgaaaaagacgctttcaagcgggaacacctggctgaagtgcgttatcagtaaaagctgacttccctaca
cctagtatatctgactttgaaatccaacttctaattagaaggataattgctcaacctctggagggtttccagagcctcacctctcct
gggtggaaaatggagaagaattaaatgccatcaacacaacagttcccaagatcctgaaactgagctctatgctgttagcagcaaa
ctggatttcaatatgacaaccaaccacagcttcatgtgtctcatcaagtagtgacatttaagagtgaatcagaccttcaactggaata
caaccaagcaagagcatttctgataacggcGGAGGGGGAagtggcGGGGGTgggtccGGCggcGGCg
gcTCGTtattcacagtgcagctcctaaggaaactgtacataatagagcatggcagcaatgtgaccttggaaatgcaactttgac
actggaagtcatgtgaaccttggagcaataacagccagtttcaaaagggtgaaaatgatacatccccacaccgtgaaagagcc
actttgtgtaggagcagctgccctagggaaggcctcgtccacatacctcaagtcgaagtggggacgaaggacagtacca
atgcataatcatctatggggcgcctgggactacaagctgactctgaaagtcaaaacttctacaggaaaataaactcaca
tctaaagggtccagaaacagatgaggtagagctcacctgccaggctacaggttatcctctggcagaagtatcctggccaaact
cagcgttctgccaacaccagccactccaggacctgaaggcctctaccagggtcaccagtgttctgcgcctaaagccaccccc
tggcagaacttcagctgtgtgttctggaatactcacgtgagggaaacttacttggccagcattgaccttcaaagtcagatggaacc
caggacctcatcaactTAA

10

20

PD-L1-CD86, SEQ ID NO:9

atgaggataattgtctgtctttatattcatgacctactggcatttctgaacgcatttactgtcacgggtcccaaggacctatatgtggtg
gagtatggtagcaatatgacaattgaatgcaaatcccagtagaaaaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaatg
gaggataagaacattattcaatttgtgcatggagaggaagacctgaagggtcagcatagtagctacagacagagggcccgctg
ttgaaggaccagctctccctgggaaatgtgcacttcagatcacagatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatga
tcagctatgggtgcccactacaagcgaattactgtgaaagtcaatgccccatacaaaaaatcaaccaagaatttgggtgtg
gatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggctgagggtaccccaaggccgaagtcatctggacaagcagtgaccat
caagtctgagtggtgaagaccaccaccacaattccaagagagaggagaagcttttcaatgtgaccagcacactgagaatcaac
acaacaactaatgagatttctactgcacttttaggagattagatcctgaggaaaaccatacagctgaattggtcatcccagaactac
ctctggcacatcctccaaatgaaaggggcGGAGGGGGAagtggcGGGGGTgggtccGGCggcGGCggc
TCGgggtgctgctcctctgaagattcaagcttatttcaatgagactgcagacctgccatgccaatgcaactctcaaaacaaa
gcctgagtgagctagtagtatttggcaggaccaggaaaacttgggtctgaatgaggtatacttaggcaagagaaatttgacagt

30

40

gttcattccaagtatatggccgcacaagttttgattcggacagttggaccctgagacttcacaatcttcagatcaaggacaaggg
cttgtatcaatgtatcatccatcacaaaaagcccacaggaatgattcgcacccagatgaattctgaactgtcagtgcttgctaac
ttcagtcacacctgaatatgtaccaatttctaataacagaaaatgtgtacataaatttgacctgctcatctatacacggttaccaga
acctaagaagatgagtggtttgctaagaaccaagaattcaactatcagtatgatgggtattatgcagaaatcgaagataatgtcaca
gaactgtacgacgtttccatcagctgtctgtttcattccctgatgttacgagcaatatgaccatcttctgtattctggaaactgacaag
acggcgcttttatcttcacctttctctatagacttgaggaccctcagcctcccccagaccacattcctTAA

PD-L1-CD80, SEQ ID NO:10

10

atgaggatatttgcgtctttatattcatgacctactggcatttgcgtgaacgcatttactgtcacgggttcccaaggacctatatgtgga
gagtatggtagcaatatgacaattgaatgcaaatcccaagtagaaaaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaaatg
gaggataagaacattatcaatttgcgtatggagaggaagacctgaaggttcagcatagtagctacagacagagggcccgctg
ttgaaggaccagctctccctgggaaatgctgcacttcagatcacagatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatga
tcagctatgggtggtccgactacaagcgaattactgtgaaagtcaatgccccatacaaaaaatcaaccaaagaatttgggtgtg
gatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggctgagggtaccccaaggccgaagtcatctggacaagcagtgaccat
caagtctgagtggtgaagaccaccaccacaattccaagagagaggagaagctttcaatgtgaccagcacactgagaatcaac
acaacaactaatgagatttttactgcacttttaggagattagatcctgaggaaaaccatacagctgaattgtcatccagaactac
ctctggcacatcctccaaatgaaggggcGGAGGGGGAagtggcGGGGGTgggtccGGCggcGGCggc
TCGtctttctcacttctgttcagggtgtatccacgtgaccaaggagtgaagaagtggcaacgctgctctgtgtcacaatgtttc
tgttgaagagctggcacaactcgcactctactggcaaaaggagaagaaatgggtgctgactatgatgtctggggacatgaatata
tggcccgagtagaagaaccggaccatcttggatcactaataacctctccattgtgatcctggctctgcgcccatctgacgaggg
cacatacagagtggtgttctgaagtatgaaaagacgctttcaagcgggaacacctggctgaagtacgttatcagtcaaagctg
acttccctacacctaagtatatctgactttgaaattccaacttctaattagaaaggataattgctcaacctctggaggtttccagagc
ctcacctctcctggttggaaaatggagaagaattaaatgccatcaacacacagtttccaagatcctgaaactgagctctatgtg
ttagcagcaaatggatttcaatatgacaaccaaccacagcttcatgtgtctcatcaagtatggacatttaagagtgaatcagacctt
caactggaatacaaccaagcaagagcatttctctgataacTAA

20

30

PD-L2-CD86, SEQ ID NO:11

atgatcttctcctgctaattgttagcctggaattgcagcttcaccagatagcagctttatcacagtgcagtccttaaggaaactgt
acataatagagcatggcagcaatgtgacctggaatgcaactttgacactggagtcattgtgaaccttgagcaataacagccag
tttgcaaaaggtggaaaatgatacatccccacacctgaaagagccactttgctggaggagcagctgcccctaggggaaggcctc
gttccacatacctcaagtccaagttagggacgaaggacagtaccaatgcataatcatctatggggtcgcctgggactacaagtac
ctgactctgaaagtcaaagcttctctacaggaaaataaacatcacatcctaaaggttccagaaacagatgaggttagagctcacct
gccaggctacaggttatcctctggcagaagtatcctggccaaagtcagcgttctgccaacaccagccactccaggaccctg
aaggcctctaccaggtcaccagtggtctgcgcctaaagccacccctggcagaaacttcagctgtgtgttctggaatactcacgtg

40

agggaacttactttggccagcattgaccttcaaagtcagatgaacccaggacccatccaactggcGGAGGGGGAagt
ggcGGGGGTgggtccGGCggcGGCggcTCGggtgctgctccttgaagattcaagcttattcaatgagactgca
gacctgccatgccaatttgcaaacctctaaaaccaaagcctgagtgagctagtagtattttggcaggaccaggaaaacttggtct
gaatgaggtatacttaggcaaagagaaaattgacagtggtcattccaagtatatggccgcacaagtttgattcggacagttggac
cctgagacttcacaatttcagatcaaggacaaggccttgatcaatgtatcatccatcacaaaaagcccacaggaatgattcgca
tccaccagatgaattctgaactgtcagtgcttgctaacttcagtaacctgaaatagtagcaatttctaataacagaaaatgtgtac
ataaatttgacctgctcatctatacacggttaccagaacctaaagaagatgagtggtttgctaagaaccaagaattcaactatcgagt
atgatggtattatgcagaaatctcaagataatgtcacagaactgtacgacgtttccatcagcttgctgtttcattccctgatgttacga
gcaatatgacctctctgtattctggaaactgacaagacgcggtttatcttcacctttctctatagagcttgaggacctcagcct
ccccagaccacattcct

10

抗hPD-L1 scFv(VK-VH)**12A4, SEQ ID NO:12**

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ
QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSN
WPTFGQGQTKVEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSTYAI
WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED
TAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTITVTVSS

20

13G4, SEQ ID NO:13

MGWSCILFLVATATGVHSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ
QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY
PFTFGPGTKVDIKSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGITFDDYGMH
WVRQAPGKGLEWVSGISWNRGRIEYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE
DTALYYCAKGRFRYFDWFLDYWGQGTITVTVSS

30

1B12, SEQ ID NO:14

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ
QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSN
WPTFGQGQTKVEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSSYAI
WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGRAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED
TAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTITVTVSS

10A5, SEQ ID NO:15

40

MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWY
QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN
SYPYTFGQGTKLEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYD
VHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARERIQLWFDYWGQGTLLTVSS

3G10, SEQ ID NO:16

10

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLVWYQ
QKPGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRN
WPRTFGQGTKVEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYG
FSWVRQAPGQGLEWMGWITAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTVYMELRS
LRSDDTAVYYCARDYFYGMDVWGQGTLLTVSS

抗hCD28 scFv (VH-VL), SEQ ID NO:17

20

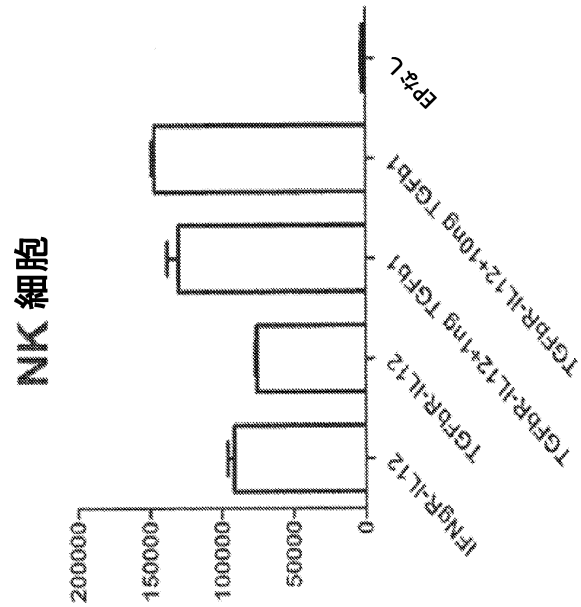
GGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWI
GCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTISITAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGL
DWNFDVWGQGTLLTVSSVEGGSGGSGGSGGVDDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQGQTPYTFGGGTKVEIK

30

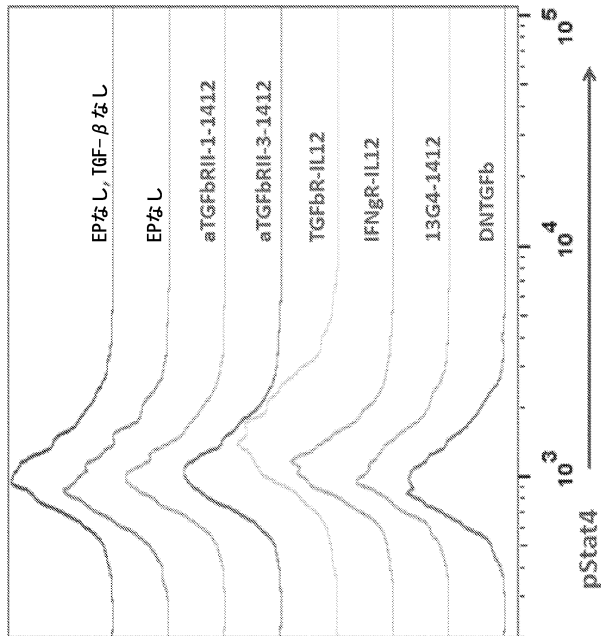
40

50

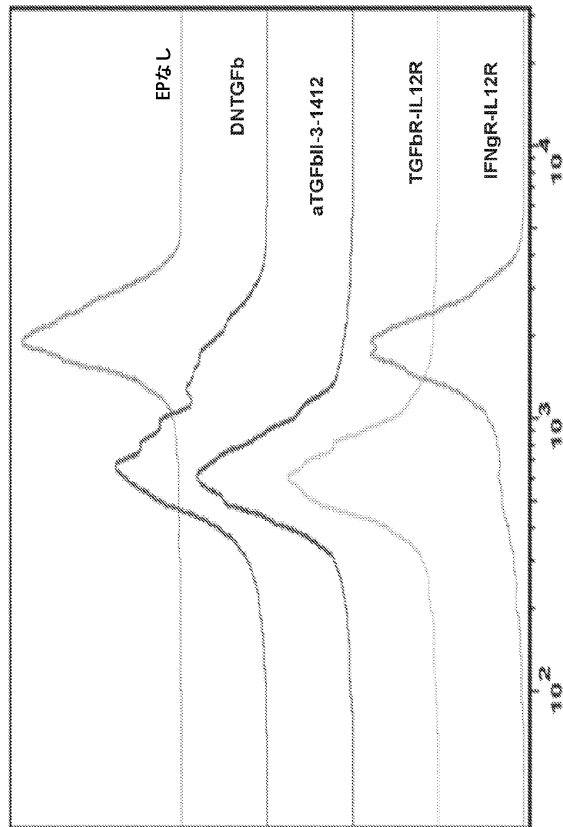
【図 5】



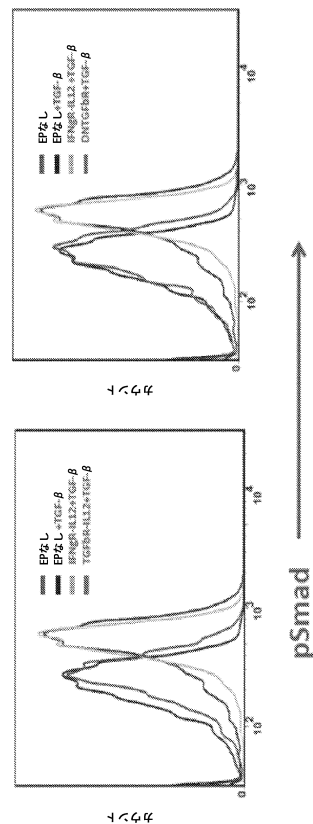
【図 6】



【図 7】



【図 8】



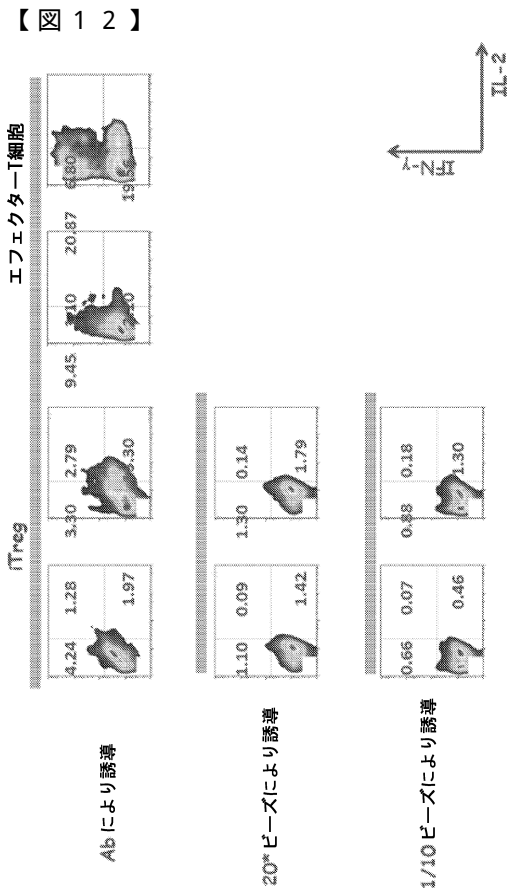
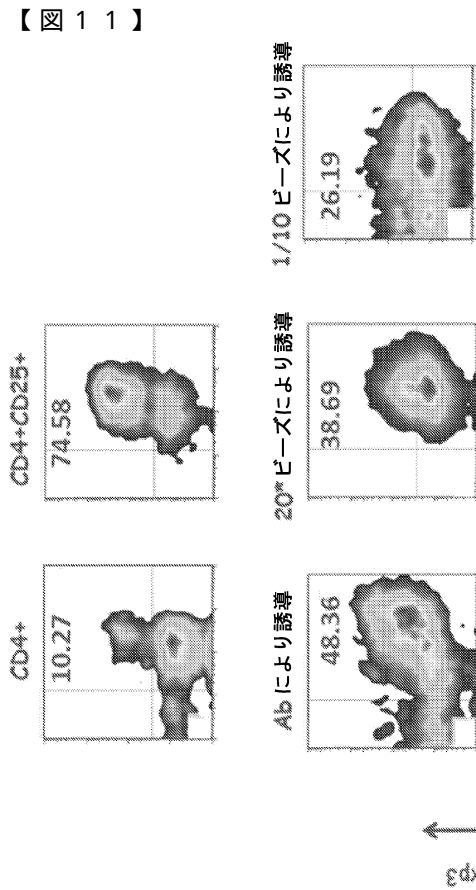
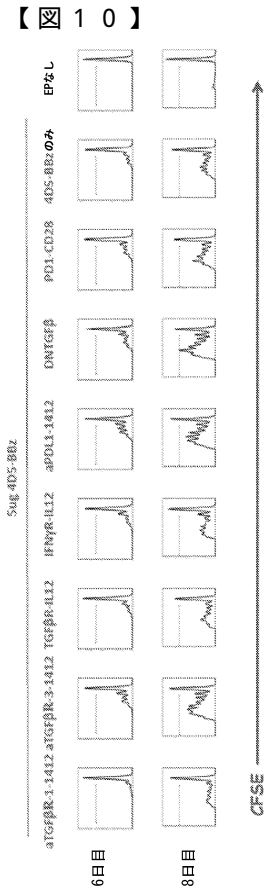
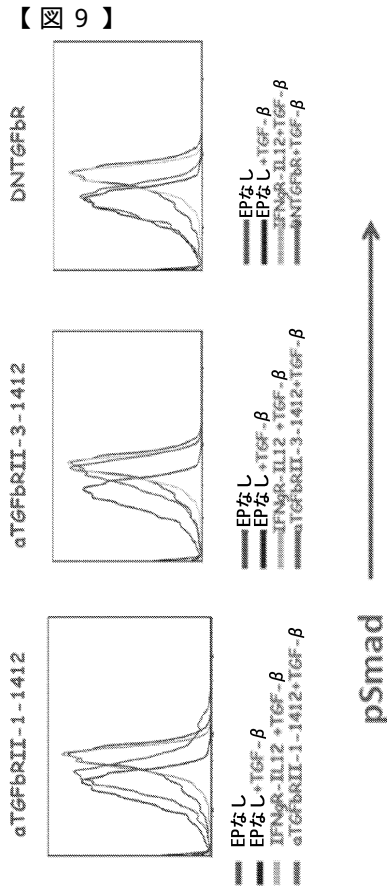
10

20

30

40

50



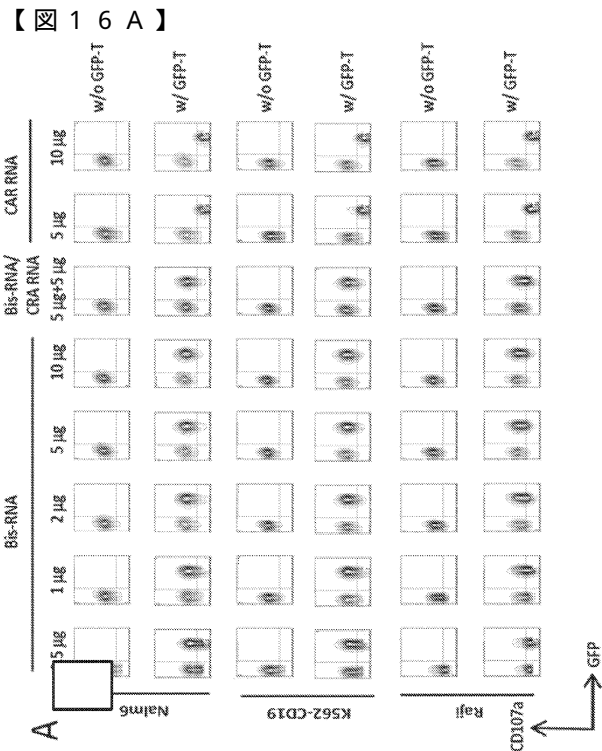
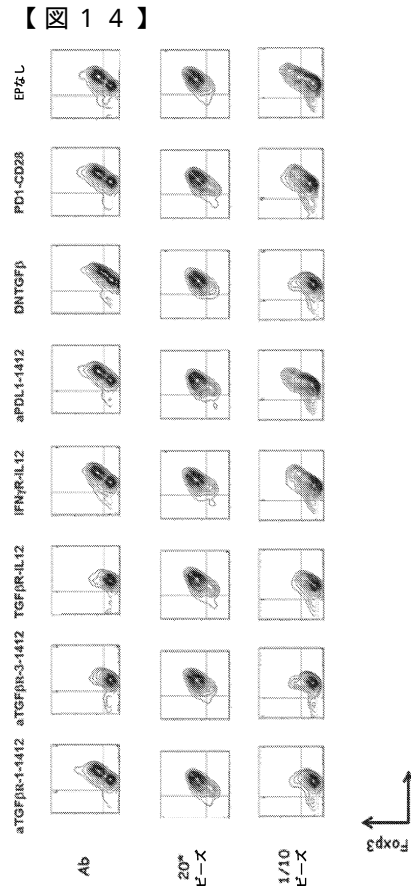
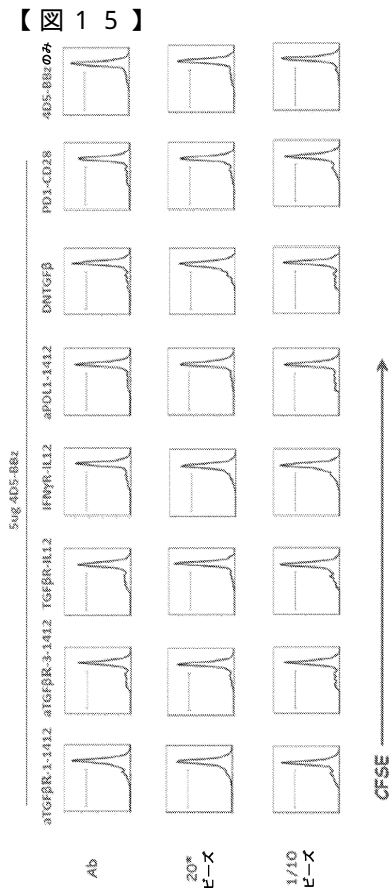
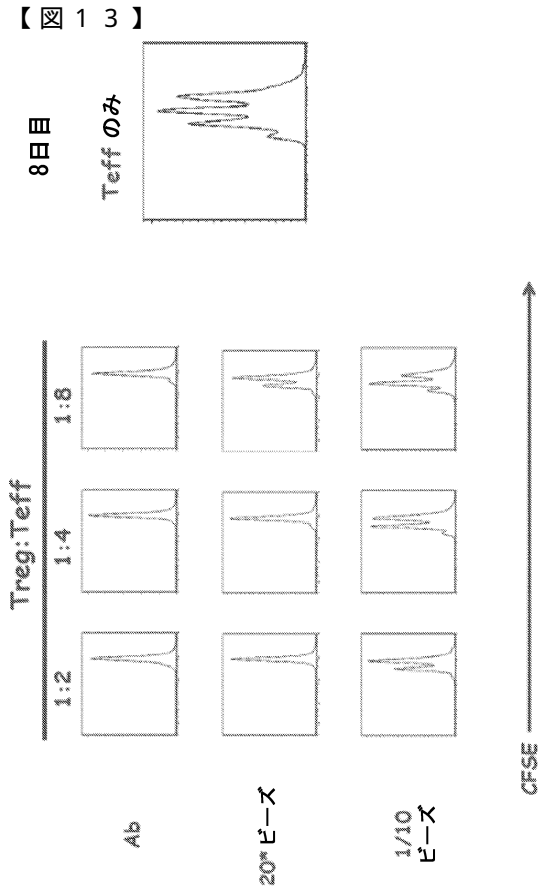
10

20

30

40

50



10

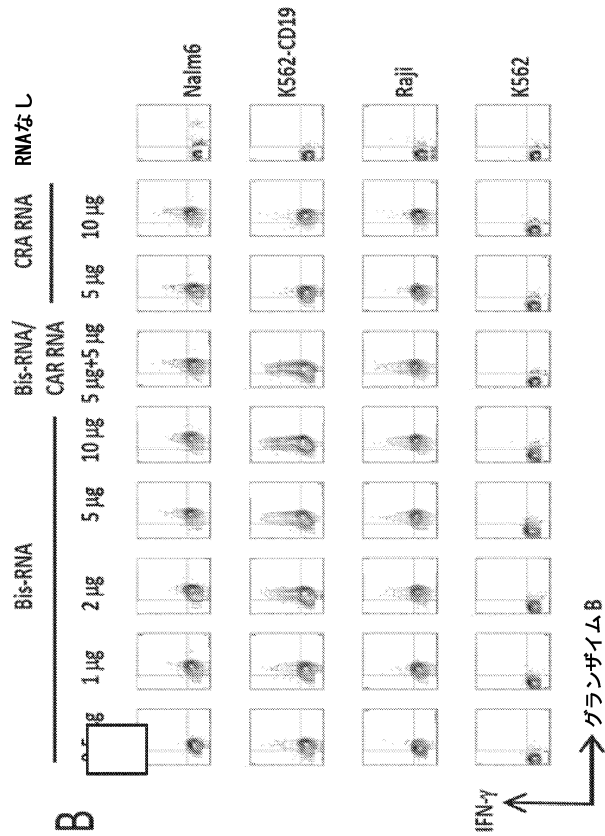
20

30

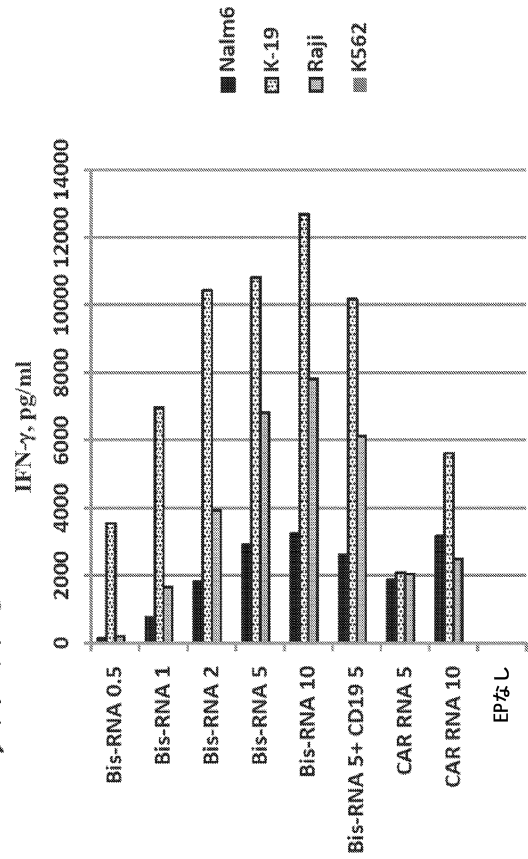
40

50

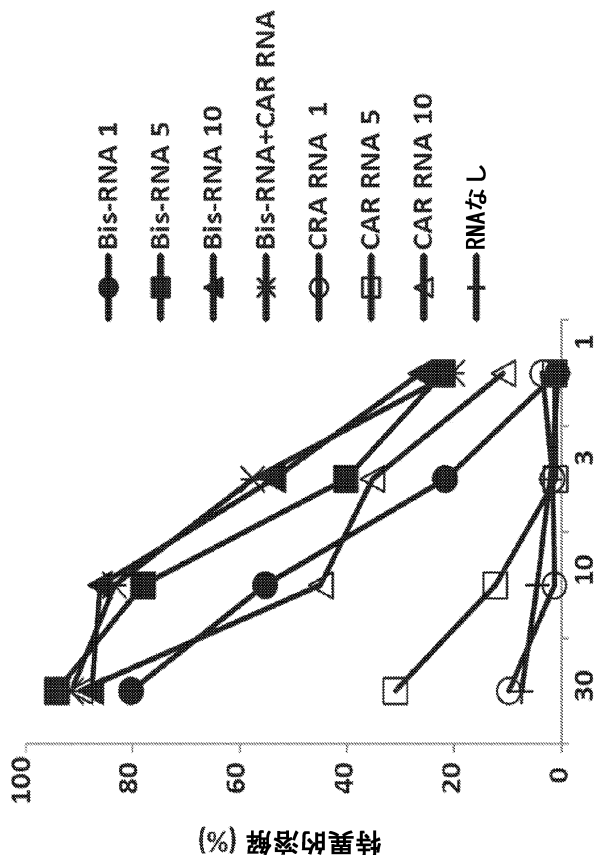
【図 16 B】



【図 16 C】



【図 16 D】



【図 17】

No	コエレクトロポレーションによる試験RNA		CD19+	EP
	RNA	CD19+		
1	10ug PD-1			
2	10ug PD-1-CD28			
3	10ug 10A5-1412			
4	10ug 13G4-1412			
5	10ug 1B12-1412			
6	10ug PD1-CD80			
7	10ug PD1-CD86			
8	10ug CD80-PD1			
9	10ug CD86-PD1			
10	10ug PDL1-CD80			
11	10ug PDL1-CD86			
12	10ug PDL2-CD80			
13	10ug PDL2-CD86			
14	10ug CD80-PDL1			
15	10ug CD80-PDL2			
16	10ug CD86-PDL1			
17	なし			
18	なし			

10

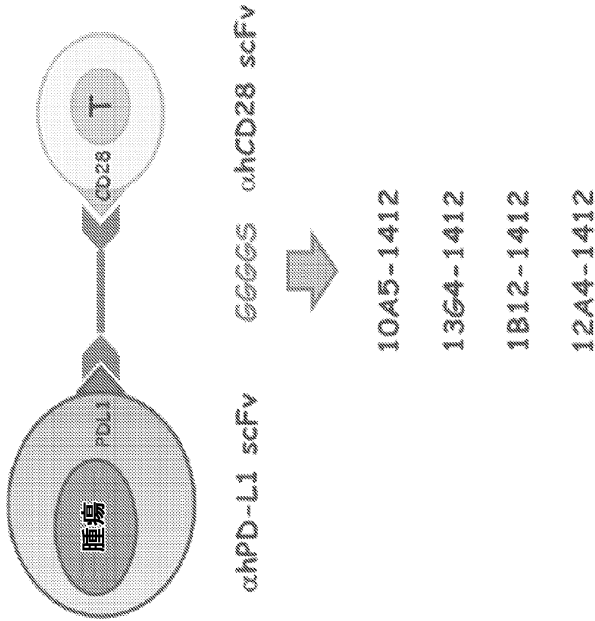
20

30

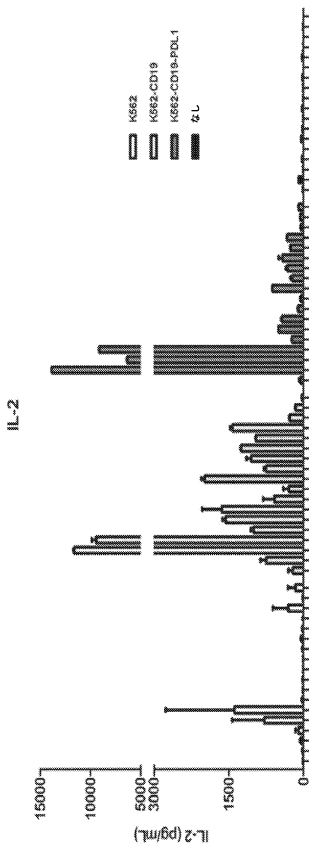
40

50

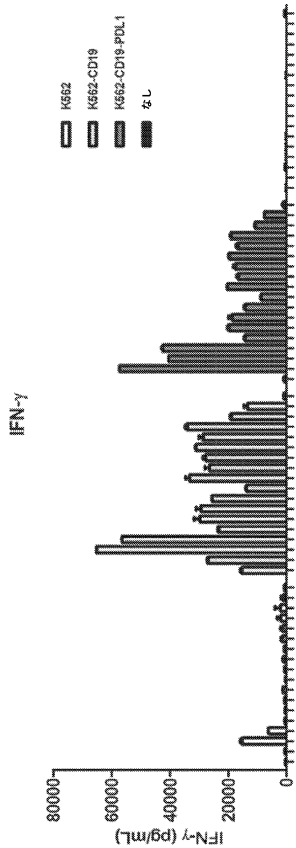
【図 18】



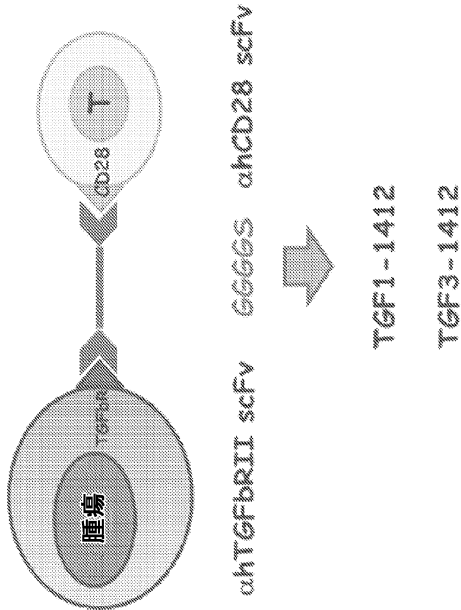
【図 19 A】



【図 19 B】



【図 20】



10

20

30

40

50

【配列表】

0007170394000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 0 7 K 14/71 (2006.01)

C 0 7 K 14/71

C 0 7 K 14/715 (2006.01)

C 0 7 K 14/715

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャオ ヤンビン

アメリカ合衆国 0 8 0 4 8 ニュージャージー州 ランバートン グラジオーラ レーン 6

(72)発明者 ジューン カール エイチ .

アメリカ合衆国 1 9 0 6 6 ペンシルベニア州 メリオン ステーション ベアード ロード 4 0 9

(72)発明者 リュー シャオジュン

アメリカ合衆国 1 9 0 8 1 ペンシルベニア州 スワースモア イェール アベニュー 8 0 1 アパートメント 8 0 9

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 宮岡 真衣

審判官 上條 肇

(56)参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 2 4 2 3 4 (J P , A)

特開 2 0 1 4 - 1 6 8 4 7 9 (J P , A)

特開 2 0 1 4 - 1 9 3 8 9 3 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 9 6 0 4 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 4 / 1 7 2 5 8 4 (W O , A 1)

Oh S . A . et al . , TGF - : Guardian of T Cell Function , J . Immunol . , 2 0 1 3 年 , Vol . 1 9 1 , pp . 3 9 7 3 - 3 9 7 9

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C07K 1/00-19/00

C12N 15/00-15/90

C12N 1/00-7/08

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)