(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7645197号
(P7645197)

(45)発行日　令和7年3月14日(2025.3.14)

(24)登録日　令和7年3月5日(2025.3.5)

(51)国際特許分類		FI		
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00	ZNA
C07K 16/28 (2006.01)		C07K	16/28	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12N 5/0783(2010.01)		C12N	5/0783	
A61K 35/17 (2025.01)		A61K	35/17	

請求項の数　33　（全160頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-568282(P2021-568282)
(86)(22)出願日　令和2年5月18日(2020.5.18)
(65)公表番号　特表2022-532747(P2022-532747A)
(43)公表日　令和4年7月19日(2022.7.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/033382
(87)国際公開番号　WO2020/232433
(87)国際公開日　令和2年11月19日(2020.11.19)
審査請求日　令和5年5月2日(2023.5.2)
(31)優先権主張番号　62/975,966
(32)優先日　令和2年2月13日(2020.2.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/848,983
(32)優先日　令和1年5月16日(2019.5.16)
最終頁に続く

(73)特許権者　500213834
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター
アメリカ合衆国 １００６５ ニューヨーク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー １２７５
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(72)発明者　アドゥスミリ， プラサッド エス．
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００２１， ニューヨーク， イースト ７６ティーエイチ ストリート ５３０， アパートメント ２７ケー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　メソテリンＣＡＲおよびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ｉ）（ａ）配列番号７６に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号７７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、および配列番号７８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を含む重鎖可変領域；ならびに配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号８０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、および配列番号８１に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む細胞外抗原結合ドメイン、
（ｂ）配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むＩＴＡＭ２バリアントおよび配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む細胞内シグナル伝達ドメイン
を含む、ヒトメソテリンに結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と；
ｉｉ）（ａ）配列番号４８のアミノ酸２１～１６５を含むプログラム細胞死１（ＰＤ－１）の細胞外ドメインの少なくとも一部；および
（ｂ）第１の膜貫通ドメイン
を含むプログラム細胞死１のドミナントネガティブ型（ＰＤ－１　ＤＮ）と
を含み、前記ＣＡＲが、切断可能ペプチドにより前記ＰＤ－１　ＤＮに融合されるポリペプチド。

【請求項２】

ｉ）前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインが、１ｎＭ～２５ｎＭのＥＣ５０値でヒトメソテリンに特異的に結合し、

ｉｉ）前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインが、１，０００個またはそれより多くのメソテリン結合部位／細胞のメソテリン発現レベルでヒトメソテリンを認識し、
ｉｉｉ）前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインが、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、Ｆａｂ、もしくはＦ（ａｂ）$_2$を含み、
ｉｖ）前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインが、前記重鎖可変領域と前記軽鎖可変領域との間にリンカーを含み、かつ／または
ｖ）前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインが、前記細胞外抗原結合ドメインのＮ末端に共有結合されているリーダーを含む、
請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
ｉ）前記重鎖可変領域が、配列番号８２に記載のアミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖可変領域が、配列番号８３に記載のアミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含む、または
ｉｉ）前記重鎖可変領域が、配列番号８２に記載のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖可変領域が、配列番号８３に記載のアミノ酸配列を含む、
請求項１または２に記載のポリペプチド。
【請求項４】
前記ＰＤ－１　ＤＮの前記第１の膜貫通ドメインが、ＣＤ８ポリペプチド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、またはその組合せを含む、請求項１～３のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項５】
前記ＰＤ－１　ＤＮの前記第１の膜貫通ドメインが、配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７を含むＣＤ８ポリペプチドを含む、請求項４に記載のポリペプチド。
【請求項６】
前記ＰＤ－１　ＤＮが、配列番号４８のアミノ酸２１～１６５および配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項７】
前記改変ＣＤ３ζポリペプチドが天然のＩＴＡＭ１を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項８】
前記改変ＣＤ３ζポリペプチドが、配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、請求項１～７のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項９】
前記ＰＤ－１　ＤＮが細胞内ドメインを欠如する、請求項１～８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
ｉ）前記ＣＡＲが第２の膜貫通ドメインをさらに含み、かつ／または
ｉｉ）前記ＣＡＲの前記細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激シグナル伝達領域をさらに含む、
請求項１～９のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１】
前記ＣＡＲの前記第２の膜貫通ドメインが、ＣＤ２８ポリペプチドを含み、および／または、前記共刺激シグナル伝達領域がＣＤ２８ポリペプチドを含む、請求項１０に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
前記ＣＡＲが配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～１１のいずれか一

項に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む免疫応答細胞。
【請求項１４】
ｉ）前記ＰＤ－１　ＤＮおよび前記ＣＡＲが組換え発現される、かつ／または
ｉｉ）前記ＰＤ－１　ＤＮおよび前記ＣＡＲがベクターから発現される、
請求項１３に記載の免疫応答細胞。
【請求項１５】
ｉ）前記免疫応答細胞が、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、および多能性幹細胞から分化したリンパ系細胞からなる群から選択される、
ｉｉ）前記免疫応答細胞が、Ｔ細胞である、
ｉｉｉ）前記免疫応答細胞が、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、制御性Ｔ細胞、およびナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞からなる群から選択されるＴ細胞である、
ｉｖ）前記免疫応答細胞が、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞から分化したリンパ系細胞である、
請求項１３または１４に記載の免疫応答細胞。
【請求項１６】
請求項１３～１５のいずれか一項に記載の免疫応答細胞の有効量および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。
【請求項１７】
10^4～10^6個の間の前記免疫応答細胞、少なくとも10^5個の前記免疫応答細胞、または10^5個の前記免疫応答細胞を含む、請求項１６に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
請求項１～１２のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸。
【請求項１９】
前記ポリヌクレオチドが配列番号１２３または配列番号１２４に記載のヌクレオチド配列を含む、請求項１８に記載の核酸。
【請求項２０】
請求項１８または１９に記載の核酸を含むベクター。
【請求項２１】
レトロウイルスベクター、γ－レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである、請求項２０に記載のベクター。
【請求項２２】
免疫応答細胞を産生する方法であって、請求項１～１２のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項１８もしくは１９に記載の核酸、または請求項２０もしくは２１に記載のベクターを免疫応答細胞に導入することを含む方法。
【請求項２３】
請求項１～１２のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項１８もしくは１９に記載の核酸、請求項２０もしくは２１に記載のベクター、請求項１３～１５のいずれか一項に記載の免疫応答細胞、または請求項１６もしくは１７に記載の医薬組成物を含むキット。
【請求項２４】
対象における新生物の処置および／もしくは予防、新生物の再発を有する対象の処置、対象における腫瘍負荷の低減、新生物を有する対象の生存の増加もしくは延長、対象における炎症疾患の予防および／もしくは処置、ならびに／または臓器移植のレシピエントである対象における移植片拒絶の予防のための、請求項１３～１５のいずれか一項に記載の免疫応答細胞を含む組成物、または請求項１６もしくは１７に記載の医薬組成物。
【請求項２５】
前記対象における腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍サイズを低減する、および／または前記腫瘍を根絶する、請求項２４に記載の組成物。

【請求項２６】
前記新生物および／または前記腫瘍が固形腫瘍である、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２７】
前記固形腫瘍が、中皮腫、肺がん、膵臓がん、卵巣がん、乳がん、大腸がん、胸膜腫瘍、神経膠芽腫、食道がん、胃がん、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃がん、胆管癌、およびその組合せからなる群から選択される、請求項２６に記載の組成物。
【請求項２８】
前記対象が、前記組成物の投与の前に免疫療法を受けた、請求項２４～２７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９】
前記対象が、免疫刺激剤、チェックポイント免疫遮断剤、およびその組合せからなる群から選択される少なくとも１つの剤を受けている、または受けたことがある、請求項２８に記載の組成物。
【請求項３０】
ｉ）前記免疫刺激剤が、ＩＬ－１２、アゴニスト共刺激性モノクローナル抗体、およびその組合せからなる群から選択され、
ｉｉ）前記アゴニスト共刺激性モノクローナル抗体が、抗４－１ＢＢ抗体、抗ＯＸ４０抗体、抗ＩＣＯＳ抗体、およびその組合せからなる群から選択され、
ｉｉｉ）前記チェックポイント免疫遮断剤が、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＰＤ－１抗体、抗ＬＡＧ３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＴＩＭ３抗体、およびその組合せからなる群から選択される、
請求項２９に記載の組成物。
【請求項３１】
前記免疫応答細胞が、前記対象に胸膜または胸膜内投与されるものである、請求項２４～３０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２】
炎症疾患が膵炎である、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３３】
前記対象が臓器移植のレシピエントである、請求項３１に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１９年５月１６日に出願された米国仮特許出願第６２／８４８，９８３号および２０２０年２月１３日に出願された米国仮特許出願第６２／９７５，９６６号に対する優先権を主張するものであり、その各々の内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれ、その各々に対する優先権が主張されている。
【０００２】
配列表
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介してＡＳＣＩＩフォーマットで提出された配列表を含有し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。２０２０年５月１３日に作成されたＡＳＣＩＩコピーは、０７２７３４１０４１ＳＬ＿ＳＴ２５．ＴＸＴと名付けられ、サイズは１４４，３１８バイトである。
【０００３】
１．緒言
本開示の主題は、がんおよび病原体に対する免疫応答を増強するための方法および組成物を提供する。本発明は、ヒトメソテリンを特異的に標的化するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）およびそのようなＣＡＲを含む免疫応答細胞に関する。本開示のメソテリン標的化ＣＡＲは、抗腫瘍活性を含む免疫活性化特性が増強されており、一方でＣＡＲが誘導する毒性および免疫原性を最小限にする特色を有する。

【背景技術】
【０００４】
２．発明の背景
細胞に基づく免疫療法は、がんの処置に関して治癒の潜在性を有する治療である。Ｔ細胞および他の免疫細胞を改変して、選択された抗原に特異的な、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と称される抗原に対する人工のまたは合成受容体をコードする遺伝子材料の導入を通して腫瘍抗原を標的化することができる。ＣＡＲを使用する標的化Ｔ細胞治療は、一部の血液悪性疾患の処置に臨床で成功したことが最近示されている。しかし、ＣＡＲ発現Ｔ細胞治療を固形腫瘍に置き換える場合、臨床での利益を達成するために克服しなければならないいくつかの障壁が提起される。悪性細胞は、免疫の認識および除去から自身を保護するために免疫抑制性の微小環境を生成するように適応する。この腫瘍の微小環境は、標的化Ｔ細胞治療などの免疫応答の刺激を伴う処置の方法に対して難題を提起する。固形腫瘍はまた、効率的なＴ細胞トラフィッキングを妨害する解剖学的区画内に制限され、アゴニスト性の共刺激リガンドの発現を欠如し、および／またはＴ細胞機能の負の調節因子を発現し得る。このため、固形腫瘍の排除に成功するためには、有効な腫瘍への浸潤および腫瘍が誘導する免疫抑制の克服を必要とする。加えて、固形腫瘍は、非腫瘍組織に対して最少のまたは認容可能な毒性で、その標的化によって強力なＴ細胞による腫瘍の根絶が可能となる最適な免疫標的－抗原を選択する際の難題を提起する。
【０００５】
したがって、がん、特に固形腫瘍を処置するためのＣＡＲを設計するための、最少の毒性および免疫原性で強力な腫瘍の根絶を誘導することが可能である新規治療戦略が必要である。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００６】
３．発明の概要
本開示の主題は、（ａ）メソテリン（例えば、ヒトメソテリン）を特異的に標的化するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）および（ｂ）プログラム細胞死１のドミナントネガティブ型（ＰＤ－１　ＤＮ）を含むポリペプチド組成物、そのようなポリペプチド組成物を含む免疫応答細胞、ならびに例えばがんを処置するためのこれらのポリペプチド組成物および免疫応答細胞の使用を提供する。
【０００７】
本開示の主題は、ポリペプチド組成物を提供する。ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は：ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、およびｉｉ）プログラム細胞死１のドミナントネガティブ型（ＰＤ－１　ＤＮ）を含み、ＣＡＲは、（ａ）細胞外抗原結合ドメイン、ならびに（ｂ）ＩＴＡＭ２バリアントおよびＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、ＩＴＡＭ２バリアントおよびＩＴＡＭ３バリアントの各々は２つの機能喪失突然変異を含む。
【０００８】
ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは：配列番号７６に記載のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号７７に記載のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号７８に記載のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む重鎖可変領域；ならびに配列番号７９に記載のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号８０に記載のアミノ酸配列を含むＣＤＲ２、および配列番号８１に記載のアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。
【０００９】
ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは：（ａ）リガンド結合領域を含むプログラム細胞死１（ＰＤ－１）の細胞外ドメインの少なくとも一部、および（ｂ）第１の膜貫通ドメインを含む。
【００１０】
ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮの第１の膜貫通ドメインは、ＣＤ８ポリペプ

チド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、またはその組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮの第１の膜貫通ドメインは、ＣＤ８ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮの第１の膜貫通ドメインに含まれるＣＤ８ポリペプチドは、配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７を含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは細胞内ドメインを欠如する。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号４８のアミノ酸２１～１６５および配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７を含む。

【００１１】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、約１ｎＭ～約２５ｎＭのＥＣ５０値でヒトメソテリンに特異的に結合する。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、約２０ｎＭのＥＣ５０値でヒトメソテリンに特異的に結合する。

【００１２】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、必要に応じて架橋されたＦａｂ、またはＦ（ａｂ）$_2$を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインはヒトｓｃＦｖを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、約１，０００個またはそれより多くのメソテリン結合部位／細胞のメソテリン発現レベルでヒトメソテリンを認識する。

【００１３】

ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号８２に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％相同から同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号８２に記載のアミノ酸配列を含む。

【００１４】

ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号８３に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％相同から同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号８３に記載のアミノ酸配列を含む。

【００１５】

ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号８２に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％相同から同一であるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号８３に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも

約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％相同から同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は配列番号８２に記載のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号８３に記載のアミノ酸配列を含む。

【００１６】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間にリンカーを含む。

【００１７】

ある特定の実施形態では、リーダーは、細胞外抗原結合ドメインのＮ末端に共有結合されている。ある特定の実施形態では、リーダーはＣＤ８ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ポリペプチドは、配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１の細胞外ドメインの少なくとも一部は、配列番号４８のアミノ酸２１～１６５を含む。

【００１８】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの改変ＣＤ３ζポリペプチドにおける機能喪失突然変異の各々は、チロシンアミノ酸残基にある。ある特定の実施形態では、ＩＴＡＭ２バリアントは、配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＩＴＡＭ３バリアントは、配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは天然のＩＴＡＭ１を含む。ある特定の実施形態では、天然のＩＴＡＭ１は、配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【００１９】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【００２０】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、第２の膜貫通ドメインをさらに含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの第２の膜貫通ドメインは、ＣＤ８ポリペプチド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、またはその組合せを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの第２の膜貫通ドメインはＣＤ２８ポリペプチドを含む。

【００２１】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、ＣＤ２８ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＤＡＰ－１０ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ポリペプチド、ＮＫＧＤ２ポリペプチド、またはその組合せを含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域はＣＤ２８ポリペプチドを含む。

【００２２】

本開示の主題は、本明細書に開示されるポリペプチド組成物を含む免疫応答細胞を提供する。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮおよび／またはＣＡＲは、組換えにより発現される。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮおよび／またはＣＡＲは、ベクターから発現される。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、そこからリンパ系細胞が分化し得る多能性幹細胞からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、多能性幹細胞は、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞である。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞はＴ細胞である。ある特定の実施形態では

、Ｔ細胞は、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、制御性Ｔ細胞、およびナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は自己である。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は同種である。

【００２３】

本開示の主題は、本明細書に開示される免疫応答細胞を含む組成物をさらに提供する。ある特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物である。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、約10^4個～10^6個の間の免疫応答細胞を含む。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、少なくとも約10^5個の免疫応答細胞を含む。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、約10^5個の免疫応答細胞を含む。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、対象における新生物を予防および／もしくは処置するため、新生物の再発を有する対象を処置するため、対象における腫瘍負荷を低減するため、新生物を有する対象の生存を増加もしくは延長するため、対象における炎症疾患を予防および／もしくは処置するため、ならびに／または臓器移植のレシピエントである対象における移植片拒絶を予防するためである。

【００２４】

加えて、本開示の主題は、本明細書に開示されるポリペプチド組成物をコードするポリヌクレオチドを含む核酸組成物を提供する。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号１２３に記載のヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号１２４に記載のヌクレオチド配列を含む。本開示の主題は、本開示の核酸組成物を含むベクターをさらに提供する。ある特定の実施形態では、ベクターはレトロウイルスベクターである。ある特定の実施形態では、レトロウイルスベクターは、γ－レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである。

【００２５】

本開示の主題は、本明細書に開示される免疫応答細胞を産生する方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本開示のポリペプチド組成物、本開示の核酸組成物、または本開示のベクターを免疫応答細胞に導入することを含む。

【００２６】

本開示の主題は、本開示のポリペプチド組成物、本開示の核酸組成物、本開示のベクター、本開示の免疫応答細胞、または本開示の医薬組成物を含むキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、新生物を処置および／または予防するための書面での使用説明書をさらに含む。

【００２７】

さらに、本開示の主題は、上記の免疫応答細胞を使用する様々な方法を提供する。例えば、本開示の主題は、対象における腫瘍負荷を低減する方法であって、本開示の免疫応答細胞または医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、対象における腫瘍細胞の数を低減し、腫瘍サイズを低減し、および／または腫瘍を根絶する。

【００２８】

本開示の主題はまた、新生物を有する対象の生存を増加させるまたは延長させる方法であって、本開示の免疫応答細胞または本開示の医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む方法も提供する。

【００２９】

ある特定の実施形態では、腫瘍または新生物は固形腫瘍である。ある特定の実施形態では、固形腫瘍は、中皮腫、肺がん、膵臓がん、卵巣がん、乳がん、大腸がん、胸膜腫瘍、神経膠芽腫、食道がん、胃がん（gastric cancer）、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃がん（stomach cancer）、胆管癌、子宮頸がん、唾液腺がん、およびその組合せからなる群から選択される。

【００３０】

本開示の主題は、新生物の再発を有する対象を処置する方法であって、本明細書に開示される免疫応答細胞または医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む方法を提供す

る。ある特定の実施形態では、対象は、免疫応答細胞または組成物の前記投与の前に免疫療法を受けた。

【００３１】

加えて、本開示の主題は、対象におけるがん細胞または病原体に応答して免疫活性化サイトカイン産生を増加させる方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本明細書に開示される免疫応答細胞または医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む。ある特定の実施形態では、免疫活性化サイトカインは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－１１、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、インターフェロン調節因子７（ＩＲＦ７）、およびその組合せからなる群から選択される。

【００３２】

本開示の主題に従って、上記の様々な方法は、少なくとも１つの免疫調節剤を投与することを含み得る。ある特定の実施形態では、少なくとも１つの免疫調節剤は、免疫刺激剤、チェックポイント免疫遮断剤、放射線療法剤、化学療法剤、およびその組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、免疫刺激剤は、ＩＬ－１２、アゴニスト性共刺激モノクローナル抗体、およびその組合せからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、免疫刺激剤はＩＬ－１２である。一部の実施形態では、アゴニスト性共刺激モノクローナル抗体は、抗４－１ＢＢ抗体、抗ＯＸ４０抗体、抗ＩＣＯＳ抗体、およびその組合せからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、アゴニスト性共刺激モノクローナル抗体は抗４－１ＢＢ抗体である。ある特定の実施形態では、チェックポイント免疫遮断剤は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＰＤ－１抗体、抗ＬＡＧ３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＴＩＭ３抗体、およびその組合せからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、チェックポイント免疫遮断剤は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体または抗ＰＤ－１抗体である。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。

【００３３】

ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は、対象に胸膜または胸膜内投与される。

【００３４】

本開示の主題は、対象における炎症疾患を予防および／または処置する方法をさらに含む。ある特定の実施形態では、方法は、本開示の免疫応答細胞または医薬組成物を対象に投与することを含む。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は免疫阻害性細胞である。ある特定の実施形態では、免疫阻害性細胞は制御性Ｔ細胞である。ある特定の実施形態では、炎症疾患は膵炎である。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は臓器移植のレシピエントである。ある特定の実施形態では、対象は、膵移植のレシピエントである。

【００３５】

本開示の主題は、臓器移植のレシピエントである対象における移植片拒絶を予防する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本開示の免疫応答細胞または医薬組成物を対象に投与することを含む。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は免疫阻害性細胞である。ある特定の実施形態では、免疫阻害性細胞は、制御性Ｔ細胞である。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は膵移植のレシピエントである。

【００３６】

４．図面の簡単な説明

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

【図面の簡単な説明】

【００３７】

【図１】図１は、本開示の主題のある特定の実施形態に従うポリペプチド組成物を表す。ポリペプチド組成物は、抗メソテリン（ＭＳＬＮ）ｓｃＦｖ、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、ＣＤ２８細胞質シグナル伝達ドメイン、ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン（例えば、Ｉ

ＴＡＭ２バリアントおよびＩＴＡＭ３バリアントを含む）を含むＣＡＲを含む。ＣＡＲは、切断可能なＰ２Ａペプチドを介してＰＤ１ＤＮＲ（およびＰＤ１シグナル伝達ドメイン）に融合される。ＳＰ：シグナル伝達ペプチド；ｓｃＦｖ：一本鎖可変断片；ＴＭ：膜貫通ドメイン；ｃｙｔ：細胞質ドメイン；ＤＮＲ：ドミナントネガティブ受容体；ＬＴＲ：長鎖末端反復配列。

【図２】図２は、実施例２に開示される様々な構築物を示す。

【図３】図３Ａ～３Ｄは、産生細胞系ＲＤ１１４におけるウイルス産生を示す。ＲＤ１１４細胞をＨ２９ウイルス上清の様々な希釈液（未希釈、１：２、および１：４）で形質導入し、抗Ｆａｂ抗体を使用するフローサイトメトリーによってＣＡＲ発現について染色した。ＲＤ１１４エンプティが陰性対照としての役割を果たした。図３ＡはＲＤ１１４エンプティを示す（陰性対照として）。図３Ｂは未希釈を示し、図３Ｃは上清１：２の希釈を示し、図３Ｄは上清１：４の希釈を示す。

【図４Ａ】図４Ａ～４Ｅは、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－Ｐ２Ａ－ＰＤ１ＤＮＲを有するヒトＴ細胞－ドナーＨ１１６－２の形質導入を示す。ＰＨＡ活性化Ｔ細胞を、様々な濃度のＲＤ１１４ウイルス上清（図４Ａは１：２を示し、図４Ｂは１：５を示し、図４Ｃは１：７を示し、図４Ｄは１：１５を示し、図４Ｅは未形質導入（「ＵＴ」）を示す）で形質導入し、フローサイトメトリーを使用して、抗Ｆａｂ染色によってＣＡＲ発現について、および抗ＰＤ１染色によってＰＤ１ＤＮＲについて染色した。

【図４Ｂ】同上。

【図４Ｃ】同上。

【図４Ｄ】同上。

【図４Ｅ】同上。

【図５Ａ】図５Ａ～５Ｅは、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－Ｐ２Ａ－ＰＤ１ＤＮＲを有するヒトＴ細胞－ドナーＨ１８の形質導入を示す。ＰＨＡ活性化Ｔ細胞を、様々な濃度のＲＤ１１４ウイルス上清（図５Ａは１：２を示し、図５Ｂは１：５を示し、図５Ｃは１：１０を示し、図５Ｄは１：１５を示し、図５Ｅは未形質導入（「ＵＴ」）を示す）で形質導入し、フローサイトメトリーを使用して、抗Ｆａｂ染色によってＣＡＲ発現について、および抗ＰＤ１染色によってＰＤ１ＤＮＲについて染色した。

【図５Ｂ】同上。

【図５Ｃ】同上。

【図５Ｄ】同上。

【図５Ｅ】同上。

【図６Ａ】図６Ａ～６Ｆは、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－Ｐ２Ａ－ＰＤ１ＤＮＲを有するヒトＴ細胞－ドナーＨ１９の形質導入を示す。ＰＨＡ活性化Ｔ細胞を、様々な濃度のＲＤ１１４ウイルス上清（図６Ａは１：２を示し、図６Ｂは１：５を示し、図６Ｃは１：７を示し、図６Ｄは１：１０を示し、図６Ｅは１：１５を示し、図６Ｆは未形質導入（「ＵＴ」）を示す）で形質導入し、フローサイトメトリーを使用して、抗Ｆａｂ染色によってＣＡＲ発現について、および抗ＰＤ１染色によってＰＤ１ＤＮＲについて染色した。

【図６Ｂ】同上。

【図６Ｃ】同上。

【図６Ｄ】同上。

【図６Ｅ】同上。

【図６Ｆ】同上。

【図７－１】図７Ａ～７Ｃは、ベクターコピー数（ＶＣＮ）の蛍光強度の中央値（ＭＦＩ）との相関を示す。ＰＨＡ活性化Ｔ細胞を、様々な濃度のＲＤ１１４ウイルス上清で形質導入し、抗Ｆａｂ染色とフローサイトメトリー分析によってＣＡＲ発現について染色した。形質導入Ｔ細胞のゲノムＤＮＡを単離し、ベクターコピー数をｑＰＣＲを使用してＤＮＡ１μｇ当たりのＶＣＮとして決定した。ＣＡＲ陽性細胞のＭＦＩを３名の異なるドナーについて１μｇのＤＮＡ当たりのＶＣＮと相関させた。図７ＡはドナーＨ１９を示し、図７ＢはドナーＨ１８を示し、図７ＣはドナーＨ１１６－２を示す。

【図７－２】同上。
【図８】図８は、３名の異なるドナー由来の形質導入Ｔ細胞に関する細胞傷害性を示す。インピーダンスベースのアッセイを使用して、様々なＥ：Ｔ比で、ＭＳＬＮ高標的細胞（ＭＧＭ）を異なるドナー由来のＭ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と共培養した。Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、Ｅ：Ｔ比１：１でＭＧＭ細胞の細胞溶解を媒介した。Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、高ＭＳＬＮ標的細胞を死滅させた。
【図９】図９は、インピーダンスベースの細胞傷害測定（ｅＣＴＬ）の例を示す。
【図１０】図１０は、ｅＣＴＬを使用する、様々な構築物の比較分析のパラメーターを示す。
【図１１Ａ】図１１Ａ～１１Ｅは、標的細胞系のＭＳＬＮおよびＰＤ－Ｌ１発現を示す。中皮腫（ＭＧＭ（図１１Ａに示す）、ＭＧＭ－ＰＤＬ１（図１１Ｂに示す）およびＭＳＴＯＧ（図１１Ｃに示す））および肺がん（Ａ５４９ＧＭ（図１１Ｄに示す）およびＡ５４９Ｇ（図１１ｅに示す））細胞系を、フローサイトメトリーによって、ＭＳＬＮおよびＰＤ－Ｌ１発現について評価した。ＭＧＭ、ＭＧＭ－ＰＤＬ１およびＡ５４９ＧＭを過剰発現したＭＳＬＮ、ＭＧＭ－ＰＤＬ１細胞は、ＰＤ－Ｌ１をさらに過剰発現した。
【図１１Ｂ】同上。
【図１１Ｃ】同上。
【図１１Ｄ】同上。
【図１１Ｅ】同上。
【図１２Ａ】図１２Ａ～１２Ｅは、形質導入Ｔ細胞のＣＡＲおよびＰＤ１発現を示す。Ｍ２８ｚ（図１２Ａに示す）、Ｍ２８ｚ１ｘｘ（図１２Ｂに示す）、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ（図１２Ｃに示す）およびＭ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲ（図１２Ｄに示す）を形質導入したヒトＴ細胞を、フローサイトメトリーを使用して、抗ｍｙｃ染色によってＣＡＲ発現について、および抗ＰＤ１染色によってＰＤ１／ＰＤ１ＤＮＲ発現について分析した。図１２Ｅは未形質導入（「ＵＴ」）Ｔ細胞を示す。
【図１２Ｂ】同上。
【図１２Ｃ】同上。
【図１２Ｄ】同上。
【図１２Ｅ】同上。
【図１３Ａ】図１３Ａ～１３Ｃは、ＭＳＬＮ高腫瘍細胞（ＭＧＭ）に関する１ＸＸドメインおよびＰＤ１ＤＮＲを保有するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を示す。ＭＳＬＮ高標的細胞（ＭＧＭ）を、図示したＥ：Ｔ比で、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。インピーダンスベースのアッセイを使用して抗腫瘍効率を評価した。図１３Ａは、約３：１のＥ：Ｔ比を示す。図１３Ｂは、約１：１のＥ：Ｔ比を示す。図１３Ｃは、約０．３３：１のＥ：Ｔ比を示す。
【図１３Ｂ】同上。
【図１３Ｃ】同上。
【図１４】図１４は、ＭＳＬＮ高腫瘍細胞（ＭＧＭ）に関する１ｘｘドメインおよびＰＤ１ＤＮＲを保有するＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞傷害性の比較分析を示す。クロム－５１で標識したＭＳＬＮ高標的細胞（ＭＧＭ）を、図示したＥ：Ｔ比で、１８時間、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。クロム－５１ＣＴＬによって細胞傷害性を決定した。
【図１５Ａ】図１５Ａ～１５Ｃは、ＭＳＬＮ陰性腫瘍細胞（ＭＳＴＯＧ）に関する１ｘｘドメインおよびＰＤ１ＤＮＲを保有するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を示す。ＭＳＬＮ陰性標的細胞（ＭＳＴＯＧ）を、図示したＥ：Ｔ比で、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。インピーダンスベースのアッセイを使用して抗腫瘍効率を評価した。図１５Ａは、約３：１のＥ：Ｔ比を示す。図１５Ｂは、約１：１のＥ：Ｔ比を示す。

図１５Ｃは、約０．３３：１のＥ：Ｔ比を示す。
【図１５Ｂ】同上。
【図１５Ｃ】同上。
【図１６】図１６は、ＭＳＬＮ陰性腫瘍細胞（ＭＳＴＯＧ）に関する１ＸＸドメインおよびＰＤ１ＤＮＲを保有するＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞傷害性の比較分析を示す。クロム－５１で標識したＭＳＬＮ陰性標的細胞（ＭＳＴＯＧ）を、図示したＥ：Ｔ比で、１８時間、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。クロム－５１ＣＴＬによって細胞傷害性を決定した。
【図１７Ａ】図１７Ａ～１７Ｃは、ＰＤＬ１を過剰発現するＭＳＬＮ高腫瘍細胞に関する１ＸＸドメインおよびＰＤ１ＤＮＲを保有するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を示す。ＰＤＬ１を過剰発現するＭＳＬＮ高標的細胞（ＭＧＭ－ＰＤＬ１）を、図示したＥ：Ｔ比で、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。インピーダンスベースのアッセイを使用して抗腫瘍効率を評価した。図１７Ａは、約３：１のＥ：Ｔ比を示す。図１７Ｂは、約１：１のＥ：Ｔ比を示す。図１７Ｃは、約０．３３：１のＥ：Ｔ比を示す。
【図１７Ｂ】同上。
【図１７Ｃ】同上。
【図１８Ａ】図１８Ａ～１８Ｃは、ＭＳＬＮ高腫瘍細胞（Ａ５４９ＧＭ）に関する１ｘｘドメインおよびＰＤ１ＤＮＲを保有するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を示す。ＭＳＬＮ高標的細胞（Ａ５４９ＧＭ）を、図示したＥ：Ｔ比で、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。インピーダンスベースのアッセイを使用して抗腫瘍効率を評価した。図１８Ａは、約１０：１のＥ：Ｔ比を示す。図１８Ｂは、約５：１のＥ：Ｔ比を示す。図１８Ｃは、約２：１のＥ：Ｔ比を示す。
【図１８Ｂ】同上。
【図１８Ｃ】同上。
【図１９Ａ】図１９Ａ～１９Ｃは、１ｘｘドメインおよびＰＤ１ＤＮＲ：ＭＳＬＮ低腫瘍細胞（Ａ５４９Ｇ）を保有するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を示す。ＭＳＬＮ低標的細胞（Ａ５４９Ｇ）を、図示したＥ：Ｔ比で、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。インピーダンスベースのアッセイを使用して抗腫瘍効率を評価した。図１９Ａは、約１０：１のＥ：Ｔ比を示す。図１９Ｂは、約５：１のＥ：Ｔ比を示す。図１９Ｃは、約２：１のＥ：Ｔ比を示す。
【図１９Ｂ】同上。
【図１９Ｃ】同上。
【図２０－１】図２０Ａ～２０Ｄは、様々な処置のｉｎ　ｖｉｖｏ研究の結果を示す。図２０Ａは、ＣＡＲ　Ｔ細胞－Ｍ２８ｚ、ＰＤ１抗体を有するＭ２８ｚ、およびＰＤ１ＤＮＲを有するＭ２８ｚのｉｎ　ｖｉｖｏでの相対的有効性を示す。図２０Ｂは、Ｍ２８ｚおよびＭ２８ｚ１ＸＸ＋ＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のｉｎ　ｖｉｖｏでの相対的有効性を示す。図２０Ｃは、腫瘍再負荷後の全身性抗腫瘍免疫を示す腫瘍負荷イメージングを示す。図２０Ｄは、ＣＡＲ　Ｔ細胞浸潤を示す同所性ＭＰＭ腫瘍のｅｘ　ｖｉｖｏ免疫蛍光染色を示す。
【図２０－２】同上。
【図２１】図２１は、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲの構造および構成成分を示す。Ｍ２８ｚと対照的に、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、単一の機能性ＩＴＡＭを有する突然変異ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインを保有し、ＣＤ８膜貫通ドメインおよびヒンジドメインからなるＰＤ１ＤＮＲを同時発現し、内因性ＰＤ１に存在する細胞内ＰＤ１シグナル伝達ドメインを欠如する。
【図２２－１】図２２は、ＣＡＲ　Ｔ細胞ベクターの構造を示す。

【図２２－２】同上。
【図２３－１】図２３は、腫瘍細胞系でのメソテリン（ＭＳＬＮ）、ＰＤ－Ｌ１、およびＧＦＰの発現を示す。ＭＧＭ、ＭＧＭ－ＰＤＬ１、およびＭＳＴＯＧ腫瘍細胞を、フローサイトメトリーによって、それらのメソテリン（左のパネル）、ＰＤ－Ｌ１（真中のパネル）、およびＧＦＰ（右のパネル）の発現について分析した。側方散乱面積（Ｙ軸）に対してプロットした相対的発現強度を示す密度プロットが示される。
【図２３－２】同上。
【図２４】図２４Ａ～２４Ｄは、同所性ＭＰＭマウスモデルを示す。図２４Ａは、ヒトＭＰＭ（左上のパネル）の肉眼所見が腫瘍に包まれた心臓、肺、および縦隔構造を有するＭＰＭのマウスモデル（右上のパネル）ならびに胸壁を侵襲する腫瘍（下のパネル）で再現されることを示す。図２４Ｂは、腫瘍の拡大血管分布がＣＤ３４免疫蛍光法によって実証されることを示す。図２４Ｃは、ＢＬＩによってモニターされる腫瘍負荷進行が各時点でＭＲＩによる腫瘍体積の測定値と相関することを示す。図２４Ｄは、連続的ＢＬＩおよびＭＲＩによってモニターされる腫瘍負荷進行を示す。
【図２５Ａ】図２５Ａ～２５Ｃは、免疫組織化学分析によるヒト組織におけるメソテリンの発現を示す。図２５Ａは、正常な胸膜および心膜に対するＭＰＭにおけるメソテリンの発現を示す。図２５Ｂは、正常な肺組織に対する肺腺癌におけるメソテリンの発現を示す。図２５Ｃは、正常な胸部組織に対する三重陰性乳がんにおけるメソテリンの発現を示す。
【図２５Ｂ】同上。
【図２５Ｃ】同上。
【図２６－１】図２６は、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲの発現をウイルス上清の様々な希釈液を使用して滴定することができることを示す。ヒトＴ細胞を、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（左のパネル）またはｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（真ん中のパネル）をコードするウイルス上清の様々な希釈液で形質導入した。生存ＣＤ３陽性細胞のＣＡＲ（Ｙ軸）およびＰＤ１（Ｘ軸）の発現をフローサイトメトリーによって評価した。図示した結果は、３名の異なるドナーのうちの１名のドナーの代表例由来のものである。
【図２６－２】同上。
【図２７】図２７は、ＭＦＩによって測定したＣＡＲ発現がＶＣＮと相関することを示す。３名の異なるドナーに由来するヒトＴ細胞を、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲまたはｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲのいずれかをコードするレトロウイルス上清の様々な希釈液で形質導入した。ＣＡＲ陽性Ｔ細胞（フローサイトメトリーによって決定した）のＭＦＩをＶＣＮ（ｑＰＣＲによって決定した）に対してプロットした。Ｒ２値は、線形回帰分析に由来した（黒線）。
【図２８】図２８Ａ～２８Ｄは、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲおよびｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞におけるＰＤ１およびＰＤ１ＤＮＲの発現を示す。図２８Ａは、ｍｙｃＭ２８ｚおよびｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のＣＡＲ表面発現のパーセントを示す。図２８Ｂは、ＰＤ１表面発現に対するＣＤ３陽性細胞のパーセントを示す。図２８Ｃは、ＣＤ３陽性細胞のＰＤ１表面発現のＭＦＩを示す。図２８Ｄは、未形質導入Ｔ細胞のものと比較した、倍数変化として示されるＰＤ１細胞外ドメインおよびＰＤ１細胞内ドメインの相対的ｍＲＮＡ発現を示す。
【図２９－１】図２９は、ｍｙｃタグを有するかまたは有さないＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ発現Ｔ細胞が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで同一の抗腫瘍効率を呈することを示す。３名の異なるドナーに由来するヒトＴ細胞を、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（赤色）またはｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（緑色）のいずれかで形質導入し（形質導入範囲、３７％～６３％）、ＭＧＭ細胞と共培養した（緑色；矢印はＴ細胞付加の時間を示す）。両構築物の抗腫瘍効率を、インピーダンスベースの細胞傷害アッセイを使用して、図示したＥ：Ｔ比で比較した。
【図２９－２】同上。
【図３０】図３０は、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、抗原特異的な、ＨＬＡに依存しない腫瘍溶解を媒介することを示す。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１Ｄ

ＮＲ（青色）またはｍｙｃＭ２８ｚ（赤色）を形質導入したヒトＴ細胞を、図示したＥ：Ｔ比で、ＭＧＭ、ＭＧＭ－ＰＤＬ１、またはＭＳＴＯＧ腫瘍細胞のいずれかで共培養した。ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞傷害性を、１８時間の共培養後に５１Ｃｒ放出アッセイによって評価した。未形質導入Ｔ細胞（橙色）は対照としての役割を果たした。

【図３１】図３１は、メソテリン発現腫瘍細胞で刺激した際のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の蓄積を示す。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（青色）またはｍｙｃＭ２８ｚ（赤色）を形質導入したヒトＴ細胞を、１：１のＥ：Ｔ比で４８時間、ＭＧＭまたはＭＧＭ－ＰＤＬ１標的細胞に繰り返し曝露させた。ＣＡＲ　Ｔ細胞の蓄積を、各抗原刺激後の絶対的なＣＡＲ　Ｔ細胞数によって定量した。

【図３２】図３２は、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、初期抗原刺激の際に、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と類似する細胞傷害性を呈したことを示す。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（青色）またはｍｙｃＭ２８ｚ（赤色）を形質導入したヒトＴ細胞を、図示したＥ：Ｔ比で、５１Ｃｒで標識したＭＧＭまたはＭＧＭ－ＰＤＬ１標的細胞と共培養した。５１Ｃｒ放出アッセイを使用して、１８時間後に細胞傷害性を評価した。未形質導入Ｔ細胞（橙色）は対照としての役割を果たした。

【図３３】図３３は、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、反復抗原刺激の際に抗腫瘍効率を保持したことを示す。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（青色）またはｍｙｃＭ２８ｚ（赤色）を形質導入したヒトＴ細胞を、４回の刺激に３：１のＥ：Ｔ比で４８時間、その後２回の追加の刺激に１：１のＥ：Ｔ比で、ＭＧＭ（左のパネル）またはＭＧＭ－ＰＤＬ１（右のパネル）標的細胞に繰り返し曝露させた。ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞傷害性を、１８時間の共培養後に、図示したＥ：Ｔ比で、４回目と７回目の抗原刺激の際に５１Ｃｒ放出アッセイによって評価した。

【図３４】図３４は、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、抗原刺激の際にエフェクターサイトカインを分泌したことを示す。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（青色）またはｍｙｃＭ２８ｚ（赤色）を形質導入したヒトＴ細胞を、１：１のＥ：Ｔ比で４８時間、ＭＧＭ（上段）またはＭＧＭ－ＰＤＬ１（下段）標的細胞に繰り返し曝露させた。１回目、３回目、および６回目の抗原への曝露の２４時間後に無細胞上清を回収し、Ｌｕｍｉｎｅｘアッセイによってエフェクターサイトカイン分泌を評価した。

【図３５】図３５は、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞に、3×10^{4}個の単回低用量の胸膜内投与がｉｎ　ｖｉｖｏでの抗腫瘍効率を実証することを示す。同所性ＭＧＭ腫瘍を保有する雌のＮＳＧマウスを、Ｐ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（ｎ＝６、赤いバー）またはｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（ｎ＝１０、青いバー）のいずれかの単回胸膜内用量で処置した。腫瘍負荷をＢＬＩによって測定した。図示した時点は、ＣＡＲ　Ｔ細胞投与後１５日目を表し、Ｐ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスが瀕死の状態になり始めた時点である。対応のないスチューデントのｔ検定（両側）を使用して、統計的有意差を決定した。＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図３６－１】図３６Ａ～３６Ｄは、胸膜内投与されたｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、ｉｎ　ｖｉｖｏでの抗腫瘍効率を呈し、生存率を増加させることを示す。図３Ａは、単回用量のｍｙｃＭ２８ｚ（1×10^{5}）またはｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（1×10^{5}または5×10^{4}）ＣＡＲ　Ｔ細胞（ｎ＝７～８）で処置したＭＧＭ－ＰＤＬ１腫瘍を保有する雌のＮＳＧマウスの連続的腫瘍ＢＬＩを示す。処置群当たり４匹のマウスを腹臥位で示す。図３６Ｂは、各処置マウスの腫瘍負荷を示す対応する連続的ＢＬＩ（背側と腹側の平均）を示す。図３６Ｃは、処置後の対応するマウスの体重を示す。図３６Ｄは、ｍｙｃＭ２８ｚおよびｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のｉｎ　ｖｉｖｏ有効性を比較するＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ生存率分析を示す。生存率曲線を対数順位検定を使用して分析した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１。

【図３６－２】同上。

【図３７】図３７は、胸膜内処置したマウスの原発腫瘍におけるｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の検出を示す。マウス由来の胸膜ＭＧＭ腫瘍を5×10^{5}個の未形質導入Ｔ細胞（左）、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（真中）、またはｍｙｃＭ２８

ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（右）で処置した。胸膜内Ｔ細胞注射の３日後に腫瘍組織を採取し、固定し、免疫蛍光法による腫瘍メソテリン（緑色）、ヒトＣＤ４５陽性細胞（赤色）、およびＤＡＰＩ（細胞核、青色）についてｅｘ　ｖｉｖｏで染色した。

【図３８】図３８Ａおよび３８Ｂは、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、ｉｎ　ｖｉｖｏでの反復腫瘍負荷に際する腫瘍再建に耐性を示したことを示す。図３８Ａは、以下の腫瘍再負荷実験を示す略図を示す：ｍｙｃＭ２８ｚまたはｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の胸膜内投与（１×１０^{5}個のＣＡＲ　Ｔ細胞の単回用量）およびＭＧＭ－ＰＤＬ１腫瘍細胞（８×１０^{5}個の接種用量）の胸膜からの根絶の６８日後に、４～８日ごとに漸増用量（２×１０^{6}～１１×１０^{6}個）のＭＧＭ腫瘍細胞を１０回、マウスに腹腔内再負荷した。図３８Ｂは、ｍｙｃＭ２８ｚ（２匹のマウス、赤色の線）またはｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（３匹のマウス、黒色の線）ＣＡＲ Ｔ細胞の単回胸膜内用量の後の腫瘍負荷および処置６８日目に開始する腫瘍再負荷を示す連続的ＢＬＩを示す。黒色の矢印は、漸増用量の腹腔内腫瘍再負荷の時点を示す。

【図３９－１】図３９Ａ～３９Ｃは、臨床試験用ベクターストックを使用して製造したＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、ｉｎ　ｖｉｖｏでの抗腫瘍効率を有し、生存期間を延長することを示す。図３９Ａは、臨床試験用のウイルス上清を使用してＣＴＣＥＦによって製造された６×１０^{4}個（ｎ＝８）または２×１０^{5}個（ｎ＝１０）のＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したＭＧＭ腫瘍を保有する雌のＮＳＧマウスの連続的腫瘍ＢＬＩを示す。図３９Ｂは、処置後の対応するマウスの体重を示す。図３９Ｃは、Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ生存率分析を示す。

【図３９－２】同上。

【図４０】図４０は、雄のマウスに関する中間　　殺時の平均体重を示す。群１（非腫瘍対照）、３（対照ビヒクル）、および５（試験物）を示す。

【図４１】図４１は、雌のマウスに関する中間　　殺時の平均体重を示す。群２（非腫瘍対照）、４（対照）、および６（試験物）を示す。

【図４２】図４２は、雄のマウスに関する最終　　殺時の平均体重を示す。群７（非腫瘍対照）、９（対照ビヒクル）、および１１（試験物）を示す。

【図４３】図４３は、雌のマウスに関する最終　　殺時の平均体重を示す。群８（非腫瘍対照）、１０（対照ビヒクル）、および１２（試験物）を示す。

【図４４－１】図４４は、ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスとビヒクルで処置したマウスの腫瘍におけるヒトＴ細胞の同定を示す。ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスとビヒクルで処置したマウスに由来する胸膜内腫瘍組織細胞を、ＤＡＰＩ抗体、抗ヒトＣＤ４５　ＡＰＣ／ＣＹ７抗体、および抗ヒトＣＤ３　ＰＥ／ＣＹ７抗体で染色して、フローサイトメトリーによって生存ヒトＴ細胞を検出した。ＤＡＰＩ陰性（生きた）単一細胞のヒトＣＤ３発現（Ｘ軸）およびヒトＣＤ４５発現（Ｙ軸）の密度プロットを示す。ゲートは、ヒトＴ細胞を表すヒトＣＤ４５およびヒトＣＤ３に対して陽性染色された細胞を示す。

【図４４－２】同上。

【図４４－３】同上。

【図４４－４】同上。

【図４５－１】図４５は、ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスとビヒクルで処置したマウスの脾臓におけるヒトＴ細胞の同定を示す。ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスとビヒクルで処置したマウスに由来する脾臓組織細胞を、ＤＡＰＩ抗体、抗ヒトＣＤ４５　ＡＰＣ／ＣＹ７抗体、および抗ヒトＣＤ３　ＰＥ／ＣＹ７抗体で染色して、フローサイトメトリーによって生存ヒトＴ細胞を検出した。ＤＡＰＩ陰性（生きた）単一細胞のヒトＣＤ３発現（Ｘ軸）およびヒトＣＤ４５発現（Ｙ軸）の密度プロットを示す。ゲートは、ヒトＴ細胞を表すヒトＣＤ４５およびヒトＣＤ３に対して陽性染色された細胞を示す。

【図４５－２】同上。

【図４５－３】同上。

【図４５－４】同上。

【図４６】図４６は、雄のマウスのＢＬＩを示す。

【図４７】図４７は、雌のマウスのＢＬＩを示す。
【発明を実施するための形態】
【００３８】
５．発明の詳細な説明
本開示の主題は、メソテリンおよびプログラム細胞死１のドミナントネガティブ型（ＰＤ－１　ＤＮ）を標的化するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むポリペプチド組成物、ならびにポリペプチド組成物を含む免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞またはＮＫ細胞）を提供する。本開示の主題はまた、標的抗原に対する免疫応答細胞の免疫応答を誘導および／もしくは増強するために、ならびに／または免疫細胞の消耗の減少が望ましい場合に新生物もしくは他の疾患／障害を処置および／もしくは予防するためにそのようなポリペプチド組成物を使用する方法も提供する。
【００３９】
例えばがんにおいてＴ細胞が持続的に抗原に曝露されると、ＣＡＲ　Ｔ細胞を機能障害にする、疲弊と称されるＴ細胞分化状態の変更が起こる（Youngblood et al., Int Immunol. 2010;22(10):797-803; Wherry et al., Nat Rev Immunol. 2015;15(8):486-499）。以前の研究から、ＣＡＲ活性化能が、ＣＤ３ζ細胞質ドメインに存在する３つのＩＴＡＭ（１－２－３）に関連することが示されている（Acuto et al., Nat Rev Immunol. 2003;3(12):939-951; Love et al., Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(6):a002485）。最近の研究から、このＣＡＲ活性化能を、ＩＴＡＭを突然変異させることによって調整することができ、それによってその機能性を低減することが実証された。重要なことに、ＣＤ３ζドメインの第２および第３位のＩＴＡＭ（１－Ｘ－Ｘ；本明細書において「１ＸＸ」と指定される）に点突然変異を導入することによって、ＣＡＲ　Ｔ細胞の運命が、高い抗原曝露の存在下で、疲弊状態からバランスのとれたエフェクターおよびメモリー状態へと変化することが示された（Feucht et al., Nat Med. 2019;25(1):82-88）。
【００４０】
ＣＡＲ　Ｔ細胞が固形腫瘍の微小環境で遭遇する別の障害は、抗原媒介性のＴ細胞活性化時に発現される阻害性受容体であるＰＤ１を通して媒介されるその細胞溶解活性の阻害である。加えて、腫瘍細胞は、Ｔ細胞によって分泌されるアポトーシス促進性サイトカインに曝露された後、ＰＤ－Ｌ１などの共阻害性リガンドの発現を増強する（McGray et al., Mol Ther. 2014;22(1):206-218; Spranger et al., Sci Transl Med. 2013;5(200):200ra116; Moon et al., Clin Cancer Res. 2014;20(16):4262-4273）。この障害を克服するために、本発明者らのグループは、メソテリン標的化ＣＡＲＴ細胞をＰＤ１遮断抗体と組み合わせて、疲弊したＣＡＲ　Ｔ細胞を救出し、本発明者らの正所性マウスモデルにおいてＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍有効性を回復した（Cherkassky et al., Ｊ Clin Invest. 2016;126(8):3130-3144; Grosser et al., Cancer Cell. 2019;36(5):471-482）。ＰＤ１チェックポイント遮断剤の繰り返し投与および関連する臨床での副作用を回避するために、本発明者らのグループは、ＰＤ１ＤＮＲが第２世代ＣＡＲと共にＴ細胞に同時形質導入される細胞固有のＰＤ１チェックポイント阻害戦略を使用することが、最終的に形質導入細胞を固形腫瘍の微小環境における腫瘍のＰＤ－Ｌ１媒介阻害に対して抵抗性にすることを実証している（Cherkassky et al., Ｊ Clin Invest. 2016;126(8):3130-3144; Grosser et al., Cancer Cell. 2019;36(5):471-482）。
【００４１】
したがって、増強された治療プロファイル、機能的持続性、および腫瘍媒介阻害に対する抵抗性を有するＣＡＲ　Ｔ細胞を開発するために、本発明者らは、１ＸＸおよびＰＤ１ＤＮＲ構成成分を第２世代ＣＡＲベクター設計に組み込み、それによってこれらの細胞は固形腫瘍の高度に免疫抑制性の微小環境において効率的に実行することが可能となる。
【００４２】
制限ではなく、本開示を明快にする目的で、詳細な説明を以下の小節に分割する：

５．１．定義；
５．２．ポリペプチド組成物；
　５．２．１．ＰＤ－１　ＤＮ；
　５．２．２．メソテリン標的化ＣＡＲ；および
　５．２．３．例示されたポリペプチド組成物；
５．３．免疫応答細胞；
５．４．核酸組成物およびベクター；
５．５．ポリペプチドおよびアナログ；
５．６．医薬組成物および投与；
５．７．製剤；
５．８．処置方法；ならびに
５．９．キット
【００４３】
５．１．定義
　それ以外であると定義していない限り、本明細書で使用する全ての科学技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。
【００４４】
　本明細書で使用される場合、用語「約」または「およそ」は、当業者によって決定される特定の値の許容可能な誤差範囲内を意味し、これらは、部分的には値を測定または決定する方法、すなわち測定系の限界に依存する。例えば、「約」は、当技術分野での実践に関して３標準偏差内または３より大きい標準偏差内を意味し得る。あるいは、「約」は、所定の値の最大２０％、例えば最大１０％、最大５％、または最大１％の範囲を意味し得る。あるいは、特に生物系またはプロセスに関して、用語は、値の一桁以内、例えば５倍以内または２倍以内を意味し得る。
【００４５】
　「免疫応答細胞」とは、免疫応答において機能する細胞、またはその前駆細胞もしくは子孫を意味する。
【００４６】
　「免疫応答細胞を活性化する」とは、免疫応答の開始をもたらす、細胞におけるシグナル伝達の誘導またはタンパク質発現の変化を意味する。例えば、ＣＤ３鎖が、リガンドの結合および免疫受容体チロシンに基づく阻害モチーフ（ＩＴＡＭ）に応答してクラスターを形成すると、シグナル伝達カスケードが産生される。ある特定の実施形態では、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）が抗原に結合すると、結合した受容体近傍の多くの分子のクラスター形成（例えば、ＣＤ４またはＣＤ８、ＣＤ３γ／δ／ε／ζ等）を含む免疫シナプスの形成が起こる。膜結合シグナル伝達分子のこのクラスター形成により、ＣＤ３鎖内に含有されるＩＴＡＭモチーフがリン酸化されるようになる。このリン酸化は次に、Ｔ細胞活性化経路を開始し、最終的にＮＦ－κＢおよびＡＰ－１などの転写因子を活性化する。これらの転写因子は、増殖のためのＩＬ－２産生を増加させるためにＴ細胞の全体的な遺伝子発現、およびＴ細胞媒介免疫応答を開始するためのマスター制御性Ｔ細胞タンパク質の発現を誘導する。
【００４７】
　「免疫応答細胞を刺激する」とは、強固で持続的な免疫応答をもたらすシグナルを意味する。様々な実施形態では、これは、免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）の活性化後に起こるか、またはＣＤ２８、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＯＸ４０、ＣＤ４０、およびＩＣＯＳを含むがこれらに限定されない受容体を通して同時に媒介する。複数の共刺激シグナルを受けることは、強固で長期間のＴ細胞媒介免疫応答を開始するために重要であり得る。Ｔ細胞は迅速に阻害され、抗原に不応答性となり得る。これらの共刺激シグナルの効果は多様であり得るが、それらは一般的に、完全かつ持続的な根絶のために抗原に強固に応答する長命で、増殖性の抗アポトーシスＴ細胞を生成するために遺伝子発現の増加をもたらす。

【００４８】
本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、インタクトな抗体分子のみならず、免疫原結合能を保持する抗体分子の断片も意味する。そのような断片はまた、当技術分野で周知であり、通常、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏの両方で使用される。したがって、本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、インタクトな免疫グロブリン分子のみならず、周知の活性な断片Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦａｂも意味する。インタクトな抗体のＦｅ断片を欠如するＦ（ａｂ’）$_2$およびＦａｂ断片は、循環中からより迅速に排泄され、インタクトな抗体のより少ない非特異的組織結合を有し得る（Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)）。本明細書で使用される場合、抗体は、天然の抗体全体、二特異性抗体、キメラ抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、一本鎖Ｖ領域断片（ｓｃＦｖ）、融合ポリペプチド、および非定型抗体を含む。ある特定の実施形態では、抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも２つの重（Ｈ）鎖および２つの軽（Ｌ）鎖を含む糖タンパク質である。各々の重鎖は重鎖可変領域（本明細書においてＶ$_H$と略す）および重鎖定常（Ｃ$_H$）領域で構成される。重鎖定常領域は、３つのドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３で構成される。各々の軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてＶ$_L$と略す）および軽鎖定常Ｃ$_L$領域で構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメインＣ$_L$で構成される。Ｖ$_H$およびＶ$_L$領域は、より保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と称される領域が介在する相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される高度可変領域にさらに細分され得る。各々のＶ$_H$およびＶ$_L$は、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で整列した３つのＣＤＲおよび４つのＦＲで構成される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の補体第１成分（Ｃ１ｑ）を含む宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

【００４９】
本明細書で使用される場合、「ＣＤＲ」は、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領域である抗体の相補性決定領域アミノ酸配列として定義される。例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)を参照されたい。一般的に、抗体は、可変領域において３つの重鎖および３つの軽鎖ＣＤＲまたはＣＤＲ残基を含む。ＣＤＲは、抗原またはエピトープに抗体が結合するための接触残基の大部分を提供する。ある特定の実施形態では、ＣＤＲ領域は、Ｋａｂａｔのシステム（Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242）を使用して表される。ある特定の実施形態では、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔのシステムに従って同定される。

【００５０】
本明細書で使用される場合、用語「一本鎖可変断片」または「ｓｃＦｖ」は、免疫グロブリンの重鎖（Ｖ$_H$）および軽鎖（Ｖ$_L$）の可変領域が共有結合により連結してＶ$_H$：：Ｖ$_L$ヘテロ二量体を形成する融合タンパク質である。Ｖ$_H$およびＶ$_L$は、直接結合されるか、またはＶ$_H$のＮ末端をＶ$_L$のＣ末端に接続する、もしくはＶ$_H$のＣ末端をＶ$_L$のＮ末端に接続するペプチドコードリンカー（例えば、１０、１５、２０、２５アミノ酸）によって結合される。リンカーは通常、柔軟性のためにグリシンに富むとともに、溶解度のためにセリンまたはスレオニンに富む。「リンカー」は、本明細書で使用される場合、２つまたはそれより多くのポリペプチドまたは核酸を共有結合させ、それによって互いを接続する官能基（例えば、化学基またはポリペプチド）を意味する。本明細書で使用される場合、「ペプチドリンカー」は、２つのタンパク質を共に連結させるために（例えば、Ｖ$_H$およびＶ$_L$ドメインを連結させるために）使用される１つまたは複数のアミノ酸を指す。ある特定の実施形態では、リンカーは、以下に提供する配列番号６６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる：

【化１】
GGGGSGGGGSGGGGS [　配列番号　66]

。
【００５１】
配列番号６６のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号５０に記載する：
【化２】
GGAGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCA [　配列番号　50]

。
【００５２】
配列番号６６のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号５１に記載する：
【化３】
GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCA [　配列番号　51]

【００５３】
定常領域が除去され、リンカーが導入されているにもかかわらず、ｓｃＦｖタンパク質は、元の免疫グロブリンの特異性を保持している。一本鎖Ｆｖポリペプチド抗体は、Huston, et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)に記載されるＶ$_H$およびＶ$_L$コード配列を含む核酸から発現させることができる。また、米国特許第５，０９１，５１３号、第５，１３２，４０５号、および第４，９５６，７７８号；ならびに米国特許出願公開第２００５０１９６７５４号および第２００５０１９６７５４号も参照されたい。阻害活性を有するアンタゴニスト性のｓｃＦｖが記載されている（例えば、Zhao et al., Hyrbidoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Imunol2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife eta., J Clin Invst 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10:31-40)を参照されたい）。刺激活性を有するアゴニスト性のｓｃＦｖが記載されている（例えば、Peter et al., J Bioi Chern 2003 25278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol1997 17(5-6):427-55; Ho et al., BioChim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66を参照されたい）。
【００５４】
本明細書で使用される場合、「Ｆ（ａｂ）」は、抗原に結合するが、一価であり、Ｆｃ部分を有しない抗体構造の断片を指し、例えば酵素パパインによって消化した抗体は、２つのＦ（ａｂ）断片およびＦｃ断片（例えば、重（Ｈ）鎖定常領域；抗原に結合しないＦｃ領域）を生じる。
【００５５】
本明細書で使用される場合、「Ｆ（ａｂ’）$_2$」は、ＩｇＧ抗体全体のペプシン消化によって生成された抗体断片を指し、この断片は２つの抗原結合（ａｂ’）（二価）領域を有し、各々の（ａｂ’）領域は、２つの個別のアミノ酸鎖、Ｈ鎖の一部および抗原に結合するためのＳ－Ｓ結合によって連結された軽（Ｌ）鎖を含み、残りのＨ鎖部分は共に連結されている。「Ｆ（ａｂ’）２」断片は、２つの個別のＦａｂ’断片に分割することができる。
【００５６】
本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、適切な制御エレメントに会合した場合に複製することが可能で、遺伝子配列を細胞に移入することができるプラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオン等などの任意の遺伝子エ

レメントを指す。このように、用語は、クローニングおよび発現ビヒクルならびにウイルスベクターおよびプラスミドベクターを含む。

【００５７】

本明細書で使用される場合、用語「発現ベクター」は、組換え核酸配列、すなわち所望のコード配列、および特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現にとって必要な適切な核酸配列を含有する組換えＤＮＡ分子を指す。原核細胞における発現にとって必要な核酸配列は通常、しばしば他の配列と共にプロモーター、オペレーター（必要に応じて）、およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、ならびに終止およびポリアデニル化シグナルを利用することが公知である。

【００５８】

本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、結合力の測定を意味する。親和性は、抗体結合部位と抗原決定基との間での立体化学的適合の密接さ、両者の間の接触領域のサイズ、および／または電荷を有する基および疎水性基の分布に依存し得る。抗体の抗原に対する親和性を計算する方法は、当技術分野で公知であり、様々な抗原結合実験、例えば機能的アッセイ（例えば、フローサイトメトリーアッセイ）を含むがこれらに限定されない。

【００５９】

用語「キメラ抗原受容体」または「ＣＡＲ」は、本明細書で使用される場合、免疫応答細胞を活性化または刺激することが可能な細胞内シグナル伝達ドメイン、および膜貫通ドメインに融合された細胞外抗原結合ドメインを含む分子を指す。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、ｓｃＦｖを含む。ｓｃＦｖは、抗体の可変重鎖および軽鎖領域を融合させることに由来し得る。あるいはまたは加えて、ｓｃＦｖは、Ｆａｂ’（例えばＦａｂライブラリから得た抗体ではなくて）に由来し得る。ある特定の実施形態では、ｓｃＦｖは、膜貫通ドメインに融合され、次に細胞内シグナル伝達ドメインに融合される。ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、抗原に対して高い結合親和性を有するように選択される。

【００６０】

本明細書で使用される場合、用語「核酸分子」は、目的のポリペプチドをコードする任意の核酸分子またはその断片を含む。そのような核酸分子は、内因性の核酸配列と必ずしも１００％相同または同一である必要はないが、実質的な同一性を示し得る。

【００６１】

「実質的に同一」または「実質的に相同」とは、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか１つ）または参照核酸配列（例えば、本明細書に記載の核酸配列のいずれか１つ）と少なくとも約５０％相同または同一を示すアミノ酸配列または核酸分子を意味する。ある特定の実施形態では、そのような配列は、比較のために使用される参照アミノ酸配列または参照核酸配列の配列と少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、または少なくとも約１００％相同または同一である。

【００６２】

配列同一性は、配列分析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705、ＢＬＡＳＴ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＧＡＰ、またはＰＩＬＥＵＰ／ＰＲＥＴＴＹＢＯＸプログラム）を使用して測定することができる。そのようなソフトウェアは、様々な置換、欠失、および／または他の改変に対する相同性の程度を割付することによって同一または類似の配列をマッチさせる。保存的置換は典型的に、以下の群内での置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定するための例示的なアプローチでは、ＢＬＡＳＴプログラムを、

近縁の配列を示すｅ－３からｅ－１００の間の確率スコアで使用してもよい。
【００６３】
本明細書で使用される場合、２つのアミノ酸配列間のパーセント相同性は、２つの配列間のパーセント同一性と等価である。２つの配列間のパーセント同一性は、２つの配列の最適なアライメントのために導入する必要があるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、％相同性＝同一の位置の数／位置の総数×１００）。配列の比較および２つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。
【００６４】
２つのアミノ酸配列間のパーセント相同性は、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれているＥ．Ｍｅｙｅｒｓ ａｎｄ Ｗ． Ｍｉｌｌｅｒ（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)）のアルゴリズムを使用して、ＰＡＭ１２０加重残基表、ギャップ伸長ペナルティ１２、およびギャップペナルティ４を使用して決定することができる。加えて、２つのアミノ酸配列間のパーセント相同性は、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで入手可能）におけるＧＡＰプログラムに組み込まれているＮｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ（J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)）のアルゴリズムを使用して、Ｂｌｏｓｓｕｍ ６２行列またはＰＡＭ２５０行列のいずれか、およびギャップ加重１６、１４、１２、１０、８、６、または４、および長さ加重１、２、３、４、５、または６を使用して決定することができる。
【００６５】
加えてまたはあるいは、本開示の主題のアミノ酸配列を「クエリ配列」としてさらに使用して、公共のデータベースに対する検索を実施し、例えば関連する配列を同定することができる。そのような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のＸＢＬＡＳＴプログラム（バージョン２．０）を使用して実施することができる。ＢＬＡＳＴタンパク質検索を、ＸＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝５０、ワード長＝３によって実施し、本明細書に開示される指定された配列（例えば、ｓｃＦｖ ｍ９０３、ｍ９０４、ｍ９０５、ｍ９０６、およびｍ９００の重鎖および軽鎖可変領域配列）と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためのギャップを伴うアライメントを得るために、Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴを、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載されるように利用することができる。ＢＬＡＳＴおよびＧａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴプログラムを使用する場合、それぞれのプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメーターを使用することができる。用語「構成的発現」または「構成的に発現された」は、本明細書で使用される場合、全ての生理的条件下での発現または発現されることを指す。
【００６６】
「疾患」とは、細胞、組織、または臓器の正常な機能に損傷を与える、または機能を妨害する任意の状態、疾患、または障害、例えば新生物、および細胞の病原体感染を意味する。
【００６７】
「有効量」は、治療効果を有するために十分な量を意味する。ある特定の実施形態では、「有効量」は、新生物の持続的な増殖、成長、または転移（例えば、浸潤または遊走）を停止させる、改善する、または阻害するために十分な量である。
【００６８】
「モジュレートする」とは、正または負に変更することを意味する。例示的なモジュレーションは、約１％、約２％、約５％、約１０％、約２５％、約５０％、約７５％、または約１００％の変化を含む。
【００６９】
「増加する」とは、少なくとも約５％、正に変更することを意味する。変更は、約５％、約１０％、約２５％、約３０％、約５０％、約７５％、約１００％、またはそれより多くであり得る。

【００７０】
「低減する」とは、少なくとも約５％、負に変更することを意味する。変更は、約５％、約１０％、約２５％、約３０％、約５０％、約７５％、または約１００％もの変更であり得る。
【００７１】
「単離された細胞」とは、細胞に天然に付随する分子および／または細胞構成成分から分離された細胞を意味する。
【００７２】
用語「単離された」、「精製された」、または「生物学的に純粋な」とは、それがその天然の状態で見出される場合に通常伴う構成成分を様々な程度に含まない材料を指す。「単離する」とは、元の起源または周囲からの分離の程度を指す。「精製する」とは、単離より高い分離の程度を指す。「精製された」または「生物学的に純粋な」タンパク質は、いかなる不純物もタンパク質の生物学的特性に実質的に影響を及ぼさないように、または他の有害な帰結を引き起こさないように、他の材料を実質的に含まない。すなわち、核酸またはペプチドは、それが細胞材料、ウイルス材料、または組換えＤＮＡ技術によって産生される場合には培養培地、または化学合成される場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない場合、精製されている。純度および均一性は典型的に、分析化学技術、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを使用して決定される。用語「精製された」は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲルにおいて本質的に１つのバンドを生じることを示し得る。改変、例えばリン酸化またはグリコシル化に供することができるタンパク質の場合、改変が異なれば異なる単離タンパク質を生じ得て、これを個別に精製することができる。
【００７３】
「新生物」とは、細胞または組織の病的な増殖、およびその後の他の組織または臓器への遊走または浸潤によって特徴付けられる疾患を意味する。新生物の成長は典型的に制御されず、進行性であり、正常な細胞の複製を誘発しないまたは複製の停止を引き起こす条件下で起こる。新生物は、膀胱、骨、脳、乳房、軟骨、グリア、食道、卵管、胆嚢、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、神経組織、卵巣、膵臓、前立腺、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿性器管、尿管、尿道、子宮、および膣からなる群から選択される臓器、またはその組織もしくは細胞タイプを含むがこれらに限定されない多様な細胞タイプ、組織、または臓器に影響を及ぼし得る。新生物は、がん、例えば肉腫、癌腫、または形質細胞腫（形質細胞の悪性腫瘍）を含む。ある特定の実施形態では、新生物は固形腫瘍である。新生物は、原発腫瘍または原発がんであり得る。加えて、新生物は転移状態であり得る。
【００７４】
本明細書で使用される場合、用語「保存的配列改変」は、アミノ酸配列を含む本開示のメソテリン標的化ＣＡＲ（例えば、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン）の結合特徴に有意に影響を及ぼさず、結合特徴を有意に変更しないアミノ酸改変を指す。保存的改変は、アミノ酸の置換、付加、および欠失を含み得る。改変は、当技術分野で公知の標準的な技術、例えば部位特異的突然変異誘発およびＰＣＲ媒介突然変異誘発によって本開示のＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインに導入することができる。アミノ酸は、電荷および極性などのその物理化学的特性に従って群に分類することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同じ群内のアミノ酸に交換される置換である。例えば、アミノ酸を電荷によって分類することができる：正電荷を持つアミノ酸は、リシン、アルギニン、ヒスチジンを含み、負の電荷を持つアミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸を含み、電荷中性のアミノ酸は、アラニン、アスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンを含む。加えて、アミノ酸は極性によって分類することができる：極性アミノ酸は、アルギニン（塩基性極性）、アスパラギン、アスパラギン酸（酸性極性）、グルタミン酸（酸性極性）、グルタミン、ヒスチジン（塩基性極性）、リシ

ン（塩基性極性）、セリン、スレオニン、およびチロシンを含み；非極性アミノ酸は、アラニン、システイン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、およびバリンを含む。このように、ＣＤＲ領域内の１つまたは複数のアミノ酸残基を、同じ群の他のアミノ酸残基に交換することができ、変更された抗体を、本明細書に記載の機能的アッセイを使用して機能の保持（すなわち、上記の（ｃ）から（ｌ）に記載の機能）に関して試験することができる。ある特定の実施形態では、指定された配列またはＣＤＲ領域内の１つ以下、２つ以下、３つ以下、４つ以下、５つ以下の残基が変更される。

【００７５】

「シグナル配列」または「リーダー配列」とは、新たに合成されたタンパク質のＮ末端に存在し、分泌経路へのその流入を方向づけるペプチド配列（例えば、５、１０、１５、２０、２５、または３０アミノ酸）を意味する。例示的なリーダー配列としては、ヒトＩＬ－２シグナル配列（例えば、ＭＹＲＭＱＬＬＳＣＩＡＬＳＬＡＬＶＴＮＳ［配列番号６７］）、マウスＩＬ－２シグナル配列（例えば、ＭＹＳＭＱＬＡＳＣＶＴＬＴＬＶＬＬＶＮＳ［配列番号６８］）；ヒトカッパリーダー配列（例えば、ＭＥＴＰＡＱＬＬＦＬＬＬＬＷＬＰＤＴＴＧ［配列番号６９］）、マウスカッパリーダー配列（例えば、ＭＥＴＤＴＬＬＬＷＶＬＬＬＷＶＰＧＳＴＧ［配列番号７０］）；ヒトＣＤ８リーダー配列（例えば、ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲＰ［配列番号７１］）；切断されたヒトＣＤ８シグナルペプチド（例えば、ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＬＨＡ［配列番号７２］）；ヒトアルブミンシグナル配列（例えば、ＭＫＷＶＴＦＩＳＬＬＦＳＳＡＹＳ［配列番号７３］）；およびヒトプロラクチンシグナル配列（例えば、ＭＤＳＫＧＳＳＱＫＧＳＲＬＬＬＬＬＶＶＳＮＬＬＬＣＱＧＶＶＳ［配列番号７４］）が挙げられるがこれらに限定されない。

【００７６】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、Ｎ末端でＣＤ８シグナルペプチドを含み、例えばシグナルペプチドは、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインに接続される。ある特定の実施形態では、ＣＤ８シグナルペプチドは、配列番号７１に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【００７７】

配列番号７１のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチドを配列番号１２５に記載する。配列番号１２５を以下に提供する。

【化４】

ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCT
[配列番号 125]

【００７８】

用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」は、米国特許法における意味に起因する広い意味を有すると意図され、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」等を意味し得る。

【００７９】

本明細書で使用される場合、「処置」は、処置される個体または細胞の疾患の経過を変更する試みでの臨床での介入を指し、予防的にまたは臨床病理の過程の間のいずれかで実施することができる。処置の治療効果は、疾患の発生または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接または間接的な病理学的帰結の減少、転移の予防、疾患進行速度の減少、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後の改善が挙げられるがこれらに限定されない。疾患または障害の進行を予防することによって、処置は、罹患しているもしくは診断された対象、または障害を有することが疑われる対象における障害による悪化を予防することができるが、処置はまた、障害のリスクがある対象または障害を有することが疑われる対象における障害の発生または障害の症状を予防し得る。

【００８０】

「個体」または「対象」は、本明細書において脊椎動物、例えばヒトまたは非ヒト動物、例えば哺乳動物である。哺乳動物としては、ヒト、霊長類、農場動物、競技用動物、齧歯類、およびペットが挙げられるがこれらに限定されない。非ヒト動物対象の非制限的な例としては、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットなどの齧歯類；ウサギ；イヌ；ネコ；ヒツジ；ブタ；ヤギ；ウシ；ウマ；ならびに類人猿およびサルなどの非ヒト霊長類が挙げられる。用語「免疫無防備」とは、本明細書で使用される場合、免疫不全を有する対象を指す。対象は日和見感染症に非常に罹りやすく、これは、健康な免疫系を有する人では通常、疾患を引き起こさないが、免疫系の機能が不良であるかまたは抑制されている人に罹患し得る生物によって引き起こされる感染症である。

【００８１】

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

【００８２】

５．２．ポリペプチド組成物

本開示の主題は、メソテリン標的化キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）およびプログラム細胞死１のドミナントネガティブ型（ＰＤ－１　ＤＮ）を含むポリペプチド組成物を提供する。

【００８３】

５．２．１．プログラム細胞死１のドミナントネガティブ型（ＰＤ－１　ＤＮ）

プログラム細胞死１のドミナントネガティブ型（「ＰＤ－１　ＤＮ」と称される）は、ＣＡＲを含む免疫応答細胞の治療有効性を増強し得る。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、（ａ）リガンド結合領域を含むプログラム細胞死１（ＰＤ－１）の細胞外ドメインの少なくとも一部、および（ｂ）膜貫通ドメインを含む。

【００８４】

ある特定の実施形態では、免疫応答細胞、例えばＴ細胞またはその前駆細胞は、ＰＤ－１のドミナントネガティブ型（ＤＮ型）を発現するように操作される。

【００８５】

悪性細胞は、免疫の認識および排除から細胞を保護する免疫抑制性の微小環境を生成するように適合する（Sharpe et al., Dis. Model Mech. 2015;8:337-350）。免疫抑制性の微小環境は、免疫療法の方法に対する制限となる。本開示の主題は、免疫応答細胞またはその前駆細胞において細胞性免疫応答の阻害剤のＤＮ型を発現させることによってこの制限に対処する。細胞性免疫応答の阻害剤のＤＮ型の詳細は、その各々の内容の全体が参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１７／０４０９４５号およびＷＯ２０１７／１００４２８号に開示されている。

【００８６】

プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）は、内因性のマクロファージおよび樹状細胞上に発現されるその対応するリガンドであるＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２との係合による活性化Ｔ細胞の負の免疫調節剤である。ＰＤ－１は、２６８アミノ酸のＩ型膜タンパク質である。ＰＤ－１は、Ｂ７ファミリーメンバーである２つのリガンド、ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２を有する。タンパク質の構造は、細胞外ＩｇＶドメインの後に膜貫通領域および細胞内テールを含む。細胞内テールは、免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフおよび免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフに位置する２つのリン酸化部位を含有する。ＰＤ－１は、ＴＣＲシグナルを負に調節する。ＳＨＰ－１およびＳＨＰ－２ホスファターゼは、リガンド結合時にＰＤ－１の細胞質テールに結合する。ＰＤ－Ｌ１の上方調節は、腫瘍細胞が宿主免疫系を回避するために使用する１つの機構である。前臨床および臨床試験では、アンタゴニスト抗体によるＰＤ－１の遮断は、宿主の内因性の免疫系を通して媒介される抗腫瘍応答を誘導した。

【００８７】

ある特定の実施形態では、ＰＤ－１ポリペプチドは、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００５００９．２（配列番号４８）を有するアミノ酸またはその断片からなる。ある特定の実施形態では、配列番号４８のアミノ酸１～２０は、ＰＤ－１のシグナルペプチド（またはペプチドシグナル）である。ある特定の実施形態では、配列番号４８のアミノ酸２１～１７

０は、ＰＤ－１の細胞外ドメインである。ある特定の実施形態では、配列番号４８のアミノ酸１７１～１９１は、ＰＤ－１の膜貫通ドメインである。ある特定の実施形態では、配列番号４８のアミノ酸１９２～２８８は、ＰＤ－１の細胞内ドメインである。配列番号４８を以下に提供する：

【化５】

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS
ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS
LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP
CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL [配列番号 48]

【００８８】

ある特定の実施形態では、ＰＤ－１の細胞外ドメインは、リガンド結合ドメイン（「細胞外リガンド結合ドメイン」と称される）を含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１の細胞外リガンド結合ドメインは、１つまたは複数の異種ポリペプチド配列に融合され、すなわちＰＤ－１　ＤＮはキメラ配列である。例えば、ＰＤ－１の細胞外リガンド結合ドメインを、必要に応じて本明細書に記載の様々なシグナルペプチドを含む異種シグナルペプチドであるシグナルペプチドにそのＮ末端で融合することができる。加えて、ＰＤ－１　ＤＮは、必要に応じて本明細書に記載の様々な膜貫通ドメインのいずれかを含む異種膜貫通ドメインである膜貫通ドメインを含み得る。

【００８９】

ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＰＤ－１ポリペプチドの細胞外ドメイン（例えば、配列番号４８のアミノ酸２１～１７０）またはそのリガンド結合部分（例えば、配列番号４８のアミノ酸２１～１６５）を含む。そのようなＰＤ－１　ＤＮを発現する細胞は、ＰＤ－１免疫チェックポイント経路においてシグナルを伝達する能力を欠如し得るかまたは低減された能力を有し得る。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、細胞内ドメインまたはその一部の欠失からなる欠失突然変異体（例えば、ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号４８のアミノ酸１９２～２８８を欠如する）である。細胞内ドメインの欠失からなるＰＤ－１は、ＰＤ－１によって媒介される免疫チェックポイント経路を低減し得るか、または阻害し得る。

【００９０】

ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＰＤ－１の細胞外リガンド結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＰＤ－１ポリペプチドの細胞外リガンド結合ドメイン、およびＰＤ－１ポリペプチドの膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号５８に記載のアミノ酸配列（または配列番号４８のアミノ酸２１～１６５）を含むかまたはそれからなる。配列番号５８を以下に提供する。

【化６】

PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA
AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA
ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQ [配列番号 58]

【００９１】

配列番号５８（または配列番号４８のアミノ酸２１～１６５）をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号５９に記載する。

【化７】

CCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTG
ACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTAC
CGCATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGAC
TGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAAT
GACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCA
GAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGC
CAG [配列番号 59]

【００９２】
ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、シグナルペプチドをさらに含み、例えば、ＰＤ－１　ＤＮは、ＰＤ－１ポリペプチドの細胞外リガンド結合ドメイン、ＰＤ－１ポリペプチドの膜貫通ドメイン、およびＰＤ－１ポリペプチドのシグナルペプチドを含む。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号４８のアミノ酸１～２０を含むかまたはそれからなる。配列番号４８のアミノ酸１～２０をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号６０に記載する。
【化８】
ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGG [配列番号 60]

【００９３】
ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号４８のアミノ酸１～１６５を含むかまたはそれからなる。
【００９４】
配列番号４８のアミノ酸１～１６５をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号６１に記載する。
【化９】
ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTC
TTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGAC
AACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCC
AGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT
GTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACC
TACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTG
ACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAG
[配列番号 61]

【００９５】
ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号４８のアミノ酸２１～１５１を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号４８のアミノ酸１～１５１を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１ＤＮは、配列番号４８のアミノ酸２１～１５１を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号４８のアミノ酸２１から始まり、配列番号４８のアミノ酸１５１～１６５の間のアミノ酸までのアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。
【００９６】
ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＣＤ８ポリペプチドをさらに含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＣＤ８の膜貫通ドメインおよび／またはヒンジドメインに融合されたＰＤ－１の細胞外ドメインまたはその一部（例えば、細胞外リガンド結合ドメイン）を含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＣＤ８の膜貫通ドメイン（例えば、配列番号８６のアミノ酸１８３～２０３）を含む。そのような実施形態は、異なる（異種）ポリペプチドからの膜貫通ドメインを含むキメラＤＮ型を表す。上記のように、膜貫通ドメインなどの異種ドメインを含むＰＤ－１　ＤＮは、必要に応じて、異種ポリペプチドからの追加の配列を含み得る。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１ＤＮは、膜貫通ドメインのＮ末端で異種ポリペプチドからの追加の配列を含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＣＤ８のヒンジドメインを含む。ある特定の実施形態では、異種配列は、ＣＤ８ポリペプチドの追加のＮ末端配列（例えば、配列番号８６のアミノ酸１３７～１８２（または必要に応じてアミノ酸１３８または１３９から始まる））を含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＣＤ８の膜貫通ドメインのＣ末端で異種ポリペプチドからの追加の配列を含む。ある特定の実施形態では、追加のＣ末端配列は、配列番号８６のアミノ酸２０４～２０９である。
【００９７】
ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＣＤ８ポリペプチドの膜貫通ドメイン（

例えば、配列番号８６のアミノ酸１８３～２０３）、ＣＤ８ポリペプチドのヒンジドメイン（例えば、配列番号８６のアミノ酸１３７～１８２）、およびＣＤ８ポリペプチドの追加のＣ末端配列（例えば、配列番号８６のアミノ酸２０４～２０７）を含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７からなるＣＤ８ポリペプチドを含む。

【００９８】

配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号６２に記載する：

【化１０】

CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAC
[　配列番号　　62]

【００９９】

ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、ＣＤ８ポリペプチドの膜貫通ドメイン（例えば、配列番号８６のアミノ酸１８３～２０３）、ＣＤ８ポリペプチドのヒンジドメイン（例えば、配列番号８６のアミノ酸１３７～１８２）、およびＣＤ８ポリペプチドの追加のＣ末端配列（例えば、配列番号８６のアミノ酸２０４～２０９）を含む。ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号８６のアミノ酸１３７～２０９からなるＣＤ８ポリペプチドを含む。

【０１００】

配列番号８６のアミノ酸１３７～２０９をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号６３に記載する：

【化１１】

CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAACCAC
AGG [　配列番号　　63]

【０１０１】

ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、以下に提供する配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含む。

【化１２】

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNA
TFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQL
PNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE
VPTAHPSPSPRPAGQAAA*PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA*
*GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT*CGVLLLSLVITLYCN　[　配列番号　　49]

【０１０２】

配列番号４９に記載のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号６４に記載する：

【化１３－１】

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTC
TTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGAC
AACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCC
AGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT

【化１３－２】

GTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACC
TACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTG
ACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGGCGGCCGCA
CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAC
[　配列番号　64]

【０１０３】

ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮは、以下に提供する配列番号１１８に記載のアミノ酸配列を含む。

【化１４】

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNA
TFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQL
PNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE
VPTAHPSPSPRPAGQAAA*PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA*
*GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT*CGVLLLSLVITLYCNHR　[　配列番号　118]

【０１０４】

配列番号１１８に記載のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１１９に記載する：

【化１５】

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTC
TTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGAC
AACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCC
AGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT
GTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACC
TACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTG
ACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGGCGGCCGCA
CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAACCAC
AGG [　配列番号　119]

【０１０５】

ある特定の実施形態では、ＰＤ－１　ＤＮの膜貫通ドメインは、膜の少なくとも一部に及ぶ疎水性アルファヘリックスを含む。異なる膜貫通ドメインは、異なる受容体安定性をもたらす。本開示の主題に従って、ＰＤ－１　ＤＮの膜貫通ドメインは、本明細書に開示される任意のポリペプチドの天然のまたは改変された膜貫通ドメイン、例えばキメラ抗原受容体に含まれ得る任意の膜貫通ドメインを含み得る。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ８ポリペプチド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４０ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ８４ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、合成ポリペプチド（免疫応答に関連するタンパク質に基づかない）、またはその組合せである。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ８ポリペプチドである。これらの膜貫通ドメインの詳細を以下の節に記載する。

【０１０６】

５．２．２．メソテリン標的化キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）

本開示のポリペプチド組成物は、メソテリン、例えばヒトメソテリンを特異的に標的とするＣＡＲを含む。

【０１０７】

ＣＡＲは、免疫エフェクター細胞に目的の特異性をグラフトするかまたは付与する操作された受容体である。ＣＡＲを使用して、モノクローナル抗体の特異性をＴ細胞にグラフトすることができ、そのコード配列の移入はレトロウイルスベクターによって容易となる。

【０１０８】

ＣＡＲには３つの世代がある。「第１世代」ＣＡＲは、典型的に細胞質／細胞内シグナル伝達ドメインに融合された膜貫通ドメインに融合された細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）で構成される。「第１世代」ＣＡＲは、ｄｅ　ｎｏｖｏでの抗原認識を提供することができ、ＨＬＡ媒介抗原提示とは無関係に、単一の融合分子中のそのＣＤ３ζ鎖シグナル伝達ドメインを通してＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞の両方の活性化を引き起こす。「第２世代」ＣＡＲは、様々な共刺激分子（例えば、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、ＣＤ２７、ＣＤ４０／Ｍｙ８８、およびＮＫＧＤ２）からの細胞内シグナル伝達ドメインをＣＡＲの細胞質テールに付加し、Ｔ細胞に対する追加のシグナルを提供する。「第２世代」ＣＡＲは、共刺激（例えば、ＣＤ２８または４－１ＢＢ）および活性化（ＣＤ３ζ）の両方を提供するＣＡＲを含む。「第３世代」ＣＡＲは、複数の共刺激（例えば、ＣＤ２８および４－１ＢＢ）および活性化（ＣＤ３ζ）を提供するＣＡＲを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲは第２世代ＣＡＲである。ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含み、細胞内シグナル伝達ドメインは共刺激シグナル伝達ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲはヒンジ（hinger）／スペーサー領域をさらに含む。

【０１０９】

５．２．２．１．ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン

ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインはメソテリン、例えばヒトメソテリンに特異的に結合する。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインはｓｃＦｖである。ある特定の実施形態では、ｓｃＦｖはヒトｓｃＦｖである。ある特定の実施形態では、ｓｃＦｖはヒト化ｓｃＦｖである。ある特定の実施形態では、ｓｃＦｖはマウスｓｃＦｖである。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、必要に応じて架橋されたＦａｂである。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインはＦ（ａｂ）$_{2}$である。ある特定の実施形態では、前述の分子のいずれも異種配列との融合タンパク質に含まれ、細胞外抗原結合ドメインを形成する。ある特定の実施形態では、ｓｃＦｖは、抗原－Ｆｃ融合タンパク質によってｓｃＦｖファージライブラリをスクリーニングすることによって同定される。ｓｃＦｖは、ヒトＶ$_{Ｌ}$および／またはＶ$_{Ｈ}$遺伝子を有するマウスに由来し得る。ｓｃＦｖはまた、ラクダ重鎖（例えば、ラクダ、ラマ等由来のＶＨＨ）、または細胞表面受容体の部分的な天然のリガンドによって置換することができる。

【０１１０】

メソテリンは、固形がんにおいて高度に発現される免疫原性細胞表面抗原である。メソテリンは、細胞増殖、接着、浸潤、細胞シグナル伝達、および転移に関与する。メソテリン発現腫瘍によって分泌される血清可溶性メソテリン関連ペプチドをヒトおよびマウスの両方において測定することができることは、研究から実証されており、それらは治療応答および予後に相関することが示されている。正常な組織では、メソテリンは、胸膜、心膜、および腹膜に限って低レベルで発現される。抗メソテリン組換え免疫毒素ＳＳ１Ｐは、患者においてｉｎ　ｖｉｖｏ特異性および有意な抗腫瘍活性を示す。膵臓がんワクチンの臨床試験では、生存優位性を有する患者は、ワクチン誘導性の遅延型過敏反応に関連するメソテリンに対して一貫したＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞応答を有した。メソテリンに由来する特異的Ｔ細胞エピトープは、ヒトＴ細胞を活性化して、メソテリンを発現するヒト腫瘍を効率的に溶解することが示された。このように、メソテリンを標的化する養子免疫療法は、メソテリン発現腫瘍を標的化することができることを裏付ける強い証拠が存在する。

【０１１１】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲはヒトメソテリンに結合する。ある特定の実施形態では、ヒトメソテリンは、ＮＣＢＩ参照番号：ＡＡＶ８７５３０．１（配列番号７５）を有

するアミノ酸配列またはその断片を含むかまたはそれからなる。

【０１１２】

配列番号７５を以下に提供する：

【化１６】

MALPTARPLL GSCGTPALGS LLFLLFSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG VLANPPNISS LSPRQLLGFP
CAEVSGLSTE RVRELAVALA QKNVKLSTEQ LRCLAHRLSE PPEDLDALPL DLLLFLNPDA FSGPQACTHF
FSRITKANVD LLPRGAPERQ RLLPAALACW GVRGSLLSEA DVRALGGLAC DLPGRFVAES AEVLLPRLVS
CPGPLDQDQQ EAARAALQGG GPPYGPPSTW SVSTMDALRG LLPVLGQPII RSIPQGIVAA WRQRSSRDPS
WRQPERTILR PRFRREVEKT ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD
VLKHKLDELY PQGYPESVIQ HLGYLFLKMS PEDIRKWNVT SLETLKALLE VNKGHEMSPQ VATLIDRFVK
GRGQLDKDTL DTLTAFYPGY LCSLSPEELS SVPPSSIWAV RPQDLDTCDP RQLDVLYPKA RLAFQNMNGS
EYFVKIQSFL GGAPTEDLKA LSQQNVSMDL ATFMKLRTDA VLPLTVAEVQ KLLGPHVEGL KAEERHRPVR
DWILRQRQDD LDTLGLGLQG GIPNGYLVLD LSVQEALSGT PCLLGPGPVL TVLALLLAST LA

[配列番号 75]

【０１１３】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖまたはそのアナログにおいて具体化される）は、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）によって測定した場合に約１ｎＭ～約２５ｎＭのＥＣ５０値でヒトメソテリンに結合する。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、ＥＬＩＳＡによって測定した場合に約２０ｎＭのＥＣ５０値を有する。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，３５７，７８３号に記載される抗メソテリン抗体またはその抗原結合性部分を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、ヒトメソテリンに結合する抗体、例えばその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Feng et al., Mol. Cancer Therapy (2009);8(5):1113-1118に開示される抗体ｍ９１２の重鎖可変領域および軽鎖可変領域に由来する。抗体ｍ９１２は、組換えメソテリンに対してパニングすることによりヒトＦａｂライブラリから単離された。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、Ｆａｂ’に由来する（例えば、ヒトまたはマウスＦａｂライブラリに由来する）。

【０１１４】

ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン（実施形態では、例えばｓｃＦｖまたはそのアナログ）の結合は、例えば酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、ＦＡＣＳ解析、バイオアッセイ（例えば、成長阻害）、またはウェスタンブロットアッセイによって確認することができる。これらのアッセイの各々は一般的に、目的の複合体に対して特異的な標識試薬（例えば、抗体またはｓｃＦｖ）を使用することによって、特定の目的のタンパク質－抗体複合体の存在を検出する。例えば、ｓｃＦｖを放射活性標識し、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）において使用することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい）。放射活性同位元素は、γカウンターまたはシンチレーションカウンター、またはオートラジオグラフィーの使用などの手段によって検出することができる。ある特定の実施形態では、メソテリン標的化細胞外抗原結合ドメインは、蛍光マーカーによって標識される。蛍光マーカーの非制限的な例としては、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、青色蛍光タンパク質（例えば、ＥＢＦＰ、ＥＢＦＰ２、Ａｚｕｒｉｔｅ、およびｍＫａｌａｍａ１）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ＥＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、およびＣｙＰｅｔ）、および黄色蛍光タンパク質（例えば、ＹＦＰ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、およびＹＰｅｔ）が挙げられる。ある特定の実施形態では、メソテリン標的化ヒトｓｃＦｖはＧＦＰによって標識される。

【０１１５】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、約１，０００個またはそれより多くのメソテリン結合部位／細胞のメソテリンレベルでヒトメソテリンに結合す

る。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、約１，０００～約５０，０００個のメソテリン結合部位／細胞のメソテリンレベルでヒトメソテリンに結合する。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、１，０００個未満のメソテリン結合部位／細胞のメソテリン発現レベルでヒトメソテリン、例えば正常組織、例えば正常な胸膜、心膜、および腹膜組織に発現されたヒトメソテリンに結合しない。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、５０，０００個より多くのメソテリン結合部位／細胞のメソテリン発現レベルでヒトメソテリンに結合しない。ある特定の実施形態では、ＣＡＲに含まれるヒトｓｃＦＶは、約１，０００～約５０，０００個のメソテリン結合部位／細胞のメソテリン発現レベルでヒトメソテリンに結合する。ある特定の実施形態では、ＣＡＲに含まれるヒトｓｃＦＶは、５０，０００個より多くまたは１，０００個未満のメソテリン結合部位／細胞のメソテリン発現レベルでヒトメソテリンに結合しない。

【０１１６】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）は、配列番号７６に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ１、配列番号７７に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ２、および配列番号７８に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ３を含む重鎖可変領域（V_H）を含む。ある特定の実施形態では、V_Hは、配列番号７６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ１、配列番号７７に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ２、および配列番号７８に記載のアミノ酸配列を含むかそれからなるＣＤＲ３を含む。

【０１１７】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）は、配列番号７９に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ１、配列番号８０に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ２、および配列番号８１に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）を含む。ある特定の実施形態では、V_Lは、配列番号７９に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ１、配列番号８０に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ２、および配列番号８１に記載のアミノ酸配列を含むかそれからなるＣＤＲ３を含む。

【０１１８】

ある特定の実施形態では、V_Hは、配列番号７６に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ１、配列番号７７に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ２、および配列番号７８に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ３を含み；ならびにV_Lは、配列番号７９に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ１、配列番号８０に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ２、および配列番号８１に記載のアミノ酸配列またはその保存的改変を含むかまたはそれからなるＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、V_Hは、配列番号７６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ１、配列番号７７に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ２、および配列番号７８に記載のアミノ酸配列を含むかそれからなるＣＤＲ３を含み、ならびにV_Lは、配列番号７９に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ１、配列番号８０に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤＲ２、および配列番号８１に記載のアミノ酸配列を含むかそれからなるＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔナンバリングシステムに従って同定される。

【０１１９】

ある特定の実施形態では、重鎖可変領域（V_H）は、配列番号８２に記載のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号８３に記載のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、V_Hは、配列番号８２に記載のアミノ酸配

列を含み、V_Lは、配列番号８３に記載のアミノ酸配列を含み、必要に応じて（ｉｉｉ）V_HとV_Lとの間にリンカー配列、例えばリンカーペプチドを含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、配列番号６６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、V_Hは、配列番号８２に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％（例えば、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％）相同または同一であるアミノ酸配列を含む。例えば、V_Hは、配列番号８２に記載のアミノ酸配列と約８０％、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％相同または同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、V_Hは、配列番号８２に記載のアミノ酸配列（amino sequence）を含む。ある特定の実施形態では、V_Lは、配列番号８３に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％（例えば、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％）相同または同一であるアミノ酸配列を含む。例えば、V_Lは、配列番号８３に記載のアミノ酸配列と約８０％、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％相同または同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、V_Lは、配列番号８３に記載のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、V_Hは、配列番号８２に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％（例えば、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％）相同または同一であるアミノ酸配列を含み、V_Lは、配列番号８３に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％（例えば、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％）相同または同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、V_Hは、配列番号８２に記載のアミノ酸配列を含み、V_Lは、配列番号８３に記載のアミノ酸配列を含む。

【０１２０】

配列番号８２のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、配列番号５２に記載する。

【０１２１】

配列番号８３のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、配列番号５３に記載する。

【０１２２】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）は、配列番号８４に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％（例えば、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％）相同または同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）は、配列番号８４に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）は、ヒトメソテリンポリペプチド（例えば、配列番号７５に記載のアミノ酸配列を含むヒトメソテリンポリペプチド）に特異的に結合する。

【０１２３】

配列番号８４のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、配列番号８５に記載する。

【０１２４】

ある特定の実施形態では、ｓｃＦｖはヒトｓｃＦｖである。

【０１２５】

配列番号５２、５３、および７６～８５を以下に提供する：

【化１７－１】

CAGGTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTT
TCTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGT
GTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTAT
TGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCT
[　配列番号　52]

CGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGTCTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGA
GCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATT
TATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACA

【化１７－２】

TTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTG
ACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATCAAGAGGACT [　配列番号　53]

GGSVSSGSYY [　配列番号　76]

IYYSGST [　配列番号　77]

AREGKNGAFDIW [　配列番号　78]

QSISSY [　配列番号　79]

AASS [　配列番号　80]

QQSYSTPLTF [　配列番号　81]

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS
VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFDIWGQGTMVTVSS [　配列番号　82]

RHQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRT [　配列番号　83]

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS
VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSRHQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRT [　配列番号　84]

CAGGTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTT
TCTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGT
GTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTAT
TGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCTGGA
GGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGT
CTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAAC
TGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTG
CCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGAT
TTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATC
AAGAGGACT [　配列番号　85]

【０１２６】

ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、以下に提供する配列番号３６に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％（例えば、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％）

相同または同一であるアミノ酸配列を含む。

【化１８】

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLE
WIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
CAREGKNGAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTSGQAG [配列番号 36]

【０１２７】

配列番号３６のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号３７に記載する。

【化１９】

caggtgcagctgcaggagtccggcccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctc 60
acctgcactgtctctggtggctccgtcagcagtggtagttactactggagctggatccgg 120
cagcccccagggaagggactggagtggattgggtatatctattacagtgggagcaccaac 180
tacaaccccctccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacgtccaagaaccagttc 240
tccctgaagctgagctctgtgaccgctgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagag 300
gggaagaatggggcttttgatatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagcc 360
tccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggc 420
acagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgg 480
aactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcagga 540
ctctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctac 600
atctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaa 660
tcttgtgacaaaactagtggccaggccggccac 693 [配列番号 37]

【０１２８】

ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下に提供する配列番号３８に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％（例えば、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％）相同または同一であるアミノ酸配列を含む。

【化２０】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
YAASSLQSGVPSGFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPL
TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [配列番号 38]

【０１２９】

配列番号３８のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号３９に記載する。

【化２１】

gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc 60
atcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagcagaaacca 120
gggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca 180
gggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacct 240
gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccccgctcactttcggcgga 300
gggaccaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca 360
tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctat 420
cccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag 480
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctactgcctcagcagcaccctgacg 540
ctgagcaaagcagactacgagaaacacaaactctacgcctgcgaagtcacccatcagggc 600
ctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt [配列番号 39]

【０１３０】

ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下に提供する配列番号４０に記載のアミ

ノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％（例えば、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％）相同または同一であるアミノ酸配列を含む。

【化２２】

RHQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSGFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[　配列番号　40]

【０１３１】

ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、以下に提供する配列番号４１に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％（例えば、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％）相同または同一であるアミノ酸配列を含む。

【化２３】

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYI
YYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFD
IWGQGTMVTVSSS [　配列番号　41]

【０１３２】

ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号３８のアミノ酸１～１０７を含む。ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号４０のアミノ酸１～１０７を含む。

【０１３３】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）は、以下に提供する配列番号４２に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％（例えば、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％）相同または同一であるアミノ酸配列を含む。

【化２４】

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G S Y Y W
S W I R Q P P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S
V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R E G K N G A F D I
W G Q G T M V T V S S S G G G G S G G G G S G G G G S R H Q M T Q S P S
S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K
L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E
D F A T Y Y C Q Q S Y S T P L T F G G G T K V E I K G Q A G H H H H H H
G D Y K D D D D K G [　配列番号　42]

【０１３４】

配列番号４２のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号４５に記載する。

【化２５－１】

atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgcaggtgcag
ctgcaggagtccggcccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtggc
tccgtcagcagtggtagttactactggagctggatccggcagcccccagggaagggactggagtggattggg
tatatctattacagtgggagcaccaactacaacccctccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacg

【化２５－２】

tccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgctgcggacacggccgtgtattactgtgcgaga
gaggggaagaatggggcttttgatatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcaggtggaggcggt
tcaggcggaggtggctctggcggtggcggatcacgacatcagatgacccagtctccatcctccctgtctgca
tctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcag
cagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaagg
ttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacctgaagattttgcaact
tactactgtcaacagagttacagtaccccgctcactttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacggact
gcggccgca [配列番号 45]

【０１３５】

配列番号４２のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号４６に記載する。配列番号４６に記載の核酸配列は、コドン使用に関して合成により最適化され、これはＣＡＲの発現を増加させることができる。

【化２６】

ATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTGCCGCTGGCGCTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGCAGGTGCAG
CTGCAGGAAAGCGGCCCGGGCCTGGTGAAACCGAGCGAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGGCGGC
AGCGTGAGCAGCGGCAGCTATTATTGGAGCTGGATTCGCCAGCCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGATTGGC
TATATTTATTATAGCGGCAGCACCAACTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGCGTGACCATTAGCGTGGATACC
AGCAAAAACCAGTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCGGCGGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGC
GAAGGCAAAAACGGCGCGTTTGATATTTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGCGGCGGC
AGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCCGCCATCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCG
AGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTAGCAGCTATCTGAACTGGTATCAG
CAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTTATGCGGCGAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCGAGCCGC
TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCGACC
TATTATTGCCAGCAGAGCTATAGCACCCCGCTGACCTTTGGCGGCGGCACCAAAGTGGAAATTAAACGCACC
GCGGCGGCG [配列番号 46]

【０１３６】

配列番号４２のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号４７に記載する。配列番号４７に記載の核酸配列は、コドン使用に関して合成により最適化され、これはＣＡＲの発現を増加させることができる。

【化２７】

atggccCTCCCGGTAACGGCTCTGCTGCTTCCACTCGCACTGCTCTTGCATGCTGCCAGACCACAGGTCCAG
CTGCAGGAGAGTGGGCCTGGACTGGTTAAGCCGAGTGAGACACTTTCCTTGACGTGCACTGTGAGCGGGGGA
AGTGTGTCCTCAGGTAGTTATTACTGGTCCTGGATTCGCCAGCCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGATAGGT
TATATCTATTATTCTGGCAGCACTAATTACAATCCTTCTCTCAAAAGTAGGGTGACAATTTCAGTGGATACT
TCCAAAAATCAGTTTAGTCTGAAGCTCAGCTCTGTGACAGCTGCTGATACTGCAGTTTACTACTGCGCCAGG
GAGGGGAAGAATGGCGCCTTCGATATTTGGGGACAGGGCACTATGGTGACTGTATCAAGCGGAGGCGGTGGC
AGCGGCGGGGGAGGGAGTGGAGGCGGCGGGTCTCGACATCAGATGACACAGAGCCCATCATCACTTAGCGCC
AGCGTTGGCGACCGGGTTACGATAACATGCAGGGCTTCCCAATCTATCAGTTCTTATCTGAACTGGTATCAG
CAGAAACCAGGTAAGGCCCCCAAGCTGCTCATCTACGCAGCCTCATCCCTGCAGAGCGGCGTCCCTAGTCGA
TTTTCCGGTAGTGGGTCAGGGACAGATTTTACCCTGACTATCAGTTCACTGCAGCCCGAGGACTTCGCGACA
TACTATTGCCAACAGTCCTATAGTACACCCTTGACATTTGGCGGCGGGACTAAAGTAGAAATTAAACGCACC
gcggccgca [配列番号 47]

【０１３７】

特定の配列（例えば、配列番号８２、配列番号８３、配列番号３６、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４１、または配列番号４２）との少なくとも約８０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％（例えば、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％）の相同性または配列同一性からなるV_Hおよび／またはV_Lアミノ酸配列は、指定された配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含み得るが、標的抗原（例えば、メソテリン）に対する結合能を保持し得る。ある特定の実施形態では、全体で１～１０個のアミノ酸が、特定の配列（例えば、配列番号８２、配列番号８３、配列番号３６、配列番号３８、配列番号４０、配列番

号４１、または配列番号４２）において置換、挿入、および／または欠失される。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、細胞外抗原結合ドメインのＣＤＲ外の領域（例えば、ＦＲ）で起こる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、その配列（配列番号８２および８３）の翻訳後改変を含む、配列番号８２および８３からなる群から選択されるＶ$_H$および／またはＶ$_L$配列を含む。

【０１３８】

５．２．２．２．ＣＡＲの膜貫通ドメイン

ある特定の実施形態では、ＣＡＲは膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、膜の少なくとも一部に及ぶ疎水性アルファヘリックスを含む。膜貫通ドメインが異なれば、異なる受容体安定性をもたらす。抗原認識後、受容体はクラスターを形成し、シグナルを細胞に伝達する。本開示の主題に従って、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＣＤ８ポリペプチド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４０ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ８４ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、合成ポリペプチド（免疫応答に関連するタンパク質に基づかない）、またはその組合せの天然のまたは改変された膜貫通ドメインを含み得る。

【０１３９】

ＣＤ８

ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインはＣＤ８ポリペプチド（例えば、ＣＤ８の膜貫通ドメインまたはその一部）を含む。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒトＣＤ８の膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００１１３９３４５．１（配列番号８６）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、または少なくとも約６０、または少なくとも約７０、および最大約２３５アミノ酸長である配列番号８６の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ポリペプチドは、配列番号８６のアミノ酸１～２３５、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、１３７～２０９、または２００～２３５のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、本開示の主題のＣＡＲは、配列番号８６のアミノ酸１３７～２０９のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤ８ポリペプチドを含む膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７を含むかまたはそれからなるＣＤ８ポリペプチドを含む。

【化２８】

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLY
LSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPR
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCK
CPRPVVKSGDKPSLSARYV [　配列番号　86]

【０１４０】

ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、マウスＣＤ８の膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＡＡＡ９２５３３．１（配列番号８７）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも

約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、または少なくとも約６０、または少なくとも約７０、または少なくとも約１００、または少なくとも約２００、および最大２４７アミノ酸長である配列番号８７の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ポリペプチドは、配列番号８７のアミノ酸１～２４７、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、１５１～２１９、または２００～２４７のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号８７のアミノ酸１５１～２１９を含むかまたはそれからなるＣＤ８ポリペプチドを含む。

【化２９】

```
1   MASPLTRFLS LNLLLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGSVS
61  QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNKI TWDEKLNSSK LFSAVRDTNN KYVLTLNKFS
121 KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTTKPVLRT PSPVHPTGTS QPQRPEDCRP
181 RGSVKGTGLD FACDIYIWAP LAGICVAPLL SLIITLICYH RSRKRVCKCP RPLVRQEGKP
241 RPSEKIV [  配列番号   87]
```

【０１４１】

ある特定の実施形態では、ＣＤ８ポリペプチドは、以下に提供する配列番号８８に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる：

【化３０】

```
STTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICY
[  配列番号   88]
```

【０１４２】

配列番号８８のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号８９に記載する。

【化３１】

```
TCTACTACTACCAAGCCAGTGCTGCGAACTCCCTCACCTGTGCACCCTACCGGGACATCTCAGCCCCAGAGA
CCAGAAGATTGTCGGCCCCGTGGCTCAGTGAAGGGGACCGGATTGGACTTCGCCTGTGATATTTACATCTGG
GCACCCTTGGCCGGAATCTGCGTGGCCCTTCTGCTGTCCTTGATCATCACTCTCATCTGCTAC
[配列番号 89]
```

【０１４３】

ＣＤ２８

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＣＤ２８ポリペプチド（例えば、ＣＤ２８の膜貫通ドメインまたはその一部）を含む。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒトＣＤ２８の膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＤ２８ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００６１３０（配列番号９０）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ２８ポリペプチドは、少なくとも約２０、少なくとも約２５、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約２２０アミノ酸長である配列番号９０の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ２８ポリペプチドは、配列番号９０のアミノ酸１～２２０、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１１４～２２０、１５３～１７９、１５０～２００、または２００～２２０のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号９２（または配列番号９０の

アミノ酸１５３～１７９）を含むかまたはそれからなるＣＤ２８ポリペプチドを含む。配列番号９２のアミノ酸配列または配列番号９０のアミノ酸１５３～１７９のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、配列番号９３に記載する。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号９０のアミノ酸１１４～２２０のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤ２８ポリペプチドを含む。配列番号９２（または配列番号９０のアミノ酸１５３～１７９）のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、配列番号９１に記載する。配列番号９０～９３を以下に提供する：

【化３２－１】

1 MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61 SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
181 SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [配列番号 90]

【化３２－２】

ttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattatt
ttctgggtg [配列番号 91]

FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWV [配列番号 92]

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATT
TTCTGGGTG [配列番号 93]

【０１４４】

ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、マウスＣＤ２８の膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＤ２８ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿０３１６６８．３（配列番号９７）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ２８ポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大２１８アミノ酸長である配列番号９７の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ２８ポリペプチドは、配列番号９７のアミノ酸１～２１８、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１１４～２２０、１５０～２００、１５１～１７７、または２００～２１８のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号９７のアミノ酸１５１～１７７を含むかまたはそれからなるＣＤ２８ポリペプチドを含む。

【０１４５】

配列番号９７を以下に提供する：

【化３３】

1 MTLRLLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSLS CRYSYNLLAK EFRASLYKGV
61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FDNETVTFRL WNLHVNHTDI YFCKIEFMYP
121 PPYLDNERSN GTIIHIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV ALCVIWTNSR
181 RNRLLQSDYM NMTPRRPGLT RKPYQPYAPA RDFAAYRP [配列番号 97]

【０１４６】

ＣＤ８４

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＣＤ８４ポリペプチドの天然のまたは改変された膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ＣＤ８４ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００１１７１８０８．１（配列番号１）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５

％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。ある特定の実施形態では、ＣＤ８４ポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約３４５アミノ酸長である配列番号１の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ８４ポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸１～３４５、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２２６～２５０、２５０～３００、または３００～３４５のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号１のアミノ酸２２６～２５０を含むかまたはそれからなるＣＤ８４ポリペプチドを含むかまたはそれからなる。

【０１４７】

配列番号１を以下に提供する：

【化３４】

```
1 maqhhlwill lclqtwpeaa gkdseiftvn gilgesvtfp vniqeprqvk iiawtsktsv
61 ayvtpgdset apvvtvthrn yyerihalgp nynlvisdlr medagdykad intqadpytt
121 tkrynlqiyr rlgkpkitqs lmasvnstcn vtltcsveke eknvtynwsp lgeegnvlqi
181 fqtpedqelt ytctaqnpvs nnsdsisarq lcadiamgfr thhtgllsvl amffllvlil
241 ssvflfrlfk rrqgrifpeg sclntftknp yaaskktiyt yimasrntqp aesriydeil
301 qskvlpskee pvntvysevq fadkmgkast qdskppgtss yeivi [  配列番号   1]
```

【０１４８】

配列番号１のアミノ酸２２６～２５０をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号２に記載する。

【化３５】

```
TTGCTGAGCGTGCTGGCTATGTTCTTTCTGCTTGTTCTCATTCTGTCTTCAGTGTTTTTGTTCCGTTTGTTC
AAG [  配列番号   2]
```

【０１４９】

ＣＤ１６６

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＣＤ１６６ポリペプチドの天然のまたは改変された膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ＣＤ１６６ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００１６１８．２（配列番号３）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。ある特定の実施形態では、ＣＤ１６６ポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、少なくとも約１００、および最大約５８３アミノ酸長である配列番号３の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ１６６ポリペプチドは、配列番号３のアミノ酸１～５８３、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５２８～５４９、または５００～５８３のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、本開示のＣＡＲの膜貫通ドメインに含まれるＣＤ１６６ポリペプチドは、配列番号３のアミノ酸５２８～５５３のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインに含まれるＣＤ１６６ポリペプチドは、配列番号３のアミノ酸５２８～５４９のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【０１５０】

配列番号３を以下に提供する：

【化３６】

```
1   MESKGASSCR LLFCLLISAT VFRPGLGWYT VNSAYGDTII IPCRLDVPQN LMFGKWKYEK
61  PDGSPVFIAF RSSTKKSVQY DDVPEYKDRL NLSENYTLSI SNARISDEKR FVCMLVTEDN
121 VFEAPTIVKV FKQPSKPEIV SKALFLETEQ LKKLGDCISE DSYPDGNITW YRNGKVLHPL
181 EGAVVIIFKK EMDPVTQLYT MTSTLEYKTT KADIQMPFTC SVTYYGPSGQ KTIHSEQAVF
241 DIYYPTEQVT IQVLPPKNAI KEGDNITLKC LGNGNPPPEE FLFYLPGQPE GIRSSNTYTL
301 TDVRRNATGD YKCSLIDKKS MIASTAITVH YLDLSLNPSG EVTRQIGDAL PVSCTISASR
361 NATVVWMKDN IRLRSSPSFS SLHYQDAGNY VCETALQEVE GLKKRESLTL IVEGKPQIKM
421 TKKTDPSGLS KTIICHVEGF PKPAIQWTIT GSGSVINQTE ESPYINGRYY SKIIISPEEN
481 VTLTCTAENQ LERTVNSLNV SAISIPEHDE ADEISDENRE KVNDQAKLIV GIVVGLLLAA
541 LVAGVVYWLY MKKSKTASKH VNKDLGNMEE NKKLEENNHK TEA [   配列番号    3]
```

【０１５１】

配列番号３のアミノ酸５２８～５５３をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号４に記載する。

【化３７】

```
CTAATTGTGGGAATCGTTGTTGGTCTCCTCCTTGCTGCCCTTGTTGCTGGTGTCGTCTACTGGCTGTACATG
AAGAAG [   配列番号    4]
```

【０１５２】

ＣＤ８ａ

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＣＤ８ａポリペプチドの天然のまたは改変された膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ＣＤ８ａポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００１１３９３４５．１（配列番号５）からなる配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ａポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約２３５アミノ酸長である配列番号５の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ａポリペプチドは、配列番号５のアミノ酸１～２３５、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１８３～２０７、１５０～２００、または２００～２３５のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号５のアミノ酸１８３～２０７を含むかまたはそれからなるＣＤ８ａポリペプチドを含む。配列番号５を以下に提供する：

【化３８】

```
1   MALPVTALLL PLALLLHAAR PSQFRVSPLD RTWNLGETVE LKCQVLLSNP TSGCSWLFQP
61  RGAAASPTFL LYLSQNKPKA AEGLDTQRFS GKRLGDTFVL TLSDFRRENE GYYFCSALSN
121 SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT PAPRPPTPAP TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA
181 CDIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYCNHRN RRRVCKCPRP VVKSGDKPSL SARYV
    [   配列番号    5]
```

【０１５３】

配列番号５のアミノ酸１８３～２０７をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号６に記載する。

【化３９】

```
atctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccctttactgc
aac [   配列番号    6]
```

【０１５４】

ＣＤ８ｂ

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＣＤ８ｂポリペプチドの天然の

または改変された膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ＣＤ８ｂポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿７４２０９９．１（配列番号７）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ｂポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約２２１アミノ酸長である配列番号７の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＤ８ｂポリペプチドは、配列番号７のアミノ酸１～２２１、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１７１～１９５、１５０～２００、または２００～２２１のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号７のアミノ酸１７１～１９５を含むかまたはそれからなるＣＤ８ｂポリペプチドを含む。配列番号７を以下に提供する：

【化４０】

```
1   MRPRLWLLLA AQLTVLHGNS VLQQTPAYIK VQTNKMVMLS CEAKISLSNM RIYWLRQRQA
61  PSSDSHHEFL ALWDSAKGTI HGEEVEQEKI AVFRDASRFI LNLTSVKPED SGIYFCMIVG
121 SPELTFGKGT QLSVVDFLPT TAQPTKKSTL KKRVCRLPRP ETQKGPLCSP ITLGLLVAGV
181 LVLLVSLGVA IHLCCRRRRA RLRFMKQLRL HPLEKCSRMD Y [  配列番号   7]
```

【０１５５】

配列番号７のアミノ酸１７１～１９５をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号８に記載する。

【化４１】

```
ATCACCCTTGGCCTGCTGGTGGCTGGCGTCCTGGTTCTGCTGGTTTCCCTGGGAGTGGCCATCCACCTGTGC
TGC [  配列番号   8]
```

【０１５６】

ＩＣＯＳ

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＩＣＯＳポリペプチドの天然のまたは改変された膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ＩＣＯＳポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿０３６２２４．１（配列番号９）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。ある特定の実施形態では、ＩＣＯＳポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約１９９アミノ酸長である配列番号９の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＩＣＯＳポリペプチドは、配列番号９のアミノ酸１～１９９、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１４１～１６５、または１５０～１９９のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号９のアミノ酸１４１～１６５を含むかまたはそれからなるＩＣＯＳポリペプチドを含む。配列番号９を以下に提供する：

【化４２】

```
1   MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGGQ
61  ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYYFCN LSIFDPPPFK
121 VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY
181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL [  配列番号   9]
```

【０１５７】

配列番号９のアミノ酸１４１～１６５をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下

に提供する配列番号１０に記載する。

【化４３】

TTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTT
ACA [　配列番号　10]

【０１５８】

ＣＴＬＡ－４

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＣＴＬＡ－４ポリペプチドの天然のまたは改変された膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ＣＴＬＡ－４ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００５２０５．２（配列番号１１）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。ある特定の実施形態では、ＣＴＬＡ－４ポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約２２３アミノ酸長である配列番号１１の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＴＬＡ－４ポリペプチドは、配列番号１１のアミノ酸１～２２３、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１６２～１８６、１５０～２００、または２００～２２３のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号１１のアミノ酸１６２～１８６を含むかまたはそれからなるＣＴＬＡ－４ポリペプチドを含む。配列番号１１を以下に提供する：

【化４４】

1　MACLGFQRHK AQLNLATRTW PCTLLFFLLF IPVFCKAMHV AQPAVVLASS RGIASFVCEY
61　ASPGKATEVR VTVLRQADSQ VTEVCAATYM MGNELTFLDD SICTGTSSGN QVNLTIQGLR
121 AMDTGLYICK VELMYPPPYY LGIGNGTQIY VIDPEPCPDS DFLLWILAAV SSGLFFYSFL
181 LTAVSLSKML KKRSPLTTGV YVKMPPTEPE CEKQFQPYFI PIN [　配列番号　11]

【０１５９】

配列番号１１のアミノ酸１６２～１８６をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１２に記載する。

【化４５】

TTCCTCCTCTGGATCCTTGCAGCAGTTAGTTCGGGGTTGTTTTTTTATAGCTTTCTCCTCACAGCTGTTTCT
TTG [　配列番号　12]

【０１６０】

ＩＣＡＭ－１

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、ＩＣＡＭ－１ポリペプチドの天然のまたは改変された膜貫通ドメインまたはその一部を含む。ＩＣＡＭ－１ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿０００１９２．２（配列番号１３）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくは少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を有し得る。ある特定の実施形態では、ＩＣＡＭ－１ポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約２２０アミノ酸長である配列番号１３の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＩＣＡＭ－１ポリペプチドは、配列番号１３のアミノ酸１～５３２、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４８１～５０７、４００～５００、ま

たは５００～５３２のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、配列番号１３のアミノ酸４８１～５０７を含むかまたはそれからなるＩＣＡＭ－１ポリペプチドを含む。配列番号１３を以下に提供する：

【化４６】

1 MAPSSPRPAL PALLVLLGAL FPGPGNAQTS VSPSKVILPR GGSVLVTCST SCDQPKLLGI
61 ETPLPKKELL LPGNNRKVYE LSNVQEDSQP MCYSNCPDGQ STAKTFLTVY WTPERVELAP
121 LPSWQPVGKN LTLRCQVEGG APRANLTVVL LRGEKELKRE PAVGEPAEVT TTVLVRRDHH
181 GANFSCRTEL DLRPQGLELF ENTSAPYQLQ TFVLPATPPQ LVSPRVLEVD TQGTVVCSLD
241 GLFPVSEAQV HLALGDQRLN PTVTYGNDSF SAKASVSVTA EDEGTQRLTC AVILGNQSQE
301 TLQTVTIYSF PAPNVILTKP EVSEGTEVTV KCEAHPRAKV TLNGVPAQPL GPRAQLLLKA
361 TPEDNGRSFS CSATLEVAGQ LIHKNQTREL RVLYGPRLDE RDCPGNWTWP ENSQQTPMCQ
421 AWGNPLPELK CLKDGTFPLP IGESVTVTRD LEGTYLCRAR STQGEVTRKV TVNVLSPRYE
481 IVIITVVAAA VIMGTAGLST YLYNRQRKIK KYRLQQAQKG TPMKPNTQAT PP

[配列番号 13]

【０１６１】

配列番号１３のアミノ酸４８１～５０７をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１４に記載する。

【化４７】

ATTGTCATCATCACTGTGGTAGCAGCCGCAGTCATAATGGGCACTGCAGGCCTCAGCACGTACCTCTATAAC

CGCCAGCGG [配列番号 14]

【０１６２】

５．２．２．３．ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域

ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、細胞外抗原結合ドメインを膜貫通ドメインに連結するヒンジ／スペーサー領域を含む。ヒンジ／スペーサー領域は、抗原認識を容易にするために抗原結合ドメインが異なる方向を向くことができるように十分に柔軟であり得る。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、ＣＤ８ポリペプチド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４０ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ８４ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、合成ポリペプチド（免疫応答に関連するタンパク質に基づかない）、またはその組合せの天然のまたは改変されたヒンジ領域を含み得る。ヒンジ／スペーサー領域は、ＩｇＧ１のヒンジ領域、または免疫グロブリンのCH_2CH_3領域、およびＣＤ３の一部、ＣＤ２８ポリペプチドの一部（例えば、配列番号９０の一部）、ＣＤ８ポリペプチドの一部（例えば、配列番号８６の一部、または配列番号８７の一部）、またはそれらと少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約１００％相同または同一である前述のいずれかの変形形態、または合成スペーサー配列であり得る。

【０１６３】

ＣＤ２８

ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、本明細書に記載のＣＤ２８ポリペプチドの天然のまたは改変されたヒンジ領域またはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号１５（または配列番号９０のアミノ酸１１４～１５２）に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤ２８ポリペプチドを含む。配列番号１５を以下に提供する。

【化４８】

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP [配列番号 15]

【０１６４】

配列番号１５（または配列番号９０のアミノ酸１１４～１５２）のアミノ酸配列をコー

ドする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号５４に記載する。
【化４９】
attgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaaggg
aaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccc [　配列番号　54]

【０１６５】
ＣＤ８４
ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、本明細書に記載のＣＤ８４ポリペプチドの天然のまたは改変されたヒンジ領域またはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号１のアミノ酸１８７～２２５を含むかまたはそれからなるＣＤ８４ポリペプチドを含む。配列番号１のアミノ酸１８７～２２５をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１６に記載する。
【化５０】
CAAGAGCTGACTTACACGTGTACAGCCCAGAACCCTGTCAGCAACAATTCTGACTCCATCTCTGCCCGGCAG
CTCTGTGCAGACATCGCAATGGGCTTCCGTACTCACCACACCGGG [　配列番号　16]

【０１６６】
ＣＤ１６６
ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、本明細書に記載のＣＤ１６６ポリペプチドの天然のまたは改変されたヒンジ領域またはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号３のアミノ酸４８９～５２７を含むかまたはそれからなるＣＤ１６６ポリペプチドを含む。配列番号３のアミノ酸４８９～５２７をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１７に記載する。
【化５１】
ACCAACTGGAGAGAACAGTAAACTCCTTGAATGTCTCTGCTATAAGTATTCCAGAACACGATGAGGCAGACG
AGATAAGTGATGAAAACAGAGAAAAGGTGAATGACCAGGCAAAA [　配列番号　17]

【０１６７】
ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号３のアミノ酸４８４～５２７を含むかまたはそれからなるＣＤ１６６ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号３のアミノ酸５０６～５２７を含むかまたはそれからなるＣＤ１６６ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号３のアミノ酸５１７～５２７を含むかまたはそれからなるＣＤ１６６ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号１０９または配列番号１１０に記載のアミノ酸配列を含むかまたそれからなるＣＤ１６６ポリペプチドを含む。配列番号１０９および１１０を以下に提供する。
【化５２】
NQLERTVNSLNVPAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAK [　配列番号　109]
AAANQLERTVNSLNVSAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAK [　配列番号　110]

【０１６８】
ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域および膜貫通ドメインに含まれるＣＤ１６６ポリペプチドは、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、または配列番号１１７に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。配列番号１１１～１１７を以下に提供する。

【化５３－１】

PEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWLYMKK [　配列番号　111]

ENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWLYMKK [　配列番号　112]

NQLERTVNSLNVPAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWLYMKK

[配列番号 113]

TCTAENQLERTVNSLNVSAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWL

[配列番号 114]

【化５３－２】

PEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWL [　配列番号　115]

NQLERTVNSLNVSAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWL

[配列番号 116]

AAANQLERTVNSLNVSAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWLYMKK

[　配列番号　117]

【０１６９】

ＣＤ８ａ

ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、本明細書に記載のＣＤ８ａポリペプチドの天然のまたは改変されたヒンジ領域またはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号５のアミノ酸１３７～１８２を含むかまたはそれからなるＣＤ８ａポリペプチドを含む。配列番号５のアミノ酸１３７～１８２をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１８に記載する。

【化５４】

cccaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgc

ccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcctgtgat

[配列番号 18]

【０１７０】

ＣＤ８ｂ

ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、本明細書に記載のＣＤ８ｂポリペプチドの天然のまたは改変されたヒンジ領域を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域に含まれるＣＤ８ｂポリペプチドは、配列番号７のアミノ酸１３２～１７０を含むかまたはそれからなる。配列番号７のアミノ酸１３２～１７０をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１９に記載する。

【化５５】

CTGAGTGTGGTTGATTTCCTTCCCACCACTGCCCAGCCCACCAAGAAGTCCACCCTCAAGAAGAGAGTGTGC

CGGTTACCCAGGCCAGAGACCCAGAAGGGCCCACTTTGTAGCCCC [　配列番号　19]

【０１７１】

ＩＣＯＳ

ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、本明細書に記載のＩＣＯＳポリペプチドの天然のまたは改変されたヒンジ領域またはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号９のアミノ酸１０２～１４０を含むかまたはそれからなるＩＣＯＳポリペプチドを含む。配列番号９のアミノ酸１０２～１４０をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号２０に記載する。

【化５６】
tctcatgccaactattacttctgcaacctatcaatttttgatcctcctccttttaaagtaactcttacagga
ggatatttgcatatttatgaatcacaactttgttgccagctgaag [　配列番号　20]

【０１７２】
ＣＴＬＡ－４
ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、本明細書に記載のＣＴＬＡ－４ポリペプチドの天然のまたは改変されたヒンジ領域またはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号１１のアミノ酸１２３～１６１を含むかまたはそれからなるＣＴＬＡ－４ポリペプチドを含む。配列番号１１のアミノ酸１２３～１６１をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号２１に記載する。
【化５７】
GACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGA
ACCCAGATTTATGTAATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGAC [　配列番号　21]

【０１７３】
ＩＣＡＭ－１
ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、本明細書に記載のＩＣＡＭ－１ポリペプチドの天然のまたは改変されたヒンジ領域またはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、配列番号１３のアミノ酸４４２～４８０を含むかまたはそれからなるＩＣＡＭ－１ポリペプチドを含む。配列番号１３のアミノ酸４４２～４８０をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号２２に記載する。
【化５８】
GGGGAATCAGTGACTGTCACTCGAGATCTTGAGGGCACCTACCTCTGTCGGGCCAGGAGCACTCAAGGGGAG
GTCACCCGCAAGGTGACCGTGAATGTGCTCTCCCCCCGGTATGAG [　配列番号　22]

【０１７４】
ある特定の実施形態では、メソテリン標的化ＣＡＲはヒンジ／スペーサー領域を含む。ある特定の実施形態では、ヒンジ／スペーサー領域は、細胞外抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置する。ある特定の実施形態では、ヒンジ／スペーサー領域は、ＣＤ８ポリペプチド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、合成ポリペプチド（免疫応答に関連するタンパク質に基づかない）、またはその組合せを含む。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ８ポリペプチド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、合成ポリペプチド（免疫応答に関連するタンパク質に基づかない）、またはその組合せを含む。
【０１７５】
ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインおよびヒンジ／スペーサー領域は、同じ分子に由来する。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインおよびヒンジ／スペーサー領域は、異なる分子に由来する。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域は、ＣＤ２８ポリペプチドを含み、ＣＡＲの膜貫通ドメインはＣＤ２８ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域はＣＤ２８ポリペプチドを

含み、ＣＡＲの膜貫通ドメインはＣＤ２８ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域はＣＤ８４ポリペプチドを含み、ＣＡＲの膜貫通ドメインはＣＤ８４ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域はＣＤ１６６ポリペプチドを含み、ＣＡＲの膜貫通ドメインはＣＤ１６６ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域はＣＤ８ａポリペプチドを含み、ＣＡＲの膜貫通ドメインはＣＤ８ａポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域はＣＤ８ｂポリペプチドを含み、ＣＡＲの膜貫通ドメインはＣＤ８ｂポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲのヒンジ／スペーサー領域はＣＤ２８ポリペプチドを含み、ＣＡＲの膜貫通ドメインはＩＣＯＳポリペプチドを含む。

【０１７６】

５．２．２．４．ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメイン

Ａ．ＣＤ３ζ

ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζポリペプチドを含み、これは細胞（例えば、リンパ系列の細胞、例えばＴ細胞）を活性化または刺激することができる。野生型（「天然の」）ＣＤ３ζは、３つの免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（「ＩＴＡＭ」）（例えば、ＩＴＡＭ１、ＩＴＡＭ２、およびＩＴＡＭ３）、３つの塩基に富むストレッチ（ＢＲＳ）領域（ＢＲＳ１、ＢＲＳ２、およびＢＲＳ３）を含み、抗原の結合後に活性化シグナルを細胞（例えば、リンパ系列の細胞、例えばＴ細胞）に送る。天然のＣＤ３ζ鎖の細胞内シグナル伝達ドメインは、内因性のＴＣＲのシグナルの一次伝達物質である。

【０１７７】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、天然のＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、天然のＣＤ３ζポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿９３２１７０（配列番号９４）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％、少なくとも約１００％相同または同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、天然のＣＤ３ζポリペプチドは、少なくとも約２０、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、または少なくとも約１００、または少なくとも約１１０、および最大約１６４アミノ酸長である配列番号９４の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、天然のＣＤ３ζポリペプチドは、配列番号９４のアミノ酸１～５０、５０～１００、１００～１５０、５０～１６４、５５～１６４、または１５０～１６４のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、天然のＣＤ３ζポリペプチドは、配列番号９４のアミノ酸５２～１６４のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【０１７８】

配列番号９４を以下に提供する：

【化５９】

```
1   MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
61  APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGL YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [  配列番号   94]
```

【０１７９】

ある特定の実施形態では、ＣＤ３ζポリペプチドは、配列番号９５に記載のアミノ酸配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％、少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換

を含み得るアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。配列番号９５を以下に提供する：
【化６０】
RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR RKNPQEGLYN
ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDT YDALHMQALP PR [配列番号 95]

【０１８０】
配列番号９５のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号９６に記載する。
【化６１】
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC
AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAG
CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC
ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [配列番号 96]

【０１８１】
ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、改変ヒトＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、配列番号３５に記載のアミノ酸配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％、少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。配列番号３５を以下に提供する：
【化６２－１】
RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR RKNPQEGLFN

【化６２－２】
ELQKDKMAEA FSEIGMKGER RRGKGHDGLF QGLSTATKDT FDALHMQALP PR [配列番号 35]

【０１８２】
配列番号３５のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号５５に記載する。
【化６３】
agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctc
aatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaag
ccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTcagt
gagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttTccaggggctcagtacagcc
accaaggacacctTcgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc [配列番号 55]

【０１８３】
ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、１つ、２つ、または３つのＩＴＡＭバリアントを含む。ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、天然のＩＴＡＭ１を含む。ある特定の実施形態では、天然のＩＴＡＭ１は、配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。
【化６４】
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKR [配列番号 23]

【０１８４】
配列番号２３のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号２４に記載する。
【化６５】
cagaaccagctctataacgagctcaatctagga cgaagagaggagtacgatgttttggacaagaga
[配列番号 24]

【０１８５】
ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、１つまたは複数の機能喪失突然変異を含むＩＴＡＭ１バリアントを含む。ある特定の実施形態では、ＩＴＡＭ１バリアントは２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、１つまたは複数（例えば、２つ）の機能喪失突然変異の各々は、ＩＴＡＭ１におけるチロシン残基の突然変異を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＩＴＡＭ１バリアント（例えば、２つの機能喪失突然変異からなるバリアント）は、以下に提供する配列番号２５に記載されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。
【化６６】
QNQLFNELNLGRREEFDVLDKR [配列番号 25]

【０１８６】
配列番号２５のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を配列番号２６に記載し、これを以下に提供する。
【化６７】
cagaaccagctctTtaacgagctcaatctagga cgaagagaggagtTcgatgttttggacaagaga
[配列番号 26]

【０１８７】
ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは天然のＩＴＡＭ２を含む。ある特定の実施形態では、天然のＩＴＡＭ２は、以下に提供する配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。
【化６８】
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK [配列番号 27]

【０１８８】
配列番号２７のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号２８に記載する。
【化６９】
caggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaa
[配列番号 28]

【０１８９】
ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、１つまたは複数の機能喪失突然変異を含むＩＴＡＭ２バリアントを含む。ある特定の実施形態では、ＩＴＡＭ２バリアントは、２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、１つまたは複数の（例えば２つの）機能喪失突然変異の各々は、ＩＴＡＭ２におけるチロシン残基の突然変異を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＩＴＡＭ２バリアント（例えば、２つの機能喪失突然変異からなるバリアント）は、以下に提供する配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。
【化７０】
QEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMK [配列番号 29]

【０１９０】
配列番号２９のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号３０に記載する。
【化７１】
caggaaggcctgtTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTcagtgagattgggatgaaa
[　配列番号　30]

【０１９１】
ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは天然のＩＴＡＭ３を含む。ある特定の実施形態では、天然のＩＴＡＭ３は、以下に提供する配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。
【化７２】
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ [　配列番号　31]

【０１９２】
配列番号３１のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号３２に記載する。
【化７３】
cacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcag
[配列番号 32]

【０１９３】
ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、１つまたは複数の機能喪失突然変異を含むＩＴＡＭ３バリアントを含む。ある特定の実施形態では、ＩＴＡＭ３バリアントは２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異の各々は、ＩＴＡＭ３のチロシン残基の突然変異を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＩＴＡＭ３バリアント（例えば、２つの機能喪失突然変異からなるバリアント）は、以下に提供する配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。
【化７４】
HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ [　配列番号　33]

【０１９４】
配列番号３３のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号配列番号３４に記載する。
【化７５】
cacgatggcctttTccaggggctcagtacagccaccaaggacacctTcgacgcccttcacatgcag
[配列番号 34]

【０１９５】
ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、１つもしくは複数の機能喪失突然変異を含むかもしくはそれからなるＩＴＡＭ１バリアント、１つもしくは複数の機能喪失突然変異を含むかもしくはそれからなるＩＴＡＭ２バリアント、および／または１つもしくは複数の機能喪失突然変異を含むかもしくはそれからなるＩＴＡＭ３バリアント、またはその組合せを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。
【０１９６】
ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ２バリアント、および１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態

では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、天然のＩＴＡＭ１、２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ２バリアント、および２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ１、配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＩＴＡＭ２バリアント、および配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチド（例えば、「１ＸＸ」と指定される構築物）を含む。ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【０１９７】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ１バリアント、および１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ１バリアント、天然のＩＴＡＭ２、および２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号２５に記載のアミノ酸配列からなるＩＴＡＭ１バリアント、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ２、および配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチド（例えば、「Ｘ２Ｘ」と指定される構築物）を含む。

【０１９８】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ１バリアント、および１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ２バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、２つの機能喪失突然変異を含むＩＴＡＭ１バリアント、２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ２バリアント、および天然のＩＴＡＭ３を含むかまたはそれからなる改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号２５に記載のアミノ酸配列からなるＩＴＡＭ１バリアント、配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＩＴＡＭ２バリアント、および配列番号３１に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ３を含む改変ＣＤ３ζポリペプチド（例えば、「ＸＸ３」と指定される構築物）を含む。

【０１９９】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異を含むＩＴＡＭ１バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ１バリアント、天然のＩＴＡＭ２、および天然のＩＴＡＭ３を含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号２５に記載のアミノ酸配列からなるＩＴＡＭ１バリアント、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ２、および配列番号３１に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ３を含む改変ＣＤ３ζポリペプチド（例えば、「Ｘ２３」と指定される構築物）を含む。

【０２００】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、天然のＩＴＡＭ１、天然のＩＴＡＭ２、および１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異を含むＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、天然のＩＴＡＭ１、天然のＩＴＡＭ２、お

よび２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ１バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ１、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ２、および配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチド（例えば、「１２Ｘ」と指定される構築物）を含む。

【０２０１】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、天然のＩＴＡＭ１、１つまたは複数の（例えば、２つの）機能喪失突然変異を含むＩＴＡＭ２バリアント、および天然のＩＴＡＭ３を含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、天然のＩＴＡＭ１、２つの機能喪失突然変異を含むかまたはそれからなるＩＴＡＭ２バリアント、および天然のＩＴＡＭ３を含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ１、配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＩＴＡＭ２バリアント、および配列番号３１に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチド（例えば、「１Ｘ３」と指定される構築物）を含む。

【０２０２】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、１つまたは２つのＩＴＡＭの欠失を含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、ＩＴＡＭ１およびＩＴＡＭ２の欠失を含むかまたはそれからなり、例えば改変ＣＤ３ζポリペプチドは、天然のＩＴＡＭ３またはＩＴＡＭ３バリアントを含み、ＩＴＡＭ１もＩＴＡＭ２も含まない。ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、配列番号３１に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ３を含み、ＩＴＡＭ１（天然または改変型）もＩＴＡＭ２（天然または改変型）も含まない（例えば、「Ｄ１２」と指定される構築物）。

【０２０３】

ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、ＩＴＡＭ２およびＩＴＡＭ３の欠失を含むかまたはそれからなり、例えば改変ＣＤ３ζポリペプチドは、天然のＩＴＡＭ１またはＩＴＡＭ１バリアントを含み、ＩＴＡＭ２もＩＴＡＭ３も含まない。ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ１を含み、ＩＴＡＭ２（天然または改変型）もＩＴＡＭ３（天然または改変型）も含まない（例えば、「Ｄ２３」と指定される構築物）。

【０２０４】

ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、ＩＴＡＭ１およびＩＴＡＭ３の欠失を含むかまたはそれからなり、例えば改変ＣＤ３ζポリペプチドは天然のＩＴＡＭ２またはＩＴＡＭ２バリアントを含み、ＩＴＡＭ１もＩＴＡＭ３も含まない。ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなる天然のＩＴＡＭ２を含み、ＩＴＡＭ１（天然または改変型）もＩＴＡＭ３（天然または改変型）を含まない（例えば、「Ｄ１３」と指定される構築物）。

【０２０５】

ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、ＩＴＡＭ１の欠失を含むかまたはそれからなり、例えば改変ＣＤ３ζポリペプチドは、天然のＩＴＡＭ２またはＩＴＡＭ２バリアント、および天然のＩＴＡＭ３またはＩＴＡＭ３バリアントを含み、ＩＴＡＭ１（天然または改変型）を含まない。

【０２０６】

ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、ＩＴＡＭ２の欠失を含むかまたはそれからなり、例えば改変ＣＤ３ζポリペプチドは、天然のＩＴＡＭ１またはＩＴＡＭ１バリアント、および天然のＩＴＡＭ３またはＩＴＡＭ３バリアントを含み、ＩＴＡＭ２（天然または改変型）を含まない。

【０２０７】
ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、ＩＴＡＭ３の欠失を含むかまたはそれからなり、例えば改変ＣＤ３ζポリペプチドは、天然のＩＴＡＭ１またはＩＴＡＭ１バリアント、および天然のＩＴＡＭ２またはＩＴＡＭ２バリアントを含み、ＩＴＡＭ３（天然または改変型）を含まない。
【０２０８】
Ｂ．共刺激シグナル伝達領域
ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、少なくとも共刺激シグナル伝達領域をさらに含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、共刺激分子の少なくとも一部を含み、これは最適なリンパ球活性化を提供することができる。
【０２０９】
本明細書で使用される場合、「共刺激分子」は、抗原に対するリンパ球の効率的な応答のために必要な、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子を指す。共刺激分子の非制限的な例としては、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＩＣＯＳ、ＤＡＰ－１０、ＣＤ２７、ＣＤ４０、およびＮＫＧＤ２が挙げられる。共刺激分子は共刺激リガンドに結合することができ、これはその受容体に結合すると共刺激応答、すなわち、抗原がそのＣＡＲ分子に結合する場合に限り刺激を行う細胞内応答を産生する、細胞表面上に発現されるタンパク質である。共刺激リガンドとしては、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ７０、ＯＸ４０Ｌ、および４－１ＢＢＬが挙げられるがこれらに限定されない。一例として、４－１ＢＢリガンド（すなわち、４－１ＢＢＬ）は、ＣＡＲシグナルと組み合わせてＣＡＲ$^{+}$ Ｔ細胞のエフェクター細胞機能を誘導する細胞内シグナルを提供するために４－１ＢＢ（「ＣＤ１３７」としても知られる）に結合し得る。４－１ＢＢ、ＩＣＯＳ、またはＤＡＰ－１０を含む共刺激シグナル伝達領域を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むＣＡＲは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第７，４４６，１９０号に開示される。
【０２１０】
ある特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８ポリペプチド（例えば、ＣＤ２８の細胞内ドメインまたはその一部）を含む共刺激シグナル伝達領域を含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、ヒトＣＤ２８の細胞内ドメインまたはその一部を含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、配列番号９０のアミノ酸１８０～２２０を含むかまたはそれからなるＣＤ２８ポリペプチドを含む。
【０２１１】
ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、配列番号１０１（または配列番号９０のアミノ酸１８０～２２０）に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤ２８ポリペプチドを含む。配列番号１０１を以下に提供する。
【化７６】
RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAYR S [　配列番号　101]

【０２１２】
配列番号１０１（または配列番号９０のアミノ酸１８０～２２０）のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１０２に記載する。
【化７７】
AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCC
ACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC　[配列番号102]

【０２１３】
ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、配列番号１０８（または配列番号９０のアミノ酸１８０～２１９）に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣ

Ｄ２８ポリペプチドを含む。配列番号１０８を以下に提供する。

【化７８】

RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAYR K [　配列番号　108]

【０２１４】

ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、マウスＣＤ２８の細胞内ドメインまたはその一部を含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、配列番号９７のアミノ酸１７８～２１８を含むかまたはそれからなる。

【０２１５】

配列番号９７のアミノ酸１７８～２１８をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号９８に記載する。

【化７９】

aat agtagaagga acagactcct tcaaagtgac tacatgaaca tgactccccg

gaggcctggg ctcactcgaa agccttacca gccctacgcc cctgccagag actttgcagc

gtaccgcccc [　配列番号　98]

【０２１６】

ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、配列番号９９に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤ２８ポリペプチドを含むかまたはそれからなる。配列番号９９を以下に提供する：

【化８０】

NSRRNRLLQS DYMNMTPRRP GLTRKPYQPY APARDFAAYR P [　配列番号　99]

。

【０２１７】

配列番号９９のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列を、以下に提供する配列番号１００に記載する。

【化８１】

AATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGGAGGCCTGGGCTCACTCGA

AAGCCTTACCAGCCCTACGCCCCTGCCAGAGACTTTGCAGCGTACCGCCCC [　配列番号　100]

【０２１８】

ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、第１の共刺激分子の一部および第２の共刺激分子の一部を含み、例えばＣＤ２８の細胞内ドメインおよび４－１ＢＢの細胞内ドメインまたはＣＤ２８の細胞内ドメインおよびＯＸ４０の細胞内ドメインを含む。

【０２１９】

ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、４－１ＢＢポリペプチド（例えば、４－１ＢＢの細胞内ドメインまたはその一部）を含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、ヒト４－１ＢＢの細胞内ドメインまたはその一部を含む。４－１ＢＢは、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）リガンドとして作用することができ、刺激活性を有し得る。ある特定の実施形態では、４－１ＢＢポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００１５５２．２（配列番号１０３）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％、少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、４－１ＢＢポリペプチドは、少なくとも約２０、少なくとも約２５、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約２５５アミノ酸長である配列番号１０３の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、４－１ＢＢポリペ

プチドは、配列番号１０３のアミノ酸１～２５５、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２１４～２５５、または２００～２５５のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、配列番号１０４（または配列番号１０３のアミノ酸２１４～２５５）を含むかまたはそれからなる４－１ＢＢポリペプチドを含む。配列番号１０３および１０４を以下に提供する：

【化８２】

1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
241 CSCRFPEEEE GGCEL [配列番号 103]

KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEGGC EL [配列番号 104]

。

【０２２０】

配列番号１０４（または配列番号１０３のアミノ酸２１４～２５５）のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１０５に記載する。

【化８３】

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCA
AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG [配列番号 105]

【０２２１】

ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、ＯＸ４０ポリペプチド（例えば、ＯＸ４０の細胞内ドメインまたはその一部）を含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、ヒトＯＸ４０の細胞内ドメインまたはその一部を含む。ある特定の実施形態では、ＯＸ４０ポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００３３１８．１（配列番号１０６）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％、少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＯＸ４０ポリペプチドは、少なくとも約２０、少なくとも約２５、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約２７７アミノ酸長である配列番号１０６の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＯＸ４０ポリペプチドは、配列番号１０６のアミノ酸１～２７７、１～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、または２００～２７７のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。配列番号１０６を以下に提供する。

【化８４】

1 MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ
61 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK
121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ
181 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL
241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI [配列番号 106]

【０２２２】

ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、ＩＣＯＳポリペプチド（例えば、ＩＣＯＳの細胞内ドメインまたはその一部）を含む。ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、ヒトＩＣＯＳの細胞内ドメインまたはその一部を含む。ある特定の

実施形態では、ＩＣＯＳポリペプチドは、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿０３６２２４（配列番号６５）を有する配列またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％、少なくとも約１００％相同もしくは同一であり、および／または必要に応じて最大１つ、もしくは最大２つ、もしくは最大３つの保存的アミノ酸置換を含み得るアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＩＣＯＳポリペプチドは、少なくとも約２０、少なくとも約２５、または少なくとも約３０、または少なくとも約４０、または少なくとも約５０、および最大約１９９アミノ酸長である配列番号６５の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、ＩＣＯＳポリペプチドは、配列番号６５のアミノ酸１～１９９、１～５０、５０～１００、１００～１５０、または１５０～１９９のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。配列番号６５を以下に提供する。

【化８５】

```
1   MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGGQ
61  ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYYFCN LSIFDPPPFK
121 VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY
181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL [   配列番号   65]
```

【０２２３】

ある特定の実施形態では、本開示のメソテリン標的化ＣＡＲは、ヒト細胞において核酸配列を発現させるために誘導可能プロモーターをさらに含む。ＣＡＲ遺伝子の発現に使用するためのプロモーターは、構成的プロモーター、例えばユビキチンＣ（ＵｂｉＣ）プロモーターであり得る。

【０２２４】

ある特定の実施形態では、異なるタンパク質に由来するＣＡＲの突然変異部位および／またはドメイン／モチーフ／領域間の接合部は、脱免疫される。異なるＣＡＲ部分の間の接合部の免疫原性は、ＮｅｔＭＨＣ　４．０サーバーを使用して予測することができる。次の部分からの少なくとも１つのアミノ酸を含有する各々のペプチドに関して、全ての対立遺伝子に関してＨＬＡ　Ａ、Ｂ、およびＣに対する結合親和性を予測することができる。各々のペプチドの免疫原性のスコアを、各ペプチドに割付することができる。免疫原性スコアは、以下の式：免疫原性スコア＝［（５０－結合親和性）＊ＨＬＡ頻度］$_n$を使用して計算することができ、ｎは各ペプチドの予測数である。

【０２２５】

５．２．２．５．例示されたＣＡＲ

ある特定の実施形態では、メソテリン標的化ＣＡＲは：

（ａ）配列番号７６に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号７７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、および配列番号７８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を含むV_H；ならびに配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号８０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、および配列番号８１に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を含むV_Lを含む細胞外抗原結合ドメイン；

（ｂ）ＣＤ２８ポリペプチドを含む膜貫通ドメイン（例えば、ヒトＣＤ２８の膜貫通ドメインまたはその一部）；

（ｃ）ＣＤ２８ヒンジ／スペーサー領域（例えば、ヒトＣＤ２８のヒンジ／スペーサー領域またはその一部）；ならびに

（ｄ）（ｉ）天然のＩＴＡＭ１、２つの機能喪失突然変異からなるＩＴＡＭ２バリアント、および２つの機能喪失突然変異からなるＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチド（例えば、改変ヒトＣＤ３ζポリペプチド）、および（ｉｉ）ＣＤ２８ポリペプチド（例えば、ヒトＣＤ２８ポリペプチド、例えばヒトＣＤ２８の細胞内ドメインまたはその一部）を含む共刺激シグナル伝達領域を含む細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む。

【０２２６】

ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号９２（または配列番号９０のアミノ酸１５３～１７９）に記載のアミノ酸配列からなるＣＤ２８ポリペプチドを含む。

【０２２７】

ある特定の実施形態では、ＣＤ２８ヒンジ／スペーサー領域は、配列番号１５（または配列番号９０のアミノ酸１１４～１５２）に記載のアミノ酸配列からなる。

【０２２８】

ある特定の実施形態では、改変ＣＤ３ζポリペプチドは、配列番号３５に記載のアミノ酸配列からなる。

【０２２９】

ある特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、配列番号１０１（または配列番号９０のアミノ酸１８０～２２０）に記載のアミノ酸配列からなるＣＤ２８ポリペプチドを含む。

【０２３０】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５６に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％、少なくとも約１００％相同または同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含む。配列番号５６を以下に提供する。

【化８６】

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS
VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSRHQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWV
LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGE
RRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR [　配列番号　56]

【０２３１】

配列番号５６のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号５７に記載する。

【化８７－１】

CAGGTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTT
TCTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGT
GTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTAT
TGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCTGGA
GGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGT
CTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAAC
TGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTG
CCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGAT
TTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATC
AAGAGGACTGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACC
ATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTG
CTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG

【化８７－２】

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGC
AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAG
TACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG
GAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCC
CTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [　配列番号　57]

【０２３２】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ８リーダーをさらに含む。ある特定の実施形態では、ＣＤ８リーダーは配列番号７１に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【０２３３】

配列番号７１のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１２０に記載する。

【化８８】

ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCT
[配列番号 120]

【０２３４】

ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、以下に提供する配列番号４３に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％、少なくとも約１００％相同または同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。配列番号４３は、配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなるＣＤ８リーダーを含む。配列番号４３を以下に提供する：

【化８９】

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWI
RQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
EGKNGAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSRHQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA
SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
YYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLF
PGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
GKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHM
QALPPR [配列番号 43]

【０２３５】

配列番号４３のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号４４に記載する。

【化９０－１】

ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGGT
TCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTTT
CTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTG
GAGTGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAAC
TATCAGTGTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTG
CTGTTTATTATTGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTG
ACAGTCAGCTCTGGAGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGAT
GACTCAGTCCCCCTCCAGTCTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTC
AGAGCATATCATCCTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTAT
GCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCAC
ATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGC
CCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATCAAGAGGACTGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTAT
CCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTG

【化９０－２】

TCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGG
CTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC
CTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA
TGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG
CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT
TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG
CCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC
GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGAC
GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [　配列番号　44]

【０２３６】

５．２．３．例示されたポリペプチド組成物

ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるメソテリン標的化ＣＡＲ、および配列番号４８のアミノ酸２１～１６５を含むかまたはそれからなるＰＤ－１　ＤＮを含む。

【０２３７】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるメソテリン標的化ＣＡＲ、および配列番号４８のアミノ酸１～１６５を含むかまたはそれからなるＰＤ－１　ＤＮを含む。

【０２３８】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるメソテリン標的化ＣＡＲ、および配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＰＤ－１　ＤＮを含む。

【０２３９】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるメソテリン標的化ＣＡＲ、および配列番号１１８に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＰＤ－１　ＤＮを含む。

【０２４０】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるメソテリン標的化ＣＡＲ、および配列番号７１に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤ８リーダー、および配列番号４８のアミノ酸２１～１６５を含むかまたはそれからなるＰＤ－１　ＤＮを含む。

【０２４１】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるメソテリン標的化ＣＡＲ、および配列番号７１に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤ８リーダー、および配列番号４８のアミノ酸１～１６５を含むかまたはそれからなるＰＤ－１　ＤＮを含む。

【０２４２】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるメソテリン標的化ＣＡＲ、および配列番号７１に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤ８リーダー、および配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＰＤ－１　ＤＮを含む。

【０２４３】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるメソテリン標的化ＣＡＲ、および配列番号７１に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＣＤ８リーダー、および配列番号１１８に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるＰＤ－１　ＤＮを含む。

【０２４４】

５．３．免疫応答細胞

本開示の主題は、本明細書に開示されるポリペプチド組成物を含む免疫応答細胞を提供

する。ある特定の実施形態では、ＣＡＲは、免疫応答細胞を活性化することが可能である。ある特定の実施形態では、ポリペプチド組成物は、免疫応答細胞の抗腫瘍効果を促進することが可能である。細胞がＣＡＲおよびＰＤ－１　ＤＮを同時発現するように、免疫応答細胞にポリペプチド組成物を形質導入することができる。

【０２４５】

本開示の主題の免疫応答細胞は、リンパ系列の細胞であり得る。Ｂ、Ｔ、およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を含むリンパ系列は、抗体の産生、細胞性免疫系の調節、血液中の異物の検出、宿主に対して異物の細胞の検出等を提供する。リンパ系列の免疫応答細胞の非制限的な例としては、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、胚性幹細胞、および多能性幹細胞（例えば、リンパ系の細胞がそこから分化し得る細胞）が挙げられる。Ｔ細胞は胸腺において成熟し、細胞性免疫の主な原因であるリンパ球であり得る。Ｔ細胞は、適応免疫系に関与する。本開示の主題のＴ細胞は、ヘルパーＴ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞（セントラルメモリーＴ細胞、幹細胞様メモリーＴ細胞（または幹細胞様メモリーＴ細胞）、および２つのタイプのエフェクターメモリーＴ細胞：例えば、T_{EM}細胞およびT_{EMRA}細胞、制御性Ｔ細胞（サプレッサーＴ細胞としても公知である）、ナチュラルキラーＴ細胞、粘膜関連インバリアントＴ細胞、およびγδＴ細胞が挙げられるがこれらに限定されない任意のタイプのＴ細胞であり得る。細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬまたはキラーＴ細胞）は、感染した体細胞または腫瘍細胞の死を誘導することが可能なＴリンパ球のサブセットである。患者自身のＴ細胞は、抗原認識受容体、例えばＣＡＲまたはＴＣＲの導入を通して特定の抗原を標的化するように遺伝子改変され得る。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞はＴ細胞である。Ｔ細胞は、$CD4^+$　Ｔ細胞または$CD8^+$　Ｔ細胞であり得る。ある特定の実施形態では、Ｔ細胞は$CD4^+$　Ｔ細胞である。ある特定の実施形態では、Ｔ細胞は$CD8^+$　Ｔ細胞である。

【０２４６】

ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、細胞性免疫の一部であり、自然免疫応答の際に作用するリンパ球であり得る。ＮＫ細胞は、標的細胞に対してその細胞傷害作用を行うために、あらかじめ活性化を必要としない。

【０２４７】

本開示の主題のヒトリンパ球のタイプとしては、末梢血ドナーリンパ球、例えばSadelain, M., et al. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45（ＣＡＲを発現するように遺伝子改変された末梢血ドナーリンパ球を開示する）、Morgan, R.A., et al. 2006 Science 314:126-129（αおよびβヘテロ二量体を含む全長の腫瘍抗原認識Ｔ細胞受容体複合体を発現するように遺伝子改変された末梢血ドナーリンパ球を開示する）、Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:4382-4392（腫瘍生検中の腫瘍浸潤性リンパ球（ＴＩＬ）に由来するリンパ球培養物を開示する）、およびDupont, J., et al. 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A., et al. 2003 Blood 102:2498-2505（人工の抗原提示細胞（ＡＡＰＣ）またはパルスした樹状細胞を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏで選択的に増大させた抗原特異的末梢血白血球を開示する）に開示されるリンパ球が挙げられるがこれらに限定されない。免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）は、自己、非自己（例えば、同種）であり得るか、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで操作された前駆細胞もしくは幹細胞に由来し得る。

【０２４８】

ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答細胞は、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるメソテリン標的化ＣＡＲ、および配列番号４８のアミノ酸１～１６５を含むかまたはそれからなるＰＤ－１　ＤＮを含む。

【０２４９】

ある特定の実施形態では、本開示の主題のＣＡＲおよび／またはＰＤ－１／ＤＮポリペプチドの１つまたは複数を含む本開示の免疫応答細胞は、同種または自己ＥＢＶ感作細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）である。例えば、ＥＢＶ感作細胞傷害性Ｔ細胞の生成は、Ｅ

ＢＶ血清陽性自己または同種ドナーからＰＢＭＣを単離すること、ならびに単球およびＮＫ細胞の枯渇によってＴ細胞に関してそれらを濃縮することを伴い得る。ＥＢＶ感作細胞傷害性Ｔ細胞はまた、１つまたは複数のＥＢＶ抗原を発現し、ＥＢＶ抗原を非刺激Ｔ細胞に提示する「刺激」細胞に、ドナーＰＢＭＣまたは精製ドナーＴ細胞を接触させることによっても産生され、それによってＥＢＶ感作ＣＴＬの刺激および増大を引き起こし得る。特に、ある特定の実施形態では、そのような方法は、ＣＤ３$^+$細胞を含む対象からの細胞（例えば、ＰＢＭＣ）試料を得ること、および前記ＣＤ３$^+$細胞に抗原および／または抗原提示刺激細胞を接触させることを含む。ある特定の実施形態では、ＣＤ３$^+$　Ｔ細胞を試料から単離した後、当技術分野で公知の方法によって抗原に接触させる（例えば、試料からのＣＤ３$^+$細胞の正の選択および／または試料から望ましくない細胞または構成成分を枯渇させることによる負の選択）。ある特定の実施形態では、そのような方法は、抗ＣＤ３ビーズ（例えば、磁気ビーズ）による蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）、プラスチック接着、抗ＣＤ５６を使用するＮＫ細胞の枯渇、エルトリエーション、および／またはその組合せを使用する選択を含む。ＥＢＶ抗原としては、例えば、潜伏期膜タンパク質（ＬＭＰ）およびＥＢＶ核抗原（ＥＢＮＡ）タンパク質、例えばＬＭＰ－１、ＬＭＰ－２Ａ、およびＬＭＰ－２Ｂ、ならびにＥＢＮＡ－１、ＥＢＮＡ－２、ＥＢＮＡ－３Ａ、ＥＢＮＡ－３Ｂ、ＥＢＮＡ－３Ｃ、およびＥＢＮＡ－ＬＰが挙げられる。１つまたは複数のＥＢＶ特異抗原を認識するＴ細胞受容体を含む細胞傷害性Ｔ細胞は、それらのＥＢＶ抗原に「感作」されていると思われ、したがって本明細書において「ＥＢＶ感作細胞傷害性Ｔ細胞」と称される。本開示のＣＡＲポリペプチドの１つまたは複数を含み得る同種または自己ＥＢＶ特異的細胞傷害性Ｔ細胞集団を生成するための公知の方法は、例えばBarker et al., Blood 116(23):5045-49 (2010); Doubrovina et al., Blood 119(11):2644-56 (2012); Koehne et al., Blood 99(5):1730-40 (2002);およびSmith et al., Cancer Res. 72(5):1116-25 (2012)に記載され、これはこれらの教示に関して参照により組み込まれる。同様に、細胞傷害性Ｔ細胞は、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、パピローマウイルス（例えば、ＨＰＶ）、アデノウイルス、ポリオーマウイルス（例えば、ＢＫＶ、ＪＣＶ、およびＭｅｒｋｅｌ細胞ウイルス）、レトロウイルス（例えば、ＨＴＬＶ－Ｉ、ＨＩＶなどのレンチウイルスも含む）、ピコルナウイルス（例えば、Ａ型肝炎ウイルス）、ヘパドナウイルス（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス）、ヘパシウイルス（例えば、Ｃ型肝炎ウイルス）、デルタウイルス（例えば、Ｄ型肝炎ウイルス）、ヘペウイルス（例えば、Ｅ型肝炎ウイルス）等を含む他のウイルス抗原に「感作され」得る。ある特定の実施形態では、標的抗原は腫瘍ウイルスに由来する。ある特定の実施形態では、本開示のＣＡＲ－Ｔ細胞を生成するために使用されるＴ細胞は、多機能Ｔ細胞、例えば単一の免疫エフェクター（例えば、サイトカインまたはＣＤ１０７ａなどの単一のバイオマーカー）のみを産生する細胞より、病原体に対して有効な免疫応答を提供する複数の免疫エフェクター機能を誘導することが可能なＴ細胞である。あまり多機能ではない、単機能の、またはさらに「疲弊した」Ｔ細胞は、慢性的な感染症の際の免疫応答を支配し、このように、ウイルス関連合併症に対する保護に負の影響を及ぼし得る。ある特定の実施形態では、本開示のＣＡＲ－Ｔ細胞は多機能である。ある特定の実施形態では、本開示のＣＡＲ－Ｔ細胞を生成するために使用されるＴ細胞の少なくとも約５０％がＣＤ４$^+$Ｔ細胞である。ある特定のそのような実施形態では、Ｔ細胞は、約５０％未満のＣＤ４$^+$Ｔ細胞である。ある特定の実施形態では、Ｔ細胞は主にＣＤ４$^+$Ｔ細胞である。

【０２５０】

ある特定の実施形態では、本開示のＣＡＲ－Ｔ細胞を生成するために使用されるＴ細胞の少なくとも約５０％は、ＣＤ８$^+$　Ｔ細胞である。ある特定のそのような実施形態では、Ｔ細胞は、約５０％未満のＣＤ８$^+$　Ｔ細胞である。ある特定の実施形態では、Ｔ細胞は主にＣＤ８$^+$　Ｔ細胞である。ある特定の実施形態では、Ｔ細胞（例えば、本明細書に記載の感作されたＴ細胞および／またはＣＡＲ－Ｔ細胞）は、細胞ライブラリまたはバンクに保存された後、対象に投与される。

【０２５１】

本開示の免疫応答細胞は、免疫応答細胞がメソテリン特異的ＣＡＲと少なくとも１つの外因性の共刺激リガンドとを同時発現するように、または同時発現するように誘導されるように、少なくとも１つの外因性の共刺激リガンドをさらに含み得る。メソテリン特異的ＣＡＲと少なくとも１つの共刺激リガンドとの間の相互作用は、免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）の完全な活性化にとって重要な非抗原特異的シグナルを提供する。共刺激リガンドとしては、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーメンバー、および免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーリガンドのメンバーが挙げられるがこれらに限定されない。ＴＮＦは、全身の炎症に関係するサイトカインであり、急性期反応を刺激する。その主な役割は、免疫細胞の調節である。ＴＮＦスーパーファミリーメンバーは、複数の共通の特色を共有する。ＴＮＦスーパーファミリーメンバーの大多数は、短い細胞質セグメントおよび比較的長い細胞外領域を含有するＩＩ型膜貫通タンパク質（細胞外Ｃ末端）として合成される。ＴＮＦスーパーファミリーメンバーとしては、神経成長因子（ＮＧＦ）、ＣＤ４０Ｌ（ＣＤ４０Ｌ）／ＣＤ１５４、ＣＤ１３７Ｌ／４－１ＢＢＬ、ＴＮＦ－α、ＣＤ１３４Ｌ／ＯＸ４０Ｌ／ＣＤ２５２、ＣＤ２７Ｌ／ＣＤ７０、Ｆａｓリガンド（ＦａｓＬ）、ＣＤ３０Ｌ／ＣＤ１５３、腫瘍壊死因子ベータ（ＴＮＦβ）／リンフォトキシン－アルファ（ＬＴα）、リンフォトキシン－ベータ（ＬＴβ）、ＣＤ２５７／Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）／Ｂｌｙｓ／ＴＨＡＮＫ／Ｔａｌｌ－１、グルココルチコイド誘導ＴＮＦ受容体リガンド（ＧＩＴＲＬ）、およびＴＮＦ関連アポトーシス誘導リガンド（ＴＲＡＩＬ）、ＬＩＧＨＴ（ＴＮＦＳＦ１４）が挙げられるがこれらに限定されない。免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーは、細胞の認識、結合、または接着プロセスに関係する細胞表面および可溶性タンパク質の大きい群である。これらのタンパク質は、免疫グロブリンと構造特色を共有し、それらは免疫グロブリンドメイン（フォールド）を有する。免疫グロブリンスーパーファミリーリガンドとしては、いずれもＣＤ２８のリガンドであるＣＤ８０およびＣＤ８６、ＰＤ－１のリガンドであるＰＤ－Ｌ１／（Ｂ７－Ｈ１）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０２５２】

ある特定の実施形態では、少なくとも１つの共刺激リガンドは、４－１ＢＢＬ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ７０、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ４８、ＴＮＦＲＳＦ１４、ＰＤ－Ｌ１、およびその組合せからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、共刺激リガンドは４－１ＢＢＬである。４－１ＢＢＬは、メソテリン標的化ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインの５’末端に共有結合することができる。あるいは、４－１ＢＢＬは、メソテリン標的化ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインの３’末端に共有結合することができる。

【０２５３】

さらに、本開示の免疫応答細胞は、免疫応答細胞がメソテリン標的化ＣＡＲと少なくとも１つの外因性のサイトカインとを同時発現するかまたは同時発現するように誘導されるように、少なくとも１つの外因性サイトカインをさらに含み得る。ある特定の実施形態では、少なくとも１つの外因性サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、およびＩＬ－２１からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、少なくとも１つの外因性サイトカインは、ＩＬ－１２を含む。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は、メソテリン標的化ＣＡＲと外因性ＩＬ－１２とを同時発現する。ＩＬ－１２は、メソテリン標的化ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインの３’末端に共有結合することができる。

【０２５４】

加えて、免疫応答細胞は、メソテリンまたはメソテリン以外の抗原である第２の抗原に結合する第２のＣＡＲを発現することができる。本開示の主題のメソテリン特異的ＣＡＲと組み合わせて第２のＣＡＲとして使用することができるＣＡＲは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Sadelain, et al., "The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design." Cancer Discovery, OF1-11, (2013), Chicaybam, et al., (2011), Brentjens et al. Nature Medicine 9:279- 286 (2003)、および米国特許第７，４４６，１９０号に記載されるＣＡＲ、例えばＣＤ１９標的化

ＣＡＲ（米国特許第７，４４６，１９０号；米国特許出願公開第２０１３／００７１４１４号を参照されたい）、ＨＥＲ２標的化ＣＡＲ（Ahmed, et al., Clin Cancer Res., 2010を参照されたい）、ＭＵＣ１６標的化ＣＡＲ（Chekmasova, et al., 2011を参照されたい）、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）標的化ＣＡＲ（例えば、Zhong, et al., Molecular Therapy, 18(2):413-420 (2010)）を含み、その全ての全体が参照により本明細書に組み込まれる。２つまたはそれより多くの抗原認識受容体（例えば、ＣＡＲ）を発現する免疫応答細胞は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１４／０５５６６８号に記載されている。

【０２５５】

第２の抗原は、腫瘍抗原または病原体抗原であり得る。任意の適した腫瘍抗原（抗原性ペプチド）が、本明細書に記載の腫瘍関連実施形態での使用にとって適している。腫瘍抗原の起源は、がんタンパク質を含むがこれらに限定されない。第２の抗原は、ペプチドとしてまたはインタクトなタンパク質もしくはその一部として発現され得る。インタクトなタンパク質またはその一部は、天然であり得るかまたは突然変異を受け得る。適した第２の抗原としては、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）および前立腺幹細胞抗原（ＰＣＳＡ）が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、炭酸脱水素酵素ＩＸ（ＣＡＩＸ）、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ１０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＣＤ４１、ＣＤ４４、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ５６、ＣＤ７４、ＣＤ１２３、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）感染細胞の抗原（例えば、細胞表面抗原）、上皮糖タンパク質２（ＥＧＰ２）、上皮糖タンパク質－４０（ＥＧＰ－４０）、上皮細胞接着分子（ＥｐＣＡＭ）、受容体チロシンタンパク質キナーゼＥｒｂ－Ｂ２、Ｅｒｂ－Ｂ３、Ｅｒｂ－Ｂ４、葉酸結合タンパク質（ＦＢＰ）、致死性アセチルコリン受容体（ＡＣｈＲ）、葉酸受容体－ａ、ガングリオシドＧ２（ＧＤ２）、ガングリオシドＧ３（ＧＤ３）、ヒト上皮成長因子受容体２（ＨＥＲ－２）、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（ｈＴＥＲＴ）、インターロイキン－１３受容体サブユニットアルファ－２（ＩＬ－１３Ｒα２）、κ－軽鎖、キナーゼ不活化ドメイン受容体（ＫＤＲ）、ＬｅｗｉｓＡ（ＣＡ１９．９）、ＬｅｗｉｓＹ（ＬｅＹ）、Ｌ１細胞接着分子（ＬｌＣＡＭ）、黒色腫抗原ファミリーＡ１（ＭＡＧＥ－ＡＩ）、ムチン１６（Ｍｕｃ－１６）、ムチン１（Ｍｕｃ－１）、ＮＫＧ２Ｄリガンド、がん精巣抗原ＮＹ－ＥＳＯ－１、癌胎児性抗原（ｈ５Ｔ４）、前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ）、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、腫瘍関連糖タンパク質７２（ＴＡＧ－７２）、血管内皮増殖因子Ｒ２（ＶＥＧＦ－Ｒ２）、ウィルムス腫瘍タンパク質（ＷＴ－１）、１型チロシンタンパク質キナーゼ膜貫通受容体（ＲＯＲ１）、またはその組合せであり得る。

【０２５６】

例えば免疫無防備の対象における病原体感染症または他の感染疾患の処置に使用するための適した病原性抗原としては、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、およびインフルエンザウイルスに存在するウイルス抗原が挙げられるがこれらに限定されない。ウイルス抗原を標的化する第２のＣＡＲを含む免疫応答細胞を、ウイルス疾患を処置するために使用することができる。ある特定の実施形態では、メソテリン標的化ＣＡＲおよびＣＭＶ抗原に結合する第２のＣＡＲを免疫応答細胞（例えば、細胞傷害性Ｔリンパ球）において同時発現させ、ＣＭＶの処置に使用することができる。

【０２５７】

本開示の主題の方法に使用することができるメソテリン特異的またはメソテリン標的化ヒトリンパ球としては、末梢血ドナーリンパ球、例えばSadelain, M., et al. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45（ＣＡＲを発現するように遺伝子改変された末梢血ドナーリンパ球を開示する）、Morgan, R.A., et al. 2006 Science 314:126-129（αおよびβヘテロ二量体を含む全長の腫瘍抗原認識Ｔ細胞受容体複合体を発現するように遺伝子改変された末梢血ドナーリンパ球を開示する）、Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:4382-4

392（腫瘍生検中の腫瘍浸潤性リンパ球（ＴＩＬ）に由来するリンパ球培養物を開示する）、およびDupont, J., et al. 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A., et al. 2003 Blood 102:2498-2505（人工の抗原提示細胞（ＡＡＰＣ）またはパルスした樹状細胞を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏで選択的に増大させた抗原特異的末梢血白血球を開示する）に開示されるリンパ球が挙げられるがこれらに限定されない。免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）は自己、非自己（例えば、同種）であり得るか、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで操作された前駆細胞または幹細胞に由来し得る。

【０２５８】

アッセイを使用して、メソテリン標的化ＣＡＲ形質導入Ｔ細胞の増殖、エフェクター機能、および繰り返し（毎週の）抗原刺激による蓄積の増強に及ぼす共刺激シグナル伝達の影響を比較してもよい。末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を、ＩＲＢによって承認されたプロトコールに従って健康なボランティアから採取し、形質導入してもよい。遺伝子移入効率を、ＦＡＣＳ解析によってモニターしてＧＦＰ$^{+}$（形質導入）Ｔ細胞分画を定量してもよく、および／または定量的ＰＣＲによってモニターしてもよい。十分に確立された同時培養システム（Gade, T.P., et al. Cancer Res. 65, 9080-9088 (2005); Gong, M.C., et al. Neoplasia. 1, 123-127 (1999); Latouche, J.B. & Sadelain, M. Nat.Biotechnol. 18, 405-409 (2000)）を使用して、メソテリンを発現する線維芽細胞ＡＡＰＣ（メソテリン対照と比較して）が、形質導入したＴ細胞（ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、およびＧＭ－ＣＳＦに関する細胞上清ＬＵＭＩＮＥＸアッセイ）からのサイトカイン放出、Ｔ細胞増殖（ＣＦＳＥ標識による）、およびＴ細胞生存（アネキシンＶ染色による）を方向づけるか否かを決定してもよい。Ｔ細胞の生存、増殖、および有効性に及ぼすＣＤ８０および／または４－１ＢＢＬの影響を評価してもよい。Ｔ細胞を、メソテリン$^{+}$（ＭＳＬＮ$^{+}$）標的細胞による繰り返し刺激に曝露し、Ｔ細胞増殖およびサイトカイン応答が繰り返し刺激によって類似のままであるかまたは減損するか否かを決定してもよい。複数のＥ：Ｔ比による細胞傷害アッセイを、クロム放出アッセイを使用して実施してもよい。統計分析を、必要に応じて二元配置ＡＮＮＯＶＡの後に対応のある多重比較手順によって実施してもよく、この場合データは平均値±ＳＥＭとして発現され得る。ＣＤ４およびＣＤ８　Ｔ細胞サブタイプ（活性化エフェクター、セントラルメモリー、エフェクターメモリー）を同定して、いずれの条件がセントラルメモリー表現型の維持または増大に都合がよいかを決定してもよい。

【０２５９】

ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）は、約１～約４、約２～約４、約３～約４、約１～約２、約１～約３、または約２～約３ベクターコピー数／細胞のメソテリン標的化ＣＡＲを発現する。例えば、本開示の免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）は、約１、約２、約３、または約４ベクターコピー数／細胞のメソテリン標的化ＣＡＲを発現する。ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）は、約３～約４ベクターコピー数／細胞のメソテリン標的化ＣＡＲを発現する。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）の細胞傷害性およびサイトカイン産生は、細胞におけるメソテリン特異的ＣＡＲの発現レベルと比例する。例えば、免疫応答細胞におけるＣＡＲ発現レベルがより高ければ、免疫応答細胞が示す細胞傷害性およびサイトカイン産生はより高くなる。高いメソテリン－ＣＡＲ発現レベルを有する免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）は、抗原特異的サイトカイン産生または分泌を誘導することができ、および／または低レベル、例えば、約２，０００個またはそれ未満、約１，０００個またはそれ未満、約９００個またはそれ未満、約８００個またはそれ未満、約７００個またはそれ未満、約６００個またはそれ未満、約５００個またはそれ未満、約４００個またはそれ未満、約３００個またはそれ未満、約２００個またはそれ未満、約１００個またはそれ未満のメソテリン結合部位／細胞のメソテリン発現を有する組織または細胞に対して細胞傷害性を示すことができる。加えてまたはあるいは、本開示の免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）の細胞傷害性およびサイトカイン産生は、標的組織または標的細胞におけるヒトメソテリンの発現レベルと比例する。例えば、標的におけるヒトメソテリンの発現レベルが

高ければ、免疫応答細胞が示す細胞傷害性およびサイトカイン産生はより高くなる。
【０２６０】
ある特定の実施形態では、標的細胞は、不均一なＭＳＬＮ発現細胞であり、これはＭＳＬＮ低発現細胞とＭＳＬＮ高発現細胞とを含む細胞集団である。本開示の免疫応答細胞は、ＭＳＬＮ高発現細胞の存在下で、ＭＳＬＮ低発現細胞（例えば、約２，０００個もしくはそれ未満、約１，０００個もしくはそれ未満、約９００個もしくはそれ未満、約８００個もしくはそれ未満、約７００個もしくはそれ未満、約６００個もしくはそれ未満、約５００個もしくはそれ未満、約４００個もしくはそれ未満、約３００個もしくはそれ未満、約２００個もしくはそれ未満、または約１００個もしくはそれ未満のＭＳＬＮ結合部位／細胞）に対して増加した細胞傷害性および抗腫瘍活性を示すことができる。ある特定の実施形態では、ＭＳＬＮ高発現細胞の存在下であっても、免疫応答細胞は、ＭＳＬＮ陰性細胞に対して増加した細胞傷害性または非特異的死滅を示さない。このように、免疫応答細胞は、ＭＳＬＮ高発現細胞の存在下でＭＳＬＮ低発現細胞に対して増加した細胞傷害性および抗腫瘍活性を示し得るが、ＭＳＬＮ陰性細胞に対する安全性を保持する。
【０２６１】
ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は、特にＣＡＲが低親和性ＣＡＲである場合に、ＭＳＬＮ特異的ＣＡＲの結合力を増加させることができる１つまたは複数の接着分子を発現することができる。接着分子の非制限的な例としては、ＣＤ２およびＶＬＡ－４が挙げられる。免疫応答細胞上に発現されるＣＤ２は、標的細胞（例えば、がん様細胞）上に発現されるＣＤ５８に結合することができる。免疫応答細胞上に発現されるＶＬＡ－４は、標的細胞（例えば、がん様細胞）上のＶＣＡＭ－１に結合することができる。
【０２６２】
非精製のＣＴＬ起源、例えば骨髄、胎児、新生児、もしくは成人起源、または他の造血細胞起源、例えば胎児肝、末梢血、もしくは臍帯血が当技術分野で公知であり得る。様々な技術を使用して細胞を分離することができる。例えば、負の選択方法は最初に非ＣＴＬを除去することができる。ｍＡｂは、正の選択および負の選択の両方にとって特定の細胞系列および／または分化段階に関連するマーカーを同定するために特に有用である。
【０２６３】
最初に、最終分化細胞の大部分を比較的おおまかな分離によって除去することができる。例えば、磁気ビーズ分離を最初に使用して多数の無関係な細胞を除去することができる。ある特定の実施形態では、造血細胞全体の少なくとも約８０％、通常少なくとも７０％が細胞単離の前に除去される。
【０２６４】
分離手順としては、密度勾配遠心分離；再沈降；細胞密度を改変する粒子とのカップリング；抗体コーティング磁気ビーズによる磁気分離；アフィニティクロマトグラフィー；補体および細胞毒素を含むがこれらに限定されない、ｍＡｂに結合したまたはそれと共に使用される細胞傷害剤；ならびに固体マトリックス、例えばプレート、チップに結合した抗体によるパニング、エルトリエーション、または他の任意の簡便な技術が挙げられるがこれらに限定されない。
【０２６５】
分離および分析のための技術としては、様々な程度の精巧化、例えば複数のカラーチャネル、小角および鈍角光散乱検出チャネル、インピーダンスチャネルを有し得るフローサイトメトリーが挙げられるがこれらに限定されない。
【０２６６】
細胞は、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）などの死細胞に関連する色素を使用することによって死細胞に対して選択することができる。ある特定の実施形態では、細胞は、２％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）もしくは０．２％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含む培地、または他の任意の適した、例えば無菌的な等張培地に収集される。
【０２６７】
５．４．核酸組成物およびベクター

本開示の主題は、本明細書に開示されるポリペプチド組成物（例えば、５．２節に開示される）をコードする核酸組成物を提供する。ある特定の実施形態では、核酸組成物は、本明細書に開示されるポリペプチド組成物（例えば、５．２節に開示される）をコードするポリヌクレオチドを含む。また、そのような核酸組成物を含むベクターおよびそのような核酸組成物またはベクターを含む細胞も提供される。

【０２６８】

ある特定の実施形態では、核酸組成物は、ポリペプチド組成物に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。ある特定の実施形態では、プロモーターは内因性または外因性である。ある特定の実施形態では、外因性プロモーターは伸長因子（ＥＦ）－１プロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＰＧＫプロモーター、およびメタロチオネインプロモーターから選択される。ある特定の実施形態では、プロモーターは誘導型プロモーターである。ある特定の実施形態では、誘導型プロモーターは、ＮＦＡＴ転写応答エレメント（ＴＲＥ）プロモーター、ＣＤ６９プロモーター、ＣＤ２５プロモーター、およびＩＬ－２プロモーターから選択される。

【０２６９】

核酸組成物は、当技術分野で公知のまたは本明細書で記載される方法によって対象に投与することができ、および／または細胞に送達することができる。

【０２７０】

免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞またはＮＫ細胞）の遺伝子改変は、実質的に均一な細胞組成物に組換えＤＮＡ構築物を形質導入することによって達成され得る。ある特定の実施形態では、ＤＮＡ構築物を細胞に導入するために、レトロウイルスベクター（ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス）を使用する。例えば抗原認識受容体をコードするポリヌクレオチドを、レトロウイルスベクターにクローニングすることができ、発現を、その内因性プロモーターから、レトロウイルス長鎖末端反復配列から、または目的の標的細胞タイプに特異的なプロモーターから駆動することができる。非ウイルスベクターも同様に使用され得る。

【０２７１】

抗原認識受容体（例えば、ＣＡＲまたはＴＣＲ）を含むように免疫応答細胞を最初に遺伝子改変する場合、一般的に形質導入のためにレトロウイルスベクターを使用するが、他の任意の適したウイルスベクターまたは非ウイルス送達システムも使用することができる。ＣＡＲおよびＰＤ－１　ＤＮは、単一の多シストロン性発現カセット中に、単一のベクターの複数の発現カセット中に、または複数のベクター中に構築することができる。多シストロン性発現カセットを作製するエレメントの例としては、様々なウイルスおよび非ウイルス性の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ、例えばＦＧＦ－１　ＩＲＥＳ、ＦＧＦ－２　ＩＲＥＳ、ＶＥＧＦ　ＩＲＥＳ、ＩＧＦ－ＩＩ　ＩＲＥＳ、ＮＦ－κＢ　ＩＲＥＳ、ＲＵＮＸ１　ＩＲＥＳ、ｐ５３　ＩＲＥＳ、Ａ型肝炎ＩＲＥＳ、Ｃ型肝炎ＩＲＥＳ、ペスチウイルスＩＲＥＳ、アフトウイルスＩＲＥＳ、ピコルナウイルスＩＲＥＳ、ポリオウイルスＩＲＥＳ、および脳心筋炎ウイルスＩＲＥＳ）、および切断可能リンカー（例えば、２Ａペプチド、例えばＰ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｅ２Ａ、およびＦ２Ａペプチド）が挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、Ｐ２Ａペプチドは、以下に提供する配列番号１０７に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる：

【化９１】

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM [　配列番号　107]

【０２７２】

ある特定の実施形態では、Ｐ２Ａペプチドは、以下に提供する配列番号１２１に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる：

【化９２】

ATNFSLLKQAGDVEENPGP [　配列番号　121]

【０２７３】
配列番号１２１のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列を、以下に提供する配列番号１２２に記載する：
【化９３】
GCAACAAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCA [配列番号 122]

【０２７４】
カプシドタンパク質がヒト細胞に感染するために機能的である場合、レトロウイルスベクターと適切なパッケージング細胞系との組合せもまた適切である。ＰＡ１２（Miller, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437）；ＰＡ３１７（Miller, et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902）；およびＣＲＩＰ（Danos, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464）を含むがこれらに限定されない様々な両種指向性ウイルス産生細胞系が公知である。非両種指向性粒子、例えばＶＳＶＧ、ＲＤ１１４、またはＧＡＬＶエンベロープによってシュードタイピングした粒子および当技術分野で公知の他の任意の粒子もまた適している。
【０２７５】
可能性がある形質導入方法はまた、例えばBregni, et al. (1992) Blood 80:1418-1422の方法による細胞と産生細胞との直接同時培養、または例えばXu, et al. (1994) Exp. Hemat. 22:223-230；およびHughes, et al. (1992) J. Clin. Invest. 89:1817の方法による適切な増殖因子およびポリカチオンの存在下または非存在下でのウイルス上清単独または濃縮ベクター保存液との培養を含む。
【０２７６】
他の形質導入ウイルスベクターを使用して免疫応答細胞を改変することができる。ある特定の実施形態では、選択されたベクターは、高い感染効率ならびに安定な組み込みおよび発現を示す（例えば、Cayouette et al., Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido et al., Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer et al., Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini et al., Science 272:263-267, 1996;および Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997を参照されたい）。使用することができる他のウイルスベクターとしては、例えばアデノウイルス、レンチウイルス、およびアデノ（adena）随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルス、ウシパピローマウイルス、またはヘルペスウイルス、例えばエプスタインバーウイルス（例えば、Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis et al., BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev et al., Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller et al., Biotechnology 7:980-990, 1989; LeGal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993;およびJohnson, Chest 107:77S- 83S, 1995のベクターも参照されたい）が挙げられる。レトロウイルスベクターは特に十分に開発されており、臨床の状況で使用されている（Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990； Anderson et al.,米国特許第５，３９９，３４６号）。
【０２７７】
ある特定の実施形態では、本開示のポリペプチド組成物をコードするベクターは、レトロウイルスベクター、例えばモロニーマウス白血病に基づくレトロウイルスベクターであり得るＳＧＦγ－レトロウイルスベクターである。ある特定の実施形態では、ベクターは、以下に提供する配列番号１２３に記載のヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる：

【化９４－１】

ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGGTTCAG
CTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTTTCTGGAGGC
AGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAGTGGATTGGG
TACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGTGTGGACACA
AGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTATTGTGCCAGG
GAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCTGGAGGTGGAGGC
TCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGTCTTTCTGCC
TCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAACTGGTACCAG
CAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCAAGCAGG
TTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGATTTTGCCACC
TACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATCAAGAGGACT
gcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccat
gtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctggtggtg
gttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaag
aggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattac
cagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcc
cccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtt
ttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctg
tTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTcagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggagg
ggcaaggggcacgatggcctttTccaggggctcagtacagccaccaaggacacctTcgacgcccttcacatg
caggccctgccccctcgcGGATCTGGAGCAACAAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGGAGGAG
AATCCCGGCCCAATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGG
CCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTG
ACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTAC
CGCATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGAC
TGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAAT
GACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCA
GAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGC
CAGGCGGCCGCACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCC
TGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTT
TACTGCAACCACAGGCGGATCCAATAAcagccactcgaggatccGGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGA
TATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGA
TAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGC
TAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGT
CAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAG
GGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCT
CAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTC
CAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCT
GTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGA
TTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCT
GTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACACATGCAGCATGTAT
CAAAATTAATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACATTGGCTTC
CTTGAAATAAACATGGAGTATTCAGAATGTGTCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTATCTCCATTGGCT
TTCTACTTTTTCTTTTATTTTTTTTTGTCCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTTGTTTGTTTGTTT
GTTGGTTGGTTGGTTAATTTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTCAAGCTAGACTATTAGCTACTCTGTA
ACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTTCCCACATCTAAGATTACAGGTATGAG
CTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATTGATTGATGTGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGTGACT
GTGAAAATGTGTGTATGGGTGTGTGTGAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GCATGTGTGTGTGTGTGACTGTGTCTATGTGTATGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTTGTGAAAAAATATTCTATGGTAGTGAGAGCCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTGGTT
TTTGAGACAGAGTCTTTCACTTAGCTTGGAATTCactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaacc

【化９４－２】

ctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggccc
gcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctcctta
cgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaa
gccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttaca
gacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgatga
cgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggt
ggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccg
ctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttc
cgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaa
gtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatc
cttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggta
ttatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgag
tactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacc
atgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttg
cacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgac
gagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttact
ctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcc
cttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagca
ctggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaa
cgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactca
tatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttttgataat
ctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaagga
tcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtg
gtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacca
aatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctc
gctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaaga
cgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcga
acgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaag
gcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcc
tggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggg
gggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctggccttttgct
cacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgatacc
gctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaa
ccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggc
agtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccg
gctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgcc
AAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCAAACTCAAATATATAAAGCATTTGACTTGTTCTATGCC
CTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTTTTAACATTTAAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACAGA
TGTTTTTATTTCATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAATA
AAAATAGATAAACGTGGAAATTACTTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCCTTCCTCAGTTGACAACATAAAT
GCGCTGCTGAGCAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATCAATTTCCCATTATGCCAGTCATATTAATTACTAGT
CAATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTGAATGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGC
TTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGG
AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCC
AAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGG
GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGG
GTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTC
GCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGA
CTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTC
CTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGAT
CGGGAGACCCCTGCCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTG
TCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCGGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATC
TGGCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCGGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTC
GGGGGCCGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTT
AGAGGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCT
TTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCGTCTTGTCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGAC
TGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGGCCCGGGCTAGcctgttaccactCCCTTAAGTTTGACCTTAGG
TCACTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTT
CTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCAC
CCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTccccTACATCGTGACCTG
GGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCC

【化９４－３】

TCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCT
CACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCCCCGCCCCTTGTAAACTT
CCCTGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGT
CCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAACTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCC
TTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACC
TTACACAGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCCA
CGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCC [　配列番号　123]

【０２７８】

ある特定の実施形態では、ベクターは、以下に提供する配列番号１２４に記載のヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる：

【化９５－１】

ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAG
GTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTTTCT
GGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAGTGG
ATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGTGTG
GACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTATTGT
GCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCTGGAGGT
GGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGTCTT
TCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCA
AGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGATTTT
GCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATCAAG
AGGACTgcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccatt
atccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctg
gtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgagg
agtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaag
cattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgca
gacgccccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtac
gatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaa
ggcctgtTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTcagtgagattgggatgaaaggcgagcgc
cggaggggcaaggggcacgatggcctttTccaggggctcagtacagccaccaaggacacctTcgacgccctt
cacatgcaggccctgcccccctcgcGGATCTGGAGCAACAAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTG
GAGGAGAATCCCGGCCCAATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGC
TGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTC
GTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAAC
TGGTACCGCATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGC
CAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGG
CGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTG
CGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCA
GCCGGCCAGGCGGCCGCACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCG
CAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAC
TTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATC
ACCCTTTACTGCAACCACAGGCGGATCCAATAAcagccactcgaggatccGGATTAGTCCAATTTGTTAAAG
ACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGC
CATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTG
GCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGAT
CAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCG
GCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCC
CCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGA
TGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTC
GCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTC
CTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGT
CTCGCTGTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACATGCAGCAT
GTATCAAAATTAATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACATTGG
CTTCCTTGAAATAAACATGGAGTATTCAGAATGTGTCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTATCTCCATT
GGCTTTCTACTTTTTCTTTTATTTTTTTTTGTCCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTTGTTTGTTT
GTTTGTTGGTTGGTTGGTTAATTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTCAAGCTAGACTATTAGCTACTC
TGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTTCCCACATCTAAGATTACAGGTA
TGAGCTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATTGATTGATGTGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGT
GAtTGTGtAtATGTGTGTATGGtTGTGTGTGAtTGTGTGTATGTATGTtTGTGTGTGAtTGTGTGTGTGTGa
tTGTGCATGTGTGTGTGTGTGAtTGTGTtTATGTGTATGAtTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

【化９５－２】

GTGTGTGTGTGTGTTGTGtAtAtATATTTATGGTAGTGAGAGgCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTG
GTTTTTGAGACAGAGTCTTTCACTTAGCTTGGAATTCactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaa
accctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagagg
cccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctcc
ttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagt
taagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgctt
acagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcga
gacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcag
gtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatc
cgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatt
tccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtga
aagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaaga
tccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcgg
tattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttg
agtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataa
ccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttt
tgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacg
acgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactactta
ctctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcgg
cccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcag
cactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatg
aacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttact
catatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttttgata
atctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaag
gatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgg
tggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatac
caaatactgtTcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacc
tcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaa
gacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagc
gaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcTAtgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaa
aggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacg
cctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcag
gggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctggccttttg
ctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgata
ccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgca
aaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgg
gcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttc
cggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacg
ccAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCAAACTCAAATATATAAAGCATTTGACTTGTTCTATG
CCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTTTTAACATTTAAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACA
GATGTTTTTATTTCATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAA
TAAAAATAGATAAACGTGGAAATTACTTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCCTTCCTCAGTTGACAACATAA
ATGCGCTGCTGAGAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATCAATTTCCCATTATGCCAGTCATATTAATTACTAG
TCAATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTA
AGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAAC
AGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAG
AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCC
AAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTG
CCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCG
CGCTTcTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGcGCGCCAGTCCTCCGATTGACTG
AGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCTT
GGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGG
GAGACCCCTGCCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCC
GATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCGGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGG
CGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCGGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTCGGG
GGCCGTTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTTAGA
GGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCTTTC
GGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGTCTTGTCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGT
GTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGGCCCGGGCTAGcctgttaccactCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCA
CTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTG
CTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCA

【化９５－３】

GGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTccccTACATCGTGACCTGGGA
AGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCTCC
ATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCAC
TCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCCCCGCCCCTTGTAAACTTCCC
TGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCA
GCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAACTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCCTTA
CCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTA
CACAGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCCACGT
GAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCC [　配列番号　124]

【０２７９】
非ウイルスアプローチもまた、免疫応答細胞の遺伝子改変のために使用することができる。例えば、リポフェクション（Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983）、アシアロオロソムコイド－ポリリシンコンジュゲーション（Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989）の存在下で、または外科的状況でマイクロインジェクション（Wolff et al., Science 247:1465, 1990）によって核酸を投与することによって、核酸分子を免疫応答細胞に導入することができる。遺伝子移入のための他の非ウイルス手段は、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥデキストラン、電気穿孔、およびプロトプラスト融合を使用するｉｎ ｖｉｔｒｏでのトランスフェクションを含む。リポソームは、ＤＮＡを細胞に送達するためにおそらく有益であり得る。正常な遺伝子を対象の罹患組織に移植することはまた、正常な核酸をｅｘ ｖｉｖｏで培養可能な細胞タイプ（例えば、自己または異種の初代細胞またはその子孫）に移入し、その後細胞（またはその子孫）を標的組織に注射するか、または全身に注射することによっても達成することができる。組換え受容体はまた、トランスポザーゼまたは標的化ヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはＴＡＬＥヌクレアーゼ、ＣＲＩＳＰＲ）を使用して誘導するまたは得ることができる。一過性の発現は、ＲＮＡ電気穿孔によって得られ得る。

【０２８０】
任意の標的化ゲノム編集方法を使用してポリペプチド組成物を発現させることができる。ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して本明細書に開示されるポリペプチド組成物を発現させる。ある特定の実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用して、本明細書に開示されるポリペプチド組成物を発現させる。ある特定の実施形態では、ＴＡＬＥＮシステムを使用して本明細書に開示されるポリペプチド組成物を発現させる。

【０２８１】
Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ－ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ ｒｅｐｅａｔｓ（ＣＲＩＳＰＲ）システムは、原核細胞において発見されたゲノム編集ツールである。ゲノム編集に利用する場合、システムは、Ｃａｓ９（そのガイドとしてｃｒＲＮＡを利用してＤＮＡを改変することができるタンパク質）、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ、Ｃａｓ９と活性な複合体を形成するｔｒａｃｒＲＮＡ（一般的にヘアピンループ形態）に結合する領域と共に宿主ＤＮＡの正確な区分にそれをガイドするためにＣａｓ９によって使用されるＲＮＡを含有する）、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ、ｃｒＲＮＡに結合してＣａｓ９と活性な複合体を形成する）、および必要に応じたＤＮＡ修復鋳型の区分（特定のＤＮＡ配列の挿入を可能にする細胞修復プロセスをガイドするＤＮＡ）を含む。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９はしばしば、プラスミドを使用して標的細胞にトランスフェクトする。ｃｒＲＮＡは、Ｃａｓ９が細胞において標的ＤＮＡを同定し、直接結合するために使用する配列であることから、ｃｒＲＮＡは、各応用に関して設計する必要がある。ＣＡＲ発現カセットを有する修復鋳型もまた、これが切断のいずれかの側で配列と重複し、挿入配列をコードしなければならないことから、各応用に関して設計する必要がある。複数のｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡを共にパッケージングし、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を形成することができる。このｓｇＲＮＡを、Ｃａｓ９遺伝子と共に結合することができ、細胞にトランスフェクトされるようにプラスミドに作製することができる。

【０２８２】
ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）は、人工の制限酵素であり、これはジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインをＤＮＡ切断ドメインと組み合わせることによって生成される。ジンクフィンガードメインは、ジンクフィンガーヌクレアーゼをゲノム内の所望の配

列に標的化させる特定のＤＮＡ配列を標的化するように操作することができる。個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的に複数の個々のジンクフィンガー反復配列を含有し、各々が複数の塩基対を認識することができる。新規ジンクフィンガードメインを生成するための最も一般的な方法は、既知の特異性のより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。ＺＦＮにおける最も一般的な切断ドメインは、ＩＩ型制限エンドヌクレアーゼＦｏｋＩからの非特異的切断ドメインである。内因性の相同組換え（ＨＲ）機構およびＣＡＲ発現カセットを有する相同なＤＮＡ鋳型を使用して、ＺＦＮを使用してＣＡＲ発現カセットをゲノムに挿入することができる。標的化配列がＺＦＮによって切断されると、ＨＲ機構は損傷を受けた染色体と相同なＤＮＡ鋳型との間の相同性を検索し、次いで染色体の２つの切断された末端の間の鋳型の配列をコピーし、それによって相同なＤＮＡ鋳型がゲノムに組み込まれる。

【０２８３】

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）は、ＤＮＡの特異的配列を切断するように操作することができる制限酵素である。ＴＡＬＥＮシステムは、ＺＦＮとほぼ同じ原理で作動する。それらは、転写活性化因子様エフェクターＤＮＡ結合ドメインをＤＮＡ切断ドメインと組み合わせることによって生成される。転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）は、特異的ヌクレオチドを強く認識する２つの可変位置を有する３３～３４アミノ酸の反復モチーフで構成される。これらのＴＡＬＥのアレイをアセンブルすることによって、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインを、所望のＤＮＡ配列に結合するように操作し、それによってヌクレアーゼをゲノムにおける特異的位置で切断するようにガイドすることができる。ポリヌクレオチド治療法において使用するためのｃＤＮＡ発現は、任意の適したプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、またはメタロチオネインプロモーター）によって方向づけられ、任意の適切な哺乳動物調節エレメントまたはイントロン（例えば、伸長因子１ａエンハンサー／プロモーター／イントロン構造）によって調節され得る。例えば、望ましければ、特定の細胞タイプにおいて遺伝子発現を優先的に方向づけることが公知のエンハンサーを使用して核酸の発現を方向づけることができる。使用されるエンハンサーとしては、組織または細胞特異的エンハンサーとして特徴付けられるエンハンサーが挙げられるがこれらに限定されない。あるいは、ゲノムクローンを治療構築物として使用する場合、調節は、上記のプロモーターまたは調節エレメントのいずれかを含む、同起源の調節配列によってまたは望ましければ異種起源に由来する調節配列によって媒介され得る。

【０２８４】

ゲノム編集剤／システムを送達する方法は、必要に応じて変化し得る。ある特定の実施形態では、選択されたゲノム編集方法の構成成分を、１つまたは複数のプラスミド中のＤＮＡ構築物として送達する。ある特定の実施形態では、構成成分を、ウイルスベクターを介して送達する。一般的な送達方法としては、電気穿孔、マイクロインジェクション、遺伝子ガン、インペールフェクション、静水圧、持続的注入、超音波処理、マグネトフェクション、アデノ随伴ウイルス、ウイルスベクターのエンベロープタンパク質シュードタイピング、複製コンピテントベクターシスおよびトランス作動エレメント、単純ヘルペスウイルス、化学的ビヒクル（例えば、オリゴヌクレオチド、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、デンドリマー、無機ナノ粒子、および細胞浸透ペプチド）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０２８５】

５．５．ポリペプチドおよびアナログ

また、免疫応答細胞において発現された場合にその抗新生物活性を増強するように改変された本明細書に開示されるポリペプチド（例えば、メソテリン、ＣＤ２８、ＣＤ８、ＣＤ３ζ、およびＰＤ－１　ＤＮ等）またはその断片も本開示の主題に含まれる。本開示の主題は、配列に変更を生じることによってアミノ酸配列または核酸配列を最適化する方法を提供する。そのような変更は、ある特定の突然変異、欠失、挿入、または翻訳後改変を含み得る。本開示の主題は、本明細書に開示されるいずれかのポリペプチド（メソテリン

、ＣＤ２８、ＣＤ８、ＣＤ３ζ、およびＰＤ－１　ＤＮを含むがこれらに限定されない）のアナログをさらに含む。アナログは、アミノ酸配列の差によって、翻訳後修飾によって、またはその両方によって本明細書に開示されるポリペプチドとは異なる。アナログは、本開示の主題のアミノ酸配列の全てまたは一部と少なくとも約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、またはそれより多くの相同性を示す。配列比較の長さは、少なくとも５、１０、１５、または２０アミノ酸残基、例えば、少なくとも２５、５０、または７５アミノ酸残基、または１００アミノ酸残基より多くである。この場合も、同一性の程度を決定する例示的なアプローチにおいて、ＢＬＡＳＴプログラムは、近縁の配列を示すｅ$^{-3}$からｅ$^{-100}$の間の確率スコアで使用され得る。改変は、ポリペプチドのｉｎ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏ化学誘導体化、例えばアセチル化、カルボキシル化、リン酸化、またはグリコシル化を含み、そのような改変は、ポリペプチド合成またはプロセシングの際、または単離された改変酵素による処置後に起こり得る。アナログはまた、一次配列の変更によってポリペプチドとは異なり得る。これらは、天然および誘導型の両方の遺伝子バリアント（例えば、放射線照射もしくはエタンメチルスルファミン酸に対する曝露によるランダム突然変異誘発に起因する、またはSambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), CSH Press, 1989、もしくはAusubel et al.、上記に記載される部位特異的突然変異誘発による）を含む。また、環状化ペプチド、分子、およびＬアミノ酸以外の残基、例えばＤアミノ酸または天然に存在しないもしくは合成アミノ酸、例えばβもしくはγアミノ酸を含有するアナログも含まれる。

【０２８６】

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

【０２８７】

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

【０２８８】

本開示の主題に従って、ヒトメソテリン（例えば、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、または（Ｆａｂ）$_2$）、ＣＤ３ζ、ＣＤ８、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、４－１ＢＢＬ、およびＩＬ－１２に特異的に結合する細胞外抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、コドン最適化によって改変することができる。コドン最適化は、任意の所定の発現系における可能性がある最高レベルの生産性を達成するために、天然に存在するおよび組換え遺伝子配列の両方を変更することができる。タンパク質発現の異なる段階に関与する要因は、コドン適

合性、ｍＲＮＡ構造、ならびに転写および翻訳における様々なシスエレメントを含む。ＯｐｔｉｍｕｍＧｅｎｅ（商標）、Ｅｎｃｏｒ最適化、およびＢｌｕｅ　Ｈｅｒｏｎを含むがこれらに限定されない当技術分野で公知の任意の適したコドン最適化方法または技術を使用して、本開示の主題のポリヌクレオチドを改変することができる。

【０２８９】

コドン最適化は、４つの異なるアルゴリズム（例えば、Ｂｌｕｅ　ＨｅｒｏｎおよびＥｎｃｏｒｅアルゴリズム）に基づいて実施することができる。４つ全てのアルゴリズムから得たコドン最適化配列を混和し、全てのＣＰＧおよびＢＡＭ－Ｈ１を最適なクローニングのために除去する。ある特定の実施形態では、コドン最適化ヌクレオチド配列は、コドン最適化の前に元の配列と約７０％相同である。免疫応答細胞（例えば、ヒト初代Ｔ細胞）において効率的な発現を得るために、コドン最適化ヌクレオチド配列をＣＤ８リーダー、例えば配列番号７１をコードするポリヌクレオチドにライゲートする。ＣＤ８リーダーは、ｓｃＦｖ重鎖（ＱＶＱＬ）の前に最適なシグナル切断を提供する。コドン最適化は、免疫応答細胞、例えば複数のヒトドナー初代Ｔ細胞におけるメソテリンＣＡＲ発現を、良好な形質導入効率で最適化する。複数のドナーＴ細胞における複数のＣＡＲベクターコピー数を、様々なメソテリン発現を有する複数の血液のがんおよび固形がん細胞に対する機能的効率、特異性、および感受性に関して試験する。ベクターコピー数１～４（より具体的には、約３～４）を有するコドン最適化メソテリン標的化ＣＡＲは、高メソテリン発現標的に対して非常に効率的な細胞傷害性を提供するが、低メソテリン発現標的、すなわち正常組織に対しては最小の反応性を示す。高メソテリンを発現するがん細胞に対しては反応性であるが、低メソテリンを発現する正常組織には影響を及ぼさない特異的メソテリンＣＡＲの生成における上記の遺伝子操作は、安全性を確保しながら、がん治療のための臨床でのベクターとして使用するために最適である。

【０２９０】

５．６．医薬組成物および投与

本開示の主題は、本開示の細胞を含む組成物（例えば５．３節に開示する）を提供する。組成物に含まれる細胞の量は、組成物の使用目的、ならびに／または組成物を投与される対象の体格、年齢、性別、体重、および状態に応じて異なり得る。ある特定の実施形態では、組成物は、約10^4～約10^{10}個の間、約10^4～約10^6個の間、約10^5～約10^6個の間、約10^5～約10^7個の間、約10^5～約10^9個の間、または約10^6～約10^8個の間の本開示の免疫応答細胞を含む。ある特定の実施形態では、組成物は、少なくとも約1×10^5個、少なくとも約5×10^5個、少なくとも約1×10^6個、少なくとも約1×10^7個、少なくとも約1×10^8個の本開示の免疫応答細胞を含む。ある特定の実施形態では、組成物は約1×10^5個の本開示の細胞を含む。

【０２９１】

本開示の免疫応答細胞を含む組成物は、抗原に対する免疫応答を誘導および／もしくは増強するため、ならびに／または新生物、病原体感染症、もしくは感染疾患、炎症疾患、もしくは移植片拒絶を処置および／もしくは予防するために対象に全身または直接提供することができる。ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物は、目的の臓器（例えば、新生物に罹患した臓器）に直接注射される。あるいは、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物は、例えば循環系（例えば、腫瘍の血管系）への投与によって目的の臓器に間接的に提供される。増大および分化剤を、細胞または組成物の投与前、投与時、または投与後に提供して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでＴ細胞、ＮＫ細胞、またはＣＴＬ細胞の産生を増加させることができる。

【０２９２】

本開示の免疫応答細胞は、任意の生理的に許容されるビヒクル中で、通常静脈内に投与することができるが、それらはまた、細胞が適切な再生および分化のための部位を発見し得る骨または他の簡便な部位（例えば、胸腺）に導入してもよい。通常、細胞少なくとも約ｌ×ｌ0^5個が投与され、最終的に約ｌ×ｌ0^{10}個またはそれより多くに達する。本開示の免疫応答細胞は、精製された細胞集団を含み得る。当業者は、様々な周知の方法、例

えば蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を使用して集団中の本開示の免疫応答細胞のパーセンテージを容易に決定することができる。本開示の免疫応答細胞を含む集団中の純度の適切な範囲は、約５０％～約５５％、約５％～約６０％、および約６５％～約７０％である。ある特定の実施形態では、純度は、約７０％～約７５％、約７５％～約８０％、または約８０％～約８５％である。ある特定の実施形態では、純度は、約８５％～約９０％、約９０％～約９５％、および約９５％～約１００％である。投薬量は、当業者が容易に調整することができる（例えば、純度が低下すれば投薬量の増加を必要とし得る）。細胞は注射、カテーテル等によって導入することができる。

【０２９３】

本開示の組成物は、本開示の免疫応答細胞またはその前駆細胞および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であり得る。投与は自己または異種であり得る。例えば、免疫応答細胞または前駆細胞を１人の対象から得て、同じ対象または異なる適合性の対象に投与することができる。末梢血由来免疫応答細胞またはその子孫（例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ由来）は、カテーテル投与、全身注射、局所注射、静脈内注射、または非経口投与を含む局所注射を介して投与することができる。本開示の主題の治療組成物（例えば、本開示の免疫応答細胞を含む医薬組成物）を投与する場合、注射可能な単位投与剤形（液剤、懸濁剤、乳剤）に製剤化することができる。

【０２９４】

５．７．製剤

本開示の免疫応答細胞を含む組成物は、選択されたｐＨとなるように緩衝され得る滅菌液体調製物、例えば等張水溶液、懸濁液、乳液、分散液、または粘性組成物として簡便に提供することができる。液体調製物は通常、ゲル、他の粘性組成物、および固体組成物より調製が容易である。加えて、液体組成物は、特に注射により投与するのにいくぶん簡便である。他方、粘性組成物は、特定の組織とのより長い接触期間を提供するために、適切な粘度範囲内で製剤化することができる。液体または粘性組成物は、例えば水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、およびその適した混合物を含有する溶媒または分散培地であり得る担体を含み得る。

【０２９５】

滅菌注射用溶液は、望ましければ様々な量の他の成分と共に必要量の適切な溶媒中で遺伝子改変免疫応答細胞を組み入れることによって調製することができる。そのような組成物は、適した担体、希釈剤、または賦形剤、例えば滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロース等との混合物であり得る。組成物はまた、凍結乾燥することもできる。組成物は、投与経路および望ましい調製物に応じて、補助物質、例えば湿潤剤、分散剤、または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、ｐＨ緩衝剤、ゲル化剤、または増粘添加剤、保存剤、香料、着色剤等を含有し得る。標準的なテキスト、例えば参照により本明細書に組み込まれる、"REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985を、過度の実験を行うことなく適した調製物を調製するための参考にしてもよい。

【０２９６】

抗菌保存剤、抗酸化剤、キレート剤、および緩衝剤を含む、組成物の安定性および無菌性を増強する様々な添加剤を添加することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等によって確保することができる。注射可能な薬学的剤形の持続的吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。しかし、本開示の主題に従って、使用されるいかなるビヒクル、希釈剤、または添加剤も、遺伝子改変免疫応答細胞またはその前駆細胞と適合性でなければならない。

【０２９７】

組成物は、等張性であり得て、すなわちそれらは血液および涙液と同じ浸透圧を有し得る。組成物の所望の等張性は、塩化ナトリウムまたは他の薬学的に許容される薬剤、例えばデキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコール、または他の無機

もしくは有機溶質を使用して達成され得る。塩化ナトリウムは、特にナトリウムイオンを含有する緩衝液のためであり得る。

【０２９８】

組成物の粘度は、望ましければ薬学的に許容される増粘化剤を使用して選択されたレベルで維持することができる。例えば、メチルセルロースは、容易に安価に入手可能であり、扱い易い。他の適した増粘化剤としては、例えばキサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマー等が挙げられる。増粘剤の濃度は、選択される薬剤に依存し得る。重要な点は、選択された粘度を達成する量を使用することである。明らかに、適した担体および他の添加剤の選択は、正確な投与経路および特定の投薬剤形、例えば液体投薬剤形の性質（例えば、組成物を、溶液、懸濁液、ゲル、または別の液体剤形、例えば徐放性剤形または液体充填剤形に製剤化するか否か）に依存する。

【０２９９】

投与される細胞の量は、処置される対象に関して異なる。ある特定の実施形態では、約10^4～約10^{10}個の間、約10^5～約10^9個の間、約10^4～約10^6個の間、約10^5～約10^6個の間、約10^5～約10^7個の間、または約10^6～約10^8個の間の本開示の免疫応答細胞が、ヒト対象に投与される。より有効な細胞を、さらに少数で投与してもよい。ある特定の実施形態では、少なくとも約1×10^5個、少なくとも約1×10^6個、少なくとも約1×10^7個、1×10^8個、少なくとも約2×10^8個、少なくとも約3×10^8個、少なくとも約4×10^8個、または少なくとも約5×10^8個の本開示の免疫応答細胞がヒト対象に投与される。有効な用量であると考えられる量の正確な決定は、特定の対象の体格、年齢、性別、体重、および状態を含む、各々の対象に対する個々の要因に基づき得る。投薬量は、本開示および当技術分野における知識から当業者が容易に確認することができる。ある特定の実施形態では、約1×10^5個の本開示の細胞を対象に投与する。

【０３００】

当業者は、組成物中のおよび方法において投与される細胞ならびに必要に応じた添加剤、ビヒクル、および／または担体の量を容易に決定することができる。典型的に、任意の添加剤（活性な細胞および／または薬剤に加えて）は、リン酸緩衝食塩水中で０．００１～５０重量％の溶液の量で存在し、活性成分は、マイクログラムからミリグラムの次数で、例えば約０．０００１～約５重量％、約０．０００１～約１重量％、約０．０００１～約０．０５重量％、または約０．００１～約２０重量％、約０．０１～約１０重量％、または約０．０５～約５重量％で存在する。動物またはヒトに投与される任意の組成物に関して、以下を決定することができる：毒性、例えば適した動物モデル、例えばマウスなどの齧歯類における致死用量（ＬＤ）およびＬＤ５０を決定することによる；適した応答を誘発する組成物の投薬量、その中の構成成分の濃度、および組成物を投与する時期。そのような決定は、当業者の知識、本開示、および本明細書に引用した文書から過度の実験を必要としない。そして、連続投与の時間は、過度の実験を行うことなく確認することができる。

【０３０１】

５．８．処置の方法

本開示の主題の免疫応答細胞およびそれを含む組成物は、新生物、病原体感染症、感染疾患、炎症疾患、または移植片拒絶を処置および／または予防するために使用することができる。そのような免疫応答細胞は、固形腫瘍（例えば、中皮腫、肺がん、膵臓がん、卵巣がん、乳がん、大腸がん、胸膜腫瘍、神経膠芽腫、食道がん、胃がん（gastric cancer）、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃がん（stomach cancer）、および／または胆管癌）の処置または予防のために、それを必要とする対象（例えば、ヒト対象）に投与することができる。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞はＴ細胞である。Ｔ細胞は、$CD4^+$ Ｔ細胞または$CD8^+$ Ｔ細胞であり得る。ある特定の実施形態では、Ｔ細胞は$CD4^+$ Ｔ細胞である。

【０３０２】

本開示の主題は、それを必要とする対象における免疫応答を誘導するおよび／または増加させる方法を提供する。本開示の免疫応答細胞およびそれを含む組成物は、対象における新生物を処置および／または予防するために使用することができる。本開示の免疫応答細胞およびそれを含む組成物は、新生物に罹患している対象の生存を延長させるために使用することができる。本開示の免疫応答細胞およびそれを含む組成物はまた、対象、例えば免疫無防備のヒト対象における病原体感染症または他の感染疾患を処置および／または予防するために使用することができる。そのような方法は、既存の状態の緩和であるかまたは再発の予防であるかによらず、所望の効果を達成するために有効な量の本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物（例えば、医薬組成物）を投与することを含む。処置するために、投与される量は、所望の効果を産生するために有効な量である。有効量は、１回のまたは一連の投与で提供され得る。有効量は、ボーラスまたは連続灌流で提供され得る。

【０３０３】

「有効量」（または「治療有効量」）は、処置の際に有益なまたは所望の臨床結果をもたらすために十分な量である。有効量は、対象に１つまたは複数の用量で投与することができる。処置に関して、有効量は、疾患の進行を緩和、改善、安定化、逆転、もしくは遅延させるために十分である量であるか、またはそうでなければ疾患の病理学的帰結を低減する量である。有効量は一般的に、医師によって症例毎に決定され、当業者の範囲内である。有効量を達成するために適切な投薬量を決定する場合には、いくつかの要因が典型的に考慮される。これらの要因は、対象の年齢、性別、および体重、処置される状態、状態の重症度、ならびに投与される免疫応答細胞の剤形および有効濃度を含む。

【０３０４】

抗原特異的Ｔ細胞を使用する養子免疫療法の場合、約$１０^{６}$～約$１０^{１０}$個の範囲（例えば、約$１０^{９}$個）の細胞用量が典型的に注入される。しかし、本開示のポリペプチド組成物の高い効率により、所望の効果を達成するために必要な本開示の細胞量はより少なくてすむ。例えば、約１×１０^{５}個の本開示の細胞は、所望の効果を達成するために十分である。

【０３０５】

免疫応答細胞を対象に投与し、その後分化させると、１つの特定の抗原（例えば、ヒトメソテリン）に対して特異的である免疫応答細胞が誘導される。Ｔ細胞の「誘導」は、欠失またはアネルギーなどによる抗原特異的Ｔ細胞の不活化を含み得る。不活化は特に、自己免疫障害の場合のように寛容を確立または再確立するために有用である。本開示の主題の免疫応答細胞は、胸膜投与、静脈内投与、皮下投与、節内投与、腫瘍内投与、髄腔内投与、胸膜内投与、腹腔内投与、および胸腺への直接投与が挙げられるがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の方法によって投与することができる。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞および／またはそれを含む組成物は、それを必要とする対象に胸膜投与される。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞および／またはそれを含む組成物は、それを必要とする対象に胸膜内投与される。

【０３０６】

本開示の主題は、免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）を使用する様々な方法を提供する。例えば、本開示の主題は、対象における腫瘍負荷を低減する方法を提供する。ある特定の実施形態では、腫瘍負荷を低減する方法は、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物の有効量を対象に投与することを含む。本開示の免疫応答細胞は、腫瘍細胞の数を低減することができ、腫瘍サイズを低減することができ、および／または対象における腫瘍を根絶することができる。腫瘍は固形腫瘍であり得る。固形腫瘍の非制限的な例としては、中皮腫、肺がん、膵臓がん、卵巣がん、乳がん、大腸がん、胸膜腫瘍、神経膠芽腫、食道がん、胃がん（gastric cancer）、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃がん（stomach cancer）、および胆管癌が挙げられる。

【０３０７】

本開示の主題はまた、新生物を有する対象の生存を増加または延長させる方法も提供す

る。ある特定の実施形態では、新形成新生物を有する対象の生存を増加または延長させる方法は、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物の有効量を対象に投与することを含む。方法は、対象における腫瘍負荷を低減または根絶することができる。したがって、本開示の主題は、対象における免疫応答を増加させる方法であって、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。本開示の主題はさらに、対象における新生物を処置および／または予防する方法であって、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。

【０３０８】

ある特定の実施形態では、新生物は固形腫瘍である。新生物は原発腫瘍または原発がんであり得る。加えて、新生物は転移状態であり得る。

【０３０９】

その成長が本開示の主題の免疫応答細胞を使用して阻害され得るがんは、免疫療法に典型的に応答するがんを含む。処置のためのがんの非制限的な例としては、中皮腫、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、膵臓がん、卵巣がん、乳がん（例えば転移性乳がん、転移性トリプルネガティブ乳がん）、大腸がん、胸膜腫瘍、神経膠芽腫、食道がん、胃がん（gastric cancer）、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃がん（stomach cancer）、胆管癌、子宮頸がん、および唾液腺がんが挙げられる。加えて、本開示の主題は、その成長が、本開示の主題の免疫応答細胞を使用して阻害され得る難治性または再発性悪性腫瘍を含む。

【０３１０】

本開示の主題の方法を使用して処置され得る他の新生物またはがんの例としては、骨がん、腸がん、肝臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、黒色腫（皮膚または眼内悪性黒色腫）、腎臓がん（例えば、明細胞癌）、咽頭がん、前立腺がん（例えば、ホルモン抵抗性前立腺腺癌）、血液のがん（例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫）、子宮がん、直腸がん、肛門領域のがん、膀胱がん、脳がん、胃がん、精巣がん、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣の癌、外陰癌、白血病（例えば、急性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄球性白血病、慢性リンパ球性白血病）、真性多血症、リンパ腫（ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫）、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟部組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、小児の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂の癌、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮がん、Ｔ細胞リンパ腫、アスベストによって誘導されるがんを含む環境誘導性がん、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、ならびに肉腫および癌腫などの固形腫瘍（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、肝腫、胆管（nile duct）癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、唾液腺がん、子宮がん、精巣がん、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、神経鞘腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫）が挙げられる。

【０３１１】

加えて、本開示の主題は、対象におけるがん細胞または病原体に応答して免疫活性化サイトカイン産生を増加させる方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む。免疫活性化サイトカインは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－１１、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、インターフェロン調節因子７（ＩＲＦ７）、およびその組合せであり得る。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は、ＧＭ－ＣＳＦ

、ＩＦＮ－γ、および／またはＴＮＦ－αの産生を増加させる。

【０３１２】

本開示の主題は、固形腫瘍（例えば、中皮腫、肺がん、膵臓がん、卵巣がん、乳がん、大腸がん、胸膜腫瘍、神経膠芽腫、食道がん、胃がん（gastric cancer）、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃がん（stomach cancer）、および胆管癌）を処置するために特に有用な治療を提供する。固形腫瘍は、原発腫瘍または転移状態の腫瘍であり得る。ある特定の固形腫瘍は、不均一なＭＳＬＮ発現腫瘍、例えば乳がん（例えば、ＴＮＢＣ）、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、食道がん、大腸がん、胃がん、および悪性胸膜中皮腫（ＭＰＭ）である。不均一なＭＳＬＮ発現細胞（例えば、腫瘍細胞）は、ＭＳＬＮ低発現細胞およびＭＳＬＮ高発現細胞を含む細胞集団である。本開示の免疫応答細胞は、ＭＳＬＮ高発現細胞の存在下でＭＳＬＮ低発現細胞（例えば、約２，０００個もしくはそれ未満、約１，０００個もしくはそれ未満、約９００個もしくはそれ未満、約８００個もしくはそれ未満、約７００個もしくはそれ未満、約６００個もしくはそれ未満、約５００個もしくはそれ未満、約４００個もしくはそれ未満、約３００個もしくはそれ未満、約２００個もしくはそれ未満、または約１００個もしくはそれ未満のＭＳＬＮ結合部位／細胞）に対して増加した細胞傷害性および抗腫瘍活性を示すことができる。ある特定の実施形態では、たとえＭＳＬＮ高発現細胞の存在下であっても、免疫応答細胞は、ＭＳＬＮ陰性細胞に対して増加した細胞傷害性または非特異的死滅を示さない。このように、免疫応答細胞は、ＭＳＬＮ高発現細胞の存在下でＭＳＬＮ低発現細胞に対して増加した細胞傷害性および抗腫瘍活性を示すことができるが、ＭＳＬＮ陰性細胞に対する安全性を保持している。

【０３１３】

さらに、本開示の主題は、病原体感染症（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、または原虫感染症）を有する対象を処置する方法を提供する。本開示の主題は、免疫無防備の対象において免疫応答を増強するために特に有用である。本発明の方法を使用する処置に感受性がある例示的なウイルス感染症としては、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、およびインフルエンザウイルス感染症が挙げられるがこれらに限定されない。したがって、本開示の主題は、対象における病原体感染症を処置または予防する方法であって、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。

【０３１４】

本開示の主題に従って、上記の様々な方法は、少なくとも１つの免疫調節剤を投与することを含み得る。免疫調節剤の非制限的な例としては、免疫刺激剤、チェックポイント免疫遮断剤、放射線療法剤、および化学療法剤が挙げられる。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は免疫刺激剤である。免疫刺激剤の非制限的な例としては、ＩＬ－１２、およびアゴニスト共刺激性モノクローナル抗体が挙げられる。ある特定の実施形態では、免疫刺激剤はＩＬ－１２である。ある特定の実施形態では、抗ＩＬ－１２抗体と組み合わせた本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物を使用して乳がん（ＢＣ）、例えば転移性トリプルネガティブ乳がん（ＴＮＢＣ）を処置することができる。アゴニスト共刺激性モノクローナル抗体の非制限的な例としては、抗４－１ＢＢ抗体、抗ＯＸ４０抗体、および抗ＩＣＯＳ抗体が挙げられる。ある特定の実施形態では、アゴニスト共刺激性モノクローナル抗体は抗４－１ＢＢ抗体である。

【０３１５】

ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物は、腫瘍標的化養子Ｔ細胞治療を示すことができるのみならず、改善された抗原受容体の設計を通しておよびＩＬ－１２を使用する免疫調節による宿主微小環境への介入を通してＴ細胞機能を増強することができる。全ての免疫治療アプローチの中で、多機能サイトカインであるＩＬ－１２は、ＢＣを処置するための最も有望なアプローチの１つであると考えられている（Boggio, K., et al., Cancer Res 60, 359-364 (2000); Czerniecki, B.J., et al., Cancer Res 67, 1842-1852 (2007); Nanni, P., et al., J Exp Me

d 194, 1195-1205 (2001))。ＩＬ－１２は、抗腫瘍応答に関係する極めて重要な経路である適応１型細胞性免疫の主な調節剤であると考えられる（Del Vecchio, M., et al., Clin Cancer Res 13, 4677-4685 (2007))。ＩＬ－１２は、ＣＤ４ Ｔ細胞のＴｈ１表現型への分極化（Wesa, et al., J Immunother 30, 75-82 (2007))、Ｔ細胞およびＮＫエフェクター機能のブースティング（Curtsinger et al., J Exp Med 197, 1141-1151 (2003))、自然免疫応答のリモデリング（Chmielewski et al., Cancer Res 71, 5697-5706 (2011))、および腫瘍血管新生の調節（Voest et al., J Natl Cancer Inst 87, 581-586 (1995))を含む様々なレベルで抗腫瘍応答をモジュレートする。ＩＬ－１２の免疫調節機能および抗血管新生機能は、がん、例えばＢＣ（例えば、ＴＮＢＣ）を処置するために本開示の主題の免疫応答細胞と組み合わせてこのサイトカインを使用する論理的根拠を提供している。がんを有する患者に対するＩＬ－１２の投与を含む１４８の臨床試験の中で（そのうち３６が最近報告された）は、成功した第ＩＩ相臨床試験は、腹腔内投与（Lenzi et al. Clin.Cancer Res. 8, 3686-3695 (2002))、または皮下投与(Mahvi et al. Cancer Gene Ther. 14, 717-723 (2007); Kang et al. Hum.Gene Ther. 12, 671-684 (2001))によるものであった。ＩＬ－１２は、遺伝子移入によって生成されたＩＬ－１２のパラクライン分泌が局所および遠隔部位の腫瘍に対して免疫を誘導することができることを示している。いくつかの試験は、乳がん（ＢＣ）の前臨床モデルにおいてＩＬ－１２の抗がん有効性を証明しているが（Boggio et al. Cancer Res 60, 359-364 (2000); Nanni et al. J Exp Med 194, 1195-1205 (2001))、組換えヒトＩＬ－１２の投与に起因する有意な毒性が進行がんにおけるいくつかの臨床試験で観察されたことから、その臨床での使用は排除されている。この制限を克服するために、多くの研究グループが、アデノウイルスベクターを使用するＩＬ－１２の腫瘍内送達が、ＢＣの前臨床モデルにおいて腫瘍の退縮およびＴ細胞活性化を誘導することを実証している（Gyorffy et al. J Immunol 166, 6212-6217 (2001); Bramson et al. Hum Gene Ther 7, 1995-2002 (1996))。近年、Ｓａｂｅｌらは、ポリ乳酸マイクロスフェアを使用してＩＬ－１２を腫瘍に放出し、抗腫瘍応答が主にＮＫ細胞によって媒介されることを見出した（Sabel et al. Breast Cancer Res Treat 122, 325-336 (2010))。他の研究者らは間葉間質細胞を使用してＩＬ－１２をマウスＢＣに局所送達した（Eliopoulos et al. Cancer Res 68, 4810-4818 (2008))。ＨＥＲ２／ｎｅｕ発現悪性腫瘍を有する患者におけるＩＬ－１２と組み合わせたパクリタキセルおよびトラスツズマブの第Ｉ相臨床試験では、ＮＫ細胞サイトカイン分泌の刺激に関してＩＬ－１２およびトラスツズマブの間で印象的な相乗効果が示された（Bekaii-Saab et al. Molecular cancer therapeutics 8, 2983-2991 (2009))。したがって、ＩＬ－１２は、抗がん剤としてかなり有望であり、養子Ｔ細胞治療アプローチにおける共刺激剤としてＩＬ－１２を使用することは、十分に正当化される。

【０３１６】

ある特定の実施形態では、免疫調節剤はチェックポイント免疫遮断剤である。チェックポイント免疫遮断剤の非制限的な例としては、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＰＤ－１抗体、抗ＬＡＧ３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、および抗ＴＩＭ３抗体が挙げられる。ある特定の実施形態では、チェックポイント免疫遮断剤は抗ＰＤ－Ｌ１抗体である。ある特定の実施形態では、本開示の主題の免疫応答細胞またはそれを含む組成物を抗ＰＤ－Ｌ１抗体と組み合わせて使用して、乳がん（ＢＣ）、例えばＴＮＢＣを処置することができる。

【０３１７】

プログラム細胞死リガンド１（ＰＤ－Ｌ１／Ｂ７－Ｈ４／ＣＤ２７４）は、活動性の炎症組織において典型的に発現される阻害性シグナルであり、Ｔ細胞活性化を制限するためのネガティブフィードバックループとして作用する。ＰＤ－Ｌ１発現は典型的には、非炎症性の通常組織（乳房を含む（Dong et al. Nature medicine 8, 793-800 (2002))）では存在せず、そのかわりにがん組織、特に炎症性の浸潤物を有するがん組織では

最も多い（Spranger et al. Science translational medicine 5, 200ra116 (2013)）。炎症とのこの関連は、おそらくＴ細胞活性化時に生成されるＴ細胞分泌サイトカインに腫瘍細胞が曝露される際のＰＤ－Ｌ１の上方調節が原因である。この発現パターンは、ＢＣによって示され、ＢＣ標本の５０％～７５％がＰＤ－Ｌ１に関して染色陽性であり、発現は重度のリンパ球浸潤物に強く関連する（Brown et al. Journal of immunology 170, 1257-1266 (2003); Ghebeh et al. Neoplasia 8, 190-198 (2006); Ghebeh et al. BMC cancer 8, 57 (2008)）。ＢＣ浸潤Ｔ細胞はまた、患者の５４％ではＰＤ－Ｌ１も発現した（Ghebeh et al. BMC cancer 8, 57 (2008)）。ＢＣはまた生来、腫瘍形成性のシグナル伝達に対して二次的にＰＤ－Ｌ１を発現し得る。ＰＩ（３）Ｋ経路の活性化は、ＢＣ細胞においてＰＤ－Ｌ１タンパク質の上方調節をもたらし、患者の腫瘍におけるＰＩ（３）Ｋ活性化は、ＰＤ－Ｌ１発現に有意に相関する（Crane et al. Oncogene 28, 306-312 (2009)）。活性化Ｔ細胞によるＰＤ－１の発現は、リガンドを免疫抑制性のＴＭＥ内での受容体発現と空間的および時間的に連結する。ＢＣ組織におけるＰＤ－Ｌ１の発現は、それがこれらの患者に関する免疫治療の標的であることを示唆している。複数の前臨床がんモデル（乳房を含む（Ge et al. Cancer letters 336, 253-259 (2013)））においてＰＤ－Ｌ１／ＰＤ－１遮断が有効であることは、進行がん患者に関してＰＤ－Ｌ１標的化抗体またはＰＤ－１標的化抗体を使用する第Ｉ相臨床試験のための道を開いた。第Ｉ相臨床試験（ＰＤ－１抗体を使用する）は、ＰＤ－Ｌ１＋患者に限って有効性を実証した（Topalian et al. The New England journal of medicine 366, 2443-2454 (2012)）。遺伝子操作したＴ細胞は、共阻害性のチェックポイントを克服するためにユニークな利点を提供し、ＴＭＥ内で見出される共刺激を典型的に欠如する。ＣＡＲ発現Ｔ細胞は実際に、Ｔ細胞増大、生存、および機能を支持するためのその共刺激必要条件を最適化するように操作されている。

【０３１８】

一部の実施形態では、免疫調節剤は放射線療法剤である。局所の放射線誘導免疫学的環境は、腫瘍における標的化Ｔ細胞の定着を増強するための前提条件を提供することができるのみならず（それによって全身リンパ球枯渇レジメンの必要をなくす）、放射線療法と養子Ｔ細胞治療の組合せに起因する免疫応答がまた、遠達性の抗腫瘍有効性も増強する。放射線抵抗性腫瘍では、ＣＡＲ－Ｔ細胞における４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達は、免疫阻害を克服することができる。一部の実施形態では、免疫調節剤は、シスプラチンを含むがこれに限定されない化学療法剤である。シスプラチンが誘導するケモカインおよびサイトカインの分泌は、ＭＳＬＮ標的化Ｔ細胞応答および内因性のＴ細胞応答を促進することができる。

【０３１９】

研究から、高レベルの細胞傷害性腫瘍浸潤リンパ球（ｃＴＩＬ）および低レベルの制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）を示す肺腺癌（ＬＡＣ）および悪性胸膜中皮腫（ＭＰＭ）を有する患者は、良好な予後およびより長い無進行生存期間を有することが示されている（Servais, et al., Clin Cancer Res (May 1, 2012);18:2478-2489; Kachala et al., Clin Cancer Res (2013);20(4); 1020-8）。ＭＳＬＮ標的化ＣＡＲを使用する養子Ｔ細胞治療を使用して、ＬＡＣおよびＭＰＭにおいてｃＴＩＬを促進することができる。Servais (2012)およびKachala (2013)は、ＭＳＬＮがＬＡＣおよびＭＰＭにおいて過剰発現され、攻撃性を促進することを報告し、ＣＡＲ Ｔ細胞治療の標的としてＭＳＬＮの選択を正当化する。シスプラチンおよび放射線療法後のＴＩＬの比率がより高いことは、マウスモデルおよび患者の両方において転帰の改善に関連する。

【０３２０】

腫瘍の放射線療法およびシスプラチン療法によって誘導される腫瘍の免疫調節および遠達性の免疫調節は、養子移入されたＴ細胞がより良好に定着するために必要な前提条件を提供し得る；腫瘍および間質の免疫調節を利用するためのＴ細胞共刺激戦略は、内因性および養子移入Ｔ細胞の両方の抗腫瘍有効性を増強することができる。

【０３２１】

加えて、例えば対象におけるがんを処置するため、または対象における腫瘍負荷を低減するために、メソテリン特異的ＣＡＲを発現する免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）を使用する上記の様々な方法を、がん細胞抗原のモジュレーションと組み合わせることができる。メソテリン特異的ＣＡＲを発現する免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）は、腫瘍またはがん様細胞の膜上に発現されるＭＳＬＮ（「細胞膜ＭＳＬＮ」と称される）を標的化して死滅させることができるが、細胞質ＭＳＬＮを標的化して死滅させることはできない。ある特定の腫瘍またはがん（例えば、肺がんおよび中皮腫）は、低い細胞膜ＭＳＬＮを有するが、高い細胞質ＭＳＬＮを有する。がん細胞抗原のモジュレーションは、腫瘍またはがん様細胞において細胞膜ＭＳＬＮの発現を増加させることができ、これによって、腫瘍またはがん様細胞はＣＡＲ発現免疫応答細胞によってより標的化される可能性が高くなり、このように免疫応答細胞による死滅に対してより感受性となり得る。ある特定の実施形態では、がん細胞抗原のモジュレーションは、放射線である。

【０３２２】

免疫学的合併症（「悪性のＴ細胞形質転換」として知られる）、例えば移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）のリスクを回避もしくは最小限にするために、または健康な組織が腫瘍細胞と同じ標的抗原を発現してＧｖＨＤと類似の転帰をもたらす場合には、さらなる改変を免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）に導入することができる。この問題に対する可能性がある解決策は、自殺遺伝子をＣＡＲ発現Ｔ細胞に操作することである。適した自殺遺伝子としては、単純ヘルペスチミジンキナーゼ（ｈｓｖ－ｔｋ）、誘導型カスパーゼ９自殺遺伝子（ｉＣａｓｐ－９）、および切断型ヒト上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲｔ）ポリペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、自殺遺伝子は、ＥＧＦＲｔポリペプチドである。ＥＧＦＲｔポリペプチドは、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体（例えば、セツキシマブ）を投与することによってＴ細胞の排除を可能にすることができる。ＥＧＦＲｔは、メソテリン標的化ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインの３’末端に共有結合することができる。自殺遺伝子は、本開示のメソテリン特異的ＣＡＲをコードする核酸を含むベクター内に含めることができる。このようにして、悪性のＴ細胞形質転換（例えば、ＧＶＨＤ）の際に自殺遺伝子を活性化するように設計されたプロドラッグ（例えば、プロドラッグ（例えば、ｉＣａｓｐ－９を活性化することができるＡＰ１９０３））を投与すると、自殺遺伝子活性化ＣＡＲ発現Ｔ細胞においてアポトーシスを誘発する。

【０３２３】

加えて、本開示の主題は、対象における炎症疾患を予防および／または処置する方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は免疫阻害性細胞である。ある特定の実施形態では、免疫阻害性細胞は制御性Ｔ細胞である。ある特定の実施形態では、炎症疾患は膵炎である。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は、臓器移植のレシピエント、例えば膵臓移植のレシピエントである。

【０３２４】

さらに、本開示の主題は、臓器移植のレシピエントである対象における移植片拒絶を予防する方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は、免疫阻害性細胞である。ある特定の実施形態では、免疫阻害性細胞は制御性Ｔ細胞である。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。さらなる実施形態では、対象は膵臓移植のレシピエントである。

【０３２５】

本開示のメソテリン標的化ＣＡＲは、免疫阻害性細胞、例えば制御性Ｔ細胞に形質導入することができる。形質導入された免疫阻害性細胞は、炎症状態または炎症疾患を有する対象（例えば、ヒト）に投与することができる。一部の実施形態では、炎症部位または炎症疾患の部位は、メソテリンの高レベル発現を有し、これは本開示のＭＳＬＮ－ＣＡＲによって認識される。炎症状態は、極度の、例えば重度の膵炎であり得る。加えて、形質導

入された免疫阻害性細胞を、臓器移植のレシピエントである対象に投与することができる。

【０３２６】

加えて、本開示のメソテリン標的化ＣＡＲならびにＭＨＣ抗原を標的化する第２のＣＡＲを、免疫阻害性細胞（例えば、制御性Ｔ細胞）に同時形質導入することができ、それによって免疫阻害性細胞を、移植された膵臓の部位で特異的に集めることができる。ある特定の実施形態では、ＭＨＣクラスＩ対象に、ＭＨＣクラスＩＩドナーからの膵移植片を移植して、レシピエントの制御性Ｔ細胞に、本開示のＭＳＬＮ特異的ＣＡＲおよびＭＨＣクラスＩＩ抗原を標的化する第２のＣＡＲを形質導入し、このようにレシピエントの形質導入された制御性Ｔ細胞を、移植された膵臓の部位で集めて／プールして、移植片または臓器拒絶を回避することができる。

【０３２７】

治療のために適したヒト対象は、典型的に臨床基準によって識別することができる２つの処置群を含む。「進行疾患」、または「高い腫瘍負荷」を有する対象は、臨床的に測定可能な腫瘍を有する対象である。臨床的に測定可能な腫瘍は、腫瘍塊（例えば、触診、ＣＡＴスキャン、ソノグラム、マンモグラム、またはＸ線；生化学または組織病理学マーカー陽性は、単独ではこの集団を同定するためには不十分である）に基づいて検出することができる腫瘍である。医薬組成物をこれらの対象に投与し、その状態を緩和する目的で抗腫瘍応答を誘発する。理想的には、腫瘍塊の低減がその結果として起こるが、いかなる臨床での改善も利益となる。臨床での改善は、進行のリスクもしくは速度の減少、または腫瘍の病理学的帰結の低減を含む。

【０３２８】

適した対象の第２の群は、当技術分野において「アジュバント群」として公知である。これらは、新生物の既往を有するが、別の治療様式に応答している個体である。以前の治療は、外科的切除、放射線療法、および従来の化学療法を含み得るがこれらに限定されない。その結果、これらの個体は、臨床的に測定可能な腫瘍を有しない。しかし、彼らは、元の腫瘍部位の近くでまたは転移のいずれかによって疾患の進行のリスクがあることが疑われる。この群をさらに、高リスクおよび低リスク個体に細分することができる。細分は、最初の処置の前または後に観察された特色に基づいて行われる。これらの特色は、臨床の技術分野で公知であり、各々の異なる新生物に関して適切に定義される。高リスク亜群に関して典型的な特色は、腫瘍が隣接する組織に浸潤している群、またはリンパ節の転移を示す群である。

【０３２９】

別の群は、新生物に対して遺伝的素因を有するが、まだ新生物の臨床徴候の証拠を示していない。例えば、乳がんに関連する遺伝子突然変異に関して試験陽性であるが、なおも妊娠可能年齢である女性は、予防的手術を行うことが適切となるまで、新生物の発生を予防的に予防する処置において本明細書に記載の免疫応答細胞の１つまたは複数の投与を希望することができる。

【０３３０】

免疫応答細胞の抗腫瘍効果を増強する抗メソテリンＣＡＲおよびＰＤ－１　ＤＮの表面発現の結果として、養子移入されたＴまたはＮＫ細胞は、腫瘍部位で増強された選択的に細胞溶解性の活性を与えられる。さらに、腫瘍またはウイルス感染へのその局在およびその増殖後、Ｔ細胞は次に腫瘍またはウイルス感染部位を、生理的な抗腫瘍または抗ウイルス応答に関係する広範囲の免疫細胞（腫瘍浸潤性リンパ球、ＮＫ、ＮＫＴ細胞、樹状細胞、およびマクロファージ）にとって非常に伝導性の環境にする。

【０３３１】

加えて、本開示の主題は、対象、例えば免疫無防備の対象における病原体感染症（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、または原虫感染症）を処置および／または予防する方法を提供する。方法は、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む組成物の有効量を、病原体感染症を有する対象に投与することを含み得る。処置に対して感受性がある例示的なウイルス感染症としては、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、

エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、およびインフルエンザウイルス感染症が挙げられるがこれらに限定されない。

【０３３２】

免疫学的合併症（「悪性のＴ細胞形質転換」として公知である）、例えば移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）のリスクを回避もしくは最小限にするために、または健康な組織が腫瘍細胞と同じ標的抗原を発現してＧｖＨＤと類似の転帰をもたらす場合には、本開示の免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）にさらなる改変を導入することができる。この問題に対する可能性がある解決策は、自殺遺伝子を本開示の免疫応答細胞に操作することである。適した自殺遺伝子としては、単純ヘルペスチミジンキナーゼ（ｈｓｖ－ｔｋ）、誘導型カスパーゼ９自殺遺伝子（ｉＣａｓｐ－９）、および切断型ヒト上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲｔ）ポリペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、自殺遺伝子は、ＥＧＦＲｔポリペプチドである。ＥＧＦＲｔポリペプチドは、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体（例えば、セツキシマブ）を投与することによってＴ細胞の排除を可能にすることができる。ＥＧＦＲｔは、本開示のＣＡＲの抗原認識受容体の上流に共有結合することができる。自殺遺伝子は、本開示のＣＡＲをコードする核酸を含むベクター内に含めることができる。このようにして、悪性のＴ細胞形質転換（例えば、ＧＶＨＤ）の際に自殺遺伝子を活性化するように設計されたプロドラッグ（例えば、プロドラッグ（例えば、ｉＣａｓｐ－９を活性化することができるＡＰ１９０３））の投与は、自殺遺伝子活性化ＣＡＲ発現Ｔ細胞においてアポトーシスを誘発する。自殺遺伝子を本開示のＣＡＲに組み込むと、ＣＡＲ　Ｔ細胞の大部分を非常に短期間で排除できることによって追加の安全性レベルを与える。自殺遺伝子を組み込んだ本開示の免疫応答細胞（例えば、Ｔ細胞）は、ＣＡＲ　Ｔ細胞注入後の所定の時点であらかじめ排除することができ、または毒性の最も早い兆候で根絶することができる。

【０３３３】

５．９．キット

本開示の主題は、対象における免疫応答を誘導および／もしくは増強する、ならびに／または新生物もしくは病原体感染症を処置および／もしくは予防するためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、本開示の免疫応答細胞またはそれを含む医薬組成物の有効量を含む。ある特定の実施形態では、キットは、滅菌容器を含み；そのような容器は、箱、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、ブリスターパック、または当技術分野において公知の他の適した容器であり得る。そのような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属ホイル、または薬剤を保持するために適した他の材料で作製することができる。ある特定の実施形態では、キットは、抗メソテリンＣＡＲをコードする単離された核酸分子、およびＰＤ－１　ＤＮを発現可能な形態でコードする単離された核酸分子を含み、これらは必要に応じて同じまたは異なるベクターに含まれ得る。

【０３３４】

望ましければ、免疫応答細胞および／または核酸分子は、細胞または核酸分子を、新生物または病原体、または免疫障害を有するまたは発達させるリスクを有する対象に投与するための使用説明書と共に提供される。使用説明書は一般的に、新生物または病原体感染症の処置および／または予防のための組成物の使用に関する情報を含む。ある特定の実施形態では、使用説明書は、以下の少なくとも１つを含む：治療剤に関する説明；新生物、病原体感染症、または免疫障害またはその症状の処置または予防のための投薬スケジュールおよび投与；警告；注意；適応；禁忌；過量に関する情報；有害反応；動物での薬理学；臨床試験；および／または参考文献。使用説明書は容器（存在する場合）に直接印刷されてもよく、または容器に貼付されたラベルとして、または容器の中にもしくは容器と共に供給される個別のシート、パンフレット、またはフォルダーとして印刷され得る。

【実施例】

【０３３５】

６．実施例

本開示の実践は、それ以外であることを示していない限り、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の通常の技術を使用し、それらは当業者の範囲内である。そのような技術は、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)などの文献に十分に説明されている。これらの技術は、本明細書に開示されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生に応用可能であり、そのため本開示の主題の作製および実践において考慮され得る。特定の実施形態の特に有用な技術を、以下の節に考察する。

【０３３６】

以下の実施例は、当業者に、本開示の細胞および組成物を作製および使用する方法の完全な開示および説明を提供するために記載され、本発明者らが本発明であると見なす範囲を制限することを意図しない。

【０３３７】

（実施例１）

本開示のポリペプチド組成物を生成した。ポリペプチド組成物は、図１に示すように：（ｉ）ヒトメソテリンに結合するＣＡＲ、および（ｉｉ）プログラム細胞死１のドミナントネガティブ型（ＰＤ－１　ＤＮ）を含む。メソテリン標的化ＣＡＲは、（ａ）ＣＤ８シグナルペプチド（例えば、配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなるＣＤ８シグナルペプチド）、（ｂ）配列番号７６に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号７７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、および配列番号７８に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３を含むV_H；ならびに配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号８０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、および配列番号８１に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を含むV_Lを含むｓｃＦｖである細胞外抗原結合ドメイン、（ｃ）ＣＤ２８ポリペプチド（例えば、配列番号９２（または配列番号９０のアミノ酸１５３～１７９）に記載のアミノ酸配列からなるＣＤ２８ポリペプチド）を含む膜貫通ドメイン、（ｄ）ＣＤ２８ヒンジ／スペーサー領域（例えば、配列番号１５（または配列番号９０のアミノ酸１１４～１５２）に記載のアミノ酸配列からなるＣＤ２８ポリペプチド）、ならびに（ｅ）配列番号３５に記載のアミノ酸配列からなる改変ＣＤ３ζポリペプチド、およびＣＤ２８ポリペプチド（例えば、配列番号１０１（または配列番号９０のアミノ酸１８０～２２０）に記載のアミノ酸配列からなるＣＤ２８ポリペプチド）を含む共刺激シグナル伝達領域を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ＰＤ－１　ＤＮは、配列番号４８のアミノ酸１～２０からなるＰＤ－１シグナルペプチド、配列番号４８のアミノ酸２１～１６５からなるＰＤ－１細胞外ドメイン、および配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７からなるＣＤ８ポリペプチドを含む。ポリペプチド組成物はまた、配列番号１２１に記載のアミノ酸配列を有し、図１に示されるようにＣＡＲとＰＤ－１　ＤＮの間に位置するＰ２Ａペプチドも含む。ポリペプチド組成物を「Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ」と指定する。

【０３３８】

ポリペプチド構築物に含まれるＣＡＲは、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を有する。ポリペプチド構築物をコードする例示的なヌクレオチド配列を、配列番号１２３に記載する。ポリペプチド組成物をコードする別の例示的なヌクレオチド配列を、配列番号１２４に記載する。

【０３３９】

（実施例２）

実施例１に記載されたポリペプチド組成物の構造を有するＭ２８ｚ１ＸＸ－Ｐ２Ａ－Ｐ

ＤＲＤＮＲの活性を研究した。代替構築物および対照構築物の構造を、図２に示されるようにＭ２８ｚ１ＸＸ－Ｐ２Ａ－ＰＤ１ＤＮＲと比較した。

【０３４０】

ＣＡＲ構築物を含むウイルスベクターを図３Ａ～３Ｄに示されるように産生細胞系ＲＤ１１４において生成した。ＲＤ１１４細胞をＨ２９ウイルス上清の様々な希釈液（未希釈、１：２、および１：４）で形質導入し、抗Ｆａｂ抗体を使用するフローサイトメトリーによってＣＡＲ発現について染色した。ＲＤ１１４エンプティが陰性対照としての役割を果たした。ヒトＴ細胞を、図４Ａ～４Ｅ、５Ａ～５Ｅ、および６Ａ～６Ｆに示されるように、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－Ｐ２Ａ－ＰＤ１ＤＮＲで形質導入するのに成功した。ＰＨＡ活性化Ｔ細胞を、様々な濃度のＲＤ１１４ウイルス上清で形質導入し、フローサイトメトリーを使用して、抗Ｆａｂ染色によってＣＡＲ発現について、および抗ＰＤ１染色によってＰＤ１ＤＮＲについて染色した。ベクターコピー数（ＶＣＮ）が蛍光強度の中央値（ＭＦＩ）と相関したかどうかを研究した。ＰＨＡ活性化Ｔ細胞を、様々な濃度のＲＤ１１４ウイルス上清で形質導入し、抗Ｆａｂ染色とフローサイトメトリー分析によってＣＡＲ発現について染色した。形質導入Ｔ細胞のゲノムＤＮＡを単離し、ベクターコピー数をｑＰＣＲを使用してＤＮＡ１μｇ当たりのＶＣＮとして決定した。図７Ａ～７Ｃに示されるように、ＣＡＲ陽性細胞のＭＦＩを３名の試験したドナー全員について１μｇのＤＮＡ当たりのＶＣＮと相関させた。ヒトＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞の形質導入比を表１に示す。

【表１】

表 1

ドナー	希釈率	CD3+ Fab+		CD3+ Fab+ PD1+		CD3+ CD8+		CD3+ CD4+	
		%	陽性のMFI	%	陽性のMFI	総%	% Fab+	総%	% Fab+
H116-2	1:7	62	4138	59	9142	33	69	64	58
H18	1:5	57	5410	65	10555	46	63	50	52
H19	1:10	64	3863	57	8107	50	69	45	60

【０３４１】

次に、Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞溶解効果を研究した。インピーダンスベースのアッセイを使用して、様々なＥ：Ｔ比で、異なるドナー由来のＭＳＬＮ高標的細胞（ＭＧＭ）をＭ２８ｚ１ＸＸ－ＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と共培養した。結果を図８に示す。図８に示されるように、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－ＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ形質導入Ｔ細胞は、３名の試験した異なるドナー全員に対する有効な細胞傷害性を実証した。エフェクター細胞傷害性は、複数のＥ：Ｔ比にわたった（データは示さず）。

結論：

【０３４２】

Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲベクターをＲＤ１１４細胞において生成することに成功した。安定した産生細胞系をすべての構築物について確立することに成功した。ウイルスベクターを滴定して、複数のドナーＴ細胞の約４０～６０％の形質導入を得た。ＣＤ４およびＣＤ８　Ｔ細胞に形質導入し、ＣＡＲおよびＰＤ１ＤＮＲを発現させることに成功した。ベクターコピー数と形質導入の間の相関を観察した。

【０３４３】

（実施例３）

この実施例は、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－ＰＤ１ＤＮＲを含む様々な構築物の比較分析について記載する。インピーダンスアッセイを使用することによって、細胞傷害性を測定した。インピーダンスベースの細胞傷害測定（ｅＣＴＬ）の原理を図９に示す。ＣＡＲ構築物、ドナー、ＣＡＲ標的およびＥ：Ｔ比を含む比較分析のパラメーターを図１０に示す。標的細

胞系におけるＭＳＬＮおよびＰＤ－Ｌ１発現を測定した。中皮腫（ＭＧＭ、ＭＧＭ－ＰＤＬ１およびＭＳＴＯＧ）および肺がん（Ａ５４９ＧＭおよびＡ５４９Ｇ）細胞系を、フローサイトメトリーによって、ＭＳＬＮおよびＰＤ－Ｌ１発現について評価した。結果を図１１Ａ～１１Ｅに示す。ＭＧＭ、ＭＧＭ－ＰＤＬ１およびＡ５４９ＧＭはＭＳＬＮを過剰発現した。ＭＧＭ－ＰＤＬ１細胞は、ＰＤ－Ｌ１をさらに過剰発現した。

【０３４４】

形質導入Ｔ細胞のＣＡＲおよびＰＤ１発現も測定した。Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲまたはＭ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲを形質導入したヒトＴ細胞を、フローサイトメトリーを使用して、抗ｍｙｃ染色によってＣＡＲ発現について、および抗ＰＤ１染色によってＰＤ１／ＰＤ１ＤＮＲ発現について分析した。結果を図１２Ａ～１２Ｅに示す。

【０３４５】

ＭＳＬＮ高腫瘍細胞（ＭＧＭ）に対してＭ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲまたはＭ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲを発現するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を行った。ＭＳＬＮ高標的細胞（ＭＧＭ）を、様々なＥ：Ｔ比で、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。インピーダンスベースのアッセイを使用して抗腫瘍効率を評価した。結果を図１３Ａ～１３Ｃに示す。さらに、クロム－５１で標識したＭＳＬＮ高標的細胞（ＭＧＭ）を、様々なＥ：Ｔ比で、１８時間、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。クロム－５１ＣＴＬによって細胞傷害性を決定した。結果を図１４に示す。

【０３４６】

次に、ＭＳＬＮ陰性腫瘍細胞（ＭＳＴＯＧ）に対してＭ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲまたはＭ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲを発現するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を測定した。ＭＳＬＮ陰性標的細胞（ＭＳＴＯＧ）を、図示したＥ：Ｔ比で、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。インピーダンスベースのアッセイを使用して抗腫瘍効率を評価した。結果を図１５Ａ～１５Ｃに示す。さらに、クロム－５１で標識したＭＳＬＮ陰性標的細胞（ＭＳＴＯＧ）を、様々なＥ：Ｔ比で、１８時間、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。クロム－５１ＣＴＬによって細胞傷害性を決定した。結果を図１６に示す。

【０３４７】

さらに、ＰＤＬ１を過剰発現するＭＳＬＮ高腫瘍細胞に対してＭ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲまたはＭ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲを発現するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を測定した。ＰＤＬ１を過剰発現するＭＳＬＮ高標的細胞（ＭＧＭ－ＰＤＬ１）を、様々なＥ：Ｔ比で、Ｍ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲ、Ｍ２８ｚ１ＸＸ－ＰＤ１ＤＮＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。インピーダンスベースのアッセイを使用して抗腫瘍効率を評価した。結果を図１９Ａ～１９Ｃに示す。同様に、ＭＳＬＮ高腫瘍細胞（Ａ５４９ＧＭ）に対してＭ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲまたはＭ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲを発現するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を測定し、結果を図１８Ａ～１８Ｃに示し；ＭＳＬＮ低腫瘍細胞（Ａ５４９Ｇ）に対してＭ２８ｚ、Ｍ２８ｚ１ｘｘ、Ｍ２８ｚ－ＰＤ１ＤＮＲまたはＭ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲを発現するＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率の比較分析を測定し、結果を図１９Ａ～１９Ｃに示す。

結論：

【０３４８】

Ｍ２８ｚ１ｘｘ－ＰＤ１ＤＮＲ構築物は、Ｅ：Ｔ比に依存してＭＳＬＮ$^{+}$標的細胞を死滅させ、ここで、この結果を異なるがん（肺がんおよび中皮腫細胞系）の異なるＴ細胞ド

ナーに関して再現した。標的化された死滅は、ＭＳＬＮ発現のレベルと相関し、ＰＤ－Ｌ１の高発現を有するＭＳＬＮ$^{+}$標的細胞に対して効率的であった。

【０３４９】

（実施例４）

細胞固有のＰＤ－１チェックポイント遮断を有する臨床グレードのメソテリン標的化ＣＡＲ Ｔ細胞の局所的送達：第Ｉ相試験への橋渡し

概要：この実施例は、臨床グレードのＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞の前臨床安全性および抗腫瘍効率の増強についてのエビデンスを提供する。

【０３５０】

方法：Ｍ２８ｚまたは Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲを発現するよう工学的に操作されたヒトＴ細胞の相対的細胞傷害性、増殖、およびサイトカイン分泌を、それぞれクロム放出、蓄積、およびＬｕｍｉｎｅｘアッセイによって評価した。胸膜内投与したＭ２８ｚまたはＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞の単回用量（１×１０^{5}個のＣＡＲ Ｔ細胞；Ｅ：Ｔ １：１０００）の抗腫瘍効率を連続的生物発光イメージングおよび生存率の比較によって、同所性胸膜中皮腫を有するＮＳＧマウスにおいて調査した。腫瘍の根絶後に、ＣＡＲ Ｔ細胞の機能持続性を腫瘍負荷（２×１０^{6}個～１１×１０^{6}個の腫瘍細胞の漸増用量）の反復によって試験した。

【０３５１】

結果：ｉｎ ｖｉｔｒｏでは、Ｍ２８ｚ Ｔ細胞とＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞の両方は、抗原特異的細胞傷害性、蓄積、およびエフェクター細胞分泌を呈した（表２を参照されたい）。ｉｎ ｖｉｖｏでは、単回用量のＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞によって、単回用量のＭ２８ｚ ＣＡＲ Ｔ細胞に対して、腫瘍根絶、生存率の増強、および１０回の腫瘍再負荷の際の腫瘍再建に対する耐性がもたらされた（表２を参照されたい）。

【０３５２】

結論：抗ＰＤ１抗体を使用せずに、ＣＡＲ Ｔ細胞の安全性、腫瘍根絶、および機能持続性に関するデータは、胸膜中皮腫を有する患者においてＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞の胸膜内投与の第Ｉ相臨床試験の開始を支持する。

【表２】

表 2-M28z CAR T 細胞構築物と M28z1XXPD1DNR CAR T 細胞構築物の比較

	M28z	M28z1XXPD1DNR
標的	メソテリン	メソテリン
共刺激性ドメイン	CD28	CD28
CD3z	突然変異なし	突然変異した 2 つの ITAM(1XX)
T 細胞固有のチェックポイント遮断 (PD1DNR)	なし	あり
in vitro での結果		
ヒト T 細胞の形質導入、範囲	25%-82%	30%-87%
未形質導入と比較した PD-1 細胞外ドメイン mRNA 発現、倍数	4	157
細胞傷害性、範囲		
E:T 10:1	35%-45%	25%-51%
E:T 5:1	28%-44%	20%-38%
E:T 2:1	17%-32%	14%-24%
蓄積、範囲、倍数	110-390	53-622
エフェクターサイトカイン(E:T 1:1、24 時間)、範囲		
IL-2	18-23 ng/mL	9-19 ng/mL
TNF-α	545-977 pg/mL	380-852 pg/mL
IFN-γ	8-11 ng/mL	6-15 ng/mL
in vivo での結果		
腫瘍根絶	26 日	19 日
生存期間中央値	56 日	到達せず
再負荷後に生物発光イメージングによって測定した腫瘍進行		
15 日間にわたり 3 回の再負荷	+1 log	+0.2 logs
52 日間にわたり 10 回の再負荷	+1-2 logs	+0.2 logs
現在の状況	第 II 相臨床試験への移行中	• 産生された臨床グレードのベクターおよびウイルス上清

【０３５３】

（実施例５）

細胞固有のＰＤ－１遮断を有する次世代ＣＡＲ　Ｔ細胞：臨床理論的根拠、前臨床および臨床試験プロトコールの開発

悪性胸膜中皮腫（ＭＰＭ）は、抗ＰＤ１抗体への応答を妨げる、突然変異負荷が低く、かつＰＤＬ１発現の低いがんである。進行中の第Ｉ／ＩＩ相試験（ＮＣＴ０２４１４２６９、ｎ＝４１）において、胸膜内投与したメソテリン標的化キメラ抗原受容体（Ｍ２８ｚＣＡＲ）Ｔ細胞と、それに続くＰＤ－１抗体の安全性および抗腫瘍効率を確立した。細胞固有の抗ＰＤ１戦略を有するＣＡＲ　Ｔ細胞は、安全であり、抗ＰＤ１抗体の反復投与を必要とせずに低ＰＤＬ１腫瘍と高ＰＤＬ１腫瘍の両方に対する抗腫瘍効率を提供することができる。

【０３５４】

概要：この実施例は、臨床グレードのＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の前臨床安全性および抗腫瘍効率の増強についてのエビデンスを提供する。

【０３５５】

方法：臨床グレードのＭ２８ｚおよびＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ（ＰＤ－１ドミナントネガティブ受容体を含む改変されたＣＤ３ｚドメイン）ＣＡＲは、エフェクターとして複数のドナーＴ細胞において形質導入され、低および高ＰＤＬ１を有するＭＰＭ細胞を標的として使用した。様々なＥ：Ｔ比で、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、およびｉｎ　ｖｉｖｏでの相対的抗腫瘍効率を、同所性ＭＰＭを有するマウスにおいて評価した。遠位部位での反復腫瘍負荷によって、全身性抗腫瘍免疫を試験した。

【０３５６】

結果：ｉｎ　ｖｉｔｒｏでは、Ｍ２８ｚ　ＣＡＲとＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲの間に有意差は認められなかった（抗原特異的細胞傷害性、蓄積、およびエフェクターサイトカイン分泌）。ｉｎ　ｖｉｖｏでは、抗ＰＤ１抗体の反復投与または細胞固有のＰＤ１ＤＮＲのいずれかと共に胸膜内投与された単回用量（１×１０^{5}個のＣＡＲ　Ｔ細胞）のＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞によって、同等の腫瘍根絶、体重増加を伴う生存率の増強がもたらされた。図２０Ａおよび表３を参照されたい。同所性ＭＰＭを有するマウスでは、単回、低用量（１×１０^{5}個のＣＡＲ　Ｔ細胞）のＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、胸膜腫瘍を根絶させ、いずれの毒性も有さずに遠位の腹膜部位における腫瘍再負荷に耐性を示すことによって、Ｍ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して全身免疫が増強されることを実証した（ＰＤ１ＤＮＲはマウスＰＤＬ１／２に結合する）。図２０Ｂおよび２０Ｃを参照されたい。回収した腫瘍は、未形質導入Ｔ細胞と比較して、より高く、より深いＣＡＲ　Ｔ細胞の浸潤を実証する。図２０Ｄを参照されたい。

【０３５７】

結論：単回、低用量の胸膜内投与したＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、実行可能性、安全性、腫瘍根絶、機能持続性および全身性抗腫瘍免疫を実証する。

【表３】

表3－PD-1 DNR CAR T細胞対CAR T細胞を含むチェックポイント遮断剤による治療の特徴の比較

特徴	PD-1 DNR CAR T細胞	CAR T細胞を含むチェックポイント遮断剤
機序	細胞固有	細胞外部
潜在的な用量	単回	複数回
標的化療法	あり	なし
毒性	腫瘍への局在化	全身
腫瘍浸透への制限	見込みなし	抗体浸透への制限
患者の選択	必要なし	高い腫瘍PD-L1
抗原応答	複数回	複数回

【０３５８】

（実施例６）

１．概要

悪性胸膜中皮腫（ＭＰＭ）は、アスベスト曝露に関連する稀な致死性の悪性腫瘍である。ＭＰＭは、特徴として生命維持に必要な器官または胸壁への侵襲を有する胸膜の局所的に侵襲的な原発性悪性腫瘍である（Carbone et al., CA Cancer J Clin. 2019;69(5):402-429）。診察時の患者の大多数（６０％～７０％）が、局所領域で進行した疾患を有し、切除不能である（Nelson et al., J Clin Oncol. 2017;35(29):3354-3362；Flores et al., J Thorac Oncol. 2007;2(10):957-965）。化学療法、積極的な外科的切除および放射線療法の併用が無事に完了しても、処置した患者の生存期間中央値は９～１７カ月にすぎない（Flores et al., J Thorac Oncol. 2007;2(10):957-965）。２００３年以降、ＭＰＭに対する新たなＦＤＡに認可された治療法は存在していない（Tsao et al., J Thorac Oncol. 2018;13(11):1655-1667）。ＭＰＭを有する患者のファーストラインの全身処置に関するケアの現在の標準は、シスプラチン単独に関する９．３カ月と比較して、全生存期間中央値が１２．１カ月であることに基づき、シ

スプラチンとペメトレキセドである（Vogelzang et al., J Clin Oncol. 2003;21(14):2636-2644）。ＭＰＭを有する患者は、低い腫瘍突然変異負荷および低いプログラム死－リガンド１（ＰＤ－Ｌ１）の発現を有するため、免疫チェックポイント阻害剤に対するそれらの応答は制限され、膨大な満たされていない需要が存続している（Yarchoan et al., JCI Insight. 2019;4(6)；Forde et al., Curr Treat Options Oncol. 2019;20(2):18）。ＭＰＭの限局性であるという性質、潜在的なアクセシビリティ、および診察時の転移の相対的欠如によって、これは、局所標的化療法に好適な候補となる（Nelson et al., J Clin Oncol. 2017;35(29):3354-3362）。

【０３５９】

この実施例は、少なくとも１つの化学療法レジメンを受けたことがあり、腫瘍を有することが文書化されているＭＰＭの診断（組織学的または細胞学的に文書化された）を有する患者の処置のための新たな治験薬である、胸膜内用量のＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞の臨床使用を支持するために行われる非臨床的研究について記載する。

【０３６０】

これは、シクロホスファミドによる前処置の後に、遺伝的に誘導された自己のＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の安全性、投与必要量、および標的化効率を評価するよう診断された最大３６名の参加者に関して、単一施設第Ｉ相研究である。この研究では、５つの計画された用量レベルがある：１ｋｇ当たり1×10^{6}、3×10^{6}、6×10^{6}、1×10^{7}、および3×10^{7}個のＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞、ただし、用量制限毒性が存在しないことを条件とする。Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を留置胸膜カテーテルを介して注入する。処置前の生検腫瘍および／または可溶性メソテリン関連ペプチドの血中レベルの免疫組織化学分析によって、メソテリンの発現に関して患者をスクリーニングする。

【０３６１】

Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ベクター産生マスター細胞バンク２９３ＶＥＣ－ＧＡＬＶ－ＳＦＧ－Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲから生成したガンマレトロウイルスベクターストックの上清をｅｘ　ｖｉｖｏで形質導入した自己のＴ細胞である。ベクターにコードされたＣＡＲの主な構成成分は：

１）メソテリンを発現する腫瘍を標的化するためのヒト抗メソテリンｓｃＦｖ、

２）Ｔ細胞の生存および増殖についてシグナル伝達するためのヒトＣＤ２８共刺激性ドメイン、

３）較正したＴ細胞活性化に対する単一の機能的免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を有する点突然変異したヒトＣＤ３ζ、ならびに

４）Ｔ細胞が抗原への曝露の際に機能不全または疲弊の状態に陥るのを防ぐためのプログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ１）ドミナントネガティブ受容体（ＰＤ１ＤＮＲ）

である（図２１を参照されたい）。

【０３６２】

メソテリンは、大多数のＭＰＭ、肺がん、トリプルネガティブ乳がん、膵臓がん、および卵巣がんおよび一部の食道がんにおいて過剰発現されるがん細胞表面抗原である（Pastan et al., Cancer Res. 2014;74(11):2907-2912；Kachala et al., Clin Cancer Res. 2014;20(4):1020-1028；Tang et al., Anticancer Agents Med Chem. 2013;13(2):276-280；Servais et al., Clin Cancer Res. 2012；Kelly et al., Mol Cancer Ther. 2012;11(3):517-525；Tchou et al., Breast Cancer Res Treat. 2012;133(2):799-804）。本発明者らは、メソテリンの過剰発現が肺腺癌（ｎ＝１２００）（Kachala et al., Clin Cancer Res. 2014;20(4):1020-1028）、ＭＰＭ（ｎ＝２５０）（Servais et al., Clin Cancer Res. 2012；Kelly et al., Mol Cancer Ther. 2012;11(3):517-525）、およびトリプルネガティブ乳がん（ｎ＝２５０）（Tozbikian et al., PLoS One. 2014;9(12):e114900）における侵襲を促進することを以前に実証した。正常組織と比較して、腫瘍において比較的高

いメソテリン発現に加えて、正常な腹膜、胸膜、および心膜の中皮表面にも非常に低いレベルで発現され（Villena-Vargas et al., Ann Cardiothorac Surg. 2012;1(4):466-471）、固形腫瘍のＣＡＲ Ｔ細胞療法に対する理想的な標的となる。メソテリンの生体機能はあまり理解されておらず、調査中である。

【０３６３】

以前に、ペンシルベニア大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ）で行われた臨床研究（ＮＣＴ０１３５５９６５）において、ＣＡＲがマウスｓｃＦｖを含むメソテリン標的化ＣＡＲ Ｔ細胞をヒトの静脈内に与えた（１ｍ^{2}当たり３×１０^{8}個の細胞または１用量当たり４．８×１０^{7}個の細胞）。１名の患者で認識されたアナフィラキシー反応は、その研究で使用されたＣＡＲ構築物のヒト化マウスｓｃＦｖ部分に対して発生した抗マウス抗体の応答によって引き起こされたことが報告された（Beatty et al., Cancer Immunol Res. 2014）。対照的に、本発明者らの実験室で行った最近の第Ｉ相研究（ＮＣＴ０２４１４２６９）では、ヒトＦａｂライブラリーに由来する完全ヒトｓｃＦｖからなるメソテリン標的化ＣＡＲ Ｔ細胞（１ｋｇ当たり最大６×１０^{7}個のＣＡＲ Ｔ細胞）を胸膜内に投与した（Feng et al., Mol Cancer Ther. 2009）。今日まで、用量制限毒性を観察することなく、４０名の患者を処置してきた。ＣＡＲ Ｔ細胞療法と、その後の３回用量のペンブロリズマブ（抗ＰＤ１）と、さらに３か月間のフォローアップを受けた患者のコホート（ｎ＝１８）で、予備的有効性をこの研究において観察した。重要なことに、このコホートの患者の８３％は、６か月の時点で新たな処置も追加の処置も必要とせず、患者の半分は、１８カ月間追加の処置を受けなかった。さらに、患者の大多数では、胸膜内投与の１００日より多い日数後に、ＣＡＲ Ｔ細胞が末梢血において検出され、これらの細胞が患者の体内に残存することを示した。

【０３６４】

ヒト初回投与臨床試験を指示して、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞に関する薬理プログラムは、一連の直交性のｉｎ ｖｉｔｒｏ特異度、細胞傷害性、蓄積、ならびにマウスにおけるサイトカイン分泌研究およびｉｎ ｖｉｖｏ腫瘍有効性および生存率の研究からなり、その結果は臨床使用に移行するための有効用量を示唆する。表４は、それらの重要な所見と一緒に、実施された非臨床的薬理学および毒性学アッセイの総合的概要を提供する。

【表４－１】

表 4.薬理学および毒性学アッセイならびにそれらの重要な所見の総合的概要

実験	目的	重要な所見
ヒト腫瘍におけるメソテリン発現	ヒト腫瘍における細胞表面メソテリンの分布を定義する	- 固形腫瘍において発現されたメソテリン -正常な肺および乳房組織においてメソテリン発現がない
形質導入	ウイルス上清の形質導入効率を決定する	- ウイルス上清の濃度は、CAR および PD1DNR 形質導入効率に直接的に比例する
ベクターコピー数 (VCN)	T 細胞ゲノムにおけるベクター挿入数を決定する	- CAR 発現と VCN の間の正の相関 - VCN を 5 以下に保つために 35%～70%に最適化された CAR 形質導入
PD1DNR の定量化	内因性 PD1 および PD1DNR のレベルを正確に定量する	- mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞に関して、タンパク質レベル(2 倍を超える)および mRNA レベル(100 倍を超える)を上方調節した PD1 細胞外ドメイン
myc タグによる妨害	CAR 機能に関する myc タグの影響を調査する	- いずれも *in vitro* で同一の抗腫瘍効率を呈する myc タグを有するおよび有さない M28z1XXPD1DNR CAR T 細胞
細胞傷害性	抗原特異的細胞傷害性を決定する	- mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞は、抗原特異的な、HLA と無関係の腫瘍溶解を媒介する
蓄積	CAR T 細胞の蓄積を調査する	- 6 回の抗原刺激にわたり、最大 622 倍増殖および蓄積することが見出された mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞
反復抗原刺激	連続的な抗原への曝露下で細胞傷害性を調査する	- 初期抗原刺激: mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞と mycM28z CAR T 細胞の間で類似する細胞傷害性 - 反復抗原刺激: mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞では保持されたが、mycM28z CAR T 細胞では低下した細胞傷害性
サイトカイン分泌	抗原刺激の際にサイトカイン分泌を定量する	- mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞は、抗原刺激の際にエフェクターサイトカイン(IL-2、IFN-γ、TNF-α)を分泌する - エフェクターサイトカイン分泌は、反復抗原刺激の際に減少した

【表４－２】

in vivo での抗腫瘍効率	*in vivo* での抗腫瘍効率および生存率を調査する	- マウス 1 匹当たり 3×10^4 個の mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞の単回胸膜内用量で観察された有効性および腫瘍根絶 - mycM28z1XXPD1DNR(5×10^4 個および 1×10^5 個の用量)CAR T 細胞で処置したマウスは、研究が終了するまで腫瘍を有さないままであった(68 日目;1×10^5 個の mycM28z CAR T 細胞で処置したマウスでは50日目に対して、生存期間中央値に達しなかった) - mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞で処置したマウスにおいて体重増加が観察され、毒性は観察されなかった
ex vivo での腫瘍の免疫蛍光染色	胸膜内処置したマウスの原発腫瘍において CAR T 細胞を検出する	- 浸潤腫瘍で見られ、腫瘍周囲の領域に豊富に存在する局所的に投与された mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞
in vivo での反復抗原負荷	機能持続性および長期抗腫瘍効率を調査する	- 1×10^5 個の mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞の単回胸膜内用量は、再負荷された腹腔内腫瘍の確立に耐性を示すことによって、優れた機能持続性および長期抗腫瘍活性の増強を実証した - 抗原再負荷の際に mycM28z CAR T 細胞は機能不全となった
in vivo での臨床グレードの CAR T 細胞の抗腫瘍効率	臨床試験用にベクターストックを形質導入した凍結乾燥 T 細胞の抗腫瘍効率を検証する	- 凍結乾燥した臨床グレードの M28z1XXPD1DNR CAR T は、*in vivo* で、解凍後に高い生存率を実証し、抗腫瘍効率を呈し、生存率を延長させた - 毒性は観察されなかった

【表４－３】

毒性	*in vivo* で毒性を調査する	- 死亡率または罹患率なし - 有意な臨床兆候なし - 非腫瘍対照と比較して体重に有意差なし - 組織病理学:顕微鏡所見は急性毒性にも遅延毒性にも関連しなかった - 血液学:研究 15 日目に屠殺した雌のマウスは、高い平均単球値(%)を有し;いずれの顕微鏡所見とも相関しなかった。 - 臨床化学:研究 14 日目に屠殺された雄のマウスは、低い平均総タンパク質値を有し;いずれの顕微鏡所見とも相関しなかった。 - メソテリン異種移植モデルにおける 1×10^5 個の mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞の単回の同所性投与は忍容性に優れる。

【０３６５】

前臨床研究においてＣＡＲ Ｔ細胞の検出を容易にするために、メソテリン特異的ｓｃＦｖ（ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ）のＮ末端にｍｙｃタグを含むＣＡＲ Ｔ細胞を生成した。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞とＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞の間の一貫性を評価するために、ウイルス上清の形質導入効率を比較し、２つの構築物の間のベクター構成成分の一貫した濃度に依存する発現を観察した。さらに、ＣＡＲとＰＤ１ＤＮＲの両方を、Ｐ２Ａ自己切断ペプチドの存在によってそれぞれ形質転換された細胞内で比例して発現させ、これらは、バイシストロニックな導入遺伝子の発現を効率的に媒介する。Ｔ細胞ゲノムにおいて、ベクターコピーの挿入数に対するＣＡＲを発現する形質導入された細胞のパーセンテージを比較すると、形質導入に使用したウイルス上清の希釈と得られたベクターコピー数（ＶＣＮ）の間に正の線形関連が観察された。これらの観察から、３５％～７０％の範囲のＣＡＲを発現するＴ細胞が、（１）低いＶＣＮ：細胞比を維持し、（２）通常は高いＶＣＮ：細胞比でより高い挿入突然変異誘発のリスクを低下させる最適な形質導入効率を確保することが決定された。

【０３６６】

ＰＤ１ＤＮＲの発現を確認し、これをその内因性カウンターパートと識別するために、フローサイトメトリーおよびｑＰＣＲアッセイを実施して、それぞれ、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲおよびｍｙｃＭ２８ｚを形質導入したＴ細胞において、ＰＤ１について細胞表面タンパク質および細胞内ｍＲＮＡ発現を測定および比較した。細胞表面タンパク質レベルでは、ｍｙｃＭ２８ｚ ＣＡＲ Ｔ細胞と比較して、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞は、ＰＤ１について陽性に染色された細胞のパーセントにおいて２倍の増加、およびＰＤ－１陽性細胞によって示された蛍光強度の中央値（ＭＦＩ）において３倍の増加を呈した。ｍＲＮＡレベルでは、未形質導入Ｔ細胞と比較して、ｍｙｃＭ２８ｚ ＣＡＲ Ｔ細胞は、ＰＤ１細胞外ドメインと細胞内ドメインの両方において４倍の増加が示され、一方、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞は、ＰＤ１細胞外ドメインにおいて１５７倍の増加を呈し、ＰＤ１細胞内ドメインにおいて２倍の増加しか

呈さなかった。ＰＤ１細胞外ドメインの１桁高い発現は、チェックポイント阻害と敵対する役割を果たすＰＤ１ＤＮＲの高発現を示す。

【０３６７】

最後に、ＣＡＲ機能に関するｍｙｃタグ（前臨床研究において使用した）のいずれの潜在的妨害も除外するために、インピーダンスベースの細胞傷害アッセイを使用して、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞とＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率を比較し、３名の異なるドナーにわたってメソテリン陽性腫瘍細胞の動態と全体的死滅に差がないことを明らかにし、ｍｙｃタグがＣＡＲ機能を妨害しないことを確認した。

【０３６８】

次に、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の特異度、細胞傷害性、蓄積、およびサイトカイン分泌を分析した。^{51}Ｃｒ細胞傷害アッセイにおいて、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ＰＤ－Ｌ１の構成的発現と過剰発現の両方に関するメソテリン陽性腫瘍細胞に対する抗原特異的細胞傷害性およびヒト白血球抗原（ＨＬＡ）に依存しない細胞傷害性を呈した。メソテリン陰性腫瘍細胞に対する非特異的細胞傷害性は観察されなかった。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、メソテリン抗原発現の非存在下で、ＰＤ－Ｌ１を過剰発現する標的に対する細胞傷害性を全く発現しなかった。反復抗原刺激アッセイを行う際（抗原ストレス試験）、６回の抗原刺激期間にわたり、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞とｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の両方において最大６２２倍の拡大が認識された。試験した時点で、構築物は、１回目の抗原刺激後と類似する細胞傷害性を実証し、４回目の抗原刺激まで類似する細胞傷害性を保持した。抗原ストレスを増加させるためにエフェクター対標的（Ｅ：Ｔ）比をさらに低下させると、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、７回目の抗原刺激の際にｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞よりも良好に細胞傷害性を保持した。しかし、アッセイの経過中、エフェクターサイトカイン（ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、およびＴＮＦ－α）の分泌は、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞とｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の両方で徐々に低下し、両方の構築物の安全性プロファイルを示した。

【０３６９】

ホタルルシフェラーゼ（ｆｆＬｕｃ）を同時に形質導入したＭＰＭ腫瘍細胞を胸膜内投与し、ＭＰＭの同所性がんモデルを表す腫瘍を確立した。腫瘍成長を非侵襲的にモニターするために、本発明者らの実験室によって以前に公開された胸膜腫瘍の退縮または進行を定量的にモニタリングするために最適化されたプロトコールを使用して、腫瘍を有するマウスの腹腔内に１５０ｍｇ／ｋｇ用量のルシフェリンを注射し、１５分後にＩＶＩＳ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍイメージングシステム（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）において可視化した。

【０３７０】

ｉｎ　ｖｉｖｏでＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍活性を研究するために行われた最初の実験では、同所性腫瘍を有するＮＳＧマウスを単回胸膜内用量の３×１０^{4}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置し、単回胸膜内用量の、前立腺特異的膜抗原（Ｐ２８ｚ）に特異的な対照ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスと比較した。１５日後に、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、腫瘍負荷において有意な低下を示したが（ｐ＝０．０００２）、一方、Ｐ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、高腫瘍負荷によって瀕死の状態になり始めた。

【０３７１】

第２のｉｎ　ｖｉｖｏ研究では、同所性の腫瘍を有するマウスを３つの群に分配し、それぞれ単回の胸膜内用量の１×１０^{5}個もしくは５×１０^{4}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞または１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を受けた。連続的な腫瘍イメージングは、ＣＡＲ　Ｔ細胞投与後５日程度で、すなわち１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスではおよそ１９日目に、１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスではおよそ２６

日目に、ベースラインレベルに対する生物発光イメージング（ＢＬＩ）シグナルの低下によって決定される、完全な腫瘍根絶を含む腫瘍負荷の低下を示した。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のいずれかの用量で処置したマウスは、研究が終了するまで（６８日）腫瘍なしのままであった。生存期間中央値は、1×10^5個のｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは５０日であり、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のいずれかの用量で処置したマウスでは生存期間中央値に達しなかった（６８日を超える；ｐ＝０．００８５～０．０４２７）。胸膜腫瘍のｅｘ　ｖｉｖｏでの免疫蛍光イメージングは、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が腫瘍周辺を高密度で囲み、局所的送達の３日後までに腫瘍実質を侵襲することを明らかにした。これらの結果は、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲを形質導入した様々なパーセンテージのＣＤ４およびＣＤ８　Ｔ細胞を有する複数のドナーに由来するＴ細胞の使用によって再現された。

【０３７２】

ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の機能持続性について調査するために、1×10^5個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞またはｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のいずれかの単回胸膜内用量を受けた同所性ＭＰＭを有するマウスに、４～８日ごとに最大１０回、漸増用量の（１回の用量当たり2×10^6～11×10^6個の細胞）腹腔内投与されたメソテリン陽性腫瘍細胞を再負荷した（細胞の反復投与は、胸膜腔よりも腹膜腔においてより実行可能である）。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスに関するＢＬＩシグナルは、各腫瘍再負荷後直ちにピークに達し、すべての再負荷の時点でベースラインレベルに戻った。対照的に、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、５回の腫瘍再負荷までは同じ傾向を示したが、後半の腫瘍再負荷の時点での（６～１０回）より多い腫瘍用量の投与後に腫瘍再確立を制御することができず、腫瘍再発および瀕死状態をもたらした。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、いかなる毒性の明らかな兆候もなく、1×10^5個のＣＡＲ　Ｔ細胞の単回の胸膜内投与後１２６日を超えても、１０回の反復負荷に対する腹腔内の腫瘍確立に耐性を示した。高い抗原ストレス環境下では、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏでｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して、優れた機能持続性および抗腫瘍効率の増強を呈した。この増強された効率が、この時点でＣＡＲ　Ｔ細胞で処置されたＮＳＧマウスにおいて一般的にみられる移植片対宿主病によるものではなかったことを確認するために、抗原を発現しない標的を投与し、抗腫瘍応答を有さない腫瘍ＢＬＩの増加をもたらし、観察された抗腫瘍効率が抗原特異的であることを確認した。

【０３７３】

臨床試験において使用されるために産生したＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲをコードするウイルスの上清を形質導入した、凍結保存されたＴ細胞の抗腫瘍効率を評価するために、ＭＳＫ　Ｃｅｌｌ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ（ＣＴＣＥＦ）によって生成されたＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を解凍し（生存率：解凍後に８８％）、同所性ＭＰＭを有するマウスの胸膜内に、マウス１匹当たり6×10^4個および2×10^5個のＣＡＲ　Ｔ細胞の用量で注射した。観察期間が終了するまで（７０日目）生存しているマウスの１００％に関して、両用量で腫瘍退縮および根絶が観察され、一方、未処置のマウスでは腫瘍が進行し、１９日目で死亡した。凍結保存されたＣＡＲ　Ｔ細胞は、解凍後に高い生存率を実証し、いかなる毒性の兆候も有さず有効であった。

【０３７４】

上記有効性実験を行う際に、マウスにおいて毒性は観察されず、体重は全体を通して安定したままであった。

【０３７５】

この実施例の項目３（「非臨床毒性学」と題する）は、ＭＰＭの同所性マウスモデルにおけるｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の潜在的毒性を具体的に評価す

るために、マウスにおいて行った研究について記載する。死亡率、罹患率、体重、臨床兆候、血液学および臨床化学、肉眼的剖検、および組織病理学的評価を、対照群および処置群に無作為に割り当てた８日齢の同所性中皮腫を保有する９６匹（４８匹の雄および４８匹の雌）ＮＳＧマウスにおいて評価した。マウス１匹当たり１×１０^{5}個のＣＡＲ　Ｔ細胞の用量または対照ビヒクル（１ｋｇ当たり５×１０^{6}個のＣＡＲ　Ｔ細胞）を同所性の注射によって１回投与した。ＣＡＲ　Ｔ細胞またはビヒクル投与後２日目および１４日目に（それぞれ中間および最終　　殺）、剖検ならびに血液学および臨床化学のパラメーター評価のためにマウスを沈静化させた。この時点で腫瘍が有意に退縮したかまたは根絶したため（以前の実験からのＢＬＩまたは剖検によって証明された）、１４日目を最終　　殺の時点として選択した。この時点で　　殺および剖検を実施することによって、高い抗原発現を伴う腫瘍負荷の非存在下でのＣＡＲ　Ｔ細胞拡大のピーク後の、低レベルのメソテリン発現を有する正常組織－具体的には胸膜、腹膜、および心膜－における任意のオンターゲット、オフ腫瘍効果（本発明者らのＣＡＲにおいて使用したｓｃＦｖはマウスのメソテリンと反応する）（Feng et al., Mol Cancer Ther. 2009）の検査が可能になる。

【０３７６】

腫瘍投与の２０～２２日後の死亡率および努力呼吸によって選択された　　殺を受けた対照ビヒクル処置群由来の２匹の動物を除いて、この研究では、死亡率も罹患率も動物において観察されなかった。本発明者らの実験室における以前の研究は、対照ビヒクルで処置された動物が、腫瘍投与のおよそ２０～２２日後に腫瘍負荷によって瀕死の状態になり得ることが示された（Servais et al., Clin Cancer Res. 2012；Servais et al., Curr Protoc Pharmacol. 2011;Chapter 14:Unit14 21；Adusumilli et al., Sci Transl Med. 2014;6(261):261ra151；Cherkassky et al., J Clin Invest. 2016;126(8):3130-3144；Servais et al., PLoS One. 2011;6(10):e26722）。したがって、これらの　　殺は、予定外ではあったが予期されていなかった訳ではなかった。いずれの死亡率も罹患率もＣＡＲ　Ｔ細胞の影響を受けていなかった。対照ビヒクルを受けた動物は、非腫瘍対照およびｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスと比較して、研究期間中の体重の進行的な減少および重量の有意差を示した。これは、対照ビヒクルで処置した動物の腫瘍負荷の増加に起因した。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは、有意な臨床兆候は観察されなかった。１匹の試験物で処置したマウスはわずかな痂皮形成を有することが観察され、これは、他の動物は影響を受けておらず、動物の活動は正常であったため、止血鉗子によって引き起こされる刺激に起因した。マウスは、モニタリング期間を通して正常に見えた。

【０３７７】

ＣＡＲ　Ｔ細胞投与の１４日後に最終　　殺を受けたｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置した雌のマウスは、腫瘍対照ビヒクルマウス（平均、３．３４％、ｎ＝５）と比較して、高い単球値の平均パーセント（平均、１８．４４％、ｎ＝５）（ｐ≦０．０００１）を有した。単球パーセントに関して確立された参照範囲は０．９％～１８％である。しかし、これは、いずれの顕微鏡所見とも相関しなかった。評価した血液学パラメーターに関して、他には有意な結果も異常な結果も観察されなかった。試験物で処置した群と対応するビヒクルで処置した群の間のいずれの差異も正常参照範囲内にあるか、または生物学的に関連しないかもしくは統計的に有意ではなかった。

【０３７８】

ＣＡＲ　Ｔ細胞投与の１４日後に最終　　殺を受けたｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置した雄のマウスは、腫瘍対照ビヒクルマウス（平均、４．６８ｇ／ｄＬ、ｎ＝４）と比較して、低い総タンパク質値の平均（平均、３．８３ｇ／ｄＬ、ｎ＝５）（ｐ＝０．００２２）を有した。総タンパク質に関して確立された参照範囲は、４．１～６．４ｇ／ｄＬである。しかし、これは、いずれの顕微鏡所見とも相関しなかった。臨床化学パラメーターへの他の有害効果は、試験物投与に関して観察されなかった。試験物で処置した群と対応するビヒクルで処置した群の間のいずれの差異も正常参照範囲内にあるか、または生物学的に関連しないかもしくは統計的に有意ではなかった。

【０３７９】
組織病理学的検討により、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞投与に起因する急性毒性または遅延毒性に関する、中間および最終　　殺日におけるいかなる顕微鏡所見も存在しないことが示された。ＣＡＲ　Ｔ細胞中間　　殺群の動物に関する顕微鏡所見は、異種移植腫瘍内の混合細胞浸潤の存在を含んだ。これは、試験物投与に関連するが、いずれの試験物毒性にも関連しないと考えられた。他のいずれの観察された所見も、対照におけるのと類似する発生率で、散発的に生じることが決定されるか、または利用した種／株において共通していた。
【０３８０】
ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、胸膜内投与の８日後に、腫瘍および脾臓において見られ、ＢＬＩによって、２週間の時点で、ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスにおいて腫瘍負荷が有意に低下することが明らかになり、試験物の投与の成功と薬理学的活性の両方を確認した。同じ時点で得られたマウスの血漿中サイトカインレベルは、ビヒクル対照で処置したマウスにおけるよりも、ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスにおいてわずかに高いＩＬ－４レベルを示した。ＩＬ－１０、ＩＬ－６、ＫＣ／ＧＲＯ、およびＴＮＦ－αのレベルは一般的に低く、ＣＡＲ　Ｔ細胞を受けているマウスとビヒクル対照を受けているマウスの間に有意差はなかった。ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、およびＩＬ－５は検出不可能（定量限界未満）であった。
【０３８１】
結論として、データは、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が忍容性に優れることを示す。マウス１匹当たり１×１０^{5}個の細胞の用量は、患者の開始用量（体重基準で１ｋｇ当たり１×１０^{6}個の細胞）より５倍多く、これは、１ｋｇ当たり５×１０^{6}個の細胞に相当する。Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、患者の安全性データ（ｎ＝５０）がすでに利用可能であるＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と同じ抗原標的化部分を有する。本発明者らの臨床試験（ＩＮＤ１６３５４）では、ＣＡＲ　Ｔ細胞投与の３週間後に与えられた抗ＰＤ１チェックポイント遮断抗体と組み合わせて胸膜内投与された最大１ｋｇ当たり６×１０^{7}個のＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞に関して、本発明者らは、いかなる用量制限毒素も観察せず、オンターゲット、オフ腫瘍毒性を観察した。４名の患者は、毒性を観察されないまま、２回目の用量の胸膜内Ｍ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と、その後の複数回用量の抗ＰＤ１剤（４週間の休薬期間）を受けた。まとめると、利用可能な前臨床および臨床データのすべては、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の提案された開始用量および投与経路は、本発明者らの患者に対して許容できないリスクをもたらさないことを合理的に示す。
【０３８２】
２．非臨床薬理学
Ａ．方法
ＣＡＲベクター。非臨床研究で使用したベクターを表５にまとめる。

【表５】

表 5.非臨床研究において使用したベクターの概要

ベクター	タンパク質発現
mycM28z	メソテリン特異的 scFv(myc タグ)、CD28、CD3ζ
mycM28z1XXPD1DNR	メソテリン特異的 scFv(myc タグ)、CD28、CD3ζ(1XX)、P2A、PD1DNR
M28z1XXPD1DNR(研究グレード)	メソテリン特異的 scFv、CD28、CD3ζ(1XX)、P2A、PD1DNR
M28z1XXPD1DNR(臨床グレード*)	メソテリン特異的 scFv、CD28、CD3ζ(1XX)、P2A、PD1DNR
GFP-ffLuc(腫瘍細胞に形質導入した)	GFP、ホタルルシフェラーゼ
P28z(陰性対照)	前立腺特異的膜抗原(PSMA)scFv、CD28、CD3ζ

*臨床グレード:臨床試験用に産生したウイルス上清を使用して MSK Cell Therapy and Cell Engineering Facility で製造された CAR T 細胞

【０３８３】

メソテリン標的化ＣＡＲ構築物は、ＣＤ２８共刺激性ドメインおよびＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン（Ｍ２８ｚ）に融合したメソテリン特異的ｓｃＦｖ（クローンｍ９１２）（Feng et al., Mol Cancer Ther. 2009）を含有する。その３つのＩＴＡＭのうちの２つでＣＤ３ζ鎖を突然変異させ、単一の機能性ＩＴＡＭ（１ＸＸと称される）をもたらした（Feucht et al., Nat Med. 2019;25(1):82-88）。ＣＡＲをブタテッショウウイルス－１に由来するＰ２Ａ部位を介してＰＤ１ＤＮＲに融合させる。ＰＤ１ＤＮＲは、ＰＤ１シグナル伝達ペプチドと、ＣＤ８膜貫通ドメインおよびヒンジドメインに融合したＰＤ１細胞外ドメインから構成される（Cherkassky et al., J Clin Invest. 2016;126(8):3130-3144）。このデコイ受容体は、ＰＤ１シグナル伝達ドメインが枯渇しており、それによってＴ細胞固有のチェックポイント遮断をもたらす。ＣＡＲの検出を容易にするために、ｍｙｃタグ（アミノ酸配列ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ×２）を構築物ｍｙｃＭ２８ｚおよびｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲにおけるｓｃＦｖのＮ末端に融合させた。ヒトにおける免疫原性のいずれの潜在的リスクも回避するために、臨床グレードの構築物Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲはｍｙｃタグを含有しない。さらに、タンパク質発現は、ＣＡＲおよびＰＤ１ＤＮＲの構築においていかなる免疫原性も回避するためにコドン最適化される。非臨床研究において使用される構築物の詳細な構造を図２２に示す。

【０３８４】

ＣＡＲ構築物の発現は、レトロウイルスＳＦＧベクターのモロニーマウス白血病ウイルスの長い末端反復（ＬＴＲ）の制御下にある（Riviere et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(15):6733-6737）。ＣＡＲとＰＤ１ＤＮＲの両方の発現は、レトロウイルスＬＴＲによって駆動される。

【０３８５】

すべてのＣＡＲベクターは２９３Ｔ　Ｈ２９パッケージング細胞系にトランスフェクトされ、これらの細胞によって産生されたウイルス上清を使用して形質導入し、安定な２９３Ｔ　ＲＤ１１４細胞系を生成した。

【０３８６】

ＣＡＲ　Ｔ細胞。ヒト初代Ｔリンパ球を、治験審査委員会に承認されたプロトコールの下で健康なボランティアドナーの血液から単離した。フィトヘムアグルチニンに活性化される末梢血単核球（ＰＢＭＣ）をＬｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉ

ｕｍ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、ＮＹ）での低密度遠心分離によって単離した。単離の２日後に、ＰＢＭＣは１５μｇ／ｍＬのＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎ（Ｔａｋａｒａ、Ｓｈｉｇａ、Ｊａｐａｎ）でコーティングした６ウェル培養プレートで２４℃にて１８００ｇで６０分間のスピノキュレーションによって、ｍｙｃＭ２８ｚ、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ、またはＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲベクターを含有するウイルス上清を形質導入した。スピノキュレーションの翌日、１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００ユニット／ｍＬのペニシリン、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシン、および２０ユニット／ｍＬのＩＬ－２を補充したＲＰＭＩ－１６４０中で、形質導入したＰＢＭＣを維持した。タグ付けしたＣＡＲのｓｃＦｖにおけるｍｙｃタグ発現のフローサイトメトリー分析によって、またはＦ（ａｂ’）$_2$断片に特異的な抗ヒトＩｇＧ抗体で染色して、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲのタグ付けされていないＣＡＲのｓｃＦｖの発現を検出することによって、形質導入効率を決定した。７０％を超える生存率、抗ヒトＣＤ３染色による９５％を超えるＴ細胞純度、フローサイトメトリーによる３５％～７０％の形質導入効率、およびＣＤ４／ＣＤ８発現について、ＣＡＲ　Ｔ細胞を試験した。非臨床研究において使用したＴ細胞の特徴を表６にまとめる。

【表６】

表 6.非臨床研究において使用した T 細胞の特徴

PBMC ドナー	% CD3	% CD3+ CAR+	% CD3+ CAR CD4+	% CD3+ CAR CD8+
H16	97-98	43-62	48-57	33-45
H18	97-99	38-57	42-45	45-52
H19	98	37-64	41-46	47-51
C	97-98	65-66	37-38	55-57
C1	97	64-70	46	48-49
H1	97	56-60	38	決定されず

【０３８７】

腫瘍細胞。ＭＳＴＯ－２１１Ｈヒト胸膜中皮腫細胞系（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２０８１）由来の細胞を遺伝子改変させ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏ研究のために使用した（表７）。

【表７】

表 7.非臨床研究において使用した腫瘍細胞の概要

腫瘍細胞	タンパク質発現
MSTOG	GFP、ffLuc
MGM	GFP、ffLuc、メソテリン
MGM-PDL1	GFP、ffLuc、メソテリン、PD-L1

【０３８８】

ＭＳＴＯ－２１１Ｈは、内因性ＣＤ８０／８６共刺激性リガンドの発現を欠如する二相性ＭＰＭがん細胞系である。ＭＳＴＯ－２１１Ｈ細胞は、ＧＦＰおよびｆｆＬｕｃタンパク質を発現するようにレトロウイルスにより形質導入され、ＭＳＴＯＧと称され、ＭＳＫ

で構築されたＳＦＧレトロウイルスベクターを使用して非侵襲性ｉｎ　ｖｉｖｏＢＬＩを可能にした。濾過したウイルスを含有する培地を８ｕｇ／ｍＬのＰｏｌｙｂｒｅｎｅ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を使用して透過処理した細胞に添加した。２４時間後に新たに採取したウイルスで細胞を再度感染させた。これらの細胞に、ＳＦＧレトロウイルスベクターにサブクローニングされたヒトメソテリンバリアント１（ヒト卵巣がん細胞系［ＯＶＣＡＲ－３］から単離された）を形質導入し、ＭＧＭと称されるメソテリン＋ＭＳＴＯ－２１１Ｈ細胞を生成した。同様に、ＭＧＭ細胞に、ＰＤ－Ｌ１（ＳＦＧベクターにサブクローニングされたＯｒｉＧｅｎｅ　ｃＤＮＡ）を形質導入し、ＭＧＭ－ＰＤＬ１を得た。３７℃の５％　CO_2加湿インキュベーター中で、１０％のＦＢＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００ユニット／ｍＬのペニシリン、および１００ｕｇ／ｍＬのストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ－１６４０培地中で、腫瘍細胞を維持した。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ルシフェラーゼを発現する腫瘍細胞とＢＬＩフォトン数の間に線形相関（ピアソン　ｒ＝０．９９９、ｐ＜０．０００１、データは示さず）が観察された。形質導入タンパク質の相対的発現レベルを図２３に示す。

【０３８９】

フローサイトメトリー。Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴ　Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）またはＢＤ　ＬＳＲＦｏｒｔｅｓｓａ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＣＡ）を使用して、フローサイトメトリーを実施した。フィコエリトリンをコンジュゲートさせた抗ヒトメソテリンラットＩｇＧ２ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）を使用して、腫瘍細胞でのヒトメソテリン細胞表面発現を検出した。フィコエリトリン－シアニン７をコンジュゲートさせた抗ヒトＰＤ－Ｌ１マウスＩｇＧ１（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、腫瘍細胞でのヒトＰＤ－Ｌ１細胞表面発現を検出した。アロフィコシアニン－シアニン７をコンジュゲートさせた抗ヒトＣＤ３マウスＩｇＧ２ａまたはフィコエリトリン－シアニン７をコンジュゲートさせた抗ヒトＣＤ３マウスＩｇＧ１抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）を使用してヒトＣＤ３の、およびそれぞれ、フルオレセインイソチオシアネートをコンジュゲートさせた抗ヒトＣＤ４マウスＩｇＧ１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）またはＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８をコンジュゲートさせた抗ヒトＣＤ８マウスＩｇＧ１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を使用してヒトＣＤ４またはヒトＣＤ８の細胞表面発現について、ヒトＴ細胞を分析した。フィコエリトリンをコンジュゲートさせた抗ｍｙｃタグ抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｄａｎｖｅｒｓ、ＭＡ）またはＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７をコンジュゲートさせたＦ（ａｂ’）$_2$断片に特異的なヤギ抗ヒトＦ（ａｂ’）$_2$断片（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ、ＰＡ）を使用して、ＣＡＲの細胞表面発現を定量した。ＣＡＲ　Ｔ細胞におけるＰＤ１の細胞表面発現をＢｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｖｉｏｌｅｔ　７１１をコンジュゲートさせた抗ヒトＰＤ１マウスＩｇＧ１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を用いて分析した。ヒトＴ細胞のｅｘ　ｖｉｖｏでの検出のために、処理したマウス組織を、フィコエリトリン－シアニン７をコンジュゲートさせた抗ヒトＣＤ３マウスＩｇＧ１抗体およびアロフィコシアニン－シアニン７をコンジュゲートさせた抗ヒトＣＤ４５マウスＩｇＧ１抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）で染色した。４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）またはｅＦｌｕｏｒ　５０６（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）のいずれかで細胞を染色することによって、死細胞からの生細胞の識別を実施した。ＦＣＳ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｄｅ　Ｎｏｖｏ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｐａｓａｄｅｎａ、ＣＡ）およびＦｌｏｗＪｏ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）ソフトウェアを使用して、データ分析を実施した。表８はフローサイトメトリーに使用した抗体をまとめる。

【表８】

表 8.非臨床薬理学研究のためのフローサイトメトリー抗体

マーカー	クローン	種	抗体フォーマット	フルオロフォア	製造業者
CD3	HIT3a	マウス	IgG2a	APC-CY7	BioLegend
	UCHT1	マウス	IgG1	PE-CY7	BioLegend
CD45	2D1	マウス	IgG1	APC-CY7	BioLegend
CD4	RPA-T4	マウス	IgG1	FITC	BioLegend
CD8	RPA-T8	マウス	IgG1	AF700	BioLegend
PD1	EH12.2H7	マウス	IgG1	BV711	BioLegend
myc タグ	1B11	マウス	IgG2a	PE	Cell Signaling
抗 $F(ab')_2$	ポリクローナル	ヤギ	$F(ab')_2$	AF647	Jackson ImmunoResearch
メソテリン	420411	ラット	IgG2a	PE	R&D Systems
PD-L1	MIH1	マウス	IgG1	PE-CY7	BD Biosciences

【０３９０】

ＶＣＮの決定。ＣＡＲ　Ｔ細胞由来の総ゲノムＤＮＡをＭｉｎｉｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、Ｈｉｌｄｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して単離した。ＴａｑＭａｎのＰＣＲプライマーとプローブを使用して、ＳＦＧおよびハウスキーピング遺伝子アルブミン（ＡＬＢ）を検出した。ヒトＳＦＧプローブおよびプライマー配列：
プローブ配列：５’－ＶＩＣ－ＡＧＧＡＣＣＴＴＡＣＡＣＡＧＴＣＣＴＧＣＴＧＡＣ－ＴＡＭＲＡ－３’［配列番号１２６］
フォワードプライマー配列：５’－ＡＧＡＡＣＣＴＡＧＡＡＣＣＴＣＧＣＴＧＧＡ－３’［配列番号１２７］
リバースプライマー配列：５’－ＣＴＧＣＧＡＴＧＣＣＧＴＣＴＡＣＴＴＴＧ－３’［配列番号１２８］
ヒトＡＬＢプローブおよびプライマー配列：
プローブ配列：５’－ＶＩＣ－ＴＧＣＴＧＡＡＡＣＡＴＴＣＡＣＣＴＴＣＣＡＴＧＣＡＧＡ－ＴＡＭＲＡ－３’［配列番号１２９］
フォワードプライマー配列：５’－ＴＧＡＡＡＣＡＴＡＣＧＴＴＣＣＣＡＡＡＧＡＧＴＴＴ－３’［配列番号１３０］
リバースプライマー配列：５’－ＣＴＣＴＣＣＴＴＣＴＣＡＧＡＡＡＧＴＧＴＧＣＡＴＡＴ－３’［配列番号１３１］

【０３９１】

増幅反応液（２５μＬ）は、５μＬ（１５０μｇ）のゲノムＤＮＡおよび１２．５μＬのＴａｑＭａｎ　Ｆａｓｔ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、０．８μＬのプライマー（フォワードおよびリバース）、０．２μＬのＴａｑＭａｎプローブ、および５．７ｕＬの蒸留水を含有した。ｑＰＣＲ条件は以下の通りであった：５０℃（２分）、９５℃（２０分）、その後、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ　７－Ｆｌｅｘ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して９５℃（１５秒）および６０℃（１分）を４２サイクル。すべてのＰＣＲ測定は三連で実施した。細胞当たりのＶＣＮは、（

ＳＦＧ量の平均／ＡＬＢ量の平均）＊２の比として計算した。平均量は、ＳＦＧおよびＡＬＢ標準曲線から外挿された。

【０３９２】

ＰＤ１ ｍＲＮＡ発現の決定。ＣＡＲ Ｔ細胞由来の総ＲＮＡをＭｉｎｉｐｒｅｐ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して単離し、Ｈｉｇｈ－Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して逆転写反応に供した。ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎアッセイを使用して、ヒトＰＤＣＤ１の細胞外ドメインと細胞内ドメインを検出した。ヒトグリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）を正規化のために使用した。以下のプライマーを使用した。

ＧＡＰＤＨプライマー配列：

フォワードプライマー配列：５’－ＧＡＡＧＧＴＧＡＡＧＧＴＣＧＧＡＧＴ－３’［配列番号１３２］

リバースプライマー配列：５’－ＣＡＴＧＧＧＴＧＧＡＡＴＣＡＴＡＴＴＧＧＡＡ－３’［配列番号１３３］

ＰＤ１細胞外ドメインプライマー配列（Yoon et al., Science. 2015;349(6247):1261669）：

フォワードプライマー配列：５’－ＣＣＡＧＧＡＴＧＧＴＴＣＴＴＡＧＡＣＴＣＣＣ－３’［配列番号１３４］

リバースプライマー配列：５’－ＴＴＴＡＧＣＡＣＧＡＡＧＣＴＣＴＣＣＧＡＴ－３’［配列番号１３５］

ＰＤ１細胞内ドメインプライマー配列（Hsu et al., J Immunol. 2016;197(5):1884-1892.）：

フォワードプライマー配列：５’－ＡＣＧＡＧＧＧＡＣＡＡＴＡＧＧＡＧＣＣＡ－３’［配列番号１３６］

リバースプライマー配列：５’－ＧＧＣＡＴＡＣＴＣＣＧＴＣＴＧＣＴＣＡＧ－３’［配列番号１３７］

【０３９３】

ｃＤＮＡを次のｑＰＣＲアッセイのために５倍に希釈した。増幅反応液（２０μＬ）は、２００ｎｇの総ＲＮＡ由来のｃＤＮＡならびに１０μＬのＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ Ｍｉｘ（Ｑｉａｇｅｎ）、４μＬのプライマー（フォワードおよびリバース、それぞれ２００ｎＭ）、および蒸留水を含有した。ｑＰＣＲ条件は以下の通りであった：９５℃（１５分）、９５℃（２０分）、その後、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ ７ Ｆｌｅｘ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲシステム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して９４℃（１５秒）、６０℃（３０秒）、７２℃（３０秒）、および５０℃（データ収集のために２０秒）を４５サイクル。すべてのＰＣＲ測定は三連で実施した。すべてのプライマーをＩｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ、ＩＡ）によって合成し、増幅効率（Ｅ）値を計算した。標的遺伝子の相対的発現を、以下のＰｆａｆｆｌ式（Pfaff, Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45）に従って、比率として参照群に対して正規化した：

$$\text{相対比} = \left(E_{\text{標的}}\right)^{\Delta Ct\text{標的}\,(\text{対照}-\text{試料})} \Big/ \left(E_{\text{参照}}\right)^{\Delta Ct\text{参照}\,(\text{対照}-\text{試料})}$$

標的＝ＰＤ１細胞外／細胞内ドメイン；Ｒｅｆ＝ＧＡＰＤＨ；対照＝未形質導入Ｔ細胞。

【０３９４】

^{51}Ｃｒ細胞傷害アッセイ。ｍｙｃＭ２８ｚ Ｔ細胞と比較したｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞の細胞傷害性を標準的な５１Ｃｒ放出アッセイによって決定した。９６ウェル丸底プレートにおいて、１０％のＦＢＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００ユニット／ｍＬのペニシリン、および１００ｕｇ／ｍＬのストレプトマイシンを含む２００μＬのＲＰＭＩ中５×１０^{5}～１×１０^{6}個の総Ｔ細胞を、１００μＬの培地中で連続的に１：２で希釈した。標的細胞を、１×１０^{6}個の細胞当たり７５μＣｉの^{51}Ｃｒと２時間インキュベートし、１００μＬ当たり５×１０^{3}個の細胞の最終濃度に再懸濁させた

。培地で３回洗浄した後、１００μＬの標的細胞をＴ細胞に三連で添加し、３７℃の５％ＣＯ$_2$加湿インキュベーター中で４～１８時間インキュベートした。上清を採取し、９６ウェルのＬｕｍｉｎａプレート（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）にプレーティングし、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ　ＴｏｐＣｏｕｎｔで測定した。自発的な５１^{Cr}放出を培地単独とインキュベートした標的細胞において評価し、最大５１^{Cr}放出を１００μＬの０．２％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００中でインキュベートした標的細胞により決定した。特異的溶解のパーセンテージは以下のように計算した：［（１分当たりの実験数（ｃｐｍ）－自発的放出ｃｐｍ）／（総ｃｐｍ－自発的放出ｃｐｍ）］×１００。データは、三連の測定値の平均＋／－平均の標準誤差として報告し、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ、Ｒｅｄｍｏｎｄ、ＷＡ）またはＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）を使用して分析した。

【０３９５】

インピーダンスアッセイ。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＣＡＲ　Ｔ細胞に誘導される標的細胞の死滅を、ｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｓｉｓ機器（ＡＣＥＡ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）を使用して、リアルタイムで評価した。第１に、標的細胞およびエフェクター細胞のための培養培地として、１０％のＦＢＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００ユニット／ｍＬのペニシリン、および１００ｕｇ／ｍＬのストレプトマイシンを含む５０μＬのＲＰＭＩを、金の微小電極（ＡＣＥＡ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）でコーティングした９６ウェルマイクロタイタープレート中に添加して、バックグラウンドインピーダンスを測定した。第２に、１ウェル当たり１００μＬの培地中１０，０００個の標的細胞をプレーティングし、標的細胞の接着を２４～３４時間モニターした後、Ｅ：Ｔ比１：１～１：３で、ＣＡＲ　Ｔ細胞を５０μＬの培地に三連で添加した。ＣＡＲ　Ｔ細胞に誘導される死滅と標的細胞の剥離の結果として、インピーダンスの変化を評価するために、エフェクター細胞の添加後最大４日間、３７℃の５％　ＣＯ$_2$加湿インキュベーター中で、１５分ごとにデータを記録した。

【０３９６】

反復抗原刺激。ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの反復抗原刺激の際のＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率を調査するために、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲまたは対照としてのｍｙｃＭ２８ｚを形質導入した３．３×１０^{5}個～１×１０^{6}個のＴ細胞を、２４ウェル細胞培養プレート中１０％のＦＢＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００ユニット／ｍＬのペニシリン、および１００ｕｇ／ｍＬのストレプトマイシンを含む１ｍＬのＲＰＭＩにおいて、３．３×１０^{5}個の放射線照射した標的細胞（Ｅ：Ｔ比、１：１～３：１）と共培養した。４８時間の共培養後に、Ｔ細胞をプールし、計数し、フローサイトメトリーによってＣＡＲの発現について分析し、最大６回の反復抗原曝露のために放射線照射した標的細胞と同じＥ：Ｔ比で再度プレーティングした。１、３、および６回の抗原曝露後に、ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞傷害性を、^{51}Ｃｒ放出およびインピーダンスベースのアッセイを使用して評価した。

【０３９７】

蓄積。２４ウェルの細胞培養プレート中１０％のＦＢＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００ユニット／ｍＬのペニシリン、および１００ｕｇ／ｍＬのストレプトマイシンを含む１ｍＬのＲＰＭＩ中で、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲまたは対照としてのｍｙｃＭ２８ｚを形質導入した３．３×１０^{5}個のＴ細胞を３．３×１０^{5}個の放射線照射した標的細胞と（Ｅ：Ｔ比、１：１）共培養することによって、蓄積を評価した。４８時間の共培養後に、Ｔ細胞をプールし、計数し、フローサイトメトリーによってＣＡＲの発現について分析し、最大６回の反復抗原曝露として放射線照射した標的細胞と同じＥ：Ｔ比で再度プレーティングした。各抗原刺激サイクル後のＣＡＲ　Ｔ細胞数を使用して、絶対Ｔ細胞数によって経時的なＣＡＲ　Ｔ細胞の蓄積を決定した。

【０３９８】

サイトカインの定量。２４ウェル細胞培養プレート中１０％のＦＢＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００ユニット／ｍＬのペニシリン、および１００ｕｇ／ｍＬのストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ中で、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲまたは対照としてのｍｙ

ｃＭ２８ｚを形質導入した３．３×１０^{5}個のＴ細胞を３．３×１０^{3}個の標的細胞と（Ｅ：Ｔ比、１：１）共培養することによって、サイトカイン放出アッセイを実施した。４８時間の共培養後に、Ｔ細胞をプールし、計数し、フローサイトメトリーによってＣＡＲの発現について分析し、最大６回の反復抗原曝露のために放射線照射した標的細胞と同じＥ：Ｔ比で再度プレーティングした。サイトカインの定量のために、上清を、１、３、および６回の反復抗原刺激のための２４時間の共培養後に採取し、室温で１０分間８００ｇで遠心分離して、細胞およびデブリを取り除いた。製造業者の使用説明書に従って、Ｈｕｍａｎ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｍａｇｎｅｔｉｃ ３０－ｐｌｅｘ Ｐａｎｅｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）およびＭＡＧＰＩＸシステム（Ｌｕｍｉｎｅｘ、Ａｕｓｔｉｎ、ＴＸ）を使用して、サイトカインレベルを二連で決定した。

【０３９９】

同所性マウスモデル。同所性腫瘍モデルは、標準的皮下モデルよりもより臨床的に関連し、薬物の有効性を予測するのにより優れていると考えられる。腫瘍細胞が起源の器官に直接的に移植されるという事実によって、これらの腫瘍は、従来の皮下異種移植腫瘍モデルよりもはるかに元の状況（例えば、微小環境）を反映する。ルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクトした腫瘍細胞を、これらの細胞の同所性移植と一緒に組み合わせることによって、腫瘍成長、腫瘍分布、および転移の成長の非侵襲的可視化が可能になる。

【０４００】

６～１０週齢の雌および雄のＮＯＤ／ＳＣＩＤガンママウス（Ｔｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｂａｒ Ｈａｒｂｏｒ、ＭＥ）を使用して、同所性モデルを作製した。すべての手順は、承認された動物実験委員会（Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ）（ＩＡＣＵＣ）のプロトコールの下で実施した。吸入イソフルランおよび酸素を使用してマウスに麻酔をかけた。同所性ＭＰＭ腫瘍を確立するために、２００μＬの無血清培地中メソテリン発現細胞（８×１０^{5}個の腫瘍細胞）の直接的胸膜内注射を右側の胸部切開によって実施した。注射の８～１２日後の接種後に、マウスの９５％より多くで腫瘍が確立した。瀕死の状態になった場合、ＩＡＣＵＣガイドラインに従って、マウスを　殺した。

【０４０１】

このモデルは、ＭＰＭの肉眼所見および組織病理学的プロファイルを反映するという点で、ヒト腫瘍微小環境を総括する（図２４Ａを参照されたい）。さらに、本発明者らのマウスモデルにおけるＭＰＭ腫瘍の広範なリンパ血管形成（図２４Ｂを参照されたい）は、ヒトＭＰＭに特徴的である。

【０４０２】

ＢＬＩは、胸膜スペースにおいて１×１０^{3}個の程度の腫瘍細胞を検出することが可能であるｉｎ ｖｉｖｏでの高感度モダリティーである。標準化および感度は、本発明者ら自身の実験に基づく（Kachala et al., Clin Cancer Res. 2014;20(4):1020-1028；Servais et al., Clin Cancer Res. 2012；Servais et al., Curr Protoc Pharmacol. 2011;Chapter 14:Unit14 21；Servais et al., PLoS One. 2011;6(10):e26722；Servais et al., J Mol Med(Berl). 2011;89(8):753-769）。ＢＬＩ腫瘍シグナルと、腫瘍体積評価に関するゴールドスタンダードである磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）によって決定した胸膜腫瘍体積の間には、強い相関が観察された（ｒ＝０．８６、ｐ＜０．０００１、マウス内のクラスター化のために調整される；図２４Ｃおよび２４Ｄ）。定量的ＢＬＩについての本発明者らの所見は、胸膜が肥厚するに従って腫瘍が胸壁に沿って成長し、腫瘍深度を最小化するという事実に起因する（図２４Ａ）。よって、同所性の胸膜がんモデルにおけるＢＬＩは、腫瘍負荷の正確な定量的評価をもたらし、それによって、生存マウスにおけるバイオマーカー性能の非侵襲的連続評価のための対応標準をもたらすことができる。免疫組織化学およびフローサイトメトリー分析を使用して、本発明者らは、疾患のステージが進行している時でさえ、メソテリン発現は同所性ＭＰＭモデルにおいて持続されることを観察した（データは示さず）。

【０４０３】

マウス組織の処理。マウスをCO_2で安楽死させ、胸膜腫瘍および脾臓を、氷冷したＲＰＭＩ－１６４０を含む５０ｍＬのコニカルチューブに採取した。処理のために、組織を４０μｍの細胞ストレーナーを通して粉砕し、４℃にて４５０ｇで５分間遠心分離した。細胞ペレットが血性に見える場合は、それを、２ｍＬのＡＣＫ溶解緩衝液（Ｌｏｎｚａ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）中に再懸濁させ、室温で５分間インキュベートした。４℃にて４５０ｇで５分間の追加の遠心分離ステップの後に、洗浄およびフローサイトメトリーにおいて直ちに使用するための抗体染色のために、５％のウシ血清アルブミンを含むＰＢＳ中に、細胞ペレットを再懸濁させた。

【０４０４】

免疫蛍光法。確立したＭＧＭ胸膜腫瘍を有する雌のＮＳＧマウスに、５×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞、または未形質導入Ｔ細胞を注射した。注射の３日後に、マウスを　　殺し、胸膜腫瘍を単離し、４％のパラホルムアルデヒド中で室温にて一晩固定し、Ｌｅｉｃａ　ＡＳＰ６０２５組織プロセッサー（Ｌｅｉｃａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｗｅｔｚｌａｒ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用してパラフィン包埋のために処理した。新たに切り出した５μｍのパラフィン切片を、Ｌｅｉｃａ　Ｂｏｎｄ　ＲＸ（Ｌｅｉｃａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）での連続的な二重免疫蛍光法のために、１．２５ｕｇ／ｍＬのＣＤ４５マウスモノクローナル抗体クローン２Ｂ１１　＋　ＰＤ７／２６（Ｄａｋｏ）で１時間染色し、Ｌｅｉｃａ　Ｂｏｎｄ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌ　Ｆで１０分の１：２００Ｔｙｒａｍｉｄｅ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５９４検出（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を行い、その後、０．０３ｕｇ／ｍＬのＭｅｓｏｔｈｅｌｉｎ　Ｒａｂｂｉｔ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ｃｌｏｎｅ　Ｄ９Ｒ５Ｇ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）で１時間染色し、Ｌｅｉｃａ　Ｂｏｎｄ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌ　Ｆで１０分の１：２００Ｔｙｒａｍｉｄｅ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８検出（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を行った。各染色の前に、１００℃で２０分間、Ｌｅｉｃａ　Ｂｏｎｄ　ＥＲ２　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｌｅｉｃａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で切片を前処理した。染色後に、切片を、２０×の対物レンズを使用するＶｅｃｔｒａ　３．０マルチスペクトル顕微鏡（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）によるデジタルスキャンのためにＭｏｗｉｏｌに載せた。

【０４０５】

腫瘍組織学および免疫染色。パラフィン包埋した４％のパラホルムアルデヒドで固定した組織試料のヘマトキシリンおよびエオシン染色の後で、腫瘍の組織病理学的評価を実施した。Ｖｅｎｔａｎａプラットフォームを使用して、マウス抗ヒトメソテリンＩｇＧ（１：１００、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ、Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ、ＣＡ）を用いてヒトメソテリンの免疫組織化学分析を実施した。以下の通り、臨床データに対して盲検した病理学者によって、メソテリンの類別を実施した：０（染色なし）、１（弱い発現）、２（中程度の発現）、および３（強い発現）。単一のコアに見られるすべての腫瘍細胞に対するメソテリン陽性腫瘍細胞の分布を、０（非存在）、１（１％～５０％）、および２（５１％～１００％）として類別した。

【０４０６】

ＭＲＩ。４００ｍＴ／ｍの傾斜磁場コイルと３２ｍｍＩＤのカスタムビルドの鳥かご型共鳴器を備えたＢｒｕｋｅｒ　４．７Ｔ　ＵＳＲスキャナー（Ｂｒｕｋｅｒ　Ｂｉｏｓｐｉｎ、Ｅｔｔｌｉｎｇｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、ＭＲＩを実施した。呼吸に誘導されるモーションアーチファクトを低減するために、動物の呼吸によって誘発されるＲＡＲＥ高速スピンエコーシーケンス［繰り返し時間（ＴＲ）＝１．７秒、エコー時間（ＴＥ）＝４０ミリ秒、および１２個の平均］を使用して、胸部軸のＭＲＩ画像を得た。切片の厚みは０．７ｍｍであり、面内の画像解像度は１１７×１５６ｍｍであった。腫瘍体積（mm^3）を、Ｂｒｕｋｅｒ　ＰａｒａＶｉｓｉｏｎ　Ｘｔｉｐソフトウェア（Ｂｒｕｋｅｒ　Ｂｉｏｓｐｉｎ）を使用して各切片の腫瘍境界を追跡することによって測定し、次いで、各切片の腫瘍領域の面積から計算した。

【０４０７】

ＢＬＩ。ＢＬＩを使用して、非侵襲的に腫瘍負荷を画像化した。１５０ｍｇ／ｋｇの用量のＤ－Ｌｕｃｉｆｅｒｉｎをマウスの腹腔内に注射した。ＩＶＩＳ Ｓｐｅｃｔｒｕｍ ｉｎ ｖｉｖｏイメージングシステム（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して、腹臥位と背臥位のマウスに関して、１５分後に腫瘍生物発光を測定した。背側と腹側の平均総流束を１秒当たりのフォトンでＢＬＩシグナルとして報告した。

【０４０８】

マウス血漿試料におけるサイトカインの定量。毒性学研究に由来するマウスのサブセットにおける血漿中サイトカインレベルを１０－ｐｌｅｘ Ｖ－Ｐｌｅｘ Ｍｏｕｓｅ Ｐｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ Ｐａｎｅｌ １アッセイ（Ｍｅｓｏ Ｓｃａｌｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）を使用して定量した。以下のサイトカインを分析した：ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２ｐ７０、ＫＣ／ＧＲＯ、およびＴＮＦ－α。利用可能である場合、６０μＬの血漿を２倍に希釈し、二連のウェルにプレーティングした。結果（試料当たりｎ＝２）を血漿１ミリリットル当たりのピコグラムとして報告した。ＭＳＫのＩｍｍｕｎｅ Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ Ｆａｃｉｌｉｔｙで、サイトカインの定量を実施した。

【０４０９】

Ｂ．ヒト組織のメソテリンおよびｉｎ ｖｉｔｒｏのＣＡＲ Ｔ細胞の研究

Ｂ．１．腫瘍および正常組織におけるメソテリン発現

公開された研究では、正常な胸膜、腹膜、および心膜では非常に低いメソテリン発現しか観察されなかった。ＭＰＭ、肺腺癌、およびトリプルネガティブ乳がんのヒト組織における拡大研究を、正常組織対照と一緒に、メソテリン免疫組織化学分析を使用して行った（Kachala et al., Clin Cancer Res. 2014;20(4):1020-1028；Servais et al., Clin Cancer Res. 2012；Rizk et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2012;21(3):482-486）。図２５Ａ～２５Ｃに示されるように、メソテリンは、正常組織と比較して、ヒトＭＰＭおよび肺癌において過剰発現された（図２５Ａを参照されたい）。メソテリンは、肺腺癌の６９％で過剰発現し、正常な肺では発現しなかった（図２５Ｂを参照されたい）。同様に、メソテリンは、正常な乳房組織では発現しなかったが、トリプルネガティブ乳がんにおいて過剰発現される（図２５Ｃを参照されたい）。

【０４１０】

Ｂ．２．ヒトＴ細胞のＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲによる形質導入

安定した２９３Ｔ ＲＤ１１４細胞系から得たＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲまたはｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲをコードするウイルス上清を滴定して、フローサイトメトリーによって、ヒトＴ細胞の形質導入効率を評価した。ＣＡＲおよびＰＤ１ＤＮＲをＴ細胞に形質導入することに成功し、ウイルス上清の試験した希釈液について、ドナーに依存する表面発現レベルの範囲は３２％～７３％のＣＡＲおよび２２％～６４％のＰＤ１であった（ＰＤ１ＤＮＲおよび内因性ＰＤ１発現を含む）（図２６を参照されたい）。ＣＡＲおよびＰＤ１ＤＮＲは、Ｐ２Ａ自己切断ペプチドによって媒介されるバイシストロニック導入遺伝子発現によって比例的に発現した。

【０４１１】

Ｂ．３．ベクターコピー数（ＶＣＮ）

Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲをヒトＴ細胞に形質導入するのに成功した後、次に、ＣＡＲ発現とＴ細胞ゲノムにおけるベクターコピーの組み込みの間の関係を分析した。ＣＡＲ陽性細胞のＭＦＩとＶＣＮの間の密接な相関が、複数のドナーとＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲまたはｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲをコードするウイルス上清の希釈液にわたって見られ、０．８９～０．９９の範囲のR^2値を得た（図２７を参照されたい）。形質導入効率とＶＣＮはドナーに依存することが判明したが、特に、７０％を超える形質導入効率で高いＶＣＮ（細胞当たり５を超える）が観察され、特に、３５％未満の形質導入効率で低いＶＣＮ（細胞当たり１未満）が観察された（データは示さず）。高リスクの挿入突然変異誘発を回避し、Ｔ細胞の効率的形質導入を確保するために、本発明者らは、すべての構築物に関するウイルス上清を滴定し、すべての次のｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖ

ｉｖｏ実験ために３５％～７０％の範囲の形質導入効率を得た。

【０４１２】

Ｂ．４．Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞はＰＤ１細胞外ドメインを過剰発現する

Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲを形質導入したヒトＴ細胞はＰＤ１ＤＮＲを発現し、デコイ受容体は、細胞内ＰＤ１シグナル伝達ドメインのものを枯渇した。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞およびｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞における相対的なＰＤ１タンパク質表面発現およびｍＲＮＡ発現を、それぞれ、フローサイトメトリーおよびｑＰＣＲによって調査した。同等のＣＡＲ表面発現（６４％～７０％、図２８Ａを参照されたい）で、細胞表面のＰＤ１染色によって、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞において、陽性細胞のパーセント（２倍）と強度（３．４倍）の両方で、より高レベルのＰＤ１が検出された（図２８Ｂおよび２８Ｃを参照されたい）。ＰＤ１細胞表面発現の検出は、ＰＤ１ＤＮＲおよび内因性ＰＤ１に存在する細胞外ドメインに限定された。したがって、ＰＤ１細胞外ドメインのより高い表面発現がＰＤ１ＤＮＲの発現によって引き起こされ、それを示したが、ＰＤ１ＤＮＲと内因性ＰＤ１の間の識別は、細胞表面レベルでは不可能であった。

【０４１３】

ＰＤ１ＤＮＲおよび内因性ＰＤ１の発現の差異をさらに探索するために、ｑＰＣＲによって相対的なｍＲＮＡ発現を調査した。ＰＤ１ＤＮＲの発現と内因性ＰＤ１の発現とを識別するために、ＰＤ１細胞外ドメインと細胞内ドメインに特異的なプライマーを設計し、未形質導入Ｔ細胞と比較したｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲおよびｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のＰＤ１細胞外ドメインと細胞内ドメインの両方のｍＲＮＡ発現を測定した。ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞はＰＤ１ＤＮＲを発現せず、よって細胞内ドメインに対する細胞外ドメインの等モル比において、内因性ＰＤ１のみを発現する。細胞内ドメインの発現は内因性ＰＤ１に対して排他的であったが、細胞外ドメインはＰＤ１ＤＮＲと内因性ＰＤ１の両方によって発現された。ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、未形質導入Ｔ細胞と比較して、４倍高いレベルのＰＤ１細胞外ドメインおよび細胞内ドメインを発現したことがわかった。しかし、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞はＰＤ１細胞外ドメインの１５７倍の上方調節を呈し、未形質導入Ｔ細胞はＰＤ１細胞内ドメインの２倍の上方調節しか呈さなかった（図２８Ｄを参照されたい）。

【０４１４】

まとめると、これらのデータによって、ＰＤ１ＤＮＲが、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞において、内因性ＰＤ１と比較して、ｍＲＮＡレベルとタンパク質レベルの両方で過剰発現されることが確認される。この所見は、Ｔ細胞固有のチェックポイント遮断に関する基礎を提供する。

【０４１５】

Ｂ．５．ｍｙｃタグを用いる場合と用いない場合のＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の機能比較

ＣＡＲ発現の検出を容易にするために、抗メソテリンｓｃＦｖのＮ末端に融合したｍｙｃタグを用いて、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を生成し、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲを得た。ｍｙｃタグのＣＡＲ機能によるいずれの潜在的妨害も除外するために、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（タグを含まない）とｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の間の抗腫瘍効率のヘッドツーヘッド比較を実施した。類似する形質導入レベル（３７％～６３％、抗ヒトＦ（ａｂ’）$_2$断片に特異的なヤギＦ（ａｂ’）$_2$断片で染色した細胞のフローサイトメトリーによって決定した）のＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲとｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲの両方を形質導入した、３名の別々のドナーから調製したヒトＴ細胞は、異なるＥ：Ｔ比で、ＭＧＭ標的細胞の動態および全体的死滅において差異を呈さなかった（図２９を参照されたい）。

【０４１６】

Ｂ．６．ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、抗原特異的なＨＬＡと無

関係の腫瘍溶解を媒介する
　ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞に対するｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲの細胞傷害活性を、メソテリン発現を有する（ＧＭ）および有さない（Ｇ）、ならびに構成的ＰＤ－Ｌ１発現を有するヒト中皮腫細胞（ＭＳＴＯ－２１１Ｈ）を含む腫瘍細胞系のパネルに対して、^{51}Ｃｒ放出アッセイによって決定した。以下の細胞傷害アッセイの結果に示されるように、複数のＥ：Ｔ比でメソテリン発現腫瘍細胞と１８時間共培養した際に、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と同様に、ＭＧＭおよびＭＧＭ－ＰＤＬ１標的を効率的に死滅させた（図３０を参照されたい）。メソテリンに対して陰性のＭＳＴＯＧ腫瘍細胞に対するｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞またはｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のいずれかによる非特異的死滅が観察された。未形質導入Ｔ細胞は、いずれの標的の死滅も全く呈さなかった。これらの結果によって、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、メソテリン特異的に、かつＨＬＡとは無関係に、標的細胞を死滅させることが確認される。

【０４１７】

Ｂ７．ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の蓄積
　ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、誘導性ＰＤ－Ｌ１発現（ＭＧＭ）または構成的ＰＤ－Ｌ１発現（ＭＧＭ－ＰＤＬ１）を有するメソテリン発現腫瘍細胞による反復抗原刺激の際にＴ細胞の蓄積を持続するかどうかを調査するために、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の拡大を定量し、ｍｙｃ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のものと比較した。６回の反復抗原刺激の経過にわたり、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と同様に、６２２倍まで拡大した（図３１を参照されたい）。

【０４１８】

Ｂ．８．反復抗原刺激の際のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率
　１回目の抗原曝露の際に、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ＭＧＭ標的細胞とＭＧＭ－ＰＤＬ１標的細胞に対するＥ：Ｔ比に依存する細胞傷害性を呈したが、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して、細胞傷害性に差異を示さなかった（図３２を参照されたい）。連続的な抗原曝露（または高抗原ストレス）中にｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞およびｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞傷害能を調査するために、ＣＡＲ　Ｔ細胞を、４サイクルの間、３：１のＥ：Ｔ比で４８時間ごとに放射線照射したＭＧＭまたはＭＧＭ－ＰＤＬ１標的細胞と繰り返し共培養した。３回目のサイクルの終了時に、ＣＡＲ　Ｔ細胞の試料を、^{51}Ｃｒ細胞傷害アッセイにおいて４回目の抗原刺激に供した。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞およびｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、４回目の抗原刺激の間、同等の細胞傷害性を実証した（図３３を参照されたい）。

【０４１９】

　抗原ストレスをさらに増加させるために、固形腫瘍における高い腫瘍負荷を模倣して、次いで、ＣＡＲ　Ｔ細胞を、５回目および６回目の抗原刺激サイクルにおいて１：１のＥ：Ｔ比で、標的細胞と共培養した。６回目のサイクルの終了時に、ＣＡＲ　Ｔ細胞の別の試料を採取し、^{51}Ｃｒ細胞傷害アッセイにおいて７回目の抗原刺激サイクルに供した。７回目の抗原刺激の際の細胞傷害性は、両方の標的細胞系に対して、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞では実質的に低下した。対照的に、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、標的細胞に関する細胞傷害性を保持した。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して、標的細胞における優れた腫瘍細胞の死滅を呈し、高い構成的ＰＤ－Ｌ１発現を有したが（図３３を参照されたい）、細胞傷害性は、最初と４回目の抗原刺激と比較して低下した。まとめると、これらのデータは、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は慢性的な抗原曝露に際して疲弊状態に達し、一方、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、高い抗原ストレスの環境下であっても抗腫瘍活性を維持することが可能であることを示す。観察された効果は、

ドナー、Ｅ：Ｔ比、および腫瘍とＣＡＲ　Ｔ細胞の間の共培養時間などの生物学的パラメーターに依存した。

【０４２０】

Ｂ．９．ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞による標的刺激サイトカイン放出

反復抗原刺激の際のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞およびｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞によるエフェクターサイトカインの分泌をＬｕｍｉｎｅｘアッセイによって評価した。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞とｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の両方は、１回目の抗原刺激後に、高レベルのＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、およびＴＮＦ－αを分泌した。しかし、エフェクターサイトカイン分泌は、反復抗原刺激の際に両方のＣＡＲ　Ｔ細胞と共に減少した（図３４を参照されたい）。

【０４２１】

Ｃ．ｉｎ　ｖｉｖｏ研究

Ｃ．１．ｆｆＬｕｃ腫瘍細胞によって可視化されたｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率

同所性モデルを使用して、マウスにおいて一連のｉｎ　ｖｉｖｏ実験を行い、腫瘍負荷および動物の生存率を測定することによって、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の特異度および効力を調査した。連続的なＢＬＩを使用して腫瘍の確立を確認し、治療介入群にわたり腫瘍負荷を均等にした後、Ｔ細胞療法を開始し、次に、治療に対する応答を測定した。

【０４２２】

ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率を調査するために、単回低用量の３×１０^{4}個のＣＡＲ　Ｔ細胞を、接種の１３日後に同所性のＭＧＭ腫瘍を有する雌のＮＳＧマウスの胸膜内に投与した。ＣＡＲ　Ｔ細胞が直面する高い腫瘍抗原負荷を模倣するために、低用量を意図的に選択した。Ｐ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を受けた対照マウスと比較して、単回用量のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、Ｔ細胞投与の１５日後に腫瘍負荷の実質的低下を示した（ｐ＝０．０００２）（図３５を参照されたい）。処置後１５日目までに、Ｐ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を投与したマウスが、高い腫瘍負荷から予期されたように瀕死の状態になり始め、一方、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を受けたマウスでは、毒性の兆候は観察されなかった。

【０４２３】

マウス１匹当たり単回用量の３×１０^{4}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（１ｋｇ当たり１．２×１０^{6}～１．５×１０^{6}個の細胞に換算される；マウスの体重、２０～２５ｇ）で有効性および腫瘍根絶を観察したため、本発明者らは、マウスにおける毒性を研究するために３～４倍まで用量レベルを増加させることを選択する（この実施例の項目３において報告した（「非臨床的毒性学」と題する））。

【０４２４】

次の実験では、確立したＭＧＭ－ＰＤＬ１胸膜腫瘍を有する雌のＮＳＧマウスを、腫瘍接種の１１日後に、マウス１匹当たり１×１０^{5}個または５×１０^{4}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（Ｅ：Ｔ比、１：１０００～１：２０００；１ｋｇ当たり２．５×１０^{6}個～５×１０^{6}個の細胞；マウスの平均体重、２０ｇ）または対照としてのマウス１匹当たり１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の単回胸膜内投与で処置した。以前に本発明者らが記載したように（Servais et al., Curr Protoc Pharmacol. 2011;Chapter 14:Unit14 21；Servais et al., PLoS One. 2011;6(10):e26722）、腫瘍負荷の定量から、Ｅ：Ｔ比を推定した。

【０４２５】

Ｄ－Ｌｕｃｉｆｅｒｉｎ（ｆｆｌｕｃのためのルシフェリン）による連続的な腫瘍イメージングによって、ＣＡＲ　Ｔ細胞投与後５日程度で、すなわち１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスではおよそ１９日目に、１×

１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスではおよそ２６日目に、完全な腫瘍根絶（バックグラウンドＢＬＩシグナル）を含むＢＬＩによる腫瘍負荷の低下を示した（図３６Ａおよび３６Ｂを参照されたい）。未処置のマウスは、処置開始の９～１２日後に瀕死の状態になった（図３６Ｂを参照されたい）。腫瘍根絶は、６８日目に研究が終了するまで、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞（用量、１×１０^{5}個および５×１０^{4}個）によって維持された。しかし、瀕死状態と体重減少により６８日目以前に　殺されたｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置されたマウスにおいて、剖検によって腫瘍の存在が示された。いずれかの用量のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、研究の時間全体を通して線形様式で体重が増加したが、一方、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、研究の終了に向かって体重が減少した（図３６Ｃを参照されたい）。生存期間中央値は、未処置マウスでは１２日、１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは５０日であり；いずれかの用量のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは生存期間中央値に達しなかった（図３６Ｄを参照されたい）。ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスと比較して、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは生存が有意に延長された（５×１０^{4}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞ではｐ＝０．００８５および１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞に対して１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞ではｐ＝０．０４２７）。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスにおいて、毒性の明らかな臨床兆候は観察されなかった。

【０４２６】

Ｃ．２．原発腫瘍におけるｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の検出

マウスのサブグループでは、５×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞、または未形質導入Ｔ細胞の、ＭＧＭ胸膜腫瘍を有するＮＳＧマウスへの胸膜内注射の後に、胸膜腫瘍を注射の３日後に単離し、免疫蛍光法を使用して、ヒトＣＤ４５およびヒト腫瘍メソテリンを染色することによって、ヒトＴ細胞の浸潤について分析した。

【０４２７】

未形質導入Ｔ細胞で処置したマウスの中で、わずかな未形質導入Ｔ細胞しか腫瘍周辺および実質において見られなかったが、一方、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞およびｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、腫瘍周囲の領域および腫瘍と腫瘍周囲の領域の間の界面において高密度で見られた（図３７を参照されたい）。これらのデータは、局所的に（胸膜内に）投与されたメソテリン標的化Ｔ細胞が、腫瘍周囲に豊富に存在し、腫瘍周辺から腫瘍中に浸潤することを示唆する。

【０４２８】

Ｃ．３．ｉｎ　ｖｉｖｏでの腫瘍再負荷の際のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍活性

ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の機能持続性を調査するために、単回胸膜内用量の１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞またはｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置した胸膜ＭＧＭ－ＰＤＬ１腫瘍（ｎ＝５）を有するマウスに、漸増用量のＭＧＭ腫瘍細胞を腹腔内に再負荷した。再負荷は、Ｔ細胞の胸膜内投与の６８日後に開始し、その後、２×１０^{6}個の腫瘍細胞の開始再負荷用量により胸膜腫瘍が根絶した。腫瘍用量は、４～８日ごとに全部で１０回の再負荷にわたり１１×１０^{6}個の腫瘍細胞まで増量させた（図３８Ａを参照されたい）。腫瘍再負荷は、各腫瘍投与後直ちにＢＬＩシグナルの増加、その後、ＢＬＩの減少と関連し、Ｔ細胞に媒介される腫瘍退縮を示した（図３８Ｂを参照されたい）。ＢＬＩピークシグナルは、次の漸増用量の腫瘍細胞の後に増加し、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、同じ用量のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスと比較して、ＢＬＩシグナルの実質的により多い増加を示した。特に、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは、ＢＬＩシグナルは、各腫瘍再負荷後直ちにピーク

に到達したが、最も多い再負荷用量でさえ、ベースラインのＢＬＩシグナルに戻った（図３８Ｂを参照されたい）。対照的に、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、５回までの腫瘍再負荷の間に、ＢＬＩの初期増加後のＢＬＩシグナルの低下を示したが、これらは、より高い腫瘍用量後に腫瘍再確立を制御する能力を最終的に失い、ＢＬＩシグナルおよび腫瘍負荷の連続的増加および瀕死の状態をもたらした。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、毒性の明らかな臨床兆候は全く有さずに、単回の胸膜内用量の1×10^5個のＣＡＲ　Ｔ細胞の１２６日後を超えても、１０回の反復負荷に対する腹腔内腫瘍確立に耐性を示した。これらのデータは、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、胸膜腔において局所的にだけではなく、体内の遠位位置でも腫瘍を制御することが可能であることを示す。ｉｎ　ｖｉｖｏでは、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、反復抗原負荷による慢性的な抗原曝露に際して機能性のままであり、長期間持続したが、一方、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、反復抗原再負荷に際して機能不全となり、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の優れた機能持続性および増強された長期間の抗腫瘍活性を示した。本発明者らは、この増強された有効性が、移植片対宿主病によるものではないことを確認した。本発明者らは、抗原を発現しない標的を投与し、抗腫瘍応答を有さない、腫瘍ＢＬＩの増加を認識し、抗腫瘍効率が抗原特異的であることを確認した。

【０４２９】

Ｃ．４．臨床グレードのＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率

この研究の目的は、ＭＳＫ　Ｃｅｌｌ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ（ＣＴＣＥＦ）によって生成された、凍結保存されたＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率を検証することであった。胸膜内注射の前に、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の凍結保存されたアリコートを１０％のＦＢＳを含むＲＰＭＩ－１６４０中で解凍し、ＦＢＳを含まないＲＰＭＩ－１６４０中で２回洗浄し、注射用ビヒクルとしてＦＢＳを含まないＲＰＭＩ－１６４０中に再懸濁させた。解凍後、注射の前にＣＡＲ　Ｔ細胞の生存率が、アクリジンオレンジ／ヨウ化プロピジウム染色によって８８％であることを決定した。ＣＡＲ　Ｔ細胞を、マウス１匹当たり6×10^4個または2×10^5個の生存ＣＡＲ　Ｔ細胞の用量で、胸膜ＭＧＭ腫瘍を有する雌のＮＳＧマウスに胸膜内注射した（ｎ＝８～１０）。連続的な腫瘍ＢＬＩによって、2×10^5個のＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは、１６日目までに腫瘍根絶が明らかになった（図３９Ａを参照されたい）。6×10^4個のＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、２９日目までに腫瘍退縮および根絶を示した（図３９Ａを参照されたい）。いずれの処置群でも体重減少は観察されなかったが、一方未処置の腫瘍保有マウスは体重が減少し、処置開始後１９日以内に死亡した（図３９Ｂおよび３９Ｃを参照されたい）。ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは毒性は観察されず、処置されたマウスの１００％は、観察期間の終了時に生存していた（７０日目、図３９Ｃを参照されたい）。この研究は、提案された臨床試験のために生成されたベクターストックを使用して製造された、凍結保存されたＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、解凍後の高い生存率を実証し、ｉｎ　ｖｉｖｏで抗腫瘍効率を呈し、マウスにおいて忍容性に優れることを確認した。

【０４３０】

３．非臨床的毒性学

Ａ．非臨床的安全性研究の概要

Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の結合および活性はヒトメソテリンに対して特異的であり、よって、非臨床的安全性研究を行うための、理想的な薬理学的に関連する種が存在しない。さらに、標的抗原の発現パターンの可変性、および免疫競合マウスにおけるＣＡＲなどのヒトポリペプチドのクリアリング機序および免疫原性の差異によって、ヒトのＣＡＲ　Ｔ細胞の毒性を予測するための動物の有用性が妨げられる。Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、ヒトメソテリンを発現する同所性の免疫不全マウスモデルにおいて、関連する薬力学的効果（サイトカイン、蓄積、腫瘍退縮）を有するため、本発明者らは、この異種モデルにおいて安全性研究を行った。これは、Ａｎｔｉｔｕｍ

ｏｒ Ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ Ｃｏｒｅ ＦａｃｉｌｉｔｙによりＭＳＫで行ったＧｏｏｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒａｃｔｉｃｅ（ＧＬＰ）研究であった。この研究の設計、方法、および結果をこの項で議論する。

【０４３１】

この研究のためのＣＡＲ Ｔ細胞の選択された用量は、１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞であった。この用量は、本発明者らの前臨床マウスモデルにおいて、同所性の中皮腫腫瘍の処置のために試験した最小有効用量（３×１０^{4}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞）よりも３～４倍多いため、選択した。重要なことに、ＣＡＲ Ｔ細胞の選択された用量（マウス１匹当たり１×１０^{5}個の細胞または１ｋｇ当たり５×１０^{6}個の細胞）は、現在の研究において提案された開始用量（１ｋｇ当たり１×１０^{6}個の細胞）よりも５倍多い。本発明者らの公開した研究では、４０，０００～５０，０００個のＣＡＲ Ｔ細胞の用量のＰＤ１ＤＮＲを含むメソテリン標的化ＣＡＲ（Cherkassky et al., J Clin Invest. 2016;126(8):3130-3144.）が、同所性の胸膜中皮腫瘍を有するマウスにおいて高い胸膜腫瘍負荷を根絶することが示された。

【０４３２】

ＣＡＲ Ｔ細胞を、胸膜腔に中皮腫の異種移植片を有するＮＳＧマウスに、胸膜内注射によって一度に送達した。胸膜内投与が胸膜腔に最初に制限される、抗体などの他の薬剤とは異なり、マウスとヒトの両方において、胸膜内投与されたＣＡＲ Ｔ細胞が１日または２日以内に全身を循環し、胸膜腔に限定されないことが示されている（Adusumilli et al., Sci Transl Med. 2014;6(261):261ra151；Cherkassky et al., J Clin Invest. 2016;126(8):3130-3144；Adusumilli et al., Cancer Res. 2019;79(13)）。特に、本発明者らは、マウスとヒトの両方において、胸膜内投与されたＣＡＲ Ｔ細胞が抗原により活性化され、短期間内で最初に投与された用量より５～１０倍多く増殖することを観察し（Adusumilli et al., Sci Transl Med. 2014;6(261):261ra151；Cherkassky et al., J Clin Invest. 2016;126(8):3130-3144）、そのため、この研究で試験したＣＡＲ Ｔ細胞の実際の数は、短期間で最初に投与された用量よりも５～１０倍多い。

【０４３３】

以下の検討は、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞のヒト安全性を評価する際に重要である。

【０４３４】

１．ＣＡＲ Ｔ細胞に関する以前のヒトの経験は、誇張された薬理学が、モニター可能かつ管理可能である、有害事象の主な原因であることを示す。本発明者らの第Ｉ相臨床研究では、メソテリン標的化ＣＡＲ Ｔ細胞のオンターゲット、オフ腫瘍毒性に関連する有害事象の報告されていない（Adusumilli et al., Cancer Res. 2019;79(13)）。

【０４３５】

２．ｉｎ ｖｉｔｒｏ研究では、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞の薬理学的活性が、標的細胞の表面でのメソテリンの発現と相関することが観察された。

【０４３６】

３．本発明者らのＭＰＭの同所性モデルでは、ＭＰＭ腫瘍を有するマウスにおいて、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞の単回胸膜内注射後に、特異的細胞傷害性および生存率の増加が観察された。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞により処置されない場合は、これらのマウスは腫瘍移植の２０～２２日以内に死亡した。７日以内に、腫瘍負荷を実質的に低下させると、動物は６８日を超えて治癒したままであり、対照的に未処置対照は、１２日の生存期間中央値を有し、ｍｙｃＭ２８ｚで処置した対照は５０日の生存期間中央値を有した。

【０４３７】

死亡率および罹患率、体重、臨床兆候、血液学および臨床化学、肉眼的剖検、および組織病理学的データを、対照群と処置群に無作為に割り当てた８日齢の同所性ＭＧＭ腫瘍を

有する９６匹（４８匹の雄および４８匹の雌）のＮＳＧマウス（Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）において評価した。このモデルにおいてｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏでの原理証明実験において決定したおよその最小有効用量の少なくとも３～４倍に相当する、ＲＰＭＩ－１６４０中マウス１匹当たり1×10^{5}個の細胞（１ｋｇ当たりおよそ5×10^{6}個の細胞）の用量を選択した（マウス１匹当たり3×10^{4}個の細胞）。用量および剖検のレジメンは合理的に選択された：（ａ）より多い初期試験用量は、用量投与のいずれかの即時有害作用（このような作用は進行中の臨床試験では見られなかった）の調査を可能にし得るが、生物学および薬理学は、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の機能持続性および増殖を反映しない（すなわち、固形腫瘍の微小環境において、高用量で誘導される腫瘍根絶のフラッシュ動力学におけるよりも比較的より多い数のＣＡＲ　Ｔ細胞が、延長された期間、腫瘍内／体内に存在するのを可能にすることが重要である）、ならびに（ｂ）腫瘍が有意に退縮したか、またはこの時点で根絶したために、１４日目を選択した（以前の実験からＢＬＩまたは剖検によって証明された通り）（Adusumilli et al., Sci Transl Med. 2014;6(261):261ra151；Cherkassky et al., J Clin Invest. 2016;126(8):3130-3144）。この時点での　殺および剖検によって、低レベルのメソテリン発現を有する正常組織、具体的には胸膜、腹膜、および心膜への任意のオンターゲット、オフ腫瘍効果（本発明者らのＣＡＲにおいて使用したｓｃＦｖはマウスのメソテリンに対して反応する）（Feng et al., Mol Cancer Ther. 2009）の検査が可能になり、高いメソテリン発現と共に、腫瘍負荷の非存在下で、ＣＡＲ　Ｔ細胞の拡大がピークに達する。

【０４３８】

ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞または対照ビヒクルを、研究１日目（雄のマウス）または研究２日目（雄のマウス）に、同所性注射によって一度に投与した。研究－８日目より前に１週間に２回、死亡率および罹患率についてすべての動物を観察し、研究１日目まで毎日モニタリングした（平日）。投与後には、研究が終了するまで（研究１５日目）、動物を毎日モニターした。研究の－８日目より前に１週間に２回、体重を記録し、研究１日目まで毎日モニタリングした（平日）。投与後には、研究が終了するまで（研究１５日目）、体重を毎日記録した。研究１日目より前に１週間に２回、臨床兆候を記録し、研究１日目～１５日目まで毎日モニタリングした。研究２日目（雄のマウスの中間　殺）、研究３日目（雌のマウスの中間　殺）、研究１４日目（雄のマウスの最終　殺）、および研究１５日目（雌のマウスの最終　殺）に、イソフルランでマウスを沈静化させ、血液学および臨床化学のために採血した。肉眼的剖検および完全な剖検のために、組織を採取し、ホルマリン中で固定した。剖検中は組織を廃棄しなかった。剖検の時点で、各動物の肉眼検査をＡｎｔｉｔｕｍｏｒ　Ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ　Ｃｏｒｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙのメンバーによって実施した。任意の顕微鏡病変または他の異常な所見を標準的用語を使用して記録し、顕微鏡所見と相関させるために病理学者に提供した。組織病理学的分析のために、剖検した動物のすべての組織をホルマリン中で保存した。固定液中で少なくとも２４時間後に、組織を処理し、パラフィンで包埋した。次いで、パラフィンブロックを４μｍの切片にした。次いで、得られた未染色スライドをヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。次いで、スライドを、委員会認定の病理学者による検査のためにＨＳＲＬ．に輸送した。形態学的診断と、その後に標準化された命名法を使用して、病変を記録した。研究９日目（雄のマウス）および１０日目（雌のマウス）に、マウスのサブグループから血漿を採取し、ＭＳＫ（非ＧＬＰ）のＩｍｍｕｎｅ　Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ　Ｃｏｒｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙで、サイトカイン評価を実施した。さらに、脾臓と腫瘍を、フローサイトメトリーによるｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の同定のために、マウスのサブグループから単離した（非ＧＬＰ）。研究の－１／１日目、７／８日目、および１４／１５日目に、ルシフェリンを使用して（背側／腹側）動物のサブグループを画像化して、腫瘍負荷および試験物の有効性を評価した。

【０４３９】

研究の１２日目と１４日目（腫瘍投与後２０～２２日目）に、罹患率と努力呼吸によっ

て選ばれた　　殺を受けたイメージングコホートの２匹の対照動物を除いて、この研究では、動物の死亡率または罹患率は観察されなかった。本発明者らの実験室における以前の研究では、対照動物が腫瘍投与のおよそ２０～２２日後の腫瘍負荷により瀕死の状態になり得ることが示された（Servais et al., Clin Cancer Res. 2012；Servais et al., Curr Protoc Pharmacol. 2011;Chapter 14:Unit14 21；Adusumilli et al., Sci Transl Med. 2014;6(261):261ra151；Cherkassky et al., J Clin Invest. 2016;126(8):3130-3144；Servais et al., PLoS One. 2011;6(10):e26722）。したがって、これらの　　殺は、予定外ではあったが予期されていなかった訳ではなかった。いずれの死亡率も罹患率も試験物の影響を受けていなかった。

【０４４０】

対照ビヒクルを受けた動物は、研究の間、体重の進行的な減少、および非腫瘍対照およびｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスと比較して、体重の有意な差異を示した。これは、対照動物の腫瘍負荷の増加を原因とするものであった。

【０４４１】

ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは、有意な臨床兆候は観察されなかった。１匹の試験物で処置されたマウスがわずかに痂皮形成を有することが観察され、これは、他の動物は影響を受けておらず、動物の活動は正常であったため、止血鉗子によってもたらされた刺激に起因した。マウスは、モニタリング期間を通して正常に見えた。

【０４４２】

群１２（研究１５日目に最終　　殺）のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置した雌のマウスは、群１０（腫瘍対照ビヒクル）（平均、３．３４％、ｎ＝５）と比較して、高い単球値の平均パーセント（平均、１８．４４％、ｎ＝５）（ｐ≦０．０００１）を有した。単球のパーセントに関して確立された参照範囲は、０．９％～１８％である。しかし、これは、いずれの顕微鏡所見とも相関しなかった。評価した血液学パラメーターに関して、他には有意な結果も異常な結果も観察されなかった。試験物で処置した群と対応するビヒクルで処置した群の間のいずれの差異も正常参照範囲内にあるか、または生物学的に関連しないかもしくは統計的に有意ではなかった。

【０４４３】

群１１（研究１４日目に最終　　殺）のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置した雄のマウスは、群９（腫瘍対照ビヒクル）（平均、４．６８ｇ／ｄＬ、ｎ＝４）と比較して、低い総タンパク質値の平均（平均、３．８３ｇ／ｄＬ、ｎ＝５）（ｐ＝０．００２２）を有した。総タンパク質に関して確立された参照範囲は、４．１～６．４ｇ／ｄＬである。しかし、これは、いずれの顕微鏡所見とも相関しなかった。臨床化学パラメーターへの他の有害効果は、試験物投与に関して観察されなかった。試験物で処置した群と対応するビヒクルで処置した群の間のいずれの差異も正常参照範囲内にあるか、または生物学的に関連しないかもしくは統計的に有意ではなかった。

【０４４４】

剖検の時点で、腫瘍組織は採取されなかったが、予期した通り中間　　殺において多くの動物において観察された。最終　　殺の時点で、腫瘍負荷は対照ビヒクル動物において明らかであったが、ほとんどの場合には、試験物で処置した動物において、少数から０個の腫瘍病巣が観察された。個々の動物に関する剖検の時点での肉眼観察は、斑点のある肝臓、小型の脾臓、青色の精嚢、暗緑色の胆嚢、青色の胆嚢、油ぎった腎臓、肝臓の泡、および脾臓上の白い斑点を含んだ。これらの所見はいずれも顕微鏡所見と相関しなかった。小型の脾臓は、リンパ球枯渇によるＮＳＧマウスの表現型において予期される。

【０４４５】

組織病理学的検討により、試験物投与に由来する急性毒性または遅延毒性に関連する中間（研究の２／３日目）および最終（研究の１４／１５日目）　　殺日における顕微鏡所見は存在しないことが決定された。群５および６（試験物；中間　　殺）の動物に関する顕微鏡所見は、肺の異種移植腫瘍内の混合細胞型浸潤の存在を含んだ。これは、試験物投与に

関連するが、いずれの試験物の毒性にも関連しないと考えられた。この所見は、胸膜内処置されたマウスの原発腫瘍におけるｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の免疫蛍光染色によって、別々の研究で確認された（この実施例の項目２．Ｃ．２を参照されたい）。他のいずれの観察された所見も、対照におけるのと類似する発生率で、散発的に生じることが決定されるか、または利用した種／株において共通していた。

【０４４６】

研究の－１／１日目のｉｎ　ｖｉｖｏでのＢＬＩは、各群のすべての動物に対する腫瘍投与に成功したことを示した。対照ビヒクル投与後に、雄および雌のマウス群の動物に対する腫瘍負荷は、各測定時点で増加し、２匹の動物は罹患率によって早期にイメージングを必要とした。試験物の投与後に、雄および雌のマウス群の動物に対する腫瘍負荷は、注射の１週間後に増加を実証したが、しかし、２週目の時点では、負荷は実質的に低下した。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスにおいて、胸膜内投与の８日後に、脾臓組織および腫瘍においてヒトＴ細胞を検出したが、ビヒクル処置したマウスでは検出されなかった。同じ時点で得られたマウスの血漿中サイトカインレベルは、ビヒクル対照で処置したマウスと比較して、ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスにおいてわずかに上昇したレベルのＩＬ－４を示した。ＩＬ－１０、ＩＬ－６、ＫＣ／ＧＲＯ、およびＴＮＦ－αのレベルは一般的に低く、ＣＡＲ　Ｔ細胞を受けているマウスとビヒクル対照を受けているマウスの間に有意な差はなかった。ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、およびＩＬ－５は検出不可能（定量限界未満）であった。

【０４４７】

この研究の目的は、単回の同所性注射後のＮＳＧマウスにおけるｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の急性毒性および遅延毒性を評価することであった。研究全体を通して、体重、臨床兆候、血液学、臨床化学、および組織病理学のデータを収集し、分析した。この研究の結果は、中皮腫異種移植モデルにおいて１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の単回の同所性投与が忍容性に優れることを示す。

【０４４８】

Ｂ．方法

試験システム。実験は、Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙからの６～８週齢の雄および雌のＮＳＧマウスを用いて行った。腫瘍群のマウスは、研究１日目（雄のマウス）および研究２日目（雌のマウス）に胸膜内注射によって、マウス１匹当たり８００，０００個のＭＧＭ細胞を受けた。これらのマウスは、注射のおよそ５～２０日後に胸膜疾患の症状を生じることが期待される。

【０４４９】

試験物。試験物（ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞）は、ＭＳＫで本発明者らが調製した。健康なドナーに由来するＰＢＭＣを２０１９年１１月５日に解凍し、２０１９年１１月７日にｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲをコードするレトロウイルス粒子を形質導入した。注射の前に、形質導入したＰＢＭＣを、１０％のＦＢＳ、１００ユニット／ｍＬのペニシリン、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシン、および２０ユニット／ｍＬのＩＬ－２を含むＲＰＭＩ－１６４０培地中で維持した。注射の日である２０１９年１１月１３日（雄のマウス）および２０１９年１１月１４日（雌のマウス）に、形質導入した細胞をプールし、ＣＤ３およびＣＡＲの発現についてフローサイトメトリーによって分析し、洗浄し、ビヒクル（ＦＢＳを含まず、フェノールレッドを含まないＲＰＭＩ－１６４０）に再懸濁させ、注射まで氷上で保存した。

【０４５０】

ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を１ｍＬ当たり５×１０^{5}個の生存ＣＡＲ　Ｔ細胞の最終濃度のビヒクルに再懸濁させた。細胞生存率を測定した。次いで、調製した溶液を、即時使用のために氷上でＡｎｉｍａｌ　Ｆａｃｉｌｉｔｙに移した。使用できる状態の氷上で保存した試験物は、研究期間を通してこれらの条件下で安定であると考えられた。ＣＡＲ　Ｔ細胞の製剤化は、無菌状態の室温でラミナーフローフード内で、本発明者らの実験室において実施した。生存率およびＣＡＲ発現を投与前および投与後

に決定した。

【０４５１】

ビヒクル。ＣＡＲ Ｔ細胞製剤の調製において、および対照群への投与のために使用したビヒクルは、ＦＢＳを含まず、フェノールレッド（ＧＩＢＣＯ、カタログ番号３２４０４、ロット番号２０９９３７６）を含まない滅菌ＲＰＭＩ－１６４０培地であった。ビヒクルは、即時使用のために氷上でＡｎｉｍａｌ Ｆａｃｉｌｉｔｙに移した。使用できる状態の氷上で保存したビヒクルは、製造業者による分析証明書によってサポートされた通り、研究期間を通してこれらの条件下で安定であると考えられた。ビヒクルの調製は、無菌状態の室温でラミナーフローフード内で、本発明者らの実験室において実施した。

【０４５２】

研究設計。研究１日目以前に、すべてのコホートを研究群に無作為化した。到着時に、動物を動物収容箱から無作為に選択し、以下の表９に概説したように、各処置群に配置した。耳パンチを使用してマウスを識別した。

【０４５３】

腫瘍群のマウスは、試験物投与の８日前に胸膜に同所性注射によって8×10^{5}個のＭＧＭ細胞を受けた。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ ＣＡＲ Ｔ細胞、または対照ビヒクルを研究１日目（雄のマウス）または研究２日目（雌のマウス）に１回同所性注射によって同様に投与した。腫瘍細胞、ビヒクル、および試験物は、マウス１匹当たり２００μＬの注射体積で投与した。

【表９】

表 9.群の割当て

群*	マウス/群	性別	マウスの識別番号	血液/組織の採取	剖検
中間層殺(24 時間) 2 日目/3 日目					
1. 腫瘍なし-対照ビヒクル	3	M	1-3	CBC & Chem	肉眼
2. 腫瘍なし-対照ビヒクル	3	F	4-6	CBC & Chem	肉眼
3. 腫瘍-対照ビヒクル	10	M	7-16	CBC & Chem	完全
4. 腫瘍-対照ビヒクル	10	F	17-26	CBC & Chem	完全
5. 腫瘍-試験物	10	M	27-36	CBC & Chem	完全
6. 腫瘍-試験物	10	F	37-46	CBC & Chem	完全
最終層殺 14 日目/15 日目					
7. 腫瘍なし-対照ビヒクル	3	M	47-49	CBC & Chem	肉眼
8. 腫瘍なし-対照ビヒクル	3	F	50-52	CBC & Chem	肉眼
9. 腫瘍-対照ビヒクル	5	M	53-57	CBC & Chem	完全
10. 腫瘍-対照ビヒクル	5	F	58-62	CBC & Chem	完全
11. 腫瘍-試験物	5	M	63-67	CBC & Chem	完全
12. 腫瘍-試験物	5	F	68-72	CBC & Chem	完全
TK/サイトカイン					
13. 腫瘍-対照ビヒクル	3	M	73-75	腫瘍、脾臓、200uL の EDTA	なし
14. 腫瘍-対照ビヒクル	3	F	76-78	腫瘍、脾臓、200uL の EDTA	なし
15. 腫瘍-試験物	3	M	79-81	腫瘍、脾臓、200uL の EDTA	なし
16. 腫瘍-試験物	3	F	82-84	腫瘍、脾臓、200uL の EDTA	なし
イメージング					
17. 腫瘍-対照ビヒクル	3	M	85-87	なし	なし
18. 腫瘍-対照ビヒクル	3	F	88-90	なし	なし
19. 腫瘍-試験物	3	M	91-93	なし	なし
20. 腫瘍-試験物	3	F	94-96	なし	なし

*群についての説明:

腫瘍なし-対照ビヒクル:非腫瘍マウス+RPMI1640

腫瘍-対照ビヒクル:MGM 腫瘍を有するマウス+RPMI1640

腫瘍-試験物:MGM 腫瘍を有するマウス+1×10^5 個の mycM28z1XXPD1DNR CAR T 細胞

【０４５４】

研究全体を通して、臨床兆候および体重を収集して、罹患率を評価し、急性毒性および遅延毒性を、それぞれ、投与の１日後および１４日後に評価した。血液学、臨床化学、および組織病理学のデータを収集し、急性および遅延の時点で評価して、試験物の忍容性を決定した。

【０４５５】

評価したパラメーター。

死亡率および罹患率。研究－８日目より前に１週間に２回、死亡率および罹患率についてすべての動物を観察し、研究１日目まで毎日モニタリングした（平日）。投与後には、研究が終了するまで（研究１５日目）、動物を毎日モニターした。

【０４５６】

体重。研究の－８日目より前に１週間に２回、体重を記録し、研究１日目まで毎日モニタリングした（平日）。投与後には、研究が終了するまで（研究１５日目）、体重を毎日記録した。

【０４５７】

臨床兆候。研究１日目より前に１週間に２回、臨床兆候を記録し、研究１日目～１５日目まで毎日モニタリングした。

【０４５８】

血液学。研究の２日目（雄の群１、３、５）、研究の３日目（雌の群２、４、６）、研究の１４日目（雄の群７、９、１１）および研究の１５日目（雌の群８、１０、１２）に、イソフルランでマウスを沈静化させ、表１０に示される以下の測定のために、全血をＥＤＴＡチューブに採取した。

【表１０】

表 10.血液学パラメーター

好中球	白血球数
リンパ球	赤血球数
単球	ヘモグロビン濃度
好酸球	ヘマトクリット
好塩基球	平均赤血球容積
好中球の%	平均赤血球ヘモグロビン量
リンパ球の%	平均赤血球ヘモグロビン濃度
単球の%	赤血球の分布幅
好酸球の%	血小板数
好塩基球の%	平均血小板容積

【０４５９】

臨床化学。研究の２日目（雄の群１、３、５）、研究の３日目（雌の群２、４、６）、研究の１４日目（雄の群７、９、１１）、および研究の１５日目（雌の群８、１０、１２）に、イソフルランでマウスを沈静化させた。血清分離管に全血を採取した。血清を分離し、表１１に示される以下の測定値について分析した。

【表１１】

表 11.臨床化学パラメーター

血中尿素窒素	コレステロール
クレアチニン	アラニンアミノトランスフェラーゼ
リン	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
カルシウム	アルカリホスファターゼ
総タンパク質	総ビリルビン
アルブミン	ナトリウム
グロブリン	カリウム
アルブミン/グロブリン比	塩化物
グルコース	ナトリウム/カリウム比

【０４６０】

剖検。研究の２日目（雄の群１、３、５）、研究の３日目（雌の群２、４、６）、研究の１４日目（雄の群７、９、１１）、および研究の１５日目（雌の群８、１０、１２）に、CO_2吸入によってマウスを安楽死させた。群１、２、７、および８の動物に関して肉眼的剖検を実施し、群３～６および９～１２の動物に関して完全な剖検を実施した。組織を採取し、ホルマリン中で固定した。剖検中、組織を廃棄しなかった。

【０４６１】

病理学の肉眼観察。剖検の時点で、各動物の肉眼検査をＡｎｔｉｔｕｍｏｒ Ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ Ｃｏｒｅ Ｆａｃｉｌｉｔｙのメンバーによって実施した。任意の顕微鏡病

変または他の異常な所見を標準的用語を使用して記録し、顕微鏡所見と相関させるために病理学者に提供した。

【０４６２】

組織病理学。剖検した動物のすべての組織をホルマリン中に保存した。固定液中で少なくとも２４時間後、表１２に列挙した組織を処理し、パラフィンで包埋した（アスタリスクで示した組織は包埋前に脱灰した）。次いで、パラフィンブロックを４μｍの切片にした。次いで、得られた未染色スライドをヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。次いで、スライドを、委員会認定の病理学者による検査のためにＨＳＲＬに輸送した。形態学的診断と、その後に標準化された命名法を使用して、病変を記録した。

【表１２】

表 12.顕微鏡によって検査した組織。

副腎	膵臓
骨(髄)*	直腸
脳(脳幹、小脳、および大脳)	唾液腺
食道	皮膚
眼	脾臓
胆嚢	胸骨*
心臓	後膝関節*
鼠径リンパ節	胃
小腸(十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸)	精巣、精巣上体、精嚢、および前立腺(雄)
腎臓	胸腺
肝臓	甲状腺
肺	舌
腸間膜リンパ節	気管
口腔～鼻腔(上咽頭)*	膀胱
卵巣、子宮角、子宮、子宮頚部、および膣(雌)	脊柱*

【０４６３】

サイトカイン分析（非ＧＬＰ）。研究９日目（雄のマウス）および１０日目（雌のマウス）に、群１３、１５（雄）、１４、および１６（雌）のマウスからＥＤＴＡチューブに採血した。血漿を分離し凍結させた。ＭＳＫ（非ＧＬＰ）のＩｍｍｕｎｅ　Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ　Ｃｏｒｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙでサイトカイン評価を実施した。

【０４６４】

毒性動態学：フローサイトメトリーによるＣＡＲ　Ｔ細胞の同定（非ＧＬＰ）。研究９日目（雄のマウス）および１０日目（雌のマウス）に、群１３、１５（雄）、１４、および１６（雌）のマウスから採血した。すべての動物に関して肉眼的剖検を実施し、この時点で腫瘍組織および脾臓をＲＰＭＩ培地中に配置させた。フローサイトメトリーによるｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の同定のために、試料は直ちに本発明者らに提供された（非ＧＬＰ）。

【０４６５】

生物発光イメージング。研究の－１／１日目、７／８日目、および１４／１５日目に、群１７～２０の動物をルシフェリン（背側／腹側）を使用して画像化して、腫瘍負荷および試験物の有効性を評価した。

【０４６６】

統計的方法。体重、血液学、および臨床化学のパラメーターに関して群の平均および標

準偏差を計算した。血液学および臨床化学については、各時点で、試験物処置群と対応するビヒクル処置群の平均間のパーセントでの差を計算した。これらの差の統計的有意差は、対応のないｔ検定を使用して分析し、ｐ＜０．０５で統計的に有意とみなした。ＰＤＳ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍｔ．Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ、ＮＪ）による前臨床実験室情報システムソフトウェアであるＡｓｃｅｎｔｏｓ Ｖｅｒｓｉｏｎ １．３．４を使用して、統計分析を実施した。１．５×ＩＱＲ試験を使用して潜在的なはずれ値に対する個々の値、実験室で確立されたパラメーター参照範囲を評価することによって、臨床データの検討を実施した。はずれ値であると決定されたいずれの値も統計分析から除去した。

【０４６７】

Ｃ．結果

Ｃ．１．死亡率および罹患率

本発明者らによる以前の研究では、対照動物が腫瘍投与のおよそ２０～２２日後に腫瘍負荷により瀕死の状態になり得ることが示された。イメージングコホート（８６［群１７］および８８［群１９］）の２匹の対照動物は、罹患率および努力呼吸によって研究の１２日目および１４日目に選ばれた　　殺を受けた。　　殺後の各動物に関する肉眼的剖検は、肺および心臓を囲む胸腔内にかなりの腫瘍負荷を示した。両方の動物を対照ビヒクルで処置し、予期ウインドウ内の罹患率を実証した。したがって、これらの　　殺は予定外ではあったが予期されていなかった訳ではなかった。他の死亡率または罹患率は、この研究のいずれの動物に関しても観察されなかった。

【０４６８】

Ｃ．２．体重

群ごとの平均体重の概要を図４０～４３に示す。群９（対照ビヒクル）の動物は、研究１４日目の非腫瘍対照（群７）および試験物動物（群１１）と比較して、研究の間に体重の進行的減少、および体重の有意差を示した。これは、対照動物の腫瘍負荷の増加に起因する（図４２を参照されたい）。同様に、群１０（対照ビヒクル）の動物は、研究１３日目に開始し研究の終了まで続く、群８（非腫瘍対照ビヒクル）および群１２（試験物）と比較した体重の有意差を実証した（図４３を参照されたい）。これも、腫瘍負荷に起因する。すべての動物は、手術の翌日（雄のマウスでは２日目および雌のマウスでは３日目）に体重の低下を示し、これは手術に起因した。非腫瘍対照およびｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、手術後２～３日以内に手術前の初期重量を取り戻し、研究の残りの期間に進行的に増量したが、ビヒクルで処置したマウスは、手術後の体重がほとんどないし全く回復を示さず、腫瘍負荷が同時に増加するのに伴って進行的に減量した（図４２および４３を参照されたい）。

【０４６９】

Ｃ．３．臨床兆候

群１７（対照ビヒクル）の動物は、脱毛（８５、８７）および痂皮形成（８７）の兆候を実証し、これらは、ケージ内の対抗動物に起因した。動物を分離すると、兆候は弱まり、観察が動物の闘争によるものであったことを示した。動物８６は、研究１２日目に努力呼吸および活動低下を有することが観察され、これは、腫瘍負荷に起因し、選ばれた　　殺をもたらした。動物９３（群１９、試験物）は、わずかな痂皮形成を有することが観察されたが、しかし、他の動物がケージ内で影響を受けておらず、動物の活動が正常であったため、これは止血鉗子によってもたらされた刺激に起因した。動物８８（群１８、対照ビヒクル）は、選ばれた　　殺の２日前に赤い眼を有することが観察された。この臨床兆候は、腫瘍負荷により選ばれた　　殺の前の動物の不安の初期指標であったようである。

【０４７０】

他の有意な臨床兆候はこの研究の間に観察されなかった－マウスはモニタリング期間を通して正常であったと考えられた。

【０４７１】

Ｃ．４．血液学

群１２（雌のマウス、試験物）は、群１０（腫瘍対照ビヒクル）（平均、３．３４％、

ｎ＝５）と比較して、高い単球値の平均パーセントを有した（平均、１８．４４％、ｎ＝５）（ｐ＝≦０．０００１）。単球のパーセントに関して確立した参照範囲は、０．９％～１８％である。しかし、これは、いずれの顕微鏡所見とも相関しなかった。

【０４７２】

評価した血液学パラメーターに関して、他には有意な結果も異常な結果も観察されなかった。試験物で処置した群と対応するビヒクルで処置した群の間のいずれの差異も正常参照範囲内にあるか、または生物学的に関連しないかもしくは統計的に有意ではなかった。

【０４７３】

Ｃ．５．臨床化学

群１１（雄のマウス、試験物）は、群９（腫瘍対照ビヒクル）（平均、４．６８ｇ／ｄＬ、ｎ＝４）と比較して、低い平均総タンパク質値を有した（平均、３．８３ｇ／ｄＬ、ｎ＝５）（ｐ＝０．００２２）。総タンパク質に対して確立された参照範囲は、４．１～６．４ｇ／ｄＬである。しかし、これは、いずれの顕微鏡所見とも相関しなかった。

【０４７４】

臨床化学パラメーターへの他の有害効果は、試験物投与に関して観察されなかった。試験物で処置した群と対応するビヒクルで処置した群の間のいずれの差異も正常参照範囲内にあるか、または生物学的に関連しないかもしくは統計的に有意ではなかった。

【０４７５】

Ｃ．６．肉眼の病理学的観察

剖検の時点で、腫瘍組織は採取されなかったが、予期した通り中間　　殺時の多くの動物において観察された。最終　　殺の時点で、腫瘍負荷は対照ビヒクル動物において明らかであったが、ほとんどの場合には、試験物で処置した動物において、腫瘍病巣はほとんどないし全く観察されなかった。剖検時の追加の所見を以下の表１３に詳述する。

【表１３】

表 13.顕微鏡所見と相関する顕微鏡観察

肉眼観察	観察した動物 (群の番号)	相関した所見	関連する試験物?
斑点のある肝臓	11 (G3 -対照ビヒクル) 32 (G5 -試験物) 59 (G10 -対照ビヒクル) 60 (G10 -対照ビヒクル) 71 (G12 -試験物)	顕微鏡所見と相関せず	なし
小型の脾臓	11 (G3 -対照ビヒクル) 16 (G3 -対照ビヒクル) 25 (G4 -対照ビヒクル) 30 (G5 -試験物) 34 (G5 -試験物) 40 (G6 -試験物) 45 (G6 -試験物) 56 (G9 -対照ビヒクル) 58 (G10 -対照ビヒクル) 59 (G10 -対照ビヒクル) 60 (G10 -対照ビヒクル) 65 (G11 -試験物) 71 (G12 -試験物)	リンパ球枯渇-NSGマウス表現型の予測構成成分	なし
青色の精嚢	57 (G9 -対照ビヒクル)	顕微鏡所見と相関せず	なし
暗緑色の胆嚢	107 (G9 -対照ビヒクル	顕微鏡所見と相関せず	なし
青色の胆嚢	62 (G10 -対照ビヒクル)	顕微鏡所見と相関せず	なし
油ぎった腎臓、斑点あり	21 (G4 -対照ビヒクル) 71 (G12 -試験物)	顕微鏡所見と相関せず	なし
肝臓内の泡	40 (G6 -試験物)	顕微鏡所見と相関せず	なし
脾臓上の白い斑点	69 (G12 -試験物)	中程度の異型性-自然な所見と考えられる	なし

剖検中に他の肉眼観察は認識されなかった。

【０４７６】

Ｃ．７．組織病理学

組織病理学的検討により、試験物投与からの急性毒性または遅延毒性に関連する中間（２日目）および最終（１４日目）の　　殺日に顕微鏡所見は存在しないことが決定された。

【０４７７】

群５および６（試験物）の動物に関する顕微鏡所見は、肺の異種移植腫瘍内の混合細胞型浸潤の存在を含んだ。これは、試験物の投与に関連するが、いずれの試験物の毒性にも関連しないと考えられた。この所見を、胸膜内処置したマウスの原発腫瘍におけるｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の免疫蛍光染色によって、別々の研究において確認した（この実施例の項目２．Ｃ．２を参照されたい）。

【０４７８】

他のいずれの観察された所見も、対照におけるのと類似する発生率で、散発的に生じることが決定されるか、または利用した種／株において共通していた。

【０４７９】

Ｃ．８．サイトカイン分析
群１３～１６から採取した（試験物／ビヒクル投与の８日後）血漿中のサイトカインレベルを測定して、処置したマウスの末梢サイトカイン発現に関するビヒクル対照に対するｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の毒性を調査した。以下のサイトカインを分析した：ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２ｐ７０、ＫＣ／ＧＲＯ、およびＴＮＦ－α。
【０４８０】
この分析からの結果は、ＣＡＲ　Ｔ細胞かビヒクル対照を受けたすべての動物に関するＩＦＮ－γ、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、およびＩＬ－５の検出不可能なレベル（定量限界未満）を実証した。ＩＬ－４は低レベルで検出可能であり、ビヒクル対照を受けているマウスにおけるよりも、ＣＡＲ　Ｔ細胞を受けているマウスにおいてわずかに高いレベルを示した唯一のサイトカインであった。ＩＬ－１０、ＩＬ－６、ＫＣ／ＧＲＯ、およびＴＮＦ－αなどの定量限界を超えて検出された他のすべてのサイトカインレベルは一般的に低く、ＣＡＲ　Ｔ細胞を受けているマウスとビヒクル対照を受けているマウスの間に有意差がなかった。
【０４８１】
Ｃ．９．腫瘍および脾臓におけるｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の同定
ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の注射を確認するために、群１３～１６を、試験／ビヒクル投与の８日後に　　殺した。脾臓および腫瘍を単離し、処理し、フローサイトメトリーによってヒトＴ細胞（ＣＤ４５＋　ＣＤ３＋）に関して染色した。すべてのｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスに由来する腫瘍および脾臓組織においてヒトＴ細胞を検出したが、ビヒクル処置したマウスでは検出されなかった（図４４および４５を参照されたい）。
【０４８２】
Ｃ．１０．生物発光イメージング
全身の光学ＢＬＩ（ＩＶＩＳ）を群１７～２０のマウスに関して実施して、ＭＧＭ腫瘍負荷の定性評価を提供した。研究の－１日目／１日目からの画像は、各群のすべての動物に対して腫瘍投与の成功を示す。対照ビヒクルの投与後に、群１７（雄のマウス）および１８（雌のマウス）の動物に対する腫瘍負荷は、各測定時点で増加し、２匹の動物は罹患率により早期のイメージングを必要とした。試験物の投与後に、群１９（雄のマウス）および２０（雌のマウス）の動物に対する腫瘍負荷は、注射の１週間後に増加を実証したが、しかし、２週目の時点では、負荷は有意に低下した。雄および雌のマウスに関するイメージング結果をそれぞれ、図４６および４７に示す。
【０４８３】
Ｄ．議論
ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏで、Ｍ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率を決定するために、拡大薬理学研究を行った。ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、メソテリンに依存し、ＨＬＡとは無関係に標的細胞を死滅させ、蓄積し、抗原刺激の際にエフェクターサイトカインを分泌することが示された。反復抗原刺激を使用する精巧な抗原ストレス試験によって、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、アッセイの経過にわたり、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞よりも長く細胞傷害性を保持できることが明らかになった。ｉｎ　ｖｉｖｏでは、反復抗原負荷は、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較したｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の優れた機能持続性を明らかにし、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは漸増腫瘍用量での一連の１０回の腫瘍再負荷にわたり連続する腫瘍退縮をもたらしたが、ｍｙｃＭ２８ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスでは最終的な腫瘍進行および再発がもたらされた。
【０４８４】
動物薬理学研究は、これらがｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイにおいて研究することができない薬理学および薬力学の重要な態様を網羅するため、ＣＡＲ　Ｔ細胞の抗腫瘍効率を研究

するのにより関連性が高い。投与経路、腫瘍部位へのトラフィッキング、リンパ組織へのホーミング、体循環、ｉｎ　ｖｉｖｏでの持続性、および使用される免疫不全状態のマウス株の制限にも関わらず、腫瘍免疫微小環境との相互作用などの因子は、最終的に抗腫瘍効率をモジュレートする。本発明者らは、ヒト疾患に類似する胸膜中皮腫の移行に関連する同所性マウスモデルを開発した（Servais et al., Clin Cancer Res. 2012）。本発明者らは、Ｔ細胞の局所的（胸膜内）投与が、胸膜疾患だけでなく、散在性腫瘍部位に対しても非常に優れていることを示した（Adusumilli et al., Sci Transl Med. 2014;6(261):261ra151）。より重要なことに、進行中の臨床試験（ＩＮＤ　１６３５４）において観察された結果が同所性ＭＰＭマウスモデルにおける本発明者らの元々の観察を反映しており、臨床的関連性に関するこのモデルの妥当性を証明している（Adusumilli et al., Cancer Res. 2019;79(13)）。この研究では、完全な腫瘍根絶が、局所的に送達された単回低用量の３×１０^{4}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で観察され、オンターゲット、オフ腫瘍毒性の兆候は観察されなかった。２週間の回復期間を有する中皮腫異種移植マウスモデルにおける単回の同所性用量の１×１０^{5}個のｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の毒性研究によって、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞が忍容性に優れることが確認された。死亡率、臨床的観察、体重変化、および肉眼／顕微鏡検査に対して有意な所見は見られなかった。顕微鏡検査は、ビヒクル処置したマウスでは観察されなかった異種移植腫瘍内の混合細胞型浸潤を明らかにしたが、ｍｙｃＭ２８ｚ１ＸＸＰＤ１ＤＮＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の薬理学を示している。雄の処置マウスは低い平均総タンパク質値を有し、雌の処置マウスは、２週間の時点で高い単球値の平均パーセントを呈したが、これらのいずれもいずれの顕微鏡所見にも相関しなかった。

【０４８５】

メソテリン標的化ＣＡＲ　Ｔ細胞を含むＣＡＲ　Ｔ細胞を、ヒトにおいて評価し、Ｔ細胞によって引き起こされる炎症を原因とする発熱、寒気、筋肉痛、過敏症、およびアナフィラキシーなどの定義された、管理可能な副作用に関して、安全であると報告している。複製－コンピテントレトロウイルスのリスクは、生成物の拡大試験によって最小化されるであろう。さらに、患者のＴ細胞は、１２週ごとに最大２年または疾患進行まで検査されることになる。ＣＡＲ　Ｔ細胞投与後最大１５年間、患者は生存率を追跡されることになる。

【０４８６】

これらのデータの評価の組合せを使用して、ヒトにおける安全な開始用量を確立し、漸増用量スキームを支持してきた。

【０４８７】

本発明において開示された主題の実施形態

前記記載から、様々な使用および条件に対して採択するために、本発明に開示された主題に対して変形および改変がなされ得ることは明らかであろう。このような実施形態は、以下の特許請求の範囲の範囲内でもある。

【０４８８】

本明細書における変数についての任意の定義において要素の列挙についての記載は、任意の単一の要素または列挙された要素の組合せ（または下位の組合せ）としてのその変数の定義を含む。本明細書における実施形態の記載は、任意の単一の実施形態としての実施形態、または任意の他の実施形態もしくはその部分と組み合わせた実施形態を含む。

【０４８９】

この明細書で言及されたすべての特許および公報は、それぞれ独立した特許および公報が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同程度に、参照によって本明細書に組み込まれる。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目１）

ｉ）（ａ）配列番号７６に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号７７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、および配列番号７８に記載のアミノ酸配列からなるＣ

ＤＲ３を含む重鎖可変領域；ならびに配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号８０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、および配列番号８１に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む細胞外抗原結合ドメイン、
（ｂ）ＩＴＡＭ２バリアントおよびＩＴＡＭ３バリアントを含む改変ＣＤ３ζポリペプチドを含む細胞内シグナル伝達ドメインであって、前記ＩＴＡＭ２バリアントおよび前記ＩＴＡＭ３バリアントの各々が２つの機能喪失突然変異を含む、細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と；
ｉｉ）（ａ）リガンド結合領域を含むプログラム細胞死１（ＰＤ－１）の細胞外ドメインの少なくとも一部；および
（ｂ）第１の膜貫通ドメイン
を含むプログラム細胞死１のドミナントネガティブ型（ＰＤ－１　ＤＮ）と
を含むポリペプチド組成物。
（項目２）
前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインが、約１ｎＭ～約２５ｎＭのＥＣ５０値でヒトメソテリンに特異的に結合する、項目１に記載のポリペプチド組成物。
（項目３）
前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインが、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、必要に応じて架橋されたＦａｂ、またはＦ（ａｂ）$_2$を含む、項目１または２に記載のポリペプチド組成物。
（項目４）
前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインがヒトｓｃＦｖを含む、項目３に記載のポリペプチド組成物。
（項目５）
前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインが、約１，０００個またはそれより多くのメソテリン結合部位／細胞のメソテリン発現レベルでヒトメソテリンを認識する、項目１～４のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目６）
前記重鎖可変領域が、配列番号８２に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％相同または同一であるアミノ酸配列を含む、項目１～５のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目７）
前記重鎖可変領域が、配列番号８２に記載のアミノ酸配列を含む、項目１～６のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目８）
前記軽鎖可変領域が、配列番号８３に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％相同または同一であるアミノ酸配列を含む、項目１～７のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目９）
前記軽鎖可変領域が、配列番号８３に記載のアミノ酸配列を含む、項目１～８のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目１０）
前記重鎖可変領域が、配列番号８２に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％相同または同一であるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号８３に記載のアミノ酸配列と少なくとも約８０％相同または同一であるアミノ酸配列を含む、項目１～９のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目１１）
前記重鎖可変領域が配列番号８２に記載のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号８３に記載のアミノ酸配列を含む、項目１～１０のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目１２）

前記ＣＡＲの前記細胞外抗原結合ドメインが、前記重鎖可変領域と前記軽鎖可変領域との間にリンカーを含む、項目１～１１のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目１３）
リーダーが、前記細胞外抗原結合ドメインのＮ末端に共有結合されている、項目１～１２のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目１４）
前記リーダーがＣＤ８ポリペプチドを含む、項目１３に記載のポリペプチド組成物。
（項目１５）
前記ＣＤ８ポリペプチドが、配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる、項目１４に記載のポリペプチド組成物。
（項目１６）
ＰＤ－１の細胞外ドメインの少なくとも一部が、配列番号４８のアミノ酸２１～１６５を含む、項目１～１５のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目１７）
前記ＰＤ－１　ＤＮの前記第１の膜貫通ドメインが、ＣＤ８ポリペプチド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、またはその組合せを含む、項目１～１６のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目１８）
前記ＰＤ－１　ＤＮの前記第１の膜貫通ドメインがＣＤ８ポリペプチドを含む、項目１７に記載のポリペプチド組成物。
（項目１９）
前記ＰＤ－１　ＤＮの前記第１の膜貫通ドメインに含まれる前記ＣＤ８ポリペプチドが、配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７を含む、項目１８に記載のポリペプチド組成物。
（項目２０）
前記ＰＤ－１　ＤＮが、配列番号４８のアミノ酸２１～１６５および配列番号８６のアミノ酸１３７～２０７を含む、項目１～２８のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目２１）
前記２つの機能喪失突然変異の各々がチロシンアミノ酸残基にある、項目１～２０のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目２２）
前記ＩＴＡＭ２バリアントが、配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、項目１～２１のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目２３）
前記ＩＴＡＭ３バリアントが、配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、項目１～２２のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目２４）
前記改変ＣＤ３ζポリペプチドが天然のＩＴＡＭ１を含む、項目１～２３のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目２５）
前記天然のＩＴＡＭ１が、配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、項目２４に記載のポリペプチド組成物。
（項目２６）
前記改変ＣＤ３ζポリペプチドが、配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、項目１～２５のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目２７）
前記ＰＤ－１　ＤＮが細胞内ドメインを欠如する、項目１～２６のいずれか一項に記載の

ポリペプチド組成物。
（項目２８）
前記ＣＡＲが第２の膜貫通ドメインをさらに含む、項目１～２７のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目２９）
前記ＣＡＲの前記第２の膜貫通ドメインが、ＣＤ８ポリペプチド、ＣＤ２８ポリペプチド、ＣＤ３ζポリペプチド、ＣＤ４ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ１６６ポリペプチド、ＣＤ８ａポリペプチド、ＣＤ８ｂポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＩＣＡＭ－１ポリペプチド、ＣＴＬＡ－４ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ペプチド、ＮＫＧＤ２ペプチド、またはその組合せを含む、項目２８に記載のポリペプチド組成物。
（項目３０）
前記ＣＡＲの前記第２の膜貫通ドメインが、ＣＤ２８ポリペプチドを含む、項目２８または２９に記載のポリペプチド組成物。
（項目３１）
前記ＣＡＲの前記細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激シグナル伝達領域をさらに含む、項目１～３０のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目３２）
前記共刺激シグナル伝達領域が、ＣＤ２８ポリペプチド、４－１ＢＢポリペプチド、ＯＸ４０ポリペプチド、ＩＣＯＳポリペプチド、ＤＡＰ－１０ポリペプチド、ＣＤ２７ポリペプチド、ＣＤ４０／Ｍｙ８８ポリペプチド、ＮＫＧＤ２ポリペプチド、またはその組合せを含む、項目３１に記載のポリペプチド組成物。
（項目３３）
前記共刺激シグナル伝達領域がＣＤ２８ポリペプチドを含む、項目３１または３２に記載のポリペプチド組成物。
（項目３４）
前記ＣＡＲが配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含む、項目１～３３のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物。
（項目３５）
項目１～３４のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物を含む免疫応答細胞。
（項目３６）
前記ＰＤ－１　ＤＮおよび／または前記ＣＡＲが組換え発現される、項目３５に記載の免疫応答細胞。
（項目３７）
前記ＰＤ－１　ＤＮおよび／または前記ＣＡＲがベクターから発現される、項目３５または３６に記載の免疫応答細胞。
（項目３８）
前記免疫応答細胞が、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、およびそこからリンパ系細胞が分化し得る多能性幹細胞からなる群から選択される、項目３５～３７のいずれか一項に記載の免疫応答細胞。
（項目３９）
Ｔ細胞である、項目３８に記載の免疫応答細胞。
（項目４０）
前記Ｔ細胞が、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、制御性Ｔ細胞、およびナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞からなる群から選択される、項目３９に記載の免疫応答細胞。
（項目４１）
前記多能性幹細胞が胚性幹細胞または人工多能性幹細胞である、項目３８に記載の免疫応答細胞。
（項目４２）
前記免疫応答細胞が自己である、項目３５～４１のいずれか一項に記載の免疫応答細胞。

（項目４３）
前記免疫応答細胞が同種である、項目３５～４１のいずれか一項に記載の免疫応答細胞。
（項目４４）
項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞の有効量および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。
（項目４５）
約10^4～10^6個の間の前記免疫応答細胞を含む、項目４４に記載の医薬組成物。
（項目４６）
少なくとも約10^5個の前記免疫応答細胞を含む、項目４４または４５に記載の医薬組成物。
（項目４７）
約10^5個の前記免疫応答細胞を含む、項目４４～４６のいずれか一項に記載の医薬組成物。
（項目４８）
対象における新生物を予防および／もしくは処置するため、新生物の再発を有する対象を処置するため、対象における腫瘍負荷を低減するため、新生物を有する対象の生存を増加もしくは延長させるため、対象における炎症疾患を予防および／もしくは処置するため、ならびに／または臓器移植のレシピエントである対象における移植片拒絶を予防するためである、項目４４～４７のいずれか一項に記載の医薬組成物。
（項目４９）
項目１～３４のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物をコードするポリヌクレオチドを含む核酸組成物。
（項目５０）
前記ポリヌクレオチドが配列番号１２３に記載のヌクレオチド配列を含む、項目４９に記載の核酸組成物。
（項目５１）
前記ポリヌクレオチドが配列番号１２４に記載のヌクレオチド配列を含む、項目４９に記載の核酸組成物。
（項目５２）
項目４９～５１のいずれか一項に記載の核酸組成物を含むベクター。
（項目５３）
レトロウイルスベクターである、項目５２に記載のベクター。
（項目５４）
前記レトロウイルスベクターがγ－レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである、項目５３に記載のベクター。
（項目５５）
免疫応答細胞を産生する方法であって、項目１～３４のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物、項目４９～５１のいずれか一項に記載の核酸組成物、または項目５２～５４のいずれか一項に記載のベクターを免疫応答細胞に導入することを含む方法。
（項目５６）
項目１～３４のいずれか一項に記載のポリペプチド組成物、項目４９～５１のいずれか一項に記載の核酸組成物、項目５２～５４のいずれか一項に記載のベクター、項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞、または項目４４～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物を含むキット。
（項目５７）
対象における新生物を処置および／もしくは予防するため、新生物の再発を有する対象を処置するため、対象における腫瘍負荷を低減するため、新生物を有する対象の生存を増加もしくは延長させるため、対象における炎症疾患を予防および／もしくは処置するため、ならびに／または臓器移植のレシピエントである対象における移植片拒絶を予防するための書面での使用説明書をさらに含む、項目５６に記載のキット。

（項目５８）
対象における新生物を予防および／または処置する方法であって、項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞または項目４４～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与することを含む方法。
（項目５９）
対象における腫瘍負荷を低減する方法であって、項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞または項目４４～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与することを含む方法。
（項目６０）
前記対象における腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍サイズを低減する、および／または前記腫瘍を根絶する、項目５９に記載の方法。
（項目６１）
前記新生物および／または前記腫瘍が固形腫瘍である、項目５８～６０のいずれか一項に記載の方法。
（項目６２）
前記固形腫瘍が、中皮腫、肺がん、膵臓がん、卵巣がん、乳がん、大腸がん、胸膜腫瘍、神経膠芽腫、食道がん、胃がん（gastric cancer）、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃がん（stomach cancer）、胆管癌、およびその組合せからなる群から選択される、項目６１に記載の方法。
（項目６３）
新生物の再発を有する対象を処置する方法であって、項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞または項目４４～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与することを含む方法。
（項目６４）
前記対象が、前記免疫応答細胞または前記組成物の前記投与の前に免疫療法を受けた、項目６３に記載の方法。
（項目６５）
新生物を有する対象の生存を増加または延長させる方法であって、項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞または項目４４～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与することを含む方法。
（項目６６）
対象におけるがん細胞または病原体に応答して免疫活性化サイトカイン産生を増加させる方法であって、項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞または項目４４～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与することを含む方法。
（項目６７）
前記免疫活性化サイトカインが、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－１１、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、インターフェロン調節因子７（ＩＲＦ７）、およびその組合せからなる群から選択される、項目６６に記載の方法。
（項目６８）
少なくとも１つの免疫調節剤を投与することをさらに含む、項目５８～６９のいずれか一項に記載の方法。
（項目６９）
前記少なくとも１つの免疫調節剤が、免疫刺激剤、チェックポイント免疫遮断剤、放射線療法剤、化学療法剤、およびその組合せからなる群から選択される、項目６８に記載の方法。
（項目７０）
前記免疫刺激剤が、ＩＬ－１２、アゴニスト共刺激性モノクローナル抗体、およびその組合せからなる群から選択される、項目６９に記載の方法。

（項目７１）
前記免疫刺激剤がＩＬ－１２である、項目７０に記載の方法。
（項目７２）
前記アゴニスト共刺激性モノクローナル抗体が、抗４－１ＢＢ抗体、抗ＯＸ４０抗体、抗ＩＣＯＳ抗体、およびその組合せからなる群から選択される、項目６９に記載の方法。
（項目７３）
前記アゴニスト共刺激性モノクローナル抗体が抗４－１ＢＢ抗体である、項目７２に記載の方法。
（項目７４）
前記チェックポイント免疫遮断剤が、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＰＤ－１抗体、抗ＬＡＧ３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＴＩＭ３抗体、およびその組合せからなる群から選択される、項目６９に記載の方法。
（項目７５）
前記チェックポイント免疫遮断剤が抗ＰＤ－Ｌ１抗体または抗ＰＤ－１抗体である、項目７４に記載の方法。
（項目７６）
前記対象がヒトである、項目５８～７５のいずれか一項に記載の方法。
（項目７７）
前記免疫応答細胞が、前記対象に胸膜または胸膜内投与される、項目５８～７５のいずれか一項に記載の方法。
（項目７８）
対象における炎症疾患を予防および／または処置する方法であって、項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞または項目４４～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法。
（項目７９）
前記免疫応答細胞が免疫阻害性細胞である、項目７８に記載の方法。
（項目８０）
前記免疫阻害性細胞が制御性Ｔ細胞である、項目７９に記載の方法。
（項目８１）
炎症疾患が膵炎である、項目７８～８０のいずれか一項に記載の方法。
（項目８２）
前記対象がヒトである、項目７８～８１のいずれか一項に記載の方法。
（項目８３）
前記対象が臓器移植のレシピエントである、項目７８～８２のいずれか一項に記載の方法。
（項目８４）
前記対象が膵臓移植のレシピエントである、項目７８～８３のいずれか一項に記載の方法。
（項目８５）
臓器移植のレシピエントである対象における移植片拒絶を予防する方法であって、項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞または項目４４～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法。
（項目８６）
前記免疫応答細胞が免疫阻害性細胞である、項目８５に記載の方法。
（項目８７）
前記免疫阻害性細胞が制御性Ｔ細胞である、項目８６に記載の方法。
（項目８８）
前記対象がヒトである、項目８５～８７のいずれか一項に記載の方法。
（項目８９）
前記対象が膵臓移植のレシピエントである、項目８５～８８のいずれか一項に記載の方

法。

（項目９０）

対象における新生物の処置および／もしくは予防、新生物の再発を有する対象の処置、対象における腫瘍負荷の低減、新生物を有する対象の生存の増加もしくは延長、対象における炎症疾患の予防および／もしくは処置、ならびに／または臓器移植のレシピエントである対象における移植片拒絶の予防に使用するための、項目３５～４３のいずれか一項に記載の免疫応答細胞、または項目４４～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【図面】

【図１】

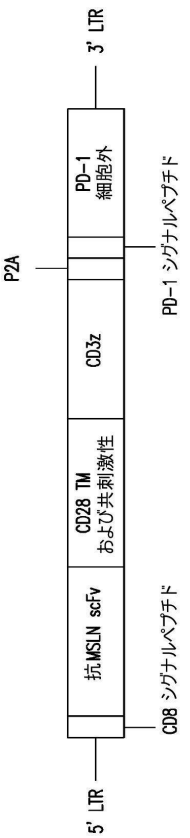


Figure 1

【図２】

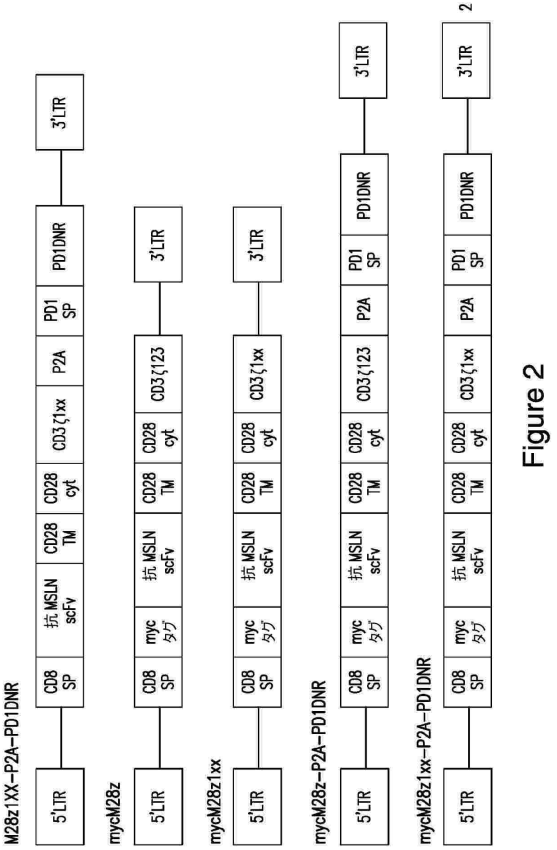
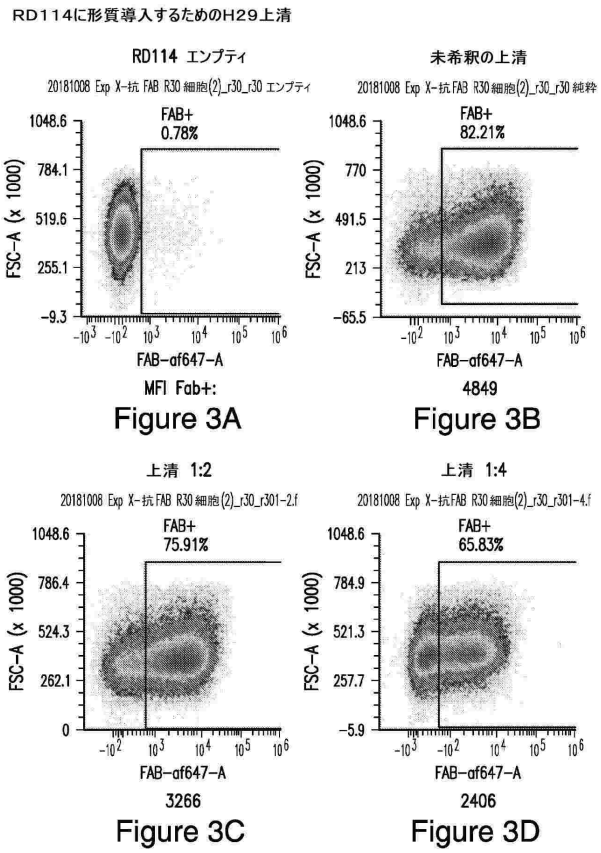
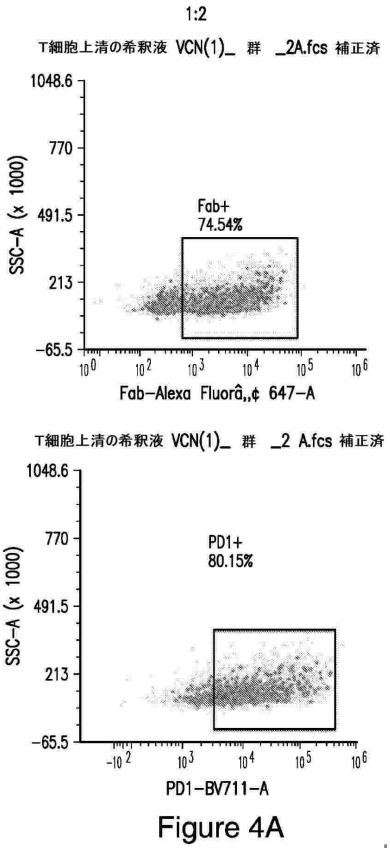


Figure 2

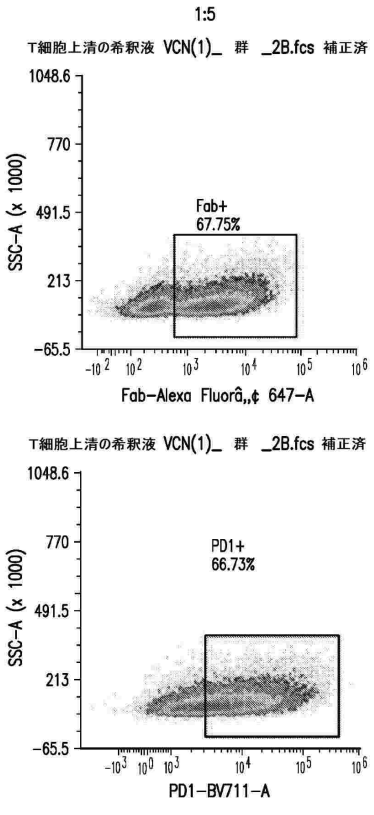
【図３】



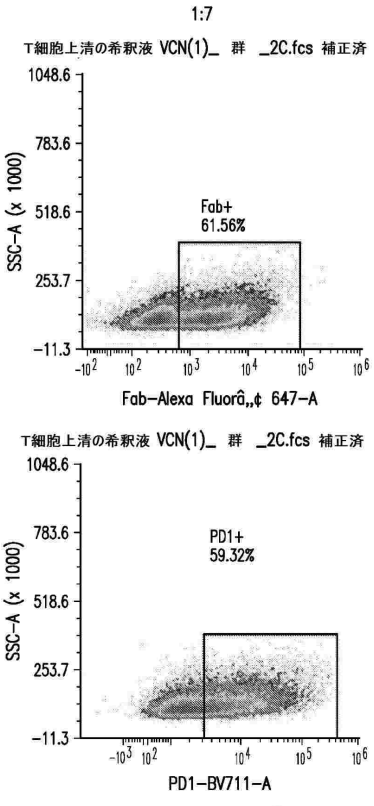
【図４Ａ】



【図４Ｂ】



【図４Ｃ】



【図４Ｄ】

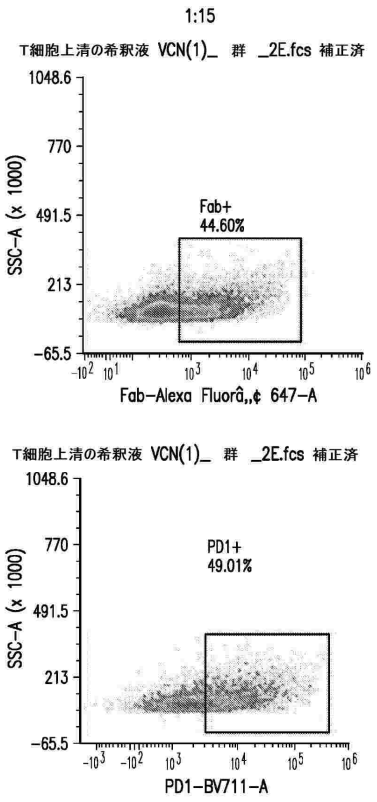


Figure 4D

【図４Ｅ】

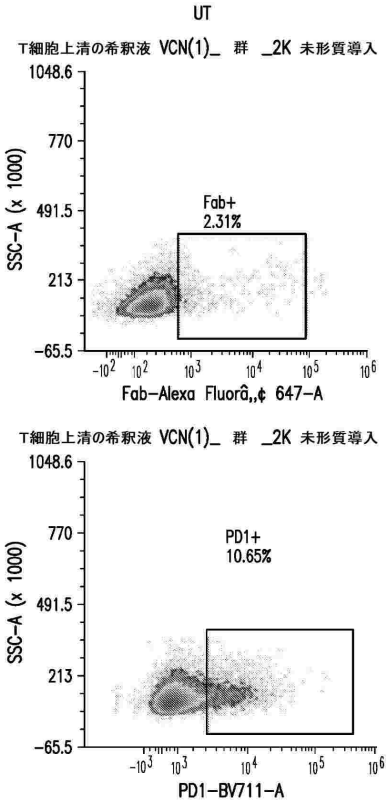


Figure 4E

【図５Ａ】

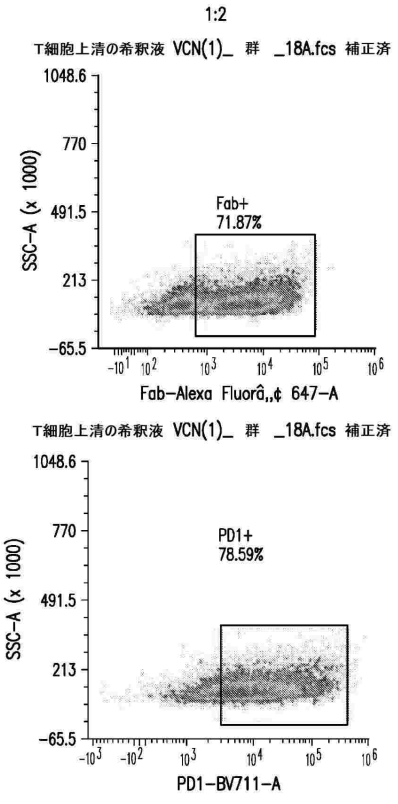


Figure 5A

【図５Ｂ】

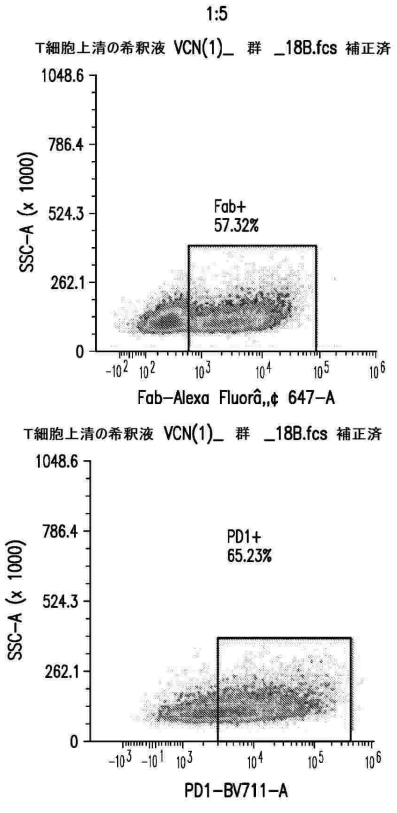


Figure 5B

【図５Ｃ】

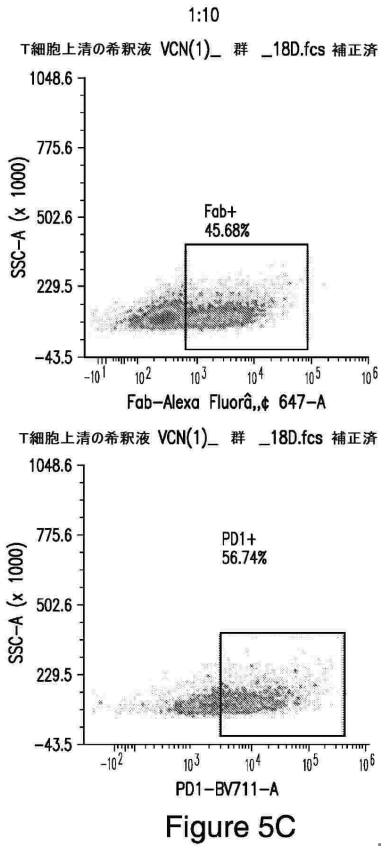


Figure 5C

【図５Ｄ】

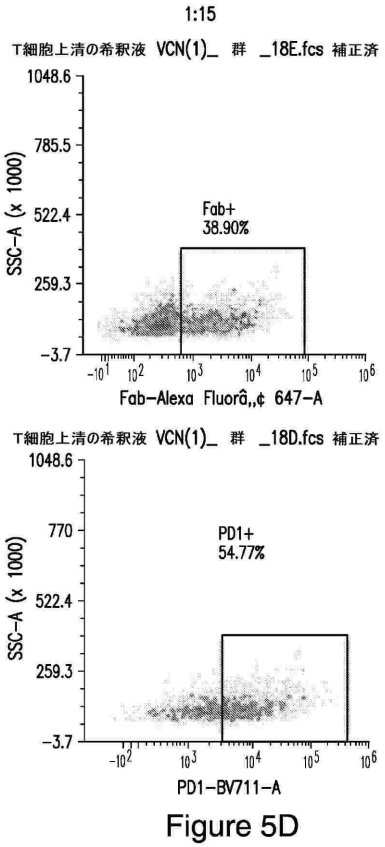


Figure 5D

【図５Ｅ】

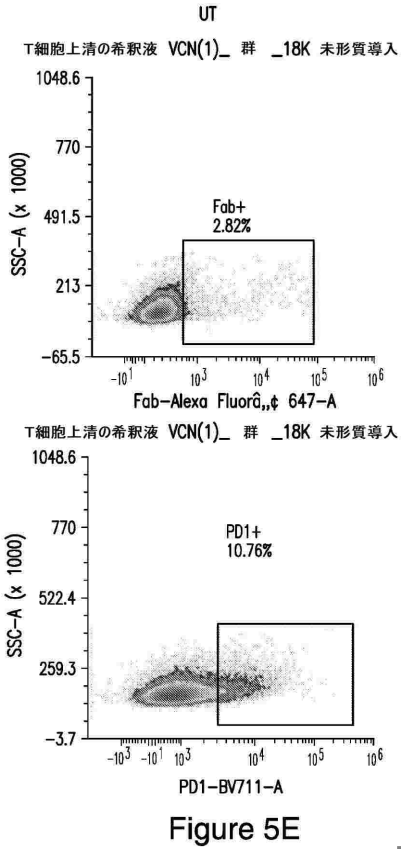


Figure 5E

【図６Ａ】

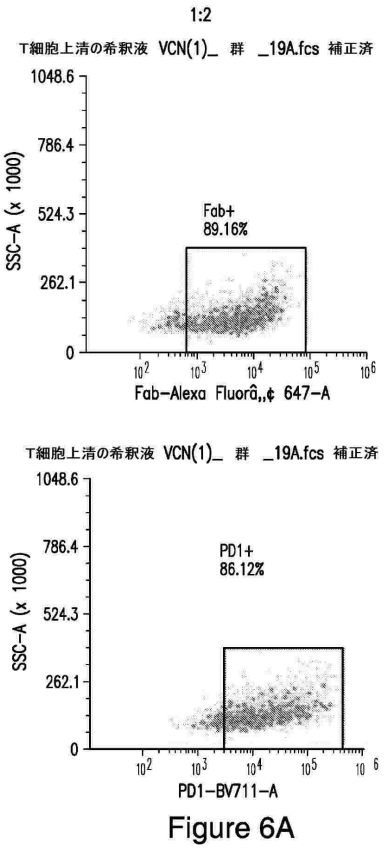


Figure 6A

【図６Ｂ】

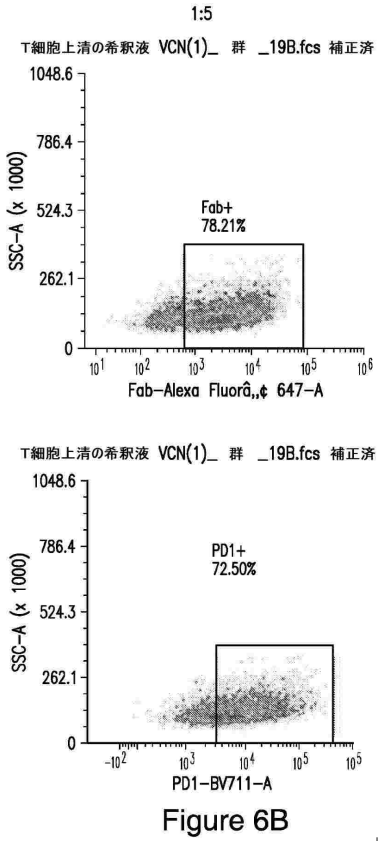


Figure 6B

【図６Ｃ】

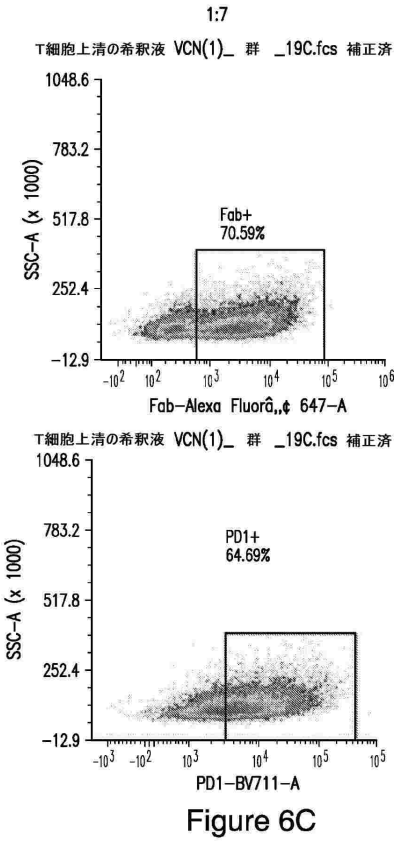


Figure 6C

【図６Ｄ】

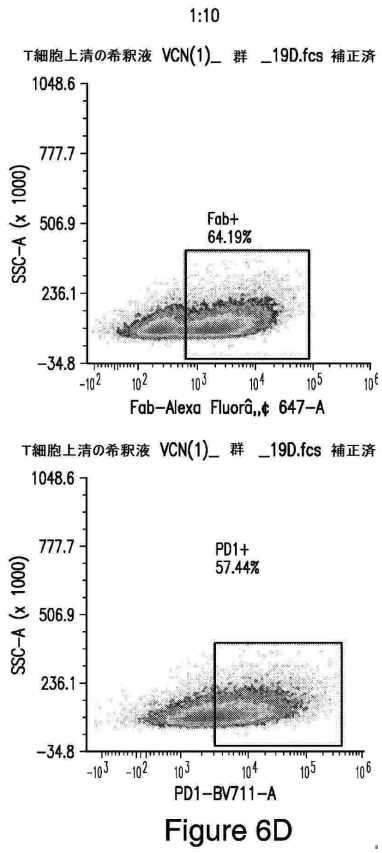


Figure 6D

【図６Ｅ】

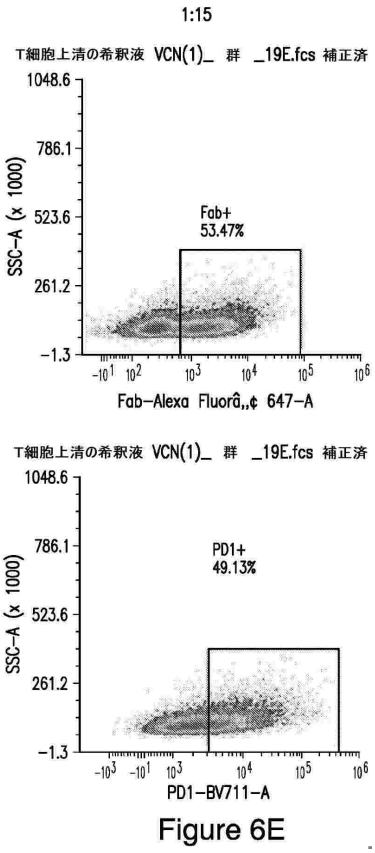


Figure 6E

【図６Ｆ】

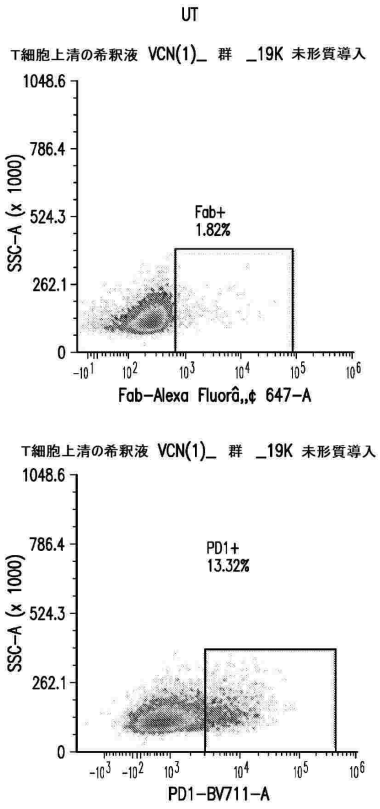


Figure 6F

【図７－１】

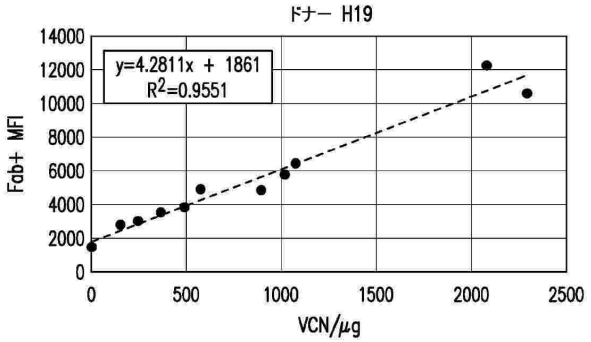


Figure 7A

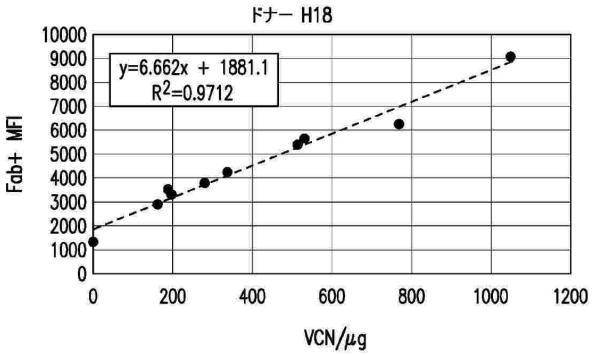


Figure 7B

【図７－２】

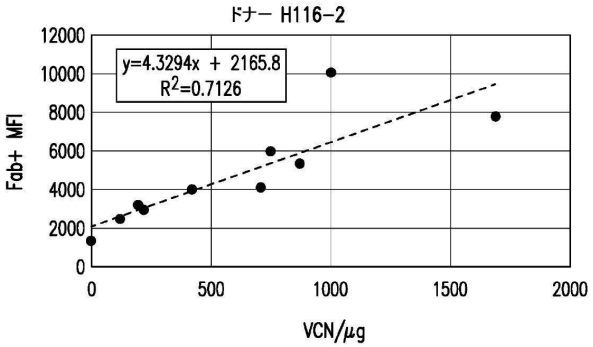


Figure 7C

【図８】

ドナー	CD3+ Fab+	
	%	陽性のMFI
H116-2	62	4138
H18	57	5410
H19	64	3863

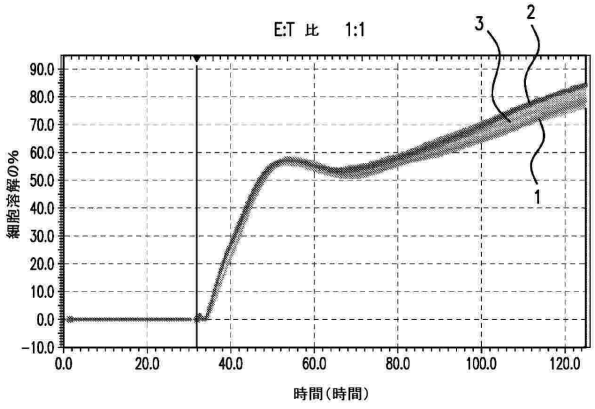


Figure 8

【図９】

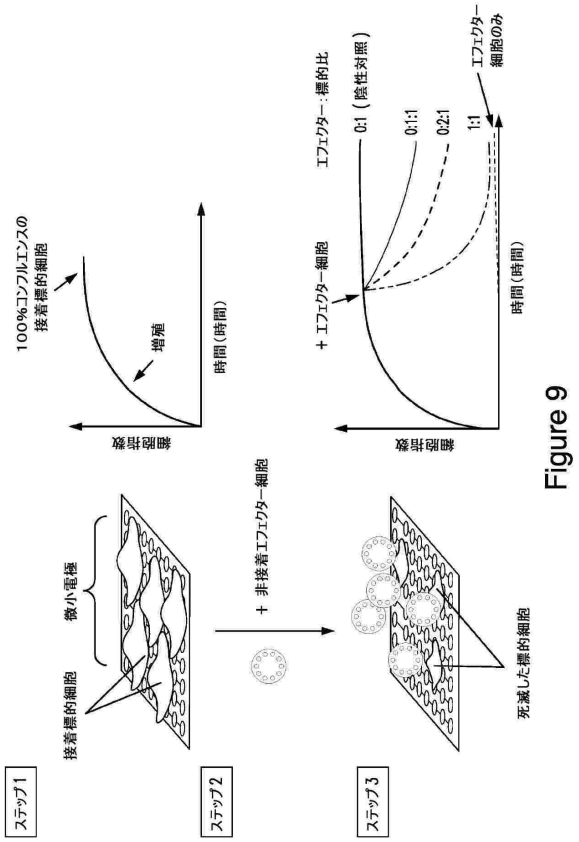


Figure 9

【図１０】

構築物：
- mycM28z
- mycM28z1XX
- mycM28z-P2A-PD1DNR
- mycM28z1XX-P2A-PD1DNR

ドナー：
- H19
- BC-O+

eCTLに対する標的：
- MGM（MSLN 高）
- MGM-PDL1（MSLN 高，PDL1 高）
- MSTO-G（MSLN 陰性）
- A549GM（MSLN 高）
- A549G（MSLN 低）

中皮腫細胞系に関するE:T比：
- 3:1
- 1:1
- 0.33:1

肺がん細胞系に関するE:T比：
- 10:1
- 5:1
- 2:1

上清希釈液：

構築物	選択された希釈率
mycM28z	1:4
mycM28z1XX	1:4
mycM28z-P2A-PD1DNR	1:7
mycM28z-P2A-PD1DNR	1:4

Figure 10

【図１１Ａ】

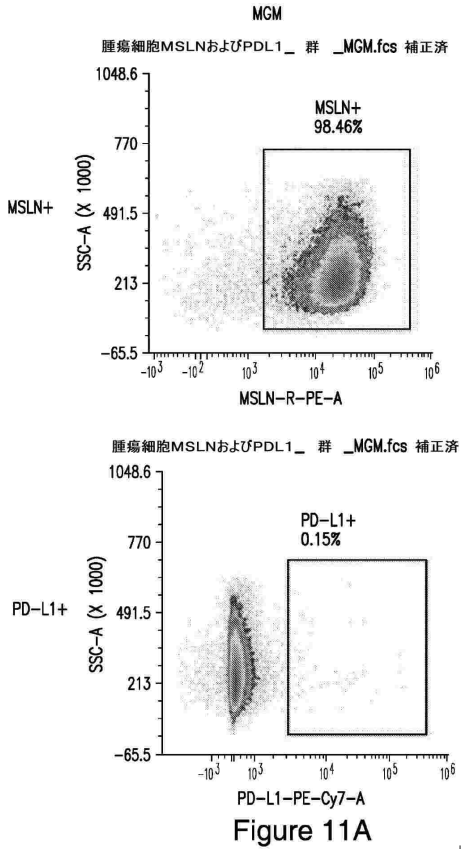


Figure 11A

【図１１Ｂ】

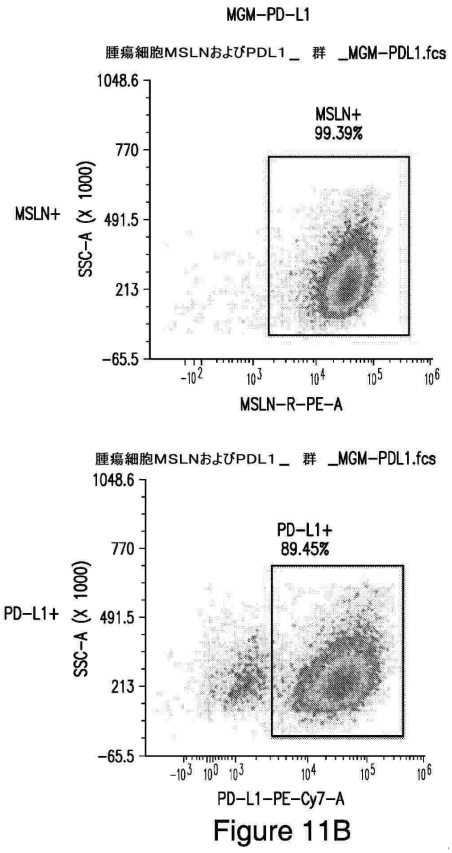


Figure 11B

【図１１Ｃ】

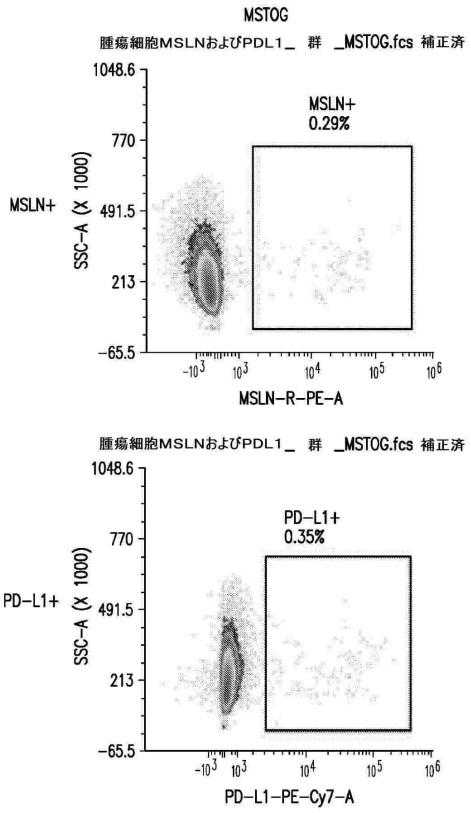


Figure 11C

【図１１Ｄ】

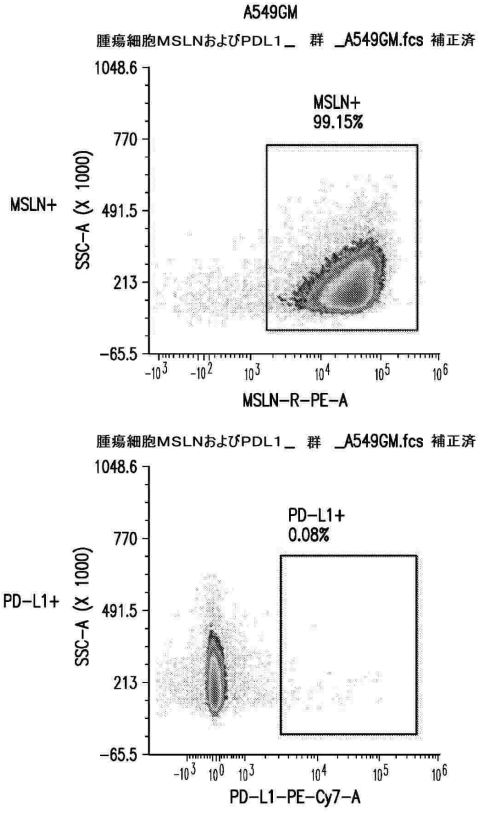


Figure 11D

【図１１Ｅ】

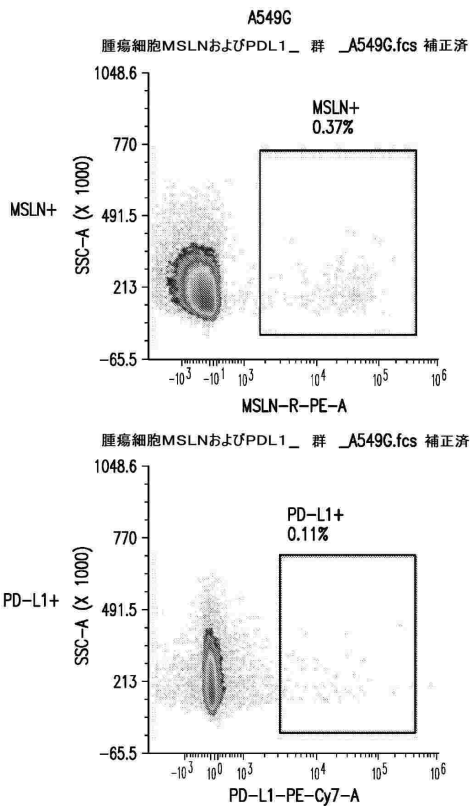


Figure 11E

【図１２Ａ】

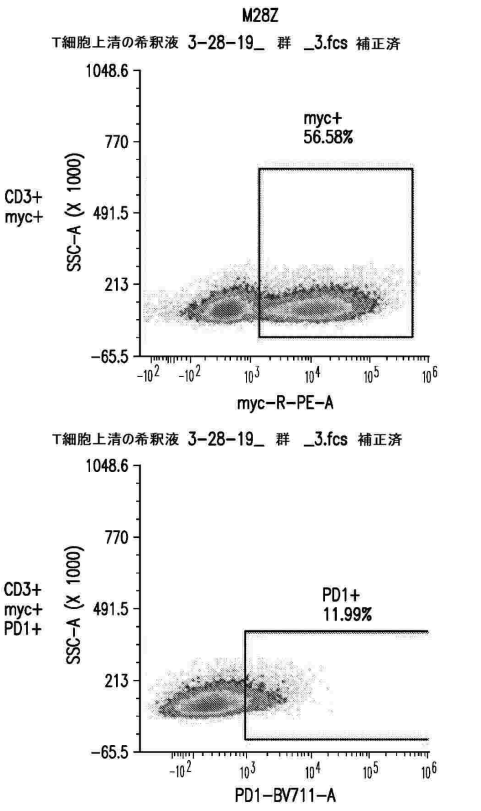


Figure 12A

【図１２Ｂ】

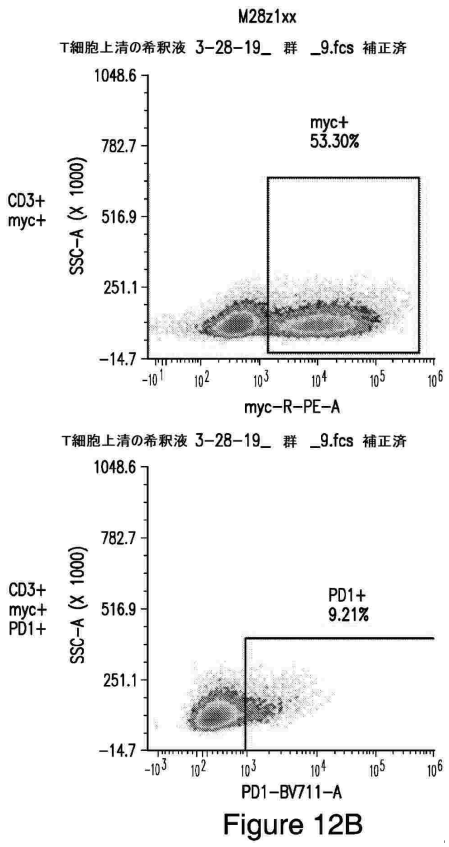


Figure 12B

【図１２Ｃ】

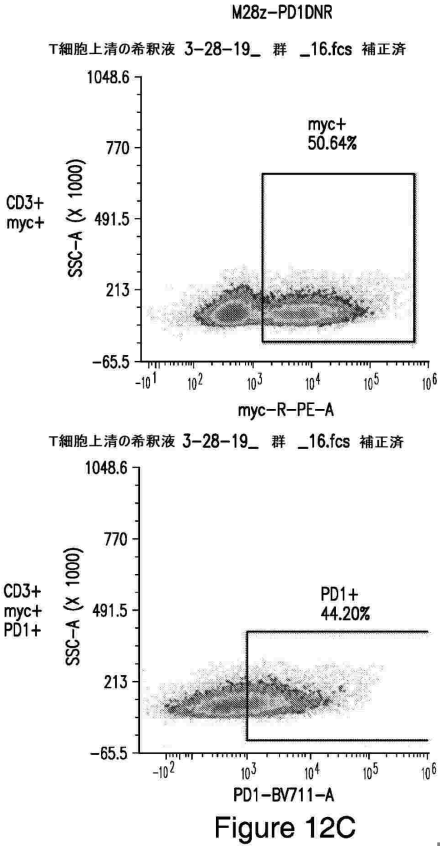


Figure 12C

【図１２Ｄ】

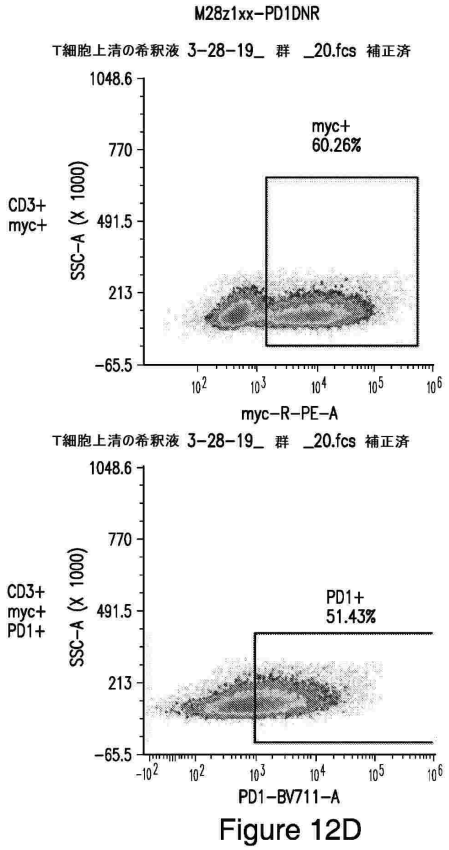


Figure 12D

【図１２Ｅ】

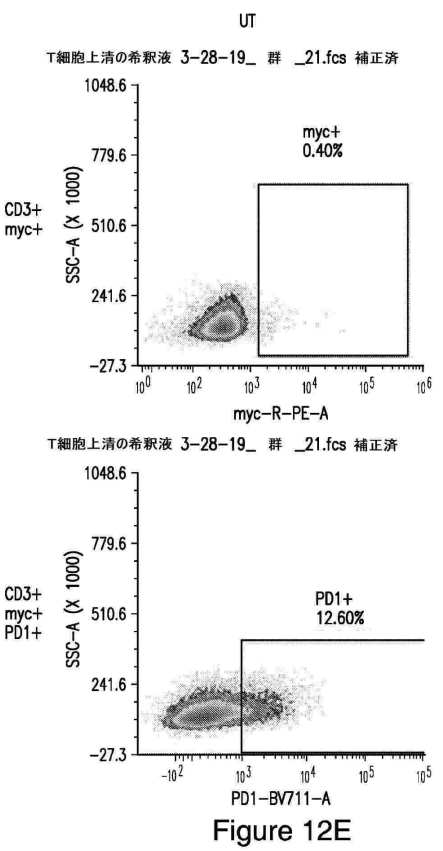


Figure 12E

【図１３Ａ】

MSLN 高 (MGM)−E:T 比 3:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

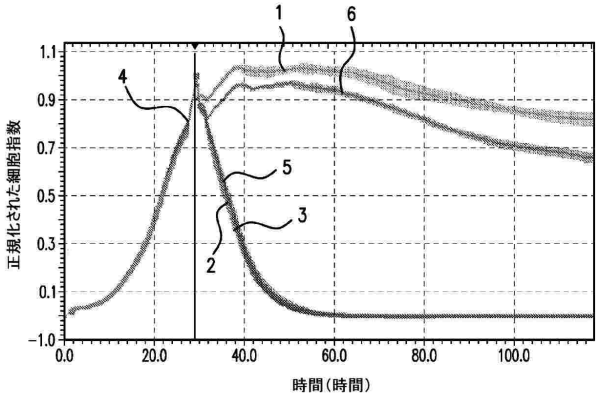


Figure 13A

【図１３Ｂ】

MSLN 高 (MGM)−E:T 比 1:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

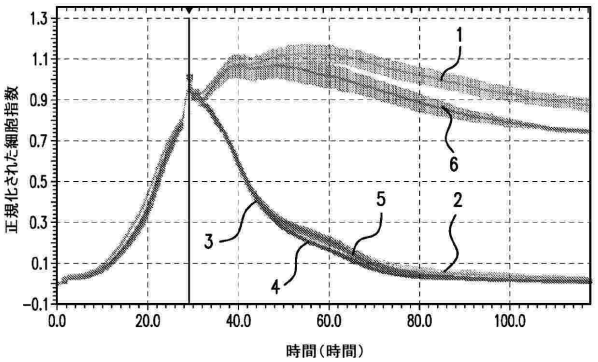


Figure 13B

【図１３Ｃ】

MSLN 高 (MGM)−E:T 比 0.33:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

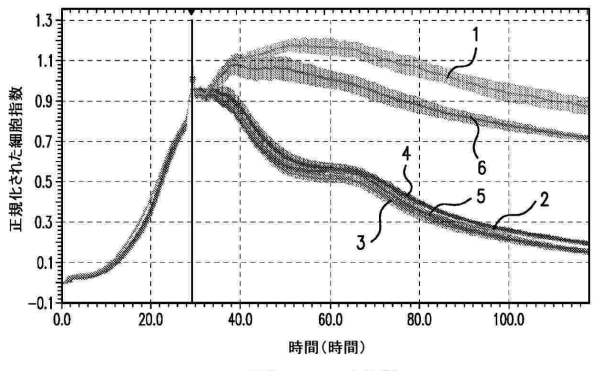


Figure 13C

【図１４】

構築物	%Fab+	Fab+ MFI
M28z−LNGFR	60	11176
M28z1XX−LNGFR	54	8892
mycM28z−PD1DNR	27	4812
mycM28z1XX−PD1DNR	67	9576
未形質導入	−	−

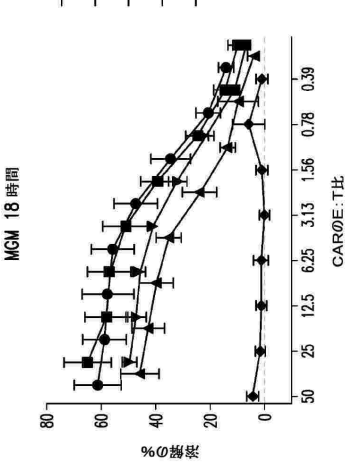


Figure 14

【図１５Ａ】

MSLN 陰性 (MSTOG)−E:T 比 3:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

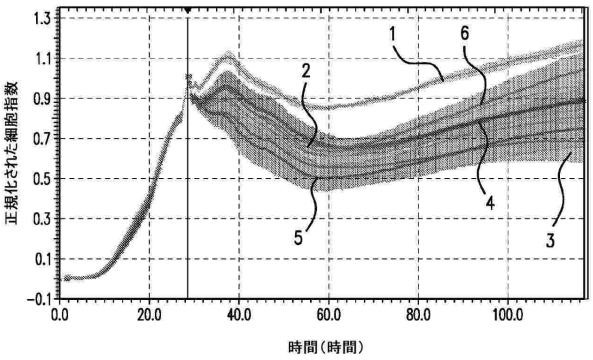


Figure 15A

【図１５Ｂ】

MSLN 陰性 (MSTOG)−E:T 比 1:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

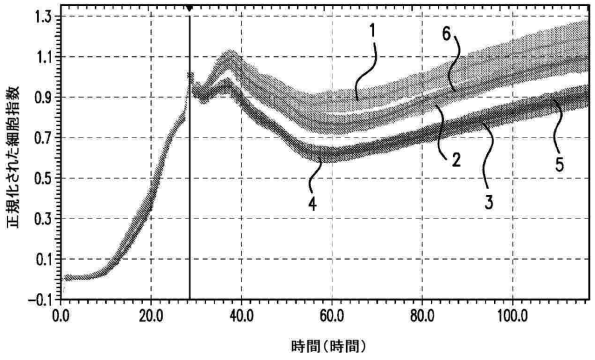


Figure 15B

【図１５Ｃ】

MSLN 陰性 (MSTOG)−E:T 比 0.33:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

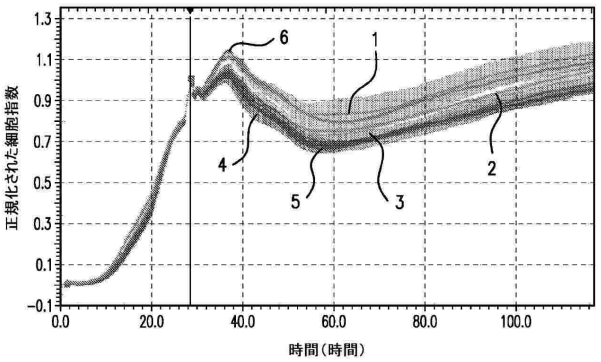


Figure 15C

【図１６】

構築物	%Fab+	Fab+ MFI
M28z−LNGFR	60	11176
M28z1XX−LNGFR	54	8892
mycM28z−PD1DNR	27	4812
mycM28z1XX−PD1DNR	67	9576

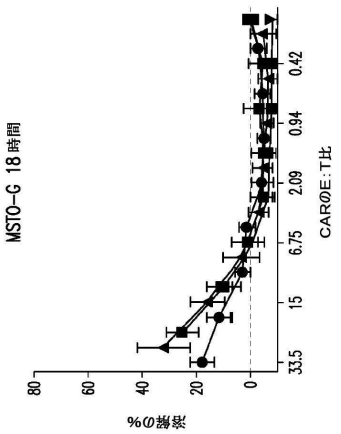


Figure 16

【図１７Ａ】

MSLNおよびPD－L1 高 (MGM-PDL1)-E:T 比 3:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	–	–	6

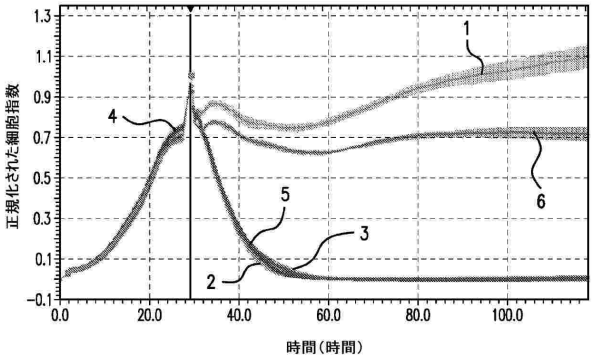


Figure 17A

【図１７Ｂ】

MSLNおよびPD－L1 高 (MGM-PDL1)-E:T 比 1:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	–	–	6

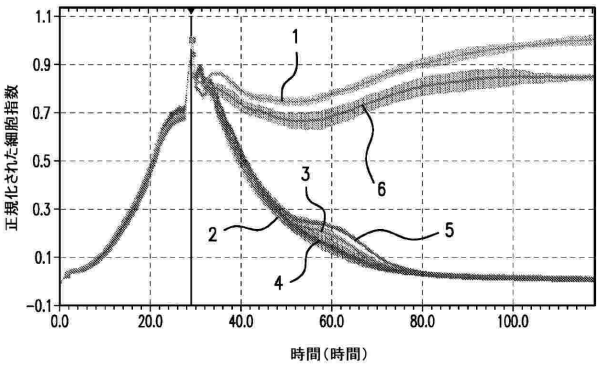


Figure 17B

【図１７Ｃ】

MSLNおよびPD－L1 高 (MGM-PDL1)-E:T 比 0:33:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	–	–	6

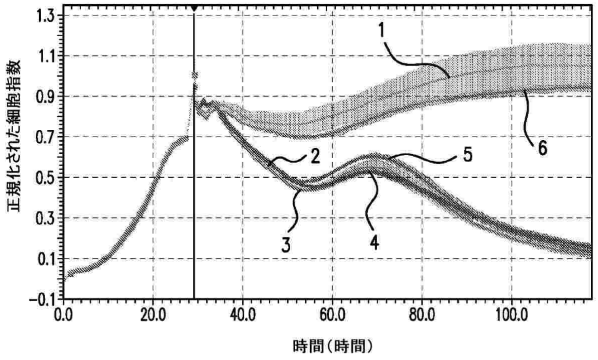


Figure 17C

【図１８Ａ】

MSLN 高 (A549GM)-E:T 比 10:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	–	–	6

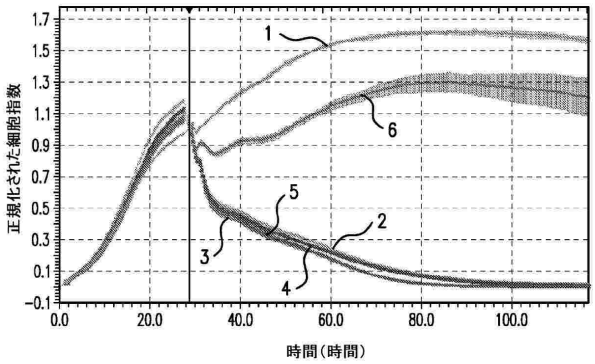


Figure 18A

【図１８Ｂ】

MSLN 高 (A549GM)−E:T 比 5:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

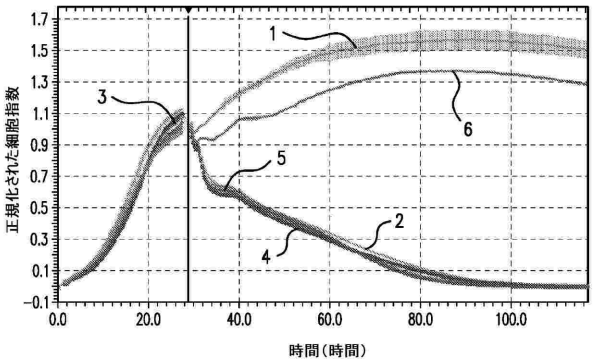


Figure 18B

【図１８Ｃ】

MSLN 高 (A549GM)−E:T 比 2:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

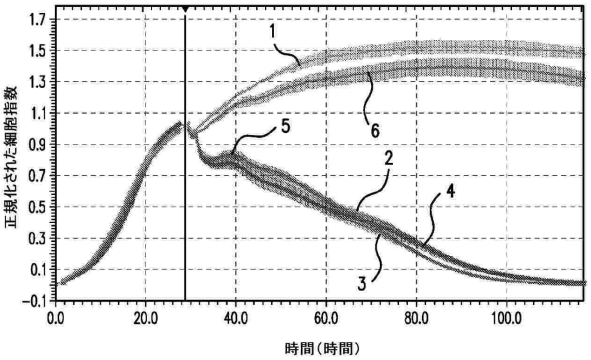


Figure 18C

【図１９Ａ】

MSLN 低 (A549G)−E:T 比 10:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

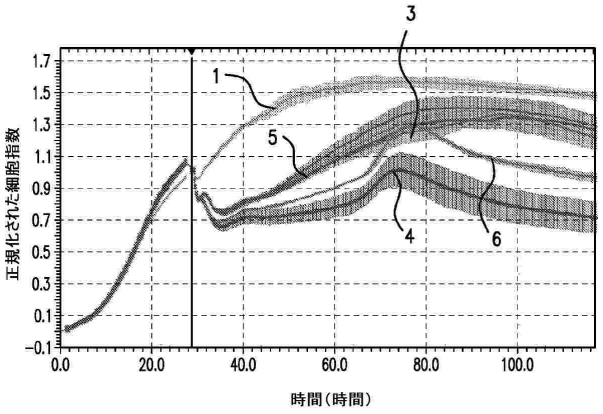


Figure 19A

【図１９Ｂ】

MSLN 低 (A549G)−E:T 比 5:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

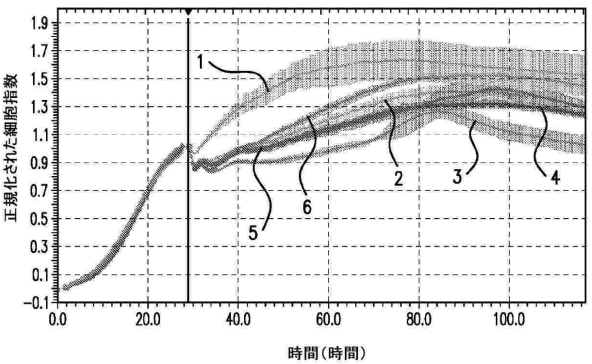


Figure 19B

【図１９Ｃ】

MSLN 低 (A549G)−E:T 比 2:1

構築物	%myc+	Myc+ MFI	
腫瘍のみ	−	−	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z−PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX−PD1DNR	60	8377	5
未形質導入	−	−	6

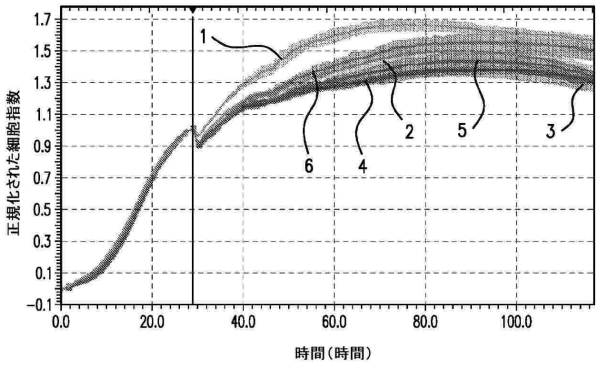


Figure 19C

【図２０−１】

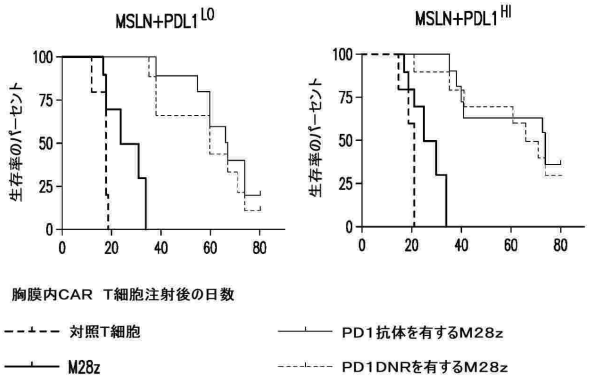


Figure 20A

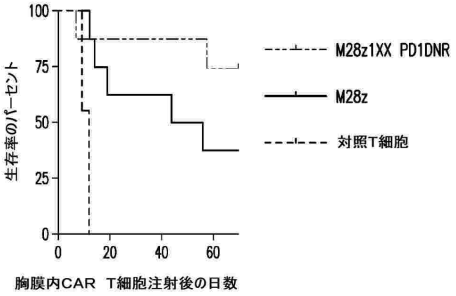


Figure 20B

【図２０−２】

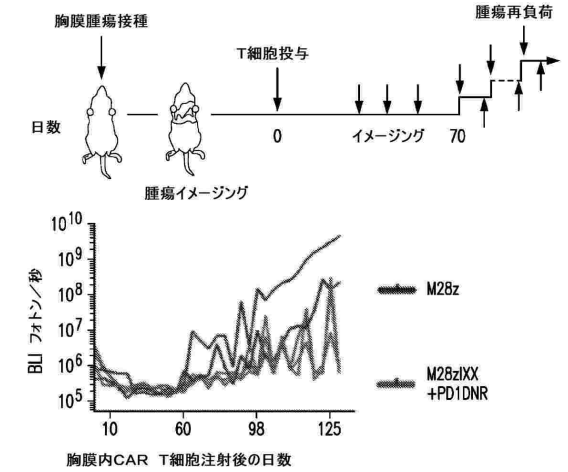


Figure 20C

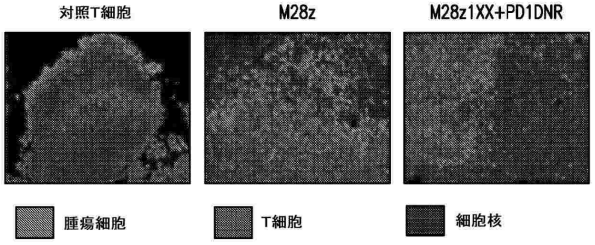


Figure 20D

【図２１】

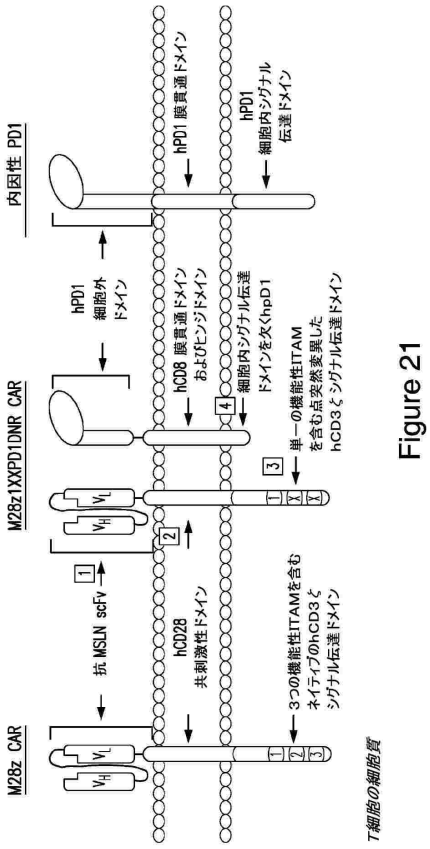


Figure 21

【図２２－１】

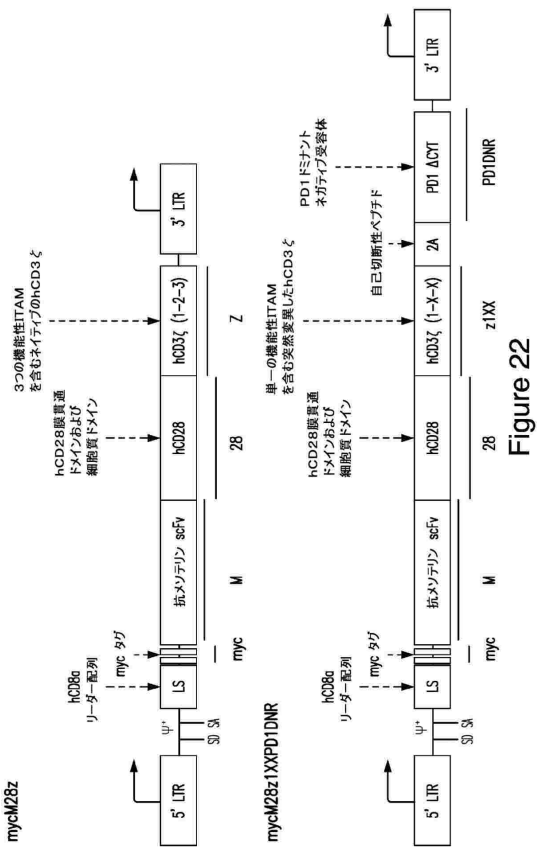


Figure 22

【図２２－２】

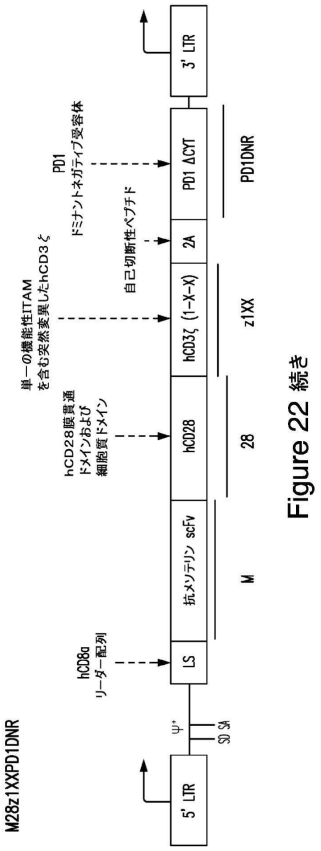


Figure 22 続き

【図２３－１】

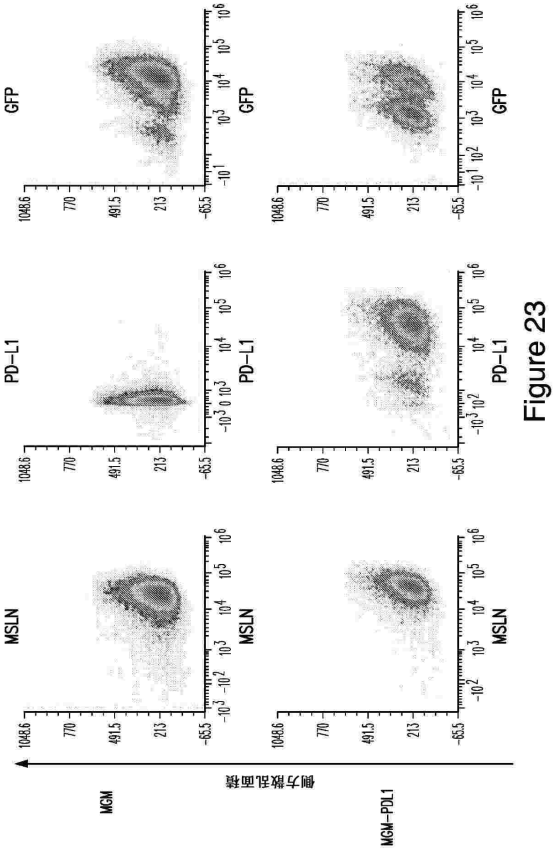


Figure 23

【図２３－２】

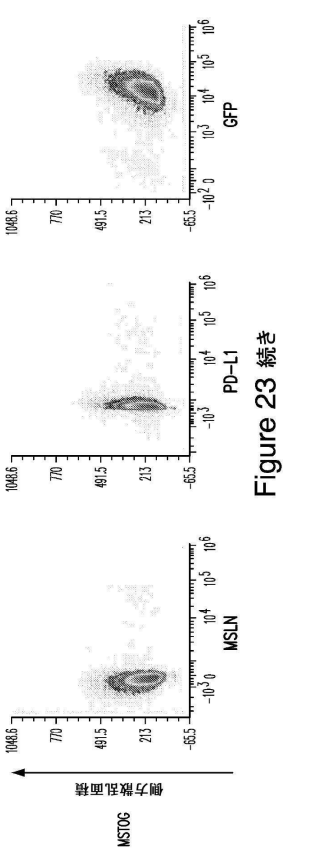


Figure 23 続き

【図２４】

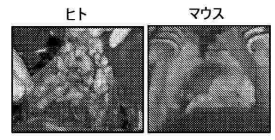
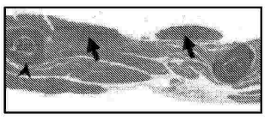


Figure 24A



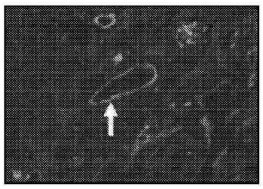


Figure 24B

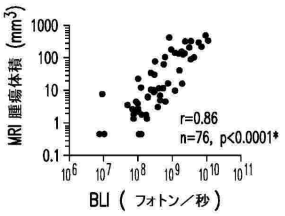


Figure 24C

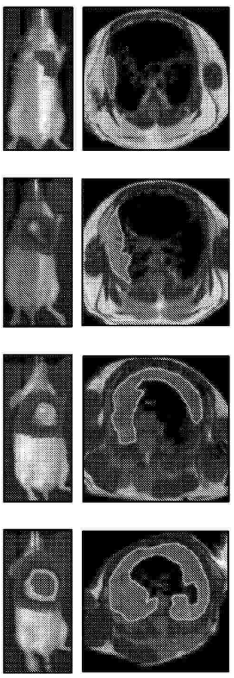
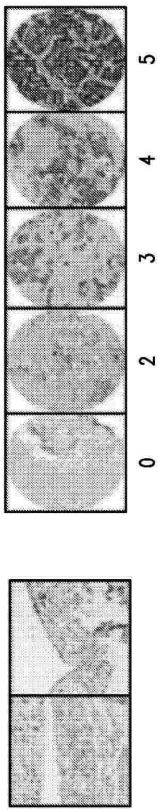


Figure 24D

【図２５Ａ】



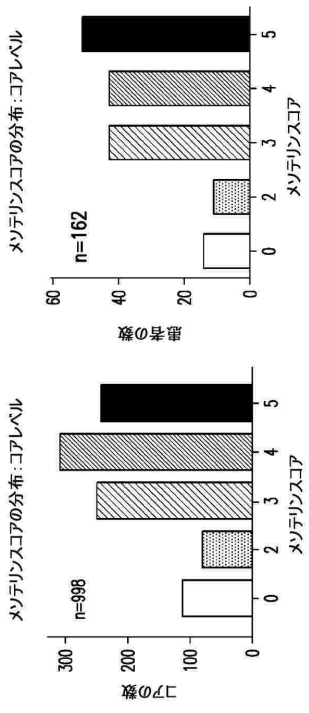
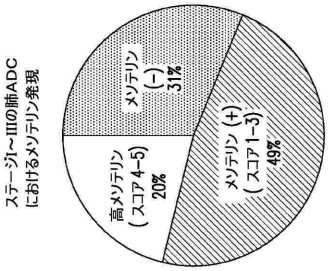


Figure 25A

【図２５Ｂ】



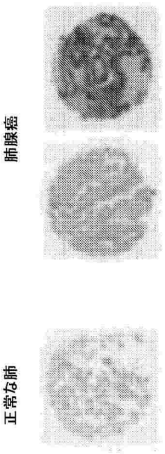


Figure 25B

【図２５Ｃ】

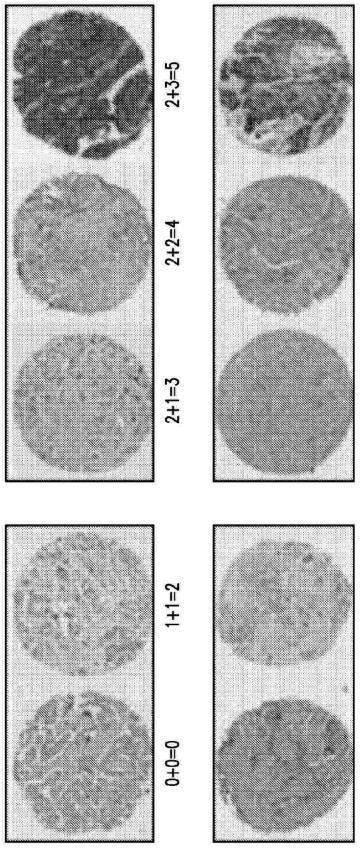


Figure 25C

【図２６－１】

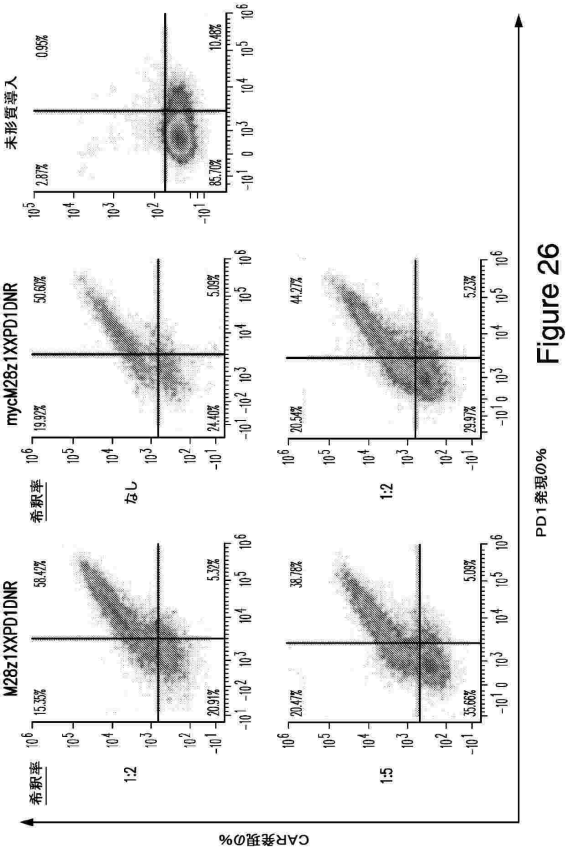


Figure 26

【図２６－２】

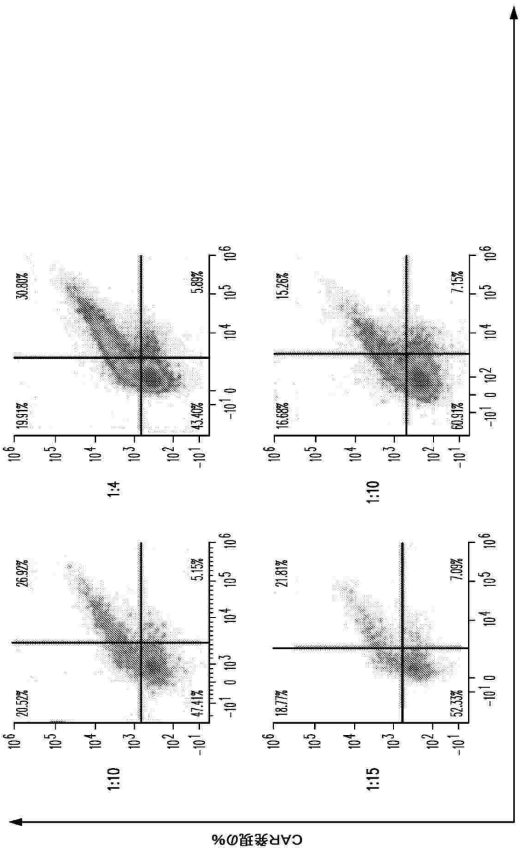


Figure 26 続き

【図２７】

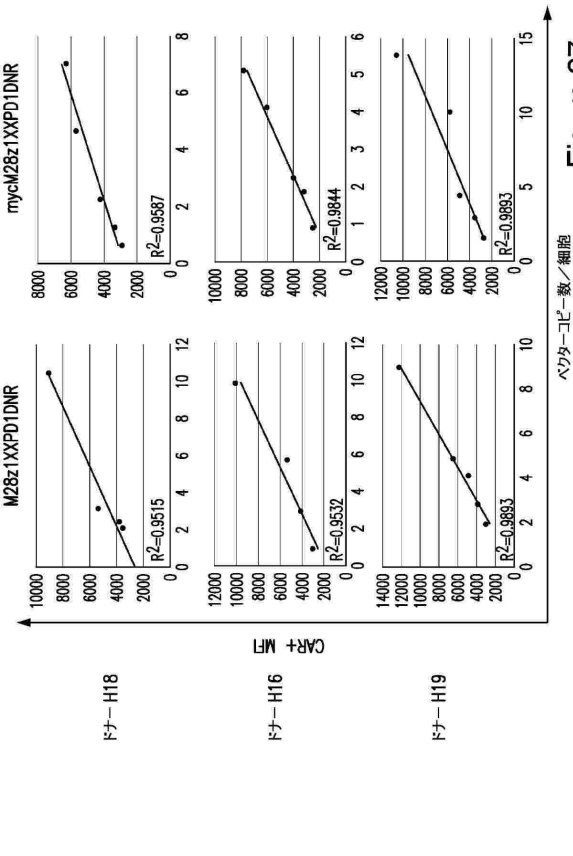


Figure 27

【図２８】

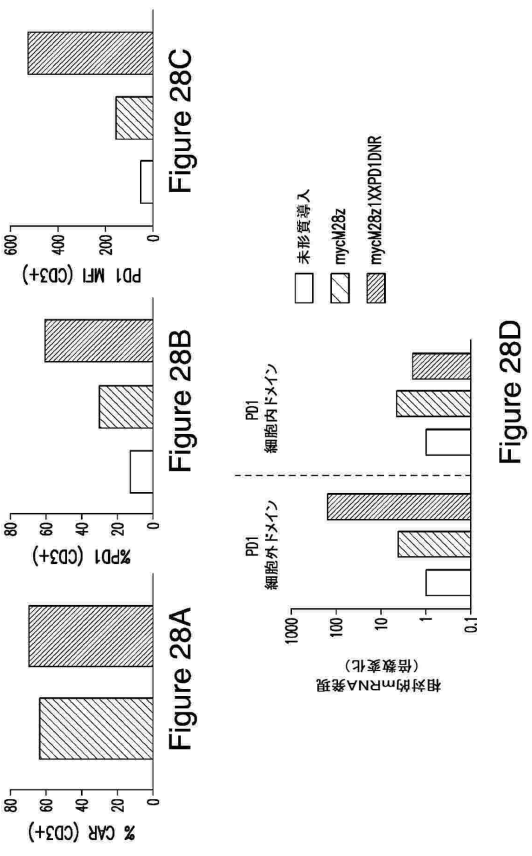


Figure 28A

Figure 28B

Figure 28C

Figure 28D

【図２９－１】

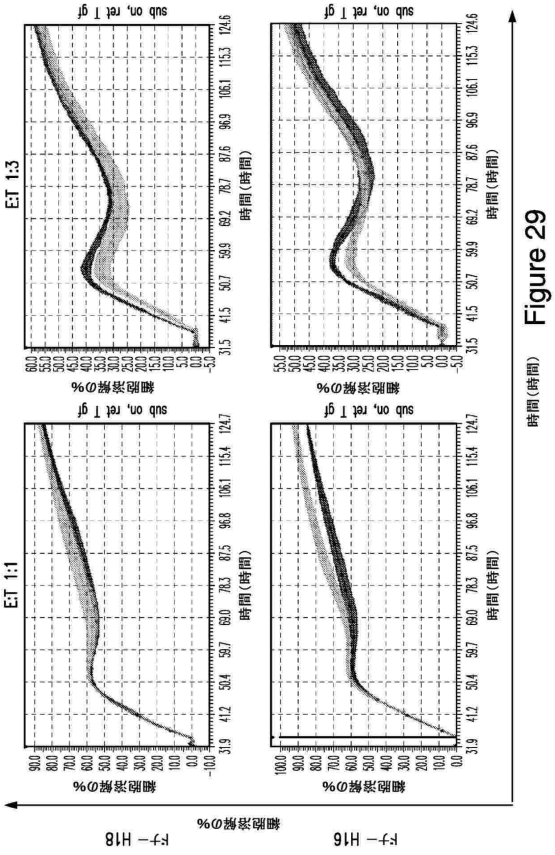


Figure 29

【図２９－２】

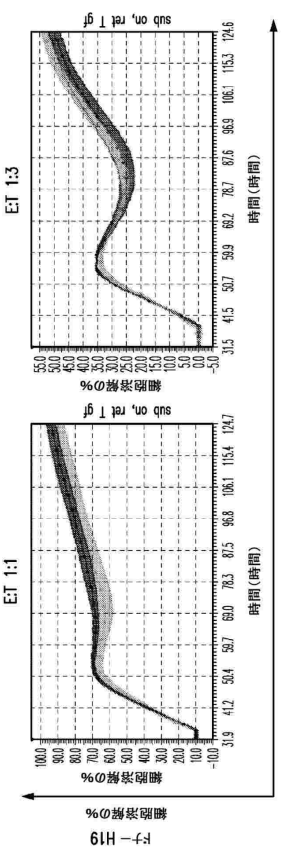


Figure 29 続き

【図３０】

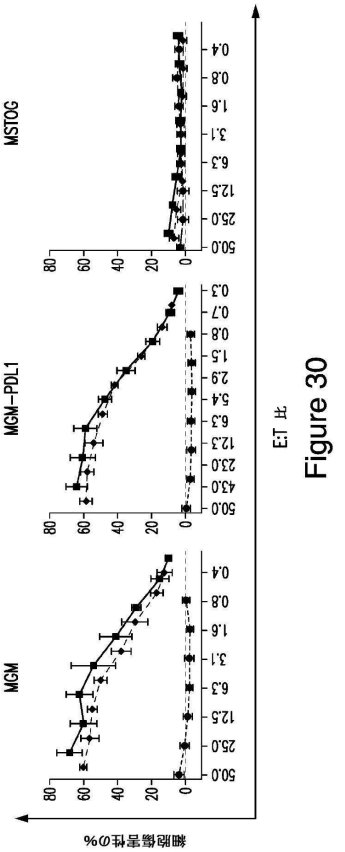


Figure 30

【図３１】

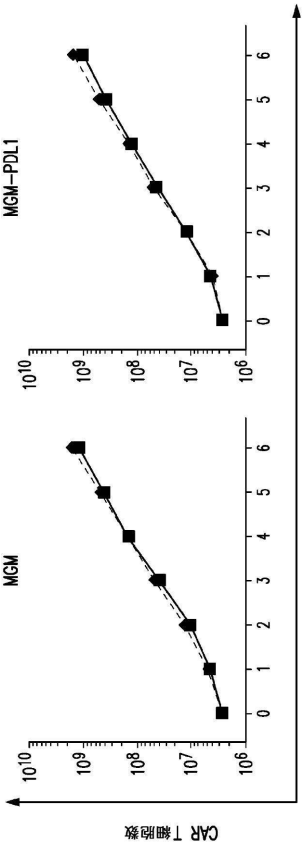


Figure 31

【図３２】

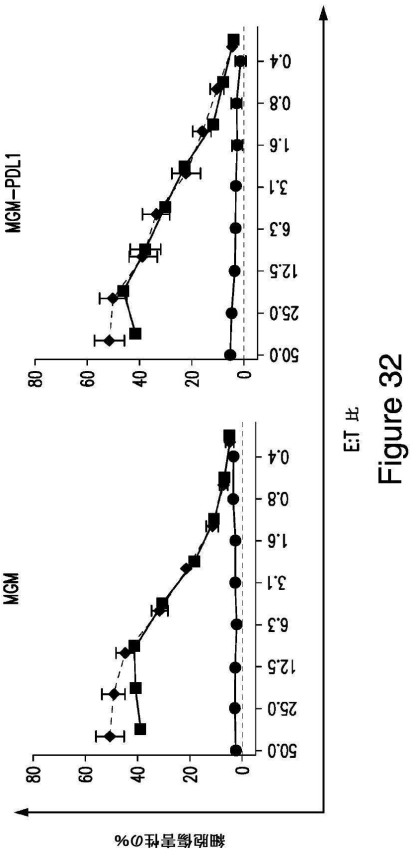


Figure 32

【図３３】

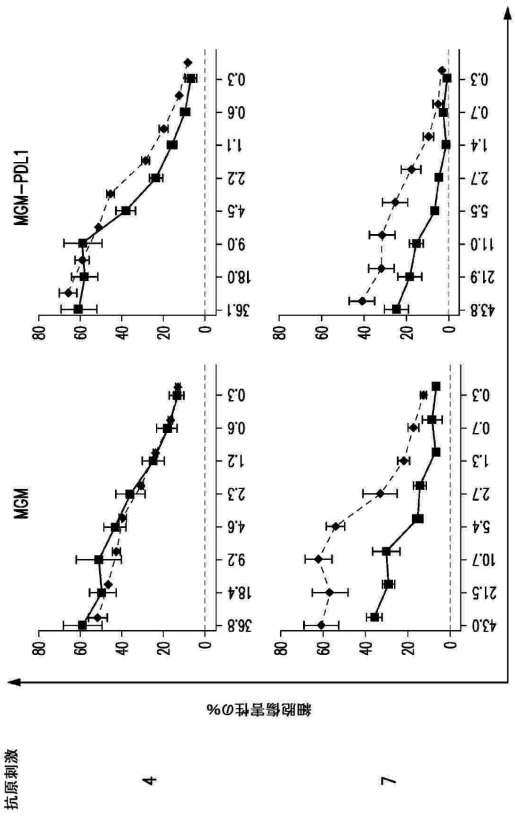


Figure 33

【図３４】

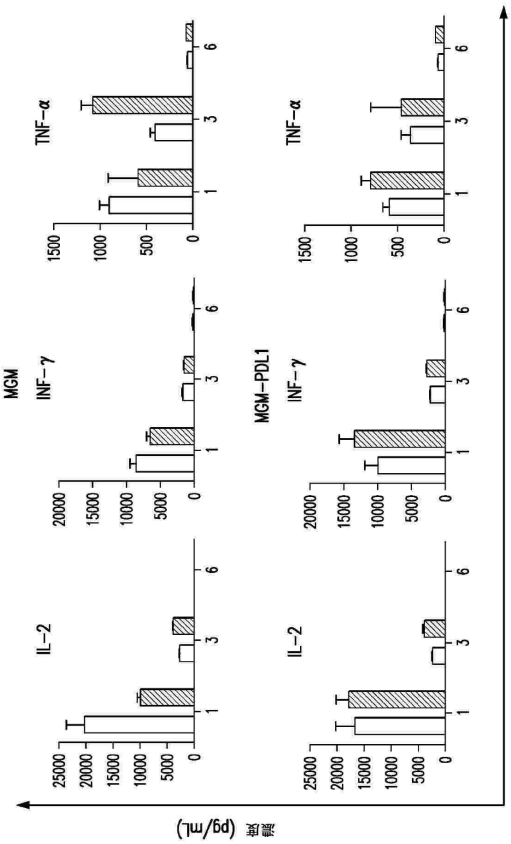


Figure 34

【図３５】

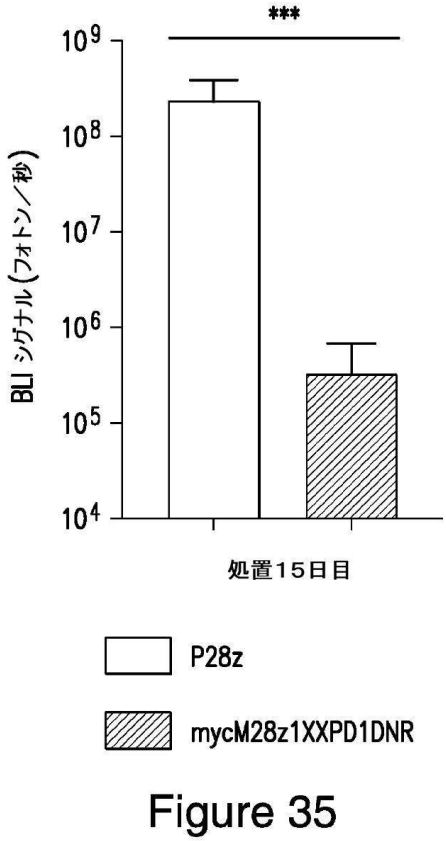


Figure 35

【図３６－１】

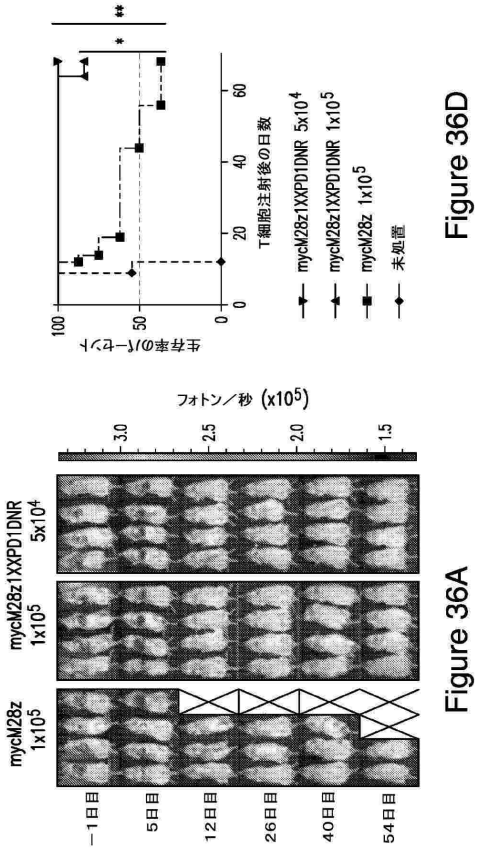


Figure 36A

Figure 36D

【図３６－２】

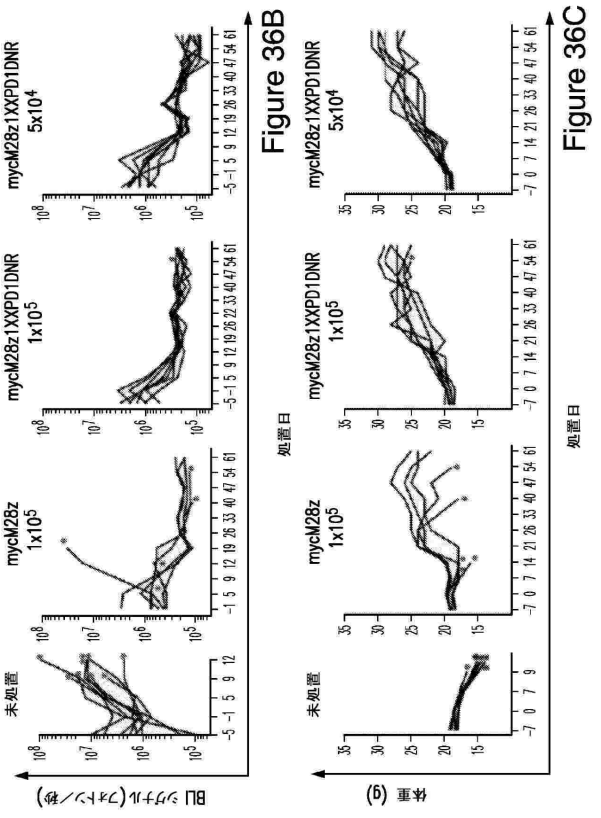


Figure 36B

Figure 36C

【図３７】

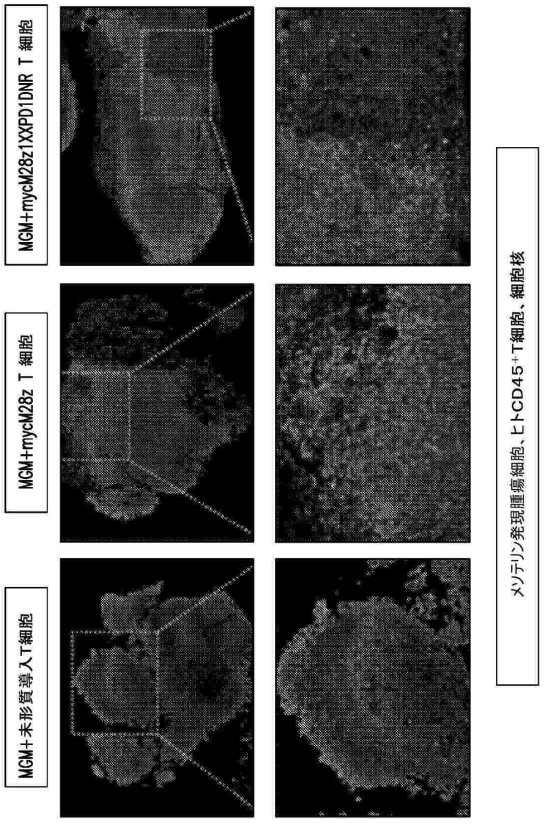


Figure 37

【図３８】

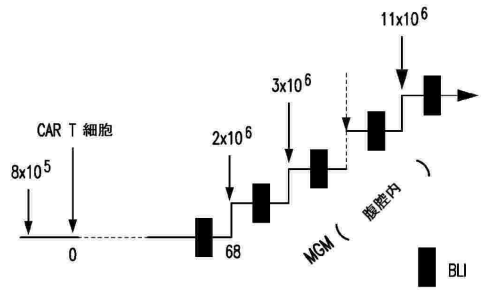


Figure 38A

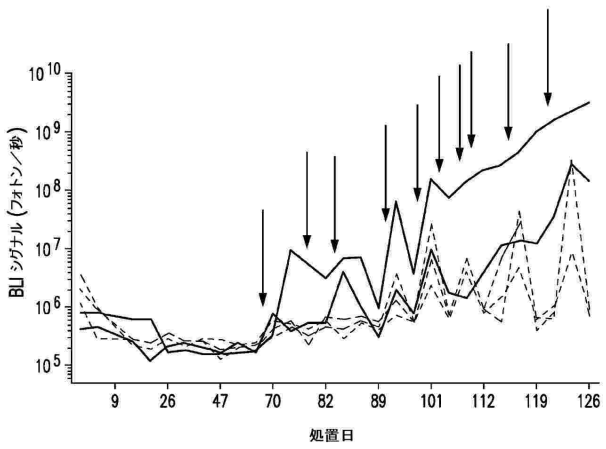


Figure 38B

【図３９－１】

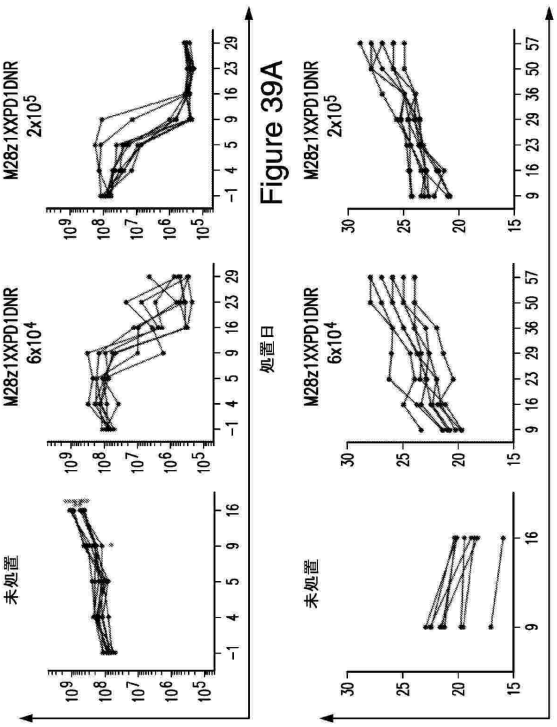


Figure 39A

Figure 39B

【図３９－２】

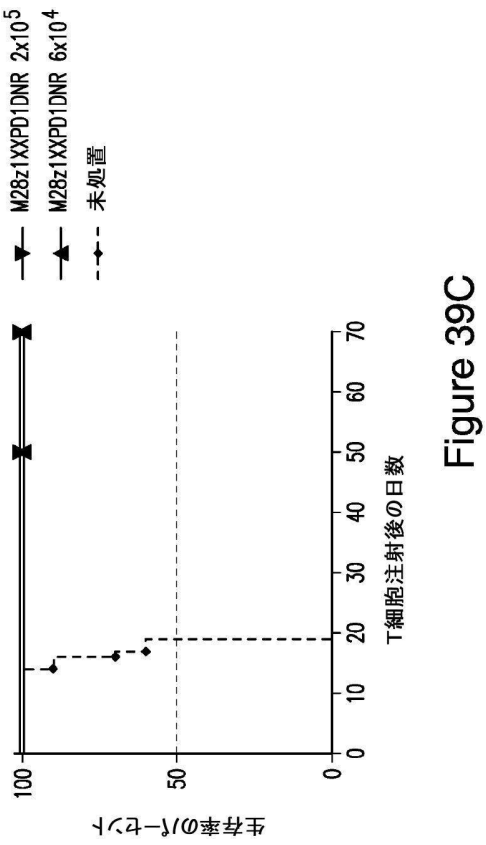


Figure 39C

【図４０】

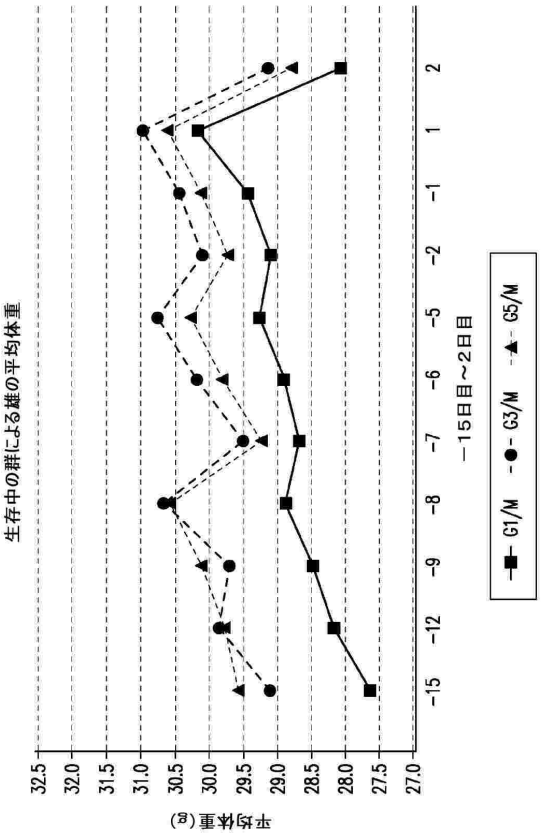


Figure 40

【図４１】

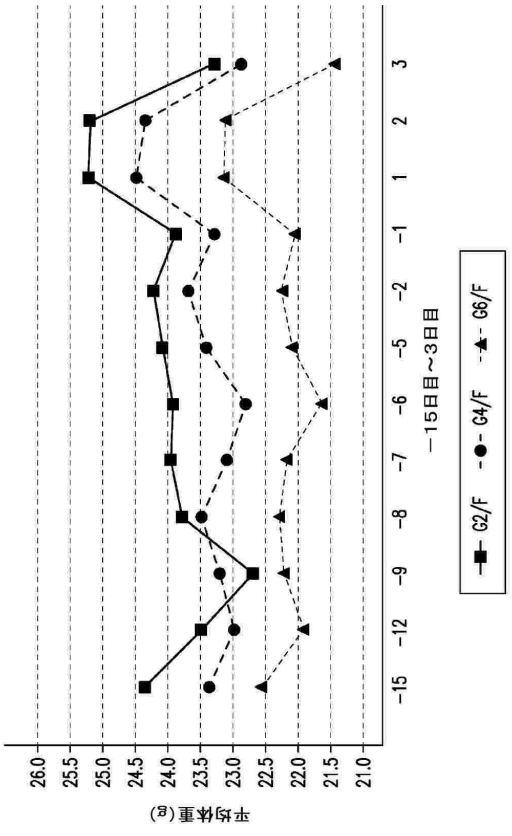


Figure 41

【図４２】

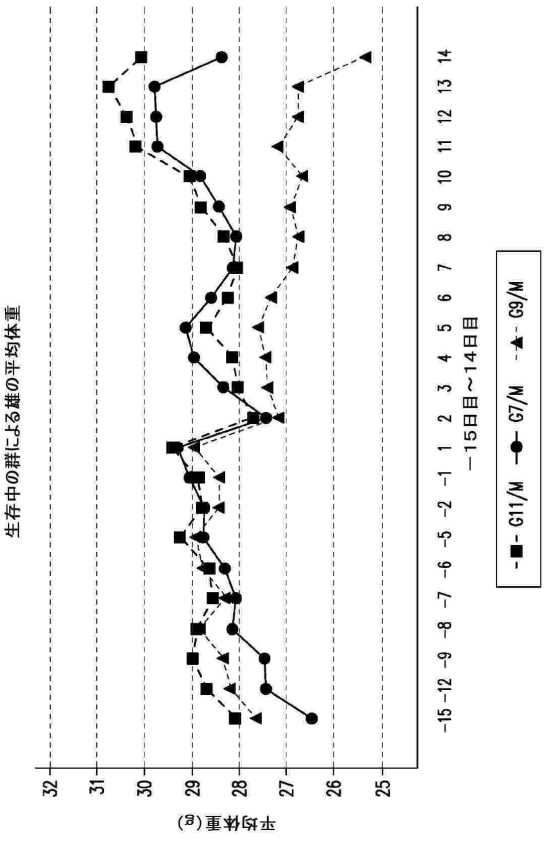


Figure 42

【図４３】

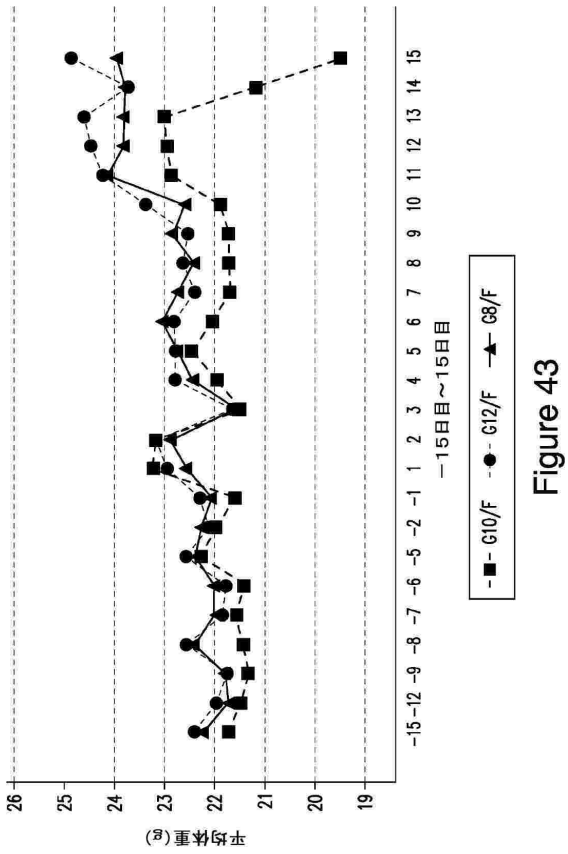


Figure 43

【図４４－１】

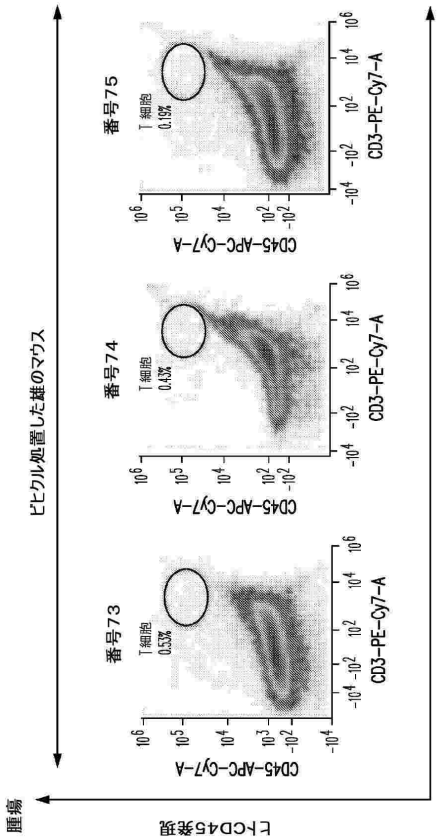


Figure 44

【図４４－２】

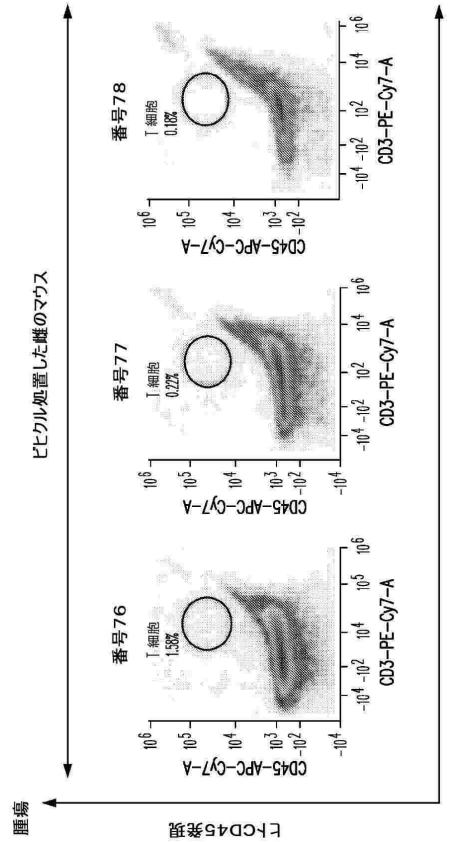


Figure 44 続き

【図４４－３】

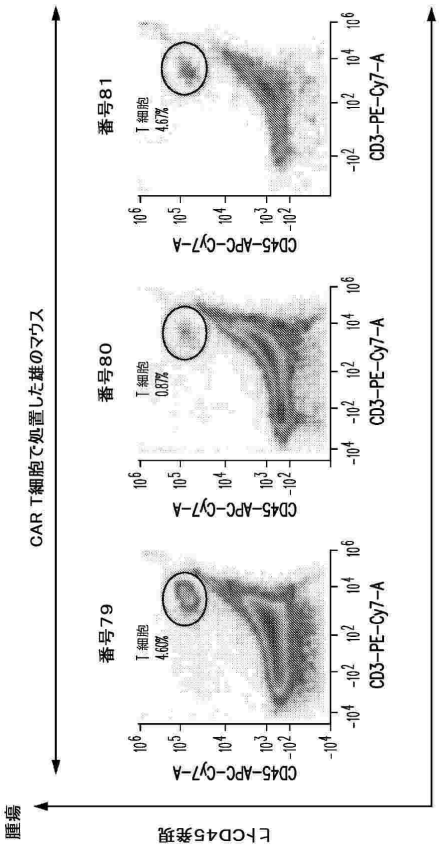


Figure 44 続き

【図４４－４】

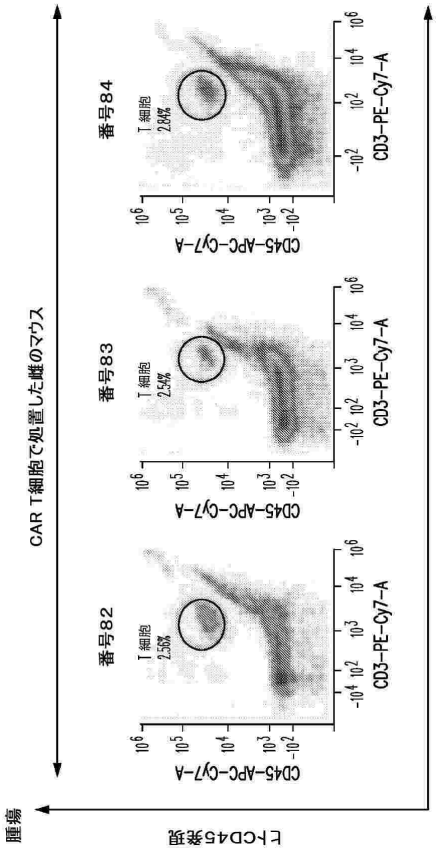


Figure 44 続き

【図４５－１】

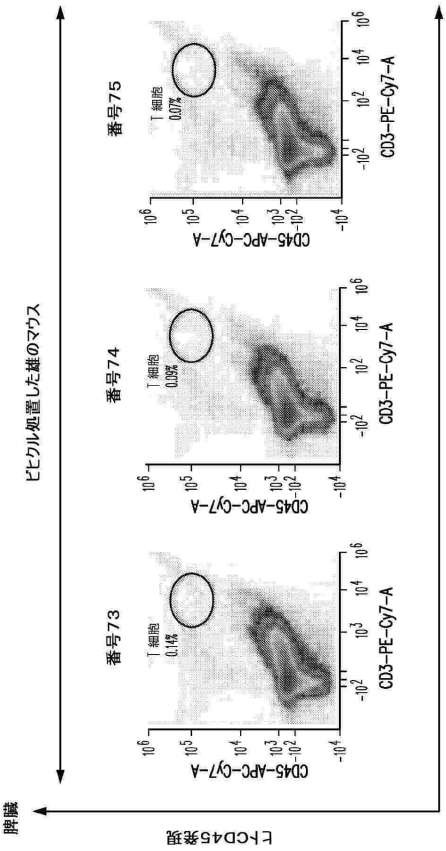


Figure 45

【図４５－２】

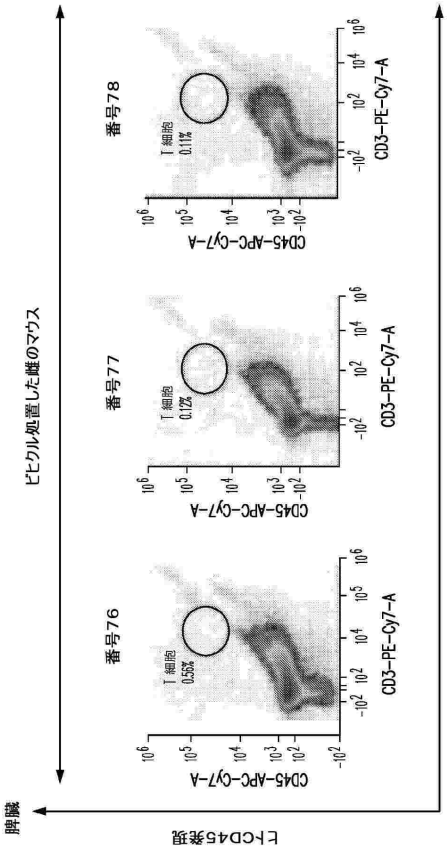


Figure 45 続き

【図４５－３】

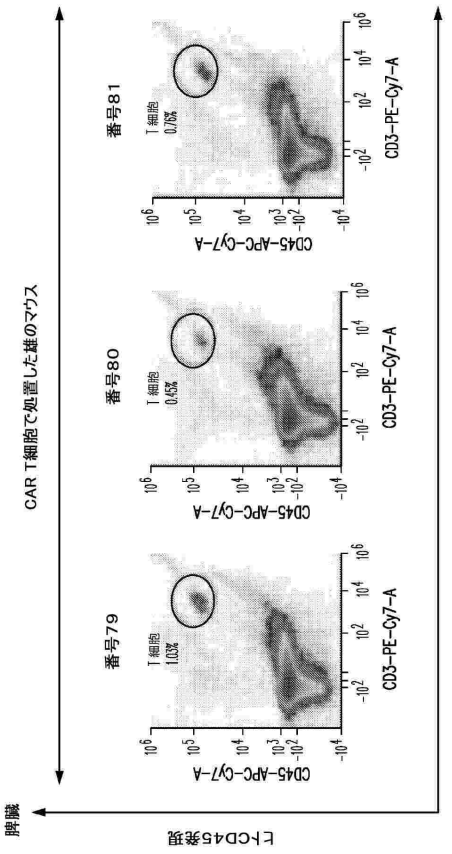


Figure 45 続き

【図４５－４】

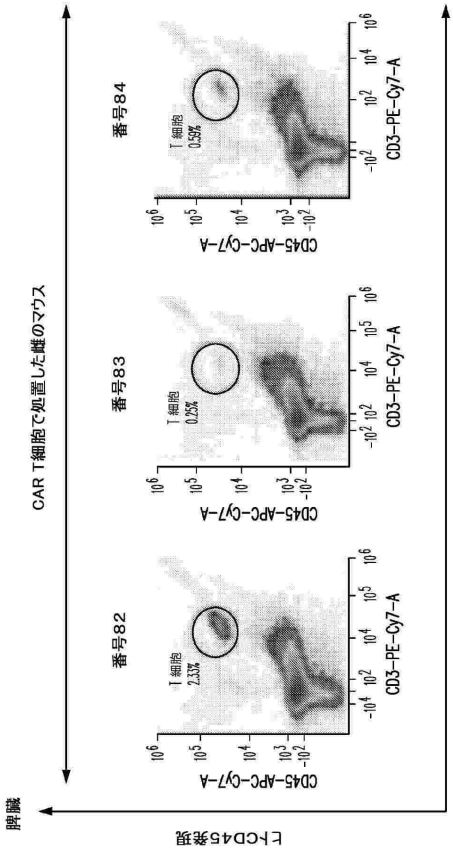


Figure 45 続き

【図４６】

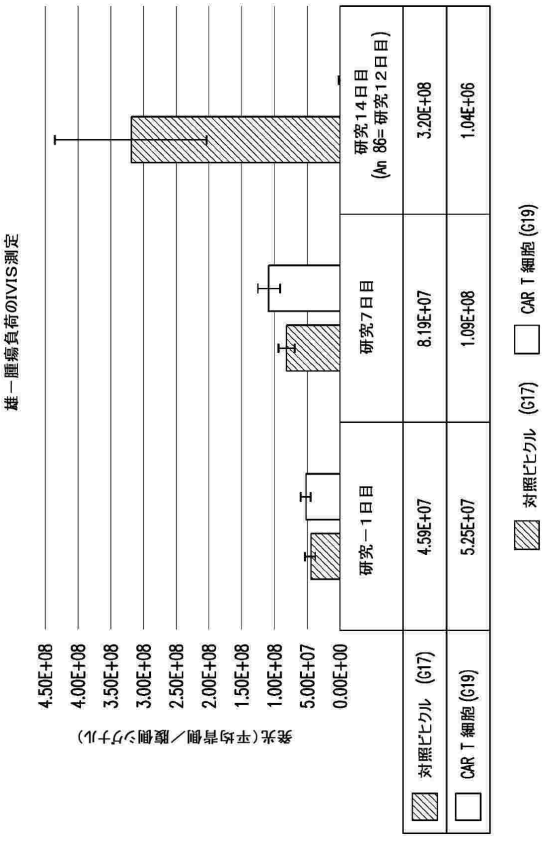


Figure 46

【図４７】

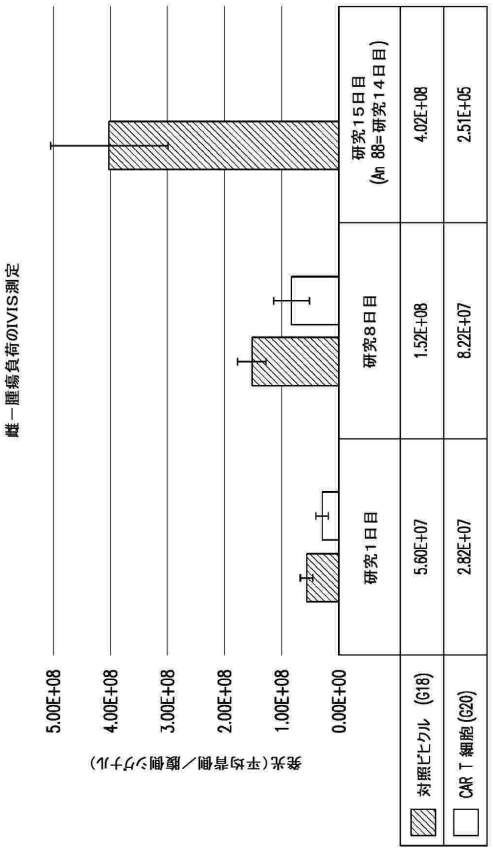


Figure 47

【配列表】
0007645197000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ	*40/11*	*(2025.01)*	Ａ６１Ｋ	40/11	
Ａ６１Ｋ	*40/31*	*(2025.01)*	Ａ６１Ｋ	40/31	
Ｃ１２Ｎ	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ
Ｃ１２Ｎ	*15/86*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/86	Ｚ
Ｃ１２Ｎ	*15/867*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ
Ｃ１２Ｎ	*15/63*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ
Ａ６１Ｋ	*31/711*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｐ	*37/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*1/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06	
			Ａ６１Ｐ	1/18	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者 サデレイン， マイケル
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００２４， ニューヨーク， ウエスト ８４ティーエイチ ストリート １５， アパートメント ２シー

審査官 團野 克也

(56)参考文献
国際公開第２０１８／１６５２２８（WO，Ａ１）
国際公開第２０１７／０４０９４５（WO，Ａ１）
特表２０１７－５１８０５３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１８／２３７０２２（WO，Ａ１）
国際公開第２０１８／０４４８６６（WO，Ａ１）
国際公開第２０１８／１３２５０６（WO，Ａ１）
Judith Feucht et al.，Nat ure Medicine，Vol. 25，pp. 82-88
Leonid Cherkassky et al.，The Journal of Clinical Investigation，2016年，Vol. 126, No. 8，pp. 3130-3144
J. King et al.，Journal of Thoracic Oncology，Vol. 13, No. 10S，p. S392, MA10.10

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
ＩＰＣ Ｃ１２Ｎ
ＤＢ名 ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＥＭＢＡＳＥ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ