

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7668261号
(P7668261)

(45)発行日 令和7年4月24日(2025.4.24)

(24)登録日 令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12
C 1 2 N 15/57 (2006.01)	C 1 2 N 15/57

請求項の数 34 (全70頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-506436(P2022-506436)	(73)特許権者	500213834
(86)(22)出願日	令和2年7月30日(2020.7.30)		メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター
(65)公表番号	特表2022-544075(P2022-544075 A)		アメリカ合衆国 1 0 0 6 5 ニューヨーク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1 2 7 5
(43)公表日	令和4年10月17日(2022.10.17)	(73)特許権者	399026731
(86)国際出願番号	PCT/US2020/044159		スローン - ケタリング・インスティテュート・フォー・キャンサー・リサーチ
(87)国際公開番号	WO2021/021989		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 6 5、ニューヨーク、ヨーク・アベニュー 1 2 7 5
(87)国際公開日	令和3年2月4日(2021.2.4)	(73)特許権者	522023761
審査請求日	令和5年7月6日(2023.7.6)		メモリアル ホスピタル フォー キャンサー アンド アライド ディージェイズ
(31)優先権主張番号	62/881,467		最終頁に続く
(32)優先日	令和1年8月1日(2019.8.1)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 改良された免疫療法のための細胞およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) キメラ抗原受容体 (C A R)、および

(b) S . p y o g e n e s の I g G 分解酵素 (I d e S)、S . e q u i s u b s p . z o o e p i d e m i c u s の I g G 分解酵素 (I d e Z)、および S . e q u i s u b s p . e q u i . の I g G 分解酵素 (I d e E) から選択される I g G 分解酵素を含む免疫応答性細胞であって、前記免疫応答性細胞が、 T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、 B 細胞、マクロファージ、単球、および樹状細胞からなる群から選択される、免疫応答性細胞。

【請求項 2】

前記 I g G 分解酵素が分泌される、または膜結合性である、請求項 1 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 3】

(c) 前記 I g G 分解酵素に付着した膜貫通ドメインをさらに含む、請求項 2 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 4】

前記膜貫通ドメインが、前記 I g G 分解酵素の C 末端に付着している、請求項 3 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 5】

前記 I g G 分解酵素に付着した前記膜貫通ドメインが、 C D 8 の膜貫通ドメインを含む

、請求項 3 または 4 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 6】

前記 C A R および / または前記 I g G 分解酵素が、ベクターから発現される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 7】

T 細胞である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 8】

前記 C A R が、抗原に結合する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 9】

前記抗原が、腫瘍抗原、病原体抗原、正常細胞抗原、H L A 抗原、および同種抗原から選択される、請求項 8 に記載の免疫応答性細胞。

10

【請求項 10】

前記抗原が、

- a) 腫瘍抗原である、
- b) 正常細胞抗原である、
- c) H L A 抗原である、または
- d) 同種抗原である、

請求項 8 または 9 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 11】

前記 C A R が、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む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

20

【請求項 12】

a) 前記 C A R の前記細胞外抗原結合ドメインが、単鎖可変断片 (s c F v) を含む、
 b) 前記膜貫通ドメインが、C D 8 ポリペプチドを含む、または
 c) 前記 C A R の前記細胞内シグナル伝達ドメインが、C D 3 ポリペプチドを含む、
 請求項 11 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 13】

前記 C A R の前記細胞内シグナル伝達ドメインが、少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、請求項 11 または 12 に記載の免疫応答性細胞。

30

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメインが、C D 2 8 ポリペプチド、4 - 1 B B ポリペプチド、またはこれらの組合せを含む、請求項 13 に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 15】

前記 I g G 分解酵素が、(a) I g G を切断し、それによって、I g G 抗体が前記細胞を死滅させるのを防ぐ、および / または (b) I g G を切断し、それによって、前記 I g G の残りの断片の前記細胞への結合を保持させ、前記細胞を 1 つまたは複数の細胞傷害性抗体から保護する、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞。

【請求項 16】

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の免疫応答性細胞を含む医薬組成物。

40

【請求項 17】

薬学的に許容される賦形剤を含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

対象における腫瘍負荷を低減するための、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の細胞を含む組成物、または請求項 16 もしくは 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記対象において、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍サイズを低下させる、および / または前記腫瘍を根絶する、請求項 18 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 20】

新生物、病原体感染、および / または自己免疫疾患を処置および / または防止するため

50

の、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の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 21】

新生物、病原体感染、および/または自己免疫疾患を有する対象の生存時間を延長するための、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の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 22】

前記腫瘍または新生物が、急性骨髄性白血病 (AML)、リンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、慢性骨髄性白血病 (CML)、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、乳がん、卵巣がん、中皮腫、神経膠芽腫、結腸直腸がん、および膵臓がんから選択される、請求項 18 から 21 のいずれか一項に記載の組成物または医薬組成物。

10

【請求項 23】

前記自己免疫疾患が、関節リウマチ、重症筋無力症、全身性ループス、グレーブス病、橋本甲状腺炎、全身性硬化症、胆汁性肝硬変、セリアック病、軸索型ニューロパチー、炎症性筋障害、小脳変性、1型糖尿病、および多発性筋炎から選択される、請求項 20 または 21 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 24】

臓器移植を受ける対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止するための、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の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。

20

【請求項 25】

前記移植が、同種異系移植 (同種移植) である、請求項 24 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 26】

前記対象が、前記臓器移植前に、前記細胞または組成物を投与される、請求項 24 または 25 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 27】

細胞療法を受ける対象において使用される細胞または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止するための、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の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。

30

【請求項 28】

前記細胞および/または組織が、前記細胞療法に含まれる、請求項 27 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 29】

前記細胞および/または組織が、自家または同種異系である、請求項 27 または 28 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 30】

a) 新生物、病原体感染、および/または自己免疫疾患を処置および/または防止する際に使用するための、

40

b) 新生物、病原体感染、および/または自己免疫疾患を有する対象の生存時間を延長する際に使用するための、

c) 臓器移植を受ける対象における細胞および組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する際に使用するための、または

d) 細胞療法を受ける対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する際に使用するための、
請求項 16 または 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

前記対象において、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍サイズを低下させる、および/または前記腫瘍を根絶する、請求項 30 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 3 2】

前記腫瘍または新生物が、急性骨髄性白血病（AML）、リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、乳がん、卵巣がん、中皮腫、神経膠芽腫、結腸直腸がん、および膵臓がんから選択される、請求項 3 0 または 3 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 3】

前記自己免疫疾患が、関節リウマチ、重症筋無力症、全身性ループス、グレーブス病、橋本甲状腺炎、全身性硬化症、胆汁性肝硬変、セリアック病、軸索型ニューロパチー、炎症性筋障害、小脳変性、1型糖尿病、および多発性筋炎から選択される、請求項 3 0 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3 4】

前記移植が、同種異系移植である、請求項 3 0 に記載の医薬組成物。

【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、その内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2019年8月1日に出願された米国仮特許出願番号第62/881,467号に対する優先権を主張する。

【0002】

20

助成金情報

本発明は、国立衛生研究所（National Institutes of Health）の国立がん研究所（National Cancer Institute）から助成金番号P30 CA008747により政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列表

本出願は、EFS-WebによってASCII形式で提出され、これにより参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。2020年7月28日に作成されたASCIIコピーは、「072734__1109__ST25.txt」という名称であり、52,647バイトのサイズである。

30

【0004】

1. 緒言

本開示の主題は、改善された免疫療法のための細胞および組成物ならびにこのような細胞および組成物を使用する方法を提供する。本開示の主題は、リガンド認識受容体（例えば、抗原認識受容体、例えば、キメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR））およびIgG分解酵素またはその断片を含む細胞に関する。IgG分解酵素は、IgGを迅速に切断する。IgG分解酵素は、宿主体液性応答に対する生体分子シールドとしての役割を果たす。細胞は、宿主体液性応答（例えば、抗体に駆動される宿主体液性応答）に対する耐性を増加させ、これにより、細胞の持続性の延長が可能になり、細胞活性の増強がもたらされる。

40

【背景技術】

【0005】

2. 発明の背景

合成免疫学および合成生物学では、免疫細胞を利用して腫瘍細胞を死滅させるか、または他の重要な疾患を処置する。合成免疫学および生物学において急速に成長した領域は、養子細胞移入、幹細胞移植、臓器移植、CRISPR遺伝子編集、遺伝子治療、およびCAR-T細胞療法の使用におけるものである。変更されたか、または操作された細胞が対象中に導入されるいずれの状況においても、宿主（対象）は、その細胞または組織に対する免疫応答を開始させる可能性があり、これは、その細胞または組織が外来のものである

50

か、または宿主内には通常見られない外来の遺伝子およびタンパク質を含有するためである。この免疫認識の結果は、治療効果の中和、組織もしくは細胞の拒絶、および/または治療意図の失敗などであり得る。したがって、宿主体液性応答に対する耐性の増加した操作された細胞が必要である。

【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)リガンド認識受容体、および(b)IgG分解酵素またはその断片を含む細胞を提供する。ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は分泌される。ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は膜結合性である。ある特定の実施形態では、細胞は、(c)IgG分解酵素に付着した膜貫通ドメインをさらに含む。膜貫通ドメインは、IgG分解酵素のC末端に付着していてもよい。ある特定の実施形態では、IgG分解酵素に付着した膜貫通ドメインは、CD8ポリペプチドを含む。

10

【0007】

ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、*S. pyogenes*のIgG分解酵素(IdeS)、*S. equi subsp. zooepidemicus*のIgG分解酵素(IdeZ)、*S. equi subsp. equi*のIgG分解酵素(IdeE)、*Streptococcus pyogenes*由来のエンドグリコシダーゼ(EndoS)、および*Streptococcus pyogenes*由来の連鎖球菌システインプロテイナーゼ(SpeB)から選択される。

20

【0008】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、外因性または内因性である。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、組換え発現される。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、ベクターから発現される。ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、ベクターから発現される。

【0009】

ある特定の実施形態では、細胞は、応答性細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、応答性細胞、例えば、免疫応答性細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、活性化可能な細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、B細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、幹細胞、正常組織細胞(例えば、腎臓、肝臓、肺、骨髄、または膵臓に由来する)およびそれらの組合せから選択される。ある特定の実施形態では、細胞は、T細胞である。

30

【0010】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、抗原に結合する。抗原は、腫瘍抗原、病原体抗原、正常細胞抗原、HLA抗原または同種抗原であってもよい。ある特定の実施形態では、抗原は、正常細胞抗原である。ある特定の実施形態では、同種抗原は、マイナー組織適合性同種抗原である。

【0011】

ある特定の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、CD19である。

40

【0012】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、T細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)である。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、CARである。ある特定の実施形態では、CARは、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、単鎖可変断片(scFv)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、CD3ポリペプチドを含む。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、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインをさ

50

らに含む。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激ドメインは、CD28ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、またはこれらの組合せを含む。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激ドメインは、4-1BB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つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0013】

ある特定の実施形態では、IgG分解酵素はIgGを切断し、それによって、IgG抗体が細胞を死滅させるのを防ぐ。ある特定の実施形態では、IgG分解酵素はIgGを切断し、それによって、IgGの残りの断片の細胞への結合を保持させ、細胞を1つまたは複数の細胞傷害性抗体から保護する。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の細胞傷害性抗体はIgGと同じ部位に結合し、細胞を死滅させる。したがって、このプロセスは、保護シールドを生じる。

10

【0014】

本開示の主題は、本明細書に記載の細胞を含む組成物も提供する。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、組成物は、新生物を処置するためのものである。

【0015】

さらに、本開示の主題は、本明細書に開示される細胞を生成するための方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、細胞内に、(a)リガンド認識受容体をコードする第1のポリヌクレオチド、および(b)IgG分解酵素またはその断片をコードする第2のポリヌクレオチドを導入するステップを含む。ある特定の実施形態では、(a)および/または(b)は、遺伝的に細胞に導入される。ある特定の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、プロモーターエレメントに必要に応じて作動可能に連結している。ある特定の実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、プロモーターエレメントに必要に応じて作動可能に連結している。ある特定の実施形態では、第1および第2のポリヌクレオチドの一方または両方は、ベクター中に含まれる。ある特定の実施形態では、第1および第2のポリヌクレオチドは、2つの異なるベクター中に含まれる。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、ベクターは、レンチ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、mRNA分子内にコードされる。

20

30

【0016】

本開示の主題は、核酸組成物をさらに提供する。ある特定の実施形態では、核酸組成物は、(a)リガンド認識受容体をコードする第1のポリヌクレオチドおよび(b)IgG分解酵素またはその断片をコードする第2のポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、プロモーターエレメントに作動可能に連結している。ある特定の実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、プロモーターエレメントに作動可能に連結している。ある特定の実施形態では、第1および第2のポリヌクレオチドの一方または両方は、ベクター中に含まれる。ある特定の実施形態では、第1および第2のポリヌクレオチドは、2つの異なるベクター中に含まれる。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、ベクターは、レンチ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、mRNA分子内にコードされる。

40

【0017】

また、本明細書に記載の核酸組成物を含むベクターも提供される。

【0018】

本開示の主題は、本明細書に記載の細胞、本明細書に記載の組成物、本明細書に記載の核酸組成物、または本明細書に記載のベクターを含むキットをさらに提供する。ある特定の実施形態では、キットは、新生物、病原体感染、および/または自己免疫障害を処置および/または防止するための書面の指示をさらに含む。

【0019】

50

本開示の主題は、様々な方法も提供する。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、本方法は、対象に、本明細書に記載の細胞、本明細書に記載の組成物、本明細書に記載の核酸組成物、または本明細書に記載のベクターの有効量を投与するステップを含む。ある特定の実施形態では、本方法は、対象において、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍サイズを低下させる、および/または腫瘍を根絶する。

【0020】

本開示の主題は、新生物、病原体感染、および/または自己免疫障害を処置および/または防止する方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に記載の細胞、本明細書に記載の組成物、本明細書に記載の核酸組成物、または本明細書に記載のベクターの有効量を投与するステップを含む。

10

【0021】

本開示の主題は、新生物、病原体感染、および/または自己免疫障害を有する対象の生存時間を延長する方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に記載の細胞、本明細書に記載の組成物、本明細書に記載の核酸組成物、または本明細書に記載のベクターの有効量を投与するステップを含む。

【0022】

ある特定の実施形態では、新生物は、急性骨髄性白血病（AML）、リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、乳がん、卵巣がん、中皮腫、神経膠芽腫、結腸直腸がん、および膵臓がんから選択される。

20

【0023】

本開示の主題は、臓器移植を受ける対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する方法を提供する。ある特定の実施形態では、移植は、同種異系移植（同種移植）である。ある特定の実施形態では、対象は、臓器移植前に、細胞、組成物、または核酸組成物を投与される。

【0024】

本開示の主題は、細胞療法を受ける対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、細胞および/または組織は、自家または同種異系である。ある特定の実施形態では、細胞および/または組織は、細胞療法において使用される。

30

【0025】

ある特定の実施形態では、本方法は、本明細書に記載の細胞、本明細書に記載の組成物、本明細書に記載の核酸組成物、または本明細書に記載のベクターの有効量を投与するステップを含む。

4. 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1Aおよび1Bは、本開示の主題のある特定の実施形態に従うベクターおよび細胞を示す。図1Aは、本開示の主題のある特定の実施形態に従うベクターおよび細胞を示し、例えば、IgG分解酵素は細胞上に存在する。図1Bは、本開示の主題のある特定の実施形態に従うベクターおよび細胞を示し、例えば、IgG分解酵素は細胞から分泌される。

40

【0027】

【図2】図2は、哺乳類細胞におけるIdeS発現を示す。HEK293t細胞に、IdeSの膜結合（IdeS-tm）および分泌（IdeS-sec）バージョンを一過的にトランスフェクトした。細胞溶解物および上清液は、抗HA抗体を使用してウエスタンイムノプロットによって分析し、IdeSタンパク質をそれぞれ、細胞または分泌液中で検出した。形質導入されていないHEK293t細胞は、IdeSタンパク質を示さなかった。（各ゲルの左のレーンは分子量マーカである）。

50

【0028】

【図3】図3A～3Cは、経時的に細胞で発現されたI d e S切断活性を示す。H E K 293 t細胞にI d e S - t mを一過的にトランスフェクトした。図3Aは、トランスフェクションの48時間後を示し、ここで、I g Gを24ウェルプレートのウェルに添加し、次いで、様々な時点で取り除き、L a e m m l i緩衝液を使用してクエンチした。試料をS D S - P A G Eによって分析した。図3Bは、クマシーで染色したゲルを示す。切断されたI gは5分以内に出現し、経時的に増加した。図3Cは、抗ヒトF c特異的抗体によるプロットを示す。F c断片としての切断されたI gは5分以内に出現し、経時的に増加した。

【0029】

【図4】図4Aおよび4Bは、I d e Sによる切断を示す。E L I S Aベースのアッセイを使用して、I d e SによるI g Gの切断の程度を分析した。図4Aは、組換えI d e Sを使用するアッセイの標準曲線による検証を示す。図4Bは、様々な時点での、ウエスタンブロットによるH E K 293 t細胞におけるI d e Sの発現およびE L I S Aによって評価した切断活性の確認を示す。

10

【0030】

【図5】図5A～5Bは、細胞から分泌されたI d e Sが、隣接する細胞に結合した抗体を切断することができることを示す。R a j i細胞をリツキシマブと共に30分間インキュベートした。次いで、R a j i細胞を、19BBz構築物単独、I d e S - t m 19BBz、またはI d e S - s e c 19BBzを発現するH E K 293 tと共に一晩共培養した。切断の程度を、標識した抗F c二次a bを使用して評価し、フローサイトメトリーによって測定した。図5Aは、R a j i細胞の抗F c蛍光の程度を示すヒストグラムを表す。図5Bは、各ヒストグラムに関する平均蛍光強度(M F I)に関する棒グラフを示す。

20

【0031】

【図6】図6は、本開示の主題の細胞による腫瘍細胞の殺滅を示す。形質導入されていないT細胞、19BBz C A Rおよび膜結合I d e Sを含むT細胞、19BBz C A Rを含み、かつI d e Sを分泌するT細胞、ならびに19BBz C A R T細胞を、ホタルルシフェラーゼを発現するR a j i細胞と共に18時間インキュベートした。R a j i細胞の細胞生存率を、ルシフェリンを添加し、バイオルミネセンスを測定することによって評価した。I d e SでシールドしたC A R T細胞は、シールドされていないC A R T細胞と同程度に機能的に活性であった。

30

【0032】

【図7】図7は、本開示の主題の細胞が補体依存性細胞傷害(C D C)に対して保護されたことを示す。形質導入されていないT細胞、19BBz C A Rおよび膜結合I d e Sを含むT細胞、19BBz C A Rを含み、かつI d e Sを分泌するT細胞、ならびに19BBz C A R T細胞を、様々な濃度のウサギ抗胸腺細胞グロブリン(A T G)で処置し、その後、ウサギ血清を添加し、1時間インキュベートした。細胞生存率をC e l l T i t e r G l oによって測定した。19BBz C A Rおよび膜結合I d e Sを含むT細胞ならびに19BBz C A Rを含み、かつI d e Sを分泌するT細胞は、I g GのF c断片を切断して除去し、よって、C D Cを回避し、生存したままであった。

40

【0033】

【図8】図8は、本開示の主題の細胞の例示的な作用機序を示す。I g G抗体は細胞表面抗原および受容体に結合し、C D C、A D C Cおよびオプソニン作用によって細胞死をもたらす。本開示の主題の細胞は、ヒンジ領域の下でI g Gを切断し、F c断片を放出する酵素であるI d e Sを発現する。本開示の主題の細胞は、F (a b ')₂断片で被覆されたままであり、さらなる抗体が結合するのを妨げる。

【0034】

【図9】図9は、I d e Sを発現するC A R T細胞の活性を示す。I d e Sを発現するC A R T細胞は、I g G F cを切断し、F (a b ')₂シールドを維持した。C A R T

50

細胞を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗胸腺細胞グロブリン (ATG) で処置し、一晚インキュベートした。細胞を洗浄し、抗Fc (上) または抗Fab (下) 標識抗体のいずれかで分析した。蛍光強度の中央値を右側の棒グラフにプロットした。

【0035】

【図10】図10は、本開示の細胞が抗体依存性細胞傷害 (ADCC) に対して保護されたことを示す。IdeS-tm 19BBz T細胞、IdeS-sec 19BBz T細胞、およびIdeSを有さない19BBz T細胞を様々な用量の抗胸腺細胞グロブリン (ATG) で処置し、次に、ヒトPBMCで処置した。IdeS-tm 19BBz T細胞およびIdeS-sec 19BBz T細胞は両方とも、IdeSを有さない19BBz T細胞と比較して、溶解から保護された。

10

【0036】

【図11】図11A~11Cは、本開示の細胞が、腎臓移植患者由来の血清中IgGを切断することができ (can cleaved)、CDCから保護したことを示す。図11Aは、拒絶を引き起こす抗HLA抗体を含有する腎臓移植患者 (患者2) に由来する血清が、A02+細胞に結合することが、フローサイトメトリーによって示されたことを示す。図11Bは、患者2由来の血清が、フローサイトメトリーによって検証されたように、A02+ IdeS-tm 19BBz T細胞およびIdeS-sec 19BBz T細胞によって切断されたことを示す。図11Cは、A02+ IdeS-tm 19BBz T細胞およびIdeS-sec 19BBz T細胞が、患者2の血清によって媒介される補体殺滅 (CDC) から保護されたことを示す。

20

【0037】

【図12】図12は、本開示の細胞が、*in vivo*でヒトポリクローナルIgGを切断したことを示す。ヒトT細胞に、IdeS CARを有さない19BBz (左から1~2番目のレーン) またはIdeS-tm 19BBz CAR (膜貫通形態) (左から3~5番目のレーン) およびIdeS-sec 19BBz (分泌形態) (左から6~8番目のレーン) を形質導入した。CAR T細胞を、NSGマウスに*i.p.*注射し、24時間後に、ヒトポリクローナルIgGも*i.p.*注射した。IgGの切断は、PBSを使用して*i.p.*洗浄を実施し、磁気プロテインGビーズを使用して試料を精製し、抗ヒトFc特異的HRP二次抗体を使用してウエスタンブロットによって分析することによって評価した。未切断の重鎖は、55kDa付近で観察することができ (9番目のレーン)、一方、切断されたFc断片は、25kDa付近に存在する (矢印)。

30

【発明を実施するための形態】

【0038】

5. 発明の詳細な説明

例として与えられるが、本開示の主題を記載された特定の実施形態に限定することを意図するものではない、以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて理解することができる。

【0039】

本開示の主題は、リガンド認識受容体 (例えば、TCRまたはCAR) およびIgG分解酵素またはその断片を含む遺伝子改変された免疫応答性細胞 (例えば、T細胞またはNK細胞) を含む細胞、ならびにこのような細胞を含む組成物を提供する。本開示の主題は、このような細胞を生成する方法、ならびにこのような細胞およびそれらを含む組成物 (compositions comprising thereof) を使用する方法も提供する。本開示の主題は、対象における腫瘍負荷を低減するための、新生物、病原体感染、および/もしくは自己免疫障害を有する対象の生存時間を延長するための、新生物もしくは他の疾患/障害を処置および/もしくは防止するための、自己免疫疾患を処置および/もしくは防止するための、ならびに/または対象において細胞療法に使用される細胞および/もしくは組織の抗体媒介性拒絶を低減および/もしくは防止するための、このような細胞および組成物の使用も提供し、例えば、対象は、臓器移植または前記細胞療法を受ける。

40

【0040】

50

本開示の主題は、少なくとも部分的に、I g G分解酵素、例えば、I d e Sが、I g Gを送達および切断することができ、それによって、細胞の宿主体液性応答に対する耐性を増加させることができ、これにより、細胞の持続性の延長および細胞のより強力な活性（例えば、抗腫瘍活性）がもたらされるという発見に基づく。細胞の持続性の延長は、このような細胞を含む療法、例えば、C A R - T細胞療法の費用対効果を改善することもできる。

【 0 0 4 1 】

本開示の主題の非限定的な実施形態は、本明細書および実施例によって記載される。

【 0 0 4 2 】

本開示の主題の明確化のためであって、限定としてではなく、詳細な説明は、以下の下位項目に分けられる：

- 5 . 1 . 定義；
- 5 . 2 . I g G分解酵素；
- 5 . 3 . 抗原リガンド認識受容体
- 5 . 4 . 細胞；
- 5 . 5 . 組成物およびベクター；
- 5 . 6 . ポリペプチドおよびアナログ；
- 5 . 7 . 投与；
- 5 . 8 . 製剤；
- 5 . 9 . 使用方法；ならびに
- 5 . 1 0 . キット。

5 . 1 . 定義

【 0 0 4 3 】

別段に規定されていなければ、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって通常理解される意味を有する。以下の参考文献は、当業者に、本開示の主題において使用される用語の多くの一般的定義を提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed., 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される場合、用語「約 (a b o u t) 」または「およそ (a p p r o x i m a t e l y) 」は、当業者によって決定される特定の値に対して許容される誤差範囲内を意味し、これは、その値が測定または決定される方法、すなわち、測定システムの限界に部分的に依存する。例えば、「約」は、当技術分野の実践ごとに、3または3を超える標準偏差内を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の最大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、この用語は、値の1桁の範囲内、例えば、5倍以内または2倍以内を意味し得る。

【 0 0 4 5 】

「免疫応答性細胞」とは、免疫応答において機能する細胞または前駆体、またはその子孫を意味する。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は、リンパ系列の細胞または骨髄系列の細胞である。リンパ系列の細胞の非限定的な例としては、T細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、樹状細胞、B細胞、およびリンパ系細胞に分化し得る幹細胞（例えば、人工多能性幹細胞）が挙げられる。骨髄系列の細胞の非限定的な例としては、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球、および骨髄細胞に分化し得る幹細胞が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

「免疫応答性細胞を活性化する」とは、免疫応答の開始をもたらす細胞におけるタンパク質発現のシグナル伝達または変化の誘導を意味する。例えば、CD3鎖が、リガンド結合および免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ITAM）に応答してクラスターを形成する場合、シグナル伝達カスケードが生じる。ある特定の実施形態では、内因性TCRまたは外因性CARが抗原に結合する場合、結合受容体付近に多くの分子（例えば、CD4またはCD8、CD3 / / / など）がクラスター形成することを含む免疫シナプスの形成が生じる。膜結合シグナル伝達分子のこのようなクラスター形成は、CD3鎖内に含有されるITAMモチーフがリン酸化されるのを可能にする。このリン酸化は、次に、NF- κ BおよびAP-1などの転写因子を最終的に活性化するT細胞活性化経路を開始する。これらの転写因子は、T細胞の全般的遺伝子発現を誘導し、T細胞媒介性免疫応答を開始するために、マスター調節因子T細胞タンパク質（master regulator T cell protein）の増殖および発現のためのIL-2産生を増加させる。

10

【 0 0 4 7 】

「免疫応答性細胞を刺激する」とは、強力かつ持続性の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、免疫細胞（例えば、T細胞）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介して同時に媒介される。複数の刺激シグナルを投与されることは、強力かつ長期T細胞媒介性免疫応答を開始するのに重要であり得る。T細胞は即座に阻害され、抗原に対して応答できなくなり得る。これらの共刺激シグナルの作用は様々であり得るが、これらは一般的に、遺伝子発現の増加をもたらす、完全かつ持続的な根絶のために抗原に強く応答する、長期生存性、増殖性、かつ抗アポトーシス性のT細胞を生成する。

20

【 0 0 4 8 】

用語「抗原認識受容体」は、本明細書で使用される場合、抗原への結合に応答して、免疫または免疫応答性細胞（例えば、T細胞）を活性化することが可能である受容体を指す。

【 0 0 4 9 】

抗原結合性断片は、F(ab')₂、およびFabを含む。無傷抗体のFc断片を欠くF(ab')₂、およびFab断片。

30

【 0 0 5 0 】

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に接続した少なくとも2つの重鎖（H）および2つの軽鎖（L）を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてV_Hと略される）および重鎖定常領域（C_H）から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C_H1、C_H2およびC_H3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてV_Lと略される）および軽鎖定常C_L領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C_Lから構成される。V_H領域とV_L領域は、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存的である領域が点在した、相補性決定領域（CDR）と称される超可変領域にさらに細分され得る。各V_HおよびV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端に、以下の順に配列した3つのCDRおよび4つのFRから構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1の構成成分（C1q）を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

40

【 0 0 5 1 】

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、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U. S. Department of Health

50

h and Human Services, National Institutes of Health (1987)を参照されたい。一般に、抗体は、可変領域に3つの重鎖および3つの軽鎖CDRまたはCDR領域を含む。CDRは、抗体の抗原またはエピトープへの結合のための接触残基の大多数を提供する。ある特定の形態では、CDR領域は、Kabatシステムを使用して描写される(Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。

【0052】

本明細書で使用される場合、用語「単鎖可変断片」または「scFv」は、 $V_H::V_L$ ヘテロ二量体を形成するために共有結合により連結された免疫グロブリンの重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)の可変領域の融合タンパク質である。 V_H および V_L は、直接的に接合されるか、またはペプチドをコードするリンカー(例えば、10、15、20、25個のアミノ酸)によって接合されるかのいずれかであり、これにより、 V_H のN末端が V_L のC末端に接続するか、または V_H のC末端が V_L のN末端に接続する。リンカーは通常、可撓性に関してグリシンリッチであり、および可溶性に関してセリンまたはトレオニンリッチである。定常領域の除去およびリンカーの導入にもかかわらず、scFvタンパク質は、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。単鎖Fvポリペプチド抗体は、Hustonら(Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)によって記載される V_H および V_L コード配列を含む核酸から発現される。また、米国特許第5,091,513号、同第5,132,405号および同第4,956,778号;ならびに米国特許公開第20050196754号および同第20050196754号を参照されたい。阻害活性を有するアンタゴニストのscFvが記載されている(例えば、Zhao et al., Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40を参照されたい)。刺激活性を有するアゴニストのscFvが記載されている(例えば、Peter et al., J Biochem 2003 25278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66を参照されたい)。

【0053】

本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、結合強度の尺度を意味する。親和性は、抗体結合部位(antibody combining site)と抗原決定基の間の立体化学的適合の密接度、これらの間の接触領域のサイズ、ならびに/または荷電基および疎水性基の分布に依存し得る。本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、可逆的複合体形成後の抗原-抗体結合の強度を指す「アビディティ」も含む。抗原に対する抗体の親和性を計算するための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。

【0054】

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、免疫また

10

20

30

40

50

は免疫応答細胞を活性化または刺激することが可能である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し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に融合することに由来し得る。あるいはまたはさらに、scFvは、Fabに由来し得る（抗体に由来する代わりに、例えば、Fabライブラリーから得られた）。ある特定の実施形態では、scFvは、膜貫通ドメインに融合し、次いで、細胞内シグナル伝達ドメインに融合する。

【0055】

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（例えば、IL-36ポリペプチド）またはその断片をコードする任意の核酸分子を含む。このような核酸分子は、内因性核酸配列と100%相同であるか、またはそれと同一である必要はないが、実質的同一性を示し得る。内因性配列に対する「実質的同一性」または「実質的相同性」を有するポリヌクレオチドは、典型的には、二本鎖核酸分子の少なくとも1つの鎖とハイブリダイズすることが可能である。「ハイブリダイズする」とは、様々なストリンジエンシー条件下で、相補的ポリヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載の遺伝子）、またはその部分間で二本鎖分子を形成する対を意味する。（例えば、Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507を参照されたい）。

【0056】

例えば、ストリンジエントな塩濃度は、通常、約750mM未満のNaClおよび約75mM未満のクエン酸三ナトリウム、例えば、約500mM未満のNaClおよび約50mM未満のクエン酸三ナトリウム、または約250mM未満のNaClおよび約25mM未満のクエン酸三ナトリウムである。低ストリンジエンシーハイブリダイゼーションは、有機溶媒、例えば、ホルムアミドの非存在下で得ることができるが、高ストリンジエンシーハイブリダイゼーションは、少なくとも約35%のホルムアミド、例えば、少なくとも約50%のホルムアミドの存在下で得ることができる。ストリンジエントな温度条件は、通常、少なくとも約30℃、少なくとも約37℃、または少なくとも約42℃の温度を含む。ハイブリダイゼーション時間、界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の濃度、および担体DNAの包含または排除などの追加のパラメーターを変更することは、当業者に周知である。様々なレベルのストリンジエンシーが、必要とされる場合、これらの様々な条件を組み合わせることによって達成される。ある特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションは、750mMのNaCl、75mMのクエン酸三ナトリウム、および1%のSDS中30℃で行う。ある特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションは、500mMのNaCl、50mMのクエン酸三ナトリウム、1%のSDS、35%のホルムアミド、および100μg/mlの変性したサケの精子DNA（ssDNA）中37℃で行う。ある特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションは、250mMのNaCl、25mMのクエン酸三ナトリウム、1%のSDS、50%のホルムアミド、および200μg/mlのssDNA中42℃で行う。これらの条件に関する有用な変動は、当業者には容易に明らかである。

【0057】

ほとんどの適用では、ハイブリダイゼーションの後の洗浄ステップも、ストリンジエンシーが異なる。洗浄ストリンジエンシー条件は、塩濃度および温度によって定義することができる。上記のように、洗浄ストリンジエンシーは、塩濃度を低下させること、または温度を上昇させることによって高めることができる。例えば、洗浄ステップに対するストリンジエントな塩濃度は、約30mM未満のNaClおよび約3mM未満のクエン酸三ナトリウム、例えば、約15mM未満のNaClおよび約1.5mM未満のクエン酸三ナトリウムであり得る。洗浄ステップに対するストリンジエントな温度条件は、通常、少なくとも約25℃、少なくとも約42℃、または少なくとも約68℃の温度を含む。ある特定の実施形態では、洗浄ステップは、30mMのNaCl、3mMのクエン酸三ナトリウム

10

20

30

40

50

、および0.1%のSDS中25で行う。ある特定の実施形態では、洗浄ステップは、15mMのNaCl、1.5mMのクエン酸三ナトリウム、および0.1%のSDS中42で行う。ある特定の実施形態では、洗浄ステップは、15mMのNaCl、1.5mMのクエン酸三ナトリウム、および0.1%のSDS中68で行う。これらの条件に関する追加の変動は、当業者には容易に明らかである。ハイブリダイゼーション技法は、当業者に周知であり、例えば、Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Rogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

【0058】

10

「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）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）と少なくとも約50%相同または同一であることを示すポリペプチドまたはポリヌクレオチドを意味する。ある特定の実施形態では、このような配列は、比較のために使用されるアミノ酸配列または核酸配列と、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。

20

【0059】

配列同一性は、配列解析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705のBLAST、BESTFIT、GAP、またはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を使用することによって測定することができる。このようなソフトウェアは、相同性の程度を様々な置換、欠失、および/または他の改変に割り当てることによって、同一または類似する配列をマッチさせる。保存的置換には、典型的には、以下の群内の置換が含まれる：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定することに対する例示的なアプローチでは、BLASTプログラムを使用することができ、 e^{-3} と e^{-100} の間の確率スコアは密接に関連する配列を示す。

30

【0060】

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

40

【0061】

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

【0062】

用語「構成的発現」または「構成的に発現される」は、本明細書で使用される場合、すべての生理学的条件下での発現またはその条件下で発現されることを指す。

【0063】

「疾患」とは、細胞、組織、または臓器の正常機能に損傷を与えるか、またはそれを妨

50

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。

【0064】

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

【0065】

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

【0066】

「内因性」とは、細胞または組織において正常に発現されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。

【0067】

「外因性」とは、細胞において内因的に存在しないポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。したがって、用語「外因性」は、外来の、異種の、過剰発現される核酸分子およびポリペプチドなどの、細胞内で発現される任意の組換え核酸分子またはポリペプチドを包含する。「外因性」核酸とは、天然の野生型細胞には存在しない核酸を意味し、例えば、外因性核酸は、内因性のカウンターパートとは、配列、位置/場所、またはその両方によって異なり得る。明確化のために、外因性核酸は、その天然の内因性カウンターパートと比較して同じか、または異なる配列を有してもよく、遺伝子操作によって細胞自体またはその前駆体に導入されてもよく、必要に応じて、代替の対照配列、例えば、非天然のプロモーターまたは分泌配列に連結されてもよい。

【0068】

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

【0069】

「モジュレートする」とは、正に、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。

【0070】

「増加させる」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までであってもよい。

【0071】

「低下させる」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%、またはさらに約100%までであってもよい。

【0072】

用語「単離された」、「精製された」または「生物学的に純粋な」は、天然の状態で見られるように、通常は付随する構成成分を様々な程度に含まない物質を指す。「単離する」は、元の供給源または環境からの分離の程度を示す。「精製する」は、単離よりも高度である分離の程度を示す。「精製された」または「生物学的に純粋な」タンパク質は、いずれの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ず、他の有害な結果も引き起こさないように、他の物質を実質的に含まない。すなわち、核酸またはペプチドは、組換えDNA技法によって生成される場合には、細胞材料、ウイルス材料、および培養培地を、または化学的に合成される場合には、化学的前駆体や他の化学物質を実質的に含まないならば、精製されている。純度および均一性は、典型的には、分析化学の技法、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

10

20

30

40

50

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され得るタンパク質では、様々な改変が様々な単離されたタンパク質に生じる可能性があり、これらを別々に精製することができる。

【0073】

「単離された細胞」とは、天然に細胞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。

【0074】

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

10

【0075】

「新生物」とは、細胞または組織の病理学的増殖、およびその後の、他の組織または臓器への遊走またはその侵襲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、典型的には、制御不能かつ進行的であり、正常細胞の分裂増殖(multiplication)を誘発しないか、またはその停止を引き起こす条件下で生じる。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、尿生殖路、尿管、尿道、子宮、および腔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型を含むがそれらに限定されない種々の細胞型、組織、または臓器に影響を及ぼし得る。新生物には、がん、例えば、肉腫、癌、または形質細胞腫(形質細胞の悪性腫瘍)が含まれる。

20

【0076】

「受容体」とは、少なくとも1つのリガンドに選択的に結合する細胞膜上に存在するポリペプチドまたはその部分もしくは断片を意味する。ある特定の実施形態では、リガンドは、抗原である。抗原は、腫瘍抗原、病原体抗原、正常細胞抗原、HLA抗原、または同種抗原(例えば、マイナー組織適合性同種抗原)であり得る。

【0077】

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

30

【0078】

本明細書で使用される場合、用語「リガンド認識受容体」は、リガンドを認識することが可能である受容体を指す。

【0079】

「参照」または「対照」とは、比較の標準物質を意味する。例えば、CARおよびscFvを発現する細胞によるscFv抗原結合のレベルは、CARを単独で発現する対応する細胞におけるscFv抗原結合のレベルと比較され得る。

【0080】

「分泌された」とは、例えば、小胞体、ゴルジ装置を介する分泌経路によって、および細胞形質膜において一過的に融合し、細胞の外側にポリペプチドを放出するベシクルとして、細胞から放出されるポリペプチドを意味する。

40

【0081】

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

【0082】

用語「腫瘍抗原」は、本明細書で使用される場合、正常細胞または非IS新生物細胞と比較して、腫瘍細胞上に固有に、または差次的に発現される抗原(例えば、ポリペプチド)を指す。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、抗原認識受容体によって免疫応答を活性化もしくは誘導することが可能であるか(例えば、CD19、MUC-16)、または

50

受容体 - リガンド結合によって免疫応答を抑制することが可能である（例えば、CD47、PD-L1/L2、B7.1/2）腫瘍によって発現される任意のポリペプチドを含む。

【0083】

用語「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、およびは、米国特許法においてそれらに与えられた広い意味を有することを意図し、「含む (includes)」、「含む (including)」などを意味し得る。

【0084】

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経過を変更することを試みる治療介入を指し、予防のために、または臨床病理の過程中的のいずれかに実施することができる。処置の治療効果は、限定されないが、疾患の発生または再発を防止すること、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減弱、転移を防止すること、疾患進行速度を低下させること、疾患状態の軽快または緩和、および寛解または予後の改善を含む。疾患または障害の進行を防止することによって、処置は、罹患したか、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防止することができるが、また、処置は、障害に対するリスクにあるか、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開始または障害の症状を防止することができる。

10

【0085】

「個体」または「対象」は、本明細書において、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、哺乳類などの脊椎動物である。哺乳類は、ヒト、霊長類、農場動物、狩猟動物、齧歯類および愛玩動物を含むがこれらに限定されない。非ヒト動物対象の非限定的な例としては、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットなどの齧歯類、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、ならびに類人猿およびサルなどの非ヒト霊長類が挙げられる。用語「免疫不全状態の」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、健康な免疫系を有する人において通常疾患を引き起こさないが、機能が乏しいか、または抑制された免疫系しか有さない人々を冒し得る生物によって引き起こされる感染症である日和見感染症に非常に罹り易い。

20

【0086】

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。

5.2. IgG分解酵素

30

【0087】

本開示の細胞は、IgG分解酵素を含む。

【0088】

IgG分解酵素は、IgGを切断することが可能である。IgGは、ヒト免疫系において重要な保護的役割を果たすが、関節リウマチ、重症筋無力症、全身性ループスなどのような疾患の病因にも関連し、ここで、IgGの除去をこれらの自己免疫疾患を処置するための治療手段として使用している (Johansson et al., PLoS ONE (2008); 3:1-6; Berta et al., The International Journal of Artificial Organs (1994); 17:603-608, Stummvoll et al., Annals of the Rheumatic Diseases (2005); 64:1015-1021)。さらに、宿主のIgGは、同種移植において重要な役割を果たし、ここで、HLAドナー間の不適合によって、同種移植片の抗体媒介性拒絶がもたらされる (Loupy et al., New England Journal of Medicine (2018); 379:1150-1160)。

40

【0089】

IdeSは、同種移植前の脱感作に関してヒトにおいて評価された。本研究では、25人の患者のうちの24人は、すべてのドナー特異的抗体を迅速に除去したIdeSによる処置後に、HLA-不適合移植を受けることができた (Jordan et al., New England Journal of Medicine (2017); 377

50

: 442 - 453 ; Lonze et al. , Annals of Surgery (2018) ; 268 : 488 - 496) 。

【 0090 】

研究は、IgG分解酵素が正の治療結果を有することを示している。例えば、IdeSは、特発性血小板減少症、グッドパスチャー病、および関節炎の動物モデルにおいて正の治療結果を有することが示されている (Johansson et al. , PLoS ONE (2008) ; 3 : 1 - 6 ; Yang et al. , Nephrology Dialysis Transplantation (2010) ; 25 : 2479 - 2486 ; Nandakumar et al. , Arthritis and Rheumatism (2007) ; 56 : 3253 - 3260) 。

10

【 0091 】

IgG分解酵素は、IgGを切断することができ、それによって、IgG抗体が細胞を死滅させるのを防ぐ。さらにまたはあるいは、IgG分解酵素は、IgGを切断することができ、それによって、IgGの残りの断片の細胞への結合を保持させ、細胞を1つまたは複数の細胞傷害性抗体から保護する。ある特定の形態では、1つまたは複数の細胞傷害性抗体は、IgGと同じエピトープ領域に結合し、または同じエピトープ領域への結合についてIgGと交差競合し、それによって、細胞を死滅させる。したがって、このプロセスは、保護シールドを生じる。

【 0092 】

IgG分解酵素を使用して、リガンド認識受容体 (例えば、CARまたはTCR) を含む細胞を宿主液体性応答から保護することができる。宿主液体性応答の非限定的な例としては、抗体に駆動される宿主免疫応答 (例えば、抗CAR抗体)、新たなアミノ酸配列に向けられる宿主液体性応答、外来配列に対する宿主液体性応答 (host humoral responses foreign sequences)、融合点配列に対する宿主液体性応答、同種抗原に対する宿主液体性応答 (例えば、マイナー組織適合性同種抗原)、HLA抗原に対する宿主液体性応答、他の対立遺伝子に対する宿主液体性応答、タンパク質または炭水化物の発現変化に対する宿主液体性応答、タンパク質の翻訳後修飾に対する宿主液体性応答、宿主と注入された細胞の間の差異によって誘導される宿主液体性応答が挙げられる。これは、既存の応答または細胞の注入によって刺激された応答を含み得る。宿主液体性応答からの保護は、細胞の死もしくは中和を防止し、細胞に、持続性の増加、活性の改善 (例えば、抗腫瘍活性、増殖、サイトカインの分泌、細胞溶解の関与、または細胞中に特異的に操作された他の機能を提供する。細胞の持続性および機能の増加は、細胞を含む任意の治療に対する費用の低下ももたらすことができる。例えば、CAR-T細胞療法は、非常に高い費用を伴い、例えば、1回の注入は、数十万ドルを超える (Lin , et al. , Journal of Clinical Oncology (2018) ; 36 : 3192 - 3202) 。

20

30

【 0093 】

IgG分解酵素の非限定的な例としては、S. pyogenesのIgG分解酵素 (例えば、IdeS)、S. equi subsp. zooepidemicusのIgG分解酵素 (Ide Z)、S. equi subsp. equi. のIgG分解酵素 (Ide E)、Streptococcus pyogenes由来のエンドグリコシダーゼ (EndoS)、およびStreptococcus pyogenes由来の連鎖球菌システインプロテイナーゼ (SpeB) が挙げられる。

40

【 0094 】

IdeEおよびIdeZは、Streptococcus equiに由来する (Lannergard et al. , FEMS Microbiology Letters (2006) ; 262 : 230 - 235) 。

【 0095 】

50

EndoSは、IgGのガンマ鎖上のグリカン部位を除去し、それによって、IgGのFc受容体との相互作用を妨害するエンドグリコシダーゼである(Collin et al., EMBO J. (2001); 20(12): 3046-3055)。

【0096】

ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、IgGとFc受容体の間の相互作用を妨害することが可能である。ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、エンドペプチダーゼ、例えば、IdeS、IdeZ、IdeE、およびSpeBである。ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、IgG特異的エンドペプチダーゼ、例えば、IdeS、IdeZ、およびIdeEである。ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、エンドグリコシダーゼ、例えば、EndoSである。

10

【0097】

ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、IdeSである。細菌は、オプソニン作用およびファゴサイトーシスを避けるために、タンパク質分解酵素の放出などのヒト免疫系を回避する複雑な戦略を進化させている(Potempa et al., Biol Chem. (2012); 393: 873-888)。Streptococcus pyogenesは、IgG分解酵素を分泌し、これは、ヒンジ領域の下でIgGを切断し、FabおよびFc断片を生じる。

【0098】

IdeSは、免疫グロブリンGに対して高い特異性を有するシステインプロテアーゼであり、これは、免疫グロブリンA、M、EおよびDを切断しない(Von et al., EMBO Journal (2002); 21: 1607-1615、およびJohansson et al., PLoS ONE (2008); 3: 1-6)。IdeSはそれ自体潜在的に免疫原性であるが、この酵素は、その本来の目的であるその宿主免疫応答からもそれ自体を保護するはずである。IdeSは、ヒンジ領域の下でIgGを切断し、それによって、Fc断片を放出し、F(ab')₂断片は無傷のままである(von Pawel-Rammingen et al., EMBO J. (2002); 21(7): 1607-15)。

20

【0099】

ある特定の実施形態では、IdeSは、以下に提供されるGenBank番号AEJ35177.1(配列番号1)を有するアミノ酸配列と、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%もしくは少なくとも約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、またはその断片を有する(本明細書において、相同性および同一性は、BLASTまたはFASTAなどの標準的ソフトウェアを使用して決定することができる)、ならびに/あるいは、必要に応じて、最大1または最大2または最大3つの保存的アミノ酸置換を含み得る。ある特定の実施形態では、IdeS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、または少なくとも約300、および最大341アミノ酸長である、配列番号1の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、IdeSは、配列番号1のアミノ酸1~341、30~341、1~50、50~100、100~150、150~200、または200~341のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、IdeSは、配列番号1のアミノ酸30~341を含むか、または有する。配列番号1は以下に提供される。

30

40

【化 1】

```

1 MRKRCYSTSA VVLAAVTLFA LSVDRGVIAD SFSANQEIRY SEVTPYHVTS VWTGKVTTPA
61 KFTQGEDVFH APYVANQGWY DITKTFNGKD DLLCGAATAG NMLHWWFDQN KEKIEAYLKK
121 HPDKQKIMFG DQELLDVRKV INTKGDQTN ELFNFRDKA FPGLSARRIG VMPDLVLDMF
181 INGYYLNVYK TQTTDVNRTY QEKDRRGIF DAVFTRGDQS KLLTSRHDFK EKNLKEISDL
241 IKKELTEGKA LGLSHTYANV RINHVINLWG ADFDSNGNLK AIYVTDSDSN ASIGMKKYFV
301 GVNSAGKVAI SAKEIKEDNI GAQVLGLFTL STGQDSWNQT N [ 配列番号： 1]

```

【 0 1 0 0】

配列番号 1 のアミノ酸 3 0 ~ 3 4 1 をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号 2 に示される。

10

【化 2】

```

GACTCTTTTAGTGCCAATCAAGAAATCCGATATAGCGAGGTGACTCCTTACCATGTAACCTCTGTGTGGACC
AAGGGAGTTACCCACCAGCCAAGTTCACGCAGGGTGAGGACGTATTTACGCACCGTACGTAGCTAACAG
GGTTGGTACGACATCACTAAGACCTTCAATGGGAAAGACGATCTTTTGTGTGGTGCCGCAACGGCGGGCAAC
ATGCTGCACTGGTGGTTTCGACCAAAACAAGGAGAAGATCGAAGCGTACTTGAAGAAACACCCAGACAAACAG
AAAATCATGTTTGGAGACCAGGAGCTCCTGGATGTGAGAAAAGGTAATCAACACTAAAGGTGACCAAAACAAAC
AGTGAACCTTTTAACTATTTTCGGGACAAGGCGTTTCCAGGATTGAGTGCCAGAAGAATCGGCCTAATGCCT
GACCTCGTGCTTGACATGTTTCAATGGATACTATCTCAATGTATATAAGACCCAAACCACAGATGTTAAT
CGAACTTATCAGGAGAAGGATAGAAGGGGAGGAATATTTGATGCCGTTTTTACTCGAGGAGACCAGTCTAAG
CTCTTGACCAGCAGGCACGACTTCAAAGAGAAGAATCTTAAAGAAATATCTGATCTCATAAAGAAGGAACTG
ACGGAAGGCAAAGCGCTGGGACTTTCCCATACGTATGCCAATGTAAGAATCAATCATGTCATAAACCTTTGG
GGTGCTGATTTTCGATTCTAATGGAAATCTTAAGGCTATATATGTTACTGATTCGGACTCCAACGCGTCTATT
GGCATGAAAAAATACTTCGTGGGGTGAACCTCAGCAGGAAAAGTTCGCAATATCTGCTAAGGAAATTAAGGAA
GACAACATAGGGGCGCAAGTGCTGGGTCTCTTACCCTTTCCACCGCCAAGACTCCTGGAATCAAACAAAT

```

20

[配列番号： 2]

【 0 1 0 1】

ある特定の実施形態では、I g G 分解酵素は、細胞に結合している（「膜結合 I g G 分解酵素」とも称される）。例えば、図 1 A を参照されたい。膜結合 I g G 分解酵素では、酵素は、酵素を細胞に結合または付着させることが可能である膜貫通ドメインに融合または付着している。例えば、図 1 A を参照されたい。膜貫通ドメインは、I g G 分解酵素の C 末端または N 末端に付着していてもよい。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、I g G 分解酵素の C 末端に付着している。例えば、図 1 A を参照されたい。

30

【 0 1 0 2】

膜貫通ドメインは、分子もしくはタンパク質の膜貫通ドメインまたはその部分であってもよい。膜貫通ドメインは、CD 8 ポリペプチド（例えば、CD 8 の膜貫通ドメインまたはその部分）、CD 2 8 ポリペプチド（例えば、CD 2 8 の膜貫通ドメインまたはその部分）、CD 3 ポリペプチド（例えば、CD 3 の膜貫通ドメインまたはその部分）、CD 4 ポリペプチド（例えば、CD 4 の膜貫通ドメインまたはその部分）、4 - 1 B B ポリペプチド（例えば、4 - 1 B B の膜貫通ドメインまたはその部分）、OX 4 0 ポリペプチド（例えば、OX 4 0 の膜貫通ドメインまたはその部分）、ICOS ポリペプチド（例えば、ICOS の膜貫通ドメインまたはその部分）、合成ペプチド（免疫応答に関連するタンパク質をベースとしない）、またはこれらの組合せを含み得る。

40

【 0 1 0 3】

ある特定の実施形態では、I g G 分解酵素に融合した膜貫通ドメインは、CD 8 ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、CD 8 ポリペプチドは、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列または配列番号 2 7 のアミノ酸 1 3 7 ~ 2 0 7 を含むか、または有する。配列番号 3 は以下に提供される。

50

【化3】

PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN

[配列番号 : 3]

【0104】

配列番号3のアミノ酸をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号4に示される。

【化4】

CCAATACTACTCCCGCACCGAGACCGCCCACTCCTGCTCCCACGATTGCCTCCCAACCTCTTAGCTTGAGA
CCGGAAGCATGTGCGGCTGCGGCCGGTGGCGCAGTACATACTCGCGGCCTGGACTTTGCGTGCGACATATAC
ATTTGGGCACCCCTGGCCGGCACTTGC GGAGTTTTGCTGCTGTCTCTCGTGATAACTCTCTATTGTAAC

[配列番号 : 4]

10

【0105】

ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、細胞から分泌される（「分泌IgG分解酵素」とも称される）。例えば、図1Bを参照されたい。分泌IgG分解酵素では、酵素は、膜貫通ドメインに融合も付着もせず、それによって、酵素は、細胞から、細胞外環境または細胞の近傍に分泌または放出される。例えば、図1Bを参照されたい。

【0106】

ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、シグナルペプチド（「リーダー配列」とも称される）に接続または融合されている。本明細書で使用される場合、「シグナル配列」または「リーダー配列」は、その輸送を指示するため、例えば、IgG分解酵素を細胞膜に輸送するため、またはリガンド認識受容体（例えば、CAR）を細胞膜に輸送するための、ポリペプチドもしくはタンパク質またはその断片のN末端に存在するペプチド配列（例えば、約5、10、15、20、25または30個のアミノ酸）を指す。

【0107】

例示的なシグナル配列としては、以下に限定されないが、CD4シグナルペプチド、IgG重鎖シグナルペプチド、IL-2シグナル配列（例えば、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有するヒトIL-2シグナルペプチドまたは配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するマウスIL-2シグナルペプチド）、カップシグナル配列（例えば、配列番号7に示されるアミノ酸配列を有するヒトカップシグナル配列または配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するマウスカップシグナル配列）、CD8シグナル配列（例えば、配列番号9に示されるアミノ酸配列を有するヒトCD8シグナルペプチドまたは配列番号10に示されるアミノ酸配列を有する切断されたヒトCD8シグナルペプチド）、アルブミンシグナル配列（例えば、配列番号11に示されるアミノ酸配列を有するヒトアルブミンシグナル配列）、およびプロラクチンシグナル配列（例えば、配列番号12に示されるアミノ酸配列を有するヒトプロラクチンシグナル配列）が挙げられる。配列番号5～12は以下に提供される。

【化5】

MYRMQLLSICIALSLALVTNS [配列番号 : 5]

MYSMQLASCVTTLTLVLLVNS [配列番号 : 6]

METPAQLLFLLLLWLPDPTTG [配列番号 : 7]

METDTLLLWVLLLWVPGSTG [配列番号 : 8]

MALPVTALLLPLALLLHAARP [配列番号 : 9]

MALPVTALLLPLALLLHA [配列番号 : 10]

MKWVTFISLLFSSAYS [配列番号 : 11]

MDSKGSSQKGRLLLLLVSNLLLCQGVVS [配列番号 : 12]

20

30

40

50

【0108】

ある特定の実施形態では、I g G分解酵素は、C D 8シグナル配列に接続または融合されている。ある特定の実施形態では、C D 8シグナル配列は、配列番号10に示されるアミノ酸配列を含むか、または有する。

【0109】

配列番号10のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号13に示される。

【化6】

ATGGCCCTTCCGGTGACGCGCTTCTCCTCCCTTTGGCGCTTCTTCTGCACGCT [配列番号:13]

10

【0110】

ある特定の実施形態では、I g G分解酵素は、ベクターから発現される。I g G分解酵素の発現は、イムノブロット、P C R、E L I S A、質量分析、およびフローサイトメトリーを含むがこれらに限定されない任意の好適な方法によって検出することができる。

5.3. リガンド認識受容体

【0111】

本開示の細胞は、リガンド認識受容体を含む。リガンドに結合することが可能である任意の受容体は、本開示のリガンド認識受容体であり得る。リガンド認識受容体の非限定的な例としては、目的の抗原に結合する抗原認識受容体、細胞接着分子、サイトカイン受容体（例えば、F a sリガンドまたはT G F 受容体などのインターロイキンまたはサイトカイン受容体、T r a i l、T C R、I g G、C A R、N K阻害受容体、E G F RまたはF G F Rなどの成長因子受容体、ペプチドリガンドまたは接着分子、炭水化物受容体、Gプロテイン受容体など）、およびF c受容体が挙げられる。受容体は、一価または多価であり得る。リガンド認識受容体は、内因性または外因性であり得る。リガンド認識受容体は、組換え発現され得る。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、ベクターから発現される。

20

【0112】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、目的の抗原に結合する抗原認識受容体である。抗原認識受容体の非限定的な例としては、キメラ抗原受容体（C A R）、T細胞受容体（T C R）、I g G、B細胞受容体（B C R）、I g M、I g D、およびI g Eが挙げられる。

30

【0113】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、キメラ抗原受容体（C A R）である。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、T細胞受容体（T C R）である。

【0114】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、抗原に結合する。抗原は、腫瘍抗原、病原体抗原、正常細胞抗原（例えば、自己免疫疾患または臓器移植に対する）、H L A抗原、または同種抗原（例えば、マイナー組織適合性同種抗原）であり得る。

5.3.1. 抗原

【0115】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、腫瘍抗原である抗原に結合する。任意の腫瘍抗原（抗原ペプチド）は、本明細書に記載の腫瘍に関連する実施形態において使用することができる。抗原の供給源には、がんタンパク質が含まれるがこれらに限定されない。抗原は、ペプチドとして、または無傷タンパク質もしくはその部分として発現され得る。無傷タンパク質またはその部分は、天然であっても、変異誘発されていてもよい。腫瘍抗原の非限定的な例としては、炭酸脱水酵素I X（C A I X）、癌胎児抗原（C E A）、C D 2、C D 8、C D 7、C D 10、C D 19、C D 20、C D 22、C D 30、C D 33、C L L 1、C D 34、C D 38、C D 41、C D 44、C D 49 f、C D 56、C D 74、C D 133、C D 138、C D 123、C D 44 V 6、サイトメガロウイルス（C M V）に感染した細胞の抗原（例えば、細胞表面抗原）、H P V E 6またはE 7ペ

40

50

プチド、EBVペプチド、MAGEペプチド、上皮糖タンパク質 - 2 (EGP - 2)、上皮糖タンパク質 - 40 (EGP - 40)、上皮細胞接着分子 (EpCAM)、受容体チロシン - プロテインキナーゼ erb - B2, 3, 4 (erb - B2, 3, 4)、葉酸結合タンパク質 (FBP)、胎児アセチルコリン受容体 (AChR)、葉酸受容体 - 、ガングリオシド G2 (GD2)、ガングリオシド G3 (GD3)、ヒト上皮成長因子受容体 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 - 13R 2)、軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (KDR)、Lewis Y (LeY)、L1細胞接着分子 (L1CAM)、黒色腫抗原ファミリー A、1 (MAGE - A1)、ムチン 16 (MUC16)、ムチン 1 (MUC1)、メソテリン (MSLN)、ERBB2、MAGEA3、p53、MART1、GP100、プロテイナーゼ 3 (PR1)、チロシナーゼ、サバイピン、hTERT、EpHA2、NKG2Dリガンド、がん - 精巢抗原 NY - ES0 - 1、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、ROR1、腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG - 72)、血管内皮成長因子 R2 (VEGF - R2)、およびウィルムス腫瘍タンパク質 (WT - 1)、BCMA、NKCS1、EGF1R、EGFR - VIIII、CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、および ERBB が挙げられる。

10

【0116】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、CD19 に結合する。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、マウス CD19 ポリペプチドに結合する。ある特定の実施形態では、マウス CD19 ポリペプチドは、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列を含む。

20

【化7】

RPQKSLLEVEEGNVVLPCLPDSSPVSSSEKLAWYRGNQSTPFLELSPGSPGLGLHVGSGLGILLVIVNVSDH
MGGFYLCQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDSGEMFRWNASDVRDLDCDLNRSSGSHRSTSGS QLYVWAKDHPKV
WGTPVCAPRGS SLNQLINQDLTVAPGSTLWLSCGVPPVPAKGSISWTHVHPRRPVNSLLSLSLGGHEPV
REMWVWGSLLLLLPQATALDEGTYCYCLRGNLTIERHVKVIARSAVWLWLLRTGG [配列番号 :14]

【0117】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、ヒト CD19 ポリペプチドに結合する。ある特定の実施形態では、ヒト CD19 ポリペプチドは、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【化8】

PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLPLGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQM
GGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDR
PEIWEGEPPCLPPRDSLNSQLS QDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKPKSLLSLELKDPR
ARDMWVME TGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWK [配列番号 :15]

40

【0118】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、ヒトまたはマウスの CD19 タンパク質の細胞外ドメインに結合する。

【0119】

ある特定の実施形態では、例えば、免疫不全状態の対象における、例えば、病原体感染または他の感染性疾患を処置および/または防止する際に使用するためのリガンド認識受容体は、病原体抗原に結合する。病原体の非限定的な例としては、疾患を引き起こすことが可能なウイルス、細菌、真菌、寄生生物および原生生物が挙げられる。

【0120】

ウイルスの非限定的な例としては、Retroviridae (例えば、ヒト免疫不全

50

ウイルス、例えば、HIV - 1 (HDTV - III、LAVEまたはHTLV - III / LAV、またはHIV - IIIとも称される) ; およびHIV - LPなどの他の分離株) ; Picornaviridae (例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス; エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス) ; Calciviridae (例えば、胃腸炎を引き起こす株) ; Togaviridae (例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス) ; Flaviridae (例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス) ; Coronaviridae (例えば、コロナウイルス) ; Rhabdoviridae (例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス) ; Filoviridae (例えば、エボラウイルス) ; Paramyxoviridae (例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス) ; Orthomyxoviridae (例えば、インフルエンザウイルス) ; Bungaviridae (例えば、ハンタンウイルス、ブニヤウイルス (bungavirus)、フレボウイルスおよびナイラウイルス (Nairovirus)) ; Arenaviridae (出血熱ウイルス) ; Reoviridae (例えば、レオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス) ; Birnaviridae ; Hepadnaviridae (B型肝炎ウイルス) ; Parvoviridae (パルボウイルス) ; Papovaviridae (パピローマウイルス、ポリオーマウイルス) ; Adenoviridae (ほとんどのアデノウイルス) ; Herpesviridae (単純ヘルペスウイルス (HSV) 1および2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、ヘルペスウイルス) ; Poxviridae (痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス) ; およびIridoviridae (例えば、アフリカブタ熱ウイルス) ; ならびに未分類ウイルス (例えば、デルタ肝炎の因子 (B型肝炎ウイルスの欠損サテライトであると考えられる)、非A非B型肝炎の因子 (クラス1 = 内部感染、クラス2 = 非経口感染 (すなわちC型肝炎)) ; ノーウォークおよび関連ウイルスならびにアストロウイルス) が挙げられる。

10

20

【0121】

細菌の非限定的な例としては、Pasteurella、Staphylococci、Streptococcus、Escherichia coli、Pseudomonas種、およびSalmonella種が挙げられる。感染性細菌の具体例としては、以下に限定されないが、Helicobacter pyloris、Borelia burgdorferi、Legionella pneumophilia、Mycobacteria sps (例えば、M. tuberculosis、M. avium、M. intracellulare、M. kansasii、M. gordonae)、Staphylococcus aureus、Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Listeria monocytogenes、Streptococcus pyogenes (A群連鎖球菌)、Streptococcus agalactiae (B群連鎖球菌)、Streptococcus (ビリダンス群)、Streptococcus faecalis、Streptococcus bovis、Streptococcus (嫌気性種)、Streptococcus pneumoniae、病原性Campylobacter sp.、Enterococcus sp.、Haemophilus influenzae、Bacillus anthracis、Corynebacterium diphtheriae、Corynebacterium sp.、Erysipelothrix rhusiopathiae、Clostridium perfringens、Clostridium tetani、Enterobacter aerogenes、Klebsiella pneumoniae、Pasteurella multocida、Bacteroides sp.、Fusobacterium nucleatum、Streptobacillus moniliformis、Treponema pallidum、Treponema pertenuis、Leptospira、Rickettsia、およびActinomyces israeliiが挙げられる。

30

40

50

【 0 1 2 2 】

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

【 0 1 2 3 】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、HLA分子などの同種抗原、およびマイナー組織適合性同種抗原に結合する。

5 . 3 . 2 . T細胞受容体（TCR）

10

【 0 1 2 4 】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、TCRである。TCRは、インバリアントCD3鎖分子との複合体の一部として発現される2つの可変鎖からなるジスルフィド結合ヘテロ二量体タンパク質である。TCRは、T細胞表面に見られ、主要組織適合複合体（MHC）分子に結合したペプチドとしての抗原の認識を担う。ある特定の実施形態では、TCRは、アルファ鎖およびベータ鎖（それぞれ、TRAおよびTRBによってコードされる）を含む。ある特定の実施形態では、TCRは、ガンマ鎖およびデルタ鎖（それぞれ、TRGおよびTRDによってコードされる）を含む。

【 0 1 2 5 】

TCRの各鎖は、2つの細胞外ドメイン：可変（V）領域および定常（C）領域から構成される。定常領域は、細胞膜の近位に存在し、その後、膜貫通領域および短い細胞質側末端が存在する。可変領域は、ペプチド/MHC複合体に結合する。両鎖の可変ドメインはそれぞれ、3つの相補性決定領域（CDR）を有する。

20

【 0 1 2 6 】

ある特定の実施形態では、TCRは、3つの二量体シグナル伝達モジュールCD3 / ζ 、CD3 / η およびCD247 / ϵ または γ と受容体複合体を形成することができる。TCR複合体が、その抗原およびMHC（ペプチド/MHC）と会合する場合、TCR複合体を発現するT細胞は活性化される。

【 0 1 2 7 】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、内因性TCRである。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、外因性TCRである。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、組換えTCRである。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、天然に存在しないTCRである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないTCRは、少なくとも1つのアミノ酸残基で、いずれかの天然に存在するTCRと異なる。ある特定の実施形態では、天然に存在しないTCRは、少なくとも約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約20、約25、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100またはそれより多いアミノ酸残基で、いずれかの天然に存在するTCRと異なる。ある特定の実施形態では、天然に存在しないTCRは、少なくとも1つのアミノ酸残基で、天然に存在するTCRから改変される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないTCRは、少なくとも約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約20、約25、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100またはそれより多いアミノ酸残基で、天然に存在するTCRから改変される。

30

40

5 . 3 . 3 . キメラ抗原受容体（CAR）

【 0 1 2 8 】

ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、CARである。CARは、目的の特異性を免疫エフェクター細胞上に移植または付与する操作された受容体である。レトロウイルスベクターによりコード配列の移入を促進して、CARを使用してモノクローナル抗体の特異性をT細胞上に移植することができる。

50

【0129】

3つの世代のCARが存在する。「第1世代」のCARは、典型的には、細胞質/細胞内シグナル伝達ドメインに融合した膜貫通ドメインに融合した細胞外抗原結合ドメイン(例えば、scFv)から構成される。「第1世代」のCARは、de novo抗原認識を提供し、HLA媒介性抗原提示とは無関係に、単一の融合分子において、それらのCD3鎖シグナル伝達ドメインを介してCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の両方の活性化をもたらすことができる。「第2世代」のCARは、様々な共刺激分子(例えば、CD28、4-1BB、ICOS、OX40)由来の細胞内シグナル伝達ドメインをCARの細胞質側末端に付加し、さらなるシグナルをT細胞に提供する。「第2世代」のCARは、共刺激(例えば、CD28または4-1BB)と活性化(CD3)の両方を提供するものを含む。「第3世代」のCARは、複数の共刺激(例えば、CD28および4-1BB)と活性化(CD3)を提供するものを含む。ある特定の実施形態では、抗原認識受容体は、第1世代のCARである。ある特定の実施形態では、抗原認識受容体は、第2世代のCARである。

10

【0130】

ある特定の非限定的な実施形態では、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が具体化される)は、約 5×10^{-7} Mまたはそれ未満の解離定数(K_d)で抗原に結合する。ある特定の実施形態では、 K_d は、約 5×10^{-7} Mもしくはそれ未満、約 1×10^{-7} Mもしくはそれ未満、約 5×10^{-8} Mもしくはそれ未満、約 1×10^{-8} Mもしくはそれ未満、約 5×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 1×10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 5×10^{-10} Mもしくはそれ未満、約 1×10^{-10} Mもしくはそれ未満、約 5×10^{-11} Mもしくはそれ未満、約 1×10^{-11} Mもしくはそれ未満、約 5×10^{-12} Mもしくはそれ未満、または約 1×10^{-12} Mもしくはそれ未満である。

20

【0131】

細胞外抗原結合ドメインの結合(例えば、scFvまたはそのアナログにおいて)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分析、バイオアッセイ(例えば、成長阻害)、表面プラズモン共鳴、ウエスタンブロットアッセイ、当技術分野で公知の他の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それぞれは、一般に、目的の複合体に対して特異的な標識された試薬(例えば、抗体、またはscFv)を用いることによって、特定の目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えば、scFvは、放射性標識され、ラジオイムノアッセイ(RIA)において使用することができる(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい)。放射性同位体は、カウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用などの手段によって、またはオートラジオグラフィ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、CARの細胞外抗原結合ドメインは、蛍光マーカーで標識される。蛍光マーカーの非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質(GFP)、青色蛍光タンパク質(例えば、EBFP、EBFP2、アズライト、およびmKalama1)、シアン蛍光タンパク質(例えば、ECFP、セルリアン、およびCypet)、および黄色蛍光タンパク質(例えば、YFP、シトリン、Venus、およびYPet)が挙げられる。

30

40

【0132】

本開示の主題に従って、CARは、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得、細胞外抗原結合ドメインは、抗原、例えば、腫瘍抗原または病原体抗原に特異的に結合する。

5.3.3.1. CARの細胞外抗原結合ドメイン

【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は、scFvを含む。ある

50

特定の実施形態では、 $s c F v$ は、ヒト $s c F v$ である。ある特定の実施形態では、 $s c F v$ は、ヒト化 $s c F v$ である。ある特定の実施形態では、 $s c F v$ は、マウス $s c F v$ である。ある特定の実施形態では、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、必要に応じて架橋した $F a b$ を含む。ある特定の実施形態では、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、 $F(a b)_2$ を含む。ある特定の実施形態では、前記分子のいずれかは、異種配列を含む融合タンパク質内に含まれ、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインを形成することができる。

【0134】

ある特定の実施形態では、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、マウス $s c F v$ を含む。ある特定の実施形態では、本開示の $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、 $C D 19$ に結合する $s c F v$ を含む。

10

【0135】

ある特定の実施形態では、 $s c F v$ は、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H)を含む。ある特定の実施形態では、 $s c F v$ は、配列番号17に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L)を含む。ある特定の実施形態では、 $s c F v$ は、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む V_H および配列番号17に示されるアミノ酸配列を含む V_L を含み、必要に応じて($i i i$)前記 V_H と前記 V_L の間のリンカー配列、例えば、リンカーペプチドを伴う。

【0136】

「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、これらが互いに接続されるように、共有結合により付着させる官能基(例えば、化学物質、またはポリペプチド)を指す。本明細書で使用される場合、「ペプチドリリンカー」は、2つのタンパク質を一緒に連結するために(例えば、 V_H ドメインと V_L ドメインを連結するために)使用される1つまたは複数のアミノ酸を指す。

20

【0137】

ある特定の実施形態では、リンカーは、以下に提供される配列番号18に示されるアミノ酸配列を含む。

【化9】

GGGSGGGSGGGGS [配列番号 : 18]

【0138】

ある特定の実施形態では、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、配列番号16と少なくとも約80%(例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%)相同または同一であるアミノ酸配列を含む V_H を含む。例えば、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、配列番号16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%、または約99%相同または同一であるアミノ酸配列を含む V_H を含む。ある特定の実施形態では、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む V_H を含む。

30

【0139】

ある特定の実施形態では、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、配列番号17と少なくとも約80%(例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%)相同または同一であるアミノ酸配列を含む V_L を含む。例えば、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、配列番号17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%、または約99%相同または同一であるアミノ酸配列を含む V_L を含む。ある特定の実施形態では、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、配列番号17に示されるアミノ酸配列を含む V_L を含む。ある特定の実施形態では、 $C A R$ の細胞外抗原結合ドメインは、配列番号16と少なくとも約80%(例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%)相同または同一であるアミノ酸配列を含む V_H 、および配列番号17と少なくとも約

40

50

80%（例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%）相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含むV_Hおよび配列番号17に示されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。

【0140】

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、配列番号19に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR1、配列番号20に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR2、および配列番号21に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR3を含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは、配列番号19に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR1、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR2、および配列番号21に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR3を含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは、配列番号22に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR1、配列番号23に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR2、および配列番号24に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR3を含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは、配列番号22に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR1、配列番号23に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および配列番号24に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは、配列番号19に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR1、配列番号20に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR2、配列番号21に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR3、配列番号22に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR1、配列番号23に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR2、および配列番号24に示されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR3を含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは、配列番号19に示される配列を有するアミノ酸を含むV_H CDR1、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR2、配列番号21に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR3、配列番号22に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR1、配列番号23に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および配列番号24に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む。

【0141】

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25のアミノ酸配列を含むscFvを含み、ヒトCD19ポリペプチド（例えば、配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むヒトCD19ポリペプチド）に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、配列番号25のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号26に示される。

【0142】

配列番号16、17、および19～26は以下に提供される。

10

20

30

40

50

【化 1 0】

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKG
QATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTTVTVSS [配列番号 : 16]

DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSG
SGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR [配列番号 : 17]

GYAFSSY [配列番号 : 19]

YPGDGD [配列番号 : 20]

KTISSVVDYFDY [配列番号 : 21]

KASQNVGTNVA [配列番号 : 22]

SATYRNS [配列番号 : 23]

QQYNRYPYT [配列番号 : 24]

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLTA
DKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIELTQSP
PKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQ
SKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR [配列番号 : 25]

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGGAGCCTGGGTCCCTCAGTGAAGATTTCTTCAAGGCT
TCTGGCTATGCATTGAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATT
GGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCA
GACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGT
GCAAGAAAGACCATTAGTTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTTGAGCTCACCCAGTCT
CCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACT
AATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAAC
AGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAG
TCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAG
CTGGAGATCAAACGG [配列番号 : 26]

【 0 1 4 3】

本明細書で使用される場合、用語「保存的な配列の改変」は、アミノ酸配列を含む本開示のCAR（例えば、CARの細胞外抗原結合ドメイン）の結合の特徴に有意に影響を及ぼさず、変更もしないアミノ酸改変を指す。保存的改変は、アミノ酸の置換、付加および欠失を含み得る。改変は、部位特異的変異誘発およびPCR媒介性変異誘発などの当技術分野で公知の標準的技法によって、本開示のCARのヒトscFv中に導入され得る。アミノ酸は、電荷および極性などのそれらの物理化学的特性に従って群に分類され得る。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が、同じ群にあるアミノ酸で置き換えられる置換である。例えば、アミノ酸は電荷によって分類することができる：正電荷アミノ酸には、リシン、アルギニン、ヒスチジンが含まれ、負電荷アミノ酸には、アスパラギン酸、グルタミン酸が含まれ、中性電荷アミノ酸には、アラニン、アスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンが含まれる。さらに、アミノ酸は、極性によって分類することができる：極性アミノ酸には、アルギニン（塩基性極性）、アスパラギン、アスパラギン酸（酸性極性）、グルタミン酸（酸性極性）、グルタミン、ヒスチジン（塩基性極性）、リシン（塩基性極性）、セリン、トレオニン、およびチロシンが含まれ、非極性アミノ酸には、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、およびバリンが含まれる。よって、CDR領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基は、同じ群に由来する他のアミノ酸残基で置き換えることができ、変更された抗体は、本明細書に記載の機能的アッセイを使用して、保持された機能（すなわち、上記(c)から(1)に示される機能）について試験することができる。ある特定の実施形態では、指定された配列内または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

10

20

30

40

50

る。

【0144】

特定の配列（例えば、配列番号16および17）に対して、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%）の相同性または同一性を有するV_Hおよび/またはV_Lアミノ酸配列は、指定された配列（複数可）に対して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有し得るが、標的抗原（例えば、CD19）に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計1~10個のアミノ酸が、特定の配列（例えば、配列番号16および17）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の外側の領域において（例えばFRにおいて）起こる。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、配列番号16および17（その配列（配列番号16および17）の翻訳後修飾を含む）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。

10

【0145】

本明細書で使用される場合、2つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、2つの配列間の同一性パーセントと同等である。2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアライメントのために導入される必要のあるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れた、これらの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）である。2つの配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを使用して達成することができる。

20

【0146】

2つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、PAM120重み付き残基表（weight residue table）、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを使用して、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれるE. MeyersおよびW. Miller（Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17（1988））のアルゴリズムを使用して決定することができる。さらに、2つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム（www.gcg.comにおいて利用可能）中に組み込まれた、NeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol. 48: 444-453（1970））のアルゴリズムを使用して、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重み付け、および1、2、3、4、5、または6の長さの重み付けを使用して決定することができる。

30

【0147】

さらにまたはあるいは、本開示の主題のアミノ酸配列を「クエリー配列」としてさらに使用して、例えば、関連する配列を同定するために、公共のデータベースに対して検索を実施することができる。このような検索は、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タンパク質検索は、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の配列）と相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3により実施することができる。比較目的でギャップ付きアラインメントを得るために、Altschul et al.,（1997）Nucleic Acids Res. 25（17）: 3389-3402に記載されたギャップ付きBLASTを利用することができる。BLASTおよびギャップ付きBLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターを使用することができ

40

50

る。

5.3.3.2. CARの膜貫通ドメイン

【0148】

ある特定の非限定的な実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、膜の少なくとも一部分に及ぶ疎水性アルファヘリックスを含む。様々な膜貫通ドメインは、様々な受容体安定性をもたらす。抗原認識後に、受容体がクラスター化し、シグナルが細胞に伝達される。CARの膜貫通ドメインは、CD8ポリペプチド（例えば、CD8の膜貫通ドメインまたはその部分）、CD28ポリペプチド（例えば、CD28の膜貫通ドメインまたはその部分）、CD3ポリペプチド、CD4ポリペプチド（例えば、CD4の膜貫通ドメインまたはその部分）、4-1BBポリペプチド（例えば、4-1BBの膜貫通ドメインまたはその部分）、OX40ポリペプチド（例えば、OX40の膜貫通ドメインまたはその部分）、ICOSポリペプチド（例えば、ICOSの膜貫通ドメインまたはその部分）、合成ペプチド（免疫応答に関連するタンパク質をベースとしない）、またはこれらの組合せを含み得る。

10

【0149】

ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、CD8ポリペプチド、例えば、ヒトCD8の膜貫通ドメインもしくはその部分、またはマウスCD8の膜貫通ドメインを含む。ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、以下に提供されるNCBI参照番号NP_001139345.1（配列番号27）を有する配列と、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、またはその断片を含むか、または有する（本明細書において、相同性は、BLASTまたはFASTAなどの標準的ソフトウェアを使用して決定することができる）、ならびに/あるいは、必要に応じて、最大1、または最大2、または最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、少なくとも20、または少なくとも30、または少なくとも40、または少なくとも50、および最大235アミノ酸長である、配列番号27の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、CD8ポリペプチドは、配列番号25のアミノ酸1~235、1~50、50~100、100~150、137~207、137~209、150~200、または200~235のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、配列番号27のアミノ酸137~207を含むか、または有するCD8ポリペプチドを含む。

20

30

【化11】

```
MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLY
LSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPAPR
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCK
CPRPVVKSQDKPSLSARYV [ 配列番号 : 27]
```

【0150】

配列番号27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は、以下に提供される配列番号28に示される。

40

【化12】

```
CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTCTCCTGTCACGTGTTATCACCCCTTACTGCAAC
[ 配列番号 : 28]
```

【0151】

ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、以下に提供されるNCBI参照番号AAA92533.1（配列番号29）を有する配列と、少なくとも約85%、約90%

50

、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、またはその断片を含むか、または有する（本明細書において、相同性は、BLASTまたはFASTAなどの標準的ソフトウェアを使用して決定することができる）、ならびに/あるいは、必要に応じて、最大1、または最大2、または最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。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27の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、CD8ポリペプチドは、配列番号29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、または有する。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29のアミノ酸151~219を含むか、または有するCD8ポリペプチドを含む。配列番号29は以下に提供される。

10

【化13】

```

1  MASPLTRFLS LLLLLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGSVS
61  QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNKI TWDEKLNSSK LFSAVRDTNN KYVLTLNKFS
121 KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTTKPVLR T PSPVHPTGTS QPQRPEDCRP
181 RGSVKGTGLD FACDIYI WAP LAGICVAPLL SLIITLICYH RSRKRVCCKCP RPLVLRQEGKP
241 RPSEKIV [ 配列番号 : 29]

```

20

【0152】

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、ヒトCD28の膜貫通ドメインもしくはその部分、またはマウスCD28の膜貫通ドメインを含む。CD28ポリペプチドは、NCBI参照番号NP_006130（配列番号30）を有する配列と、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、またはその断片を含むか、または有する、ならびに/あるいは、必要に応じて、最大1、または最大2、または最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。非限定的なある特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、少なくとも20、または少なくとも30、または少なくとも40、または少なくとも50、および最大220アミノ酸長である、配列番号30の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、CD28ポリペプチドは、配列番号30のアミノ酸1~220、1~50、50~100、100~150、150~200、または200~220のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、配列番号30のアミノ酸153~179を含むか、または有するCD28ポリペプチドを含む。

30

【0153】

配列番号30は以下に提供される：

40

【化14】

```

1  MLRLLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61  SAVEVCVVYGY NYSQQLQVYS KTGFNC DGKL GNESVTFY LQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSL LV TVAFIIFWVR
181 SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [ 配列番号 : 30]

```

【0154】

ある特定の非限定的な実施形態では、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スペーサー領域をさらに含む。スペーサー領域は、抗原結合ドメインが、

50

様々な方向に配向して、抗原認識を容易にすることが可能であるように十分に柔軟であり得る。スパーサー領域は、I g G 1由来のヒンジ領域、または免疫グロブリンのC H₂ C H₃領域およびC D 3の部分、C D 2 8ポリペプチドの部分（例えば、配列番号30の部分）、C D 8ポリペプチドの部分（例えば、配列番号27または29の部分）、それと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、もしくは少なくとも約95%相同または同一である前記のいずれかの変形態態、あるいは合成スパーサー配列であり得る。

5.3.3.3. CARの細胞内シグナル伝達ドメイン

【0155】

ある特定の非限定的な実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞を活性化または刺激することができる（例えば、リンパ系列の細胞、例えば、T細胞）C D 3ポリペプチドを含む。C D 3は、3つのITAMを含み、抗原が結合した後に、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）に伝達する。C D 3

鎖の細胞内シグナル伝達ドメインは、内因性TCRからのシグナルの主要なトランスミッターである。ある特定の実施形態では、C D 3ポリペプチドは、NCBI参照番号NP__932170（配列番号31）を有する配列と、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%相同であるアミノ酸配列、またはその断片を含むか、または有する、ならびに/あるいは、必要に応じて、最大1、または最大2、または最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。ある特定の非限定的な実施形態では、C D 3ポリペプチドは、少なくとも20、または少なくとも30、または少なくとも40、または少なくとも50、および最大164アミノ酸長である、配列番号31の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、C D 3ポリペプチドは、配列番号31のアミノ酸1~164、1~50、50~100、100~150、または150~164のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号31のアミノ酸52~164を含むか、または有するC D 3ポリペプチドを含む。

【0156】

配列番号31は以下に提供される：

【化15】

```
1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
61 APAYQQGQNG LYNELNLGRR EYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGE YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [ 配列番号 : 31]
```

【0157】

ある特定の実施形態では、C D 3ポリペプチドは、NCBI参照番号NP__001106864.2（配列番号32）を有する配列と、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、またはその断片を含むか、または有する、ならびに/あるいは、必要に応じて、最大1、または最大2、または最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。ある特定の非限定的な実施形態では、C D 3ポリペプチドは、少なくとも約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90、または少なくとも約100、および最大188アミノ酸長である、配列番号32の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、C D 3ポリペプチドは、配列番号32のアミノ酸1~164、1~50、50~100、52~142、100~150、または150~188のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号32のアミノ酸52~142を含むか、または有するC D 3ポリペプチドを含む。

【0158】

配列番号 32 は以下に提供される：

【化 16】

1 MKWKVSVLAC ILHVRFPAGE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVIIITALY LRAKFSRSAE
61 TAANLQDPNQ LYNELNLGRR EYDVLEKKR ARDPENGGKQ RRRNPQEGVY NALQKDKMAE
121 AYSEIGTKGE RRRGKGDHGL YQDSHFQAVQ FGNRREREGS ELTRTLGLRA RPKACRHKPK
181 LSLPAAVS [配列番号：32]

【0159】

ある特定の形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、以下に提供される配列番号33に示されるアミノ酸配列を含むか、または有するCD3ポリペプチドを含む。

10

【化 17】

RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQEGE [配列番号：33]

【0160】

配列番号33をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号34に示される。

【化 18】

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC
AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAG
CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTG [配列番号：34]

20

【0161】

ある特定の非限定的な形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域をさらに含む。ある特定の形態では、共刺激領域は、少なくとも1つの共刺激分子またはその部分を含む（例えば、共刺激分子の細胞内ドメインまたはその部分）。共刺激シグナル伝達領域は、細胞に最適なリンパ球活性化をもたらす。本明細書で使用される場合、「共刺激分子」は、目的の抗原に対する免疫応答細胞の効率的な応答に必要とされる抗原認識受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子を指す。共刺激分子の非限定的な例としては、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10、CD27、CD40、CD2、およびNKGD2が挙げられる。共刺激分子は、その受容体に結合する際に共刺激応答、すなわち、抗原認識受容体（例えば、CAR）がその標的抗原に結合する場合に提供される刺激をもたらす細胞内応答を生じる細胞表面で発現されるタンパク質である、共刺激リガンドに結合することができる。共刺激リガンドとしては、以下に限定されないが、4-1BBリガンド（4-1BBL）、CD80、CD86、CD70、OX40L、およびICOSLGが挙げられる。一例として、4-1BBLは、活性化シグナルと組み合わせ、CAR-T細胞のエフェクター細胞機能を誘導する共刺激シグナルを与えるために、4-1BB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、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、US 7,446,190に開示される。

30

【0162】

ある特定の形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域（例えば、4-1BBの細胞内ドメインまたはその部分）を含む。4-1BBポリペプチドは、NCBI参照番号NP_001552（配列番号35）を有する配列と、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%、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るアミ

40

50

ノ酸配列、またはその断片を含み得るか、または有し得る、ならびにノあるいは、必要に応じて、最大1、または最大2、または最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。非限定的なある特定の実施形態では、4-1BBポリペプチドは、少なくとも20、または少なくとも30、または少なくとも40、または少なくとも50、および最大255アミノ酸長である、配列番号35の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、4-1BBポリペプチドは、配列番号35のアミノ酸1~220、1~50、50~100、100~150、150~200、または200~255のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの細胞内ドメインまたはその部分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、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒト4-1BBの細胞内ドメインまたはその部分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、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号35のアミノ酸214~255を含むか、または有する4-1BBポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む。配列番号35は以下に提供される。

【化19】

```

1  MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
61  TCDICRQCKG VFTRRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
241 CSCRFPEEEEE GGCEL [ 配列番号 : 35]

```

【0163】

配列番号35のアミノ酸214~255をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号36に示される。

【化20】

```

AAACGGGGCAGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCA
AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTG
[ 配列番号 : 36]

```

【0164】

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ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域（例えば、CD28の細胞内ドメインまたはその部分）を含む。CD28ポリペプチドは、配列番号29もしくは配列番号30に示されるアミノ酸配列と、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは100%相同もしくは同一であるアミノ酸配列、またはその断片を含み得るか、または有し得る、ならびにノあるいは、必要に応じて、最大1、または最大2、または最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。非限定的なある特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、少なくとも20、または少なくとも30、または少なくとも40、または少なくとも50、および最大220アミノ酸長である、配列番号30の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、CD28ポリペプチドは、配列番号29または配列番号30のアミノ酸1~220、1~50、50~100、100~150、150~200、180~220、または200~220のアミノ酸配列を含むか、または有する。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28の細胞内ドメインまたはその部分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、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD28の細胞内ドメインまたはその部分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、ヒトCD28は、配列番号30に示されるアミノ酸配列と、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%

、約 98%、約 99% または 100% 相同または同一であるアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、ヒト CD28 は、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を有する。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 30 のアミノ酸 180 ~ 220 を含むか、または有する CD28 ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む。

【0165】

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、OX40 ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域（例えば、OX40 の細胞内ドメインまたはその分）を含む。OX40 ポリペプチドは、NCBI 参照番号 NP_003318.1（配列番号 37）を有する配列と、少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99% もしくは 100% 相同もしくは同一であるアミノ酸配列、またはその断片を含み得るか、または有し得る、ならびに / あるいは、必要に応じて、最大 1、または最大 2、または最大 3 つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。非限定的なある特定の実施形態では、OX40 ポリペプチドは、少なくとも 20、または少なくとも 30、または少なくとも 40、または少なくとも 50、および最大 277 アミノ酸長である、配列番号 37 の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、OX40 ポリペプチドは、配列番号 37 のアミノ酸 1 ~ 220、1 ~ 50、50 ~ 100、100 ~ 150、150 ~ 200、または 200 ~ 277 を含むか、または有する。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、OX40 の細胞内ドメインまたはその部分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、CAR の細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒト OX40 の細胞内ドメインまたはその部分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、ヒト OX40 は、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列と、少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99% または 100% 相同または同一であるアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、ヒト OX40 は、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列を有する。

【0166】

配列番号 37 は以下に提供される：

【化 21】

```

1   MCVGARRLGR  GPCAALLLLG  LGLSTVTGLH  CVGDTYPSND  RCCHECRPGN  GMVSRCSRSQ
61  NTVCRPCGPG  FYNDVVSSKP  CKPCTWCNLR  SGSERKQLCT  ATQDTVCRCR  AGTQPLDSYK
121 PGVDCAPCPP  GHFSPGDNQA  CKPWTNCTLA  GKHTLQPASN  SSSAICEDRD  PPATQPQETQ
181 GPPARPITVQ  PTEAWPRTSQ  GPSTRPVEVP  GGRAVAAILG  LGLVLGLLGP  LAILLALYLL
241 RRDQRLPPDA  HKPPGGGSFR  TPIQEEQADA  HSTLAKI [ 配列番号 : 37]

```

【0167】

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、ICOS ポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域（例えば、ICOS の細胞内ドメインまたはその部分）を含む。ICOS ポリペプチドは、NCBI 参照番号 NP_036224.1（配列番号 38）を有する配列と、少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99% もしくは 100% 相同もしくは同一であるアミノ酸配列、またはその断片を含み得るか、または有し得る、ならびに / あるいは、必要に応じて、最大 1、または最大 2、または最大 3 つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。非限定的なある特定の実施形態では、ICOS ポリペプチドは、少なくとも 20、または少なくとも 30、または少なくとも 40、または少なくとも 50、および最大 199 アミノ酸長である、配列番号 38 の連続部分であるアミノ酸配列を含むか、または有する。あるいはまたはさらに、非限定的な様々な実施形態では、ICOS ポリペプチドは、配列番号 38 のアミノ酸 1 ~ 220、1 ~ 50、50 ~ 100、100 ~ 150、または 150 ~ 199 のアミノ酸配列を含むか、または有する。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、ICOSの細胞内ドメイン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、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトICOSの細胞内ドメイン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、ヒトICOSは、配列番号38に示されるアミノ酸配列と、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または100%相同または同一であるアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、ヒトICOSは、配列番号38に示されるアミノ酸配列を有する。

【0168】

配列番号38は以下に提供される：

【化22】

```

1  MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGGQ
61  ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFFCN LSIFDPPPFK
121 VTLTGGLYHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY
181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL [ 配列番号：38]

```

10

【0169】

ある特定の実施形態では、CARは、2つの共刺激シグナル伝達ドメインを含み、第1の共刺激ドメインは、4-1BBの細胞内ドメインまたはその部分を含み、第2の共刺激ドメインは、CD28の細胞内ドメインまたはその部分を含む。

20

【0170】

ある特定の実施形態では、本開示のCARは、ヒト細胞において核酸配列を発現するための、誘導性プロモーターをさらに含む。CAR遺伝子を発現するために使用するためのプロモーターは、ユビキチンC(Ubiquitin)プロモーターなどの構成的プロモーターであり得る。

5.3.3.4. 例示的なCAR

【0171】

ある特定の実施形態では、本開示の細胞は、CD19に結合する細胞外抗原結合ドメイン、CD8ポリペプチドを含む膜貫通ドメイン(例えば、ヒトCD8の膜貫通ドメインまたはその部分)、およびCD3ポリペプチドを含む細胞内シグナル伝達ドメインおよび4-1BBポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域(例えば、ヒト4-1BBの細胞内ドメインまたはその部分)を含むCARを含む。

30

【0172】

ある特定の実施形態では、CARは、「19BBz」として示される。ある特定の実施形態では、CAR(例えば、19BBz)は、配列番号19に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR1、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR2、配列番号21に示されるアミノ酸配列を含むV_H CDR3、配列番号22に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR1、配列番号23に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR2、配列番号24に示されるアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む細胞外抗原結合ドメイン；配列番号3に示されるアミノ酸配列または配列番号27のアミノ酸137~207を含むCD8ポリペプチドを含む膜貫通ドメイン；配列番号33に示されるアミノ酸配列を含むCD3ポリペプチドを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、および配列番号35のアミノ酸214~255を含む4-1BBポリペプチドを含む共刺激シグナル伝達領域を含む。

40

【0173】

ある特定の実施形態では、CAR(例えば、19BBz)は、以下に提供される配列番号39に示されるアミノ酸配列と、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%相同または同一であるアミノ酸配列を含む。

50

【化 2 3】

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTA
 DKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQS
 PKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQ
 SKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAPTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG
 LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE
 LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
 SEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR [配列番号 :39]

10

【 0 1 7 4】

配列番号 39 のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号 40 に示される。

【化 2 4 - 1】

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCT
 TCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATT
 GGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCA
 GACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGT
 GCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
 TCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCT
 CCAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACT

20

【化 2 4 - 2】

AATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAAC
 AGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAG
 TCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAG
 CTGGAGATCAAACGGGCGGCCGCCACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCACGATC
 GCGTGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG
 CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTG
 GTTATCACCCCTTTACTGCAACAAACGGGGCAGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGA
 CCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA
 CTGAGAGTGAAGTTAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG
 CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGA
 AAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGCGGAGGCCTAC
 AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA
 GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [配列番号 :40]

30

40

【 0 1 7 5】

ある特定の実施形態では、CAR（例えば、19BBz）は、CD8シグナルペプチドをさらに含む。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 10 に示されるアミノ酸配列を含むか、または有する。配列番号 10 のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号 41 に示される。

【化 2 5】

ATGGCTCTCCAGTGAAGTGCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCA [配列番号 : 41]

【 0 1 7 6】

CD8シグナルペプチドを含む19BBzに関するアミノ酸配列は、以下に提供される

50

配列番号 4 2 に示される。

【化 2 6】

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPFGQGLEWIGQIYPG
 DGDNTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGG
 SGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDR
 FTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS
 LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
 EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [配列番号 :
 42]

10

【0 1 7 7】

配列番号 4 2 のアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列は、以下に提供される配列番号 4 3 に示される。

【化 2 7 - 1】

ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCAGCAG
 TCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGT
 AGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGA
 GATGGTGATACTAACTACAATGAAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACA
 GCCTACATGCAGCTCAGCGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGT
 TCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGA
 TCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACA
 TCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAA

20

【化 2 7 - 2】

CAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGAACAGTGGAGTCCCTGATCGC
 TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGAC
 TATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGGC
 GCCGCACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCTGTCC
 CTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
 ATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC
 AACAAACGGGGCAGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAA
 GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTTCAGC
 AGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGA
 GAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
 CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA
 GCGCAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC
 GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [配列番号 : 43]

30

40

5 . 4 . 細胞

【0 1 7 8】

本開示の主題は、(a) リガンド認識受容体 (例えば、項目 5 . 3 に開示されるリガン
 ド認識受容体)、および (b) I g G 分解酵素 (例えば、項目 5 . 2 に開示される I g G
 分解酵素) を含む細胞を提供する。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、細
 胞を活性化することが可能である。細胞がリガンド認識受容体および I g G 分解酵素を同
 時に発現するように、細胞に、リガンド認識受容体および I g G 分解酵素を形質導入する

50

ことができる。ある特定の実施形態では、I g G分解酵素は、細胞表面に付着されている。ある特定の実施形態では、I g G分解酵素は、細胞表面に付着されておらず、細胞から送達または放出される。

【0179】

ある特定の実施形態では、細胞は、切断可能な（例えば、自己切断可能な）リンカー（例えば、2 Aペプチド、例えば、P 2 Aペプチド、T 2 Aペプチド、E 2 Aペプチド、およびF 2 Aペプチド）をさらに含む。ある特定の実施形態では、細胞は、P 2 Aペプチドをさらに含む。ある特定の実施形態では、P 2 Aペプチドは、リガンド認識受容体とI g G分解酵素の間に位置する。ある特定の実施形態では、P 2 Aペプチドは、以下に提供される配列番号44に示されるアミノ酸配列を含むか、または有する：

【化28】

ATNFSLLKQAGDVEENPGP [配列番号：44]

【0180】

配列番号44に示されるアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号45に示される。

【化29】

GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT [配列番号：

45]

【0181】

ある特定の実施形態では、細胞は、応答性細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、応答性細胞、例えば、免疫応答性細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、活性化可能な細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、リンパ系列の細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、骨髄系列の細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、正常組織に由来する、例えば、腎臓、肝臓、肺、骨髄、または脾臓に由来する細胞である。

【0182】

リンパ系列の細胞は、抗体の産生、細胞免疫系の調節、血中の外来の病原因子の検出、宿主に対して外来の細胞の検出などをもたらし得る。リンパ系列の細胞の非限定的な例としては、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、樹状細胞、およびリンパ系細胞に分化し得る幹細胞が挙げられる。幹細胞は、多能性幹細胞（例えば、胚性幹細胞、および人工多能性幹細胞）であってもよい。

【0183】

ある特定の実施形態では、細胞は、T細胞である。T細胞は、胸腺において成熟するリンパ球であってもよく、大部分が細胞媒介性免疫を担う。T細胞は、獲得免疫系に関与する。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（または幹様メモリーT細胞）、および2型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}細胞を含む）、制御性T細胞（サプレッサーT細胞としても公知）、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、ナチュラルキラーT細胞（NK T細胞）、粘膜関連インバリアントT細胞、およびT細胞を含むがこれらに限定されない、いずれかの型の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の導入によって、特定の抗原を標的とするよう遺伝子改変され得る。T細胞は、CD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞であってもよい。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。

【0184】

ある特定の実施形態では、細胞は、NK細胞である。ナチュラルキラー（NK）細胞は

10

20

30

40

50

、細胞媒介性免疫の一部であり、自然免疫応答において作用するリンパ球であり得る。NK細胞は、標的細胞における細胞傷害性効果を発揮するために、事前の活性化を必要としない。

【0185】

本開示の主題のヒトリンパ球の型としては、限定されないが、末梢ドナーリンパ球、例えば、Sadelain, M., et al. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45 (CARを発現するように遺伝子改変された末梢ドナーリンパ球を開示する)、Morgan, R.A., et al. 2006 Science 314:126-129 (およびヘテロ二量体を含む完全長腫瘍抗原認識T細胞受容体複合体を発現するよう遺伝子改変された末梢ドナーリンパ球を開示する)、Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:4382-4392 (腫瘍生検において腫瘍浸潤リンパ球(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 (人工抗原提示細胞(AAPC)またはパルスされた樹状細胞を用いて*in vitro*で選択的に拡大された抗原特異的末梢血白血球を開示する)に開示されたものが挙げられる。

10

【0186】

細胞(例えば、T細胞)は、自家、非自家(例えば、同種異系)であってもよく、*in vitro*で、操作された前駆体または幹細胞に由来してもよい。ある特定の実施形態では、細胞は、同種異系細胞である。

20

【0187】

ある特定の実施形態では、細胞は、骨髄系列の細胞である。骨髄系列の細胞の非限定的な例としては、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球、および骨髄細胞に分化し得る幹細胞が挙げられる。

【0188】

ある特定の実施形態では、本開示の細胞は、治療において使用される。ある特定の実施形態では、本開示の細胞は、細胞療法において使用される。ある特定の実施形態では、本開示の細胞は、遺伝子治療において使用される。ある特定の実施形態では、本開示の細胞は、CRISPR遺伝子治療において使用される。細胞操作の分野は、特に、CRISPR-Cas9技術の使用が普及してきているため、および複数の外来タンパク質の細胞内への導入に関しては、細胞の免疫原性が重要な関心事となっているため、拡大している。免疫原性細胞は患者から迅速に排除され、それらの有効性が低下してしまう(Porter et al., Science Translational Medicine (2015); 7; Maude et al., N Engl J Med. (2014); 371:1507-1517; Louis et al., Blood (2011); 118:6050-6056)。遺伝子治療は、多くの場合、ウイルス遺伝子または他の外来のヘルパー遺伝子を伴う細胞へと外来遺伝子を挿入することに関与する。血友病処置および他の遺伝性障害において使用されるAAVウイルス由来などのウイルスタンパク質は、数カ月または数年間患者において存続することができ、免疫応答の標的としての役割を果たす。

30

40

【0189】

本開示の細胞は、外来の細胞の免疫原性を軽減することができる。

【0190】

ある特定の実施形態では、本開示の細胞は、免疫療法において使用される。ある特定の実施形態では、本開示の細胞は、養子細胞移入(ACT)において使用される。迅速に出現し、個別化されたタイプの免疫療法は、患者の免疫細胞が、患者のがんを処置するためのツールとして使用される、養子細胞移入(ACT)である(Kalos et al., Immunity (2013); 39:49-60)。T細胞は、腫瘍細胞を認識する

50

ように遺伝子操作され、*in vitro*で拡大され、次いで、患者へと戻され得る。キメラ抗原受容体(CAR)T細胞、T細胞受容体(TCR)操作されたT細胞、および腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を含むいくつかの種類のACTが存在する(Rosenberg et al., *Nature Reviews Cancer* (2008); 8: 299 - 308)。ACTでは、T細胞は、腫瘍細胞を認識するように遺伝子操作され、*in vitro*で拡大され、次いで、患者へと戻され得る。

【0191】

CAR T細胞療法は、2017年にFDAに承認された2つの治療を含む臨床実践場で進歩した(Zheng et al., *Drug Discovery Today* (2018); 23: 1175 - 1182)。この分野における継続的努力は、腫瘍の輸送(trafficking)および認識を改善し、それらの増殖および持続性を増加させ、それらの活性に対する本発明者らのコントロールを強化するために、CAR T細胞療法の現在の限界を対象としている(Lim et al., *Cell* (2017); 168: 724 - 740)。オフターゲット効果の低下および毒性の減少、ならびに全体的有効性の改善を伴うACTの改善が必要とされる。患者における体液性応答は、それらを投与される患者のCAR T細胞に対して観察されている。このような抗体は、CAR構築物タンパク質、および形質導入に使用されるレトロウイルスベクター由来のプロウイルスタンパク質に対するものであった(Kershaw et al., *Clinical Cancer Research* (2006); 12: 6106 - 6115; Lamers et al., *Blood* (2011); 117: 72 - 82; Jensen et al., *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2010); 16: 1245 - 1256.7 - 9)。細菌タンパク質がCRISPR技術の使用によってCAR T細胞操作のために使用されるので、また重要なことには、同種異系のCAR T細胞がより普及しているので、免疫原性はより一般的な問題にもなり得る(Jung et al., *Molecules and Cells* (2018); 41: 717 - 723; Graham et al., *Cells* (2018); 7: 155)。

【0192】

本開示の細胞は、ACT有効性を改善することができる、および/またはCAR T細胞に対する抗原性に関連して毒性を低減することができる。

【0193】

本開示の細胞は、体液性応答に対する耐性を増加させ、これにより、CAR T細胞の末梢持続性の延長が可能になり、それによって、より強力な活性(例えば、抗腫瘍活性)がもたらされる。細胞の持続性の延長は、細胞療法の費用対効果も改善することができる(例えば、通常、非常に高い費用を伴うACT)。

【0194】

CAR-T細胞への抗体の結合により、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)または補体依存性細胞傷害(CDC)によるCAR T細胞の溶解がもたらされ、よって、治療効果の低下が生じ得る。抗イディオタイプ抗体は、CAR T細胞機能を中和させることが示されている(Lamers et al., *Blood* (2011); 117: 72 - 82)。CAR T細胞の制限された末梢持続性は、細胞応答にも寄与しており、ここで、CAR T細胞は、内因性T細胞によって標的とされる(Lamers et al., *Blood* (2011); 117: 72 - 82; Jensen et al., *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2010); 16: 1245 - 1256)。炭酸脱水酵素IX(CAIX)を標的とするCAR T細胞モデルにおいて観察される抗CAR免疫を担うエピトープが同定され、これには、CARの相補性決定領域およびフレームワーク領域に由来するペプチド配列、またSFGレトロウイルスベクターに由来するプロウイルス配列が含まれた(Lamers et al., *Blood* (2011); 117: 72 - 82)。この問題に対処するためにとられた1つのアプローチは、CARを非免疫原性にするために、C

10

20

30

40

50

ARをヒト化することである(Gonzales et al., Tumor Biology (2005); 26:31-43)。しかし、これは、ウイルスベクターに特異的な免疫応答の問題にも、同種異系細胞の問題にも対処しないであろう。本開示の細胞は、CAR T細胞療法などの外来の細胞療法に対する体液性応答を克服することができ、抗細胞抗体による細胞活性の中和を妨げることができる。

【0195】

文献には、抗CAR抗体の形成に関する先行技術が存在するが、しかし、これらの療法の成功に対してはかなりの障害が存在する(Kershaw et al., Clinical Cancer Research (2006); 12:6106-6115; Lamers et al., Blood (2011); 117:72-82; Jensen et al., Biology of Blood and Marrow Transplantation (2010); 16:1245-1256; Jung et al., Molecules and Cells (2018); 41:717-723; Graham et al., Cells (2018); 7:155)。

10

【0196】

宿主体液性応答に対する生体分子シールド(例えば、潜在的な抗体)としての役割を果たすIgG分解酵素(例えば、IdeS)を含む本開示の細胞(presently discloses cells)。細胞におけるIgG分解酵素の発現によって、a)抗CAR抗体を中和することからの保護、b)細胞(例えば、操作されたCAR T細胞)の持続性の延長、およびc)治療活性ウインドウの延長がもたらされ、それによって、全体的により高い有効性が得られる。CAR-T細胞の分野における他のアプローチは、例えば、HLA IおよびTCRを除去することによって、CAR T細胞に対する細胞免疫応答に焦点を当てている(Zhao et al., Journal of Hematology and Oncology (2018); 11:1-9)。しかし、本発明者らの認識として、これは、抗体に駆動される宿主免疫応答に対処することを直接目的とする最初の研究である。

20

5.5. 組成物およびベクター

【0197】

本開示の主題(the present discloses subject matter)は、本明細書に開示されるIgG分解酵素(例えば、項目5.2に開示される)および本明細書に開示されるリガンド認識受容体(例えば、項目5.3に開示される)を含む組成物を提供する。このような組成物を含む細胞も提供される。

30

【0198】

ある特定の実施形態では、IgG分解酵素は、第1のプロモーターに作動可能に連結している。ある特定の実施形態では、リガンド認識受容体は、第2のプロモーターに作動可能に連結している。

【0199】

ある特定の実施形態では、組成物は、切断可能な(例えば、自己切断可能な)リンカー(例えば、2Aペプチド、例えば、P2Aペプチド、T2Aペプチド、E2Aペプチド、およびF2Aペプチド)をさらに含む。ある特定の実施形態では、組成物は、P2Aペプチドをさらに含む。ある特定の実施形態では、P2Aペプチドは、リガンド認識受容体とIgG分解酵素の間に位置する。ある特定の実施形態では、P2Aペプチドは、配列番号43に示されるアミノ酸配列を含むか、または有する。

40

【0200】

さらに、本開示の主題(the present discloses subject matter)は、本明細書に開示されるIgG分解酵素(例えば、項目5.2に開示される)をコードする第1のポリヌクレオチドおよび本明細書に開示されるリガンド認識受容体(例えば、項目5.3に開示される)をコードする第2のポリヌクレオチドを含む核酸組成物を提供する。このような核酸組成物を含む細胞も提供される。

【0201】

50

ある特定の実施形態では、核酸組成物は、I g G分解酵素に作動可能に連結した第1のプロモーターをさらに含む。ある特定の実施形態では、核酸組成物は、リガンド認識受容体に作動可能に連結した第2のプロモーターをさらに含む。

【0202】

ある特定の実施形態では、第1および第2のプロモーターの一方または両方は、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(E F) - 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。

【0203】

ある特定の実施形態では、核酸組成物は、切断可能な(例えば、自己切断可能な)リンカー(例えば、2Aペプチド、例えば、P2Aペプチド、T2Aペプチド、E2Aペプチド、およびF2Aペプチド)をさらに含む。ある特定の実施形態では、核酸組成物は、P2Aペプチドをさらに含む。ある特定の実施形態では、P2Aペプチドは、リガンド認識受容体とI g G分解酵素の間に位置する。ある特定の実施形態では、P2Aペプチドは、配列番号45に示されるヌクレオチド配列を含むか、または有する。組成物および核酸組成物は、対象に投与することができる、および/または当技術分野で公知の方法によるかもしくは本明細書に記載されたように細胞内に送達することができる。

【0204】

細胞(例えば、免疫応答性細胞、例えば、T細胞またはNK細胞)の遺伝子改変は、組換えDNA構築物を実質的に均一な細胞組成物に形質導入することによって達成することができる。ある特定の実施形態では、レトロウイルスベクター(ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルスのいずれか)が、核酸組成物の細胞内への導入に用いられる。例えば、I g G分解酵素をコードする第1のポリヌクレオチドおよびリガンド認識受容体をコードする第2のポリヌクレオチドをレトロウイルスベクター中にクローニングすることができ、その内因性プロモーターから、レトロウイルスの長鎖末端反復配列から、または目的の標的細胞型に特異的なプロモーターから、発現が駆動され得る。非ウイルスベクターも同様に使用することができる。

【0205】

リガンド認識受容体(例えば、CARまたはTCR)を含むための細胞の最初の遺伝子改変のために、レトロウイルスベクターが、一般に、形質導入のために用いられるが、しかし、任意の他の好適なウイルスベクターまたは非ウイルス送達系も使用することができる。リガンド認識受容体およびI g G分解酵素は、単一のマルチシストロニック発現カセット、単一のベクターの複数の発現カセット、または複数のベクターにおいて構築することができる。ポリシストロニック発現カセットを生じるエレメントの例としては、以下に限定されないが、様々なウイルスおよび非ウイルスの配列内リボソーム進入部位(IRES、例えば、FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF- β IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、A型肝炎IRES、C型肝炎IRES、ペストウイルス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)ならびに切断可能なリンカー(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。レトロウイルスベクターと適切なパッケージング系の組合せは、キャプシドタンパク質が、ヒト細胞に感染するのに機能的である場合にも好適である。様々なアンホトロピックウイルス産生細胞系が公知であり、以下に限定されないが、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)が含まれる。非アンホトロピック粒子、例えば、VSVG、RD114またはGALVエンベロープおよび当技術分野で公知の任意の他のものでシュードタイプ化された粒子も好適である。

10

20

30

40

50

【0206】

形質導入の可能な方法には、例えば、Bregni, et al. (1992) Blood 80:1418-1422の方法による、細胞の産生細胞との直接的共培養、あるいは例えば、Xu, et al. (1994) Exp. Hemat. 22:223-230;およびHughes, et al. (1992) J. Clin. Invest. 89:1817の方法によって、ウイルス上清単独と、または適切な成長因子およびポリカチオンありまたはなしの濃縮ベクターストックと培養することも含まれる。

【0207】

他の形質導入ウイルスベクターを使用して、細胞を改変してもよい。ある特定の実施形態では、選択されたベクターは、感染の高い効率ならびに安定した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., Bio Techniques 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、特によく開発されており、臨床実践場面で使用されている(Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990;Andersonらの米国特許第5,399,346号)。

【0208】

非ウイルスアプローチも、細胞の遺伝子改変に用いることができる。例えば、リポフェクションの存在下で核酸を投与することによって(Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987;Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990;Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989;Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983)、アジ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)、または外科手術条件下でのマイクロインジェクション(Wolff et al., Science 247:1465, 1990)によって、核酸分子を細胞内に導入

10

20

30

40

50

することができる。遺伝子移入のための他の非ウイルスによる手段には、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* トランスフェクションが含まれる。DNAの細胞内への送達には、リボソームも潜在的に有益であり得る。正常な遺伝子の、対象の罹患組織への移植は、正常な核酸を、*ex vivo* で培養可能な細胞型（例えば、自家または異種の初代細胞またはその後代）に移入し、その後、細胞（またはその子孫）を標的化組織に注射するか、または全身的に注射することによって達成され得る。組換え受容体はまた、トランスポサゼまたは標的化されたヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはTALENヌクレアーゼ、CRISPR）を使用して誘導され得るか、または得ることができる。一過的発現は、RNA電気穿孔によって得ることができる。

10

【0209】

いずれかの標的化ゲノム編集方法を使用して、本明細書に開示されるIgG分解酵素および/またはリガンド認識受容体を細胞または対象に送達することができる。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IgG分解酵素および/またはリガンド認識受容体を送達する。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IgG分解酵素および/またはリガンド認識受容体を送達する。ある特定の実施形態では、TALEN系を使用して、本明細書に開示されるIgG分解酵素および/またはリガンド認識受容体を送達する。

【0210】

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）システムは、原核細胞において発見されたゲノム編集ツールである。ゲノム編集のために利用される場合、このシステムは、Cas9（*crRNA*をそのガイドとして利用してDNAを改変することができるタンパク質）、CRISPR RNA（*crRNA*、Cas9と活性複合体を形成する*tracrRNA*（一般に、ヘアピンループ形態の）に結合する領域と一緒に、宿主DNAの正しいセクション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）、*trans*活性化*crRNA*（*tracrRNA*、*crRNA*に結合し、Cas9と活性複合体を形成する）、およびDNA修復鋳型（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）の必要に応じたセクションを含む。CRISPR/Cas9は、標的細胞にトランスフェクトするためにプラスミドを用いることが多い。*crRNA*は、Cas9が、細胞内の標的DNAを特定し、それに直接結合するために使用する配列であるため、適用ごとに設計される必要がある。CAR発現カセットを保有する修復鋳型も、それが、切断のいずれかの側の配列と重複し、かつ挿入配列をコードしなければならないため、適用ごとに設計される必要がある。複数の*crRNA*および*tracrRNA*と一緒にパッケージングして、単一のガイドRNA（*sgRNA*）を形成することができる。この*sgRNA*は、Cas9遺伝子と一緒に接合され、プラスミドにされ、細胞内にトランスフェクトされ得る。

20

30

【0211】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）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人工的制限酵素である。ジンクフィンガードメインは、特定のDNA配列を標的とするように操作されてもよく、それにより、ジンクフィンガーヌクレアーゼがゲノム内の所望の配列を標的とすることが可能になる。個々のZFNのDNA結合ドメインは、典型的には、複数の個々のジンクフィンガーリピートを含有し、それぞれ、複数の塩基対を認識することができる。新たな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、公知の特異性のより小さなジンクフィンガー「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由来の非特異的切断ドメインである。内因性相同組換え（HR）機構およびCAR発現カセットを保有する相同DNA鋳型を使用すると、ZFNを使用して、CAR発現カセットをゲノム内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DNA鋳型の間の相同性を検索し、次いで、染色体の2つの破壊された末端の間の鋳型

40

50

の配列をコピーし、それによって、相同DNA鋳型がゲノム内に組み込まれる。

【0212】

転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) は、DNAの特定の配列を切断するよう操作され得る制限酵素である。T A L E Nシステムは、Z F Nとほとんど同じ原理で作用する。これらは、転写アクチベーター様エフェクター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。転写アクチベーター様エフェクター (T A L E) は、特定のヌクレオチドに対する強力な認識を有する2つの可変位置を有する33~34アミノ酸反復モチーフから構成される。これらのT A L Eのアレイをアセンブルすることによって、T A L E 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、ゲノム内の特定の場所で切断するようヌクレアーゼをガイドすることができる。ポリヌクレオチド治療方法において使用するためのcDNA発現を、任意の好適なプロモーター (例えば、ヒトサイトメガロウイルス (C M V)、シミアンウイルス40 (S V 40)、またはメタロチオネインプロモーター) から指示することができ、任意の適切な哺乳類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) によって調節することができる。例えば、所望の場合、特定の細胞型において遺伝子発現を優先的に指示することが公知のエンハンサーを使用して、核酸の発現を指示することができる。使用されるエンハンサーとしては、限定されないが、組織または細胞特異的エンハンサーとして特徴付けられるものを挙げることができる。あるいは、ゲノムクローンが治療用構築物として使用される場合、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、同族の調節配列によって、または所望の場合、異種供給源に由来する調節配列によって、調節が媒介され得る。

10

20

【0213】

得られる細胞は、未改変細胞に関する条件に類似する条件下で成長することができ、それによって、改変細胞は拡大され、種々の目的で使用され得る。

【0214】

ゲノム編集剤/システムを送達するための方法は、その必要性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は、1つまたは複数のプラスミドにおいて核酸組成物 (例えば、DNA構築物) として送達される。ある特定の実施形態では、構成成分は、ウイルスベクターによって送達される。一般的な送達方法としては、以下に限定されないが、電気穿孔、マイクロインジェクション、遺伝子銃、インパルフェクション (i m p a l e f e c t i o n)、静水圧、持続注入、超音波処理、マグネトフェクション、アデノ随伴ウイルス、ウイルスベクターのエンベロープタンパク質シュードタイプ化、複製コンピテントベクター c i s および t r a n s 作用エレメント、単純ヘルペスウイルス、および化学的ビヒクル (例えば、オリゴヌクレオチド、リボプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、デンドリマー、無機ナノ粒子、および細胞透過性ペプチド) が挙げられる。

30

【0215】

本明細書に開示される組成物または核酸組成物は、ゲノム内の任意の場所に配置され得る。ある特定の実施形態では、組成物または核酸組成物は、T細胞のゲノム内の部位に配置される。

40

5.6. ポリペプチドおよびアナログ

【0216】

所望の目的のため、例えば、細胞内で発現される場合、それらの抗新生物および/または抗腫瘍活性を増強するための方法で改変される、本明細書に開示されるポリペプチド (例えば、C D 1 9、4 - 1 B B、C D 2 8、C D 3、およびI g G分解酵素またはその断片) も本開示の主題に含まれる。本開示の主題は、配列において変更を生じさせることによってアミノ酸配列または核酸配列を最適化するための方法、ならびに改変されたアミノ酸配列および核酸配列を提供する。このような変更には、ある特定の変異、欠失、挿入、または翻訳後修飾が含まれてもよい。本開示の主題は、本明細書に開示される任意の天然に存在するポリペプチドのアナログをさらに含む。アナログは、アミノ酸配列の差異に

50

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天然に存在するポリペプチドと異なり得る。アナログは、本開示の主題の天然に存在するアミノ酸配列 (amino , acid sequence) のすべてまたはその一部と、少なくとも約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99% またはそれより高い割合で相同であることを示し得る。配列比較の長さは、少なくとも 5、10、15 もしくは 20 アミノ酸残基、例えば、少なくとも 25、50、もしくは 75 アミノ酸残基、または 100 を超えるアミノ酸残基である。ここでもやはり、同一性の程度を決定することに対する例示的なアプローチでは、BLAST プログラムを使用することができ、 e^{-3} と e^{-100} の間の確率スコアは密接に関連する配列を示す。改変には、ポリペプチドの *in vivo* および *in vitro* の化学誘導体化、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が含まれ、このような改変は、ポリペプチドの合成もしくはプロセッシング中に、または単離された改変酵素を用いた処理の後に起こり得る。アナログは、一次配列の変更によっても天然に存在するポリペプチドと異なり得る。これらには、自然の、および誘導された遺伝学的バリエーションの両方 (例えば、放射線照射もしくはエタンメチルスルフェートへの曝露によるランダム変異誘発からもたらされるか、または Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), CSH Press, 1989、もしくは Ausubel et al., 上掲に記載されている部位特異的変異誘発による) が含まれる。例えば、D-アミノ酸または天然に存在しないかもしくは合成アミノ酸 (例えば、またはアミノ酸) のような、L-アミノ酸以外の残基を含有する環化ペプチド、分子、およびアナログも含まれる。

【0217】

全長ポリペプチドに加えて、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 の連続するアミノ酸、少なくとも 30 の連続するアミノ酸、または少なくとも 50 の連続するアミノ酸を含む。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するアミノ酸を含む。断片は、当業者に公知の方法によって生成されてもよく、または通常のプロセッシング (例えば、新生ポリペプチドからの、生物学的活性に必要なとされないアミノ酸の除去、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ッシング事象によるアミノ酸の除去) から得られてもよい。

【0218】

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 (例えば、IgG 分解酵素) 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。このようなアナログは、元のポリペプチドの生理学的活性を超える場合がある。アナログ設計の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細胞内で発現された場合に、元のポリペプチドの抗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、このような方法に従って実施することができる。これらの化学的改変には、代替の R 基を置換すること、および参照ポリペプチドの特定の炭素原子における飽和度を変更することが含ま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* での分解に対して比較的耐性であり、投与の際により延長された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には、以下の実施例に記載されるものが含まれるがこれらに限定されない。

5.7. 投与

【0219】

本開示の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、ならびに/または新生物、病原体感染、もしくは感染性疾患を処置および/もしくは防止するために、全身的または直接的に対象に与えられてもよい。ある特定の実施形態では

、本開示の細胞、組成物、または核酸組成物は、目的の臓器（例えば、新生物に罹患した臓器）に直接注入される。あるいは、本開示の細胞、組成物、または核酸組成物は、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与えられる。増殖および分化剤（*expansion and differentiation agent*）は、*in vitro*または*in vivo*で、細胞（例えば、T細胞（例えば、CTL細胞）またはNK細胞）の生成を増加させるために、細胞、組成物、または核酸組成物の投与前、その間またはその後と与えることができる。

【0220】

本開示の細胞、組成物、または核酸組成物は、静脈内、皮下、リンパ節内、腫瘍内、髄腔内、胸腔内、腹腔内、および皮膚を含むがこれらに限定されない任意の好適な経路で投与することができる。ある特定の実施形態では、本開示の細胞、組成物、または核酸組成物は、対象に、腹腔内投与される。通常、少なくとも約 1×10^5 個の細胞が投与され、最終的に約 1×10^{10} 個またはそれより多くに達する。本開示の細胞は、細胞の不純な、または精製された集団を含み得る。当業者は、蛍光標識細胞分取（FACS）などの様々な周知の方法を使用して、集団における本開示の細胞のパーセンテージを容易に決定することができる。本開示の細胞を含む集団における純度の好適な範囲は、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、当業者によって容易に調整され得る（例えば、純度の低下には、投薬量の増加が必要とされ得る）。細胞は、注射、カテーテルなどによって導入することができる。細胞は、様々な系列の、 10^9 または最大 10^{11} 個の細胞を含む臓器または組織から構成されていてもよい。

【0221】

本開示の組成物は、本開示の細胞またはそれらの前駆体および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であってもよい。投与は、自家または異種であってもよい。例えば、細胞、または前駆体は、1つの対象から得られ、同じ対象または異なる、適合性対象に投与されてもよい。末梢血由来の細胞またはそれらの後代（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によって投与され得る。本開示の主題の治療用組成物（例えば、本開示の免疫応答性細胞を含む医薬組成物）を投与する場合、これは、注射可能な単位剤形（液剤、懸濁剤、乳剤）に製剤化され得る。

5.8. 製剤

【0222】

本開示の細胞を含む組成物は、滅菌液体調製物、例えば、等張水性液剤、懸濁剤、乳剤、分散液剤、または粘性組成物（選択されたpHに緩衝され得る）として、好都合に提供され得る。液体調製物は、通常、ゲル剤、他の粘性組成物、および固体組成物よりも調製するのが容易である。さらに、液体組成物は、特に注射によって投与するのが、多少なりともより都合がよい。一方、粘性組成物は、適切な粘度範囲内で製剤化され、特定の組織とより長い接触期間を得ることができる。液体または粘性の組成物は、担体を含んでもよく、担体は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であってもよい。

【0223】

滅菌注射用液剤は、所要量の適切な溶媒に、遺伝子改変された免疫応答性細胞を、所望の場合、様々な量の他の成分と共に組み込むことによって調製することができる。このような組成物は、好適な担体、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、ブドウ糖などと混合されてもよい。組成物は、凍結乾燥されてもよい。組成物は、補助物質、例えば、所望の投与経路および調製物に応じて、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、ゲル化または増粘添加剤、防腐剤、着

香剤、着色剤などを含有することができる。不要な実験をすることなく、好適な調製物を調製するために、参照により本明細書に組み込まれる、"REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985などの標準的なテキストを参照してもよい。

【0224】

抗微生物防腐剤、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滅菌性を増強する様々な添加剤を添加してもよい。微生物活動の防止は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって確実にすることができる。注射可能な医薬形態の吸収の延長は、吸収を遅延させる剤、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、本開示の主題によれば、使用される任意のビヒクル、希釈剤、または添加剤は、遺伝子改変された免疫応答性細胞またはそれらの前駆体と適合性でなければならない。

10

【0225】

組成物は、等張性であってもよく、すなわち、これらは、血液および涙液と同じ浸透圧を有してもよい。組成物の所望の等張性は、塩化ナトリウム、あるいは他の薬学的に許容される剤、例えば、ブドウ糖、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することができる。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剤のためのものであり得る。

【0226】

組成物の粘度は、所望の場合、薬学的に許容される増粘剤を使用して、選択されたレベルに維持することができる。例えば、メチルセルロースは、容易かつ経済的に利用可能であり、共に作用し易い。他の好適な増粘剤としては、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、カルボマーなどが挙げられる。増粘剤の濃度は、選択される剤に依存し得る。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、好適な担体および他の添加剤の選択は、正確な投与経路および特定の剤形、例えば、液体剤形の性質（例えば、組成物が、液剤、懸濁剤、ゲル剤または別の液体形態、例えば、持続放出（time release）形態もしくは液体充填形態に製剤化されるべきかどうか）に依存する。

20

【0227】

投与される細胞の量は、処置される対象に対して変化する。ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答性細胞の約 10^4 ～約 10^{10} 個の間、約 10^5 ～約 10^9 個の間、または約 10^6 ～約 10^8 個の間が対象（例えば、ヒト対象）に投与される。ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答性細胞の約 10^4 ～約 10^7 個の間、または約 10^5 ～約 10^7 個の間が対象（例えば、ヒト対象）に投与される。より効果的な細胞は、さらにより少ない数で投与される場合がある。ある特定の実施形態では、本開示の免疫応答性細胞の少なくとも約 1×10^8 、約 2×10^8 、約 3×10^8 、約 4×10^8 、または約 5×10^8 個が対象（例えば、ヒト対象）に投与される。有効用量と考えられるものの正確な決定は、それらのサイズ、年齢、性別、体重、および特定の対象の状態を含む、各対象に固有の要因に基づいてもよい。投薬量は、本開示および当技術分野における知識から、当業者によって容易に確認され得る。

30

40

【0228】

当業者は、組成物中の、および方法において投与されるべき、細胞ならびに必要な応じた添加剤、ビヒクル、および/または担体の量を容易に決定することができる。典型的には、任意の添加剤（活性細胞（複数可）および/または剤（複数可）に加えて）は、リン酸緩衝食塩水中、0.001～50%（重量）溶液の量で存在し、活性成分は、マイクログラムからミリグラムのオーダーで、例えば、約0.0001～約5wt%、約0.0001～約1wt%、約0.0001～約0.05wt%または約0.001～約20wt%、約0.01～約10wt%、または約0.05～約5wt%で存在する。動物またはヒトに投与されるべき任意の組成物に関して、以下のものを決定することができる：好適な動物モデル、例えば、マウスなどの齧歯類において、致死用量（LD）およびLD50

50

を決定することなどによる毒性；好適な応答を誘発する組成物（複数可）の投薬量、その中の構成成分の濃度および組成物（複数可）を投与するタイミング。このような決定は、当業者の知識、本開示および本明細書において引用される文書から、不要な実験を必要としない。そして、逐次的投与のための時間は、不要な実験を用いずに確認することができる。

5.9. 使用方法

【0229】

本開示の主題は、本開示の細胞、本開示の組成物、または本開示の核酸組成物を、例えば、処置または治療のために、対象に投与するための方法を提供する。処置または治療の非限定的な例としては、免疫療法（例えば、養子細胞移入）、細胞療法（cell therapy）（または細胞療法（cellular therapy））、幹細胞移植、臓器移植、遺伝子療法（例えば、CRISPR遺伝子編集療法）、ウイルス注入（例えば、AAV）、核酸、遊離核酸もしくはより安定化されたアナログ、mRNAもしくは安定化されたmRNAを含有するナノ粒子、または対象の操作された細胞を含有する臓器もしくは組織が挙げられる。本開示の細胞、組成物、および核酸組成物は、治療、処置、または医薬において使用することができる。ある特定の実施形態では、宿主体液性応答に対する増加した耐性、細胞の延長された持続性、および/または外来細胞の緩和された免疫原性が、治療または処置に対して望ましい。

10

【0230】

本開示の主題は、対象における新生物を処置および/または防止するための方法を提供する。本開示の細胞、組成物、および核酸組成物は、対象における新生物を処置および/または防止するために使用することができる。本開示の細胞、組成物、および核酸組成物は、新生物を患っている対象の生存時間を延長するために使用することができる。

20

【0231】

本開示の主題は、対象、例えば、免疫不全状態のヒト対象における病原体感染または他の感染性疾患を処置および/または防止するための方法を提供する。本開示の細胞、組成物、および核酸組成物は、対象、例えば、免疫不全状態のヒト対象における病原体感染または他の感染性疾患を処置および/または防止するために使用することもできる。このような方法は、有効量で、本開示の細胞、本開示の組成物（例えば、医薬組成物）、または本開示の核酸組成物を投与し、所望の効果（たとえそれが、既存の状態の緩和または再発の防止であっても）を達成するステップを含む。

30

【0232】

本開示の主題は、対象における自己免疫疾患を処置および/または防止するための方法を提供する。本開示の細胞、組成物、および核酸組成物は、対象における自己免疫疾患を処置および/または防止するためにも使用することができる。このような方法は、有効量で、本開示の細胞、本開示の組成物（例えば、医薬組成物）、または本開示の核酸組成物を、自己免疫疾患を有する対象に投与するステップを含む。

【0233】

本開示の主題は、対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止するための方法であって、対象が臓器移植を受ける、方法を提供する。本開示の細胞、組成物、および核酸組成物を、対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止するために使用することもでき、対象は臓器移植を受ける。このような方法は、有効量で、本開示の細胞、本開示の組成物（例えば、医薬組成物）、または本開示の核酸組成物を、臓器移植を受ける対象に投与するステップを含む。

40

【0234】

本開示の主題は、対象における自家または同種異系細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止するための方法であって、対象が細胞療法を受ける、方法を提供する。本開示の細胞、組成物、および核酸組成物を、細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止するために使用することもでき、対象は細胞療法を受ける。このような方法は、有効量で、本開示の細胞、本開示の組成物（例えば、医

50

薬組成物)、または本開示の核酸組成物を、細胞療法を受ける対象に投与するステップを含む。

【0235】

処置では、投与される量は、所望の効果を生じるのに有効な量である。有効量は、1回または一連の投与において与えることができる。有効量は、ポーラスで、または連続的灌流によって与えることができる。

【0236】

「有効量」(すなわち、「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のに十分な量である。有効量は、1回または複数回の用量で対象に投与することができる。処置に関して、有効量は、疾患の進行を軽減するか、軽快させるか、安定化させるか、逆転させるか、もしくは遅らせる、またはそうでなければ、疾患の病理学的結果を低減させるのに十分な量である。有効量は、一般に、個々の場合に依りて医師によって決定され、当業者の技術の範囲内である。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、典型的には、いくつかの要因が考慮される。これらの要因には、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細胞の形態および有効濃度が含まれる。

10

【0237】

抗原に特異的なT細胞を使用する養子免疫療法では、約 $10^6 \sim 10^{10}$ (例えば、約 10^9)個の範囲の細胞用量が、典型的に注入される。本開示の細胞の宿主への投与、およびその後の分化の際に、特異的抗原に対して特異的に方向付けられるT細胞が誘導される。

20

新生物

【0238】

本開示の主題は、対象における新生物を処置および/または防止するための方法を提供する。本方法は、本開示の細胞、本開示の組成物、または本開示の核酸組成物の有効量を、新生物を有する対象に投与するステップを含み得る。

【0239】

新生物の非限定的な例としては、血液がん(例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫)、卵巣がん、乳がん、膀胱がん、脳がん、結腸がん、腸がん、肝臓がん、肺がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、神経膠芽腫、咽頭がん、黒色腫、神経芽腫、腺癌、神経膠腫、軟組織肉腫、および様々な癌(前立腺がんおよび小細胞肺癌を含む)が挙げられる。好適な癌は、腫瘍学の分野で公知の任意のものをさらに含み、以下に限定されないが、星状細胞腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、乏突起神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、原始神経外胚葉腫瘍(PNET)、軟骨肉腫、骨原性肉腫、膵管腺癌、小細胞肺腺癌および大細胞肺腺癌、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、扁平上皮癌、細気管支肺胞癌、上皮性腺癌、ならびにこれらの肝転移、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫(lymphangioma)、ヘパトーマ、胆管癌、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、横紋筋肉腫、結腸癌、基底細胞癌、汗腺癌、乳頭状癌、脂腺癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、神経芽腫、網膜芽腫、白血病、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、ならびに重鎖病、乳房腫瘍(例えば、腺管および小葉腺癌)、子宮頸部の扁平上皮癌および腺癌、子宮上皮癌および卵巣上皮癌、前立腺腺癌、膀胱の移行扁平上皮癌、B細胞リンパ腫およびT細胞リンパ腫(結節性およびびまん性)形質細胞腫、急性白血病および慢性白血病、悪性黒色腫、軟組織肉腫ならびに平滑筋肉腫を含む。ある特定の実施形態では、新生物は、血液がん(例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫)、卵巣がん、前立腺がん、乳がん、膀胱がん、脳がん、結腸がん、腸がん、肝臓がん、肺がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、神経膠芽腫、および咽頭がんから選択される。ある特定の実施形態では、本開示の細胞、組成物、核酸組成物は、従来の治療介入を受けることができない、血液がん(例えば、白血病、リンパ腫、および骨髄腫)または卵巣がんを処置および/または防止するために使用することができる。

30

40

50

ある特定の実施形態では、本開示の細胞、組成物、核酸組成物は、固形腫瘍を処置および/または防止するために使用することができる。ある特定の実施形態では、本開示の細胞、組成物、核酸組成物は、急性骨髄性白血病（AML）、リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、乳がん、卵巣がん、中皮腫、神経膠芽腫、結腸直腸がん、および膵臓がんから選択される新生物を処置および/または防止するために使用することができる。

自己免疫疾患

【0240】

本開示の主題は、対象における自己免疫疾患を処置および/または防止するための方法を提供する。本方法は、本開示の細胞、本開示の組成物、または本開示の核酸組成物の有効量を、自己免疫疾患を有する対象に投与するステップを含み得る。自己免疫疾患の非限定的な例としては、関節リウマチ、重症筋無力症、全身性ループス、グレーブス病、橋本甲状腺炎、全身性硬化症、胆汁性肝硬変、セリアック病、軸索型ニューロパチー、炎症性筋障害、小脳変性、1型糖尿病、および多発性筋炎が挙げられる。

10

【0241】

米国には、自己免疫障害を有する2000万人を超える患者が存在する。これらの多く、例えば、ループスおよび重症筋無力症は、患者自身の組織構成成分、DNAおよび細胞への抗体による攻撃に關与する。<https://www.google.com/search?client=firefox-b-1-d&q=incidence+ou+timune+disease>。これらの疾患には、有効なアプローチも治療可能なアプローチも少ない。IgGは、ヒト免疫系において重要な保護的役割を果たすが、関節リウマチ、重症筋無力症、全身性ループスなどのような疾患の病因にも関連し、ここで、IgGの除去をこれらの自己免疫疾患を処置するための治療手段として使用している（Johansson et al., PLoS ONE (2008); 3:1-6; Bert et al., The International Journal of Artificial Organs (1994); 17:603-608; Stummvoll et al., Annals of the Rheumatic Diseases (2005); 64:1015-1021)。本開示の細胞に含まれるIgG分解酵素は、宿主細胞を攻撃する機能的IgGを枯渇させ、それによって、自己免疫疾患を処置することができる。

20

30

抗体媒介性拒絶

【0242】

本開示の主題は、対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止するための方法を提供する。ある特定の実施形態では、対象は、臓器移植を受ける。ある特定の実施形態では、移植は、同種異系移植（同種移植）である。ある特定の実施形態では、対象は、臓器移植前に、本開示の細胞、組成物、または核酸組成物を投与される。ある特定の実施形態では、対象は、細胞療法を受ける、例えば、細胞および/または組織（例えば、自家または同種異系の細胞および/または組織）は、細胞療法において使用される。

40

【0243】

本方法は、本開示の細胞、本開示の組成物、または本開示の核酸組成物の有効量を、対象に投与するステップを含み得る。

【0244】

腎臓、肝臓、肺、心臓および他の臓器に関するものなどの固形臓器移植は、米国において、1年に36,000人を超える患者で使用され、100,000人を超える人が移植を待っている。<https://www.organdonor.gov/statistics-stories/statistics.html>。これらの臓器は、可能な限り患者に適合されるが、重篤な結果および時には致命的な結果を有する患者の免疫抑制は、高頻度であり一生続く。米国における費用は100,000,000,000ドルで

50

ある。宿主の I g G は、同種移植において重要な役割を果たし、ここで、H L A ドナー間の不適合によって、同種移植片の抗体媒介性拒絶がもたらされる (L o u p y e t a l . , N e w E n g l a n d J o u r n a l o f M e d i c i n e (2 0 1 8) ; 3 7 9 : 1 1 5 0 - 1 1 6 0) 。 I d e S は、同種移植前の脱感作に関してヒトにおいて評価された。本研究では、25人の患者のうち24人は、すべてのドナー特異的抗体を迅速に除去した I d e S による処置後に、H L A - 不適合移植を受けることができた (J o r d a n e t a l . , N e w E n g l a n d J o u r n a l o f M e d i c i n e (2 0 1 7) ; 3 7 7 : 4 4 2 - 4 5 3 ; L o n z e e t a l . , A n n a l s o f S u r g e r y (2 0 1 8) ; 2 6 8 : 4 8 8 - 4 9 6) 。本開示の細胞に含まれる I g G 分解酵素は、機能的 I g G (例えば、宿主の I g G) を枯渇させ、ドナーの臓器細胞を攻撃し、それによって、臓器移植に伴う抗体媒介性拒絶を低減および/または防止することができる。

10

【0245】

対象は、進行した形態の疾患を有する場合があります、この場合には、処置の目的は、疾患進行の軽減もしくは逆転、および/または副作用の軽快を含み得る。対象は、既に処置された状態の病歴を有する場合があります、この場合には、治療目的は、典型的には、再発リスクの低下または遅延を含む。

【0246】

治療に対して好適なヒト対象は、典型的には、臨床基準によって識別され得る2つの処置群を含む。「進行した疾患」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、腫瘍量 (t u m o r m a s s) に基づいて検出され得る腫瘍である (例えば、触診、C A T スキャン、ソノグラム、マンモグラムまたは X 線によって ; それら自体の正の生化学的マーカーまたは組織病理学的マーカーは、この集団を特定するのに不十分である) 。医薬組成物は、これらの対象に投与され、これらの状態を軽減する目的で、抗腫瘍応答を誘発する。理想的には、腫瘍量の低減が結果として生じるが、いずれの臨床的改善も利益を構成する。臨床的改善には、進行のリスクもしくは速度の低下、または腫瘍の病理学的結果における低減が含まれる。

20

【0247】

第2の群の好適な対象は、「アジュバント群」として当技術分野で公知である。これらは、新生物の病歴を有しているが、別の治療方式に対して応答性であった個体である。以前の治療には、外科的切除、放射線治療、および伝統的な化学療法が含まれ得るが、これらに限定されない。結果として、これらの個体は、臨床的に測定可能な腫瘍を有さない。しかし、これらは、元の腫瘍部位付近で、または転移によるかのいずれかで、疾患の進行に関するリスクがあると疑われる。この群は、高リスクの個体と低リスクの個体へとさらに細分することができる。細分は、初期の処置の前後に観察された特色 (f e a t u r e) に基づいてなされる。これらの特色は、臨床の技術分野で公知あり、それぞれ異なる新生物に対して好適に定義される。高リスクサブグループの典型的な特色は、腫瘍が隣接する組織を侵襲しているか、またはリンパ節の関与を示すものである。

30

【0248】

別の群は、新生物に対する遺伝的素因を有するが、新生物の臨床徴候を未だ明示していない。例えば、乳がんに関連する遺伝子変異に関する試験に陽性であるが、依然として妊娠可能年齢である女性は、予防手術を実施するのに好適となるまで、新生物の出現を防止するために予防的な処置において、本発明に記載の細胞の1つまたは複数を受けることを希望することができる。

40

【0249】

リガンド認識受容体 (例えば、腫瘍抗原に結合する抗原認識受容体) および細胞の活性 (例えば、抗腫瘍活性) を増強する I g G 分解酵素の発現の結果として、養子移入された細胞は、腫瘍部位で増大された選択的な細胞溶解活性を与えられる。さらに、腫瘍またはウイルス感染に対するそれらの局在化およびそれらの増殖に引き続いて、細胞 (例えば、T 細胞) は、腫瘍またはウイルス感染部位を、生理学的抗腫瘍または抗ウイルス応答に関

50

与する広範囲の免疫細胞（腫瘍浸潤リンパ球、NK細胞、NK T細胞、樹状細胞、およびマクロファージ）に対する高度に伝導性の環境に変える。

【0250】

さらに、本開示の主題は、対象、例えば、免疫不全状態の対象における病原体感染（例えば、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、寄生生物感染、または原生生物感染）を処置および/または防止するための方法を提供する。本方法は、本開示の細胞、本開示の組成物、または本開示の核酸組成物の有効量を、病原体感染を有する対象に投与するステップを含み得る。処置に感受性の例示的なウイルス感染としては、以下に限定されないが、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、およびインフルエンザウイルス感染が挙げられる。

10

【0251】

さらなる改変は、本開示の細胞（例えば、T細胞）に導入され、免疫学的合併症（「悪性T細胞形質転換」として公知）、例えば、移植片対宿主病（GVHD）のリスク、または健康な組織が腫瘍細胞と同じ標的抗原を発現する場合、GVHDと同様の転帰をもたらすことのリスクを回避するかまたは最小限にすることができる。この問題に対する潜在的な解決は、本開示の免疫応答性細胞へ自殺遺伝子を操作することである。好適な自殺遺伝子としては、以下に限定されないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV-tk）、誘導性カパーゼ9自殺遺伝子（iCasp-9）、および短縮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。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細胞排除を可能にし得る。EGFRtは、本開示のCARの抗原認識受容体の上流に共有結合により接合されてもよい。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まれてもよい。この方法では、悪性T細胞形質転換（例えば、GVHD）の間に自殺遺伝子を活性化するように設計したプロドラッグ（例えば、プロドラッグ（例えば、iCasp-9を活性化し得るAP1903））の投与は、自殺遺伝子活性化CAR発現T細胞中でアポトーシスを誘発する。自殺遺伝子の本開示のCARへの組み込みにより、非常に短い期間内にCAR T細胞の大多数を排除する能力と共にさらなるレベルの安全性が与えられる。自殺遺伝子を組み込まれた本開示の細胞（例えば、T細胞）は、CAR T細胞注入後の所与の時点で先制して排除されるか、または毒性の最も早い徴候の時点で根絶され得る。

20

30

5.10.キット

【0252】

本開示の主題は、対象における新生物、または病原体感染、または自己免疫疾患を処置および/または防止するためのキット、ならびに対象における抗体媒介性拒絶を低減および/または防止するためのキットを提供し、対象は臓器移植を受ける。ある特定の実施形態では、キットは、本開示の細胞、本開示の組成物、または本開示の核酸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；このような容器は、ボックス、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、プリスターパック、または当技術分野で公知の他の好適な容器形態であり得る。このような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属ホイル、または医薬を保持するために好適な他の材料から作製することができる。ある特定の非限定的な実施形態では、キットは、目的の抗原に対する抗原認識受容体（例えば、CARまたはTCR）をコードする単離された核酸分子および発現可能な（および分泌可能な）形態でIL-36ポリペプチドをコードする単離された核酸分子（これらは、必要に応じて、同じかまたは異なるベクターに含まれてもよい）を含む。

40

【0253】

所望の場合、細胞、組成物、または核酸組成物は、新生物、病原体感染、もしくは自己免疫疾患を有するかもしくは発症するリスクのある対象、または臓器移植を受ける対象に、細胞、組成物、または核酸組成物を投与するための指示と一緒に提供される。指示は、一般に、新生物または病原体感染、または自己免疫疾患の処置または防止のための細胞、

50

組成物または核酸組成物の使用についての情報を含む。ある特定の実施形態では、指示は、以下のうちの少なくとも1つを含む：治療剤の説明；新生物、病原体感染、もしくは免疫障害またはその症状の処置または防止のための投薬スケジュールおよび投与；使用上の注意；警告；適応症；禁忌；過量情報；有害反応；動物薬理学；臨床研究；ならびに／あるいは参考文献。指示は、容器（存在する場合）に直接印刷されてもよく、あるいは容器に貼付されるラベルとして、または容器の中に、もしくは容器と一緒に供給される別個のシート、パンフレット、カード、もしくはフォルダーとして印刷されてもよい。

【実施例】

【0254】

6. 実施例

本開示の実践には、別段に指定されていない限り、十分に当業者の範囲内にある分子生物学（組み換え技法を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技法が用いられる。このような技法は、"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)などの文献において十分に説明されている。これらの技法は、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適用可能であり、したがって、本開示の主題を作製および実践する際に考慮され得る。特定の実施形態に関する特に有用な技法は、以降の項目において議論される。

【0255】

以下の実施例は、本開示の細胞および組成物を作製および使用する方法の完全な開示および説明を当業者に提供するために示されるものであり、本発明者らが自らの発明と考えるものの範囲の限定を意図するものではない。

(実施例1)

生成および *in vitro* での活性

概要

【0256】

2つの形態の IdeS を発現する CAR T細胞、すなわち、膜結合形態（IdeSは、表面膜結合形態として発現された）および分泌形態（IdeSは、細胞から分泌された）を生成した。以下に示されるように、両方の形態で、IdeSは、*in vitro* で IgG を切断することに成功した。

結果

構築物および安定した株の生成

【0257】

B細胞腫瘍の抗原である CD19 を標的とする CAR T細胞療法は、FDAによって最近承認された (Zheng et al., Drug Discovery Today (2018); 23: 1175 - 1182)。CD19は、B細胞に特異的であり、通常、他の細胞または組織上で発現されないため、理想的な抗原となる。4-1BB/CD3シグナル伝達ドメインを有する CD19 CAR は、*in vitro* で、および患者において *in vivo* で十分に特徴付けられている (Brentjens et al., Sci Transl Med. (2013); 5: 177ra38; Pegram et al., Blood (2012); 119: 4133 - 4141; Kalos e

10

20

30

40

50

t al., Science Translational Medicine (2011); 3: 1-11)。

【0258】

図1に示されるように、膜結合形態の構築物(「IdeS-tm」と称される; 図1Aを参照されたい)および分泌形態の構築物(「IdeS-sec」と称される; 図1Bを参照されたい)を生成した。T細胞を操作して、4-1BBポリペプチドおよびCD3ポリペプチドを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、ならびにCD8ポリペプチドを含む膜貫通ドメインを含むCD19標的化CARを発現させた。CARは、「19BBz」として示される。

【0259】

構築物の設計は、SFGガンマレトロウイルスベクターを使用する以前に報告された方法に基づいた(Riviere et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1995); 92: 6733-7)。CD8シグナルペプチド配列を使用して、IdeSを細胞膜に輸送した(図1Aおよび1Bを参照されたい)。酵素の膜結合バージョンを生成するために、CD8の膜貫通ドメインを酵素のC末端に組み込んだ。次いで、CAR構築物を自己切断ペプチド2Aの後に付加した。図1Aおよび1Bに示されるように、CAR構築物は、CD8シグナルペプチド配列、抗原特異的scFv(この場合、抗CD19)、CD8膜貫通ドメイン、および4-1BB/CD3細胞内シグナル伝達ドメインを含む。CARを発現するT細胞を生成するプロセスは、Brentjens et al., Sci Transl Med. (2013); 5: 177ra38; Parente-Pereira et al., Journal of Biological Methods (2014); 1: 7)に以前に記載された。H29レトロウイルスパッケージング細胞系に、構築物を使用してトランスフェクトした。H29細胞に由来するウイルスを使用して、安定なPG13レトロウイルスパッケージング細胞系を生成した。PG13細胞は、テナガザル白血病ウイルス(GALV)粒子を産生し、これらを使用して、いずれかの細胞系、または初代細胞に形質導入した(Parente-Pereira et al., Journal of Biological Methods (2014); 1: 7)。末梢血単核球(PBMC)に形質導入して、CAR T細胞を生成した。さらに、Galv9産生細胞系を使用して、ウ

イルスを産生した。

発現およびin vitroでの活性

【0260】

IdeSの安定な発現を、ジャーカット細胞などのモデルの安定したT細胞系でイムノプロットを使用して試験した。C末端HAタグがIdeS構築物に含まれたため、この細胞系の細胞溶解物および上清を抗HA抗体を使用して試験した。図2に示されるように、IdeSの発現を、HEK293t細胞の一過的トランスフェクトによって哺乳類細胞に首尾よく適合させることができる。CAR T細胞の機能を、IdeS活性に関して、またCAR活性に関する評価した。

【0261】

IdeSの酵素活性を、IgGの切断の程度を評価することによって試験した。SDS-PAGEアッセイおよびELISAベースのアッセイを使用した。図3A~3Cは、SDS-PAGEアッセイの結果を示す。SDS-PAGEアッセイでは、HEK293t細胞にIdeS-tmを一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に、IgGを24ウェルプレートのウェルに添加し、次いで、様々な時点で取り除き、Laemmli緩衝液を使用してクエンチした。図3Aを参照されたい。ヒトポリクローナルIgGの切断を経時的に追跡し、SDS-PAGEアッセイを使用して検出し、これを、クマシーとイムノプロットの両方で可視化した(図3Bおよび3C)。図3Bおよび3Cに示されるように、HEK293t細胞から発現されるIdeSは、in vitroで活性であった。

10

20

30

40

50

【0262】

図4Aおよび4Bは、ELISAベースのアッセイの結果を示す。適合したELISAベースのアッセイ(Jaernum et al., Molecular Cancer Therapeutics (2017); 16:1887-1897)を使用して、IdeSによってIgGの切断を検出した。組換えIdeSを使用して、切断ELISAを検証した(図4Aを参照されたい)。HEK293t細胞に、IdeSの分泌バージョン(「IdeS-sec」)をトランスフェクトした。酵素の発現を、抗HAを使用するイムノプロットによって上清液を試験することによって検証した(図4Bを参照されたい)。切断ELISAを適用することによって、IdeS-secが、様々な時点でヒトポリクローナルIgGを効率的に切断したことを確認した(図4Bを参照されたい)。

10

【0263】

IdeSが、細胞表面に結合した抗体を切断するのに成功できるかどうかを評価するために、共培養実験を設計した。共培養実験では、IdeS発現細胞を、CD20を発現するRaji細胞と、Raji細胞に結合する抗体リツキシマブと共にインキュベートした。しかし、IdeSは、抗体を切断し、Fc断片を放出した。図5に示されるように、IdeSを分泌するHEK293t細胞は、Raji細胞に結合したリツキシマブのFc断片を切断することに成功した。

【0264】

CAR T細胞による特異的溶解を、Dao et al., Science Translational Medicine (2013); 5:1-11に以前に開示された通り、ルシフェラーゼを発現する標的細胞に対する活性を試験することによって試験した。CD19⁺Raji細胞系を腫瘍モデルとして使用し、Raji細胞の特異的溶解を測定した。Raji細胞を改変してホタルルシフェラーゼを発現させ、ルシフェラーゼベースの殺滅アッセイを可能にする。図6に示されるように、IdeS-tm 19BBz細胞とIdeS-sec 19BBz細胞の両方が、IdeSを有さない19BBz細胞と同程度まで、in vitroでRaji細胞を死滅させた。よって、IdeSのCAR T細胞への添加は、CAR T細胞の殺滅活性を損なうものではない。

20

【0265】

さらに、IdeS発現細胞が補体依存性細胞傷害(CDC)から保護され得るかどうかを研究した。形質導入されていないT細胞、IdeS-tm 19BBz T細胞、IdeS-sec 19BBz T細胞、およびIdeSを有さない19BBz T細胞を、様々な濃度のウサギ抗胸腺細胞グロブリン(ATG)で処置し、その後、ウサギ血清を添加し、1時間インキュベートした。細胞生存率をCell Titer Gloによって測定した。図7に示されるように、IdeS-tm 19BBz T細胞とIdeS-sec 19BBz T細胞の両方が、IgGのFc断片を切断して除去し、よって、CDCを回避した。

30

【0266】

さらに、IdeS発現細胞が抗体依存性細胞傷害(ADCC)から保護され得るかどうかを研究した。IdeS-tm 19BBz T細胞、IdeS-sec 19BBz T細胞、およびIdeSを有さない19BBz T細胞を様々な用量の抗胸腺細胞グロブリン(ATG)で処置し、次に、ヒトPBMCで処置した。細胞傷害性を⁵¹Cr放出アッセイを使用して決定した。図10に示されるように、IdeS-tm 19BBz T細胞およびIdeS-sec 19BBz T細胞は両方とも、IdeSを有さない19BBz T細胞と比較して、溶解から保護された。

40

【0267】

さらに、本発明者らは、IdeS発現細胞が、腎臓移植患者由来の血清中IgGを切断し、補体依存性細胞傷害(CDC)から保護することができるかどうかを研究した。図11Aに示されるように、拒絶を引き起こす抗HLA抗体を含有する腎臓移植患者(患者2)に由来する血清が、A02⁺細胞に結合することが、フローサイトメトリーによって示された。図11Bに示されるように、患者2由来の血清が、フローサイトメトリーによっ

50

て検証されたように、A02+ IdeS - tm 19BBz T細胞およびIdeS - sec 19BBz T細胞によって切断された。図11Cに示されるように、A02+ IdeS - tm 19BBz T細胞およびIdeS - sec 19BBz T細胞が、患者2の血清によって媒介される補体殺滅(CDC)からも保護された(右)。

作用機序

【0268】

次いで、本発明者らは、IdeS発現細胞が、潜在的な抗体に対してそれら自体をシールドする方法について研究した。図8は、1つの提案される作用機序を示す。図8に示されるように、IgG抗体は細胞表面抗原および受容体に結合し、CDC、ADCCおよびオプソニン作用によって、細胞死をもたらす。IdeSは、ヒンジ領域の下でIgGを切断し、Fc断片を放出する。IdeS発現細胞は、F(ab')₂断片で被覆されたままであり、さらなる抗体が結合するのを妨げる。

10

【0269】

膜に結合した酵素に対する、分泌された酵素の切断機序を理解することが重要である。膜結合形態は、より局所的な活性を可能にするが、しかし、図5に示されるデータは、分泌形態が、trans系で抗体を切断するのにより有効であることを示唆する。IdeS発現細胞のcisまたはtrans切断の機序も評価される。このために、ウサギ抗マウス(mouse)抗体を使用し、その抗体は、scFvのマウス(murine)部分を標的とする。IdeSの膜結合バージョンまたは分泌バージョンがより有利であるかどうか評価される。

20

【0270】

この酵素の機序の重要な側面は、それが、ヒンジ領域の下でIgGを切断するため、F(ab')₂断片は無傷のままであり、よって、細胞表面に結合したままであり得ることである。組換えIdeSを使用して、IdeSの濃度を増加させると、Fc断片が細胞表面から取り除かれるが、一方、F(ab')₂断片は表面に結合したままであることが観察された。図9に示されるように、IdeSを発現するCAR T細胞は、IgG Fcを切断し、F(ab')₂シールドを維持した。IgG(ATG)が、IdeS発現細胞(膜貫通形態または分泌形態のいずれか)に添加された後、IgGはFab形態として細胞に結合したままであり、Fcは放出された。Fcの欠如は、機能を排除したが、結合したFabは、新たな細胞傷害性IgGが結合するのを妨げ、したがって、シールドとして機能した。IdeSを含有しない細胞に関しては、これは起こらなかった。

30

【0271】

このことは、残留したF(ab')₂断片が、細胞周囲にシールドを生じ、これを、潜在的な将来の体液性応答から隠すことを示唆する。この仮定を、上記の安定した系(line)において、膜結合IdeSおよび細胞分泌IdeSを使用することによって試験する。抗Fab特異的抗体または抗Fc特異的抗体を使用して、IgGのどの部分が依然として細胞に結合しているかを検出する。切断後にどれくらいの間F(ab')₂断片が結合したままであるか、およびこれらが、無傷IgGによる競合によって除去されるかどうかを理解するために、このプロセスのキネティクスについても検査する。

結論

40

【0272】

この実施例に示される本発明者らのデータは、IdeSを発現するCAR T細胞が、哺乳類細胞において首尾よく発現し、in vitroで有効な切断活性を示したことを実証する。さらに、IdeSがCAR T細胞に含まれても、CARのin vitroでの殺滅活性は損なわれない。さらに、IdeSを発現するCAR-T細胞は、補体依存性細胞傷害(CDC)に対して保護された。

(実施例2)

in vivoでの活性

概要

【0273】

50

この実施例では、実施例1のIdeSを発現するCAR T細胞の*in vivo*での活性を調査する。これらの細胞のIgG切断活性および殺細胞活性を、*in vivo*マウスモデルにおいて調査する。これらの細胞を、これらが抗体によって標的とされる系(system)で試験し、CAR T細胞に対する体液性免疫原性のモデルを再現する。このモデルでは、細胞の持続性を、通常のCAR T細胞に対する腫瘍細胞の殺滅効率と共に試験する。これらの実験設計における1つの重要な懸念は、IdeSがマウスIgGを切断しないことである。よって、追加の異種抗体(例えば、IdeSが作用するウサギまたはヒト、および潜在的に生着した免疫エフェクター細胞)と適合可能な高度に免疫不全のマウスモデルであるNSGマウスを使用する。

*in vivo*での細胞持続性

【0274】

IdeSを発現するCAR T細胞の*in vivo*での持続性を、IdeSを有さないCAR T細胞と比較し、試験する。NSGマウスに、IdeSを発現するCAR T細胞またはIdeSを有さないCAR T細胞を腹腔内(IP)注射する。次いで、マウスに、CAR T細胞を標的とするヒト抗体、例えば、抗CD3、抗MHCクラスI抗体、またはCARを標的とする抗体をIP注射する。IdeSは、ウサギIgGおよびヒトIgGのすべてのアイソフォームを完全に切断するため、ウサギまたはヒト由来の抗体が使用される(Johansson et al., PLoS ONE (2008); 3:1-6; Yang et al., Nephrology Dialysis Transplantation (2010); 25:2479-2486; Wang et al., Experimental Neurology (2017); 291:134-140)。IdeS発現細胞は、ヒンジの下の抗体を切断し、よって、Fc断片を放出することが期待される。マウスから回収された腹水および末梢血を、以前に示されたイムノブロットまたはELISA(Rafiq et al., Nature Biotechnology (2018); 36:847-858)によって様々な時点で分析し、IgGの切断を評価する(図3および4に示される)。CAR T細胞の存在は、腹水を採取し、IdeS構築物に存在する抗CD19 CARおよび抗HAタグを用いるフローサイトメトリーによって分析することによって決定する。Fab断片が細胞表面に結合したままであるかどうか(機能的IgGのさらなる結合に対するシールドとして)を調査するために、抗Fab特異的抗体を使用して、フローサイトメトリーによって残留する結合を分析する。残っている利用可能なCAR T細胞表面標的(すなわち、CD3またはMHC I)の存在も評価する。細胞および抗体の静脈内(IV)注入により、類似する実験が行われる(conducted)。

*in vivo*有効性

【0275】

CD19⁺Raji細胞系を腫瘍モデルとして使用し、Raji細胞の特異的溶解を測定する。Raji細胞を、ホタルルシフェラーゼを発現するように改変し、ルシフェラーゼベースの殺滅アッセイおよび腫瘍の*in vivo*でのバイオルミネセンスイメージングを可能にする(Koneru et al., Oncoimmunology (2015); 4:e994446)。NSGマウスにRaji細胞をIP注入し、その後、IdeSを発現するCAR-T細胞またはIdeSを有さないCAR T細胞を注入し、Raji細胞に結合しないCAR T細胞を標的とする抗体(例えば、抗CD3または抗マウス抗体)を注射して、CARを標的化する。腫瘍成長および疾患進行を、バイオルミネセンスイメージングを使用して評価する。CAR T細胞の持続性も、フローサイトメトリーを使用するこのシステムで、または代替の発光プローブを保有するCAR T細胞のイメージングによって評価する。ガウシアルルシフェラーゼを発現するよう操作されたCAR T細胞を、ホタルルシフェラーゼに対して直交的に使用することができる(Santos et al., Nature Medicine (2009); 15:338-344)。発光プローブを保有するCAR T細胞は、CAR T細胞の持続性を経時的に追跡およびモニターすることが可能であるが、一方、腫瘍の追跡も可能である。細胞およ

10

20

30

40

50

び抗体のIV注入により、類似する実験が行われる。

(実施例3)

【0276】

ヒトT細胞に、IdeS CARを有さない19BBz(左から1~2番目のレーン)またはIdeS-tm 19BBz CAR(膜貫通形態)(左から3~5番目のレーン)およびIdeS-sec 19BBz CAR(分泌形態)(左から6~8番目のレーン)を形質導入した。2×10⁶個のCAR T細胞を、NSGマウスにi.p.注射し、24時間後に、ヒトポリクローナルIgGもi.p.注射した。IgGの切断は、PBSを使用してi.p.洗浄を実施し、磁気プロテインGビーズを使用して試料を精製し、抗ヒトFc特異的HRP二次抗体を使用してウエスタンブロットによって分析することによって評価した。図12に示されるように、未切断の重鎖は、55kDa付近で観察され(9番目のレーン)、一方、切断されたFc断片は、25kDa付近に存在した(矢印)。

本開示の主題の実施形態

【0277】

前記記載から、様々な使用および条件に本開示の主題を採用するために、本開示の主題に対して変更および修正がなされ得ることが明らかである。このような実施形態もまた、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【0278】

本明細書において、変数についてのいずれかの定義における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。本明細書において、実施形態についての記載は、任意の単一の実施形態として、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、その実施形態を含む。

【0279】

この明細書において言及されるすべての特許および刊行物は、それぞれ独立した特許および刊行物が、具体的かつ個別に参照により組み込まれることが示されるのと同程度に、参照により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)

(a) リガンド認識受容体、および

(b) IgG分解酵素またはその断片

を含む細胞。

(項目2)

前記IgG分解酵素が分泌される、項目1に記載の細胞。

(項目3)

前記IgG分解酵素が膜結合性である、項目1に記載の細胞。

(項目4)

(c) 前記IgG分解酵素に付着した膜貫通ドメインをさらに含む、項目3に記載の細胞。

(項目5)

前記膜貫通ドメインが、前記IgG分解酵素のC末端に付着している、項目4に記載の細胞。

(項目6)

前記IgG分解酵素に付着した前記膜貫通ドメインが、CD8ポリペプチド、必要に応じてCD8の膜貫通を含む、項目4または5に記載の細胞。

(項目7)

前記IgG分解酵素が、S. pyogenesのIgG分解酵素(IdeS)、S. equi subsp. zooepidemicusのIgG分解酵素(IdeZ)、S. equi subsp. equi.のIgG分解酵素(IdeE)、Streptococcus pyogenes由来のエンドグリコシダーゼ(EndoS)、およびStr

10

20

30

40

50

e p t o c o c c u s p y o g e n e s由来の連鎖球菌システインプロテイナーゼ (S p e B) から選択される、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 8)

前記リガンド認識受容体が、外因性または内因性である、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 9)

前記リガンド認識受容体が、組換え発現される、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 0)

前記リガンド認識受容体が、ベクターから発現される、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の細胞。

10

(項目 1 1)

前記 I g G 分解酵素が、ベクターから発現される、項目 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 2)

応答性細胞または活性化可能な細胞である、項目 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 3)

免疫応答性細胞である、項目 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 4)

20

T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、B 細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、幹細胞、および正常組織細胞からなる群から選択される、項目 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 5)

T 細胞である、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 6)

前記リガンド認識受容体が、抗原に結合する、項目 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 7)

前記抗原が、腫瘍抗原、病原体抗原、正常細胞抗原、H L A 抗原、および同種抗原から選択される、項目 1 6 に記載の細胞。

30

(項目 1 8)

前記抗原が、腫瘍抗原である、項目 1 6 または 1 7 に記載の細胞。

(項目 1 9)

前記腫瘍抗原が、C D 1 9 である、項目 1 7 または 1 8 に記載の細胞。

(項目 2 0)

前記抗原が、正常細胞抗原である、項目 1 6 または 1 7 に記載の細胞。

(項目 2 1)

前記抗原が、H L A 抗原または同種抗原である、項目 1 6 または 1 7 に記載の細胞。

(項目 2 2)

40

前記同種抗原が、マイナー組織適合性同種抗原である、項目 2 1 に記載の細胞。

(項目 2 3)

前記リガンド認識受容体が、T 細胞受容体 (T C R) またはキメラ抗原受容体 (C A R) である、項目 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 2 4)

前記リガンド認識受容体が、C A R である、項目 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 2 5)

前記 C A R が、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む、項目 2 4 に記載の細胞。

50

(項目26)

前記CARの前記細胞外抗原結合ドメインが、単鎖可変断片(s c F v)を含む、項目25に記載の細胞。

(項目27)

前記膜貫通ドメインが、CD8ポリペプチドを含む、項目25または26に記載の細胞。

(項目28)

前記CARの前記細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3ポリペプチドを含む、項目25から27のいずれか一項に記載の細胞。

(項目29)

前記CARの前記細胞内シグナル伝達ドメインが、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、項目25から28のいずれか一項に記載の細胞。

10

(項目30)

前記少なくとも1つの共刺激ドメインが、CD28ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、またはこれらの組合せを含む、項目29に記載の細胞。

(項目31)

前記少なくとも1つの共刺激ドメインが、4-1BBポリペプチドを含む、項目29または30に記載の細胞。

(項目32)

前記IgG分解酵素が、(a)IgGを切断し、それによって、IgG抗体が前記細胞を死滅させるのを防ぐ、および/または(b)IgGを切断し、それによって、前記IgGの残りの断片の前記細胞への結合を保持させ、前記細胞を1つまたは複数の細胞傷害性抗体から保護し、必要に応じて、前記1つまたは複数の細胞傷害性抗体が、前記IgGと同じエピトープ領域に結合し、前記細胞を死滅させる、項目1から31のいずれか一項に記載の細胞。

20

(項目33)

項目1から32のいずれか一項に記載の細胞を含む組成物。

(項目34)

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、項目33に記載の組成物。

(項目35)

新生物を処置するためのものである、項目33または34に記載の組成物。

30

(項目36)

細胞を生成するための方法であって、(a)リガンド認識受容体をコードする第1のポリヌクレオチド、および(b)IgG分解酵素またはその断片をコードする第2のポリヌクレオチドを、細胞内に導入するステップを含み、前記第1および第2の核酸配列のそれぞれが、必要に応じて、プロモーターエレメントに作動可能に連結している、方法。

(項目37)

前記第1および第2のポリヌクレオチドの一方または両方が、ベクター中に含まれる、項目36に記載の方法。

(項目38)

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターであるか、またはmRNA分子中にコードされている、項目37に記載の方法。

40

(項目39)

(a)リガンド認識受容体をコードする第1のポリヌクレオチドおよび(b)IgG分解酵素またはその断片をコードする第2のポリヌクレオチドを含む核酸組成物。

(項目40)

前記第1のポリヌクレオチドが、プロモーターエレメントに作動可能に連結している、項目39に記載の核酸組成物。

(項目41)

前記第2のポリヌクレオチドが、プロモーターエレメントに作動可能に連結している、項目39または40に記載の核酸組成物。

50

(項目 4 2)

前記第 1 および第 2 のポリヌクレオチドの一方または両方が、ベクター中に含まれる、項目 3 9 から 4 1 のいずれか一項に記載の核酸組成物。

(項目 4 3)

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターであるか、または mRNA 分子中にコードされている、項目 4 2 に記載の核酸組成物。

(項目 4 4)

項目 3 9 から 4 3 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 4 5)

項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物、または項目 4 4 に記載のベクターを含むキット。

10

(項目 4 6)

新生物、病原体感染、および / または自己免疫障害を処置および / または防止するための書面の指示をさらに含む、項目 4 5 に記載のキット。

(項目 4 7)

対象における腫瘍負荷を低減する方法であって、前記対象に、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物、または項目 4 4 に記載のベクターの有効量を投与するステップを含む、方法。

20

(項目 4 8)

前記対象において、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍サイズを低下させる、および / または前記腫瘍を根絶する、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

新生物、病原体感染、および / または自己免疫疾患を処置および / または防止する方法であって、対象に、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物、または項目 4 4 に記載のベクターの有効量を投与するステップを含む、方法。

(項目 5 0)

新生物、病原体感染、および / または自己免疫疾患を有する対象の生存時間を延長する方法であって、前記対象に、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物、または項目 4 4 に記載のベクターの有効量を投与するステップを含む、方法。

30

(項目 5 1)

前記腫瘍または新生物が、急性骨髄性白血病 (A M L)、リンパ芽球性白血病 (A L L)、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、乳がん、卵巣がん、中皮腫、神経膠芽腫、結腸直腸がん、および膵臓がんから選択される、項目 4 4 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記自己免疫疾患が、関節リウマチ、重症筋無力症、全身性ループス、グレーブス病、橋本甲状腺炎、全身性硬化症、胆汁性肝硬変、セリアック病、軸索型ニューロパチー、炎症性筋障害、小脳変性、1 型糖尿病、および多発性筋炎から選択される、項目 4 9 または 5 0 に記載の方法。

40

(項目 5 3)

臓器移植を受ける対象における細胞および / または組織の抗体媒介性拒絶を低減および / または防止する方法であって、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物、または項目 4 4 に記載のベクターの有効量を投与するステップを含む、方法。

(項目 5 4)

前記移植が、同種異系移植 (同種移植) である、項目 5 3 に記載の方法。

50

(項目 5 5)

前記対象が、前記臓器移植前に、前記細胞、組成物、または核酸組成物を投与される、項目 5 3 または 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

細胞療法を受ける対象において使用される細胞または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する方法であって、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物、または項目 4 4 に記載のベクターの有効量を投与するステップを含む、方法。

(項目 5 7)

前記細胞および/または組織が、前記細胞療法に含まれる、項目 5 6 に記載の方法。

10

(項目 5 8)

前記細胞および/または組織が、自家または同種異系である、項目 5 6 または 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

治療において使用するための、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 0)

腫瘍負荷を低減する際に使用するための、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 1)

新生物、病原体感染、および/または自己免疫障害を処置および/または防止する際に使用するための、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞。

20

(項目 6 2)

新生物、病原体感染、および/または自己免疫疾患を有する対象の生存時間を延長する際に使用するための、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 3)

臓器移植を受ける対象における細胞および組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する際に使用するための、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 4)

細胞療法を受ける対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する際に使用するための、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6 5)

治療において使用するための、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

30

(項目 6 6)

腫瘍負荷を低減する際に使用するための、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 6 7)

新生物、病原体感染、および/または自己免疫疾患を処置および/または防止する際に使用するための、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 6 8)

新生物、病原体感染、および/または自己免疫疾患を有する対象の生存時間を延長する際に使用するための、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

40

(項目 6 9)

臓器移植を受ける対象における細胞および組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する際に使用するための、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 7 0)

細胞療法を受ける対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する際に使用するための、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 7 1)

治療において使用するための、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物。

(項目 7 2)

腫瘍負荷を低減する際に使用するための、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核

50

酸組成物。

(項目 7 3)

新生物、病原体感染、および/または自己免疫疾患を処置および/または防止する際に使用するための、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物。

(項目 7 4)

新生物、病原体感染、および/または自己免疫疾患を有する対象の生存時間を延長する際に使用するための、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物。

(項目 7 5)

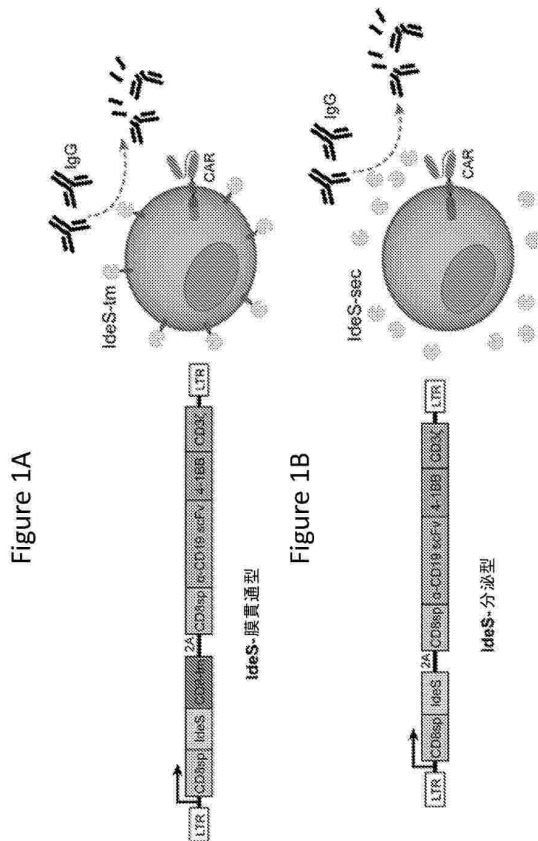
臓器移植を受ける対象における細胞および組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する際に使用するための、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物。

(項目 7 6)

細胞療法を受ける対象における細胞および/または組織の抗体媒介性拒絶を低減および/または防止する際に使用するための、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の核酸組成物。

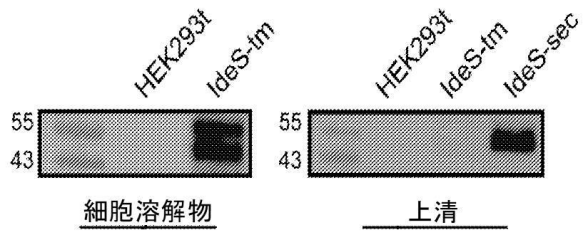
【図面】

【図 1】



【図 2】

Figure 2.



10

20

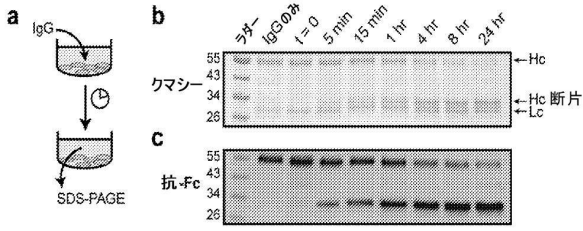
30

40

50

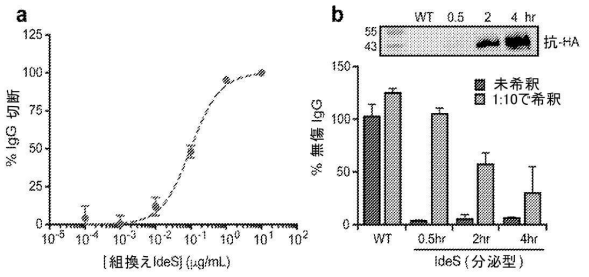
【 図 3 】

Figure 3



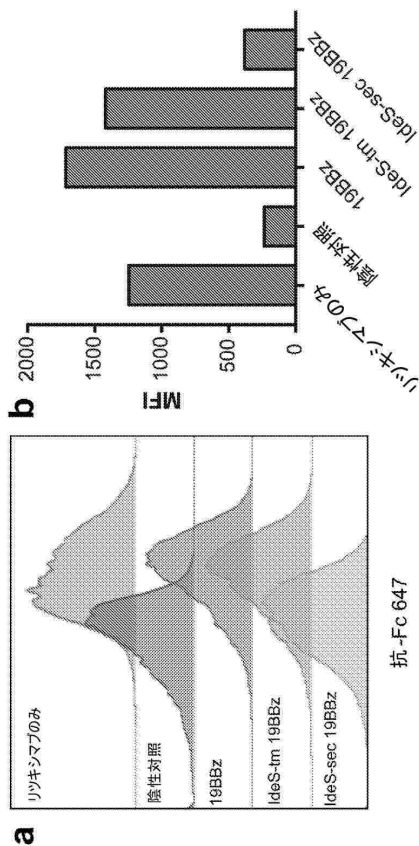
【 図 4 】

Figure 4.



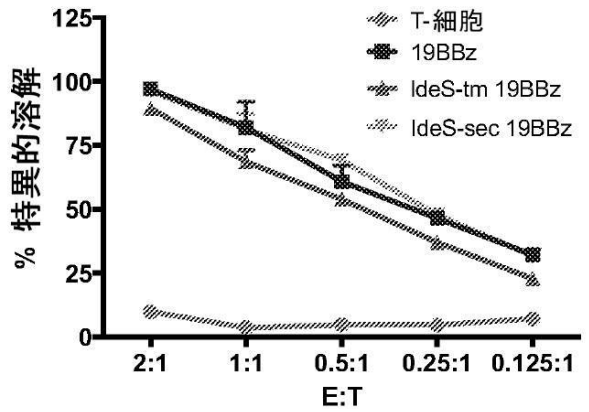
【 図 5 】

Figure 5.



【 図 6 】

Figure 6



10

20

30

40

50

【 図 7 】

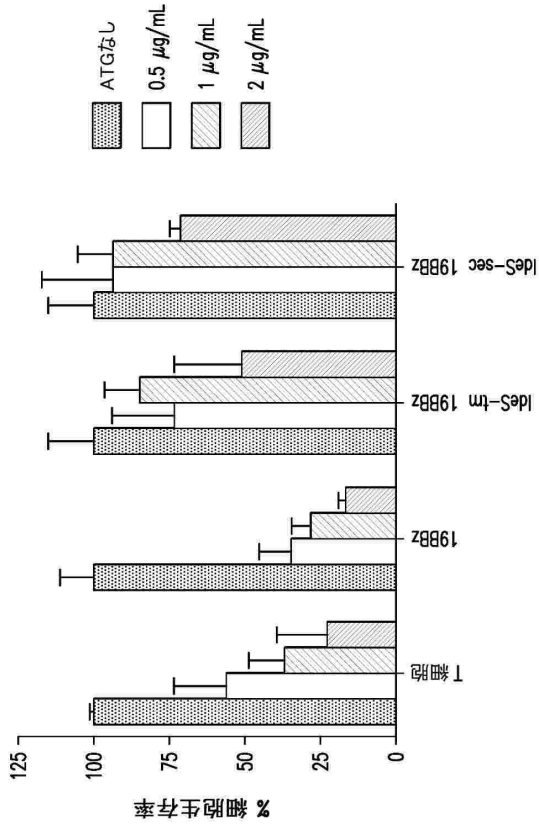


FIG. 7

【 図 8 】

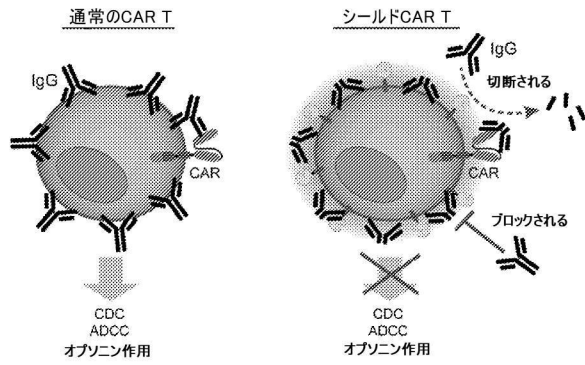


Figure 8.

【 図 9 】

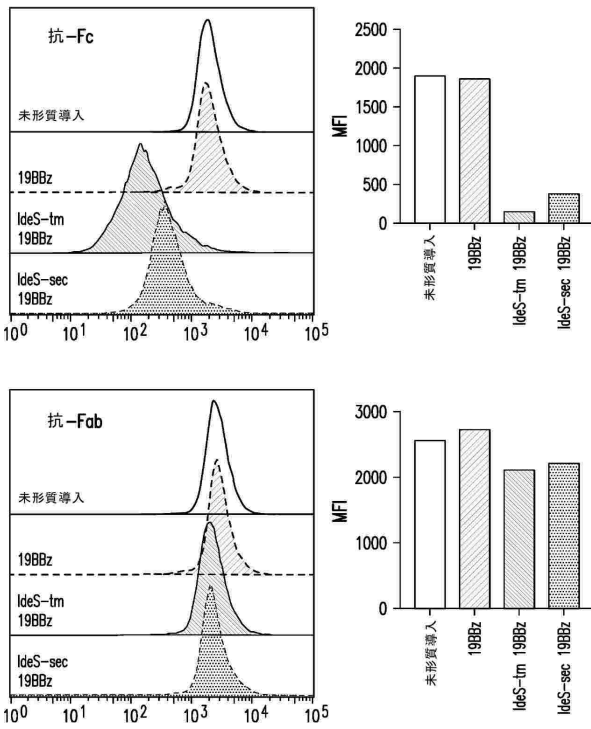


FIG. 9

【 図 10 】

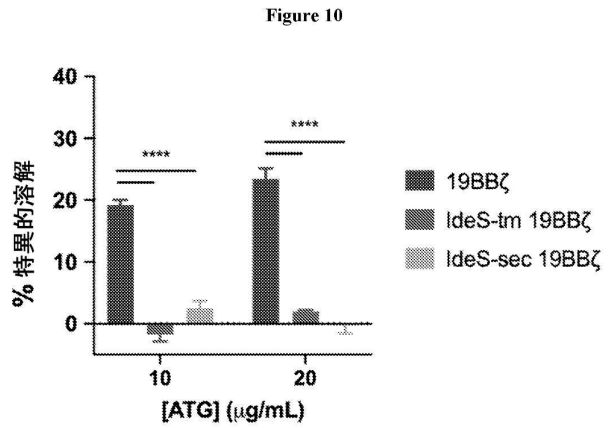


Figure 10

10

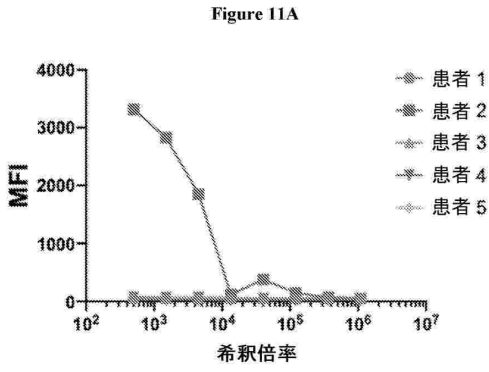
20

30

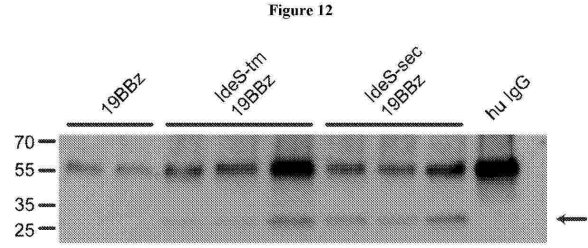
40

50

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



10

Figure 11B

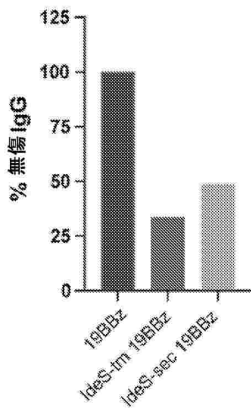
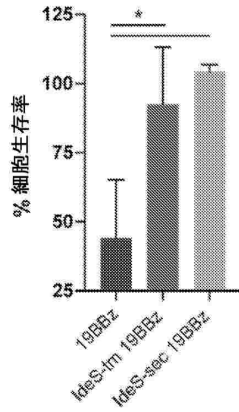


Figure 11C



20

【 配列表 】

0007668261000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I		
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z
A 6 1 K	40/31 (2025.01)	A 6 1 K	40/31	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	
C 1 2 N	9/52 (2006.01)	C 1 2 N	9/52	
C 1 2 N	5/0781(2010.01)	C 1 2 N	5/0781	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	5/0784(2010.01)	C 1 2 N	5/0784	
C 1 2 N	5/0786(2010.01)	C 1 2 N	5/0786	

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

(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 シャインバーグ, デイビッド エー .

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 2 5 , ニューヨーク , セントラル パーク ウェスト 3 2 5 , ナンバー 6 エヌ

(72)発明者 ペラロ, レイラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 1 , ケンブリッジ, スプリング ストリート 1 3 0

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特表 2 0 1 9 - 5 0 1 6 5 4 (J P , A)

特表 2 0 1 9 - 5 0 1 6 5 5 (J P , A)

特表 2 0 1 9 - 5 0 4 8 9 2 (J P , A)

特表 2 0 0 8 - 5 4 2 4 1 8 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 0 9 3 8 1 (J P , A)

特表 2 0 0 7 - 5 3 6 9 0 0 (J P , A)

特表 2 0 1 7 - 5 2 2 3 8 4 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 0 6 4 6 7 (W O , A 1)

BLOOD, 2011年, Vol.117, No.1, pp.72-82

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 5 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0

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