

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7584299号
(P7584299)

(45)発行日 令和6年11月15日(2024.11.15)

(24)登録日 令和6年11月7日(2024.11.7)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
請求項の数 15 (全48頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-564250(P2020-564250)	(73)特許権者	509034605 ナショナル ユニバーシティ オブ シン ガポール シンガポール共和国 シンガポール 1 1 9 0 7 7 ロウワー ケント リッジ ロー ド 2 1
(86)(22)出願日	令和1年5月23日(2019.5.23)	(74)代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(65)公表番号	特表2021-525068(P2021-525068 A)	(74)代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(43)公表日	令和3年9月24日(2021.9.24)	(74)代理人	100117189 弁理士 江口 昭彦
(86)国際出願番号	PCT/US2019/033836	(74)代理人	100134120 弁理士 内藤 和彦
(87)国際公開番号	WO2019/226945	(72)発明者	カンバーナ, ダリオ
(87)国際公開日	令和1年11月28日(2019.11.28)		
審査請求日	令和4年5月16日(2022.5.16)		
(31)優先権主張番号	62/675,511		
(32)優先日	平成30年5月23日(2018.5.23)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T細胞悪性腫瘍の免疫療法のためのCD2表面発現の遮断およびキメラ抗原受容体の発現

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

操作された免疫細胞であって、

(i)細胞局在化ドメインのN末端に連結された一本鎖可変フラグメント(s c F v)を含む、CD2遮断ポリペプチドであって、

前記s c F vがCD2に結合し、前記細胞局在化ドメインが、小胞体(ER)保持配列を含み、前記CD2遮断ポリペプチドが、前記操作された免疫細胞の細胞内に留まり、前記操作された細胞内で内因性CD2に結合し、前記CD2遮断ポリペプチドが配列番号4を含む、CD2遮断ポリペプチドと、

(ii)CD2標的化ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)で、前記CARが抗CD2-4-1BB CD3 CARであり、前記抗CD2-4-1BB CD3 CARが配列番号5を含む、と、を含む、操作された免疫細胞。

【請求項2】

i)前記操作された免疫細胞が、CD2+細胞の細胞毒性を誘発し、および/または前記操作された免疫細胞によるCD2表面発現が、前記CD2遮断ポリペプチドによって遮断され、かつ、前記操作された免疫細胞による前記CD2表面発現の前記遮断が、少なくとも6ヶ月間持続し、もしくは、前記操作された細胞による前記CD2表面発現の前記遮断が、少なくとも12ヶ月間持続する、および/または(ii)前記操作された免疫細胞が、相当する免疫細胞と実質的に同等の速度で増殖する、および/または前記操作された

免疫細胞が同種異系細胞である、または前記操作された免疫細胞が自家細胞である、請求項 1 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 3】

i) 前記操作された免疫細胞が、操作された T 細胞である；

ii) 前記操作された免疫細胞が、操作されたガンマ - デルタ T 細胞である；または

iii) 前記操作された免疫細胞が、操作された NK 細胞である、

請求項 2 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞のうちの少なくとも 1 つを含む、医薬組成物。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞を含む、癌の治療を必要とする対象において癌を治療するための組成物であって、前記組成物が、薬学的に許容される担体をさらに含む、組成物。

【請求項 6】

前記癌が、T 細胞悪性腫瘍または CD 2 関連癌である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 T 細胞悪性腫瘍または前記 CD 2 関連癌が、T 細胞白血病 T 細胞リンパ腫、T 細胞急性リンパ芽球性白血病 (T - A L L)、初期 T 細胞前駆細胞急性リンパ芽球性白血病 (E T P - A L L)、T 細胞前リンパ腫性白血病、T 細胞大顆粒リンパ性白血病、腸疾患関連 T 細胞リンパ腫、肝脾 T 細胞リンパ腫、皮下脂肪織炎様 T 細胞リンパ腫、皮膚 T 細胞リンパ腫 (C T C L)、C T C L の任意のサブタイプ、菌状息肉症、セザリー症候群、原発性皮膚ガンマ - デルタ T 細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (N H L) の T 系統サブセットを伴う悪性腫瘍、特に明記されていない末梢 T 細胞リンパ腫 (P T C L) (P T C L - N O S)、および血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫、および未分化大細胞リンパ腫からなる群から選択される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記組成物の投与が、静脈内注入、動脈内注入、腹腔内注入、腫瘍への直接注射および / もしくは手術後の腫瘍床の灌流、人工足場の腫瘍部位への移植、または髄腔内投与による、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

請求項 1 または 2 に記載の前記 CD 2 遮断ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の前記 C A R をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 9 に記載のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 11 に記載の発現ベクター。

【請求項 13】

請求項 9 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 14】

請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞を産生するための方法であって、

i) 請求項 9 もしくは 10 に記載のポリヌクレオチドを免疫細胞に導入すること；または

ii) 請求項 12 に記載の発現ベクターを免疫細胞に導入すること

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年5月23日出願の米国仮出願第62/675,511号の優先権を主張し、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、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。2019年5月23日作成の当該ASCIIコピーは、「119419-5004-WO__ST25.txt」という名称であり、40.0キロバイトのサイズである。

10

【0003】

本明細書に記載の発明は、一般に、T細胞悪性腫瘍を治療するために、細胞内でCD2に結合する融合タンパク質を遮断するタンパク質発現を含む、キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T細胞)の臨床的に有効な集団、加えてそのようなCAR-T細胞の使用に関する。本発明はまた、細胞内でCD2に結合する融合タンパク質を遮断するタンパク質発現を含む他の免疫細胞の臨床的に有効な集団に関する。

【背景技術】

【0004】

遺伝子操作された免疫細胞は、癌および自己免疫疾患の強力な新しい治療法である。キメラ抗原受容体(CAR)を発現するTリンパ球を用いた最近の臨床試験の結果は、このアプローチの力の説得力のある実証を提供した。キメラ抗原受容体(CAR)は、免疫細胞をリダイレクトして、腫瘍細胞を特異的に認識して死滅させることができる。CARは、膜貫通ドメインを介してシグナル伝達分子に連結された抗体の単鎖可変領域(scFv)で構成される人工的な多分子タンパク質である。scFvがその同種抗原をライゲーションすると、シグナル伝達が引き起こされ、CARを発現する細胞毒性Tリンパ球による腫瘍細胞の殺傷を生じる(Eshhar et al. PNAS USA. 90(2): 720-724, 1993; Geiger et al. J Immunol. 162(10): 5931-5939, 1999; Brentjens et al. Nat Med. 9(3): 279-286, 2003; Cooper et al. Blood 101(4): 1637-1644, 2003; Imai C, et al. Leukemia. 18: 676-684, 2004)。CARを発現する自己Tリンパ球を用いた臨床試験では、B細胞難治性白血病およびリンパ腫の患者で好ましい反応が示されている(例えば、Till et al. Blood 119(17): 3940-3950, 2012; Maude et al. N Engl J Med. 371(16): 1507-1517, 2014を参照されたい)。

20

30

【0005】

表面分子CD19に特異的なCAR-T細胞は、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫などの治療抵抗性のCD19陽性悪性腫瘍の患者で形態学および分子的寛解を誘発することが示されている。他の悪性腫瘍は、異なる抗原に対してリダイレクトされたT細胞によって攻撃され得る。したがって、腫瘍学における遺伝子工学的細胞療法の可能な応用は広範囲である。

40

【0006】

CAR-T細胞注入の初期の臨床経験も潜在的な限界を特定しており、これは治療効果を著しく低下させ、開発を妨げる可能性がある。主要な問題は、がん患者から収集された免疫細胞の適応度が変化し、インビボで拡大し、抗腫瘍効果を発揮する予測不可能な能力をもたらすことである。この変動により、最も効果的な細胞用量の特定が複雑になり、短命で効果のない細胞産物の注入につながり、最終的には一貫した「生体薬(living drug)」の開発が妨げられる可能性がある。健康なドナーからのTリンパ球の使用は、有効性と一貫性を改善するはずであるが、ドナーリンパ球注入の重大な、そして潜在的

50

に致命的な結果である移植片対宿主病（G v H D）のリスクを伴う。そのような同種異系環境では、不可欠な細胞によって発現される組織抗原を認識する能力を抑制するために、注入されるT細胞に対して追加の修飾が必要である。

【0007】

要するに、癌および自己免疫疾患の患者に対する新しい治療法の選択肢について、未だ対処されていない重要なニーズがある。

【発明の概要】

【0008】

本明細書で提供されるのは、免疫細胞における表面受容体発現の遮断のための単純で効果的な方法である。タンパク質発現ブロッカー（PEBL）という名称の特定の構築物は、標的タンパク質の細胞膜への輸送を防ぐ。PEBL構築物は、他の遺伝子修飾と容易に組み合わせることができ、既存の大規模cGMPグレードのプロトコルに組み込まれてエクスピボで細胞を処理して免疫細胞の機能を最適化できる。

10

【0009】

一態様では、本明細書で提供されるのは、操作された免疫細胞であって、

(i) 細胞局在化ドメインのN末端に連結されたCD2に結合する一本鎖可変フラグメント（scFv）を含むCD2遮断ポリペプチドであって、細胞局在化ドメインが、小胞体（ER）保持配列、ゴルジ体保持配列、およびプロテオソーム局在化配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該CD2遮断ポリペプチドが、当該操作された細胞内で細胞に留まり、操作された細胞内で内因性CD2に結合する、CD2遮断ポリペプチドと、

20

(ii) CD2標的化ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）、と、を含む、操作された免疫細胞である。

【0010】

いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号18に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変重鎖（VH）配列と、配列番号19に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変軽鎖（VL）配列とを含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号20に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変重鎖（VH）配列と、配列番号21に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変軽鎖（VL）配列とを含む。

30

【0012】

いくつかの実施形態では、ER保持配列は、KDEL、KKXX、KKMP、およびKKTN（式中、Xが任意のアミノ酸であり得る）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはゴルジ体保持配列は、YGRLL、YQRL、YKGL、およびYXXL（式中、Xが任意のアミノ酸であり得る）からなる群から選択される。

【0013】

いくつかの実施形態では、CD2遮断ポリペプチドは、scFvと、KKMPもしくはKKTNを含むER保持配列ドメイン、またはYGRLL、YQRL、YKGLを含むゴルジ体保持配列ドメインのいずれかとの間に連結された膜貫通ドメインをさらに含み、膜貫通ドメインが、CD8_α、CD8_β、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16、OX40、CD3_ε、CD3_γ、CD3_δ、CD3_ζ、TCR_β、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、およびFGFR2Bからなる群のうちいずれか1つから選択される膜貫通ドメインである。

40

【0014】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8_αのヒンジ-膜貫通ドメインを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、CD2遮断ポリペプチドは、配列番号1~4からなる群から選択されるいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を

50

含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、CARは、抗CD2-4-1BB-CD3 CARである。いくつかの実施形態では、抗CD2-4-1BB-CD3 CARは、配列番号5に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CD2+細胞の細胞毒性を誘発する。いくつかの実施形態では、操作された細胞によるCD2表面発現は、CD2遮断ポリペプチドによって遮断されるか、または顕著に低減される。いくつかの実施形態では、操作された細胞による当該CD2表面発現の遮断は、少なくとも6ヶ月間持続する。いくつかの実施形態では、操作された細胞によるCD2表面発現の遮断は、少なくとも12ヶ月間持続する。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、相当する免疫細胞と実質的に同等の速度で増殖する。

10

【0018】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、同種異系細胞である。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、自己細胞である。

【0019】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、操作されたT細胞である。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、操作されたNK細胞である。

【0020】

別の態様では、本発明は、本明細書で概説される操作された免疫細胞を含む、治療量の組成物を対象に投与し、それにより癌の治療を必要とする対象において癌を治療することを含む、癌の治療を必要とする対象において癌を治療する方法を提供する。

20

【0021】

いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、癌は、T細胞悪性腫瘍またはCD2関連癌である。いくつかの実施形態では、T細胞悪性腫瘍または当該CD2関連癌は、T細胞白血病T細胞リンパ腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)、初期T細胞前駆細胞急性リンパ芽球性白血病(ETP-ALL)、T細胞前リンパ腫性白血病、T細胞大顆粒リンパ性白血病、腸疾患関連T細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、皮下脂肪織炎様T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)、CTCLの任意のサブタイプ、菌状息肉症、セザリー症候群、原発性皮膚ガンマ-デルタT細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)のT系サブセットを伴う悪性腫瘍、特に明記されていない末梢T細胞リンパ腫(PTCL)(PTCL-NOS)、および血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、および未分化大細胞リンパ腫からなる群から選択される。

30

【0023】

いくつかの実施形態では、投与ステップは、静脈内注入、動脈内注入、腹腔内注入、腫瘍への直接注射および/もしくは手術後の腫瘍床の灌流、人工足場の腫瘍部位への移植、または髄腔内投与による。

40

【0024】

また、本明細書で提供されるのは、記載のCD2遮断ポリペプチドのうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドである。また、本明細書で提供されるのは、記載のCARのうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドである。

【0025】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、CD2遮断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、CARをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、CD2遮断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つと、本明細書に記載のCARをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む発現

50

ベクター。

【0026】

また、本明細書で提供されるのは、CD2遮断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む、発現ベクターを含む宿主細胞であり、発現ベクターは、CARをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む。

【0027】

本明細書に提供されるのは、CD2遮断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つと、本明細書に記載のCARをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つと、を含む発現ベクターを含む宿主細胞である。

【0028】

いくつかの態様では、本発明は、実施形態のうちのいずれか1つの操作された免疫細胞を産生するための方法を提供する。本方法は、例示的なポリヌクレオチドを免疫細胞に導入することを含む。

【0029】

他の態様では、本発明は、実施形態のうちのいずれか1つの操作された免疫細胞を産生するための方法を提供する。本方法は、例示的な発現ベクターのうちの1つ以上を免疫細胞に導入することを含む。

【0030】

本発明の追加の説明は、2018年5月24日出願の米国仮出願第62/675,525号に見出すことができ、その内容は、配列、図、および図の凡例を含めて、その全体が本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】本明細書に記載の例示的な抗CD2キメラ抗原受容体(CAR)構築物の概略を示す。

【図2】Jurkat細胞における抗CD2 CARの発現を示す。抗CD2 CARは、抗CD2モノクローナル抗体9.6系抗CD2 scFvを含む。9.6の詳細な説明は、例えば、Kamoun et al. J Exp Med, 1981, 153:207-212に見出すことができる。細胞は、CAR構築物とGFP、またはGFPのみ(「モック」)を含むベクターで形質導入されている。フローサイトメリーのドットプロットは、抗CD2 CAR発現を示している。抗ヤギ抗マウス抗体APC(GAM-APC)を使用した。抗CD2モノクローナル抗体9.6および9-1の詳細な説明は、例えば、Kamoun et al. J Exp Med, 1981, 153:207-212、およびBernard et al., in Leukocyte Typing II, 1986, eds. Reinherz, E.L., Haynes, B.F., Nadler, L.M., & Bernstein, I.D. (Springer, New York), pp. 53-66にそれぞれ見出すことができる。

【図3】抗CD2 CARの発現が、CD2+標的細胞の存在下で活性化マーカーの発現を誘発したことを示す。棒グラフは、9.6抗CD2 CARを発現する細胞の存在下にあるとき、CCRf-CEM細胞株のCD25+細胞およびCD69+細胞の数が増加したことを示している。

【図4】T細胞上での9.6抗CD2 CAR構築物の発現を示す。T細胞は、CAR構築物とGFP、またはGFPのみ(「モック」)を含むベクターで形質導入されている。フローサイトメリーのドットプロットは、抗CD2 CAR発現を示している。抗ヤギ抗マウス抗体APC(GAM-APC)を使用した。

【図5】標的細胞(CD2+標的細胞)に対する9.6抗CD2 CAR発現T細胞の細胞毒性活性を示す。共培養実験では、抗CD2 scFv-41BB-CD3 CAR mRNAまたはGFPのみのmRNAのいずれかで電気穿孔したCARまたはモック形質導入T細胞の細胞毒性が示された。CAR T細胞および標的を1:1のエフェクター対標的比(E:T)でプレーティングした。数日間の共培養後、生存可能な標的細胞の数を

10

20

30

40

50

決定した。棒グラフは、9.6抗CD2 CAR T細胞が、CD2+標的細胞に対して細胞毒性を発揮したことを示している。CD107aは、刺激に続くCD8+T細胞の脱顆粒化およびNK細胞の機能的活性のマーカーを表す。棒グラフは、GFPのみと比較して、9.6抗CD2 CARを発現するとCD107a+細胞の割合がより高いことを示している。

【図6】本明細書に記載の抗CD2タンパク質発現ブロッカー(PEBL)構築物の例示的な実施形態を提供する。9.6PEBL I構築物は、CD8シグナルペプチドと、リンカーを介してVHドメインに接続されたVLドメインを含む9.6抗CD2 scFvと、ER保持ドメインと、を含む。9.6PEBL II構築物は、CD8シグナルペプチドと、リンカーを介してVHドメインに接続されたVLドメインを含む9.6抗CD2 scFvと、CD8ヒンジ-膜貫通ドメインと、ER保持ドメインと、を含む。9.6PEBL I構築物は、CD8シグナルペプチドと、リンカーを介してVHドメインに接続されたVLドメインを含む9.6抗CD2 scFvと、ER保持ドメインと、を含む。9.6PEBL II構築物は、CD8シグナルペプチドと、リンカーを介してVHドメインに接続されたVLドメインを含む9.6抗CD2 scFvと、CD8ヒンジ-膜貫通ドメインと、ER保持ドメインと、を含む。9.6抗CD2モノクローナル抗体および9.6抗CD2モノクローナル抗体の詳細な説明は、例えば、Kamounet al. *J Exp Med*, 1981, 153:207-212、およびBernard et al., *in Leukocyte Typing II*, 1986, eds. Reinherz, E.L., Haynes, B.F., Nadler, L.M., & Bernstein, I.D. (Springer, New York), pp. 53-66にそれぞれ見出すことができる。9.6scFvは、休止T細胞および活性化T細胞の両方でCD2を認識し結合する。また、CD58のCD2への結合を阻害(遮断)する。9.6scFvは、活性化T細胞上のCD2を認識し結合する。CD58のCD2への結合は遮断しない。

【図7】9.6抗CD2 PEBL I、9.6抗CD2 PEBL II、9.6抗CD2 PEBL I、9.6抗CD2 PEBL II、またはGFPのみ(「モック」)で形質導入されたJurkat細胞における、CD2の表面および細胞内発現のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。Jurkat細胞における9.6抗CD2 PEBL II構築物の発現は、CD2の発現を下方制御した。

【図8】9.6抗CD2 PEBL II構築物を電気穿孔したT細胞におけるCD2の表面発現のフローサイトメトリードットプロットを示す。データは、電気穿孔されたT細胞によるCD2発現の下方制御(部分的な下方制御)を示している。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明の例示的な実施形態の説明は以下の通りである。

【0033】

I. 導入

本発明は、CAR-T細胞を含むT細胞の表面分子の迅速かつ効率的な下方制御を可能にする方法を提供する。本発明の一実施形態では、抗CD2 PEBLの形質導入によってCD2の細胞内保持が生じた抗CD2 PEBL(CD2 PEBLとも称される)が提供される。本明細書で概説されるPEBL構築物は、細胞外漏出が最小限であるか、または全くない場合があり、CD2発現およびシグナル伝達の遮断に非常に効果的である。PEBL発現およびCD2遮断は永続的であり、他の表面分子の発現には影響を与えない。PEBLを発現する免疫細胞、例えばT細胞は、相当する免疫細胞、例えばT細胞と同様に生存および増殖することができる。重要なことに、PEBL発現T細胞はCARシグナル伝達に正常に応答し、インビトロで、CAR標的白血病細胞、例えば癌細胞を効果的に殺傷することができる。PEBLによる、CD2発現およびシグナル伝達の遮断は、CAR-T細胞などの同種異系T細胞の注入をサポートするためのシンプルかつ効果的なツールである。

【0034】

II. 定義

本発明の実施は、他に示されない限り、当技術分野の範囲内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を用いるであろう。そのような技術は、文献で完全に説明されている。例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984)、Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195、Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds., 1984)、Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds., 1984)、Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987)、Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986)、B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)、the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson and M. Simon, eds. - in - chief, Academic Press, Inc., New York)、具体的には Vols. 154 および 155 (Wu et al. eds.) および Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.)、Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)、Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)、Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I - IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986)、ならびに Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986) を参照されたい。

【0035】

本開示をより容易に理解することができるようにするために、特定の用語をまず定義する。本出願で使用される場合、本明細書で明示的に提供される場合を除き、次の各用語は、以下に記載される意味を有するものとする。追加の定義は、本出願全体にわたり記載されている。

【0036】

他に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本開示が関連する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei - Show, 2nd ed., 2002, CRC Press、The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press、および the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press は、多くの本開示で使用される用語の一般的な

10

20

30

40

50

辞書を当業者に提供する。

【0037】

態様が「含む」という言葉で本明細書に記載されている場合は常に、「からなる」および/または「本質的にからなる」に関して記載されている類似の態様もまた提供されることが理解される。

【0038】

本明細書で使用する場合、「操作された免疫細胞」とは、天然に存在する免疫細胞と比較して、遺伝的に修飾された免疫細胞を指す。

【0039】

本明細書で使用する場合、「核酸」という用語は、複数のヌクレオチドモノマー（例えば、リボヌクレオチドモノマーまたはデオキシリボヌクレオチドモノマー）を含むポリマーを指す。「核酸」には、例えば、ゲノムDNA、cDNA、RNA、およびDNA-RNAハイブリッド分子が含まれる。核酸分子は、天然に存在する、組換え、または合成のものであり得る。さらに、核酸分子は、一本鎖、二本鎖または三本鎖であり得る。いくつかの実施形態では、核酸分子を修飾することができる。二本鎖ポリマーの場合、「核酸」は分子の片方または両方の鎖を指す。

10

【0040】

核酸に関する「ヌクレオチド配列」という用語は、リン結合（例えば、ホスホジエステル、アルキルおよびアリアルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル結合）および/または非リン結合（例えば、ペプチドおよび/またはスルファメート結合）などの共有結合により接合された連続した一連のヌクレオチドを指す。特定の実施形態では、例えば、局在化ドメインに連結された標的結合分子をコードするヌクレオチド配列は、異種配列（例えば、異なる種または細胞型起源の遺伝子）である。

20

【0041】

「ヌクレオチド」および「ヌクレオチドモノマー」という用語は、天然に存在するリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドモノマー、ならびにその天然に存在しない誘導体および類似体を指す。したがって、ヌクレオチドには、例えば、天然に存在する塩基（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、イノシン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、またはデオキシシチジン）を含むヌクレオチド、および当技術分野で既知の修飾塩基を含むヌクレオチドが含まれ得る。

30

【0042】

当業者によって理解されるように、いくつかの態様では、核酸はプラスミド配列をさらに含む。プラスミド配列は、例えば、プロモーター配列、選択マーカー配列、および遺伝子座標的配列からなる群から選択される1つ以上の配列を含むことができる。

【0043】

本明細書で使用する場合、局在化ドメインに連結された標的結合分子をコードする遺伝子は、「PEBLをコードする遺伝子」、「PEBLをコードするポリヌクレオチド」、「PEBLをコードする核酸」などと称されることがある。

【0044】

特定の実施形態では、標的結合分子は抗体またはその抗原結合フラグメントである。本明細書で使用する「抗体」とは、無傷の抗体または抗体の抗原結合フラグメントを意味し、無傷の抗体または修飾されたまたは操作された、またはヒト抗体である抗原結合フラグメントを含む。修飾されたまたは操作された抗体の例は、キメラ抗体、ヒト化抗体、マルチパラトピック抗体（例えば、バイパラトピック抗体（*biparatopic antibody*））、および多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体（*bispecific antibody*））である。抗原結合フラグメントの例には、Fab、Fab'、 $(Fab')_2$ 、Fv、単鎖抗体（例えばscFv）、ミニ抗体（*minibody*）および二重特異性抗体（*diabody*）が含まれる。

40

【0045】

「二重特異性抗体（*diabody*）」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フ

50

ラグメントである。フラグメントは、同じポリペプチド鎖 ($V_H - V_L$ または $V_L - V_H$) 中に軽鎖可変領域 (V_L) に接続された重鎖可変領域 (V_H) を含む。同じ鎖上の2つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用すると、ドメインは別のチェーンの相補ドメインとペアリングさせられ、2つの抗原結合部位が作成される。二重特異性抗体は、例えば、特許文献EP 404,097、WO 93/11161、および Holliger et al, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448 に記載されている。

【0046】

特定の実施形態では、抗体は三重特異性抗体 (triabody) または四重特異性抗体 (tetrabody) である。三重特異性抗体および四重特異性抗体を設計および生産する方法は、当技術分野で知られている。例えば、Todorovska et al, J. Immunol. Methods 248 (1-2): 47 - 66, 2001 を参照されたい。

10

【0047】

「ドメイン抗体フラグメント」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含む免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントである。場合によっては、2つ以上の V_H 領域がペプチドリンカーと共有結合して、二価ドメイン抗体フラグメントを作成する。二価ドメイン抗体フラグメントの2つの V_H 領域は、同じ抗原または異なる抗原を標的とし得る。

【0048】

いくつかの実施形態では、抗体は修飾または操作されている。修飾または操作された抗体の例には、キメラ抗体、マルチパラトピック抗体 (例えば、バイパラトピック抗体)、および多特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体 (bisppecific antibody)) が含まれる。

20

【0049】

本明細書で使用する場合、「マルチパラトピック抗体」とは、少なくとも2つの単一ドメイン抗体を含む抗体を意味し、少なくとも1つの単一ドメイン抗体は抗原上の第1の抗原決定基に対するものであり、少なくとも1つの他の単一ドメイン抗体は同じ抗原上の第2の抗原決定基に対するものである。したがって、例えば、「バイパラトピック」抗体は、抗原上の第1の抗原決定基に対する少なくとも1つの単一ドメイン抗体と、同じ抗原上の第2の抗原決定基に対する少なくとも1つのさらなる単一ドメイン抗体を含む。

30

【0050】

本明細書で使用する場合、「多特異性抗体」とは、少なくとも2つの単一ドメイン抗体を含む抗体を意味し、少なくとも1つの単一ドメイン抗体は第1の抗原に対するものであり、少なくとも1つの他の単一ドメイン抗体は第2の抗原に対するものである (第1の抗原とは異なる)。したがって、例えば、「二重特異性」抗体は、第1の抗原に対する少なくとも1つの単一ドメイン抗体と、例えば第1の抗原とは異なる、第2の抗原に対する少なくとも1つのさらなる単一ドメイン抗体を含む抗体である。

【0051】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体は、モノクローナル抗体、例えばマウスモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体を産生する方法は、当該分野で周知である。例えば、Pluckthun (1994) The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 を参照されたい。

40

【0052】

「Fab フラグメント」は、1つの軽鎖と1つの重鎖の CH_1 および可変領域を含む。Fab 分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。

【0053】

「Fc」領域は、抗体の CH_2 および CH_3 ドメインを含む2つの重鎖フラグメントを

50

含む。2つの重鎖フラグメントは、2つ以上のジスルフィド結合と、CH₃ドメインの疎水性相互作用によって結合している。

【0054】

「Fab'フラグメント」には、1つの軽鎖と、VHドメインとCHIドメイン、およびCHIドメインとCH₂ドメイン間の領域を含む1つの重鎖の一部が含まれ、2つのFab'フラグメントの2つの重鎖間で鎖間ジスルフィド結合が形成されF(ab')₂分子を形成する。

【0055】

「F(ab')₂フラグメント」は、2つの軽鎖とCH₁ドメインとCH₂ドメイン間の定常領域の一部を含む2つの重鎖を含み、2つの重鎖間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、F(ab')₂フラグメントは、2つの重鎖間のジスルフィド結合によって結合された2つのFab'フラグメントで構成されている。

10

【0056】

「Fv領域」は、重鎖と軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域を欠いている。

【0057】

特定の実施形態では、標的結合分子は単鎖Fv抗体(「scFv抗体」)である。scFvは、抗体のVHおよびVLドメインを含む抗体フラグメントを指し、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、Fvポリペプチドは、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成できるようにするVHドメインとVLドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含む。scFvの総説については、Pluckthun(1994) *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315を参照されたい。PCT公開第WO88/01649および米国特許第4,946,778号および第5,260,203号も参照されたい。

20

【0058】

「配列同一性」という用語は、デフォルトギャップ重量を使用するプログラムGAPまたはBESTFITなどによって最適に整列されると、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列が、少なくとも、例えば、70%の配列同一性、または少なくとも80%の配列同一性、または少なくとも85%の配列同一性、または少なくとも90%の配列同一性、または少なくとも90%以上の配列同一性を共有することを意味する。配列比較では、通常、1つの配列が参照配列(親配列など)として機能し、試験配列と比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験および参照配列がコンピューターに入力され、必要に応じてサブ配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。次に、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列のパーセント配列同一性を計算する。

30

【0059】

比較のための配列の最適なアライメントは、例えば、Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970)の相同アラインメントアルゴリズムにより、Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988)の類似法の検索により、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実装(Wisconsin Genetics Software PackageのGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、ウィスコンシン州マディソン)により、または目視検査により(一般的にAusubel et al, *Current Protocols in Molecular Biology*を参照)行うことができる。パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに適切なアルゴリズムの一例は、BLASTアルゴリズムであり、これはAltschul et al, *J. Mol. Biol.* 215: 403 (199

40

50

0)に記載されている。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationから公開されている(National Institutes of Health NCBIインターネットサーバーから公開されている)。通常、デフォルトのプログラムパラメータを使用して配列比較を実行できるが、カスタマイズされたパラメータも使用できる。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、デフォルトとしてワード長(W)3、期待値(E)10、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)を参照)。

【0060】

本明細書で使用する場合、PEBL遺伝子に関連する「作動可能に連結された」とは、1つ以上の局在化ドメインをコードする1つ以上の遺伝子に隣接するフレームに(例えば、リンカーなしで)標的結合分子を直接コードする遺伝子を指す。あるいは、標的結合分子をコードする遺伝子は、本明細書に記載されるように、リンカー配列を介して1つ以上の局在化ドメインをコードする1つ以上の遺伝子に接続されてもよい。

【0061】

本明細書で使用する場合、タンパク質に関連する「連結された」とは、第1のドメイン、例えば標的結合分子の、第2のドメイン、例えば局在化ドメインへの接合を指す。リンカーはアミノ酸配列であり得る。当技術分野で周知の様々な適切なリンカーを使用して、標的結合分子を局在化ドメインにつなぐことができる。例えば、変動する長さの親水性残基からなるポリペプチド、または(GGGGS)_n(配列番号35)ポリペプチド(nが、例えば3~12の整数である)などの天然に存在しないペプチドを、包括的に、本発明に従って使用することができる。

【0062】

本明細書で使用する場合、「治療する(treat)」、「治療すること(treating)」、または「治療(treatment)」という用語は、臨床的に許容される基準に従って、医学的状態が改善される程度まで、医学的状態(例えば、T細胞悪性腫瘍に関係する状態)に対抗することを指す。

【0063】

本明細書で使用する場合、「対象」という用語は、哺乳動物(例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス)を指す。特定の実施形態では、対象はヒトである。「治療を必要とする対象」とは、T細胞を誘発して悪性腫瘍T細胞に対して特異的な細胞毒性を発揮することにより治療(例えば、改善、寛解、予防)することができる疾患または状態を、有するかまたは発症するリスクがある対象(例えば、患者)を指す。

【0064】

本明細書で定義されるように、「治療量」とは、対象に投与されると、投与条件下で対象において所望の治療効果を達成する(T細胞悪性腫瘍に関係する状態を治療する)のに十分である量を指す。投与される薬剤の有効量は、本明細書で提供されるガイドンスおよび当技術分野で知られている他の方法を使用して、および例えば、選択された特定の薬剤、対象の年齢、感受性、薬物に対する耐性および全体的な健康状態を含むいくつかの要因に依存して、通常の技能の臨床医が決定できる。

【0065】

本明細書で使用する場合、「治療効果の増強」とは、宿主における移植片対宿主病(GvHD)の低減、宿主による拒絶の低減もしくは排除、宿主における生存期間の延長、宿主における腫瘍による阻害の低減、宿主における自己殺傷(self-killing)の低減、宿主における炎症カスケードの低減、または宿主におけるCAR媒介シグナル伝達の持続のうちの1つ以上を指す。

【0066】

III. タンパク質発現ブロッカー(PEBL)

10

20

30

40

50

本明細書に記載の方法は、免疫細胞におけるCD2などの特定の標的タンパク質の迅速な除去または不活性化を可能にする。この方法は、一部は、除去または中和される標的（例えば、タンパク質）に結合する標的結合分子を含むポリペプチド構築物に依存している。標的結合分子は、用途に応じて、ゴルジ体、小胞体、プロテアソーム、または細胞膜などの特定の細胞区画にポリペプチドを導くドメイン（例えば、局在化ドメインまたは細胞内保持ドメイン）に連結されている。簡単にするために、局在化ドメインに連結された標的結合分子は、本明細書では「タンパク質発現ブロッカー」または「PEBL」と称されることがある。いくつかの実施形態では、PEBLはまた、シグナルペプチドドメインを含む。さらに他の実施形態では、PEBLは、膜貫通ドメインを含むか、または細胞局在化ドメインは、膜貫通ドメインを含む。

10

【0067】

PEBLの例示的な実施形態を図6に示し、例示的なアミノ酸および核酸配列を表1に提供する。

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1. P E B L、C A R、およびそれらの構成要素の配列

名称	配列番号:	配列
9-IPEBL I	配列番号 1	MALPVTALLLPLALLLHAARPIVMTQSPATLSVTPGDRVLSSCR ASQSIDYLVHWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSD FTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELRGGGGSG GGGSGGGGSQVQLQQPGTELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWV NWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFTDKAISTIDTSSNT AYMQLSTLTSDASAVYYCSRSPRDSSTNLADWGQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGGSGGGGSAEKDEL
9-IPEBL II	配列番号 2	MALPVTALLLPLALLLHAARPIVMTQSPATLSVTPGDRVLSSCR ASQSIDYLVHWYQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSD FTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELRGGGGSG GGGSGGGGSQVQLQQPGTELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWV NWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFTDKAISTIDTSSNT AYMQLSTLTSDASAVYYCSRSPRDSSTNLADWGQGLTVTVSSK PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYKYKSRRSFIEEKKMP
9.6PEBL I	配列番号 3	MALPVTALLLPLALLLHAARPNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMT CKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAVYYCHQYLSSTHFGGGTKLE IKRGGGGSGGGSGGGGSQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGY TFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLT VDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTS VTVSSGGGGSGGGSGGGGSAEKDEL
9.6PEBL II	配列番号 4	MALPVTALLLPLALLLHAARPNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMT CKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAVYYCHQYLSSTHFGGGTKLE IKRGGGGSGGGSGGGGSQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGY TFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLT VDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTS VTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYKYKSRRSFIEEKKMP
9.6 抗-CD2 CAR	配列番号 5	MALPVTALLLPLALLLHAARPNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMT CKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAVYYCHQYLSSTHFGGGTKLE IKRGGGGSGGGSGGGGSQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGY TFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLT VDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTS VTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGN QLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQUALPPR
9-IPEBL I	配列番号 6	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCGTGACCGCCCTGCTG CTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCGCCAATCGTGA TGACCCAGAGCCCAGCCACCCTGTCCGTGACACCTGGCGACC GGGTGTCTCTGAGCTGCAGAGCCTCCAGTCTATCAGCGATT ACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGTCCCACGAGTCTCCCCGGC TGCTGATCAAGTACGCTAGCCAGTCTATCAGCGGCATCCCTA GCCGGTCTCCGGATCTGGAAGCGGATCCGACTTTACCCTGA GCATCAACTCCGTGGAGCCAGAGGATGTGGGCGTGTACTATT GCCAGAATGGCCACTCCTTCCCCCTGACCTTTGGCGCCGCA CAAAGCTGGAGCTGCGGAGAGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGA GGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCCAGGTGCAGCTGCAGCA GCCAGGAACAGAGCTGGTGCGGCCCGGCAGCTCCGTGAAGC

10

20

30

40

【表 1 - 2】

		TGTCCTGTAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACAAGCTATTGGGT GAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGACCAGGGCCTGGAGTGGA TCGGAAGGATCGACCCATACGATTCTGAGACACACTATAACC AGAAGTTTACAGACAAGGCCATCAGCACCATCGATACATCTA GCAATACCGCCTATATGCAGCTGTCCACCCTGACATCTGATG CCAGCGCCGTGTAATTTGTTCTAGGAGCCCTCGCGACTCCTC TACAAATCTGGCAGATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGT GAGCTCCGGTGGTGGCGGCAGTGGTGGCGGTGGCTCAGGCG GTGGTGGCTCCGGTGGCGGTGGCTCTGCAGAAAAAGATGAGT TGTAACCTCGAG
9-1PEBL II	配列番号 7	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCCTGCTG CTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCGCCCAATCGTGA TGACCCAGAGCCCAGCCACCCTGTCCGTGACACCTGGCGACC GGGTGTCTCTGAGCTGCAGAGCCTCCAGTCTATCAGCGATT ACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGTCCCACGAGTCTCCCCGGC TGCTGATCAAGTACGCTAGCCAGTCTATCAGCGGCATCCCTA GCCGGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGATCCGACTTACCCTGA GCATCAACTCCGTGGAGCCAGAGGATGTGGGCGTGTACTATT GCCAGAAATGGCCACTCCTTCCCCCTGACCTTGGCGCCGCA CAAAGCTGGAGCTGCGGAGAGGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGA GGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCCAGGTGCAGCTGCAGCA GCCAGGAACAGAGCTGGTGGCGGCCCGGACGCTCCGTGAAGC TGTCTGTAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACAAGCTATTGGGT GAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGACCAGGGCCTGGAGTGGA TCGGAAGGATCGACCCATACGATTCTGAGACACACTATAACC AGAAGTTTACAGACAAGGCCATCAGCACCATCGATACATCTA GCAATACCGCCTATATGCAGCTGTCCACCCTGACATCTGATG CCAGCGCCGTGTAATTTGTTCTAGGAGCCCTCGCGACTCCTC TACAAATCTGGCAGATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGT GAGCTCCAAGCCAACCACAACCCCTGCACCAAGGCCACCTAC ACCAGCACCTACCATCGCAAGCCAGCCACTGTCCCTGAGGCC AGAGGCATGTAGGCCTGCAGCAGGAGGCGCCGTGCACACAC GCGGCCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATCTGGGCACCAC TGGCAGGAACCTGTGGCGTGTCTGCTGAGCCTGGTGATTA CCCTGTATAAGTACAAGTCCAGACGCTCATTATTGAGGAAA AGAAAATGCCTTAACTCGAG
9.6PEBL I	配列番号 8	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCCTGCTG CTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCGCCCAACATCA TGATGACCCAGTCCCCAGCTCCCTGGCCGTGTCTGCCGGAG AGAAGGTGACCATGACATGCAAGTCTAGCCAGTCCGTGCTGT ACTCCTCTAACCAAGAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGA AGCCCCGCCAGAGCCCTAAGCTGTGATCTATTGGGCAAGCA CCCCGGAGTCCGGAGTGCCAGACAGATTACCCGGAAGCGGA TCCGGAACAGACTTCACCCGACAAATCAGTCCGTGCAGCCT GAGGACCTGGCCGTGTAATTTGCCACCAGTACCTGTCTAGC CACACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGAGGGG AGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTCTGGCGGCGGCGGCA GCCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCCGGC TCCTCTGTGAAGCTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCA CAAGGTATTGGATCCACTGGGTGAAGCAGCGCCCTATCCAGG GCCTGGAGTGGATCGGCAACATCGACCCATCTGATAGCGAGA CACACTACAATCAGAAGTTTAAAGGACAAGGCCACCCTGACAG TGGATAAGAGCTCCGGCACCGCCTATATGCAGCTGTCTAGCC TGACATCCGAGGACTCTGCCGTGTAATTTGTGCCACAGAGG ATCTGTACTATGCCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCTCCG TGACAGTGTCTCTGGTGGTGGCGGCAGTGGTGGCGGTGGCT CAGGCGGTGGTGGCTCCGGTGGCGGTGGCTCTGCAGAAAAA GATGAGTTGTAACCTCGAG

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

9.6PEBL II	配列番号 9	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCCTGCTG CTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCCGCCCCAAACATCA TGATGACCCAGTCCCCCAGCTCCCTGGCCGTGTCTGCCGGAG AGAAGGTGACCATGACATGCAAGTCTAGCCAGTCCGTGCTGT ACTCCTCTAACCAAGAAGAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGA AGCCCCGCCAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCAAGCA CCCCGGAGTCCGGAGTGCCAGACAGATTACCCGGAAGCGGA TCCGGAACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGCCT GAGGACCTGGCCGTGACTATTGCCACCAGTACCTGTCTAGC CACACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGAGGGG AGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTCTGGCGGCGGCGGCA GCCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCCGGC TCCTCTGTGAAGCTGTCTTGTAAAGGCCAGCGCTACACCTTCA CAAGGTATTGGATCCACTGGGTGAAGCAGCGCCCTATCCAGG GCCTGGAGTGGATCGGCAACATCGACCCATCTGATAGCGAGA CACACTACAATCAGAAGTTTAAAGGACAAGGCCACCCTGACAG TGGATAAGAGCTCCGGCACCCTATATGCAGCTGTCTAGCC TGACATCCGAGGACTCTGCCGTGACTATTGTGCCACAGAGG ATCTGACTATGCCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCTCCG TGACAGTGTCTCTAAGCCAACCACAACCCCTGCACCAAGGC CACCTACACCAGCACCTACCATCGCAAGCCAGCCACTGTCCC TGAGGCCAGAGGCATGTAGGCCTGCAGCAGGAGGCGCCGTG CACACACGCGGCCCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATCTGG GCACCACTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGCTGAGCCTG GTGATTACCTGTATAAGTACAAGTCCAGACGCTCATTATT GAGGAAAAGAAAATGCCTTAACTCGAG	10
9.6 抗-CD2 CAR	配列番号 10	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCCTGCTG CTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCCGCCCCAAACATCA TGATGACCCAGTCCCCCAGCTCCCTGGCCGTGTCTGCCGGAG AGAAGGTGACCATGACATGCAAGTCTAGCCAGTCCGTGCTGT ACTCCTCTAACCAAGAAGAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGA AGCCCCGCCAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCAAGCA CCCCGGAGTCCGGAGTGCCAGACAGATTACCCGGAAGCGGA TCCGGAACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGCCT GAGGACCTGGCCGTGACTATTGCCACCAGTACCTGTCTAGC CACACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGAGGGG AGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTCTGGCGGCGGCGGCA GCCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCCGGC TCCTCTGTGAAGCTGTCTTGTAAAGGCCAGCGCTACACCTTCA CAAGGTATTGGATCCACTGGGTGAAGCAGCGCCCTATCCAGG GCCTGGAGTGGATCGGCAACATCGACCCATCTGATAGCGAGA CACACTACAATCAGAAGTTTAAAGGACAAGGCCACCCTGACAG TGGATAAGAGCTCCGGCACCCTATATGCAGCTGTCTAGCC TGACATCCGAGGACTCTGCCGTGACTATTGTGCCACAGAGG ATCTGACTATGCCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCTCCG TGACAGTGTCTCTACCACTACACCTGCACCAAGGCCTCCCA CACCCGCTCCCACTATCGCTTCCCAGCCACTGTCCCTGAGGCC CGAGGCCTGCAGGCCAGCAGCTGGCGGAGCCGTGCATACTA GGGGGCTGGACTTCGCTTGCACATCTACATCTGGCCCCAC TGGCAGGGACATGCGGAGTCTGCTGCTGTCCCTGGTCATCA CACTGTACTGCAAGCGGGGCGCAAAAAAAGTGTGTATATCT TTAAGCAGCCTTTCATGAGACCAGTGCAGACAACCCAGGAGG AAGATGGGTGCTCATGCCGGTTTCCCGAGGAGGAGGAAGGC GGCTGCGAGCTGAGGGTGAAGTTTTCCCGCTCAGCAGATGCT CCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAATGAGCTG AACCTGGGCAGACGCGAAGAGTATGATGTGCTGGACAAAAG GCGGGGAAGAGACCCCGAAATGGGAGGGAAGCCAAGGCGG AAAAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGA	20
			30
			40

【表 1 - 4】

		CAAAATGGCAGAGGCTTACAGTGAGATTGGGATGAAGGGAG AGAGACGGAGGGGAAAAGGGCACGATGGCCTGTACCAGGGG CTGAGCACAGCAACCAAAGATACTTATGACGCACTGCACATG CAGGCACTGCCACCCAGATGACAGCCAGGGGATTTACCACCT CAAAGGCCAGACCTGCAGACGCCAGATTATGAGACACACTC GAG	
CD8 シグナル ペプチド	配列番号 11	MALPVTALLLPLALLLHAARP	
VL-VH リンカ ー	配列番号 12	GGGGSGGGGSGGGGS	
ER 保持ドメイ ン	配列番号 13	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAEKDEL	10
ER 保持ドメイ ン	配列番号 14	LYKYKSRRSFIEEKMP	
CD8 α ヒンジ および膜貫通 ドメイン	配列番号 15	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLITLY	
4-1BB 細胞内 シグナル伝達 ドメイン	配列番号 16	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	
CD3 ζ 細胞内 シグナル伝達 ドメイン	配列番号 17	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	20
抗 CD2 VH(9- 1)	配列番号 18	QVQLQQPGTELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWVNWVKQRPD QGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFTDKAISTIDTSSNTAYMQLSTLT SDASAVYYCSRSPRDSSTNLADWGQGLVTVSS	
抗 CD2 VL(9- 1)	配列番号 19	IVMTQSPATLSVTPGDRVLSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHESPR LIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVPEPEDVGVYYCQNGH SFPLTFGAGTKLELRR	
抗 CD2 VH(9.6)	配列番号 20	QLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLE WIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSED SAVYYCATEDLYAMEYWGQTSVTVSS	
抗 CD2 VL(9.6)	配列番号 21	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPED LAVYYCHQYLSSTFGGGTKLEIKR	30
抗 CD2 scFv (9-1)	配列番号 22	IVMTQSPATLSVTPGDRVLSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHESPR LIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVPEPEDVGVYYCQNGH SFPLTFGAGTKLELRRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQPGTELV RPGSSVKLSCKASGYTFTSYWVNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYD SETHYNQKFTDKAISTIDTSSNTAYMQLSTLTSASAVYYCSRSP RDSSTNLADWGQGLVTVSS	
抗 CD2 scFv(9)	配列番号 23	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPED LAVYYCHQYLSSTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQL QPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIG NIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAV YYCATEDLYAMEYWGQTSVTVSS	40

【 0 0 6 8 】

活性化された免疫細胞によるサイトカインの分泌は、免疫細胞療法の深刻な悪影響をもたらすことが示されている、サイトカイン放出症候群およびマクロファージ活性化症候群を引き起こす (Lee et al., Blood, 2014, 124(2): 188-195)。

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態では、PEBLの標的結合分子は、CDタンパク質、例えば、ヒトCD2に特異的に結合する分子である。場合によっては、標的結合分子は、抗CD2抗体またはCD2に結合する抗原結合フラグメントである。

【 0 0 7 0 】

T細胞上で発現されるリガンド（例えば、ペプチドまたは抗原）への結合時に免疫応答を活性化または不活性化することができるそのような適切な結合分子はすべて、「標的結合分子」と総称される。当業者に理解されるように、標的結合分子は、抗体または抗原結合フラグメント（例えば、s c F v）を含む必要はなく、むしろ、標的分子に結合する標的結合分子の部分は、例えば、受容体 - リガンド対の受容体、または受容体 - リガンド対のリガンドに由来し得る。

【 0 0 7 1 】

本明細書に記載の P E B L の標的結合分子は、C D 2 に結合する抗体に由来し得る。いくつかの実施形態では、C D 2 に結合する抗体は、抗 C D 2 モノクローナル抗体 9 . 6 またはその変異体である。いくつかの実施形態では、C D 2 に結合する抗体は、抗 C D 2 モノクローナル抗体 9 . 6 のヒト化変異体である。他の実施形態では、C D 2 に結合する抗体は、抗 C D 2 モノクローナル抗体 9 - 1 である。いくつかの実施形態では、C D 2 に結合する抗体は、抗 C D 2 モノクローナル抗体 9 - 1 のヒト化変異体である。

10

【 0 0 7 2 】

9 . 6 および 9 - 1 の詳細な説明は、例えば、Kamoun et al. J Exp Med、1981、153 : 207 - 212 および Bernard et al. , Leukocyte Typing II、1986、eds. Reinherz, E. L. , Haynes, B. F. , Nadler, L. M. , & Bernstein, I. D. (Springer, New York) , pp. 53 - 66 にそれぞれ見出すことができる。

20

【 0 0 7 3 】

ヒト化抗体とは、標的抗原（例えば、ヒト C D 2 ）に結合することができ、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するフレームワーク（F R）領域、および実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する C D R を含む、免疫グロブリンアミノ酸配列変異体またはそのフラグメントを指す。したがって、ヒト化抗体 9 - 1 は、C D 2 に結合することができ、これは、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する F R 領域と、実質的にマウス抗体 9 - 1 のアミノ酸配列を有する C D R とを含む。同様に、ヒト化抗体 9 . 6 は、C D 2 に結合することができ、これは、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する F R 領域と、実質的にマウス抗体 9 . 6 のアミノ酸配列を有する C D R とを含む。

30

【 0 0 7 4 】

一般に、ヒト化抗体は、C D R 領域のすべてもしくは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応するか、または F R 領域のすべてもしくは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの変域ドメイン（F a b、F a b'、F（a b'）₂、F a b c、F v）のうちの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリンの、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域（F c）の少なくとも一部を含むであろう。通常、抗体は、軽鎖、ならびに少なくとも重鎖の変域ドメインの両方を含むであろう。抗体はまた、重鎖の C H 1、ヒンジ、C H 2、C H 3、および C H 4 領域を含み得る。

【 0 0 7 5 】

ヒト化抗体は、I g M、I g G、I g D、I g A、および I g E を含む任意のクラスの免疫グロブリン、ならびに I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 を含む任意のアイソタイプから選択することができる。通常、定常ドメインは、ヒト化抗体が細胞毒性活性を呈することが望まれる補体結合定常ドメインであり、クラスは、典型的には I g G 1 である。そのような細胞毒性活性が望ましくない場合、定常ドメインは、I g G 2 クラスのものであってもよい。ヒト化抗体は、2 つ以上のクラスまたはアイソタイプからの配列を含むことができ、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の定常ドメインを選択することは、当該技術分野の範囲内である。

40

【 0 0 7 6 】

ヒト化抗体の F R および C D R 領域は、親配列に正確に対応する必要はなく、例えば、

50

インポートCDRまたはコンセンサスFRは、少なくとも1つの残基の置換、挿入、または削除によって変異誘発され、それによりその位置のCDRまたはFR残基が、コンセンサスまたはインポート抗体のいずれにも対応していない場合がある。しかしながら、そのような突然変異は、広範囲に及ばないであろう。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも75%、より多くの場合90%、最も好ましくは95%超が、親FRおよびCDR配列の残基に対応するであろう。

【0077】

一般に、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列および様々な概念的なヒト化産物の分析プロセスによって産生される。三次元免疫グロブリンモデルが一般的に利用可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の可能性のある三次元コンフォメーション構造を例示および表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの画面上での検査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を与える残基の分析を可能にする。

10

【0078】

抗原結合（例えば、CD2結合）に影響を与える残基は、正または負の意味で、候補免疫グロブリンの抗原親和性または抗原特異性を実質的に担う残基であると定義される。場合によっては、コンセンサスおよびインポート配列からのFR残基の選択および組み合わせが、所望の免疫グロブリン特徴を得るために実行される。そのような望ましい特徴としては、標的抗原に対する親和性の増加およびより高い特異性が挙げられるが、状況によっては反対の効果が望まれる場合があることが想定される。一般に、CDR残基は、抗原結合に影響を与えることに直接かつ最も実質的に関与している（が、すべてのCDR残基がそのように関与しているわけではなく、したがってコンセンサス配列に置換する必要はない）。しかしながら、FR残基はまた、顕著な効果を有し、少なくとも3つの方式での影響を発揮することができる。それらは、抗原に非共有結合的に直接結合することができ、CDR残基と相互作用することができ、重鎖と軽鎖の境界に影響を与えることができる。

20

【0079】

典型的には、隣接するCDRの空間的位置、ならびに標的抗原の寸法および構造から抗原の位置を補完する必要がある。一般に、塩橋の形成、水素結合、または疎水性相互作用することができるヒト化抗体残基のみが、非共有抗原結合に関与する可能性があるが、しかしながら抗原から空間的に3.2オングストローム以下離れた原子を有する残基はまた、抗原と非共有結合的に相互作用し得る。そのような残基は、典型的には、チロシン、アルギニン、およびリジンなど、最大のかさを有する側鎖を有する比較的大きなアミノ酸である。また3次元モデリングによって視覚化されるように、抗原結合FR残基はまた、典型的には、CDRドメインから溶媒中に約7オングストロームおよびCDRドメインのいずれかの側に約7オングストローム延在するCDRの溶媒配向面を取り囲むエンベロープに配向される側鎖を有するであろう。

30

【0080】

CDRと相互作用する残基は、一般に、CDRポリペプチド骨格のコンフォメーションに影響を与えるか、またはCDR残基側鎖と非共有結合を形成するかのいずれかの残基である。コンフォメーションに影響を与える残基は、通常、任意のCDR骨格原子の空間位置を約0.2オングストローム超変化させる残基である。CDR配列の骨格原子は、例えば、ベータシート、ヘリックス、ループなどの組織化された構造を中断または修飾する残基によって置き換えられる。隣接する配列のコンフォメーションに大きな影響を発揮し得る残基としては、プロリンおよびグリシンが挙げられ、どちらも骨格に屈曲を導入することができる。骨格原子を置き換えることができる他の残基は、塩橋および水素結合に関与することができるものである。

40

【0081】

CDR側鎖と相互作用する残基は、CDR側鎖との非共有結合、一般に塩橋または水素結合のいずれかを形成すると合理的に予想される残基である。そのような残基は、それら

50

の側鎖の三次元的な位置によって識別される。塩橋またはイオンブリッジは、互いに約 2.5 ~ 3.2 オングストローム以内に位置し、反対の電荷を担持する 2 つの側鎖、例えばリシニルとグルタミルの対の間に形成されると予想することができる。水素結合は、セリルまたはスレオニルとアスパルチルまたはグルタミルなどの残基対（または他の水素受容残基）の側鎖間に形成されると予想することができる。そのような対は、タンパク質化学の分野で周知であり、候補抗体の三次元モデリングにおいて当業者には明らかであろう。

【0082】

所与の置換の正確な影響がどのようなものであるかを事前に予測することは完全には可能でないので、置換を行い、所望の特徴について候補抗体を評価する必要がある。しかしながら、これらのステップは、それ自体が日常的であり、当該技術分野の範囲内である。

10

【0083】

CDR および FR 残基は、標準的な配列定義 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1987)、および構造的定義 (Chothia and Lesk, J. Mol Biol. 196:901-917 (1987)) に従って決定される。これらの 2 つの方法での CDR 識別にわずかな差異が生じる場合、構造的定義が優先されるが、配列定義方法で識別された残基は、コンセンサス配列にインポートするフレームワーク残基を決定するための重要な FR 残基と見なされる。

20

【0084】

一般に、インポート抗体（例えば、9-1 抗体または 9.6 抗体）をヒト化する最初のステップは、インポート配列を組み込むためのコンセンサスアミノ酸配列を導出することである。次に、上記の方法を使用して、これらの配列のモデルが生成される。特定の実施形態では、コンセンサスヒト配列は、Kabatらの配列編集における最も豊富なサブクラスに由来する (Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987))。これらのステップは異なる順序で行うことができるが、典型的には、候補ヒト化抗体の構造は、対応するヒト CDR 全体が除去された後、非ヒトインポート配列からコンセンサスヒト構造に少なくとも 1 つの CDR を転送することによって作り出される。ヒト化抗体は、配列変動 (Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)) によって定義されるように、または構造変動 (Chothia, C. & Lesk, A. M., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) によって定義されるように、CDR 内の位置での非ヒトインポート残基のヒト置換を含み得る。非ヒトインポート残基とヒトコンセンサスフレームワーク残基との間の差異を個々に調査して、CDR コンフォメーションおよび/または抗原への結合に対するそれらの考えられる影響を決定する。そのような考えられる影響の調査は、望ましくは、モデリングを通じて、特定の位置でのアミノ酸の特徴を調べることによって実行されるか、または特定のアミノ酸の置換もしくはは突然変異誘発の効果を評価することを通じて実験的に決定される。

30

40

【0085】

いくつかの実施形態では、インポート非ヒト抗体およびヒト抗体のアミノ酸配列を含むヒト化抗体は、以下のステップ：(a) インポート抗体可変ドメインおよびコンセンサスヒト可変ドメインの少なくとも一部のアミノ酸配列を得るステップと、(b) インポートおよびヒト可変ドメイン配列の相補性決定領域 (CDR) アミノ酸配列を特定するステップと、(c) 対応するヒト CDR アミノ酸配列をインポート CDR アミノ酸配列で置換するステップと、(d) インポート抗体のフレームワーク領域 (FR) およびコンセンサス抗体の対応する FR のアミノ酸配列を整列させるステップと、(e) 対応するコンセンサ

50

ス抗体残基と非相同である、整列させた F R 配列におけるインポート抗体 F R 残基を特定するステップと、(f) 非相同インポートアミノ酸残基が次の効果：(1 .) 抗原に直接非共有結合する、(2 .) C D R と相互作用する、または(3 .) V L - V H 界面に関与する、のうちの少なくとも1つを有すると合理的に予想されるかどうかを決定することと、(g) これらの効果のうちの少なくとも1つを有すると合理的に予想される任意の非相同インポート抗体アミノ酸残基について、コンセンサス抗体 F R 配列の対応するアミノ酸残基をその残基で置換するステップと、を利用して作製される。

【 0 0 8 6 】

任意選択的に、ステップ(e) で特定された任意の非相同残基がドメインの表面に露出しているか、またはドメイン内に埋もれているかを決定し、残基が露出しているがステップ(f) で特定されたいずれの効果も有さない場合は、コンセンサス残基を保持してもよい。

10

【 0 0 8 7 】

ヒト化抗体を生成するための方法の追加の説明は、例えば、U S 6 , 0 5 4 , 2 9 7、U S 6 , 4 0 7 , 2 1 3、およびU S 6 , 7 1 9 , 9 7 1に見出され、それらの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態では、P E B L の標的結合分子は、配列番号 1 8 に対して少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) の配列同一性を有する V H ドメインと、配列番号 1 9 に対して少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) の配列同一性を有する V L ドメインと、を含む抗 C D 2 一本鎖可変フラグメントを含む。場合によっては、リンカーは、s c F v の V H ドメインと V L ドメインとを接続する。V H - V L リンカーは、(G G G G S)_n (配列番号 3 5) リンカー (式中、n が、1 ~ 6、例えば、1、2、3、4、5、または 6 の範囲であり得る) であり得る。他の例では、V H - V L リンカーは、任意の G S リンカーまたは当業者に既知の他の柔軟なリンカーであり得る。場合によっては、V H ドメインは、配列番号 1 8 に記載の配列において少なくとも 1 つ (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、またはそれ以上) のアミノ酸置換を含む。場合によっては、V L ドメインは、配列番号 1 9 に記載の配列において少なくとも 1 つ (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、またはそれ以上) のアミノ酸置換を含む。

20

30

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態では、P E B L の標的結合分子は、配列番号 2 0 に対して少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) の配列同一性を有する V H ドメインと、配列番号 2 1 に対して少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) の配列同一性を有する V L ドメインと、を含む抗 C D 2 一本鎖可変フラグメントを含む。場合によっては、リンカーは、s c F v の V H ドメインと V L ドメインとを接続する。V H - V L リンカーは、(G G G G S)_n (配列番号 3 5) リンカー (式中、n が、1 ~ 6、例えば、1、2、3、4、5、または 6 の範囲であり得る) であり得る。他の例では、V H - V L リンカーは、任意の G S リンカーまたは当業者に既知の他の柔軟なリンカーであり得る。

40

【 0 0 9 0 】

場合によっては、抗 C D 2 s c F v は、ヒト免疫細胞の C D 2 への結合に適合する 1 つ以上のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、V H ドメインは、配列番号 1 8 に記載の配列において少なくとも 1 つ (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、またはそれ以上) のアミノ酸置換を含み、V L ドメインは、配列番号 1 9 に記載の配列において少なくとも 1 つ (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、またはそれ以上) のアミノ酸置換を含み、それにより、C D 2 発現がヒト免疫細胞で遮断、低減、または減少される。他の実施形態では、V H ドメインは、配列番号 2 0 に記載の配

50

列において少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）のアミノ酸置換を含み、VLDドメインは、配列番号21に記載の配列において少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）のアミノ酸置換を含み、それにより、CD2発現がヒト免疫細胞で遮断、低減、または減少される。

【0091】

様々な実施形態では、本明細書に記載のPEBLの標的結合分子は、配列番号22に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を含む抗CD2 s c F vを含む。様々な他の実施形態では、標的結合分子は、配列番号23に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を含む抗CD2 s c F vを含む。いくつかの実施形態では、抗CD2 s c F vは、配列番号22の変異体であり、配列番号22の抗CD2 s c F vと同じ結合活性を有する。他の実施形態では、抗CD2 s c F vは、配列番号23の変異体であり、配列番号23の抗CD2 s c F vと同じ結合活性を有する。

10

【0092】

いくつかの実施形態では、PEBLのs c F vは、抗CD2抗体の可変重鎖配列に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有する可変重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明のs c F vは、抗CD2抗体の可変軽鎖配列に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有する可変軽鎖配列を含む。例えば、抗CD2抗体は、当業者によって認識されるそのようないずれかのものであり得る。いくつかの実施形態では、本発明の抗CD2抗体または抗CD2 s c F vは、そのヒト化変異体である。

20

30

【0093】

いくつかの実施形態では、PEBLの抗CD2 s c F vは、休止T細胞および活性化T細胞の細胞内CD2に結合する。他の実施形態では、抗CD2 s c F vは、活性化T細胞の細胞内CD2に結合する。特定の実施形態では、抗CD2 s c F vは、活性化T細胞の細胞内CD2に結合し、休止T細胞では結合しない。特定の実施形態では、抗CD2 s c F vは、免疫細胞の細胞内CD2に結合する。

【0094】

いくつかの実施形態では、PEBLの抗CD2 s c F vは、CD58のCD2結合を阻害、遮断、または防止する。他の実施形態では、抗CD2 s c F vは、CD58のCD2結合を阻害、遮断、または防止しない。

40

【0095】

細胞局在化ドメインは、保持シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞局在化ドメインは、保持シグナル伝達ドメインおよび膜貫通ドメインを含む。場合によっては、細胞局在化ドメインは、小胞体（ER）保持配列、ゴルジ体保持配列、またはプロテアソーム局在化配列を含む。細胞局在化ドメインは、タンパク質が細胞によって分泌されるのを防止するかまたは妨げるアミノ酸配列を含んでもよい。細胞局在化ドメインは、細胞内区画にタンパク質を保持するアミノ酸配列を含んでもよい。場合によっては、細胞局在化ドメインは、ERまたはゴルジ体の膜などの細胞膜にタンパク質のアンカーを保持するアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、保持シグナル伝達ドメインは、KDEL

50

配列（配列番号24）、KKD/E配列（配列番号25）、KKXX配列（配列番号26）、KKMP配列（配列番号27）、またはYQRL配列（配列番号28）（式中、Xが任意のアミノ酸配列を表す）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、保持シグナル伝達ドメインがKKXXまたはKKMPを含む場合、細胞局在化ドメインは、限定されないが、配列番号15の配列などの、CD8 ヒンジおよび膜貫通ドメインをさらに含む。場合によっては、CD8 ヒンジおよび膜貫通ドメインは、配列番号14のER保持ドメインのN末端に連結されている。

【0096】

いくつかの実施形態では、細胞局在化ドメインは、KDEL配列（配列番号24）を含む。特定の実施形態では、細胞局在化ドメインは、AEKDELの配列（配列番号29）を含む。様々な実施形態では、細胞局在化ドメインは、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSAEKDEL（配列番号30）の配列を含む。特定の実施形態では、細胞局在化ドメインは、KKMP配列（配列番号27）を含む。いくつかの実施形態では、細胞局在化ドメインは、LYKYKSRRSFIEEKMPの配列（配列番号31）およびKKMP配列（配列番号27）を含む。

10

【0097】

特定の実施形態では、細胞局在化ドメインは、所望の機能を有する限り、配列番号30に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、細胞局在化ドメインは、所望の機能を有する限り、配列番号31に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を含む。

20

【0098】

いくつかの実施形態では、ER保持配列は、KDEL、KKXX、KKMP、およびKKTN（式中、Xが任意のアミノ酸であり得る）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ゴルジ体保持配列は、YQRL（配列番号40）、YQRL（配列番号41）、YKGL（配列番号42）、およびYXXL（配列番号43）（式中、Xが任意のアミノ酸であり得る）からなる群から選択される。

30

【0099】

いくつかの実施形態では、プロテアソーム局在化は、scFv配列を、21（TRIM21）標的化ドメイン配列を含む三者モチーフに連結し、ヒトTRIM21 E3ユビキチンリガーゼタンパク質をコードする配列を共発現することによって達成される。TRIM21は、抗体のFcドメインに高い親和性で結合し、ユビキチン-プロテオソーム複合体を動員して、抗体に結合した分子（例えばタンパク質およびペプチド）を分解することができる。TRIM21標的化ドメイン配列は、IgG1、IgG2、またはIgG4などのヒト免疫グロブリンG（IgG）定常領域（Fc）遺伝子の群から選択されるアミノ酸配列をコードし、scFvおよびFcドメインを含む融合タンパク質を形成するために使用される。この実施形態では、外因的に発現するTRIM21タンパク質は、標的タンパク質（例えば、CD2）に結合したscFv-Fc融合タンパク質に結合し、複合体をプロテアソームに導いて分解する。

40

【0100】

ヒトTRIM21 E3リガーゼタンパク質のアミノ酸配列の詳細は、NCBIタンパク質データベースでは、例えば、NCBI参照配列番号NP_003132.2に見出すことができる。ヒトTRIM21 E3リガーゼタンパク質をコードする核酸配列の詳細

50

は、NCBIタンパク質データベースでは、例えば、NCBI参照配列番号NM__003141.3に見出すことができる。

【0101】

膜貫通ドメインは、CD8、CD8、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16、OX40、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32、CD64、ICOS、VEGFR2、FAS、またはFGFR2Bに由来する膜貫通ドメイン、またはヒンジと膜貫通ドメインとの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8に由来する。特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8に由来する。CD8に由来するヒンジおよび膜貫通ドメインは、ERまたはゴルジ体保持シグナル伝達ドメインに連結されている。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインまたはヒンジ、および膜貫通ドメインは、所望の機能を有する限り、配列番号15に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を含む。

【0103】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、リンカーを介して保持シグナル伝達ドメインに連結されている。いくつかの実施形態では、scFvのVLドメインおよびVHドメインは、リンカーによって接続されている。膜貫通ドメインと保持シグナル伝達ドメインとの間のリンカーは、scFvのリンカーと同じ配列である。場合によっては、膜貫通ドメインと保持シグナル伝達ドメインとの間のリンカーは、scFvのリンカーとは異なる配列を有する。リンカーの非限定的な例としては、(GS)_n、(GGS)_n、(GGGS)_n (配列番号32)、(GGSG)_n (配列番号33)、(GGSGG)_n (配列番号34)、または(GGGGS)_n (配列番号35) (式中、nが1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である)が挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、(GGGGGS)₃ (配列番号36)、または(GGGGS)₄ (配列番号37)である。リンカーの長さの変動は、活性を保持するかまたは増強でき、活性研究において優れた有効性を生じる。

20

【0104】

特定の実施形態では、リンカーは、例えばGGGGSGGGGS (配列番号38)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、例えば、GGGGSGGGGS GGGS (配列番号39)を含む。様々な実施形態では、約5~約100アミノ酸の長さを有するペプチドリンカーを、包括的に、本発明で使用することができる。特定の実施形態では、約20~約40アミノ酸の長さを有するペプチドリンカーを本発明で使用することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも5アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも15アミノ酸、少なくとも20アミノ酸、少なくとも25アミノ酸、少なくとも30アミノ酸、少なくとも35アミノ酸、または少なくとも40アミノ酸の長さを有するペプチドリンカーを本発明で使用することができる。当業者によって理解されるように、そのようなリンカー配列およびそのようなリンカー配列の変異体は、当技術分野で知られている。リンカー配列を組み込む構築物を設計する方法、および機能性を評価する方法は、当業者に容易に利用可能である。

30

40

【0105】

特定の実施形態では、PEBLのシグナルペプチドは、CD8シグナル伝達ペプチドに由来する。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号11に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少な

50

くとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を含む。シグナルペプチドは、標的結合分子に対してN末端に位置し得る。

【0106】

当業者が理解するであろうように、特定の実施形態では、本明細書に開示の様々な構成要素の配列（例えば、シグナルペプチド、s c F v、細胞内シグナル伝達ドメイン、膜貫通ドメイン、リンカー、局在化ドメイン、およびそれらの組み合わせ）のうちのいずれかが、本明細書に開示の特定の対応する配列に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有し得る。

10

【0107】

本明細書に記載のP E B Lの例示的な実施形態を、表1に提供する。

【0108】

いくつかの実施形態では、抗C D 2 P E B Lをコードする核酸配列は、表1に記載の1つ以上の核酸配列を含む。特定の実施形態では、抗C D 2 P E B Lは、配列番号6またはそのコドン最適化変異体に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性）を有するヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態では、抗C D 2 P E B Lは、配列番号7またはそのコドン最適化変異体に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性）を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、抗C D 2 P E B Lは、配列番号8、またはそのコドン最適化変異体に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性）を有するヌクレオチド配列を含む。他の実施形態では、抗C D 2 P E B Lは、配列番号9またはそのコドン最適化変異体に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性）を有するヌクレオチド配列を含む。例えば、抗C D 2 P E B Lをコードする核酸配列は、ヒト細胞、例えば、ヒト免疫細胞において所望の発現または活性を得るために修飾され得る。

20

30

【0109】

任意の標的タンパク質に対する抗体およびその抗体フラグメントを産生する方法は、当技術分野で周知であり、通例のものである。さらに、本明細書に例示されるように、様々な標的、例えばC D 2に対する市販の抗体を使用して、本明細書に例示されるP E B L分子を生成することができる。本明細書に例示されるように、当技術分野で周知の抗体、ならびにそれから誘導される抗体のフラグメント（例えばs c F v）を本発明で 사용할ことができる。

【0110】

当業者によって理解されるように、キメラ抗原受容体および/またはP E B L分子は、本明細書に開示される標的ならびに本明細書に開示される標的の変異体に結合するように設計され得る。例として、キメラ抗原受容体および/またはP E B L分子は、C D 2、またはその天然に存在する変異体分子に結合するように設計することができる。そのような天然に存在する変異体は、分子の野生型と同じ機能を持つことができる。他の実施形態では、変異体は、分子の野生型と比較して変化する機能を有することができる（例えば、病的状態を与える）。

40

【0111】

当業者によって理解されるように、組み合わせが機能的なP E B Lを産生する限り、P E B L分子構築物の様々な構成要素は、異なる組み合わせで（例えば、異なるリンカー、異なる局在化配列、異なるs c F vなどを含むように）置換することができる。特定の構

50

建築物の機能性を評価する方法は、本明細書に開示されているように、当業者の範囲内である。

【0112】

IV. キメラ抗原受容体 (CAR)

キメラ抗原受容体 (CAR) は、単一の融合分子の1つ以上のシグナル伝達ドメインに関連する標的化部分からなる合成受容体である。一般に、CARの結合部分は、柔軟なリンカーによって接合されているモノクローナル抗体の軽く可変的なフラグメントを含む、一本鎖抗体 (scFv) の抗原結合ドメインからなる。第一世代のCARのシグナル伝達ドメインは、CD3ゼータの細胞質領域またはFc受容体ガンマ鎖に由来してきた。第一世代のCARは、T細胞の細胞毒性をうまくリダイレクトすることが示されているが、しかしながら、インビボでの長期的な展開および抗腫瘍活性を提供することはできなかった。CAR修飾T細胞の生存率を増強し、増殖を増加するために、CD28、OX40 (CD134)、および4-1BB (CD137) を含む共刺激分子からのシグナル伝達ドメインが、単独 (第2世代) または組み合わせ (第3世代) に追加されている。

10

【0113】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCARは、一本鎖CARに加えて、多鎖CARである。多鎖CARまたは多重特異性CARは、異なる標的に同時に結合し、それにより免疫細胞の活性化および機能を増大させるための、いくつかの (例えば、2つ以上の) 細胞外抗原 (リガンド) 結合ドメインを含む。場合によっては、細胞外抗原結合ドメインは、同じ膜貫通ポリペプチド上にタンデムに配置され、任意選択的にリンカーによって分離することができる。他の例では、多鎖CARを構成する異なる膜貫通ポリペプチド上に、異なる細胞外抗原結合ドメインを配置してもよい。一本鎖CARと同様に、多鎖CARのシグナル伝達ドメインは、Fc受容体またはT細胞受容体、および抗原受容体の結合に続いてシグナル伝達を開始するために協調して作用する共受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導體または変異体、ならびに同じ機能的な能力としての任意の合成配列であってもよい。

20

【0114】

シグナル伝達ドメインは、抗原依存性の一次活性化を開始するものと、抗原非依存的様式で作用して二次または共刺激シグナルを提供するものの、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列を含む。一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ (ITAM) として知られているシグナル伝達モチーフを含み得る。本発明で使用されるITAMの非限定的な例としては、非限定的な例として、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、FcRイプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するものを挙げることができる。シグナル伝達ドメインはまた、共刺激シグナル分子を含み得る。二重特異性または多重特異性CARの追加の説明は、WO2014/4011988に記載されており、その内容は、参照によりその全体が組み込まれる。

30

【0115】

したがって、一実施形態では、本発明は、キメラ抗原受容体 (例えば、CAR) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、CD2に結合する局在化ドメインに連結された標的結合分子 (例えば、PEBL) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、を含む、操作された免疫細胞に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、CD2に結合するキメラ抗原受容体 (例えば、CAR) と、CD2に結合する局在化ドメインに連結された標的結合分子 (例えば、PEBL) と、を含む、操作された免疫細胞 (例えば、CAR-T細胞) に関する。CAR-T細胞のCD2 CARは、別の細胞の細胞表面上のCD2に結合し、CD2 PEBL、CAR-T細胞は、CAR-T細胞の細胞内コンパートメントに位置するCD2に結合する。そのため、CD2 PEBLは、他のCD2結合CARによるCAR-T細胞のフラトリサイドを防止する。

40

【0116】

本発明の特定の態様では、キメラ抗原受容体 (CAR) は、標的細胞の表面上に発現す

50

るCD2に結合する。一実施形態では、CARはまた、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD28、CD30、CD38、CD45、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD57、CD99、CD127、またはCD137に結合する。

【0117】

CARのCD2結合ドメインは、抗CD2抗体またはCD2に結合する抗原結合フラグメントであり得る。いくつかの実施形態では、CD2に結合する抗体は、抗CD2モノクローナル抗体9.6である。他の実施形態では、CD2に結合する抗体は、抗CD2モノクローナル抗体9-1である。いくつかの実施形態では、CD2に結合する抗体は、抗CD2モノクローナル抗体9.6またはその変異体である。いくつかの実施形態では、CD2に結合する抗体は、抗CD2モノクローナル抗体9.6のヒト化変異体である。他の実施形態では、CD2に結合する抗体は、抗CD2モノクローナル抗体9-1である。いくつかの実施形態では、CD2に結合する抗体は、抗CD2モノクローナル抗体9-1のヒト化変異体である。

10

【0118】

いくつかの実施形態では、CARのCD2結合ドメインは、抗CD2 s c F vである。いくつかの実施形態では、s c F vは、抗CD2抗体の可変重鎖配列に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有する可変重鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明のs c F vは、抗CD2抗体の可変軽鎖配列に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有する可変軽鎖配列を含む。例えば、抗CD2抗体は、当業者によって認識されるそのようないずれかのものであり得る。

20

【0119】

いくつかの実施形態では、抗CD2一本鎖可変フラグメントは、配列番号18に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するVHドメインと、配列番号19に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するVLドメインと、を含み得る。場合によっては、リンカーは、s c F vのVHドメインとVLドメインとを接続する。VH-VLリンカーは、(GGGS)_n（配列番号35）リンカー（式中、nが、1~6、例えば、1、2、3、4、5、または6の範囲であり得る）であり得る。他の例では、VH-VLリンカーは、任意のGSリンカーまたは当業者に既知の他の柔軟なリンカーであり得る。

30

40

【0120】

場合によっては、VHドメインは、配列番号18に記載の配列において少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）のアミノ酸置換を含む。場合によっては、VLドメインは、配列番号19に記載の配列において少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）のアミノ酸置換を含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、抗CD2 s c F vは、配列番号20に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するVHドメインと、配列番号21に

50

対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するVLDメインと、を含む。場合によっては、リンカーは、scFvのVHドメインとVLDメインとを接続する。VH-VLリンカーは、(GGGS)_n（配列番号35）リンカー（式中、nが、1~6、例えば、1、2、3、4、5、または6の範囲であり得る）であり得る。

【0122】

場合によっては、抗CD2 scFvは、ヒト免疫細胞のCD2への結合に適合する1つ以上のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号18に記載の配列において少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）のアミノ酸置換を含み、VLDメインは、配列番号19に記載の配列において少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）のアミノ酸置換を含み、それにより、CD2発現がヒト免疫細胞で遮断、低減、または減少される。他の実施形態では、VHドメインは、配列番号20に記載の配列において少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）のアミノ酸置換を含み、VLDメインは、配列番号21に記載の配列において少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）のアミノ酸置換を含み、それにより、CD2発現がヒト免疫細胞で遮断、低減、または減少される。

【0123】

様々な実施形態では、抗CD2 scFvは、配列番号22に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有する。様々な他の実施形態では、抗CD2 scFvは、配列番号23に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、抗CD2 scFvは、配列番号22の変異体であり、配列番号22の抗CD2 scFvと同じ結合活性を有する。他の実施形態では、抗CD2 scFvは、配列番号23の変異体であり、配列番号23の抗CD2 scFvと同じ結合活性を有する。

【0124】

PEBLのCD2結合ドメインは、CARの抗CD2結合ドメインと同じCD2のエピトープに結合することができる。他の場合、PEBLの抗CD2結合ドメインは、CARのCD2結合ドメインとは異なるCD2のエピトープに結合することができる。PEBLのCD2結合ドメインおよびCARのCD2結合ドメインのアミノ酸配列は、実質的に同一であり得る。または、PEBLのCD2結合ドメインおよびCARのCD2結合ドメインのアミノ酸配列は、異なってもよい。いくつかの実施形態では、PEBLのCD2結合ドメインの配列は、CARのCD2結合ドメインに対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有する。

【0125】

CARの例示的な実施形態を図1に示し、例示的なアミノ酸および核酸配列を表1に提供する。

【0126】

いくつかの実施形態では、抗CD2 CARをコードする核酸配列は、表1に記載の1つ以上の核酸配列を含む。特定の実施形態では、抗CD2 CARは、配列番号10またはそのコドン最適化変異体に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性）を有するヌクレオチド配列を含む。例えば、抗CD2 CARをコードする核酸配列は、ヒト細胞、例えば、ヒト免疫細胞において所望の発現または活性を得るために修飾され得る。

【0127】

10

20

30

40

50

当業者が理解するであろうように、特定の実施形態では、本明細書に開示の様々な構成要素の配列（例えば、シグナルペプチド、s c F v、細胞内シグナル伝達ドメイン（複数可）、膜貫通ドメイン、リンカー、およびそれらの組み合わせ）のうちのいずれかが、本明細書に開示の特定の対応する配列に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有し得る。

【0128】

いくつかの実施形態では、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインは、所望の機能を有する限り、配列番号16に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有し得る。

10

【0129】

特定の実施形態では、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1、またはCD2などの共刺激分子からの別の細胞内シグナル伝達ドメインによって置き換えることができる。いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1、またはCD2の細胞内シグナル伝達ドメインに対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有し得る。任意選択的に、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインはまた、CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1、またはCD2などの共刺激分子からの別の細胞内シグナル伝達ドメイン（またはそれらの一部）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、追加の細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1、またはCD2の細胞内シグナル伝達ドメインに対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有し得る。

20

30

【0130】

いくつかの実施形態では、CD3ゼータ（CD3）細胞内シグナル伝達ドメインは、所望の機能を有する限り、配列番号17に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有し得る。

40

【0131】

場合によっては、細胞内シグナル伝達ドメインは、所望の機能を有する限り、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（ITAM）またはその一部を含む。CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、ITAMに対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一

50

性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有する配列を含み得る。特定の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、所望の機能を有する限り、FcRI、CD4、CD7、CD8、CD28、OX40、またはH2-Kbに対して少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有し得る。

【0132】

いくつかの実施形態では、CD8アルファ(CD8)ヒンジおよび膜貫通ドメインは、所望の機能を有する限り、配列番号11に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有し得る。

10

【0133】

本発明での使用に適したヒンジおよび膜貫通配列は、当技術分野では既知であり、例えば、その全体が参照により組み込まれる公開第WO2016/126213号に提供されている。

【0134】

いくつかの実施形態では、抗CD2CARのヒンジおよび膜貫通ドメインは、CD8、IgG、CD8、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16、OX40、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、FGFR2Bからのシグナル伝達ドメイン(例えば、膜貫通ドメイン)、または別の膜貫通タンパク質を含み得る。膜貫通ドメインは、天然に存在しない疎水性タンパク質セグメントであってもよい。

20

【0135】

いくつかの実施形態では、CD8アルファ(CD8)シグナルペプチドは、所望の機能を有する限り、配列番号11に対して少なくとも90%の配列同一性、少なくとも91%の配列同一性、少なくとも92%の配列同一性、少なくとも93%の配列同一性、少なくとも94%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、または100%の配列同一性を有し得る。

30

【0136】

V. 操作された免疫細胞

したがって、一実施形態では、本発明は、CD2CARおよびCD2PEBLを発現する操作された免疫細胞に関する。特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、操作されたT細胞、操作されたナチュラルキラー(NK)細胞、操作されたNK/T細胞、操作された単球、操作されたマクロファージ、または操作された樹状細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)由来T細胞である。

40

【0137】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書で概説されるものなど、CD2に結合するPEBLを発現する操作された免疫細胞について記載する。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、配列番号1~4から選択されるいずれか1つに対して少なくとも90%(例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上)の同一性を有するアミノ酸配列を含むPEBLを発現する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、配列番号1に対して少なくとも90%(例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上)の同一性を有するアミノ酸配列を含むPEBLを発現する

50

。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、配列番号 2 に対して少なくとも 90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上) の同一性を有するアミノ酸配列を含む P E B L を発現する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、配列番号 3 に対して少なくとも 90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上) の同一性を有するアミノ酸配列を含む P E B L を発現する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、配列番号 4 に対して少なくとも 90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上) の同一性を有するアミノ酸配列を含む P E B L を発現する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む P E B L を発現する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む P E B L を発現する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む P E B L を発現する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む P E B L を発現する。特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、操作された T 細胞、操作された T 細胞、P B M C 由来 T 細胞、操作されたナチュラルキラー (NK) 細胞、操作された NK / T 細胞、操作された単球、操作されたマクロファージ、または操作された樹状細胞である。

10

【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態では、本発明は、C D 2 に結合する C A R を発現し、本明細書で概説されるものを含む操作された免疫細胞を対象とする。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、少なくとも 90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上) の配列番号 5 の同一性を有するアミノ酸配列を含む C A R を発現する。特定の実施形態では、操作された細胞は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C A R を発現する。特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、操作された T 細胞、操作された T 細胞、P B M C 由来 T 細胞、操作されたナチュラルキラー (NK) 細胞、操作された NK / T 細胞、操作された単球、操作されたマクロファージ、または操作された樹状細胞である。

20

【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書で概説されるものを含む、C D 2 に結合する C A R および C D 2 に結合する P E B L を発現する操作された免疫細胞を対象とする。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、配列番号 5 に対して少なくとも 90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上) の同一性を有するアミノ酸配列を含む C A R に加えて、配列番号 1 ~ 4 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上) の同一性を有するアミノ酸配列を含む P E B L を発現する。特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C A R に加えて、配列番号 1 ~ 4 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む P E B L を発現する。

30

【 0 1 4 0 】

場合によっては、操作された免疫細胞は、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する P E B L と、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する C A R と、を発現する。場合によっては、操作された免疫細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する P E B L と、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する C A R と、を発現する。場合によっては、操作された免疫細胞は、配列番号 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する P E B L と、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する C A R と、を発現する。場合によっては、操作された免疫細胞は、配列番号 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する P E B L と、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する C A R と、を発現する。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、配列番号 1 の P E B L と、配列番号

40

50

5のCARと、を発現する。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、配列番号1のPEBLと、配列番号5のCARと、を発現する。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、配列番号2のPEBLと、配列番号5のCARと、を発現する。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、配列番号3のPEBLと、配列番号5のCARと、を発現する。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、配列番号4のPEBLと、配列番号5のCARと、を発現する。特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、操作されたT細胞、操作されたT細胞、PBM C由来T細胞、操作されたナチュラルキラー(NK)細胞、操作されたNK/T細胞、操作された単球、操作されたマクロファージ、または操作された樹状細胞である。

【0141】

本明細書で概説するPEBLは、標的タンパク質の細胞膜への輸送を妨げる。例えば、上記のCD2を対象とするPEBLは、ERなどの細胞内に保持される。CD2を対象とするPEBLは、CD2と細胞内に共局在し得る。したがって、細胞表面上でのCD2発現は抑制される。いくつかの実施形態では、そのようなPEBLは、CD2の表面発現を阻害する。場合によっては、PEBLは、操作された免疫細胞に免疫表現型の変化を引き起こさない。また、PEBLは、操作された免疫細胞の増殖に影響を与えず、減少させない。いくつかの実施形態では、PEBLは、抗CD2-4-1BB-CD3 CARなどのCARと共発現する。場合によっては、CD2 CARを発現する免疫細胞におけるCD2結合PEBLの発現または存在は、他のCD2 CAR-T細胞によるそのような細胞のフラクチシド(fractricide)を防止する。

【0142】

特定の実施形態で提供されるのは、操作された免疫細胞であって、局在化ドメインに連結された標的結合分子(例えば、PEBL)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含み、標的結合分子が、CD2に結合する抗体であり、局在化ドメインが、小胞体(ER)配列、ゴルジ体保持配列、プロテオソーム局在化配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む保持シグナルドメインを含む、操作された免疫細胞である。場合によっては、PEBLはまた、CD8、CD8、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16、OX40、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、またはFGFR2Bに由来する膜貫通ドメインを含む。

【0143】

場合によっては、操作された細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む。特定の場合、CARは、4-1BBおよびCD3の細胞内シグナル伝達ドメイン、ならびにCD2に結合する抗体を含む。特定の実施形態では、標的結合分子に関連するCD2に結合する抗体は、表1に記載のVH配列およびVL配列を含む。

【0144】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、操作されたT細胞、操作されたナチュラルキラー(NK)細胞、操作されたNK/T細胞、操作された単球、操作されたマクロファージ、または操作された樹状細胞である。場合によっては、操作された免疫細胞は同種異系細胞である。他の場合、操作された免疫細胞は自己細胞である。

【0145】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、少なくとも6ヶ月間、CD2表面発現を欠く。他の実施形態では、操作された免疫細胞は、少なくとも12ヶ月間、CD2表面発現を欠く。特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、少なくとも20ヶ月間、CD2表面発現を欠く。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、少なくとも24ヶ月間、CD2表面発現を欠く。

【0146】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CD2 PEBLを生成しない免疫細胞と比較して、少なくとも6ヶ月間、CD2表面発現を顕著に低減させる。他の実施形

10

20

30

40

50

態では、操作された免疫細胞は、少なくとも12ヶ月間、CD2表面発現を低減させる。特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、少なくとも20ヶ月間、CD2表面発現を低減させる。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、少なくとも24ヶ月間、CD2表面発現を低減させる。

【0147】

特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、相当する免疫細胞と比較して実質的に等しい速度で増殖する。いくつかの実施形態では、CARおよび抗CD2PEBLを発現する操作された免疫細胞は、対応するCARを発現する免疫細胞と同様に増殖する。

【0148】

いくつかの実施形態では、本発明の操作された免疫細胞は治療効果が增强される。そのような操作された免疫細胞は、対象において癌を治療するために使用することができる。特定の実施形態では、癌は、CD2関連癌またはT細胞悪性腫瘍、例えば、T細胞急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)、T細胞前リンパ腫性白血病、T細胞大顆粒リンパ性白血病、腸疾患関連T細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、皮下脂肪織炎様T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)、CTCLのサブタイプ、菌状息肉症、セザリー症候群、原発性皮膚ガンマ-デルタT細胞リンパ腫、限定されないが、特に明記されていない末梢T細胞リンパ腫(PTCL)(PTCL-NOS)、および血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、および未分化大細胞リンパ腫を含む、非ホジキンリンパ腫(NHL)のT系統サブセットを伴う悪性腫瘍、などのT細胞白血病またはT細胞リンパ腫である。特定の実施形態では、T細胞悪性腫瘍は、初期T細胞前駆細胞急性リンパ芽球性白血病(ETP-ALL)である。

【0149】

いくつかの実施形態では、CARおよび抗CD2PEBLを発現する本発明の操作された免疫細胞は、対応するCARを発現する免疫細胞と比較して、增强または増加した治療効果を有する。いくつかの実施形態では、CARおよび抗CD2PEBLを発現する操作された免疫細胞は、対応するCARを発現する免疫細胞に相当する治療効果を有する。

【0150】

別の実施形態では、本発明は、本発明の操作された免疫細胞を産生する方法であって、キメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメイン(例えば、PEBL分子)に連結された標的結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを免疫細胞に導入することと、それにより操作された免疫細胞を産生することと、を含む、方法に関する。

【0151】

特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、操作されたT細胞、操作されたナチュラルキラー(NK)細胞、操作されたNK/T細胞、操作された単球、操作されたマクロファージ、または操作された樹状細胞である。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、任意のタイプのT細胞である。特定の実施形態では、操作されたT細胞は、ガンマ-デルタ()T細胞である。特定の実施形態では、操作されたT細胞は、PBMC由来T細胞から産生される。

【0152】

特定の実施形態では、ヌクレオチド配列を含む核酸は、エキスピボで免疫細胞に導入される。他の実施形態では、ヌクレオチド配列を含む核酸は、インピボで免疫細胞に導入される。

【0153】

導入されるヌクレオチド配列を含む核酸は、本明細書に記載のキメラ抗原受容体および局在化ドメインに連結された標的結合分子(例えばscFv)を含む単一のバイシストロン性構築物であり得る。本明細書に記載されるように、本明細書に記載のキメラ抗原受容体(例えばCAR)および標的結合分子(例えばscFv)をコードする2つのcDNAの間に内部リボソーム進入部位(IRES)または2Aペプチドコード領域部位を挿入することにより、単一のバイシストロン性構築物を調製することができる。2つ以上の標的

10

20

30

40

50

を削除するためのトリシストロン性送達システムの設計も実行可能でなければならない。あるいは、個々の構築物（例えば、CARおよびPEBL）の別々の形質導入（同時または連続）を実施することができる。外因性核酸を導入する方法は本明細書に例示されており、当技術分野で周知である。

【0154】

いくつかの実施形態では、CARをコードするヌクレオチド配列およびPEBLをコードするヌクレオチド配列は連続的に導入される。他の実施形態では、CARをコードするヌクレオチド配列およびPEBLをコードするヌクレオチド配列は同時に導入される。特定の場合、CARをコードするヌクレオチド配列とPEBLをコードするヌクレオチド配列は機能的に連結されており、したがって単一の発現ベクターまたはプラスミドに導入することができる。

10

【0155】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、限定されないが、IL-2、IL-7、IL-15、およびそれらの任意の組み合わせを含む、1つ以上のサイトカインの存在下で培養される。場合によっては、免疫細胞は、T細胞、CD4+T細胞、および/またはCD8+T細胞の増殖を増強または誘発することができる薬剤の存在下で培養される。場合によっては、免疫細胞は、TCR/CD3複合体の分子に結合する薬剤および/またはCD28に結合する薬剤の存在下で培養される。特定の実施形態では、操作された免疫細胞を培養する方法は、CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMからなる群から選択される分子の存在下で培養することを含む。特定の実施形態では、培養する方法は、CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、またはHVEMに結合する薬剤の存在下で培養することを含む。本明細書に記載の操作された免疫細胞を培養するための追加の方法は、例えば、US2019/0136186、US2019/0062706、およびUS2017/0037369に見出すことができる。

20

【0156】

いくつかの実施形態では、末梢血単核細胞(PBMC)が得られる。いくつかの実施形態では、末梢血単核細胞(PBMC)は、ヒト対象から採取される。いくつかの実施形態では、末梢血単核細胞(PBMC)は、健康なヒト対象から採取される。いくつかの実施形態では、末梢血単核細胞(PBMC)は、本明細書に記載のいずれかを含む、癌を有するヒト対象から採取される。いくつかの実施形態では、T細胞の正の選択は、製造業者の推奨に従って、(a)CD3マイクロビーズ、または(b)CD4およびCD8マイクロビーズの両方のいずれかを用いて実行される。場合によっては、細胞は、滅菌濾過したPBS+0.5%のBSA+2mMのEDTAを含む、MACS緩衝液80μlあたり 1×10^7 個の細胞で再懸濁し、細胞懸濁液80μlあたり20μlのマイクロビーズで標識される。細胞を4で15分間インキュベートし、次いでMACS緩衝液で洗浄する。標識された細胞を、LSカラム(Miltenyi Biotec)に通過させ、正に選択したT細胞をLSカラムに向かわせ、収集チューブへ溶出させる。単離されたT細胞を洗浄し、1ミリリットルあたり 1×10^6 個の細胞の密度の3%のヒトAB血清(Sigma)を補充したTexMACS培地に再懸濁させる。いくつかの実施形態では、T細胞は、 1×10^6 個のT細胞あたり10μlのT Cell TransAct(Miltenyi Biotec)で活性化させ、(a)120IU/ml組換えヒトIL-2、または(b)12.5ng/mlの組換えヒトIL-7および12.5ng/mlの組換えヒトIL-15、のいずれかと共に培養する。

30

40

【0157】

いくつかの実施形態では、選択および活性化の1日後(1日目)、T細胞は、本明細書に記載のPEBLをコードするポリヌクレオチドおよび/または本明細書に記載のCARをコードするポリヌクレオチドを、静的な形質導入を使用して1~10のMOI(例えば

50

、MOI 1、MOI 2、MOI 3、MOI 4、MOI 5、MOI 6、MOI 7、MOI 8、MOI 9、およびMOI 10)で含む、レンチウイルスで形質導入される。場合によっては、T細胞培養物は、培養培地1ミリリットルあたり $0.5 \sim 2 \times 10^6$ 個のT細胞の細胞密度で、監視および維持される。未使用のIL-2またはIL-7、およびIL-15サイトカインを、3~4日ごとに培養物に添加してもよい。いくつかの実施形態では、形質導入の10日後(11日目)に、展開したT細胞が採取される。場合によっては、展開したT細胞は、機能アッセイおよびフローサイトメトリーによる表現型分析を使用して分析される。

【0158】

様々な態様では、本明細書に記載の操作された免疫細胞を産生するためのキットも提供される。本キットは、例えば、同種異系または自己エフェクターT細胞を産生するために使用することができる。

10

【0159】

したがって、本明細書で提供されるのは、抗CD2 PEBLなどのPEBLをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むキットである。いくつかの実施形態では、抗CD2 PEBLなどのPEBLをコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、CARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、を含む、キット。キットは、本明細書に記載の実施形態のいずれかに従って設計することができる。

【0160】

特定の実施形態では、CARをコードするヌクレオチド配列および/またはPEBLをコードするヌクレオチド配列は、例えば、クローニングおよび/または発現を可能にする配列(例えば、プラスミドまたはベクター配列)をさらに含む。例えば、ヌクレオチド配列は、例えば細胞(例えば免疫細胞)へのトランスフェクションのために他のプラスミドとして、および/または発現ベクターへのクローニングを容易にするためにプラスミドの一部として提供され得る。特定の実施形態では、CARをコードするヌクレオチド配列およびPEBLをコードするヌクレオチド配列は、単一のプラスミドまたはベクターで提供される。特定の実施形態では、ヌクレオチド配列は、別個のプラスミドまたは発現ベクター上で提供される。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、ウイルス発現のために選択される。

20

【0161】

通常、キットは使いやすさのために区画化されており、試薬が入った1つ以上の容器を含むことができる。特定の実施形態では、キットの構成要素はすべて一緒に包装される。あるいは、キットの1つ以上の個別の構成要素を、他のキットの構成要素とは別のパッケージで提供できる。キットには、キットの構成要素を使用するための指示も含まれ得る。

30

【0162】

VI. 治療の方法

一態様では、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結された単鎖可変断片(scFv)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む、癌を治療するための操作された免疫細胞の使用であって、治療量の操作された免疫細胞を、癌の治療を必要とする対象に投与することを含む、使用に関する。

40

【0163】

他の態様では、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結された標的結合分子(例えば、scFv)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む、自己免疫障害を治療するための操作された免疫細胞の使用であって、治療量の操作された免疫細胞を、自己免疫障害の治療を必要とする対象に投与することを含む、使用に関する。

【0164】

他の態様では、本発明はまた、キメラ抗原受容体(CAR)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、局在化ドメインに連結されたCD2に対する標的結合分子(例えば、

50

抗CD2 s c F v)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む、感染性疾患を治療するための操作された免疫細胞の使用であって、治療量の操作された免疫細胞を、感染性疾患の治療を必要とする対象に投与することを含む、使用に関する。

【0165】

いくつかの態様では、操作された免疫細胞は、対象への注入によって投与される。免疫細胞（例えば、同種異系または自己免疫細胞）を注入する方法は、当技術分野で知られている。病気の症状を改善するために、十分な数の細胞がレシピエントに投与される。典型的には、 $10^7 \sim 10^{10}$ 個の細胞の投与量、例えば、 10^9 個の細胞の投与量が、で1回の設定で注入される。注入は、1回の 10^9 個の細胞用量として、または数回に分けた 10^9 個の細胞用量として投与される。注入の頻度は、3～30日ごと、または必要に応じて、または必要ならばより長い間隔にすることができる。注入の量は、一般に、対象ごとに少なくとも1回の注入であり、好ましくは、許容されるように、または疾患の症状が改善されるまで、少なくとも3回の注入である。細胞は、50～250 ml / 時間の速度で静脈内に注入することができる。他の適切な投与様式には、動脈内注入、腫瘍への直接注射および/または手術後の腫瘍床の灌流、人工足場の腫瘍部位への移植、髄腔内投与、および眼内投与が含まれる。本発明をそのような送達様式に適合させる方法は、当業者に容易に利用可能である。

10

【0166】

いくつかの態様で提供されるのは、本明細書に記載の操作された免疫細胞のうちのいずれか1つを含む、操作された免疫細胞の実質的に純粋な集団であって、操作された免疫細胞の少なくとも90%、例えば少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上がCD2発現を欠く、集団である。場合によっては、実質的に純粋な集団は、少なくとも80%、例えば少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上がCD2発現を欠く、操作された免疫細胞を含む。

20

【0167】

また、他の態様で提供されるのは、癌または自己免疫障害の治療を必要とする対象において癌または自己免疫障害を治療する方法であって、本明細書に記載の実施形態のうちのいずれかを有する治療量の操作された免疫細胞を対象に投与し、それにより癌または自己免疫障害の治療を必要とする対象において癌または自己免疫障害を治療することを含む、方法である。いくつかの態様で提供されるのは、癌または自己免疫障害の治療を必要とする対象において癌または自己免疫障害を治療する方法であって、本明細書に記載の実施形態うちのいずれかを有する治療量の操作された免疫細胞の実質的に純粋な集団を対象に投与し、それにより癌または自己免疫障害の治療を必要とする対象において癌または自己免疫障害を治療することを含む、方法である。

30

【0168】

特定の実施形態では、本方法は、本明細書に記載されるように、局在化ドメインに連結されたCD2に対する標的結合分子をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む、治療量の操作された免疫細胞を投与することを含む。場合によっては、第2の核酸はCARをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、4-1BBおよびCD3の細胞内シグナル伝達ドメイン、ならびにCD2などのサイトカインに結合する抗体を含む。

40

【0169】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、治療を必要とする対象に対して自己細胞である。他の実施形態では、操作された免疫細胞は、治療を必要とする対象に対して同種異系である。

【0170】

特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、静脈内注入、動脈内注入、腫瘍への直接注射および/または手術後の腫瘍母地の灌流、人工スキャフォールドにおける腫瘍部位で

50

の移植、髄腔内投与、ならびに眼内投与によって対象に投与される。

【0171】

特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、対象への注入によって投与される。免疫細胞（例えば、同種異系または自己免疫細胞）を注入する方法は、当技術分野で知られている。病気の症状を改善するために、十分な数の細胞がレシピエントに投与される。典型的には、 $10^7 \sim 10^{10}$ 個の細胞の投与量、例えば、 10^9 個の細胞の投与量が、で1回の設定で注入される。注入は、1回の 10^9 個細胞用量として、または数回に分けた 10^9 個の細胞用量として投与される。注入の頻度は、毎日、2～30日ごと、または必要に応じて、または必要ならばより長い間隔にすることができる。注入の量は、一般に、対象ごとに少なくとも1回の注入であり、好ましくは、許容されるように、または疾患の症状が改善されるまで、少なくとも3回の注入である。細胞は、 $50 \sim 250 \text{ ml}$ / 時間の速度で静脈内に注入することができる。他の適切な投与様式には、動脈内注入、腹腔内注入、腫瘍への直接注射および/または手術後の腫瘍床の灌流、人工足場の腫瘍部位への移植、髄腔内投与が含まれる。本発明をそのような送達様式に適合させる方法は、当業者に容易に利用可能である。

10

【0172】

特定の実施形態では、本発明による癌の治療方法は、少なくとも1つの他の既知の癌療法、例えば化学療法と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、本発明による癌を治療する方法は、PD-1、CTLA4、LAG3、TIM3、TIGITに対する抗体などの負のチェックポイント調節因子、または別の免疫チェックポイント分子を抑制する薬剤と治療的に組み合わせられる。この組み合わせは、リンパ腫内にしばしば存在する免疫抑制環境に起因して、T細胞リンパ腫を治療するときに特に効果的であり得る。

20

【0173】

また、他の態様で提供されるのは、癌を治療するための本明細書に記載の実施形態のうちの一つを有する操作された免疫細胞の使用であって、治療量の操作された免疫細胞（治療集団）を、癌の治療を必要とする対象に投与することを含む、使用である。特定の実施形態では、操作された免疫細胞は、静脈内注入、動脈内注入、腹腔内注入、腫瘍への直接注射、および/または手術後の腫瘍床の灌流、人工足場の腫瘍部位への移植、髄腔内投与により投与される。

【0174】

いくつかの実施形態では、対象は、本明細書で概説される操作された免疫細胞の投与（例えば、注入）の前に、非骨髄破壊的的化学療法で治療される。いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的的化学療法は、 $60 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ で2日間（操作された免疫細胞注入の27日および26日前）のシクロホスファミドおよび $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ で5日間（操作された免疫細胞注入の27日～23日前）のフルダラビンである。対象は、1つ以上のリンパ枯渇（例えば、免疫抑制コンディショニング）剤を投与される。プレコンディショニング剤の非限定的な例としては、シクロホスファミド、フルダラビン、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられる。CAR-T細胞療法の前に患者をコンディショニングするための詳細な方法は、例えば、US 9,855,298に見出され、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

【0175】

追加のプレコンディショニング方法は、Gassner et al., Cancer Immunol. Immunother. 2011, 60, 75-85、Muranski et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 2006, 3, 668-681、Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-5239、およびDudley et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-2357に記載されており、これらはすべて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0176】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的的化学療法および操作された免疫細胞の注入を受

50

けた後、対象は、IL - 2、IL - 7、IL - 15、またはそれらの任意の組み合わせなどのサイトカインの静脈内投与を受ける。いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的化学療法を受けた後、患者は、IL - 2、IL - 7、IL - 15、またはそれらの任意の組み合わせと組み合わせて、操作された免疫細胞の集団を受け取る。場合によっては、IL - 2、IL - 7、IL - 15、またはそれらの任意の組み合わせは、細胞の集団の後に投与される。特定の場合では、IL - 2、IL - 7、IL - 15、またはそれらの任意の組み合わせは、細胞の集団と同時に投与される。IL - 2としては、IL - 2 (アルデスケウキン (aldesleukin))、そのバイオシミラー、またはその変異体が挙げられる。
【0177】

いくつかの実施形態では、IL - 2は、限定されないが、本明細書に記載の治療上有効な操作された免疫細胞の集団の投与後、その日に静脈内投与を開始するなどの、高用量IL - 2レジメンを含み、IL - 2が、0.037 mg/kgまたは0.044 mg/kg IU/kg (患者の体重)の用量で、8時間ごとに15分間のボラス静脈内注入を使用して許容範囲まで、最大14回投与される。9日間の休止の後、スケジュールはさらに14回、合計最大28回繰り返され得る。

【0178】

他の実施形態では、IL - 2は、6時間にわたって約 1.8×10^6 IU/m²の用量、続いて12時間にわたって 1.8×10^6 IU/m²の用量、続いて24時間にわたって 1.8×10^6 IU/m²の用量、続いて72時間にわたって 1.8×10^6 IU/m²の用量で静脈内投与される。そのような治療レジメンは、28日ごとに最大4サイクル繰り返され得る。いくつかの実施形態では、IL - 2レジメンは、1日目の18,000,000 IU/m²、2日目の9,000,000 IU/m²、3日目、および4日目の4,500,000 IU/m²を含む。別の実施形態では、IL - 2レジメンは、0.10 mg/日~50 mg/日の用量で、1、2、4、6、7、14、または21日ごとにペグ化IL - 2を投与することを含む。

【0179】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞または操作された免疫細胞の集団は、抗体もしくは操作された細胞もしくは受容体などの別の治療的介入、または細胞毒性剤もしくは治療剤などの薬剤と同時に、または任意の順序で連続してなど、併用治療の一部として投与される。いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上の追加の治療剤と共に、または別の治療的介入に関連して、同時にまたは任意の順序で連続して、のいずれかで同時投与される。いくつかの実施形態では、細胞は、細胞集団が1つ以上の追加の治療剤の効果を増強するように、またはその逆であるように、十分に時間的に近接して別の治療と同時投与される。いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上の追加の治療剤の前に投与される。いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上の追加の治療剤の後に投与される。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の薬剤は、例えば、持続性を増強するために、IL - 2などのサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、方法は、化学療法剤の投与を含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、限定されないが、PD - 1、CTLA4、LAG3、TIM3、TIGITに対する抗体などの負のチェックポイント調節因子、または別の免疫チェックポイント分子を抑制する。

【0180】

本明細書に記載の操作された免疫細胞の投与に続いて、いくつかの実施形態における操作された細胞集団の生物学的活性は、例えば、多数の既知の方法のうちのいずれかによって測定される。評価するパラメータとしては、インピボでの例えば画像による、またはエクスピボでの例えばELISAもしくはフローサイトメトリーによる、操作されたもしくは天然のT細胞または他の免疫細胞の、抗原への特異的結合が挙げられる。特定の実施形態では、標的細胞を破壊するために操作された細胞の能力は、例えば、Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)、およびHerman et al., J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)に記載の細胞毒性アッセイなどの当

10

20

30

40

50

技術分野で既知の任意の適切な方法を使用して測定することができる。特定の実施形態では、細胞の生物学的活性は、CD107a、IFN、IL-2、およびTNFなどの1つ以上のサイトカインの発現および/または分泌を評価することによって測定される。いくつかの態様では、生物学的活性は、癌の負荷(cancer burden)または負荷(load)の低減などの臨床転帰を評価することによって測定される。

【0181】

VII. 本発明の例示的な実施形態

一態様では、本発明は、抗CD2一本鎖可変フラグメント(scFv)ドメイン、CD8 ヒンジ-膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3シグナル伝達ドメインを含む、抗CD2-4-1BB-CD3 キメラ抗原受容体(CAR)をコードする、ポリヌクレオチドを提供する。

10

【0182】

任意の実施形態のポリヌクレオチドの、CARの当該抗CD2 scFvドメインは、少なくとも90%(例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)の配列番号22または配列番号23の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む。任意の実施形態のポリヌクレオチドの、CARの当該CD8 ヒンジ-膜貫通ドメインは、少なくとも90%の配列番号15の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。任意の実施形態のポリヌクレオチドの、CARの当該4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインは、少なくとも90%(例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)の配列番号16の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。任意の実施形態のポリヌクレオチドの、CARの当該CD3シグナル伝達ドメインは、少なくとも90%(例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)の配列番号17の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。任意の実施形態のポリヌクレオチドの、CARは、配列番号5に対して少なくとも90%(例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、CARは、配列番号10のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%(例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)の配列同一性を有する、核酸配列を含む。

20

30

【0183】

本明細書で提供されるのは、本明細書に記載のCARをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む、単離されたウイルスベクターである。本発明のいくつかの態様では、本明細書で概説されるCARをコードするポリヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む単離されたウイルスベクターは、免疫細胞に導入される。

【0184】

また本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の抗CD2-4-1BB-CD3 キメラ抗原受容体を含む操作された免疫細胞である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、操作された同種異系細胞である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、操作された自己細胞である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、操作されたT細胞である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、T細胞を担持する、操作されたガンマ-デルタT細胞受容体である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、操作されたNK細胞である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、T細胞を担持する、操作されたガンマ-デルタT細胞受容体である。

40

【0185】

細胞局在化ドメインのN末端に連結されたCD2に結合する一本鎖可変フラグメント(scFv)を含むCD2遮断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書で提供される単離されたウイルスベクターであって、細胞局在化ドメインが、小胞体(ER)保持配列、ゴルジ体保持配列、およびプロテオソーム局在化配列からなる群から選

50

扱されるアミノ酸配列を含み、当該CD2遮断ポリペプチドが、細胞内で内因性CD2に結合する、ウイルスベクター。

【0186】

実施形態のうちのいずれか1つの単離されたウイルスベクターの、当該scFvは、(i)配列番号18に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変重鎖(VH)配列と配列番号19に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変軽鎖(VL)配列、または(ii)配列番号20に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変重鎖(VH)配列と配列番号21に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変軽鎖(VL)配列を含む。

【0187】

実施形態のうちのいずれか1つの単離されたウイルスベクターの、当該ER保持配列は、KDEL、KKXX、KKMP、およびKKTN(式中、Xが任意のアミノ酸であり得る)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、または当該ゴルジ体保持配列は、YGR L(配列番号40)、YQR L(配列番号41)、YKGL(配列番号42)、およびYXX L(配列番号43)(式中、Xが任意のアミノ酸であり得る)からなる群から選択される。実施形態のうちのいずれか1つの単離されたウイルスベクターの、当該CD2遮断ポリペプチドは、当該scFvと、KKMPもしくはKKTNを含む当該ER保持配列ドメイン、またはYGR L、YQR L、YKGLを含む当該ゴルジ体保持配列ドメインとの間に連結された膜貫通ドメインをさらに含み、当該膜貫通ドメインが、CD8、CD8、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16、OX40、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、およびFGFR2Bのうちのいずれか1つから選択される膜貫通ドメインである。実施形態のうちのいずれか1つの単離されたウイルスベクターの、当該膜貫通ドメインは、CD8のヒンジ-膜貫通ドメインを含む。

【0188】

実施形態のうちのいずれか1つの単離されたウイルスベクターの、当該CD2遮断ポリペプチドは、配列番号1~4からなる群から選択されるいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD2遮断ポリペプチドは、配列番号6~9のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%(例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0189】

本発明のいくつかの態様では、本明細書で概説されるCD2遮断ポリペプチドのうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む単離されたウイルスベクターは、免疫細胞に導入される。

【0190】

また、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載のCD2遮断ポリペプチドを含む操作された免疫細胞である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、操作された同種異系細胞である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、操作された自己細胞である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、操作されたT細胞である。任意の実施形態の操作された免疫細胞は、操作されたNK細胞である。

【0191】

一態様では、本明細書で提供されるのは、細胞局在化ドメインに連結された標的結合分子を含むポリペプチドを含む操作された免疫細胞であって、標的結合分子が、CD2タンパク質(例えば、ヒトCD2タンパク質)に結合する抗体であり、細胞局在化ドメインが、小胞体(ER)保持配列、ゴルジ体保持配列、およびプロテオソーム局在化配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、局在化ドメインに連結された標的結合分子が、操作された細胞によって分泌されない、操作された免疫細胞である。

【0192】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、CD2タンパク質（例えば、ヒトCD2タンパク質）に結合する抗体は、抗CD2一本鎖可変フラグメント（scFv）である。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号18に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変重鎖（V_H）配列と、配列番号19に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変軽鎖（V_L）配列と、を含む。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号18に記載の可変重鎖（V_H）配列と、配列番号19に記載の可変軽鎖（V_L）配列と、を含む。

【0193】

いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号20に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変重鎖（V_H）配列と、配列番号21に対して少なくとも90%の配列同一性を有する可変軽鎖（V_L）配列と、を含む。特定の実施形態では、scFvは、配列番号20に記載の可変重鎖（V_H）配列と、配列番号21に記載の可変軽鎖（V_L）配列と、を含む。

10

【0194】

いくつかの実施形態では、細胞局在化ドメインは、KDEL、KKXX、KKMP、またはKKTN（式中、Xが任意のアミノ酸であり得る）から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、標的結合分子と細胞局在化ドメインとの間に連結された膜貫通ドメインをさらに含む。場合によっては、膜貫通ドメインは、CD8、CD8、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcRI、CD16、OX40、CD3、CD3、CD3、CD3、TCR、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、またはFGFR2Bに由来する。

20

【0195】

特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8に由来するヒンジ-膜貫通ドメインを含む。

【0196】

様々な実施形態では、操作された免疫細胞のポリペプチドは、配列番号1または配列番号3に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ポリペプチドは、配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含み得る。

【0197】

特定の実施形態では、操作された免疫細胞のポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含み得る。

30

【0198】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）をさらに含む。特定の例では、CARは、抗CD2-4-1BB-CD3 CARである。抗CD2-4-1BB-CD3 CARは、配列番号5に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。抗CD2-4-1BB-CD3 CARは、CD2（例えば、ヒトCD2）に結合することができる。場合によっては、そのような抗CD2-4-1BB-CD3 CARは、「CD2 CAR」と称され得る。

40

【0199】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CD2+細胞の細胞毒性を誘発する。

【0200】

いくつかの実施形態では、内因性CD2発現は、操作された免疫細胞において遮断される。内因性CD2発現の遮断は、少なくとも6か月間持続することができる。内因性CD2発現の遮断は、少なくとも12か月間持続することができる。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、相当する免疫細胞と実質的に同等の速度で増殖する。

【0201】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、操作された同種異系細胞または操作

50

された自己細胞である。他の実施形態では、操作された免疫細胞は、ガンマ - デルタ T 細胞などの操作された T 細胞である。

【 0 2 0 2 】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、癌または自己免疫疾患の治療を必要とする対象において癌または自己免疫疾患を治療する方法であって、本明細書に記載の操作された免疫細胞のうちのいずれか 1 つを含む、治療量の組成物を対象に投与し、それにより癌または自己免疫疾患の治療を必要とする対象において癌または自己免疫疾患を治療することを含む、方法である。場合によっては、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。癌は、T 細胞悪性腫瘍または CD 2 関連癌であり得る。一実施形態では、T 細胞悪性腫瘍は、初期 T 細胞前駆細胞急性リンパ芽球性白血病 (E T P - A L L) または別の T 細胞白血病である。別の実施形態では、T 細胞悪性腫瘍は、限定されないが、皮膚 T 細胞リンパ腫 (C T C L)、菌状息肉症、セザリー症候群、または末梢 T 細胞リンパ腫 (P T C L) を含む、リンパ腫である。

10

【 0 2 0 3 】

いくつかの実施形態では、投与は、静脈内注入、動脈内注入、腹腔内注入、腫瘍への直接注射および/もしくは手術後の腫瘍床の灌流、人工足場の腫瘍部位への移植、または髄腔内投与による。

【 0 2 0 4 】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、細胞局在化ドメインに連結された標的結合分子を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。場合によっては、標的結合分子は、CD 2 タンパク質 (例えば、ヒト CD 2 タンパク質) に結合する抗体であり、細胞局在化ドメインは、小胞体 (E R) 保持配列、ゴルジ体保持配列、およびプロテオソーム局在化配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、局在化ドメインに連結された標的結合分子は、操作された細胞によって分泌されない。

20

【 0 2 0 5 】

特定の実施形態では、CD 2 タンパク質 (例えば、ヒト CD 2 タンパク質) に結合する抗体は、抗 CD 2 一本鎖可変フラグメント (s c F v) である。特定の実施形態では、s c F v は、配列番号 1 8 に対して少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) の配列同一性を有する可変重鎖 (V H) 配列と、配列番号 1 9 に対して少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) の配列同一性を有する可変軽鎖 (V L) 配列と、を含む。いくつかの実施形態では、s c F v は、配列番号 1 8 に記載の可変重鎖 (V H) 配列と、配列番号 1 9 に記載の可変軽鎖 (V L) 配列と、を含む。

30

【 0 2 0 6 】

他の実施形態では、s c F v は、配列番号 2 0 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する可変重鎖 (V H) 配列と、配列番号 2 1 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する可変軽鎖 (V L) 配列と、を含む。特定の実施形態では、s c F v は、配列番号 2 0 に記載の可変重鎖 (V H) 配列と、配列番号 2 1 に記載の可変軽鎖 (V L) 配列と、を含む。

40

【 0 2 0 7 】

いくつかの実施形態では、細胞局在化ドメインは、K D E L、K K X X、K K M P、または K K T N (式中、X が任意のアミノ酸であり得る) から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、標的結合分子と細胞局在化ドメインとの間に連結された膜貫通ドメインをさらに含む。場合によっては、膜貫通ドメインは、C D 8、C D 8、4 - 1 B B、C D 2 8、C D 3 4、C D 4、F c R I、C D 1 6、O X 4 0、C D 3、C D 3、C D 3、C D 3、T C R、C D 3 2、C D 6 4、V E G F R 2、F A S、または F G F R 2 B に由来する。

【 0 2 0 8 】

特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8 に由来するヒンジ - 膜貫通ドメイン

50

を含む。

【0209】

特定の実施形態では、操作された免疫細胞のポリペプチドは、配列番号1または配列番号3に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ポリペプチドは、配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含み得る。

【0210】

様々な実施形態では、操作された免疫細胞のポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含み得る。

10

【0211】

特定の実施形態では、本明細書に記載のPEBLは、配列番号6～9のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0212】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載のポリヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む発現ベクターである。場合によっては、発現ベクターはまた、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列を含む。CARは、抗CD2-4-1BB-CD3 CARであり得る。いくつかの実施形態では、抗CD2-4-1BB-CD3 CARは、配列番号5に対して少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0213】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号10のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有する核酸配列を含む。場合によっては、発現ベクターは、配列番号10の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号6～9のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有する核酸配列を含む。場合によっては、発現ベクターは、配列番号6～9のうちのいずれか1つの核酸配列を含む。

30

【0214】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される本明細書に記載の発現ベクターのうちのいずれか1つを含む宿主細胞。

【0215】

さらに別の態様では、本明細書で提供されるのは、操作された免疫細胞を産生するための方法であって、本明細書に開示のポリヌクレオチドまたは発現ベクターのうちのいずれか1つを免疫細胞に導入することを含む、方法である。いくつかの実施形態では、内因性CD2発現は、操作された免疫細胞において遮断される。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、操作された同種異系細胞または操作された自己細胞である。他の実施形態では、操作された免疫細胞は、ガンマ-デルタT細胞などの操作されたT細胞である。

40

【0216】

一態様では、本明細書で提供されるのは、抗CD2一本鎖可変フラグメント(scFv)ドメイン、CD8 ヒンジ-膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む、単離された抗CD2-4-1BB-CD

50

3 キメラ抗原受容体 (CAR) 分子である。抗CD2一本鎖可変フラグメント (scFv) ドメインは、少なくとも90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%) の配列番号22または配列番号23の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。CD8 ヒンジ-膜貫通ドメインは、少なくとも90%の配列番号15の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインは、少なくとも90%の配列番号16の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。CD3 シグナル伝達ドメインは、少なくとも90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%) の配列番号17の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、単離されたCAR分子は、配列番号5に対して少なくとも90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%) の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の単離されたCAR分子のうちのいずれか1つをコードする単離された核酸分子である。抗CD2-4-1BB-CD3 CARは、CD2 (例えば、ヒトCD2) に結合することができる。

【0217】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、抗CD2一本鎖可変フラグメント (scFv) ドメイン、CD8 ヒンジ-膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む、抗CD2-4-1BB-CD3 キメラ抗原受容体 (CAR) を含むポリペプチドを含む、操作された免疫細胞である。抗CD2-4-1BB-CD3 CARは、CD2 (例えば、ヒトCD2) に結合することができる。

【0218】

いくつかの実施形態では、抗CD2一本鎖可変フラグメント (scFv) ドメインは、少なくとも90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%) の配列番号22または配列番号23の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD8 ヒンジ-膜貫通ドメインは、少なくとも90%の配列番号15の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインは、少なくとも90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%) の配列番号16の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、CD3 シグナル伝達ドメインは、少なくとも90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%) の配列番号17の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたCAR分子は、配列番号5に対して少なくとも90% (例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%) の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたCAR分子は、配列番号10の核酸配列を含む。

【0219】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、操作された同種異系細胞または操作された自己細胞である。他の実施形態では、操作された免疫細胞は、ガンマ-デルタT細胞などの操作されたT細胞である。

【0220】

WO2016/126213およびPCT/US2017/063048の明細書、特許請求の範囲、および図などの内容は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0221】

実施例1：効果的なキメラ抗原受容体療法のためのT細胞におけるCD2発現の遮断

10

20

30

40

50

本実施例は、強力な抗CD2 CAR-T細胞を生じる、第2世代のCARと組み合わせた新規の方法を用いるCD2発現の遮断を示す。この実用的な戦略は、癌患者に新しい治療オプションを提供する。

【0222】

図1は、例示的な抗CD2キメラ抗原受容体(CAR)を提供する。抗CD2モノクローナル抗体9.6のscFvは、CD8シグナルペプチド、CD8ヒンジ-膜貫通ドメイン、ならびに以前実験室で開発した抗CD19-4-1BB-CD3CARの4-1BBおよびCD3の細胞内ドメインに接合した。抗CD2モノクローナル抗体9.6または9-1のscFvは、CD8シグナルペプチド、および局在化ドメイン、および任意選択的にCD8ヒンジ-膜貫通ドメインをコードする配列に接合した。これらを、マウス幹細胞ウイルス(MSCV)ベクターにサブクローニングした。場合によっては、MSCVは、MSCV-内部リボソーム進入部位(IRES)-ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む緑色蛍光タンパク質(GFP)レトロウイルスベクターである。

10

【0223】

9.6抗CD2CARレトロウイルスベクター構築物をJurkat細胞(白血病細胞株)に形質導入した。レトロウイルス上清の調製および形質導入は、当業者に既知の標準的なプロトコルに従って実行した。発現結果を図2に示す。

【0224】

また、CD2遺伝子を有するCCRF-CEM細胞には、9.6抗CD2CARレトロウイルスベクター構築物を形質導入した。得られた細胞は、10%FBSおよび1%Pen-Strepを補充したRPMI-1640培地で維持した。9.6抗CD2の活性を評価した。図3は、抗CD2CARが、CD2標的細胞の存在下でCD2およびCD69(活性化マーカー)の発現を誘発したことを示している。

20

【0225】

末梢血Tリンパ球における抗CD2CARの効果を決定的に決定するために、抗CD2CARをレトロウイルス(例えば、レンチウイルス)形質導入または電気穿孔によって初代T細胞に導入した。

【0226】

図4は、CAR発現を示す。

【0227】

図5は、CD2+標的細胞(MOLT-4)を、抗CD2CARで形質導入したか、またはGFPのみを含むベクターで形質導入した、Jurkat細胞と共培養したときの抗CD2CARの機能を示す。場合によっては、細胞は、1:1のE:Tで共培養した。結果は、9.6抗CD2CAR-T細胞が、CD2+標的細胞に対して細胞毒性を発揮することを示している。

30

【0228】

図6は、抗CD2PEBL構築物の例示的な実施形態を示す。9.6PEBLおよび9-1PEBLを、Jurkat細胞にレトロウイルスで形質導入した。図7のヒストグラムは、CD2発現の下方制御を示している。

【0229】

図8は、9.6PEBLIIが、ヒト末梢血T細胞におけるCD2発現を下方制御することを示している。

40

【0230】

本明細書で引用されたすべての特許、公開された出願および参考文献の教示は、その全体が参照により組み込まれる。

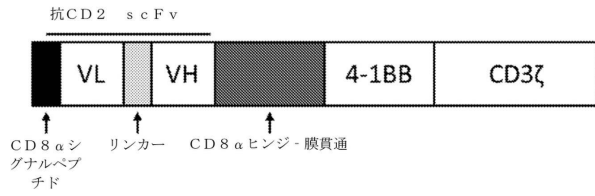
【0231】

本発明をその例示的な実施形態を参照して特に示し、説明したが、添付の特許請求の範囲に含まれる本発明の範囲から逸脱することなく、形態および詳細の様々な変更を行うことができることを当業者は理解するであろう。

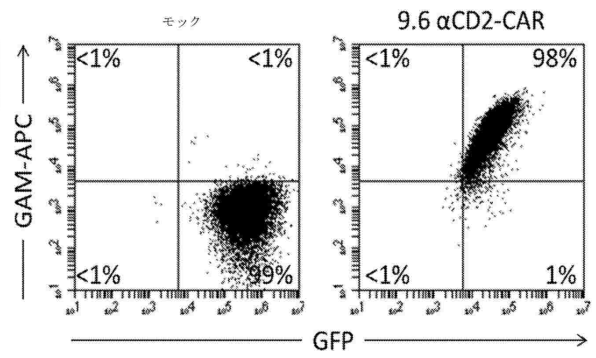
50

【図面】

【図 1】

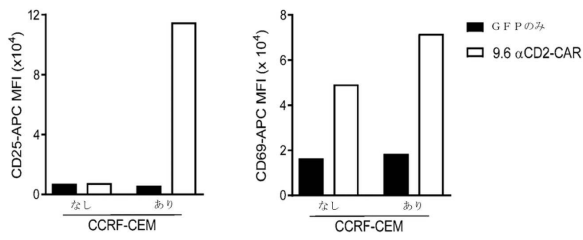


【図 2】

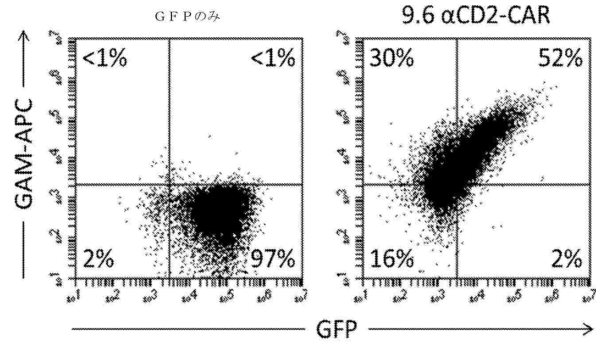


10

【図 3】

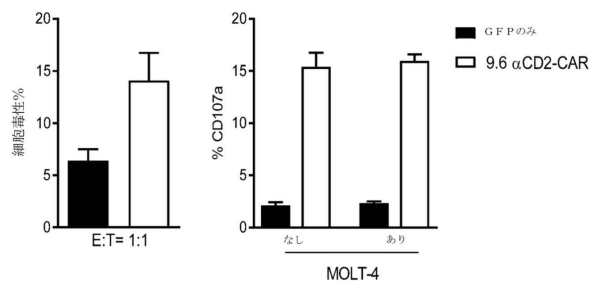


【図 4】

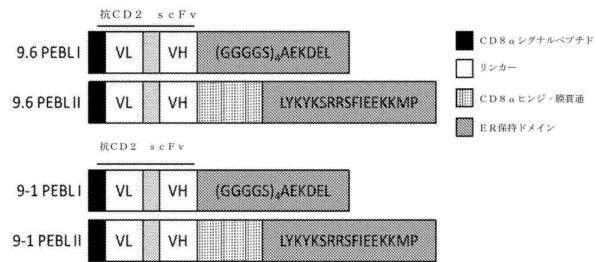


20

【図 5】



【図 6】

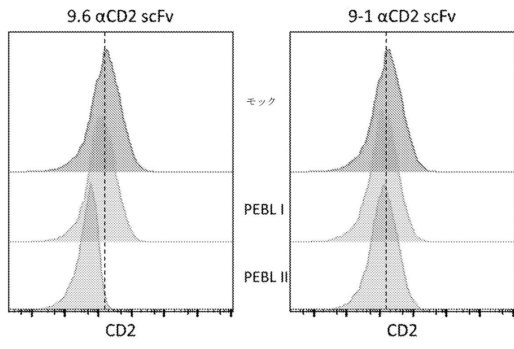


30

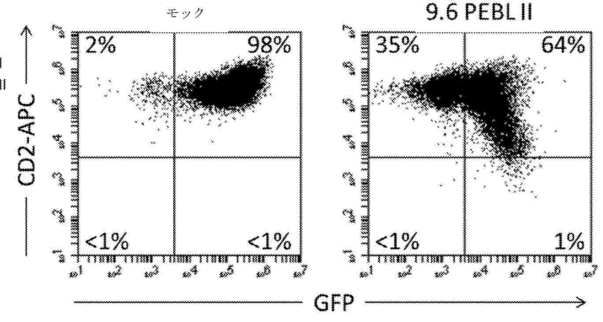
40

50

【 図 7 】



【 図 8 】



10

【 配列表 】

[0007584299000001.app](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/15 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/15</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>35/02 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>35/02</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/00</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00 (2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/28 (2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>16/28</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>35/17 (2015.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>35/17</i>

F I

H

シンガポール共和国, シンガポール 0 8 9 3 7 9 , エパートン ロード 2 4

(72)発明者 ビナニカ, ナターシャ

シンガポール共和国, シンガポール 5 8 9 6 6 4 , ブキティマ ロード ナンバー 0 9 - 1 8 9 6 9

(72)発明者 ビン, イ ティアン

シンガポール共和国, シンガポール 7 5 3 1 2 8 キャンペラ ストリート ナンバー 1 3 - 5 6 4
ビーエルケー 1 2 8 シー

(72)発明者 神谷 尚宏

東京都江東区門前仲町 1 - 1 9 - 1 1 3 0 8

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 8 / 0 2 7 0 3 6 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 2 6 2 1 3 (W O , A 1)

Takahiro KAMIYA et al. , “ A novel method to generate T-cell receptordeficient chimeric anti gen receptor T cells ” , Blood Advances , 2018年03月05日 , Vol. 2, No. 5 , p.517-528 , DO I: 10.1182/bloodadvances.2017012823

Yi Tian PNG et al. , “ Blockade of CD7 expression in T cells for effective chimeric antigen rec eptor targeting of T-cell malignancies ” , Blood Advances , 2017年11月21日 , Vol. 1, No. 2 5 , p.2348-2360 , DOI: 10.1182/bloodadvances.2017009928

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 5 / 2 8

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0

C 1 2 P

G 0 1 N

M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / C A P L U S / R E G I S T R Y (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)