(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7602803号
(P7602803)

(45)発行日　令和6年12月19日(2024.12.19)

(24)登録日　令和6年12月11日(2024.12.11)

(51)国際特許分類

Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	19/00	
Ｃ０７Ｋ　16/28　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	16/28	
Ｃ１２Ｎ　15/12　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/12	
Ｃ１２Ｎ　15/13　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/13	
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ

ＦＩ

請求項の数　41　（全59頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-555228(P2021-555228)
(86)(22)出願日　令和2年2月28日(2020.2.28)
(65)公表番号　特表2022-525318(P2022-525318A)
(43)公表日　令和4年5月12日(2022.5.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/020436
(87)国際公開番号　WO2020/190483
(87)国際公開日　令和2年9月24日(2020.9.24)
審査請求日　令和5年2月15日(2023.2.15)
(31)優先権主張番号　62/819,403
(32)優先日　平成31年3月15日(2019.3.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　306010244
ラトガーズ、ザ ステイト ユニバーシティ オブ ニュージャージー
アメリカ合衆国 ニュージャージー ０８９０１，ニュー ブランスウィック，サマーセット ストリート ８３
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＤ１４７キメラ抗原受容体および使用の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

（ａ）ＣＤ１４７に特異的に結合する抗原結合ドメインであって、配列番号１の核酸配列を含む核酸によってコードされる、抗原結合ドメイン、

（ｂ）ヒンジドメイン、

（ｃ）膜貫通ドメイン、ならびに

（ｄ）１つまたは複数の共刺激分子細胞内ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内ドメイン

を含む、キメラ抗原受容体。

【請求項２】

前記抗原結合ドメインが、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項３】

前記抗原結合ドメインが、高レベルの表面ＣＤ１４７を発現する細胞に結合する、請求項１または請求項２に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項４】

前記１つまたは複数の共刺激分子細胞内ドメインが、ＣＤ２８および４－１ＢＢの細胞内ドメインを含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項５】

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインを含む、請求項

１から４のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項６】
前記ヒンジドメインが、ＩｇＧ１ヒンジドメインを含む、請求項１から５のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項７】
前記膜貫通ドメインが、ＣＤ２８膜貫通ドメインまたはＣＤ８ａ膜貫通ドメインである、請求項１から６のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項８】
配列番号５のアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１から７のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項９】
配列番号５のアミノ酸配列を含む、請求項８に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１０】
１つまたは複数の追加の抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１から９のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１１】
前記１つまたは複数の追加の抗原結合ドメインが、グリピカン３、アルファ－フェトプロテイン、またはムチン－１に特異的に結合する、請求項１０に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１２】
誘導性自殺分子をさらに含む、請求項１から１１のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１３】
前記自殺分子が、カスパーゼ９を含む、請求項１２に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１４】
前記自殺分子の発現が、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、またはラパマイシンによって誘導可能である、請求項１２または請求項１３に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１５】
配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１２または請求項１３に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１６】
配列番号７のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１７】
サイトカイン受容体細胞内ドメインをさらに含む、請求項１から１６のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１８】
前記サイトカイン受容体細胞内ドメインが、インターロイキン－１５受容体細胞内ドメイン、インターロイキン－１２受容体細胞内ドメイン、またはインターロイキン１８受容体細胞内ドメインである、請求項１７に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項１９】
前記サイトカイン受容体細胞内ドメインが、配列番号１２のアミノ酸配列を含むインターロイキン－１５受容体細胞内ドメインである、請求項１８に記載のキメラ抗原受容体。
【請求項２０】
請求項１から１９のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体をコードする核酸分子。
【請求項２１】
配列番号４、配列番号６、または配列番号１４の核酸配列を含む、請求項２０に記載の核酸分子。
【請求項２２】
請求項２０または請求項２１に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項２３】
Ｂ型肝炎ウイルスまたはＣ型肝炎ウイルスを標的とする第２のキメラ抗原受容体をコー

ドする核酸分子をさらに含む、請求項２２に記載のベクター。
【請求項２４】
前記キメラ抗原受容体をコードする核酸分子に作動可能に連結された誘導性プロモーターまたはエンハンサーの核酸分子をさらに含む、請求項２２に記載のベクター。
【請求項２５】
前記エンハンサーの核酸分子が、Ｇａｌ４上流活性化配列である、請求項２４に記載のベクター。
【請求項２６】
配列番号１５の核酸配列を含む、請求項２５に記載のベクター。
【請求項２７】
ウイルスベクターである、請求項２２から２６のいずれか一項に記載のベクター。
【請求項２８】
前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである、請求項２７に記載のベクター。
【請求項２９】
請求項１から１９のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体を発現する、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
【請求項３０】
請求項２０、もしくは請求項２１に記載の核酸、または請求項２２から２８のいずれか一項に記載のベクターを含む、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
【請求項３１】
前記誘導性プロモーターまたはエンハンサーのアクチベーターをコードする核酸分子をさらに含む、請求項２４から２６のいずれか一項に記載のベクターを含むＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
【請求項３２】
前記アクチベーターをコードする前記核酸が、抗ＧＰＣ３特異的結合剤をさらにコードする、請求項３１に記載のＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
【請求項３３】
誘導性プロモーターまたはエンハンサーのアクチベーターをコードする核酸分子および前記誘導性プロモーターまたはエンハンサーに作動可能に連結された抗ＧＰＣ３キメラ抗原受容体を含むベクターをさらに含む、請求項２４に記載のベクターを含むＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
【請求項３４】
抗ＧＰＣキメラ抗原受容体を含む前記ベクターが、配列番号１６の核酸配列を含む、請求項３３に記載のＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
【請求項３５】
末梢血、臍帯血、リンパ節、骨髄、腫瘍組織、または細胞系から得られる、請求項２９から３４のいずれか一項に記載のＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
【請求項３６】
ＮＫ－９２細胞またはＮＫ－９２ＭＩ細胞である、請求項２９から３５のいずれか一項に記載のＮＫ細胞。
【請求項３７】
ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞またはＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞を産生する方法であ

って、請求項２２から２８のいずれか一項に記載のベクターをＴ細胞またはＮＫ細胞に形質導入またはトランスフェクトすることを含む方法。
【請求項３８】
請求項２９から３６のいずれか一項に記載のＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージを含む、がんを有する対象を処置するための組成物。
【請求項３９】
前記対象が、ＣＤ１４７を発現するがんを有する、請求項３８に記載の組成物。
【請求項４０】
前記対象が、肝細胞癌、神経芽腫、乳がん、膵がん、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、結腸直腸がん、肺がん、黒色腫、腎細胞癌、肉腫、または鼻咽頭癌を有する、請求項３８または請求項３９に記載の組成物。
【請求項４１】
前記対象に、手術、放射線、化学療法、追加の免疫療法、またはそれらの２つもしくはそれより多い組合せの少なくとも１つでさらに処置されていることを特徴とする、請求項３８から４０のいずれか一項に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる２０１９年３月１５日出願の米国仮特許出願第６２／８１９，４０３号の利益を主張する。
【０００２】
分野
本開示は免疫療法、特にＣＤ１４７を標的とするキメラ抗原受容体およびがんを処置するためのそれらの使用に関する。
【０００３】
政府補助の謝辞
本発明はアメリカ国立衛生研究所によって授与された助成金番号ＡＩ１３０１９７、ＨＬ１２５０１８、ＡＩ１２４７６９－０１、およびＡＩ１２９５９４による政府補助によって行われた。政府は本発明において一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００４】
肝がんは世界で２番目に多いがん関連の死因である。肝がんの負荷は２０３０年までに１００万例を超すと予測されている。肝がんは世界の症例では５番目であり、男性の死亡の２番目である。毎年、５０万人を超える患者が肝細胞癌（hepatocellular carcinoma）（ＨＣＣ）で死亡している。
【０００５】
原発性肝がんには肝細胞癌（ＨＣＣ）、肝内胆管癌（ｉＣＣＡ）、線維層板癌、および肝芽腫が含まれる。ＨＣＣおよびｉＣＣＡは最も一般的な原発性肝がんであり、原発性肝がん症例の９９％よりも多くを占める。ＨＣＣ単独（１年あたりほぼ８００，０００の新たな症例）で原発性肝がんの全症例の９０％を占める。現在のところ、ＨＣＣを処置するために利用可能な有効な療法はない。ソラフェニブ（ＣｈｅｃｋＭａｔｅ－０４０、進行したＨＣＣを有する患者に広く使用されているマルチキナーゼ阻害剤であるが、効力が低く重篤な副作用がある）がＨＣＣのファーストラインの標準的な全身性薬剤である。現在のところ、ＰＤ－１遮断薬Ｏｐｄｉｖｏ（ニボルマブ）が、以前ソラフェニブによって処置されたＨＣＣを有する患者へのセカンドライン処置戦略として米国食品医薬品局（ＦＤＡ）によって承認されている。ＨＣＣのファーストライン処置としてのＰＤ－１遮断薬を試験する臨床試験が、現在進行中である。その間に、他の介入と組み合わせたＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１遮断薬を使用する種々の臨床試験も進行中である。例えば、切除可能なお

よびおそらく切除可能なＨＣＣを有する患者において、抗ＣＴＬＡ－４抗体と組み合わせた抗ＰＤ－１抗体を評価する研究が、臨床試験で試験されている（ＮＣＴ０３２２２０７６）。

【０００６】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）改変Ｔ細胞療法は、種々の血液がんの処置のための有望な免疫療法戦略になってきた。血液がんにおけるＣＡＲ改変Ｔ細胞免疫療法の最近の進歩にも関わらず、高い費用および重篤な毒性がその広範囲におよぶ使用を妨げてきた。一方、ＣＡＲ－Ｔ細胞は、固形腫瘍の標的化の間に、腫瘍微小環境における永続的な増殖および持続性を維持することなどのさらなる課題に直面している。肝がんのためのＣＡＲ媒介免疫療法に対するさらなる課題は、有効な標的を発見することである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

ＣＤ１４７は様々なレベルで種々の細胞型（例えば造血、上皮、および内皮細胞）に発現する。しかし、ＣＤ１４７はＨＣＣ、乳がん、膀胱がん、結腸直腸がん、卵巣がん、黒色腫、および骨肉腫などの病態において有意に上方調節される。ＣＤ１４７を発現する細胞を特異的に標的とするＣＡＲが提供される。これらのＣＡＲは、ＣＤ１４７を発現または過剰発現しているがんの免疫療法において使用することができる。

【０００８】

ＣＤ１４７に特異的に結合する改変された一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）が本明細書で開示される。一部の実施形態では、ｓｃＦｖは、配列番号８の可変重鎖（ＶＨ）ドメイン相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３アミノ酸配列、ならびに配列番号９の可変軽鎖（ＶＬ）ドメインＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３アミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する。一部の例では、ｓｃＦｖは配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有するか、または配列番号２のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる。改変されたＣＤ１４７ｓｃＦｖをコードする核酸、例えば配列番号１の核酸分子と少なくとも９０％の配列同一性を有するか、または配列番号１の核酸配列を含むかもしくはそれからなる核酸、および核酸配列を含むベクターも提供される。追加の実施形態では、改変されたＣＤ１４７ｓｃＦｖをコードするベクター（例えば配列番号１）が提供され、ベクターはＣＤ１４７ｓｃＦｖ核酸分子に作動可能に連結された誘導性プロモーターまたはエンハンサー核酸分子をさらに含む。一部の例では、エンハンサー核酸は、ＣＤ１４７ｓｃＦｖをコードする核酸に作動可能に連結されたＧａｌ４上流活性化配列（ＵＡＳ）である。別の例では、ベクターはｓｙｎＮｏｔｃｈ構築物、例えばｓｙｎＮｏｔｃｈおよびＧａｌ４－ＶＰ６４コーディング配列（例えば配列番号１７）に連結された改変されたＣＤ１４７ｓｃＦｖ核酸分子（例えば配列番号１）の核酸配列を含むベクターである。

【０００９】

本明細書で提供する改変されたＣＤ１４７ｓｃＦｖ、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、１つまたは複数の共刺激分子細胞内ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内ドメインを含むＣＡＲも提供される。一実施形態では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、本明細書で提供する改変されたＣＤ１４７ｓｃＦｖ、ＩｇＧ１ヒンジドメイン、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、ＣＤ２８および４－１ＢＢ共刺激ドメイン、ならびにＣＤ３ζシグナル伝達ドメインを含む。一部の例では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、配列番号５のアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、または配列番号５のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる。

【００１０】

一部の実施形態では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、カスパーゼ９などの誘導性自殺分子をさらに含む。一部の例では、自殺分子の発現はテトラサイクリン、ドキシサイクリン、またはラパマイシンによって誘導される。一例では、誘導性自殺遺伝子を有するＣＤ１４７－ＣＡＲは、配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列

を含むか、または配列番号７のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる。ＣＤ１４７－ＣＡＲは、サイトカイン受容体細胞内ドメイン、例えばインターロイキン－１５受容体細胞内ドメイン（例えば配列番号１２）、インターロイキン－１２受容体細胞内ドメイン、またはインターロイキン１８受容体細胞内ドメインをさらに含んでよい。

【００１１】

本明細書で開示するＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸、および該核酸を含むベクター（例えばウイルスベクター）も提供される。一部の例では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、配列番号４または配列番号６の核酸配列と少なくとも９０％の同一性を有する核酸配列によってコードされる。他の例では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、配列番号４または配列番号６の核酸配列を含むか、またはこれらからなる核酸によってコードされる。

【００１２】

追加の実施形態では、ＣＤ１４７－ＣＡＲ（例えば配列番号４または配列番号６）をコードし、ＣＤ１４７－ＣＡＲ核酸分子に作動可能に連結された誘導性プロモーターまたはエンハンサー核酸分子をさらに含むベクターが提供される。一部の例では、エンハンサー核酸は、ＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸に作動可能に連結されたＧａｌ４上流活性化配列（ＵＡＳ）（例えば配列番号１４）である。一例では、ベクターはｓｙｎＮｏｔｃｈ構築物中のＣＤ１４７－ＣＡＲ、例えば配列番号１５の核酸配列を含むベクターを含む。他の例では、ＣＤ１４７－ＣＡＲ核酸分子（例えば配列番号１）は、ｓｙｎＮｏｔｃｈおよびＧａｌ４－ＶＰ６４コーディング配列（例えば配列番号１７）に連結されている。

【００１３】

開示したｓｃＦｖおよび／またはＣＡＲを発現するＴ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞（$CD3^{+}CD4^{-}CD8^{-}$）、好中球、またはマクロファージ、例えば開示したＣＤ１４７ｓｃＦｖもしくはＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸または開示したＣＤ１４７ｓｃＦｖもしくはＣＤ１４７－ＣＡＲをコードするベクターを含むＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージも提供される。一部の例では、ＮＫ細胞はＮＫ－９２またはＮＫ－９２ＭＩ細胞である。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞、またはＣＤ１４７－ＣＡＲ－マクロファージを含むがこれらに限らないＣＡＲを発現する細胞を産生する方法が提供される。これらの方法は、開示したＣＡＲをコードするベクターをＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージに形質導入またはトランスフェクトすることを含む。

【００１４】

さらなる実施形態では、誘導性プロモーターまたはエンハンサーエレメントのアクチベーターに作動可能に連結されたＣＤ１４７－ＣＡＲを発現するＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージが提供される。一部の例では、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージは、誘導性プロモーターまたはエンハンサーエレメントのアクチベーターに作動可能に連結された抗ＧＰＣ３特異的結合剤（例えば抗ＧＰＣ３ｓｃＦｖ）をコードする核酸をさらに発現する。他の実施形態では、誘導性プロモーターまたはエンハンサーエレメントに作動可能に連結されたＣＤ１４７ｓｃＦｖを発現し、誘導性プロモーターまたはエンハンサーに作動可能に連結された抗ＧＰＣ３キメラ抗原受容体をコードする核酸分子をさらに含むＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージが提供される。

【００１５】

例えば本明細書で開示するＣＡＲを発現するＮＫ細胞、Ｔ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージ（例えばＣＤ１４７－ＣＡＲ　ＮＫ細胞、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞、またはＣＤ１４７－ＣＡＲマクロファージ）を対象に投与することによって、がんを有する対象を処置するための方法が本明細書で開示される。一部の例では、対象は、ＣＤ１４７を発現するがんを有する。特定の非限定的な例では、対象は、肝細胞癌、神経芽腫、乳がん、膵がん、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、結腸直腸がん、肺がん、黒色腫、腎細胞癌、肉腫、または鼻咽頭癌を有する。

【００１６】
本開示の上記および他の特色は、添付した図面への参照によって進む以下の詳細な説明によってさらに明らかになる。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１－１】図１Ａ～１Ｅは、肝細胞癌細胞におけるＣＤ１４７の過剰発現を示す。図１Ａは、ＴＣＧＡデータセットからのヒトがん患者の全生存期間についてのＣＤ１４７の上方調節された発現の予後値を示す。相対的なＣＤ１４７の高いおよび低い発現（下のパネル）に基づく様々な患者集団の生存曲線（上のパネル）。ＬＵＡＤ（肺腺癌）、ＳＫＣＭ（皮膚黒色腫）、ＬＩＨＣ（肝細胞癌（Liver hepatocellular carcinoma））、およびＬＧＧ（脳の低悪性度神経膠腫）のデータを解析のために収集した。図１Ｂは、ＴＣＧＡデータセットからの正常組織（ＮＴ）および多数のがん型における腫瘍試料（ＴＰ）の間のＣＤ１４７発現の比較を示す。データは、３回の個別の実験の平均±ＳＥＭを表す。対応のないスチューデントのｔ検定を用いた。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、およびｎ．ｓ（有意差なし）。ＴＣＧＡデータベースによれば、各がん型の完全名称は、ＢＲＣＡ（乳房浸潤癌）、ＣＨＯＬ（胆管癌）、ＧＢＭ（多形性神経膠芽腫）、ＬＧＧ（脳の低悪性度神経膠腫）、ＨＮＳＣ（頭頸部扁平上皮癌）、ＫＩＣＨ（腎嫌色素性）、ＫＩＰＡＮ汎腎コホート（ＫＩＣＨ＋ＫＩＲＣ＋ＫＩＲＰ）、ＫＩＲＰ（腎乳頭細胞癌）、ＬＩＨＣ（肝細胞癌）、ＬＵＡＤ（肺腺癌）、ＬＵＳＣ（肺扁平上皮癌）、ＰＲＡＤ（前立腺腺癌）、ＵＣＥＣ（子宮体内膜癌）である。図１Ｃは、ＨＣＣ細胞系におけるＣＤ１４７のウェスタンブロット解析を示す。種々の細胞系の１×１０^{6}個の細胞を２００μｌのＲＩＰＡ緩衝液中で溶解し、５０μｌの５×ＳＤＳローディング緩衝液と混合した後、独立にＳＤＳ－ＰＡＧＥにロードした。マウス抗ヒトＣＤ１４７（ＨＩＭ６、マウスＩｇＧ１）をウェスタンブロット解析に使用した。ローディング対照として抗ＧＡＰＤＨを使用した。図１Ｄは、ＨＣＣ細胞系（ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＨｅｐＧ２）中のＣＤ１４７を示す。ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＨｅｐＧ２（１×１０^{6}個の細胞）は、２μｇのＦＩＴＣ－マウス抗ヒトＣＤ１４７（抗ＣＤ１４７）または２μｇのＦＩＴＣ－アイソタイプマウスＩｇＧ１（アイソタイプ、カッパ）で染色した。インキュベーションおよび洗浄の後、フローサイトメトリーによって試料を解析した。数字は各試料の平均蛍光強度（ＭＦＩ）を表す。図１Ｅは、ＰＤＸマウスモデルから単離したヒトＨＣＣ腫瘍上のＣＤ１４７抗原発現の組織病理学的解析を示す一連のパネルである。それぞれＰＢＳ、ＮＫ－９２ＭＩ、およびＣＤ１４７－ＣＡＲ　ＮＫ－９２ＭＩで処置した様々な患者由来の異種移植（ＰＤＸ）マウスからの腫瘍試料の代表的なＨ＆Ｅ（上の列）およびＣＤ１４７のＩＨＣ染色（中間の列）。下列は一次抗体なしのＩＨＣ染色を示す。スケールバーは５０μｍを表す。データは３回の独立した実験を代表する。
【図１－２】同上。
【図１－３】同上。
【図２－１】図２Ａ～２Ｆは、ＣＤ１４７－ＣＡＲの設計およびＣＡＲ改変ＮＫ－９２ＭＩ細胞の表現型判定を示す。図２Ａは、ＳＦＧレトロウイルスベクターに基づくＣＤ１４７特異的ＣＡＲの概略設計を示す。構築物は、ＣＤ１４７特異的一本鎖抗体断片（クローン５Ｆ６からの改変されたｓｃＦｖ、ｍＩｇＧ１）、ヒトＩｇＧ１　ＣＨ２ＣＨ３ヒンジ領域およびＣＤ２８膜貫通領域、それに続く共刺激ＣＤ２８、４－１ＢＢの細胞内ドメインおよびＣＤ３ζの細胞内ドメインを含む。図２Ｂは、親ＮＫ－９２ＭＩおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの表面上のＣＡＲ発現およびＣＤ５６のフローサイトメトリー解析を示す。データは、少なくとも３回の実験を代表する。図２Ｃは、内因性ＣＤ１４７およびＣＤ１４７－ＣＡＲ融合タンパク質の検出のための抗ヒトＣＤ３ζ特異的抗体による親ＮＫ－９２ＭＩおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞におけるＣＡＲ発現のウェスタンブロット解析を示す。図２Ｄは、親ＮＫ－９２ＭＩ、ＣＡＲ－ＣＤ１９（４－１ＢＢ）－ＮＫ－９２ＭＩ、およびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞におけるＮＫ活性化および阻害マーカーを示す。各データは少なくとも３回または４回の実験を

表す。フローグラフ中の数字は、各試料の平均蛍光強度（ＭＦＩ）を表す。図２Ｅは、ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）を使用したＣＤ１９－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩにおけるＣＡＲの発現のフローサイトメトリー解析を示す。対照として野生型ＮＫ－９２ＭＩ細胞を使用した。図２Ｆは、ＮＫ－９２ＭＩ、ＣＤ１９－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ、およびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩにおけるＣＤ１４７の発現のフローサイトメトリー解析を示す。図２Ｇは、ＮＫ－９２ＭＩ、ＣＤ１９－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ、およびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩにおけるＣＤ１４７発現レベルの重ね合わせたフローサイトメトリープロファイルを示す。データは２回の独立した実験を代表する。

【図２－２】同上。

【図２－３】同上。

【図３－１】図３Ａ～図３Ｄは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞におけるＣＤ１０７ａの脱顆粒およびサイトカイン産生がその感受性標的細胞によって刺激されることを示す。図３Ａは、培地（対照）、ＳＫ－Ｈｅｐ１、およびＨｅｐＧ２を用いて１０時間後のＮＫ－９２ＭＩ、ＣＤ１９－４－１ＢＢ－ＣＡＲ、ＣＤ１９－ＣＤ２８－ＣＡＲ、およびＣＤ１４７－ＣＡＲにおけるＣＤ１０７ａの脱顆粒を説明する代表的なフローサイトメトリーデータを示す。エフェクターと標的の比は１：１．２である。表面ＣＤ１０７ａ発現を定量するため、細胞をＣＤ５６陽性サブセットについてゲーティングした。図３Ｂは、示したように、様々な刺激におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞における表面ＣＤ１０７ａ発現のパーセンテージの定量データを示す。様々な条件によって刺激されたＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ、ＣＤ１９－４－１ＢＢ－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ、ＣＤ１９－ＣＤ２８－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ、および野生型ＮＫ－９２ＭＩによるサイトカインＴＮＦ－アルファ（図３Ｃ）およびＩＦＮ－ガンマ（図３Ｄ）の産生。ＮＫ－９２ＭＩ細胞は、ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞とともにエフェクター／標的比１：１または培地で、１２時間共培養した。陽性対照としてフォルボール－１２－ミリステート－１３－アセテート（ＰＭＡ）／イオノマイシン（ＩＯＮＯ）を使用した。サイトカイン放出の比は以下の等式：試料の値／陽性対照値の平均×１００（％）によって計算した。データは少なくとも３回または４回の実験からプールした。

【図３－２】同上。

【図４】図４Ａ～４Ｃは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩによる２種のＨＣＣ細胞系の殺滅を示す。図４Ａは、Ｈｕｈ７（左）およびＨＣＯ２（右）細胞系における表面ＣＤ１４７分子の代表的なフローサイトメトリー染色である。図４Ｂは、標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定したＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの細胞傷害性を示すグラフである。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩに感受性のある標的細胞としてＣＤ１４７陽性Ｈｕｈ７細胞を使用した。対照として野生型ＮＫ－９２ＭＩを使用した。図４Ｃは、標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定したＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの細胞傷害性を示すグラフである。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩに感受性のある標的細胞としてＣＤ１４７陽性ＨＣＯ２細胞を使用した。対照として野生型ＮＫ－９２ＭＩを使用した。データは３回の独立した実験からの平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図５－１】図５Ａ～５Ｇは、ＣＤ１４７陽性標的細胞の刺激におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の活性化を示す。図５Ａは、示したように、様々な刺激におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞における表面ＣＤ１０７ａ発現のパーセンテージを示す代表的なデータを示す。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞を、ＳＫ－Ｈｅｐ１またはＨｅｐＧ２細胞で４時間刺激した。ＣＤ１４７－ＣＡＲとＣＤ１４７分子との間の相互作用を遮断するために、５μｇのマウス抗ヒトＣＤ１４７（ＨＩＭ６）をエフェクターと標的細胞との混合物に添加した。示したように、対照として５μｇのアイソタイプ－マウスＩｇＧ（ＩｇＧ）またはＰＢＳ（ビヒクル対照群）を使用した。図５Ｂおよび５Ｃは、ＣＤ１４７陽性ＳＫ－Ｈｅｐ１（図５Ｂ）およびＣＤ１４７陽性ＨｅｐＧ２（図５Ｃ）細胞系で刺激したＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞における表面ＣＤ１

０７ａ染色のパーセンテージの定量データを示すグラフである。示したように、対照として野生型ＮＫ－９２ＭＩ細胞単独およびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞単独を使用した。図５Ｄは、ＣＤ１４７陽性野生型（ＷＴ）ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系（上のパネル）およびＣＤ１４７ノックアウト（ＣＤ１４７$^{-/-}$）ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系（中間のパネル）で刺激したＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞における表面ＣＤ１０７ａ発現のパーセンテージを示す代表的なデータを示す。対照として培養培地のみの群を使用した。対照エフェクター細胞としてナイーブＮＫ－９２ＭＩおよび４－１ＢＢ－ＣＤ１９－ＣＡＲ（ＣＤ１９－ＣＡＲ）を使用した。図５Ｅは、それぞれＣＤ１４７陽性ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＷＴ）およびＣＤ１４７ノックアウトＳＫ－Ｈｅｐ１（ＣＤ１４７$^{-/-}$）細胞系で刺激したＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞における表面ＣＤ１０７ａ染色のパーセンテージの定量データを示す。図５Ｆは、ＣＤ１４７陽性野生型（ＷＴ）ＨｅｐＧ２細胞系（上のパネル）およびＣＤ１４７ノックアウトＨｅｐＧ２細胞系（中間のパネル）で刺激したＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞における表面ＣＤ１０７ａ発現のパーセンテージを示す代表的なデータを示す。対照として培養培地のみの群を使用した。対照エフェクター細胞としてナイーブおよびＣＤ１９－４－１ＢＢ－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ（ＣＤ１９－ＣＡＲ）を使用した。図５Ｇは、それぞれＣＤ１４７陽性ＨｅｐＧ２（ＷＴ）およびＣＤ１４７ノックアウトＨｅｐＧ２（ＣＤ１４７$^{-/-}$）細胞系で刺激したＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞における表面ＣＤ１０７ａ染色のパーセンテージの定量データを示す。エフェクターと標的の比は１：１．２である。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞は、ＣＤ５６抗体表面染色によってゲーティングした。ＮＫ脱顆粒は、フローサイトメトリーによるＣＤ１０７ａ表面染色によって測定した。データは３回の個別の実験の平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図５－２】同上。

【図６】図６は、マウス抗ヒトＣＤ１４７（ＨＩＭ６）がＣＤ１９－ＣＡＲ－ＮＫ細胞の細胞傷害性に影響しないことを示す。ＣＤ１９－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの細胞傷害性は、ＦＦＬｕｃレポートシステムアッセイを使用して測定した。簡単に述べると、Ｄａｕｄｉ－ＦＦＬｕｃ細胞（１×１０^{4}）を、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＢＤ）で処置した９６ウェルの光学底マイクロプレート（optical-bottom microplate）に一夜、前播種した。エフェクター細胞（ＣＤ１９－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ）を、２つの異なるエフェクター／標的比（示したように５：１および１：１）で、６時間、共培養した。マイクロプレートリーダーによって発光シグナルを定量し、特異的溶解のパーセンテージを計算した。データは３回の独立した実験からプールした。エラーバーは±ＳＥＭ（平均の標準誤差（standard error））を示す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図７】図７Ａおよび７Ｂは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの殺滅活性の代表的なイメージを示す。エフェクター細胞（１×１０^{4}）ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩおよびＮＫ－９２ＭＩを、標的細胞ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１（図７Ａ、上）（１×１０^{4}）およびＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ２（図７Ａ、下）とともに、９６ウェルの光学底マイクロプレート中で１２時間、共培養した。同じ設定でＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの殺滅活性を可視化するために、従来の蛍光顕微鏡法で検出したＧＦＰ蛍光（上のレーン）および明視野（下のレーン）を使用した。ＧＦＰ蛍光強度は、ＩｍａｇｅＪソフトウェア（ＮＩＨ）によって定量した（図７Ｂ）。ＧＦＰの定量平均蛍光強度（ＭＦＩ）をＧｒａｐｈプリズム５ソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ、ＵＳＡ）によってプロットした。

【図８－１】図８Ａ～８Ｎは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＴおよびＮＫ細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏでＣＤ１４７陽性腫瘍細胞を特異的に殺滅することを示す。図８Ａは、ＦＦＬｕｃレポーターアッセイによって測定した初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性を示す。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔに感受性のある標的細胞としてＣＤ１４７陽性ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１を使用した。各実験の対照群としてカッパ－ＣＡＲ　Ｔ細胞を使用した。図８Ｂおよび８Ｃは、ＦＦＬｕｃレポーターアッセイによる、ノックアウトＣＤ１４

７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系およびＨｅｐＧ２細胞系を使用したＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性の有意な低下を示す。データは３回の独立した実験からの平均±ＳＥＭを表す。図８Ｄは、４時間の標準的な^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定した初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞の細胞傷害性を示す。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔに感受性のある標的細胞としてＣＤ１４７陽性ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１を使用した。各実験の対照群としてカッパ－ＣＡＲ　Ｔ細胞を使用した。図８Ｅおよび８Ｆは、４時間の標準的な^{51}Ｃｒ放出アッセイによる、ノックアウトＣＤ１４７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系およびＨｅｐＧ２細胞系を使用した初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞の細胞傷害性の有意な低下を示す。データは３回の独立した実験からの平均±ＳＥＭを表す。図８Ｇは、初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫがＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１を自然に殺滅するのを、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体が遮断したことを示す。様々な比の初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞を、ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１、ノックアウトＣＤ１４７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系、または５μｇの抗ＮＫＧ２Ｄを含むノックアウトＣＤ１４７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系とともに４時間、共培養した。ＦＦＬｕｃレポーターアッセイを使用した。データは３回の独立した実験からの平均±ＳＥＭを表す。図８Ｈは、ＳＫ－Ｈｅｐ１に対するＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの細胞傷害性を標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定したことを示す。エフェクター細胞（ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩおよびＮＫ－９２ＭＩ）をウェルあたり１×１０^{4}個の標的細胞ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１とともに共培養した。４時間後、上清を収集し、放出された^{51}Ｃｒをガンマカウンターで測定した。図８Ｉおよび８Ｊは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩによるＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ２細胞系の特異的殺滅のＦＦＬｕｃレポーターシステムアッセイである。エフェクター細胞（ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩおよびＮＫ－９２ＭＩ）を、ウェルあたり１×１０^{4}個のＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１（図８Ｉ）またはＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ２（図８Ｊ）標的細胞とともに、９６ウェルの光学底マイクロプレート中で６時間、共培養した。Ｄ－ルシフェリンとともに５分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーによって発光シグナルを測定して、ＮＫ細胞の細胞傷害性を計算した。使用した対照群は、ＣＤ１４７陽性ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１またはＣＤ１４７陽性ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ２とともにインキュベートした野生型ＮＫ－９２ＭＩであった。図８Ｋおよび８Ｌは、ＦＦＬｕｃレポーターシステムアッセイによる、ノックアウトＣＤ１４７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１（図８Ｋ）およびノックアウトＣＤ１４７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ２（図８Ｌ）細胞系を使用したＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の細胞傷害性の低下を示す。エフェクター細胞（ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩおよびＮＫ－９２ＭＩ）を、ウェルあたり１×１０^{4}個の野生型またはＣＤ１４７ノックアウト標的細胞とともに、９６ウェルの光学底マイクロプレート中で６時間、共培養した。Ｄ－ルシフェリンとともに５分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーによって発光シグナルを測定して、ＮＫ細胞の細胞傷害性を計算した。図８Ｍおよび８Ｎは、抗ＣＤ１４７（クローン、ＨＩＭ６）がＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１（図８Ｍ）およびＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ２（図８Ｎ）に対するＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの特異的溶解効果を阻害したことを示すグラフである。エフェクター細胞（ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩおよびＮＫ－９２ＭＩ）を、ウェルあたり１×１０^{4}個のＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１またはＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ２標的細胞とともに、９６ウェルの光学底マイクロプレート中で６時間、共培養した。Ｄ－ルシフェリンとともに５分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーによって発光シグナルを測定して、ＮＫ細胞の細胞傷害性を計算した。データは３回の独立した実験からの平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図８－２】同上。

【図９】図９Ａおよび９Ｂは、フローサイトメトリーおよびウェスタンブロットによるノックアウトＣＤ１４７ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＨｅｐＧ２細胞系の検証を示す。図９Ａは、

野生型（ｗｔ）ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＣＤ１４７$^{-/-}$－ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系（上）、ならびに野生型（ｗｔ）ＨｅｐＧ２およびＣＤ１４７$^{-/-}$－ＨｅｐＧ２細胞系（下）における表面ＣＤ１４７分子の染色を示す。図９Ｂは、野生型（ｗｔ）ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＣＤ１４７$^{-/-}$－ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系、ならびに野生型（ｗｔ）ＨｅｐＧ２およびＣＤ１４７$^{-/-}$－ＨｅｐＧ２細胞系におけるＣＤ１４７分子のウェスタンブロット解析を示す。ローディング対照としてＧＡＰＤＨを使用した（下）。

【図１０】図１０Ａ～１０Ｃは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－Ｔ細胞がＣＤ１４７陽性腫瘍細胞を特異的に殺滅することを示す。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性は、ＦＦＬｕｃレポートシステムアッセイによって測定した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔに感受性のある標的細胞としてＣＤ１４７陽性ＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－Ｈｅｐ－Ｇ２（図１０Ａ）およびＣＤ１４７陽性ＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１（図１０Ｂ）を使用した。各実験の対照群としてカッパ－ＣＡＲ　Ｔ細胞を使用した。図１０Ｃは、ＦＦＬｕｃレポートシステムアッセイによる、ノックアウトＣＤ１４７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系を使用したＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性の有意な低下を示す。簡単に述べると、エフェクター細胞（ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞）を、標的細胞ＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１またはＣＤ１４７ノックアウトＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１（1×10^{4}）とともに、９６ウェルの光学底マイクロプレート中で６時間、共培養した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性は、マイクロプレートリーダーによる発光シグナルの読み取りによって測定した。データは３回の独立した実験からの平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図１１】図１１Ａ～１１Ｄは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ－９２ＭＩ細胞が異種移植マウスモデルにおけるＨＣＣの進行を制御することを示す。図１１ＡはＨＣＣ異種移植モデルの実験設計のダイアグラムである。簡単に述べると、ＮＳＧマウスに、等体積のＭａｔｒｉｇｅｌと予備混合した4×10^{6}個のＳＫ－Ｈｅｐ１細胞を皮下注射した（０日目）。マウスを腫瘍負荷についてモニターし（ほぼ５０mm^{2}に到達）、４日目にランダムにグループ分けした。５日目（Ｄ５）に、マウスに１用量の1×10^{7}個のエフェクターＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ（群＃１）細胞を2×10^{4}ＩＵのＩＬ－２とともに注射（ｉ．ｖ．）した。対照群にはビヒクル（ＰＢＳ）対照のみを注射した（群＃２）。７、９、および１６日目に、各群に同一の処置を投与した。図１１Ｂは、それぞれＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＴおよびＰＢＳ（ビヒクル対照群）で処置したＳＫ－Ｈｅｐ１異種移植片の腫瘍負荷の定量を示す。全ての結果は平均±ＳＥＭである。各群についての差異は二元配置ＡＮＯＶＡ解析によって解析した。図１１Ｃは、示した時点で評価した各群の定量的体重である。図１１Ｄは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞およびＰＢＳ（ビヒクル対照群）での処置後の担腫瘍マウスのＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ生存曲線を示す。ｐ値はログ－ランク（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定によって解析した。

【図１２】図１２Ａ～１２Ｄは、マウス異種移植モデルにおけるＨＣＣに対するＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２－ＭＩ細胞の抗腫瘍効力を示す。図１２Ａは、ＨＣＣ異種移植モデルにおける初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫの抗腫瘍効力についての実験設計のダイアグラムである。５日間の腫瘍の埋め込みの後（５日目）、マウスに１用量の1×10^{7}個のエフェクター初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞を2×10^{4}ＩＵのＩＬ－２とともに注射（ｉ．ｖ．）した。対照群には同数の形質導入していない初代ＮＫ細胞を2×10^{4}ＩＵのＩＬ－２（群＃２）またはＰＢＳのみ（群＃３）とともに注射した。５、７、９、１６、および１８日目に、示したように各群において同一の処置を投与した。図１２Ｂは、それぞれ初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ、形質導入していない初代ＮＫ、およびＰＢＳ（ビヒクル対照群）で処置したＨＣＣ異種移植マウスの定量的腫瘍負荷を示す。全ての結果は平均±ＳＥＭである。各群についての差異は二元配置ＡＮＯＶＡ解析によって解析した。図１２Ｃは、示した時点で評価した各群の定量的体重を示す。図１２Ｄは、初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ、親初代ＮＫ群、およびＰＢＳ（ビヒクル対照群）での処置後の担腫瘍マウスのＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ生存曲線である。ログ－ランク（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定によるｐ値解析。各群についての差異は二元配置ＡＮＯＶＡ解析によって解析

した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１は、ＣＤ１４７－ＣＡＲ改変細胞で処置した群の対照群との比較におけるものとして示している。
【図１３】図１３は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＨＣＣ細胞系の殺滅における照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩと非照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の間の同程度の抗ＨＣＣ腫瘍活性を示す。照射および非照射のＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの細胞傷害性は、標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩに感受性のある標的細胞としてＣＤ１４７陽性野生型ＨｅｐＧ２腫瘍細胞（実験群、左パネル）またはＣＤ１４７ノックアウト（ＣＤ１４７ＫＯ、右パネル）ＨｅｐＧ２腫瘍細胞系を使用した。エフェクター細胞対照群として照射および非照射の野生型ＮＫ－９２ＭＩ細胞を使用した。データは３回の独立した実験の代表である。全てのデータは平均±ＳＥＭとして提示している。
【図１４】図１４Ａ～１４Ｄは、異種移植マウスモデルにおけるＨＣＣの進行の制御における照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩと非照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の間の同程度の抗ＨＣＣ腫瘍活性を示す。図１４ＡはＨＣＣ異種移植モデルの実験設計のダイアグラムである。ＮＳＧマウスに、等体積のＭａｔｒｉｇｅｌと予備混合した２×１０^{6}個のＳＫ－Ｈｅｐ１細胞を注射した（ｓ．ｃ．）（０日目）。処置の１日前（４日目）に腫瘍負荷を決定し（ほぼ５０ｍｍ^{2}に到達）、マウスをランダムにグループ分けした。５日目（Ｄ５）に、マウスに１用量の１×１０^{7}個のエフェクター非照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ（群＃１）細胞を２×１０^{4}ＩＵのＩＬ－２とともに注射した（ｉ．ｖ．）。対照群にはＰＢＳ中の同数の照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩを２×１０^{4}ＩＵのＩＬ－２とともに（群＃２）またはビヒクル対照のみ（群＃３）を注射した。７、９、１６、および１８日目に、各群に同一の処置を投与した。図１４Ｂは、それぞれＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩおよびＰＢＳ（ビヒクル対照群）で処置したＳＫ－Ｈｅｐ１異種移植片の腫瘍負荷の定量を示す。全ての結果は平均±ＳＥＭである。各群についての差異は二元配置ＡＮＯＶＡ解析によって解析した。図１４Ｃは、示した時点で評価した各群の定量的体重のグラフである。図１４Ｄは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞およびＰＢＳ（ビヒクル対照群）での処置後の担腫瘍マウスのＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ生存曲線を示す。ｐ値はログ－ランク（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定によって解析した。データは２回の独立した実験の代表である。全てのデータは平均±ＳＥＭとして提示している。
【図１５】図１５Ａ～１５Ｄは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞が異種移植マウスモデルにおいてＨＣＣの進行を制御することを示す。図１５ＡはＨＣＣ異種移植モデルの実験設計のダイアグラムである。簡単に述べると、ＮＳＧマウスに、等体積のＭａｔｒｉｇｅｌと予備混合した４×１０^{6}個のＳＫ－Ｈｅｐ１細胞を皮下注射した（－７日目）。０日目（１日目の前日）に腫瘍負荷を決定し（約５０ｍｍ^{2}）、マウスをランダムにグループ分けした。１日目（Ｄ１）に、マウスに１用量の１×１０^{7}個のエフェクターＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ（群＃１）細胞を２×１０４ＩＵのＩＬ－２とともに注射（ｉ．ｖ．）した。対照群にはＰＢＳ中の同数のＮＫ－９２ＭＩを２×１０^{4}ＩＵのＩＬ－２とともに（群＃２）またはビヒクル対照のみ（群＃３）を注射した。３日目および５日目に、各群において同一の処置を投与した。図１５Ｂは、それぞれＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ、親ＮＫ－９２ＭＩ細胞（対照群）、およびＰＢＳ（ビヒクル対照群）で処置したＳＫ－Ｈｅｐ１異種移植片の腫瘍負荷の定量を示す。全ての結果は平均±ＳＥＭである。各群についての差異は二元配置ＡＮＯＶＡ解析によって解析した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１は、ＣＤ１４７－ＣＡＲ処置群のＮＫ－９２ＭＩ処置群との比較におけるものとして示している。＋ｐ＜０．０５、＋＋ｐ＜０．０１、および＋＋＋ｐ＜０．００１は、ＣＤ１４７－ＣＡＲ処置群のビヒクル対照処置群との比較におけるものとして示している。図１５Ｃは、示した時点で評価した各群の定量的体重を示し、図１５Ｄは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞、親ＮＫ－９２ＭＩ群、およびＰＢＳ（ビヒクル対照群）での処置後の担腫瘍マウスのＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ生存曲線を示す。ｐ値はログ－ランク（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定によ

って解析した。
【図１６】図１６Ａ～１６Ｄは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞がＰＤＸマウスモデルにおいてＨＣＣの進行を制御することを示す。図１６Ａは、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙによって生成された肝ＰＤＸモデルにおけるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの抗腫瘍効力の実験設計のダイアグラムである。患者由来の異種移植肝がんマウスは、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから購入した。４週間の腫瘍の埋め込みの後（１日目）、腫瘍負荷を決定し（約５０mm^2）、マウスをランダムにグループ分けした。次いで示したマウスに１用量の５×１０６個のエフェクターＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞を２×10^4ＩＵのＩＬ－２とともに注射（ｉ．ｖ．）した。対照群にはＰＢＳ中の同数のＮＫ－９２ＭＩ細胞を２×10^4ＩＵのＩＬ－２とともに（群＃２）またはＰＢＳのみ（群＃３）を注射した。６、８、１１、１５、１８、２２、および２６日目に、示したように各群において同一の処置を投与した。図１６Ｂは、それぞれＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞、親ＮＫ－９２ＭＩ細胞（対照群）、およびＰＢＳ（ビヒクル対照群）で処置したＰＤＸマウスの定量的腫瘍負荷である。全ての結果は平均±ＳＥＭである。各群についての差異は二元配置ＡＮＯＶＡ解析によって解析した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１は、ＣＤ１４７－ＣＡＲ処置群のＮＫ－９２ＭＩ処置群との比較におけるものとして示している。＋ｐ＜０．０５、＋＋ｐ＜０．０１、および＋＋＋ｐ＜０．００１は、ＣＤ１４７－ＣＡＲ処置群のビヒクル対照処置群との比較におけるものとして示している。図１６Ｃは、示した時点で評価した各群の定量的体重を示す。図１６Ｄは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞、親ＮＫ－９２ＭＩ群、およびＰＢＳ（ビヒクル対照群）での処置後の担腫瘍マウスのＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ生存曲線である。ログ－ランク（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定によるｐ値解析。
【図１７】図１７Ａ～１７Ｄは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞によるＣＤ１４７陽性ＨＣＣ細胞の殺滅を示す。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞によるＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＨｅｐＧ２の特異的殺滅のＦＦＬｕｃレポーターシステムアッセイ（図１７Ａ）。対照群は、ＣＤ１４７陽性ＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＨｅｐＧ２とともにインキュベートする野生型カッパ－ＣＡＲ－Ｔ細胞を使用した。図１７Ｂは、ＦＦＬｕｃレポートシステムアッセイによる、ノックアウトＣＤ１４７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ１を使用したＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性の低下を示す。図１７Ｃは、標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定したＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性を示す。図１７Ｄは、標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイによる、ノックアウトＣＤ１４７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ１を使用したＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性の有意な低下を示す。
【図１８－１】図１８Ａおよび１８Ｂは、ＣＤ１４７　ＣＡＲ－Ｔまたは－ＮＫ細胞によるＣＤ１０７ａの脱顆粒を示す。図１８Ａは、培地（対照）、ＳＫ－Ｎ－ＳＨ腫瘍細胞での１０時間後のＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞におけるＣＤ１０７ａの脱顆粒を示す代表的なフローサイトメトリーデータを示す。表面ＣＤ１０７ａ発現を定量するため、細胞をＣＤ５６陽性サブセットについてゲーティングした。図１８Ｂは、示したように、様々な刺激におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞上の表面ＣＤ１０７ａ発現のパーセンテージの定量データを示す。データは少なくとも３回または４回の実験からプールした。
【図１８－２】同上。
【図１９】図１９は、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおけるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞のＤａｏＹ細胞に対する細胞傷害性を示す。
【図２０】図２０は、元のｓｃＦｖ配列（配列番号３）およびコンセンサス配列（配列番号１３）と比較した、最適化されたＣＤ１４７ｓｃＦｖ核酸配列（配列番号１）を示すアラインメントである。
【図２１－１】図２１Ａ～２１Ｅは、患者由来の初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞がｉｎ ｖｉｔｒｏでＣＤ１４７陽性腫瘍細胞を特異的に殺滅することを示す。図２１Ａは、様々なステージのＨＣＣ患者からの肝の試料の代表的なＨ＆Ｅ（上）およびＩＨＣ（下）

染色である。図２１Ｃは、肝がん組織の様々な区域からのＨＣＣ試料取得の実験設計のダイアグラムである。簡単に述べると、目的の３つの領域（腫瘍ゾーン、隣接ゾーン、および非腫瘍ゾーン）が得られた。これらのゾーンから初代ＮＫ細胞を単離した（図２１Ｂに示す）。図２１Ｄは、肝組織の様々なゾーンからのＣＤ１４７－ＣＡＲ陽性初代ＮＫ細胞のフローサイトメトリー解析である。図２１Ｅは、４時間の標準的な^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定した初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞の細胞傷害性を示す。

【図２１－２】同上。

【図２１－３】同上。

【図２２－１】図２２Ａおよび２２Ｂは、様々な型の細胞におけるＣＤ１４７発現の代表的なフローサイトメトリー解析（図２２Ａ）および様々なＣＤ１４７発現レベルを有する標的細胞に対する標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定したＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩの細胞傷害性（図２２Ｂ）である。データは２回の独立した実験の代表である。全てのデータは平均±ＳＥＭとして提示している。

【図２２－２】同上。

【図２３－１】図２３Ａ～２３Ｈは、ＳｙｎＮｏｔｃｈ　ＧＰＣ３誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲ　Ｔ細胞がＧＰＣ３＋ＣＤ１４７＋ＨｅｐＧ２細胞を選択的に標的とするが、ＧＰＣ３＋ＣＤ１４７－またはＧＰＣ３－ＣＤ１４７＋ＨｅｐＧ２細胞を標的としないことを示している。図２３Ａは、ＳＦＧレトロウイルスベクター中のＧＰＣ３－Ｇａｌ４ＶＰ６４－ｓｙｎＮｏｔｃｈ受容体およびｐＨＲレンチウイルスベクターに基づくＣＤ１４７－ＣＡＲの概略設計である。ＳＦＧレトロウイルスベクターはｅＧＦＰを含有し、これはＧＰＣ３－Ｇａｌ４ＶＰ６４－ｓｙｎＮｏｔｃｈ陽性細胞を選択するためのマーカーとして使用することができる。ｐＨＲ構築物は、ＣＤ１４７特異的一本鎖抗体断片（クローン、５Ｆ６）、ヒトＩｇＧ１　ＣＨ２ＣＨ３ヒンジ領域、およびＣＤ２８膜貫通領域、それに続く共刺激ＣＤ２８、４－１ＢＢの細胞内ドメイン、およびＣＤ３ζの細胞内ドメインを含んでいた。ｐＨＲレンチウイルスベクターはｍＣｈｅｒｒｙを含有し、これはＣＤ１４７－ＣＡＲ陽性細胞を選択するためのマーカーとして使用することができる。図２３Ｂは、両方の抗原が共発現された場合には誘導された細胞傷害性を示すが、バイスタンダーまたは健康な細胞の上で個別に発現された場合には細胞傷害性を示さない、「論理ゲート（Logic-gated）」ＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈおよびＣＤ１４７－ＣＡＲの概略設計である。図２３Ｃおよび２３Ｄは、ＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙベクターで共形質導入したＴ細胞の概略実験設計（図２３Ｃ）ならびにＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙの発現の代表的なフローサイトメトリー解析（図２３Ｄ）である。図２３Ｅは、Ｔ細胞に共形質導入し、ＧＰＣ３^{high}ＣＤ１４７^{low}ＨｅｐＧ２細胞系によりプライミングし、続いてｍＣｈｅｒｒｙ陽性のみ、ＧＦＰ陽性のみ、ＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙの二重陽性、ならびにＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙの二重陰性のサブセットを含む形質導入されたＴ細胞の様々なサブセットの中でＣＤ１４７－ＣＡＲ発現解析したＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙベクターの概略実験設計である。図２３Ｆは、形質導入されたＴ細胞の様々なサブセットの表面におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ発現の代表的なフローサイトメトリー解析を示す。平均蛍光強度（ＭＦＩ）とＣＤ１４７－ＣＡＲのパーセンテージの両方を各代表的なフローサイトメトリーチャートに表示している。図２３Ｇは、ＨｅｐＧ２腫瘍細胞系におけるＣＤ１４７およびＧＰＣ３の発現の代表的なフローサイトメトリー解析である。図２３Ｈは、様々なＨｅｐＧ２腫瘍細胞系による２時間の「プライミングおよび誘発」プロトコールの後の形質導入されたＴ細胞の様々なサブセットにおける表面ＣＤ１０７ａ発現の定量的解析を示す。データは２回の独立した実験の代表である。

【図２３－２】同上。

【図２３－３】同上。

【図２４】図２４は、ガンマセクレターゼ阻害剤（ＭＫ－０７５２、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達阻害剤）が、ＧＰＣ３－ＳｙｎＮｏｔｃｈ－ｅＧＦＰ＋およびＣＤ１４７－ＣＡＲ－

ｍＣｈｅｒｒｙ＋初代Ｔ細胞サブセットにおいてＧＰＣ３－ＳｙｎＮｏｔｃｈ誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲ発現を特異的に遮断するが、他の初代Ｔ細胞のサブセットでは遮断しないことを示す。初代Ｔ細胞の様々なサブセットの中のＣＤ１４７－ＣＡＲ発現の代表的なフローサイトメトリー解析（中間）。形質導入されたＴ細胞は、それぞれＤＭＳＯ（０．３％、対照）、ＭＫ－０７５２（１０μＭ）、ＴＡＰＩ－１（１０μＭ）、ＧＩ２５４０２３Ｘ（１０μＭ）、およびＭＫ－０７５２＋ＴＡＰＩ－１＋ＧＩ２５４０２３Ｘの組合せで処置した。一方、これらの細胞をＣＤ１４７ＫＯ　ＧＰＣ３ｈｉｇｈ　ＨｅｐＧ２細胞の存在下でプライミングした。形質導入されたＴ細胞の様々なサブセットの表面におけるＣＤ１４７－ＣＡＲの発現は、フローサイトメトリーによって解析した。平均蛍光強度（ＭＦＩ）とＣＤ１４７－ＣＡＲのパーセンテージの両方を各代表的なフローサイトメトリーチャートに表示している。データは２回の独立した実験の代表である。全てのデータは平均±ＳＥＭとして提示している。

【図２５－１】図２５Ａ～２５Ｈは、ＳｙｎＮｏｔｃｈ　ＣＤ１４７誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲ　Ｔ細胞がＧＰＣ３＋ＣＤ１４７＋ＨｅｐＧ２細胞を選択的に標的とするが、ＧＰＣ３＋ＣＤ１４７－またはＧＰＣ３－ＣＤ１４７＋のＨｅｐＧ２細胞を標的としないことを示す。図２５Ａは、ＳＦＧレトロウイルスベクター中のＭｙｃ－ＣＤ１４７－Ｇａｌ４ＶＰ６４－ＳｙｎＮｏｔｃｈ受容体、およびｐＨＲレンチウイルスベクターに基づくＧＰＣ３－ＣＡＲの概略設計である。ＳＦＧレトロウイルスベクターはＭｙｃタグを含有し、これはＣＤ１４７－Ｇａｌ４ＶＰ６４－ＳｙｎＮｏｔｃｈ陽性細胞を選択するためのマーカーとして使用することができる。ｐＨＲ構築物は、ＧＰＣ３特異的一本鎖抗体断片（ｓｃＦｖ、クローン５Ｆ６、ｍＩｇＧ１）、ヒトＩｇＧ１　ＣＨ２ＣＨ３ヒンジ領域、およびＣＤ２８膜貫通領域、これに続く共刺激ＣＤ２８、４－１ＢＢの細胞内ドメインおよびＣＤ３ζの細胞内ドメインからなっていた。ｐＨＲレンチウイルスベクターはｍＣｈｅｒｒｙを含有し、これはＧＰＣ３－ＣＡＲ陽性細胞を含む細胞を選択するためのマーカーとして使用することができる。図２５Ｂは、両方の抗原が共発現された場合には誘導された細胞傷害性を示すが、バイスタンダーまたは健康な細胞の上で個別に発現された場合には活性化されない、「論理ゲート」ＣＤ１４７－ＳｙｎＮｏｔｃｈおよびＧＰＣ３－ＣＡＲの概略設計である。図２５Ｃおよび２５Ｄは、Ｍｙｃ－ＣＤ１４７－ＳｙｎＮｏｔｃｈおよびＧＰＣ３－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙベクターで共形質導入したＴ細胞の概略実験設計（図２５Ｃ）ならびにＭｙｃ－ＣＤ１４７－ＳｙｎＮｏｔｃｈおよびＧＰＣ３－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙ発現の代表的なフローサイトメトリー解析（図２５Ｄ）である。図２５Ｅは、Ｔ細胞に共形質導入し、ＧＰＣ３^{high}ＣＤ１４７^{low}ＨｅｐＧ２細胞系によりプライミングし、続いてｍＣｈｅｒｒｙ陽性のみ、ＧＦＰ陽性のみ、ＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙの二重陽性、ならびにＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙの二重陰性のサブセットを含む形質導入されたＴ細胞の様々なサブセットの中でＧＰＣ３－ＣＡＲ発現解析したＭｙｃ－ＣＤ１４７－ＳｙｎＮｏｔｃｈおよびＧＰＣ３－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙベクターの概略実験設計である。図２５Ｆは、形質導入されたＴ細胞の様々なサブセットの表面におけるＧＰＣ３－ＣＡＲ発現の代表的なフローサイトメトリー解析である。平均蛍光強度（ＭＦＩ）とＧＰＣ３－ＣＡＲのパーセンテージの両方を各代表的なフローサイトメトリーチャートに表示している。図２５Ｇは、様々なＨｅｐＧ２腫瘍細胞系による「プライミングおよび誘発」プロトコールの後の形質導入されたＴ細胞の様々なサブセットにおける表面ＣＤ１０７ａ発現の代表的なフローサイトメトリー解析である。図２５Ｈは、様々なＨｅｐＧ２腫瘍細胞系による「プライミングおよび誘発」プロトコールの後の形質導入されたＴ細胞の様々なサブセットにおける表面ＣＤ１０７ａ発現の定量的解析を示す。ＣＤ１０７ａのＭＦＩの倍数変化は以下のように計算した。［（ＭＦＩ試料－ＭＦＩプライミングのみ）／ＭＦＩプライミングのみ］。データは２回の独立した実験の代表である。全てのデータは平均±ＳＥＭとして提示している。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図２５－２】同上。

【図２５－３】同上。

【図２６】図２６Ａ～２６Ｄは、ＳｙｎＮｏｔｃｈ　ＧＰＣ３誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲＴ細胞がＧＰＣ３^{high}ＣＤ１４７^{high}ＨｅｐＧ２細胞を選択的に殺滅するが、ＣＤ１４７^{knockout}ＧＰＣ３^{high}ＨｅｐＧ２細胞を殺滅しないことを示す。図２６Ａおよび２６Ｂは、ＣＤ３、ＣＤ５６、ＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰ、およびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙ発現の代表的なフローサイトメトリー解析である。初代ＰＢＭＣにＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙレンチウイルスを形質導入した。これらのｍＣｈｅｒｒｙ陽性Ｔ細胞を、フローサイトメトリーを使用してソートし、続いてＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰレトロウイルスを二次形質導入した。ＣＤ３およびＣＤ５６の代表的なフローサイトメトリー解析（図２６Ａ）ならびにＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙの発現（図２６Ｂ）をそれぞれ表示する。図２６Ｃは、７時間のＦＦｌｕｃレポーターアッセイによって測定したＨｅｐＧ２－ＣＤ１４７^{high}－ＧＰＣ３^{high}およびＨｅｐＧ２－ＣＤ１４７^{knockout}－ＧＰＣ３^{high}に対する初代ＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰ－ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙ　Ｔ細胞の細胞傷害性のグラフである。図２６Ｄは、７時間のＣｒ－５１放出アッセイによって測定したＨｅｐＧ２－ＣＤ１４７^{high}－ＧＰＣ３^{high}およびＨｅｐＧ２－ＣＤ１４７^{knockout}－ＧＰＣ３^{high}に対する初代ＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰ－ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙ　Ｔ細胞の細胞傷害性を示すグラフである。データは２回の独立した実験の代表である。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

配列表

本明細書または添付した配列表に列挙した任意の核酸およびアミノ酸の配列は、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．８２２に定義されたヌクレオチド塩基およびアミノ酸の標準的な略号を使用して示している。少なくとも一部の例では、各核酸配列の１つの鎖のみが示されているが、表示された鎖への任意の参照によって相補的な鎖が含まれていると理解される。

配列番号１は改変されたＣＤ１４７ｓｃＦｖをコードする核酸配列である。ヌクレオチド３４９～４０９はリンカー配列である。

配列番号２は改変されたＣＤ１４７ｓｃＦｖのアミノ酸配列である。

配列番号３は出発ＣＤ１４７ｓｃＦｖをコードする核酸配列である。

配列番号４はＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸配列である。シグナルペプチド：ヌクレオチド１～５７；ＶＨドメイン：ヌクレオチド５８～４１１；リンカー配列：ヌクレオチド４１２～４６８；ＶＬドメイン：ヌクレオチド４６９～７９２；ＣＤ２８　ＴＭドメイン－４１ＢＢ細胞内ドメイン－ＣＤ３ζドメイン：ヌクレオチド７９３～２２０２。

配列番号５はＣＤ１４７－ＣＡＲのアミノ酸配列である。シグナルペプチド：アミノ酸１～１９；ＶＨドメイン：アミノ酸２０～１３７；リンカー配列：アミノ酸１３８～１５６；ＶＬドメイン：アミノ酸１５７～２６４；ＣＤ２８　ＴＭドメイン－４１ＢＢ細胞内ドメイン－ＣＤ３ζドメイン：アミノ酸２６９～７３４。

配列番号６は誘導性カスパーゼ９を含むＣＤ１４－ＣＡＲをコードする核酸配列である。ｉカスパーゼ９配列はヌクレオチド３５５～１２００である。

配列番号７はＣＤ１４７－ｉカスパーゼ９－ＣＡＲのアミノ酸配列である。アミノ酸１１９～４００はｉカスパーゼ９である。

配列番号８は抗ＣＤ１４７　ＶＨ　ＣＤＲドメインのアミノ酸配列である。

配列番号９は抗ＣＤ１４７　ＶＬ　ＣＤＲドメインのアミノ酸配列である。

配列番号１０および１１はＣＤ１４７ノックアウト細胞系を生成するために使用されるＣＤ１４７を標的とするガイドＲＮＡである。

配列番号１２は例示的なＩＬ－１５受容体細胞内ドメインである。

配列番号１３は元のｓｃＦｖ配列（配列番号３）と比較して最適化されたＣＤ１４７ｓｃＦｖ核酸配列（配列番号１）のコンセンサス核酸配列である。

配列番号１４はＧａｌ４ＵＡＳ　ＣＤ１４７－ＣＡＲ構築物の核酸配列である。

配列番号１５はｐＨＲ＿Ｇａｌ４ＵＡＳ－ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｐＧＫ＿ｍＣｈｅｒｒ

ｙベクターの核酸配列である。
配列番号１６はＧＰＣ３－ＣＡＲの核酸配列である。
配列番号１７はＧＡＬ４－ＶＰ６４アクチベーターをコードする核酸である。
配列番号１８～３５はプラスミドの構築に使用されるプライマーの核酸配列である。
【００１９】
詳細な説明
新規なＣＤ１４７標的化ＣＡＲを発現する免疫細胞（Ｔ細胞およびＮＫ細胞を含む）が本明細書で開示される。ＣＤ１４７抗原の生物学的特性により、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞およびＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞がｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏで肝細胞癌に対する強力な抗腫瘍活性を産生することが可能になる。さらに、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞はｉｎ ｖｉｔｒｏでヒト神経芽腫細胞を殺滅することもできる。
【００２０】
ＣＤ１４７は様々な発現レベルでいくつかの臓器でも発現されるので、ＣＤ１４７－ＣＡＲ改変免疫細胞は「オンターゲット、オフ腫瘍」毒性を示す可能性がある。「自殺遺伝子」（誘導性カスパーゼ９など）ならびにＣＤ１４７およびＧＰＣ３などの２つの抗原の結合に際してのみ活性化されるＣＡＲ発現細胞のような組合せ処置を含む、この毒性の可能性に対処するための構築物および方法が本明細書で開示される。
【００２１】
Ｉ．用語
他に注記しない限り、技術用語は従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般的な用語の定義は、Lewin's Genes X, ed. Krebs et al., Jones and Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 0763766321)、Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829)、Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341)、およびGeorge P. Redei, Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics, 3rd Edition, Springer, 2008 (ISBN: 1402067534)、ならびに他の同様の参照文献に見出され得る。
【００２２】
他に説明しない限り、本明細書で使用する全ての技術および科学用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈によって他が明確に示されない限り、複数の参照を含む。「ＡまたはＢを含む」は、Ａ、またはＢ、またはＡおよびＢを含むことを意味する。核酸またはポリペプチドについて与えられる全ての塩基のサイズまたはアミノ酸のサイズ、および全ての分子量または分子質量値は近似値であり、説明のために提供されることがさらに理解されるべきである。
【００２３】
本明細書に記載したものと同様または等価の方法および材料は本開示の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料が以下に記載されている。本明細書で述べる全ての出版物、特許出願、特許、および他の参考文献は参照によりその全体が組み込まれ、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号も同様である。矛盾する場合には、本明細書が用語の説明を含めて優先する。さらに、材料、方法、および実施例は説明のみであって限定することを意図していない。
【００２４】
本開示の種々の実施形態の概要を容易にするために、特定の用語について以下の説明が提供される。
【００２５】
抗体：抗原のエピトープを認識し、これに結合する（例えば特異的に認識し、特異的に結合する）少なくとも１つの可変領域を含むポリペプチドリガンド。哺乳動物の免疫グロ

ブリン分子は重（Ｈ）鎖および軽（Ｌ）鎖から構成されており、そのそれぞれが、それぞれ可変重（V_H）領域および可変軽（V_L）領域と称される可変領域を有する。V_H領域およびV_L領域は一緒に、抗体によって認識される抗原の結合に関与している。哺乳動物の免疫グロブリンには５つの主な重鎖クラス（またはアイソタイプ）があり、これらが抗体分子：ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、およびＩｇＥの機能活性を決定する。

【００２６】

抗体可変領域は、「フレームワーク」領域および「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」として公知の超可変領域を含有する。ＣＤＲは抗原のエピトープへの結合に主に関与している。抗体のフレームワーク領域はＣＤＲを三次元空間において位置決めし、整列させるために働く。所与のＣＤＲのアミノ酸配列の境界は、Ｋａｂａｔら（Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991;「Ｋａｂａｔ」番号付けスキーム）、Ｃｈｏｔｈｉａら（Chothia and Lesk, J Mol Biol 196:901-917, 1987、Chothia et al., Nature 342:877, 1989、およびAl-Lazikani et al., (JMB 273, 927-948, 1997; 「Ｃｈｏｔｈｉａ」番号付けスキームを参照）、およびＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ（ＩＭＧＴ）データベース（Lefranc, Nucleic Acids Res 29:207-9, 2001、「ＩＭＧＴ」番号付けスキームを参照）によって記載されたものを含む周知のいくつかの番号付けスキームのいずれかを使用して容易に決定することができる。ＫａｂａｔおよびＩＭＧＴのデータベースはオンラインで維持されている。

【００２７】

一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）は、遺伝子的に融合した一本鎖分子として好適なポリペプチドリンカーによって連結された１つまたは複数の抗体のV_HおよびV_Lドメインを含有する遺伝子操作された分子である（例えばBird et al., Science, 242:423-426, 1988、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85:5879-5883, 1988、Ahmad et al., Clin. Dev. Immunol., 2012, doi:10.1155/2012/980250、Marbry, IDrugs, 13:543-549, 2010を参照）。ｓｃＦｖにおけるV_HドメインおよびV_Lドメインの分子内配向は典型的にはｓｃＦｖについて決定的ではない。したがって、両方の可能な配置（V_Hドメイン－リンカードメイン－V_Lドメイン、V_Lドメイン－リンカードメイン－V_Hドメイン）を有するｓｃＦｖを使用することができる。ｄｓＦｖでは、V_HおよびV_Lはジスルフィド結合を導入して鎖の会合を安定化するように変異している。ダイアボディも含まれ、これはV_HおよびV_Lドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現しているが、同じ鎖における２つのドメインの間で対形成することを可能にするには短すぎるリンカーを使用していて、それによりドメインを別の鎖の相補的ドメインと対形成させ、２つの抗原結合部位を作出する、二価で二重特異性の抗体である（例えばHolliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90:6444-6448, 1993、Poljak et al., Structure, 2:1121-1123, 1994を参照）。

【００２８】

抗体には、キメラ抗体（例えばヒト化マウス抗体）およびヘテロコンジュゲート抗体（例えば二重特異性抗体）などの遺伝子操作された形態も含まれる。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

【００２９】

がん：異常なまたは制御されない細胞成長によって特徴付けられる悪性腫瘍。がんと関連することが多い他の特色には、転移、近隣細胞の正常な機能への干渉、サイトカインまたは他の分泌産物の異常なレベルでの放出および炎症性または免疫学的な応答の抑制または悪化、リンパ節などの周囲または遠位の組織または臓器の侵襲などが含まれる。「転移性疾患」は、元の腫瘍部位を離れ、例えば血流またはリンパ系を介して身体の他の部分に移動したがん細胞を指す。

【００３０】

ＣＤ１４７：ベイシジン（ＢＳＧ）としても公知の細胞外マトリックスメタロプロテイ

ナーゼ阻害剤（ＥＭＭＰＲＩＮまたはＥＭＰＲＩＮ）。正常な細胞機能および疾患において多数の機能を有する膜貫通糖タンパク質（Hahn et al., J. Leukocyte Biol. 98:33-48, 2015）。ＣＤ１４７は免疫細胞において、Ｔ細胞の活性化および増殖、ならびに細胞の遊走、付着、および侵襲のために重要である（Hahn et al., J. Leukocyte Biol. 98:33-48, 2015）。ＣＤ１４７は種々の細胞型（例えば造血、上皮、および内皮細胞）において様々なレベルで発現され（Liao et al., Mol. Cell Biol. 31:2591-2604, 2011）、ＨＣＣなどの疾患状態で有意に上方調節され得る。

【００３１】

ＣＤ１４７の配列は公的に利用可能である。例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿１９８５９０、ＮＭ＿１９８５９１、ＮＭ＿００１７２８、ＮＭ＿１９８５８９、およびＮＭ＿００１３２２２４３はヒトＣＤ１４７核酸配列を開示し、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ＿９４０９９２、ＮＰ＿９４０９９３、ＮＰ＿００１７１９、ＮＰ＿９４０９９１、およびＮＰ＿００１３０９１７２はヒトＣＤ１４７アミノ酸配列を開示している。同様に、ＮＭ＿００９７６８およびＮＭ＿００１０７７１８４はマウスＣＤ１４７核酸配列を開示し、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ＿０３３８９８およびＮＰ＿００１０７０６５２はマウスＣＤ１４７アミノ酸配列を開示している。これらの配列の全ては、２０１９年３月１５日にＧｅｎＢａｎｋに存在するように参照により組み込まれる。

【００３２】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）：抗原結合性部分（単一ドメイン抗体またはｓｃＦｖなど）およびＴ細胞受容体由来のシグナル伝達ドメイン（例えばＣＤ３ζ）などのシグナル伝達ドメインを含むキメラ分子。典型的には、ＣＡＲは抗原結合性部分、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む。細胞内ドメインは、典型的にはＣＤ３ζまたはＦｃεＲＩγなどの免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を有するシグナル伝達鎖を含む。一部の場合には、細胞内ドメインは、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、ＣＤ２７、および／またはＤＡＰ１０などの少なくとも１つのさらなる共刺激ドメインの細胞内部分も含む。

【００３３】

相補性決定領域（ＣＤＲ）：抗体の結合親和性および特異性を定義する超可変アミノ酸配列の領域。哺乳動物の免疫グロブリンの軽鎖および重鎖はそれぞれＶＬ－ＣＤＲ１、ＶＬ－ＣＤＲ２、ＶＬ－ＣＤＲ３、およびＶＨ－ＣＤＲ１、ＶＨ－ＣＤＲ２、ＶＨ－ＣＤＲ３と指定される３つのＣＤＲをそれぞれ有する。

【００３４】

グリピカン－３（ＧＰＣ３）：ＣＤ２６に結合し、その活性を阻害する細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン。ＧＰＣ３は一部の細胞型においてアポトーシスを誘導し得る。ＧＰＣ３は肝細胞癌、黒色腫、卵巣明細胞癌、卵黄嚢腫瘍、神経芽腫、肝芽腫、およびウィルムス腫瘍を含む一部の腫瘍によって発現される。

【００３５】

ＧＰＣ３の配列は公的に利用可能である。例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００１１６４６１９、ＮＭ＿００１１６４６１８、ＮＭ＿００４４８４、およびＮＭ＿００１１６４６１７は例示的なヒトＧＰＣ３核酸配列を開示し、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ＿００１１５８０９１、ＮＰ＿００１１５８０９０、ＮＰ＿００４４７５、およびＮＰ＿００１１５８０８９は例示的なヒトＧＰＣ３アミノ酸配列を開示している。同様に、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿０１６６９７は例示的なマウスＧＰＣ３核酸配列を開示し、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ＿０５７９０６は例示的なマウスＧＰＣ３アミノ酸配列を開示している。これらの配列のそれぞれは、２０２０年２月２７日にＧｅｎＢａｎｋに存在するように参照により組み込まれる。

【００３６】

単離された：核酸、タンパク質（抗体を含む）、またはオルガネラなどの「単離された」生物学的成分は、その成分が天然に存在する環境（細胞など）中の他の生物学的成分、即ち他の染色体のおよび染色体外のＤＮＡおよびＲＮＡ、タンパク質、およびオルガネラ

から実質的に分離または精製されている。「単離され」ている核酸およびタンパク質は、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質を含む。用語は、宿主細胞中で組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学合成された核酸も包含する。

【００３７】

肝がん：肝細胞癌（ＨＣＣ）は、肝の原発性悪性腫瘍の最も一般的な型であり、ウイルス性肝炎（例えばＢ型肝炎またはＣ型肝炎）、毒物への曝露、または肝硬変（アルコール依存症によって引き起こされることがある）を有する患者で起こることが多い。他の型の肝がんには、肝内胆管癌（ｉＣＣＡ）、線維層板癌、および肝芽腫が含まれる。

【００３８】

ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞：特定の抗原刺激の非存在下、ＭＨＣクラスによる制約なしに標的細胞を殺滅する免疫系の細胞。標的細胞は腫瘍細胞またはウイルスを有する細胞であり得る。ＮＫ細胞はＣＤ５６表面マーカーの存在およびＣＤ３表面マーカーの非存在によって特徴付けられる。ＮＫ細胞は典型的には正常末梢血中の単核細胞画分のほぼ１０～１５％を占める。歴史的には、ＮＫ細胞は事前の免疫や活性化なしにある特定の腫瘍細胞を溶解するそれらの能力によって最初に同定された。ＮＫ細胞は、ＭＨＣクラスＩ提示を下方調節することによってＣＴＬ応答を逃れ得るウイルスおよび腫瘍に対する「バックアップ」防御機構を提供すると考えられる。直接の細胞傷害性殺滅への関与に加えて、ＮＫ細胞はサイトカイン産生における役割も果たしており、これはがんおよび感染を制御するために重要であり得る。

【００３９】

一部の例では、「改変されたＮＫ細胞」は、異種核酸（例えば本明細書で開示する核酸またはベクターの１つまたは複数）によって形質導入もしくはトランスフェクトされた、または１つもしくは複数の異種タンパク質を発現するＮＫ細胞である。用語「改変されたＮＫ細胞」および「形質導入されたＮＫ細胞」は、本明細書の一部の例で相互交換可能に使用される。

【００４０】

精製された：用語「精製された」は完全な純粋さを必要としない。むしろ、これは相対的な用語として意図されている。したがって、例えば精製されたタンパク質または核酸の調製物は、タンパク質または核酸が、タンパク質または核酸が天然の環境（例えば細胞内）にある場合よりも富化されている調製物である。一実施形態では、調製物はタンパク質または核酸が調製物の総タンパク質または核酸の含量の少なくとも５０％を表すように精製される。実質的な精製は、他のタンパク質または細胞成分からの精製を意味する。実質的に精製されたタンパク質または核酸は、少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または９８％純粋である。したがって、１つの具体的な非限定的な例では、実質的に精製されたタンパク質または核酸は、他の成分を９０％含まない。

【００４１】

組換え：天然に存在しない配列を有するか、または他の方法で分離された配列の２つのセグメントの人工的な組合せによって作製された配列（例えば「キメラ」配列）を有する、核酸またはタンパク質。この人工的な組合せは、化学合成によって、または核酸の単離されたセグメントの人工的な操作によって、例えば遺伝子操作技法によって、達成することができる。

【００４２】

対象：生きている多細胞脊椎動物、ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含めたヒト対象および獣医学的対象の両方を含むカテゴリー。

【００４３】

Ｔ細胞：免疫応答の重要なメディエーターである白血球（リンパ球）。Ｔ細胞にはＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞が含まれるが、これらに限定されない。ＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球は、「分化抗原群４」（ＣＤ４）として公知のマーカーをその表面に有する免疫細胞である。これらの細胞はヘルパーＴ細胞としても公知であり、抗体応答ならびにキラーＴ細

胞の応答を含む免疫応答を組織化することを助ける。ＣＤ８＋Ｔ細胞は「分化抗原群８」（ＣＤ８）マーカーを有する。一実施形態では、ＣＤ８＋Ｔ細胞は細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）である。別の実施形態では、ＣＤ８＋細胞はサプレッサーＴ細胞である。

【００４４】

活性化されたＴ細胞は、細胞増殖の増加および／または１つもしくは複数のサイトカイン（ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＦＮγ、またはＴＮＦαなど）の発現もしくは分泌によって検出することができる。ＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化は、抗原への応答における細胞溶解活性の増加によっても検出することができる。

【００４５】

一部の例では、「改変されたＴ細胞」は、異種核酸（例えば本明細書で開示する核酸またはベクターの１つまたは複数）を形質導入もしくはトランスフェクトされた、または１つもしくは複数の異種タンパク質を発現するＴ細胞である。用語「改変されたＴ細胞」および「形質導入されたＴ細胞」は、本明細書の一部の例で相互交換可能に使用される。

【００４６】

形質導入されたまたは形質転換された：形質転換された細胞は、その中に核酸分子が分子生物学的技法によって導入された細胞である。本明細書で使用される場合、用語「形質導入」および「形質転換」は、それによって核酸分子がそのような細胞に導入され得る、ウイルスベクターによるトランスフェクション、プラスミドベクターの使用、ならびに電気穿孔、リポフェクション、およびパーティクルガン加速によるＤＮＡの導入を含む全ての技法を包含する。

【００４７】

疾患を処置するまたは改善する：「処置する」は、疾患または病態が発症し始めた後、その兆候または症状を低減または阻害する治療介入、例えば腫瘍サイズまたは腫瘍負荷の低減を指す。「改善する」は、がんなどの疾患の兆候または症状の数または重症度の低減を指す。

【００４８】

ベクター：宿主細胞に（例えばトランスフェクションまたは形質導入によって）導入することができ、それにより形質転換された宿主細胞を産生する核酸分子。組換えＤＮＡベクターは、組換えＤＮＡを有するベクターである。ベクターは、宿主細胞中で複製することを可能にする核酸配列、例えば複製の起点を含み得る。ベクターは、１つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子および当技術分野で公知の他の遺伝子エレメントも含み得る。ウイルスベクターは、１つまたは複数のウイルスに由来する少なくともいくつかの核酸配列を有する組換え核酸ベクターである。複製欠如ウイルスベクターは、少なくとも１つの複製に必須の遺伝子機能の欠如により、複製に必要なウイルスゲノムの１つまたは複数の領域の補完を必要とするベクターである。

【００４９】

ＩＩ．いくつかの実施形態の概要

改変されたＣＤ１４７ｓｃＦｖを含むＣＤ１４７特異的結合剤が本明細書で開示される。ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、ならびに共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内ドメインに融合されたＣＤ１４７特異的結合剤をコードするキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）も開示される。一部の例では、共刺激ドメインはＣＤ２８および／または４－１ＢＢ由来であり、シグナル伝達ドメインはＣＤ３ζ由来である。ＣＤ１４７特異的結合剤およびＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸ならびに核酸を含むベクターも提供される。

【００５０】

ＣＤ１４７－ＣＡＲを発現する改変された免疫細胞（例えばＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージ）も本明細書で提供される。一部の実施形態では、改変された免疫細胞は、肝炎ウイルス（例えばＢ型肝炎またはＣ型肝炎）を標的とするＣＡＲなどの、１つまたは複数のさらなるＣＡＲを発現する。他の実施形態では、改変された免疫細胞は、誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲおよびＣＤ１４７－ＣＡＲの発現

を誘導する構築物、例えばＣＤ１４７－ＣＡＲのインデューサーの発現を推進する抗ＧＰＣ３　ＳｙｎＮｏｔｃｈ構築物を発現する。さらなる実施形態では、改変された免疫細胞は、誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲおよびＧＰＣ３－ＣＡＲの発現を誘導する構築物、例えばＧＰＣ３－ＣＡＲのインデューサーの発現を推進する抗ＣＤ１４７　ＳｙｎＮｏｔｃｈ構築物を発現する。特定の例では、ＣＤ１４７－ＣＡＲおよび／または抗ＣＤ１４７　ＳｙｎＮｏｔｃｈ構築物は、本明細書で開示する改変されたＣＤ１４７ｓｃＦｖを含む。

【００５１】

対象におけるＣＤ１４７を発現するがんを処置する方法も提供される。一部の実施形態では、方法は、ＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸を含む有効量の改変された免疫細胞（例えばＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージ）を対象に投与することを含む。他の実施形態では、方法は、誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸およびＣＤ１４７－ＣＡＲ発現のインデューサーを発現する抗ＧＰＣ３　ＳｙｎＮｏｔｃｈのための核酸を含む有効量の改変された免疫細胞（例えばＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージ）を対象に投与することを含む。さらに他の実施形態では、方法は、ＧＰＣ３－ＣＡＲをコードする核酸およびＧＰＣ３－ＣＡＲ発現のインデューサーを発現する抗ＣＤ１４７　ＳｙｎＮｏｔｃｈ構築物を含む有効量の改変された免疫細胞（例えばＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージ）を対象に投与することを含む。一部の例では、改変された免疫細胞は自己である。他の例では、免疫細胞は同種である。一部の具体的な例では、対象は肝細胞癌または神経芽腫を有する。

【００５２】

ＩＩＩ．ＣＤ１４７特異的結合剤

一部の例ではキメラ抗原受容体の標的化部分として使用されるＣＤ１４７結合剤が本明細書で開示される。一部の実施形態では、ＣＤ１４７結合剤は５Ｆ６クローン由来のＣＤ１４７特異的ｓｃＦｖをコードする改変された断片であるＣＤ１４７ｓｃＦｖである（米国特許第８，６１８，２６４号）。図２０は、出発ＣＤ１４７ｓｃＦｖ核酸配列（配列番号３）および改変されたｓｃＦｖ核酸配列（配列番号１）のアラインメントを示す。一部の例では、改変されたＣＤ１４７特異的ｓｃＦｖは高発現ＣＤ１４７細胞に結合する。

【００５３】

一部の実施形態では、ＣＤ１４７特異的結合剤は、ＣＤ１４７に特異的に結合する単一ドメイン抗体（ｓｃＦｖなど）であり、表１に提供するＣＤＲ配列を含む。一部の例では、ｓｃＦｖはＣＤ１４７に特異的に結合し、配列番号８の可変重鎖（ＶＨ）ドメイン相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３のアミノ酸配列、ならびに配列番号９の可変軽鎖（ＶＬ）ドメインＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ｓｃＦｖは表１で提供するＣＤＲアミノ酸配列を含み、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性）を有する。他の実施形態では、ｓｃＦｖは配列番号１のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【表１】

表1. CD147scFv配列におけるCDRの位置(Kabat番号付けスキームを使用して決定)

CDR	核酸配列 (　配列番号　1)	アミノ酸配列 (　配列番号　2)
VH CDR1	GGCTTCACCTTCAGCAACTAC (nt 76-96)	GFTFSNY (aa 26-32)
VH CDR2	AGACTGAAGTCCTACAACTACGCC (nt 154-177)	RLKSYNYA (aa 52-59)
VH CDR3	GATGGCAGCGAC (nt 301-312)	DGSD (aa 101-104)
VL CDR1	AAGGCCTCCCAGTCCGTGAGCAACGATGTGGCC (nt 478-510)	KASQSVSNDVA (aa 155-165)
VL CDR2	TACGCCAGCAACAGGTACACA (nt 556-576)	YASNRYT (aa 181-187)
VL CDR3	CAGCAGGACTACTCCAGCCCCTACACC (nt 673-699)	QQDYSSPYT (aa 220-228)

【００５４】

追加の例では、ｓｃＦｖは表１に提供するＣＤＲ配列を含む核酸によってコードされ、配列番号２のヌクレオチド配列と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性）を有する。他の実施形態では、ｓｃＦｖは配列番号２のヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる核酸によってコードされる。

【００５５】

上記のＣＤ１４７特異的結合剤をコードする核酸を含むベクターも提供される。一部の例では、ベクターは、配列番号１と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性）を有する核酸を含み、例えば配列番号２と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性）を有するアミノ酸配列をコードする。

【００５６】

さらなる例では、Ｇａｌ４－ＶＰ６４（例えば配列番号１７）をコードする核酸に作動可能に連結されたＣＤ１４７特異的結合剤をコードする核酸（例えば配列番号１と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する核酸）が本明細書で提供される。一部の例では、核酸はＳｙｎＮｏｔｃｈ構築物の部分である。ＣＤ１４７がこの構築物によってコードされるタンパク質に結合する場合、Ｇａｌ４－ＶＰ６４が活性化され、Ｇａｌ４応答性エレメント（例えばＧａｌ４ＵＡＳ）を有する構築物の発現を誘導することができる。抗ＣＤ１４７ｓｃＦｖ　ＳｙｎＮｏｔｃｈインデューサー構築物をコードする例示的なベクターを図２５Ａに示す。

【００５７】

ＩＶ．ＣＤ１４７キメラ抗原受容体

上のセクションＩＩＩに記載したＣＤ１４７特異的結合剤を含むＣＤ１４７－ＣＡＲが本明細書で提供される。一部の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ１４７特異的ｓｃＦｖ（例えば配列番号２）、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに少なくとも１つの共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内ドメインを含む抗原結合ドメインを含む。

【００５８】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、例えば配列番号２と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％の同一性）を有するアミノ酸配列を有するか、または配列番号２のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなるＣＤ１４７特異的ｓｃＦｖである。

【００５９】

一部の実施形態では、ヒンジドメインはＩｇＧヒンジ領域である。一例では、ヒンジドメインはＩｇＧ１ヒンジである。他のヒンジドメイン、例えば他の免疫グロブリン（例えばＩｇＧ４またはＩｇＤ）由来のヒンジ領域、またはＣＤ８、ＣＤ２８、もしくはＣＤ４０由来のヒンジ領域を使用することができる。

【００６０】

追加の実施形態では、膜貫通ドメインはＣＤ２８膜貫通ドメインである。一例では、膜貫通ドメインはＣＤ２８由来である。膜貫通ドメインは、他のＴ細胞タンパク質、例えばＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ３ζ、ＣＤ４０、ＯＸ４０Ｌ、４１ＢＢＬ、ＩＣＯＳ、ＩＣＯＳ－Ｌ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１、ＩＣＡＭ－１、ＣＤ５６、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＮＫＰ３０、ＮＫＰ４４、ＮＫＰ４０、ＮＫＰ４６、Ｂ７－Ｈ３、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－２、およびＣＤ７０由来であってもよい。

【００６１】

さらなる実施形態では、細胞内ドメインは、共刺激分子由来の１つまたは複数の細胞内領域、またはその部分を含む。例示的な共刺激分子には、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＣＤ８、ＣＤ４０、ＯＸ－４０、ＩＣＯＳ、ＣＤ２７、およびＤＡＰ１０、ＯＸ４０－Ｌ、４－１ＢＢＬ、ＩＣＯＳ－Ｌ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１、ＣＤ５６、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＮＫＰ３０、ＮＫＰ４４、ＮＫＰ４０、ＮＫＰ４６、Ｂ７－Ｈ３、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－２、およびＣＤ７０が含まれる。特定の例では、共刺激ドメインはＣＤ２８および／または４－１ＢＢ由来である。一例では、共刺激ドメインはＣＤ２８と４－１ＢＢの両方由来のドメインを含む。細胞内ドメインは、ＣＤ３ζ由来の細胞内シグナル伝達ドメインも含む。他の例では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＰＤＫ、またはＦｃεＲＩγ由来である。一例では、細胞内シグナル伝達ドメインはＣＤ３ζ由来である。

【００６２】

一部の実施形態では、ＣＤ１４７－ＣＡＲはシグナル配列も含み、これはｓｃＦｖドメインのＮ末端に位置している。一部の例では、シグナル配列はＩｇＧシグナル配列またはＧＭ－ＣＳＦシグナル配列である。一例では、シグナル配列は配列番号５のアミノ酸１～１９である。

【００６３】

特定の実施形態では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、配列番号５と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％の同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の例では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは配列番号５のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００６４】

追加の実施形態では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、ＣＤ１４７－ＣＡＲ発現細胞を排除するために使用することができる誘導性遺伝子（例えば「自殺」遺伝子）をさらに含む。誘導性遺伝子は、サイトカイン放出症候群（「サイトカインストーム」）などのオフターゲッ

ト副作用（またはオンターゲット／オフ腫瘍効果）の事象において活性化され得る。一部の例では、自殺遺伝子の発現は、テトラサイクリンもしくはドキシサイクリン（「ＴＥＴＯＮ」システム）またはラパマイシンなどの小分子によって誘導可能である。例えばGargett et al., Front. Pharmacol. 5:235, 2014、Stavrou et al., Mol. Ther. 6:1266-1276, 2018を参照されたい。他の例では、自殺遺伝子はＦａｓドメイン誘導性システムによって誘導可能である。一部の例では、誘導性自殺ドメインはＣＡＲの抗原結合ドメインのＮ末端またはＣ末端に位置しているが、他の例では、誘導性自殺ドメインはＣＡＲのＣＤ３ζドメインのＣ末端に位置している。誘導性自殺ドメインは自己切断性ペプチド（例えばＰ２ＡペプチドまたはＴ２Ａペプチド）によってＣＡＲから分離されている。一部の実施形態では、誘導性自殺ドメインはカスパーゼ９、例えば配列番号７のアミノ酸１１９～４００を含む。一部の例では、テトラサイクリン誘導性カスパーゼ９を含むＣＤ１４７－ＣＡＲは、配列番号７と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％の同一性）を有するアミノ酸配列を含む。他の例では、テトラサイクリン誘導性カスパーゼ９を含むＣＤ１４７－ＣＡＲは、配列番号７のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００６５】

他の実施形態では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、ＣＡＲを発現する改変された免疫細胞の生存または持続性を増大させるドメインをさらに含む。一部の例では、ドメインはサイトカイン受容体由来の細胞内ドメイン、例えばインターロイキン（ＩＬ）受容体１５（例えば配列番号１２）、ＩＬ－１２受容体またはＩＬ－１８受容体由来の細胞内ドメインである。他の例では、ドメインは成長因子受容体由来の細胞内ドメイン、例えばＣＤ４０、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＰ４０、またはＮＫＰ４６由来の細胞内ドメインである。一部の例では、ドメインはＣＡＲのＣＤ３ζドメインのＣ末端に位置している。

【００６６】

一部の例では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、腫瘍細胞上でＣＤ１４７と共発現する抗原に特異的に結合する１つまたは複数の追加の抗原結合ドメインをさらに含む。一部の非限定的な例では、ＣＤ１４７－ＣＡＲは、肝がん抗原、例えばグリピカン－３、アルファ－フェトプロテイン、またはムチン－１の１つまたは複数に特異的に結合する少なくとも１つの追加の抗原結合ドメインを含む。追加の腫瘍抗原は、処置されるがんの型に基づいて選択することができる。

【００６７】

本明細書で開示するＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸も提供される。一部の実施形態では、核酸は、ＣＤ１４７特異的ｓｃＦｖを含むＣＡＲ、例えば配列番号１と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性）を有する核酸配列をコードするか、または配列番号１の核酸配列を含むかもしくはそれからなる。一部の例では、ＣＤ１４７特異的ＣＡＲ核酸は、ＩｇＧヒンジドメイン、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、ＣＤ２８および４－１ＢＢ共刺激ドメイン、ならびにＣＤ３ζドメインもコードする。一例では、ＣＤ１４７特異的ＣＡＲは、配列番号４と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性）を有する核酸配列によってコードされるか、または配列番号４の核酸配列を含むかもしくはそれからなる。他の例では、ＣＤ１４７特異的ＣＡＲ核酸は、誘導性カスパーゼ９ドメイン、例えば配列番号６と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性）を有する核酸配列もコードするか、または配列番号６の核酸配列を含むかもしくはそれからなる。

【００６８】
本明細書に記載したＣＡＲの機能性バリアントまたはそのドメインも提供され、これらは、バリアントであるかまたは特定のドメインの生物活性を保持しているＣＡＲの生物活性を保持している。機能性バリアントは、親のＣＡＲまたはドメインに対してアミノ酸配列において少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％）、約９７％、約９８％、約９９％、またはそれよりも大きく同一であり得る。置換は、例えば細胞外標的化ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインの１つまたは複数において行うことができる。
【００６９】
一部の例では、機能性バリアントは、少なくとも１つの保存的アミノ酸置換（例えば１０個までの保存的アミノ酸置換、例えば１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の保存的置換）を有する親のＣＡＲまたはドメインのアミノ酸配列を含む。他の例では、機能性バリアントは、少なくとも１つの非保存的アミノ酸置換（例えば１０個までの非保存的アミノ酸置換、例えば１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の非保存的置換）を有する親のＣＡＲまたはドメインのアミノ酸配列を含む。この場合には、非保存的アミノ酸置換は、機能性バリアントの生物活性に干渉も阻害もしない。非保存的アミノ酸置換は機能性バリアントの生物活性を増強し得、それにより、機能性バリアントの生物活性は親のＣＡＲまたはドメインと比較して増大する。
【００７０】
ＣＡＲまたはそのドメインは、一部の例では、１つまたは複数の天然に存在するアミノ酸の代わりに、１つまたは複数の合成アミノ酸を含み得る。そのような合成アミノ酸には、例えばアミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、ａ－アミノｎ－デカン酸、ホモセリン、Ｓ－アセチルアミノメチル－システイン、ｔｒａｎｓ－３－およびｔｒａｎｓ－４－ヒドロキシプロリン、４－アミノフェニルアラニン、４－ニトロフェニルアラニン、４－クロロフェニルアラニン、４－カルボキシフェニルアラニン、β－フェニルセリンβ－ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、α－ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン－２－カルボン酸、１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、Ｎ’－ベンジル－Ｎ’－メチル－リシン、Ｎ’，Ｎ’－ジベンジル－リシン、６－ヒドロキシリシン、オルニチン、α－アミノシクロペンタンカルボン酸、α－アミノシクロヘキサンカルボン酸、ｏｃ－アミノシクロヘプタンカルボン酸、－（２－アミノ－２－ノルボルナン）－カルボン酸、γ－ジアミノ酪酸、α，β－ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、およびα－ｔｅｒｔ－ブチルグリシンが含まれる。ＣＡＲは、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、ホスホリル化、エステル化、Ｎ－アシル化、例えばジスルフィド結合による環化、もしくは酸付加塩への変換、および／または必要に応じて二量体化もしくは重合、またはコンジュゲートしてもよい。
【００７１】
一部の実施形態では、開示したＣＡＲをコードする核酸分子は、宿主細胞、例えばＴ細胞またはＮＫ細胞における発現のために発現ベクター（例えばウイルスベクター）中に含まれる。一部の例では、発現ベクターは、ＣＡＲをコードする核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。追加の発現制御配列、例えば１つまたは複数のエンハンサー、転写および／または翻訳のターミネーター、および開始配列も、発現ベクターに含めることができる。一部の実施形態では、本明細書で提供するＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸は、ウイルスベクターに含まれる。好適なウイルスベクターの例には、レトロウイルス（例えばＭｏＭＬＶまたはレンチウイルス）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、および鶏痘ウイルスが含まれる。具体的な例では、ＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする核酸は、ＭｏＭＬＶベクター、例えばＳＦＧレトロウイルスベクターまたはｐＨＡＧＥ－ＣＰＰＴレンチウイルスベクターに含まれる。他の例では、ベクターはＤＮＡベクターであってよい。
【００７２】

一部の実施形態では、ベクターは、ＣＤ１４７－ＣＡＲの誘導性発現を可能にする上流活性化配列（ＵＡＳ）をさらに含む。１つの非限定的な例では、ＵＡＳは、Ｇａｌ４によって活性化されるＧａｌ４ＵＡＳである。しかし、当業者であれば、利用することができる他のトランス活性化システムを特定することができる。一例では、Ｇａｌ４ＵＡＳ　ＣＤ１４７－ＣＡＲ核酸は、配列番号１４と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性）を有する核酸配列を含む。Ｇａｌ４ＵＡＳ　ＣＤ１４７－ＣＡＲ構築物をコードする例示的なベクター、例えばｐＨＲ＿Ｇａｌ４ＵＡＳ－ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｐＧＫ＿ｍＣｈｅｒｒｙを、図２３Ａに示す。一部の例では、ベクターは、配列番号１５と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性）を有する核酸配列を含む。一部の例では、ベクターは選択可能なマーカー（例えば配列番号１５におけるｍＣｈｅｒｒｙ）を含むが、他の例では選択可能なマーカーはベクターに含まれない。

【００７３】

一部の例では、ベクターは、少なくとも１つの追加のＣＡＲをコードする核酸配列をさらに含む。一部の例では、追加のＣＡＲは追加の腫瘍抗原に特異的であり、例えばＣＤ１４７を発現または過剰発現する腫瘍細胞へのＣＤ１４７－ＣＡＲの標的化の特異性を増大させる。一部の例では、ベクターは、肝がん抗原、例えばグリピカン－３、アルファ－フェトプロテイン、またはムチン－１の１つまたは複数に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む１つまたは複数のＣＡＲをコードする核酸を含む。追加の腫瘍抗原／ＣＡＲは、処置されるがんの型に基づいて選択することができる。他の例では、ベクターは、Ｂ型肝炎またはＣ型肝炎に特異的な抗原結合ドメインを含むＣＡＲをコードする核酸を含む。一部の例では、追加のＣＡＲは、ＨＢＶエンベロープタンパク質またはＢ型肝炎表面抗原（ＨＢｓＡｇ）に結合する。他の例では、追加のＣＡＲは、ＨＣＶ　Ｅ２糖タンパク質に結合する。一部の例では、１つまたは複数の追加のＣＡＲは、例えばＰ２Ａペプチド配列などの自己切断性ペプチドによって分離されたＣＤ１４７－ＣＡＲを有するベクターに含まれる。

【００７４】

Ｖ．ＣＤ１４７　ＣＡＲまたはＣＤ１４７特異的結合剤を発現する細胞

開示したＣＤ１４７－ＣＡＲまたはＣＤ１４７特異的結合剤を発現する細胞（例えば免疫細胞）も本明細書で提供される。特定の実施形態では、細胞にはＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージが含まれる。一部の実施形態では、細胞はＣＤ１４７－ＣＡＲを発現するＴ細胞、ＮＫ細胞、またはマクロファージである。

【００７５】

一部の例では、細胞は抗ＧＰＣ３ｓｃＦＶなどのＧＰＣ３特異的結合剤をさらに発現する。特定の例では、細胞はＧａｌ４－ＶＰ６４をコードする核酸に作動可能に連結された抗ＧＰＣ３ｓｃＦＶ（例えばＳｙｎＮｏｔｃｈ構築物）を発現する。ＧＰＣ３がこの構築物によってコードされるタンパク質に結合する場合、Ｇａｌ４－ＶＰ６４が活性化され、Ｇａｌ４応答性エレメントを有する構築物（例えばＧａｌ４ＵＡＳ）の発現を誘導することができる。抗ＧＰＣ３ｓｃＦｖ　ＳｙｎＮｏｔｃｈインデューサー構築物をコードする例示的なベクターを図２３Ａに示す。したがって、一部の例では、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージは、誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲ（例えば配列番号１４）および誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲの発現を誘導する抗ＧＰＣ３結合剤構築物を発現する。

【００７６】

他の実施形態では、細胞はＣＤ１４７ｓｃＦｖ（例えば配列番号１）およびＧＰＣ３－ＣＡＲなどのＣＤ１４７特異的結合剤を発現するＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ

細胞、好中球、またはマクロファージである。一部の例では、ＧＰＣ３－ＣＡＲは、配列番号１６と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性）を有する核酸配列を含む。特定の例では、細胞はＧａｌ４－ＶＰ６４をコードする核酸に作動可能に連結された抗ＣＤ１４７ｓｃＦＶ（例えばＳｙｎＮｏｔｃｈ構築物）を発現する。ＣＤ１４７がこの構築物によってコードされるタンパク質に結合する場合、Ｇａｌ４－ＶＰ６４が活性化され、Ｇａｌ４応答性エレメントを有する構築物（例えばＧａｌ４ＵＡＳ）の発現を誘導することができる。抗ＣＤ１４７ｓｃＦｖ　ＳｙｎＮｏｔｃｈインデューサー構築物および抗ＧＰＣ３－ＣＡＲをコードする例示的なベクターを図２５Ａに示す。したがって、、一部の例では、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、マクロファージは、誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲ（例えば配列番号１６）および誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲの発現を誘導する抗ＣＤ１４７結合剤構築物を発現する。

【００７７】

一部の例では、免疫細胞は、ＣＤ１４７－ＣＡＲ、誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲ、誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲ、インデューサーに作動可能に連結されたＣＤ１４７特異的結合剤、インデューサーに作動可能に連結されたＧＰＣ３特異的結合剤、またはそれらの２つもしくはそれより多い任意の組合せをコードする核酸を含む１つまたは複数の核酸を含む１つまたは複数の発現ベクターを形質導入またはトランスフェクトされる。他の例では、ベクター（または構築物をコードするＤＮＡ）は、ベクターまたはＤＮＡを含むナノ粒子に細胞を接触させることによって導入され得る。一部の例では、細胞は、形質導入またはトランスフェクションに続いて、例えば対象に投与される前に照射される（例えば少なくとも１，０００、少なくとも２，０００、少なくとも３，０００、少なくとも５，０００、少なくとも７，０００、少なくとも８，０００、少なくとも９，０００、少なくとも１０，０００、少なくとも１１，０００、少なくとも１２，０００、もしくは少なくとも１５，０００、または約１，０００～１５，０００、２，０００～１２，０００、１，０００～５，０００、５，０００～１０，０００、もしくは８，０００～１２，０００、または約１０，０００Ｒａｄの線量などでγ線照射により処置される）。

【００７８】

一部の例では、形質導入またはトランスフェクトされた細胞は、単離されたＴ細胞（例えば初代Ｔ細胞または対象から得られたＴ細胞）、単離されたＮＫ細胞（例えば初代ＮＫ細胞または対象から得られたＮＫ細胞）、単離されたＮＫＴ細胞、単離されたＤＮＴ細胞、単離された好中球、または単離されたマクロファージ（例えば初代マクロファージまたは対象から得られたマクロファージ）である。一部の例では、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージは、末梢血、臍帯血、リンパ節組織、骨髄、または腫瘍組織から得られる。一部の例では、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、またはＤＮＴ細胞はまた、例えば開示した発現ベクターの１つまたは複数による形質導入の前および／または後で、対象からの試料から富化、精製、および／または増大される。

【００７９】

１つの非限定的な実施形態では、細胞はＮＫ－９２細胞である。ＮＫ－９２細胞は、非ホジキンリンパ腫を有する患者に由来するＮＫ細胞系（例えばＡＴＣＣ（登録商標）ＣＲＬ－２４０７（商標））である。この細胞系は活性化されたＮＫ細胞の特性を有する（例えばGong et al., Leukemia 8:652-658, 1994を参照）。別の実施形態では、細胞はＮＫ－９２ＭＩ細胞（例えばＡＴＣＣ（登録商標）ＣＲＬ－２４０８（商標））である。ＮＫ－９２ＭＩ細胞系は、ヒトＩＬ－２を安定的に発現する、ＮＫ－９２に由来するインターロイキン－２（ＩＬ－２）非依存性ＮＫ細胞系である（例えばTam et al., Hum. Gene Ther. 10:1359-1373, 1999を参照）。ＣＡＲ（例えば本明細書で開示するＣＤ１４７－ＣＡＲおよび／または他の核酸）を発現するＮＫ－９２またはＮＫ－９２ＭＩ細胞は、各対象について自己ＮＫ細胞を産生する必要がないので、「既製の」免疫療法として本明細書で使用することができる。本明細書に記載したＣＤ１４７－ＣＡＲ（または

他の核酸）とともに使用することができる他のＮＫ細胞系には、ＮＫＬ、ＫＨＹＧ－１、およびＹＴＳ細胞が含まれる。

【００８０】

現在、ＮＫ－９２媒介免疫療法のフェーズＩ／ＩＩ臨床試験が進行中である（Arai et al., 2008、Tonn et al., 2013）。一般には、永久的生着を防止するために、ＮＫ－９２細胞は注入に先立って照射しなければならない。必要な照射の量はおよそ１０Ｇｙである。照射したＮＫ－９２の注入の用量は最大10^{10}ＮＫ９２細胞／m^2であってよい。重要なことに、いくつかのＮＫ－９２臨床試験（ＮＣＴ００９００８０９、ＮＣＴ００９９０７１７、ＮＣＴ００９９５１３７、およびＮＣＴ０１９７４４７９）で実証されたように、照射したＮＫ－９２細胞は患者における注入に対して安全であることが示されている。

【００８１】

一部の非限定的な実施形態では、免疫細胞はＣＤ１４７－ＣＡＲをコードするベクターによって形質導入される。形質導入に続いて、ＣＤ１４７－ＣＡＲを発現する細胞は、例えばＣＤ１４７に結合する標識された抗体を使用するフローサイトメトリーによって、検出および／または富化することができる。一部の例では、形質導入された細胞（例えばＮＫ細胞またはＴ細胞）は、例えば形質導入に続くある期間の細胞培養によって増大される。一部の例では、改変された細胞の一部または全部は、後の使用のために凍結保存される。

【００８２】

ＶＩ．免疫療法の方法

本明細書に開示するＣＤ１４７－ＣＡＲを用いて、対象におけるがん（例えばＣＤ１４７を発現または過剰発現するがん）を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、ＣＤ１４７－ＣＡＲを発現する改変された（例えばＣＡＲをコードするベクターを形質導入された）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージおよび薬学的に許容される担体を含む組成物を対象に投与することを含む。他の例では、方法は、ＣＤ１４７－ＣＡＲをコードする発現ベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与することを含む。

【００８３】

本明細書で開示する誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲおよび該誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲのインデューサーの発現に連結されたＧＰＣ３特異的結合剤を用いて、対象におけるがん（例えばＣＤ１４７を発現または過剰発現するがん）を処置する方法も提供される。一部の実施形態では、方法は、誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲおよびインデューサーに連結されたＧＰＣ３特異的結合剤を発現する改変された（例えばＣＤ１４７－ＣＡＲおよびＧＰＣ３特異的結合剤をコードする１つまたは複数のベクターを形質導入された）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージならびに薬学的に許容される担体を含む組成物を対象に投与することを含む。他の例では、方法は、誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲ（例えば配列番号１５）およびインデューサーに連結されたＧＰＣ３特異的結合剤をコードする１つまたは複数の発現ベクターならびに薬学的に許容される担体を対象に投与することを含む。

【００８４】

誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲおよび誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲのインデューサーに連結された本明細書で開示するＣＤ１４７特異的結合剤を用いて、対象におけるがん（例えばＣＤ１４７を発現または過剰発現するがん）を処置する方法も提供される。一部の実施形態では、方法は、誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲおよびインデューサーに連結されたＣＤ１４７特異的結合剤を発現する改変された（例えばＧＰＣ３－ＣＡＲ（例えば配列番号１６）およびＣＤ１４７特異的結合剤をコードする１つまたは複数のベクターを形質導入された）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージならびに薬学的に許容される担体を含む組成物を対象に投与することを含む。他の例では、方法は、誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲおよびインデューサーに連結されたＣＤ１４７特異的結合剤をコードする１つまたは複数の発現ベクターならびに薬学的に許容される担体を対象に投与すること

を含む。

【００８５】

本明細書に記載したＣＤ１４７－ＣＡＲまたはＣＤ１４７特異的結合剤を発現する改変された細胞（例えばＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＤＮＴ細胞、好中球、またはマクロファージ）は、医薬組成物に組み込むことができる。そのような組成物は、典型的には細胞（例えばＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞またはＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞）の集団および薬学的に許容される担体を含む。「薬学的に許容される担体」は、医薬投与に適合するあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む（例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition, 2005を参照）。そのような担体または希釈剤の例には、それだけに限らないが、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、平衡塩類溶液、および５％ヒト血清アルブミンが含まれる。リポソームおよび固定油などの非水性ビヒクルも使用され得る。補完的な活性化合物も組成物に組み込むことができる。投与可能な組成物を調製するための実際の方法には、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition (2005)に提供されたものが含まれる。

【００８６】

一部の例では、組成物は約10^4～10^{12}個の改変されたＮＫ細胞またはＴ細胞（例えば、約10^4～10^8個の細胞、約10^6～10^8個の細胞、または約10^6～10^{12}個の細胞）を含む。例えば、組成物は約10^4～10^{10}個の改変されたＮＫ細胞または改変されたＴ細胞／ｋｇ（例えば約10^4、10^5、10^6、10^7、または10^8個の細胞／ｋｇ）が対象に投与されるように調製してよい。具体的な例では、組成物は少なくとも10^4、10^5、10^6、または10^7個のＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞またはＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞を含む。改変されたＮＫ細胞または改変されたＴ細胞の集団は、典型的には非経口で、例えば静脈内で投与されるが、腫瘍もしくは腫瘍付近への注射または注入（局所投与）または腹腔への投与も使用することができる。適切な投与経路は、対象、処置される状態、および他の因子などの因子に基づいて決定することができる。

【００８７】

改変されたＮＫ細胞または改変されたＴ細胞の集団の複数回用量を対象に投与することができる。例えば、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞またはＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞は、毎日、１日おき、週２回、毎週、隔週、３週ごと、毎月、またはそれより少ない頻度で、投与することができる。熟練した臨床医は、対象、処置される状態、以前の処置履歴、および他の因子に基づいて、投与スケジュールを選択することができる。

【００８８】

追加の例では、対象に、改変されたＮＫ細胞または改変されたＴ細胞の生存および／または成長を支持するために、少なくとも１つ、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、または少なくとも４つのサイトカイン（例えばＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、および／またはＩＬ－１２）も投与される。具体的な非限定的な例では、少なくとも１つのサイトカインにはＩＬ－２およびＩＬ－１５が含まれる。サイトカイン（複数可）は、改変されたＮＫ細胞または改変されたＴ細胞の前、後、または実質的にこれと同時に、投与される。具体的な例では、少なくとも１つのサイトカイン（例えばＩＬ－２）は、例えばＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞と同時に投与される。

【００８９】

一部の例では、処置される対象は固形腫瘍、例えばＣＤ１４７を発現する固形腫瘍を有する。固形腫瘍の例には、肉腫（例えば線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、および他の肉腫）、滑膜種、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸がん、結腸直腸がん、腹膜がん、食道がん（例えば食道扁平上皮癌）、膵がん、乳がん（基底乳癌、腺管癌、および小葉乳癌を含む）、子宮内膜がん、肺がん（

例えば非小細胞肺がん）、卵巣がん、前立腺がん、肝がん（肝細胞癌を含む）、胃がん、扁平上皮癌（頭頸部扁平上皮癌を含む）、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞腫、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支原性癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、卵管がん、精巣腫瘍、精上皮腫、膀胱がん（例えば腎細胞がん）、黒色腫、およびＣＮＳ腫瘍（例えば神経膠腫、神経膠芽腫、星状細胞腫、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、乏突起膠腫、髄膜腫、神経芽腫、および網膜芽腫）が含まれる。固形腫瘍には、腫瘍転移（例えば肺、肝、脳、または骨への転移）も含まれる。一部の例では、対象は肝細胞癌、神経芽腫、乳がん、胃がん、子宮内膜がん、膀胱がん（例えば腎細胞癌）、肺がん（例えば非小細胞肺がん）、子宮頸がん、髄芽腫、食道がん（例えば食道扁平上皮癌）、前立腺がん、精上皮腫、神経膠芽腫、骨肉腫、星状細胞腫、または軟部組織肉腫を有する。特定の例では、対象は肝細胞癌または神経芽腫を有する。

【００９０】

他の例では、対象は血液悪性腫瘍、例えばＣＤ１４７を発現する血液悪性腫瘍を有する。血液悪性腫瘍の例には、急性白血病（例えば１１ｑ２３陽性急性白血病、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、Ｔ細胞ＡＬＬ、急性骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、および骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病）を含む白血病、慢性白血病（例えば慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ球性白血病）、リンパ芽球性白血病、真性赤血球増加症、リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、Ｔ細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、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、重鎖病、骨髄異形成症候群、ヘアリー細胞白血病、および骨髄異形成が含まれる。特定の例では、対象は急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、Ｔ細胞ＡＬＬ、急性骨髄球性白血病、または急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）を有する。

【００９１】

一部の例では、対象は、手術、放射線療法、および化学療法剤の１つまたは複数によっても処置される。例示的な化学療法剤には（それだけに限らないが）、ナイトロジェンマスタード（例えばメクロレタミン、シクロホスファミド、メルファラン、ウラシルマスタード、またはクロラムブシル）、アルキルスルホネート（例えばブスルファン）、ニトロソウレア（例えばカルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、またはダカルバジン）などのアルキル化剤；葉酸アナログ（例えばメトトレキセート）、ピリミジンアナログ（例えば５－ＦＵまたはシタラビン）、およびメルカプトプリンもしくはチオグアニンなどのプリンアナログなどの代謝拮抗剤；または天然産物、例えばビンカアルカロイド（例えばビンブラスチン、ビンクリスチン、またはビンデシン）、エピポドフィロトキシン（例えばエトポシドまたはテニポシド）、抗生物質（例えばダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、またはマイトマイシン（mitocycin）Ｃ）、および酵素（例えばＬ－アスパラギナーゼ）が含まれる。追加の薬剤には、白金配位錯体（例えばシスプラチンとしても公知のｃｉｓ－ジアミン－ジクロロ白金ＩＩ）、置換ウレア（例えばヒドロキシウレア）、メチルヒドラジン誘導体（例えばプロカルバジン）、および副腎皮質抑制剤（adrenocrotical suppressant）（例えばミトタンおよびアミノグルテチミド）；ホルモンおよびアンタゴニスト、例えば副腎皮質ステロイド（例えばプレドニゾン）、プロゲスチン（例えばヒドロキシプロゲステロンカプロエート、メドロキシプロゲステロンアセテート、および酢酸メゲストロール（magestrol acetate））、エストロゲン（例えばジエチルスチルベストロールおよびエチニルエストラジオール）、抗エストロゲン（例えばタモキシフェン）、およびアンドロゲン（例えばテストステロンプロピオネートおよびフルオキシメステロン）が含まれる。最も一般的に使用される化学療法薬の例には、アドリアマイシン、メルファラン（Ａｌｋｅｒａｎ（登録商標））、Ａｒａ－Ｃ（シタラビン）、カルムスチン、ブスルファン、ロムスチン、カルボプラチナム、シスプラチナム、シクロホスファミド（Ｃｙｔｏｘａｎ（登録商標））、ダウノルビシン、ダカルバジン、５－フルオロウラシル、フルダラビン、ヒドロ

キシウレア、イダルビシン、イフォスファミド、メトトレキセート、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ナイトロジェンマスタード、パクリタキセル（またはドセタキセルなどの他のタキサン）、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ＶＰ－１６が含まれるが、より新しい薬物にはゲムシタビン（Ｇｅｍｚａｒ（登録商標））、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ロイスタチン、ナベルビン、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、イマチニブ（ＳＴＩ－５７１）、トポテカン（Ｈｙｃａｍｔｉｎ（登録商標））、カペシタビン、イブリツモマブ（Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標））、およびカルシトリオールが含まれる。熟練した臨床医は、対象、処置されるがん、処置履歴、および他の因子などの因子によって、（本明細書に列挙した療法または他の現在の療法から）対象への適切な追加の療法を選択することができる。

【実施例】

【００９２】

以下の実施例は、ある特定の特色および／または実施形態を説明するために提供される。これらの実施例は、本開示を記載した特定の特色または実施形態に限定するものと解釈すべきではない。

【００９３】

（実施例１）

材料および方法

抗体および試薬：精製した抗ＣＤ２４７（Ｔ細胞表面糖タンパク質ＣＤ３ゼータ鎖、ＣＤ３としても公知）抗体（クローン６Ｂ１０．２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、精製した抗ヒトＣＤ１４７、ＦＩＴＣコンジュゲート抗ヒトＣＤ１４７（クローンＨＩＭ６、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＰＥまたはＡＰＣコンジュゲート抗ヒトＣＤ３抗体（クローンＯＫＴ３、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＦＩＴＣまたはＢＶ５１０コンジュゲート抗ヒトＣＤ５６抗体（クローンＨＣＤ５６、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＰＥコンジュゲート抗ヒトＣＤ６９抗体（クローンＦＮ５０、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＡＰＣ／Ｆｉｒｅ７５０コンジュゲート抗ヒトＣＤ２２６抗体（ＤＮＡＭ－１としても公知、クローン１１Ａ８、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＡＰＣ／Ｆｉｒｅ７５０コンジュゲート抗ヒトＫＬＲＧ１（ＭＡＦＡ）抗体（クローンＳＡ２３１Ａ２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＢＶ４２１コンジュゲート抗ヒトＣＤ３３５（ＮＫｐ４６）抗体（クローン９Ｅ２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＰＥ／Ｃｙ７コンジュゲート抗ヒトＣＤ１５８ｂ（ＫＩＲ２ＤＬ２／Ｌ３、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）抗体（クローンＤＸ２７、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＰＥ／Ｃｙ７コンジュゲート抗ヒトＣＤ２４４（２Ｂ４）抗体（クローンＣ１．７、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＰＥコンジュゲート抗ヒトＣＤ１５２（ＣＴＬＡ－４）抗体（クローンＢＮＩ３）、ＡＰＣコンジュゲート抗ヒトＣＤ３６６（Ｔｉｍ－３）抗体（クローンＦ３８－２Ｅ２）、ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５抗ヒトＴＩＧＩＴ（ＶＳＴＭ３）抗体（クローンＡ１５１５３Ｇ）、ＦＩＴＣコンジュゲート抗ヒトＣＤ２２３（ＬＡＧ－３）抗体（クローン１１Ｃ３Ｃ６５、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、およびＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５コンジュゲート抗ヒトＣＤ９４（クローンＤＸ２２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）は、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ、ＵＳＡ）から購入した。

【００９４】

ＡＰＣコンジュゲート抗ヒトＣＤ１６抗体（クローンＢ７３．１、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＦＩＴＣコンジュゲート抗ヒトＣＤ３抗体（クローンＵＣＨＴ１、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＢＶ４８０コンジュゲート抗ヒトＣＤ８５ｊ抗体（ＬＩＲ－１）抗体（クローンＧＨＩ／７５、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＢＶ７１１コンジュゲート抗ヒトＣＤ３１４（ＮＫＧ２Ｄ）抗体（クローン１Ｄ１１、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、およびＰＥまたはＦＩＴＣコンジュゲート抗ヒトＣＤ１０７ａ抗体（クローンＨ４Ａ３、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）は、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ、ＵＳＡ）から購入した。

【００９５】

ＦＩＴＣコンジュゲート抗ヒトＫＩＲ／ＣＤ１５８抗体（クローン１８０７０４、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＰＥコンジュゲート抗ヒトＫＩＲ２ＤＬ１／ＫＩＲ２ＤＳ５抗体（クローン１４３２１１、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＡＰＣコンジュゲート抗ヒトＫＩＲ３ＤＬ１抗体（クローンＤＸ９、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＡＦ４０５コンジュゲート抗ヒトＫＩＲ３ＤＬ２／ＣＤ１５８ｋ抗体（クローン５３９３０４、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＡＰＣコンジュゲート抗ヒトＮＫＧ２Ａ／ＣＤ１５９ａ抗体（クローン１３１４１１、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、およびＰＥコンジュゲート抗ヒトＮＫＧ２Ｃ／ＣＤ１５９ｃ抗体（クローン１３４５９１、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）は、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した。ＡＦ６４７ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆ（ａｂ’）^{2}断片抗体は、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ（Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ、ＰＡ、ＵＳＡ）から購入した。

【００９６】

公的がん患者データベースからの生物情報解析：患者の生存データおよびＣＤ１４７に関するＲＳＥＭ（ＲＮＡ－Ｓｅｑ　ｂｙ　Ｅｘｐｅｃｔａｔｉｏｎ　Ｍａｘｉｍｉｚａｔｉｏｎ）正規化発現データセットをＴｈｅ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ａｔｌａｓ（ＴＣＧＡ）から生成し、ＯｎｃｏＬｎｃ（oncolnc.org）からダウンロードした。データは、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ５．０（ＧｒａｐｈＰａｄ）を使用してＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ曲線についてプロットした。ＴＣＧＡに由来するＲＳＥＭ正規化発現データセットはＦｉｒｅＨｏｓｅ　Ｂｒｏａｄ　ＧＤＡＣからのもので、これはＴｈｅ　Ｂｒｏａｄ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（gdac.broadinstitute.org）によって開発された。図はＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ５によって生成した。

【００９７】

細胞系：２９３Ｔ、Ｋ５６２、Ｄａｕｄｉ細胞、ＳＫ－Ｈｅｐ１、およびＨｅｐＧ２細胞系は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から購入した。Ｄａｕｄｉ－ＦＦｌｕｃ細胞を確立するため、以前に記載したように、ＣＤ１４７陽性のＨｅｐＧ２およびＳＫ－Ｈｅｐ１細胞に、ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰをコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。健康なドナーからの末梢血の収集のためのプロトコールは、Ｒｕｔｇｅｒｓ－Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｃｈｏｏｌ（Ｎｅｗａｒｋ、ＮＪ）の施設内審査委員会（ＩＲＢ）および倫理審査委員会によって承認された。

【００９８】

ＮＫ－９２ＭＩの細胞培養およびＣＡＲ改変ＮＫ－９２ＭＩ細胞の生成：ＮＫ－９２ＭＩ細胞系は、ＡＴＣＣ（登録商標）（ＣＲＬ－２４０８（商標）、ＵＳＡ）から購入した。インターロイキン－２（ＩＬ－２）非依存性ＮＫ細胞系であるＮＫ－９２ＭＩは、ヒトＩＬ－２　ｃＤＮＡによって安定的に発現されるＮＫ－９２（ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＲＬ－２４０７（商標））細胞系（Gong et al., Leukemia 8:652-658, 1994）に由来する（Tam et al., Hum Gene Ther 10:1359-1373, 1999、Tam et al., J. Hematother. 8:281-290, 1999）。ＮＫ９２－ＭＩ細胞系は、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドを含まないが２ｍＭのＬ－グルタミンおよび１．５ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムを含む特異的ＮＫ－９２ＭＩ培養培地（アルファ最小必須培地、アルファＭＥＭ）中で維持した。完全成長培地を作製するため、以下の成分を基本培地に添加した。０．２ｍＭのイノシトール、０．１ｍＭの２－メルカプトエタノール、０．０２ｍＭの葉酸、最終濃度１２．５％のウマ血清、および最終濃度１２．５％のウシ胎児血清。３日目に、組換えフィブロネクチン断片（ＦＮ　ＣＨ－２９６；Ｒｅｔｒｏｎｅｃｔｉｎ；Ｔａｋａｒａ、Ｊａｐａｎ）をコーティングしたプレート中で、レトロウイルス上清をＮＫ－９２ＭＩ細胞に形質導入した。形質導入の後、ＩＬ－２を使用してＮＫ細胞を増大させた。ＮＫ－９２ＭＩ細胞上のＣＤ１４７－ＣＡＲ発現のパーセンテージを確認するため、これらの細胞をＣＤ３およびＣＤ５６について染色してＮＫ細胞を染色した後、フローサイトメトリー解析を行った。

【００９９】

ＣＤ１４７ノックアウト細胞系の生成：ＣＤ１４７ノックアウト肝細胞の細胞系を生成するため、レンチウイルス送達システムである、ＣＤ１４７配列を標的とするガイドＲＮＡ：＃１（５－ＴＴＧＡＣＡＴＣＧＴＴＧＧＣＣＡＣＣＧＣ－３；配列番号１０）、＃３（５－ＧＴＧＧＡＣＧＣＡＧＡＴＧＡＣＣＧＣＴＣ－３；配列番号１１）を使用した。レンチウイルスは、レンチ－ＣＲＩＳＰＲ　ｖ２にパッケージングプラスミドｐＳＰＡＸ２およびｐＭＤ２ＧをトランスフェクトすることによってＨＥＫ２９３Ｔ中で産生させた。３日後、上清を濾過（０．４５μｍ）し、肝細胞の細胞系および８μｇ／ｍＬのポリブレン（Ｓｉｇｍａ）とともにインキュベートした。４８時間のインキュベーションの後、形質導入した細胞を新鮮な培地に交換し、８．０μｇ／ｍｌのピューロマイシンによって５日間選択した。ウェスタンブロットおよびフローサイトメトリー解析を実施して、ノックアウト細胞系の効力を確認した。

【０１００】

プラスミドの構築およびレトロウイルスの産生：５Ｆ６クローンからの抗ＣＤ１４７特異的ｓｃＦｖをコードするコドン最適化ＤＮＡ断片をＧＥＮＥＷＩＺによって合成し、ヒトＩｇＧ１のヒンジ成分、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、細胞内ドメインＣＤ２８プラス４－１ＢＢ、およびヒトＴＣＲ／ＣＤ３複合体のζ鎖を含むインフレームのＳＦＧレトロウイルスベクターレトロウイルス骨格にインフレームでサブクローニングした。ＣＤ１４７－ＣＡＲレトロウイルスを産生させるため、以前に記載したように、ＣＤ１４７特異的ｓｃＦｖ、ＲＤＦ、およびＰｅｇＰａｍ３を含有するプラスミドの組合せを２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした（Loskog et al., Leukemia 20:1819-1828, 2006）。ＣＤ１９－ＣＤ２８－ＣＡＲおよびＣＤ１９－４－１ＢＢ－ＣＡＲの構築物は以前に記載されている（Xiong et al., Mol. Ther. 26:963-975, 2018）。

【０１０１】

ＣＤ１４７－ＣＡＲによるＮＫ－９２ＭＩ細胞の形質導入：増大の７日目にＮＫ細胞を採取し、Ｒｅｔｒｏｎｅｃｔｉｎ（ＦＮ　ＣＨ－２９６、Ｔａｋａｒａ、Ｊａｐａｎ）をコーティングしたプレート中でＣＤ１４７－ＣＡＲレトロウイルスを形質導入した。２日後、細胞をＧ－Ｒｅｘ６マルチウェル細胞培養プレートに移し、２００Ｕ／ｍｌのＩＬ－２（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）を含む３５ｍｌの完全ＲＰＭＩ－１６４０培地中で維持した。３～４日ごとに培地を交換し、毎回培養を継続するために各ウェルに2×10^{7}個の細胞を保持した。総細胞数はＴｒｙｐａｎ　Ｂｌｕｅ排除を使用して計数した。ＮＫ細胞のパーセンテージおよびＣＡＲの発現を確認するため、ＣＤ３、ＣＤ５６、およびＩｇＧ　Ｆ（ａｂ’）$_2$について細胞を染色し、フローサイトメトリーによって解析した。

【０１０２】

フローサイトメトリー解析およびソーティング：１％のウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含むＦＡＣＳ染色緩衝液中、氷上で３０分間、ＣＡＲ－ＮＫ細胞を蛍光コンジュゲート抗体で染色し、ＰＢＳで洗浄し、ＦＡＣＳ　ＬＳＲＩＩまたはＬＳＲ　Ｆｏｒｔｅｓｓａフローサイトメーター（ＢＤ）で解析した。ＰＭＴ電圧を調整し、データ収集の前に補正値を計算した。ＦＡＣＳ　Ｄｉｖａソフトウェア（ＢＤ）を使用してデータを取得し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ）を使用して解析した。

【０１０３】

フローサイトメトリーの単一生細胞ソーティングのため、（１％のＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０）で、氷上で３０分間、試料細胞の全てを蛍光コンジュゲート抗体で染色し、ＰＢＳで２回洗浄し、完全培養培地中に再懸濁し、ＳＯＲＰ　ＢＤ　ＦＡＣＳ　ＡｒｉａＩＩＩによってソーティングした。ソーティングの後、予熱した培地で収集試料を１回洗浄し、使用のために培養した。

【０１０４】

ＣＡＲ－ＮＫ脱顆粒アッセイ（ＣＤ１０７ａ）：Ｕ底９６ウェルプレート中の完全ＮＫ－９２ＭＩ培養培地中で、３７℃で４時間または一夜、ＣＡＲ－ＮＫ細胞（1×10^{5}）を標的細胞とともにインキュベートした。その後、細胞を採取し、洗浄し、ＧｏｌｇｉＳｔｏｐ（ＢＤ）を用いて氷上で３０分間、ＣＤ３、ＣＤ５６、およびＣＤ１０７ａについ

て染色し、フローサイトメトリーによって解析した。

【０１０５】

サイトカイン放出アッセイ：ＣＡＲ－ＮＫによって分泌されるＩＦＮガンマおよびＴＮＦ－アルファサイトカインは、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ－Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）により、メーカーのプロトコールに従って測定した。

【０１０６】

^{51}Ｃｒ放出アッセイ：ＣＡＲ－ＮＫ細胞の細胞傷害活性を評価するため、標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイを使用した。簡単に述べると、標的細胞を３７℃で２時間、^{51}Ｃｒで標識し、次いでＩＬ２を含まず１０％のＦＢＳを含むＮＫ－９２ＭＩ培養培地中、２×１０^{5}／ｍＬで再懸濁した。次いで２×１０^{4}個の標的細胞を、連続希釈したＣＡＲ－ＮＫ細胞とともに３７℃で４時間、インキュベートした。遠心分離の後、上清を収集し、放出された^{51}Ｃｒをガンマカウンター（Ｗａｌｌａｃ、Ｔｕｒｋｕ、Ｆｉｎｌａｎｄ）で測定した。細胞傷害性（パーセンテージとして）は以下のように計算した：［（試料－自然放出）／（最大放出－自然放出）］×１００。

【０１０７】

ＦＦＬｕｃレポーターシステムアッセイ：ＣＡＲ改変免疫細胞の細胞傷害性を定量するため、ＦＦＬｕｃレポーターシステムアッセイを開発した。簡単に述べると、１日目に光学９６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－Ｏｎｅ（商標）Ｎｏ．６５５０９８）上、１００μｌ／ウェルの標的細胞の完全栄養培地中で、標的細胞を２×１０^{4}または３×１０^{4}個の標的細胞／ウェル（ＦＦｌｕｃ－ＧＦＰを安定的に形質導入した細胞）で前播種し、５％CO_2中、３７℃で一夜インキュベートした。翌日、エフェクター／標的の比に従ってエフェクター細胞の連続希釈液を調製し、示したエフェクター細胞を各ウェルに添加した（１００μｌ／ウェル）。反応物を５％CO_2とともに、３７℃で４時間インキュベートし、次いで上清を穏やかに廃棄した。１００μｌの作業用Ｄ－ルシフェリンを各ウェルに添加し、光を消して５％CO_2とともに、３７℃で５分間インキュベートした。マイクロプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、ＵＳＡ）を使用してデータを定量した。データは、得られた値を以下の等式：特異的溶解のパーセンテージ（％）＝［１－（Ｓ－Ｅ）／（Ｔ－Ｍ）］×１００、（ここでＳは試料ウェルの発光の値であり、Ｅは試料ウェルと比較した「エフェクター細胞のみ」のウェルの発光の値であり、Ｔは「標的細胞のみ」のウェルの発光の平均値であり、Ｍは「ブランク培地のみ」のウェルの発光の平均値である）によって特異的溶解のパーセンテージに変換することによって定量した。

【０１０８】

動物研究：全ての動物実験は、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＩＡＣＵＣ）によって承認された。全てのｉｎ　ｖｉｖｏ実験に、Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ、ＭＥ）からのＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃ^{scid}Ｉｌ２ｒｇ^{tm1Wjl}／ＳｚＪ（ＮＳＧ）マウスを使用した。肝細胞癌細胞系異種移植モデルを確立するため、雌雄両方のＮＳＧマウス（８週齢）の右側腹部に、１００μＬのＰＢＳ　Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標）Ｍａｔｒｉｇｅｌ（登録商標）Ｍａｔｒｉｘ中の４×１０^{6}個のＳＫ－Ｈｅｐ１細胞を皮下注射した。腫瘍負荷が約４０～５０ｍｍ^{2}に達したら、マウスをランダムに３群に割り付けた。１日目に処置を開始して、マウスに１００μＬのＰＢＳ中の５×１０^{6}個のＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞を注射（ｉ．ｖ．）した。対照群には親ＮＫ－９２ＭＩ細胞またはビヒクル（ＰＢＳ）を注入した。翌日（２日目）、全ての動物にＩＬ－２（２０，０００単位／マウス）を注射（ｉ．ｖ．）した。動物体重および腫瘍負荷を週２回、収集した。腫瘍サイズはキャリパーで測定し、最大縦径（長さ）および最大横径（幅）を記録した。キャリパー測定に基づく腫瘍サイズは、改変された楕円式によって計算した。腫瘍サイズは以下のように計算した：腫瘍サイズ（ｍｍ^{2}）＝１／２（長さ×幅^{2}）。腫瘍負荷が２０００ｍｍ^{2}を超えるか、動物の体重が２０％を超えて減少した場合、ＩＡＣＵＣのガイドラインに従ってマウスを安楽死させた。同時に動物の生存データを記録した。

【０１０９】
患者由来の異種移植（ＰＤＸ）モデルのため、患者肝細胞癌の動物モデルがＴｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙによって開発された。簡単に述べると、新鮮なＰＤＸ検体を６～８週齢のＮＯＤ ＳＣＩＤガンマ（ＮＳＧ）マウスの側腹部の皮下に埋め込んだ。腫瘍負荷が約４０～５０mm^2に達した後で、さらなる解析のためにマウスをランダムに３群に割り付けた。使用した主な処置手順は上記の通りであった。異種移植片検体は１０％のホルマリンで固定し、切断のためにパラフィンに包埋し、ＩＨＣ染色のために処理するか、またはさらなる解析のために液体窒素中に直接凍結した。
【０１１０】
統計解析：腫瘍サイズの統計解析は、Ｂｏｎｆｅｒｒｏｎｉ事後検定を伴う二元配置ＡＮＯＶＡによって実施した。全生存期間統計は、ログ－ランク検定を使用して計算した。他の統計的有意性は、両側対応のないスチューデントのｔ検定および両側対応のあるスチューデントのｔ検定を使用して決定した。全ての統計計算グラフは、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ５．０によって生成した。Ｐ＜０．０５（＊）、Ｐ＜０．０１（＊＊）、およびＰ＜０．００１（＊＊＊）を、統計的に有意とみなした。
【０１１１】
（実施例２）
ＣＤ１４７は、肝細胞癌細胞系および患者からの肝がん検体において発現される
ＣＤ１４７が肝細胞癌および他の型のがんのための有効で妥当な標的であるかどうかを決定するため、患者の生存とＴＣＧＡ（Ｔｈｅ Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｔｌａｓ、cancergenome.nih.gov）データセットからのＣＤ１４７の発現レベルとの間の相関を解析した。２つの異なる患者サブセット（ＣＤ１４７^{high}およびＣＤ１４７^{low}）からの生存パーセンテージの比較は、ＣＤ１４７と生存パーセンテージとの間に強い負の相関があることを示した（図１Ａ）。具体的には、複数の腫瘍組織中のＣＤ１４７^{high}は、低い生存パーセンテージを示した（図１Ａ）。さらに、正常組織（ＮＴ）と複数のがんの型における腫瘍試料（ＴＰ）との間のＣＤ１４７発現の比較は、異なる型の腫瘍組織の中で、ＣＤ１４７発現の有意な上方調節を示した（図１Ｂ）。
【０１１２】
生物情報解析からのデータを検証するため、様々な腫瘍細胞系および他の組織の中のＣＤ１４７の発現をウェスタンブロットにより解析した。これらの細胞系には、野生型ＮＫ－９２（ヒトＮＫ細胞系）、Ｔ２（変異体Ｔ×Ｂ細胞ハイブリッド）、７２１．２２１（ＨＬＡ－Ａ、－Ｂ、－Ｃヌルヒト細胞系）、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１（ヒト乳癌細胞系）、Ｋ５６２（ヒト骨髄性白血病細胞系）、ＨｅｐＧ２（ヒト肝細胞癌細胞系）、ＳＫ－Ｈｅｐ１（ヒト肝腺癌細胞系）、Ｒａｊｉ（ヒトＢリンパ球バーキットリンパ腫細胞系）、Ｄａｕｄｉ（ヒトＢリンパ芽球細胞系）、ＮＫ－９２－ＭＩ（インターロイキン－２非依存性ナチュラルキラー細胞系）、およびヒト末梢血単球（ＰＢＭＣ）が含まれる。ＣＤ１４７分子は、ＰＢＭＣと比較して、ＨｅｐＧ２およびＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系（２種の肝細胞癌細胞系）において高度に上方調節されていた（図１Ｃ）。ＰＢＭＣにおけるＣＤ１４７の発現は、腫瘍細胞系と比較して、比較的低かった（図１Ｃ）。同様の結果がフローサイトメトリー解析によって得られた（図１Ｄ）。さらに、免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイの結果は、ＰＤＸマウスモデルから単離したＨＣＣ組織においてＣＤ１４７が有意に上方調節されたことを確認した（図１Ｅ）。
【０１１３】
（実施例３）
ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞の生成および特徴付け
ＳＦＧベクター（Loskog et al., Leukemia 20:1819-1828, 2006、Xiong et al., Mol. Ther. 26:963-975, 2018）を使用してＣＤ１４７－ＣＡＲを構築した。ＣＤ１４７－ＣＡＲは、抗ＣＤ１４７抗体の改変された一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）（実施例１に記載したようにクローン５Ｆ６に由来する）、ＩｇＧ－ＣＨ２ＣＨ３スペーサー、ＣＤ２８の膜貫通ドメイン、ＣＤ２８－４－１ＢＢの細胞内ドメイン、およびＴＣＲ－

ゼータ鎖の細胞内シグナル伝達ドメインを含有していた（図２Ａ）。
【０１１４】
最初に、このＣＡＲ構築物をＮＫ－９２ＭＩ細胞系で試験した。形質導入の後、ＮＫ－９２ＭＩはＣＤ１４７－ＣＡＲ分子を発現した（図２Ｂ）。フローサイトメトリーによるソーティングの後、ＣＤ１４７陽性ＮＫ－９２ＭＩ細胞のパーセンテージは９６％を超えていた（図２Ｂ）。ＮＫ－９２ＭＩ細胞におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ分子の発現を、ウェスタンブロットによってさらに検証した。親ＮＫ－９２ＭＩ細胞系と比較して、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩは、キメラｓｃＦｖ－ＣＤ１４７－ＣＡＲを発現した。近似的な分子量は約８０～８５ｋＤであった（図２Ｃ）。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞系を、フローサイトメトリーによってさらに特徴付けた。同程度の活性化受容体（例えばＣＤ５６、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＰ４６、ＮＫＧ２Ａ、ＣＤ１６、ＣＤ９４／ＮＫＧ２Ｃ、ＣＤ２２６（ＤＮＡＭ－１としても公知）、およびＣＤ２４４（２Ｂ４としても公知））および阻害性受容体（例えばＫＬＲＧ１、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ－３、ＰＤ－１、およびＴＩＧＩＴ）の発現が観察された（図２Ｄ）。ＮＫ９２－ＭＩ細胞における低レベルのＣＤ１４７発現を考慮して、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞系におけるＣＤ１４７の発現も、フローサイトメトリーによって解析した。ＮＫ－９２ＭＩにおけるＣＤ１４７－ＣＡＲの発現は、形質導入後３０日を超えても安定であった。しかしＣＤ１４７－ＣＡＲ発現にはＮＫ－９２ＭＩ細胞系におけるＣＤ１４７の喪失が付随しており、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の中での限定的な同胞殺し（fratricide）を示していた（図２Ｅ～２Ｇ）。注目すべきことに、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞におけるＣＤ１４７分子発現の喪失は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるその機能性および発現に影響しなかった。
【０１１５】
（実施例４）
ＣＤ１４７－ＣＡＲ　ＮＫ細胞はｉｎ　ｖｉｔｒｏで肝細胞癌（ＨＣＣ）を特異的に殺滅する
ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞の確立が成功した後で、ＣＤ１４７$^{+}$ＨＣＣ細胞系（ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＨｅｐＧ２細胞を含む）を根絶するＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の能力を試験した。対照のＣＤ１９－ＣＤ２８－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩおよびＣＤ１９－４－１ＢＢ－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞と比較して、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞は、２種のＨＣＣ細胞系、ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＨｅｐＧ２（図３Ａおよび３Ｂ）、ならびにＨｕｈ５およびＨＣＯ２細胞系（図４Ａ～４Ｃ）に対して有意な細胞傷害性を示した。さらに、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞によるＴＮＦ－アルファとＩＦＮ－ガンマの両方の産生は、ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＨｅｐＧ２細胞によって刺激したＣＤ１９－ＣＤ２８－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩおよびＣＤ１９－４－１ＢＢ－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞のそれよりも有意に高かった（図３Ｃおよび３Ｄ）。興味深いことに、それらに感受性のある標的細胞によるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の活性化は、抗ＣＤ１４７抗体（クローンＨＩＭ６）によって遮断することができるが、対照ＩｇＧ１によっては遮断することができない（図５Ａ～５Ｃ）。この抗ＣＤ１４７抗体の特異性は、ＣＤ１９－４－１ＢＢ－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の細胞傷害性に対するその効果を試験することによってさらに検証された。この抗ＣＤ１４７抗体は、ＣＤ１９陽性Ｄａｕｄｉ細胞系に対するＣＤ１９－４－１ＢＢ－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の細胞傷害性を遮断することができず（図６）、ＣＤ１９－４－１ＢＢ－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞および抗ＣＤ１４７抗体の選択性を示した。
【０１１６】
ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の特異性をさらに確認するため、ＣＤ１４７ノックアウト（ＣＤ１４７$^{-}$／$^{-}$）ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系（ＣＤ１４７$^{-}$／$^{-}$－ＳＫ－Ｈｅｐ１）およびＣＤ１４７ノックアウト（ＣＤ１４７$^{-}$／$^{-}$）ＨｅｐＧ２細胞系（ＣＤ１４７$^{-}$／$^{-}$－ＨｅｐＧ２）を生成した。ＣＤ１４７$^{-}$／$^{-}$－ＨｅｐＧ２およびＣＤ１４７$^{-}$／$^{-}$－ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞はＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞によって認識されず（図５Ｄ～５Ｇ）、これはＣＤ１４７－ＫＯ細胞系とともに共培養した場合のＣＤ１０７ａ

の表面発現によって定量された。

【０１１７】

ＣＤ１０７ａアッセイとサイトカイン産生アッセイの両方を使用して、感受性のある標的細胞によるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の活性化を評価することができる。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞がＣＤ１４７陽性ＨＣＣ細胞を殺滅することができるかどうかを直接試験するため、４時間の標準的なクロム－５１（^{51}Ｃｒ）放出アッセイ（免疫学の分野におけるＣＴＬおよびＮＫ細胞の細胞傷害性を評価するための最も標準的なアッセイ）を使用した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞は、ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＤａｕｄｉ細胞を殺滅した。追加のＨＣＣ細胞系、例えばＨｕｈ７細胞系（Kasai et al., Hum Cell 31:261-267, 2018）およびＨＣＯ２細胞系（Trinh et al., PLoS One 10:e0136673, 2015）に対するＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞による同様の殺滅活性。

【０１１８】

ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の殺滅活性をさらに検証するため、ルシフェラーゼ生物発光シグナルを使用するＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の細胞傷害性の評価のための新規で容易に使用できる非放射性アプローチを開発した。最初に、ＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＨｅｐＧ２細胞系を生成した。標的細胞の直接殺滅を評価するため、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞を、それぞれＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＨｅｐＧ２細胞系とともに共培養した。ＥＧＦＰ－ホタルルシフェラーゼ融合遺伝子（ＥＧＦＰ－ＦＦｌｕｃ）を安定的に発現する標的細胞を前播種した９６ウェルの光学底マイクロプレート中ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の４時間インキュベート後、ＥＧＦＰ－ＦＦｌｕｃの化学生物発光シグナルを蛍光マイクロプレートリーダーによって定量した。実施例１に記載したように、^{51}Ｃｒ放出アッセイと同様にＦＦＬｕｃシグナルを特異的溶解のパーセンテージに変換した（図８Ｈおよび８Ｉ）。

【０１１９】

最初に、ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から単離したＣＤ１４７－ＣＡＲ改変初代ＴおよびＮＫ細胞は、多数のＨＣＣ細胞系（ＳＫ－Ｈｅｐ１、Ｈｕｈ７、およびＨｅｐＧ２などを含む）を根絶することができるが、カッパ－ＣＡＲ改変Ｔ細胞は根絶することができない（図８Ａ～８Ｃ）。本発明者らはまた、^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、ＣＤ１４７－ＣＡＲ改変ヒト初代ＮＫ細胞がｉｎ ｖｉｔｒｏでＨＣＣ細胞系を効果的に殺滅することを実証した（図８Ｄ～８Ｆ）。ＣＤ１４７－ＣＡＲ初代ＮＫ細胞傷害性に加えて、ＮＫＧＤ／ＮＫＧ２ＤＬ相互作用による初代ＮＫの天然殺滅能力をさらに実証するために、本発明者らは抗ＮＫＧ２ＤがＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫによるＣＤ１４７$^{-/-}$－ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞の殺滅をさらに遮断することを見出した（図８Ｇ）。

【０１２０】

用量依存性特異的溶解は、^{51}Ｃｒ放出アッセイと同程度であった。一般的な倒立蛍光顕微鏡下でこのアプローチによって測定される細胞傷害活性をさらに定量して、標的細胞におけるＥＧＦＰシグナルの形態学および動力学を評価した（図７Ａおよび７Ｂ）。したがって、２つの相補的なアプローチによって、ＣＤ１４７－ＣＡＲ ＮＫ細胞がｉｎ ｖｉｔｒｏで肝細胞癌（ＨＣＣ）を特異的に殺滅することが実証された。

【０１２１】

ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞は、親のＳＫ－Ｈｅｐ１およびＨｅｐＧ２細胞と比較して、ＣＤ１４７$^{-/-}$－ＳＫ－Ｈｅｐ１およびＣＤ１４７$^{-/-}$－ＨｅｐＧ２を殺滅することができなかった（図８Ｋおよび８Ｌ）。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の細胞傷害性の特異性は、エフェクターおよび標的細胞の共培養系に抗ＣＤ１４７抗体を添加することによって、さらに検証された（図８Ｍおよび８Ｎ）。ＣＤ１４７をＨＣＣの有効かつ妥当な標的としてさらに立証するため、２種の異なるＨＣＣ細胞系、ＨｅｐＧ２（図１０Ａ）およびＳＫ－Ｈｅｐ１（図１０Ｂ）に対するＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性を試験した。ＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系においてＣＤ１４７分子を除去する

と（ＣＤ１４７ノックアウトＳＫ－Ｈｅｐ１細胞系）、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の特異的溶解は有意に低下し（図１０Ｃ）、ＣＤ１４７陽性ＨＣＣ細胞系に対するＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性の特異性がさらに立証された。

【０１２２】

（実施例５）

ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞はｉｎ　ｖｉｖｏでＨＣＣの進行を制御する

ＣＤ１４７－ＣＡＲがｉｎ　ｖｉｖｏでＨＣＣを殺滅することができるかどうかを評価するため、２つの異なる異種移植モデルを使用した。最初に、ＰＢＭＣに由来するＣＤ１４７－ＣＡＲ改変初代ＴおよびＮＫ細胞を、ＳＫ－Ｈｅｐ１異種移植マウスモデルで評価した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ改変初代Ｔ細胞は、腫瘍サイズを有意に抑制し、生存期間を延長させた（図１１Ａ～１１Ｄ）。ＣＤ１４７－ＣＡＲ改変初代ＮＫ細胞の効力をさらに評価するため、本発明者らは形質導入していない（ＮＴ）初代ＮＫ群を追加の対照として含めた（図１２Ａ～１２Ｄ）。親ＮＴ－ＮＫ対照群およびＰＢＳビヒクル対照群を受けたマウスは、急速な疾患の進行を生じさせた。対照的に、ＣＤ１４７－ＣＡＲ初代ＴおよびＮＫ細胞を受けたマウスは、急速な進行から有意に保護され、それらの生存期間中央値が延長し（Ｐ＜０．０５）、体重は異なる群の間で同程度であり（図１１Ｃおよび１２Ｃ）、ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＣＤ１４７－ＣＡＲ改変初代ＴおよびＮＫ細胞の忍容できる毒性が示された。

【０１２３】

さらに、追加の「既製の」細胞療法戦略をさらに開発するため、本発明者らはＣＤ１４７－ＣＡＲ改変ＮＫ－９２ＭＩ細胞の効力を評価した。ＮＫ－９２ＭＩの悪性な性質のため、ＣＡＲ改変ＮＫ－９２ＭＩ細胞は患者４６、６１に投与する前に照射する必要がある。非照射および照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の細胞傷害性を、標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイによって比較した（図１３）。非照射および照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の間で、同程度の細胞傷害性がｉｎ　ｖｉｔｒｏで観察された（図１３）。

【０１２４】

異種移植ＮＳＧマウスモデルにおける非照射および照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の間の効力をさらに比較した（図１４Ａ～１４Ｄ）。生存期間中央値によって測定して、非照射および照射ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩを注入したマウスの間で、同程度の効力がｉｎ　ｖｉｖｏで観察された（図１４Ａ～１４Ｄ）。

【０１２５】

腫瘍成長を制御するＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞（腫瘍の埋め込みの後、１日目、３日目、および５日目に注射）の効力をさらに評価するため、腫瘍サイズによって疾患の進行を測定した（図１５Ａ）。親ＮＫ－９２ＭＩおよびＰＢＳビヒクル対照群を受けたマウスは、急速な疾患の進行を生じた（図１５Ｂ）。対照的に、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞を受けたマウスは、急速な進行から有意に保護され、それらの生存期間中央値が延長し（Ｐ＜０．０１）、体重は異なる群の間で同程度であり（図１５Ｃおよび１５Ｄ）、ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の忍容できる毒性が示された。

【０１２６】

がん細胞系は生物学および治療効果を正確にモデル化するそれらの能力における有意な制約を有し得るが、患者由来の異種移植（ＰＤＸ）モデルは生物学的に安定であり、変異の状態、遺伝子発現のパターン、および腫瘍の不均一性に関するヒトの臨床条件を模倣することができる。したがって、患者からの転移肝がん組織を使用する第２の異種移植マウスモデルを用いた。生着後０日目、４日目、８日目、１１日目、１５日目、２２日目、２５日目、および３５日目に投与されたＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の効果を試験した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞で処置したマウスの生存期間中央値は６３日であり、これは対照マウスのもの（生存期間中央値約４２日）よりも有意に長かった。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞で処置したマウスにおいて腫瘍負荷およ

び疾患進行の低減が観察され（図１６Ａ～１６Ｄ）、ＰＤＸマウスモデルでの肝がんの進行の抑制におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の効力が示された。

【０１２７】

（実施例６）

ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞はＣＤ１４７陽性腫瘍細胞を特異的に殺滅する

ＨＣＣ細胞を殺滅するＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の能力を、８種のＨＣＣ細胞系（Ｈｕｈ７、Ｈｕｈ７．５、ＨｅｐＧ２、ＳＫ－Ｈｅｐ１、Ｈｅｐ３Ｂ、Ｈｕ１５４５、ＨＣＯ２、およびＬＨ８６）に対して試験した。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は健康なドナーから得た。ＰＢＭＣを形質導入するため、１０％ ＦＢＳ ＲＰＭＩ－１６４０培地中の１００Ｕ／ｍｌの組換えヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ；Ｃｈｉｒｏｎ、Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ、ＣＡ、ＵＳＡ）を含む１μｇ／ｍｌの抗ＣＤ３（クローン、ＯＫＴ３、Ｏｒｔｈｏ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ、ＮＪ、ＵＳＡ）および１μｇ／ｍｌの抗ＣＤ２８で細胞を活性化した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞を産生するため、組換えフィブロネクチン断片（ＦＮ ＣＨ－２９６；Ｒｅｔｒｏｎｅｃｔｉｎ；Ｔａｋａｒａ Ｓｈｕｚｏ、Ｏｔｓｕ、Ｊａｐａｎ）をコーティングしたプレート中で３日目に、活性化されたＴ細胞にレトロウイルス上清を形質導入した。形質導入の後、ＩＬ－２を使用してＴ細胞を増大させ、次いでアッセイに使用した。

【０１２８】

実施例１に記載したＦＦＬｕｃレポーターシステムアッセイを使用して、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞によるＦＦｌｕｃ－ＥＧＦＰ－ＨｅｐＧ２の特異的殺滅を試験した（図１７Ａ）。９６ウェルの光学底マイクロプレート中で６時間、ウェルあたり1×10^4個のＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ２で、エフェクター細胞（ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞）を標的細胞とともに共培養した。対照群には、野生型カッパ－ＣＡＲ－Ｔ細胞をＣＤ１４７陽性ＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＨｅｐＧ２とともにインキュベートして使用した。ＦＦＬｕｃレポートシステムアッセイにより、ノックアウトＣＤ１４７ＦＦＬｕｃ－ＧＦＰ－ＨｅｐＧ１を使用したＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性の低下が示された（図１７Ｂ）。９６ウェルの光学底マイクロプレート中で６時間、エフェクター細胞（ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＴおよびＫａｐｐ－ＣＡＲ－Ｔ細胞）を標的細胞ＣＤ１４７陽性ＦＦＬｕｃ－ＥＧＦＰ－ＨｅｐＧ２（1×10^4）とともに共培養した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性を、マイクロプレートリーダーによる発光シグナルの読み取りによって測定した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞傷害性を、標準的な４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定した（図１７Ｃ）。陰性対照群としてカッパ－ＣＡＲ－Ｔ細胞を使用した。

【０１２９】

（実施例７）

神経芽腫細胞に対するＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞の効果

ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞におけるＣＤ１０７ａの脱顆粒を、培地（対照）またはＳＫ－Ｎ－ＳＨ腫瘍細胞（図１８Ａ）、ならびにＤａｏＹおよびＤ２８３細胞で１０時間後に観察した。エフェクターと標的の比は１：１．２であった。表面ＣＤ１０７ａの発現を定量するため、細胞をＣＤ５６陽性サブセットについてゲーティングした。示したように、様々な刺激におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞上の表面ＣＤ１０７ａ発現のパーセンテージの定量データ（図１８Ｂ）。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞は、３時間後にＤａｏＹ細胞に対しても細胞傷害性であった（図１９）。

【０１３０】

（実施例８）

ＨＣＣ患者由来の初代ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞はＣＤ１４７陽性腫瘍細胞をｉｎｖｉｔｒｏで特異的に殺滅する

多数の固形腫瘍の型にわたるＣＤ１４７の幅広い発現パターンにより、ＣＤ１４７はＣＤ１４７－ＣＡＲに基づくがんの免疫療法の魅力的な標的である。ここで本発明者らは、ＣＤ１４７がヒトＨＣＣ組織試料中で上方調節されるかどうかを調べた。様々なステージ

のＨＣＣ腫瘍組織は、健康な肝組織と比較して、ＣＤ１４７について強く陽性に染色された（図２１Ａ）。

【０１３１】

ＨＣＣの肝から直接単離されたＣＤ１４７－ＣＡＲ改変初代ＮＫ細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏでＨＣＣを殺滅することができるかどうかを評価するため、ＨＣＣを有するヒト肝における腫瘍ゾーン、腫瘍隣接ゾーン、および非腫瘍ゾーンを含む肝組織の様々なゾーンからＮＫ細胞を単離した（図２１Ｂ）。次いで、これらのＮＫ細胞を増大させた（図２１Ｃ）。ヒトＨＣＣ肝組織からのこれらの増大したＮＫ細胞を使用して、ＣＤ１４７－ＣＡＲを生成した。活性化されたＮＫ細胞の形質導入の効率は一般に７０％よりも大きかった（図２１Ｄ）。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞は、ＣＤ１４７を発現している腫瘍細胞を特異的に認識した。ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫの抗腫瘍活性をＨＣＣ細胞系に対して評価した（図２１Ｅ）。合わせて、これはＣＤ１４７－ＣＡＲ再指向初代ヒト肝ＮＫ細胞がＣＤ１４７陽性標的細胞を特異的かつ選択的に殺滅することを実証している。

【０１３２】

（実施例９）

ＳｙｎＮｏｔｃｈ　ＧＰＣ３誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲ　Ｔ細胞はＧＰＣ３＋ＣＤ１４７＋ＨＣＣ細胞を選択的に標的とするが、ＧＰＣ３＋ＣＤ１４７－またはＧＣＰ３－ＣＤ１４７＋ＨＣＣ細胞を標的としない

抗ＧＰＣ３　ｓｙｎＮｏｔｃｈ誘導受容体ベクターを生成するため、ヒトＧＰＣ３抗原と特異的に結合することができる抗ＧＰＣ３（マウスＧＣ３３クローン）ｓｃＦｖを、ＧＥＮＥＷＩＺによって合成した。Ｎ末端のシグナルペプチドおよびｍｙｃタグをコードする配列を、（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド＃７９１２５）に由来するｓｙｎＮｏｔｃｈ－Ｇａｌ４ＶＰ６４誘導エレメントとオーバーラップＰＣＲによって融合した。断片を、制限エンドヌクレアーゼＮｃｏＩおよびＸｈｏＩによって消化したＳＦＧガンマレトロウイルスベクターに挿入した。

【０１３３】

抗ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙベクターの構築のため、全ＣＤ１４７－ＣＡＲエレメントを、制限エンドヌクレアーゼＭｌｕＩおよびＮｄｅＩによって消化したｐＨＲ＿Ｇａｌ４ＵＡＳ＿ｐＧＫ＿ｍＣｈｅｒｒｙ（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド＃７９１２４）に挿入した。ｍＣｈｅｒｒｙ遺伝子の発現は、ｐＧＫプロモーターの制御下にあった。この戦略において、さらなる解析および機能性評価のために、ｓｙｎＮｏｔｃｈ　ＣＡＲ改変細胞としてｅＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙ二重陽性細胞をゲーティングした。

【０１３４】

抗ＣＤ１４７ｓｙｎＮｏｔｃｈ誘導受容体ベクターを生成するため、抗ＣＤ１４７ｓｃＦｖを、ｐＨＲ＿ＰＧＫ＿抗ＣＤ１９＿ｓｙｎＮｏｔｃｈ＿Ｇａｌ４ＶＰ６４（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド＃７９１２５）に由来するｓｙｎＮｏｔｃｈ－Ｇａｌ４ＶＰ６４誘導エレメントとオーバーラップＰＣＲによって融合した。ｍｙｃタグをＮ末端に付加した。断片を、制限エンドヌクレアーゼＳａｌＩおよびＭｌｕＩによって消化したシグナルペプチドの後のＳＦＧガンマレトロウイルスベクターに挿入した。

【０１３５】

抗ＧＰＣ３－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙベクターの構築のため、抗ＧＰＣ３（マウスＧＣ３３クローン）ｓｃＦｖを含有する全ＧＰＣ３－ＣＡＲエレメントを、制限エンドヌクレアーゼＭｌｕＩおよびＮｄｅＩによって消化したｐＨＲ＿Ｇａｌ４ＵＡＳ＿ｐＧＫ＿ｍＣｈｅｒｒｙ（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド＃７９１２４）に挿入した。ｍＣｈｅｒｒｙ遺伝子の発現は、ｐＧＫプロモーターの制御下にあった。この戦略において、さらなる解析および機能性評価のために、ｓｙｎＮｏｔｃｈ　ＣＡＲ改変細胞としてｍｙｃタグ付きおよびｍＣｈｅｒｒｙ二重陽性細胞をゲーティングした。

【表２－１】
表2.プラスミド構築のためのプライマー

構築物名	プライマー名	プライマー配列	配列番号
pSFG-Myc-αCD147-synNotch-Gal4VP64	SFG-Myc-CD147.FOR	5’-TGCGT CGACG AGCAG AAACT CATCT CTGAA GAGGA TCTGG AGATG AAGCT GGAAG AGAGC GGCGG-3’	18
	融合-Notch.FOR	5’-GGCAC CAAGC TGGAG ATCAA GATCC TGGAC TACAG CTTCA CAGG-3’	19
	融合-CD147.REV	5’-CCTGT GAAGC TGTAG TCCAG GATCT TGATC TCCAG CTTGG TGCC-3’	20
	SFG-Myc-CD147.REV	5’-CTAAC GCGTT CATGA TCCGA GCATG TCCAG GTCAA AG-3’	21
pHR-Gal4UAS-GPC3-CAR-PGK-mCherry	FP-FOR-GPC3	5’- TCGACATTCGTTGGATCCGCCAGCATGGAGTTTGGTTTAAGC -3’	22
	FP-GPC-bbz-オーバーラップ	5’-CGGCT CCGGA ACCAA GCTGG AGATT AAGGA GCCCA AATCT CCTGA CAAAA CTCAC-3’	23
	RP-GPC-bbz-オーバーラップ	5’-GTGAG TTTTG TCAGG AGATT TGGGC TCCTT AATCT CCAGC TTGGT TCCGG AGCCG-3’	24
	RP-REV-bbz	5’-TAGAA TTCGT TAACC TCGAG TTAGC GAGGG GGCAG GGCCT GC-3’	25
pSFG-Myc-αGPC3-synNotch-Gal4VP64-IRES-GFP	FP -NcoI	5’-TGCCA CCATG GCAAT GGAGT TTGGT TTAAG CTGGC TGTTT TTAGT GGCCA TTTTA AAGGG CGTG-3’	26
	RP-MluI	5’-CAGGA TACGC GTCTT AATCT CCAGC TTGGT TCCGG-3’	27
	FP-Notch-MluI	5’-TTAAG ACGCG TATCC TGGAC TACAG CTTCA CAGGT G-3’	28
	RP-Notch-XhoI	5’-TCCCG CTCGA GTCAT GATCC GAGCA TGTCC AGG-3’	29
pHR-Gal4UAS-CD147-CAR-PGK-mCherry	FP-BamHI	5’-TCGTT GGATC CACGC GTCGT ACGTT AATTA ACCCG GGCAT ATGTT GACTT GCGGC CGCAA C-3’	30
	RP-BIpI	5’-CCATT GCTCA GCGGT GCTG-3’	31
	FP-MluI-147 挿入	5’-GATCC ACGCG TATGG AGTTT GGGCT GAGCT GGC-3’	32
	RP-NdeI-147 挿入	5’-GTCAA CATAT GTTAG CGAGG GGGCA GGGCC TGCAT G-3’	33
pSFG-	FP-CD147	5’-CTAGA CTGCC ATGGA GTTTG GGCTG AGCTG-3’	34

【表２－２】

構築物名	プライマー名	プライマー配列	配列番号
CD147-CAR-28bbz	挿入		
	RP-CD147 挿入	5’-GACGG TGACG TACGT CTTGA TCTCC AGCTT GGTG-3’	35

【０１３６】
正常組織へのオフ腫瘍毒性を軽減するため、ＣＤ１４７－ＣＡＲの抗腫瘍活性に対する様々な細胞の型（造血細胞を重点的に）におけるＣＤ１４７発現の密度の効果を試験した。ＨｅｐＧ２、Ｒａｊｉ、ＤａｕｄｉおよびＰＢＭＣの中でのＣＤ１４７発現を評価した。ＣＤ１４７の異なる発現レベルが観察された（図２２Ａ）。注目すべきことに、低レベルのＣＤ１４７を発現する細胞（例えばＰＢＭＣ）は、１０：１という高いエフェクター対標的比（Ｅ：Ｔ比）でＣＤ１４７－ＣＡＲ細胞を標的細胞とともに培養した場合でさえ、ＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ－９２ＭＩ細胞の細胞傷害活性を誘発しなかった（図２２Ｂ）。これらの知見は、抗ＣＤ１４７の最適化されたｓｃＦｖ配列のみが、特異的ｓｃＦｖドメインが細胞を高発現ＣＤ１４７分子と結合することを可能にし、これが低レベルのＣＤ１４７分子を発現する正常組織に対するオフ腫瘍傷害性を軽減できることを示唆している。

【０１３７】
ＣＤ１４７－ＣＡＲのオフ腫瘍毒性をさらに軽減するため、様々な腫瘍抗原に対するＣＡＲの発現を推進する転写因子を放出することができるｓｙｎＮｏｔｃｈ受容体を使用した。「論理ゲート」ｓｙｎＮｏｔｃｈ　ＣＡＲは、二重抗原陽性腫瘍細胞のみを殺滅することができ、単一腫瘍抗原陽性腫瘍細胞を殺滅することはできない。オフ腫瘍毒性を軽減するため、ＧＰＣ－３およびＣＤ１４７からなる組合せアプローチを設計した。簡単に述べると、Ｇａｌ４－ＶＰ６４細胞内転写活性化ドメインを連結する抗ＧＰＣ３特異的ｓｙｎＮｏｔｃｈ受容体をコードするＳＦＧレトロウイルスベクターを構築した。構造的に発現される増強ＧＦＰ（ｅＧＦＰ）をＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈの下流に配置して、形質導入された細胞を同定した（図２３Ａ）。

【０１３８】
ｓｙｎＮｏｔｃｈ受容体の会合の後で放出されるＧａｌ４－ＶＰ６４転写因子によって活性化され得る上流活性化配列（ＵＡＳ）プロモーターの制御下に抗ＣＤ１４７－ＣＡＲが配置されたレンチウイルスベクターを構築した。構造的に発現されるモノマー赤色蛍光タンパク質Ｃｈｅｒｒｙ（ｍＣｈｅｒｒｙ）を誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲの下流に配置して、形質導入された細胞を同定した（図２３Ａ）。

【０１３９】
ヒトＰＢＭＣを、レンチウイルスおよびレトロウイルスの両方のベクターと共形質導入した（図２３Ｃ）。二重陽性細胞は、フローサイトメトリー解析を使用してｅＧＦＰ（抗ＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈのマーカー）およびｍＣｈｅｒｒｙ（ＣＤ１４７－ＣＡＲのマーカー）によって検証した（図２３Ｄ）。形質導入されたＴ細胞の４つのサブセット（ｍＣｈｅｒｒｙ陽性のみ、ＧＦＰ陽性のみ、ＧＦＰとｍＣｈｅｒｒｙの二重陽性、およびＧＦＰとｍＣｈｅｒｒｙの二重陰性のサブセットを含む）を解析した（図２３Ｅ）。これらの形質導入されたＴ細胞をＧＰＣ３^{high}ＣＤ１４７^{low}ＨｅｐＧ２細胞系によりプライミングして、表面上におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ発現を誘導した（図２３Ｆ）。ｓｙｎＮｏｔｃｈの会合がない場合では、ＣＤ１４７－ＣＡＲ発現は観察されなかった。形質導入された初代Ｔ細胞では、ＣＡＲ発現の漏出性は観察されなかった。しかし、形質導入されたＮＫ－９２ＭＩ細胞では、約１０％のＣＡＲ発現の漏出性が観察された（データは示していない）。この観察は、ガンマセクレターゼ阻害剤（ＭＫ－０７５２、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達阻害剤）処置アッセイによって、さらに検証した（図２４）。ＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙ二重陽性Ｔ細胞におけるＣＤ１４７－ＣＡＲ発現は、ＭＫ－０７５２処置によって劇的に阻害された（図２４）。

【０１４０】
ＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙの、Ｔ細胞への共形質導入およびＧＰＣ３^{high}ＣＤ１４７^{low}ＨｅｐＧ２細胞系によるプライミングの後で、ＨＣＣ細胞系の様々なサブセットによって２時間、形質導入されたＴ細胞の活性を誘発させて、殺滅効力を評価した。ＨＣＣ細胞系の様々なサブセットは、Ｃ

ＣＤ１４７＋ＧＰＣ３^{high}ＨｅｐＧ２細胞系、ＣＤ１４７^{ko}ＧＰＣ３^{high}ＨｅｐＧ２細胞系、ＣＤ１４７＋ＧＰＣ３^{low}ＨｅｐＧ２細胞系、ＣＤ１４７^{ko}ＧＰＣ３^{low}ＨｅｐＧ２細胞系（図２３Ｇ）であった。陽性対照としてフォルボール－１２－ミリステート－１３－アセテート（ＰＭＡ）／イオノマイシン（ＩＯＮＯ）を使用した。

【０１４１】

ＣＤ１４７^{ko}ＧＰＣ３^{high}ＨｅｐＧ２細胞によってプライミングしたＧＰＣ３－ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰおよびＣＤ１４７－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙ二重陽性Ｔ細胞は、ＣＤ１４７＋ＧＰＣ３^{high}ＨｅｐＧ２細胞によって特異的に活性化することができ（図２３Ｈ）、これは様々な標的細胞系と共培養した場合にＣＤ１０７ａの表面発現によって定量された。ｍｙｃタグ付きＣＤ１４７特異的ｓｙｎＮｏｔｃｈ－ＧＦＰおよび誘導性ＧＰＣ３－ＣＡＲ－ｍＣｈｅｒｒｙをＴ細胞に共形質導入した場合にも同様の結果が得られた（図２５Ａ～２５Ｈ）。

【０１４２】

合わせて、データは、ｓｙｎＮｏｔｃｈ　ＧＰＣ３誘導性ＣＤ１４７－ＣＡＲ　Ｔ細胞のみがＧＰＣ３＋ＣＤ１４７＋ＨｅｐＧ２細胞によって特異的に活性化され得るが、ＧＰＣ３＋ＣＤ１４７－またはＧＰＣ３－ＣＤ１４７＋のＨｅｐＧ２細胞によっては活性化されないことを示唆している。これらの活性化されたＣＤ１４７－ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ＣＤ１４７＋ＧＰＣ３＋ＨｅｐＧ２細胞を殺滅することができるが、ＣＤ１４７－ＧＰＣ３＋ＨｅｐＧ２細胞を殺滅することができない（図２６Ａ～２６Ｄ）。

【０１４３】

本開示の原理を適用することができる多くの可能な実施形態に鑑み、説明した実施形態は例に過ぎず、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきでないことを認識されたい。むしろ、本発明の範囲は以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって本発明者らは、これらの請求項の範囲および精神に含まれる全てを我々の発明として主張する。

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）それぞれ配列番号２のアミノ酸位置２６～３２、５２～５９、および１０１～１０４の可変重鎖（ＶＨ）ドメイン相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３のアミノ酸配列、ならびにそれぞれ配列番号２のアミノ酸位置１５５～１６５、１８１～１８７、および２２０～２２８の可変軽鎖（ＶＬ）ドメインＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を含む、ＣＤ１４７に特異的に結合する抗原結合ドメイン、

（ｂ）ヒンジドメイン、

（ｃ）膜貫通ドメイン、ならびに

（ｄ）１つまたは複数の共刺激分子細胞内ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内ドメイン

を含む、キメラ抗原受容体。

（項目２）

前記抗原結合ドメインが、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する、項目１に記載のキメラ抗原受容体。

（項目３）

前記抗原結合ドメインが、配列番号２のアミノ酸配列を含む、項目２に記載のキメラ抗原受容体。

（項目４）

前記抗原結合ドメインが、高レベルの表面ＣＤ１４７を発現する細胞に結合する、項目１から３のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

（項目５）

前記１つまたは複数の共刺激分子細胞内ドメインが、ＣＤ２８および４－１ＢＢの細胞内ドメインを含む、項目１から４のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。

（項目６）

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインを含む、項目１から５のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
（項目７）
前記ヒンジドメインが、ＩｇＧ１ヒンジドメインを含む、項目１から６のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
（項目８）
前記膜貫通ドメインが、ＣＤ２８膜貫通ドメインまたはＣＤ８ａ膜貫通ドメインである、項目１から７のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
（項目９）
配列番号５のアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目１から８のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１０）
配列番号５のアミノ酸配列を含む、項目９に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１１）
１つまたは複数の追加の抗原結合ドメインをさらに含む、項目１から１０のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１２）
前記１つまたは複数の追加の抗原結合ドメインが、グリピカン３、アルファ－フェトプロテイン、またはムチン－１に特異的に結合する、項目１１に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１３）
誘導性自殺分子をさらに含む、１から１２のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１４）
前記自殺分子が、カスパーゼ９を含む、項目１３に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１５）
前記自殺分子の発現が、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、またはラパマイシンによって誘導可能である、項目１３または項目１４に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１６）
配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目１３または項目１４に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１７）
配列番号７のアミノ酸配列を含む、項目１６に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１８）
サイトカイン受容体細胞内ドメインをさらに含む、項目１から１７のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体。
（項目１９）
前記サイトカイン受容体細胞内ドメインが、インターロイキン－１５受容体細胞内ドメイン、インターロイキン－１２受容体細胞内ドメイン、またはインターロイキン１８受容体細胞内ドメインである、項目１８に記載のキメラ抗原受容体。
（項目２０）
項目１から１９のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体をコードする核酸分子。
（項目２１）
配列番号４、配列番号６、または配列番号１４の核酸配列を含む、項目２０に記載の核酸分子。
（項目２２）
項目２０または項目２１に記載の核酸分子を含むベクター。
（項目２３）
Ｂ型肝炎ウイルスまたはＣ型肝炎ウイルスを標的とする第２のキメラ抗原受容体をコードする核酸分子をさらに含む、項目２２に記載のベクター。
（項目２４）
前記キメラ抗原受容体核酸分子に作動可能に連結された誘導性プロモーターまたはエン

ハンサーの核酸分子をさらに含む、項目２２に記載のベクター。
（項目２５）
前記エンハンサー核酸分子が、Ｇａｌ４上流活性化配列である、項目２４に記載のベクター。
（項目２６）
配列番号１５の核酸配列を含む、項目２５に記載のベクター。
（項目２７）
ウイルスベクターである、項目２２から２６のいずれか一項に記載のベクター。
（項目２８）
前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである、項目２７に記載のベクター。
（項目２９）
それぞれ配列番号２のアミノ酸位置２６～３２、５２～５９、および１０１～１０４の可変重鎖（ＶＨ）ドメイン相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３のアミノ酸配列、ならびにそれぞれ配列番号２のアミノ酸位置１５５～１６５、１８１～１８７、および２２０～２２８の可変軽鎖（ＶＬ）ドメインＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を含む、ＣＤ１４７に特異的に結合する一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）。
（項目３０）
前記アミノ酸配列が、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する、項目２９に記載のｓｃＦｖ。
（項目３１）
前記アミノ酸配列が、配列番号２のアミノ酸配列を含む、項目３０に記載のｓｃＦｖ。
（項目３２）
高レベルの表面ＣＤ１４７を発現する細胞に結合する、項目２９から３１のいずれか一項に記載のｓｃＦｖ。
（項目３３）
項目２９から３２のいずれか一項に記載のｓｃＦｖをコードする核酸分子。
（項目３４）
配列番号１の核酸配列を含む、項目３３に記載の核酸分子。
（項目３５）
項目３３または項目３４に記載の核酸配列を含むベクター。
（項目３６）
項目１から１９のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体を発現する、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
（項目３７）
項目２０、項目２１、項目３３、もしくは項目３４に記載の核酸、または項目２２から２８もしくは項目３５のいずれか一項に記載のベクターを含む、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
（項目３８）
前記誘導性プロモーターまたはエンハンサーのアクチベーターをコードする核酸分子をさらに含む、項目３７に記載のＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
（項目３９）
前記アクチベーターをコードする前記核酸が、抗ＧＰＣ３特異的結合剤をさらにコードする、項目３８に記載のＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。
（項目４０）

誘導性プロモーターまたはエンハンサーのアクチベーターをコードする核酸分子および前記誘導性プロモーターまたはエンハンサーに作動可能に連結された抗ＧＰＣ３キメラ抗原受容体を含むベクターをさらに含む、項目２４または項目３５に記載のベクターを含むＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。

（項目４１）

抗ＧＰＣキメラ抗原受容体を含む前記ベクターが、配列番号１６の核酸配列を含む、項目４０に記載のＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。

（項目４２）

末梢血、臍帯血、リンパ節、骨髄、腫瘍組織、または細胞系から得られる、項目３６から４１のいずれか一項に記載のＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージ。

（項目４３）

ＮＫ－９２細胞またはＮＫ－９２ＭＩ細胞である、項目３６から４２のいずれか一項に記載のＮＫ細胞。

（項目４４）

ＣＤ１４７－ＣＡＲ－Ｔ細胞またはＣＤ１４７－ＣＡＲ－ＮＫ細胞を産生する方法であって、項目２２から２８のいずれか一項に記載のベクターをＴ細胞またはＮＫ細胞に形質導入またはトランスフェクトすることを含む方法。

（項目４５）

がんを有する対象を処置する方法であって、有効量の項目３６から４３のいずれか一項に記載のＴ細胞、ＮＫ細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、二重陰性Ｔ（ＤＮＴ）細胞、好中球、またはマクロファージを前記対象に投与することを含む方法。

（項目４６）

前記対象が、ＣＤ１４７を発現するがんを有する、項目４５に記載の方法。

（項目４７）

前記対象が、肝細胞癌、神経芽腫、乳がん、膵がん、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、結腸直腸がん、肺がん、黒色腫、腎細胞癌、肉腫、または鼻咽頭癌を有する、項目４５または項目４６に記載の方法。

（項目４８）

手術、放射線、化学療法、追加の免疫療法、またはそれらの２つもしくはそれより多い組合せの少なくとも１つを用いて前記対象を処置することをさらに含む、項目４５から４７のいずれか一項に記載の方法。

【図面】

【図１－１】

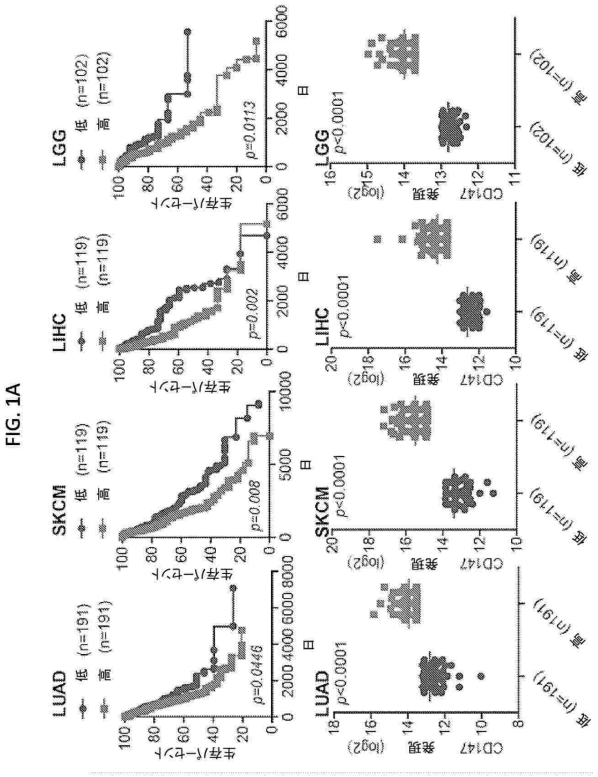


FIG. 1A

【図１－２】

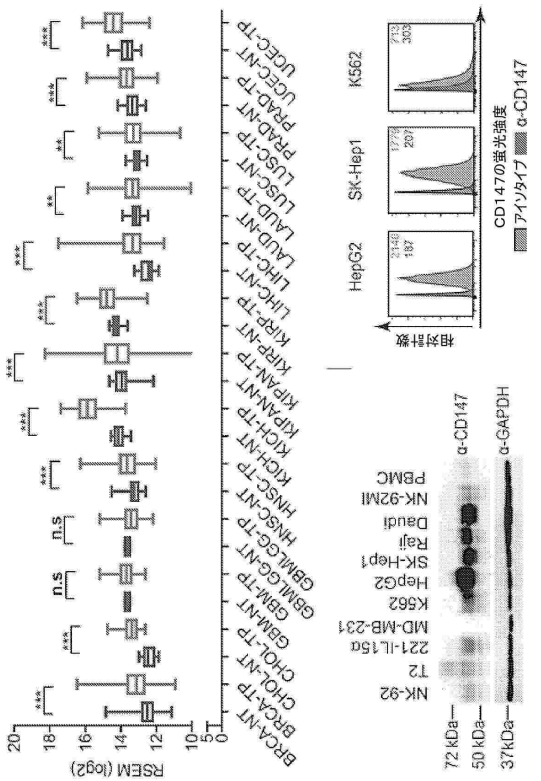


FIG. 1B

FIG. 1C

FIG. 1D

【図１－３】

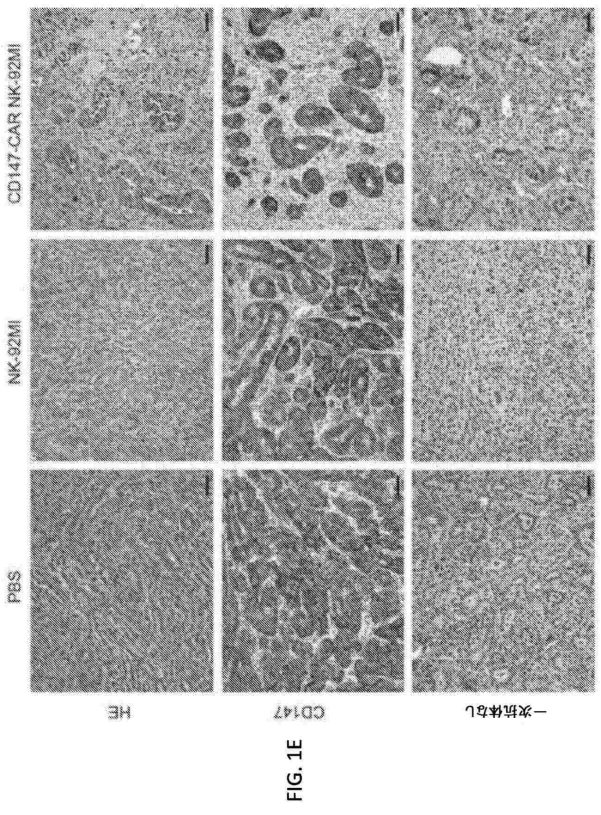


FIG. 1E

【図２－１】

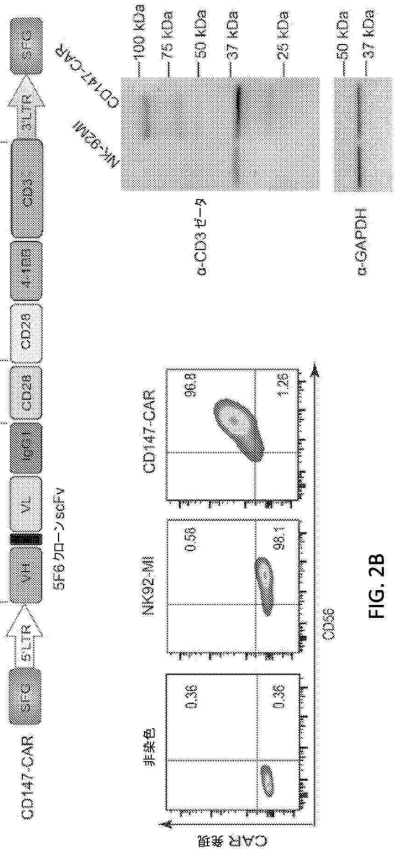


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

【図２－２】

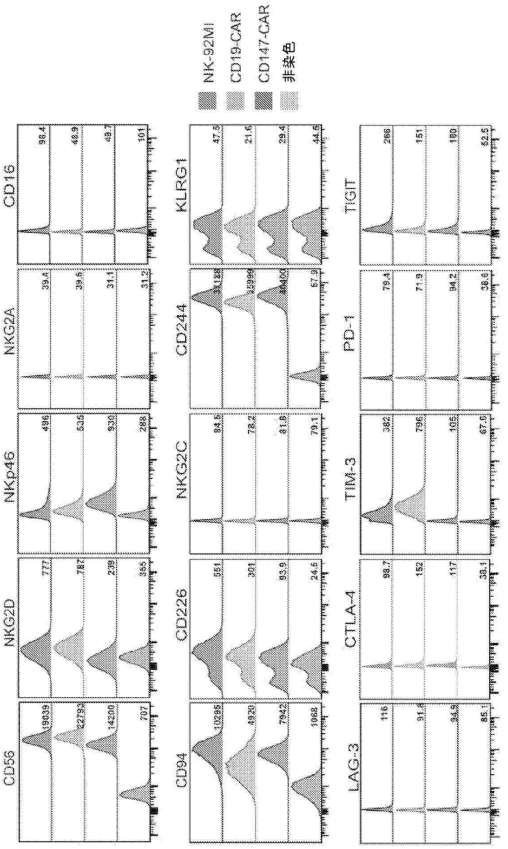


FIG. 2D

【図２－３】

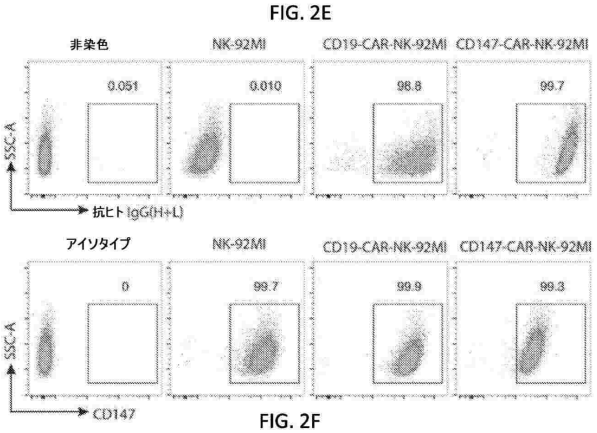


FIG. 2E

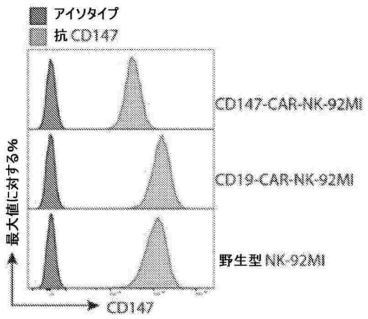


FIG. 2F

FIG. 2G

【図３－１】

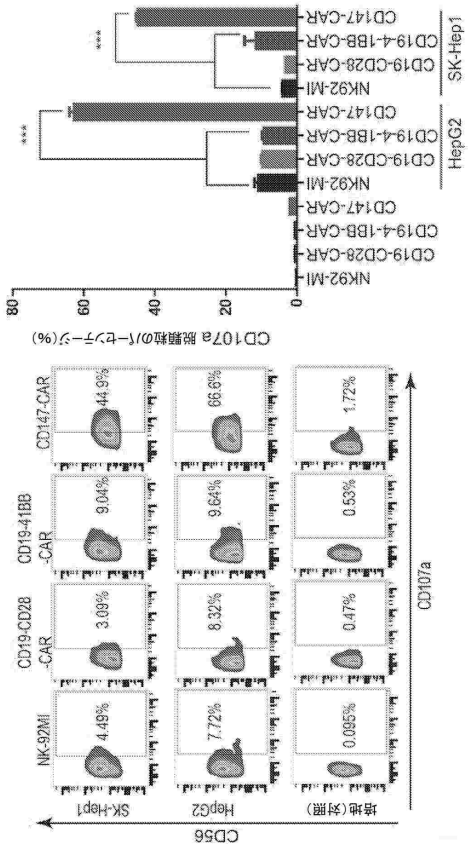


FIG. 3B

FIG. 3A

【図３－２】

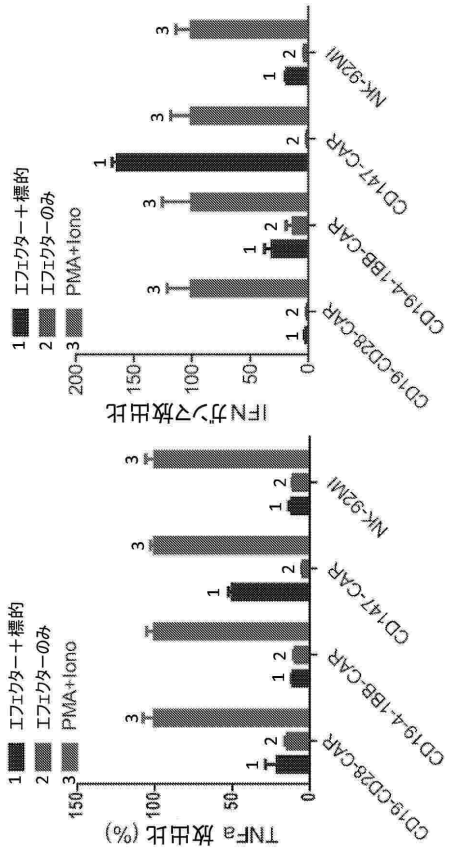


FIG. 3D

FIG. 3C

【図４】

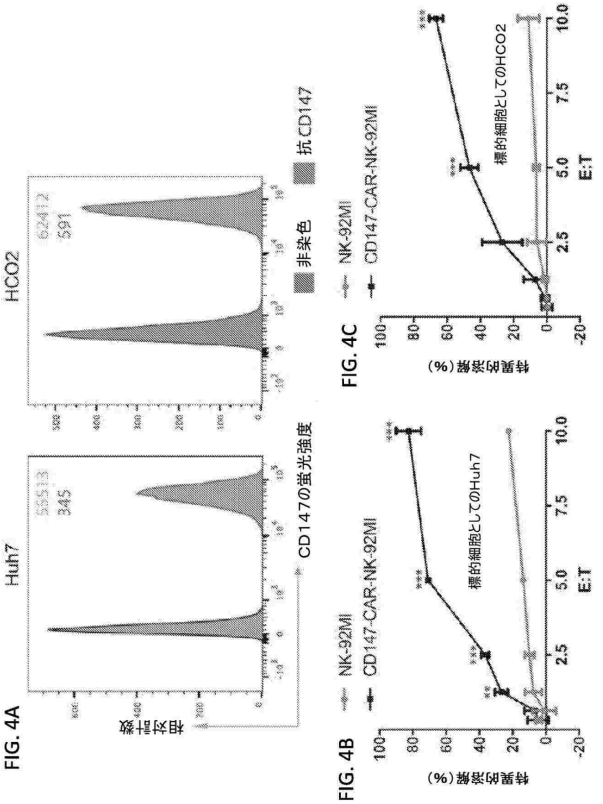


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

【図５－１】

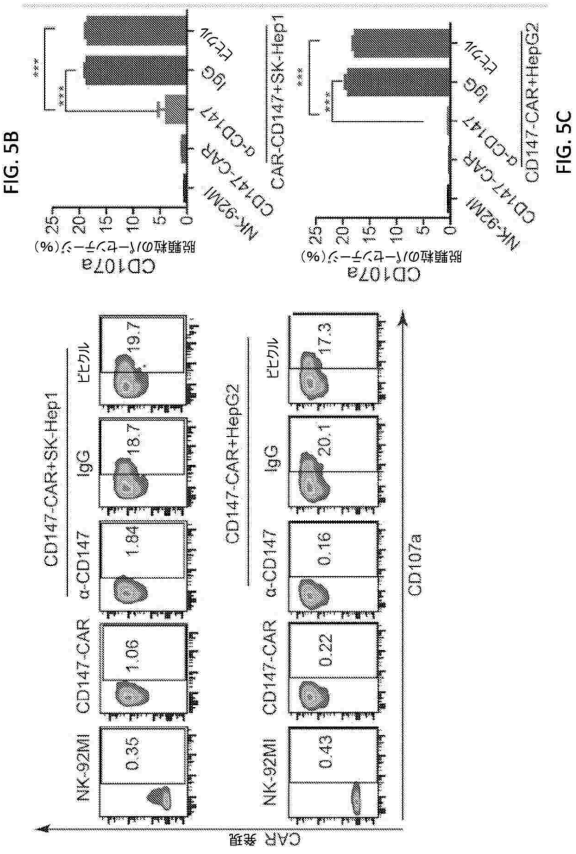


FIG. 5B

FIG. 5C

FIG. 5A

【図５－２】

FIG. 5D

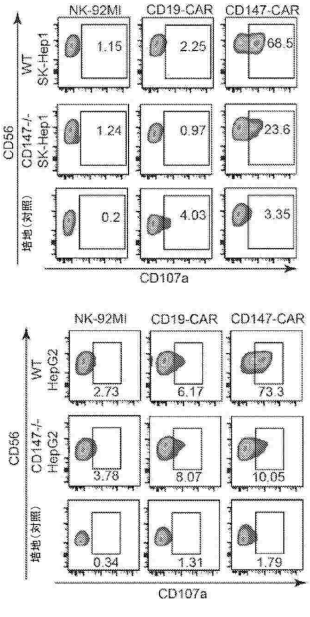


FIG. 5F

FIG. 5E

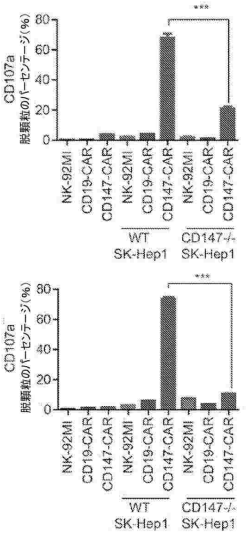
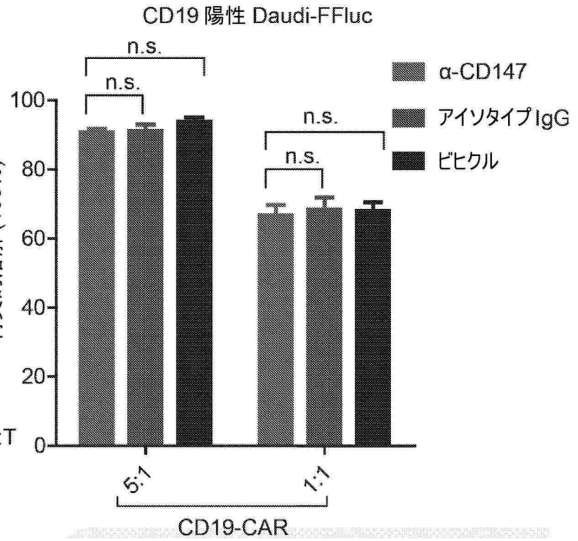


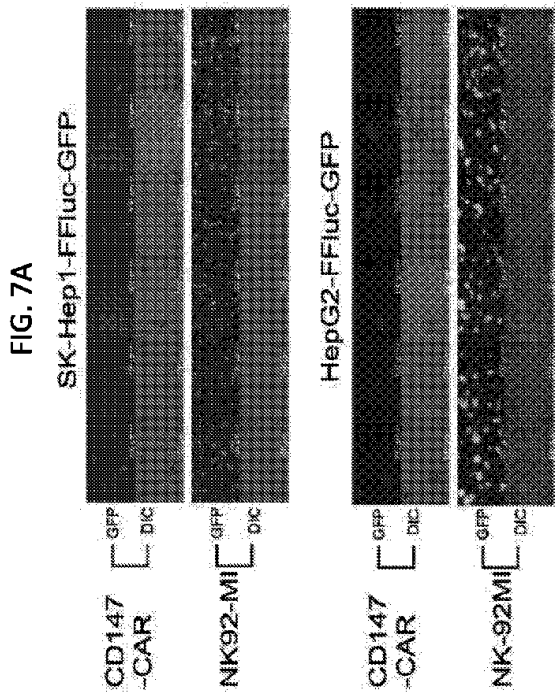
FIG. 5G

【図６】

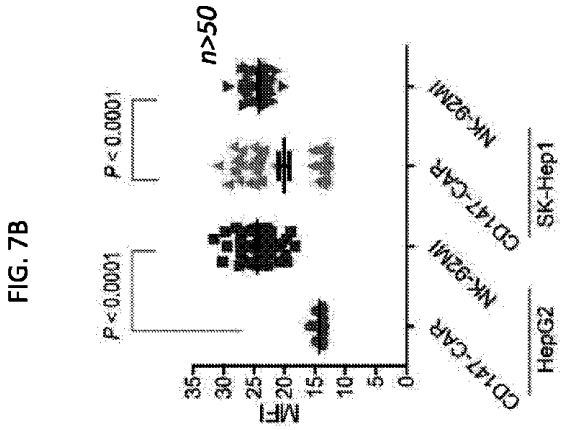
FIG. 6



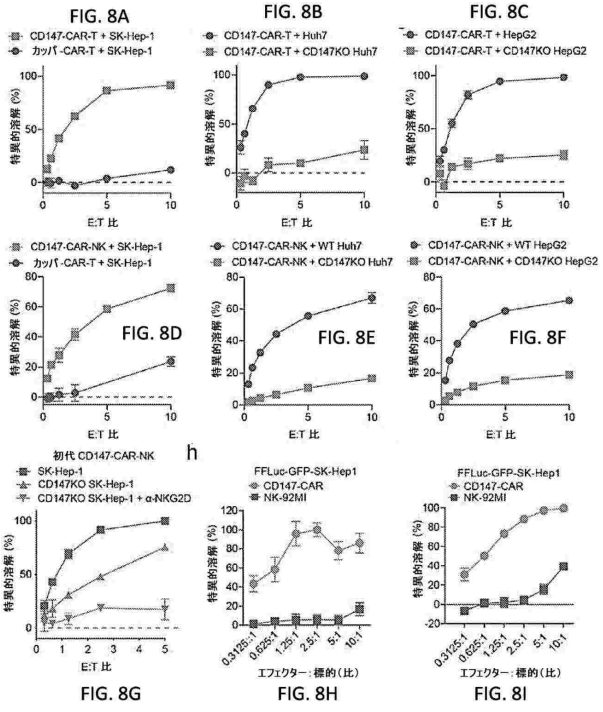
【図７Ａ】



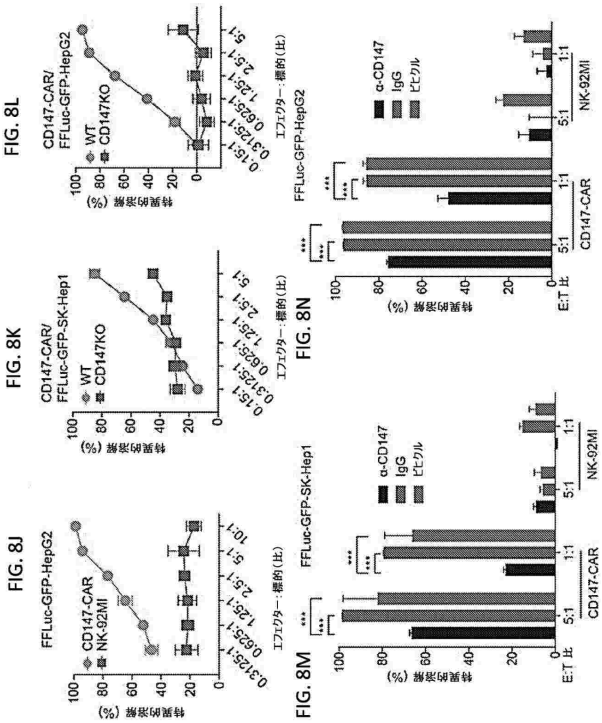
【図７Ｂ】



【図８－１】



【図８－２】



【図９】

FIG. 9A

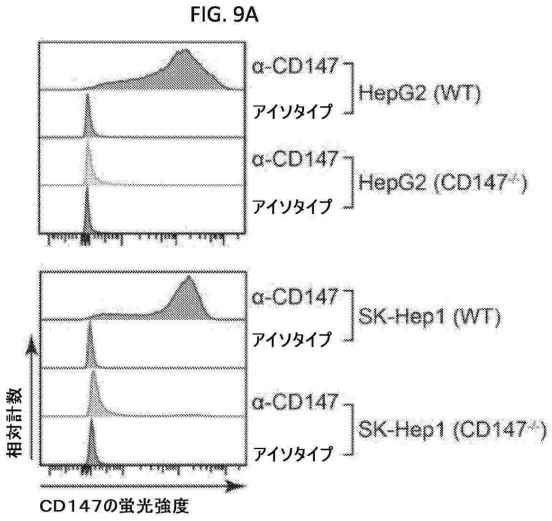
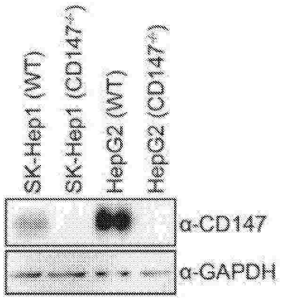


FIG. 9B



【図１０】

FIG. 10B

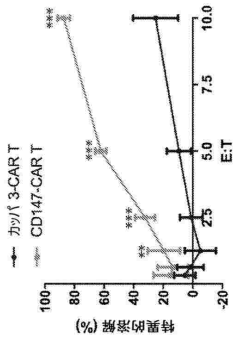


FIG. 10A

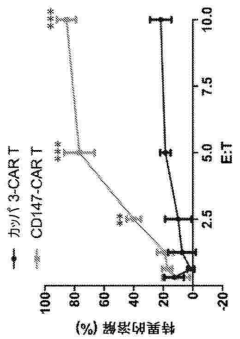
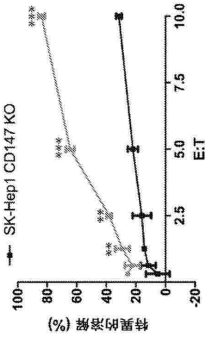


FIG. 10C



【図１１】

FIG. 11B

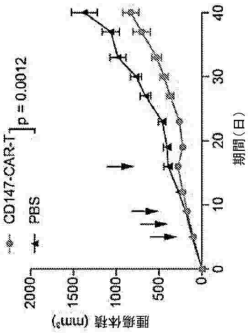


FIG. 11D

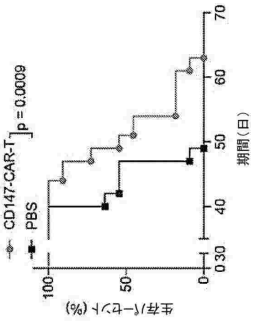


FIG. 11A

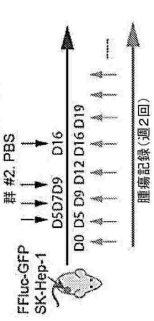
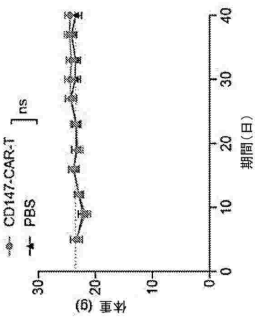


FIG. 11C



【図１２】

FIG. 12B

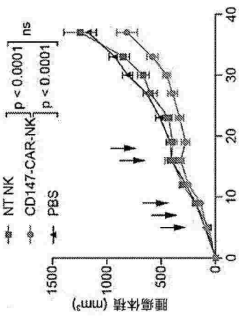


FIG. 12D

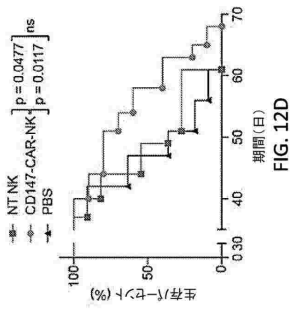


FIG. 12A

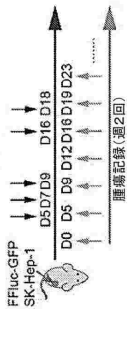
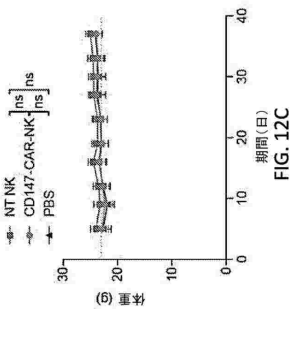


FIG. 12C



【図１３】

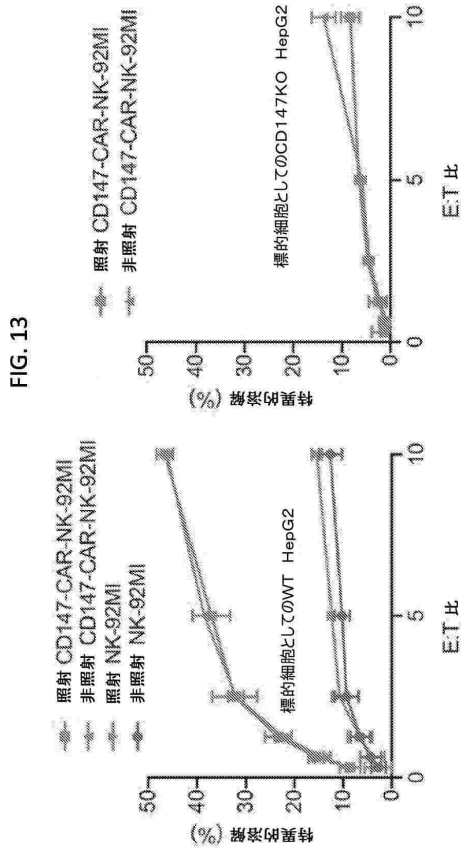
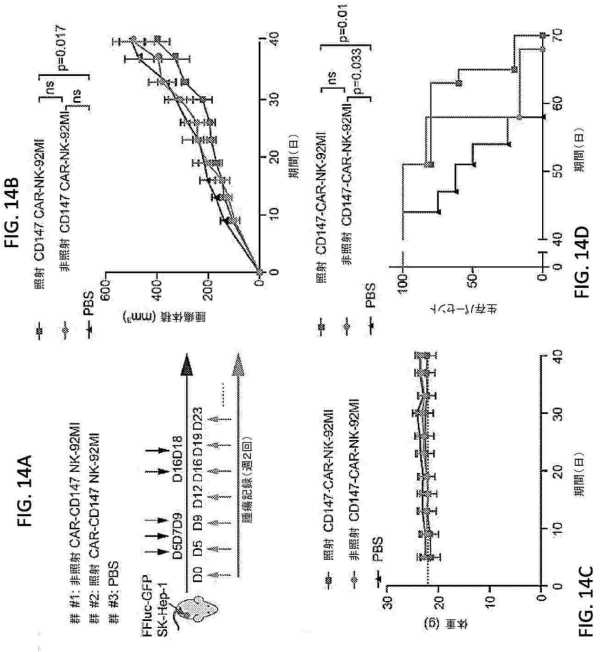
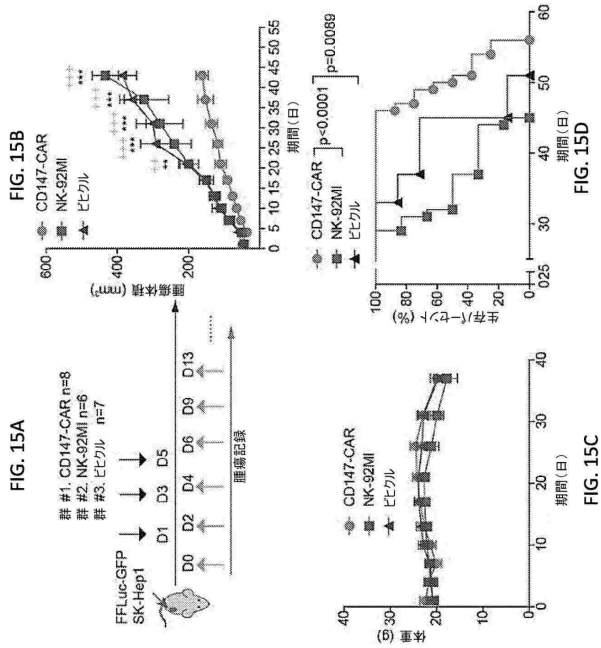


FIG. 13

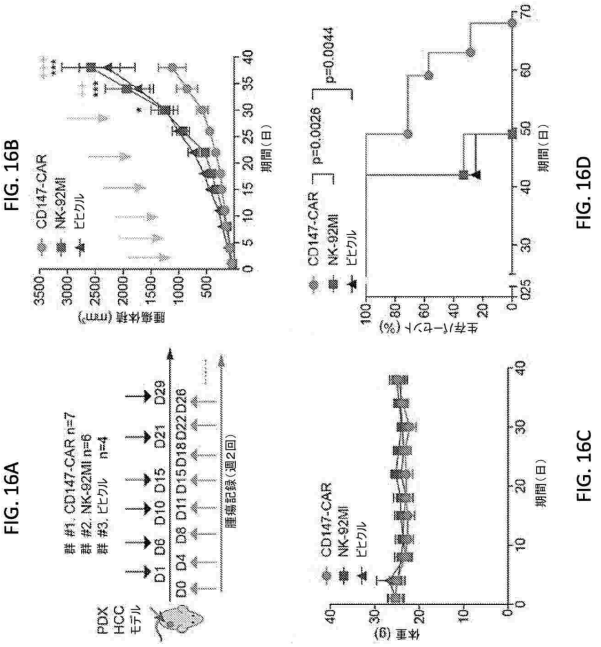
【図１４】



【図１５】



【図１６】



【図１７】

FIG. 17A

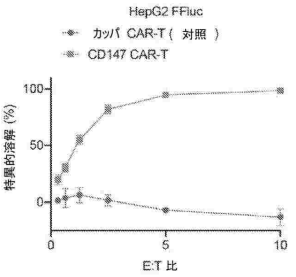
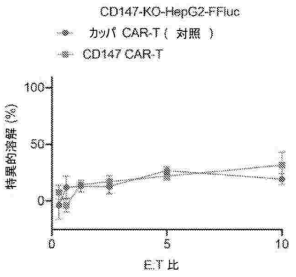


FIG. 17B



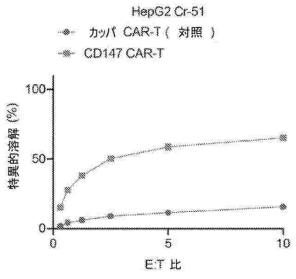


FIG. 17C

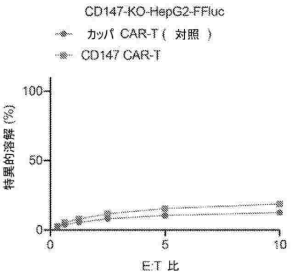


FIG. 17D

【図１８－１】

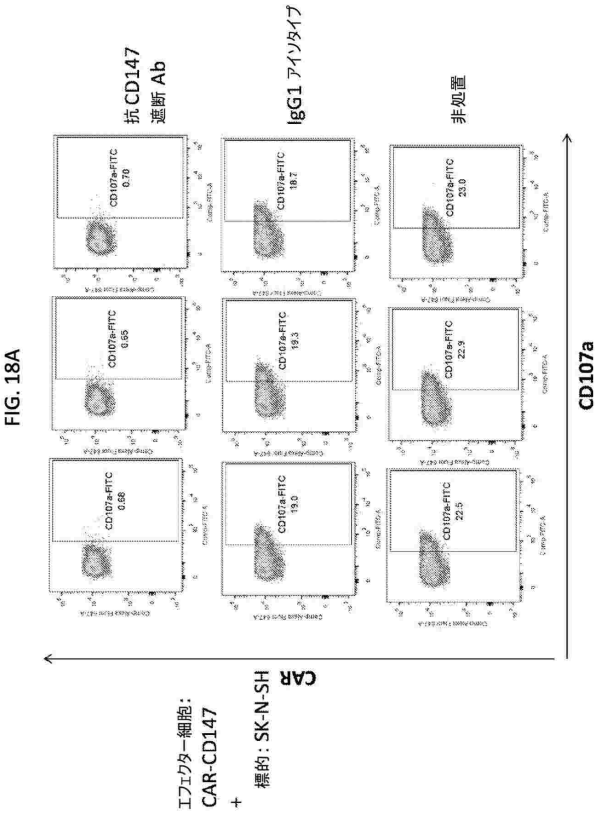
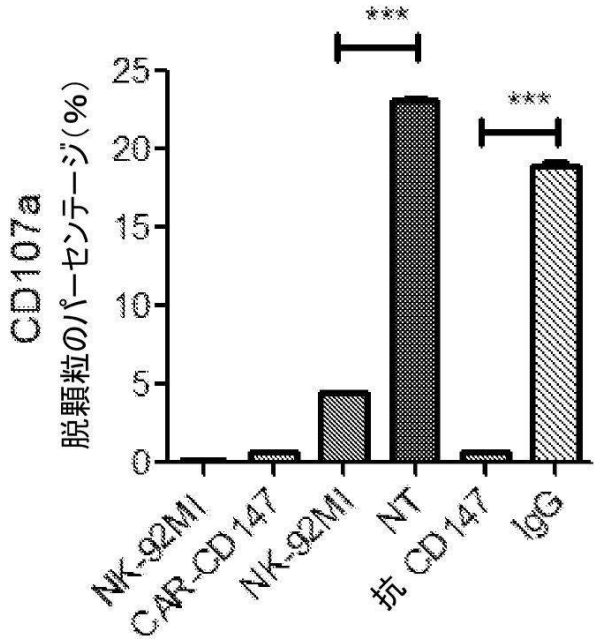


FIG. 18A

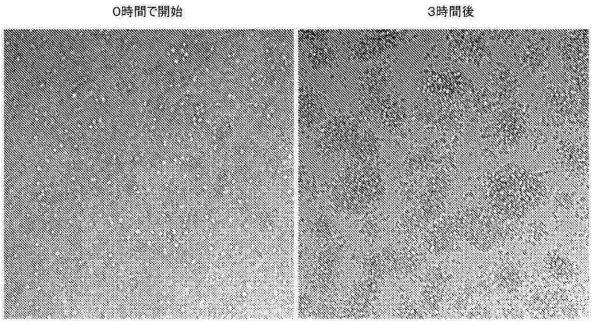
【図１８－２】

FIG. 18B



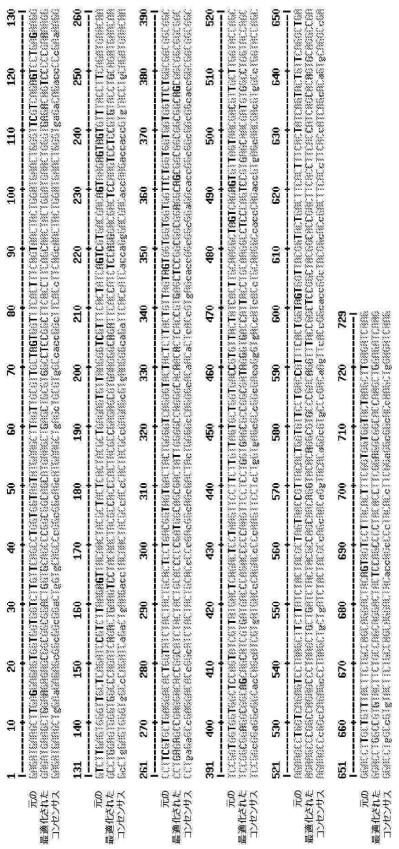
【図１９】

FIG. 19



【図２０】

FIG. 20



【図２１－１】

FIG. 21A

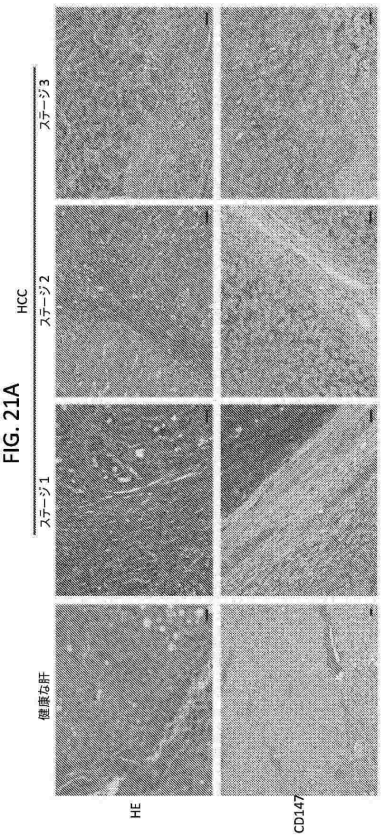


FIG. 21C

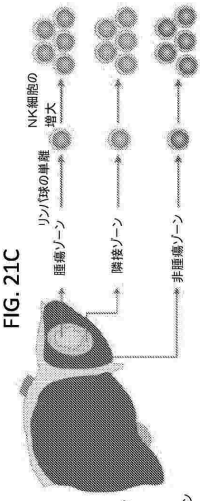
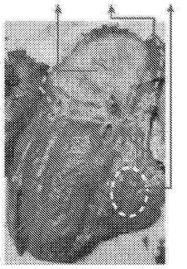
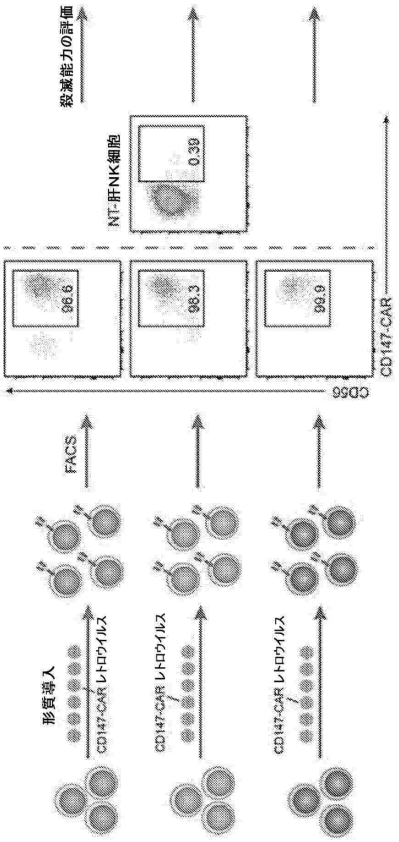


FIG. 21B



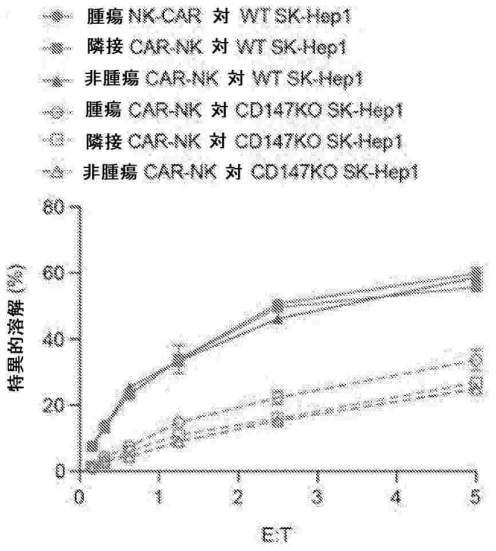
【図２１－２】

FIG. 21D



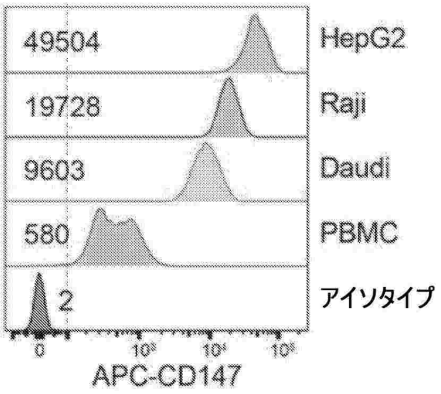
【図２１－３】

FIG. 21E



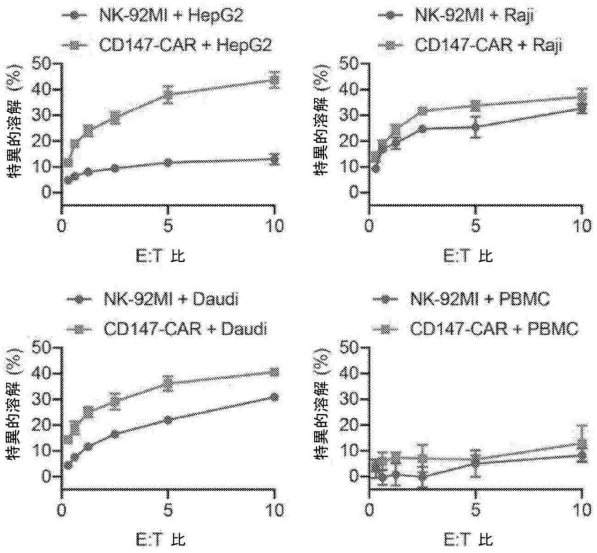
【図２２－１】

FIG. 22A



【図２２－２】

FIG. 22B



【図２３－１】

FIG. 23A

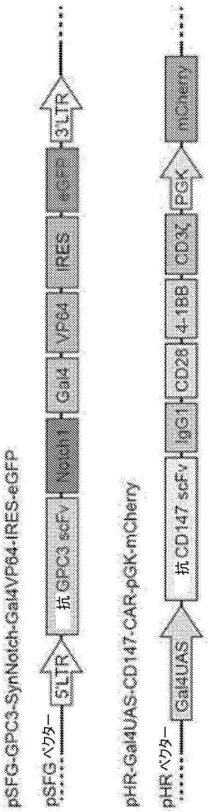
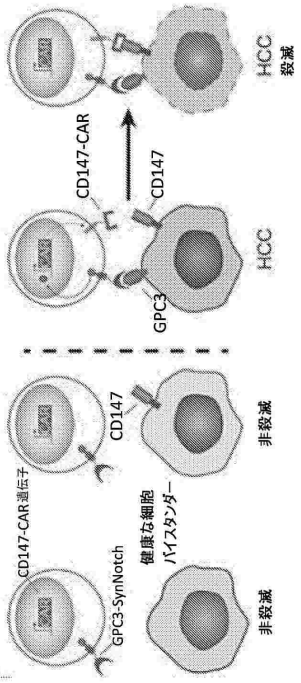


FIG. 23B



【図２３－２】

FIG. 23C

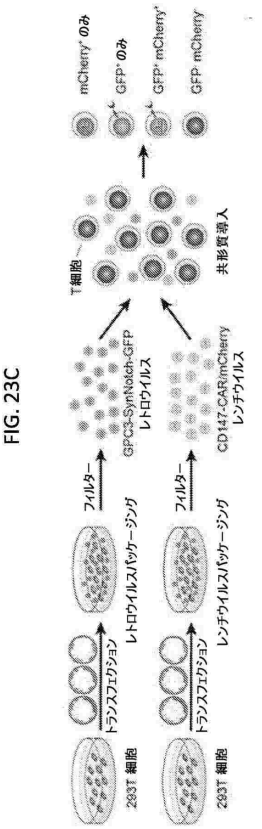
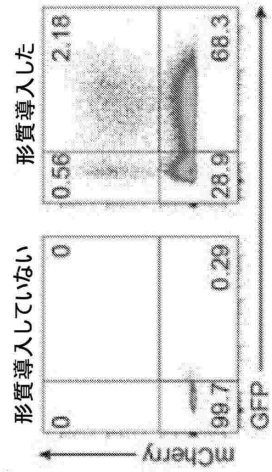


FIG. 23D



【図２３－３】

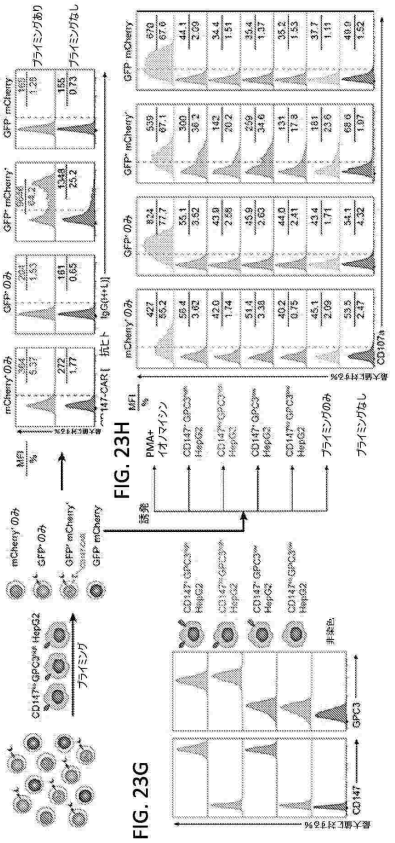


FIG. 23F

FIG. 23E

FIG. 23H

FIG. 23G

【図２４】

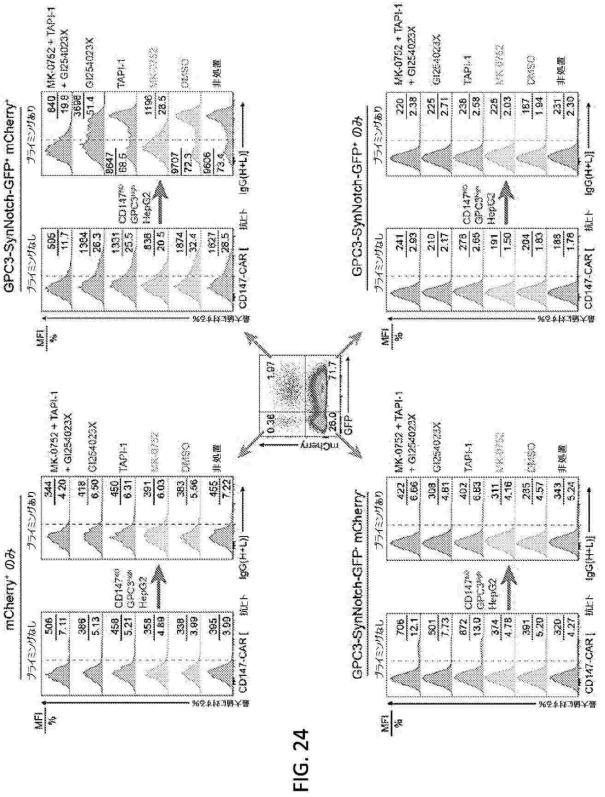


FIG. 24

【図２５－１】

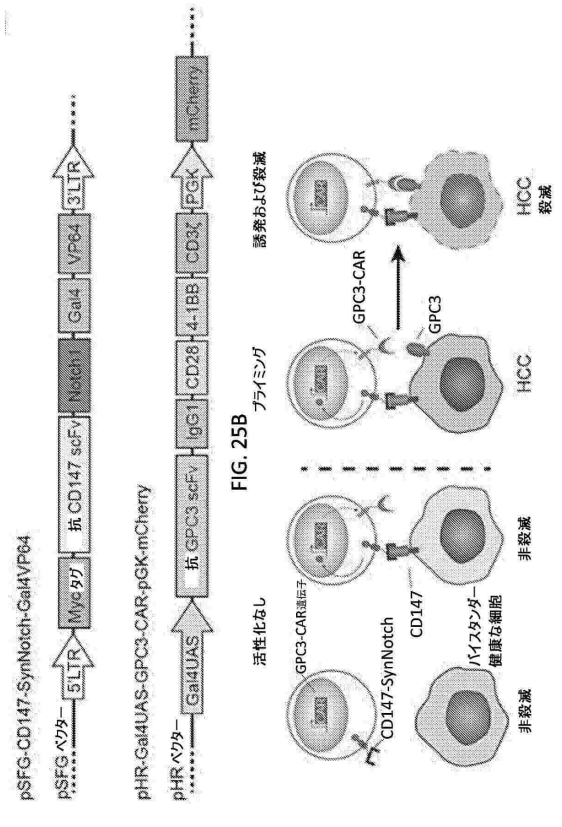


FIG. 25A

FIG. 25B

【図２５－２】

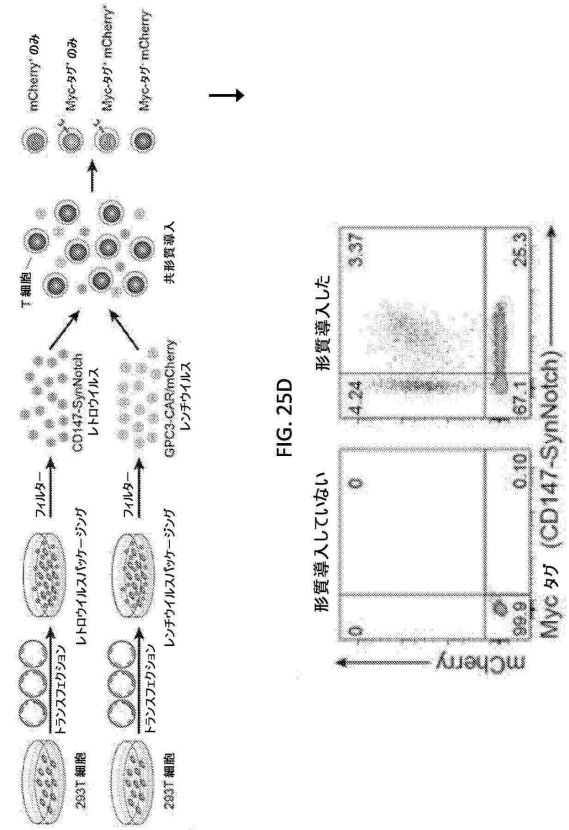
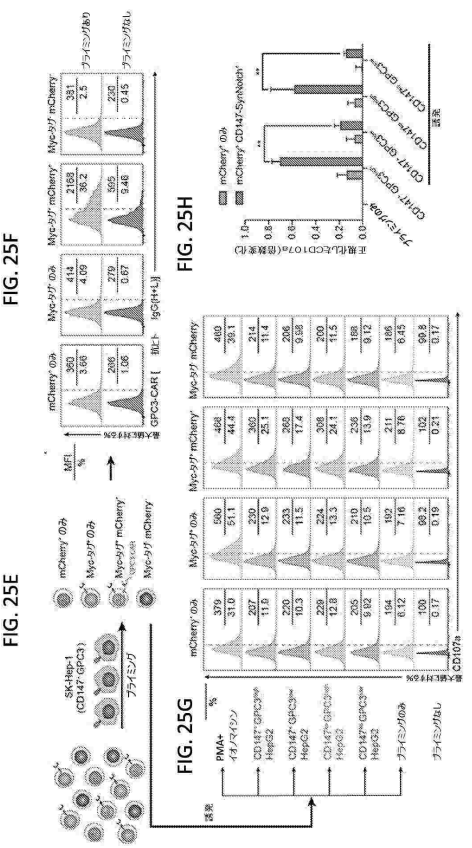


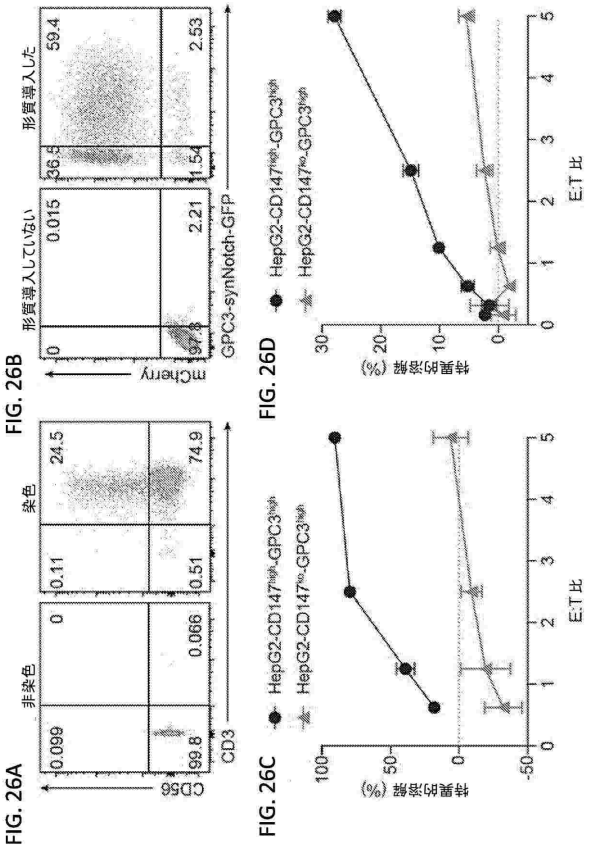
FIG. 25C

FIG. 25D

【図２５－３】



【図２６】



【配列表】

0007602803000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			
C12N 15/86 (2006.01)		C12N	15/86		Z
C12N 15/867 (2006.01)		C12N	15/867		Z
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10		
C12N 5/0783 (2010.01)		C12N	5/0783		
C12N 5/0786 (2010.01)		C12N	5/0786		
C12N 5/0787 (2010.01)		C12N	5/0787		
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00		
A61P 35/02 (2006.01)		A61P	35/02		
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	121	
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	45/00		
A61K 35/17 (2015.01)		A61K	35/17		
A61K 35/15 (2015.01)		A61K	35/15		
A61K 35/13 (2015.01)		A61K	35/13		
A61K 35/51 (2015.01)		A61K	35/51		
A61K 35/28 (2015.01)		A61K	35/28		
A61K 35/26 (2015.01)		A61K	35/26		
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62		Z
C07K 14/705 (2006.01)		C07K	14/705		ZNA

弁護士　山本 健策

(72)発明者　リウ， ドンファン

アメリカ合衆国 ニュージャージー ０８９０１， ニュー ブランスウィック， サマーセット ストリート ８３， ラトガーズ， ザ ステイト ユニバーシティ オブ ニュー ジャージー 気付

審査官　齋藤 光介

(56)参考文献　特表２０１２－５０６３６９（ＪＰ，Ａ）

国際公開第２０１８／１６５６１９（WO，Ａ１）

特表２０１８－５１８９７２（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)

Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０

Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００

ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）