

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-530238
(P2021-530238A)

(43) 公表日 令和3年11月11日(2021.11.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 7
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2021-503023 (P2021-503023)
 (86) (22) 出願日 令和1年7月19日 (2019.7.19)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年3月17日 (2021.3.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/042707
 (87) 国際公開番号 W02020/018973
 (87) 国際公開日 令和2年1月23日 (2020.1.23)
 (31) 優先権主張番号 62/700, 942
 (32) 優先日 平成30年7月20日 (2018.7.20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 507189666
 デューク ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
 7705, ダラム, アーウィン ロード
 2812 스위트 306
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 リー, チージン
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27
 705, ダラム, アーウィン ロ
 ド 2812, 스위트 306, デ
 ユーク ユニバーシティ 気付

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんの処置のための抗LYPD3 CAR T細胞療法

(57) 【要約】

本開示は、LYPD3を特異的に結合するキメラ抗原レセプター(CAR)分子に関し、LYPD3に特異的なCAR T細胞由来エフェクター細胞を含む組成物、ならびにこれらの作製および使用方法も提供する。本発明は、例えば、キメラ抗原レセプター(CAR)であって、ここで前記CARは、(1)LYPD3に特異的に結合する細胞外結合ドメイン；(2)膜貫通ドメイン；および(3)少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインを含むCARを提供する。

FIG. 7



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原レセプター（CAR）であって、ここで前記CARは、

- （1）LYPD3に特異的に結合する細胞外結合ドメイン；
- （2）膜貫通ドメイン；および
- （3）少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメイン

を含むCAR。

【請求項 2】

前記細胞外結合ドメインは、LYPD3に特異的に結合する単鎖可変領域フラグメント（scFv）を含む、請求項1に記載のCAR。

10

【請求項 3】

前記scFvは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む、請求項2に記載のCAR。

【請求項 4】

前記膜貫通ドメインは、T細胞レセプターの鎖、T細胞レセプターの鎖、T細胞レセプターの鎖、CD3-、CD3-、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、またはCD154である分子に由来するアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれかに記載のCAR。

【請求項 5】

前記膜貫通ドメインは、CD8に由来するアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれかに記載のCAR。

20

【請求項 6】

前記膜貫通ドメインは、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む、請求項1～5のいずれかに記載のCAR。

【請求項 7】

前記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD2、CD3-、CD3-、CD3-、CD3-、CD5、CD7、CD22、CD27、CD28、CD30、CD40、CD66d、CD79a、CD79b、4-1BB（CD137）、OX40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、LIGHT、NKG2C、B7-H3、FcR-、FcR-、またはTCR-である分子に由来する少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、請求項1～6のいずれかに記載のCAR。

30

【請求項 8】

前記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD3-に由来するアミノ酸配列を含む、請求項1～7のいずれかに記載のCAR。

【請求項 9】

前記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む、請求項1～8のいずれかに記載のCAR。

【請求項 10】

前記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD28に由来するアミノ酸配列を含む、請求項1～7のいずれかに記載のCAR。

40

【請求項 11】

前記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む、請求項1～7および10のいずれかに記載のCAR。

【請求項 12】

前記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、4-1BBに由来するアミノ酸配列を含む、請求項1～7のいずれかに記載のCAR。

【請求項 13】

50

前記少なくとも 1 個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号 13 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 7 および 12 のいずれかに記載の C A R。

【請求項 14】

前記 C A R は、3 個の細胞質シグナル伝達ドメインを含み、ここで第 1 の細胞質シグナル伝達ドメインは、C D 28 に由来し、第 2 の細胞質シグナル伝達ドメインは、C D 3 に由来し、第 3 の細胞質シグナル伝達ドメインは、4 - 1 B B に由来する、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の C A R。

【請求項 15】

前記第 1 の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号 14 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含み、前記第 2 の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号 12 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含み、前記第 3 の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号 13 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の C A R。

10

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のキメラ抗原レセプター (C A R) を含む活性化 T 細胞の集団。

【請求項 17】

前記活性化 T 細胞の集団は、L Y P D 3 を発現するがんの処置のために治療上有効な量で存在する、請求項 16 に記載の集団。

20

【請求項 18】

請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の C A R を発現する活性化 T 細胞の集団、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 19】

前記薬学的に受容可能なキャリアは、活性化 T 細胞の集団の維持を支援する、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

【請求項 20】

少なくとも 1 つの治療剤をさらに含む、請求項 18 または 19 に記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の C A R をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

30

【請求項 22】

L Y P D 3 を発現するがん罹患している被験体において T 細胞応答を誘導する方法であって、ここで前記方法は、前記被験体に、請求項 16 もしくは 17 に記載の活性化 T 細胞の集団または請求項 18 ~ 20 のいずれかに記載の薬学的組成物の治療上有効な量を投与する工程を包含し、ここで前記投与は、前記がんに対する抗腫瘍応答を誘導する、方法。

【請求項 23】

前記がんは、肺がん、頭頸部がん、子宮頸がん、尿路上皮がん、黒色腫、乳がん、前立腺がん、結腸がん、腎細胞がん、卵巣がん、神経芽腫、横紋筋肉腫、白血病、およびリンパ腫からなる群より選択される、請求項 22 に記載の方法。

40

【請求項 24】

請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のキメラ抗原レセプター (C A R) を発現する活性化 T 細胞の集団を調製する方法であって、ここで前記方法は、

(1) 単離された T 細胞を、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の C A R をコードする核酸でトランスフェクトまたは形質導入する工程；および

(2) トランスフェクションまたは形質導入の後に、前記 C A R 発現 T 細胞を拡大する工程であって、ここで前記 T 細胞は、I L - 2、ならびに / または C D 3 抗体および C D 28 抗体の存在下で培養することによって拡大される工程、

を包含する方法。

50

【請求項 25】

前記単離された T 細胞は、哺乳動物から単離される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記哺乳動物はヒトである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記ヒトは、LYPD3 を発現するがん罹患している被験体である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記単離された T 細胞は、LYPD3 を発現するがん罹患している被験体に対して自家である、請求項 24 ~ 28 のいずれかに記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権

本出願は、2018年7月20日出願の米国仮特許出願第62/700,942号（これは、その全体において本明細書に参考として援用される）に基づく利益を主張する。

【0002】

発明の背景

発明の分野

本開示は、がんを処置する方法を提供する。より詳細には、本開示は、LYPD3 を標的とするキメラ抗原レセプター（CAR）を含む組成物およびLYPD3 に特異的なCARを発現するT細胞を含む組成物、ならびにこれらの作製および使用方法を提供する。

20

【背景技術】

【0003】

関連技術の説明

過去10年間に、キメラ抗原レセプター（CAR）T細胞療法は、血液の種々のがんの成功裡の処置として出現した。この治療戦略は、腫瘍細胞の表面に発現される抗原性分子を選択的に認識し、免疫系活性化、腫瘍細胞クリアランス、および改善された患者の転帰を生じるために、T細胞のエキソピボ操作を含む。白血病およびリンパ腫の多くのタイプの処置が成功しているが、CAR T細胞有効性は、固形腫瘍の処置に関しては制限されているままである。1つの固形腫瘍タイプである扁平上皮癌は、頭頸部、食道、肺、膀胱、および子宮頸部に端を発するがんを含み、その大部分は現在、有効な処置がない。

30

【0004】

Ly6/PLAURドメイン含有タンパク質3（LYPD3）は、潜在的CAR T細胞標的として識別されており、LYPD3は、多数の扁平上皮癌サブタイプにおいて発現されている。LYPD3は、機能がほとんど不明の細胞表面タンパク質であるが、以前の研究は、LYPD3を、細胞マトリクス相互作用および腫瘍の進行に関係あるとしていた。重要なことには、LYPD3発現には極性があり、その結果、それは、扁平上皮癌の侵襲的先端部において過剰発現され、従って、標的とされたLYPD3の除去は、正常細胞

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

要旨

以下の詳細な説明においてさらに記載される概念の選択を紹介するために、要旨が提供される。この要旨は、特許請求される主題の重要なまたは本質的な特徴を識別することは意図されず、特許請求される主題の範囲を限定することにおける一助として使用されることも意図されない。

【0006】

50

CAR T細胞療法は、患者のT細胞が単離され、実験室において改変され、その結果、その改変されたT細胞ががん細胞を攻撃する処置の1タイプである。単離されたT細胞は、患者のがん細胞上である特定のタンパク質（すなわち、LYPD3）に結合するキメラ抗原レセプター（CAR）を発現するように改変される。次いで、多数のCAR T細胞が、実験室において増殖され、上記患者に、代表的には注入によって与えられる。CAR T細胞療法はまた、キメラ抗原レセプターT細胞療法といわれる。

【0007】

1つの局面において、本開示は、キメラ抗原レセプター（CAR）であって、ここで上記CARは、(1)LYPD3に特異的に結合する細胞外結合ドメイン；(2)膜貫通ドメイン；および(3)少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインを含むCARを提供する。

10

【0008】

上記CARのある特定の実施形態において、上記細胞外結合ドメインは、LYPD3に特異的に結合する単鎖可変領域フラグメント（scFv）を含む。一実施形態において、上記scFvは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。

【0009】

上記CARのある特定の実施形態において、上記膜貫通ドメインは、T細胞レセプターの鎖、T細胞レセプターの鎖、T細胞レセプターの鎖、CD3-、CD3-、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、またはCD154である分子に由来するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、上記膜貫通ドメインは、CD8に由来するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記膜貫通ドメインは、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。さらに別の実施形態において、上記膜貫通ドメインは、配列番号11のアミノ酸配列を含む。

20

【0010】

上記CARのある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD2、CD3-、CD3-、CD3-、CD3-、CD5、CD7、CD22、CD27、CD28、CD30、CD40、CD66d、CD79a、CD79b、4-1BB（CD137）、OX40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、LIGHT、NKG2C、B7-H3、FcR-、FcR-、またはTCR-である分子に由来する少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD3-に由来するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。さらに別の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD28に由来するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。さらに別の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、4-1BBに由来するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。さらに別の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列を含む。

30

40

【0011】

いくつかの実施形態において、上記CARは、3個の細胞質シグナル伝達ドメインを含

50

み、ここで第1の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD28に由来し、第2の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD3に由来し、第3の細胞質シグナル伝達ドメインは、4-1BBに由来する。一実施形態において、第1の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含み、第2の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含み、第3の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。さらに別の実施形態において、第1の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含み、第2の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列を含み、第3の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列を含む。

10

【0012】

別の局面において、本開示は、本明細書で開示されるとおりのキメラ抗原レセプター(CAR)を含む活性化T細胞の集団を提供する。ある特定の実施形態において、上記活性化T細胞の集団は、LYPD3を発現するがんの処置のために治療上有効な量で存在する。

【0013】

さらに別の局面において、本開示は、本明細書で開示されるとおりのCARを発現する活性化T細胞の集団、および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を提供する。ある特定の実施形態において、上記薬学的に受容可能なキャリアは、上記活性化T細胞の集団の維持を支援する。上記薬学的組成物のいくつかの実施形態において、上記組成物は、少なくとも1つの治療剤をさらに含む。

20

【0014】

別の局面において、本開示は、本明細書で開示されるとおりのCARをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。

【0015】

さらに別の局面において、本開示は、LYPD3を発現するがん罹患している被験体においてT細胞応答を誘導する方法であって、ここで上記方法は、上記被験体に、上記活性化T細胞の集団または本明細書で開示されるとおりの薬学的組成物の治療上有効な量を投与する工程を包含し、ここで上記投与は、上記がんに対する抗腫瘍応答を誘導する方法を提供する。上記方法のある特定の実施形態において、上記がんは、肺がん、頭頸部がん、子宮頸がん、尿路上皮がん、黒色腫、乳がん、前立腺がん、結腸がん、腎細胞がん、卵巣がん、神経芽腫、横紋筋肉腫、白血病、およびリンパ腫からなる群より選択される。

30

【0016】

別の局面において、本開示は、本明細書で開示されるとおりのキメラ抗原レセプター(CAR)を発現する活性化T細胞の集団を調製する方法であって、ここで上記方法は、(1)単離されたT細胞を、本明細書で開示されるとおりのCARをコードする核酸でトランスフェクトまたは形質導入する工程；および(2)トランスフェクションまたは形質導入の後に、上記CAR発現T細胞を拡大する工程であって、ここで上記T細胞は、IL-2、ならびに/またはCD3抗体およびCD28抗体の存在下で培養することによって拡大される工程を包含する方法を提供する。ある特定の実施形態において、上記単離されたT細胞は、哺乳動物から単離される。一実施形態において、上記哺乳動物はヒトである。ある特定の実施形態において、上記ヒトは、LYPD3を発現するがん罹患している被験体である。ある特定の実施形態において、上記単離されたT細胞は、LYPD3を発現するがん罹患している被験体に対して自家である。

40

【0017】

本開示の別の局面は、本明細書に記載され、例証される全てのものを提供する。

【0018】

本開示の前述の局面および他の特長は、以下の説明において、添付の図面に関連して解釈されて説明される。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 1 9 】

【 図 1 】 図 1 は、形質導入されたマウスリンパ球における L Y P D 3 C A R 発現を示すグラフである。

【 図 2 】 図 2 は、L e w i s 肺がん細胞による L Y P D 3 C A R T 細胞活性化を示すグラフである。

【 図 3 】 図 3 は、L e w i s 肺がん細胞に対する L Y P D 3 C A R T 細胞殺滅有効性を示すグラフである。

【 図 4 A 】 図 4 A ~ 4 D は、マウス肺がんに対する L Y P D 3 C A R T 細胞のインビボ有効性を示すグラフおよび画像である。(図 4 A) L Y P D 3 C A R T 細胞投与後の示した時点での個々の L e w i s 肺腫瘍サイズのスパイダープロット；(図 4 B) (4 A) で示した腫瘍の平均容積；(図 4 C) 解剖後の腫瘍画像；(図 4 D) コントロールおよび L Y P D 3 C A R 群の腫瘍重量(片側 t 検定)。

10

【 図 4 B 】 図 4 A ~ 4 D は、マウス肺がんに対する L Y P D 3 C A R T 細胞のインビボ有効性を示すグラフおよび画像である。(図 4 A) L Y P D 3 C A R T 細胞投与後の示した時点での個々の L e w i s 肺腫瘍サイズのスパイダープロット；(図 4 B) (4 A) で示した腫瘍の平均容積；(図 4 C) 解剖後の腫瘍画像；(図 4 D) コントロールおよび L Y P D 3 C A R 群の腫瘍重量(片側 t 検定)。

【 図 4 C 】 図 4 A ~ 4 D は、マウス肺がんに対する L Y P D 3 C A R T 細胞のインビボ有効性を示すグラフおよび画像である。(図 4 A) L Y P D 3 C A R T 細胞投与後の示した時点での個々の L e w i s 肺腫瘍サイズのスパイダープロット；(図 4 B) (4 A) で示した腫瘍の平均容積；(図 4 C) 解剖後の腫瘍画像；(図 4 D) コントロールおよび L Y P D 3 C A R 群の腫瘍重量(片側 t 検定)。

20

【 図 4 D 】 図 4 A ~ 4 D は、マウス肺がんに対する L Y P D 3 C A R T 細胞のインビボ有効性を示すグラフおよび画像である。(図 4 A) L Y P D 3 C A R T 細胞投与後の示した時点での個々の L e w i s 肺腫瘍サイズのスパイダープロット；(図 4 B) (4 A) で示した腫瘍の平均容積；(図 4 C) 解剖後の腫瘍画像；(図 4 D) コントロールおよび L Y P D 3 C A R 群の腫瘍重量(片側 t 検定)。

【 図 5 】 図 5 は、L Y P D 3 C A R T 細胞投与後に明白な毒性がないことを示すグラフである。C 5 7 B L / 6 マウスを、示されるように、L Y P D 3 C A R T 細胞の種々の用量での処置後、毎日秤量した。

30

【 図 6 - 1 】 図 6 A ~ 6 D は、ヒト L Y P D 3 C A R T 細胞がヒトがん細胞に対して反応性であることを示すグラフおよび F A C S プロットである。(図 6 A) ヒト P B M C における L Y P D 3 C A R 発現；(図 6 B) M C F 7 乳がん細胞に対する L Y P D 3 C A R T 細胞活性化；(図 6 C) M C F 7 乳がん細胞と共培養した後の、形質導入されていない T 細胞 (6 C) または L Y P D 3 C A R T 細胞 (図 6 D) による I F N - 発現。

【 図 6 - 2 】 図 6 A ~ 6 D は、ヒト L Y P D 3 C A R T 細胞がヒトがん細胞に対して反応性であることを示すグラフおよび F A C S プロットである。(図 6 A) ヒト P B M C における L Y P D 3 C A R 発現；(図 6 B) M C F 7 乳がん細胞に対する L Y P D 3 C A R T 細胞活性化；(図 6 C) M C F 7 乳がん細胞と共培養した後の、形質導入されていない T 細胞 (6 C) または L Y P D 3 C A R T 細胞 (図 6 D) による I F N - 発現。

40

【 図 6 - 3 】 図 6 A ~ 6 D は、ヒト L Y P D 3 C A R T 細胞がヒトがん細胞に対して反応性であることを示すグラフおよび F A C S プロットである。(図 6 A) ヒト P B M C における L Y P D 3 C A R 発現；(図 6 B) M C F 7 乳がん細胞に対する L Y P D 3 C A R T 細胞活性化；(図 6 C) M C F 7 乳がん細胞と共培養した後の、形質導入されていない T 細胞 (6 C) または L Y P D 3 C A R T 細胞 (図 6 D) による I F N - 発現。

【 図 7 】 図 7 は、例示的な L Y P D 3 C A R 構築物の模式図を示す。

【 発明を実施するための形態 】

50

【0020】

詳細な説明

本開示の原理の理解を促進する目的で、ここで好ましい実施形態に対して参照がなされ、具体的文言が、それを記載するために使用される。にもかかわらず、本開示の範囲を限定しないことがそれによって意図され、本開示のこのような変更およびさらなる改変は、本明細書で例証され、本開示が関連する分野の当業者に概ね想起されるとして企図されることが理解される。

【0021】

冠詞「a (1つの、ある)」および「an (1つの、ある)」は、その冠詞の文法上の対象の1つまたは1より多い(すなわち、少なくとも1)に言及するために、本明細書で使用される。例示によれば、「1つの要素(an element)」は、少なくとも1つの要素を意味し、1つより多くの要素を含み得る。

10

【0022】

用語「約(about)」とは、所定の値が、望ましい結果に影響を及ぼすことなく、数値範囲の端点を「わずかに上回る(slightly above)」または「わずかに下回る(slightly below)」可能性があるということを提供することによって、その端点に融通性をもたらすために使用される。

【0023】

本明細書全体を通じて、別段文脈が要求しなければ、語句「含む、包含する(comprise)」および「含む、包含する、が挙げられる(include)」およびバリエーション(例えば、「含む、包含する(comprises)」、「含む、包含する(comprising)」、「含む、包含する、が挙げられる(includes)」、「含む、包含する、が挙げられる(including)」)は、述べられた構成要素、特徴、要素もしくは工程、または構成要素、特徴、要素もしくは工程の群の包含を暗示するが、いかなる他の完全体もしくは工程の、または他の完全体もしくは工程の群の排除をも暗示しないことが理解される。ある特定の要素を「含む、包含する、が挙げられる」、「含む、包含する」または「有する(having)」として記載される実施形態はまた、それらある特定の要素「から本質的になる(consisting essentially of)」および「からなる(consisting of)」として企図される。

20

【0024】

本明細書中の値の範囲の記載は、本明細書で別段記載されなければ、その範囲内に入る各別個の値に個々に言及する簡略表記法として働くことが意図されるに過ぎず、各別個の値は、それが、本明細書で個々に記載されているかのように本明細書に組み込まれる。例えば、濃度範囲が、1%~50%として述べられる場合、2%~40%、10%~30%、または1%~3%などのような値が、本明細書中で明示的に挙げられていることが意図される。これらは、具体的に何が意図されているかの例に過ぎず、挙げられる最低値と最高値との間ならびにその最高値および最低値を含む数値の全ての考えられる組み合わせが、本開示において明示的に述べられているとみなされるべきである。

30

【0025】

別段定義されなければ、本明細書で使用される全ての技術用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。

40

【0026】

定義

本明細書で使用される場合、「処置(treatment)」、「治療(therapy)」および/または「治療レジメン(therapy regimen)」とは、患者が示すかまたは患者が感受性のあり得る、疾患、障害または生理学的状態に対する応答においてなされる臨床的介入に言及する。処置の目的としては、疾患、障害もしくは状態の症状の緩和もしくは予防、上記疾患、障害もしくは状態の進行もしくは増悪を遅らせるもしくは停止する、および/または上記疾患、障害もしくは状態の寛解が挙げられる。

【0027】

50

用語「有効量 (e f f e c t i v e a m o u n t) 」または「治療上有効な量 (t h e r a p e u t i c a l l y e f f e c t i v e a m o u n t) 」とは、有益なまたは望ましい生物学および/または臨床的結果をもたらすために十分な量に言及する。「有効量」または「治療上有効な量」は、医療従事者の熟練チームによって決定され得、画像検査、生体マーカー検査、またはさらなる検査の使用を含み得る。がんに関しては、治療上有効な量の投与は、がんの転移を予防するか、固形腫瘍のサイズもしくは塊の減少を生じるか、または腫瘍の壊死を生じる。

【 0 0 2 8 】

用語「疾患」とは、本明細書で使用される場合、生物の一部に影響を及ぼす、構造もしくは機能の任意の異常な状態および/または障害が挙げられるが、これらに限定されない。それは、外部因子（例えば、感染性疾患）によって、内部の機能障害（例えば、がん、がんの転移など）によって引き起こされ得る。

10

【 0 0 2 9 】

当該分野で公知であるように、がんは、一般に、制御されない細胞増殖と考えられる。本発明の組成物および方法は、L Y P D 3 を発現する任意のがん、およびその任意の転移を処置するために使用され得る。例としては、肺がん、頭頸部がん、子宮頸がん、尿路上皮がん、黒色腫、乳がん、前立腺がん、結腸がん、腎細胞がん、卵巣がん、神経芽腫、横紋筋肉腫、白血病、リンパ腫、扁平上皮がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、消化器がん、膵臓がん、膠芽腫、肝臓がん、膀胱がん、肝細胞癌、大腸がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、唾液腺癌、中皮腫、腎臓がん、外陰がん、膵臓がん、甲状腺がん、肝癌 (h e p a t i c c a r c i n o m a) 、皮膚がん、黒色腫、脳がん、神経芽腫、骨髄腫、種々のタイプの頭頸部がん、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、ユーイング肉腫および末梢性神経上皮腫が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、上記がんは、肺がん、頭頸部がん、子宮頸がん、または尿路上皮がんである。

20

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用される場合、用語「被験体 (s u b j e c t) 」および「患者 (p a t i e n t) 」とは、本明細書で交換可能に使用され、ヒトおよび非ヒト動物の両方に言及する。本開示の用語「非ヒト動物 (n o n h u m a n a n i m a l) 」としては、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類など）が挙げられる。ある特定の実施形態において、上記被験体は、がんを有すると疑われるか、癌を有するか、または癌に罹患しているヒト患者である。一実施形態において、上記ヒトは、L Y P D 3 を発現するがんを有すると疑われる被験体である。別の実施形態において、上記ヒトは、L Y D 3 を発現するがんを有する被験体である。さらに別の実施形態において、上記ヒトは、L Y P D 3 を発現するがん罹患している被験体である。

30

【 0 0 3 1 】

用語「キメラ抗原レセプター (c h i m e r i c a n t i g e n r e c e p t o r) 」とは、本明細書で使用される場合、1つのタンパク質上で一緒に天然には一緒に見出されない組み合わせにおいて、細胞外結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインを含む細胞表面レセプターとして定義される。これは特に、細胞外ドメインおよび細胞質ドメインが、1つのレセプタータンパク質上で一緒に天然には見出されないレセプターを含む。さらに、上記キメラ抗原レセプターは、天然のT細胞リンパ球において発現されるT細胞レセプター (T C R) とは異なる。

40

【 0 0 3 2 】

用語「C A R T 細胞 (C A R T - c e l l) 」とは、本明細書で使用される場合、T細胞またはT細胞の集団の表面上でキメラ抗原レセプター (C A R) を発現する分子生物学的方法を通じて改変されているT細胞またはその集団に言及する。上記C A R は、T細胞活性化ドメインの細胞内部分に（例えば、融合物、1またはこれより多くのジスルフィド結合によって連結された別個の鎖として）作動可能に接続されて、発現された所望の標的に対して予め規定された結合特異性を伴う細胞外結合ドメインを有する操作されたポ

50

リペプチドである。MHCクラスIおよびクラスII拘束を迂回することによって、CD8+およびCD4+サブセットの両方のCAR操作T細胞は、再方向付けされた標的細胞認識のために動員され得る。最も一般的なCARは、CD3-ゼータ(CD3)膜貫通および細胞質ドメイン(エンドドメイン)への免疫グロブリン結合機能性の(例えば、モノクローナル抗体に由来する単鎖可変フラグメント(scFv)としての)融合物である。このような分子は、その標的の免疫グロブリン結合機能性による認識に応答して、シグナルの伝達を生じる。しかし、多くの選択肢が存在する。例示によれば、天然のT細胞レセプター(TCR)および単鎖に由来する抗原認識ドメインは、結合機能性として使用され得る。あるいは、レセプターエクストドメイン(例えば、CD4エクストドメイン)またはサイトカイン(これは、同族のサイトカインレセプターを有する細胞の認識をもたらす)が、使用され得る。結合機能性に必要とされるのは、特異的様式において、高親和性で所定の標的を結合することだけである。

【0033】

ある特定の実施形態において、上記CAR操作ポリペプチドは、(1)細胞外結合ドメイン、(2)貫通ドメイン、および(3)少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインを含む。

【0034】

上記細胞外結合ドメインはまた、抗原結合ドメインとして言及され得、目的の抗原(すなわち、LYPD3)に結合する任意のドメインを含み得る。ある特定の実施形態において、上記結合ドメインは、抗体配列、その改変体またはフラグメントを含む。ある特定の実施形態において、上記抗体配列としては、CH1ドメイン、CH2ドメイン、またはCH3ドメイン、重鎖、軽鎖、単鎖可変フラグメント(scFv)、ドメイン抗体、二重特異的抗体、CDR、Fab領域、Fv、Fc領域、またはこれらのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、上記結合ドメインは、レセプターまたはそのリガンド配列もしくはこれらのフラグメントであり得る。ある特定の実施形態において、上記抗原結合ドメインは、腫瘍抗原または腫瘍関連抗原を結合する。一実施形態において、上記細胞外結合ドメインは、LYPD3を特異的に結合する。ある特定の実施形態において、LYPD3を特異的に結合する上記細胞外結合ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む、LYPD3に特異的に結合するscFvである。一実施形態において、上記細胞外結合ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記細胞外結合ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列からなる。

【0035】

上記CARはまた、膜貫通ドメインを含む。上記膜貫通ドメインは、当該分野で公知の任意の分子に由来するかまたはその分子から得られる任意の膜貫通ドメインであり得る。ある特定の実施形態において、上記膜貫通ドメインは、上記CARの細胞外結合ドメインに融合される。上記膜貫通ドメインは、天然のまたは合成の供給源のいずれかに由来し得る。ある特定の実施形態において、上記膜貫通ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。ある特定の実施形態において、上記膜貫通タンパク質は、T細胞レセプターの、もしくは鎖、CD3-、CD3-、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、またはCD154を含むが、これらに限定されない群から選択される。一実施形態において、上記膜貫通ドメインは、CD8に由来する。ある特定の実施形態において、上記膜貫通ドメインは、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記膜貫通ドメインは、配列番号11のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記膜貫通ドメインは、配列番号11のアミノ酸配列からなる。

【0036】

上記CARはまた、少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含み、そのシグナル伝達ドメインはまた、CARの細胞内シグナル伝達ドメインおよび/または細胞質共刺激シグ

10

20

30

40

50

ナル伝達ドメインとして言及され得る。上記細胞質シグナル伝達ドメインは、T細胞の正常なエフェクター機能のうち少なくとも1つの活性化を担い、抗原へのリンパ球の効率的応答に必要とされる。用語「エフェクター機能 (effector function)」とは、細胞の専門の機能に言及する。T細胞のエフェクター機能は、例えば、サイトカインの分泌を含む、細胞溶解活性またはヘルパー活性であり得る。従って、用語「細胞質共刺激シグナル伝達ドメイン (cytoplasmic costimulatory signaling domain)」は、上記エフェクター機能シグナルを伝達し、上記細胞に専門化の機能を行うように指向するタンパク質の一部に言及する。細胞内シグナル伝達ドメイン全体が使用され得る場合、多くの場合には、鎖全体を使用する必要はない(すなわち、上記シグナル伝達ドメインが、タンパク質全体に由来し得る)。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮した部分が使用される程度まで、このような短縮化した部分は、その短縮化した部分が上記エフェクター機能シグナルを伝達する限りにおいて、無傷の鎖の代わりに使用され得る。用語、細胞内シグナル伝達ドメインは、上記エフェクター機能シグナルを伝達するために十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の短縮化した部分に由来し得るかまたはその短縮化した部分を含み得る。ある特定の実施形態において、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、抗原レセプター結合 (engagement) 後にシグナル伝達を開始する、T細胞レセプター (TCR) および共レセプターの細胞質配列から選択される。ある特定の実施形態において、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD 2、CD 3 - 、CD 3 - 、CD 3 - 、CD 3 - 、CD 5、CD 7、CD 22、CD 27、CD 28、CD 30、CD 40、CD 66d、CD 79a、CD 79b、4 - 1 BB (CD 137)、OX 40、PD - 1、ICOS、リンパ球機能関連抗原 - 1 (LFA - 1)、LIGHT、NKG 2C、B7 - H3、FcR - 、FcR - 、およびTCR - を含むが、これらに限定されない群から選択される。一実施形態において、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD 3 - 、CD 28、および/または4 - 1 BBに由来する。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD 3 - に由来するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列からなる。一実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD 28に由来するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、4 - 1 BBに由来するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列と少なくとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、上記少なくとも1個の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態において、上記CARは、3つの細胞質シグナル伝達ドメインを含み、上記細胞質シグナル伝達ドメインは、CD 28、CD 3、および4 - 1 BBに由来する。一実施形態において、第1の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD 28に由来し、第2の細胞質シグナル伝達ドメインは、CD 3に由来し、第3の細胞質シグナル伝達ドメインは、4 - 1 BBに由来する。ある特定の実施形態において、第1の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含み、第2の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列と少な

10

20

30

40

50

くとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含み、第3の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列と少なくとも95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、第1の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含み、第2の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列を含み、第3の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、第1の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列からなり、第2の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号12のアミノ酸配列からなり、第3の細胞質シグナル伝達ドメインは、配列番号13のアミノ酸配列からなる。

【0037】

本明細書で使用される場合、用語「特異的に結合する (specifically binds)」または「選択的に結合する (selectively binds)」とは、抗体/抗原、リガンド/レセプター、核酸/相補的核酸、または他の結合対(例えば、サイトカインに対してサイトカインレセプター)に言及する場合、タンパク質および他の生物製剤の異種集団中のタンパク質の存在を決定する結合反応を示す。従って、指定された条件下では、特定された抗体またはその結合ドメインは、特定の抗原に結合し、サンプル中に存在する他のタンパク質に対して、顕著な量で結合しない。特異的結合はまた、例えば、企図した方法の、その結合する化合物、核酸リガンド、抗体、または抗体の抗原結合部位に由来する結合組成物が、任意の他の結合する化合物との親和性より、しばしば少なくとも25%大きい、よりしばしば少なくとも50%大きい、最もしばしば少なくとも100%(2倍)大きい、概ね少なくとも10倍大きい、より概ね少なくとも20倍大きい、および最も概ね少なくとも100倍大きい親和性でその標的に結合することを意味し得る。

【0038】

用語「投与 (administration)」とは、この用語がヒト、霊長類、哺乳動物、哺乳動物被験体、動物、獣医学的被験体、プラシーボ被験体、研究用被験体、実験用被験体、細胞、組織、器官、または生物学的流体に適用される場合、上記被験体、細胞、組織、器官、または生物学的流体などへの外因性リガンド、試薬、プラシーボ、低分子、薬学的薬剤、治療剤、診断剤、または組成物の接触に言及するが、これらに限定されない。「投与」はまた、例えば、治療的方法、薬物動態的方法、診断的方法、研究方法、プラシーボ方法、および実験方法に言及し得る。細胞の処理は、上記細胞への試薬の接触、および流体への試薬の接触を包含し、この場合、流体は、上記細胞と接触した状態にある。「投与」はまた、例えば、細胞の、試薬、診断組成物、結合組成物による、または別の細胞による、インビトロおよびエキソビオ処理を包含し得る。投与経路としては、静脈内投与または注入技術が挙げられ得るが、これらに限定されない。注入技術は、針またはカテーテルを経て上記活性化T細胞の集団の投与を包含し得る。代表的には、注入は、上記活性化T細胞の集団が、静脈内投与または皮下投与されることを意味する。ある特定の実施形態において、上記活性化T細胞の集団は、全身投与される。ある特定の実施形態において、上記活性化T細胞の集団は、静脈内投与される(すなわち、静脈内(IV)注入によって)。好ましい投与経路は、腹腔内または静脈内である。

【0039】

用語「弱毒化 (attenuation)」および「弱毒化した (attenuated)」とは、宿主に対する毒性を低減するために改変された、細菌、ウイルス、寄生物、感染性生物、プリオン、細胞、感染性生物の遺伝子などを包含する。上記宿主は、ヒトもしくは動物宿主、または器官、組織、もしくは細胞であり得る。上記ウイルスは、非限定的な例を挙げると、宿主細胞への結合を低減するために、1つの宿主細胞から別の宿主細胞への拡がりを低減するために、弱毒化され得る。弱毒化は、例えば、毒性の徴候 (indicum or indicia)、LD₅₀、器官からのクリアランスの速度、または競合指数を測定することによって評価され得る(例えば、Auerbuchら、(2001) Infect. Immunity 69:5953-5957を参照のこ

10

20

30

40

50

と)。一般に、弱毒化は、少なくとも25%；より一般には少なくとも50%；最も一般には少なくとも100%（2倍）；概ね少なくとも5倍；より概ね少なくとも10倍；最も概ね少なくとも50倍；しばしば少なくとも100倍；よりしばしば少なくとも500倍；および最もしばしば少なくとも1,000倍；通常は少なくとも5,000倍；より通常は少なくとも10,000倍；および最も通常は少なくとも50,000倍；ならびに最もしばしば少なくとも100,000倍のLD₅₀における増大および/またはクリアランス速度における増大を生じる。

【0040】

CAR T細胞

本開示は、部分的に、CAR T細胞由来エフェクター細胞の調製およびレシピエントにおけるその使用に関する。1つの局面において、本開示は、キメラ抗原レセプター（CAR）であって、LYPD3を特異的に結合する細胞外ドメインを有するCARを発現する活性化T細胞の集団に関する。LYPD3（LY6/PLAURドメイン含有3）は、C4.4A、GPIアンカー転移関連タンパク質C4.4Aホモログ（GPI-anchored metastasis-associated protein C4.4A homolog）、GPIアンカー転移関連タンパク質ホモログ（GPI-anchored metastasis-associated protein homolog）、MIG-C4、またはマトリゲル誘導性遺伝子C4タンパク質（matrigel-induced gene C4 protein）としても公知である。

【0041】

本明細書で開示される方法において使用されるT細胞は、商業的に利用可能な単離方法を含め、当該分野で公知の方法によって単離され得る（例えば、Cartellieriら, A Novel Ex Vivo Isolation and Expansion Procedure for Chimeric Antigen Receptor Engrafted Human T Cells, 2014；およびGhassemiら, Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells, 2018を参照のこと）。T細胞の供給源としては、末梢血、臍帯血、骨髄、または造血幹細胞の他の供給源が挙げられるが、これらに限定されない。種々の技術が、上記細胞を分離して、所望のT細胞を単離または富化するために使用され得る。さらに、T細胞を拡大するための方法は、当該分野で周知である（例えば、Cartellieriら, A Novel Ex Vivo Isolation and Expansion Procedure for Chimeric Antigen Receptor Engrafted Human T Cells, 2014；およびGhassemiら, Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells, 2018を参照のこと）。調節性T細胞を単離および拡大するための方法はまた、商業的に利用可能である（例えば、BD Biosciences, San Jose, Calif.; STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada; eBioscience, San Diego, Calif.; Invitrogen, Carlsbad, Calif.を参照のこと）。いくつかの実施形態において、上記T細胞は、IL-2の存在下で培養することによって拡大され得る。ある特定の実施形態において、上記T細胞は、抗CD3抗体および/または抗CD28抗体の存在下で培養することによって拡大され得る。いくつかの実施形態において、上記T細胞は、IL-2の存在下で培養することによって、ならびに抗CD3抗体および/または抗CD28抗体の存在下で培養することによって拡大され得る。

【0042】

細胞を分離するためのプロトコールとしては、密度勾配遠心分離、細胞密度を改変する

粒子への連結、抗体被覆磁性ビーズでの磁性分離、アフィニティークロマトグラフィー；モノクローナル抗体（mAb）に結合されるかまたはともに使用される細胞傷害性薬剤（補体および細胞毒素が挙げられるが、これらに限定されない）、ならびに固体マトリクス（例えば、プレートまたはチップ）に結合される抗体でのパニング、エルトリエーション、フローサイトメトリー、または任意の他の簡便な技術が挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

上記単離されたT細胞は、これらが本明細書で開示されるとおりの処置の方法において投与される被験体に対して自家または非自家であり得る。自家細胞は、上記CARを含む活性化T細胞の集団が投与されるべき被験体から単離される。ある特定の実施形態において、自家細胞は、CARを組換え発現する上記単離され拡大された細胞が投与されるべき被験体から単離される。いくつかの実施形態において、上記細胞は、白血球除去法によって得られ得る。ここで白血球は、採られた血液から選択的に除去され、組み換えられ、次いで、ドナー被験体に再度輸液される。あるいは、被験体ではない非自家ドナーに由来する同種異系細胞が使用され得る。非自家ドナーの場合、上記細胞は、当該分野で周知であるように、適切なレベルの適合性を決定するために、タイプ分けされ、ヒト白血球抗原（HLA）に対してマッチングされる。自家および非自家細胞の両方に関して、上記細胞は、当該分野で周知の方法を使用して、遺伝子操作および/または被験体への投与のために使用され得る準備ができるまで、必要に応じて低温保存され得る。

10

【0044】

サイトカイン放出は、有効なCAR T細胞ベースの療法のために、T細胞活性化および有効性の必要な結論であることから、上記活性化T細胞のうちの少なくとも一部が1またはこれより多くのサイトカイン（例えば、IL-1、IL-2、TNF-、およびIFN- からなる群より選択される1またはこれより多くのサイトカイン）を生成することは好ましい。さらに、上記活性化T細胞の集団のうちの少なくとも一部は、好ましくは、CD2、CD28、CTLA4、CD40リガンド（gp39）、CD18、CD25、CD69、CD16/CD56、MHCクラスI、MHCクラスII、CD8、CD4、CD3/TcR、CD54、LFA-1およびVLA-4からなる群より選択される1またはこれより多くの表面マーカーを発現する。

20

【0045】

治療用組成物

本明細書に記載される細胞組成物は、単独で、または薬学的に受容可能なキャリアとの組み合わせのいずれかにおいて、適切な抗腫瘍応答を誘導するために十分な量で被験体に投与され得る。上記応答は、特異的免疫応答、非特異的免疫応答、特異的および非特異的応答の両方、先天的応答、一次免疫応答、適応免疫、二次免疫応答、記憶免疫応答、免疫細胞活性化、免疫細胞増殖、免疫細胞分化、およびサイトカイン発現を含み得るが、これらに限定されない。

30

【0046】

本開示は、CAR T細胞集団の有効な量を被験体に投与することによって、上記被験体において抗腫瘍免疫を生成する方法を提供する。「有効量」は、本明細書で使用される場合、治療上または予防上の利益を提供する量を意味する。CAR T細胞の有効量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染もしくは転移の程度、および患者（被験体）の状態における個々の差異を考慮して、医師によって決定され得る。本明細書に記載されるとおりのCARを発現する活性化T細胞の集団を含む薬学的組成物が、 $10^4 \sim 10^{11}$ 細胞/kg 体重、好ましくは $10^7 \sim 10^{10}$ 細胞/kg 体重（それら範囲内の全ての整数値を含む）の投与量において投与され得ることが、一般に述べられ得る。T細胞組成物はまた、これらの投与量において多数回投与され得る。上記細胞は、免疫療法において一般に公知である注入技術を使用することによって投与され得る（例えば、Rosenbergrら, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照のこと）。特定の患者にとっての最適な投与量および処置レジメンは、上記患者を、

40

50

疾患の徴候に関してモニターし、それに応じて上記処置を調節することによって、医療分野の当業者によって容易に決定され得る。

【0047】

本明細書で記載されるとおりのキメラ抗原レセプターを発現する活性化T細胞の集団を含む細胞組成物の有効量は、上記活性化T細胞の集団の用量の1回の投与において与えられ得るが、1用量に制限されない。従って、上記投与は、上記キメラ抗原レセプターを発現する活性化T細胞の集団の2用量、3用量、4用量、5用量、6用量、7用量、8用量、9用量、10用量、11用量、12用量、13用量、14用量、15用量、16用量、17用量、18用量、19用量、20用量、またはこれより多くの用量であり得る。用量の1回より多くの投与が存在する場合、上記用量の投与は、1分間、2分間、3分間、4分間、5分間、6分間、7分間、8分間、9分間、10分間、またはより多くの分数の時間間隔、約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間などの間隔が空けられ得る。時間 (hour) の文脈において、用語「約」とは、±30分以内の任意の時間間隔を意味する。上記用量の投与はまた、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、またはこれより長い時間間隔、およびこれらの任意の組み合わせの時間間隔が空けられ得る。本発明は、時間において等しく空けられる投与間隔に限定されるのではなく、等しくない間隔での投与も包含し得る（例えば、例えば、1日間、4日間、7日間、および25日間での投与からなる予備刺激スケジュール）。

10

20

【0048】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア (pharmaceutically acceptable carrier)」または「薬学的に受容可能な賦形剤 (pharmaceutically acceptable excipient)」とは、活性化T細胞の集団と組み合わせた場合、上記T細胞の集団が生物学的活性を保持することを可能にする任意の物質に言及する。例としては、標準的な薬学的キャリア（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水、水、油/水エマルジョンのようなエマルジョン、アミノ酸ベースの緩衝液、または炭酸水素緩衝化溶液、および種々のタイプの湿潤剤）のうちいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、上記キャリアは、被験体に投与される場合に、有害反応、アレルギー反応、または他の不都合な反応を生じない。いくつかの実施形態において、上記キャリアを含む薬学的組成物は、発熱物質、ならびに被験体に有害であり得る他の不純物を含まない。薬学的に受容可能なキャリアとしては、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、被覆、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられ得る；これらの使用は、当該分野で周知である。受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシピエントに対して非毒性であり、好ましくは、使用される投与量および濃度において不活性であり、緩衝化剤（例えば、リン酸、クエン酸、または他の有機酸）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンが挙げられる）；キレート化剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩を形成する対イオン（例えば、ナトリウム）；および/または非イオン性界面活性剤（例えば、Tween、Pluronicまたはポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる。このようなキャリアを含む組成物は、周知の従来の方法によって製剤化され得る（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, A. Gennaro, 編, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990; および Remingto

30

40

50

n, The Science and Practice of Pharmacy 第21版. Mack Publishing, 2005を参照のこと)。選択されるキャリアは、および使用されるキャリアの量は、投与様式に依存し得る。

【0049】

特定の被験体/患者に対する「有効量」は、処置されている状態またはがん、上記被験体の全体的な健康状態、投与の経路および用量、ならびに副作用の重篤度のような要因に依存して変動し得る。処置および診断の方法のガイダンスは、入手可能である（例えば、Maynardら, (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UKを参照のこと）。投与されるべき細胞数の決定は、当業者によって行われ、一部は、がんの範囲および重篤度、ならびにトランスフェクトした細胞が、既存のがんの処置のために投与されているのか、またはがんの予防のために投与されているのかに依存する。上記活性化T細胞を含む薬学的組成物の調製は、本開示に照らして、当業者に公知である。

10

【0050】

本開示のキメラ抗原レセプターを発現する活性化T細胞の集団は、1用量で、または複数の投与量で投与され得、ここで各用量は、少なくとも100細胞/kg体重；少なくとも1,000細胞/kg体重；少なくとも10,000細胞/kg体重；少なくとも100,000細胞/kg体重；少なくとも1,000,000細胞/kg体重；少なくとも10,000,000細胞/kg体重；少なくとも 1×10^9 細胞/kg体重；少なくとも 10×10^9 細胞/kg体重；少なくとも 100×10^9 細胞/kg体重；または少なくとも 1×10^{12} 細胞/kg体重を含む。

20

【0051】

例えば、1回/週、2回/週、3回/週、4回/週、5回/週、6回/週、7回/週、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、4週間ごとに1回、5週間ごとに1回などの投与スケジュールが使用され得る。上記投与スケジュールは、例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、および12ヶ月までまたはこれより長い合計期間にわたる投与を包含する。

30

【0052】

上記の投与スケジュールのサイクルが提供される。上記サイクルは、およそ、例えば、7日ごと；14日ごと；21日ごと；28日ごと；35日ごと；42日ごと；49日ごと；56日ごと；63日ごと；70日ごとなどに反復される。投与しない間隔は、サイクルの間に起こり得、ここで上記間隔は、およそ、例えば、7日間；14日間；21日間；28日間；35日間；42日間；49日間；56日間；63日間；70日間；などであり得る。この文脈において、用語「およそ」とは、 ± 1 日、 ± 2 日、 ± 3 日、 ± 4 日、 ± 5 日、 ± 6 日、または ± 7 日を意味する。

40

【0053】

本開示に従うCAR T細胞はまた、1またはこれより多くのさらなる治療剤とともに投与され得る。さらなる治療剤との共投与のための方法は、当該分野で周知である（例えば、Hardmanら, (編) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第10版, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (編) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (

50

編) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.). 他の薬剤は、上記被験体の治療レジメン(例えば、他の免疫療法、チェックポイントインヒビター、免疫-腫瘍薬物(immunology drug)、標的化薬剤、化学療法、および/または放射線療法)のうちの一部であり得る。本開示の組成物と組み合わせて使用され得る薬剤/治療レジメンの例としては、CTLA-4、PD-1、および/もしくはPD-L1を遮断する薬物、CSF-1Rインヒビター、TLRアゴニスト、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、イピリムマブ、アテゾリズマブ、アレムツズマブ、アベルマブ、オファツムマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、リツキシマブ、デュルバルマブ、サイトカイン療法、インターフェロン、インターフェロン- α 、インターロイキン、インターロイキン-2、樹状細胞療法(例えば、Sipuleucel-T)、CHOP、シクロホスファミド、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、ピノレルピン、ドキシソルピシン、ドセタキセル、プレオマイシン、ダカルバジン、ムスチン、プロカルバジン、プレドニゾン、エトポシド、シスプラチン、エピルビシン、フォリン酸、およびオキサリプラチンが挙げられるが、これらに限定されない。本開示の組成物は、上記さらなる治療剤の前に、上記さらなる治療剤と同時に、または上記さらなる治療剤の後に投与され得る。

【0054】

共投与は、固体における同時の投与をいう必要があるのではなく、むしろ、多数の治療剤の投与が、1つの処置計画の結果である限りにおいて、数時間またはさらには数日、数週間、またはより長く間隔を空けた投与を含み得る。共投与は、本開示のCAR Tエフェクター細胞を、代替のCAR T細胞の前に、その後、または同時に投与することを包含し得る。例示的処置スケジュールにおいて、本開示のCAR Tエフェクター細胞は、複数日にわたるプロトコールにおける初期用量として、後の投与日に与えられる代替のCAR T細胞とともに与えられ得るか；または代替のCAR T細胞は、複数日にわたるプロトコールにおける初期用量として、後の投与日に与えられる本開示のCAR Tエフェクター細胞とともに与えられ得る。他方で、代替のCAR T細胞および本開示のCAR Tエフェクター細胞は、複数日にわたるプロトコールにおいて一日おきに投与され得る。これは、可能な投与プロトコールの限定的リストであることを意味しない。

【0055】

治療剤の有効量は、概ね少なくとも10%、より概ね少なくとも20%、最も概ね少なくとも30%、代表的には少なくとも40%、より代表的には少なくとも50%、最も代表的には少なくとも60%、しばしば少なくとも70%、よりしばしば少なくとも80%、および最もしばしば少なくとも90%、従来のには少なくとも95%、より従来のには少なくとも99%、最も従来のには少なくとも99.9%、上記がんの症状を減少または改善する量である。例えば、本明細書で開示されるとおりの活性化CAR T細胞の集団の投与は、他のがん処置で処置したコントロールもしくは患者、または処置前の同じ患者と比較して、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約1ヶ月、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約1年、約2年、約5年、もしくは約10年、またはより長く、約1%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約100%、腫瘍増殖を低減する。

【0056】

治療剤の製剤は、例えば、凍結乾燥散剤、スラリー、水性液剤または懸濁物の形態において、生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定化剤と混合することによって、貯蔵のために調製され得る(例えば、Hardmanら(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro(2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott

10

20

30

40

50

t, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avisā (編) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Liebermanā (編) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Liebermanā (編) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.を参照のこと)。

10

【0057】

作製方法

本開示は、本明細書で開示されるとおりのキメラ抗原レセプター(CAR)を発現する活性化T細胞の集団を調製する方法であって、ここで上記方法は、(1)単離されたT細胞を、本明細書で開示されるとおりのCARをコードする核酸でトランスフェクトまたは形質導入する工程;および(2)トランスフェクションまたは形質導入の後に、上記CAR発現T細胞を拡大する工程であって、ここで上記T細胞は、IL-2、ならびに/またはCD3抗体およびCD28抗体の存在下で培養することによって拡大される工程を包含する方法を提供する。ある特定の実施形態において、上記T細胞は、IL-2の存在下で培養することによって拡大される。ある特定の実施形態において、上記T細胞は、抗CD3抗体の存在下で培養することによって拡大される。ある特定の実施形態において、上記T細胞は、抗CD28の存在下で培養することによって拡大される。ある特定の実施形態において、上記T細胞は、IL-2、抗CD3抗体、および抗CD28抗体の存在下で培養することによって拡大される。ある特定の実施形態において、上記単離されたT細胞は、哺乳動物から単離される。一実施形態において、上記哺乳動物はヒトである。ある特定の実施形態において、上記ヒトは、LYPD3を発現するがん罹患している被験体である。上記方法の一実施形態において、上記単離されたT細胞は、LYPD3を発現するがん罹患している被験体に対して自家である。

20

【0058】

以下の実施例は、例証によって提供されるのであって、限定によって提供されるのではない。

30

【実施例】

【0059】

材料および方法

構築物デザイン. LYPD3-CARを発現するMP71レトロウイルス構築物を、標準的な分子生物学技術を使用して生成した。

【0060】

細胞株および培地. HEK-293T細胞、Jurkat細胞、LLC細胞、およびMCF7細胞を、ATCCから購入した。匿名のドナーからの末梢血単核細胞(PBMC)を、Hemacareから購入した。細胞を、DMEM+10% FBS、RPMI+10% FBS、またはX-Vivo+5% ヒト血清A/B中で培養した。

40

【0061】

レトロウイルスベクター生成. レトロウイルスベクターを、標準的なリン酸カルシウム沈殿プロトコールを使用することによって、HEK-293T細胞の一過性トランスフェクションによって調製した。ウイルス上清を、48時間で採取し、T細胞を形質導入するために使用した。

【0062】

T細胞形質導入および拡大. レトロウイルス形質導入の前に、PBMCを、T細胞アクチベーターピースおよびヒトIL-2との培養によって、2日間活性化した。形質導入のために、新鮮に採取したレトロウイルス上清を、32において2時間、2,000g

50

で遠心分離することによって、15 mg RetroNectin/ウェルで被覆した組織培養処理していない24ウェルプレート(Clontech Laboratories)上に遠心分離して載せた。活性化PBMCを、上記プレート上に載せ、600gにおいて、32で30分間、遠心分離した。T細胞を、37および5% CO₂においてインキュベートした。培養培地を、2日ごとに補充した。マウスT細胞形質導入のために、マウスリンパ球をリンパ節から単離し、プレートに被覆した抗CD3/CD28抗体(4 mg/ml)および50 IU/ml ヒトIL-2によって、遠心分離して感染させる前に2日間活性化した。

【0063】

CAR染色． 全ての抗体を、Biolegendから購入した。組換えCARの発現を、形質導入の4日後に、Fab染色、続いて、フローサイトメトリーによって検出した。

10

【0064】

CD69染色． 全ての抗体を、Biolegendから購入した。LYPD3 CAR形質導入したT細胞またはコントロールの形質導入していないT細胞を、標的細胞(図2では、LLC、図6ではMCF7)と一晚共培養した。次いで、T細胞を集め、フローサイトメトリーによる分析の前に、CD3抗体およびCD69抗体で染色した。

【0065】

インビトロIFN生成． 全ての抗体を、Biolegendから購入した。LYPD3 CAR形質導入したT細胞またはコントロールの形質導入していないT細胞を、MCF7標的細胞とともに1:2 エクター-対-標的比において一晚共培養した。T細胞を、プレフェルジンAおよびモネンシンで4時間処理し、その後、T細胞を集め、細胞内IFN発現を、フローサイトメトリーを使用して測定した。生きているCD4+およびCD8+ リンパ球ゲーティングストラテジーを使用した。

20

【0066】

T細胞殺滅アッセイ． マウスLYPD3を過剰発現するLewis肺癌(LLC)腫瘍細胞を、CellTrace CFSEで標識氏、形質導入していないまたはLYPD3-CAR-T細胞とともに種々の比において共培養した。生きているLLC細胞を、フローサイトメトリーによって分析し、T細胞殺滅有効性を、生きているLLC細胞の数に基づいて計算した。

30

【0067】

インビボ腫瘍接種および処理． 6~8週齢のC57BL/6マウスに、1e6のLLC細胞を皮下移植した。腫瘍が触知できるようになった場合、シクロホスファミド(300 mg/kg)を腹腔内注射した。次いで、24時間後、10e6の形質導入していないまたはLYPD3-CAR-T細胞を、尾静脈を介してマウスに注射した。腫瘍増殖およびマウス体重を、図4に示されるように、研究のエンドポイントに達するまで定期的にモニターした。上記エンドポイントにおいて、全てのLLC腫瘍を採取し、写真を撮り、秤量した。

【0068】

実施例1． LYPD3を発現する扁平上皮がん(squamous cancer)細胞のLYPD3 CAR-T細胞殺滅

40

LYPD3抗原を発現する扁平上皮がん細胞に対するLYPD3 CAR T細胞の生成、活性化、および腫瘍殺滅有効性を示す第1のデータが、ここで提供される(図1~3)。図1は、形質導入したマウスリンパ球におけるLYPD3 CAR発現を示す。マウスリンパ球は、Fab染色によって決定される場合、およそ77.6% LYPD3 CAR陽性であったことを示す。

【0069】

図2は、CD69活性化によって測定される場合のLYPD3陽性Lewis肺がん(LLC)細胞によるLYPD3 CAR T細胞活性化を詳述する。形質導入していないまたはLYPD3 CAR-T細胞を、LYPD3を過剰発現するように操作したLLC

50

細胞とともに一晚共培養し、その後、T細胞を、フローサイトメトリーによる分析の前に、CD3抗体およびCD69抗体で染色した。

【0070】

図3は、LYPD3陽性腫瘍細胞に対するLYPD3 CAR T細胞殺滅有効性を示す。殺滅有効性を、示された比でインキュベートした形質導入していないまたはLYPD3 CAR-T細胞と一晚共培養した後に存在する、生きたLLC細胞の数に基づいて計算した。まとめると、これらの3枚の図面は、マウスLYPD3 CAR-T細胞が、LYPD3抗原を有する腫瘍細胞を特異的に認識および殺滅し得ることを示す。

【0071】

実施例2. 明確な毒性のないLYPD3 CAR-T細胞の前臨床的抗腫瘍有効性

先の実施例は、LYPD3陽性腫瘍細胞に対するマウスLYPD3 CAR-T細胞のインビトロ刺激および細胞傷害性活性を例証する。これらの所見をがんの治療的処置に適用可能であることを実証するために、C57BL/6マウスに、LYPD3を過剰発現するように操作した1e6のLLC細胞を皮下移植した。腫瘍が一旦触知できるようになった場合、プレコンディショニングのためにシクロホスファミド(300mg/kg)を腹腔内注射した。次いで、24時間後、10e6の形質導入していないまたはLYPD3 CAR-T細胞を、尾静脈を介して注射した。

【0072】

図4に図示されるように、このLYPD3 CAR-T細胞療法での肺扁平上皮がん(squamous lung cancer)を有するマウスの処置は、個々の腫瘍容積(図4A)および平均腫瘍容積(図4B)、研究のエンドポイントにおける腫瘍の出現(図4C)、ならびに上記エンドポイントにおける腫瘍重量(図4D)によって決定されるように、マウス腫瘍負荷において>2倍の平均低減を生じた。これらの所見は、マウス肺がんに対するLYPD3 CAR-T細胞療法の前臨床的有効性を示す。

【0073】

さらに、毒性研究は、LYPD3 CAR-T細胞を投与した動物が、この処置に耐容性があり、正常な体重を保持することを示す(図5)。LYPD3 CAR-T細胞は、明らかな毒性がなく、抗腫瘍有効性を示すことから、これらの細胞は、LYPD3関連がんの処置のための新規な養子T細胞ベースの治療アプローチを示す。

【0074】

実施例3. ヒト乳がんに対するLYPD3 CAR-T細胞の反応性

先の実施例は、LYPD3 CAR-T細胞が、LYPD3抗原を有するマウス腫瘍細胞を選択的に殺滅し得ることを例証する。その同じプロセスがヒトにおいても保存されるという証拠を提供するために、ヒトPBMCを、ヒトLYPD3 CARを発現するように操作した。以下の実施例において、LYPD3を内因的に発現するヒトMCF7乳がん細胞を、標的細胞として利用した。

【0075】

図6は、ヒトLYPD3 CAR T細胞がヒトがん細胞に対して反応性であることを示すFACSを含む。図6Aは、ヒトFab染色によって定量されるように、ヒトPBMCにおける強いLYPD3 CAR発現を示すのに対して、図6Bは、内因性LYPD3を発現するヒトがん細胞によるLYPD3 CAR-T細胞刺激を詳述する。MCF7乳がん細胞とともに一晚共培養した後、CAR-T細胞を集め、フローサイトメトリーによる定量の前に、CD3抗体およびCD69抗体で染色した。これらの結果は、マウスLYPD3 CAR-T細胞(図1~3)と同様に、ヒトLYPD3 CAR-T細胞が、LYPD3抗原を発現する腫瘍細胞の存在下で活性化されることを示す。

【0076】

ヒトLYPD3 CAR-T細胞刺激は、形質導入していないT細胞(図6C)またはLYPD3 CAR T細胞(図6D)をMCF7乳がん細胞とともに、1:2 エフェクター-対-標的比で一晚共培養した後にIFN発現を示す、図6Cおよび6Dにおいてさらに詳述される。<1% IFN陽性コントロール細胞との比較において、LYP

10

20

30

40

50

D3 CAR-T細胞のうちのおよそ10.4%が、IFN陽性によって測定されるように、MCF7細胞とインキュベートした際に活性化された。

【0077】

上記の実施例は、先のマウスLYPD3 CAR-T細胞の結果が、LYPD3陽性乳がん細胞に対する応答において強いヒトCAR-T細胞活性化によって明らかにされるように、ヒトT細胞およびがんがんに容易に適用され得ることを示す。まとめると、これらの結果は、LYPD3抗原の細胞表現発現を示す種々の腫瘍タイプに対する有望で新たな処置としてLYPD3 CAR-T細胞療法を明らかにする。

【0078】

配列番号1. LYPD3-scFvの核酸配列

10

【化1】

atggctctgcccgtcaccgccctgctgctgcctctggctctgctgctgcacgccgcacgacccgaagt
ccagctgctggaaagtgggggaggcctgggtgcagccaggaggctctctgaggctgagctgctgcagcat
ccggcttcaccttagcaacgcatggatgtcctgggtgaggcaggcacctggcaagggcctggagtgg
gtgtcctacatcagctcctctggctctacaatctactatgccgacagcgtgaagggcaggttaccat
ctctagagataacagcaagaatacactgtatctgcagatgaattccctgagggccgaggacaccgccg
tgtactattgcgccagagagggcctgtgggcctttgataagtggggccagggcaccctgggtgacagtg
agctccggaggaggaggatctggcggaggaggcagcggcggcggcggctctcagagcgtgctgacca
gccaccttccgcctctggaacaccaggccagagagtgaccatctcctgtacaggctctagctccaaca
tcggcgccggctacgtggtgcactggatcagcagctgccaggaaccgcaccaaaagtgtgatctac
gacaacaataagcggcctagcggcgtgccagatcgcttcagcggcctccaagtctggcacaagcgcctc
cctggcaatctccggcctgcggctctgaggacgaggcagattactattgtgccgcctttgacgatcgcc
tgaatggacccgtgttcggaggagggaactaaactgaccgtgctgggacaggc

20

配列番号2. 膜貫通ドメインの核酸配列

【化2】

ttcgtgcccgtcttccctgccagcgaagcccaccacgacgccagcgcgcgaccaccaacaccggcgcc
caccatcgcgctgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgcagtg
acacgagggggctggacttcgctgtgatctacatctgggcgccttggccgggacttgtggggtc
cttctcctgtcactggttatcaccctttaactgcaaccacaggaac

30

配列番号3. 共刺激シグナル伝達ドメインの核酸配列

【化3】

aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcccccgggcccac
ccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc

配列番号4. 41BB共刺激シグナル伝達ドメインの核酸配列

【化4】

cgtttctctgttgtaaacggggcagaaagaagctcctgtatatattcaaacaaccatttatgagacc
agtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtg
aactg

40

配列番号5. CD3 細胞内シグナル伝達ドメインの核酸配列

【化5-1】

agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacga
gctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatgg
ggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcg

50

【化5-2】

gaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttacca
gggtctcagtagcagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgctaa

配列番号6. マウスLYPD3 CARの膜貫通ドメインの核酸配列

【化6】

actactaccaagccagtgtctgcaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagag
accagaagattgtcggccccgtggctcagtgaaagggaccggattggacttcgcctgtgatatttaca
tctgggcacccttggccggaatctgcgtggcccttctgctgtccttgatcatcactctcatctgctac
cacaggagccga

10

配列番号7. マウスLYPD3 CARのCD28共刺激シグナル伝達ドメインの核酸配列

【化7】

aatagtagaaggaacagactccttcaagtgactaccatgaacatgactccccggaggcctgggctcac
tcgaaagccttaccagccctacgccctgccagagactttgcagcgtaccgcccc

配列番号8. マウスLYPD3 CARの41BB共刺激シグナル伝達ドメインの核酸配列

【化8】

aatggatcaggaaaaattccccacatattcaagcaaccatttaagaagaccactggagcagctca
agaggaagatgctttagctgccgatgtccacaggaagaagaaggaggaggaggagctatgagctg

20

配列番号9. マウスLYPD3 CARのCD3細胞内シグナル伝達ドメインの核酸配列

【化9】

agagcaaaattcagcaggagtgcagagactgctgccaacctgcaggaccccaaccagctctacaatga
gctcaatctagggcgaagagaggaatatgacgtcttggagaagaagcgggctcgcgatccagagatgg
gaggcaaacagcagaggaggaggaacccccaggaaggcgtatacaatgcactgcagaaagacaagatg
gcagaagcctacagtgagatcggcacaaaaggcgagaggcggagaggcaaggggcacgatggccttta
ccagggtctcagcactgccaccaaggacacctatgatgccttgcataatgcagaccctggccccctcgc

配列番号10. LYPD3-scFvのアミノ酸配列

【化10】

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEW
VSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGLWAFDKWGQGLVTV
SSGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVWHYQQLPGTAPKLLIY
DNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAFDDRLNGPVFGGGTKLTVLGQ

30

配列番号11. 膜貫通ドメインのアミノ酸配列

【化11】

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV
LLLSLVITLYCNHRN

40

配列番号12. CD28共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列

【化12】

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

配列番号13. 41BB共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列

【化13】

RFSVVKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEGGCEL

配列番号14. CD3細胞内シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列

【化14】

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

配列番号15. マウスLYPD3 CARの膜貫通ドメインのアミノ酸配列

【化15】

TTTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICY
HRSR

配列番号16. マウスLYPD3 CARのCD28共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列

【化16】

NSRRNRLQLVTTMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRP

配列番号17. マウスLYPD3 CARの41BB共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列

【化17】

KWIRKKFPHIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL

配列番号18. マウスLYPD3 CARのCD3 細胞内シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列

【化18】

RAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQRRRNPNQEGVYNALQKDKM
AEAYSEIGTKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLAPR

配列番号19. NM_014400.3 Homo sapiens LY6/PLAURドメイン含有3(LYPD3), mRNA

【化19-1】

ACATCCAGGGGGGACGCCAAGGGAGCAGGACGGAGCCATGGACCCCGCCAGGAAAGCAGGTGCCCAGG
CCATGATCTGGACTGCAGGCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTTCGCGGAGGAGCGCAGGCCCTGGAGTGC
TACAGCTGCGTGCAGAAAGCAGATGACGGATGCTCCCCGAACAAGATGAAGACAGTGAAGTGCGCGCC

10

20

【化 19 - 2】

GGGCGTGGACGTCTGCACCGAGGCCGTGGGGGCGGTGGAGACCATCCACGGACAATTCTCGCTGGCAG
 TCGGGGTTGCGGTTTCGGGACTCCCCGGCAAGAATGACCGCGGCCTGGATCTTCACGGGCTTCTGGCG
 TTCATCCAGCTGCAGCAATGCGCTCAGGATCGCTGCAACGCCAAGCTCAACCTCACCTCGCGGGCGCT
 CGACCCGGCAGGTAATGAGAGTGCATACCCGCCAACGGCGTGGAGTGCTACAGCTGTGTGGGCCTGA
 GCCGGGAGGCGTGCCAGGTTACATCGCCGCCGTCGTGAGCTGCTACAACGCCAGCGATCATGTCTAC
 AAGGGCTGCTTCGACGGCAACGTCACCTTGACGGCAGCTAATGTGACTGTGTCTTGCCTGTCCGGGG
 CTGTGTCCAGGATGAATTCTGCACTCGGGATGGAGTAACAGGCCAGGGTTACGCTCAGTGGCTCCT
 GTTGCCAGGGGTCCCGCTGTAACCTTGACCTCCGCAACAAGACCTACTTCTCCCCTCGAATCCCACCC
 CTTGTCCGGCTGCCCTCCAGAGCCCACGACTGTGGCCTCAACCACATCTGTCACCCTTCTACCTC
 GGCCCCAGTGAGACCCACATCCACCACCAAACCCATGCCAGCGCCAACCAGTCAGACTCCGAGACAGG
 GAGTAGAACACGAGGCCTCCCGGGATGAGGAGCCCAGGTTGACTGGAGGCGCCGCTGGCCACCAGGAC
 CGCAGCAATTCAGGGCAGTATCCTGCAAAAGGGGGGCCCCAGCAGCCCCATAATAAAGGCTGTGTGGC
 TCCCACAGCTGGATTGGCAGCCCTTCTGTTGGCCGTGGCTGCTGGTGTCTACTGTGAGCTTCTCCAC
 CTGGAAATTTCCCTCTCACCTACTTCTCTGGCCCTGGGTACCCCTCTTCTCATCACTTCTGTTCCCA
 CCACTGGACTGGGCTGGCCAGCCCCTGTTTTTCCAACATTTCCCAGTATCCCAGCTTCTGCTGCGC
 TGGTTTTCGGGCTTTGGGAAATAAAATACCGTTGTATATATTTCTGCCAGGGGTGTTCTAGCTTTTTGAG
 GACAGCTCCTGTATCCTTCTCATCCTTGTCTCTCCGCTTGTCTCTTGTGATGTTAGGACAGAGTGAG
 AGAAGTCAGCTGTCACGGGGAAGGTGAGAGAGAGGATGCTAAGCTTCTACTCACTTTCTCCTAGCCA
 GCCTGGACTTTGGAGCGTGGGGTGGGTGGGACAATGGCTCCCCACTCTAAGCACTGCCTCCCCTACTC
 CCCGCATCTTTGGGGAATCGGTTCCCATATGTCTTCTTACTAGACTGTGAGCTCCTCGAGGGCAGG
 GACCGTGCCTTATGTCTGTGTGTGATCAGTTTCTGGCACATAAATGCCTCAATAAAGATTTAATTACT
 TTGTATAGTG

10

20

配列番号20. NP_055215.2 Iy6/PLAURドメイン含有タンパク質3前駆体[Homo sapiens]

【化 20】

MDPARKAGAQAMIWTAGWLLLLLLRGAQALECYSCVQKADDGCSFNKMKTVKCAPGVDVCTEAVGAV
 ETIHGQFSLAVRGCGLPGKNDRLDLHGLLAFIQLQQAQDRCNALNLTSRALDPAGNESAYPPN
 GVECYSVGLSREACQGTSPVVSVCYNASDHVYKCFDGNVTLTAANVTVSLPVRGCVQDEFCTRDGV
 TGPFTLSGCCQGSRCNSDLRNKTYFSPRIPLVRLPPPEPTTVASTTSVTTSTSAPVRPTSTTKPM
 PAPTSTPRQVEHEASRDEEPRLTGGAAGHQDRSNSGQYPAKGGPQQPHNKGCVAPTAGLAALLLAV
 AAGVLL

30

【0079】

本明細書で言及される任意の特許または刊行物は、本発明が関連する分野の当業者のレ
 ベルを示す。これらの特許および刊行物は、各個々の刊行物が、参考として援用されるこ
 とを具体的にかつ個々に示されるのと同程度まで、本明細書に参考として援用される。矛
 盾する場合には、定義を含め、本明細書が優先する。

40

【0080】

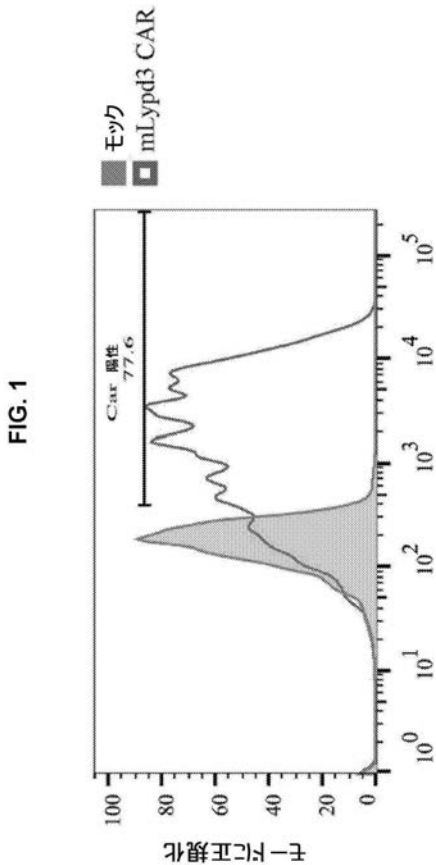
当業者は、本発明が、目的を果たし、言及される目的および利点、ならびにその中に内
 在するものを得るために十分に適合されることを容易に認識する。本明細書に記載される
 開示は、好ましい実施形態の現在の代表であり、例示であり、本発明の範囲に対する限定
 とは意図されない。その中での変更および他の使用は、当業者に想起され、それは、請求
 項の範囲によって規定されるとおりの本発明の趣旨の範囲内に包含される。

【0081】

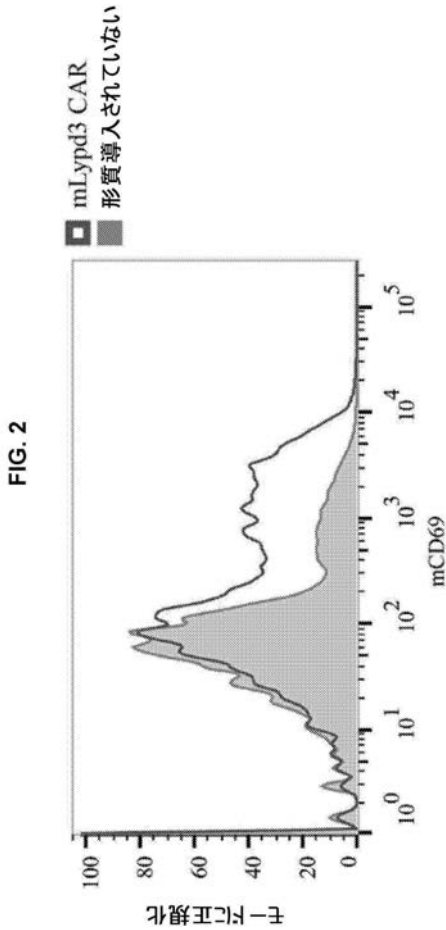
50

本明細書で引用される任意の非特許文献または特許文献を含め、任意の参考文献が、先行技術を構成することは、認めない。特に、別段述べられなければ、本明細書中の任意の文献に対する言及は、これらの文献のうちのいずれかが米国または任意の他の国において当該分野での一般的技術常識の一部を形成するという自白を構成しないことが、理解される。上記参考文献の何らかの考察は、それらの著者らが主張することを述べ、出願人は、本明細書で引用される文献のうちのいずれかの正確さおよび適切であることに異議を唱える権利を留保する。本明細書で引用される全ての参考文献は、別段明示的に示されなければ、参考として完全に援用される。任意の定義および/または引用文献中に見出される記載との間で何らかの不一致が存在する場合には、本開示が優先する。

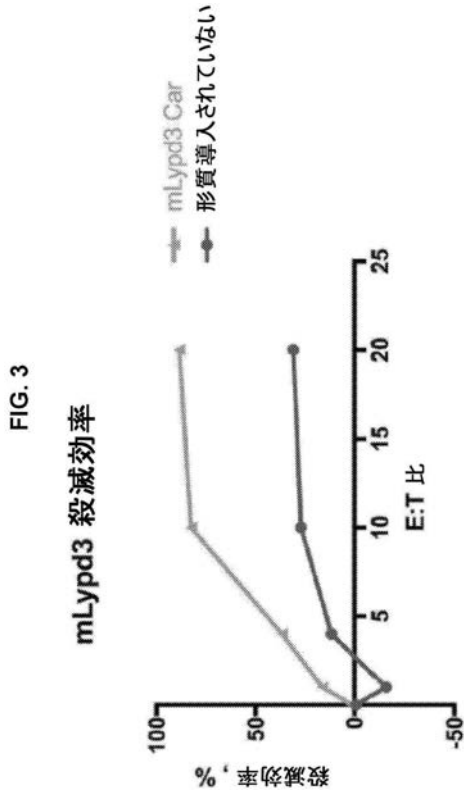
【 図 1 】



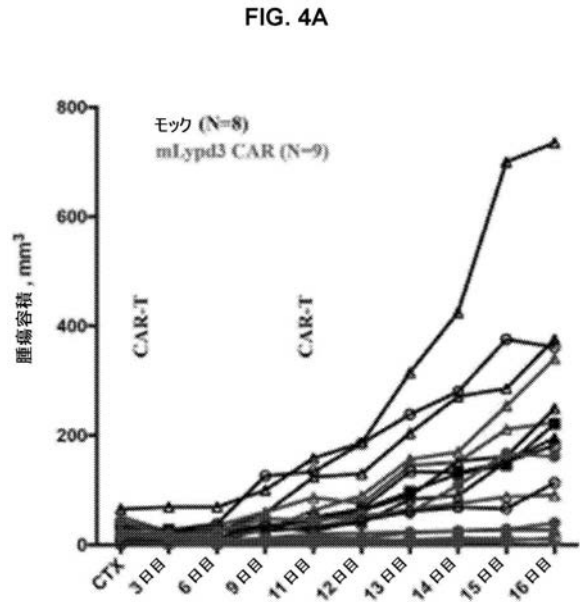
【 図 2 】



【 図 3 】

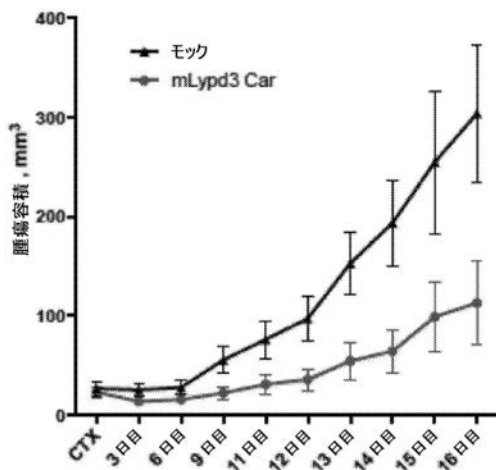


【 図 4 A 】



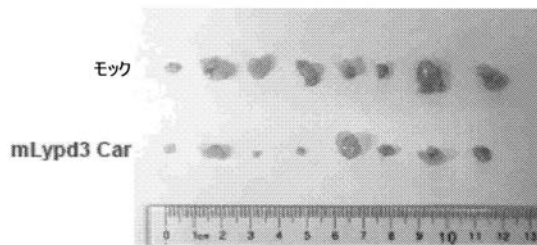
【 図 4 B 】

FIG. 4B

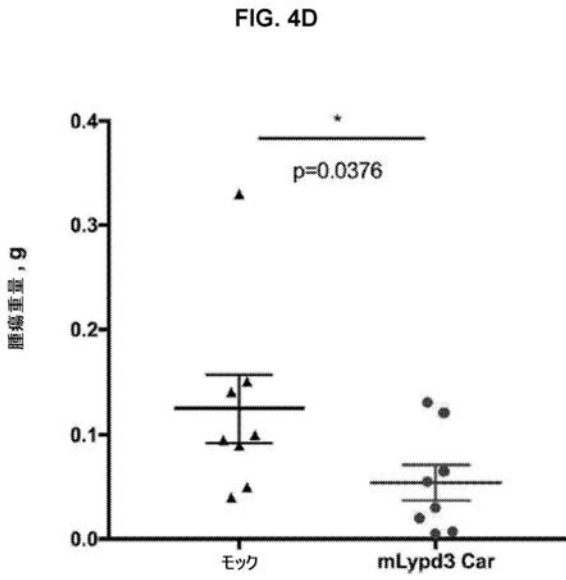


【 図 4 C 】

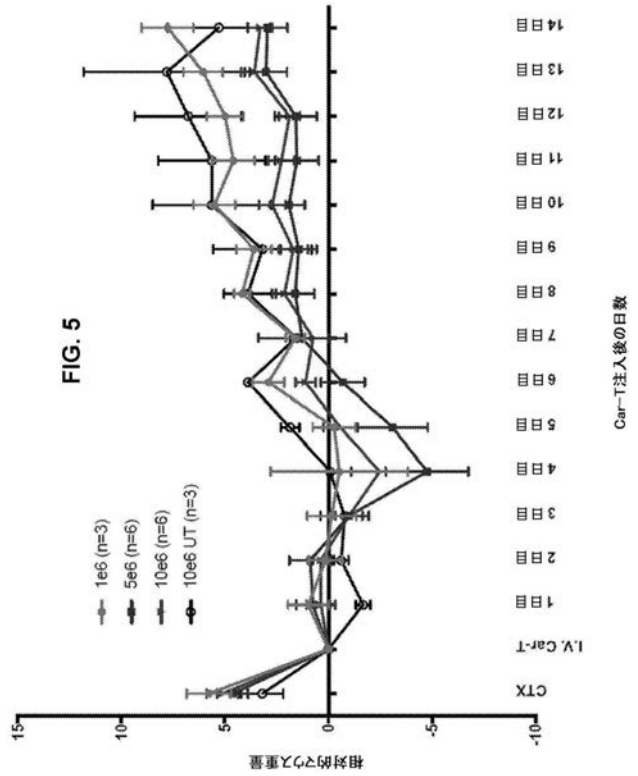
FIG. 4C



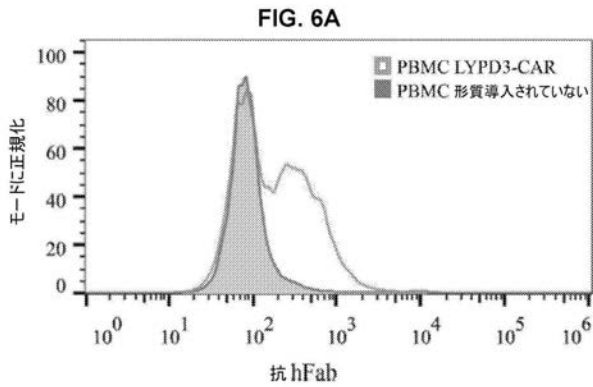
【 図 4 D 】



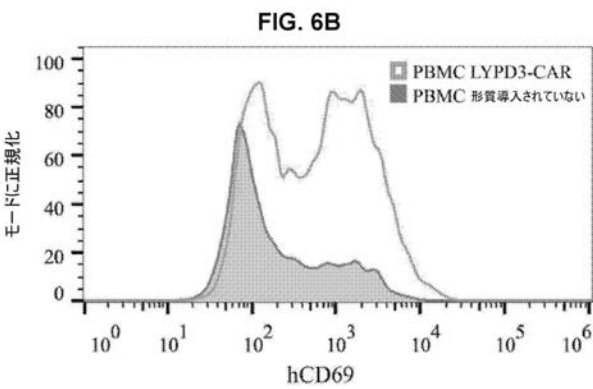
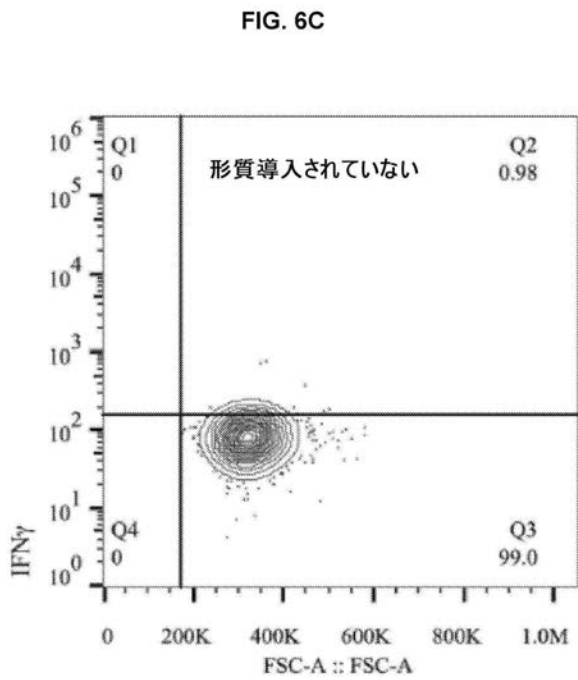
【 図 5 】



【 図 6 - 1 】

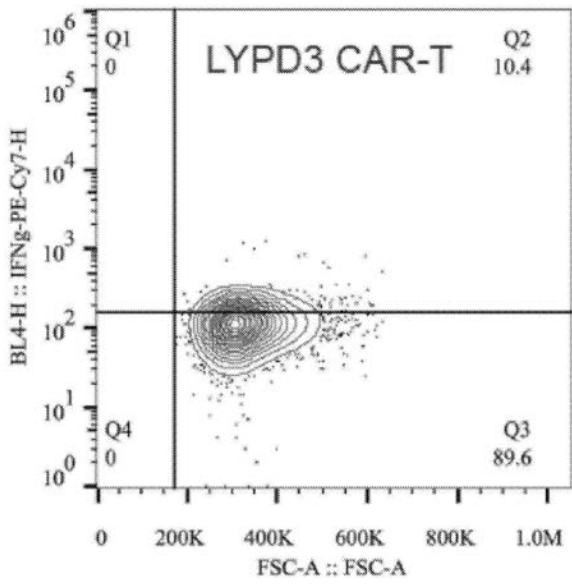


【 図 6 - 2 】



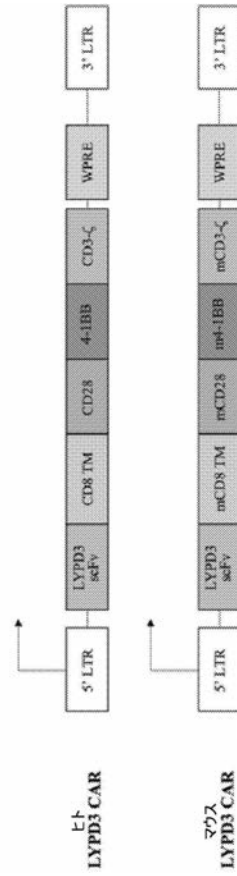
【 図 6 - 3 】

FIG. 6D



【 図 7 】

FIG. 7



【 配列表 】

[202153023800001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/42707

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C07K 16/28, 16/30; A61K 39/395 (2019.01) CPC - C07K 16/28, 16/30; A61K 39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/064084 A1 (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT) 20 April 2017; abstract; page 4, lines 21-25; page 13, lines 16-17; page 17, lines 28-29; claim 1	1-2, 4/1-2
Y --- A	US 2017/0158775 A1 (BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH) 08 June 2017; paragraphs [0030]-[0031], [0071]	1-2, 4/1-2 ----- 3, 4/3
A	(LANTTO, J et al.) Functional Consequences of Insertions and Deletions in the Complementarity-determining Regions of Human Antibodies. The Journal of Biological Chemistry. 16 September 2002; Vol. 277, No. 47; pages 45106-45114; Genbank Supplemental pages 1-2; DOI: 10.1074/jbc.M208401200	3, 4/3
A	US 2004/0071696 A1 (ADAMS, GP et al.) 15 April 2004; paragraph [0013]	3, 4/3
P, X	WO 2019/186877 A1 (SIXFOLD BIOSCIENCE LTD.) 08 September 2019; whole document	1-2, 4/1-2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 September 2019 (26.09.2019)		Date of mailing of the international search report 07 NOV 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/42707

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/42707

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 5-28
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. P l u r o n i c

(72) 発明者 ワン, シャオ - ファン
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27705, ダーラム, アーウィン ロード 2812
 , スイート 306, デューク ユニバーシティ 気付

(72) 発明者 チョン, メンヤン
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27705, ダーラム, アーウィン ロード 2812
 , スイート 306, デューク ユニバーシティ 気付

(72) 発明者 チェン, ルイ
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27705, ダーラム, アーウィン ロード 2812
 , スイート 306, デューク ユニバーシティ 気付

Fターム(参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 AC20 BA02 CA44
 4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 NA05 NA14
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA42 DA50 DA76 EA22
 EA28 FA74