

(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2021-515598
(P2021-515598A)

(43) 公表日 令和3年6月24日(2021.6.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725 Z N A	4 C 0 8 7
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-571330 (P2020-571330)
 (86) (22) 出願日 平成31年3月8日 (2019.3.8)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年9月30日 (2020.9.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/021315
 (87) 国際公開番号 WO2019/173693
 (87) 国際公開日 令和1年9月12日 (2019.9.12)
 (31) 優先権主張番号 62/641, 159
 (32) 優先日 平成30年3月9日 (2018.3.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 519032826
 ティーシーアール2 セラピューティクス
 インク.
 アメリカ合衆国 02142 マサチュー
 セッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリ
 ート 100 스위트 710
 (74) 代理人 100082072
 弁理士 清原 義博
 (72) 発明者 バウエル, パトリック アレクサンダー
 アメリカ合衆国 02142 マサチュー
 セッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリ
 ート 100 7階

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 融合タンパク質を用いたTCRリプログラミングのための組成物及び方法

(57) 【要約】

本明細書では、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)及びTCR定常ドメインをコードする組換え核酸、コードされた分子を発現する改変T細胞、及びがんを含む疾患の治療のためのその使用方法を提供する。

【選択図】 図1

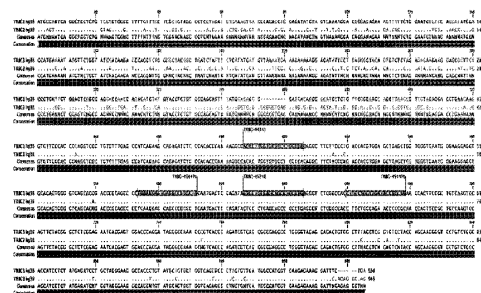


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換え核酸であって、

(a) T 細胞受容体 (T C R) 融合タンパク質 (T F P) をコードする配列であって

、

(i) 以下 :

(1) T C R 細胞外ドメインの少なくとも一部、

(2) 膜貫通ドメイン、及び

(3) C D 3 イプシロン、C D 3 ガンマ、C D 3 デルタ、T C R アルファ、または T C R ベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む T C R サブユニットと

10

(i i) 抗原結合ドメインを含むヒト抗体またはヒト化抗体とを含む前記配列と、

(b) T C R 定常ドメインをコードする配列であって、前記 T C R 定常ドメインが、T C R アルファ定常ドメイン、T C R ベータ定常ドメイン、または T C R アルファ定常ドメインと T C R ベータ定常ドメインである、前記配列とを含み、

前記 T C R サブユニット及び前記抗体が機能的に連結されており、かつ

内因性 T C R の機能的破壊を含む改変 T 細胞で発現すると前記 T F P が T C R 複合体に機能的に組み込まれる、

20

組換え核酸。

【請求項 2】

組換え核酸であって、

(a) T 細胞受容体 (T C R) 融合タンパク質 (T F P) をコードする配列であって

、

(i) 以下 :

(1) T C R 細胞外ドメインの少なくとも一部、

(2) 膜貫通ドメイン、及び

(3) C D 3 イプシロン、C D 3 ガンマ、C D 3 デルタ、T C R アルファ、または T C R ベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む T C R サブユニットと

30

(i i) 抗体またはその断片に結合できる結合リガンドまたはその断片とを含む前記配列と、

(b) T C R 定常ドメインをコードする配列であって、前記 T C R 定常ドメインが、T C R アルファ定常ドメイン、T C R ベータ定常ドメイン、または T C R アルファ定常ドメインと T C R ベータ定常ドメインである、前記配列とを含み、

前記 T C R サブユニット及び結合リガンドまたはその断片は機能的に連結されており、かつ

内因性 T C R の機能的破壊を含む改変 T 細胞で発現すると前記 T F P が T C R 複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸。

40

【請求項 3】

前記結合リガンドが、前記抗体の F c ドメインと結合できる、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 4】

前記結合リガンドが、I g G 1 抗体と選択的に結合できる、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 5】

前記結合リガンドが、I g G 4 抗体と特異的に結合できる、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 6】

50

前記抗体またはその断片が細胞表面抗原に結合する、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 7】

前記抗体またはその断片が腫瘍細胞の表面にある細胞表面抗原に結合する、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 8】

前記結合リガンドが、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体を含む、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 9】

前記結合リガンドが抗体またはその断片を含まない、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 10】

前記結合リガンドが CD 16 ポリペプチドまたはその断片を含む、請求項 9 に記載の組換え核酸。

【請求項 11】

前記結合リガンドが CD 16 結合ポリペプチドを含む、請求項 10 に記載の組換え核酸。

【請求項 12】

前記結合リガンドがヒトのものであるか、またはヒト化されている、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 13】

前記結合リガンドが結合できる抗体またはその断片をコードする核酸配列をさらに含む、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 14】

前記抗体またはその断片が細胞から分泌できる、請求項 13 に記載の組換え核酸。

【請求項 15】

組換え核酸であって、

(a) T 細胞受容体 (T C R) 融合タンパク質 (T F P) をコードする配列であって、

(i) 以下：

(1) T C R 細胞外ドメインの少なくとも一部、

(2) 膜貫通ドメイン、及び

(3) C D 3 イプシロン、C D 3 ガンマ、C D 3 デルタ、T C R アルファ、または T C R ベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む T C R サブユニットと

(i i) 細胞の表面に発現する受容体またはポリペプチドに結合するリガンドまたはその断片を含む抗原ドメインと

を含む前記配列と、

(b) T C R 定常ドメインをコードする配列であって、前記 T C R 定常ドメインが、T C R アルファ定常ドメイン、T C R ベータ定常ドメイン、または T C R アルファ定常ドメインと T C R ベータ定常ドメインである、前記配列とを含み、

前記 T C R サブユニット及び前記抗原ドメインは機能的に連結されており、かつ

内因性 T C R の機能的破壊を含む改変 T 細胞で発現すると前記 T F P が T C R 複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸。

【請求項 16】

前記抗原ドメインがリガンドを含む、請求項 15 に記載の組換え核酸。

【請求項 17】

前記リガンドが細胞の受容体に結合する、請求項 15 に記載の組換え核酸。

【請求項 18】

前記リガンドが細胞の表面に発現するポリペプチドに結合する、請求項 15 に記載の組換え核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

細胞の表面に発現する前記受容体またはポリペプチドが、ストレス応答受容体またはポリペプチドを含む、請求項 15 に記載の組換え核酸。

【請求項 20】

細胞の表面に発現する前記受容体またはポリペプチドが、MHC クラス I 関連糖タンパク質である、請求項 15 に記載の組換え核酸。

【請求項 21】

前記 MHC クラス I 関連糖タンパク質が、MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 20 に記載の組換え核酸。

10

【請求項 22】

前記抗原ドメインが、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体を含む、請求項 15 に記載の組換え核酸。

【請求項 23】

前記抗原ドメインが、前記リガンドまたはその断片の単量体または二量体を含む、請求項 22 に記載の組換え核酸。

【請求項 24】

前記リガンドまたはその断片が、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体である、請求項 15 に記載の組換え核酸。

【請求項 25】

前記リガンドまたはその断片が単量体または二量体である、請求項 24 に記載の組換え核酸。

20

【請求項 26】

前記抗原ドメインが抗体またはその断片を含まない、請求項 15 に記載の組換え核酸。

【請求項 27】

前記抗原ドメインが可変領域を含まない、請求項 15 に記載の組換え核酸。

【請求項 28】

前記抗原ドメインが CDR を含まない、請求項 15 に記載の組換え核酸。

【請求項 29】

前記リガンドまたはその断片が、ナチュラルキラーグループ 2D (NKG2D) リガンドまたはその断片である、請求項 15 に記載の組換え核酸。

30

【請求項 30】

T 細胞で発現すると、前記 TCR 定常ドメインが機能的 TCR 複合体に組み込まれる、請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 31】

前記 TCR 定常ドメインが、T 細胞で発現すると、前記 TFP を組み込む前記機能的 TCR 複合体と同じ機能的 TCR 複合体に組み込まれる、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 32】

前記 TFP をコードする配列と前記 TCR 定常ドメインをコードする配列が、同じ核酸分子内に含まれている、請求項 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

40

【請求項 33】

前記 TFP をコードする配列と前記 TCR 定常ドメインをコードする配列が、異なる核酸分子内に含まれている、請求項 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 34】

前記 TCR サブユニットと、前記抗体ドメイン、前記抗原ドメイン、もしくは前記結合リガンド、またはそれらの断片とが、リンカー配列によって機能的に連結されている、請求項 1 ~ 33 に記載の組換え核酸。

【請求項 35】

前記リンカー配列が $(G_4S)_n$ (式中、 $n = 1 \sim 4$) を含む、請求項 34 に記載の組

50

換え核酸。

【請求項 36】

前記膜貫通ドメインが、CD3 イプシロン、CD3 ガンマ、CD3 デルタ、TCR アルファ、またはTCR ベータからのTCR 膜貫通ドメインである、請求項 1～35 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 37】

前記細胞内ドメインが、CD3 イプシロンのみ、CD3 ガンマのみ、CD3 デルタのみ、TCR アルファのみ、またはTCR ベータのみに由来する、請求項 1～36 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 38】

前記TCR サブユニットが、(i) TCR 細胞外ドメインの少なくとも一部、(ii) TCR 膜貫通ドメイン、及び(iii) TCR 細胞内ドメインを含み、(i)、(ii)、及び(iii)のうち少なくとも2つは同じTCR サブユニット由来である、請求項 1～37 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

10

【請求項 39】

前記TCR 細胞外ドメインが、TCR アルファ鎖、TCR ベータ鎖、CD3 イプシロンTCR サブユニット、CD3 ガンマTCR サブユニット、CD3 デルタTCR サブユニット、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の細胞外ドメインまたはその一部を含む、請求項 1～38 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

20

【請求項 40】

前記TCR サブユニットが、TCR アルファ鎖、TCR ベータ鎖、TCR ゼータ鎖、CD3 イプシロンTCR サブユニット、CD3 ガンマTCR サブユニット、CD3 デルタTCR サブユニット、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む、請求項 1～39 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 41】

前記TCR サブユニットが、CD3 イプシロン、CD3 ガンマ、またはCD3 デルタの細胞内シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含むTCR 細胞内ドメインを含む、請求項 1～40 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

30

【請求項 42】

前記TCR サブユニットが、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメイン及び/またはCD3 ゼータの機能的シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含む細胞内ドメインを含む、請求項 1～41 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 43】

共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項 1～42 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

40

【請求項 44】

前記共刺激ドメインが、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、及び4-1BB(CD137)、ならびに少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む、請求項 43 に記載の組換え核酸。

【請求項 45】

前記TCR サブユニットが、CD3 ゼータTCR サブユニット、CD3 イプシロンTCR サブユニット、CD3 ガンマTCR サブユニット、CD3 デルタTCR サブユニット、

50

TCRゼータ鎖、Fcイプシロン受容体1鎖、Fcイプシロン受容体2鎖、Fcガンマ受容体1鎖、Fcガンマ受容体2a鎖、Fcガンマ受容体2b1鎖、Fcガンマ受容体2b2鎖、Fcガンマ受容体3a鎖、Fcガンマ受容体3b鎖、Fcベータ受容体1鎖、TYROBP(DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)またはその一部を含む、TCRサブユニットITAMを含む、請求項1~44のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項46】

前記ITAMが、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはCD3イプシロンのITAMを置換する、請求項45に記載の組換え核酸。

【請求項47】

前記ITAMが、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択され、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択される別のITAMを置換する、請求項45に記載の組換え核酸。

【請求項48】

前記TFP、前記TCRアルファ定常ドメイン、前記TCRベータ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせが、内因性TCR複合体及び/または少なくとも1つの内因性TCRポリペプチドと機能的に相互作用できる、請求項1~47のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項49】

(a)前記TCR定常ドメインはTCRアルファ定常ドメインであり、前記TFPがTCRベータ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体に機能的に統合されるか、

(b)前記TCR定常ドメインはTCRベータ定常ドメインであり、前記TFPがTCRアルファ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体に機能的に統合されるか、あるいは

(c)前記TCR定常ドメインはTCRアルファ定常ドメイン及びTCRベータ定常ドメインであり、前記TFPが、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体に機能的に統合される、請求項1~48のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項50】

前記少なくとも1つだが20以下の修飾が、細胞シグナル伝達を媒介するアミノ酸の修飾、またはTFPへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の修飾を含む、請求項1~49のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項51】

前記ヒト抗体またはヒト化抗体が抗体断片である、請求項1及び34~50のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項52】

前記抗体断片が、scFv、単一ドメイン抗体ドメイン、V_Hドメイン、またはV_Lドメインである、請求項51に記載の組換え核酸。

【請求項53】

抗原結合ドメインが、抗CD19結合ドメイン、抗B細胞成熟抗原(BCMA)結合ドメイン、抗メソテリン(MSLN)結合ドメイン、抗IL13R2結合ドメイン、抗MUC16結合ドメイン、抗CD22結合ドメイン、抗PD-1結合ドメイン、抗BAFFまたはBAFF受容体結合ドメイン、及び抗ROR-1結合ドメインからなる群から選択される、請求項1及び34~52のいずれか1項に記載の組換え核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 54】

前記核酸が、DNA及びRNAからなる群から選択される、請求項1～53のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項 55】

前記核酸がmRNAである、請求項1～54のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項 56】

前記組換え核酸が核酸類似体を含み、前記核酸類似体は前記組換え核酸のコード配列にはない、請求項1～55のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項 57】

前記核酸類似体が、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、ロックド核酸(LNA)、エチレン核酸(ENA)、ペプチド核酸(PNA)、1',5'-アンヒドロヘキシトール核酸(HNA)、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、及び2'-フルオロN3-P5'-ホスホロアミダイトからなる群から選択される、請求項56に記載の組換え核酸。

10

【請求項 58】

リーダー配列をさらに含む、請求項1～57のいずれか1項に記載の組換え核酸。

20

【請求項 59】

プロモーター配列をさらに含む、請求項1～58のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項 60】

ポリ(A)尾部をコードする配列をさらに含む、請求項1～59のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項 61】

3'UTR配列をさらに含む、請求項1～60のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項 62】

前記核酸が、単離された核酸または天然に存在しない核酸である、請求項1～61のいずれか1項に記載の組換え核酸。

30

【請求項 63】

前記核酸がin vitro転写した核酸である、請求項1～62のいずれか1項に記載の組換え核酸分子。

【請求項 64】

TCRアルファ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項1～63のいずれか1項に記載の組換え核酸分子。

【請求項 65】

TCRベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項1～63のいずれか1項に記載の組換え核酸分子。

40

【請求項 66】

TCRアルファ膜貫通ドメインをコードする配列及びTCRベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項1～63のいずれか1項に記載の組換え核酸。

【請求項 67】

請求項1～66のいずれか1項に記載の組換え核酸を含むベクター。

【請求項 68】

DNA、RNA、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)ベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群から選択される、請求項67に記載のベクター。

【請求項 69】

50

A A V 6 ベクターである、請求項 6 7 または 6 8 に記載のベクター。

【請求項 7 0】

プロモーターをさらに含む、請求項 6 7 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 7 1】

in vitro 転写したベクターである、請求項 6 7 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 7 2】

請求項 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸または請求項 6 7 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む改変 T 細胞であって、内因性 T C R の機能的破壊を含む、改変 T 細胞。

10

【請求項 7 3】

請求項 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の核酸の T F P をコードする配列、または T F P をコードする請求項 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の核酸の配列によってコードされる T F P を含む改変 T 細胞であって、内因性 T C R の機能破壊を含む、改変 T 細胞。

【請求項 7 4】

請求項 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の T F P をコードする配列、または T F P をコードする請求項 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の核酸の配列によってコードされる T F P を含む、改変同種 T 細胞。

【請求項 7 5】

T C R 定常ドメインをコードする異種配列をさらに含み、前記 T C R 定常ドメインは、T C R アルファ定常ドメイン、T C R ベータ定常ドメイン、または T C R アルファ定常ドメインと T C R ベータ定常ドメインである、請求項 7 2 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞。

20

【請求項 7 6】

前記機能的に破壊される内因性 T C R が、内因性 T C R アルファ鎖、内因性 T C R ベータ鎖、または内因性 T C R アルファ鎖と内因性 T C R ベータ鎖である、請求項 7 2 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞。

【請求項 7 7】

前記機能的に破壊された内因性 T C R が、未改変の対照 T 細胞のものと比較して、M H C ペプチド複合体への結合が減少する、請求項 7 2 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞。

30

【請求項 7 8】

前記機能的破壊が、前記内因性 T C R をコードする遺伝子の破壊である、請求項 7 2 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞。

【請求項 7 9】

前記内因性 T C R をコードする遺伝子の前記破壊が、T 細胞のゲノム由来の前記内因性 T C R をコードする前記遺伝子の配列の除去である、請求項 7 8 に記載の改変 T 細胞。

【請求項 8 0】

C D 4 細胞、C D 8 細胞、ナイーブ T 細胞、メモリー幹 T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、二重陰性 T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞、エフェクター T 細胞、T h 0 細胞、T c 0 細胞、T h 1 細胞、T c 1 細胞、T h 2 細胞、T c 2 細胞、T h 1 7 細胞、T h 2 2 細胞、ガンマ/デルタ T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、ナチュラルキラー T (N K T) 細胞、造血幹細胞、及び多能性幹細胞から選択されるヒト T 細胞である、請求項 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞。

40

【請求項 8 1】

C D 8 ⁺ T 細胞または C D 4 ⁺ T 細胞である、請求項 7 2 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞。

【請求項 8 2】

同種 T 細胞である、請求項 7 2 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞。

【請求項 8 3】

50

抑制分子の少なくとも一部を含む第 1 のポリペプチドを含む抑制分子をコードする核酸を、細胞内シグナル伝達ドメインからの陽性シグナルを含む第 2 のポリペプチドと会合してさらに含む、請求項 7 2 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞。

【請求項 8 4】

前記抑制分子が、PD 1 の少なくとも一部を含む第 1 のポリペプチドと、共刺激ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第 2 のポリペプチドとを含む、請求項 8 3 に記載の改変 T 細胞。

【請求項 8 5】

- (a) 請求項 7 2 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞と、
- (b) 薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

10

【請求項 8 6】

請求項 7 2 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞を作製する方法であって、

(a) TCR アルファ鎖、TCR ベータ鎖、または TCR アルファ鎖と TCR ベータ鎖をコードする内因性 TCR 遺伝子を破壊し、それにより内因性 TCR 遺伝子の機能的破壊を含んだ T 細胞を作製することと、

(b) 内因性 TCR 遺伝子の機能的破壊を含んだ T 細胞に、請求項 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸または請求項 6 7 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載のベクターを形質導入することを含む、方法。

【請求項 8 7】

前記破壊が、TCR アルファ鎖、TCR ベータ鎖、または TCR アルファ鎖と TCR ベータ鎖をコードする内因性遺伝子を標的とするヌクレアーゼタンパク質、またはヌクレアーゼタンパク質をコードする核酸配列を T 細胞に形質導入することを含む、請求項 8 6 に記載の方法。

20

【請求項 8 8】

請求項 7 2 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞を作製する方法であって、内因性 TCR 遺伝子の機能的破壊を含んだ T 細胞に、請求項 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸または請求項 6 7 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載のベクターを形質導入することを含む、方法。

【請求項 8 9】

内因性 TCR 遺伝子の機能的破壊を含んだ前記 T 細胞が、TCR アルファ鎖、TCR ベータ鎖、または TCR アルファ鎖と TCR ベータ鎖をコードする内因性 TCR 遺伝子の機能的破壊を含んだ T 細胞である、請求項 8 8 に記載の方法。

30

【請求項 9 0】

前記 T 細胞がヒト T 細胞である、請求項 8 6 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 1】

内因性 TCR 遺伝子の機能的破壊を含んだ前記 T 細胞が、未変更の対照 T 細胞のものと比較して、MHC - ペプチド複合体への結合が減少する、請求項 8 6 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、CRISPR/Cas ヌクレアーゼ、または me g a T A L ヌクレアーゼである、請求項 8 6 ~ 9 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 9 3】

前記組換え核酸または前記ベクターに含まれる前記配列が、切断部位で前記内因性 TCR サブユニット遺伝子に挿入され、前記内因性 TCR サブユニット遺伝子への前記配列の前記挿入により前記内因性 TCR サブユニットが機能的に破壊される、請求項 8 6 ~ 9 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記ヌクレアーゼがメガヌクレアーゼである、請求項 8 6 ~ 9 3 のいずれか 1 項に記載

50

の方法。

【請求項 9 5】

前記メガヌクレアーゼが第 1 のサブユニット及び第 2 のサブユニットを含み、前記第 1 のサブユニットは前記認識配列の第 1 の認識半部位に結合し、前記第 2 のサブユニットは前記認識配列の第 2 の認識半部位に結合する、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記メガヌクレアーゼが、リンカーを含む一本鎖メガヌクレアーゼであり、前記リンカーは前記第 1 のサブユニットと前記第 2 のサブユニットとを共有結合する、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

治療を必要とする対象におけるがんの治療方法であって、請求項 8 5 に記載の治療有効量の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

10

【請求項 9 8】

治療を必要とする対象におけるがんの治療方法であって、(a) 請求項 8 6 ~ 9 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って作製される改変 T 細胞と、(b) 薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 9 9】

治療を必要とする対象におけるがんの治療方法であって、(a) 請求項 8 8 ~ 9 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って作製される改変 T 細胞と、(b) 薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

20

【請求項 1 0 0】

前記改変 T 細胞が同種異系 T 細胞である、請求項 9 7 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

有効量の未改変の対照 T 細胞を投与した対象と比較して、前記対象において放出されるサイトカインが少ない、請求項 9 7 ~ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

請求項 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸または請求項 6 7 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む有効量の改変 T 細胞を投与した対象と比較して、前記対象において放出されるサイトカインが少ない、請求項 9 7 ~ 1 0 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 0 3】

前記方法が、前記医薬組成物の有効性を増加させる薬剤と組み合わせて前記医薬組成物を投与することを含む、請求項 9 7 ~ 1 0 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記方法が、前記医薬組成物に付随する 1 つ以上の副作用を改善する薬剤と組み合わせて前記医薬組成物を投与することを含む、請求項 9 7 ~ 1 0 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記がんが固形癌、リンパ腫、または白血病である、請求項 9 7 ~ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 0 6】

前記がんが、腎細胞癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌、子宮頸癌、脳癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、及び胃癌からなる群から選択される、請求項 9 7 ~ 1 0 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

医薬品としてまたは医薬品の調製に使用するための、請求項 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸、請求項 6 7 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 7 2 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の改変 T 細胞、または請求項 8 5 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年3月9日出願の米国仮出願第62/641,159号の利益を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

血液悪性腫瘍または末期固形腫瘍を有する患者のほとんどは、標準治療では治癒不可能である。加えて、従来の治療法の選択肢は、多くの場合、重篤な副作用がある。がん細胞を拒絶するために患者の免疫系を誘導する数多くの試み、すなわちがん免疫療法と総称される方法が実施されてきた。しかしながら、いくつかの障害が、臨床効果の達成をかなり困難なものにしている。いわゆる腫瘍抗原が何百と特定されているが、これらは多くの場合、自己由来であるため、健康な組織に対してがん免疫療法を向ける可能性があるか、または免疫原性に乏しい。さらに、がん細胞は複数のメカニズムを用いて、がん細胞自体を不可視にするか、またはがん免疫療法による免疫攻撃の開始及び伝播に対抗する。

10

【0003】

キメラ抗原受容体(CAR)改変自己T細胞療法は、遺伝子操作したT細胞をがん細胞の適切な細胞表面分子へ誘導する方法を利用しているが、この療法を用いた最近の開発は、免疫系の作用を利用したB細胞悪性腫瘍治療において有望な結果を示している(例えば、Sadelain et al., Cancer Discovery 3:388-398(2013)を参照)。CD19特異的CAR T細胞(CTL019と称する)での臨床結果は、慢性リンパ性白血病(CLL)ならびに小児急性リンパ球性白血病(ALL)に罹患した患者において完全寛解を示した(例えば、Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73(2011)、Porter et al., NEJM 365:725-733(2011)、Grupp et al., NEJM 368:1509-1518(2013)を参照)。これに代わる手法は、自己T細胞を遺伝子操作するために、腫瘍関連ペプチド抗原に合わせて選択されたT細胞受容体(TCR)アルファ鎖及びベータ鎖を使用することである。これらのTCR鎖は完全なTCR複合体を形成し、第2の定められた特異性のためにTCRをT細胞に提供する。NY-ESO-1特異的TCRアルファ鎖及びベータ鎖を発現する改変自己T細胞によって滑膜癌の患者で有望な結果が得られた。

20

30

【0004】

改変T細胞による患者の治療を奏功させるには、CARまたは第2のTCRを発現する遺伝子改変T細胞が、in vitro/ex vivoでそれぞれの標的細胞を認識して破壊する能力以外に、強力な活性化、増殖、経時的な持続性が可能であること、及び再発性疾患の場合には「メモリー」応答を可能にすることが当該T細胞に必要とされる。CAR T細胞の高度かつ操作可能な臨床有効性は、現在のところ、CD19陽性B細胞悪性腫瘍と、HLA-A2表現型の、NY-ESO-1-ペプチドを発現する滑膜肉腫患者に限定されている。

40

【発明の概要】

【0005】

種々のヒト悪性腫瘍に対して幅広く作用させるため、遺伝子操作T細胞の改善が必要とされていることは明らかである。

【0006】

本明細書では、CD3イプシロン鎖、CD3ガンマ鎖、CD3デルタ鎖、TCRガンマ鎖、TCRデルタ鎖、TCRアルファ鎖、及びTCRベータ鎖を含むTCRサブユニットと細胞表面抗原に特異的な結合ドメインとの融合タンパク質を含み、既存の手法の限界を克服する可能性を有する改変T細胞について記載する。加えて、この改変T細胞は、内因性TCR(例えば、TCRアルファ、ベータ、またはその両方)を機能的に破壊させることができる。この改変T細胞は、CARよりも効率的に標的細胞を殺傷する能力を有し得

50

るが、CARと同等またはそれよりも低レベルの炎症性サイトカインを放出し得る。そのようなサイトカインのレベル上昇は養子CAR-T療法用量制限毒性を伴っているため、この改変T細胞及びその使用方法は、CARと比較した場合の当該細胞の優位性を表し得る。

【0007】

本明細書では、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)及びTCR定常ドメインを含む改変T細胞、改変T細胞の作製方法、及び疾患の治療のためのその使用方法を提供する。

【0008】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)(i)(1)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(2)膜貫通ドメイン、及び(3)CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRガンマ、TCRデルタ、TCRアルファ、またはTCRベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むTCRサブユニットと、(ii)抗原結合ドメインを含むヒト抗体またはヒト化抗体とを含む、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)をコードする配列と；(b)TCR定常ドメインをコードする配列とを含み、TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、TCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメイン、TCRガンマ定常ドメイン、TCRデルタ定常ドメイン、またはTCRガンマ定常ドメインとTCRデルタ定常ドメインであり；TCRサブユニット及び抗体は機能的に連結されており、かつT細胞で発現するとTFPがTCR複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸である。

【0009】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)(i)(1)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(2)膜貫通ドメイン、及び(3)CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むTCRサブユニットと、(ii)抗体またはその断片に結合できる結合リガンドまたはその断片とを含む、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)をコードする配列と；(b)TCR定常ドメインをコードする配列とを含み、TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、またはTCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメインであり；TCRサブユニット及び結合リガンドまたはその断片は機能的に連結されており、かつ内因性TCRの機能的破壊を含むT細胞で発現するとTFPがTCR複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸である。場合によっては、結合リガンドは、抗体のFcドメインに結合できる。場合によっては、結合リガンドは、IgG1抗体と選択的に結合できる。場合によっては、結合リガンドは、IgG1抗体と特異的に結合できる。場合によっては、抗体またはその断片は細胞表面抗原に結合する。場合によっては、抗体またはその断片は腫瘍細胞の表面にある細胞表面抗原に結合する。場合によっては、結合リガンドは、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体を含む。場合によっては、結合リガンドは抗体またはその断片を含まない。場合によっては、結合リガンドはCD16ポリペプチドまたはその断片を含む。場合によっては、結合リガンドはヒトのものであるか、またはヒト化されている。場合によっては、組換え核酸は、結合リガンドが結合できる抗体またはその断片をコードする核酸配列をさらに含む。場合によっては、抗体またはその断片は細胞から分泌可能である。

【0010】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)(i)(1)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(2)膜貫通ドメイン、及び(3)CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むTCRサブユニットと、(ii)細胞の表面に発現する受容体またはポリペプチドに結合するリガンドまたはその断

片を含む抗原ドメインとを含む、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)をコードする配列と；(b)TCR定常ドメインをコードする配列とを含み、TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、またはTCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメインであり；TCRサブユニット及び抗原ドメインは機能的に連結されており、かつ内因性TCRの機能的破壊を含むT細胞で発現するとTFPがTCR複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸である。場合によっては、抗原ドメインはリガンドを含む。場合によっては、リガンドは細胞の受容体に結合する。場合によっては、リガンドは、細胞の表面に発現するポリペプチドに結合する。場合によっては、細胞の表面に発現する受容体またはポリペプチドは、ストレス応答受容体またはポリペプチドを含む。場合によっては、細胞の表面に発現する受容体またはポリペプチドは、MHCクラスI関連糖タンパク質である。場合によっては、MHCクラスI関連糖タンパク質は、MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。場合によっては、抗原ドメインは、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体を含む。場合によっては、抗原ドメインは、リガンドまたはその断片の単量体または二量体を含む。場合によっては、リガンドまたはその断片は、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体を含む。場合によっては、リガンドまたはその断片は単量体または二量体である。場合によっては、抗原ドメインは抗体またはその断片を含まない。場合によっては、抗原ドメインは可変領域を含まない。場合によっては、抗原ドメインはCDRを含まない。場合によっては、リガンドまたはその断片は、ナチュラルキラーグループ2D(NKG2D)リガンドまたはその断片である。

【0011】

いくつかの実施形態では、上記に開示される組換え核酸に関して、TCR定常ドメインはT細胞で発現すると機能的TCR複合体に組み込まれる。場合によっては、TCR定常ドメインは、T細胞で発現するとTFPを組み込む機能的TCR複合体と同じ機能的TCR複合体に組み込まれる。場合によっては、TFPをコードする配列とTCR定常ドメインをコードする配列とは、同じ核酸分子内に含まれている。場合によっては、TFPをコードする配列とTCR定常ドメインをコードする配列とは、異なる核酸分子内に含まれている。場合によっては、TCRサブユニットと、抗体ドメイン、抗原ドメイン、または結合リガンドもしくはそれらの断片とは、リンカー配列によって機能的に連結されている。場合によっては、リンカー配列は $(G_4S)_n$ (式中、 $n = 1 \sim 4$)を含む。場合によっては、膜貫通ドメインは、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータからのTCR膜貫通ドメインである。場合によっては、細胞内ドメインは、CD3イプシロンのみ、CD3ガンマのみ、CD3デルタのみ、TCRアルファのみ、またはTCRベータのみに由来する。場合によっては、TCRサブユニットは、(i)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(ii)TCR膜貫通ドメイン、及び(iii)TCR細胞内ドメインを含み、(i)、(ii)、及び(iii)のうち少なくとも2つは同じTCRサブユニット由来である。場合によっては、TCR細胞外ドメインは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の細胞外ドメインまたはその一部を含む。場合によっては、TCRサブユニットは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、TCRガンマ鎖、TCRデルタ鎖、TCRゼータ鎖、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。場合によっては、TCRサブユニットは、CD3イプ

シロン、CD3ガンマ、またはCD3デルタの細胞内シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含むTCR細胞内ドメインを含む。場合によっては、TCRサブユニットは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメイン及び/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含む細胞内ドメインを含む。場合によっては、組換え核酸は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、共刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、及び4-1BB(CD137)、ならびに少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。場合によっては、TCRサブユニットは、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、TCRゼータ鎖、Fcイプシロン受容体1鎖、Fcイプシロン受容体2鎖、Fcガンマ受容体1鎖、Fcガンマ受容体2a鎖、Fcガンマ受容体2b1鎖、Fcガンマ受容体2b2鎖、Fcガンマ受容体3a鎖、Fcガンマ受容体3b鎖、Fcベータ受容体1鎖、TYROBP(DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)またはその一部を含む、TCRサブユニットのITAMを含む。場合によっては、ITAMは、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはCD3イプシロンのITAMを置換する。場合によっては、ITAMは、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択され、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択される別のITAMを置換する。場合によっては、TFP、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性TCR複合体及び/または少なくとも1つの内因性TCRポリペプチドと機能的に相互作用することが可能である。場合によっては、(a)TCR定常ドメインがTCRアルファ定常ドメインであり、TCRベータ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合されるか；(b)TCR定常ドメインがTCRベータ定常ドメインであり、TCRアルファ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合されるか；あるいは(c)TCR定常ドメインがTCRアルファ定常ドメインおよびTCRベータ定常ドメインであり、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合される。場合によっては、それに対して少なくとも1つだが20以下の修飾は、細胞シグナル伝達を媒介するアミノ酸の修飾、またはTFPへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の修飾を含む。場合によっては、ヒト抗体またはヒト化抗体は抗体断片である。場合によっては、抗体断片は、scFv、単ドメイン抗体ドメイン、V_Hドメイン、またはV_Lドメインである。場合によっては、抗原結合ドメインを含むヒト抗体またはヒト化抗体は、抗CD19結合ドメイン、抗B細胞成熟抗原(BCMA)結合ドメイン、抗メソテリン(MSLN)結合ドメイン、抗ILL13R2結合ドメイン、抗MUC16結合ドメイン、抗CD22結合ドメイン、抗PD-1結合ドメイン、抗BAFFまたはBAFF受容体結合ドメイン、及び抗ROR-1結合ドメインからなる群から選択される。場合によっては、核酸は、DNA及びRNAからなる群から選択される。場合によっては、核酸はmRNAである。場合によっては、組換え核酸は核酸類似体を含み、この核酸類似体は組換え核酸のコード配列にはない。場合によっては、核酸類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-

10

20

30

40

50

MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、ロックド核酸(LNA)、エチレン核酸(ENA)、ペプチド核酸(PNA)、1',5'-アンヒドロヘキシトール核酸(HNA)、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、及び2'-フルオロN3-P5'-ホスホロアミダイトからなる群から選択される。場合によっては、組換え核酸はリーダー配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸はプロモーター配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸はポリ(A)尾部をコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は3'UTR配列をさらに含む。場合によっては、核酸は、単離された核酸または天然に存在しない核酸である。場合によっては、核酸は*in vitro*転写した核酸である。場合によっては、組換え核酸は、TCRアルファ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は、TCRベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は、TCRアルファ膜貫通ドメインをコードする配列及びTCRベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。

10

【0012】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本明細書に開示される組換え核酸を含むベクターである。場合によっては、ベクターは、DNA、RNA、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)ベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群から選択される。場合によっては、ベクターはAAV6ベクターである。場合によっては、ベクターはプロモーターをさらに含む。場合によっては、ベクターは*in vitro*転写したベクターである。

20

【0013】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、上記に開示される組換え核酸または上記に開示されるベクターを含む改変T細胞であり、当該改変T細胞は内因性TCRの機能的破壊を含む。いくつかの実施形態において、本明細書にさらに開示されるのは、上記に開示される核酸のTFPをコードする配列、またはTFPをコードする上記に開示される核酸の配列によってコードされるTFPを含む改変T細胞であり、当該改変T細胞は内因性TCRの機能的破壊を含む。また本明細書では、上記に開示されるTFPをコードする配列、またはTFPをコードする上記に開示される核酸の配列によってコードされるTFPを含む改変同種T細胞も開示される。場合によっては、T細胞はTCR定常ドメインをコードする異種配列をさらに含み、当該TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、またはTCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメインである。場合によっては、機能的に破壊される内因性TCRは、内因性TCRアルファ鎖、内因性TCRベータ鎖、または内因性TCRアルファ鎖と内因性TCRベータ鎖である。場合によっては、機能的に破壊された内因性TCRは、未改変の対照T細胞のものと比較して、MHCペプチド複合体への結合が減少する。場合によっては、機能的破壊は、内因性TCRをコードする遺伝子の破壊である。場合によっては、内因性TCRをコードする遺伝子の破壊とは、内因性TCRをコードする遺伝子の配列のT細胞のゲノムからの除去である。場合によっては、T細胞はヒトT細胞である。場合によっては、T細胞は、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、ナイーブT細胞、メモリー幹T細胞、セントラルメモリーT細胞、二重陰性T細胞、エフェクターメモリーT細胞、エフェクターT細胞、Th0細胞、Tc0細胞、Th1細胞、Tc1細胞、Th2細胞、Tc2細胞、Th17細胞、Th22細胞、ガンマデルタ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、造血幹細胞、または多能性幹細胞である。場合によっては、T細胞はCD8⁺T細胞またはCD4⁺T細胞である。場合によっては、T細胞は同種T細胞である。場合によっては、改変T細胞は、細胞内シグナル伝達

30

40

50

ドメインからの陽性シグナルを含む第2のポリペプチドと会合した、抑制分子の少なくとも一部を含む第1のポリペプチドを含む抑制分子をコードする核酸をさらに含む。場合によっては、抑制分子は、PD1の少なくとも一部を含む第1のポリペプチドと、共刺激ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第2のポリペプチドとを含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)本開示の改変T細胞；及び(b)薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。

【0015】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本開示の改変T細胞を作製する方法であり、この方法は、(a)TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、またはTCRアルファ鎖とTCRベータ鎖をコードする内因性TCR遺伝子を破壊し、それにより内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞を作製することと；(b)内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞に、本明細書に開示される組換え核酸またはベクターを形質導入することとを含む。場合によっては、破壊は、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、またはTCRアルファ鎖とTCRベータ鎖をコードする内因性遺伝子を標的とするヌクレアーゼタンパク質、またはヌクレアーゼタンパク質をコードする核酸配列をT細胞に形質導入することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書にさらに開示されるのは、本開示の改変T細胞を作製する方法であり、この方法は、内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞に、本明細書に開示される組換え核酸またはベクターを形質導入することを含む。場合によっては、内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞は、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、またはTCRアルファ鎖とTCRベータ鎖をコードする内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞である。場合によっては、T細胞はヒトT細胞である。場合によっては、内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞は、未改変の対照T細胞のものと比較して、MHC-ペプチド複合体への結合が減少する。場合によっては、ヌクレアーゼはメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Casヌクレアーゼ、またはmegaTALENヌクレアーゼである。場合によっては、組換え核酸またはベクターに含まれる配列は、切断部位で内因性TCRサブユニット遺伝子に挿入され、この内因性TCRサブユニット遺伝子への配列の挿入により内因性TCRサブユニットが機能的に破壊される。場合によっては、ヌクレアーゼはメガヌクレアーゼである。場合によっては、メガヌクレアーゼは、第1のサブユニット及び第2のサブユニットを含み、第1のサブユニットは認識配列の第1の認識半部位に結合し、第2のサブユニットは認識配列の第2の認識半部位に結合する。場合によっては、メガヌクレアーゼは、リンカーを含む一本鎖メガヌクレアーゼであり、このリンカーは第1のサブユニットと第2のサブユニットとを共有結合する。

【0016】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、治療を必要とする対象におけるがんの治療方法であり、この方法は、本明細書に開示される、治療有効量の医薬組成物を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのはまた、治療を必要とする対象におけるがんの治療方法であり、この方法は、(a)本明細書に開示される方法に従って作製される改変T細胞、及び(b)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。場合によっては、改変T細胞は同種異系T細胞である。場合によっては、有効量の未改変の対照T細胞を投与した対象と比較して、対象において放出されるサイトカインが少ない。場合によっては、本明細書に開示される組換え核酸または本明細書に開示されるベクターを含む有効量の改変T細胞を投与した対象と比較して、対象において放出されるサイトカインが少ない。場合によっては、この方法は、医薬組成物の有効性を増加させる薬剤と組み合わせて医薬組成物を投与することを含む。場合によっては、この方法は、医薬組成物に付随する1つ以上の副作用を改善する薬剤と組み合わせて医薬組成物を投与することを含む。場合によっては、がんは固形癌、リンパ腫、または白血病である。場合によっては、がんは、腎細胞癌、乳癌、肺癌、

10

20

30

40

50

卵巣癌、前立腺癌、結腸癌、子宮頸癌、脳癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、及び胃癌からなる群から選択される。

【0017】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、医薬品としてまたは医薬品の調製に使用するための、本明細書に開示される組換え核酸、ベクター、改変T細胞、または医薬組成物である。

【0018】

参照による組み込み

本明細書で言及される刊行物、特許、及び特許出願はすべて、個別の刊行物、特許、または特許出願がそれぞれ具体的かつ個別に参照により本明細書に組み込まれた場合と同様に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】TRBC1とTRBC2との間の配列アラインメントである。選択したcrRNAを、TRBC1配列上方の矢印で表す。

【図2】A～Bは、TRA編集細胞(A)及びTRB編集細胞(B)におけるCD3(SK7)対TCR(IP26)の表面発現を示す例示的なグラフを図示したものである。TRACまたはTRBC遺伝子のいずれかで野生型Jurkat細胞を編集し、TRAまたはTRBの表面発現を妨げた。CD3及びTCRに対して陰性の細胞を、磁気細胞分離法を使用して精製した。CD3及びTCRが陰性-陰性の細胞集団を視覚化するゲートがプロットに描かれ、各四分区間にある細胞の比率が4隅に示されている。

【図3】A～Eは、精製前後の野生型細胞対編集(TRA/B破壊)細胞におけるCD3対TCRの表面発現を示すグラフの例を図示したものである。TRAC(BまたはD)またはTRBC(CまたはE)遺伝子のいずれかで野生型ドナー1T細胞(A)を編集し、TRAまたはTRBの表面発現を妨げた。B及びCは、編集直後のCD3対TCR表面マーカーの状態を示し、それに対してD及びEは、磁気細胞分離法(MACS)を使用した陰性選択後のこれらの表面マーカーの状態を示す。CD3及びTCRが陰性-陰性の細胞集団を視覚化するゲートがプロットに描かれ、各四分区間にある細胞の比率が4隅に示されている。

【図4】増殖率を観察することによりTCR陰性T細胞の同種性を測定するグラフの例を図示する。TCR陰性T細胞は、細胞分裂により濃度が半分になるCSFE色素で恒久的に標識した。X軸方向の濃灰色のピークは、陰性対照である非標識細胞のCSFEシグナルを示す。灰色線は、何も刺激していない24時間後の細胞でのCSFE量を示し、黒線は5日間の共培養後(刺激あり)のCSFE量を示す。Y軸は細胞の比率(%)を示す。TRA陰性T細胞を上部4つのプロットに示し、対するTRB陰性T細胞を下部4つのプロットに示す。同種反応は、TRA KOドナー2 T細胞が異なるハプロタイプのドナー(ドナー1)からのPBMCと混合されたことを示し、自己反応は、同じドナーのT細胞とPBMCが共培養されたことを示す。TCRに依存しない刺激に対する陽性対照は、PMA及びイオノマイシンのパネルに示した。

【図5】同種異系TFP T細胞を産生するための戦略例を図示する。以下の番号は、図5の各図に付された番号に対応している。(1)は、抗原提示細胞及び抗原上のMHC Iと相互作用するT細胞の内因性TCRを示す。(2)は、TRA-/ -またはTRB-/ -細胞における、TRBCと、TFP結合因子に融合したTRACとの共発現を示す。(3)は、TRA-/ -またはTRB-/ -細胞における、マウスTRBCと、TFP結合因子に融合したマウスTRACとの共発現を示す。(4)は、TRA-/ -またはTRB-/ -細胞における、マウス化TRBCと、TFP結合因子に融合したマウス化TRACとの共発現を示す。(5)は、TRA-/ -細胞において、TCRに対する強い親和性をもつ増強されたTRACタンパク質が保持するTFP結合因子を示す。(6)は、TRACとTRBCとの間の相互作用を増強するために、IgG定常ドメインを各TCR定常ドメインのC末端に融合する戦略を示す。TRA-/ -またはTRB-/ -細胞にお

10

20

30

40

50

いて、TFP結合因子はIgG定常ドメインのC末端に融合される。(7)は、TRAC及びTRBCのN末端部分を、それぞれTCR及びTCRのそれらのホモログ部分で置換する戦略を示す。TRA-/またはTRB-/細胞において、TFP結合因子はTRAC及び/またはTRBCが保持する。

【図6】同種異系TFP T細胞の産生を可能にするT2A自己切断型配列のノックイン戦略を示す例示的な模式図を図示する。

【図7】実施例6に記載されるようなLuc-Cytoアッセイによって決定される、TCR及びCD3(ヒト)またはマウスTCRの表面発現を示す例示的なグラフを図示する。

【図8】3対1、1対1、または1対3比で腫瘍標的細胞(上部パネルにNa1m6細胞、下部パネルにK562細胞)と培養したTエフェクター細胞のLuc-Cyto分析を示す例示的なグラフを図示する。標的(CD19陽性)細胞を左側のパネルに示す。x軸は腫瘍細胞溶解の比率(%)を表す。

【図9】A~Cは、野生型細胞(A)、形質導入を伴わないTRBK O細胞(B)、TCR全長(FL)TFPの形質導入を伴うTRBK O細胞(C)におけるCD3対TCRの表面発現を示す例示的なグラフを図示したものである。CD3及びTCRが陰性-陰性の細胞集団を視覚化するゲートがプロットに描かれ、各四分区間にある細胞の比率(%)が4隅に示されている。

【図10】A~Bは、ヒトTRBC遺伝子(A)及びマウスTRAC-T2A-TRBC遺伝子(B)を形質導入したTRBノックアウト細胞におけるCD3対TCRの表面発現を示す例示的なグラフを図示したものである。CD3及びTCRが陰性-陰性の細胞集団を視覚化するゲートがプロットに描かれ、各四分区間にある細胞の比率(%)が4隅に示されている。

【発明を実施するための形態】

【0020】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)(i)(1)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(2)膜貫通ドメイン、及び(3)CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、またはTCRデルタの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むTCRサブユニットと、(ii)抗原結合ドメインを含むヒト抗体またはヒト化抗体とを含む、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)をコードする配列と、(b)TCR定常ドメインをコードする配列とを含み、TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、またはTCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメインであり、TCRサブユニット及び抗体は機能的に連結されており、かつT細胞で発現するとTFPがTCR複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸である。

【0021】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)(i)(1)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(2)膜貫通ドメイン、及び(3)CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むTCRサブユニットと、(ii)抗体またはその断片に結合できる結合リガンドまたはその断片とを含む、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)をコードする配列と、(b)TCR定常ドメインをコードする配列とを含み、TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、またはTCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメインであり、TCRサブユニット及び結合リガンドまたはその断片が機能的に連結されており、かつT細胞で発現するとTFPがTCR複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸である。

【0022】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)(i)(1)TCR

10

20

30

40

50

細胞外ドメインの少なくとも一部、(2)膜貫通ドメイン、及び(3)CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むTCRサブユニットと、(i)細胞の表面に発現する受容体またはポリペプチドに結合するリガンドまたはその断片を含む抗原ドメインとを含む、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)をコードする配列と、(b)TCR定常ドメインをコードする配列とを含み、TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、またはTCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメインであり、TCRサブユニット及び抗原ドメインは機能的に連結されており、かつT細胞で発現するとTFPがTCR複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸である。

10

【0023】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本明細書に開示される組換え核酸を含むベクターである。

【0024】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本明細書に開示される組換え核酸または本明細書に開示されるベクターを含む改変T細胞であり、当該改変T細胞は内因性TCRの機能的破壊を含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本明細書に開示される核酸のTFPをコードする配列、または本明細書に開示される核酸の配列によってコードされるTFPを含む改変T細胞であり、当該改変T細胞は内因性TCRの機能的破壊を含む。

20

【0026】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本明細書に開示されるTFPをコードする配列、または本明細書に開示される核酸の配列によってコードされるTFPを含む改変同種T細胞である。

【0027】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)本開示の改変T細胞、及び(b)薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。

【0028】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本開示の改変T細胞を作製する方法であり、この方法は、(a)TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、またはTCRアルファ鎖とTCRベータ鎖をコードする内因性TCR遺伝子を破壊し、それにより内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞を作製することと、(b)内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞に、本開示の組換え核酸または本明細書に開示されるベクターを形質導入することを含む。

30

【0029】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本開示の改変T細胞を作製する方法であり、この方法は、内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞に、本明細書に開示される組換え核酸または本明細書に開示されるベクターを形質導入することを含む。

40

【0030】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、治療を必要とする対象におけるがんの治療方法であり、この方法は、本明細書に開示される、治療有効量の医薬組成物を対象に投与することを含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、治療を必要とする対象におけるがんの治療方法であり、この方法は、(a)本明細書に開示される方法に従って作製される改変T細胞、及び(b)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。

【0032】

50

特定用語

特に定義しない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者に共通して理解されているものと同じ意味を有する。

【0033】

「a」及び「an」は、その冠詞の文法上の目的語の1つまたは複数（すなわち、少なくとも1つ）を指す。例として、「要素」は1つの要素または複数の要素を意味する。

【0034】

本明細書で使用される場合、「約」は、状況、及び当業者に既知であるかまたは知り得ることに応じて、1パーセント未満、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、または30パーセント超の増減を意味することができる。

10

【0035】

本明細書で使用される場合、「対象」（単数または複数）または「個体」は、哺乳動物、例えばヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えば家畜、農業用動物または野生動物、ならびに鳥類及び水生動物などを含み得るが、これらに限定されない。「患者」は、疾患、障害、または病態に罹患しているか、その発症リスクがある対象、あるいは別様に本明細書で提供される組成物及び方法を必要とする対象である。

【0036】

本明細書で使用される場合、「治療すること」または「治療」とは、疾患または病態の治療または改善に関する何らかの奏功の兆候を指す。治療することは、例えば、疾患または病態の1つ以上の症状の重症度を低下、遅延、または軽減することを含む場合もあれば、あるいは疾患、不全、障害、または有害な病態などの症状が患者に現れる頻度を低減することを含む場合もある。本明細書で使用される場合、「治療または予防する」は、疾患または病態のある程度の治療または改善をもたらす方法を指すものとして本明細書で使用される場合もあり、病態の完全な予防を含むがそれに限定されない、その目的に対する範囲の結果を企図している。

20

【0037】

本明細書で使用される場合、「予防する」とは、患者における疾患または病態、例えば腫瘍形成の予防を指す。例えば、腫瘍またはその他の形態のがんの発症リスクがある個体が本開示の方法で治療され、それ以降、腫瘍またはその他の形態のがんを発症しない場合、その個体において当該疾患は少なくともある期間にわたって予防されている。

30

【0038】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」は、組成物を投与する個体に対して有益な効果を与えるか、別様に有害な有益でない事象を低減するのに十分な組成物またはその活性成分の量である。本明細書で「治療有効用量」とは、1つ以上の所望のまたは望ましい（例えば有益な）効果を生み出すために投与される用量のことを意味し、そのような投与は所与の期間にわたり1回以上行われる。正確な用量は治療の目的に依存し、当業者は公知の技術を使用して確認することができる（例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999)、及びPickar, Dosage Calculations (1999)を参照）。

40

【0039】

本明細書で使用される場合、「T細胞受容体(TCR)融合タンパク質」または「TFP」は、TCRを含む様々なポリペプチド由来の組換えポリペプチドを含み、当該TCRは概して、i) 標的細胞の表面抗原に結合すること、及びii) 通常はT細胞内またはその表面に共存する場合、インタクトなTCR複合体の他のポリペプチド成分と相互作用することができる。

【0040】

「刺激」という用語は、刺激ドメインまたは刺激分子（例えば、TCR/CD3複合体

50

）が、その同種リガンドと結合し、それによりシグナル伝達事象を媒介することで誘導される一次応答を指し、このシグナル伝達事象として、TCR/CD3複合体を介したシグナル伝達などがあるが、これらに限定されない。刺激は、ある特定の分子の発現の変化、及び/または細胞骨格構造の再構成などを媒介することができる。

【0041】

「刺激分子」または「刺激ドメイン」という用語は、T細胞のシグナル伝達経路の少なくともいくつかの側面に対して、TCR複合体の一次活性化を刺激的に調節する一次細胞質シグナル伝達配列（複数可）を提供する、T細胞によって発現される分子またはその一部を指す。一態様では、一次シグナルは、例えばペプチドが負荷されたMHC分子とTCR/CD3複合体との結合によって開始され、増殖、活性化、分化などを含むがこれらに限定されないT細胞応答の媒介をもたらす。刺激的に作用する一次細胞質シグナル伝達配列（「一次シグナル伝達ドメイン」とも称する）は、免疫受容体チロシン活性化モチーフ、すなわち「ITAM」として知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。本発明で特に有用な、ITAMを含んだ一次細胞質シグナル伝達配列の例としては、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」とも称する）、及びCD66dに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0042】

「抗原提示細胞」すなわち「APC」という用語は、その表面で主要組織適合複合体（MHC）と複合化された外来抗原を提示する補助細胞（例えば、B細胞、樹状細胞など）のような免疫系細胞を指す。T細胞は、T細胞受容体（TCR）を使用してこれらの複合体を認識し得る。APCは抗原を処理し、それをT細胞に提示する。

20

【0043】

「主要組織適合複合体（MHC）分子は典型的には、ペプチド：MHC複合体の一部としてTCRによって結合される。MHC分子は、MHCクラスIまたはII分子であり得る。複合体は、樹状細胞もしくはB細胞などの抗原提示細胞、またはがん細胞を含む任意の他の細胞の表面に存在する場合もあれば、例えばビーズまたはプレート上に被覆することによって固定化されている場合もある。

【0044】

ヒト白血球抗原系（HLA）は、ヒトの主要組織適合複合体（MHC）をコードし、HLAクラスI抗原（A、B、及びC）及びHLAクラスII抗原（DP、DQ、及びDR）を含む遺伝子複合体の名称である。HLA対立遺伝子A、B、及びCは、主に細胞内タンパク質、例えば細胞内に発現するタンパク質に由来するペプチドを提示する。

30

【0045】

*in vivo*でのT細胞発現時に、T細胞は、自己MHCを確実に認識する正の選択ステップを受け、続いて自己抗原を提示するMHCとの結合が強すぎるT細胞を除去する負のステップを受ける。結果として、ある特定のT細胞とそれが発現するTCRは、ある特定の種類のMHC分子、すなわち特定のHLA対立遺伝子によってコードされるものによって提示されるペプチドのみを認識する。これはHLA制約として知られている。

【0046】

対象となる1つのHLA対立遺伝子は、白人集団の大多数（50%超）において発現するHLA-A*0201である。したがって、HLA-A*0201によってコードされる（すなわち、HLA-A*0201に制約される）MHCによって提示されるWT1ペプチドに結合するTCRは、そのようなTCRを利用する免疫療法が白人集団の大部分の治療に適しているため有利である。

40

【0047】

対象となる他のHLA-A対立遺伝子は、HLA-A*0101、HLA-A*2402、及びHLA-A*0301である。

【0048】

対象となる広範囲に発現するHLA-B対立遺伝子は、HLA-B*3501、HLA

50

- B * 0 7 0 2、及び H L A - B * 3 5 0 2 である。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用される「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、T F P 含有細胞、例えば改変 T - T 細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成する。例えば改変 T - T 細胞における免疫エフェクター機能の例として、細胞溶解活性、及びサイトカインの分泌を含めた T ヘルパー細胞活性が挙げられる。ある実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは一次細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。例示的な一次細胞内シグナル伝達ドメインとして、一次刺激または抗原依存性刺激に關与する分子に由来するものが挙げられる。ある実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは共刺激細胞内ドメインを含み得る。例示的な共刺激細胞内シグナル伝達ドメインとして、共刺激シグナルまたは抗原非依存性刺激に關与する分子に由来するものが挙げられる。

10

【 0 0 5 0 】

一次細胞内シグナル伝達ドメインは、I T A M (「免疫受容体チロシン活性化モチーフ」) を含み得る。I T A M を含んだ一次細胞質シグナル伝達配列の例として、C D 3 ゼータ、F c R ガンマ、F c R ベータ、C D 3 ガンマ、C D 3 デルタ、C D 3 イプシロン、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、ならびに C D 6 6 d D A P 1 0 及び D A P 1 2 に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 1 】

「共刺激分子」という用語は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、例えば T 細胞による増殖などであるがこれに限定されない共刺激反応を媒介する、T 細胞での同種結合パートナーを指す。共刺激分子とは、効率的な免疫応答に必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。共刺激分子として、M H C クラス 1 分子、B T L A、及び T o l l リガンド受容体、ならびに O X 4 0、C D 2、C D 2 7、C D 2 8、C D 5、I C A M - 1、L F A - 1 (C D 1 1 a / C D 1 8)、及び 4 - 1 B B (C D 1 3 7) が挙げられるが、これらに限定されない。共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内部分であり得る。共刺激分子は、以下のタンパク質ファミリー、すなわち T N F 受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (S L A M タンパク質)、及び活性化 N K 細胞受容体に現れる可能性がある。そのような分子の例として、C D 2 7、C D 2 8、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、O X 4 0、G I T R、C D 3 0、C D 4 0、I C O S、B A F F R、H V E M、リンパ球機能関連抗原 - 1 (L F A - 1)、C D 2、C D 7、L I G H T、N K G 2 C、S L A M F 7、N K p 8 0、C D 1 6 0、B 7 - H 3、及び C D 8 3 などと特異的に結合するリガンドが挙げられる。細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来する分子の細胞内部分全体または天然細胞内全体のシグナル伝達ドメイン、またはそれらの機能的断片を含み得る。「4 - 1 B B」という用語は、G e n B a n k アクセション番号 A A A 6 2 4 7 8 . 2 が付与されたアミノ酸配列、または非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サル、類人猿などに由来する同等の残基の T N F R スーパーファミリーのメンバーを指し、また「4 - 1 B B 共刺激ドメイン」は、G e n B a n k アクセション番号 A A A 6 2 4 7 8 . 2 のアミノ酸残基 2 1 4 ~ 2 5 5、または非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サル、類人猿などに由来する同等の残基として定義される。

20

30

40

【 0 0 5 2 】

本発明で使用される場合、「抗体」という用語は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子に由来するタンパク質またはポリペプチド配列を指す。抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナル起源のインタクトな免疫グロブリン、またはそれらの断片であってよく、天然源または組換え源に由来するものであってよい。

【 0 0 5 3 】

「抗体断片」という用語は、抗体の少なくとも一部、またはその組換え変異体を指し、これは抗原結合ドメイン、すなわちインタクトな抗体の抗原決定可変領域を含み、標的、例えば抗原及びその定められたエピトープに対する抗体断片の認識及び特異的結合を付与

50

するのに十分なものである。抗体断片の例として、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片、一本鎖(sc)Fv(「scFv」)抗体断片、線状抗体、sdAbなどの単一ドメイン抗体(V_LまたはV_Hのいずれか)、ラクダ科V_HHドメイン、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

「scFv」という用語は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片と、重鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片とを含む融合タンパク質を指し、この軽鎖及び重鎖の可変領域は、短い可撓性ポリペプチドリンカーを介して隣接して連結されており、単一のポリペプチド鎖として発現でき、scFvは、それが由来するインタクトな抗体の特異性を保持する。

10

【0055】

抗体に関する「重鎖可変領域」または「V_H」とは、フレームワーク領域として知られる隣接ストレッチの間に置かれる3つのCDRを含む重鎖の断片を指し、このフレームワーク領域は一般に、CDRよりも高度に保存されており、CDRを支持する骨格を形成する。ラクダ科「V_HH」ドメインは、単一の可変抗体ドメインを含む重鎖である。

【0056】

特に指定のない限り、本明細書で使用される場合、scFvは、例えばポリペプチドのN末端及びC末端を基準にしていずれの順序でV_L及びV_Hの可変領域を有してもよく、scFvは、V_L-リンカー-V_Hを含んでもよく、またはV_H-リンカー-V_Lを含んでもよい。

20

【0057】

抗体またはその抗体断片を含む本開示のTFP組成物の一部は、様々な形態で存在してよく、抗原結合ドメインは、例えば単一ドメイン抗体断片(sdAb)、マウス、ヒト化、またはヒト抗体に由来する一本鎖抗体(scFv)を含む、連続ポリペプチド鎖の一部として発現する(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883、Bird et al., 1988, Science 242: 423-426)。ある態様では、本開示のTFP組成物の抗原結合ドメインは抗体断片を含む。さらなる態様では、TFPは、scFvまたはsdAbを含む抗体断片を含む。

30

【0058】

「組換え抗体」という用語は、組換えDNA技術を用いて作製される抗体、例えばバクテリオファージまたは酵母の発現系によって発現される抗体などを指す。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子の合成によって作製される抗体であって、そのDNA分子が抗体タンパク質またはその抗体を特定するアミノ酸配列を発現し、そのDNAまたはアミノ酸配列が、当技術分野において利用可能であり、かつ周知である組換えDNAまたはアミノ酸配列技術を用いて得られる抗体を意味すると解釈されるべきである。

40

【0059】

「抗原」または「Ag」という用語は、抗体によって特異的に結合できるか、それ以外の方法で免疫応答を誘発する分子を指す。この免疫応答は、抗体産生、もしくは免疫学的にコンピテントな特異的細胞の活性化のいずれか、または両方に関連し得る。

【0060】

当業者であれば、実質的にすべてのタンパク質またはペプチドを含めたあらゆる巨大分子が抗原の役割を果たし得ることを理解されよう。さらに抗原は、組換えDNAまたはゲノムDNAから誘導することができる。したがって、当業者であれば、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的なヌクレオチド配列を含むあらゆるDNAが、本明細書で使用される用語での「抗原」をコードすることを理解されよう

50

。さらに、当業者であれば、遺伝子の全長ヌクレオチド配列のみによって抗原がコードされている必要がないことを理解されよう。本開示は、複数の遺伝子の部分的なヌクレオチド配列の使用を含むが、これに限定されず、これらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発するポリペプチドをコードする様々な組み合わせで配置されていることは自明である。さらに、当業者であれば、抗原は「遺伝子」によってコードされる必要は全くないことを理解されよう。抗原は、合成されて作製されてもよく、または生体試料由来であってもよく、またはポリペプチド以外の巨大分子であってもよいことは自明である。そのような生体試料は、組織試料、腫瘍試料、細胞、またはその他の生物学的成分を含む液体を含み得るが、これらに限定されない。

【0061】

本明細書で使用される場合、「CD19」という用語は、B細胞白血病前駆細胞、他の悪性B細胞、及び正常なB細胞系統のほとんどの細胞で検出可能な抗原決定基である分化群19タンパク質を指す。

【0062】

本明細書で使用される場合、「BCMA」という用語は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー17(TNFRSF17)としても知られるB細胞成熟抗原を指し、分化群269タンパク質(CD269)は、ヒトにおいてTNFRSF17遺伝子によってコードされるタンパク質である。TNFRSF17は、B細胞活性化因子(BAFF)を認識するTNF受容体スーパーファミリーの細胞表面受容体である(例えば、Laabei et al., EMBO 11(11):3897-904(1992)を参照)。この受容体は成熟Bリンパ球に発現しており、B細胞の発生と自己免疫応答に重要であり得る。

【0063】

本明細書で使用される場合、「CD16」(FcRIIIとしても知られる)という用語は、ナチュラルキラー細胞、好中球多形核白血球、単球、及びマクロファージの表面に見られる分化群分子を指す。CD16は、シグナル伝達に関するFc受容体FcRIIIa(CD16a)及びFcRIIIb(CD16b)であると同定されている。CD16は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)に関する免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)の分子である。

【0064】

本明細書で使用される場合、「NKG2D」とは、C型レクチン様受容体のCD94/NKG2ファミリーに属する膜貫通タンパク質を指す。ヒトでは、NKG2DはNK細胞、T細胞、及びCD8⁺T細胞によって発現される。NKG2Dは、ストレス細胞、悪性に形質転換された細胞、及び感染細胞の表面に出現するMIC及びRAET1/ULBPファミリーの誘導性自己タンパク質を認識する。

【0065】

メソテリン(MSLN)とは、胸膜、腹膜、及び心膜の内側を覆う中皮細胞に通常存在する腫瘍分化抗原を指す。メソテリンは、中皮腫、卵巣腺癌、及び膵臓腺癌を含むいくつかのヒト腫瘍で過剰発現する。

【0066】

神経栄養チロシンキナーゼ受容体関連1(NTRKR1)としても知られるチロシンタンパク質キナーゼ膜貫通受容体ROR1は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体(ROR)ファミリーのメンバーである。これはがんの転移に関連している。

【0067】

「ムチン16、細胞表面関連」または「卵巣癌関連腫瘍マーカーCA125」としても知られる「MUC16」という用語は、アミノ末端側に細胞外ドメイン、大きなタンデムリピートドメイン、及び短い細胞質ドメインをもつ膜貫通ドメインを含む膜係留ムチンである。この遺伝子の産物は種々のがんのマーカーとして使用されており、発現レベルの上昇に伴って転帰が悪化する。

【0068】

10

20

30

40

50

シアル酸結合Ig様レクチン2、SIGLEC-2、T細胞表面抗原leu-14、及びB細胞受容体CD22としても知られる「CD22」という用語は、B細胞/B細胞相互作用を媒介するタンパク質であり、リンパ組織内でのB細胞の局在に關与していると考えられており、難治性血液癌及び有毛細胞白血病を含む疾患に關連している。本明細書に開示される方法での使用に適した完全ヒト抗CD22モノクローナル抗体(「M971」)は、例えばXiao et al., MAbs. 2009 May-Jun; 1(3): 297-303に記載されている。

【0069】

「CD79」及び「CD79」遺伝子は、Bリンパ球抗原受容体を構成するタンパク質、すなわち抗原特異的成分、表面免疫グロブリン(Ig)を含む多量体複合体をコードする。表面Igは、B細胞抗原受容体の発現と機能に必要な、他の2つのタンパク質であるIg-アルファ及びIg-ベータ(それぞれCD79とそのパラログCD79によってコードされる)と非共有結合する。この複合体の機能的破壊は、例えばヒトB細胞慢性リンパ性白血病を引き起こし得る。

10

【0070】

B細胞活性化因子、すなわち「BAFF」は、腫瘍壊死因子(TNF)リガンドファミリーに属するサイトカインである。このサイトカインは、受容体TNFRSF13B/TACI、TNFRSF17/BCMA、及びTNFRSF13C/BAFF-Rのリガンドである。このサイトカインはB細胞系統細胞で発現し、強力なB細胞活性化因子として機能する。また、B細胞の増殖と分化に重要な役割を果たすことも示されている。

20

【0071】

「抗腫瘍効果」という用語は、例えば、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、期待余命の延長、腫瘍細胞増殖の減少、腫瘍細胞生存率の低下、またはがん病態に付随する種々の生理学的症状の改善を含むがこれらに限定されない種々の方法によって現われ得る生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」はまた、本開示のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞、及び抗体が、腫瘍のそもそもの発生を予防する能力によっても現われ得る。

【0072】

「自己由来」という用語は、同一の個体に由来する任意の物質が、後にその個体へ再導入されることを指す。

【0073】

「同種異系」またはそれに代わる「同種」という用語は、物質が導入される個体と同じ種の異なる動物または異なる患者に由来する任意の物質を指す。1つ以上の遺伝子座の遺伝子が同一でない場合に、2つ以上の個体は互いに同種異系であるといわれる。いくつかの態様では、同じ種の個体からの同種異系の物質は、抗原的に相互作用するには十分に遺伝的に異なり得る。

30

【0074】

「異種」という用語は、異なる種の動物に由来する移植片を指す。

【0075】

「がん」という用語は、異常細胞の急速かつ制御不能な増殖を特徴とする疾患を指す。がん細胞は、局所的に分布することもあれば、血流及びリンパ系を介して身体の他の部分へと拡散することもある。種々のがんの例が本明細書に記載されており、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵臓癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、悪性脳腫瘍、リンパ腫、白血病、肺癌などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0076】

「コードする」という用語は、遺伝子、cDNA、またはmRNAなどの、ポリヌクレオチド中の特定のヌクレオチド配列固有の特性が、生物学的過程での他のポリマー及び巨大分子の合成において、定義したヌクレオチド配列(例えば、rRNA、tRNA、及びmRNA)または定義したアミノ酸配列のいずれか、及びそれに起因する生物学的特性を有する鋳型として機能することを指す。したがって、遺伝子、cDNA、またはRNAは、その遺伝子に対応するmRNAの転写及び翻訳によって、細胞または他の生体系にタン

50

パク質が産生される場合、タンパク質をコードしている。ヌクレオチド配列が mRNA 配列と同一であり、通常は配列表に示されているコード鎖と、遺伝子または cDNA の転写用鋳型として用いられる非コード鎖の双方を、タンパク質またはその遺伝子もしくは cDNA の他の産物をコードすると称することができる。

【0077】

特に指定のない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、互いの縮重型であり、同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチド配列が含まれる。また、タンパク質または RNA をコードするヌクレオチド配列という表現は、このタンパク質をコードするヌクレオチド配列が一部の型において1つ以上のイントロンを含み得る限りにおいてイントロンを含み得る。

10

【0078】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、本明細書では同義に使用されており、特定の生物学的または治療上の効果を達成するのに有効である、本明細書に記載の化合物、製剤、材料、または組成物の量を指す。

【0079】

「内因性」という用語は、生物、細胞、組織、もしくは系に由来するか、またはその内部で産生される任意の物質を指す。

【0080】

「外因性」という用語は、生物、細胞、組織、もしくは系の外部から導入されるか、または産生される任意の物質を指す。

20

【0081】

「発現」という用語は、プロモーターによって誘導される特定のヌクレオチド配列の転写及び/または翻訳を指す。

【0082】

「機能的破壊」という用語は、細胞内での正常な発現及び/または挙動を妨げる、特定の(例えば、標的)核酸に対する(例えば、遺伝子、RNA 転写物に対しての、それによってコードされるタンパク質の)物理的または生化学的变化を指す。一実施形態では、機能的破壊とは、遺伝子編集法による遺伝子の修飾を指す。一実施形態では、機能的破壊は、標的遺伝子(例えば内因性遺伝子)の発現を妨げる。

【0083】

「転写ベクター」という用語は、単離された核酸を含み、かつその単離された核酸を細胞の内部に送達するために使用できる組成物である。線状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と会合したポリヌクレオチド、プラスミド、及びウイルスを含むが、これに限定されない数多くのベクターが、当技術分野において公知である。したがって、「転写ベクター」という用語は、自己複製プラスミドまたはウイルスを含む。この用語はまた、例えばポリリジン化合物、リボソームなどのような、細胞内への核酸の移入を容易にする非プラスミド性及び非ウイルス性の化合物をさらに含むと解釈されるべきである。ウイルス性転写ベクターの例として、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0084】

「発現ベクター」という用語は、発現させようとするヌクレオチド配列と機能的に連結された発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターを指す。発現ベクターは、発現に十分なシス作用エレメントを含み、発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、または *in vitro* 発現系で供給され得る。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを組み込んだ、コスミド、プラスミド(例えば、裸のプラスミド、またはリボソーム中に含まれるもの)、及びウイルス(例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス)を含め、当技術分野で公知のものすべてが含まれる。

【0085】

50

「レンチウイルス」という用語は、レトロウイルス科の属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染可能であるという点で、レトロウイルスの中でも独特であり、相当な量の遺伝情報を宿主細胞のDNA中に送達することができるため、遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIV、及びFIVはすべて、レンチウイルスの例である。

【0086】

「レンチウイルスベクター」という用語は、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部に由来するベクターを指し、これには特に、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)に示される自己不活性化レンチウイルスベクターが含まれる。臨床に使用できるレンチウイルスベクターの他の例として、例えば、Oxford BioMedica製のLENTIVECTOR(商標)遺伝子送達技術、Lentigen製のLENTIMAX(商標)ベクターシステムなどが挙げられるが、これらに限定されない。非臨床型のレンチウイルスベクターもまた利用可能であり、当業者に公知である。

10

【0087】

「相同」または「同一性」という用語は、2つのポリマー分子間、例えば2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子などの2つの核酸分子間、または2つのポリペプチド分子間でのサブユニット配列の同一性を指す。2つの配列双方のサブユニット位置を同じ単量体サブユニットが占めている場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれの位置をアデニンが占めている場合には、それらの分子はその位置で相同または同一である。2配列間の相同性は、一致位置または相同位置の数の直接の関数であり、例えば、2配列の位置の半数(例えば、10サブユニット長のポリマーの5箇所)が相同である場合、この2配列は、50%相同であり、位置の90%(例えば、10のうち9)が一致するまたは相同である場合、この2配列は90%相同である。

20

【0088】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」形態は、最小限の非ヒト免疫グロブリン由来の配列を有するキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそれらの断片(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体のその他の抗原結合部分配列)である。主としてヒト化抗体及びその抗体断片は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)由来の残基が、望ましい特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)、例えばマウス、ラット、またはウサギのCDR由来の残基で置換されているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体または抗体断片)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基が、対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体/抗体断片は、レシピエント抗体にも、取り込まれたCDRまたはフレームワーク配列にも見られない残基を含み得る。このような改変は、抗体または抗体断片の性能をさらに改良し、最適化することができる。一般に、ヒト化抗体またはその抗体断片は、少なくとも1つ、及び通常は2つの可変ドメインを実質的にすべて含み、その可変ドメインにおいて、すべてまたは実質的にすべてのCDR領域は非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域のすべての部分または相当な部分が、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体または抗体断片はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、通常はヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含み得る。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992を参照のこと。

30

40

【0089】

「ヒト」または「完全ヒト」とは、分子全体がヒト起源のものであるか、またはヒト型の抗体もしくは免疫グロブリンと同一であるアミノ酸配列からなる、抗体または抗体断片などの免疫グロブリンを指す。

【0090】

50

「単離された」という用語は、天然の状態から変更または除去されたことを意味する。例えば、生きた動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離された」ものではないが、その天然状態で共存する物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離された」ものである。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態のまま存在することも、または例えば宿主細胞などの非天然環境で存在することもできる。

【0091】

本開示の文脈において、一般的に存在する核酸塩基に関しては以下の略語を使用する。「A」はアデノシンを指し、「C」はシトシンを指し、「G」はグアノシンを指し、「T」はチミジンを指し、「U」はウリジンを指す。

10

【0092】

「保存的配列修飾」という用語は、アミノ酸配列を含む抗体または抗体断片の結合特性に著しく影響しないかまたは結合特性を著しく変化させないアミノ酸修飾を指す。そのような保存的修飾には、アミノ酸の置換、付加、及び欠失が含まれる。修飾は、当技術分野において公知の標準技術、例えば部位特異的突然変異誘発及びPCR媒介突然変異誘発によって、本開示の抗体または抗体断片に導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が、類似する側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである。類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当技術分野で定義されている。これらのファミリーとして、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）をもつアミノ酸が挙げられる。したがって、本開示のTFP内の1つ以上のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置換することができ、変更されたTFPは、本明細書に記載の機能アッセイを用いて試験することができる。

20

【0093】

「機能的に連結された」または「転写制御」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間にあって、異種核酸配列の発現をもたらす機能的連結を指す。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的関係にある場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と機能的に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターはコード配列と機能的に連結されている。機能的に連結されたDNA配列は互いに隣接してもよく、例えば2つのタンパク質コード領域の結合に必要とされる場合には、同一のリーディングフレーム内にある。

30

【0094】

免疫原性組成物の「非経口」投与という用語は、例えば、皮下（s.c.）、静脈内（i.v.）、筋肉内（i.m.）、もしくは胸骨内の注射、腫瘍内、または輸注法を含む。

【0095】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖または二本鎖いずれかの形態のデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）及びそれらのポリマーを指す。特に制限のない限り、この用語は、参照核酸と類似する結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似する方法で代謝される、天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。特に指定のない限り、特定の核酸配列には、明示された配列と同様に、その保存的に修飾された変異体（例えば、縮重コドン置換体）、対立遺伝子、オルソログ、SNP、及び相補的配列も暗黙裡に包含する。具体的には、縮重コドン置換体は、1つ以上の選択された（またはすべての）コドンの3番目の位置が混合塩基及び/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって得ることができる（Batzere et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991)、

40

50

Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605 - 2608 (1985)、及び Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91 - 98 (1994)。

【0096】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は同義に使用され、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって互いに結合した2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書で使用される場合、この用語は、例えば、当技術分野で一般にペプチド、オリゴペプチド、及びオリゴマーとも称される短鎖と、当技術分野で一般にタンパク質と称され、多くの種類がある長鎖の双方を指す。「ポリペプチド」には、例えば、生物学的活性断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導體、類似体、融合タンパク質が特に含まれる。ポリペプチドは、天然ペプチド、組換えペプチド、またはそれらの組み合わせを含む。

10

【0097】

「プロモーター」という用語は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるために必要とされる、細胞の転写機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列を指す。

20

【0098】

「プロモーター/調節配列」という用語は、そのプロモーター/調節配列に機能的に連結された遺伝子産物の発現に必要とされる核酸配列を指す。場合によっては、この配列はコアプロモーター配列であってよく、また別の場合には、この配列が、遺伝子産物の発現に必要とされるエンハンサー配列及び他の調節エレメントを含んでもよい。プロモーター/調節配列は、例えば、組織特異的に遺伝子産物を発現させるものであってもよい。

【0099】

「構成的」プロモーターという用語は、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、細胞のほとんどまたはすべての生理的条件下で、その遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列を指す。

30

【0100】

「誘導性」プロモーターという用語は、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、そのプロモーターに対応する誘導物質が細胞内に存在する場合のみ、実質的にその遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列を指す。

【0101】

「組織特異的」プロモーターという用語は、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、細胞がそのプロモーターに対応する組織型の細胞である場合のみ、実質的にその遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列を指す。

40

【0102】

s c F v の文脈において使用される「リンカー」及び「可撓性ポリペプチドリリンカー」という用語は、可変重鎖領域及び可変軽鎖領域を共に連結するために単独でまたは組み合わせて使用されるグリシン残基及び/またはセリン残基などのアミノ酸からなるペプチドリリンカーを指す。一実施形態では、可撓性ポリペプチドリリンカーは、Gly/Ser リンカーであり、アミノ酸配列 (Gly - Gly - Gly - Ser)_n を含み、式中、n は 1 以上の正の整数である。例えば、n = 1、n = 2、n = 3、n = 4、n = 5、n = 6、n = 7、n = 8、n = 9、及び n = 10 である。一実施形態では、可撓性ポリペプチドリリンカーは、(Gly₄ Ser)₄ または (Gly₄ Ser)₃ を含むが、これらに限定されない。別の実施形態では、リンカーは、(Gly₂ Ser)、(Gly Ser)、または

50

(Gly₃Ser)の多重反復を含む。また、本開示の範囲には、WO2012/138475(参照により本明細書に組み込まれる)に記載のリンカーが含まれる。場合によっては、リンカー配列は長いリンカー(LL)配列を含む。場合によっては、長いリンカー配列は(G₄S)_n(式中、n=2~4)を含む。場合によっては、リンカー配列は短いリンカー(SL)配列を含む。場合によっては、短いリンカー配列は(G₄S)_n(式中、n=1~3)を含む。

【0103】

本明細書で使用される場合、5'キャップ(RNAキャップ、RNA7-メチルグアノシンキャップ、またはRNA m7Gキャップとも称する)とは、転写開始直後に真核生物のメッセンジャーRNAの「先頭」または5'末端に付加される修飾グアニンヌクレオチドである。5'キャップは、最初に転写されるヌクレオチドに連結された末端基からなる。リボソームによる認識、及びRNaseからの保護にとって、その存在が不可欠である。キャップの付加は転写と連動しており、それぞれが互いに影響し合うように同時転写的に発生する。転写開始後まもなく、合成されるmRNAの5'末端に、RNAポリメラーゼと会合したキャップ合成複合体が結合する。この酵素複合体は、mRNAのキャップに必要とされる化学反応を触媒する。合成は多段階の生化学反応として進行する。キャップ部分を修飾して、翻訳の安定性または効率などのmRNAの機能を調節することができる。

10

【0104】

本明細書で使用される場合、「in vitro転写したRNA」とは、in vitroで合成されたRNA、好ましくはmRNAを指す。概して、in vitro転写したRNAは、in vitro転写ベクターから生成される。in vitro転写ベクターは、in vitro転写したRNAを生成するために使用される鋳型を含む。

20

【0105】

本明細書で使用される場合、「ポリ(A)」は、ポリアデニル化によってmRNAに結合した一連のアデノシンである。一過性発現のための構築物の好ましい実施形態では、ポリAは50~5000、好ましくは64超、より好ましくは100超、最も好ましくは300超または400超である。ポリ(A)配列を化学的または酵素的に修飾して、翻訳の局在化、安定性、または効率などのmRNA機能を調節することができる。

【0106】

本明細書で使用される場合、「ポリアデニル化」とは、メッセンジャーRNA分子へのポリアデニル部分またはその修飾変異体の共有結合を指す。真核生物では、ほとんどのメッセンジャーRNA(mRNA)分子が3'末端でポリアデニル化されている。3'ポリ(A)尾部は、酵素であるポリアデニル酸ポリメラーゼの作用によってmRNA前駆体に付加されるアデニンヌクレオチド(多くの場合、数百)の長い配列である。高等真核生物では、特定の配列、すなわちポリアデニル化シグナルを含んだ転写物にポリ(A)尾部が付加される。ポリ(A)尾部とそれに結合したタンパク質は、エキソヌクラーゼによる分解からmRNAを保護するのに役立つ。ポリアデニル化はまた、転写終結、mRNAの核外輸送、及び翻訳にとって重要である。ポリアデニル化は、RNAへのDNAの転写の直後に核内で起こるが、後に細胞質内でもさらに起こり得る。転写が終結した後、RNAポリメラーゼと会合したエンドヌクラーゼ複合体の作用によってmRNA鎖が切断される。通常、切断部位は、切断部位近傍に塩基配列AAUAAAが存在することを特徴とする。mRNAが切断された後、アデノシン残基が切断部位の解放3'末端に付加される。

30

40

【0107】

本明細書で使用される場合、「一過性」とは、非組み込み型導入遺伝子の発現が数時間、数日間、または数週間であることを指し、その発現の期間は、遺伝子がゲノムに組み込まれる場合、または宿主細胞の安定なプラスミドレプリコン内に収容される場合の遺伝子の発現期間よりも短い。

【0108】

50

「シグナル伝達経路」という用語は、細胞のある部分から細胞の別の部分へのシグナルの伝達において役割を担う種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係を指す。「細胞表面受容体」という表現は、シグナルを受け取り、細胞膜を越えてシグナルを伝達することができる分子及び分子の複合体を含む。

【0109】

「対象」という用語は、免疫応答を誘発することができる生物（例えば、哺乳動物、ヒト）を包含することを意図する。

【0110】

「実質的に精製された」細胞という用語は、他の細胞型を本質的に含まない細胞を指す。また、実質的に精製された細胞とは、天然に存在する状態で通常付随する他の細胞型から分離された細胞も指す。場合によっては、実質的に精製された細胞の集団とは、均一な細胞集団を指す。別の場合には、この用語は、単に、天然の状態において本来付随する細胞から分離された細胞を指す。いくつかの態様では、細胞は *in vitro* で培養される。他の態様では、細胞は *in vitro* では培養されない。

10

【0111】

本明細書で使用される場合、「治療的」という用語は治療を意味する。治療効果は、病状の軽減、抑制、寛解、または根絶によって得られる。

【0112】

本明細書で使用される場合、「予防」という用語は、疾患または病状の予防または保護的処置を意味する。

20

【0113】

本開示の文脈において、「腫瘍抗原」または「過剰増殖性疾患抗原」または「過剰増殖性疾患に関連する抗原」とは、特定の過剰増殖性疾患に共通する抗原を指す。ある特定の態様では、本開示の過剰増殖性疾患抗原は、原発性または転移性の黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、NHL、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎臓癌、ならびに乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌のような腺癌などを含むがこれらに限定されないがんに由来する。

【0114】

「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞内に移入または導入される過程を指す。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞とは、外因性核酸をトランスフェクト、形質転換、または形質導入された細胞である。この細胞は初代対象細胞とその継代を含む。

30

【0115】

「特異的に結合する」という用語は、試料中に存在する同種の結合パートナー（例えば CD19）を認識して、それと結合するが、試料中の他の分子は必ずしも実質的に認識せず、結合しない抗体、抗体断片、または特異的リガンドを指す。

【0116】

本明細書で使用される場合、「メガヌクレアーゼ」という用語は、認識配列が12塩基対より大きい、二本鎖DNAと結合するエンドヌクレアーゼを指す。好ましくは、本開示のメガヌクレアーゼの認識配列は22塩基対である。メガヌクレアーゼは、I-Cre1に由来するエンドヌクレアーゼであってよく、天然のI-Cre1と比較して、例えばDNA結合特異性、DNA切断活性、DNA結合親和性、または二量体化特性に関して改変されたI-Cre1の改変バリエーションを指す場合もある。I-Cre1のそのような改変バリエーションの作製方法は、当技術分野において公知である（例えば、WO2007/047859）。本明細書で使用されるメガヌクレアーゼは、ヘテロ二量体として、またはペプチドリンカーを使用して、DNA結合ドメインの対が単一のポリペプチドに結合されている「一本鎖メガヌクレアーゼ」として二本鎖DNAに結合する。「ホーミングエンドヌクレアーゼ」という用語は、「メガヌクレアーゼ」という用語と同義である。本開示のメガヌクレアーゼは、細胞を37°Cでトランスフェクトして維持できるように、細胞、特に

40

50

ヒトT細胞で発現されたとき実質的に無毒であり、本明細書に記載の方法を使用して測定した場合に、細胞生存性への有害な影響またはメガヌクレアーゼ切断活性の著しい低下を認めない。

【0117】

本明細書で使用される場合、「一本鎖メガヌクレアーゼ」という用語は、リンカーによって連結されたヌクレアーゼサブユニットの対を含むポリペプチドを指す。一本鎖メガヌクレアーゼの構成はN末端サブユニット-リンカー-C末端サブユニットである。これらの2つのメガヌクレアーゼサブユニットは概してアミノ酸配列が同一ではなく、同一でないDNA配列を認識する。したがって、一本鎖メガヌクレアーゼは通常、偽パリンδροーム認識配列または非パリンδροーム認識配列を切断する。一本鎖メガヌクレアーゼは、実

10

【0118】

本明細書で使用される場合、「T A L E N」という用語は、F o k 1ヌクレアーゼドメインの任意の部分に融合された16~22個のT A Lドメインリピートを含む、DNA結合ドメインを含むエンドヌクレアーゼを指す。

【0119】

本明細書で使用される場合、「小型T A L E N」という用語は、I - T e v 1ホーミングエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインの任意の触媒活性部分に任意の向きで融合された16~22個のT A LドメインリピートをもつDNA結合ドメインを含むエンドヌクレアーゼを指す。

20

【0120】

本明細書で使用される場合、「C R I S P R」という用語は、C a s 9などのカスパーゼと、ゲノムDNAの認識部位にハイブリダイズすることによりカスパーゼのDNA切断を指示するガイドRNAとを含む、カスパーゼ系のエンドヌクレアーゼを指す。

【0121】

本明細書で使用される場合、「m e g a T A L」という用語は、転写活性化因子様エフェクター(T A L E)DNA結合ドメインと、改変された配列特異的ホーミングエンドヌクレアーゼとを含む一本鎖ヌクレアーゼを指す。

30

【0122】

範囲：本開示を通して、本開示の様々な態様を範囲形式で示す場合がある。範囲形式による記載は、単に便宜上かつ簡潔さのためであって、本開示の範囲に対する不変の限定と解釈されるべきではないものと理解されるべきである。したがって、ある範囲の記載は、その範囲内におけるすべての可能な部分範囲のほか、個々の数値も明確に開示されているとみなされるべきである。例えば、1~6などの範囲の記載は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などの部分範囲のほか、その範囲内の個々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、及び6も明確に開示されているとみなされるべきである。別の例として、95~99%の同一性などの範囲は、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性であるものを含み、かつ96~99%、96~98%、96~97%、97~99%、97~98%、及び98~99%の同一性などの部分範囲を含む。これは範囲の幅とは関係なく適用される。

40

【0123】

説明

本明細書では、T細胞受容体(T C R)融合タンパク質(T F P)及びT C R定常ドメインを含む改変T細胞であって、機能的に破壊された内因性T C Rサブユニットも有する改変T細胞を使用した、がんなどの疾患を治療するための組成物及び使用方法を提供する。本明細書で使用される場合、「T細胞受容体(T C R)融合タンパク質」または「T F P」は、T C Rを含む様々なポリペプチド由来の組換えポリペプチドを含み、当該T C R

50

は概して、i) 標的細胞の表面抗原に結合すること、及びii) 通常はT細胞内またはその表面に共存する場合、インタクトなTCR複合体の他のポリペプチド成分と相互作用することができる。本明細書に示すように、TFPはキメラ抗原受容体と比較して大幅な利点を与える。「キメラ抗原受容体」またはそれに代わる「CAR」という用語は、scFvの形態の細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び以下に定義する刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン(本明細書では「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも称する)を含む組換えポリペプチドを指す。概して、CARの中央の細胞内シグナル伝達ドメインは、通常はTCR複合体と会合して存在するCD3ゼータ鎖由来である。このCD3ゼータシグナル伝達ドメインは、4-1BB(すなわちCD137)、CD27、及び/またはCD28などの少なくとも1つの共刺激分子由来の1つ以上の機能的シグナル伝達ドメインと融合することができる。

10

【0124】

T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)

本開示は、TFPをコードする組換えDNA構築物であって、当該TFPが、CD19、例えばヒトCD19に特異的に結合する抗体断片を含み、当該抗体断片の配列が、TCRサブユニットまたはその一部をコードする核酸配列と隣接し、かつ同一のリーディングフレーム内にある構築物を包含する。本開示は、TFPをコードする組換えDNA構築物であって、当該TFPが、BCMA、例えばヒトBCMAに特異的に結合する抗体断片を含み、当該抗体断片の配列が、TCRサブユニットまたはその一部をコードする核酸配列と隣接し、かつ同一のリーディングフレーム内にある構築物を包含する。本開示は、TFPをコードする組換えDNA構築物であって、当該TFPが、ROR1、例えばヒトROR1に特異的に結合する抗体断片を含み、当該抗体断片の配列が、TCRサブユニットまたはその一部をコードする核酸配列と隣接し、かつ同一のリーディングフレーム内にある構築物を包含する。本開示は、TFPをコードする組換えDNA構築物であって、当該TFPが、CD22、例えばヒトCD22に特異的に結合する抗体断片を含み、当該抗体断片の配列が、TCRサブユニットまたはその一部をコードする核酸配列と隣接し、かつ同一のリーディングフレーム内にある構築物を包含する。本明細書で提供するTFPは、1つ以上の内因性(または代わりに、1つ以上の外因性、または内因性と外因性の組み合わせ)のTCRサブユニットと会合して、機能的TCR複合体を形成することができる。

20

【0125】

一態様では、本開示のTFPは、別の状況では抗原結合ドメインと称される標的・特異的結合要素を含む。部分の選択は、標的細胞の表面を決定する標的抗原の型及び数に応じて異なる。例えば、抗原結合ドメインは、特定の病状と関連する標的細胞の細胞表面マーカーとして作用する標的抗原を認識するように選択することができる。したがって、本開示のTFPの抗原結合ドメインに対する標的抗原として作用し得る細胞表面マーカーの例としては、ウイルス、細菌、及び寄生虫の感染症、自己免疫疾患、及びがん疾患(例えば悪性腫瘍疾患)に関連するものが挙げられる。

30

【0126】

一態様では、抗原結合ドメインを操作して所望の抗原に特異的に結合するTFPにすることによって、TFP介在型T細胞応答を、対象となる抗原に誘導することができる。

40

【0127】

一態様では、抗原結合ドメインを含むTFP部分は、CD19を標的とする抗原結合ドメインを含む。一態様では、抗原結合ドメインは、ヒトCD19を標的とする。一態様では、抗原結合ドメインを含むTFP部分は、BCMAを標的とする抗原結合ドメインを含む。一態様では、抗原結合ドメインは、ヒトBCMAを標的とする。

【0128】

抗原結合ドメインは、限定されないものの、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ならびに重鎖可変ドメイン(V_H)、軽鎖可変ドメイン(V_L)、及びラクダ科由来ナノボディの重鎖可変ドメイン(V_{HH})などの単一ドメイン抗体を含むがこれに限定されないそれらの機能的断片を含む抗原と結合するあら

50

ゆるドメイン、ならびに当技術分野において抗原結合ドメインとして機能することが公知である代替骨格、例えば組換えフィブロネクチンドメイン、アンチカリン、DARPINなどと結合するあらゆるドメインであり得る。同様に、標的抗原を特異的に認識し、それと結合する天然または合成のリガンドを、TFPに対する抗原結合ドメインとして使用することができる。場合によっては、最終的にTFPが使用されるものと同じ種に由来する抗原結合ドメインが有益である。例えば、ヒトに使用する場合、TFPの抗原結合ドメインが、抗体または抗体断片の抗原結合ドメインに対するヒト残基またはヒト化残基を含むことが有益であり得る。

【0129】

したがって、一態様では、抗原結合ドメインは、ヒト化抗体もしくはヒト抗体、もしくは抗体断片、またはマウス抗体もしくは抗体断片を含む。一実施形態では、ヒト化またはヒトの抗CD19または抗BCMA結合ドメインは、本明細書に記載のヒト化またはヒトの抗CD19または抗BCMA結合ドメインの軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)、及び軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)のうちの一つ以上(例えば、3つすべて)、及び/または本明細書に記載のヒト化またはヒトの抗CD19結合ドメインの重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)、及び重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)の一つ以上(例えば、3つすべて)を含み、例えば、1つ以上、例えば3つすべてのLC CDRと、1つ以上、例えば3つすべてのHC CDRを含むヒト化またはヒトの抗CD19または抗BCMA結合ドメインである。一実施形態では、ヒト化またはヒトの抗CD19結合ドメインは、本明細書に記載のヒト化またはヒトの抗CD19または抗BCMA結合ドメインの重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)、及び重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)の一つ以上(例えば、3つすべて)を含み、例えば、ヒト化またはヒトの抗CD19または抗BCMA結合ドメインは、それぞれが本明細書に記載のHC CDR1、HC CDR2、及びHC CDR3を含む2つの可変重鎖領域を有する。一実施形態では、ヒト化またはヒトの抗CD19または抗BCMA結合ドメインは、本明細書に記載のヒト化もしくはヒトの軽鎖可変領域及び/または本明細書に記載のヒト化もしくはヒトの重鎖可変領域を含む。一実施形態では、ヒト化またはヒトの抗CD19または抗BCMA結合ドメインは、本明細書に記載のヒト化重鎖可変領域、例えば本明細書に記載の少なくとも2つのヒト化またはヒトの重鎖可変領域を含む。一実施形態では、抗CD19または抗BCMA結合ドメインは、本明細書で提供するアミノ酸配列の軽鎖及び重鎖を含むscFvである。ある実施形態では、抗CD19または抗BCMA結合ドメイン(例えば、scFv)は、本明細書で提供する軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1つ、2つ、もしくは3つの修飾(例えば置換)、ただし30、20、または10個以下の修飾(例えば置換)を有するアミノ酸配列、または本明細書で提供するアミノ酸配列に対して95~99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域、及び/または本明細書で提供する重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1つ、2つ、もしくは3つの修飾(例えば置換)、ただし30、20、または10個以下の修飾(例えば置換)を有するアミノ酸配列、または本明細書で提供するアミノ酸配列に対して95~99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態では、ヒト化またはヒトの抗CD19または抗BCMA結合ドメインはscFvであり、本明細書に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカーを介して、本明細書に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に結合されている。一実施形態では、ヒト化抗CD19または抗BCMA結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを含み、式中、nは1、2、3、4、5、または6、好ましくは3または4である。scFvの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、例えば、軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域、または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれの配置であってもよい。場合によっては、リンカー配列は長いリンカー(LL)配列を含む。場合によっては、長いリンカー配列は(G₄S)_n(式中、n=2~4)を含む。場合によっては、リンカー配列は短いリンカー(SL)配列を含む。場合によっては、短いリンカー配列は(

10

20

30

40

50

$G_4S)_n$ (式中、 $n = 1 \sim 3$) を含む。

【0130】

いくつかの態様では、非ヒト抗体がヒト化されており、その場合、抗体の特定の配列または領域が、ヒトにおいて天然に産生される抗体またはその断片との類似性を高めるように修飾されている。一態様では、抗原結合ドメインはヒト化されている。

【0131】

ヒト化抗体は、当技術分野において公知である種々の技術を使用して作製することができ、このような技術として、CDR移植(例えば、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、欧州特許第EP239,400号、国際公開第WO91/09967号、及び米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号、及び同第5,585,089号を参照)、ペニアリングまたはリサーフェイス(例えば、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、欧州特許第EP592,106号及び同第EP519,596号、Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498、Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814、ならびにRoguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973を参照)、鎖シャッフル(例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,565,332号を参照)、例えば、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第US2005/0042664号、米国特許出願公開第US2005/0048617号、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公開第WO9317105号、Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25(2002)、Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60(2000)、Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79(2000)、Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84(1997)、Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904(1996)、Couto et al., *Cancer Res.*, 55(23 Supp):5973s-5977s(1995)、Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22(1995)、Sandhu JS, *Gene*, 150(2):409-10(1994)、及びPedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73(1994)に開示された技術が挙げられるが、これらに限定されない。多くの場合、フレームワーク領域内のフレームワーク残基を、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換して、抗原結合を変更、例えば改善する。このようなフレームワーク置換は、当技術分野において周知の方法によって同定され、例えば、CDRとフレームワーク残基との相互作用をモデル化して、抗原結合及び配列比較にとって重要なフレームワーク残基を同定し、特定の位置での特異なフレームワーク残基を同定することによる(例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる、Queen et al., 米国特許第5,585,089号、及びRiechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323を参照)。

【0132】

ヒト化抗体または抗体断片は、非ヒトである供給源からの残存する1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と呼ばれることが多く、通常は「移入」可変ドメインから取得される。本明細書で提供されるように、ヒト化抗体または抗体断片は、非ヒト免疫グロブリン分子からの1つ以上のCDRとフレームワーク領域とを含み、フレームワークを含むアミノ酸残基は完全にまたはほとんどヒト生殖細胞系列に由来する。抗体または抗体断片のヒト化に関する多くの技術が当技術分野において周知されており、Winter及び共同研究者(Jones et al., *Nature* 321:522-525(1986)、Riechmann et al., *Nature* 332:323-327(1988)、Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536(1988))の方法に従って、齧歯類のCD

10

20

30

40

50

RまたはCDR配列を、ヒト抗体の対応する配列の代わりに用いること、すなわちCDR移植（内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、EP239,400、PCT公開第WO91/09967号、及び米国特許第4,816,567号、同第6,331,415号、同第5,225,539号、同第5,530,101号、同第5,585,089号、同第6,548,640号）により基本的に行うことができる。そのようなヒト化抗体及び抗体断片において、非ヒト種由来の対応配列による置換は、インタクトなヒト可変ドメインより大幅に少ない。ヒト化抗体は多くの場合、いくつかのCDR残基及び場合によってはいくつかのフレームワーク（FR）残基が、齧歯類抗体の類似部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。抗体及び抗体断片のヒト化は、ベニアリングまたはリサーフェイス（EP592,106、EP519,596、Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6): 805-814; 及び Roguska et al., *PNAS*, 91: 969-973(1994)、及び鎖シャッフル（米国特許第5,565,332号）でも達成することができる。その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0133】

ヒト化抗体の作製に使用するヒト可変ドメイン（軽鎖及び重鎖の両方）の選択は、抗原性を低下させるためである。いわゆる「最良適合」法に従って、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対して、齧歯類抗体の可変ドメインの配列をスクリーニングする。その後、齧歯類のものに最も近似するヒト配列が、ヒト化抗体用のヒトフレームワーク（FR）として認められる（内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296(1993)、Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901(1987)）。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体に使用してもよい（例えば、内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34(16-17): 1157-1165(1997)、Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285(1992)、Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623(1993)を参照）。いくつかの実施形態では、フレームワーク領域、例えば重鎖可変領域の4つすべてのフレームワーク領域が、V_H4-4-59生殖細胞系列配列に由来する。一実施形態では、フレームワーク領域は、例えば対応するマウス配列でのアミノ酸からの1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの修飾、例えば置換を含み得る。一実施形態では、フレームワーク領域、例えば軽鎖可変領域の4つすべてのフレームワーク領域が、V_K3-1.25生殖細胞系列配列に由来する。一実施形態では、フレームワーク領域は、例えば対応するマウス配列でのアミノ酸からの1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの修飾、例えば置換を含み得る。

20

30

【0134】

いくつかの態様では、抗体断片を含む本開示のTFP組成物の一部が、標的抗原に対する高親和性及び他の有利な生物学的特性を保持したままヒト化される。本開示の一態様によれば、ヒト化抗体及び抗体断片は、親配列及びヒト化配列の3次元モデルを使用した、親配列及び種々の概念的ヒト化産物の分析過程により作製される。3次元免疫グロブリンモデルは一般に入手可能であり、当業者に周知のものである。選択した候補の免疫グロブリン配列の有望な3次元立体構造を例示及び表示するコンピュータープログラムが利用可能である。これらの表示を精査すると、候補の免疫グロブリン配列の機能性に見込まれる残基の役割の分析、例えば、候補の免疫グロブリンが標的抗原と結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能である。このように、所望の抗体または抗体断片の特性、例えば標的抗原に対する親和性の増加が達成されるように、レシピエント及び移入配列からのFR残基を選択して組み合わせることができる。一般に、CDR残基が、抗原結合への影響に対して、直接的及び最も大きく関与している。

40

50

【0135】

ヒト化抗体または抗体断片は、元の抗体と類似する抗原特異性、例えば本開示では、ヒトCD19との結合能を保持することができる。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体または抗体断片は、ヒトCD19またはヒトBCMAに対する結合の親和性及び/または特異性を改善することができる。

【0136】

一態様では、抗CD19または抗BCMA結合ドメインは、抗体または抗体断片の特定の機能的特徴または特性によって特徴づけられる。例えば、一態様では、抗原結合ドメインを含む本開示のTFP組成物の一部が、ヒトCD19またはヒトBCMAと特異的に結合する。一態様では、抗原結合ドメインは、ヒトCD19に対して、Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997)に記載のFMC63 scFvと同じかまたは類似する結合特異性を有する。一態様では、本開示は、抗体または抗体断片を含む抗原結合ドメインに関し、当該抗体結合ドメインは、CD19もしくはBCMAタンパク質またはそれらの断片に特異的に結合し、当該抗体または抗体断片は、本明細書で提供されるアミノ酸配列を含む可変軽鎖及び/または可変重鎖を含む。ある特定の態様では、scFvは、リーダー配列と隣接し、かつ同一のリーディングフレーム内にある。

10

【0137】

一態様では、抗CD19または抗BCMA結合ドメインは、断片、例えば一本鎖可変断片(scFv)である。一態様では、抗CD19結合ドメインは、Fv、Fab、(Fab')₂、または二重機能性(例えば二重特異性)ハイブリッド抗体(例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))である。一態様では、本開示の抗体及びその断片は、野生型のまたは増強された親和性でCD19タンパク質と結合する。

20

【0138】

また、標的抗原(例えば、CD19、BCMA、または融合部分結合ドメインの標的について本明細書の他の箇所に記載した任意の標的抗原)に特異的な抗体抗原結合ドメインを得るための方法を本明細書で提供し、当該方法は、本明細書で述べるV_Hドメインのアミノ酸配列での1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換、または挿入により、V_Hドメインのアミノ酸配列パリアントであるV_Hドメインを提供すること、場合により、そのように提供されたV_Hドメインを1つ以上のV_Lドメインと組み合わせること、ならびにこのV_HドメインまたはV_H/V_Lの1種または複数種の組み合わせを試験し、特異的結合メンバー、または対象となる標的抗原(例えば、CD19またはBCMA)に特異的であり、場合により1つ以上の所望の特性を有する抗体抗原結合ドメインを同定することを含む。

30

【0139】

場合によっては、V_Hドメイン及びscFvは、当技術分野において公知の方法に従って作製することができる(例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423-426及びHouston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照)。scFv分子は、V_H及びV_L領域を、可撓性ポリペプチドリンカーを用いて連結させることにより作製することができる。scFv分子は、長さ及び/またはアミノ酸組成が最適化されたリンカー(例えば、Ser-Glyリンカー)を含む。このリンカーの長さは、scFvの可変領域がどのようにフォールディングされ相互作用するか大きく影響し得る。実際、短いポリペプチドリンカーを使用する場合(例えば5~10アミノ酸)、鎖内のフォールディングが妨げられる。また、2つの可変領域をひとつにして機能的エピトープ結合部位を形成するには、鎖間フォールディングが必要となる。場合によっては、リンカー配列は長いリンカー(LL)配列を含む。場合によっては、長いリンカー配列は(G₄S)_n(式中、n=2~4)を含む。場合によっては、リンカー配列は短いリンカー(SL)配列を含む。場合によっては、短いリンカー配列は(G₄S)_n(式中、n=1~3)を含

40

50

む。リンカーの配置及び大きさの例については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Hollinger et al., 1993 Proc Natl Acad Sci U.S.A. 90: 6444-6448、米国特許出願公開第2005/0100543号、同第2005/0175606号、同第2007/0014794号、ならびにPCT公開第WO2006/020258号及び同第WO2007/024715号を参照のこと。

【0140】

s c F v は、その V_L 及び V_H 領域間に、約 10、11、12、13、14、15、または 15 超の残基のリンカーを含み得る。リンカー配列は、任意の天然に存在するアミノ酸を含んでもよい。いくつかの実施形態では、リンカー配列はアミノ酸のグリシン及びセリンを含む。別の実施形態では、リンカー配列は、 $(Gly_4Ser)_n$ (式中、 n は 1 以上の正の整数である) などのグリシンとセリンのセットのリピートを含む。一実施形態では、リンカーは $(Gly_4Ser)_4$ または $(Gly_4Ser)_3$ であり得る。リンカー長の変動により、活性を保持または増強させ、活性試験において優れた有効性を生じさせることができる。場合によっては、リンカー配列は長いリンカー (LL) 配列を含む。場合によっては、長いリンカー配列は $(G_4S)_n$ (式中、 $n = 2 \sim 4$) を含む。場合によっては、リンカー配列は短いリンカー (SL) 配列を含む。場合によっては、短いリンカー配列は、 $(G_4S)_n$ (式中、 $n = 1 \sim 3$) を含む。

10

【0141】

安定性と変異

抗 CD19 または抗 BCMA 結合ドメイン、例えば s c F v 分子 (例えば、可溶性 s c F v) の安定性は、従来の対照 s c F v 分子または全長抗体の生物物理学的特性 (例えば、熱安定性) を基準にして評価することができる。一実施形態では、ヒト化またはヒト s c F v は、記載されるアッセイにおいて、親 s c F v よりも、約 0.1、約 0.25、約 0.5、約 0.75、約 1、約 1.25、約 1.5、約 1.75、約 2、約 2.5、約 3、約 3.5、約 4、約 4.5、約 5、約 5.5、約 6、約 6.5、約 7、約 7.5、約 8、約 8.5、約 9、約 9.5、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、または約 15 高い熱安定性を有する。

20

【0142】

抗 CD19 または抗 BCMA 結合ドメイン、例えば s c F v の改善された熱安定性は、引き続き CD19 - TFP 構築物全体に付与され、抗 CD19 または抗 BCMA TFP 構築物の治療的特性の改善につながる。抗 CD19 または抗 BCMA 結合ドメイン、例えば s c F v の熱安定性を、従来の抗体と比較して、少なくとも約 2 または 3 改善することができる。一実施形態では、抗 CD19 または抗 BCMA 結合ドメイン、例えば s c F v は、従来の抗体と比較して熱安定性が 1 改善している。別の実施形態では、抗 CD19 結合ドメイン、例えば s c F v は、従来の抗体と比較して熱安定性が 2 改善している。別の実施形態では、s c F v は、従来の抗体と比較して熱安定性が 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 改善している。比較は、例えば、本明細書に開示される s c F v 分子と、s c F v の V_H 及び V_L が由来する抗体の s c F v 分子または Fab 断片との間で行うことができる。熱安定性は当技術分野において公知の方法を使用して測定することができる。例えば、一実施形態では T_M を測定することができる。 T_M の測定方法及びタンパク質の安定性を決定する他の方法を以下に詳述する。

30

40

【0143】

s c F v の変異 (可溶性 s c F v のヒト化または直接変異誘発を介して生じる) は、s c F v の安定性を変化させ、かつ s c F v 及び抗 CD19 または抗 BCMA TFP 構築物の全体的な安定性を改善する。 T_M 、温度変性、及び温度凝集などの測定値を用いて、ヒト化 s c F v の安定性をマウス s c F v と比較する。一実施形態では、抗 CD19 または抗 BCMA 結合ドメイン、例えば s c F v は、ヒト化過程から生じる少なくとも 1 つの

50

変異を含み、それによって変異型 s c F v は抗 C D 1 9 T F P 構築物に改善された安定性を付与する。別の実施形態では、抗 C D 1 9 結合ドメイン、例えば s c F v は、ヒト化過程から生じる少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個の変異を含み、それによって変異型 s c F v は C D 1 9 T F P または B C M A T F P 構築物に改善された安定性を付与する。

【0144】

一態様では、T F P の抗原結合ドメインは、本明細書に記載の抗原結合ドメインのアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を含み、抗原結合ドメインは、本明細書に記載の抗 C D 1 9 または抗 B C M A 抗体断片の所望の機能特性を保持する。具体的な一態様では、本開示の T F P 組成物は抗体断片を含む。さらなる態様では、抗体断片は s c F v を含む。

10

【0145】

様々な態様において、T F P の抗原結合ドメインは、一方または双方の可変領域（例えば、V_H 及び/または V_L）内、例えば 1 つ以上の C D R 領域内、及び/または 1 つ以上のフレームワーク領域内の 1 つ以上のアミノ酸を修飾することにより改変される。具体的な一態様では、本開示の T F P 組成物は抗体断片を含む。さらなる態様では、抗体断片は s c F v を含む。

【0146】

アミノ酸配列に関して（例えば、野生型とは）異なるが、所望の活性に関しては変化しないように、本開示の抗体または抗体断片をさらに修飾できることは当業者に理解されている。例えば、「非必須」アミノ酸残基にアミノ酸置換をもたらす追加のヌクレオチド置換をタンパク質に行うことができる。例えば、分子内の非必須アミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置換することができる。別の実施形態では、アミノ酸の鎖が、側鎖ファミリーメンバーの順序及び/または組成が異なる構造的に類似した鎖で置換されていてもよい。例えば、アミノ酸残基が、類似する側鎖を有するアミノ酸残基で置換される保存的置換を行うことができる。

20

【0147】

類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当技術分野で定義されており、これには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。

30

【0148】

2 つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関する文脈において、同一性パーセントとは、2 つ以上の配列が同一であることを指す。以下の配列比較アルゴリズムのいずれかを使用して、または手作業でのアラインメント及び目視検査を用いて測定されるような、比較領域または指定された領域にわたる最大一致を比較及びアラインメントしたとき、2 つの配列が、同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドを特定の比率（例えば、指定された領域にわたって、または指定されていない場合には配列全体にわたって、60%の同一性、場合により、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性）で有する場合、2 つの配列は「実質的に同一」である。場合により、少なくとも約 50 のヌクレオチド（または 10 アミノ酸）長である領域にわたって、またはより好ましくは、100 ~ 500 もしくは 1000 以上のヌクレオチド（または 20、50、200、もしくはそれ以上のアミノ酸）長である領域にわたって同一性が存在する。

40

【0149】

50

配列を比較するには、通常1つの配列を参照配列として利用し、試験配列をその参照配列と比較する。配列比較アルゴリズムを利用する場合には、試験配列と参照配列をコンピューターに入力し、必要に応じて部分座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムのパラメーターを指定する。デフォルトのプログラムパラメーターを使用することも、別のパラメーターを指定することもできる。その後、配列比較アルゴリズムにより、プログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントが算出される。比較のための配列アラインメント方法は当技術分野において周知である。配列比較に最適なアラインメントは、例えば、Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482cの局所相同性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48: 443の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実施(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.のGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)によって、または手作業アラインメント及び目視検査(例えば、Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biologyを参照)によって実施することができる。配列同一性パーセント及び配列類似性の決定に適したアルゴリズムの2つの例が、BLAST及びBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれAltschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402、及びAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410に記載されている。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationにより公開されている。

【0150】

一態様では、本開示は、機能的に等価な分子を生成する出発抗体または断片(例えばscFv)のアミノ酸配列の修飾を企図する。例えば、TFPに含まれる抗CD19または抗BCMA結合ドメイン、例えばscFvのV_HまたはV_Lは、抗CD19結合ドメイン、例えばscFvの出発V_HまたはV_Lフレームワーク領域の少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を保持するように修飾することができる。本開示は、TFP構築物全体の修飾、例えば機能的に等価な分子を生成するための、TFP構築物の種々のドメインのうち1つ以上のアミノ酸配列の修飾を企図する。TFP構築物は、出発TFP構築物の少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を保持するように修飾することができる。

【0151】

細胞外ドメイン

細胞外ドメインは、天然源または組換え源のいずれに由来してもよい。供給源が天然である場合、このドメインは、どのタンパク質に由来してもよいが、特に膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質以外のドメインである。一態様では、細胞外ドメインは膜貫通ドメインと会合することができる。本開示で特に使用される細胞外ドメインは、例えば、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖、もしくはゼータ鎖、またはCD3イプシロン、CD3ガンマ、もしくはCD3デルタ、あるいは別の実施形態では、CD28、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154の細胞外領域(複数可)を少

なくとも含み得る。

【0152】

膜貫通ドメイン

一般的に、TFP配列には、単一のゲノム配列がコードする細胞外ドメインと膜貫通ドメインとが含まれる。代替的实施形態では、TFPは、TFPの細胞外ドメインとは異種の膜貫通ドメインを含むように設計することができる。膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接する1つ以上の付加アミノ酸、例えば、膜貫通が由来したタンパク質の細胞外領域に会合した1つ以上のアミノ酸（例えば、細胞外領域の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれ以上のアミノ酸）、及び/または膜貫通が由来したタンパク質の細胞内領域に会合した1つ以上の付加アミノ酸（例えば、細胞内領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれ以上のアミノ酸）を含み得る。場合によっては、膜貫通ドメインは、細胞外領域の少なくとも30、35、40、45、50、55、60、またはそれ以上のアミノ酸を含み得る。場合によっては、膜貫通ドメインは、細胞内領域の少なくとも30、35、40、45、50、55、60、またはそれ以上のアミノ酸を含み得る。一態様では、膜貫通ドメインは、使用されるTFPの他のドメインの1つと会合するものである。場合によっては、膜貫通ドメインを選択する、またはアミノ酸置換により修飾することにより、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに対するそのようなドメインの結合を回避することで、例えば、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えことができる。一態様では、膜貫通ドメインは、TFP-T細胞表面の別のTFPとのホモ二量化が可能である。異なる態様では、同じTFPに存在する天然の結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小限にするように膜貫通ドメインのアミノ酸配列を修飾または置換することができる。

10

20

30

40

50

【0153】

膜貫通ドメインは、天然源または組換え源のいずれに由来してもよい。供給源が天然である場合、ドメインは何らか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。一態様では、TFPが標的に結合している場合はいつでも、膜貫通ドメインは細胞内ドメイン（複数可）へシグナル伝達ができる。本開示で特に使用される膜貫通ドメインは、例えば、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖、ガンマ鎖、デルタ鎖、もしくはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154の膜貫通領域（複数可）を少なくとも含み得る。

【0154】

場合によっては、膜貫通ドメインは、TFPの細胞外領域、例えばTFPの抗原結合ドメインに、ヒンジ、例えばヒトタンパク質由来のヒンジを介して結合させることができる。例えば、一実施形態では、ヒンジは、ヒト免疫グロブリン（Ig）ヒンジ、例えばIgG4ヒンジ、またはCD8aヒンジであり得る。

【0155】

リンカー

場合により、長さが2~10アミノ酸である短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカーによって、TFPの膜貫通ドメインと細胞質領域との間に結合が形成されていてよい。場合によっては、リンカーは少なくとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上の長さであり得る。グリシン-セリンのダブルットは特に適したリンカーとなる。例えば、一態様では、リンカーは、アミノ酸配列GGGSGGGGS（配列番号3）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーはGGTGGCGGAGGTTC TGGAGGTGGAGGTTC C（配列番号4）のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0156】

細胞質ドメイン

T F PにC D 3ガンマ、デルタ、またはイプシロンポリペプチドが含まれている場合、T F Pの細胞質ドメインが細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。T C Rアルファ及びT C Rベータサブユニットは概してシグナル伝達ドメインを含まない。細胞内シグナル伝達ドメインは概して、T F Pが導入されている免疫細胞の少なくとも1つの正常なエフェクター機能の活性化に關与する。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特別な機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達して、特別な機能を実行するように細胞を誘導するタンパク質の部分の部分を指す。通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を利用できるが、多くの場合、その鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮部分を使用する場合には、そのような短縮部分がエフェクター機能シグナルを伝達する限り、それをインタクトな鎖の代わりに使用してもよい。したがって、細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの任意の短縮部分を含むものとする。

10

【0157】

本開示のT F Pに使用される細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するために協調して作用するT細胞受容体(T C R)と共受容体の細胞質配列、ならびにその配列の任意の誘導体またはバリエーション、及び同じ機能的な能力を有する任意の組換え配列が挙げられる。

20

【0158】

T C R単独で生成されたシグナルは、ナイーブT細胞の完全な活性化には不十分であり、二次的及び/または共刺激的なシグナルを必要とすることが知られている。したがって、T細胞活性化は、2つのクラスの異なる細胞質シグナル伝達配列、すなわちT C Rを介して抗原依存性の一次活性化を開始するもの(一次細胞内シグナル伝達配列)と、抗原に依存せずに作用して、二次的または共刺激的なシグナルをもたらすもの(二次細胞質ドメイン、例えば共刺激ドメイン)によって媒介されるといってよい。

【0159】

一次シグナル伝達ドメインは、刺激的方法または阻害的方法のいずれかで、T C R複合体の一次活性化を調節する。刺激的方法で作用する一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(I T A M)として知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。

30

【0160】

本開示で特に有用な、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むI T A Mの例としては、C D 3ゼータ、F c Rガンマ、F c Rベータ、C D 3ガンマ、C D 3デルタ、C D 3イプシロン、C D 5、C D 22、C D 79 a、C D 79 b、及びC D 66 dのものが挙げられる。一実施形態では、本開示のT F Pは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばC D 3イプシロンの一次シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、改変I T A Mドメイン、例えば天然のI T A Mドメインと比較して、活性が変化(例えば、増加または減少)している変異型I T A Mドメインを含む。一実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、改変I T A Mを含む一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、最適化及び/または短縮されたI T A Mを含む一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれより多いI T A Mモチーフを含む。

40

【0161】

T F Pの細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3ゼータシグナル伝達ドメインを単独で含んでも、または本開示のT F Pの文脈において有用である任意の他の望ましい細胞内シグナル伝達ドメイン(複数可)と組み合わせてもよい。例えば、T F Pの細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3イプシロン鎖部分及び共刺激シグナル伝達ドメインを含み得る。共刺激シグナル伝達ドメインとは、共刺激分子の細胞内ドメインを含むT F Pの一部を

50

指す。共刺激分子は、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。そのような分子の例として、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKGC、B7-H3、及びCD83に特異的に結合するリガンドなどが挙げられる。例えば、CD27共刺激は、*in vitro*でのヒトTFP-T細胞の増殖、エフェクター機能、及び生存性を増強すること、*in vivo*でのヒトT細胞の持続性と抗腫瘍活性を増大することが実証されている(Song et al. Blood. 2012; 119(3): 696-706)。

【0162】

本開示のTFPの細胞質部分内の細胞内シグナル伝達配列は、ランダムな順序または指定された順序で互いに連結することができる。場合により、例えば、長さが2~10アミノ酸(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸)である短いオリゴリンカーまたはポリペプチドリンカーによって、細胞内シグナル伝達配列間の結合が形成されてもよい。

【0163】

一実施形態では、適切なリンカーとしてグリシン-セリンダブレットを使用することができる。一実施形態では、適切なリンカーとして単一のアミノ酸、例えばアラニン、グリシンを使用することができる。

【0164】

一態様では、本明細書に記載のTFP発現細胞は、例えば同じ標的(CD19またはBCMA)または異なる標的(例えばCD123)に対する第2のTFP、例えば異なる抗原結合ドメインを含む第2のTFPをさらに含み得る。一実施形態では、TFP発現細胞が2つ以上の異なるTFPを含む場合、異なるTFPの抗原結合ドメインは、各抗原結合ドメインが互いに相互作用しないようなものであり得る。例えば、第1及び第2のTFPを発現する細胞は、第1のTFPの抗原結合ドメインを、例えば、第2のTFPの抗原結合ドメインと会合を形成しない断片、例えばscFvとして有することができ、例えば第2のTFPの抗原結合ドメインはV_{HH}である。

【0165】

別の態様では、本明細書に記載のTFP発現細胞は、別の作用物質、例えば改変T細胞の活性を増強する作用物質をさらに発現することができる。例えば、一実施形態では、作用物質は抑制分子を阻害する作用物質であり得る。抑制分子、例えばPD1は、いくつかの実施形態では、改変T細胞が免疫エフェクター応答を高める能力を低下させることができる。抑制分子の例として、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、及びTGFRベータが挙げられる。一実施形態では、抑制分子を阻害する作用物質は、陽性シグナルを細胞、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインに供給する第2のポリペプチドに会合した第1のポリペプチド、例えば抑制分子を含む。一実施形態では、作用物質は、第1のポリペプチド、例えば、PD1、LAG3、CTLA4、CD160、BTLA、LAIR1、TIM3、2B4、及びTIGITなどの抑制分子、またはそれらのいずれかの断片(例えば、これらのいずれかの細胞外ドメインの少なくとも一部)のものと、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメイン(例えば、本明細書に記載の4-1BB、CD27、またはCD28)及び/または、一次シグナル伝達ドメイン(例えば、本明細書に記載のCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)を含む)である第2のポリペプチドとを含む。一実施形態では、作用物質は、PD1の第1のポリペプチドまたはその断片(例えば、PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部)と、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、本明細書に記載のCD28シグナル伝達ドメイン、及び/または本明細書に記載のCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)である第2のポリペプチドとを含む。PD1は、CD28、CTLA-4、ICOS、及びBTLAも含む受容体のCD28ファミリーの抑制性メンバーである。PD-1は、活性化B細胞、

10

20

30

40

50

T細胞、及び骨髄細胞に発現する (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8: 765-75)。PD1に対する2つのリガンドであるPD-L1及びPD-L2は、PD1への結合時、T細胞の活性化を下方制御することが示されている (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192: 1027-34、Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2: 261-8、Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32: 634-43)。PD-L1は、ヒトがんにおいて豊富である (Dong et al. 2003 J Mol Med 81: 281-7、Blank et al. 2005 Cancer Immunol Immunother 54: 307-314、Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10: 5094)。PD1とPD-L1との局所的相互作用を阻害することによって免疫抑制を逆転することができる。

10

【0166】

一実施形態では、作用物質は抑制分子の細胞外ドメイン (ECD) を含み、例えばプログラム死1 (PD1) を、膜貫通ドメイン及び場合により41BB及びCD3ゼータなどの細胞内シグナル伝達ドメインと融合することができる (本明細書ではPD1 TFPとも称する)。一実施形態では、PD1 TFPは、本明細書に記載の抗CD19 TFPと組み合わせて使用すると、T細胞の持続性が改善する。一実施形態では、TFPは、PD1の細胞外ドメインを含むPD1 TFPである。あるいは、プログラム死リガンド1 (PD-L1) またはプログラム死リガンド2 (PD-L2) に特異的に結合するscFvなどの抗体または抗体断片を含むTFPを提供する。

20

【0167】

別の態様では、本開示は、TFP発現T細胞、例えばTFP-T細胞の集団を提供する。いくつかの実施形態では、TFP発現T細胞の集団は、異なるTFPを発現する細胞の混合物を含む。例えば、一実施形態では、TFP-T細胞の集団は、本明細書に記載の抗CD19または抗BCMA結合ドメインを有するTFPを発現する第1の細胞と、異なる抗CD19または抗BCMA結合ドメイン、例えば第1の細胞によって発現されるTFP内の抗CD19結合ドメインとは異なる本明細書に記載の抗CD19または抗BCMA結合ドメインを有するTFPを発現する第2の細胞とを含み得る。別の例として、TFP発現細胞の集団は、例えば本明細書に記載されるような抗CD19または抗BCMA結合ドメインを含むTFPを発現する第1の細胞と、CD19またはBCMA以外の標的 (例えば、別の腫瘍関連抗原) に対する抗原結合ドメインを含むTFPを発現する第2の細胞とを含み得る。

30

【0168】

別の態様では、本開示は、集団内の少なくとも1つの細胞が本明細書に記載の抗CD19または抗BCMAドメインを有するTFPを発現する細胞の集団と、別の作用物質、例えば改変T細胞の活性を増強する作用物質を発現する第2の細胞とを提供する。例えば、一実施形態では、作用物質は抑制分子を阻害する作用物質であり得る。抑制分子、例えば、いくつかの実施形態では、改変T細胞が免疫エフェクター応答を高める能力を低下させることができる。抑制分子の例として、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、及びTGFRベータが挙げられる。一実施形態では、抑制分子を阻害する作用物質は、第1のポリペプチド、例えば抑制分子を、陽性シグナルを細胞、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインに供給する第2のポリペプチドに会合して含む。

40

【0169】

本明細書では、TFPをコードする、in vitro転写したRNAの作製方法を開示する。また、本開示は、細胞に直接トランスフェクトすることができる、TFPをコードするRNA構築物も含む。トランスフェクションに用いるmRNAの作製方法には、特別に設計したプライマーによる鋳型のin vitro転写 (IVT) と、それに続くポリAの付加を伴い、3'及び5'非翻訳配列 (「UTR」)、5'キャップ、及び/また

50

は配列内リボソーム進入部位 (IRES)、発現される核酸、ならびに典型的には50 ~ 2000塩基長のポリA尾部を含む構築物を産生することができる。そのようにして産生されたRNAは、異なる種類の細胞を効率的にトランスフェクトすることができる。一態様では、鑄型はTFPに対する配列を含む。

【0170】

一態様では、抗CD19または抗BCMA TFPは、メッセンジャーRNA (mRNA) によってコードされる。一態様では、抗CD19または抗BCMA TFPをコードするmRNAは、T細胞に導入されて、TFP-T細胞を産生する。一実施形態では、in vitro転写したRNA TFPは、一過性トランスフェクションの形態で細胞に導入することができる。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 生成鑄型を用いた in vitro転写によって産生される。任意の供給源からの対象となるDNAをPCRによって鑄型に直接変換し、適切なプライマー及びRNAポリメラーゼを使用した in vitro mRNA合成を行うことができる。DNA源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列、または任意の他の適切なDNA源であり得る。in vitro転写用の望ましい鑄型は、本開示のTFPである。一実施形態では、PCRに使用されるDNAはオープンリーディングフレームを含む。このDNAは、生物のゲノム由来の天然に存在するDNA配列由来であってもよい。一実施形態では、核酸は、5'及び/または3'非翻訳領域 (UTR) の一部またはすべてを含み得る。核酸は、エキソン及びイントロンを含み得る。一実施形態では、PCRに使用されるDNAはヒト核酸配列である。別の実施形態では、PCRに使用されるDNAは、5'及び3'UTRを含むヒト核酸配列である。あるいは、DNAは、天然に存在する生物では通常発現しない人工DNA配列であってもよい。例示的な人工DNA配列は、ひとつにライゲーションされて、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成する遺伝子部分を含むものである。ひとつにライゲーションされるDNAの部分は、単一の生物または複数の生物由来であり得る。

【0171】

PCRは、トランスフェクションに使用される、mRNAのin vitro転写用の鑄型を作製するために使用される。PCRの実施方法は、当技術分野において周知である。PCRに使用されるプライマーは、PCR用の鑄型として使用されるDNAの領域に対して実質的に相補的である領域を有するように設計される。本明細書で使用される場合、「実質的に相補的」とは、プライマー配列中の塩基の大半もしくはすべてが相補的であるか、または1つ以上の塩基が非相補的もしくは不一致である、ヌクレオチドの配列を指す。実質的に相補的な配列は、PCRに使用されるアニール条件下で、意図したDNA標的とアニールまたはハイブリダイズすることができる。プライマーは、DNA鑄型の任意の部分に対して実質的に相補的であるように設計することができる。例えば、5'及び3'UTRを含む、細胞内で通常転写される核酸の一部 (オープンリーディングフレーム) を増幅するようにプライマーを設計することができる。また、対象となる特定のドメインをコードする核酸の一部を増幅するようにプライマーを設計することもできる。一実施形態では、プライマーは、5'及び3'UTRの全体または一部を含む、ヒトcDNAのコード領域を増幅するように設計される。PCRに有用なプライマーは、当技術分野において周知である合成法によって作製することができる。「フォワードプライマー」とは、増幅させようとするDNA配列の上流である、DNA鑄型上のヌクレオチドに対して実質的に相補的であるヌクレオチドの領域を含むプライマーである。本明細書で使用される「上流」とは、コード鎖に対して、増幅させようとするDNA配列の5'位を指す。「リバースプライマー」とは、増幅させようとするDNA配列の下流である、二本鎖DNA鑄型に対して実質的に相補的であるヌクレオチドの領域を含むプライマーである。本明細書で使用される「下流」とは、コード鎖と相対して増幅されるDNA配列の3'位を指す。

【0172】

PCRに有用なDNAポリメラーゼのいずれをも、本明細書で開示される方法に使用することができる。試薬及びポリメラーゼは、いくつかの供給元から市販されている。

【0173】

安定性及び/または翻訳効率を高める能力を有する化学構造体を使用することもできる。RNAは5'及び3'UTRを有することが好ましい。一実施形態では、5'UTRは1~3000ヌクレオチド長である。コード領域に付加される5'及び3'UTR配列の長さは、様々な方法によって変化させることができ、この方法には、UTRの別の領域とアニールするPCR用プライマーの設計を含むが、これに限定されない。この手法を用いて、当業者は、転写RNAのトランスフェクト後に最適な翻訳効率を達成するために必要とされる5'及び3'UTRの長さを変更することができる。

【0174】

5'及び3'UTRは、対象となる核酸の天然に存在する内因性5'及び3'UTRであり得る。あるいは、UTR配列をフォワードプライマー及びリバースプライマーに組み込むことによって、または鋳型の他の何らかの改変によって、対象となる核酸に内在しないUTR配列を付加することができる。対象となる核酸に内在しないUTR配列の使用は、RNAの安定性及び/または翻訳効率の変更に有用であり得る。例えば、3'UTR配列中のAUリッチエレメントはmRNAの安定性を低下させ得ることが知られている。したがって、当技術分野において周知であるUTRの特性に基づいて、転写RNAの安定性を高めるように3'UTRを選択または設計することができる。

【0175】

一実施形態では、5'UTRは内因性核酸のコザック配列を含み得る。あるいは、対象となる核酸に内在しない5'UTRを上記のようにPCRによって付加すると、5'UTR配列の付加によりコンセンサスコザック配列を再設計することができる。コザック配列は、いくつかのRNA転写物の翻訳効率を高めることができるが、効率的な翻訳を可能にするためにRNAすべてに必要であるとは思われない。多くのmRNAにコザック配列が必要であることは、当技術分野において公知である。他の実施形態では、5'UTRは、RNAゲノムが細胞内で安定であるRNAウイルスの5'UTRである。他の実施形態では、mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨げるために、様々なヌクレオチド類似体を3'または5'UTRに使用することができる。

【0176】

遺伝子クローニングを必要とせずにDNA鋳型からのRNAの合成を可能にするには、転写される配列の上流でDNA鋳型に転写プロモーターが結合される必要がある。RNAポリメラーゼに対するプロモーターとして機能する配列をフォワードプライマーの5'末端に付加すると、RNAポリメラーゼプロモーターが、転写させようとするオープンリーディングフレームの上流でPCR産物に組み込まれるようになる。好ましい一実施形態では、プロモーターは、本明細書の他の箇所に記載したようなT7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターとしては、T3及びSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。T7、T3、及びSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は当技術分野において公知である。

【0177】

いくつかの実施形態では、mRNAは5'末端のキャップ及び3'ポリ(A)尾部の両方を有し、これらガリボソーム結合、翻訳の開始、及び細胞でのmRNA安定性を決定する。環状DNA鋳型、例えばプラスミドDNA上では、RNAポリメラーゼは、真核細胞での発現に適さない長いコンカテマー産物を産生する。3'UTRの末端での線状プラスミドDNAの転写では、通常サイズのmRNAが得られるが、これは転写後にポリアデニル化されても、真核生物のトランスフェクションに有効ではない。

【0178】

線状DNA鋳型では、ファージT7 RNAポリメラーゼは、鋳型の最終塩基を越えて転写物の3'末端を伸長させることができる(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13: 6223-36 (1985)、Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270: 1485-65 (2003))。

10

20

30

40

50

【0179】

DNA 鋳型にポリA/Tストレッチを組み込む従来の方法は分子クローニングである。しかしながら、プラスミドDNAに組み込まれたポリA/T配列はプラスミドの不安定化を引き起こす恐れがあり、このことが、細菌細胞から得たプラスミドDNA鋳型に欠失及び他の異常がしばしば高頻度で混入する理由となっている。そのため、クローニング手順が面倒で時間がかかるだけでなく、信頼性も損なわれる場合が多い。このような理由から、ポリA/T 3'ストレッチを有するDNA鋳型の構築をクローニングなしで可能にする方法が待望されている。

【0180】

転写DNA鋳型のポリA/Tセグメントは、PCR時にポリT尾部、例えば100Tの尾部（サイズは50～5000Tであり得る）などを含むリバースプライマーを使用することによって、またはPCR後に、DNAライゲーションもしくは*in vitro*組換えを含むが、これらに限定されない他の任意の方法によって産生することができる。ポリ(A)尾部はまた、RNAに安定性をもたらし、その分解も低下させる。一般に、ポリ(A)尾部の長さは、転写RNAの安定性と正の相関関係にある。一実施形態では、ポリ(A)尾部は100～5000個のアデノシンである。

10

【0181】

RNAのポリ(A)尾部は、*in vitro*転写後に、ポリ(A)ポリメラーゼ、例えば*E. coli*ポリAポリメラーゼ(E-PAP)などの使用により、さらに伸長させることができる。一実施形態では、ポリ(A)尾部の長さを100ヌクレオチドから300～400ヌクレオチドへと増やすことにより、RNAの翻訳効率が約2倍増加する。さらに、異なる化学基を3'末端に結合して、mRNAの安定性を高めることができる。このような結合部は、修飾/人工ヌクレオチド、アダプター、及び他の化合物を含み得る。例えば、ATP類似体をポリ(A)ポリメラーゼを用いてポリ(A)尾部に組み込むことができる。ATP類似体は、RNAの安定性をさらに高めることができる。

20

【0182】

5'キャップもまた、RNA分子に安定性を与える。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法により産生されるRNAは5'キャップを含む。5'キャップは、当技術分野において公知であって本明細書に記載される技術を使用して付与される(Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29: 436-444 (2001)、Stepinski, et al., *RNA*, 7: 1468-95 (2001)、Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330: 958-966 (2005))。

30

【0183】

本明細書に開示される方法により産生されるRNAはまた、配列内リボソーム進入部位(IRES)配列も含み得る。IRES配列は、mRNAに対するキャップ非依存的なりボソーム結合を開始させて、翻訳開始を容易にする、任意のウイルス配列、染色体配列、または人工的に設計された配列であってよい。細胞透過性及び生存可能性を促進する因子、例えば糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤、及び界面活性剤などを含有し得る、細胞エレクトロポレーションに適した任意の溶質を含んでもよい。

40

【0184】

RNAは、いくつかの様々な方法のいずれか、例えば、エレクトロポレーション(Amaxa Nucleofector (登録商標) - II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)、またはGene Pulser (登録商標) II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (登録商標) (Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを用いるカチオン性リボソーム媒介性トランスフェクション、ポリマーカプセル封入、ペプチド媒介性トランスフェクション、または「遺伝子銃」などのバイオリスティック粒子送達システムを含むが、これらに限定されない市販の方法を用いて、標的細

50

胞に導入することができる(例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8): 861-70(2001を参照)。

【0185】

TFP及びTCR定常ドメインをコードする組換え核酸

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)(i)(1)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(2)膜貫通ドメイン、及び(3)CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むTCRサブユニットと、(ii)抗原結合ドメインを含むヒト抗体またはヒト化抗体とを含む、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)をコードする配列と、(b)TCR定常ドメインをコードする配列とを含み、TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、またはTCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメインであり、TCRサブユニット及び抗体は機能的に連結されており、かつT細胞で発現するとTFPがTCR複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸である。

10

【0186】

場合によっては、T細胞で発現すると、TCR定常ドメインは機能的TCR複合体に組み込まれる。場合によっては、TCR定常ドメインは、T細胞で発現するとTFPを組み込む機能的TCR複合体と同じ機能的TCR複合体に組み込まれる。場合によっては、TFPをコードする配列とTCR定常ドメインをコードする配列とは、同じ核酸分子内に含まれている。場合によっては、TFPをコードする配列とTCR定常ドメインをコードする配列とは、異なる核酸分子内に含まれている。

20

【0187】

場合によっては、TCRサブユニットと、抗体ドメイン、抗原ドメイン、もしくは結合リガンド、またはそれらの断片とは、リンカー配列によって機能的に連結されている。場合によっては、リンカー配列は $(G4S)_n$ (式中、 $n=1\sim 4$)を含む。

【0188】

場合によっては、膜貫通ドメインは、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータからのTCR膜貫通ドメインである。場合によっては、細胞内ドメインは、CD3イプシロンのみ、CD3ガンマのみ、CD3デルタのみ、TCRアルファのみ、またはTCRベータのみに由来する。

30

【0189】

場合によっては、TCRサブユニットは、(i)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(ii)TCR膜貫通ドメイン、及び(iii)TCR細胞内ドメインを含み、(i)、(ii)、及び(iii)のうち少なくとも2つは同じTCRサブユニット由来である。

【0190】

場合によっては、TCR細胞外ドメインは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の細胞外ドメインまたはその一部を含む。

40

【0191】

場合によっては、TCRサブユニットは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、TCRゼータ鎖、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。

【0192】

50

場合によっては、TCRサブユニットは、CD3イプシロン、CD3ガンマ、またはCD3デルタの細胞内シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含むTCR細胞内ドメインを含む。

【0193】

場合によっては、TCRサブユニットは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメイン及び/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含む細胞内ドメインを含む。

【0194】

場合によっては、組換え核酸は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、共刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、及び4-1BB(CD137)、ならびに少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【0195】

場合によっては、TCRサブユニットは、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、TCRゼータ鎖、Fcイプシロン受容体1鎖、Fcイプシロン受容体2鎖、Fcガンマ受容体1鎖、Fcガンマ受容体2a鎖、Fcガンマ受容体2b1鎖、Fcガンマ受容体2b2鎖、Fcガンマ受容体3a鎖、Fcガンマ受容体3b鎖、Fcベータ受容体1鎖、TYROBP(DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)またはその一部を含む、TCRサブユニットITAMを含む。場合によっては、ITAMは、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはCD3イプシロンのITAMを置換する。場合によっては、ITAMは、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択され、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択される別のITAMを置換する。

【0196】

場合によっては、TFP、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性TCR複合体及び/または少なくとも1つの内因性TCRポリペプチドと機能的に相互作用することができる。場合によっては、(a)TCR定常ドメインがTCRアルファ定常ドメインであり、TCRベータ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合されるか、(b)TCR定常ドメインがTCRベータ定常ドメインであり、TCRアルファ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合されるか、あるいは(c)TCR定常ドメインがTCRアルファ定常ドメインであり、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合される。

【0197】

場合によっては、上記の、それに対して少なくとも1つだが20以下の修飾は、細胞シグナル伝達を媒介するアミノ酸の修飾、またはTFPへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の修飾を含む。

【0198】

場合によっては、ヒト抗体またはヒト化抗体は抗体断片である。場合によっては、抗体

10

20

30

40

50

断片は、 $s c F v$ 、単ドメイン抗体ドメイン、 V_H ドメイン、または V_L ドメインである。場合によっては、抗原結合ドメインを含むヒト抗体またはヒト化抗体は、抗CD19結合ドメイン、抗B細胞成熟抗原(BCMA)結合ドメイン、抗メソテリン(MSLN)結合ドメイン、抗CD22結合ドメイン、抗PD-1結合ドメイン、抗BAFFまたはBAFF受容体結合ドメイン、及び抗ROR-1結合ドメインからなる群から選択される。

【0199】

場合によっては、核酸は、DNA及びRNAからなる群から選択される。場合によっては、核酸はmRNAである。場合によっては、組換え核酸は核酸類似体を含み、この核酸類似体は組換え核酸のコード配列にはない。場合によっては、核酸類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、ロックド核酸(LNA)、エチレン核酸(ENA)、ペプチド核酸(PNA)、1',5'-アンヒドロヘキシトール核酸(HNA)、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、及び2'-フルオロN3-P5'-ホスホロアミダイトからなる群から選択される。

10

【0200】

場合によっては、組換え核酸はリーダー配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸はプロモーター配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸はポリ(A)尾部をコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は3'UTR配列をさらに含む。場合によっては、核酸は、単離された核酸または天然に存在しない核酸である。場合によっては、核酸は*in vitro*転写した核酸である。

20

【0201】

場合によっては、組換え核酸は、TCRアルファ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は、TCRベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は、TCRアルファ膜貫通ドメインをコードする配列及びTCRベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。

【0202】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a)(i)(1)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(2)膜貫通ドメイン、及び(3)CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むTCRサブユニットと、(ii)抗体またはその断片に結合できる結合リガンドまたはその断片とを含む、T細胞受容体(TCR)融合タンパク質(TFP)をコードする配列と、(b)TCR定常ドメインをコードする配列とを含み、TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、またはTCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメインであり、TCRサブユニット及び結合リガンドまたはその断片が機能的に連結されており、かつT細胞で発現するとTFPがTCR複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸である。場合によっては、結合リガンドは、抗体のFcドメインと結合できる。場合によっては、結合リガンドは、IgG1抗体と選択的に結合できる。場合によっては、結合リガンドは、IgG1抗体と特異的に結合できる。場合によっては、抗体またはその断片は細胞表面抗原に結合する。場合によっては、抗体またはその断片は腫瘍細胞の表面にある細胞表面抗原に結合する。場合によっては、結合リガンドは、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体を含む。場合によっては、結合リガンドは抗体またはその断片を含まない。場合によっては、結合リガンドはCD16ポリペプチドまたはその断片を含む。場合によっては、結合リガンドはCD16結合ポリペプチドを含む。場合によっては、結合リガンドはヒトのものであるか、またはヒト化されている。場合によっては、組換え核酸は、結合リガンドが結合できる抗体または

30

40

50

その断片をコードする核酸配列をさらに含む。場合によっては、抗体またはその断片は細胞から分泌できる。

【0203】

場合によっては、TCR定常ドメインは、T細胞で発現すると、機能的TCR複合体に組み込まれる。場合によっては、TCR定常ドメインは、T細胞で発現するとTFPを組み込む機能的TCR複合体と同じ機能的TCR複合体に組み込まれる。場合によっては、TFPをコードする配列とTCR定常ドメインをコードする配列とは、同じ核酸分子内に含まれている。場合によっては、TFPをコードする配列とTCR定常ドメインをコードする配列とは、異なる核酸分子内に含まれている。

【0204】

場合によっては、TCRサブユニットと、抗体ドメイン、抗原ドメイン、もしくは結合リガンド、またはそれらの断片は、リンカー配列によって機能的に連結されている。場合によっては、リンカー配列は $(G_4S)_n$ (式中、 $n = 1 \sim 4$)を含む。

【0205】

場合によっては、膜貫通ドメインは、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータからのTCR膜貫通ドメインである。場合によっては、細胞内ドメインは、CD3イプシロンのみ、CD3ガンマのみ、CD3デルタのみ、TCRアルファのみ、またはTCRベータのみに由来する。

【0206】

場合によっては、TCRサブユニットは、(i)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(ii)TCR膜貫通ドメイン、及び(iii)TCR細胞内ドメインを含み、(i)、(ii)、及び(iii)のうち少なくとも2つは同じTCRサブユニット由来である。

【0207】

場合によっては、TCR細胞外ドメインは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の細胞外ドメインまたはその一部を含む。

【0208】

場合によっては、TCRサブユニットは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、TCRゼータ鎖、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。

【0209】

場合によっては、TCRサブユニットは、CD3イプシロン、CD3ガンマ、またはCD3デルタの細胞内シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含むTCR細胞内ドメインを含む。

【0210】

場合によっては、TCRサブユニットは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメイン及び/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含む細胞内ドメインを含む。

【0211】

場合によっては、組換え核酸は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、共刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、IC

10

20

30

40

50

AM - 1、LFA - 1 (CD 11 a / CD 18)、ICOS (CD 278)、及び4 - 1 BB (CD 137)、ならびに少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【0212】

場合によっては、TCRサブユニットは、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、TCRゼータ鎖、Fcイプシロン受容体1鎖、Fcイプシロン受容体2鎖、Fcガンマ受容体1鎖、Fcガンマ受容体2a鎖、Fcガンマ受容体2b1鎖、Fcガンマ受容体2b2鎖、Fcガンマ受容体3a鎖、Fcガンマ受容体3b鎖、Fcベータ受容体1鎖、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) またはその一部を含む、TCRサブユニットのITAMを含む。場合によっては、ITAMは、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはCD3イプシロンのITAMを置換する。場合によっては、ITAMは、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択され、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択される別のITAMを置換する。

10

20

【0213】

場合によっては、TFP、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性TCR複合体及び/または少なくとも1つの内因性TCRポリペプチドと機能的に相互作用することができる。場合によっては、(a) TCR定常ドメインがTCRアルファ定常ドメインであり、TCRベータ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合されるか、(b) TCR定常ドメインがTCRベータ定常ドメインであり、TCRアルファ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合されるか、あるいは(c) TCR定常ドメインがTCRアルファ定常ドメイン及びTCRベータ定常ドメインであり、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合される。

30

【0214】

場合によっては、上記の、それに対して少なくとも1つだが20以下の修飾は、細胞シグナル伝達を媒介するアミノ酸の修飾、またはTFPへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の修飾を含む。

【0215】

場合によっては、ヒト抗体またはヒト化抗体は抗体断片である。場合によっては、抗体断片は、scFv、単ドメイン抗体ドメイン、V_Hドメイン、またはV_Lドメインである。場合によっては、抗原結合ドメインを含むヒト抗体またはヒト化抗体は、抗CD19結合ドメイン、抗B細胞成熟抗原 (BCMA) 結合ドメイン、抗メソテリン (MSLN) 結合ドメイン、抗CD22結合ドメイン、抗PD - 1結合ドメイン、抗BAFF結合ドメイン、及び抗ROR - 1結合ドメインからなる群から選択される。

40

【0216】

場合によっては、核酸は、DNA及びRNAからなる群から選択される。場合によっては、核酸はmRNAである。場合によっては、組換え核酸は核酸類似体を含み、この核酸類似体は組換え核酸のコード配列にはない。場合によっては、核酸類似体は、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル (2' - O - MOE)、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル (2' - O

50

- A P)、2' - O - ジメチルアミノエチル (2' - O - D M A O E)、2' - O - ジメチルアミノプロピル (2' - O - D M A P)、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' - O - D M A E O E)、2' - O - N - メチルアセトアミド (2' - O - N M A) 修飾、ロックド核酸 (L N A)、エチレン核酸 (E N A)、ペプチド核酸 (P N A)、1' , 5' - アンヒドロヘキシトール核酸 (H N A)、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、及び2' - フルオロ N 3 - P 5' - ホスホリアミダイトからなる群から選択される。

【 0 2 1 7 】

場合によっては、組換え核酸はリーダー配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸はプロモーター配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸はポリ (A) 尾部をコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は3' U T R 配列をさらに含む。場合によっては、核酸は、単離された核酸または天然に存在しない核酸である。場合によっては、核酸は *in vitro* 転写した核酸である。

10

【 0 2 1 8 】

場合によっては、組換え核酸は、T C R アルファ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は、T C R ベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は、T C R アルファ膜貫通ドメインをコードする配列及びT C R ベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。あるいは、組換え核酸は、T C R ガンマドメインまたはT C R デルタドメイン、例えば膜貫通ドメインをコードする配列を含む。

20

【 0 2 1 9 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a) (i) (1) T C R 細胞外ドメインの少なくとも一部、(2) 膜貫通ドメイン、及び(3) C D 3 イプシロン、C D 3 ガンマ、C D 3 デルタ、T C R アルファ、またはT C R ベータの細胞内シグナル伝達ドメインからの刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むT C R サブユニットと、(i i) 細胞の表面に発現する受容体またはポリペプチドに結合するリガンドまたはその断片を含む抗原ドメインとを含む、T 細胞受容体 (T C R) 融合タンパク質 (T F P) をコードする配列と、(b) T C R 定常ドメインをコードする配列とを含み、T C R 定常ドメインは、T C R アルファ定常ドメイン、T C R ベータ定常ドメイン、またはT C R アルファ定常ドメインとT C R ベータ定常ドメインであり、T C R サブユニット及び抗原ドメインは機能的に連結されており、かつT 細胞で発現するとT F P がT C R 複合体に機能的に組み込まれる、組換え核酸である。場合によっては、抗原ドメインはリガンドを含む。場合によっては、リガンドは細胞の受容体に結合する。場合によっては、リガンドは、細胞の表面に発現するポリペプチドに結合する。場合によっては、細胞の表面に発現する受容体またはポリペプチドは、ストレス応答受容体またはポリペプチドを含む。場合によっては、細胞の表面に発現する受容体またはポリペプチドは、M H C クラス I 関連糖タンパク質である。場合によっては、M H C クラス I 関連糖タンパク質は、M I C A、M I C B、R A E T 1 E、R A E T 1 G、U L B P 1、U L B P 2、U L B P 3、U L B P 4、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。場合によっては、抗原ドメインは、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体を含む。場合によっては、抗原ドメインは、リガンドまたはその断片の単量体または二量体を含む。場合によっては、リガンドまたはその断片は、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体を含む。場合によっては、リガンドまたはその断片は単量体または二量体である。場合によっては、抗原ドメインは抗体またはその断片を含まない。場合によっては、抗原ドメインは可変領域を含まない。場合によっては、抗原ドメインはC D R を含まない。場合によっては、リガンドまたはその断片は、ナチュラルキラーグループ 2 D (N K G 2 D) リガンドまたはその断片である。

30

40

【 0 2 2 0 】

場合によっては、T C R 定常ドメインは、T 細胞で発現すると、機能的T C R 複合体に

50

組み込まれる。場合によっては、TCR定常ドメインは、T細胞で発現するとTFPを組み込む機能的TCR複合体と同じ機能的TCR複合体に組み込まれる。場合によっては、TFPをコードする配列とTCR定常ドメインをコードする配列とは、同じ核酸分子内に含まれている。場合によっては、TFPをコードする配列とTCR定常ドメインをコードする配列とは、異なる核酸分子内に含まれている。

【0221】

場合によっては、TCRサブユニットと、抗体ドメイン、抗原ドメイン、もしくは結合リガンド、またはそれらの断片は、リンカー配列によって機能的に連結されている。場合によっては、リンカー配列は $(G4S)_n$ (式中、 $n = 1 \sim 4$)を含む。

【0222】

場合によっては、膜貫通ドメインは、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TCRアルファ、またはTCRベータからのTCR膜貫通ドメインである。場合によっては、細胞内ドメインは、CD3イプシロンのみ、CD3ガンマのみ、CD3デルタのみ、TCRアルファのみ、またはTCRベータのみに由来する。

【0223】

場合によっては、TCRサブユニットは、(i)TCR細胞外ドメインの少なくとも一部、(ii)TCR膜貫通ドメイン、及び(iii)TCR細胞内ドメインを含み、(i)、(ii)、及び(iii)のうち少なくとも2つは同じTCRサブユニット由来である。

【0224】

場合によっては、TCR細胞外ドメインは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の細胞外ドメインまたはその一部を含む。

【0225】

場合によっては、TCRサブユニットは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、TCRゼータ鎖、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む。

【0226】

場合によっては、TCRサブユニットは、CD3イプシロン、CD3ガンマ、またはCD3デルタの細胞内シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含むTCR細胞内ドメインを含む。

【0227】

場合によっては、TCRサブユニットは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメイン及び/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインから選択されるタンパク質の刺激ドメイン、またはそれらに対して少なくとも1つの修飾を有するアミノ酸配列を含む細胞内ドメインを含む。

【0228】

場合によっては、組換え核酸は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、共刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、及び4-1BB(CD137)、ならびに少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【0229】

10

20

30

40

50

場合によっては、TCRサブユニットは、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、CD3デルタTCRサブユニット、TCRゼータ鎖、Fcイプシロン受容体1鎖、Fcイプシロン受容体2鎖、Fcガンマ受容体1鎖、Fcガンマ受容体2a鎖、Fcガンマ受容体2b1鎖、Fcガンマ受容体2b2鎖、Fcガンマ受容体3a鎖、Fcガンマ受容体3b鎖、Fcベータ受容体1鎖、TYROBP(DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d、それらの機能的断片、及び少なくとも1つだが20以下の修飾を有するそのアミノ酸配列からなる群から選択される、タンパク質の免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)またはその一部を含む、TCRサブユニットのITAMを含む。場合によっては、ITAMは、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはCD3イプシロンのITAMを置換する。場合によっては、ITAMは、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択され、CD3ゼータTCRサブユニット、CD3イプシロンTCRサブユニット、CD3ガンマTCRサブユニット、及びCD3デルタTCRサブユニットからなる群から選択される別のITAMを置換する。

10

【0230】

場合によっては、TFP、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、及びそれらの任意の組み合わせは、内因性TCR複合体及び/または少なくとも1つの内因性TCRポリペプチドと機能的に相互作用することができる。場合によっては、(a) TCR定常ドメインがTCRアルファ定常ドメインであり、TCRベータ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合されるか、(b) TCR定常ドメインがTCRベータ定常ドメインであり、TCRアルファ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合されるか、あるいは(c) TCR定常ドメインがTCRアルファ定常ドメイン及びTCRベータ定常ドメインであり、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、またはそれらの組み合わせの内因性サブユニットを含むTCR複合体にTFPが機能的に統合される。

20

【0231】

場合によっては、上記の、それに対して少なくとも1つだが20以下の修飾は、細胞シグナル伝達を媒介するアミノ酸の修飾、またはTFPへのリガンド結合に応答してリン酸化されるアミノ酸の修飾を含む。

30

【0232】

場合によっては、ヒト抗体またはヒト化抗体は抗体断片である。場合によっては、抗体断片は、scFv、単ドメイン抗体ドメイン、V_Hドメイン、またはV_Lドメインである。場合によっては、抗原結合ドメインを含むヒト抗体またはヒト化抗体は、抗CD19結合ドメイン、抗B細胞成熟抗原(BCMA)結合ドメイン、抗メソテリン(MSLN)結合ドメイン、抗CD22結合ドメイン、抗BAFF結合ドメイン、抗PD-1結合ドメイン、及び抗ROR-1結合ドメインからなる群から選択される。

40

【0233】

場合によっては、核酸は、DNA及びRNAからなる群から選択される。場合によっては、核酸はmRNAである。場合によっては、組換え核酸は核酸類似体を含み、この核酸類似体は組換え核酸のコード配列にはない。場合によっては、核酸類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、ロックド核酸(LNA)、エチレン核酸(ENA)、ペプチド核酸(PNA)、

50

1' , 5' - アンヒドロヘキシトール核酸 (H N A)、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、及び 2' - フルオロ N 3 - P 5' - ホスホロアミダイトからなる群から選択される。

【 0 2 3 4 】

場合によっては、組換え核酸はリーダー配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸はプロモーター配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸はポリ (A) 尾部をコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は 3' U T R 配列をさらに含む。場合によっては、核酸は、単離された核酸または天然に存在しない核酸である。場合によっては、核酸は *in vitro* 転写した核酸である。

【 0 2 3 5 】

場合によっては、組換え核酸は、T C R アルファ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は、T C R ベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。場合によっては、組換え核酸は、T C R アルファ膜貫通ドメインをコードする配列及び T C R ベータ膜貫通ドメインをコードする配列をさらに含む。

【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態において、本明細書にさらに開示されるのは、本明細書に開示される組換え核酸を含むベクターである。場合によっては、ベクターは、D N A、R N A、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター (A A V)、ラウス肉腫ウイルス (R S V) ベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群から選択される。場合によっては、ベクターは A A V 6 ベクターである。場合によっては、ベクターはプロモーターをさらに含む。場合によっては、ベクターは *in vitro* 転写したベクターである。

【 0 2 3 7 】

所望の分子をコードする核酸配列は、当技術分野において公知の組換え法を用いて、例えば、標準的な技術を使用して、遺伝子を発現する細胞のライブラリーをスクリーニングすることによって、遺伝子を含むことが既知であるベクターから遺伝子を誘導することによって、または遺伝子を含む細胞及び組織から直接単離することによって得ることができる。あるいは、対象となる遺伝子を、クローニングではなく合成的に作製することができる。

【 0 2 3 8 】

本開示は、本開示の D N A が挿入されたベクターも提供する。レンチウイルスなどのレトロウイルス由来のベクターは、導入遺伝子の長期間の安定した組み込み及び娘細胞へのその伝搬を可能にするため、長期間の遺伝子移入を実現するのに適したツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖細胞を形質導入することができるという点で、マウス白血病ウイルスなどのオンコレトロウイルス由来のベクターを上回る別の利点を有する。これらはまた、免疫原性が低いという別の利点を有する。

【 0 2 3 9 】

別の実施形態では、本開示の所望の T F P をコードする核酸を含むベクターは、アデノウイルスベクター (A 5 / 3 5) である。別の実施形態では、T F P をコードする核酸の発現は、スリーピングピューティ、クリスパー、C A S 9、及びジンクフィンガーヌクレアーゼなどのトランスポゾンを使用して達成することができる。参照により本明細書に組み込まれる、以下、J u n e e t a l . 2 0 0 9 N a t u r e R e v i e w s I m m u n o l o g y . 9 . 1 0 : 7 0 4 - 7 1 6 を参照のこと。

【 0 2 4 0 】

本開示の発現構築物はまた、標準的な遺伝子送達プロトコルを用いた、核酸免疫法及び遺伝子療法に使用することができる。遺伝子送達の方法は、当技術分野において公知である (例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 5 , 3 9 9 , 3 4 6 号、同第 5 , 5 8 0 , 8 5 9 号、同第 5 , 5 8 9 , 4 6 6 号を参照) 。別の実施形態では、本開示は遺伝子療法ベクターを提供する。

【 0 2 4 1 】

10

20

30

40

50

核酸は、いくつかの種類ベクターにクローニングすることができる。例えば、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス、及びコスミドを含むが、これらに限定されないベクターにクローニングすることができる。特に対象となるベクターとして、発現ベクター、複製ベクター、プロンプ生成ベクター、及び配列決定ベクターが挙げられる。

【0242】

さらに、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供されてもよい。ウイルスベクター技術は、当技術分野において周知であり、例えば Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY)、ならびに他のウイルス学及び分子生物学のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスとして、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及びレンチウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。一般に、好適なベクターには、少なくとも1種の生物において機能する複製起点、プロモーター配列、利便な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び1つ以上の選択マーカが含まれている(例えば、WO01/96584、WO01/29058、及び米国特許第6,326,193号)。

10

【0243】

哺乳動物細胞への遺伝子移入のための、ウイルスを用いた系がいくつか開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系に利便なプラットフォームを提供する。当技術分野で公知の技術を用いて、選抜された遺伝子をベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次いで、組換えウイルスを単離し、*in vivo*または*ex vivo*のいずれかで対象の細胞に送達することができる。いくつかのレトロウイルス系が、当技術分野において公知である。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターを使用する。いくつかのアデノウイルスベクターが、当技術分野において公知である。一実施形態では、レンチウイルスベクターを使用する。

20

【0244】

追加のプロモーターエレメント、例えばエンハンサーは転写開始の頻度を調節する。通常これは、開始部位の上流30~110bpの領域に位置するが、いくつかのプロモーターは開始部位の下流にも機能的エレメントを含むことが示されている。エレメントが互いに反転または移動するときにプロモーター機能が維持されるように、プロモーターエレメント間の間隔は柔軟であることが多い。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターでは、プロモーターエレメント間の間隔は、50bpの距離まで大きくすることができ、それ以降は活性が低下し始める。プロモーターによっては、転写を活性化するために、個々のエレメントを協働的に機能させることも、または独立して機能させることもできると思われる。

30

【0245】

哺乳動物のT細胞においてTFP導入遺伝子を発現することができるプロモーターの例は、EF1aプロモーターである。天然EF1aプロモーターは、アミノアシルtRNAのリボソームへの酵素的送達に関与する伸長因子1複合体のアルファサブユニットの発現を駆動する。EF1aプロモーターは、哺乳動物の発現プラスミドに広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローニングされた導入遺伝子からのTFP発現を駆動させるのに有効であることが示されている(例えば、Milone et al., Mol. Ther. 17(8):1453-1464(2009)を参照)。プロモーターの別の例は、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに機能的に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルな発現を駆動できる強力な構成的プロモーター配列である。ただし、他の構成的プロモーター配列も使用することができ、これには、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)長末端反復(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプス

40

50

タイン・パールウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびにアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、伸長因子1 aプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターなどであるが、それらに限定されないヒト遺伝子プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、本開示は、構成的プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターもまた、本開示の一部として企図される。誘導性プロモーターを使用すると、それが機能的に連結されているポリヌクレオチド配列の発現を、そのような発現が望ましい場合はオンにし、発現が望ましくない場合はオフにすることができる分子スイッチが得られる。誘導性プロモーターの例としては、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリン調節プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0246】

細胞に導入される発現ベクターはまた、TFPポリペプチドまたはその一部の発現を評価するために、ウイルスベクターを介してトランスフェクトまたは感染させようとする細胞集団からの発現細胞の同定及び選択を容易にする選択マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子のいずれかまたは両方を含むことができる。他の態様では、選択マーカーを個別のDNA片上に担持して、同時トランスフェクト手順に使用することができる。選択マーカーとレポーター遺伝子はいずれも、宿主細胞での発現ができる適切な調節配列と隣接させることができる。有用な選択マーカーとして、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子が挙げられる。

20

【0247】

レポーター遺伝子は、トランスフェクトされた可能性のある細胞を同定するため、及び調節配列の機能性を評価するために使用される。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物もしくは組織に存在しないか、またはそれらによって発現されない遺伝子であり、いくつかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性によって発現が顕在化されるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞に導入された後の適切な時点で評価される。適切なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子を含み得る(例えば、Ui-Tei et al., 2000 F E B S L e t t e r s 4 7 9 : 7 9 - 8 2)。適切な発現系は周知であり、公知の技術を用いて調製するか、または市販品を入手することができる。一般に、レポーター遺伝子の最大発現レベルを示す最小5'隣接領域をもつ構築物を、プロモーターとして同定する。そのようなプロモーター領域をレポーター遺伝子に連結することで、作用物質のプロモーター駆動性転写を調節する能力に関する評価に使用することができる。

30

【0248】

遺伝子を細胞に導入し発現させる方法は、当技術分野において公知である。発現ベクターの文脈において、当技術分野の任意の方法によって、宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母、または昆虫細胞にベクターを容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、または生物学的手段によって宿主細胞に移入することができる。

40

【0249】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法として、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが挙げられる。ベクター及び/または外因性核酸を含む細胞の産生方法は、当技術分野において周知である。例えば、Sambrook et al., 2012, M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , v o l u m e s 1 - 4 , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , N Yを参照のこと。ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための好ましい方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0250】

50

対象となるポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNAベクター及びRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えばヒト細胞への遺伝子挿入に最も幅広く使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI型、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る（例えば、米国特許第5,350,674号及び同第5,585,362号を参照のこと）。

【0251】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段としては、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフィア、ビーズ、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含む脂質ベース系などのコロイド分散系が挙げられる。in vitro及びin vivoでの送達ビヒクルとして使用される例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。標的化ナノ粒子またはその他の好適なサブミクロンサイズの送達系でのポリヌクレオチドの送達といった他の最先端の標的化核酸送達方法が利用可能である。

10

【0252】

非ウイルス送達系を利用する場合、例示的な送達ビヒクルはリポソームである。核酸の宿主細胞への導入（in vitro、ex vivo、またはin vivo）に脂質製剤の使用が企図されている。別の態様では、核酸は脂質と会合していてもよい。脂質と会合した核酸は、リポソームの水性内部に封入されてもよく、リポソームの脂質二重層内に散在させてもよく、リポソームとオリゴヌクレオチドの双方に会合した連結分子を介してリポソームに結合されてもよく、リポソームに内包されてもよく、リポソームと複合体化されてもよく、脂質を含有する溶液中に分散させてもよく、脂質と混合されてもよく、脂質と複合体化されてもよく、脂質中に懸濁液として含有されもよく、ミセルに含有されるかもしくはそれと複合体化されてもよく、またはそれ以外の方法で脂質と会合されてもよい。脂質、脂質/DNA、または脂質/発現ベクター会合組成物は、溶液中においていかなる特定の構造にも限定されない。例えば、それらは、二層構造で、ミセルとして、または「崩壊」構造で存在し得る。それらはまた、単に溶液中に散在していてもよく、場合によりサイズまたは形状が均一ではない凝集体を形成してもよい。脂質は脂肪物質であり、天然に存在する脂質または合成の脂質であり得る。例えば、脂質は、細胞質に天然に存在する脂肪滴、ならびに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドなどの長鎖脂肪族炭化水素及びその誘導体を含む化合物のクラスを含む。

20

30

【0253】

使用に適した脂質は、市販品の供給元から入手することができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma, St. Louis, MOから入手することができ、リン酸ジセチル（「DCP」）は、K&K Laboratories (Plainview, N.Y.)から入手することができ、コレステロール（「Choi」）は、Calbiochem-Behringから入手することができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）及びその他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.)から入手することができる。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質原液は、約-20で保存することができる。クロロホルムはメタノールよりも容易に蒸発するので、単独の溶媒としてはクロロホルムを使用する。「リポソーム」とは、封入脂質二重層または凝集体の生成によって形成される多様な単膜及び多重膜の脂質ビヒクルを包含する一般用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜及び内部水性媒体をもつ小胞構造を有することを特徴とし得る。多重膜リポソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。これは、リン脂質を過剰の水溶液中で懸濁させると自然に形成される。脂質成分は、自己再構成を受けた後、閉鎖構造を形成し、脂質二重層間に水及び溶解された溶質を取り込む（Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5:505-10）。しかしながら、通常の小胞構造とは異なる構造を溶液中で有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造をとることも、または単に脂質分子の不均一な凝集

40

50

体として存在することもできる。また、リポフェクタミン - 核酸複合体も企図される。

【0254】

外因性核酸の宿主細胞への導入に使用する方法、またはそれ以外の本開示の阻害剤への細胞の曝露に使用する方法を問わず、宿主細胞中の組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイを実施することができる。そのようなアッセイには、例えば、サザン及びノーザンブロッティング、RT-PCR、及びPCRなどの当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば免疫学的手段（ELISA及びウエスタンブロット）または本開示の範囲内にある薬剤の同定に関する本明細書に記載のアッセイによって、特定のペプチドの有無を検出するなどの「生化学的」アッセイが含まれる。

【0255】

本開示はTFPをコードする核酸分子を含むベクターをさらに提供する。一態様では、TFPベクターを細胞、例えばT細胞に直接形質導入することができる。一態様では、ベクターは、クローニングまたは発現ベクター、例えば1種以上のプラスミド（例えば、発現プラスミド、クローニングベクター、ミニサークル、ミニベクター、二重微小染色体）、レトロウイルス及びレンチウイルスのベクター構築物を含むがこれらに限定されないベクターである。一態様では、ベクターは、哺乳動物T細胞においてTFP構築物を発現することができる。一態様では、哺乳動物T細胞はヒトT細胞である。

【0256】

改変T細胞

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本明細書に開示される組換え核酸または本明細書に開示されるベクターを含む改変T細胞であり、当該改変T細胞は内因性TCRの機能的破壊を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのはまた、本明細書に開示される核酸のTFPをコードする配列、または本明細書に開示される核酸の配列によってコードされるTFPを含む改変T細胞であり、当該改変T細胞は内因性TCRの機能的破壊を含む。いくつかの実施形態において、本明細書にさらに開示されるのは、本明細書に開示されるTFPをコードする配列、または本明細書に開示される核酸の配列によってコードされるTFPを含む改変同種T細胞である。

【0257】

場合によっては、T細胞はTCR定常ドメインをコードする異種配列をさらに含み、当該TCR定常ドメインは、TCRアルファ定常ドメイン、TCRベータ定常ドメイン、またはTCRアルファ定常ドメインとTCRベータ定常ドメインである。場合によっては、機能的に破壊される内因性TCRは、内因性TCRアルファ鎖、内因性TCRベータ鎖、または内因性TCRアルファ鎖と内因性TCRベータ鎖である。場合によっては、機能的に破壊された内因性TCRは、未改変の対照T細胞のものと比較して、MHCペプチド複合体への結合が減少する。場合によっては、機能的破壊は、内因性TCRをコードする遺伝子の破壊である。場合によっては、内因性TCRをコードする遺伝子の破壊とは、T細胞のゲノム由来の内因性TCRをコードする遺伝子の配列の除去である。場合によっては、T細胞はヒトT細胞である。場合によっては、T細胞はCD8⁺T細胞またはCD4⁺T細胞である。場合によっては、T細胞は同種T細胞である。場合によっては、改変T細胞は、抑制分子の少なくとも一部を含む第1のポリペプチドを含む抑制分子をコードする核酸を、細胞内シグナル伝達ドメインからの陽性シグナルを含む第2のポリペプチドと会合して、さらに含む。場合によっては、抑制分子は、PD1の少なくとも一部を含む第1のポリペプチドと、共刺激ドメイン及び一次シグナル伝達ドメインを含む第2のポリペプチドとを含む。

【0258】

T細胞源

増殖及び遺伝子改変の前に、T細胞源を対象から採取する。「対象」という用語は、免疫応答を誘発することができる生物（例えば、哺乳動物）を包含することを意図する。対象の例として、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、及びそれらのトランスジェニック種が挙げられる。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感

10

20

30

40

50

染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含む、多くの供給源から得ることができる。本開示のある特定の態様では、当技術分野において利用可能な任意の数のT細胞株を使用することができる。本開示のある特定の態様では、T細胞は、Ficoll (商標) 分離などの、当業者に公知の任意の数の技術を用いて、対象から採取された血液単位から得ることができる。好ましい一態様では、個体の血流からの細胞は、アフレーションによって得られる。アフレーション産物は通常、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、及び血小板を含有する。一態様では、アフレーションによって採取された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、以降の処理ステップに備えて、細胞を適切な緩衝液または培地に入れてもよい。本開示の一態様では、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄する。代替的態様では、洗浄溶液はカルシウムを含まず、またマグネシウムを含んでいなくても、またはすべてではないものの二価カチオンの多くを含んでいなくてもよい。初期活性化ステップにカルシウムが存在しないことにより、活性化を増大させることができる。当業者であれば容易に理解できるように、洗浄ステップは、当業者に公知の方法、例えば半自動の「フロースルー」遠心分離機 (例えば、Cobe (登録商標) 2991細胞処理装置、Baxter Oncology CytoMate、またはHaemonetics (登録商標) Cell Saver (登録商標) 5) を製造業者の指示に従って使用することにより行うことができる。洗浄後、細胞は、様々な生体適合性緩衝液、例えば、Ca非含有PBS、Mg非含有PBS、PlasmaLyte A、または緩衝剤を含む、または含まないその他の生理食塩水などに再懸濁してもよい。あるいは、アフレーション試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁させてもよい。

10

20

【0259】

一態様では、T細胞は、赤血球を溶解し、例えばPERCOLL (登録商標) グラジエントによる遠心分離、または対向流遠心溶出法により単球を減少させることによって、末梢血リンパ球から単離する。陽性選択技術または陰性選択技術によって、特定のT細胞の亜集団、例えばCD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、及びCD45RO⁺ T細胞をさらに単離することができる。例えば、一態様では、所望のT細胞の陽性選択に十分な期間、抗CD3/抗CD28 (例えば3x28) をコンジュゲートしたビーズ、例えばDYNABEADS (登録商標) M-450 CD3/CD28 Tとインキュベートすることによって、T細胞を単離する。一態様では、期間は約30分である。さらなる態様では、期間は、30分~36時間の範囲またはそれ以上の範囲であり、その間のすべての整数値である。さらなる態様では、期間は少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。さらに別の好ましい態様では、期間は10~24時間である。一態様では、インキュベーション期間は24時間である。腫瘍組織または免疫不全個体から腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を単離する場合など、他の細胞型と比較してT細胞が少ない場合には、状況を問わず、T細胞の単離に長いインキュベーション時間を用いてもよい。さらに、用いるインキュベーション時間を長くすることにより、CD8⁺ T細胞の捕捉効率を増加させることができる。したがって、時間を単に短縮または延長することにより、T細胞をCD3/CD28ビーズに結合させることができ、及び/またはT細胞に対するビーズの比率を (本明細書でさらに記載されるように) 増減させることにより、培養開始時またはプロセス中の他の時点で、可否に応じてT細胞の亜集団を優先的に選択することができる。加えて、ビーズまたは他の表面上の抗CD3及び/または抗CD28抗体の比率を増減させることにより、培養開始時または他の望ましい時点で、可否に応じてT細胞の亜集団を優先的に選択することができる。当業者であれば、本開示の文脈において、複数回の選択も使用できることを認識されよう。ある特定の態様では、活性化及び増殖過程において、選択手順を実施して「非選択」細胞を使用することが望ましい場合がある。「非選択」細胞はまた、さらに数回の選択を行ってもよい。

30

40

【0260】

陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、陰性選択された細胞に固有の表面マーカーに対する抗体の組み合わせを用いて行うことができる。1つの方法は、陰性選択された細胞に存

50

在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体カクテルを使用する、負磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる細胞の分取及び/または選別である。例えば、陰性選択によってCD4⁺細胞を濃縮するには、モノクローナル抗体カクテルは通常、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、及びCD8に対する抗体を含む。ある特定の態様では、通常CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺、及びFoxP3⁺を発現する制御性T細胞を濃縮するかまたは陽性選択することが望ましい場合がある。あるいは、ある特定の態様では、抗C25がコンジュゲートされたビーズまたは他の類似の選択方法によって、制御性T細胞を減少させる。

【0261】

一実施形態では、IFN-、TNF-アルファ、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムB、及びパーフォリン、またはその他の適切な分子、例えばその他のサイトカインの1つ以上を発現するT細胞集団を選択することができる。細胞発現のスクリーニング方法は、例えばPCT公開第WO2013/126712号に記載の方法で決定することができる。

【0262】

陽性選択または陰性選択によって所望の細胞集団を単離する場合に、細胞及び表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変更することができる。ある特定の態様では、ビーズと細胞の混合量を大幅に減少させて（例えば、細胞濃度を増加させて）、細胞とビーズの接触を最大にすることが望ましい場合がある。例えば、一態様では、20億細胞/mLの濃度を使用する。一態様では、10億細胞/mLの濃度を使用する。さらなる態様では、1億細胞/mL超を使用する。さらなる態様では、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万細胞/mLの細胞濃度を使用する。さらに別の態様では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億細胞/mLの細胞濃度を使用する。さらなる態様では、1億2500万または1億5000万細胞/mLの濃度を使用することができる。高濃度を使用すると、細胞収率、細胞活性化、及び細胞増殖の増加を生じさせることができる。さらに、高細胞濃度の使用により、CD28陰性T細胞などの、対象となる標的抗原の発現が弱い場合がある細胞、または腫瘍細胞が多く存在する試料（例えば、白血病の血液、腫瘍組織など）からの細胞をより効率的に捕捉することが可能になる。そのような細胞集団は治療的価値を有する可能性があり、取得することが望ましいと予想される。例えば、高濃度の細胞の使用により、通常はCD28発現が弱いCD8⁺T細胞の効率的な選択が可能になる。

【0263】

関連する態様では、低濃度の細胞を使用することが望ましい場合がある。T細胞及び表面（例えば、ビーズなどの粒子）の混合物を大幅に希釈することによって、粒子と細胞との間の相互作用が最小限に抑えられる。これにより、所望の抗原を大量に発現する細胞が選択され、粒子に結合される。例えば、CD4⁺T細胞は、CD28の発現レベルがより高く、希薄濃度でCD8⁺T細胞よりも効率的に捕捉される。一態様では、使用される細胞の濃度は 5×10^6 / mLである。他の態様では、使用される濃度は、約 1×10^5 / mL ~ 1×10^6 / mL、及びその間のあらゆる整数値であり得る。他の態様では、細胞は、様々な長さの時間にわたって、様々な速度で2 ~ 10 または室温にてローター上でインキュベートすることができる。

【0264】

刺激用のT細胞はまた、洗浄ステップ後に凍結することもできる。理論に束縛されるものではないが、凍結及びその後の解凍ステップにより、顆粒球及びある程度の単球を細胞集団から除去することで、より均一な産物が得られる。血漿と血小板を除去する洗浄ステップの後、細胞を凍結溶液中に懸濁させてもよい。多くの凍結溶液及びパラメーターが当技術分野で公知であり、この状況において有用であるが、1つの方法は、20%DMSO及び8%ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または10%デキストラン40と5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミン、及び7.5%DMSOを含有する培養培地、

10

20

30

40

50

または31.25%Plasmalyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45%NaCl、10%デキストラン40と5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミン、及び7.5%DMSOを含有する培養培地、または例えばHespan及びPlasmalyte Aを含有する他の好適な細胞凍結培地を使用し、次いで細胞を-80になるまで毎分1の速度で凍結させ、液体窒素貯蔵タンクの蒸気相中で保存することを含む。他の制御凍結方法を使用しても、-20または液体窒素中で無制御に急速凍結する方法を使用してもよい。ある特定の態様では、凍結保存した細胞を本明細書に記載されるように解凍して洗浄し、室温で1時間静置した後、本開示の方法を使用して活性化する。

【0265】

また、本開示の文脈において、本明細書に記載される細胞の増殖が必要となり得る前の時点で、対象から血液試料またはアフレーシス産物を採取することも企図される。したがって、増殖させる細胞の供給源は、必要に応じていつでも採取することができ、本明細書に記載されるようなT細胞療法が有益である、任意の数の疾患または病態に向けたT細胞療法に後ほど使用するために単離して凍結することができる。一態様では、血液試料またはアフレーシスは、概ね健康な対象から採取される。ある特定の態様では、血液試料またはアフレーシスは、疾患を発症する危険性があるが、まだ疾患を発症していない概ね健康な対象から採取され、対象となる細胞は後ほど使用するために単離して凍結される。ある特定の態様では、T細胞を増殖させ、凍結し、後で使用してもよい。ある特定の態様では、試料は、本明細書に記載される特定の疾患と診断された直後であるが、何らかの治療をする前に患者から採取される。さらなる態様では、関連する任意の数の治療法の前に、対象由来の血液試料またはアフレーシスから細胞を単離する。このような治療法には、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤などの薬剤、化学療法、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、及びミコフェノレートなどの免疫抑制剤、抗体、またはアレムツズマブ、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、タクロリムス、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、ロミデプシンなどの他の免疫除去薬、ならびに照射による治療を含むが、これらに限定されない。

【0266】

本開示のさらなる態様では、T細胞は、機能的T細胞を対象に残す治療後に直接患者から採取される。この点に関して、ある種のがん治療、特に免疫系に損傷を与える薬物による治療後で、通常であれば患者が治療から回復中である治療直後の期間は、得られるT細胞の質が、*ex vivo*での増殖に最適であるか、または増強され得ることが観察されている。同様に、本明細書に記載の方法を用いた*ex vivo*操作後、これらの細胞は、移植及び*in vivo*増殖の増強に好ましい状態であり得る。したがって、本開示の文脈の範囲内で、この回復期中に、T細胞、樹状細胞、または造血系統の他の細胞を含む血液細胞を採取することが企図される。さらに、ある特定の態様では、動員（例えば、GM-CSFによる動員）及び条件付きレジメンを用いて、特に療法後のある規定された時間枠の間、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生、及び/または増殖にとって有利に働く条件を対象に作り出すことができる。例示的な細胞型として、T細胞、B細胞、樹状細胞、及び免疫系の他の細胞が挙げられる。

【0267】

T細胞の活性化及び増殖

T細胞は一般に、例えば米国特許第6,352,694号、同第6,534,055号、同第6,905,680号、同第6,692,964号、同第5,858,358号、同第6,887,466号、同第6,905,681号、同第7,144,575号、同第7,067,318号、同第7,172,869号、同第7,232,566号、同第7,175,843号、同第5,883,223号、同第6,905,874号、同第6,797,514号、同第6,867,041号、及び同第7,572,631号に記載の方法を使用して、活性化及び増殖することができる。

【0268】

一般に、本開示のT細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する作用物質、

及びT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドがそこに結合された表面と接触することによって増強させることができる。特に、T細胞集団は、本明細書に記載されるように、表面上に固定された抗CD3抗体もしくはその抗原結合断片、または抗CD2抗体との接触によって、またはカルシウムイオノフォアを伴うプロテインキナーゼC活性化因子（例えば、プリオスタチン）との接触などによって刺激され得る。T細胞の表面での補助分子の共刺激には、補助分子と結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞の増殖を刺激するのに適した条件下で、T細胞の集団を抗CD3抗体及び抗CD28抗体と接触させることができる。CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞のいずれかの増殖を刺激するための、抗CD3抗体及び抗CD28抗体。抗CD28抗体の例として、9.3、B-T3、XR-CD28 (Diaclone, Besancon, France) が挙げられ、当技術分野で一般に知られている他の方法と同様に使用することができる (Berg et al., Transplant Proc. 30(8): 3975-3977, 1998、Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9): 1319-1328, 1999、Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2): 53-63, 1999)。

10

【0269】

刺激に曝露された時間がさまざまであるT細胞は、異なる特徴を示し得る。例えば、通常の血液またはアフエーシス末梢血単核細胞産物は、細胞傷害性またはサブレッサーT細胞集団(TC、CD8⁺)よりも多くヘルパーT細胞集団(TH、CD4⁺)を有する。CD3及びCD28受容体を刺激することによりT細胞をex vivoで増殖すると、約8~9日目以前には、主としてTH細胞からなるT細胞の集団を産生するが、約8~9日目以後、T細胞の集団は、TC細胞の集団を次第に多く含むようになる。したがって、治療の目的に応じて、主としてTH細胞を含むT細胞集団を対象に注入することが有利な場合がある。同様に、TC細胞の抗原特異的サブセットが単離されている場合、このサブセットの増殖度をより高めるのに有益な場合がある。

20

【0270】

さらに、CD4及びCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーも、細胞の増殖過程で大幅に、ただし大部分において再現性を伴って変動する。したがって、そのような再現性により、特定の目的に応じて活性化T細胞産物を調整することが可能になる。

30

【0271】

抗CD19、抗BCMA、抗CD22、抗ROR1、抗PD-1、または抗BAFF TFPを構築した後、種々のアッセイを使用して、分子の活性を評価することができ、この活性として、抗原刺激後のT細胞を増殖する能力、再刺激の非存在下でT細胞増殖を維持する能力、及び適切なin vitro及び動物モデルでの抗がん活性などがあるが、これらに限定されない。抗CD19、抗BCMA、抗CD22、抗ROR1、抗PD-1、または抗BAFF TFPの効果の評価するためのアッセイについては、以下でさらに詳細に記載する。

【0272】

初代T細胞におけるTFP発現のウエスタンブロット分析を用いて、単量体及び二量体の存在を検出することができる(例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464(2009)を参照)。極めて簡潔には、TFPを発現するT細胞(CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞との1:1混合物)を、in vitroで10日より長く増殖させた後、溶解して、還元条件下でSDS-PAGEにかける。TCR鎖に対する抗体を使用して、ウエスタンブロッティングでTFPを検出する。非還元条件下でのSDS-PAGE分析に同じT細胞のサブセットを使用して、共有結合二量体の生成の評価を可能にする。

40

【0273】

抗原刺激後のTFP⁺T細胞のin vitroでの増殖は、フローサイトメトリーにより測定することができる。例えば、CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞との混合物を、アルファCD3/アルファCD28、及びAPCで刺激した後、プロモーターの制御下でG

50

FPを発現するレンチウイルスベクターで形質導入し、分析する。例示的なプロモーターとして、CMV IE遺伝子、EF-1アルファ、ユビキチンC、またはホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターが挙げられる。CD4⁺及び/またはCD8⁺T細胞サブセットでの培養の6日目に、GFPの蛍光をフローサイトメトリーにより評価する(例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)を参照)。あるいは、0日目にCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞との混合物を、アルファCD3/アルファCD28被覆磁気ビーズで刺激し、1日目に、TFPを発現するバイシストロニックなレンチウイルスベクターを、2ARIボソームスキッピング配列を用いたeGFPと共に使用して、TFPに形質導入する。洗浄後、CD19⁺K562細胞(K562-CD19)、野生型K562細胞(K562野生型)、または抗CD3及び抗CD28抗体の存在下でhCD32及び4-1BBLを発現するK562細胞(K562-BBL-3/28)のいずれかで再刺激する。外因性IL-2を隔日100IU/mLで培養物に加える。ビーズに基づく計数を用いてフローサイトメトリーによりGFP⁺T細胞を数える(例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)を参照)。

【0274】

再刺激を実施せずに持続したTFP⁺T細胞の増殖も測定することができる(例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)を参照)。簡潔には、0日目にアルファCD3/アルファCD28被覆磁気ビーズで刺激を与え、1日目に、示されたTFPに形質導入した後、培養の8日目に平均T細胞体積(fl)を、Coulter Multisizer III粒子カウンターを使用して測定する。

【0275】

動物モデルを使用してTFP-T活性を測定することもできる。例えば、免疫不全マウスにおいて、初代ヒトpre-B ALLの処理にヒトCD19特異的TFP⁺T細胞を使用する異種移植モデルを用いることができる(例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)を参照)。極めて簡潔には、ALLの定着後に、マウスを処置群に関してランダム化する。異なる数の改変T細胞を1:1比で、B-ALLを有するNOD/SCID/-/-マウスに同時注入する。マウス由来の脾臓DNAにおける各ベクターのコピー数を、T細胞の注入後の様々な時点で評価する。1週間間隔で動物を白血病について評価する。アルファCD19-ゼータTFP⁺T細胞、またはモック形質導入T細胞を注入したマウスにおいて、末梢血CD19⁺B-ALL芽細胞数を測定する。各群の生存曲線を、ログランク検定を用いて比較する。加えて、NOD/SCID/-/-マウスにT細胞を注入後4週間の末梢血CD4⁺及びCD8⁺T細胞の絶対数も分析することができる。マウスに白血病細胞を注入し、3週間後に、eGFPに連結されたTFPをコードするバイシストロニックレンチウイルスベクターでTFPを発現するように操作したT細胞を注入する。注入の前に、モック形質導入細胞と混合することにより、45~50%のインプットGFP⁺T細胞に対してT細胞を正規化し、フローサイトメトリーにより確認する。1週間隔で動物を白血病について評価する。TFP⁺T細胞群の生存曲線を、ログランク検定を用いて比較する。

【0276】

用量依存的なTFP処置反応を評価することができる(例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)を参照)。例えば、21日目に、TFP T細胞を注入したマウス、同数のモック形質導入T細胞を注入したマウス、またはT細胞を注入していないマウスにおいて、白血病の定着後35~70日目に末梢血を採取する。35日目及び49日目に、各群のマウスからランダムに採血して、末梢血CD19⁺ALL芽細胞数の測定を行った後、殺処分する。残りの動物は、57日目及び70日目に評価する。

10

20

30

40

50

【0277】

細胞増殖及びサイトカイン産生の評価については、例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)に以前に記載されている。簡潔には、TFP介在型増殖の評価は、洗浄したT細胞を、CD19を発現するK562細胞(K19)、またはCD32及びCD137を発現するK562細胞(KT32-BBL)と、最終的なT細胞：K562細胞比が2：1になるように混合して、マイクロタイプレート中にて実施する。使用前にガンマ線によりK562細胞を照射する。抗CD3(クローンOKT3)及び抗CD28(クローン9.3)モノクローナル抗体を、KT32-BBL細胞を含む培養物に加え、T細胞の増殖を刺激する陽性対照として機能させる。これは、このシグナルが長期間のCD8⁺T細胞のex vivo増殖を裏付けるという理由による。T細胞を、培養物中で、CountBright(商標)蛍光ビーズ(Invitrogen)及びフローサイトメトリーを使用して、製造業者の指示に従って計数する。TFP⁺T細胞を、eGFP-2Aが連結されたTFP発現レンチウイルスベクターで操作したT細胞を使用してGFPの発現により同定する。GFPを発現しないTFP⁺T細胞については、ビオチン化組換えCD19タンパク質及び二次アビジン-PEコンジュゲートによりTFP⁺T細胞を検出する。T細胞でのCD4⁺及びCD8⁺の発現も、特異的モノクローナル抗体(BD Biosciences)により同時に検出される。サイトカインの測定を、再刺激の24時間後に採取した上清で、ヒトTH1/TH2サイトカインサイトメトリービーズアレイキット(BD Biosciences)を使用して、製造業者の指示に従って実施する。FACS Calibur(商標)フローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して蛍光を評価し、データを製造業者の指示に従って解析する。

10

20

【0278】

細胞毒性を、標準的な⁵¹Cr放出アッセイによって評価することができる(例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)を参照)。標的細胞(K562株及び初代pro-B-ALL細胞)に、⁵¹Cr(NaCrO₄, New England Nuclearである)を、37で2時間、頻りに攪拌しながら充填し、これを完全RPMIで2度洗浄し、マイクロタイプレートに播種する。エフェクターT細胞を、種々のエフェクター細胞：標的細胞(E:T)比で完全なRPMIのウェル中の標的細胞と混合する。さらに、培地のみを含むウェル(自然放出、SR)、または界面活性剤Triton-X 100の1%溶液を含むウェル(総放出、TR)を用意する。37で4時間のインキュベーション後に、各ウェルから上清を採取する。次に、放出された⁵¹Crをガンマ粒子カウンター(Packard Instrument Co., Waltham, Mass.)を使用して測定する。各条件を少なくとも3連で実施し、細胞溶解率(%)を、式：細胞溶解率(%)=(ER-SR)/(TR-SR)(式中、ERは、各実験条件で放出された⁵¹Crの平均を表す)を用いて算出する。

30

【0279】

画像技術を用いて、腫瘍を保有する動物モデルにおけるTFPの特異的輸送及び増殖を評価することができる。そのようなアッセイは、例えば、Barrett et al., Human Gene Therapy 22:1575-1586(2011)に記載されている。NOD/SCID/c-/- (NSG)マウスにNalm-6細胞(ATCC(登録商標)CRL-3273(商標))を静注した7日後に、TFP構築物のエレクトロポレーション後4時間のT細胞を静注する。ホタルルシフェラーゼを発現するレンチウイルス構築物をT細胞に安定的にトランスフェクトし、マウスの生物発光を撮像する。あるいは、Nalm-6異種移植モデルにおけるTFP⁺T細胞の単回注射の治療有効性及び特異性を、以下のように測定することができる。NSGマウスに、ホタルルシフェラーゼを安定的に発現するように形質導入したNalm-6を注射し、続いて7日後に、CD19⁺TFP⁺をエレクトロポレーションしたT細胞を尾静脈に単回注射する。注射後の様々な時点で動物を撮像する。例えば、5日目(処置の2日前)及び8日目(TF

40

50

P + P B L の 2 4 時間後) の代表的なマウスにおけるホタルルシフェラーゼ陽性白血病の光子密度ヒートマップを作成することができる。

【 0 2 8 0 】

本明細書の実施例の項に記載のもの、ならびに当技術分野において公知のものを含めた他のアッセイもまた、本明細書に開示される抗 C D 1 9、抗 B C M A、抗 C D 2 2、抗 R O R 1、抗 P D - 1、または抗 B A F F T F P 構築物を評価するために用いることができる。

【 0 2 8 1 】

医薬組成物

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、(a) 本開示の改変 T 細胞、及び (b) 薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。そのような組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液、グルコース、マンノース、スクロース、またはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物、タンパク質、ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、E D T A またはグルタチオンなどのキレート剤、アジュバント (例えば、水酸化アルミニウム)、ならびに防腐剤を含んでもよい。本開示の組成物は、一態様では、静脈内投与用に製剤化される。

【 0 2 8 2 】

本開示の医薬組成物は、治療 (または予防) する疾患に適した方法で投与することができる。投与の量及び頻度は、患者の病態、ならびに患者の疾患の種類及び重症度のような要因によって決定することになるが、適切な投与量を臨床試験によって決定してもよい。

【 0 2 8 3 】

一実施形態では、医薬組成物は、例えば、エンドトキシン、マイコプラズマ、複製能力のあるレンチウイルス (R C L)、p 2 4、V S V - G 核酸、H I V g a g、残留抗 C D 3 / 抗 C D 2 8 被覆ビーズ、マウス抗体、プールされたヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地成分、ベクターパッケージング細胞またはプラスミド成分、細菌、及び真菌からなる群から選択される、汚染物質を実質的に含まず、例えば検出可能なレベルの汚染物質が存在しない。一実施形態では、細菌は、A l c a l i g e n e s f a e c a l i s、C a n d i d a a l b i c a n s、E s c h e r i c h i a c o l i、H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a、N e i s s e r i a m e n i n g i t i d e s、P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s、S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a、及び S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s A 群からなる群から選択される少なくとも 1 種である。

【 0 2 8 4 】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示されている場合、投与される本開示の組成物の正確な量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染症または転移の程度、及び患者 (対象) の病態に関する個体差を考慮して、医師が決定することができる。一般に、本明細書に記載の T 細胞を含む医薬組成物は、範囲内のすべての整数値を含む、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞 / k g 体重、場合によっては $10^5 \sim 10^6$ 細胞 / k g 体重の投与量で投与できるといってよい。また、T 細胞組成物を、これらの投与量で複数回投与してもよい。細胞は、免疫療法において一般に公知である注入技術を用いて投与することができる (例えば、R o s e n b e r g e t a l . , N e w E n g . J . o f M e d . 3 1 9 : 1 6 7 6 , 1 9 8 8 を参照) 。

【 0 2 8 5 】

ある特定の態様では、活性化 T 細胞を対象に投与し、その後引き続き再採血を行い (またはアフエーシスを実施)、それに由来する T 細胞を本開示に従って活性化し、これらの活性化及び増殖した T 細胞を患者に再注入することが望ましい場合がある。この過程を、数週間ごとに複数回実施することができる。ある特定の態様では、1 0 c c ~ 4 0 0 c c の採血から T 細胞を活性化することができる。ある特定の態様では、2 0 c c、3 0 c c、4 0 c c、5 0 c c、6 0 c c、7 0 c c、8 0 c c、9 0 c c、または 1 0 0 c c

10

20

30

40

50

の採血からT細胞を活性化することができる。

【0286】

本組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、経口摂取、輸液、注入、または移植によるものを含む、任意の利便な方法で行ってよい。本明細書に記載の組成物は、患者に、経動脈投与、皮下投与、皮内投与、腫瘍内投与、リンパ節内投与、髄内投与、筋肉内投与、静脈内(i.v.)注射投与、または腹腔内投与することができる。一態様では、本開示のT細胞組成物は、皮内注射または皮下注射によって患者に投与される。一態様では、本開示のT細胞組成物は、i.v.注射によって投与される。T細胞組成物は、腫瘍、リンパ節、または感染部位に直接注射してもよい。

【0287】

特定の例示的な態様では、対象は白血球搬出法を受けてもよい。これは、*ex vivo*で白血球を採取、濃縮、または減少させ、対象となる細胞、例えばT細胞を選択及び/または単離するものである。このようなT細胞分離株を、当技術分野において公知の方法で増殖し、本開示の1種以上のTFP構築物を導入できるように処理することで、本開示の改変T-T細胞を生成することができる。引き続き、高用量の化学療法と、それに続く末梢血幹細胞移植による標準治療を、それを必要とする対象が受けてもよい。ある特定の態様では、対象は、移植後または移植と同時に、本開示の増殖した改変T細胞の注入を受ける。追加の態様では、増殖細胞を術前または術後に投与する。

【0288】

患者に投与すべき上記処置の投与量は、治療する病態及び治療のレシピエントの厳密な性質に応じて異なる。ヒト投与の投与量の秤量は、当技術分野で許容される慣行に従って行うことができる。例えば、アレムツズマブの用量は一般に、成人患者の場合、1~約100mgの範囲であり、通常は1~30日の期間、毎日投与する。好ましい1日用量は、1~10mg/日であるが、場合によっては、最大40mg/日の多用量を用いてもよい(米国特許第6,120,766号に記載)。

【0289】

一実施形態では、TFPを、例えば*in vitro*転写を用いてT細胞に導入し、本開示のTFP-T細胞の最初の投与、及びそれに続く1回以上の本開示のTFP-T細胞の投与を対象(例えば、ヒト)に行うが、その場合、1回以上の後続投与は、先の投与の、15日後未滿、例えば14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、または2日後に投与される。一実施形態では、本開示のTFP-T細胞の複数回投与は、1週間ごとに対象(例えばヒト)に実施され、例えば、本開示のTFP-T細胞の2、3、または4回の投与を1週間ごとに実施する。一実施形態では、1週間ごとに複数回のTFP-T細胞の投与(例えば、1週間ごとに2、3、または4回の投与)(本明細書ではサイクルとも称する)を対象(例えばヒト対象)が受けた後、1週間はTFP-T細胞の投与をせず、その後、さらに1回以上のTFP-T細胞の投与(例えば、1週間ごとに複数回のTFP-T細胞の投与)を対象に実施する。別の実施形態では、複数サイクルのTFP-T細胞を対象(例えばヒト対象)が受け、各サイクルの間隔は、10、9、8、7、6、5、4、または3日未滿である。一実施形態では、TFP-T細胞は、1週間に3回の投与になるように隔日投与される。一実施形態では、本開示のTFP-T細胞は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8週間、またはそれより長く投与される。

【0290】

一態様では、CD19-TFP-T細胞を、レンチウイルスなどのレンチウイルス型ウイルスベクターを使用して産生する。その方法で産生されるTFP-T細胞は、安定的にTFPを発現する。

【0291】

一態様では、TFP-T細胞は、形質導入後、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15日間、TFPベクターを一過性に発現する。TFPの一過性発現は、RNA-TFPベクターの送達によって行うことができる。一態様では、TFP-RNAを、エレクトロポレーションによってT細胞に形質導入する。

10

20

30

40

50

【0292】

一過性に発現するTFP T細胞（特に、マウスscFv保持TFP T細胞）を使用して治療される患者に生じ得る潜在的な問題は、複合治療後のアナフィラキシーである。

【0293】

理論に束縛されるものではないが、そのようなアナフィラキシー反応は、体液性抗TFP P反応を発症している患者、すなわち抗IgEアイソタイプを有する抗TFP抗体によって引き起こされる可能性があると思われる。抗原への曝露が10～14日間中断された場合に、患者の抗体産生細胞が、IgGアイソタイプ（アナフィラキシーを引き起こさない）からIgEアイソタイプへのクラススイッチを行うと考えられる。

【0294】

一過性TFP療法（RNA形質導入によって産生されるものなど）の過程で抗TFP抗体反応が患者に生じる危険性が高い場合、TFP T細胞注入の中断は、10～14日より長く継続するべきではない。

【0295】

改変T細胞の作製方法

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、本開示の改変T細胞を作製する方法であり、この方法は、（a）TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、TCRガンマ鎖、TCRデルタ鎖、またはそれらの組み合わせをコードする内因性TCR遺伝子を破壊し、それにより内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞を作製することと、（b）内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞に、本開示の組換え核酸または本明細書に開示されるベクターを形質導入することを含む。場合によっては、破壊は、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、またはTCRアルファ鎖とTCRベータ鎖をコードする内因性遺伝子を標的とするヌクレアーゼタンパク質、またはヌクレアーゼタンパク質をコードする核酸配列をT細胞に形質導入することを含む。

【0296】

いくつかの実施形態において、本明細書にさらに開示されるのは、本開示の改変T細胞を作製する方法であり、この方法は、内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞に、本明細書に開示される組換え核酸または本明細書に開示されるベクターを形質導入することを含む。場合によっては、内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞は、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、またはTCRアルファ鎖とTCRベータ鎖をコードする内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞である。

【0297】

場合によっては、T細胞はヒトT細胞である。場合によっては、内因性TCR遺伝子の機能的破壊を含んだT細胞は、未改変の対照T細胞のものと比較して、MHC-ペプチド複合体への結合が減少する。

【0298】

場合によっては、ヌクレアーゼはメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、CRISPR/Casヌクレアーゼ、CRISPR/Casニッカーゼ、またはmegaTALENヌクレアーゼである。場合によっては、組換え核酸またはベクターに含まれる配列は、切断部位で内因性TCRサブユニット遺伝子に挿入され、この内因性TCRサブユニット遺伝子への配列の挿入により内因性TCRサブユニットが機能的に破壊される。場合によっては、ヌクレアーゼはメガヌクレアーゼである。場合によっては、メガヌクレアーゼは、第1のサブユニット及び第2のサブユニットを含み、第1のサブユニットは認識配列の第1の認識半部位に結合し、第2のサブユニットは認識配列の第2の認識半部位に結合する。場合によっては、メガヌクレアーゼは、リンカーを含む一本鎖メガヌクレアーゼであり、このリンカーは第1のサブユニットと第2のサブユニットとを共有結合する。

【0299】

遺伝子編集技術

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される改変T細胞は、clustered

10

20

30

40

50

regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR (登録商標)、例えば米国特許第8,697,359号を参照)、転写活性化因子様エフェクター (TALE)ヌクレアーゼ (TALEN、例えば米国特許第9,393,257号を参照)、メガヌクレアーゼ (12~40塩基対の二本鎖DNA配列を含む大きな認識部位を有するエンドデオキシリボヌクレアーゼ)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN、例えばUrnov et al., Nat. Rev. Genetics (2010) v11, 636-646を参照)、またはmegaTALヌクレアーゼ (メガヌクレアーゼとTALリピートとの融合タンパク質)の方法などの遺伝子編集技術を用いて操作される。このようにして、キメラ構築物を操作すると、立体構造またはシグナル伝達能力など、各サブユニットの望ましい特性を組み合わせることができる。それぞれが参照により本明細書に組み込まれる、Sander & Joung, Nat. Biotech. (2014) v32, 347-55、及びJune et al., 2009 Nature Reviews Immunol. 9.10:704-716も参照のこと。いくつかの実施形態では、複数の天然TCRサブユニットドメインの態様を有する (すなわち、キメラである) ように、TFPサブユニットの1つ以上の細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインが操作される。

10

【0300】

近年、治療応用の礎となる、ヒトゲノムを恒久的に改変し、部位特異的ゲノム修飾を疾患関連遺伝子に導入する技術が開発されている。現在、これらの技術は「ゲノム編集」として一般に知られている。

20

【0301】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集技術を用いて、内因性TCR遺伝子を破壊する。いくつかの実施形態では、言及する内因性TCR遺伝子は、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、またはTCRアルファ鎖とTCRベータ鎖をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子編集技術は、内因性TCR遺伝子における複数のゲノム遺伝子座の同時破壊を可能にする多重ゲノム編集を容易にする。いくつかの実施形態では、多重ゲノム編集技術を適用して、内因性TCR、及び/またはヒト白血球抗原 (HLA)、及び/またはプログラム細胞死タンパク質1 (PD1)、及び/または他の遺伝子の発現が欠損している遺伝子破壊T細胞を産生する。

30

【0302】

現在の遺伝子編集技術には、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TALEエフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、及びclustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR関連 (Cas) システムが含まれる。これら4種の主要なクラスの遺伝子編集技術は、DNAのユーザー定義配列の結合と、二本鎖DNA切断 (DSB) の介在という共通の作用機序を共有している。さらにDSBは、非相同末端結合 (NHEJ) または (ドナーDNAが存在する場合) 相同組換え (HR)、すなわちドナーDNA断片から相同配列を導入する事象のいずれかにより修復することができる。加えて、ニッカーゼヌクレアーゼは一本鎖DNA切断 (SSB) を産生する。DSBは、ドナーDNAから相同配列を導入する事象である、一本鎖DNA組み込み (ssDI) または一本鎖鋳型修復 (ssTR) によって修復することができる。

40

【0303】

ゲノムDNAの遺伝子改変は、対象となる遺伝子座のDNA配列を認識するように操作された部位特異的な希少切断エンドヌクレアーゼを使用して実施することができる。操作された部位特異的エンドヌクレアーゼを作製する方法は、当技術分野において公知である。例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を、ゲノム内の所定の部位を認識して切断するように操作することができる。ZFNは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインを、FokI制限酵素のヌクレアーゼドメインに融合して含むキメラタンパク質である。合理的な手段または実験的手段によりジンクフィンガードメインを再設計し、長さ18塩基対の所定のDNA配列に結合するタンパク質を作製することができる。この操作された

50

タンパク質ドメインをFokIヌクレアーゼに融合することにより、ゲノムレベルの特異度でDNA切断を標的とすることが可能である。ZFNは、広範囲の真核生物における遺伝子の付加、除去、及び置換の標的化に幅広く使用されている(Durai et al. (2005), *Nucleic Acids Res* 33, 5978に概説)。同様に、ゲノムDNAの特異的部位を切断するTALEヌクレアーゼ(TALEN)を産生することができる。ZFNと同様に、TALENは、操作された部位特異的DNA結合ドメインを、FokIヌクレアーゼドメインに融合して含む(Mak et al. (2013), *Curr Opin Struct Biol* 23:93-9に概説)。ただし、TALENの場合、DNA結合ドメインは、それぞれが単一のDNA塩基対を特異的に認識するTALEヌクレアーゼドメインの縦列配列を含む。小型TALENは、二量体化を必要としない代替エンドヌクレアーゼ構造を有する(Beurdeley et al. (2013), *Nat Commun* 4:1762)。小型TALENは、操作された部位特異的TALEヌクレアーゼ-DNA結合ドメインを。I-TevIホーミングエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインに融合して含む。FokIとは異なり、I-TevIは二本鎖DNA切断を生成するために二量体化を必要としないため、小型TALENは単量体として機能する。

10

20

30

40

50

【0304】

CRISPR/Cas9システムに基づいて操作されたエンドヌクレアーゼもまた、当技術分野において公知である(Ran et al. (2013), *Nat Protoc* 8:2281-2308、Mali et al. (2013), *Nat Methods* 10:957-63)。CRISPR遺伝子編集技術は、DNA標的化の特異性及び切断活性を、短鎖ガイドRNAまたは二重鎖crRNA/TracrRNAによってプログラム可能であるエンドヌクレアーゼタンパク質で構成されている。CRISPRエンドヌクレアーゼは、(1)通常は微生物Cas9である、カスパーゼエフェクターヌクレアーゼ、及び(2)ヌクレアーゼをゲノム内の対象となる位置に誘導する18~20ヌクレオチドの標的化配列を含む短鎖「ガイドRNA」またはRNA二重鎖という2つの要素を含む。それぞれが異なる標的化配列を持つ複数のガイドRNAを同じ細胞で発現させることにより、ゲノム内の複数の部位を同時に標的とするDNA切断が可能である(マルチプレックスゲノム編集)。

【0305】

当技術分野において公知であるCRISPRシステムには2つのクラスがあり(Adli (2018) *Nat. Commun* 9:1911)、それぞれ複数のCRISPR型が含まれている。クラス1には、古細菌で一般的にみられるI型及びI-II型CRISPRシステムが含まれる。また、クラスIIにはII型、IV型、V型、及びVI型CRISPRシステムが含まれる。最も幅広く使用されているCRISPR/CasシステムはII型CRISPR-Cas9システムであるが、CRISPR/Casシステムはゲノム編集の研究者によって別の目的に再利用されている。過去数年内で、10を超える異なるCRISPR/Casタンパク質が改造された(Adli (2018) *Nat. Commun* 9:1911)。そのうち、*Acid-aminococcus* sp (Ascpf1)及び*Lachnospiraceae bacterium* (Lbcpf1)由来のCas12a (Cpf1)タンパク質などが特に興味深い。

【0306】

ホーミングエンドヌクレアーゼは、植物及び真菌のゲノムに一般的にみられる15~40塩基対の切断部位を認識する天然に存在するヌクレアーゼ群である。それらは、グループ1の自己スプライシングイントロン及びインテンなどの寄生生物DNA要素と頻繁に連係する。これらは、染色体に二本鎖切断を生じさせ、細胞DNA修復機構を動員することにより、宿主ゲノムの特異的位置での相同組換えまたは遺伝子挿入を自然に促進する(Stoddard (2006), *Q. Rev. Biophys* 38:49-95)。特定のアミノ酸の置換により、ホーミングヌクレアーゼのDNA切断特異性をリプログラムすることができる(Niyonzima (2017), *Protein Eng Des*

Sei. 30 (7) : 503 - 522)。メガヌクレアーゼ (MN) は、細菌のホーミングエンドヌクレアーゼに由来し、固有の標的部に合わせて操作された、生得的なヌクレアーゼ活性をもつ単量体タンパク質である (Gersbach (2016), Molecular Therapy. 24 : 430 - 446)。いくつかの実施形態では、メガヌクレアーゼは、操作された I - CreI ホーミングエンドヌクレアーゼである。他の実施形態では、メガヌクレアーゼは、操作された I - SceI ホーミングエンドヌクレアーゼである。

【0307】

言及した4種の主要な遺伝子編集技術に加えて、メガヌクレアーゼ、ZFN、及びTALENの融合体を含むキメラタンパク質を操作して、ZFN及びTALENの結合親和性とメガヌクレアーゼの切断特異性を利用する新規な単量体酵素が産生されている (Gersbach (2016), Molecular Therapy. 24 : 430 - 446)。例えば、megaTALは、TALEN由来のDNA結合ドメインの調整の容易さとメガヌクレアーゼの高い切断効率とを兼ね備える単一のキメラタンパク質である。

10

【0308】

遺伝子編集技術を実行するには、ヌクレアーゼが、またCRISPR/Cas9システムの場合には、gRNAが、対象となる細胞に効率的に送達されなければならない。物理的方法、化学的方法、及びウイルスによる方法などの送達方法も当技術分野において公知である (Mali (2013), Indian J. Hum. Genet. 19 : 3 - 8)。場合によっては、物理的送達方法は、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、または微粒子銃の使用から選択することができるが、これに限定されない。一方、化学的送達方法では、リン酸カルシウム、脂質、またはタンパク質などの複雑な分子の使用を必要とする。いくつかの実施形態では、ウイルス送達方法は、アデノウイルス、レンチウイルス、及びレトロウイルスなどであるがこれらに限定されないウイルスを使用する遺伝子編集技術に適用される。

20

【0309】

治療方法

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるのは、治療を必要とする対象におけるがんの治療方法であり、この方法は、本明細書に開示される、治療有効量の医薬組成物を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書にさらに開示されるのは、治療を必要とする対象におけるがんの治療方法であり、この方法は、(a)本明細書に開示される方法に従って作製される改変T細胞、及び(b)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。

30

【0310】

場合によっては、改変T細胞は同種異系T細胞である。場合によっては、有効量の未改変の対照T細胞を投与した対象と比較して、対象において放出されるサイトカインが少ない。場合によっては、本明細書に開示される組換え核酸または本明細書に開示されるベクターを含む有効量の改変T細胞を投与した対象と比較して、対象において放出されるサイトカインが少ない。

【0311】

場合によっては、この方法は、医薬組成物の有効性を増加させる薬剤と組み合わせて医薬組成物を投与することを含む。場合によっては、この方法は、医薬組成物に付随する1つ以上の副作用を改善する薬剤と組み合わせて医薬組成物を投与することを含む。

40

【0312】

場合によっては、がんは固形癌、リンパ腫、または白血病である。場合によっては、がんは、腎細胞癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌、子宮頸癌、脳癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、及び胃癌からなる群から選択される。

【0313】

本開示は、TFP及びTCRアルファ及び/またはベータ定常ドメインを発現するようにT細胞を遺伝子改変し、改変T細胞を、それを必要とするレシピエントに注入するタイ

50

ブの細胞療法を含む。注入された細胞は、レシピエントの腫瘍細胞を殺傷することができる。抗体療法とは異なり、この改変T細胞は *in vivo* で複製可能であるため、長期的に残存し、持続的な腫瘍制御をもたらすことができる。様々な態様において、患者に投与されるT細胞、またはその継代は、患者へのT細胞の投与後、少なくとも4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間、12か月間、13か月間、14か月間、15か月間、16か月間、17か月間、18か月間、19か月間、20か月間、21か月間、22か月間、23か月間、2年間、3年間、4年間、または5年間、患者に存続する。

【0314】

本開示はまた、例えば *in vitro* 転写されたRNAにより、TFP及びTCRアルファ及び/またはベータ定常ドメインを一過性発現するようにT細胞を改変し、改変T細胞を、それを必要とするレシピエントに注入するタイプの細胞療法も含む。注入された細胞は、レシピエントの腫瘍細胞を殺傷することができる。したがって、様々な態様において、患者に投与されたT細胞は、患者へのT細胞の投与後、1か月未満、例えば3週間、2週間、または1週間存在する。

10

【0315】

特定の理論に束縛されるものではないが、改変T細胞によって誘発される抗腫瘍免疫応答は、能動的な免疫応答の場合もあれば、または受動的な免疫応答の場合もあり、あるいは直接免疫応答か間接免疫応答かに起因し得る。

20

【0316】

一態様では、本開示のヒト改変T細胞は、哺乳動物における *ex vivo* 免疫付与及び/または *in vivo* 療法のためのワクチンの一種であり得る。一態様では、哺乳動物はヒトである。

【0317】

ex vivo 免疫付与に関して、細胞を哺乳動物に投与する前に、i) 細胞の増殖、ii) TFP及びTCRアルファ及び/またはベータ定常ドメインをコードする核酸の細胞への導入、またはiii) 細胞の凍結保存のうちの少なくとも1つを *in vitro* で行う。

【0318】

ex vivo 手順は当技術分野において周知されており、以下で網羅的に考察する。簡潔には、細胞は哺乳動物（例えばヒト）から単離され、本明細書に開示されるベクターで遺伝子改変（すなわち、*in vitro* で形質導入またはトランスフェクト）される。改変T細胞を哺乳動物のレシピエントに投与して、治療上の利点をもたらすことができる。哺乳動物のレシピエントはヒトであってもよく、改変細胞はそのレシピエントに対して自己由来であり得る。あるいは、細胞は、レシピエントに対して、同種異系、同系、または異種であり得る。

30

【0319】

造血幹細胞及び前駆細胞の *ex vivo* 増殖のための手順は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,199,942号に記載されており、本開示の細胞に適用することができる。他の好適な方法は当技術分野において公知であるため、本開示は、細胞の *ex vivo* 増殖に関するいかなる特定の方法にも限定されない。簡潔には、T細胞の *ex vivo* 培養及び増殖は、(1)末梢血採取または骨髓移植片からの哺乳動物由来CD34⁺造血幹細胞及び前駆細胞の回収、及び(2)そのような細胞の *ex vivo* 増殖を含む。米国特許第5,199,942号に記載の細胞増殖因子に加えて、flt3-L、IL-1、IL-3、及びc-kitリガンドなどの他の因子を、細胞の培養及び増殖に使用することができる。

40

【0320】

ex vivo 免疫付与に関しては、細胞を用いたワクチンの使用に加え、本開示はまた、患者の抗原に対する免疫応答を誘発する *in vivo* 免疫付与のための組成物及び方法を提供する。

50

【0321】

一般に、本明細書に記載されるように活性化及び増殖した細胞は、免疫不全状態の個体に起こる疾患の治療及び予防に利用することができる。

【0322】

本開示の改変T細胞は、単独で投与しても、あるいは希釈剤及び/またはIL-2もしくは他のサイトカインもしくは細胞集団などの他の成分と組み合わせて医薬組成物として投与してもよい。

【0323】

併用療法

本明細書に記載の改変T細胞は、他の公知の薬剤及び療法と組み合わせて使用することができる。本明細書で使用される場合、「組み合わせて」投与するとは、対象が疾患に罹患している期間、対象に2種(またはそれ以上)の異なる治療が送達されること、例えば、患者が障害と診断された後で、かつ障害が治癒する前もしくは消失する前、または他の理由で治療が中止される前に、2種以上の治療が送達されることを意味する。いくつかの実施形態では、第1の治療の送達が、第2の送達の開始時に引き続き行われているため、投与面で重複がある。これを本明細書で「同時」または「同時送達」と称することもある。他の実施形態では、第1の治療の送達は、他の治療の送達が開始される前に終了する。いずれの場合のいくつかの実施形態においても、投与の組み合わせにより、治療の有効性は高まる。例えば、第1の治療をせずに第2の治療が投与された場合に認められるもの、または類似の状況が第1の治療により認められるものよりも、第2の治療が有効である、例えば、第2の治療を減らしても同等の効果が認められるか、または第2の治療で症状が大幅に軽減する。いくつかの実施形態では、送達は、症状、または疾患に関連する他のパラメーターの軽減が、他方の治療をせずに送達される一方の治療で観察されるであろうものよりも大きいような送達である。2種の治療の効果は、部分的に相加的、完全に相加的、または相加を超える場合がある。送達は、送達された第1の治療の効果が、第2の治療が送達されるときに引き続き検出可能であるような送達であり得る。

10

20

【0324】

いくつかの実施形態では、「少なくとも1種の追加治療薬」は、改変T細胞を含む。また、同じかもしくは異なる標的抗原、または同じ標的抗原上の同じかもしくは異なるエピトープに結合する複数のTFPを発現するT細胞も提供される。T細胞の第1のサブセットが第1のTFPとTCRアルファ及び/またはベータ定常ドメインを発現し、T細胞の第2のサブセットが第2のTFPとTCRアルファ及び/またはベータ定常ドメインを発現するT細胞の集団も提供される。

30

【0325】

本明細書に記載の改変T細胞と、少なくとも1種の追加治療薬とは、同時に、同じ組成物かもしくは別々の組成物で、または逐次的に投与することができる。逐次投与の場合、本明細書に記載の改変T細胞を最初に投与し、追加薬剤を2番目に投与しても、または投与の順序を逆にしてもよい。

【0326】

さらなる態様では、本明細書に記載の改変T細胞は、手術、化学療法、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレート、及びFK506などの免疫抑制剤、抗体、またはアテムツズマブなどの他の免疫除去薬、抗CD3抗体、または他の抗体療法、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、タクロリムス、ラバマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、ロミデプシン、サイトカイン、及び照射、Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971に記載されるようなペプチドワクチンと併用して治療レジメンに使用することができる。

40

【0327】

一実施形態では、改変T細胞の投与に伴う副作用を軽減または改善する薬剤を対象に投与することができる。改変T細胞の投与に伴う副作用として、サイトカイン放出症候群(CRS)及び血球貪食性リンパ組織球症(HLH)、別称マクロファージ活性化症候群(

50

M A S) が挙げられるが、これらに限定されない。C R S の症状として、高熱、悪心、一過性低血圧、低酸素症などが挙げられる。したがって、本明細書に開示される方法は、本明細書に記載の改変 T 細胞を対象に投与すること、及び改変 T 細胞を用いた治療により生じる可溶性因子のレベル上昇を管理する薬剤をさらに投与することを含み得る。一実施形態では、対象において上昇する可溶性因子は、I F N - 、T N F 、I L - 2、及び I L - 6 のうちの 1 つ以上である。したがって、この副作用に対処するために投与される薬剤は、これらの可溶性因子の 1 つ以上を中和する薬剤であり得る。そのような薬剤として、ステロイド、T N F の阻害剤、及び I L - 6 の阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。T N F 阻害剤の例はエタネルセプトである。I L - 6 阻害剤の例はトシリズマブ (t o c) である。

10

【 0 3 2 8 】

一実施形態では、改変 T 細胞の活性を増強する薬剤を対象に投与することができる。例えば、一実施形態では、薬剤は抑制分子を阻害する薬剤であり得る。抑制分子、例えばプログラム死 1 (P D 1) は、いくつかの実施形態では、改変 T 細胞が免疫エフェクター応答を高める能力を低下させることができる。抑制分子の例として、P D 1、P D - L 1、C T L A 4、T I M 3、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、及び T G F R ベータが挙げられる。例えば、D N A、R N A、またはタンパク質レベルでの阻害による抑制分子の阻害は、改変 T 細胞の性能を最適化することができる。各実施形態では、阻害性核酸、例えば阻害性核酸、例えば d s R N A、例えば s i R N A または s h R N A を使用して、T F P 発現細胞における抑制分子の発現を阻害することができる。ある実施形態では、阻害剤は s h R N A である。ある実施形態では、抑制分子は、改変 T 細胞内で阻害される。これらの実施形態では、抑制分子の発現を阻害する d s R N A 分子が、T F P の構成要素、例えば構成要素のすべてをコードする核酸に連結される。一実施形態では、抑制シグナルの阻害剤は、例えば、抑制分子に結合する抗体または抗体断片であり得る。例えば、薬剤は、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、または C T L A 4 に結合する抗体または抗体断片であり得る (例えば、イピリムマブ (別称 M D X - 0 1 0 及び M D X - 1 0 1、Y e r v o y (商標)として市販、B r i s t o l - M y e r s S q u i b b、トレメリムマブ (P f i z e r から入手可能な I g G 2 モノクローナル抗体、旧称チシリムマブ、C P - 6 7 5 , 2 0 6))。ある実施形態では、薬剤は、T I M 3 に結合する抗体または抗体断片である。ある実施形態では、薬剤は、L A G 3 に結合する抗体または抗体断片である。

20

30

【 0 3 2 9 】

いくつかの実施形態では、改変 T 細胞の活性を増強する薬剤は、例えば、第 1 のドメインと第 2 のドメインとを含む融合タンパク質であり得、その場合、第 1 のドメインは抑制分子またはその断片であり、第 2 のドメインは、陽性シグナルに関連するポリペプチド、例えば、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドである。いくつかの実施形態では、陽性シグナルに関連するポリペプチドは、C D 2 8、C D 2 7、I C O S の共刺激ドメイン、例えば C D 2 8、C D 2 7、及び / または I C O S の細胞内シグナル伝達ドメイン、及び / または例えば C D 3 ゼータの一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載のものを含み得る。一実施形態では、融合タンパク質は、T F P を発現するものと同じ細胞によって発現される。別の実施形態では、融合タンパク質は、抗 C D 1 9 T F P を発現しない細胞、例えば T 細胞によって発現される。

40

【実施例】

【 0 3 3 0 】

本発明を、以下の実験実施例を参照してさらに詳細に説明する。これら実施例は、例示説明のみを目的として提供するものであり、特に指定のない限り、限定的であることを意図しない。したがって、本発明は、いかなる場合も以下の実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書に示す教示の結果として明らかにされるすべてのいかなる変更をも包含すると解釈されるべきである。さらなる説明がなくても、当業者は、前述の説明及び以下の例示的な実施例を用いて、本発明の化合物を作製して利用し、請求さ

50

れる方法を実施することができると考えられる。以下の実施例は、本発明の種々の態様を具体的に示すものであり、いかなる場合においても本開示のそれ以外の部分を限定するものとみなされるべきではない。

【0331】

実施例1～5の背景

T細胞受容体(TCR)が認識する外来抗原は、小さなペプチドとして処理され、抗原提示細胞(APC)表面の主要組織適合複合体(MHC)分子に結合されている。T細胞受容体(TCR)複合体は、T細胞受容体のアルファ及びベータサブユニット(TCR /)またはガンマ及びデルタサブユニット(TCR)、ならびにCD3二量体のCD3 / 、CD3 / 、CD3 / を含むグループ化した二量体によって形成される。T細胞受容体アルファ定常(TRAC)及びT細胞受容体ベータ定常(TRBC)遺伝子は、それぞれTCR 及びTCR の定常C末端領域をコードする。

10

【0332】

TCR定常領域(複数可)の破壊は、細胞表面へのTCR またはTCR の移行を遮断し、それによりTCR受容体複合体のアセンブリを阻害する。TCR受容体全体のアセンブリを阻害するには、TCR またはTCR の移行を減じるだけで十分である。したがって、TCR複合体の不活性化は、clustered regularly interspaced short palindromic repeat(CRISPR)法、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、またはメガヌクレアーゼを使用する遺伝子編集法を用いて、TRACまたはTRBC遺伝子を標的化することにより行うことができる。ただし、CD3 またはCD3 またはCD3 融合タンパク質に基づくTFP T細胞には、機能的TCR複合体に組み込むTCR / の表面発現を必要とする。

20

【0333】

受容体抗原によるドナーT細胞の表面でのTCR複合体の活性化(すなわち、抗原提示細胞の主要組織適合複合体(MHC)によって提示される抗原の認識)は、移植片対宿主病(GvHD)及びサイトカイン放出症候群(CRS)などの望ましくない作用を引き起こす可能性がある。したがって、以下の実施例は、TCR またはTCR の短縮型をコードする導入遺伝子をTCRノックアウト細胞に導入する方法、及び自己切断シグナル(例えば、T2A)によって分離された融合タンパク質自体について記載する。一実施形態では、TCR またはTCR の短縮型は、TCR またはTCR の膜貫通ドメイン及び結合ペプチドドメイン(CP)を含む。別の実施形態では、TFPの抗原結合ドメインは、短縮型または全長TCR 及び / またはTCR のN末端に融合される。

30

【0334】

実施例1.crrRNA(CRISPR RNA)の設計

TRACを不活性化するcrrRNAを、DeskGen(商標)CRISPRライブラリーウェブサイト(www.deskgen.com)で公開されている「Dunne 2017」アルゴリズムを用いて設計した。TRAC遺伝子座と結合するいかなるcrrRNAも、TRAC遺伝子の二本鎖切断を効率的に生じさせることができる。CRISPRエンドヌクレアーゼのオフターゲット活性を最小限に抑えるため、使用したcrrRNAはオフターゲットスコアが90%超であり、Genome Reference Consortium Humanゲノムビルド38(GRCh38/hg38)ゲノム内の最も近似する相同配列とのミスマッチが少なくとも3つ含まれる。好ましい実施形態では、1つのミスマッチは、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の8bp上流に位置する。表1～2は、TRAC遺伝子を不活性化するために選択された例示的なcrrRNA配列(表1)及び予測されるオフターゲット活性(表2)を示している。

40

【0335】

【表 1】

表 1 : T R A 遺伝子を不活性化するために選択された c r R N A :

ID	crRNA	PAM	標的	ゲノム位置	オフターゲットスコア (%)
TRAC1-4894	TCTCTCAGCTGGTACACGGC	AGG	TRAC1	chr14: 22547526 - 22547545	94
TRAC2-4598	CTCGACCAGCTTGACATCAC	AGG	TRAC2	chr14: 22549647 - 22549666	98
TRAC3-2998	GATTAAACCCGGCCACTTTC	AGG	TRAC3	chr14: 22550612 - 22550631	98

10

【 0 3 3 6 】

【表 2】

表 2：予測されるオフターゲット部位。オンターゲットとオフターゲットのミスマッチを太字で示す

crRNA	オフターゲット	PAM	ミスマッチ	エキソン	ゲノム位置
TRAC1 - 4894	TCCCTCAGCTGGTAC AGGA	TGG	3, 17, 20	あり	chr1: 186070730 - 186070753
	TCT GTCA ACTGGTACATGGC	AAG	4, 8, 17	なし	chrX: 83244396 - 83244419
	TCTCATAGCTGGTACATGGC	GGG	5, 6, 17	なし	chr15: 100865579 - 100865602
	T TTCT CAGCTGGTACATGG A	GGG	2, 17, 20	なし	chr1: 247923608 - 247923631
	GCACT CAGCTGGTAC CCGGC	AAG	1, 3, 16	なし	chr16: 8713603 - 8713626
	T CACT CAGCTGGTACATGG G	CAG	3, 17, 20	なし	chr4: 130310607 - 130310630
	TCT CC CAGCTGGGACACGG T	GAG	5, 13, 20	なし	chr1: 55167399 - 55167422
	T CAAT CAGCTGGT GC ACGGC	TGG	3, 4, 14	なし	chr1: 236924538 - 236924561
	TCT AC CAGCTGATATA CGGC	TGG	5, 12, 15	なし	chr12: 49641344 - 49641367
TRAC2 - 4598	CTCC ACCACCTTGAC CTCAC	CGG	4, 9, 16	あり	chr10: 102422239 - 102422262
	CTCA ACCAG AAT <u>GACATCAC</u>	CAG	4, 10, 11	なし	chr2: 55715822 - 55715845
	CTAG ACCAGCTTGAC CTCCC	CAG	3, 16, 19	なし	chr4: 89585943 - 89585966
	CTAG ACCAGCTT GGCA ACAC	AGG	3, 14, 17	なし	chr5: 82123725 - 82123748
TRAC3 - 2998	GAATAAA ACCGGCCACT TTG	GGG	3, 8, 20	なし	chr5: 128101267 - 128101290
	GATT TACCTGGCCAC ATTC	AAG	6, 10, 17	なし	chr2: 145719958 - 145719981

【0337】

TRBを不活性化するcrRNAを、上記のDunne 2017アルゴリズムを用いて設計した。TCRの定常領域は2つの遺伝子、すなわちTRBC1とTRBC2によってコードされているため、crRNAはTRBC1とTRBC2双方の同一配列に誘導される。その結果、DeskGen(商標)によって生成されるオフターゲットスコアは94%未満である。ただし、TRBC1とTRBC2の標的化を除き、crRNAとGR

10

20

30

40

50

C h 3 8 / h g 3 8 ゲノムとの間の他の相同配列は少なくとも3つのミスマッチをもつ。好ましい実施形態では、これらのミスマッチのうち1つは、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) の 8 b p 上流に局在する。表 3 ~ 4 は、 T R B 遺伝子を不活性化するために選択された例示的な c r R N A 配列 (表 3) 及び予測されるオフターゲット活性 (表 4) を示している。

【 0 3 3 8 】

【 表 3 】

表 3 : T R B 遺伝子を不活性化するために選択された c r R N A

ID	crRNA	PAM	標的	位置	オフターゲットスコア (%)
TRBC-44345	ACACTGGTGTGCCTGGC	AGG	TRBC1	chr7: 142801121 - 142801140	45
	CAC		TRBC2	chr7_KI270803v1_alt: 814747 - 814766	
TRBC-45447a	AGGGCGGGCTGCTCCTT	GGG	TRBC1	chr7: 142791879 - 142791898	47
	GAG		TRBC2	chr7: 142801226 - 142801245	
TRBC-45246	CTGCCTGAGCAGCCGCC	GGG	TRBC1	chr7: 142791914 - 142791933	46
	TGA		TRBC2	chr7: 142801261 - 142801280	
TRBC-45447b	GCGGGGGTTCTGCCAGA	TGG	TRBC1	chr7: 142791946 - 142791965	47
	AGG		TRBC2	chr7: 142801293 - 142801312	

【 0 3 3 9 】

【表 4 - 1】

表 4 : 予測されるオフターゲット、オンターゲットとオフターゲットのミスマッチを太字で示す

crRNA	オフターゲット	PAM	ミスマッチ	エキソン	遺伝子座
TRBC-44345	ACTCTGGGCTGCCTGGCCAC	GGG	3,8,9	あり	chr14: 105601630-105601653
	ACTCTGTTGTGCCTGGACAC	CGG	3,7,17	あり	chr20: 62963310-62963333
	TCACAGGTGAGCCTGGCCAC	AGG	1,5,10	なし	chr14: 98950719-98950742
	GCACGGGTGGGCTGGCCAC	TGG	1,5,10	なし	chr12: 108839394-108839417
	GCAGGGGTGTGCCTGGCCAC	TGG	1,4,5	なし	chr16: 3010877-3010900
	ATCCTGCTGTGCCTGGCCAC	AGG	2,3,7	なし	chr6: 37655368-37655391
	TCTCTGGTGTGCCTGGCCAA	GAG	1,3,20	なし	chrX: 138046658-138046681
	ACACATGTGGGCTGGCCAC	GGG	5,6,10	なし	chr16: 2438272-2438295
	AGCCTGGTGTGTCTGGCCAC	TGG	2,3,12	なし	chr2: 162055950-162055973
	CCTCTGGTGTGCCTGGCCCC	AGG	1,3,19	なし	chr2: 239228091-239228114
	CCACTTGTGTGCATGGCCAC	TAG	1,6,13	なし	chr1: 101657244-101657267
	ATAATGGTGTGCCTGGCAAC	TAG	2,4,18	なし	chr1: 230924183-230924206
	ACACTGGCCTGCCTGGGCAC	TAG	8,9,17	なし	chr1: 155926881-155926904
	AGCGCGGGCTCCTCCTTGAC	GGG	3,11,20	あり	chr8: 143598506-143598529
	AGGGCCTGCTGCTCCTTCAG	CAG	6,7,18	あり	chr3: 45030894-45030917
	AGGGCTGACAGCTCCTTGAG	TGG	6,8,10	なし	chr20: 683139-683162
	GGGGTGGGCTGCTCCTGGAG	CAG	1,5,17	なし	chr20: 63440195-63440218
	AGAGCGGCCTGCTCCTCGAG	GGG	3,8,17	なし	chr17: 50124057-50124080

【表 4 - 2】

TRBC-45447a	GGGGTGGGCTGCACCTTGAG	GGG	1,5,13	なし	chr12: 3189255-3189278	
	AAGGCAGGCTCCTCCTTGAG	AGG	2,6,11	なし	chr5: 176733401-176733424	
	AGGAAGGGCTGCTCTTTGAG	GAG	4,5,15	なし	chr10: 100783415-100783438	
	AGGCTGGGCTGCTCTTTGAG	CAG	4,5,15	なし	chr1: 226617392-226617415	10
	AGTGCCGGCTGCTCCTGGAG	TGG	3,6,17	なし	chr15: 74624787-74624810	
	AGGGTGGGGTGCTCCTCGAG	GGG	5,9,17	なし	chr7: 99165433-99165456	
	TGGGCTGGCTGCACCTTGAG	TAG	1,6,13	なし	chr12: 92396203-92396226	
	TGGGCGGGCTGTTCCTTGGG	GAG	1,12,19	なし	chr5: 179287136-179287159	20
TRBC-45246	CTTCCTGAGCAGCCGCTGTC	AGG	3,16,20	あり	chr5: 177525051-177525074	
	CTGCCTGAGCAGCTGCCACA	AGG	14,18,19	あり	chr21: 42085445-42085468	
	CAGCGTTAGCAGCCGCCTGA	GGG	2,5,7	なし	chr6: 24719514-24719537	
	CACCCAGAGCAGCCGCCTGA	CAG	2,3,6	なし	chr8: 58226030-58226053	30
	CTGCCTGGGAAGCCGCCTGC	CAG	8,10,20	なし	chr1: 41873106-41873129	
	CTGCCTCCTCAGCCGCCTGA	GGG	7,8,9	なし	chr15: 89663036-89663059	
	CTGTCTGACCAGCCGCCTGC	CGG	4,9,20	なし	chr1: 9401937-9401960	
	CAGCCTGAGCTGCCGCCTGC	GGG	2,11,20	なし	chr17: 36923765-36923788	40

【 0 3 4 1 】

【表 4 - 3】

	CAACCTGAGCAGCCTCTGA	GAG	2,3,15	なし	chr8: 127075998-127076021	
	CTCCCTGATCAGCCGCATGA	GGG	3,9,17	なし	chr20: 63598726-63598749	
	CGGCCGGAGCAGCCGCCTCA	GGG	2,6,19	なし	chr1: 204685196-204685219	
	CTGCCTCAACATCCGCCTGA	AAG	7,9,12	なし	chrX: 58268037-58268060	10
TRBC-44547b	GTTGGGATTCTGCCAGAAGG	CAG	2,3,7	なし	chr17: 52505137-52505160	
	GAGGGGGCCTGCCAGAAGG	AGG	2,8,9	なし	chr8: 1547518-1547541	
	GCGGAAGATCTGCCAGAAGG	GGG	5,6,8	なし	chr16: 1946717-1946740	
	GGTGGGGTTCTGCCAGGAGG	AGG	2,3,17	なし	chr9: 135224974-135224997	20
	GCGGGGGATGTGCCAGGAGG	AGG	8,10,17	なし	chr11: 62414927-62414950	
	GAGGGGATTCTGCCAGCAGG	CGG	2,7,17	なし	chr5: 133192714-133192737	
	GAGGGGGTCTGCCAGCAGG	GAG	2,9,17	なし	chr6: 13415078-13415101	
	GAGGGTGTCTGCCAGCAGG	CAG	2,6,17	なし	chr8: 23039425-23039448	30
	GCAGGGGTTCCAGCCAGGAGG	CAG	3,11,17	なし	chr11: 60938213-60938236	
	GAGGGGGTTCAGACAGAAGG	CAG	2,11,13	なし	chr18: 13654430-13654453	
	GCAGGGGTTCTCCAGTAGG	CAG	3,12,17	なし	chr3: 18516713-18516736	
	GTGGGGGTTCTGCCAGCAGC	TGG	2,17,20	なし	chr17: 68030673-68030696	40

【 0 3 4 2 】

実施例 2 : Jurkat 細胞での内因性 TCR または の編集

Jurkat 細胞における TRA または TRB 遺伝子の不活性化を、TRA または TRB 遺伝子に対する SpCas9 リボ核タンパク質 (RNP) のエレクトロポレーションによって行った。細胞はエレクトロポレーションするまで、1 mL あたり 0.2×10^6 細胞で、10% ウシ胎仔血清 (FBS) 及び 300 mg/L の L-グルタミンを補充した RPMI 1640 培地中に保持した。TRA または TRB 遺伝子を標的とする SpCas9 リボ核タンパク質を、TRAC (TRAC2-4598) または TRBC (TRBC-44345) のいずれかを標的とする crRNA と、tracrRNA とを分子比 1 : 1

でアニールすることにより調製した。アニールされた二重鎖を分子比1.5:1でSpCas9タンパク質と混合した。0.61 μ MのRNPを 2.5×10^6 個のT細胞と混合し、Neon Transfection System (ThermoFisher)に関する製造業者のプロトコルに従ってエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションは1600V、10ms、3パルスに設定した。パルスをかけた後、細胞を直ちに温培地に移し、37 $^{\circ}$ Cで3日間インキュベートした。

【0343】

フローサイトメトリーによりTCR α 及びCD3の表面発現の減少を観察することにより、編集効果を評価した。結果をTRA編集細胞(左パネル)及びTRB編集細胞(右パネル)として図2に示す。編集したJurkat細胞を、磁気細胞分離法(MACS、Miltenyi Biotec)細胞分離システムによって精製した。編集したJurkat細胞を、抗TCR α IP27 (eBioscience #17-9986-42)抗体及び抗CD3 SK7抗体(eBioscience #25-0036-42)に対して陰性に選択した。TCR α またはCD3を表面に発現している細胞を、MACS MS(型番#130-041-301)またはLS(型番#130-041-306)カラムに固定するとともに、TCR α 及びCD3の両方に対して陰性である、編集したJurkat細胞をカラムフロースルーで回収し、上記に指定した培地中 0.4×10^6 細胞/mLで培養液中に保持した。

10

【0344】

実施例3. ヒトT細胞の編集

次に、ヒトドナー由来の初代T細胞においてTRAまたはTRB遺伝子を不活性化する。エレクトロポレーションの2~4日前に、10%のヒト血清(hAB、Valley Biomedical HP 1022)及び $300 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL2 (Petrotech #200-02)を補充したCTS optimizer培地(Gibco #A1022101)中の1:1比のCD3/CD28(Gibco #11132D)に特異的なDynabeads(登録商標)ヒトT細胞活性化因子ビーズを用いてT細胞を活性化した。TRAまたはTRB遺伝子を標的とするSpCas9リボ核タンパク質(RNP)を、TRAC(TRA C2-4598)またはTRBC(TRBC-44345)のいずれかを標的とするcrRNAとtracrRNAを分子比1:1でアニールすることにより調製した。アニールされた二重鎖を分子比1.5:1でSpCas9タンパク質と混合した。0.61 μ MのRNPを 2.5×10^6 個のT細胞と混合し、Neon Transfection Systemに関する製造業者のプロトコルに従ってエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションは1600V、10ms、3パルスに設定した。10%hAB(Valley Biomedical #HP1022)、 $300 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL2 (Petrotech #200-02)、 $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL7 (R&D System #207-IL-010)を含む温培地(CTS Optimizer (Gibco #A1048501)に細胞を直ちに移し、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートして、編集したT細胞を約3~5日の倍加時間で増殖させた。フローサイトメトリーによりTCR α 及びCD3の表面発現の減少を測定することにより、編集効果を評価した。編集したT細胞を、製造業者に従い、磁気細胞分離法(MACS(登録商標)、Miltenyi Biotec)細胞分離システムを使用して精製し、抗TCR α IP27抗体(eBioscience #14-9986-82)及び抗CD3 SK7抗体(eBioscience #16-0036-81)に対して陰性に選択した。TCR α またはCD3を表面に発現している細胞を、MACS MS(型番#130-041-301)またはLS(型番#130-041-306)カラムに固定するとともに、TCR α 及びCD3の両方に対して陰性である、編集したT細胞をカラムフロースルーで回収し、上記に指定した培地中 10^6 細胞/mLで培養液中に保持した。結果を図3に示す。

20

30

40

【0345】

実施例4: TCR陰性T細胞の同種性

50

混合リンパ球反応 (MLR) アッセイを使用して、TCR ノックアウト (KO) 細胞の同種性について評価した。カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CSFE) 標識色素をTCR 及びTCR KO T細胞に組み込み、続いてHLA一致 (自己反応) ドナーまたは不一致 (同種反応) ドナー (それぞれドナー1及び2) からの増殖停止したPBMC (Streck, Inc.) と細胞を1:1比で共培養した。5 ng/mLのホルボールミリストアセテート (PMA) 及び500 ng/mLのイオノマイシンを、独立したTCR刺激に対する陽性対照として使用した。またプレートに結合した抗CD3 を、TCR 及びTCR ノックアウトT細胞におけるTCR受容体の欠損を確認するための間接的な対照として使用した。ドナーT細胞の増殖を、CSFEの減少によってモニタリングした。刺激なしの24時間のインキュベーション後に増殖の基礎レベルを測定し、5日間のインキュベーション期間後に再びレベルを測定した。CSFE色素は細胞分裂時に半分に希釈されるため、T細胞で発生した増殖の量を評価し、HLA一致ドナー対照及び不一致ドナー対照と比較した。結果を図4に示す。

10

【0346】

TCR 及びCD3 の表面発現を実施例2に記載のように、Jurkat T細胞 (図9A~C) 及びドナーT細胞 (図10A~B) について分析した。図9A~Cは、野生型細胞 (図9A)、形質導入を伴わないTRB KO細胞 (図9B)、TCR 全長 (FL) TFPの形質導入を伴うTRB KO細胞 (図9C) におけるCD3対TCR の表面発現を示す。CD3及びTCR が陰性-陰性の細胞集団を視覚化するゲートがプロットに描かれ、各四分区間にある細胞の比率が4隅に示されている。

20

【0347】

図10A~Bは、短縮型ヒトTRBC遺伝子 (図10A) 及びマウスTRAC-T2A-TRBC遺伝子 (図10B) を形質導入したTRBノックアウト細胞におけるCD3対TCR の表面発現を示す。CD3及びTCR が陰性-陰性の細胞集団を視覚化するゲートがプロットに描かれ、各四分区間にある細胞の比率が4隅に示されている。

【0348】

実施例5: TCR陰性細胞におけるT細胞受容体融合タンパク質の発現

TRAまたはTRBの不活性化は、すべてのTCRサブユニットの細胞表面への移行を遮断する。その結果、外因性TRAまたはTRB導入遺伝子が、それぞれTRA^{-/-}またはTRB^{-/-}細胞で発現され、機能的TFP T細胞が得られる。

30

【0349】

Jurkat細胞の形質導入

TFP導入遺伝子を、例えば、同時係属中の米国特許公開第2017-0166622号に記載されているように、レンチウイルスを使用してJurkat細胞に導入した。Jurkat細胞を感染多重度 (MOI) 5でウイルスとインキュベートした。24時間のインキュベーション後、培地を交換した。形質導入の有効性及びTFPの発現を、対象となるTFP結合因子に特異的なリガンドを使用したフローサイトメトリー、及び/またはTCR 及びCD3 の表面発現により評価した。

【0350】

T細胞の形質導入

TFP導入遺伝子を、例えば、同時係属中の米国特許公開第2017-0166622号に記載されているように、レンチウイルスを使用してT細胞に導入した。T細胞を感染多重度 (MOI) 5のウイルス、さらに5 µg/mLのポリブレンと600 gで100分間遠心分離した。24時間の遠心分離後、培地を交換した。形質導入の有効性及びTFPの発現を、対象となるTFP結合因子に特異的なリガンドを使用したフローサイトメトリー、及び/またはTCR 及びCD3 の表面発現により評価した。

40

【0351】

ヒトTCR / TFPの発現

TCR 陰性細胞は依然としてTCR を発現し、逆にTCR はTCR 陰性細胞で発現される。したがって、TCR TFPをTRA^{-/-}細胞で発現させ、TCR

50

T F PをT R B - / - 細胞で発現させた。T C R / 及びT C R / T F Pの複数の形式をT C R 陰性細胞において試験し、T C R 複合体全体の移行を復元するための最適な構造を決定した(図5)。T C R / 全長(F L) T F Pを、いずれかの可変エキソン(V)といずれかの接合部エキソン(J)とをアセンブリし、続いてT C R 遺伝子座からの定常エキソンのすべてをアセンブリすることにより作製した。一実施形態では、多様なエキソンドをVとJとの間に配置することができ得る。場合により、変異またはインデルを各エキソンの接合部に付加して、組換え活性化遺伝子(R A G)酵素の活性を模倣することができ得る。T R A V残基を、国際的なI m M u n o G e n e T i c s i n f o r m a t i o n s y s t e m (I M G T、i m g t . o r g)に従って列挙する。

T R A - / - 細胞で発現したT C R (F L) F M C 6 3 T F P
 N t - F M C 6 3 - T R A (V 1 3 - 1 (1 - 2 5 6) ; J 1 3 ; C) - C t
 N t - F M C 6 3 - T R A (V 8 - 1 ; J 2 0 ; C) - C t
 N t - F M C 6 3 - T R A (V 2 9 D V 5 ; J 4 4 ; C) - C t
 T R A - / - 細胞で発現した短縮型T C R T F P
 N t - F M C 6 3 - T R A (V 1 3 - 1 (3 3 - 2 5 6) ; J 1 3 ; C) - C t
 N t - F M C 6 3 - T R A (V 1 3 - 1 (1 0 5 - 2 5 6) ; J 1 3 ; C) - C t

【0352】

T R A - / - 細胞で発現した短縮型T C R、T R A C残基を、国際的なI m M u n o G e n e T i c s i n f o r m a t i o n s y s t e m (I M G T、w w w . i m g t . o r g)に従って付番する。

N t - T R A C 7 - 1 7 4 - C t
 N t - T R A C 1 2 8 - 1 7 4 - C t
 T R B - / - 細胞で発現したT C R (F L) F M C 6 3 T F P
 N t - F M C 6 3 - T R B (V 9 ; J 1 - 1 ; C 1) - C t
 N t - F M C 6 3 - T R B (V 7 - 9 ; J 1 - 5 ; C 1) - C t
 N t - F M C 6 3 - T R B (V 5 - 1 ; J 2 - 2 ; C 1) - C t

【0353】

T R B - / - 細胞で発現した短縮型T C R T F P、T R B C残基は上記の国際I M G T i n f o r m a t i o n s y s t e mに従って付番する。

N t - F M C 6 3 - T R B C 1 (- 8) - 1 7 3 - C t
 N t - F M C 6 3 - T R B C 1 1 2 2 - 1 7 4 - C t
 N t - F M C 6 3 - T R B C 1 1 2 7 - 1 7 4 - C t

【0354】

短縮型ヒトT C R / T F Pの発現

T C R とT C R 両方の定常ドメインの過剰発現は、T C R 複合体全体の細胞表面への移行を促進するのに十分であり得る。これを試験するため、2 A自己切断型ペプチドによって分離されるT C R 及びT C R の定常ドメインをコードするT R P導入遺伝子を設計した。一実施形態では、T F P結合因子はT R A C及び/またはT R B CのN末端に融合される。別の実施形態では、T F Pは、C D 3分子に融合され、T R [A / B] C導入遺伝子とは独立して発現する。

【0355】

短縮型マウスT C R / T F Pの発現

ヒトT C R定常領域は、それらのマウスホモログと互換性がある。加えて、マウスT C R定常領域は、ヒト細胞での発現時にC D 3 / T C R複合体の安定性を高める。そこで、2 A自己切断型ペプチドによって分離されるマウスT C R 及びT C R の定常ドメインをコードするT F P導入遺伝子を設計した。一実施形態では、T F P結合因子はm T R A C及び/またはm T R B CのN末端に融合される。別の実施形態では、T F P結合因子は、C D 3分子に保持され、m T R [A / B] C導入遺伝子とは独立して発現する。

T R A - / - またはT R B - / - 細胞で発現するm T R [A / B] C導入遺伝子

N t - F M C 6 5 - m T R A C 1 1 4 - 1 6 9 - T 2 A - m T R B C 1 2 3 - 1 7 3 - C

10

20

30

40

50

t

N t - m T R A C _{1 1 4} - _{1 6 9} - T 2 A - m T R B C _{1 2 3} - _{1 7 3} - C t

【0356】

マウス化ヒトTCR / TFPの発現

ヒトTCR 及びTCR の定常領域間の親和性を増加させるために、ヒトTCR 残基がマウスTCRで置換されている一連の配列を設計した。置換を、TCR の定常領域に導入し、それらの置換は、残基P90S、E91D、S92V、S93Pを含む。TCR の定常領域に導入された置換は、E11K、S15A、F129I、E132A、Q135Hであった。このような置換により、TRAC及びTRBCはTCR複合体全体の細胞表面への移行に十分なものとなった。したがって、導入遺伝子N t - F M C 6 3 - T R A C (- 7) - _{1 7 4} P 9 0 S , E 9 1 D , S 9 2 V , S 9 3 P - T 2 A - T R B C 1 (- 8) - _{1 7 3} E 1 1 K , S 1 5 A , F 1 2 9 I , E 1 3 2 A , Q 1 3 5 H - C t によってT R A - / - またはT R B - / - 細胞でTFPを発現させた。

10

【0357】

増強されたTCR TFPの発現

ヒトTCR 複合体のいくつかの構造は、タンパク質データバンク(PDB)に公開されている。このような構造は、TCR / TCR の相互作用に関与する残基、およびTRBCに近似するが、TCR / TCR の相互作用には関与しない、TRACの他の残基を強調する。したがって、V22W、F85.5E、T84D、S85.1D、V84.1Wといった、TRACにおける1つ以上の置換によって、TCR に対するTCR の親和性を増強することが可能である。

20

【0358】

T R A - / - 細胞での増強されたT R A C - T F Pの発現は、TCR全体の細胞表面への移行を復元する。WT細胞において増強されたT R A C - T F Pは効率的に、TCR複合体の内因性TCR 分子の代わりとなる。増強型T R A Cは、TFP結合因子なしで発現し、TCR複合体の細胞表面への移行を効率的に復元する。その場合、TFP結合因子はCD3分子に融合され、2A自己切断型ペプチドを両方のコード配列(CDS)の間に配置することにより、増強されたT R A C導入遺伝子とは独立して、または同じ導入遺伝子に発現する。

30

【0359】

同様に、T R B Cにおける置換は、TCR / TCR 間の相互作用を増強する。個別にまたは組み合わせてT R B Cに導入される置換V22Wは、T R B - / - 細胞においてTCR全体の細胞表面への移行を復元するのに十分である。T R B - / - 細胞での増強されたT R B C - T F Pの発現は、TCR全体の細胞表面への移行を復元する。野生型細胞において増強されたT R B C - T F Pの発現は効率的に、TCR複合体の内因性TCR 分子の代わりとなる。増強されたT R B CがTFP結合因子なしで発現する場合、TFP結合因子はCD3分子に融合され、2A自己切断型ペプチドを両方のCDSの間に配置することにより、増強されたT R B C導入遺伝子とは独立して、または同じ導入遺伝子に発現する。

40

【0360】

ハイブリッドIgG / TCR / TFPの発現

TCR とTCR との間の相互作用は、TCR 及びTCR の可変ドメインをIgG定常ドメインで置換することによって増強される。したがって、IgG重鎖定常ドメインCH1をTRBCのN末端に融合し、IgG軽鎖定常ドメインCLをTRACのN末端に融合した。最後に、TFPをCLのN末端に付加した。一実施形態では、両方の構築物は、以下に示されているように、それらの間に2A自己切断型ペプチドを配置することにより、同一の導入遺伝子によってコードされる：N t - F M C 6 3 - I g G _{C L} (- 7) - _{1 2 5} - T R A C (- 6) - _{1 7 4} - T 2 A - I g G _{C H 1} (- 7) - _{1 2 2} - T R B C (- 8) - _{1 7 3}。別の実施形態では、I g G _{C L} とI g G _{C H 1} の位置が交換される。別の実施形態では、TFP結合因子はI g G _{C L} または / 及びI g G _{C H 1} のN末端に

50

融合されるか、またはCD3分子に融合され、独立して発現される。別の実施形態では、残基置換IgG_{C_L}F7A、IgG_{C_H1}A20Lを導入して、CH1/CLの相互作用を増強する。

【0361】

ドメインスワップされたTCR-TFPの発現

TCR / / / 分子は、同様の構造組織を採る。N末端では、それらのV(D)J領域は免疫グロブリン(IgV)様の立体構造を採るが、それらのC領域は免疫グロブリン(IgC)様のドメイン、続いて接続ペプチド(CP)、膜貫通ドメイン(TM)、及びC末端の短い細胞内尾部(IC)で構成される。これらの分子間の高い構造的相同性にもかかわらず、TCRはTCRとのみ対形成し、TCRはTCRとのみ対形成する。その結果、TCRのドメイン(複数可)をTCRドメイン(複数可)と、TCRのドメイン(複数可)をTCRドメイン(複数可)と交換すると、内因性TCR分子と対形成しないTFPが産生される。例えば、Nt-FMC63-IgC-CP-TM-IC-2A-IgC-CP-IC-Ctは、IgC-CP-TM-ICがIgCbCPdICdとは特異的に相互作用するが、TRA- / -細胞の内因性TCRまたはTRB- / -細胞の内因性TCRaとは相互作用しない、同種異系受容体を産生する。別の実施形態では、TFP結合因子はIgCまたは / 及びIgCのN末端に融合されるか、またはCD3分子に融合され、独立して発現される。交換されたドメインの異なる組み合わせを、本明細書で開示される方法で使用することができる。

10

20

【0362】

TCR遺伝子座における2A自己切断型ペプチドのノックイン(KI)

CPドメイン上流の自己切断シグナルをTRACまたはTRBC遺伝子にインフレームで導入すると、内因性短縮型のTCRまたはTCRが産生される。したがって、CP及びTMドメインを含む切断シグナルの下流の配列は、細胞表面に移行される。対照的に、相補性決定領域(CDR)を含む切断シグナルの上流の部分は、細胞表面に移行しない。一実施形態では、自己切断シグナルが、相同組換え修復(HDR)または一本鎖鋳型修復(ssTR)により、TRACまたはTRBC遺伝子にインフレームで挿入される。HDRはDNA一本鎖切断(SSB)またはDNA二本鎖切断(DSB)によって誘発されるが、ssTRはSSBによってのみ誘発される。一実施形態では、カスタムエンドヌクレアーゼを使用してCP領域上流にDSBを生じさせるか、ニッカーゼを使用してTRACまたはTRBCの同じ領域にSSBを生じさせる。自己切断シグナルを含む相同ドナーDNAは、内因性標的と少なくとも40塩基対(bp)の相同性を有する必要があるが、一本鎖でも二本鎖でもよく、線状でも環状であってもよい。加えて、相同ドナーDNAは、カスタムエンドヌクレアーゼまたはニッカーゼによって切断されないように複数の塩基置換を含む。一実施形態では、CD3-TFP導入遺伝子が、遺伝子編集前または後に細胞に挿入される。別の実施形態では、相同ドナーDNAは、自己切断ペプチドの下流のTFP配列をTRACまたはTRBCにインフレームでコードする。その結果、TFP-TCR融合分子は内因性TCR受容体の制御下にあり、ゲノムによって外因性プロモーターがランダムに複数挿入される危険性はない。模式図を図6に示す。

30

40

【0363】

実施例6：TFPを発現するヒトTCR陰性T細胞の細胞毒性

ルシフェラーゼを用いた細胞毒性アッセイ(「Luc-Cyto」アッセイ)は、共培養後の残存生標的細胞におけるルシフェラーゼ酵素活性を間接的に測定することにより、TFP T細胞の細胞毒性を評価するものである。

【0364】

ホタルルシフェラーゼ(Luc)発現腫瘍細胞の産生

Luc-Cytoアッセイに使用した標的細胞は、ホタルルシフェラーゼを発現するNa1m6(DSMZ型番#ACC128)及びK562((ATCC(登録商標)型番#CCL-243(商標))細胞を安定的に形質導入することにより産生された、Na1m6-Luc(CD19陽性)及びK562-Luc(CD19陰性)であった。ホタルル

50

シフェラーゼをコードするDNAは、Gene Art（登録商標）（ThermoFisher）によって合成し、シングルプロモーターレンチウイルスベクターpCDH527A-1（System Biosciences）のマルチクローニング部位に挿入した。レンチウイルスは製造業者の指示に従って封入した。次に、24時間かけて腫瘍細胞にレンチウイルスを形質導入し、ピューロマイシン（5 µg/mL）で選別した。NaIm6-Luc細胞及びK562-Luc細胞の産生の成否は、Bright-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（Promega）で細胞内のルシフェラーゼ酵素活性を測定することにより確認した。

【0365】

Allο-TFP T細胞の表現型の特性決定

同種TFP T細胞を、ヒトTCR（抗ヒトTCR、Miltenyi Bio、クローンBW242/412を用いる）、マウスTCR（抗マウスTCR、BioLegend、クローンH57-597を用いる）、ヒトCD3（抗ヒトCD3 BioLegend、クローンUCHT1を用いる）、ヒトCD4（抗ヒトCD4、BioLegend、クローンRPA-T4を用いる）、ヒトCD8（抗ヒトCD8、BioLegend、クローンSK-1を用いる）、及びTFP（ビオチン化CD19（型番#CD9-H8259、AcroBio）によるCD19結合因子FMC63の検出を用いる）の発現について調べた。比較として同じドナー由来の野生型T細胞（編集なし）を同じパネルで調べた。

【0366】

結果を図7に示す。野生型T細胞は、ヒトTCR及びCD3の表面発現を示すが、マウスTCRの表面発現は示さない。対照的に、同種TFP T細胞は、ヒトTCRの表面発現を示さず、編集の成功を表している。同種TFP T細胞でのマウスTCRの表面発現は、表面でのヒトCD3の検出と一貫しており、完全なTCR複合体の再構築の成功を示唆している。ヒトCD4及びCD8の発現については、野生型細胞とTFP T細胞との間で有意差はない。表面CD19結合因子（FMC63、配列番号X）の検出は、同種TFP T細胞でのみ観察される。

【0367】

T細胞の細胞毒性を評価するLuc-Cytoアッセイ

Luc-Cytoアッセイを、様々なエフェクター（T細胞）対標的（腫瘍細胞）（E対T）比でT細胞を腫瘍細胞と混合することにより準備した。標的細胞（NaIm6-LucまたはK562-Luc）を、10%熱不活化（HI）FBSを補充したRPMI-1640培地を入れた96ウェルプレートに1ウェルあたり10,000細胞で播種した。E対T比が3:1、1:1、または1:3になるように、同種異系TFP T細胞を1ウェルあたり30000、10000、または3333細胞で腫瘍細胞に加えた。細胞の混合物を5%CO₂と共に、37°Cで24時間インキュベートした。ルシフェラーゼ酵素活性を、T細胞と腫瘍細胞の共培養物中の残存生標的細胞からの活性を測定するBright-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（Promega）を使用して測定した。

【0368】

結果を図8に示す。同種異系TFP T細胞であるAllο CD3-TFP T細胞及びAllο mTCR-TFP T細胞は、CD19陽性腫瘍細胞NaIm6-Lucに対して頑強かつ特異的な溶解を示したが、CD19陰性腫瘍細胞K562-Lucには示さなかった。

【0369】

TFPを発現するヒトTCR陰性T細胞のMLR

混合リンパ球反応（MLR）アッセイを使用して、TFPを発現するヒトTCR陰性T細胞の同種性について評価した。不一致のPBMCドナー細胞を、CD19陰性細胞の磁気細胞分離によって、最初にB細胞枯渇させる。PBMCを親油性の細胞標識色素PKHで標識し、0.4%パラホルムアルデヒドで固定する。同時に、異なる色のPKH色素を

10

20

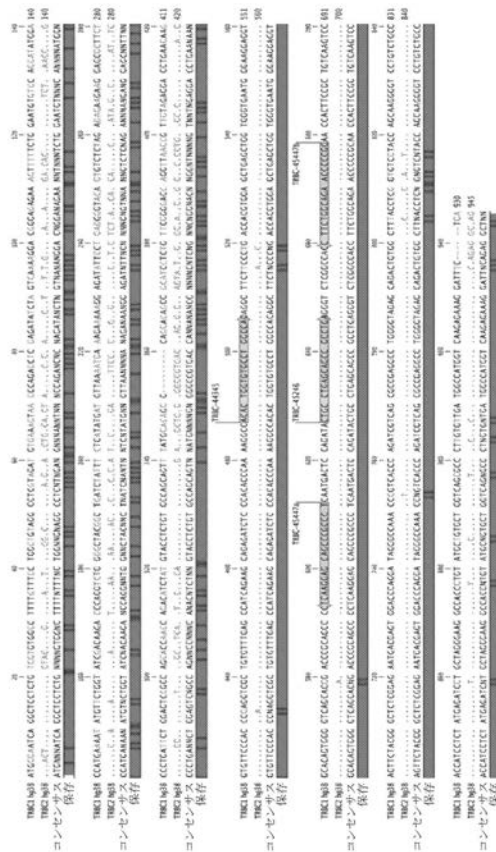
30

40

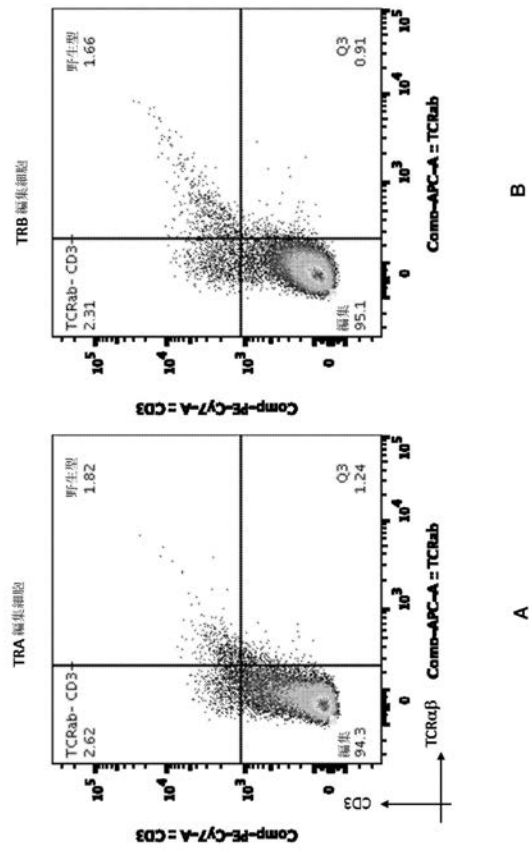
50

標的T細胞に組み込む。その後、TFPを発現するヒトTCR陰性T細胞と、同じドナーの野生型T細胞とを、1:1比(PBMC対T細胞)で共培養するか、T細胞を単独で培養する。ドナーT細胞の増殖を、6~12日の時点にわたりPKH色素を追跡することによりモニタリングする。PKH色素は細胞分裂時に半分に希釈されるため、T細胞で発生する増殖の量を評価し、野生型対照と比較する。

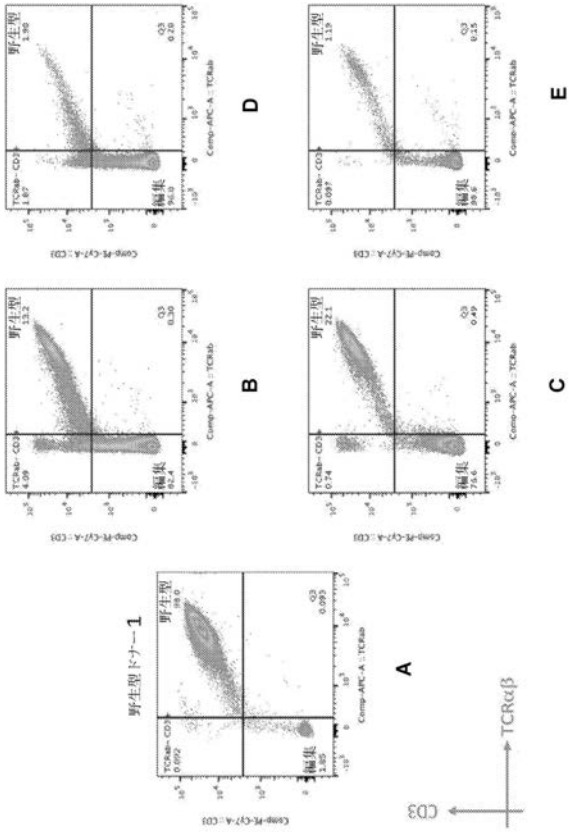
【 図 1 】



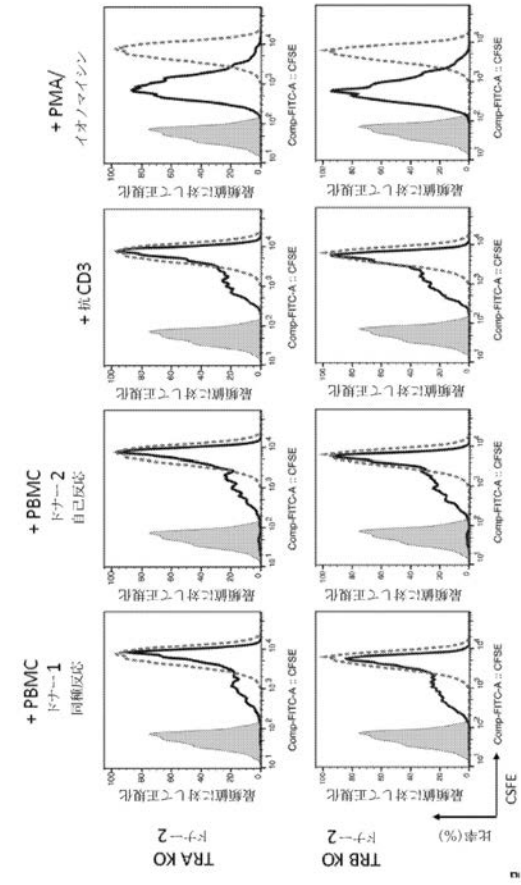
【 図 2 】



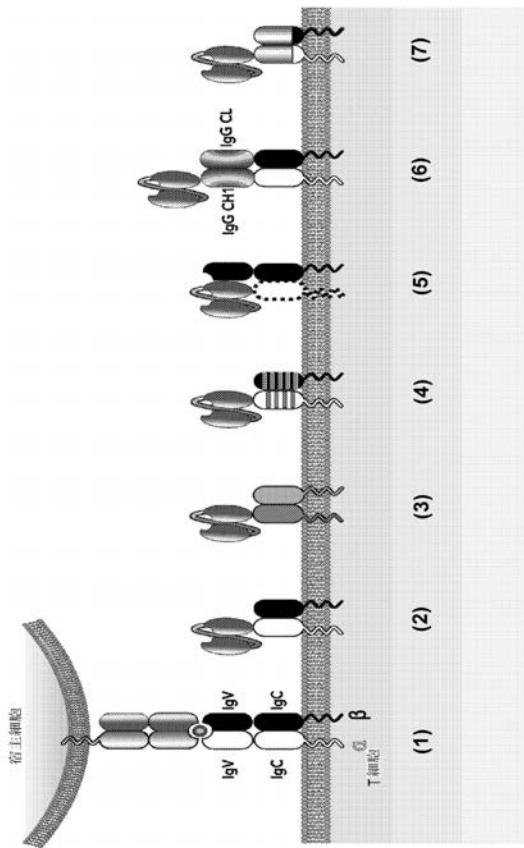
【 図 3 】



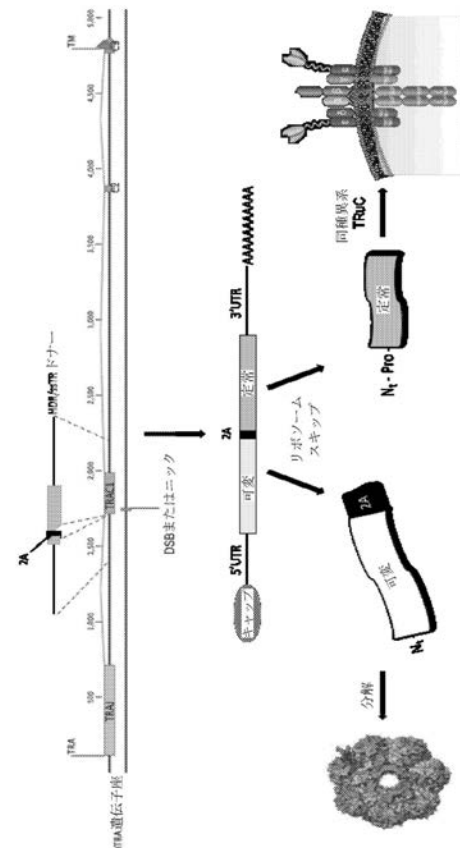
【 図 4 】



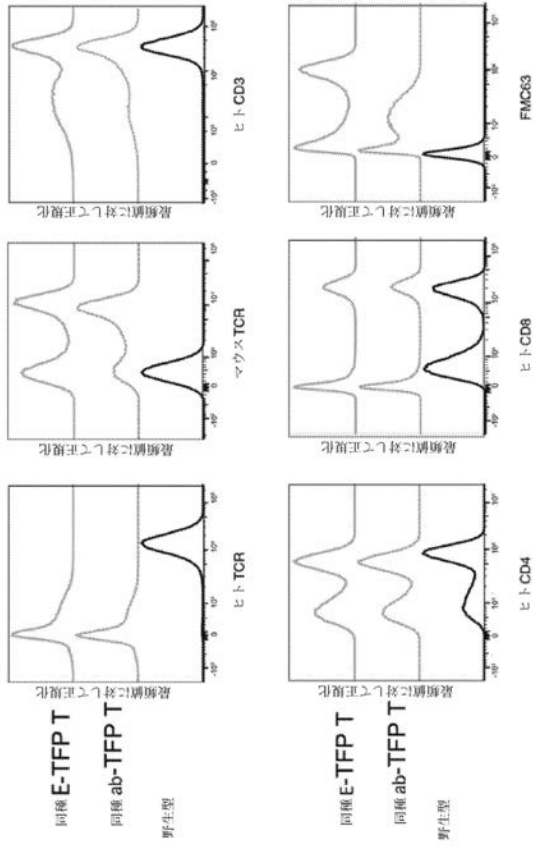
【 図 5 】



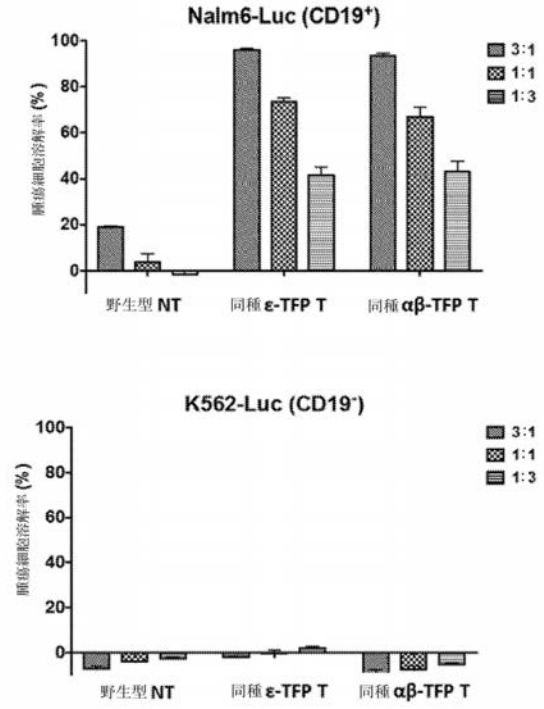
【 図 6 】



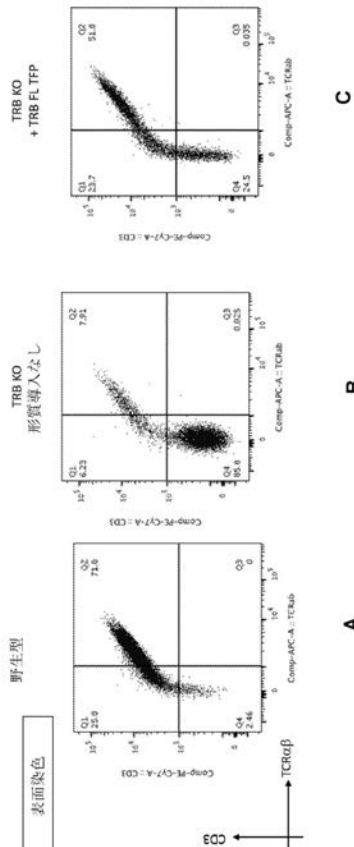
【 図 7 】



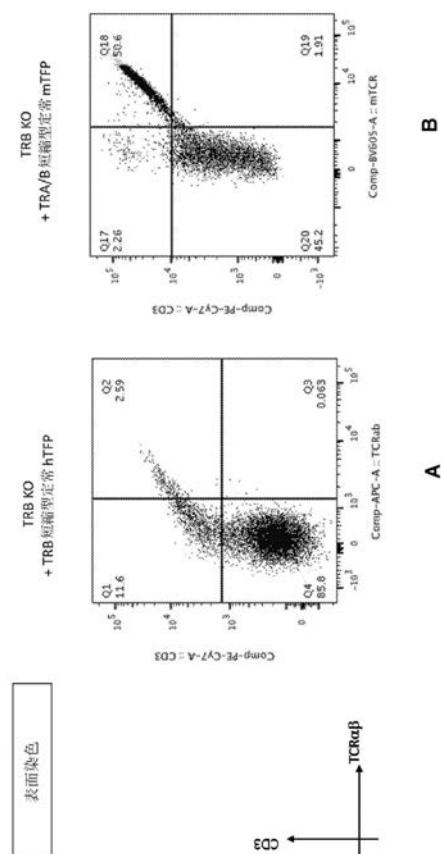
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【配列表】

2021515598000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/021315

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.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/US2019/021315

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.: 31-107
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/021315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 35/12; A61K 35/17; A61K 35/26; A61K 39/00; A61P 31/00; A61P 31/12 (2019.01) CPC - A61K 35/17; A61K 39/0011; A61K 2035/124; A61K 2039/5156; A61K 2039/585; A61P 31/00; A61P 31/12; A61P 35/00; A61P 37/00; A61P 37/06; C07K 14/7051; C07K 16/2833; C07K 2319/00; C12N 5/0636; C12N 5/0638; C12N 2501/515; C12N 2510/02; C12N 2511/00 (2019.05)		
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 USPC - 424/93.71; 424/93.21; 435/325; 435/375; 435/372.3; 506/23 (keyword delimited)		
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	US 2017/0166622 A1 (TCR2 THERAPEUTICS INC.) 15 June 2017 (15.06.2017) entire document	1-30
Y	US 2016/0120907 A1 (THE TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) 05 May 2016 (05.05.2016) entire document	1-30
Y	- NIMMERJAHN et al. "FcγRIV: a Novel FcR with Distinct IgG Subclass Specificity," Immunity, 01 July 2005 (01.07.2005), Vol. 23, No. 1, Pgs. 41-51. entire document	4
Y	US 2017/0355768 A1 (XENCOR, INC.) 14 December 2017 (14.12.2017) entire document	5
P, X	WO 2018/119298 A1 (TCR2 THERAPEUTICS INC. et al) 28 June 2018 (28.06.2018) entire document	1-30
P, X	WO 2018/098365 A2 (TCR2 THERAPEUTICS INC.) 31 May 2018 (31.05.2018) entire document	1-30
A	- BRUHNS et al. "Specificity and Affinity of Human Fc Receptors and Their Polymorphic Variants for Human IgG Subclasses," Blood, 16 April 2009 (16.04.2009), Vol. 113, No. 16, Pgs. 3716-3725. entire document	1-30
A	- D'ALOIA et al. "T Lymphocytes Engineered to Express a CD16-Chimeric Antigen Receptor Redirect T-cell Immune Responses Against Immunoglobulin G-Opsonized Target Cells," Cytotherapy, 01 February 2016 (01.02.2016), Vol. 18, No. 2, Pgs. 278-290. entire document	1-30
<input checked="" 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	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 14 May 2019	Date of mailing of the international search report 13 JUN 2019	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2019/021315
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	POIROT et al. "Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies," Cancer Research, 16 July 2015 (16.07.2015), Vol. 75, No. 18, Pgs. 3853-3864. entire document	1-30
A	VANSEGGELEN et al. "T Cells Engineered With Chimeric Antigen Receptors Targeting NKG2D Ligands Display Lethal Toxicity in Mice," Molecular Therapy, 21 July 2015 (21.07.2015), Vol. 23, No. 10, Pgs. 1600-1610. entire document	1-30
A	US 2006/0062780 A1 (ZOCHER et al) 23 March 2006 (23.03.2006) entire document	1-30

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 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 0 0
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	C 0 7 K 16/28	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 35/02	

(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 R I T O N

- (72) 発明者 ホフマイスター, ロバート
 アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート 1 0 0
 7階
- (72) 発明者 ゲッツ, ダニエル
 アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート 1 0 0
 7階
- (72) 発明者 キーファー - クウォン, フィリップ
 アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート 1 0 0
 7階
- (72) 発明者 ドナゲイ, ジュリー
 アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー・ストリート 1 0 0
 7階

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AA95Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44
 4C087 AA01 AA02 BB65 NA14 ZB26 ZB27
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA40 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20
 FA74