

(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2020-506700

(P2020-506700A)

(43) 公表日 令和2年3月5日(2020.3.5)

(51) Int.Cl.

C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/62
C 07 K 19/00
C 07 K 16/30
C 07 K 14/705
C 07 K 14/725

Z
Z N A
C 07 K 16/30
C 07 K 14/705
C 07 K 14/725

テーマコード(参考)

4 B 065
4 C 085
4 C 087
4 H 045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 157 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-541338 (P2019-541338)
(86) (22) 出願日 平成30年1月31日 (2018.1.31)
(85) 翻訳文提出日 令和1年8月19日 (2019.8.19)
(86) 國際出願番号 PCT/US2018/016139
(87) 國際公開番号 WO2018/144535
(87) 國際公開日 平成30年8月9日 (2018.8.9)
(31) 優先権主張番号 62/452,601
(32) 優先日 平成29年1月31日 (2017.1.31)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71) 出願人 504389991
ノバルティス アーゲー
スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
35
(71) 出願人 500429103
ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー
シティ オブ ペンシルバニア
アメリカ合衆国 19104 ペンシルベ
ニア州 フィラデルフィア シビック セ
ンター ブールバード 3600 ナイン
ス フロア
(74) 代理人 100106518
弁理士 松谷 道子
(74) 代理人 100122301
弁理士 富田 慎史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多重特異性を有するキメラT細胞受容体タンパク質を用いた癌の治療

(57) 【要約】

本発明は、T細胞受容体(TCR)シグナル伝達を調節するためのキメラCD3タンパク質の使用を特徴とする。具体的には、本発明は、一部には、1つ以上の抗原結合ドメインに融合されたそれらの細胞外ドメインの全部又は大部分を有する複数のキメラCD3タンパク質(例えば、CD3₊、CD3₋及びCD3_±)が1つ以上の同種抗原の存在下でTCRを活性化し得るという発見に基づく。本発明は、前述のキメラタンパク質がキメラ分子の細胞内部分への共刺激ドメインの組み込みを通して増強され得るという観察にさらに基づく。従って、本発明の操作されたシグナル伝達複合体の好ましい要素は、2つ以上の抗原結合ドメイン、前述のCD3タンパク質の1つに由来する細胞外ドメイン及び細胞内共刺激ドメインを含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第1の抗原結合ドメインと、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインとを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及びCD3、又は以外のタンパク質に由来する第1の細胞内共刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む第1のキメラ膜タンパク質と；

第2の抗原結合ドメインと、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインとを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び任意選択によりCD3、又は以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む第2のキメラ膜タンパク質と

を含む系であって、前記第1の抗原結合ドメインと前記第2の抗原結合ドメインとは、同一ではなく、CD3、又はの前記細胞外ドメインに由来する前記第1の細胞外ドメインと、CD3、又はの前記細胞外ドメインに由来する前記第2の細胞外ドメインとは、同一ではない、系。

【請求項 2】

前記第1の細胞外ドメインは、CD3、若しくはの前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、任意選択により、前記第1の細胞外ドメインは、配列番号88、83若しくは78のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、任意選択により、前記第1の細胞外ドメインは、配列番号88、83又は78の前記アミノ酸配列を含む、請求項1に記載の系。

【請求項 3】

前記第2の細胞外ドメインは、CD3、又はの前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、任意選択により、前記第2の細胞外ドメインは、配列番号88、83若しくは78のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、任意選択により、前記第2の細胞外ドメインは、配列番号88、83又は78の前記アミノ酸配列を含む、請求項1又は2に記載の系。

【請求項 4】

(i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み；

(ii) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号88の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号83の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み；

(iii) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号88の前記アミノ酸配列を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号83の前記アミノ酸配列を含み；

(iv) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み；

(v) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号88の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号78の前

10

20

30

40

50

記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み；

(v i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号88の前記アミノ酸配列を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号78の前記アミノ酸配列を含み；

(v i i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み；

(v i i i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号83の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号88の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み；

(i x) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号83の前記アミノ酸配列を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号88の前記アミノ酸配列を含み；

(x) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み；

(x i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号83の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号78の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み；

(x i i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号83の前記アミノ酸配列を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号78の前記アミノ酸配列を含み；

(x i i i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み；

(x i v) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号78の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号88の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み；

(x v) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号78の前記アミノ酸配列を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号88の前記アミノ酸配列を含み；

(x v i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み；

(x v i i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号78の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号83の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置

10

20

30

40

50

換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列)を含み; 又は
(x v i i i)前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号78の前記アミノ酸配列を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号83の前記アミノ酸配列を含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の系。

【請求項5】

前記第1のキメラ膜タンパク質の前記膜貫通ドメインは、CD3、若しくはの膜貫通ドメイン又はその機能的変異体を含み、任意選択により、前記第1のキメラ膜タンパク質の前記膜貫通ドメインは、配列番号89、84若しくは79のアミノ酸配列(又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ/又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列)を含む、請求項1~4のいずれか一項に記載の系。
10

【請求項6】

前記第1のキメラ膜タンパク質の前記膜貫通ドメインは、CD3、又はの膜貫通ドメインを含まない、請求項1~4のいずれか一項に記載の系。

【請求項7】

前記第2のキメラ膜タンパク質の前記膜貫通ドメインは、CD3、若しくはの膜貫通ドメイン又はその機能的変異体を含み、任意選択により、前記第2のキメラ膜タンパク質の前記膜貫通ドメインは、配列番号89、84若しくは79の前記アミノ酸配列(又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ/又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列)を含む、請求項1~6のいずれか一項に記載の系。
20

【請求項8】

前記第2のキメラ膜タンパク質の前記膜貫通ドメインは、CD3、又はの膜貫通ドメインを含まない、請求項1~6のいずれか一項に記載の系。

【請求項9】

前記第1のキメラ膜タンパク質は、CD3、若しくはタンパク質又はその機能的変異体を含む、請求項1~8のいずれか一項に記載の系。

【請求項10】

(i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号90、85若しくは80のアミノ酸配列(又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ/又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列)を含み、任意選択により、前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号90、85又は80の前記アミノ酸配列を含み; 又は
30

(ii) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号87、82若しくは77のアミノ酸配列(又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ/又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列)を含み、任意選択により、前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号87、82又は77の前記アミノ酸配列を含む、請求項9に記載の系。

【請求項11】

前記第2のキメラ膜タンパク質は、前記CD3、若しくはタンパク質又はその機能的変異体を含む、請求項1~10のいずれか一項に記載の系。
40

【請求項12】

(i) 前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号90、85若しくは80の前記アミノ酸配列(又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ/又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列)を含み、任意選択により、前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号90、85又は80の前記アミノ酸配列を含み; 又は
50

(ii) 前記第2のキメラ膜タンパク質は、前記CD3、若しくはタンパク質又はその機能的変異体を含み、任意選択により、前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号

87、82若しくは77の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、任意選択により、前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号87、82又は77の前記アミノ酸配列を含む、請求項11に記載の系。

【請求項13】

前記第1のキメラ膜タンパク質は、前記CD3、又はタンパク質に由来するいかなる細胞内ドメインも含まない、請求項1～9、11又は12のいずれか一項に記載の系。
10

【請求項14】

前記第2のキメラ膜タンパク質は、前記CD3、又はタンパク質に由来するいかなる細胞内ドメインも含まない、請求項1～11又は13のいずれか一項に記載の系。

【請求項15】

前記第1の抗原結合ドメインは、CD3、又はの前記細胞外ドメインに由来する前記第1の細胞外ドメインに対してN末端に位置する、請求項1～14のいずれか一項に記載の系。

【請求項16】

前記第2の抗原結合ドメインは、CD3、又はの前記細胞外ドメインに由来する前記第2の細胞外ドメインに対してN末端に位置する、請求項1～15のいずれか一項に記載の系。
20

【請求項17】

前記第1のキメラ膜タンパク質、前記第2のキメラ膜タンパク質又は前記第1及び第2のキメラ膜タンパク質の両方は、前記第1及び／又は第2の抗原結合ドメインに対してN末端に位置する第3の抗原結合ドメインを含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の系。

【請求項18】

前記第1の抗原結合ドメインと、CD3、又はの前記細胞外ドメインに由来する前記第1の細胞外ドメインとは、第1のリンカーによって結合され、且つ／又は前記第2の抗原結合ドメインと、CD3、又はの前記細胞外ドメインに由来する前記第2の細胞外ドメインとは、第2のリンカーによって結合される、請求項1～17のいずれか一項に記載の系。
30

【請求項19】

前記第1のリンカー及び／又は第2のリンカーは、(GGGGS) n を含み、例えばそれからなり、例えば、ここで、nは、0～10の整数であり、例えばn=1、2又は4である、請求項18に記載の系。

【請求項20】

前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3、又は以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含む、請求項1～19のいずれか一項に記載の系。

【請求項21】

前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3、又は以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含まない、請求項1～19のいずれか一項に記載の系。
40

【請求項22】

第2の細胞内共刺激ドメインを含まない、請求項1～19又は21のいずれか一項に記載の系。

【請求項23】

前記第1の細胞内共刺激ドメイン及び前記第2の細胞内共刺激ドメインの両方を含む、請求項1～20のいずれか一項に記載の系。

【請求項24】

前記第1のキメラ膜タンパク質は、前記第1の細胞内共刺激ドメインに対してC末端に位置する、CD3、又は以外のタンパク質に由来する第3の細胞内共刺激ドメイン
50

を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 2 5】

前記細胞内共刺激ドメイン（例えば、前記第 1 の細胞内共刺激ドメイン、及び / 又は存在する場合には第 2 の細胞内共刺激ドメイン、及び / 又は存在する場合には第 3 の細胞内共刺激ドメイン）の 1 つ以上は、MHC クラス I 分子、TNF 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（SLAM タンパク質）、活性化 NK 細胞受容体、BT LA、To 11 リガンド受容体、OX 4 0、CD 2、CD 7、CD 27、CD 28、CD 30、CD 40、CD 5、ICAM - 1、4 - 1 BBB（CD 137）、B7 - H3、ICOS（CD 278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS 2、SLAMF 7、NKP 8 0（KLRF 1）、NKP 4 4、NKP 3 0、NKP 4 6、CD 19、CD 4、CD 8 、CD 8 、IL 2 R 、IL 2 R 、IL 7 R 、ITGA 4、VLA 1 、CD 49 a、ITGA 4、IA 4、CD 49 D、ITGA 6、VLA - 6、CD 49 f 、ITGAD、CD 11 d、ITGAE、CD 10 3、ITGAL、CD 11 a、LFA - 1、ITGAM、CD 11 b、ITGAX、CD 11 c、ITGB 1、CD 29、ITGB 2、CD 18、ITGB 7、NKG 2 D、NKG 2 C、TNFR 2、TRANCE / RANK L、DNAM 1（CD 226）、SLAMF 4（CD 244、2B4）、CD 8 4、CD 9 6（Tactile）、CEACAM 1、CRTAM、Ly 9（CD 229）、CD 16 0（BY 5 5）、PSGL 1、CD 10 0（SEMA 4 D）、CD 6 9、SLAMF 6（NTB - A、Ly 108）、SLAM（SLAMF 1、CD 150、IPO - 3）、BLAME（SLAMF 8）、SELPLG（CD 162）、LTBR、LAT、GADS、SLP - 7 6、PAG / Cbp、CD 19 a 及び CD 8 3 と特異的に結合するリガンド又はそれらの機能的変異体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である、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の系。
10

【請求項 2 6】

前記細胞内共刺激ドメイン（例えば、前記第 1 の細胞内共刺激ドメイン、及び / 又は存在する場合には第 2 の細胞内共刺激ドメイン、及び / 又は存在する場合には第 3 の細胞内共刺激ドメイン）の 1 つ以上は、4 - 1 BBB の機能的シグナル伝達ドメイン又はその機能的変異体であり、任意選択により、前記細胞内共刺激ドメイン（例えば、前記第 1 の細胞内共刺激ドメイン、及び / 又は存在する場合には第 2 の細胞内共刺激ドメイン、及び / 又は存在する場合には第 3 の細胞内共刺激ドメイン）の 1 つ以上は、配列番号 5 0 のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 若しくはそれを超えて同一であり、且つ / 又は 1 つ、2 つ、3 つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、任意選択により、前記細胞内共刺激ドメイン（例えば、前記第 1 の細胞内共刺激ドメイン、及び / 又は存在する場合には第 2 の細胞内共刺激ドメイン、及び / 又は存在する場合には第 3 の細胞内共刺激ドメイン）の 1 つ以上は、配列番号 5 0 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の系。
30

【請求項 2 7】

(i) 前記第 1 のキメラ膜タンパク質は、配列番号 9 1、8 6 若しくは 8 1 のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 若しくはそれを超えて同一であり、且つ / 又は 1 つ、2 つ、3 つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、任意選択により、前記第 1 のキメラ膜タンパク質は、配列番号 9 1、8 6 又は 8 1 の前記アミノ酸配列を含み；又は
40
(i i) 前記第 2 のキメラ膜タンパク質は、配列番号 9 1、8 6 若しくは 8 1 の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 若しくはそれを超えて同一であり、且つ / 又は 1 つ、2 つ、3 つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、任意選択により、前記第 1 のキメラ膜タンパク質は、配列番号 9 1、8 6 又は 8 1 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の系。
50

【請求項 28】

前記第1の抗原結合ドメインは、腫瘍抗原に結合する、請求項1～27のいずれか一項に記載の系。

【請求項 29】

前記第1の抗原結合ドメインは、B細胞抗原に結合する、請求項1～28のいずれか一項に記載の系。

【請求項 30】

前記第1の抗原結合ドメインによって結合される前記B細胞抗原は、CD5、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、F1t3、ROR1、BCMA、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL-7/4/3R又はIL4Rである、請求項29に記載の系。
10

【請求項 31】

前記第1の抗原結合ドメインによって結合される前記B細胞抗原は、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、BCMA、CS-1又はCD138である、請求項30に記載の系。

【請求項 32】

前記第2の抗原結合ドメインは、腫瘍抗原に結合する、請求項1～31のいずれか一項に記載の系。
20

【請求項 33】

前記第2の抗原結合ドメインは、B細胞抗原に結合する、請求項1～32のいずれか一項に記載の系。

【請求項 34】

前記第2の抗原結合ドメインは、前記第1の抗原結合ドメインによって結合される前記B細胞抗原と異なるB細胞抗原に結合する、請求項29～31又は33のいずれか一項に記載の系。
30

【請求項 35】

前記第2の抗原結合ドメインによって結合される前記B細胞抗原は、CD5、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、F1t3、ROR1、BCMA、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL-7/4/3R又はIL4Rである、請求項33又は34に記載の系。

【請求項 36】

前記第2の抗原結合ドメインによって結合される前記B細胞抗原は、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、BCMA、CS-1又はCD138である、請求項35に記載の系。
40

【請求項 37】

(i) 前記第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、CD20に結合し；

(ii) 前記第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、CD22に結合し；

(iii) 前記第1の抗原結合ドメインは、CD20に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、CD22に結合し；

(iv) 前記第1の抗原結合ドメインは、CD20に結合し、及び前記第2の抗原結合ド

50

メインは、CD19に結合し；

(v) 前記第1の抗原結合ドメインは、CD22に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、CD19に結合し；又は

(vi) 前記第1の抗原結合ドメインは、CD22に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、CD20に結合する、請求項33～36のいずれか一項に記載の系。

【請求項38】

前記第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、CD22に結合し、任意選択により、

(i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号70のアミノ酸配列（又はそれに対しても少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号75若しくは76のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み；

(ii) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号71のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号73のアミノ酸配列、配列番号74のアミノ酸配列、配列番号75の前記アミノ酸配列若しくは配列番号76の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み；又は

(iii) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号72のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び前記第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号73若しくは74の前記アミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む、請求項37に記載の系。

【請求項39】

前記第1又は第2の抗原結合ドメインは、固体腫瘍抗原に結合する、請求項1～38のいずれか一項に記載の系。

【請求項40】

前記固体腫瘍抗原は、EGFRvIII、メソテリン、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-糖ペプチド、sTn-O-糖ペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB（例えば、ERBB2）、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6若しくはE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラスターーゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、globobH、RAGE1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシリエステラーゼ、mut hsp70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR 4又はMHCに提示される前記抗原のいずれかのペプチドである、請求項3

10

20

30

40

50

9に記載の系。

【請求項 4 1】

前記固体腫瘍抗原は、C L D N 6、メソテリン及びE G F R v I I I からなる群から選択される、請求項4 0に記載の系。

【請求項 4 2】

(i) 前記第1の抗原結合ドメインは、C D 1 9に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、メソテリンに結合し；

(i i) 前記第1の抗原結合ドメインは、C D 1 9に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、E G F R v I I I に結合し；

(i i i) 前記第1の抗原結合ドメインは、C D 1 9に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、C L D N 6に結合し；

(i v) 前記第1の抗原結合ドメインは、メソテリンに結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、C D 1 9に結合し；

(v) 前記第1の抗原結合ドメインは、E G F R v I I I に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、C D 1 9に結合し；又は

(v i) 前記第1の抗原結合ドメインは、C L D N 6に結合し、及び前記第2の抗原結合ドメインは、C D 1 9に結合する、請求項4 1に記載の系。

【請求項 4 3】

請求項1～4 2のいずれか一項に記載の系をコードする核酸構築物。

【請求項 4 4】

m R N Aである、請求項4 3に記載の核酸構築物。

【請求項 4 5】

前記第1のキメラ膜タンパク質をコードする第1の核酸分子と、前記第2のキメラ膜タンパク質をコードする第2の核酸分子とを含み、任意選択により、

(i) 前記第1及び第2の核酸分子は、単一の核酸分子上に配置されるか、又は

(i i) 前記第1及び第2の核酸分子は、個別の核酸分子上に配置される、請求項4 3又は4 4に記載の核酸構築物。

【請求項 4 6】

請求項4 3～4 5のいずれか一項に記載の核酸構築物を含むベクター。

【請求項 4 7】

レンチウイルス、アデノウイルス又はレトロウイルスベクターである、請求項4 6に記載のベクター。

【請求項 4 8】

前記第1及び第2のキメラ膜タンパク質の発現時、前記タンパク質は、単一のm R N A転写物として発現される、請求項4 6又は4 7に記載のベクター。

【請求項 4 9】

前記第1及び第2のキメラ膜タンパク質をコードする核酸配列は、自己切断部位又は配列内リボソーム進入部位をコードする核酸によって分離される、請求項4 8に記載のベクター。

【請求項 5 0】

請求項4 3～4 5のいずれか一項に記載の核酸構築物、請求項4 6～4 9のいずれか一項に記載のベクター又は請求項1～4 2のいずれか一項に記載の系を含む細胞。

【請求項 5 1】

N K 細胞又はT 細胞である、請求項5 0に記載の細胞。

【請求項 5 2】

第1の阻害剤をさらに含み、

(i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、C D 3 の前記細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含み、及び前記第1の阻害剤は、前記細胞中の内在性C D 3 の発現を低減し；

(i i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、C D 3 の前記細胞外ドメインに由来する第

10

20

30

40

50

1の細胞外ドメインを含み、及び前記第1の阻害剤は、前記細胞中の内在性CD3の発現を低減し；又は

(i i i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含み、及び前記第1の阻害剤は、前記細胞中の内在性CD3の発現を低減し、任意選択により、

前記第1の阻害剤は、前記細胞中の前記第1のキメラ膜タンパク質の発現を低減しないか又は実質的に低減しない（例えば、前記第1の阻害剤は、前記第1の阻害剤の非存在下での前記第1のキメラ膜タンパク質の発現と比較して2、5、10、15又は20%以下のレベルで前記第1のキメラ膜タンパク質の発現を低減する）、請求項50又は51に記載の細胞。

10

【請求項53】

第2の阻害剤をさらに含み、

(i) 前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び前記第2の阻害剤は、前記細胞中の内在性CD3の発現を低減し；

(i i) 前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び前記第2の阻害剤は、前記細胞中の内在性CD3の発現を低減し；又は

(i i i) 前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の前記細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び前記第2の阻害剤は、前記細胞中の内在性CD3の発現を低減し、任意選択により、

20

前記第2の阻害剤は、前記細胞中の前記第2のキメラ膜タンパク質の発現を低減しないか又は実質的に低減しない（例えば、前記第2の阻害剤は、前記第2の阻害剤の非存在下での前記第2のキメラ膜タンパク質の発現と比較して2、5、10、15又は20%以下のレベルで前記第2のキメラ膜タンパク質の発現を低減する）、請求項50～52のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項54】

前記第1又は第2の阻害剤は、RNA干渉を媒介する薬剤、例えばsiRNA若しくはshRNA又はsiRNA若しくはshRNAをコードする核酸分子である、請求項52又は53に記載の細胞。

30

【請求項55】

前記第1又は第2の阻害剤は、遺伝子編集系（例えば、CRISPR/Cas9系、亜鉛フィンガースクリアーゼ系、TALEN系若しくはメガヌクレアーゼ系）又は前記遺伝子編集系の1つ以上の成分をコードする核酸分子である、請求項52又は53に記載の細胞。

【請求項56】

増殖性疾患を有する対象を治療する方法であって、請求項50～55のいずれか一項に記載の細胞を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項57】

前記対象は、腫瘍を有し、及び前記投与は、前記腫瘍に対する免疫を前記対象に提供する、請求項56に記載の方法。

40

【請求項58】

癌を有する対象において抗癌免疫応答を提供する方法であって、請求項50～55のいずれか一項に記載の細胞を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項59】

前記細胞は、T細胞又はNK細胞であり、且つ前記対象に対してオートロガスである、請求項56～58のいずれか一項に記載の方法。

【請求項60】

前記細胞は、同種異系T細胞又はNK細胞である、請求項56～58のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 6 1】

前記対象は、ヒトである、請求項 5 6 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記対象は、癌を有する、請求項 5 6 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記癌は、例えば、少なくとも 1 つの過去の標準療法に際して進行している対象における中皮腫（例えば、悪性胸膜中皮腫）；肺癌（例えば、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺扁平上皮癌又は大細胞肺癌）；膵臓癌（例えば、少なくとも 1 つの過去の標準療法に際して進行している対象における例えば膵管腺癌若しくは転移性膵管腺癌（P D A））；食道腺癌、卵巣癌（例えば、標準療法の少なくとも 1 つの過去のレジメン後に進行している対象における例えば漿液性上皮卵巣癌）、乳癌、大腸癌、膀胱癌又はそれらのいずれかの組み合わせから選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

10

【請求項 6 4】

前記癌は、慢性リンパ性白血病（C L L）、マントル細胞リンパ腫（M C L）、多発性骨髓腫、急性リンパ性白血病（A L L）、ホジキンリンパ腫、B 細胞急性リンパ性白血病（B A L L）、T 細胞急性リンパ性白血病（T A L L）、小リンパ球性白血病（S L L）、B 細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（D L B C L）、慢性炎症を伴う D L B C L、慢性骨髓性白血病、骨髓増殖性腫瘍、囊胞性リンパ腫、小児性囊胞性リンパ腫、有毛細胞性白血病、小細胞若しくは大細胞性囊胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性病態、M A L T リンパ腫（粘膜関連リンパ組織型節外性辺縁帯リンパ腫）、辺縁帯リンパ腫、骨髓異形成、骨髓異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、脾辺縁帯リンパ腫、脾臓リンパ腫 / 白血病、びまん性赤脾臓小型 B 細胞リンパ腫、有毛細胞性白血病亜型、リンパ形質細胞性リンパ腫、H 鎮病、形質細胞骨髓腫、孤立性骨形質細胞腫、骨外形成細胞腫、節性辺縁帯リンパ腫、小児性節性辺縁帯リンパ腫、原発性皮膚濾胞中心リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、原発性縦隔（胸腺）大細胞型 B 細胞リンパ腫、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫、A L K 陽性大細胞型 B 細胞リンパ腫、H H V 8 関連多中心性キャッスルマン病に発生する大細胞型 B 細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、B 細胞リンパ腫、急性骨髓性白血病（A M L）又は分類不能型リンパ腫から選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

20

【請求項 6 5】

前記第 1 の抗原結合ドメインは、第 1 の抗原（例えば、第 1 の腫瘍抗原）に結合し、及び前記第 2 の抗原結合ドメインは、第 2 の抗原（例えば、第 2 の腫瘍抗原）に結合し、前記癌は、前記第 1 の抗原（例えば、第 1 の腫瘍抗原）及び / 又は前記第 2 の抗原（例えば、第 2 の腫瘍抗原）の異種発現を呈し、例えば、前記癌における細胞の 9 0 %、8 0 %、7 0 %、6 0 % 又は 5 0 % 未満は、前記第 1 の抗原（例えば、第 1 の腫瘍抗原）を発現し、及び前記癌における細胞の 9 0 %、8 0 %、7 0 %、6 0 % 又は 5 0 % 未満は、前記第 2 の抗原（例えば、第 2 の腫瘍抗原）を発現する、請求項 6 2 に記載の方法。

30

【請求項 6 6】

細胞を作製する方法であって、請求項 4 6 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のベクターを細胞に導入すること、例えば請求項 4 6 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のベクターで細胞を形質導入することを含む方法。

40

【請求項 6 7】

第 1 の阻害剤を前記細胞に導入することをさらに含み、

(i) 前記第 1 のキメラ膜タンパク質は、C D 3 の前記細胞外ドメインに由来する第 1 の細胞外ドメインを含み、及び前記第 1 の阻害剤は、前記細胞中の内在性 C D 3 の発現を低減し；

(i i) 前記第 1 のキメラ膜タンパク質は、C D 3 の前記細胞外ドメインに由来する第 1 の細胞外ドメインを含み、及び前記第 1 の阻害剤は、前記細胞中の内在性 C D 3 の発現を低減し；又は

50

(i i i) 前記第1のキメラ膜タンパク質は、 C D 3 の前記細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含み、及び前記第1の阻害剤は、前記細胞中の内在性 C D 3 の発現を低減し、任意選択により、

前記第1の阻害剤は、前記細胞中の前記第1のキメラ膜タンパク質の発現を低減しないか又は実質的に低減しない(例えば、前記第1の阻害剤は、前記第1の阻害剤の非存在下での前記第1のキメラ膜タンパク質の発現と比較して2、5、10、15又は20%以下のレベルで前記第1のキメラ膜タンパク質の発現を低減する)、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

第2の阻害剤を細胞に導入することをさらに含み、

(i) 前記第2のキメラ膜タンパク質は、 C D 3 の前記細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び前記第2の阻害剤は、前記細胞中の内在性 C D 3 の発現を低減し；

(i i) 前記第2のキメラ膜タンパク質は、 C D 3 の前記細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び前記第2の阻害剤は、前記細胞中の内在性 C D 3 の発現を低減し；又は

(i i i) 前記第2のキメラ膜タンパク質は、 C D 3 の前記細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び前記第2の阻害剤は、前記細胞中の内在性 C D 3 の発現を低減し、任意選択により、

前記第2の阻害剤は、前記細胞中の前記第2のキメラ膜タンパク質の発現を低減しないか又は実質的に低減しない(例えば、前記第2の阻害剤は、前記第2の阻害剤の非存在下での前記第2のキメラ膜タンパク質の発現と比較して2、5、10、15又は20%以下のレベルで前記第2のキメラ膜タンパク質の発現を低減する)、請求項66又は67に記載の方法。

【請求項69】

前記第1又は第2の阻害剤は、 R N A 干渉を媒介する薬剤、例えば s i R N A 若しくは s h R N A 又は s i R N A 若しくは s h R N A をコードする核酸分子である、請求項67又は68に記載の方法。

【請求項70】

前記第1又は第2の阻害剤は、遺伝子編集系(例えば、 C R I S P R / C a s 9 系、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ系、 T A L E N 系若しくはメガヌクレアーゼ系)又は前記遺伝子編集系の1つ以上の成分をコードする核酸分子である、請求項67又は68に記載の方法。

【請求項71】

前記細胞は、免疫エフェクター細胞、例えば T 細胞又は N K 細胞である、請求項66～70のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2017年1月31日に出願された米国特許出願第62/452601号明細書に対する優先権を主張し、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、 A S C I I 形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2018年1月31日に作成された前記 A S C I I コピーは、 N 2 0 6 7 - 7 1 4 7 W O 2 _ S L . t x t という名称であり、サイズが 2 3 1 , 2 2 9 バイトである。

【0003】

本発明は、概して、腫瘍抗原の発現と関連する疾患を治療するための、キメラ膜タンパ

10

20

30

40

50

ク質を発現するように操作された免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

オートロガスT細胞、特にキメラ抗原受容体（CAR）を形質導入したT細胞による養子細胞移入（ACT）療法は、血液癌の治療において有望性が示されている。ACTに使用するための改善されたキメラ分子が当技術分野で求められている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、少なくとも一部には、腫瘍抗原の発現と関連する癌を治療するための、本明細書に記載する通り前記腫瘍抗原に結合する2つ以上のキメラポリペプチドを発現するように操作された免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の使用に関する。

【0006】

第1の態様において、本発明は、

第1の抗原結合ドメインと、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインとを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及びCD3、又は以外のタンパク質に由来する第1の細胞内共刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む第1のキメラ膜タンパク質と；

第2の抗原結合ドメインと、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインとを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び任意選択によりCD3、又は以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む第2のキメラ膜タンパク質と

を含む系であって、第1の抗原結合ドメインと第2の抗原結合ドメインとは、同一ではなく、CD3、又はの第1の細胞外ドメインと、CD3、又はの第2の細胞外ドメインとは、同一ではない、系を提供する。

【0007】

実施形態において、前記第1のCD3、又は細胞外ドメインは、CD3、又は細胞外ドメイン全体を含む。前述の実施形態を含む実施形態において、前記第2のCD3、又は細胞外ドメインは、CD3、又は細胞外ドメイン全体を含む。

【0008】

前述の実施形態を含む実施形態において、a) 第1のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み、及び第2のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み；b) 第1のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み、及び第2のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み；又はc) 第1のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み、及び第2のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含む。

【0009】

前述の実施形態を含む実施形態において、第1のキメラタンパク質は、CD3、又はタンパク質全体を含む。前述の実施形態を含む実施形態において、第2のキメラタンパク質は、CD3、又はタンパク質全体を含む。前述の実施形態を含む他の実施形態において、第1のキメラタンパク質は、CD3、又はタンパク質に由来するいかなる細胞内ドメインも含まない。前述の実施形態を含む実施形態において、第2のキメラタンパク質は、CD3、又はタンパク質に由来するいかなる細胞内ドメインも含まない。

【0010】

前述の実施形態を含む実施形態において、第1のキメラタンパク質及び/又は第2のキメラタンパク質の膜貫通ドメインは、CD3、又はの膜貫通ドメインを含まない。

【0011】

前述の実施形態を含む実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD3、又

10

20

30

40

50

は に由来する前記第1の細胞外ドメインに対してN末端に位置する。前述の実施形態を含む実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、CD3、又は に由来する前記第2の細胞外ドメインに対してN末端に位置する。

【0012】

前述の実施形態を含む実施形態において、第1のキメラタンパク質、第2のキメラタンパク質又は第1及び第2のキメラタンパク質の両方は、前記第1及び/又は第2の抗原結合ドメインに対してN末端に位置する第3の抗原結合ドメインを含む。

【0013】

前述の実施形態を含む実施形態において、第1の抗原結合ドメインと、CD3、又は に由来する前記第1の細胞外ドメインとは、第1のリンカーによって結合され、且つ/又は第2の抗原結合ドメインと、CD3、又は に由来する前記第2の細胞外ドメインとは、第2のリンカーによって結合される。実施形態において、前記第1のリンカー及び/又は第2のリンカーは、(GGGGS)_nを含み、例えばそれからなり、例えば、ここで、nは、0~10の整数であり(配列番号68)、例えばn=4である。

10

【0014】

前述の実施形態を含む実施形態において、前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3、又は 以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含む。前述の実施形態を含む他の実施形態では、前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3、又は 以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含まない。前述の実施形態を含む実施形態において、系は、第2の細胞内共刺激ドメインを含まない。

20

【0015】

前述の実施形態を含む実施形態において、系は、第1の細胞内共刺激ドメイン及び第2の細胞内共刺激ドメインの両方を含む。

【0016】

前述の実施形態を含む実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、第1の細胞内共刺激ドメインに対してC末端に位置する、CD3、又は 以外のタンパク質に由来する第3の細胞内共刺激ドメインを含む。

【0017】

前述の実施形態を含む実施形態において、前記細胞内共刺激ドメイン(例えば、第1の細胞内共刺激ドメイン、及び/又は存在する場合には第2の細胞内共刺激ドメイン、及び/又は存在する場合には第3の細胞内共刺激ドメイン)の1つ以上は、MHCクラスI分子、TNF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(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD5、ICAM-1、LFA-1、(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CD5、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKP80(KLRF1)、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49d、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a及びCD83と特異的に結合するリガンド又はそれらの機能的変異体からなる群から選択され

30

40

40

50

るタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインであり、例えば本明細書に記載の共刺激ドメインを含む。

【0018】

前述の実施形態を含む実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、腫瘍抗原に結合する。実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、B細胞抗原、例えばCD5、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、F1t3、ROR1、BCMA、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL-7/4/3R又はIL4R、例えばCD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、BCMA、CS-1又はCD138に結合する。
10

【0019】

前述の実施形態を含む実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、腫瘍抗原に結合する。実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、B細胞抗原、例えば第1の抗原結合ドメインによって結合されるものと同じB細胞抗原であるが、抗原上の異なる結合エピトープ又は領域に結合する。他の実施形態では、第2の抗原結合ドメインは、B細胞抗原、例えば第1の抗原結合ドメインによって結合されるものと異なるB細胞抗原に結合する。実施形態において、第2の抗原結合ドメインによって結合されるB細胞抗原は、CD5、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、F1t3、ROR1、BCMA、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL-7/4/3R又はIL4Rであり、例えばCD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、BCMA、CS-1又はCD138である。
20

【0020】

実施形態において、a) 第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD20に結合し；b) 第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD22に結合し；又はc) 第1の抗原結合ドメインは、CD20に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD22に結合する。
30

【0021】

実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、例えば、本明細書に記載のように、固形腫瘍抗原、例えばEGFRvIII、メソテリン、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-糖ペプチド、sTn-O-糖ペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB(例えば、ERBB2)、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6又はE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラスターーゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、globoH、RAGE1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシリエステラーゼ、mut hsp70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR 4及びMHCに提示されるこれらの抗原のいずれかのペプチド、例えばCLDN6、
40

メソテリン及び E G F R v I I I からなる群から選択される固形腫瘍抗原に結合する。

【0022】

実施形態において、a) 第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、メソテリンに結合し；b) 第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、EGFRvIIIに結合し；又はc) 第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CLDN6に結合する。

【0023】

第2の態様において、本発明は、前述の態様及び実施形態のいずれかの系をコードする核酸構築物を提供する。実施形態において、核酸構築物は、RNA、例えばmRNAである。他の実施形態では、核酸構築物は、DNAである。10

【0024】

第3の態様において、本発明は、既述の態様の核酸構築物を含むベクターを提供する。実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルス、アデノウイルス又はレトロウイルスである。実施形態において、前記第1及び第2のキメラ膜タンパク質の発現時、前記タンパク質は、単一のmRNA転写物として発現され、例えば、前記第1及び第2のキメラ膜タンパク質をコードする核酸配列は、自己切断部位又は配列内リボソーム進入部位をコードする核酸によって分離される。

【0025】

第4の態様において、本発明は、例えば、本明細書に記載のように既述の核酸構築物態様及び実施形態のいずれかの核酸構築物、前述したベクター態様及び実施形態のいずれかのベクター又は前述した態様及び実施形態のいずれかの系を含む細胞を提供する。実施形態において、前記細胞は、NK細胞又はT細胞から選択される。20

【0026】

第5の態様において、本発明は、増殖性疾患を有する対象を治療する方法であって、前述した細胞態様及び実施形態のいずれか1つの細胞を投与することを含む方法を提供する。実施形態において、前記対象は、腫瘍を有し、及び前記投与は、前記腫瘍に対する免疫を対象に提供する。実施形態において、前記細胞は、T細胞又はNK細胞であり、且つ前記対象に対してオートロガスである。他の実施形態では、前記細胞は、同種異系T細胞又はNK細胞である。実施形態において、前記対象は、ヒトである。30

【0027】

系のキメラ膜タンパク質の特徴が上記に記載されているが、系のキメラ膜タンパク質のさらなる態様を以下に記載する。

【0028】

従って、関連する態様では、本発明は、CD3、又はドメインと、細胞内共刺激ドメインとを含むキメラ膜タンパク質を特徴とし、CD3ドメインは、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する細胞外ドメインを含み、及び細胞内共刺激ドメインは、CD3、又はに由来しない。

【0029】

関連する態様では、本発明は、CD3、又はドメインと、第1の細胞二量体化ドメインとを含むキメラ膜タンパク質を特徴とし、CD3、又はドメインは、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する細胞外ドメインを含む。この態様では、タンパク質は、任意選択により、細胞内共刺激ドメインをさらに含み得る。40

【0030】

また別の態様では、本発明は、抗原結合ドメインと、CD3、又はドメインとを含むキメラ膜タンパク質を特徴とし、CD3、又はドメインは、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する細胞外ドメインを含む。

【0031】

前述した態様のいずれかにおいて、CD3、又はドメインは、CD3、若しくは細胞外ドメイン全体（例えば、全タンパク質）又はCD3、若しくはの一部50

を含む。上記ドメインが細胞外ドメインの一部のみである特定の態様では、切断型ドメインは、残るT C R ポリペプチドと結合する能力を保持する。特定の態様では、キメラタンパク質は、CD3、又はに由来するいかなる細胞内及び/又は膜貫通ドメインも含まない。

【0032】

前述した態様のいずれかにおいて、タンパク質は、CD3、又はドメインに対してN末端に位置する抗原結合ドメインも含む。

【0033】

別の態様では、本発明は、前述のキメラ膜タンパク質のいずれか1つを含む細胞(例えば、NK細胞又はT細胞)を特徴とする。

10

【0034】

別の態様では、本発明は、前述したキメラ膜タンパク質のいずれか1つをコードする核酸(例えば、DNA又はmRNA)を特徴とする。本発明は、こうした核酸を含むベクター(例えば、レンチウイルス、アデノウイルス又はレトロウイルス)ベクターも特徴とする。

20

【0035】

前述した細胞の特定のいずれかにおいて、キメラ膜タンパク質は、CD3、又はドメインと、細胞内二量体化ドメインとを含み、細胞は、第2のキメラタンパク質をさらに含み、及び第2のキメラタンパク質は、細胞内共刺激ドメインと第2の細胞内二量体化ドメインとを含む。特定の実施形態において、第1及び第2の二量体化ドメインは、細胞内で発現されると、ヘテロ二量体化ペアを形成してヘテロ二量体化する(例えば、p53及びMDM2、mFos及びmJunCohls並びにVPS36及びVPS28)。他の実施形態では、第1及び第2の二量体化ドメインは、二量体化化合物の存在下においてのみ、細胞内で発現されたときにヘテロ二量体化ペアを形成してヘテロ二量体化する。例えば、第1及び第2の二量体化ドメインの一方は、FKBPと少なくとも85%の同一性を有するラパマイシン類似体結合配列を含み得、及び任意選択により、第1及び第2の二量体化ドメインの他方は、FRPと少なくとも85%の同一性を有するラパマイシン類似体結合配列を含む。別の例では、第1及び第2の二量体化ドメインの一方は、FKBPに由来するラパマイシン類似体結合配列を含む。ここで、第1及び第2の二量体化ドメインの他方は、任意選択により、FRPに由来するラパマイシン類似体結合配列を含み得る。特定の実施形態において、ラパマイシン類似体結合配列は、FKBP又はFRPに由来するAP21967結合配列を含む。他の例示的なヘテロ二量体化ペアは、GyrB-GyrBベースのスイッチ、GAI-GID1ベースのスイッチ又はハロ-タグ/SNAP-タグベースのスイッチを含む。

30

【0036】

第2のキメラタンパク質は、例えば、キメラ膜タンパク質であり得、例えば細胞外抗原結合ドメインをさらに含み得る。他の態様では、前述の細胞のいくつかは、例えば、CD3、又はドメインと、細胞内二量体化ドメインとを含み得、細胞は、例えば、第2のキメラタンパク質(例えば、キメラ膜タンパク質)をさらに含み得、第2のキメラタンパク質は、細胞外抗原結合ドメインと、細胞内共刺激ドメインと、CD3、又は結合ドメイン(例えば、細胞内又は細胞外CD3ドメインに結合する)とを含む。こうした結合ドメインは、例えば、抗CD3、又は抗体由来(例えば、scFv又はVhhドメイン)であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、第2のキメラタンパク質の細胞外抗原結合ドメイン(例えば、抗体又はそのフラグメントの抗原結合ドメイン)は、第2のキメラタンパク質の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと異種であり、且つ/又は阻害分子の細胞外ドメインである。或いは、第2のキメラタンパク質の細胞外抗原結合ドメインは、第2のキメラタンパク質の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインと天然に結合している。

40

【0037】

上の態様のいくつかでは、第2のキメラタンパク質は、例えば、細胞内タンパク質とし

50

て発現され得る。

【0038】

前述の態様のいくつかでは、第1及び第2のキメラタンパク質は、いずれも同じ又は異なる内在性タンパク質に由来する細胞内共刺激ドメインを含む。

【0039】

別の態様では、本発明は、前述した第1及び第2のキメラタンパク質のいずれかをコードする核酸と、そのような核酸とを含むベクターを特徴とする。こうしたベクターは、第1及び第2のキメラタンパク質の発現時、タンパク質が単一のmRNA転写物として発現され、例えば、ここで、第1及び第2のキメラタンパク質が、自己切断部位又は配列内リボソーム進入部位をコードする核酸によって分離されるように構成され得る。

10

【0040】

前述の実施形態のいずれかにおいて、細胞内共刺激ドメインの1つ以上は、MHCクラスI分子、TNF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(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BT LA、T o 1 1 リガンド受容体、OX 4 0、CD 2、CD 7、CD 2 7、CD 2 8、CD 3 0、CD 4 0、CD S、ICAM - 1、LFA - 1、(CD 1 1 a / CD 1 8)、4 - 1 BB(CD 1 3 7)、B7 - H3、CD S、ICAM - 1、ICOS(CD 2 7 8)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHT R)、KIRDS2、SLAMF7、NKP80(KLRF1)、NKP44、NKP30、NKP46、CD 1 9、CD 4、CD 8、CD 8、IL 2 R、IL 2 R、IL 7 R、ITGA4、VLA1、CD 4 9 a、ITGA4、IA4、CD 4 9 D、ITGA6、VLA - 6、CD 4 9 f、ITGAD、CD 1 1 d、ITGAE、CD 1 0 3、ITGAL、CD 1 1 a、LFA - 1、ITGAM、CD 1 1 b、ITGAX、CD 1 1 c、ITGB1、CD 2 9、ITGB2、CD 1 8、LFA - 1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE / RANKL、DNAM1(CD 2 2 6)、SLAMF4(CD 2 4 4、2B4)、CD 8 4、CD 9 6(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD 2 2 9)、CD 1 6 0(BY 5 5)、PSGL1、CD 1 0 0(SEMA4D)、CD 6 9、SLAMF6(NTB - A、Ly 1 0 8)、SLAM(SLAMF1、CD 1 5 0、IPO - 3)、BLAME(SLAMF8)、SELP LG(CD 1 6 2)、LTBR、LAT、GADS、SLP - 7 6、PAG / Cbp、CD 1 9 a及びCD 8 3と特異的に結合するリガンド又はそれらの機能的変異体を含む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である。

20

【0041】

また別の態様では、本発明は、前述の細胞のいずれかを用いた対象(例えば、ヒト)の治療を特徴とする(ここで、対象は、増殖性疾患(例えば、癌)を有する。特定の実施形態において、対象は、腫瘍を有し、及び投与は、腫瘍に対する免疫を対象に提供する。細胞は、例えば、対象に対してオートロガス又は同種異系のT細胞又はNK細胞であり得る。

30

【0042】

キメラタンパク質コード核酸

40

従って、一態様では、本発明は、本明細書に記載する腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメイン(例えば、抗体又は抗体フラグメント、TCR又はTCRフラグメント)、膜貫通ドメイン(例えば、本明細書に記載の膜貫通ドメイン)、及び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、本明細書に記載の共刺激ドメイン)を含む細胞内シグナル伝達ドメイン)及び/又は一次シグナル伝達ドメイン(例えば、本明細書に記載的一次シグナル伝達ドメイン)の1つ以上を含むキメラ膜タンパク質をコードする単離された核酸分子に関する。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、CD 1 9 ; CD 1 2 3 ; CD 2 2 ; CD 3 0 ; CD 1 7 1 ; CS - 1 (CD 2 サブセット1とも呼ばれるCRACC、SLAMF7、CD 3 1 9 及び19A24) ; C型レクチン様分子 - 1 (CLL - 1又はCLECL1) ; CD 3 3 ; 表皮成長因子受容体変異体III(EGRFvIII) ; ガン

50

グリオシドG2 (G D 2) ; ガングリオシドG D 3 (a N e u 5 A c (2 - 8) a N e u 5 A c (2 - 3) b D G a l p (1 - 4) b D G 1 c p (1 - 1) C e r) ; TNF受容体ファミリーメンバーB細胞成熟 (B C M A) ; Tn抗原 (Tn Ag) 又は (G a l N A c - S e r / T h r)) ; 前立腺特異的膜抗原 (P S M A) ; 受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (R O R 1) ; F m s 様チロシンキナーゼ3 (F L T 3) ; 腫瘍関連糖タンパク質72 (T A G 7 2) ; C D 3 8 ; C D 4 4 v 6 ; 癌胎児性抗原 (C E A) ; 上皮細胞接着分子 (E P C A M) ; B 7 H 3 (C D 2 7 6) ; K I T (C D 1 1 7) ; インターロイキン-13受容体サブユニット-2 (I L - 1 3 R a 2 又は C D 2 1 3 A 2) ; メソテリン ; インターロイキン11受容体 (I L - 1 1 R a) ; 前立腺幹細胞抗原 (P S C A) ; プロテアーゼセリン21 (テスチシン又はP R S S 2 1) ; 血管内皮増殖因子受容体2 (V E G F R 2) ; ルイス (Y) 抗原 ; C D 2 4 ; 血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R -) ; ステージ特異的胎児性抗原-4 (S S E A - 4) ; C D 2 0 ; 葉酸受容体 ; 受容体チロシン-タンパク質キナーゼE R B B 2 (H e r 2 / n e u) ; ムチン1、細胞表面結合型 (M U C 1) ; 上皮成長因子受容体 (E G F R) ; 神經細胞接着分子 (N C A M) ; プロスターーゼ ; 前立腺性酸性ホスファターーゼ (P A P) ; 伸長因子2突然変異型 (E L F 2 M) ; エフリンB2 ; 線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) ; インスリン様成長因子1受容体 (I G F - 1受容体) 、炭酸脱水酵素IX (C A I X) ; プロテアソーム (P r o s o m e , M a c r o p a i n) サブユニット、型、9 (L M P 2) ; 糖タンパク質100 (g p 1 0 0) ; 切断点クラスター領域 (B C R) 及びアベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1 (A b 1) からなる癌遺伝子融合タンパク質 (b c r - a b 1) ; チロシナーゼ ; エフリンA型受容体2 (E p h A 2) ; フコシルG M 1 ; シアリルルイス接合分子 (s L e) ; ガングリオシドG M 3 (a N e u 5 A c (2 - 3) b D G a l p (1 - 4) b D G 1 c p (1 - 1) C e r) ; トランスグルタミナーゼ5 (T G S 5) ; 高分子量黒色腫関連抗原 (H M W M A A) ; o - アセチル-G D 2 ガンクリオシド (O A c G D 2) ; 葉酸受容体 ; 肿瘍内皮マーカー-1 (T E M 1 / C D 2 4 8) ; 肿瘍内皮マーカー7-関連 (T E M 7 R) ; クローディン (C L D N 6) ; 甲状腺刺激ホルモン受容体 (T S H R) ; Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5、メンバーD (G P R C 5 D) ; 染色体Xオープンリーディングフレーム61 (C X O R F 6 1) ; C D 9 7 ; C D 1 7 9 a ; 未分化リンパ腫キナーゼ (A L K) ; ポリシアル酸 ; 胎盤特異的1 (P L A C 1) ; g l o b o H 六糖部分グリコセラミド (G l o b o H) ; 乳腺分化抗原 (N Y - B R 1) ; ウロプラキン2 (U P K 2) ; A型肝炎ウイルス細胞受容体 (H A V C R 1) ; アドレナリン受容体3 (A D R B 3) ; パネキシン3 (P A N X 3) ; Gタンパク質共役受容体20 (G P R 2 0) ; リンパ腫抗原6複合体、遺伝子座K9 (L Y 6 K) ; 嗅覚受容体51E2 (O R 5 1 E 2) ; T C R 選択的リーディングフレームタンパク質 (T A R P) ; ウィルムス (W i l m s) 肿瘍タンパク質 (W T 1) ; 癌/精巣抗原1 (N Y - E S O - 1) ; 癌/精巣抗原2 (L A G E - 1 a) ; 黒色腫関連抗原1 (M A G E - A 1) ; 染色体12pに位置するE T S 転座-変異型遺伝子6 (E T V 6 - A M L) ; 精子タンパク質17 (S P A 1 7) ; X抗原ファミリー、メンバー1A (X A G E 1) ; アンジオポイエチン結合表面受容体2 (T i e 2) ; 黒色腫癌精巣抗原-1 (M A D - C T - 1) ; 黒色腫癌精巣抗原-2 (M A D - C T - 2) ; F o s - 関連抗原1 ; 肿瘍タンパク質p53 (p 5 3) ; p 5 3突然変異体 ; プロステイン ; 生存 ; テロメラーゼ ; 前立腺癌腫瘍抗原-1 (P C T A - 1 又はガレクチン8) 、T細胞1により認識される黒色腫抗原 (M e l a n A 又はM A R T 1) ; R a t 肉腫 (R a s) 突然変異体 ; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T) ; 肉腫転座切断点 ; アポトーシスの黒色腫阻害剤 (M L - I A P) ; E R G (膜貫通プロテアーゼ、セリン2 (T M P R S S 2) E T S 融合遺伝子) ; N - アセチルグルコサミニル-トランスフェラーゼV (N A 1 7) ; ペードボックスタンパク質P a x - 3 (P A X 3) ; アンドロゲン受容体 ; サイクリンB1 ; v - m y c トリ骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子神經芽腫由来ホモログ (M Y C N) ; R a s ホモログファミリーメンバーC (R h o C) ; チロシナーゼ関連タンパク質2 (T R P - 2) ; シトクロムP 4 5 0 1 B 1 (C Y P 1 B 1) ; C C C T C 結合

10

20

30

40

50

因子(亜鉛フィンガータンパク質)様(BORIS又はBrother of the Regulator of Imprinted Sites)、T細胞3により認識される扁平上皮癌抗原(SART3)；ペアードボックスタンパク質Pax-5(PAX5)；プロアクロシン結合タンパク質sp32(OY-TES1)；リンパ腫特異的タンパク質チロシンキナーゼ(LCK)；キナーゼアンカータンパク質4(AKAP-4)；滑膜肉腫、X切断点2(SSX2)；終末糖化産物受容体(RAGE-1)；腎臓ユビキタス1(RU1)；腎臓ユビキタス2(RU2)；レグマイン；ヒトパピローマウイルスE6(HPV E6)；ヒトパピローマウイルスE7(HPV E7)；腸カルボキシリエステラーゼ；熱ショックタンパク質70-2突然変異型(mut hsp70-2)；CD79a；CD79b；CD72；白血球関連免疫グロブリン様受容体1(LAIR1)；IgA受容体のFcフラグメント(FCAR又はCD89)；白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2(LILRA2)；CD300分子様ファミリーメンバーf(CD300LF)；C型レクチンドメインファミリー12メンバーA(CLEC12A)；骨髓間質細胞抗原2(BST2)；EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2(EMR2)；リンパ球抗原75(LY75)；グリピカン-3(GPC3)；Fc受容体様5(FCRL5)；及び免疫グロブリン様ポリペプチド1(IGLL1)の1つ以上から選択される。

10

【0043】

一部の実施形態では、コード化分子によって結合される腫瘍抗原は、TSHR、CD171、CS-1、CLL-1、GD3、TnAg、FLT3、CD38、CD44v6、B7H3、KIT、IL-13Ra2、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、SSEA-4、MUC1、EGFR、NCAM、CAIX、LMP2、EphA2、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、Globoph、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5及びIGLL1の1つ以上から選択される。

20

30

【0044】

特定の実施形態では、コード化CAR分子によって結合される腫瘍抗原は、TSHR、CLDN6、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、Globoph、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K及びOR51E2の1つ以上から選択される。

40

【0045】

特定の実施形態では、抗原結合ドメインの1つ以上は、B細胞抗原に結合し、例示的なB細胞抗原は、次の通りである：CD5、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、Flt3、ROR1、BCMA、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL-7/4/3R及びIL4R。特に好ましいB細胞抗原は、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、BCMA、CS-1及びCD

50

138を含む。実施形態において、B細胞抗原は、CD19である。実施形態において、B細胞抗原は、CD20である。実施形態において、B細胞抗原は、CD22である。実施形態において、B細胞抗原は、BCMAである。実施形態において、B細胞抗原は、FcRn5である。実施形態において、B細胞抗原は、FcRn2である。実施形態において、B細胞抗原は、CS-1である。実施形態において、B細胞抗原は、CD138である。

【0046】

一部の実施形態では、コード化分子の抗原結合ドメインは、抗体、抗体フラグメント、scFv、Fv、Fab、(Fab')2、単一ドメイン抗体(SDAB)、VH若しくはVLドメイン又はラクダ科動物のVHHドメインを含む。10

【0047】

一部の実施形態では、コード化分子の膜貫通ドメインは、T細胞受容体の、若しくは鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、Nkp80(KLRF1)、CD160、CD19、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、Nkp44、Nkp30、Nkp46、NKG2D及び/若しくはNKG2Cの膜貫通ドメイン又はそれらの機能的変異体から選択される膜貫通ドメインを含む。20

【0048】

他の実施形態では、核酸分子は、一次シグナル伝達ドメインをコードする配列及び/又は共刺激シグナル伝達ドメインをコードする配列を含む細胞内シグナル伝達ドメインをコードする。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインをコードする配列を含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする配列を含む。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインをコードする配列と、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする配列とを含む。30

【0049】

特定の実施形態では、コード化一次シグナル伝達ドメインは、CD3、CD3、CD3、共通FcR(FCKER1G)、FcR(FcR1b)、CD79a、CD79b、FcRIIa、DAP10及びDAP12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。40

【0050】

一実施形態において、コード化一次シグナル伝達ドメインは、CD3の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

【0051】

特定の好みしい実施形態において、コード化細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする配列を含む。例えば、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインをコードする配列と、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする配列とを含み得る。一部の実施形態において、コード化共刺激シグナル伝達ドメインは50

、 CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46若しくはNKG2D又はそれらの機能的変異体の1つ以上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。
10

【0052】

一部の実施形態において、核酸分子は、リーダー配列をさらに含む。

【0053】

特定の実施形態において、コード化抗原結合ドメインは、 10^{-4} M~ 10^{-8} Mの結合親和性KDを有する。
20

【0054】

一実施形態において、コード化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、例えば上に挙げた標的に対する本明細書に記載の抗原結合ドメインである。

【0055】

一実施形態において、コード化分子は、標的抗原に対して 10^{-4} M~ 10^{-8} M、例えば 10^{-5} M~ 10^{-7} M、例えば 10^{-6} M又は 10^{-7} Mの結合親和性KDを有する抗原結合ドメインを含む。一実施形態において、抗原結合ドメインは、参照抗体、例えば本明細書に記載の抗体より少なくとも5倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍又は1000倍小さい結合親和性を有する。一実施形態において、コード化抗原結合ドメインは、参照抗体(例えば、抗原結合ドメインが由来する抗体)より少なくとも5倍小さい結合親和性を有する。
30

【0056】

別の様において、本明細書では、第1の抗原結合ドメインと、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインとを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及びCD3、又は以外のタンパク質に由来する第1の細胞内共刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む第1のキメラ膜タンパク質と、

第2の抗原結合ドメインと、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインとを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び任意選択によりCD3、又は以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む第2のキメラ膜タンパク質と
40

を含む系であって、第1の抗原結合ドメインと第2の抗原結合ドメインとは、同一ではなく、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインと、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインとは、同一ではない、系が提供される。

【0057】

一実施形態において、第1の細胞外ドメインは、CD3、若しくはの細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、任意選択により、第1の細胞外ドメインは、配列番号
50

8 8、 8 3 若しくは 7 8 のアミノ酸配列（又はそれに対する少なくとも約 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 9 9 %若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は 1 つ、 2 つ、 3 つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第 1 の細胞外ドメインは、配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第 1 の細胞外ドメインは、配列番号 8 3 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第 1 の細胞外ドメインは、配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第 2 の細胞外ドメインは、 C D 3 、若しくはの細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、任意選択により、第 2 の細胞外ドメインは、配列番号 8 8、 8 3 若しくは 7 8 のアミノ酸配列（又はそれに対する少なくとも約 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 9 9 %若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は 1 つ、 2 つ、 3 つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第 2 の細胞外ドメインは、配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第 2 の細胞外ドメインは、配列番号 8 3 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第 2 の細胞外ドメインは、配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 8 】

一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号88のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号83のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号88のアミノ酸配列を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号83のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号88のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号78のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号88のアミノ酸配列を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号78のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号83のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号88のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号83のアミノ酸配列を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号88のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号88のアミノ酸配列を含む。

1のキメラ膜タンパク質は、配列番号83のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号78のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号83のアミノ酸配列を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号78のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号78のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号88のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号78のアミノ酸配列を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号88のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメイン又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号78のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号83のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号78のアミノ酸配列を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号83のアミノ酸配列を含む。

【0059】

一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質の膜貫通ドメインは、CD3、若しくはの膜貫通ドメイン又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質の膜貫通ドメインは、配列番号89、84若しくは79のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。

【0060】

一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質の膜貫通ドメインは、CD3、又はの膜貫通ドメインを含まない。

【0061】

一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質の膜貫通ドメインは、CD3、若しくはの膜貫通ドメイン又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質の膜貫通ドメインは、配列番号89、84若しくは79のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。

【0062】

一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質の膜貫通ドメインは、CD3、又はの膜貫通ドメインを含まない。

10

20

30

40

50

【0063】

一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、CD3、若しくはタンパク質又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号90、85若しくは80のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号90のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号85のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号80のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号87、82若しくは77のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号87のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号82のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号77のアミノ酸配列を含む。

10

【0064】

一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、CD3、若しくはタンパク質又はその機能的変異体を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号90、85若しくは80のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号90のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号85のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号80のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、CD3、若しくはタンパク質又はその機能的変異体を含み、任意選択により、第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号87、82若しくは77のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号87のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号82のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号77のアミノ酸配列を含む。

20

【0065】

一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、CD3、又はタンパク質に由来するいかなる細胞内ドメインも含まない。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、CD3、又はタンパク質に由来するいかなる細胞内ドメインも含まない。

30

【0066】

一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する前記第1の細胞外ドメインに対してN末端に位置する。一実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する前記第2の細胞外ドメインに対してN末端に位置する。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質、第2のキメラ膜タンパク質又は第1及び第2のキメラ膜タンパク質の両方は、前記第1及び／又は第2の抗原結合ドメインに対してN末端に位置する第3の抗原結合ドメインを含む。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインと、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する前記第1の細胞外ドメインとは、第1のリンカーによって結合され、且つ／又は第2の抗原結合ドメインと、CD3、又はの細胞外ドメインに由来する前記第2の細胞外ドメインとは、第2のリンカーによって結合される。一実施形態に

40

50

おいて、第1のリンカー及び／又は第2のリンカーは、(G G G G S)_nを含み、例えばそれからなり、例えば、ここで、nは、0～10の整数であり、例えばn=1、2又は4である。一実施形態では、n=1である。一実施形態では、n=2である。一実施形態では、n=4である。

【0067】

一実施形態において、前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3、又は以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含む。一実施形態では、前記第2のキメラ膜タンパク質は、CD3、又は以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含まない。一実施形態において、系は、第2の細胞内共刺激ドメインを含まない。一実施形態において、系は、第1の細胞内共刺激ドメイン及び第2の細胞内共刺激ドメインの両方を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、第1の細胞内共刺激ドメインに対してC末端に位置する、CD3、又は以外のタンパク質に由来する第3の細胞内共刺激ドメインを含む。

10

【0068】

一実施形態において、前記細胞内共刺激ドメイン（例えば、第1の細胞内共刺激ドメイン、及び／又は存在する場合には第2の細胞内共刺激ドメイン、及び／又は存在する場合には第3の細胞内共刺激ドメイン）の1つ以上は、MHCクラスI分子、TNF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（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tol1リガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD5、ICAM-1、4-1BB（CD137）、B7-H3、ICOS（CD278）、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRD-S2、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49d、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a及びCD83と特異的に結合するリガンド又はそれらの機能的変異体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である。

20

30

30

【0069】

一実施形態において、前記細胞内共刺激ドメイン（例えば、第1の細胞内共刺激ドメイン、及び／又は存在する場合には第2の細胞内共刺激ドメイン、及び／又は存在する場合には第3の細胞内共刺激ドメイン）の1つ以上は、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメイン又はその機能的変異体であり、任意選択により、前記細胞内共刺激ドメイン（例えば、第1の細胞内共刺激ドメイン、及び／又は存在する場合には第2の細胞内共刺激ドメイン、及び／又は存在する場合には第3の細胞内共刺激ドメイン）の1つ以上は、配列番号50のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、前記細胞内共刺激ドメイン（例えば、第1の細胞内共刺激ドメイン、及び／又は存在する場合には第2の細胞内共刺激ドメイン、及び／又は存在する場合には第3の細胞内共刺激ドメイン）の1つ以上は、配列番号50のアミノ酸配列を含む。

40

【0070】

50

一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号91、86若しくは81のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号91のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号86のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号81のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号91、86若しくは81のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号91のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号86のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号81のアミノ酸配列を含む。

10

【0071】

一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、腫瘍抗原に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、B細胞抗原に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインによって結合されるB細胞抗原は、CD5、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、F1t3、ROR1、BCMA、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL-7/4/3R又はIL4Rである。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインによって結合されるB細胞抗原は、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、BCMA、CS-1又はCD138である。

20

【0072】

一実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、腫瘍抗原に結合する。一実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、B細胞抗原に結合する。一実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、第1の抗原結合ドメインによって結合されるB細胞抗原と異なるB細胞抗原に結合する。一実施形態において、第2の抗原結合ドメインによって結合されるB細胞抗原は、CD5、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、F1t3、ROR1、BCMA、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL-7/4/3R又はIL4Rである。一実施形態において、第2の抗原結合ドメインによって結合されるB細胞抗原は、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、BCMA、CS-1又はCD138である。

30

【0073】

一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD20に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD22に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD20に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD22に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD20に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD19に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD22に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD19に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD22に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD20に結合する。

40

50

第2の抗原結合ドメインは、CD20に結合する。

【0074】

一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD22に結合し、任意選択により、

(i) 第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号70のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号75若しくは76のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み；

(ii) 第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号71のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号73、74、75若しくは76のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み；又は

(iii) 第1のキメラ膜タンパク質は、配列番号72のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含み、及び第2のキメラ膜タンパク質は、配列番号73若しくは74のアミノ酸配列（又はそれに対して少なくとも約85%、90%、95%、99%若しくはそれを超えて同一であり、且つ／又は1つ、2つ、3つ若しくはそれを超える置換、挿入若しくは欠失、例えば保存的置換を有する配列）を含む。

【0075】

一実施形態において、第1又は第2の抗原結合ドメインは、固体腫瘍抗原に結合する。一実施形態において、固体腫瘍抗原は、EGFRvIII、メソテリン、GD2、Tn抗原、sTn抗原、Tn-O-糖ペプチド、sTn-O-糖ペプチド、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPICAM、KIT、IL-13Ra2、レグマント、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB（例えば、ERBB2）、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCA M、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6若しくはE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fo s関連抗原、好中球エラスター、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、PLAC1、g10boH、RAGE1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸カルボキシリエステラーゼ、mut hsp70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、NY-ESO-1、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR 4又はMHCに提示されるこれらの抗原のいずれかのペプチドである。一実施形態において、前記固体腫瘍抗原は、CLDN6、メソテリン及びEGFRvIIIからなる群から選択される。

【0076】

一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、メソテリンに結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、EGFRvIIIに結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CD19に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CLDN6に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは

10

20

30

40

50

、メソテリンに結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD19に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、EGFRvIIIに結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD19に結合する。一実施形態において、第1の抗原結合ドメインは、CLDN6に結合し、及び第2の抗原結合ドメインは、CD19に結合する。

【0077】

一態様において、本発明は、前述の態様及び実施形態のいずれかの系をコードする核酸構築物を提供する。実施形態において、核酸構築物は、RNA、例えばmRNAである。他の実施形態では、核酸構築物は、DNAである。一実施形態において、核酸構築物は、第1のキメラ膜タンパク質をコードする第1の核酸分子と、第2のキメラ膜タンパク質をコードする第2の核酸分子とを含む。一実施形態において、第1及び第2の核酸分子は、単一の核酸分子上に配置される。一実施形態において、第1及び第2の核酸分子は、個別の核酸分子上に配置される。

10

【0078】

一態様において、本発明は、既述の態様の核酸構築物を含むベクターを提供する。実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルス、アデノウイルス又はレトロウイルスベクターである。実施形態において、前記第1及び第2のキメラ膜タンパク質の発現時、前記タンパク質は、単一のmRNA転写物として発現され、例えば、前記第1及び第2のキメラ膜タンパク質をコードする核酸配列は、自己切断部位又は配列内リボソーム進入部位をコードする核酸によって分離される。

20

【0079】

一態様において、本発明は、前述した核酸構築物態様及び実施形態のいずれかの核酸構築物、前述したベクター態様及び実施形態のいずれかのベクター又は前述した態様及び実施形態のいずれかの系を含む細胞を提供する。実施形態において、細胞は、T細胞又はNK細胞である。

【0080】

一実施形態において、細胞は、第1の阻害剤をさらに含み、
 (i) 第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含み、及び第1の阻害剤は、細胞中の内在性CD3の発現を低減し；
 (ii) 第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含み、及び第1の阻害剤は、細胞中の内在性CD3の発現を低減し；又は
 (iii) 第1のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含み、及び第1の阻害剤は、細胞中の内在性CD3の発現を低減する。
 一実施形態において、第1の阻害剤は、細胞中の第1のキメラ膜タンパク質の発現を低減しないか又は実質的に低減しない(例えば、第1の阻害剤は、第1の阻害剤の非存在下での第1のキメラ膜タンパク質の発現と比較して2、5、10、15又は20%以下のレベルで第1のキメラ膜タンパク質の発現を低減する)。

30

【0081】

一実施形態において、細胞は、第2の阻害剤をさらに含み、
 (i) 第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び第2の阻害剤は、細胞中の内在性CD3の発現を低減し；
 (ii) 第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び第2の阻害剤は、細胞中の内在性CD3の発現を低減し；又は
 (iii) 第2のキメラ膜タンパク質は、CD3の細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び第2の阻害剤は、細胞中の内在性CD3の発現を低減する。
 一実施形態において、第2の阻害剤は、細胞中の第2のキメラ膜タンパク質の発現を低減しないか又は実質的に低減しない(例えば、第2の阻害剤は、第2の阻害剤の非存在下での第2のキメラ膜タンパク質の発現と比較して2、5、10、15又は20%以下のレベルで第2のキメラ膜タンパク質の発現を低減する)。

40

【0082】

一実施形態において、第1又は第2の阻害剤は、RNA干渉を媒介する薬剤、例えばs

50

i R N A 若しくは s h R N A 又は s i R N A 若しくは s h R N A をコードする核酸分子である。一実施形態において、第 1 又は第 2 の阻害剤は、遺伝子編集系（例えば、C R I S P R / C a s 9 系、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ系、T A L E N 系若しくはメガヌクレアーゼ系）又は遺伝子編集系の 1 つ以上の成分をコードする核酸分子である。

【 0 0 8 3 】

一態様において、本発明は、増殖性疾患有する対象を治療する方法であって、前述した細胞態様及び実施形態のいずれか 1 つの細胞を対象に投与することを含む方法を提供する。実施形態において、前記対象は、腫瘍を有し、及び前記投与は、前記腫瘍に対する免疫を前記対象に提供する。

【 0 0 8 4 】

一態様において、本発明は、癌を有する対象において抗癌免疫応答を提供する方法であって、前述した細胞態様及び実施形態のいずれか 1 つの細胞を対象に投与することを含む方法を提供する。

【 0 0 8 5 】

一実施形態において、前記細胞は、T 細胞又はN K 細胞であり、且つ前記対象に対してオートロガスである。他の実施形態では、前記細胞は、同種異系 T 細胞又はN K 細胞である。実施形態において、前記対象は、ヒトである。一実施形態では、対象は、癌を有する。一実施形態において、癌は、例えば、少なくとも 1 つの過去の標準療法に際して進行している対象における中皮腫（例えば、悪性胸膜中皮腫）；肺癌（例えば、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺扁平上皮癌又は大細胞肺癌）；膵臓癌（例えば、少なくとも 1 つの過去の標準療法に際して進行している対象における例えば膵管腺癌若しくは転移性膵管腺癌（P D A ））；食道腺癌、卵巣癌（例えば、過去の標準療法の少なくとも 1 つのレジメン後に進行している対象における例えば漿液性上皮卵巣癌）、乳癌、大腸癌、膀胱癌又はそれらのいずれかの組み合わせから選択される。一実施形態において、癌は、慢性リンパ性白血病（C L L ）、マントル細胞リンパ腫（M C L ）、多発性骨髄腫、急性リンパ性白血病（A L L ）、ホジキンリンパ腫、B 細胞急性リンパ性白血病（B A L L ）、T 細胞急性リンパ性白血病（T A L L ）、小リンパ球性白血病（S L L ）、B 細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（D L B C L ）、慢性炎症を伴うD L B C L 、慢性骨髓性白血病、骨髓増殖性腫瘍、囊胞性リンパ腫、小児性囊胞性リンパ腫、有毛細胞性白血病、小細胞若しくは大細胞性囊胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性病態、M A L T リンパ腫（粘膜関連リンパ組織型節外性辺縁帯リンパ腫）、辺縁帯リンパ腫、骨髓異形成、骨髓異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、脾辺縁帯リンパ腫、脾臓リンパ腫 / 白血病、びまん性赤脾髓小型 B 細胞リンパ腫、有毛細胞性白血病亜型、リンパ形質細胞性リンパ腫、H 鎮病、形質細胞骨髓腫、孤立性骨形質細胞腫、骨外形成細胞腫、節性辺縁帯リンパ腫、小児性節性辺縁帯リンパ腫、原発性皮膚濾胞中心リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、原発性縦隔（胸腺）大細胞型 B 細胞リンパ腫、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫、A L K 陽性大細胞型 B 細胞リンパ腫、H H V 8 関連多中心性キャッスルマン病に発生する大細胞型 B 細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、B 細胞リンパ腫、急性骨髓性白血病（A M L ）又は分類不能型リンパ腫から選択される。

【 0 0 8 6 】

一実施形態において、第 1 の抗原結合ドメインは、第 1 の抗原（例えば、第 1 の腫瘍抗原）に結合し、及び第 2 の抗原結合ドメインは、第 2 の抗原（例えば、第 2 の腫瘍抗原）に結合し、癌は、第 1 の抗原（例えば、第 1 の腫瘍抗原）及び / 又は第 2 の抗原（例えば、第 2 の腫瘍抗原）の異種発現を呈し、例えば、癌における細胞の 9 0 %、8 0 %、7 0 %、6 0 % 又は 5 0 % 未満は、第 1 の抗原（例えば、第 1 の腫瘍抗原）を発現し、及び癌における細胞の 9 0 %、8 0 %、7 0 %、6 0 % 若しくは 5 0 % 未満は、第 2 の抗原（例えば、第 2 の腫瘍抗原）を発現する。

【 0 0 8 7 】

10

20

30

40

50

一態様において、本発明は、細胞を作製する方法であって、前述したベクター態様及び実施形態のベクターを細胞に導入することを含む方法を提供する。一実施形態において、この方法は、前述したベクター態様及び実施形態のベクターで細胞を形質導入することを含む。

【0088】

一実施形態において、本方法は、第1の阻害剤を細胞に導入することをさらに含み、(i) 第1のキメラ膜タンパク質は、CD3 の細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含み、及び第1の阻害剤は、細胞中の内在性CD3 の発現を低減し；(ii) 第1のキメラ膜タンパク質は、CD3 の細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含み、及び第1の阻害剤は、細胞中の内在性CD3 の発現を低減し；又は(iii) 第1のキメラ膜タンパク質は、CD3 の細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含み、及び第1の阻害剤は、細胞中の内在性CD3 の発現を低減する。一実施形態において、第1の阻害剤は、細胞中の第1のキメラ膜タンパク質の発現を低減しないか又は実質的に低減しない(例えば、第1の阻害剤は、第1の阻害剤の非存在下での第1のキメラ膜タンパク質の発現と比較して2、5、10、15又は20%以下のレベルで第1のキメラ膜タンパク質の発現を低減する)。

【0089】

一実施形態において、本方法は、第2の阻害剤を細胞に導入することをさらに含み、(i) 第2のキメラ膜タンパク質は、CD3 の細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び第2の阻害剤は、細胞中の内在性CD3 の発現を低減し；(ii) 第2のキメラ膜タンパク質は、CD3 の細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び第2の阻害剤は、細胞中の内在性CD3 の発現を低減し；又は(iii) 第2のキメラ膜タンパク質は、CD3 の細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含み、及び第2の阻害剤は、細胞中の内在性CD3 の発現を低減する。一実施形態において、第2の阻害剤は、細胞中の第2のキメラ膜タンパク質の発現を低減しないか又は実質的に低減しない(例えば、第2の阻害剤は、第2の阻害剤の非存在下での第2のキメラ膜タンパク質の発現と比較して2、5、10、15又は20%以下のレベルで第2のキメラ膜タンパク質の発現を低減する)。

【0090】

一実施形態において、第1又は第2の阻害剤は、RNA干渉を媒介する薬剤、例えばsiRNA若しくはshRNA又はsiRNA若しくはshRNAをコードする核酸分子である。一実施形態において、第1又は第2の阻害剤は、遺伝子編集系(例えば、CRISPR/Cas9系、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ系、TALEN系若しくはメガヌクレアーゼ系)又は遺伝子編集系の1つ以上の成分をコードする核酸分子である。

【0091】

一実施形態において、細胞は、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はNK細胞である。

【0092】

ベクター

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のキメラポリペプチドをコードする核酸配列を含むベクターに関する。一実施形態では、ベクターは、DNAベクター、RNAベクター、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又はレトロウイルスベクターから選択される。一実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。

【0093】

実施形態では、ベクターは、例えば、本明細書に記載のキメラタンパク質をコードする核酸配列と、in hKIR細胞質ドメインと、膜貫通ドメイン、例えばKIR膜貫通ドメイン及び阻害剤細胞質ドメイン、例えばITIMドメイン(例えば、in hKIR ITIMドメイン)を含む抑制分子をコードする核酸配列とを含む。実施形態では、抑制分子は、天然型in hKIRであるか、或いは天然型in hKIRと少なくとも50、60、

10

20

30

40

50

70、80、85、90、95若しくは99%の相同性を共有する配列又は天然型 i nh K I R と 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15若しくは20以下の残基が異なる配列である。

【0094】

実施形態では、抑制分子をコードする核酸配列は、SLAMファミリー細胞質ドメインと、膜貫通ドメイン、例えばSLAMファミリー膜貫通ドメインと、阻害剤細胞質ドメイン、例えばSLAMファミリードメイン（例えば、SLAMファミリーITIMドメイン）とを含む。実施形態では、抑制分子は、天然型SLAMファミリーメンバーであるか、或いは天然型SLAMファミリーメンバーと少なくとも50、60、70、80、85、90、95若しくは99%の相同性を共有する配列又は天然型SLAMファミリーメンバーと1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15若しくは20以下の残基が異なる配列である。
10

【0095】

一実施形態では、ベクターは、プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは、EF-1プロモーター、CMV IE遺伝子プロモーター、EF-1プロモーター、ユビキチンCプロモーター又はホスホグリセレートキナーゼ（PGK）プロモーターから選択される。一実施形態では、プロモーターは、EF-1プロモーターである。

【0096】

一実施形態では、ベクターは、インビトロ転写ベクター、例えば本明細書に記載の核酸分子のRNAを転写するベクターである。一実施形態では、ベクター中の核酸配列は、ポリ(A)テール、例えば本明細書に記載のポリAテール（例えば、約150のアデノシン塩基を含む）をさらに含む。一実施形態では、ベクター中の核酸配列は、3'UTR、例えば本明細書に記載の3'UTR（例えば、ヒト-グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの繰り返しを含む）をさらに含む。一実施形態では、ベクター中の核酸配列は、プロモーター、例えばT2Aプロモーターをさらに含む。
20

【0097】

ポリペプチド

別の態様では、本発明は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインの1つ以上を含む1つ以上の単離されたポリペプチド分子を特徴とし、前記抗原結合ドメインは、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1(CLECL1)、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPICAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、SSEA-4、CD20、葉酸受容体、ERBB2(Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、プロスターゼ、PAP、ELF2M、エフリンB2、FAP、IGF-I受容体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、チロシナーゼ、EpHA2、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチルGD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、Globoph、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、MAGE-A1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロステイン、サバイビン並びにテロメラーゼ、PCTA-1/ガレクチン8、メランA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座ブレークポイント、ML-IAP、ERG(TMPrss2ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SS
30
40
50

X 2、R A G E - 1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、R U 1、R U 2、レグマイン、H P V E 6、E 7、腸内カルボキシルエステラーゼ、m u t h s p 7 0 - 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 7 2、L A I R 1、F C A R、L I L R A 2、C D 3 0 0 L F、C L E C 1 2 A、B S T 2、E M R 2、L Y 7 5、G P C 3、F C R L 5 及びI G L L 1 の1つ以上から選択される腫瘍抗原に結合する。

【0098】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子の抗原結合ドメインは、T S H R、C D 1 7 1、C S - 1、C L L - 1、G D 3、T n A g、F L T 3、C D 3 8、C D 4 4 v 6、B 7 H 3、K I T、I L - 1 3 R a 2、I L - 1 1 R a、P S C A、P R S S 2 1、V E G F R 2、ルイスY、C D 2 4、P D G F R - 、S S E A - 4、M U C 1、E G F R、N C A M、C A I X、L M P 2、E p h A 2、フコシルG M 1、s L e、G M 3、T G S 5、H M W M A A、o - アセチル - G D 2、葉酸受容体、T E M 1 / C D 2 4 8、T E M 7 R、C L D N 6、G P R C 5 D、C X O R F 6 1、C D 9 7、C D 1 7 9 a、A L K、ポリシアル酸、P L A C 1、G l o b o H、N Y - B R - 1、U P K 2、H A V C R 1、A D R B 3、P A N X 3、G P R 2 0、L Y 6 K、O R 5 1 E 2、T A R P、W T 1、E T V 6 - A M L、精子タンパク質17、X A G E 1、T i e 2、M A D - C T - 1、M A D - C T - 2、F o s 関連抗原1、p 5 3 変異体、h T E R T、肉腫転座ブレークポイント、M L - I A P、E R G (T M P R S S 2 E T S融合遺伝子)、N A 1 7、P A X 3、アンドロゲン受容体、サイクリンB 1、M Y C N、R h o C、C Y P 1 B 1、B O R I S、S A R T 3、P A X 5、O Y - T E S 1、L C K、A K A P - 4、S S X 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 7 2、L A I R 1、F C A R、L I L R A 2、C D 3 0 0 L F、C L E C 1 2 A、B S T 2、E M R 2、L Y 7 5、G P C 3、F C R L 5 及びI G L L 1 の1つ以上から選択される腫瘍抗原に結合する。
10

【0099】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子の抗原結合ドメインは、T S H R、C L D N 6、G P R C 5 D、C X O R F 6 1、C D 9 7、C D 1 7 9 a、A L K、ポリシアル酸、P L A C 1、G l o b o H、N Y - B R - 1、U P K 2、H A V C R 1、A D R B 3、P A N X 3、G P R 2 0、L Y 6 K 及びO R 5 1 E 2 の1つ以上から選択される腫瘍抗原に結合する。
20

【0100】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子の抗原結合ドメインは、抗体、抗体フラグメント、s c F v、F v、F a b、(F a b') 2、シングルドメイン抗体(S D A B)、V H若しくはV L ドメイン又はラクダ科動物V H H ドメインを含む。
30

【0101】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド分子の抗原結合ドメインは、T 細胞受容体の、若しくは鎖、C D 2 8、C D 3 、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C D 1 5 4、K I R D S 2、O X 4 0、C D 2、C D 2 7、L F A - 1 (C D 1 1 a、C D 1 8)、I C O S (C D 2 7 8)、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、G I T R、C D 4 0、B A F F R、H V E M (L I G H T R)、S L A M F 7、N K p 8 0 (K L R F 1)、C D 1 6 0、C D 1 9、I L 2 R 、I L 2 R 、I L 7 R 、I T G A 1 , V L A 1、C D 4 9 a、I T G A 4、I A 4、C D 4 9 D、I T G A 6、V L A - 6、C D 4 9 f、I T G A D、C D 1 1 d、I T G A E、C D 1 0 3、I T G A L、C D 1 1 a、L F A - 1、I T G A M、C D 1 1 b、I T G A X、C D 1 1 c、I T G B 1、C D 2 9、I T G B 2、C D 1 8、L F A - 1、I T G B 7、T N F R 2、D N A M 1 (C D 2 2 6)、S L A M F 4 (C D 2 4 4、2 B 4)、C D 8 4、C D 9 6 (T a c t i l e)、C E A C A M 1、C R T A M、L y 9 (C D 2 2 9)、C D 1 6 0 (B Y 5 5)、P S G L 1、C D 1 0 0 (S E M A 4 D)、S L A M F 6 (N T B - A、L y 1 0 8)、S L A M (S L A M F 1、C D 1 5 0、I P O - 3)、B L A M E (S L A M F 8)、S E L P L G (C D 1 6 2)、L T B R、P A G / C b p、N K p 4 4、N K p 3 0、N K p
40
50

46、NKG2D及び／若しくはNKG2C又はそれらの機能的変異体から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。

【0102】

他の実施形態では、ポリペプチド分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン及び／又は共刺激シグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態では、ポリペプチド分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインを含む。他の好みしい実施形態では、ポリペプチド分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。さらに他の実施形態では、ポリペプチド分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0103】

他の実施形態では、CARポリペプチド分子の一次シグナル伝達ドメインは、CD3、CD3、CD3、CD3、共通FcR(FCKER1G)、FcR(FcR1b)、CD79a、CD79b、FcRIIa、DAP10及びDAP12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。一実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、CD3の機能的シグナル伝達ドメインを含む。

10

【0104】

好みしい実施形態では、CARポリペプチド分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする配列を含む。例えば、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインをコードする配列と、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする配列とを含むことができる。いくつかの実施形態では、コードされた共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKP80(KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8、CD8、IL2R、IL2R、IL7R、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49d、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKP44、NKP30、NKP46若しくはNKG2D又はそれらの機能的変異体の1つ以上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。

20

30

【0105】

いくつかの実施形態では、CARポリペプチド分子は、リーダー配列をさらに含む。

【0106】

特定の実施形態では、ポリペプチド分子の抗原結合ドメインは、 10^{-4} M～ 10^{-8} Mの結合親和性KDを有する。一実施形態では、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、例えば上記で提供された標的に対する本明細書に記載の抗原結合ドメインである。一実施形態では、CAR分子は、標的抗原に対して 10^{-4} M～ 10^{-8} M、例えば 10^{-5} M～ 10^{-7} M、例えば 10^{-6} M又は 10^{-7} Mの結合親和性KDを有する抗原結合ドメインを含む。一実施形態では、抗原結合ドメインは、参照抗体、例えば本明細書に記載の抗体の少なくとも5倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍又は1,000倍小さい結合親和性を有する。一実施形態では、コードされた抗原結合ドメインは、参照抗体(例えば、抗原結合ドメインが由来する抗体)よりも少なくとも5倍小さい結合親和性を有する。

40

50

【0107】

別の態様では、本発明は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む単離されたポリペプチド分子を特徴とし、前記抗原結合ドメインは、腫瘍担持抗原（例えば、本明細書に記載の腫瘍担持抗原）に結合する。いくつかの実施形態では、腫瘍担持抗原は、間質細胞又は骨髄由来サプレッサー細胞（M D S C）上に存在する抗原である。

【0108】

キメラタンパク質発現細胞及びキメラタンパク質系発現細胞

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の核酸分子、1つ以上のキメラポリペプチド分子又はベクターを含む細胞、例えば免疫エフェクター細胞（例えば、細胞の集団、例えば免疫エフェクター細胞の集団）に関する。

10

【0109】

一実施形態では、細胞は、ヒトT細胞である。一実施形態では、細胞は、本明細書に記載の細胞（例えば、ヒトT細胞、例えば本明細書に記載のヒトT細胞）又はヒトNK細胞（例えば、本明細書に記載のヒトNK細胞）である。一実施形態では、ヒトT細胞は、CD8+T細胞である。一実施形態では、細胞は、T細胞であり、このT細胞は、ジアグリセロールキナーゼ（D G K）欠損である。一実施形態では、細胞は、T細胞であり、このT細胞は、イカロス欠損である。一実施形態では、細胞は、T細胞であり、このT細胞は、D G K及びイカロスの両方が欠損している。

20

【0110】

別の実施形態では、本明細書に記載のキメラタンパク質発現免疫エフェクター細胞は、別の作用物質、例えば細胞の活性を増強する作用物質をさらに発現し得る。例えば、一実施形態では、この作用物質は、抑制分子を阻害する作用物質であり得る。抑制分子の例としては、例えば、本明細書に記載されるようなPD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5）、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4及びTGF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、例えば第1のポリペプチド、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインに提供する第2のポリペプチドと関連する抑制分子を含む。一実施形態では、作用物質は、例えば、PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5）、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4若しくはTGF又はこれらのいずれかのフラグメントなどの抑制分子の第1のポリペプチドと、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインである（例えば、共刺激ドメイン（例えば、本明細書に記載されるように41BB、CD27又はCD28）及び/又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。一実施形態では、作用物質は、PD-1又はそのフラグメントの第1のポリペプチドと、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、CD27、OX40若しくは4-IgBシグナル伝達ドメイン及び/又は本明細書に記載のCD3シグナル伝達ドメイン）の第2のポリペプチドとを含む。

30

【0111】

一実施形態では、細胞は、in h K I R細胞質ドメインと、膜貫通ドメイン、例えばK I R膜貫通ドメインと、阻害剤細胞質ドメイン、例えばI T I Mドメイン（例えば、in h K I R I T I Mドメイン）とを含む抑制分子をさらに含む。実施形態では、抑制分子は、天然型in h K I Rであるか、或いは天然型in h K I Rと少なくとも50、60、70、80、85、90、95若しくは99%の相同意を共有する配列又は天然型in h K I Rと1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15若しくは20以下の残基が異なる配列である。

40

【0112】

50

一実施形態では、細胞は、SLAMファミリー細胞質ドメインと、膜貫通ドメイン、例えばSLAMファミリー膜貫通ドメインと、阻害剤細胞質ドメイン、例えばSLAMファミリードメイン（例えば、SLAMファミリーITIMドメイン）とを含む抑制分子をさらに含む。実施形態では、抑制分子は、天然型SLAMファミリーメンバーであるか、或いは天然型SLAMファミリーメンバーと少なくとも50、60、70、80、85、90、95若しくは99%の相同性を共有する配列又は天然型SLAMファミリーメンバーと1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15若しくは20以下の残基が異なる配列である。

【0113】

一実施形態では、細胞中の第2のCARは、抑制CARであり、抑制CARは、抑制分子の抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含む。抑制分子は、PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGF、CEACAM-1、CEACAM-3及びCEACAM-5の1つ以上から選択することができる。一実施形態では、第2のCAR分子は、PD1又はそのフラグメントの細胞外ドメインを含む。10

【0114】

実施形態では、細胞中の第2のCAR分子は、一次シグナル伝達ドメイン及び/又は細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0115】

他の実施形態では、細胞中の細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3の機能的ドメイン又はその機能的変異体を含む一次シグナル伝達ドメインと、4-1BBの機能的ドメインを含む共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。20

【0116】

特定の実施形態では、第1のキメラ分子の抗原結合ドメインは、scFvを含み、第2のキメラ分子の抗原結合ドメインは、scFvを含まない。例えば、第1のキメラ分子の抗原結合ドメインは、scFvを含み、第2のキメラ分子の抗原結合ドメインは、ラクダ科動物のVHHドメインを含む。

【0117】

治療 / 併用療法の方法

別の態様では、本発明は、ポリペプチド（例えば、本明細書に記載の）又はポリペプチド（例えば、本明細書に記載の）をコードする1つ以上の核酸を含む細胞を投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、対象は、本明細書に記載の障害を有し、例えば、対象は、癌を有し、例えば、対象は、本明細書に記載の標的抗原を発現する癌を有する。一実施形態では、対象は、ヒトである。30

【0118】

別の態様では、有効量の、ポリペプチド（例えば、本明細書に記載の）を含む細胞を対象に投与することを含む、本明細書に記載の癌関連抗原の発現に関連する疾患を有する対象を治療する方法に関する。

【0119】

さらに別の態様では、対象に、有効量の、本明細書に記載のキメラ分子を含む細胞、例えば免疫エフェクター細胞（例えば、免疫エフェクター細胞の集団）を投与することを含む、腫瘍抗原の発現に関連する疾患を有する対象を治療する方法を特徴とする。40

【0120】

関連する態様では、本発明は、腫瘍抗原の発現に関連する疾患を有する対象を治療する方法を特徴とする。本方法は、免疫細胞の効力を増加させる作用物質と組み合わせて、有効量の、キメラ分子を含む細胞、例えば免疫エフェクター細胞（例えば、免疫エフェクター細胞の集団）を対象に投与することを含む。別の態様では、本発明は、腫瘍抗原の発現と関連する疾患、例えば本明細書に記載の障害を有する対象の治療で使用するための、ポリペプチド（例えば、本明細書に記載の）を含む免疫エフェクター細胞（例えば、免疫エフェクター細胞の集団）を含む組成物を特徴とする。50

【0121】

前述の方法又は使用のいずれかの特定の実施形態では、腫瘍抗原、例えば本明細書に記載の腫瘍抗原に関連する疾患は、癌若しくは悪性腫瘍などの増殖性疾患又は骨髓異形成、骨髓異形成症候群若しくは前白血病などの前癌状態から選択され、或いは本明細書に記載の腫瘍抗原の発現に関連する非癌性適応症である。一実施形態では、疾患は、本明細書に記載の癌、例えば本明細書に記載の標的に関連するような本明細書に記載の癌である。一実施形態では、疾患は、血液癌である。一実施形態では、血液癌は、白血病である。一実施形態では、癌は、B細胞急性リンパ性白血病（「B ALL」）、T細胞急性リンパ性白血病（「T ALL」）、急性リンパ性白血病（ALL）が挙げられるが、これらに限定されない1つ以上の急性白血病、慢性骨髓性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）が挙げられるが、これらに限定されない1つ以上の慢性白血病、B細胞前リンパ性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、有毛細胞性白血病、小細胞又は大細胞性濾胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性病態、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞辺縁帯リンパ腫、多発性骨髓腫、骨髓異形成及び骨髓異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞腫瘍、ワルデンシュトーレムマクログロブリン血症及び骨髓性血液細胞の無効な産生（又は異形成）によって合併された血液学的状態の多様な集合である「前白血病」が挙げられるが、これらに限定されない追加の血液癌若しくは血液学的状態及び本明細書に記載の腫瘍抗原を発現する異型並びに／又は非古典的癌、悪性腫瘍、前癌状態若しくは増殖性疾患が挙げられるが、これらに限定されない本明細書に記載の腫瘍抗原の発現に関連する疾患並びにこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。別の実施形態では、本明細書に記載の腫瘍抗原に関連する疾患は、固形腫瘍である。

10

20

30

40

50

【0122】

前述の方法又は使用のいずれかの特定の実施形態では、疾患に関連する腫瘍抗原は、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1（CLECL1）、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、TnAg、PSMA、ROR1、FLT3、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、SSEA-4、CD20、葉酸受容体、ERBB2（Her2/neu）、MUC1、EGFR、NCAM、プロスターぜ、PAP、ELF2M、エフリンB2、FAP、IGF-I受容体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-ab1、チロシナーゼ、EphA2、フコシリGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチルGD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、GlobobH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、MAGE-A1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロステイン、サバイビン並びにテロメラーゼ、PCTA-1／ガレクチン8、メランA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座ブレークポイント、ML-IAP、ERG（TMPRSS2-ETS融合遺伝子）、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2、レグマイン、HPVE6、E7、腸内カルボキシリエステラーゼ、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5及びIGLL1の1つ以上から選択される。

【0123】

前述の方法又は使用のいずれかの他の実施形態では、疾患に関連する腫瘍抗原は、TSHR、CD171、CS-1、CLL-1、GD3、TnAg、FLT3、CD38、CD44v6、B7H3、KIT、IL-13Ra2、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、SSEA-4、MUC1、EGFR、NCAM、CAIX、LMP2、EphA2、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、Globoph、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53変異体、hTERT、肉腫転座ブレークポイント、ML-IAP、ERG(TMPRSS2ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、RhOC、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、ILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5及びIGLL1の1つ以上から選択される。
10

【0124】

前述の方法又は使用のいずれかの他の実施形態では、疾患に関連する腫瘍抗原は、TSHR、CLDN6、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、Globoph、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K及びOR51E2の1つ以上から選択される。
20

【0125】

特定の実施形態では、本方法又は使用は、免疫エフェクター細胞の効力を増加させる作用物質、例えば本明細書に記載の作用物質と組み合わせて行われる。

【0126】

前述の方法又は使用のいずれかにおいて、腫瘍抗原の発現に関連する疾患は、増殖性疾患、前癌状態、癌及び腫瘍抗原の発現に関連する非癌性適応症からなる群から選択される。
30

【0127】

癌は、血液癌、例えば慢性リンパ性白血病(CLL)、急性白血病、急性リンパ性白血病(ALL)、B細胞急性リンパ性白血病(B-ALL)、T細胞急性リンパ性白血病(T-ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、B細胞前リンパ性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、有毛細胞性白血病、小細胞又は大細胞性濾胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性病態、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞腫瘍、ワルデンシュトトレームマクログロブリン血症又は前白血病の1つ以上から選択される癌であり得る。
40

【0128】

癌は、大腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、肺の非小細胞癌、小腸癌、食道癌、黒色腫、骨癌、膀胱癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚又は眼内悪性黑色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、腔癌、外陰癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児固形癌、膀胱癌、腎臓又は尿管の癌、腎孟癌、中枢神経系(CNS)の新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、T細胞リンパ腫、環境誘発癌、前記癌の組み合わせ及び前記癌の転移性病巣から選択することもできる。
50

【0129】

本明細書に記載の方法又は使用の特定の実施形態では、キメラ分子は、免疫エフェクター細胞の効力を増加させる作用物質、例えばタンパク質ホスファターゼ阻害剤、キナーゼ阻害剤、サイトカイン、免疫抑制分子の阻害剤又はT_{REG}細胞のレベル若しくは活性を減少させる作用物質の1つ以上と組み合わせて投与される。

【0130】

本明細書に記載の方法又は使用の特定の実施形態では、タンパク質ホスファターゼ阻害剤は、SHP-1阻害剤及び/又はSHP-2阻害剤である。

【0131】

本明細書に記載の方法又は使用の特定の実施形態では、キナーゼ阻害剤は、CDK4阻害剤、CDK4/6阻害剤(例えば、パルボシクリブ)、BTK阻害剤(例えば、イブルチニブ若しくはRН-486)、mTOR阻害剤(例えば、ラパマイシン若しくはエペロリムス(RAD001))、MNK阻害剤又は二重PI3K/mTOR阻害剤の1つ以上から選択される。一実施形態では、BTK阻害剤は、インターロイキン-2-誘導性キナーゼ(ITK)のキナーゼ活性を低減又は阻害しない。

10

【0132】

本明細書に記載の方法又は使用の他の実施形態では、免疫抑制分子を阻害する作用物質は、抑制分子の発現を阻害する抗体若しくは抗体フラグメント、抑制核酸、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)、転写アクティベータ様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)又は亜鉛フィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を含む。

20

【0133】

本明細書に記載の方法又は使用の他の実施形態では、T_{REG}細胞のレベル又は活性を減少させる作用物質は、シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渇型又はこれらの組み合わせから選択される。

【0134】

本明細書に記載の方法又は使用の特定の実施形態では、免疫抑制分子は、PD1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGF、CEACAM-1、CEACAM-3及びCEACAM-5からなる群から選択される。

30

【0135】

他の実施形態では、抑制分子を阻害する作用物質は、抑制分子又はそのフラグメントを含む第1のポリペプチドと、細胞に陽性シグナルを提供する第2のポリペプチドとを含み、第1及び第2のポリペプチドは、CAR含有免疫細胞上で発現され、(i)第1のポリペプチドは、PD1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGF、CEACAM-1、CEACAM-3及びCEACAM-5又はこれらのフラグメントを含み、且つ/又は(ii)第2のポリペプチドは、一次シグナル伝達ドメイン及び/若しくは共刺激シグナル伝達ドメインを含む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、CD3の機能的ドメインを含み、且つ/又は共刺激シグナル伝達ドメインは、41BB、CD27及びCD28から選択されるタンパク質の機能的ドメインを含む。

40

【0136】

他の実施形態では、サイトカインは、IL-7、IL-15若しくはIL-21又は両方から選択される。

【0137】

他の実施形態では、免疫エフェクター細胞及び第2の例えば本明細書に記載の併用療法のいずれか(例えば、免疫エフェクター細胞の効力を増加させる作用物質)は、実質的に同時に又は逐次的に投与される。

【0138】

50

一実施形態では、リンパ球輸注法、例えば同種異系リンパ球輸注法が癌の治療で使用され、リンパ球輸注法は、本発明の少なくとも1つの細胞を含む。一実施形態では、自己リンパ球輸注法が癌の治療で使用され、自己リンパ球輸注法は、本明細書に記載の少なくとも1つの細胞を含む。

【0139】

一実施形態では、細胞は、T細胞であり、このT細胞は、ジアグリセロールキナーゼ(DGK)欠損である。一実施形態では、細胞は、T細胞であり、このT細胞は、イカロス欠損である。一実施形態では、細胞は、T細胞であり、このT細胞は、DGK及びイカロスの両方が欠損している。

【0140】

一実施形態では、本方法は、本明細書に記載の細胞を発現する細胞を、このような細胞の活性を増強する作用物質と組み合わせて投与することを含み、この作用物質は、サイトカイン、例えばIL-7、IL-15、IL-21又はこれらの組み合わせである。サイトカインは、細胞と組み合わせて、例えば細胞の投与と同時に又は細胞の投与の直後に送達され得る。或いは、サイトカインは、細胞の投与から長期間後、例えば対象の細胞に対する応答の評価後に送達され得る。一実施形態では、サイトカインは、対象に対し、請求項61～80のいずれか一項に記載の細胞又は細胞の集団と同時に投与される(例えば、同日に投与される)か、又は投与直後に投与される(例えば、投与後1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、6日目又は7日目に投与される)。他の実施形態では、対象に対し、請求項61～80のいずれか一項に記載の細胞又は細胞の集団の投与から長期間後(例えば、例として少なくとも2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間又はそれを超えて後)或いは対象の細胞に対する応答の評価後に投与される。

10

20

30

40

50

【0141】

他の実施形態では、細胞は、細胞の投与に関連する1つ以上の副作用を改善する作用物質と組み合わせて投与される。細胞に関連する副作用は、サイトカイン放出症候群(CRS)又は血球貪食性リンパ組織球症(HLH)から選択することができる。

【0142】

前述の方法又は使用のいずれかの実施形態では、分子を発現する細胞は、腫瘍抗原の発現に関連する疾患を治療する作用物質、例えば本明細書に開示される第2又は第3の療法のいずれかと組み合わせて投与される。追加の例示的な組み合わせは、下記の1つ以上を含む。

【0143】

別の実施形態では、分子、例えば本明細書に記載されるような分子を発現する細胞は、別の作用物質、例えば本明細書に記載のキナーゼ阻害剤及び/又はチェックポイント阻害剤と組み合わせて投与することができる。実施形態では、細胞は、別の作用物質、例えばキメラタンパク質発現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。

【0144】

例えば、一実施形態では、細胞の活性を増強する作用物質は、抑制分子(例えば、免疫抑制分子)を阻害する作用物質であり得る。抑制分子の例としては、PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACA M-3及び/又はCEACAM-5)、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4及びTGF-が挙げられる。

【0145】

一実施形態では、抑制分子を阻害する作用物質は、抑制核酸であり、dsRNA、siRNA又はshRNAである。実施形態では、抑制核酸は、キメラ分子の構成成分をコードする核酸に結合している。例えば、抑制分子は、細胞上で発現され得る。

【0146】

別の実施形態では、抑制分子を阻害する作用物質は、例えば、本明細書に記載の分子であり、例えば第1のポリペプチド、例えば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提供する第2のポリペプチドに関連する抑制分子を含む作

用物質である。一実施形態では、作用物質は、例えば、P D - 1、P D - L 1、C T L A - 4、T I M - 3、C E A C A M (例えは、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3 及び / 又は C E A C A M - 5) 、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 若しくは T G F などの抑制分子又はこれらのいずれかのフラグメント (例えは、これらのいずれかの細胞外ドメインの少なくとも一部) の第 1 のポリペプチドと、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインである (例えは、共刺激ドメイン (例えは、本明細書に記載されるような 4 1 B B 、C D 2 7 若しくは C D 2 8) 及び / 又は一次シグナル伝達ドメイン (例えは、本明細書に記載の C D 3 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。一実施形態では、作用物質は、P D 1 又はそのフラグメント (例えは、P D 1 の細胞外ドメインの少なくとも一部) の第 1 のポリペプチドと、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン (例えは、本明細書に記載の C D 2 8 シグナル伝達ドメイン及び / 又は本明細書に記載の C D 3 シグナル伝達ドメイン) の第 2 のポリペプチドとを含む。

10

【 0 1 4 7 】

一実施形態では、本発明の免疫エフェクター細胞、例えは T 細胞又は N K 細胞は、以前の幹細胞移植、例えは自己幹細胞移植を受けている対象に投与される。

【 0 1 4 8 】

一実施形態では、本発明の免疫エフェクター細胞、例えは T 細胞又は N K 細胞は、以前のメルファランの投与を受けた対象に投与される。

20

【 0 1 4 9 】

一実施形態では、本明細書に記載の細胞は、細胞の効力を増加させる作用物質、例えは本明細書に記載の作用物質と組み合わせて投与される。

【 0 1 5 0 】

一実施形態では、本明細書に記載の細胞は、m T O R 阻害剤の低い免疫増強用量と組み合わせて投与される。理論に束縛されることを望むものではないが、低い免疫増強用量 (例えは、免疫系を完全に抑制するには不十分であるが、免疫機能を改善するのに十分である用量) による治療は、P D - 1 陽性 T 細胞の減少又は P D - 1 陰性細胞の増加を伴うと考えられる。P D - 1 陰性 T 細胞ではなく、P D - 1 陽性 T 細胞は、P D - 1 リガンド、例えは P D - L 1 又は P D - L 2 を発現する細胞とのエンゲージメントによって枯渇する可能性がある。

30

【 0 1 5 1 】

実施形態では、低い免疫増強用量の m T O R 阻害剤、例えはアロステリック型阻害剤、例えは R A D 0 0 1 又は触媒的阻害剤の投与は、本明細書に記載の細胞、例えは T 細胞又は N K 細胞の投与前に開始される。実施形態では、P D 1 陰性免疫エフェクター細胞、例えは T 細胞又は N K 細胞のレベル又は P D 1 陰性免疫エフェクター細胞、例えは T 細胞 / P D 1 陽性免疫エフェクター細胞、例えは T 細胞の比が少なくとも一時的に増加しているように、細胞は、m T O R 阻害剤の十分な時間又は十分な投与が行われた後に投与される。

【 0 1 5 2 】

一実施形態では、本明細書に記載の細胞は、本明細書に記載の投与量及び / 又は投与スケジュールで投与される。

40

【 0 1 5 3 】

別の態様では、本発明は、本発明の 1 つ以上のキメラタンパク質をコードする単離核酸分子、本発明の 1 つ以上のキメラタンパク質の単離ポリペプチド分子、本発明の 1 つ以上のキメラタンパク質をコードする核酸を含むベクター及び医薬品として使用するための、本発明の 1 つ以上のキメラタンパク質を含む細胞に関する。

【 0 1 5 4 】

前述の方法又は使用のいずれかにおいて、腫瘍担持抗原の発現に関連する疾患は、増殖性疾患、前癌状態、癌及び腫瘍担持抗原の発現に関連する非癌性関連適応症からなる群から選択される。実施形態では、本明細書に記載の腫瘍担持抗原に関連する疾患は、固形腫

50

傷である。

【0155】

本明細書に記載の方法又は使用の一実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、別の作用物質と組み合わせて投与される。一実施形態では、作用物質は、キナーゼ阻害剤、例えばCDK4/6阻害剤、BTK阻害剤、mTOR阻害剤、MNK阻害剤又は二重PI3K/mTOR阻害剤及びこれらの組み合わせであり得る。一実施形態では、キナーゼ阻害剤は、CDK4阻害剤、例えば本明細書に記載のCDK4阻害剤、例えばCD4/6阻害剤（例えば、6-アセチル-8-シクロペンチル-5-メチル-2-(5-ピペラジン-1-イル-ピリジン-2-イルアミノ)-8H-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-オン、塩酸塩（パルボシクリブ又はP D 0 3 3 2 9 9 1とも称される）など）である。一実施形態では、キナーゼ阻害剤は、BTK阻害剤、例えば本明細書に記載のBTK阻害剤（例えば、イブルチニブなど）である。一実施形態では、キナーゼ阻害剤は、mTOR阻害剤、例えば本明細書に記載のmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン、ラパマイシン類似体、OSI-027など）である。このmTOR阻害剤は、例えば、mTORC1阻害剤及び/又はmTORC2阻害剤、例えば本明細書に記載のmTORC1阻害剤及び/又はmTORC2阻害剤であり得る。一実施形態では、キナーゼ阻害剤は、MNK阻害剤、例えば本明細書に記載のMNK阻害剤（例えば、4-アミノ-5-(4-フルオロアニリノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンなど）である。MNK阻害剤は、例えば、MNK1a、MNK1b、MNK2a及び/又はMNK2b阻害剤であり得る。二重PI3K/mTOR阻害剤は、例えば、P F - 0 4 6 9 5 1 0 2 あり得る。
10
20

【0156】

本明細書に記載の方法又は使用の一実施形態では、キナーゼ阻害剤は、アロイシンA；フラボピリドール又はHMR-1275、2-(2-クロロフェニル)-5,7-ジヒドロキシ-8-[(3S,4R)-3-ヒドロキシ-1-メチル-4-ペリジニル]-4-クロメノン；クリゾチニブ(P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 ; 2 -(2-クロロフェニル)-5,7-ジヒドロキシ-8-[(2R,3S)-2-(ヒドロキシメチル)-1-メチル-3-ピロリジニル]-4H-1-ベンゾピラン-4-オン、塩酸塩(P 2 7 6 - 0 0)；1-メチル-5-[[2-[5-(トリフルオロメチル)-1H-イミダゾール-2-イル]-4-ピリジニル]オキシ]-N-[4-(トリフルオロメチル)フェニル]-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン(R A F 2 6 5)；インジスラム(E 7 0 7 0)；ロスコビチン(C Y C 2 0 2)；パルボシクリブ(P D 0 3 3 2 9 9 1)；デイナシクリブ(S C H 7 2 7 9 6 5)；N-[5-[[(5-tert-ブチルオキサゾール-2-イル)メチル]チオ]チアゾール-2-イル]ペリジン-4-カルボキサミド(B M S 3 8 7 0 3 2)；4-[[9-クロロ-7-(2,6-ジフルオロフェニル)-5H-ピリミド[5,4-d][2]ベンザゼピン-2-イル]アミノ]-安息香酸(M L N 8 0 5 4)；5-[3-(4,6-ジフルオロ-1H-ベンズイミダゾール-2-イル)-1H-インダゾール-5-イル]-N-エチル-4-メチル-3-ピリジンメタンアミン(A G - 0 2 4 3 2 2)；4-(2,6-ジクロロベンゾイルアミノ)-1H-ピラゾール-3-カルボン酸N-(ペリジン-4-イル)アミド(A T 7 5 1 9)；4-[2-メチル-1-(1-メチルエチル)-1H-イミダゾール-5-イル]-N-[4-(メチルスルホニル)フェニル]-2-ピリミジンアミン(A Z D 5 4 3 8)；及びX L 2 8 1(B M S 9 0 8 6 6 2)から選択されるCDK4阻害剤である。
30
40

【0157】

本明細書に記載の方法又は使用の一実施形態では、キナーゼ阻害剤は、テムシロリムス；リダホリムス(AP23573及びMK8669としても知られる)(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[3.0.3.1.0⁴.⁹]ヘキサトリアコンタ-16,24,26,28-テト
50

ラエン - 1 2 - イル] プロビル] - 2 - メトキシシクロヘキシリジメチルホスフィン酸エステル ; エベロリムス (R A D 0 0 1) ; ラパマイシン (A Y 2 2 9 8 9) ; セマピモド (s i m a p i m o d) ; (5 - { 2 , 4 - ビス [(3 S) - 3 - メチルモルホリン - 4 - イル] ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 - イル } - 2 - メトキシフェニル) メタノール (A Z D 8 0 5 5) ; 2 - アミノ - 8 - [トランス - 4 - (2 - ヒドロキシエトキシ) シクロヘキシル] - 6 - (6 - メトキシ - 3 - ピリジニル) - 4 - メチル - ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 (8 H) - オン (P F 0 4 6 9 1 5 0 2) ; 及び N² - [1 , 4 - ジオキソ - 4 - [[4 - (4 - オキソ - 8 - フェニル - 4 H - 1 - ベンゾピラン - 2 - イル) モルホリニウム - 4 - イル] メトキシ] ブチル] - L - アルギニルグリシル - L - - アスパルチル L - セリン - (配列番号 3 9 として開示される「 R G D S 」) ; 分子内塩 (S F 1 1 2 6) ; 並びに X L 7 6 5 から選択される m T O R 阻害剤である。 10

【 0 1 5 8 】

本明細書に記載の方法又は使用の一実施形態では、キナーゼ阻害剤は、 C G P 0 5 2 0 8 8 ; 4 - アミノ - 3 - (p - フルオロフェニルアミノ) - ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン (C G P 5 7 3 8 0) ; セルコスボラミド ; E T C - 1 7 8 0 4 4 5 - 2 ; 及び 4 - アミノ - 5 - (4 - フルオロアニリノ) - ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジンから選択される M N K 阻害剤である。

【 0 1 5 9 】

本明細書に記載の方法又は使用の一実施形態では、キナーゼ阻害剤は、 2 - アミノ - 8 - [トランス - 4 - (2 - ヒドロキシエトキシ) シクロヘキシル] - 6 - (6 - メトキシ - 3 - ピリジニル) - 4 - メチル - ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 (8 H) - オン (P F - 0 4 6 9 1 5 0 2) ; N - [4 - [[4 - (ジメチルアミノ) - 1 - ピペリジニル] カルボニル] フェニル] - N ' - [4 - (4 , 6 - ジ - 4 - モルホリニル - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 - イル) フェニル] 尿素 (P F - 0 5 2 1 2 3 8 4 , P K I - 5 8 7) ; 2 - メチル - 2 - { 4 - [3 - メチル - 2 - オキソ - 8 - (キノリン - 3 - イル) - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] キノリン - 1 - イル] フェニル } プロピオニトリル (B E Z - 2 3 5) ; アピトリシブ (G D C - 0 9 8 0 , R G 7 4 2 2) ; 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミド (G S K 2 1 2 6 4 5 8) ; 8 - (6 - メトキシピリジン - 3 - イル) - 3 - メチル - 1 - (4 - (ピペラジン - 1 - イル) - 3 - (トリフルオロメチル) フェニル) - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] キノリン - 2 (3 H) - オンマレイン酸 (N V P - B G T 2 2 6) ; 3 - [4 - (4 - モルホリニルピリド [3 ' , 2 ' : 4 , 5] フロ [3 , 2 - d] ピリミジン - 2 - イル) フエノール (P I - 1 0 3) ; 5 - (9 - イソプロピル - 8 - メチル - 2 - モルホリノ - 9 H - プリン - 6 - イル) ピリミジン - 2 - アミン (V S - 5 5 8 4 , S B 2 3 4 3) ; 及び N - [2 - [(3 , 5 - ジメトキシフェニル) アミノ] キノキサリン - 3 - イル] - 4 - [(4 - メチル - 3 - メトキシフェニル) カルボニル] アミノフェニルスルホンアミド (X L 7 6 5) から選択される二重ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ (P I 3 K) 及び m T O R 阻害剤である。 30

【 0 1 6 0 】

本明細書に記載の方法又は使用の一実施形態では、本明細書に記載の免疫エフェクター細胞は、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、例えば本明細書に記載のタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤と組み合わせて対象に投与される。一実施形態では、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、 S H P - 1 阻害剤、例えば本明細書に記載の S H P - 1 阻害剤 (例えば、スチボグルコン酸ナトリウムなど) である。一実施形態では、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、 S H P - 2 阻害剤である。

【 0 1 6 1 】

本明細書に記載の方法又は使用の一実施形態では、キメラ分子は、別の作用物質と組み合わせて投与され、この作用物質は、サイトカインである。サイトカインは、例えば、 I L - 7 , I L - 1 5 , I L - 2 1 又はこれらの組み合わせであり得る。別の実施形態では

10

20

30

40

50

、 C A R 分子は、 チェックポイント阻害剤、 例えば本明細書に記載のチェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される。 例えば、 一実施形態では、 チェックポイント阻害剤は、 P D - 1 、 P D - L 1 、 C T L A - 4 、 T I M - 3 、 C E A C A M (例えば、 C E A C A M - 1 、 C E A C A M - 3 及び / 又は C E A C A M - 5) 、 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 から選択される抑制分子を阻害する。

【 0 1 6 2 】

キメラタンパク質及びキメラタンパク質系発現細胞の作製方法

別の態様では、 本発明は、 細胞、 例えば本明細書に記載の T 細胞又は N K 細胞に、 ポリペプチド又は系 (例えば、 本明細書に記載の) をコードする核酸を含むベクターを導入する (例えば、 形質導入する) ことを含む、 細胞 (例えば、 免疫エフェクター細胞若しくはその集団) 又はポリペプチド若しくは系 (例えば、 本明細書に記載の) をコードする核酸を作製する方法に関する。 10

【 0 1 6 3 】

本方法における細胞は、 免疫エフェクター細胞 (例えば、 T 細胞又は N K 細胞若しくはこれらの組み合わせ) である。 いくつかの実施形態では、 本方法における細胞は、 ジアグリセロールキナーゼ (D G K) 及び / 又はイカロス欠損である。

【 0 1 6 4 】

いくつかの実施形態では、 核酸分子を導入することは、 ポリペプチド若しくは系 (例えば、 本明細書に記載の) をコードする核酸分子を含むベクターを形質導入すること、 又はポリペプチド若しくは系 (例えば、 本明細書に記載の) をコードする核酸分子をトランスフェクトすることを含み、 この核酸分子は、 インビトロ転写 R N A である。 20

【 0 1 6 5 】

他の実施形態では、 細胞の集団は、 細胞の表面上の共刺激分子を刺激するシグナル及び / 又はリガンドに関連する C D 3 / T C R 複合体を刺激する作用物質の存在下で細胞を培養することによって増殖される。 この作用物質は、 抗 C D 3 抗体若しくはそのフラグメント及び / 又は抗 C D 2 8 抗体若しくはそのフラグメントと結合したビーズであり得る。

【 0 1 6 6 】

他の実施形態では、 細胞の集団は、 フローサイトメトリーによって測定したとき、 1 4 日間の増殖期間にわたり、 細胞において少なくとも 2 0 0 倍、 2 5 0 倍、 3 0 0 倍又は 3 5 0 倍の増加をもたらす、 1 つ以上のインターロイキンを含む適切な培地内で増殖される。 30

【 0 1 6 7 】

他の実施形態では、 細胞の集団は、 I L - 1 5 及び / 又は I L - 7 の存在下で増殖される。

【 0 1 6 8 】

特定の実施形態では、 本方法は、 適切な増殖期間後に細胞の集団を凍結保存することをさらに含む。

【 0 1 6 9 】

さらに他の実施形態では、 本明細書に開示される作製方法は、 免疫エフェクター細胞の集団を、 テロメラーゼサブユニット、 例えば h T E R T をコードする核酸と接触させることをさらに含む。 テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、 D N A であり得る。 40

【 0 1 7 0 】

本発明は、 R N A 操作細胞、 例えば本明細書に記載の細胞、 例えば免疫エフェクター細胞 (例えば、 T 細胞、 N K 細胞) の集団を生成し、 外因性 R N A を一過性発現させる方法も提供する。

【 0 1 7 1 】

別の態様では、 本発明は、 有効量の本明細書に記載されるような細胞を対象に投与することを含む、 対象において抗腫瘍免疫を提供する方法に関する。 一実施形態では、 細胞は、 自己 T 細胞又は N K 細胞である。 一実施形態では、 細胞は、 同種異系 T 細胞又は N K 細 50

胞である。一実施形態では、対象は、ヒトである。

【0172】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるような核酸分子を含むベクターでトランスフェクト又は形質導入されている自己細胞の集団を含む。一実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクターである。一実施形態では、ベクターは、本明細書の他の箇所に記載されているような自己不活性化レンチウイルスベクターである。一実施形態では、ベクターは、細胞、例えばT細胞又はNK細胞に送達され（例えば、トランスフェクション又はエレクトロポレーションによって）、ベクターは、mRNA分子として転写されている、本明細書に記載されるようなポリペプチドをコードする核酸分子を含み、本発明のキメラタンパク質は、このRNA分子から翻訳され、細胞の表面上で発現される。

10

【0173】

一実施形態では、本発明の分子の核酸分子（例えば、本明細書に記載されるような）は、mRNA分子として発現される。一実施形態では、本発明の発現細胞、例えば免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）は、所望のタンパク質をコードするRNA分子を細胞にトランスフェクション又はエレクトロポレーションする（例えば、ベクター配列なしに）ことによって生成することができる。一実施形態では、本発明の分子のキメラタンパク質は、このRNA分子が組み込まれ、組換え細胞の表面上で発現されると、RNA分子から翻訳される。

【0174】

特定の態様では、前述のキメラタンパク質（例えば、本明細書に記載の系の）は、同じフレーム内の単一の核酸分子により、単一のポリペプチド鎖としてコードされる。この態様では、タンパク質は、例えば、1つ以上のペプチド切断部位（例えば、自己切断部位又は細胞内プロテアーゼの基質）によって分離され得る。ペプチド切断部位の例としては、以下が挙げられ、ここで、GSG残基は、任意選択である。

T2A : (GSG) E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号40)

P2A : (GSG) A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号41)

E2A : (GSG) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号42)

F2A : (GSG) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号43)

【0175】

関連する態様では、本発明は、2つのキメラポリペプチドをコードする、上述したような単一タンパク質を特徴とする。

30

【0176】

他の態様では、前述のポリペプチド（例えば、系の）は、単一の又は複数の核酸分子によってコードされ、単一のポリペプチドとして発現されない。ここで、例えば、ポリペプチドは、共通のプロモーターによって制御されるか、又は配列内リボソーム進入部位によって分離され得る。或いは、2つのタンパク質の発現は、例えば、別個のプロモーターによって制御され得る。

【0177】

さらに別の態様では、本発明は、異なるキメラタンパク質（例えば、系の）をコードする前述の核酸分子を含む1つ以上のベクター（例えば、上述のベクターのいずれか）を特徴とする。

40

【図面の簡単な説明】

【0178】

【図1】構成的活性化TCRベースのキメラ抗原受容体（TCAR）を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、細胞内ヘテロ二量体化ドメインとの融合、及び第2のヘテロ二量体化ドメインと融合したCD3などの内在性TCR複合体メンバーによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図2】細胞内ヘテロ二量体化ドメインを含む抗原活性化TCARのJNLシグナル伝達及びIL2発現を示すグラフの対である。

【図3】表示の構築物でトランスフェクトした細胞における表示細胞殺傷のパーセンテー

50

ジをトランスフェクションの関数として示すグラフの対である。

【図4】表示の構築物におけるトランスフェクションの関数としてIL-2発現の濃度を示すグラフである。

【図5】増殖増大を伴う構成的活性化TCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、細胞内ヘテロ二量体化ドメインとの融合、及び第2の共刺激ドメインと、第2のヘテロ二量体化ドメインとに融合したCD3などの内在性TCR複合体メンバーの細胞外及び膜貫通ドメインによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。第3世代CARと異なり、この配向は、両方の共刺激メンバーを膜近位にし、増殖能力をさらに増強するはずである。

【図6】構成的活性化TCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。天然の細胞外ドメインを含むか又は含まない共刺激受容体は、細胞内ヘテロ二量体化ドメインとの融合、及び第2の細胞内ヘテロ二量体化ドメインと融合したCD3などの内在性TCR複合体メンバーに融合したターゲティングドメインによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図7】構成的活性化TCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。細胞質ゾル共刺激ドメインは、細胞内ヘテロ二量体化ドメインとの融合、及び第2の細胞内ヘテロ二量体化ドメインと融合したCD3などの内在性TCR複合体メンバーに融合したターゲティングドメインによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図8】構成的活性化TCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、TCR複合体のメンバーに結合する細胞内ドメインとの融合によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図9】構成的活性化TCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、TCR複合体のメンバーに結合する細胞外ドメインとの融合によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図10】構成的活性化キメラ抗原受容体TCR融合物(fusTCAR)を示す概略図である。抗体に由来するターゲティングドメインのVL及びVHは、内在性切断型及びTCRとの直接融合によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図11】構成的活性化キメラ抗原受容体TCR融合物(fuTCAR)を示す概略図である。抗体に由来するターゲティングドメインのVL及びVHは、内在性切断型及びTCRとの直接融合、続いて1つ以上の共刺激ドメインの細胞内融合によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図12】構成的活性化キメラ抗原受容体TCR融合物(fusTCAR)を示す概略図である。ターゲティングドメインは、CD3などの内在性TCR複合体メンバーとの直接融合によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図13】構成的活性化キメラ抗原受容体TCR融合物(fusTCAR)を示す概略図である。ターゲティングドメインは、CD3などの内在性TCR複合体メンバー、続いて4-1BBなどの1つ以上の細胞内共刺激ドメイン又はその機能的変異体との直接融合によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図14】構成的活性化キメラ抗原受容体TCR融合物(fusTCAR)を示す概略図である。ターゲティングドメインは、CD3などの内在性TCR複合体メンバーの細胞外及び膜貫通ドメイン、続いて4-1BBなどの1つ以上の細胞内共刺激ドメイン又はその機能的変異体との直接融合によってTCR複合体内に埋め込まれる。

【図15】活性化fusTCARのJNLシグナル伝達及びIL2発現を示すグラフである。

【図16】表示の構築物でトランスフェクトした細胞による表示細胞の特異的殺傷のパーセンテージをトランスフェクションの関数として示す一連のグラフである。

【図17】表示の構築物によるトランスフェクションの関数としてIL-2発現を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図18】表示の構築物でトランスフェクトした細胞における表示細胞殺傷のパーセンテージをトランスフェクションの関数として示すグラフの対である。

【図19】表示の構築物におけるトランスフェクションの関数としてIL-2発現の濃度を示すグラフである。

【図20】増殖増大を伴う調節可能なTCRベースのキメラ抗原受容体(rTCAR)を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、細胞内ヘテロ二量体化スイッチドメインとの融合、及び第2の共刺激ドメインと、第2のヘテロ二量体化スイッチドメインとに融合したCD3などの内在性TCR複合体メンバーの細胞外及び膜貫通ドメインによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。シグナル伝達は、ラパログなどのスイッチ分子の添加時に誘導される。10

【図21】調節可能なTCRベースのキメラ抗原受容体(rTCAR)を示す概略図である。天然の細胞外ドメインを含むか又は含まない共刺激受容体は、細胞内ヘテロ二量体化スイッチドメインとの融合、及び第2の細胞内ヘテロ二量体化スイッチドメインと融合したCD3などの内在性TCR複合体メンバーに融合したターゲティングドメインによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。増殖は、ラパログなどのスイッチ分子の添加時に誘導される。

【図22】構成的活性化TCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、細胞内ヘテロ二量体化スイッチドメインとの融合、及び共刺激受容体の膜貫通及び細胞内ドメインと、第2のヘテロ二量体化スイッチドメインとに融合した、TCR複合体のメンバーに結合する細胞外ドメインによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。シグナル伝達は、ラパログなどのスイッチ分子の添加時に誘導される。20

【図23】構成的活性化TCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、細胞内ヘテロ二量体化スイッチドメインとの融合、及び第2のヘテロ二量体化スイッチドメインと、TCR複合体のメンバーに結合する細胞内ドメインとに融合した、その天然の細胞外ドメインを含むか又は含まない共刺激受容体による同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。シグナル伝達は、ラパログなどのスイッチ分子の添加時に誘導される。

【図24】構成的活性化TCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、細胞内ヘテロ二量体化スイッチドメインとの融合、及び第2のヘテロ二量体化スイッチドメインと、TCR複合体のメンバーに結合する細胞内ドメインとに融合した、細胞質ゾル共刺激ドメインによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。シグナル伝達は、ラパログなどのスイッチ分子の添加時に誘導される。30

【図25】調節可能なTCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、細胞内ヘテロ二量体化スイッチドメインとの融合、及び第2のヘテロ二量体化スイッチドメインと融合したCD3などの内在性TCR複合体メンバーによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。シグナル伝達は、ラパログなどのスイッチ分子の添加時に誘導される。

【図26】調節可能なTCRベースのキメラ抗原受容体(rTCAR)を示す概略図である。ターゲティング及び共刺激ドメインは、細胞内ヘテロ二量体化スイッチドメインとの融合、及び第2のヘテロ二量体化スイッチドメインと融合したCD3などの内在性TCR複合体メンバーによる同時トランスフェクション/同時形質導入によってTCR複合体内に埋め込まれる。シグナル伝達は、ラパログなどのスイッチ分子の添加時に誘導される。シグナル伝達がTCR複合体の他のメンバーによって誘導されることを実証するために、CD3融合物からのITAMドメインをフェニルアラニンに変異させた。40

【図27】RAD001で誘導した抗原活性化FKBP/FRP_rTCARのJNLシグナル伝達及びIL2発現を示す一連のグラフである。

【図28】CD3eITAMシグナル伝達のノックアウトを含む及び含まないラパログ媒介抗原活性化FKBP/FRP_rTCARについてのJNLシグナル伝達及びIL2発現50

の比較を示す一連のグラフである。

【図 29】表示の構築物でトランスフェクトした細胞における表示細胞殺傷のパーセンテージをトランスフェクションの関数として示すグラフの対である。

【図 30】表示の構築物におけるトランスフェクションの関数としての IL - 2 発現の濃度を示すグラフである。

【図 31】表示の構築物でトランスフェクトした細胞における表示細胞殺傷のパーセンテージをトランスフェクションの関数として示すグラフの対である。

【図 32】表示の構築物におけるトランスフェクションの関数としての IL - 2 発現の濃度を示すグラフである。

【図 33】N F A T リポータ遺伝子系により生成される光強度を示すグラフである。抗イディオタイプ抗体は、発現された s c F v に結合する。

【図 34】表示の構築物でトランスフェクトした細胞における表示細胞殺傷のパーセンテージをトランスフェクションの関数として示すグラフの対である。

【図 35】表示の構築物におけるトランスフェクションの関数としての IL - 2 発現の濃度を示すグラフである。

【図 36】左側パネルは、表示の構築物でトランスフェクトした細胞における表示細胞殺傷のパーセンテージをトランスフェクションの関数として示すグラフである。右側パネルは、表示の発現条件下において表示の構築物を発現する細胞の数を示す一連のグラフである。

【図 37】表示の構築物でトランスフェクトした細胞における表示細胞殺傷のパーセンテージをトランスフェクションの関数として示すグラフである。

【図 38】表示の構築物におけるトランスフェクションの関数としての IL - 2 発現の濃度を示すグラフである。

【図 39】表示の構築物でトランスフェクトした細胞における表示細胞殺傷のパーセンテージをトランスフェクションの関数として示すグラフである。

【図 40】表示の構築物におけるトランスフェクションの関数としての IL - 2 発現の濃度を示すグラフである。

【図 41】本発明の様々な態様で使用するキメラ膜タンパク質の種々の例を示す。本発明の系態様において、2つ以上のキメラ膜タンパク質を一緒に使用し、例えば細胞内で一緒に発現させる。

【図 42】本発明の系からアセンブリングした T C R ベースのキメラ抗原受容体 (T C A R) を示す概略図である。 T C A R は、第 1 及び第 2 の抗原結合ドメイン (ここでは、 s c F v 抗原結合ドメインとして描かれる) と、 C D 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質及び C D 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質との融合によって 2 つの抗原に対する特異性を有する。共刺激シグナル伝達ドメインは、 1 つ以上のキメラ膜分子の細胞内部分にさらに融合している。例えば、 T 細胞への両方のキメラ膜タンパク質の同時トランスフェクション / 同時形質導入により、 2 つの異種キメラタンパク質を含む T C R が形成され、これにより T C R / 細胞に対する二重抗原特異性及び抗原結合時の C D 3 シグナル伝達と共に刺激シグナル伝達との両方がもたらされる。

【図 43】本発明の系からアセンブリングした T C R ベースのキメラ抗原受容体 (T C A R) を示す概略図である。 T C A R は、第 1 及び第 2 の抗原結合ドメイン (ここでは、 s c F v 抗原結合ドメインとして描かれる) と、 C D 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質及び C D 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質との融合によって 2 つの抗原に対する特異性を有する。共刺激シグナル伝達ドメインは、 1 つ以上のキメラ膜分子の細胞内部分にさらに融合している。例えば、 T 細胞への両方のキメラ膜タンパク質の同時トランスフェクション / 同時形質導入により、 2 つの異種キメラタンパク質を含む T C R が形成され、これにより T C R / 細胞に対する二重抗原特異性及び抗原結合時の C D 3 シグナル伝達と共に刺激シグナル伝達との両方がもたらされる。

【図 44】本発明の系からアセンブリングした T C R ベースのキメラ抗原受容体 (T C A R) を示す概略図である。 T C A R は、第 1 及び第 2 の抗原結合ドメイン (ここでは、 s

10

20

30

40

50

c F v 抗原結合ドメインとして描かれる)と、CD 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質及びCD 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質との融合によって2つの抗原に対する特異性を有する。共刺激シグナル伝達ドメインは、1つ以上のキメラ膜分子の細胞内部分にさらに融合している。例えば、T細胞への両方のキメラ膜タンパク質の同時トランスフェクション/同時形質導入により、2つの異種キメラタンパク質を含むTCRが形成され、これによりTCR/細胞に対する二重抗原特異性及び抗原結合時のCD 3 シグナル伝達と共に刺激シグナル伝達との両方がもたらされる。

【図45】本発明の系からアセンブリングしたTCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。TCARは、第1、第2及び第3の抗原結合ドメイン(ここでは、sc F v 抗原結合ドメインとして描かれる)と、CD 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質、CD 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質、及びCD 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質との融合によって3つの抗原に対する特異性を有する。共刺激シグナル伝達ドメインは、1つ以上のキメラ膜分子の細胞内部分にさらに融合している。例えば、T細胞への両方のキメラ膜タンパク質の同時トランスフェクション/同時形質導入によって2つの異種キメラタンパク質を含むTCRが形成され、これによりTCR/細胞に対する二重抗原特異性及び抗原結合時のCD 3 シグナル伝達と共に刺激シグナル伝達との両方がもたらされる。

【図46】本発明の系からアセンブリングしたTCRベースのキメラ抗原受容体(TCAR)を示す概略図である。TCARは、第1及び第2の抗原結合ドメイン(ここでは、sc F v 抗原結合ドメインとして描かれる)と、CD 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質(ここでは、タンデムsc F v 融合として示される)との融合、及びCD 3 タンパク質の細胞外部分を含むタンパク質と融合した第3の抗原結合ドメインによって3つの抗原に対する特異性を有する。共刺激シグナル伝達ドメインは、1つ以上のキメラ膜分子の細胞内部分にさらに融合している。例えば、T細胞への両方のキメラ膜タンパク質の同時トランスフェクション/同時形質導入によって2つの異種キメラタンパク質を含むTCRが形成され、これによりTCR/細胞に対する二重抗原特異性及び抗原結合時のCD 3 シグナル伝達と共に刺激シグナル伝達との両方がもたらされる。

【図47A - 47D】JNL細胞上のTCARの発現を示すフローサイトメトリープロットのパネルである。非形質導入JNL(UTD)、CD 19 - TCAR、CD 22 - TCAR又はCD 19 - TCAR及びCD 22 - TCAR(CD 19 / 22二重TCAR)形質導入細胞をCD 19 - CAR抗イディオタイプAb及びCD 22 - Fvで染色してから、フローサイトメトリーによりアッセイした。左上象限内の数は、CD 22 - TCARの発現レベルを表し、右下象限内の数は、CD 19 - TCARの発現レベルを表す(幾何平均)。

【図48A - 48C】TCARの機能を試験する、Jurkat NFATルシフェラーゼ(JNL)リポータアッセイからの結果を示す棒グラフのパネルである。非形質導入JNL(UTD)、CD 19 - TCAR、CD 22 - TCAR又はCD 19 - TCAR及びCD 22 - TCAR(CD 19 / 22二重TCAR)形質導入細胞を慢性骨髓性白血病(CML)細胞株K562(K562 - WT)又はCD 19(K562 - CD 19)若しくはCD 20(K562 - CD 20)を過剰発現するように操作されたK562細胞と共に培養した。表示の腫瘍:JNL細胞比の各JNL細胞株についてルミネッセンス(RLU)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0179】

本発明は、T細胞受容体(TCR)シグナル伝達を調節するためのキメラCD 3タンパク質の使用を特徴とする。具体的には、本発明は、一部には、それらの細胞外ドメインのすべて又は大部分を抗原結合ドメインに融合させたキメラCD 3タンパク質(例えば、CD 3、CD 3 及びCD 3)が同族抗原の存在下でTCRを活性化できるという発見に基づいている。本発明は、上記キメラタンパク質がキメラ分子の細胞内部分における共刺激ドメインの組み入れを通して増強され得るという観察にさらにに基づいている。従って

、本発明の操作されたシグナル伝達複合体の好ましい要素は、抗原結合ドメイン、上記 C D 3 タンパク質の 1 つに由来する細胞外ドメイン及び細胞内共刺激ドメインを含む。興味深いことに、本発明は、これらの要素が、抗原ベースの T C R シグナル伝達を達成するために単一のポリペプチド中に存在する必要がないという発見にさらに基づいている。実際には、抗原結合ドメイン及び / 又は共刺激ドメインのいずれかは、第 2 のキメラ分子に操作され、第 2 のキメラ分子及び C D 3 分子が、本明細書に記載されるように、誘導型又は構成型二量体又はドメインのいずれかを介して結合されることを条件として、依然としてシグナル伝達を達成することができる。

【 0 1 8 0 】

T C R ベースのキメラ抗原受容体 (T C A R) は、従来のキメラ抗原受容体に対して固有の有益性を提供することができる。従来のキメラ抗原受容体は、標的ドメイン、それに続くヒンジ、膜貫通ドメイン、1 つ以上の共刺激ドメイン及び C D 3 などのシグナル伝達ドメインを含む単一の連続鎖分子である。標的ドメインを T C R 複合体の一部として作製することにより、T C A R によって誘導されるシグナル伝達は、T C R 複合体内の補助タンパク質の経路全体を利用し、例えば C A R 鎖上の C D 3 からの従来の C A R によって提供される排他的なシグナル伝達に限定されない。T 細胞活性化及び増殖のための天然の経路では、関与する細胞内経路のメンバーは、膜の近位にあるが、これは、従来の C A R フォーマットでは共刺激ドメイン及びシグナル伝達ドメインの両方にとって不可能であり、T C A R は、T 細胞に操作されるのに最適な配向を可能にする。

10

【 0 1 8 1 】

定義

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本発明が関係する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。

20

【 0 1 8 2 】

用語「1 つの (a) 」及び「1 つの (a n) 」は、その冠詞の文法上の指示対象の 1 つ又は 1 つより多い（即ち少なくとも 1 つ）を指す。例として、「要素」は、1 つの要素又は 1 つより多い要素を意味する。

30

【 0 1 8 3 】

用語「約」は、量、時間的な継続期間などの計測可能な値を参照するとき、指定される値から ± 2 0 % 又は一部の例では ± 1 0 % 、又は一部の例では ± 5 % 、又は一部の例では ± 1 % 、又は一部の例では ± 0 . 1 % の変動が、かかる変動が本開示の方法の実施に適切であるものとして包含されることを意味する。

【 0 1 8 4 】

用語「自己」は、同じ個体に由来する任意の材料であって、後にその個体に再導入されることになる材料を指す。

40

【 0 1 8 5 】

用語「同種異系」は、材料が導入される個体と同じ種の異なる動物に由来する任意の材料を指す。2 つ以上の個体は、1 つ以上の遺伝子座の遺伝子が同一でないとき、互いに同種異系であると言われる。一部の態様において、同じ種の個体からの同種異系材料は、抗原的に相互作用するのに十分に遺伝的に異なり得る。

40

【 0 1 8 6 】

用語「異種」は、異なる種の動物に由来する移植片を指す。

【 0 1 8 7 】

用語「癌」は、異常細胞の無制御の成長によって特徴付けられる疾患を指す。癌細胞は、局所的に又は血流及びリンパ系を通じて体の他の部位に広がり得る。様々な癌の例が本明細書に記載され、限定されないが、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、肺癌、結腸直腸癌、腎癌、肝癌、脳癌、リンパ腫、白血病、肺癌などが挙げられる。用語「腫瘍」及び「癌」は、本明細書では同義的に使用され、例えば、両方の用語とも固形及び液性、例えばびまん性又は循環性腫瘍を包含する。本明細書で使用されるとき、用語「癌」又は「腫瘍」は、前癌性並びに悪性の癌及び腫瘍を含む。

50

【0188】

語句「本明細書に記載の腫瘍抗原の発現に関連する疾患」は、限定されないが、例えば癌若しくは悪性腫瘍などの増殖性疾患又は骨髄形成異常、骨髄異形成症候群若しくは前白血病などの前癌病態を含めた、本明細書に記載の腫瘍抗原の発現に関連する疾患又は本明細書に記載の腫瘍抗原を発現する細胞に関連する病状又は本明細書に記載の腫瘍抗原を発現する細胞に関連する非癌関連の適応症を含む。一態様において、本明細書に記載の腫瘍抗原の発現と関連する癌は、血液癌である。一態様において、本明細書に記載の腫瘍抗原の発現と関連する疾患には、限定されないが、例えば本明細書に記載の腫瘍抗原の発現に関連する非定型の及び／又は非古典的な癌、悪性腫瘍、前癌病態又は増殖性疾患が含まれる。本明細書に記載の腫瘍抗原の発現に関連する非癌関連徵候には、限定されないが、例えば自己免疫疾患（例えば、ループス）、炎症性障害（アレルギー及び喘息）及び移植が含まれる。一部の実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、腫瘍抗原をコードするmRNAを発現するか、又はいずれかの時点で発現した。実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、腫瘍抗原タンパク質（例えば、野生型又は突然変異体）を産生し、腫瘍抗原タンパク質は、正常レベル又は低下したレベルで存在し得る。実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、一時的に検出可能なレベルの腫瘍抗原タンパク質を産生したが、続いて検出可能な腫瘍抗原タンパク質を実質的に産生しなくなった。

10

【0189】

用語「保存的配列改変」は、そのアミノ酸配列を含む抗体又は抗体断片の結合特性が大きい影響又は変化を被ることのないアミノ酸改変を指す。かかる保存的改変には、アミノ酸置換、付加及び欠失が含まれる。改変は、部位特異的突然変異誘発及びPCR媒介性突然変異誘発など、当技術分野において公知の標準技法によって本発明の抗体又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は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、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、スレオニン、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）、分枝側鎖（例えば、スレオニン、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）を有するアミノ酸が含まれる。従って、本発明のCAR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に置き換えることができ、及び変化したCARは、本明細書に記載される機能アッセイを用いて試験することができる。

20

【0190】

「刺激」という用語は、刺激分子（例えば、TCR/CD3複合体）とその同族のリガンド（又はCARの場合には腫瘍抗原）との結合によって誘導される一次応答を指し、それにより、限定されないが、TCR/CD3複合体を介したシグナル伝達、又は適切なNK受容体若しくはシグナル伝達ドメインを介したシグナル伝達などのシグナル伝達事象を媒介する。刺激は、ある分子の発現変化を媒介することができる。

30

【0191】

用語「抗原提示細胞」又は「APC」は、その表面上に主要組織適合遺伝子複合体（MHC）と複合体化した外来抗原を提示するアクセサリー細胞などの免疫系細胞（例えば、B細胞、樹状細胞など）を指す。T細胞は、そのT細胞受容体（TCR）を用いてこうした複合体を認識し得る。APCは、抗原をプロセシングしてそれをT細胞に提示する。

40

【0192】

「免疫エフェクター細胞」は、この用語が本明細書で使用されるとき、免疫応答、例えば免疫エフェクター応答の促進に関する細胞を指す。免疫エフェクター細胞の例としては、T細胞、例えば／T細胞及び／T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（N

50

K) 細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、肥満細胞及び骨髄由来食細胞が挙げられる。

【0193】

「免疫エフェクター機能又は免疫エフェクター応答」は、この用語が本明細書で使用されるとき、標的細胞の免疫攻撃を亢進させる又は促進する例えば免疫エフェクター細胞の機能又は応答を指す。例えば、免疫エフェクター機能又は応答は、標的細胞の死滅又は成長若しくは増殖阻害を促進するT細胞又はNKT細胞の特性を指す。T細胞の場合、一次刺激及び共刺激が免疫エフェクター機能又は応答の例である。

【0194】

用語「コードする」は、定義付けられたヌクレオチド配列（例えば、rRNA、tRNA及びmRNA）又は定義付けられたアミノ酸配列のいずれかを有する生物学的過程における他のポリマー及び巨大分子の合成の錆型としての役割を果たす、遺伝子、cDNA又はmRNAなど、ポリヌクレオチド内の特異的ヌクレオチド配列の固有の特性及びそれによってもたらされる生物学的特性を指す。従って、遺伝子、cDNA又は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又は他の生体系のタンパク質が産生される場合にタンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列がmRNA配列と同一の且つ通常配列表に提供されるものであるコード鎖、及び遺伝子又はcDNAの転写錆型として使用される非コード鎖の両方は、その遺伝子のcDNAのタンパク質又は他の産物をコードすると称することができる。

10

【0195】

特記されない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の全てを含む。タンパク質又はRNAをコードするヌクレオチド配列という語句には、そのタンパク質をコードするヌクレオチド配列が何らかのバージョンで1つ又は複数のイントロンを含み得る限りにおいて、イントロンも含まれ得る。

20

【0196】

用語「有効量」又は「治療有効量」は、本明細書では同義的に使用され、本明細書に記載されるとおりの化合物、製剤、材料又は組成物が特定の生物学的結果を達成するのに有効な量を指す。

30

【0197】

用語「内因性」は、生物、細胞、組織又は系由來の、又はその内部で産生される任意の材料を指す。

【0198】

用語「外因性」は、生物、細胞、組織又は系の外側から導入されるか又はその外側で産生される任意の材料を指す。

【0199】

用語「発現」は、プロモーターによってドライブされる特定のヌクレオチド配列の転写及び/又は翻訳を指す。

【0200】

用語「トランスファーベクター」は、単離核酸を含む組成物であって、細胞内部への単離核酸の送達に使用し得る組成物を指す。当技術分野では、限定されないが、線状ポリヌクレオチド、イオン性又は両親媒性化合物に関連するポリヌクレオチド、プラスミド及びウイルスを含め、多くのベクターが公知である。従って、用語「トランスファーベクター」には自己複製プラスミド又はウイルスが含まれる。この用語は、例えば、ポリリジン化合物、リポソームなど、細胞への核酸のトランスファーを促進する非プラスミド及び非ウイルス化合物もさらに含むものと解釈されなければならない。ウイルストランスクアーベクターの例としては、限定されないが、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。

40

【0201】

用語「発現ベクター」は、発現させるヌクレオチド配列に作動可能に連結した発現制御

50

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、他の発現用エレメントは、宿主細胞によって供給されるか、又はインビトロ発現系に供給され得る。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを組み込むコスマド、プラスミド（例えば、ネイキッド又はリボソームに含まれる）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、当技術分野において公知のもの全てが含まれる。

【0202】

用語「レンチウイルス」は、レトロウイルス科（Retroviridae）の属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞を感染させることができる点でレトロウイルスの中でユニークであり、レンチウイルスは、宿主細胞のDNAに多量の遺伝情報を送達することができ、そのため、遺伝子デリバリーべクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIV及びFIVは、全てレンチウイルスの例である。

10

【0203】

用語「レンチウイルスベクター」は、特に、Milone et al., Mol. Ther. 17(8):1453-1464(2009)に提供されるとおりの自己不活性化レンチウイルスベクターを含め、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部分に由来するベクターを指す。臨床で使用し得るレンチウイルスベクターの他の例としては、限定されないが、例えばOxford BiomedicaからのLENTI VECTO R（登録商標）遺伝子デリバリー技術、LentigenからのLENTIMAX（商標）ベクターシステムなどが挙げられる。非臨床タイプのレンチウイルスベクターも利用可能であり、当業者に公知であろう。

20

【0204】

用語「相同」又は「同一性」は、2つのポリマー分子間、例えば2つのDNA分子又は2つのRNA分子など、2つの核酸分子間又は2つのポリペプチド分子間におけるサブユニット配列同一性を指す。2つの分子の両方におけるサブユニット位置が同じ単量体サブユニットによって占有されるとき、例えば、2つのDNA分子の各々の位置がアデニンによって占有される場合、それらは、その位置で相同又は同一である。2つの配列間の相同性は、一致する位置又は相同な位置の数の直接の関数である。例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、10サブユニット長のポリマーにおける5個の位置）が相同である場合、それらの2つの配列は、50%相同である。位置の90%（例えば、10個中9個）が一致するか又は相同である場合、それらの2つの配列は、90%相同である。

30

【0205】

「ヒト化」形態の非ヒト（例えば、マウス）抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片（抗体のFab、Fab'、F(ab')2又は他の抗原結合部分配列など）である。ほとんどの場合、ヒト化抗体及びその抗体断片は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体又は抗体断片）においてレシピエントの相補決定領域（CDR）からの残基が所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のCDRからの残基に置き換えられているものである。一部の例では、ヒト免疫グロブリンのFabフレームワーク領域（FR）残基が対応する非ヒト残基に置き換えられる。さらに、ヒト化抗体/抗体断片は、レシピエント抗体にも、移入されるCDR又はフレームワーク配列にも見られない残基を含むことができる。これらの改変は抗体又は抗体断片の性能をさらに精緻化及び最適化し得る。一般に、ヒト化抗体又はその抗体断片は、少なくとも1つ及び典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、CDR領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、及びFR領域の全て又は大部分がヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体又は抗体断片は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部分も含むことができる。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.,

40

50

2 : 5 9 3 - 5 9 6 , 1 9 9 2 を参照されたい。

【 0 2 0 6 】

「完全にヒト」は、分子全体がヒト起源であるか、又はヒト形態の抗体又は免疫グロブリンと同一のアミノ酸配列からなる抗体又は抗体断片などの免疫グロブリンを指す。

【 0 2 0 7 】

用語「単離されている」は、自然状態から改変されているか又は取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸又はペプチドは、「単離されている」のではないが、その自然状態の共存する材料から部分的又は完全に分離された同じ核酸又はペプチドは、「単離されている」。単離核酸又はタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができ、又は例えば宿主細胞など、非天然環境中に存在することができる。

10

【 0 2 0 8 】

本発明に関連して、一般的に存在する核酸塩基について以下の略記が使用される。「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、及び「U」は、ウリジンを指す。

【 0 2 0 9 】

用語「作動可能に連結された」又は「転写制御」は、調節配列と異種核酸配列との間ににおける後者の発現をもたらす機能的な連結を指す。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的に関係した状態に置かれているとき、第1の核酸配列は、第2の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写又は発現に影響を及ぼす場合、プロモーターは、コード配列に作動可能に連結されている。作動可能に連結されるDNA配列は、互いに連続し得、例えば2つのタンパク質コード領域をつなぎ合わせる必要がある場合、同じリーディングフレーム内にある。

20

【 0 2 1 0 】

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.)、又は胸骨内注射、腫瘍内、又は輸注技法を含む。

【 0 2 1 1 】

用語「核酸」又は「ポリヌクレオチド」は、一本鎖又は二本鎖の形態のデオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)及びそれらのポリマーを指す。具体的に限定しない限り、この用語には、参照核酸と同様の結合特性を有し、且つ天然に存在するヌクレオチドと同じように代謝される、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸が含まれる。特に指示されない限り、ある詳細な核酸配列は、默示的に、その保存的に改変された変異体(例えば、縮重コドン置換)、アレル、オルソログ、SNP及び相補配列並びに明示的に指示される配列も包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択の(又は全ての)コドンの3番目の位置が混合塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を作成することによって達成し得る(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); 及び Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994))。

30

【 0 2 1 2 】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、同義的に使用され、ペプチド結合によって共有結合的に連結したアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質又はペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質の配列又はペプチドの配列を含むことのできるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドは、互いにペプチド結合によってつなぎ合わされた2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又はタンパク質を含む。本明細書で使用されるとき、この用語は、当技術分野では一般に例えばペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとも称される短鎖と、当技術分野では概してタンパク質と称される、多数の種類があるより長い鎖との両方を指す。「ポリペプチド」には、例えば、生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴ

40

50

ペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変異体、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が特に含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド又はこれらの組み合わせが含まれる。

【0213】

用語「プロモーター」は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるのに必要である、細胞の合成機構又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。

【0214】

用語「プロモーター／調節配列」は、そのプロモーター／調節配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を指す。一部の例では、この配列は、コアプロモーター配列であり得、他の例では、この配列は、エンハンサー配列及び遺伝子産物の発現に必要な他の調節エレメントも含み得る。プロモーター／調節配列は、例えば、遺伝子産物を組織特異的に発現するものであり得る。

10

【0215】

用語「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか又はそれを指定するポリヌクレオチドと作動可能に連結されているとき、細胞のほとんど又は全ての生理条件下で細胞において遺伝子産物の産生を生じさせるヌクレオチド配列を指す。

【0216】

用語「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか又はそれを指定するポリヌクレオチドと作動可能に連結されているとき、実質的にプロモーターに対応する誘発物質が細胞に存在する場合に限り細胞において遺伝子産物の産生を生じさせるヌクレオチド配列を指す。

20

【0217】

用語「組織特異的」プロモーターは、遺伝子をコードするか又はそれによって指定されるポリヌクレオチドと作動可能に連結されているとき、実質的に細胞がプロモーターに対応する組織型の細胞である場合に限り細胞において遺伝子産物の産生を生じさせるヌクレオチド配列を指す。

【0218】

用語「癌関連抗原」又は「腫瘍抗原」は、同義的に、癌細胞の表面上に、完全に又は代わりに断片（例えば、MHC／ペプチド）として発現する分子（典型的にはタンパク質、炭水化物又は脂質）であって、癌細胞への薬理学的薬剤の優先的なターゲティングに有用な分子を指す。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、正常細胞及び癌細胞の両方が発現するマーカー、例えば系列マーカー、例えばB細胞上のCD19である。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、正常細胞と比較して癌細胞で過剰発現する（例えば、正常細胞と比較して1倍の過剰発現、2倍の過剰発現、3倍の過剰発現又はそれを超える）細胞表面分子である。一部の実施形態において、腫瘍抗原は、癌細胞で不適切に合成される細胞表面分子、例えば正常細胞に発現する分子と比較して欠失、付加又は突然変異を含む分子である。一部の実施形態において、腫瘍抗原は癌細胞の細胞表面にのみ、完全に又は代わりに断片（例えば、MHC／ペプチド）として発現することになり、正常細胞の表面に合成されず、又は発現しない。一部の実施形態において、本発明のCARは、MHC提示ペプチドに結合する抗原結合ドメイン（例えば、抗体又は抗体断片）を含むCARを含む。通常、内因性タンパク質に由来するペプチドは、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI分子のポケットに嵌まり、CD8+Tリンパ球上のT細胞受容体（TCR）によって認識される。MHCクラスI複合体は、あらゆる有核細胞によって構成的に発現される。癌では、ウイルス特異的及び／又は腫瘍特異的ペプチド／MHC複合体が免疫療法用のユニークなクラスの細胞表面標的となる。ヒト白血球抗原（HLA）-A1又はHLA-A2のコンテクストでウイルス又は腫瘍抗原由来のペプチドを標的とするTCR様抗体が記載されている（例えば、Sastry et al., J Virol. 2011 85(5) : 1935 - 1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16) : 4262 - 4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4) : 2156 - 2165; Willemesen et al.

30

40

40

50

, Gene Ther 2001 8(21) : 1601 - 1608 ; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176) : 176ra33 ; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2) : 84 - 100 を参照されたい)。例えば、TCR様抗体は、ヒトscFvファージディスプレイライブリなど、ライブリのスクリーニングによって同定することができる。

【0219】

用語「腫瘍支持抗原」又は「癌支持抗原」は、互換的に、それ自体癌性ではないが、例えば増殖又は生存、例えば免疫細胞に対する抵抗性を促進することにより癌細胞を支持する、細胞の表面に発現される分子（典型的には、タンパク質、炭水化物又は脂質）を指す。この型の例示的な細胞は、間質細胞及び骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）を含む。腫瘍支持抗原自体は、抗原が癌細胞を支持する細胞上に存在する限り、腫瘍細胞を支持する役割を果たさなくてもよい。

10

【0220】

「B細胞抗原」又は「B-細胞抗原」という用語は、互換的に使用され、B細胞に結合する作用物質を用いて標的化され得るB細胞の表面上で優先的且つ特異的に発現される分子（典型的には、タンパク質、炭水化物又は脂質）を指す。特に注目されるB細胞抗原は、哺乳動物の他の非B細胞組織と比べてB細胞上で優先的に発現される。B細胞抗原は、1つの特定のB細胞集団、例えばB前駆細胞又は成熟B細胞上で発現され得、或いは2つ以上の特定のB細胞集団、例えば前駆B細胞及び成熟B細胞の両方の上で発現され得る。例示的なB細胞表面マーカーとしては、CD5、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、F1t3、ROR1、BCMA、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL7/4/3R及びIL4Rが挙げられる。特に好ましいB-細胞抗原としては、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、BCMA、CS-1及びCD138が挙げられる。実施形態では、B-細胞抗原は、CD19である。実施形態では、B-細胞抗原は、CD20である。実施形態では、B-細胞抗原は、CD22である。実施形態では、B-細胞抗原は、BCMAである。実施形態では、B-細胞抗原は、FcRn5である。実施形態では、B-細胞抗原は、FcRn2である。実施形態では、B-細胞抗原は、CS-1である。実施形態では、B-細胞抗原は、CD138である。

20

【0221】

「固体腫瘍抗原」又は「固体腫瘍細胞抗原」という用語は、固体腫瘍細胞に結合する作用物質を用いて標的化され得る固体腫瘍細胞の表面上で優先的且つ特異的に発現される分子（典型的には、タンパク質、炭水化物又は脂質）を指す。特に注目される固体腫瘍抗原は、哺乳動物の他の非腫瘍組織と比べて固体腫瘍細胞上で優先的に発現される。固体腫瘍抗原は、1つの特定の固体腫瘍細胞集団、例えば中皮腫腫瘍細胞上で発現され得、或いは2つ以上の特定の固体腫瘍細胞集団、例えば中皮腫腫瘍細胞及び卵巣癌細胞の両方の上で発現され得る。例示的な固体腫瘍抗原としては、EGFRvIII、メソテリン、GD2、TnAg、PSMA、TAG72、CD44v6、CEA、EPICAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB（例えば、ERBB2）、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチルGD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6又はE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラスター、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、P

30

40

50

LAC1、globoH、RAGE1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸内カルボキシリエステラーゼ、mut hsp70-2、NA-17、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、Ly6k、OR51E2、TARP、GFR 4及びMHC上に存在するこれらの抗原のいずれかのペプチドが挙げられる。特に好ましい固体腫瘍抗原としては、CLDN6、メソテリン及びEGFRVIIIが挙げられる。

【0222】

「骨髓性腫瘍抗原」又は「骨髓性腫瘍細胞抗原」は、骨髓性腫瘍細胞に結合する作用物質を用いて標的化され得る骨髓性腫瘍細胞の表面上で優先的且つ特異的に発現される分子（典型的には、タンパク質、炭水化物又は脂質）を指す。特に注目される骨髓性腫瘍抗原は、哺乳動物の他の非腫瘍組織と比べて骨髓性腫瘍細胞上で優先的に発現される。骨髓性腫瘍抗原は、1つの特定の骨髓性腫瘍細胞集団、例えば急性骨髓性白血病（AML）腫瘍細胞上で発現され得、或いは2つ以上の特定の骨髓性腫瘍細胞集団上で発現され得る。例示的な骨髓性腫瘍抗原としては、CD123、CD33及びCLL-1が挙げられる。

10

【0223】

用語「可動性ポリペプチドリンカー」又は「リンカー」は、scFvとの関連で使用されるとき、可変重鎖領域と可変軽鎖領域とを共に連結するために単独又は組み合わせで使用されるグリシン及び/又はセリン残基などのアミノ酸からなるペプチドリンカーを指す。一実施形態において、可動性ポリペプチドリンカーは、Gly/Serリンカーであり、アミノ酸配列(Gly-Gly-Gly-Ser)n（式中、nは、1以上の正の整数である）（配列番号44）。例えば、n=1、n=2、n=3、n=4、n=5及びn=6、n=7、n=8、n=9及びn=10である。一実施形態において、可動性ポリペプチドリンカーには、限定されないが、(Gly4Ser)4（配列番号45）又は(Gly4Ser)3（配列番号46）が含まれる。別の実施形態において、リンカーは、(Gly2Ser)、(GlySer)又は(Gly3Ser)（配列番号44）の複数の繰り返しを含む。また、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2012/138475号パンフレットに記載されるリンカーも本発明の範囲内に含まれる）。

20

【0224】

本明細書で使用されるとき、5'キャップ(RNAキャップ、RNA7-メチルグアノシンキャップ又はRNA m⁷Gキャップとも称される)は、転写開始直後に真核生物メッセンジャーRNAの「前」又は5'末端に付加された修飾グアニンヌクレオチドである。5'キャップは、1番目の転写ヌクレオチドに連結される末端基からなる。その存在は、リボソームによる認識及びRNAアーゼからの保護に重要である。キャップ付加は転写と結び付いており、それぞれが他方に影響を与えるようにして同時転写的に起こる。転写開始直後、合成されているmRNAの5'末端に、RNAポリメラーゼに関連するキャップ合成複合体が結合する。この酵素複合体は、mRNAキャッピングに必要な化学反応を触媒する。合成は、多段階生化学反応として進行する。キャッピング部分は、mRNAのその安定性又は翻訳効率などの機能を調整するために改変することができる。

30

【0225】

本明細書で使用されるとき、「インビトロ転写RNA」は、インビトロ合成されたRNA、好ましくはmRNAを指す。概して、インビトロ転写RNAは、インビトロ転写ベクターから作成される。インビトロ転写ベクターは、インビトロ転写RNAの作成に使用される鋳型を含む。

40

【0226】

本明細書で使用されるとき、「一過性」は、数時間、数日間又は数週間の期間にわたる組み込まれないトランス遺伝子の発現を指し、この発現期間は、宿主細胞においてゲノムに組み込まれた場合又は安定プラスミドリコン中に含まれている場合の遺伝子の発現期間よりも短い。

【0227】

本明細書で使用されるとき、用語「治療する」、「治療」及び「治療している」は、1

50

つ以上の療法の投与によってもたらされる増殖性障害の進行、重症度及び／又は持続期間の低減又は改善又は増殖性障害の1つ以上の症状（好ましくは1つ以上の認識し得る症状）の改善を指す。具体的な実施形態において、用語「治療する」、「治療」及び「治療している」は、患者には必ずしも認識できない、腫瘍の成長などの増殖性障害の少なくとも1つの計測可能な理学的パラメータの改善を指す。他の実施形態において用語「治療する」、「治療」及び「治療している」は、増殖性障害の進行の物理的な、例えば認識し得る症状の安定化による阻害、生理学的な、例えば理学的パラメータの安定化による阻害のいずれか又は両方を指す。他の実施形態において用語「治療する」、「治療」及び「治療している」は、腫瘍サイズ又は癌性細胞数の低減又は安定化を指す。

【0228】

10

用語「シグナル伝達経路」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果たす種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係を指す。語句「細胞表面受容体」は、シグナルを受け取り、且つ細胞の膜を越えてシグナルを伝える能力を有する分子及び分子複合体を含む。

【0229】

用語「対象」は、免疫応答を生じさせることのできる生きている生物（例えば、哺乳類、ヒト）を含むことが意図される。

【0230】

20

用語の「実質的に精製された」細胞は、他の細胞型を本質的に含まない細胞を指す。実質的に精製された細胞とは、その天然に存在する状態でそれが通常結び付いている他の細胞型と分離されている細胞も指す。一部の例では、実質的に精製された細胞集団とは、均質な細胞集団を指す。他の例では、この用語は、単に、その自然状態でそれが天然に結び付いている細胞から分離されている細胞を指す。一部の態様において、これらの細胞は、インビトロで培養される。他の態様において、これら細胞は、インビトロで培養されない。

【0231】

用語「療法的」とは、本明細書で使用されるとき、治療を意味する。療法的效果は疾患状態の低減、抑制、寛解又は根絶によって達成される。

【0232】

30

用語「予防」は、本明細書で使用されるとき、疾患又は疾患状態の予防又はそれに対する予防的治療を意味する。

【0233】

本発明に関連して、「腫瘍抗原」又は「過剰増殖性障害抗原」若しくは「過剰増殖性障害に関連する抗原」とは、特定の過剰増殖性障害に共通である抗原を指す。特定の態様では、本発明の過剰増殖性障害抗原は、原発性又は転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎臓癌及び乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの腺癌が挙げられるが、これらに限定されない癌に由来する。

【0234】

40

用語「トランスフェクトされた」、又は「形質転換された」、又は「形質導入された」は、外因性核酸を宿主細胞に移入させるか又は導入するプロセスを指す。「トランスフェクトされた」、又は「形質転換された」、又は「形質導入された」細胞は、外因性核酸をトランスフェクト、形質転換又は形質導入されたものである。細胞には初代対象細胞及びその子孫が含まれる。

【0235】

用語「特異的に結合する」は、試料中に存在する結合パートナー（例えば、腫瘍抗原）タンパク質を認識し、結合する抗体又はリガンドであって、しかし、試料中の他の分子は、実質的に認識又は結合しない、抗体又はリガンドを指す。

【0236】

50

「膜アンカー」又は「膜繫留ドメイン」は、この用語が本明細書で使用されるとき、細

胞外又は細胞内ドメインを細胞膜にアンカリングするのに十分なポリペプチド又は部分、例えばミリストイル基を指す。

【0237】

「膜タンパク質」とは、膜貫通ドメインを含むタンパク質を意味し、標的細胞において発現されると細胞膜内に固定されるか、又は細胞膜を通過する。

【0238】

「CD3」という用語は、T細胞表面糖タンパク質CD3鎖を指す。Swiss-Prot登録番号P07766は、例示的なヒトCD3アミノ酸配列を提供する。例示的なヒトCD3アミノ酸配列は、配列番号77として提供されている。実施形態では、CD3は、Swiss-Prot登録番号P07766で提供される配列又は配列番号77の配列の機能的変異体若しくはフラグメントである。CD3は、本明細書ではCD3Eとも称することができる。
10

【0239】

「CD3」という用語は、T細胞表面糖タンパク質CD3鎖を指す。Swiss-Prot登録番号P04234は、例示的なヒトCD3アミノ酸配列を提供する。例示的なヒトCD3アミノ酸配列は、配列番号82として提供されている。実施形態では、CD3は、Swiss-Prot登録番号P04234で提供される配列又は配列番号82の配列の機能的変異体若しくはフラグメントである。CD3は、本明細書ではCD3Dとも称することができる。

【0240】

「CD3」という用語は、T細胞表面糖タンパク質CD3鎖を指す。Swiss-Prot登録番号P09693は、例示的なヒトCD3アミノ酸配列を提供する。例示的なヒトCD3アミノ酸配列は、配列番号87として提供されている。実施形態では、CD3は、Swiss-Prot登録番号P09693で提供される配列又は配列番号87の配列の機能的変異体若しくはフラグメントである。CD3は、本明細書ではCD3Gとも称することができる。
20

【0241】

「CD3、又はドメイン」とは、CD3、又はに由来し、且つCD3、又はの少なくとも1つの内因性活性を保持するドメインを意味する。

【0242】

本明細書で使用される場合、「系」とは、キメラ膜タンパク質、例えば2つのキメラ膜タンパク質の組を指す。いくつかの実施形態では、キメラ膜タンパク質のそれぞれは、抗原結合ドメイン、TCRの構成要素に由来するドメイン（例えば、CD3、又はに由来するドメイン）及び膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、キメラ膜タンパク質の1つ以上は、共刺激ドメインをさらに含む。
30

【0243】

本発明の組成物及び方法は、特定された配列又はそれに実質的に同一であるか若しくは類似する配列、例えば特定された配列と少なくとも85%、90%若しくは95%以上同一の配列を有するポリペプチド及び核酸を包含する。アミノ酸配列に関連して、「実質的に同一」という用語は、本明細書において、第1及び第2のアミノ酸配列が共通の構造ドメイン及び/又は共通の機能活性を有することができるよう、例えば共通構造ドメインを含有するアミノ酸配列が参照配列、例えば本明細書に提供される配列と少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するように、i) 第2のアミノ酸配列中の整列アミノ酸残基と同一であるか、又はii) 第2のアミノ酸配列中の整列アミノ酸残基の保存的置換である、十分な又は最小数のアミノ酸残基を含有する第1のアミノ酸配列を指すように使用される。
40

【0244】

ヌクレオチド配列に関連して、「実質的に同一」という用語は、本明細書において、第1及び第2のヌクレオチド配列が、共通機能活性を有するポリペプチドをコードするか、又は共通の構造ポリペプチドドメイン若しくは共通の機能ポリペプチド活性をコードする
50

ように、例えばヌクレオチド配列が参照配列、例えば本明細書に提供される配列と少なくとも約 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するように、第2の核酸配列中の整列ヌクレオチドと同一である、十分な又は最小数のヌクレオチドを含有する第1の核酸配列を指すように使用される。

【0245】

「変異体」という用語は、参照アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、又は実質的に同一のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、変異体は、機能的変異体である。

【0246】

「機能的変異体」という用語は、参照アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、又は実質的に同一のヌクレオチド配列によってコードされ、参照アミノ酸配列の1つ以上の活性を有することができるポリペプチドを指す。

【0247】

「シグナル伝達ドメイン」という用語は、第2のメッセンジャーを生成するか、又はこのようなメッセンジャーに応答することによりエフェクターとして機能することにより、定義されたシグナル伝達経路を介して細胞活性を調節するために、細胞内で情報を伝えることにより作用するタンパク質の機能的部分を指す。

【0248】

「細胞内共刺激ドメイン」とは、共刺激分子の細胞内部分を意味する。共刺激分子は、以下のタンパク質ファミリーで表すことができる：TNF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（SLAMタンパク質）及び活性化NK細胞受容体。このような分子の例としては、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、ICAM-1、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）、CD2、CD5、CD7、CD287、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKP80、NKP30、NKP44、NKP46、CD160、B7-H3及びCD83と特異的に結合するリガンドなどが挙げられる。

【0249】

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、又は固有の細胞内シグナル伝達ドメイン全体、又はその機能的フラグメント若しくは誘導体を含むことができる。

【0250】

本明細書で使用されるような「由来する」は、第1の分子と第2の分子との間の関係を示す。これは、一般的には、第1の分子と第2の分子との間の構造的類似性を指し、第2の分子に由来する第1の分子に対するプロセス又は供給源の限定を暗示又は含むものではない。例えば、CD3分子に由来する細胞外ドメインの場合、細胞外ドメインは、それが要求される機能、すなわち適切な条件下でシグナルを発生するための能力を有するよう十分なCD3構造を保持する。これは、細胞外ドメインを生成する特定のプロセスへの限定を暗示又は含むものではなく、例えば、これは、細胞外ドメインを提供するために、CD3配列から始めて、不必要的配列を欠失させるか、又は突然変異を強要して、細胞外ドメインに達することを意味するものではない。

【0251】

「細胞外ドメイン」とは、細胞の外側で発現される膜貫通タンパク質のドメインを意味する。

【0252】

「二量体化ドメイン」とは、構成的又は誘導的のいずれかで同族二量体化ドメインに結合するドメインを意味する。このような同族二量体ドメインは、初期二量体化ドメインと同一であるか若しくは類似し得（「ホモ二量体化ドメイン」）、又は初期二量体化ドメインと異種であり得る（「ヘテロ二量体化ドメイン」）。ドメインが構成的に二量体化する

10

20

30

40

50

場合、このような二量体化は、典型的には、両方のドメインが同じ細胞コンパートメントで発現されることを条件として生じるであろう。ドメインが誘導的に二量体化する場合、このような二量体化は、「二量体化分子」の存在下でのみ生じるであろう。

【0253】

「二量化分子」は、この用語が本明細書で使用されるとき、第1の二量化ドメインと第2の二量化ドメインとの会合を促進する分子を指す。実施形態において、二量化分子は、対象に天然に存在しないか、又は有意な二量化をもたらし得る濃度で存在しない。実施形態において、二量化分子は、小分子、例えばラバマイシン又はラパログ、例えばR A D 0 0 1である。

【0254】

本明細書で使用される場合、「抗原結合ドメイン」という用語は、第2のポリペプチドに結合することができるポリペプチドを指す。このような抗原結合ドメインは、抗体分子を含む。さらに、「抗原結合ドメイン」という用語は、抗体分子に由来しないポリペプチド（例えば、受容体タンパク質の細胞外ドメインを含む、同族ポリペプチド又は分子に元々結合するポリペプチド）も含む。

【0255】

本明細書で使用される場合、「抗体分子」という用語は、免疫グロブリン鎖又は少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むそのフラグメントを指す。「抗体分子」という用語は、抗体及び抗体フラグメントを包含する。実施形態では、抗体分子は、多重特異性抗体分子であり、例えば、これは、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、この中で、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列の第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列が第1のエピトープに対する結合特異性を有し、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列の第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列が第2のエピトープに対する結合特異性を有する。実施形態では、多重特異性抗体分子は、二重特異性抗体分子である。二重特異性抗体は、2つ以下の抗原に対する特異性を有する。二重特異性抗体分子は、第1のエピトープに対して結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列及び第2のエピトープに対して結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列によって特徴付けられる。

【0256】

抗体又はその抗体フラグメントを含む本発明のキメラタンパク質の一部は、抗原結合ドメインが、例えば、單一ドメイン抗体フラグメント(s d A b)、一本鎖抗体(s c F v)、ヒト化抗体又は二重特異性抗体を含む連続ポリペプチド鎖の一部として発現される様々な形態で存在し得る(Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NYにおいて; Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New Yorkにおいて; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883; Bird et al., 1988, Science 242: 423 - 426)。一態様では、本発明の組成物の抗原結合ドメインは、抗体フラグメントを含む。さらなる態様では、本タンパク質は、s c F vを含む抗体フラグメントを含む。

【0257】

抗体又はその抗体フラグメントは、抗原結合ドメインが、例えば、單一ドメイン抗体フラグメント(s d A b)、一本鎖抗体(s c F v)、ヒト化抗体又は二重特異性抗体を含む連続ポリペプチド鎖の一部として発現される様々な形態で存在し得る(Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NYにおいて; Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New Yorkにおいて; Houston et al., 1988, Proc. N

10

20

30

40

50

at 1 . Acad . Sci . USA 85 : 5879 - 5883 ; Bird et al . , 1988 , Science 242 : 423 - 426) 。一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、抗体フラグメントを含む。さらなる態様では、本タンパク質は、scFvを含む抗体フラグメントを含む。所与のCDRの正確なアミノ酸配列境界は、Kabat et al . (1991) , " Sequences of Proteins of Immunological Interest , " 5th Ed . Public Health Service , National Institutes of Health , Bethesda , MD (「 Kabat 」 ナンバリングスキーム) 、 Al - La zikani et al . , (1997) JMB 273 , 927 - 948 (「 Chothia 」 ナンバリングスキーム) に記載されるもの又はこれらの組み合わせを含む多数の周知のスキームのいずれかを使用して決定することができる。

10

【 0258 】

「 scFv 」という用語は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも 1 つの抗体フラグメントと、重鎖の可変領域を含む少なくとも 1 つの抗体フラグメントとを含む融合タンパク質を指し、この軽鎖及び重鎖可変領域は、例えば、合成リンカー、例えば短いフレキシブルポリペプチドリンカーを介して連続的に連結されており、一本鎖ポリペプチドとして発現されることができ、この scFv は、これが由来するインタクトな抗体の特異性を保持する。特に規定がない限り、本明細書で使用される場合、 scFv は、 VL 及び VH 可変領域を例えばポリペプチドの N 末端及び C 末端に対していずれの順序でも有し得、 scFv は、 VL - リンカー - VH を含み得、又は VH - リンカー - VL を含み得る。

20

【 0259 】

「 4 - 1 BB 」という用語は、 GenBank 登録番号 AAA62478 . 2 として提供されるアミノ酸配列又は非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サル、類人猿などからの同等の残基を有する TNFR スーパーファミリーのメンバーを指し、「 4 - 1 BB 共刺激ドメイン 」は、 GenBank 登録番号 AAA62478 . 2 のアミノ酸残基 214 ~ 255 又は非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サル、類人猿などからの同等の残基として定義される。一態様では、「 4 - 1 BB 共刺激ドメイン 」は、本明細書に提供されるような配列又は非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サル、類人猿などからの同等の残基である。

【 0260 】

「 生物学的に同等 」という用語は、参考用量又は参考量の参考化合物（例えば、 RAD 001 ）によって生じた作用に同等な作用を生じさせるのに必要である、参考化合物（例えば、 RAD 001 ）以外の作用物質の量を指す。実施形態では、この作用は、例えば、 P70 S6 キナーゼ阻害によって測定されるような、例えばインビボ又はインビトロアッセイで評価されるような、例えば本明細書に記載のアッセイ（例えば、 Boulay アッセイ）によって測定されるような mTOR 阻害のレベルである。実施形態では、この作用は、細胞選別によって測定されるような PD - 1 陽性 / PD - 1 陰性 T 細胞の比の変更である。実施形態では、 mTOR 阻害剤の生物学的に同等な量又は用量は、参考用量又は参考量の参考化合物が阻害するのと同じレベルの P70 S6 キナーゼの阻害を達成する量又は用量である。実施形態では、 mTOR 阻害剤の生物学的に同等な量又は用量は、参考用量又は参考量の参考化合物が変更するのと同じレベルの PD - 1 陽性 / PD - 1 陰性 T 細胞の比の変更を達成する量又は用量である。

30

【 0261 】

「 低い免疫増強用量 」という用語は、 mTOR 阻害剤、例えばアロステリック型 mTOR 阻害剤、例えば RAD 001 若しくはラパマイシン又は触媒的 mTOR 阻害剤と併せて使用されるとき、例えば P70 D6 キナーゼ活性の阻害によって測定されるような mTOR 活性を完全にではなく部分的に阻害する mTOR 阻害剤の用量を指す。例えば、 P70 S6 キナーゼの阻害により、 mTOR 活性を評価するための方法が本明細書で論議される。この用量は、完全な免疫抑制をもたらすには不十分であるが、免疫応答を増強せんには十分なものである。実施形態では、 mTOR 阻害剤の低い免疫増強用量は、 PD - 1 陽性 T 細胞の数の減少及び / 又は PD - 1 陰性 T 細胞の数の増加をもたらすか、或いは

40

50

P D - 1 陰性 T 細胞 / P D - 1 陽性 T 細胞の比の増加をもたらす。実施形態では、m T O R 阻害剤の低い免疫増強用量は、ナイーブ T 細胞の数の増加をもたらす。実施形態では、m T O R 阻害剤の低い免疫増強用量は、以下の 1 つ以上をもたらす：例えば、メモリー T 細胞、例えばメモリー T 細胞前駆細胞上の以下のマーカーの 1 つ以上の発現の増加：C D 6 2 L^{h i g h}、C D 1 2 7^{h i g h}、C D 2 7⁺ 及び B C L 2；例えば、メモリー T 細胞、例えばメモリー T 細胞前駆細胞上の K L R G 1 の発現の減少；及びメモリー T 細胞前駆細胞、例えば以下の特徴：増加した C D 6 2 L^{h i g h}、増加した C D 1 2 7^{h i g h}、増加した C D 2 7⁺、減少した K L R G 1 及び増加した B C L 2 のいずれか 1 つ又は組み合わせを有する細胞の数の増加。上記変化のいずれかは、例えば、未処置対照と比べて例えは少なくとも一過性に生じる。

10

【0262】

「不応性」は、本明細書で使用されるとき、治療に応答しない疾患、例えば癌を指す。実施形態において、不応性癌は、治療の開始前又は開始時点で治療に抵抗性であり得る。他の実施形態において、不応性癌は、治療中に抵抗性になり得る。不応性癌は、抵抗性癌とも称される。

【0263】

「再発した」は、本明細書で使用されるとき、改善期間後、例えば療法、例えば癌療法の前治療後における疾患（例えば、癌）又は癌などの疾患の徵候及び症状の再来を指す。

【0264】

範囲：本開示全体を通じて、本発明の様々な態様が範囲の形式で提示され得る。範囲の形式での記載は、単に便宜上及び簡潔にするためのものであり、本発明の範囲に対する確固たる限定と解釈されてはならないことが理解されるべきである。従って、範囲の記載は、具体的に開示される全ての可能な部分範囲並びにその範囲内にある個々の数値を有すると考えられなければならない。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などの具体的に開示される部分範囲並びにその範囲内にある個々の数値、例えば1、2、2.7、3、4、5、5.3及び6を有すると考えられなければならない。別の例として、95～99%の同一性などの範囲は、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するものを含み、及び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、範囲の幅に関わらず適用される。

20

【0265】

記述

本発明のキメラタンパク質で操作された免疫エフェクター細胞（例えば、T 細胞、N K 細胞）を使用して、癌などの疾患の治療に使用するための物質の組成物及び方法が本明細書で提供される。

30

【0266】

本発明の様々な構成要素のいくつかの例の配列を表 1 に列挙し、ここで、a_aは、アミノ酸を表し、n_aは、対応するペプチドをコードする核酸を表す。

【0267】

【表1】

表1. CAR の様々な構成要素の配列(aa:アミノ酸、na:対応するタンパク質をコードする核酸)

記述	配列
EF-1 プロモーター	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGCAGAGCGCACA TCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTGGGGGAGGGGTCGG CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAACGGTGGCGCGGGTAA ACTGGGAAAGTGTGAGTGTACTGGCTCCGCCTTTTC CCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAAGTGCAGTAGTC GCCGTGAACGTTCTTTCGCAACGGTTGCCGCCAGA ACACAGGTAAAGTGCCGTGTGGTTCCCAGGGCCTGG CCTCTTACGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTGAATTAC TTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTGATCCCAGCT TCGGGTTGGAAGTGGTGGAGAGATTCGAGGCCTTGC CTTAAGGAGCCCCCTCGCCTCGTGTGAGTTGAGGCCT GGCCTGGCGCTGGGCCGCGTGCAGATCTGGTGG CACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTCGATAAGTCTA GCCATTTAAAATTGGTGTGACCTGCTGCGACGCTTTT TCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTG CACACTGGTATTCGGTTTGGGGCCGCGGGCGCGAC GGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTGGCGAGGC GGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAACATGGACGGGG AGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCTCG CGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGCGCAAGGCTG GCCCGGTGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCC GCTTCCCAGGCGCTGCTGCAGGGAGCTAAATGGAGGA CGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACA CAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCTCAGCCGTCGCTCA TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCT CGATTAGTTCTCGAGCTTGGAGTACGTCGTCTTAGG TTGGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTCCCCACAC TGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACT TGATGTAATTCTCCTGGAATTGCCCTTTGAGTTGG ATCTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTCAAAG TTTTTTCTCCATTTCAGGTGTCGTGA (配列番号 47)
リーダー(aa)	MALPV TALLPLALLHAARP (配列番号 48)
リーダー(na)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCCTGCCTGGCT CTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCC (配列番号 49)
例示的な 4-1BB 細胞内ドメイン(aa)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRFPEEEAGGC EL (配列番号 50)
例示的な 4-1BB 細胞内ドメイン(na)	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACA ACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAG ATGGCTGTA GCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA CTG (配列番号 51)
例示的な CD8 TM(aa)	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC (配列番号 92)
例示的な CD8 TM(na)	ATCTACATCTGGCGCCCTGGCCGGACTTGTGGGGTC CTTCTCCTGTCAGTGGTTATCACCCTTACTGC (配列番号 93)

10

20

30

40

【表2】

例示的な CD27 細胞内ドメイン(aa)	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEGSTIPIQEDYRKP EPACSP (配列番号 94)	
例示的な CD27 細胞内ドメイン(na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATACAT GAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCCGCAAGC ATTACCAGCCCTATGCCCCACCACCGACTTCGCAGCCT ATCGCTCC (配列番号 95)	10
例示的な CD3- ζ 細胞内ドメイン(aa)	RVKFSRSADAPAYKQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列 番号 96)	
例示的な CD3- ζ 細胞内ドメイン(na)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTA CAAGCAGGGCCAGAACCAAGCTCTATAACGAGCTCAATC TAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGA CGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGAAAGCCGAGAA GGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACACTGCAG AAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGC CTTACCAAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA CGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (配列 番号 97)	20
例示的な CD3- ζ 細胞内ドメイン(aa)	RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列 番号 98)	
例示的な CD3- ζ 細胞内ドメイン(na)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTA CCAGCAGGGCCAGAACCAAGCTCTATAACGAGCTCAATC TAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGA CGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGAAAGCCGAGAA GGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACACTGCAG AAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGC CTTACCAAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA CGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (配列 番号 99)	30
例示的な CD28 細胞内ドメイン(aa)	RSKRSRLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RS (配列番号 100)	
例示的な CD28 細胞内ドメイン(na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATACAT GAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCCGCAAGC ATTACCAGCCCTATGCCCCACCACCGACTTCGCAGCCT ATCGCTCC (配列番号 101)	
例示的な ICOS 細胞内ドメイン(aa)	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRNAVNTAKKSRLTDVTL (配列番号 102)	40
例示的な ICOS 細胞内ドメイン(na)	ACAAAAAAGAAGTATTCCAGTGTGCACGACCCCTAA CGGTGAATACATGTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCA AAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCCTA (配列番号 103)	

【0269】

癌関連抗原

本発明は、免疫エフェクター細胞を癌に向かわせる1つ以上のキメラタンパク質を含有するように操作された免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、NK細胞）を提供する。これは、癌関連抗原に特異的であるタンパク質上の抗原結合ドメインを通して達成される。本発明のタンパク質によって標的化することができる癌関連抗原（腫瘍抗原）の2つの

部類があり、これらは(1)癌細胞の表面上で発現される癌関連抗原、及び(2)それ自体細胞内にあるが、このような抗原(ペプチド)のフラグメントがMHC(主要組織適合性複合体)により癌細胞の表面上に存在する癌関連抗原である。

【0270】

従って、本発明は、以下の癌関連抗原(腫瘍抗原)：CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1(CLECL1)、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、TnAg、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPICAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、IL-11Ra、PSCA、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、PRSS21、SSEA-4、CD20、葉酸受容体、ERBB2(Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、プロスター-ゼ、PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-I受容体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl1、チロシナ-ゼ、EphA2、フコシリGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチルGD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、Globoph、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、レグマイン、HPV E6、E7、MAGE-A1、MAGE-A1、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロステイン、サバイビン並びにテロメラ-ゼ、PCTA-1/ガレクチン8、メランA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座ブレークポイント、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、Rhoc、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラ-ゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸内カルボキシリエステラ-ゼ、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、ILT1RA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5及びIGLL1を標的とするタンパク質を提供する。

【0271】

実施形態では、本発明は、以下のB-細胞抗原：CD5、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD30、CD34、CD37、CD38、CD40、CD53、CD69、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD123、CD135、CD138、CD179、CD269、Flt3、ROR1、BCMA、FcRn5、FcRn2、CS-1、CXCR4、5、7、IL-7/3R、IL7/4/3R及びIL4Rを標的とするタンパク質を提供する。特に好ましいB-細胞抗原としては、CD19、CD20、CD22、FcRn5、FcRn2、BCMA、CS-1及びCD138が挙げられる。

【0272】

実施形態では、本発明は、以下の固形腫瘍抗原：EGFRvIII、メソテリン、GD2、TnAg、PSMA、TAG72、CD44v6、CEA、EPICAM、KIT、IL-13Ra2、レグマン、GD3、CD171、IL-11Ra、PSCA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、VEGFR2、ルイスY、CD24、PDGFR-、SSEA-4、葉酸受容体、ERBB(例えば、ERBB2)、Her2/neu、MUC1、EGFR、NCAM、エフリンB2、CAIX、LMP2、sLe、HMWMAA、o-アセチルGD2、葉酸受容体、TEM1/CD248、TEM7R、FAP、レグマイン、HPV E6又はE7、ML-IAP、CLDN6、TSHR、GPRC5D、ALK、ポリシアル酸、Fos関連抗原、好中球エラスター-ゼ、TRP-2、CYP1B1、精子タンパク質17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、AFP、チログロブリン、

P L A C 1、g l o b o H、R A G E 1、M N - C A I X、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、腸内カルボキシルエステラーゼ、m u t h s p 7 0 - 2、N A - 1 7、N Y - B R - 1、U P K 2、H A V C R 1、A D R B 3、P A N X 3、G P R 2 0、L y 6 k、O R 5 1 E 2、T A R P、G F R 4 及びM H C 上に存在するこれらの抗原のいずれかのペプチドを標的とするタンパク質を提供する。特に好ましい固形腫瘍抗原としては、C L D N 6、メソテリン及びE G F R v I I I が挙げられる。

【 0 2 7 3 】

本明細書に記載のキメラタンパク質は、腫瘍支持抗原（例えば、本明細書に記載の腫瘍支持抗原）に結合する抗原結合ドメイン（例えば、抗体又は抗体フラグメント、T C R 又はT C R フラグメント）を含み得る。一部の実施形態において、腫瘍支持抗原は、間質細胞又は骨髓由来サプレッサー細胞（M D S C ）上に存在する抗原である。間質細胞は、微小環境における細胞分裂を促進するために成長因子を分泌し得る。M D S C 細胞は、T 細胞の増殖及び活性化を阻害することができる。10

【 0 2 7 4 】

一実施形態において、間質細胞抗原は、骨髓間質細胞抗原2（B S T 2）、線維芽細胞活性化タンパク質（F A P ）及びテネイシンの1つ以上から選択される。一実施形態において、F A P 特異的抗体は、シブロツズマブとの結合について競合するか、又はそれと同じC D R を有する。実施形態において、M D S C 抗原は、C D 3 3、C D 1 1 b、C 1 4、C D 1 5 及びC D 6 6 b の1つ以上から選択される。従って、一部の実施形態において、腫瘍支持抗原は、骨髓間質細胞抗原2（B S T 2）、線維芽細胞活性化タンパク質（F A P ）又はテネイシン、C D 3 3、C D 1 1 b、C 1 4、C D 1 5 及びC D 6 6 b の1つ以上から選択される。20

【 0 2 7 5 】

本開示から理解されるように、本発明の系、細胞及び他の態様は、2つ以上の抗原が標的化されるように2つ以上の抗原結合ドメインを含む。本明細書に記載の抗原のいずれかの組み合わせは、2つ以上の抗原の前記組み合わせを標的とする抗原結合ドメインを含む系を利用することによって標的化され得る。

【 0 2 7 6 】

本発明のキメラタンパク質

本発明は、1つ以上のキメラタンパク質を特徴とする。一般的に、本発明は、C D 、又は の細胞外ドメインのすべて又は機能的部分を含む第1のキメラ膜タンパク質を特徴とする。これらのキメラタンパク質は、以下：抗原結合ドメイン、細胞内共刺激ドメイン及び / 又は二量体化ドメインの1つ以上をさらに含む。例えば、第1のキメラ分子が抗原結合ドメインを含まない特定の実施形態では、本発明は、第2のキメラ膜タンパク質を特徴とし、このタンパク質は、細胞外抗原結合ドメイン及び二量体化ドメイン有する。任意選択により、この第2のタンパク質は、細胞内共刺激ドメインをさらに含むことができる（第1のキメラタンパク質がこのようなドメインを有するかどうかに関わりなく）。或いは、第2のキメラタンパク質は、第1のキメラタンパク質のドメイン（例えば、細胞外又は細胞内ドメイン）に結合するドメイン及び共刺激ドメイン、抗原結合ドメイン又は両方を含むことができる。30

【 0 2 7 7 】

抗原結合ドメイン

一態様では、本発明の特定のキメラタンパク質は、抗原結合ドメインと別途称される標的特異的結合エレメントを含む。部分の選択は、標的細胞の表面を画定するリガンドの種類及び数に依存する。例えば、抗原結合ドメインは、特定の疾患状態に関連する標的細胞上で細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択され得る。従って、本発明のタンパク質中の抗原結合ドメインに対してリガンド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、細菌並びに病原体感染症、自己免疫疾患及び癌細胞に関連するものが挙げられる。40

【 0 2 7 8 】

10

20

30

40

50

抗原結合ドメインは、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、ヒト化抗体及びその機能的フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない抗原に結合する任意のドメインであり得、限定されるものではないが、重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)並びにラクダ科動物由来のナノボディの可変ドメイン(VHH)などのシングルドメイン抗体及び組換えフィブロネクチンドメイン、T細胞受容体(TCR)又はそのフラグメント、例えば一本鎖TCRなどのような抗原結合ドメインとして機能することが当技術分野において既知の代替的な足場が挙げられる。

【0279】

一実施形態において、CD22に対する抗原結合ドメインは、例えば、Haso et al., Blood, 121(7):1165-1174(2013); Wayne et al., Clin Cancer Res 16(6):1894-1903(2010); Kato et al., Leuk Res 37(1):83-88(2013); Creative Biomart (creativebiomart.net): M0M-18047-S(P)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

10

【0280】

一実施形態において、CS-1に対する抗原結合ドメインは、エロツズマブ(BMS)の抗原結合部分、例えばCDRであり、例えばTai et al., 2008, Blood 112(4):1329-37; Tai et al., 2007, Blood. 110(5):1656-63を参照されたい。

20

【0281】

一実施形態において、CLL-1に対する抗原結合ドメインは、例えば、R&D、ebiosciences、Abcamから入手可能な抗体、例えばPE-CLL1-hu Cat#353604(BioLegend); 及びPE-CLL1(CLEC12A)Cat#562566(BD)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0282】

一実施形態において、CD33に対する抗原結合ドメインは、例えば、Bross et al., Clin Cancer Res 7(6):1490-1496(2001)(Gentuzumab Ozogamicin, hP67.6)、Caron et al., Cancer Res 52(24):6761-6767(1992)(Lintuzumab, HUM195)、Lapusan et al., Invest New Drugs 30(3):1121-1131(2012)(AVE9633)、Aigner et al., Leukemia 27(5):1107-1115(2013)(AMG330, CD33 BiTE)、Dutour et al., Adv hematol 2012:683065(2012)及びPizzitola et al., Leukemia doi:10.1038/Lue.2014.62(2014)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

30

【0283】

一実施形態において、GD2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Mujooh et al., Cancer Res. 47(4):1098-1104(1987); Cheung et al., Cancer Res 45(6):2642-2649(1985), Cheung et al., J Clin Oncol 15(9):1430-1440(1987), Cheung et al., J Clin Oncol 16(9):3053-3060(1998), Handgretinger et al., Cancer Immunol Immunother 35(3):199-204(1992)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。一部の実施形態において、GD2に対する抗原結合ドメインは、mAb 14.18、14G2a、ch14.18、hu14.18、3F8、hu3F8、3G6、8B6、60C3、10B8、ME36.1及び8H9(例えば、国際公開第2012033885号パンフレット、国際公開第2013040371号パンフレット、国際公開第20131922号パンフレット)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

40

50

94号パンフレット、国際公開第2013061273号パンフレット、国際公開第2013123061号パンフレット、国際公開第2013074916号パンフレット及び国際公開第201385552号パンフレットを参照されたい)から選択される抗体の抗原結合部分である。一部の実施形態において、GD2に対する抗原結合ドメインは、米国特許出願公開第20100150910号明細書又は国際公開第2011160119号パンフレットに記載されている抗体の抗原結合部分である。

【0284】

一実施形態では、BCMAに対する抗原結合ドメインは、抗原結合部分、例えば国際公開第2012163805号パンフレット、同第200112812号パンフレット及び同第2003062401号パンフレットに記載される抗体のCDRである。10

【0285】

一実施形態において、Tn抗原に対する抗原結合ドメインは、米国特許第8,440,798号明細書、Brooks et al., PNAS 107(22):10056-10061(2010)及びStone et al., Oncol Immunology 1(6):863-873(2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0286】

一実施形態において、PSMAに対する抗原結合ドメインは、例えば、Parker et al., Protein Expr Purif 89(2):136-145(2013), 米国特許出願公開第20110268656号明細書(J591ScFv); Frigerio et al., European J Cancer 49(9):2223-2232(2013)(scFvD2B); 国際公開第2006125481号パンフレット(mAb 3/A12、3/E7及び3/F11)に記載されている抗体及び单鎖抗体フラグメント(scFv A5及びD7)の抗原結合部分、例えばCDRである。20

【0287】

一実施形態において、ROR1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Hudecek et al., Clin Cancer Res 19(12):3153-3164(2013); 国際公開第2011159847号パンフレット; 及び米国特許出願公開第20130101607号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。30

【0288】

一実施形態において、FLT3に対する抗原結合ドメインは、例えば、国際公開第2011076922号パンフレット、米国特許第5777084号明細書、欧州特許第0754230号明細書、米国特許出願公開第20090297529号明細書及びいくつかの市販カタログ抗体(R&D、ebiosciences、Abcam)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0289】

一実施形態において、TAG72に対する抗原結合ドメインは、例えば、Hombach et al., Gastroenterology 113(4):1163-1170(1997)に記載されている抗体; 及びAbcam ab691の抗原結合部分、例えばCDRである。40

【0290】

一実施形態において、FAPに対する抗原結合ドメインは、例えば、Ostermann et al., Clinical Cancer Research 14:4584-4592(2008)(FAP5)、米国特許出願公開第2009/0304718号明細書; シプロツズマブ(例えば、Hofheinz et al., Oncology Research and Treatment 26(1), 2003を参照されたい); 及びTran et al., J Exp Med 210(6):1125-1135(2013)に記載の抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。50

【0291】

一実施形態において、CD38に対する抗原結合ドメインは、ダラツムマブ（例えば、Groen et al., Blood 116(21):1261-1262(2010)；MOR202（例えば、米国特許第8,263,746号明細書を参照されたい）；又は米国特許第8,362,211号明細書に記載の抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0292】

一実施形態において、CD44v6に対する抗原結合ドメインは、例えば、Casucci et al., Blood 122(20):3461-3472(2013)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 10

【0293】

一実施形態において、CEAに対する抗原結合ドメインは、例えば、Chmielewski et al., Gastroenterology 143(4):1095-1107(2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0294】

一実施形態において、EPCAMに対する抗原結合ドメインは、例えば、MT110、EpCAM-CD3二特異性Ab（例えば、clinicaltrials.gov / ct2/show/NCT00635596を参照されたい）；エドレコロマブ；3622W94；ING-1；及びアデカツムマブ(MT201)から選択される抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 20

【0295】

一実施形態において、PRSS21に対する抗原結合ドメインは、米国特許第8,080,650号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0296】

一実施形態において、B7H3に対する抗原結合ドメインは、例えば、抗体MGA271(Macrogenics)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0297】

一実施形態において、KITに対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7,915,391号明細書、米国特許出願公開第20120288506号明細書に記載されている抗体及びいくつかの市販のカタログ抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 30

【0298】

一実施形態において、IL-13Ra2に対する抗原結合ドメインは、例えば、国際公開第2008/146911号パンフレット、国際公開第2004087758号パンフレット、いくつかの市販カタログ抗体及び国際公開第2004087758号パンフレットに記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0299】

一実施形態において、CD30に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7,908,438号明細書及び欧州特許第0805871号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0300】

一実施形態において、GD3に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7,253,263号明細書；米国特許第8,207,308号明細書；米国特許出願公開第20120276046号明細書；欧州特許第1013761号明細書；国際公開第2005035577号パンフレット；及び米国特許第6,437,098号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 40

【0301】

一実施形態において、CD171に対する抗原結合ドメインは、例えば、Hong et al., J Immunother 37(2):93-104(2014)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0302】

10

20

30

40

50

一実施形態において、IL-11Raに対する抗原結合ドメインは、Abcam（カタログ番号ab55262）又はNovus Biologicals（カタログ番号EP-R5446）から入手可能な抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。別の実施形態において、IL-11Raに対する抗原結合ドメインは、ペプチドであり、例えばHuang et al., Cancer Res 72(1):271-281(2012)を参照されたい。

【0303】

一実施形態において、PSCAに対する抗原結合ドメインは、例えば、Morgenroth et al., Prostate 67(10):1121-1131(2007) (scFv 7F5); Nejatollahi et al., J of Oncology 2013(2013), article ID 839831 (scFv C5-II); 及び米国特許出願公開第20090311181号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。
10

【0304】

一実施形態において、VEGFR2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Chinnasamy et al., J Clin Invest 120(11):3953-3968(2010)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0305】

一実施形態において、ルイスYに対する抗原結合ドメインは、例えば、Kelly et al., Cancer Biother Radiopharm 23(4):411-423(2008) (hu3S193 Ab(scFvs)); Dolezal et al., Protein Engineering 16(1):47-56(2003) (NC10 scFv)に記載の抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。
20

【0306】

一実施形態において、CD24に対する抗原結合ドメインは、例えば、Maliar et al., Gastroenterology 143(5):1375-1384(2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0307】

一実施形態において、PDGFRに対する抗原結合ドメインは、抗体Abcam ab32570の抗原結合部分、例えばCDRである。
30

【0308】

一実施形態において、SSSEA-4に対する抗原結合ドメインは、抗体MC813(Cel1 Signaling)又は他の市販の抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。
。

【0309】

一実施形態において、CD20に対する抗原結合ドメインは、抗体リツキシマブ、オファツムマブ、オクレリズマブ、ベルツズマブ又はGA101の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0310】

一実施形態において、葉酸受容体に対する抗原結合ドメインは、抗体IMGN853又は米国特許出願公開第20120009181号明細書; 米国特許第4851332号明細書、LK26:米国特許第5952484号明細書に記載の抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。
40

【0311】

一実施形態において、ERBB2に対する抗原結合ドメイン(Her2/neu)は、抗体トラスツズマブ又はペルツズマブの抗原結合部分、例えばCDRである。

【0312】

一実施形態において、MUC1に対する抗原結合ドメインは、抗体SAR566658の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0313】

50

一実施形態において、EGFRに対する抗原結合ドメインは、抗体セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ又はマツズマブの抗原結合部分、例えばCDRである。

【0314】

一実施形態において、NCAMに対する抗原結合ドメインは、抗体クローン2-2B：MAB5324(EMD Millipore)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0315】

一実施形態において、エフリンB2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Abengozar et al., Blood 119(19):4565-4576(2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 10

【0316】

一実施形態において、IGF-I受容体に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第8344112B2号明細書；欧州特許出願公開第2322550A1号明細書；国際公開第2006/138315号パンフレット又はPCT/米国特許出願公開第2006/022995号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0317】

一実施形態において、CAIXに対する抗原結合ドメインは、抗体クローン303123(R&D Systems)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0318】

一実施形態において、LMP2に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7,410,640号明細書又は米国特許出願公開第20050129701号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 20

【0319】

一実施形態において、gp100に対する抗原結合ドメインは、抗体HMB45、NKIbetaB、又は国際公開第2013165940号パンフレット又は米国特許出願公開第20130295007号明細書に記載の抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 。

【0320】

一実施形態において、チロシナーゼに対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第5843674号明細書；又は米国特許出願公開第19950504048号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 30

【0321】

一実施形態において、EphA2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Yu et al., Mol Ther 22(1):102-111(2014)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0322】

一実施形態において、GD3に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第7253263号明細書；米国特許第8,207,308号明細書；米国特許出願公開第20120276046号明細書；欧州特許出願公開第1013761A3号明細書；米国特許出願公開第20120276046号明細書；国際公開第2005035577号パンフレット；又は米国特許第6437098号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 40

【0323】

一実施形態において、フコシルGM1に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許出願公開第20100297138号明細書；又は国際公開第2007/067992号パンフレットに記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0324】

一実施形態において、sLeに対する抗原結合ドメインは、抗体G193(ルイスYについて)の抗原結合部分、例えばCDRである。Scott AM et al., Cancer Res 60:3254-61(2000)を参照されたく、Neeson e 50

t a l , J Immunol May 2013 190 (Meeting Abstract Supplement) 177.10 にも記載される。

【0325】

—実施形態において、GM3に対する抗原結合ドメインは、抗体CA2523449(mAb 14F7)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0326】

—実施形態において、HMWMAAに対する抗原結合ドメインは、Kmiecik et al., Oncimmunology 3(1): e27185 (2014) (PMID: 24575382) (mAb 9.2.27) ; 米国特許第6528481号明細書；国際公開第2010033866号パンフレット；又は米国特許出願公開第20140004124号明細書に記載の抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 10

【0327】

—実施形態において、o-アセチル-GD2に対する抗原結合ドメインは、抗体8B6の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0328】

—実施形態において、TEM1 / CD248に対する抗原結合ドメインは、例えば、Marty et al., Cancer Lett 235(2): 298 - 308 (2006) ; Zhao et al., J Immunol Methods 363(2): 221 - 232 (2011) に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 20

【0329】

—実施形態において、CLDN6に対する抗原結合ドメインは、抗体IMAB027(Ganymed Pharmaceuticals)の抗原結合部分、例えばCDRである。例えば、clinicaltrial.gov/show/NCT02054351を参照されたい。

【0330】

—実施形態において、TSHRに対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第8,603,466号明細書；米国特許第8,501,415号明細書；又は米国特許第8,309,693号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0331】

—実施形態において、GPRC5Dに対する抗原結合ドメインは、抗体FAB6300A(R&D Systems)；又はLS-A4180(Lifespan Biosciences)の抗原結合部分、例えばCDRである。 30

【0332】

—実施形態において、CD97に対する抗原結合ドメインは、例えば、米国特許第6,846,911号明細書；de Groot et al., J Immunol 183(6): 4127 - 4134 (2009) に記載されている抗体；又はR&D: MAB3734からの抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0333】

—実施形態において、ALKに対する抗原結合ドメインは、例えば、Mino-Kudson et al., Clin Cancer Res 16(5): 1561 - 1571 (2010) に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 40

【0334】

—実施形態において、ポリシリアル酸に対する抗原結合ドメインは、例えば、Nagae et al., J Biol Chem 288(47): 33784 - 33796 (2013) に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0335】

—実施形態において、PLAC1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Ghods et al., Biotechnol Appl Biochem 2013 doi: 10.1002/bab.1177 に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDR

である。

【0336】

一実施形態において、Glob o Hに対する抗原結合ドメインは、抗体V K 9；又は例えば、Kudryashov V et al., Glycoconj J. 15(3) : 243 - 9 (1998), Lou et al., Proc Natl Acad Sci USA 111(7) : 2482 - 2487 (2014)；MBr1:Bremer E - G et al. J Biol Chem 259: 14773 - 14777 (1984)に記載されている抗体の抗原結合部分である。

【0337】

一実施形態において、NY-BR-1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Jager et al., Appl Immunohistochem Mol Morphol 115(1) : 77 - 83 (2007)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 10

【0338】

一実施形態において、WT-1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Diao et al., Sci Transl Med 5(176) : 176ra33 (2013)；又は国際公開第2012/135854号パンフレットに記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0339】

一実施形態において、MAGE-A1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Willemsen et al., J Immunol 174(12) : 7853 - 7858 (2005) (TCR様scFv)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 20

【0340】

一実施形態において、精子タンパク質17に対する抗原結合ドメインは、例えば、Song et al., Target Oncol 2013 Aug 14 (PMID: 23943313)；Song et al., Med Oncol 29(4) : 2923 - 2931 (2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 30

【0341】

一実施形態において、Tie2に対する抗原結合ドメインは、抗体AB33(Cell Signaling Technology)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0342】

一実施形態において、MAD-CT-2に対する抗原結合ドメインは、例えば、PMID: 2450952；米国特許第7,635,753号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0343】

一実施形態において、Fos関連抗原1に対する抗原結合ドメインは、抗体12F9(Novus Biologicals)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0344】

一実施形態において、MelanA/MART1に対する抗原結合ドメインは、欧州特許第2514766A2号明細書；又は米国特許第7,749,719号明細書に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。 40

【0345】

一実施形態において、肉腫転座切断点に対する抗原結合ドメインは、例えば、Luo et al., EMBO Mol Med. 4(6) : 453 - 461 (2012)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0346】

一実施形態において、TRP-2に対する抗原結合ドメインは、例えば、Wang et al., J Exp Med. 184(6) : 2207 - 16 (1996)に記載され

ている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0347】

一実施形態において、CYP1B1に対する抗原結合ドメインは、例えば、Maecker et al., Blood 102(9):3287-3294(2003)に記載されている抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0348】

一実施形態において、RAGE-1に対する抗原結合ドメインは、抗体MAB5328(EMD Millipore)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0349】

一実施形態において、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素に対する抗原結合ドメインは、抗体カタログ番号：LS-B95-100(Lifespan Biosciences)の抗原結合部分、例えばCDRである。 10

【0350】

一実施形態において、腸カルボキシルエステラーゼに対する抗原結合ドメインは、抗体4F12：カタログ番号：LS-B6190-50(Lifespan Biosciences)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0351】

一実施形態において、mut hsp70-2に対する抗原結合ドメインは、抗体Lifespan Biosciences：モノクローナル：カタログ番号：LS-C133261-100(Lifespan Biosciences)の抗原結合部分、例えばCDRである。 20

【0352】

一実施形態において、CD79aに対する抗原結合ドメインは、Abcamから入手可能な抗体抗CD79a抗体[HM47/A9](ab3121)；Cell Signaling Technologyから入手可能な抗体CD79A抗体番号3351；又はSigma Aldrichから入手可能なウサギにおいて産生した抗CD79A抗体である抗体HPA017748の抗原結合部分、例えばCDRである。 20

【0353】

一実施形態において、CD79bに対する抗原結合ドメインは、抗体ポラツズマブベドチン、Dornan et al., "Therapeutic potential of an anti-CD79b antibody-drug conjugate, anti-CD79b-vc-MMAE, for the treatment of non-Hodgkin lymphoma" Blood. 2009 Sep 24; 114(13):2721-9. doi: 10.1182/blood-2009-02-205500. Epub 2009 Jul 24に記載の抗CD79b又は"4507 Pre-Clinical Characterization of T Cell-Dependent Bispecific Antibody Anti-CD79b/CD3 As a Potential Therapy for B Cell Malignancies" Abstracts of 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA December 6-9 2014に記載の二特異性抗体抗CD79b/CD3の抗原結合部分、例えばCDRである。 40

【0354】

一実施形態において、CD72に対する抗原結合ドメインは、Myers及びUckun, "An anti-CD72 immunotoxin against therapy-refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia." Leuk Lymphoma. 1995 Jun; 18(1-2):119-22に記載の抗体J3-109又はPolson et al., "Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma: Target and 50

Linker - Drug Selection" Cancer Res March 15, 2009 69; 2358に記載の抗CD72(10D6.8.1, mIgG1)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0355】

一実施形態において、LAIR1に対する抗原結合ドメインは、ProSpecから入手可能な抗体ANT-301 LAIR1抗体；又はBiologicsから入手可能な抗ヒトCD305(LAIR1)抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0356】

一実施形態において、FCARに対する抗原結合ドメインは、Sino Biological Inc.から入手可能な抗体CD89/FCAR antibody(カタログ番号10414-H08H)の抗原結合部分、例えばCDRである。

10

【0357】

一実施形態において、LILRA2に対する抗原結合ドメインは、Abnovaから入手可能な抗体LILRA2モノクローナル抗体(M17)、クローン3C7又はLifeSpan Biosciencesから入手可能なマウス抗LILRA2抗体、モノクローナル(2D7)の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0358】

一実施形態において、CD300LFに対する抗原結合ドメインは、Biologicsから入手可能な抗体マウス抗CMRF35様分子1抗体、モノクローナル[UP-D2]又はR&D Systemsから入手可能なラット抗CMRF35様分子1抗体、モノクローナル[234903]の抗原結合部分、例えばCDRである。

20

【0359】

一実施形態において、CLEC12Aに対する抗原結合ドメインは、抗体二特異性T細胞エンゲージャー(BiT E)scFv抗体及びNoordhuys et al., "Targeting of CLEC12A In Acute Myeloid Leukemia by Antibody-Drug-Conjugates and Bispecific CLL-1×CD3 BiTE Antibody" 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, December 10-13, 2011に記載のADC及びMCLA-117(Merus)の抗原結合部分、例えばCDRである。

30

【0360】

一実施形態において、BST2(CD317とも称される)に対する抗原結合ドメインは、Antibodies-Onlineから入手可能な抗体マウス抗CD317抗体、モノクローナル[3H4]又はR&D Systemsから入手可能なマウス抗CD317抗体、モノクローナル[696739]の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0361】

一実施形態において、EMR2(CD312とも称される)に対する抗原結合ドメインは、LifeSpan Biosciencesから入手可能な抗体マウス抗CD312抗体、モノクローナル[LS-B8033]又はR&D Systemsから入手可能なマウス抗CD312抗体、モノクローナル[494025]の抗原結合部分、例えばCDRである。

40

【0362】

一実施形態において、LY75に対する抗原結合ドメインは、EMD Milliporeから入手可能な抗体マウス抗リンパ球抗原75抗体、モノクローナル[HD30]又はLife Technologiesから入手可能なマウス抗リンパ球抗原75抗体、モノクローナル[A15797]の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0363】

一実施形態において、GPC3に対する抗原結合ドメインは、Nakano K, Ishiguro T, Konishi H, et al. Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by C

50

D R grafting and stability optimization. Anticancer Drugs. 2010 Nov; 21(10): 907-916に記載の抗体hGC33、又はMDX-1414、HN3、又はYP7の抗原結合部分、例えばCDRであり、これら3つは、全てFeng et al., "Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer." FEBS Lett. 2014 Jan 21; 588(2): 377-82に記載される。

【0364】

一実施形態において、FcRL5に対する抗原結合ドメインは、Elkins et al., "FcRL5 as a target of antibody-drug conjugates for the treatment of multiple myeloma" Mol Cancer Ther. 2012 Oct; 11(10): 2222-32に記載の抗FcRL5抗体の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0365】

一実施形態において、IGLL1に対する抗原結合ドメインは、Life span Biosciencesから入手可能な抗体マウス抗免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1抗体、モノクローナル[AT1G4]、Biologendから入手可能なマウス抗免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1抗体、モノクローナル[HSL11]の抗原結合部分、例えばCDRである。

【0366】

一実施形態において、抗原結合ドメインは、上記に挙げた抗体からの1つ、2つ、3つの（例えば、3つ全ての）重鎖CDR、HC CDR1、HC CDR2及びHC CDR3及び/又は上記に挙げた抗体からの1つ、2つ、3つの（例えば、3つ全ての）軽鎖CDR、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3を含む。一実施形態において、抗原結合ドメインは、上記に挙げた抗体の重鎖可変領域及び/又は可変軽鎖領域を含む。

【0367】

別の態様において、抗原結合ドメインは、ヒト化抗体又は抗体断片を含む。一部の態様において、非ヒト抗体は、ヒト化であり、抗体の特定の配列又は領域は、ヒトで天然に產生される抗体又はその断片との類似性が増すように改変される。一態様において、抗原結合ドメインは、ヒト化である。

【0368】

ヒト化抗体は、CDR移植（例えば、欧洲特許第239,400号明細書；国際公開第91/09967号パンフレット；及び米国特許第5,225,539号明細書、同第5,530,101号明細書及び同第5,585,089号明細書を参照されたい（これらのそれは、その全体が参考により本明細書に組み込まれる））、ベニアリング又はリサーフェシング（例えば、欧洲特許第592,106号明細書及び欧洲特許第519,596号明細書；Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5): 489-498；Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6): 805-814；及びRoguska et al., 1994, PNAS, 91: 969-973を参照されたい（これらのそれは、その全体が参考により本明細書に組み込まれる））、鎖シャフリング（例えば、その全体が参考により本明細書に組み込まれる米国特許第5,565,332号明細書を参照されたい）を含むが、これらに限定されない、当技術分野で知られている様々な技術、及び例えば米国特許出願公開第2005/0042664号明細書、米国特許出願公開第2005/0048617号明細書、米国特許第6,407,213号明細書、米国特許第5,766,886号明細書、国際公開第9317105号パンフレット、Tane 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)、

10

20

30

40

50

00)、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)並びにPedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73(1994)(これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている技術を使用して生成することができる。多くの場合、抗原結合を変更するために、例えば改善するために、フレームワーク領域内のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体からの対応する残基で置換されるであろう。これらの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り、例えば抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するためのCDRとフレームワーク残基との相互作用のモデリング及び特定の位置における異常なフレームワーク残基を特定するための配列比較によって特定される(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるQueenらの米国特許第5,585,089号明細書;及びRiechmann et al., 1988, Nature, 332:323を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0369】

ヒト化抗体又は抗体フラグメントは、非ヒトである供給源からのものがその中に残っている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、多くの場合に「インポート」残基と称され、これらは、通常、「インポート」可変ドメインから採取される。本明細書に提供されるように、ヒト化抗体又は抗体フラグメントは、非ヒト免疫グロブリン分子からの1つ以上のCDRと、フレームワークを構成するアミノ酸残基がヒト生殖細胞系に完全に又はほとんど由来するフレームワーク領域とを含む。抗体又は抗体フラグメントのヒト化のための多くの技術が当技術分野において周知であり、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置き換えることにより、すなわちCDR移植により(欧洲特許第239,400号明細書;国際公開第91/09967号パンフレット;及び米国特許第4,816,567号明細書;同第6,331,415号明細書;同第5,225,539号明細書;同第5,530,101号明細書;同第5,585,089号明細書;同第6,548,640号明細書(これらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる))、Winter及び共同研究者の方法に従って本質的に実施することができる(Jones et al., Nature, 321:522-525(1986);Riechmann et al., Nature, 332:323-327(1988);Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536(1988))。このようなヒト化抗体及び抗体フラグメントでは、実質的にインタクトなヒト可変ドメイン未満のものが非ヒト種からの対応する配列によって置き換えられている。ヒト化抗体は、多くの場合、いくつかのCDR残基及び可能であればいくつかのフレームワーク(FR)残基が、齧歯類抗体中の類似した部位からの残基によって置き換えられているヒト抗体である。抗体又は抗体フラグメントのヒト化は、ベニアリング若しくはリサーフェシング(欧洲特許第592,106号明細書及び欧洲特許第519,596号明細書;Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498;Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814(1994);及びRoguska et al., PNAS, 91:969-973(1994))又は鎖シャーリング(米国特許第5,565,332号明細書)(これらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)によっても達成され得る。

【0370】

ヒト化抗体の作製で使用されるためのヒト可変ドメイン、軽鎖及び重鎖の両方の選択は、抗原性を低減させるためのものである。いわゆる「最良適合」法によれば、齧歯類抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリ

ーニングされる。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒト配列がヒト化抗体のためのヒトフレームワーク(FR)として許容される(Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 (1987))、これらの内容は、その全体が本明細書における参照により本明細書に組み込まれる)。別の方針は、軽鎖又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がいくつかの異なるヒト化抗体に使用され得る(例えば、Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 (1993)を参照されたい(これらの内容は、その全体が本明細書における参照により本明細書に組み込まれる))。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域のフレームワーク領域、例えばすべての4つのフレームワーク領域は、VH4_4-5_9生殖細胞系配列に由来する。一実施形態では、フレームワーク領域は、例えば、対応するネズミ配列でのアミノ酸からの1つ、2つ、3つ、4つ又は5つの修飾、例えば置換を含むことができる。一実施形態では、軽鎖可変領域のフレームワーク領域、例えばすべての4つのフレームワーク領域は、VK3_1_25生殖細胞系配列に由来する。一実施形態では、フレームワーク領域は、例えば、対応するネズミ配列でのアミノ酸からの1つ、2つ、3つ、4つ又は5つの修飾、例えば置換を含むことができる。

【0371】

いくつかの態様では、抗体フラグメントは、標的抗原に対する高親和性及び他の好ましい生物学的特性を保持する状態でヒト化される。本発明の一態様によれば、ヒト化抗体及び抗体フラグメントは、親配列及びヒト化配列の三次元モデルを使用する、親配列及び様々な概念ヒト化産物の解析のプロセスによって調製される。三次元演繹グロブリンモデルは、一般に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定される三次元立体配座構造を例示且つ表示するコンピュータプログラムが入手可能である。これらの表示の精査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の解析、例えば候補免疫グロブリンの標的抗原に結合する能力に影響を与える残基の解析を可能にする。このようにして、標的抗原に対する増加した親和性などの所望の抗体又は抗体フラグメントの特性が達成されるよう、FR残基は、レシピエント及びインポート配列から選択且つ組み合わされ得る。一般的に、CDR残基は、抗原結合に影響を与えることに直接的且つ最も実質的に関与する。

【0372】

ヒト化抗体又は抗体フラグメントは、元々の抗体と同様の抗原特異性、例えば本発明では本明細書に記載のヒト癌関連抗原に結合する能力を保持することができる。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体又は抗体フラグメントは、本明細書に記載されるようなヒト癌関連抗原に結合する改善された親和性及び/又は特異性を有することができる。

【0373】

一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、抗体又は抗体フラグメントの特定の機能的特徴又は特性によって特徴付けられる。例えば、一態様では、抗原結合ドメインは、本明細書に記載されるような腫瘍抗原に特異的に結合する。

【0374】

一態様では、本明細書に記載されるような抗癌関連抗原結合ドメインは、フラグメント、例えば一本鎖可変フラグメント(scfv)である。一態様では、本明細書に記載されるような抗癌関連抗原結合ドメインは、Fv、Fab、(Fab')2又は二重機能性(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、本発明の抗体及びそのフラグメントは、本明細書に記載されるような癌関連抗原タンパク質に野生型又は増強された親和性で結合する。

【0375】

10

20

30

40

50

ある場合には、scFvは、当技術分野において既知の方法に従って調製することができる（例えば、Bird et al. , (1988) Science 242:423-426及びHuston et al. , (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883を参照されたい）。scFv分子は、フレキシブルポリマーリンカーを使用してVH及びVL領域と一緒に連結することによって生成することができる。scFv分子は、最適化された長さ及び/又はアミノ酸組成を有するリンカー（例えば、Ser-Glyリンカー）を含む。このリンカー長さは、scFvの可変領域がどのように折り畳み且つ相互作用するかに大きく影響し得る。実際、短い（例えば、5~10個のアミノ酸の）ポリペプチドリンカーが使用される場合、鎖内折り畳みは妨げられる。鎖内折り畳みは、2つの可変領域と一緒ににして、機能的エピトープ結合部位を形成することも必要である。リンカーの配向及びサイズの例については、例えば、参考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号明細書、同第2005/0175606号明細書、同第2007/0014794号明細書並びに国際公開第2006/020258号パンフレット及び同第2007/024715号パンフレットを参照されたい。
10

【0376】

scFvは、そのVLとVH領域との間に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50個又はそれを超えるアミノ酸残基のリンカーを含むことができる。リンカー配列は、任意の天然型アミノ酸を含み得る。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、(Gly₄Ser)_nなどのグリシンとセリンとの繰り返しの組を含み、式中、nは、1以上の正の整数である（配列番号52）。一実施形態では、リンカーは、(Gly₄Ser)₄（配列番号45）又は(Gly₄Ser)₃（配列番号46）であり得る。リンカー長さにおける変動は、活性を保持又は向上させることができ、活性研究において優れた有効性をもたらす。
20

【0377】

別の態様では、抗原結合ドメインは、T細胞受容体（「TCR」）又はそのフラグメント、例えば一本鎖TCR（scTCR）である。このようなTCRを作製するための方法は、当技術分野において既知である。例えば、Williemse RA et al., Gene Therapy 7:1369-1377 (2000); Zhang T et al., Cancer Gene Ther. 11:487-496 (2004); Aggen et al., Gene Ther. 19 (4): 365-74 (2012)を参照されたい（参考文献は、その全体が本明細書に組み込まれる）。例えば、scTCRは、リンカー（例えば、フレキシブルペプチド）によって連結されたT細胞クローニングからのV 及びV 遺伝子を含有するように操作することができる。このアプローチは、それ自体細胞内にあるが、このような抗原（ペプチド）のフラグメントがMHCによって癌細胞の表面上に提示されている癌関連標的に非常に有用である。
30

【0378】

CD19抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗原結合ドメインは、CD19（例えば、ヒトCD19）に結合する（「CD19抗原結合ドメイン」）。

【0379】

一実施形態では、CD19抗原結合ドメインは、Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997)に記載されるFMC63 scFvフラグメントと同一又は同様の結合特異性を有する。一実施形態では、CD19抗原結合ドメインは、参考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)に記載されるscFvフラグメントを含む。
40
50

【0380】

一実施形態では、CD19抗原結合ドメインは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2012/07900号パンフレットに記載される抗原結合ドメイン（例えば、CAR19構築物の抗原結合ドメイン）又はそれと少なくとも約85%、90%、95%、99%以上同一であり、及び／又は1つ、2つ、3つ以上の置換、挿入若しくは欠失、例えば保存置換を有する配列を含む。

【0381】

一実施形態では、CD19抗原結合ドメインは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/153270号パンフレットの表3による抗原結合ドメイン（例えば、ヒト化抗原結合ドメイン）又はそれと少なくとも約85%、90%、95%、99%以上同一であり、及び／又は1つ、2つ、3つ以上の置換、挿入若しくは欠失、例えば保存置換を有する配列を含む。臨床状況では、ネズミCD19抗体のヒト化が望ましく、ここで、マウス特異的残基がCAR-T19治療、すなわちCAR19構築物で形質導入されたT細胞による治療を受けた患者において、ヒト抗マウス抗原（HAMA）応答を誘発させ得る。ヒト化CD19 CAR配列の產生、特性評価及び有効性は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/153270号パンフレット（実施例1～5（115～159頁）を含む）に記載されている。国際公開第2014/153270号パンフレットは、様々なCD19抗原結合ドメイン構築物の結合及び有効性をアッセイする方法も記載している。

10

【0382】

一実施形態では、CD19抗原結合ドメインは、配列番号104のアミノ酸配列（又はそれと少なくとも約85%、90%、95%、99%以上同一であり、及び／又は1つ、2つ、3つ以上の置換、挿入若しくは欠失、例えば保存置換を有する配列）を含む。

20

【化1】

DIQMTQTSSLASALGDRVТИSCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG
VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGG
GGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL
GVIWGSETTYYNSALKSRLTHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGS
YAMDYWGQGTSVTVSS (配列番号104)

30

【0383】

BCMA抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗原結合ドメインは、BCMA（例えば、ヒトBCMA）に結合する（「BCMA抗原結合ドメイン」）。

【0384】

例示的なBCMA抗原結合ドメインは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/014565号パンフレットの表1又は16に開示される配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%、99%以上同一であり、及び／又は1つ、2つ、3つ以上の置換、挿入若しくは欠失、例えば保存置換を有する配列を含むことができる。一実施形態では、BCMA抗原結合ドメインは、国際公開第2016/014565号パンフレットに開示されるBCMA-1、BCMA-2、BCMA-3、BCMA-4、BCMA-5、BCMA-6、BCMA-7、BCMA-8、BCMA-9、BCMA-10、BCMA-11、BCMA-12、BCMA-13、BCMA-14、BCMA-15、149362、149363、149364、149365、149366、149367、149368、149369、BCMA_EBB-C1978-A4、BCMA_EBB-C1978-G1、BCMA_EBB-C1979-C1、BCMA_EBB-C1978-C7、BCMA_EBB-C1978-D10、BCMA_EBB-C1979-C12、BCMA_EBB-C1980-G4、BCMA_EBB-C1980-D

40

50

2、B C M A _ E B B - C 1 9 7 8 - A 1 0 、B C M A _ E B B - C 1 9 7 8 - D 4 、B C M A _ E B B - C 1 9 8 0 - A 2 、B C M A _ E B B - C 1 9 8 1 - C 3 、B C M A _ E B B - C 1 9 7 8 - G 4 、A 7 D 1 2 . 2 、C 1 1 D 5 . 3 、C 1 2 A 3 . 2 又は C 1 3 F 1 2 . 1 の 1 つ以上の C D R 、V H 、V L 若しくは s c F v 又はそれと少なくとも約 8 5 % 、9 0 % 、9 5 % 、9 9 % 以上同一であり、及び / 又は 1 つ、2 つ、3 つ以上の置換、挿入若しくは欠失、例えば保存置換を有する配列を含む。

【 0 3 8 5 】

追加の例示的な B C M A 抗原結合ドメインは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2 0 1 7 / 0 2 1 4 5 0 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 7 / 0 1 1 8 0 4 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 7 / 0 2 5 0 3 8 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 0 3 2 7 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 6 / 1 3 0 5 9 8 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 6 / 2 1 0 2 9 3 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 0 3 2 0 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 6 / 0 1 4 7 8 9 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 4 3 0 4 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 6 / 1 5 4 0 5 5 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 5 / 1 6 6 0 7 3 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 5 / 1 8 8 1 1 9 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 5 / 1 5 8 6 7 1 号パンフレット、米国特許第 9 , 2 4 3 , 0 5 8 号明細書、米国特許第 8 , 9 2 0 , 7 7 6 号明細書、米国特許第 9 , 2 7 3 , 1 4 1 号明細書、米国特許第 7 , 0 8 3 , 7 8 5 号明細書、米国特許第 9 , 0 3 4 , 3 2 4 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 4 9 7 3 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 2 8 4 4 6 7 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 0 5 1 2 6 6 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 4 4 8 4 4 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 3 1 6 5 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 2 9 7 8 8 4 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 2 9 7 8 8 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 5 1 3 0 8 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 5 1 2 5 2 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 5 1 2 5 2 号明細書、国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 0 3 3 2 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 6 / 0 8 7 5 3 1 号公開、国際公開第 2 0 1 6 / 0 7 9 1 7 7 号公開、国際公開第 2 0 1 5 / 1 7 2 8 0 0 号公開、国際公開第 2 0 1 7 / 0 0 8 1 6 9 号公開、米国特許第 9 , 3 4 0 , 6 2 1 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 2 7 3 0 5 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 7 6 9 7 3 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 6 8 3 5 1 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 5 1 0 6 8 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 6 8 9 8 8 号明細書及び米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 2 3 2 5 5 7 号明細書に開示されている。いくつかの実施形態では、追加の例示的な B C M A 抗原結合ドメインは、国際公開第 2 0 1 2 / 0 1 6 3 8 0 5 号パンフレット（その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）からの V H 及び V L 配列を使用して生成される。

【 0 3 8 6 】

C D 2 0 抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗原結合ドメインは、C D 2 0 （例えば、ヒト C D 2 0 ）に結合する（「 C D 2 0 抗原結合ドメイン」）。いくつかの実施形態では、C D 2 0 抗原結合ドメインは、参照により組み込まれる国際公開第 2 0 1 6 / 1 6 4 7 3 1 号パンフレット及び P C T / 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 5 5 6 2 7 号明細書による抗原結合ドメインを含む。例示的な C D 2 0 抗原結合ドメインは、例えば、P C T / 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 5 5 6 2 7 号明細書の表 1 ~ 5 に開示されている。いくつかの実施形態では、C D 2 0 抗原結合ドメインは、P C T / 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 5 5 6 2 7 号明細書又は国際公開第 2 0 1 6 / 1 6 4 7 3 1 号パンフレットに開示されている C D 2 0 抗原結合ドメインの C D R 、可変領域若しくは s c F v 配列又はそれと少なくとも約 8 5 % 、9 0 % 、9 5 % 、9 9 % 以上同一であり、及び / 又は 1 つ、2 つ、3 つ以上の置換、挿入若しくは欠失、例えば保存置換を有する配列を含む。

【 0 3 8 7 】

C D 2 2 抗原結合ドメイン

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗原結合ドメインは、CD22（例えば、ヒトCD22）に結合する（「CD22抗原結合ドメイン」）。いくつかの実施形態では、CD22抗原結合ドメインは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/164731号パンフレット及びPCT/米国特許出願公開第2017/055627号明細書による抗原結合ドメインを含む。例示的なCD22抗原結合ドメインは、例えば、国際公開第2016/164731号パンフレットの表6A、6B、7A、7B、7C、8A、8B、9A、9B、10A及び10B並びにPCT/米国特許出願公開第2017/055627号明細書又は国際公開第2016/164731号パンフレットに開示されているCD22抗原結合ドメインのCDR、可変領域若しくはscFv配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%、99%以上同一であり、及び/又は1つ、2つ、3つ以上の置換、挿入若しくは欠失、例えば保存置換を有する配列を含む。

10

【0388】

EGFR抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗原結合ドメインは、EGFR（例えば、ヒトEGFR、例えばEGFRvIII）に結合する（「EGFRvIII抗原結合ドメイン」）。いくつかの実施形態では、EGFRvIII抗原結合ドメインは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2014/130657号パンフレットによる抗原結合ドメインを含む。例示的なEGFRvIII抗原結合ドメインは、例えば、国際公開第2014/130657号パンフレットの表2に開示されている。いくつかの実施形態では、EGFRvIII抗原結合ドメインは、国際公開第2014/130657号パンフレットに開示されているEGFRvIII抗原結合ドメインのCDR、可変領域若しくはscFv配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%、99%以上同一であり、及び/又は1つ、2つ、3つ以上の置換、挿入若しくは欠失、例えば保存置換を有する配列を含む。

20

【0389】

メソテリン抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗原結合ドメインは、メソテリン（例えば、ヒトメソテリン）に結合する（「メソテリン抗原結合ドメイン」）。いくつかの実施形態では、メソテリン抗原結合ドメインは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2015090230号パンフレット及び国際公開第2017112741号パンフレットによる抗原結合ドメインを含む。例示的なメソテリン抗原結合ドメインは、例えば、国際公開第2017112741号パンフレットの表2、3、4及び5に開示されている。いくつかの実施形態では、メソテリン抗原結合ドメインは、国際公開第2015090230号パンフレット及び国際公開第2017112741号パンフレットに開示されているメソテリン抗原結合ドメインのCDR、可変領域若しくはscFv配列又はそれと少なくとも約85%、90%、95%、99%以上同一であり、及び/又は1つ、2つ、3つ以上の置換、挿入若しくは欠失、例えば保存置換を有する配列を含む。

30

【0390】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、種々の実施形態において、キメラタンパク質は、キメラタンパク質の細胞外ドメインに結合する膜貫通ドメインを含むように設計できる。膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接した1つ以上のさらなるアミノ酸、例えば膜貫通が由来するタンパク質の細胞外領域と関連する1つ以上のアミノ酸（例えば、細胞外領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10～最大15アミノ酸）及び/又は膜貫通タンパク質が由来するタンパク質の細胞内領域と関連する1つ以上のさらなるアミノ酸（例えば、細胞内領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10～最大15アミノ酸）を含み得る。一様において、膜貫通ドメインは、キメラ分子の他のドメインの1つと関連するものであり、例えば、一実施形態において、膜貫通ドメインは、シグナル伝達ドメイン、共刺激ド

40

50

メイン、ヒンジドメイン又は細胞外ドメインが由来するのと同じタンパク質由来であり得る。別の態様において、膜貫通ドメインは、キメラタンパク質の任意の別のドメインが由来するものと同じタンパク質に由来しない。

【0391】

一態様において、膜貫通ドメインは、組換えであり得、その場合、ロイシン及びバリンなどの疎水性残基を優勢に含む。一態様において、フェニルアラニン、トリプトファン及びバリンのトリプレットを、組換え膜貫通ドメインの各末端に見ることができる。

【0392】

細胞質ドメイン

一次シグナル伝達ドメインは、T C R 複合体の一次活性化を刺激性方向又は阻害性方向のいずれかで制御する。刺激性方向で作用する初代細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ又は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。

【0393】

本発明において特に有用であるI T A M含有初代細胞内シグナル伝達ドメインの例は、C D 3 、共通F c R (F C E R 1 G)、F c R I I a 、F c R (F c R 1 b) 、C D 3 、C D 3 、C D 3 、C D 7 9 a 、C D 7 9 b 、D A P 1 0 及びD A P 1 2 のものを含む。一実施形態において、本発明のC A Rは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばC D 3 の一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0394】

一実施形態では、一次シグナル伝達ドメインは、修飾型I T A Mドメイン、例えば天然I T A Mドメインと比べて変更された（例えば、増加した又は減少した）活性を有する変異型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、修飾型I T A Mを含有する一時細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば最適化された及び／又は短縮されたI T A Mを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。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つ以上のI T A Mモチーフを含む。

【0395】

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C A Rの一部を指す。共刺激分子は、リンパ球の抗原に対する効率的な応答に必要である、抗原受容体又はそのリガンド以外の細胞表面分子である。このような分子の例としては、C D 2 7 、C D 2 8 、4 - 1 B B (C D 1 3 7) 、O X 4 0 、C D 3 0 、C D 4 0 、P D - 1 、I C O S 、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 、B 7 - H 3 及びC D 8 3 と特異的に結合するリガンドなどが挙げられる。例えば、C D 2 7 共刺激は、増殖、エフェクター機能及びインビトロでのヒトC A R T細胞の生存を増強することが証明されており、インビオでのヒトT細胞の持続性及び抗腫瘍活性を増強させる (S o n g e t a l . B l o o d . 2 0 1 2 ; 1 1 9 (3) : 6 9 6 - 7 0 6) 。このような共刺激分子のさらなる例としては、C D 5 、I C A M - 1 、G I T R 、B A F F R 、H V E M (L I G H T R) 、S L A M F 7 、N K p 8 0 (K L R F 1) 、N K p 4 4 、N K p 3 0 、N K p 4 6 、C D 1 6 0 、C D 1 9 、C D 4 、C D 8 、C D 8 、I L 2 R 、I L 2 R 、I L 7 R 、I T G A 4 、V L A 1 、C D 4 9 a 、I T G A 4 、I A 4 、C D 4 9 D 、I T G A 6 、V L A - 6 、C D 4 9 f 、I T G A D 、C D 1 1 d 、I T G A E 、C D 1 0 3 、I T G A L 、C D 1 1 a 、L F A - 1 、I T G A M 、C D 1 1 b 、I T G A X 、C D 1 1 c 、I T G B 1 、C D 2 9 、I T G B 2 、C D 1 8 、L F A - 1 、I T G B 7 、T N F R 2 、T R A N C E / R A N K L 、D N A M 1 (C D 2 2 6) 、S L A M F 4 (C D 2 4 4 、2 B 4) 、C D 8 4 、C D 9 6 (T a c t i l e) 、N K G 2 D 、C E A C A M 1 、C R T A M 、L y 9 (C D 2 2 9) 、C D 1 6 0 (B Y 5 5) 、P S G L 1 、C D 1 0 0 (S E M A 4 D) 、C D 6 9 、S L A M F 6 (N T B - A 、L y 1 0 8) 、S L A M (S L A M F 1 、C D 1 5 0 、I P O - 3) 、B L A M E (S L A M F 8) 、S E L P L G (C D 1 6 2) 、L T B R 、L A T 、G A D S 、S L P - 7 6 、P A G / C b p 及びC D 1 9 a が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0396】

調節可能なキメラ抗原受容体

いくつかの実施形態では、CAR活性が制御され得る調節可能なCAR(RCAR)は、CAR療法の安全性及び有効性を最適化するために望ましい。CAR活性が制御され得る多くの方法がある。例えば、二量体化ドメインに融合されたカスパーゼを使用する例えは誘導性アボトーシス(例えば、Diet al., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3; 365(18): 1673-1683を参照されたい)は、本発明のCAR療法において安全スイッチとして使用することができる。一態様では、RCARは、ポリペプチドの組、典型的には、最も簡単な実施形態では2つのポリペプチドの組を含み、この中で、本明細書に記載の標準CARの構成要素、例えば抗原結合ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインが別々のポリペプチド又はメンバー上に分割されている。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの組は、二量体化分子の存在時、ポリペプチドを互いに結合することができる、例えば抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインに結合することができる二量体化スイッチを含む。

10

【0397】

二量体化スイッチ

二量体化スイッチは、非共有結合性又は共有結合性であり得る。非共有結合性二量体化スイッチでは、二量体化分子は、スイッチドメイン間の非共有結合性相互作用を促進する。共有結合性二量体化スイッチでは、二量体化分子は、スイッチドメイン間の共有結合性相互作用を促進する。

20

【0398】

実施形態では、RCARは、FKBP/FRAPベースの又はFKBP/FRBベースの二量体化スイッチを含み、FKBP12(FKBP又はFK506結合タンパク質)は、天然物免疫抑制剤のラパマイシンに対する初期細胞内標的として機能する豊富な細胞質タンパク質である。ラパマイシンは、FKBPに結合し、且つ大型のPI3K総胴体FRAP(RAFT、mTOR)に結合する。FRBは、FKBP-ラパマイシン複合体に結合するのに十分であるFRAPの93個のアミノ酸部分である(Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J. & Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4947-51)。

30

【0399】

実施形態では、FKBP/FRAPベース、例えばFKBP/FRBベースのスイッチは、二量体化分子、例えばラパマイシン又はラパマイシン類似体を使用することができる。

【0400】

FKBPのアミノ酸配列は、以下の通りである。

40

【化2】

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPKRG
QTCVVHVTGMLEDGKKFDSSRDRNPKFKFMLGKQEVRGW
EEGVAQMSVGQRRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFD
VELLKLETSY(配列番号53)

【0401】

実施形態では、FKBPスイッチドメインは、ラパマイシン又はラパログ(rapalog)の存在下において、FRB又はそのフラグメント若しくは類似体に結合する能力を

50

有する F K B P のフラグメントを含むことができ、例えば、これは、下記の下線を施した部分である。

【化 3】

```
V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D
R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A
Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E T S (配列番号54)
```

【0 4 0 2】

F R B のアミノ酸配列は、以下の通りである。

10

【化 4】

```
I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F
N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S G N V K D L T Q A W D L Y Y H V F R R I S K (配列番号55)
```

【0 4 0 3】

実施形態では、F K B P / F R B 二量体化スイッチは、F R B ベースのスイッチドメイン、例えば修飾型 F R B スイッチドメイン、F K B P ベースのスイッチドメインと、二量体化分子、例えばラパマイシン又はラパログ、例えば R A D 0 0 1 との間の変更された、
例えは増強された複合体形成を示す修飾型 F R B スイッチドメインを含む。実施形態では
、修飾型 F R B スイッチドメインは、1つ以上の突然変異、例えばアミノ酸位置における
突然変異 L 2 0 3 1 、 E 2 0 3 2 、 S 2 0 3 5 、 R 2 0 3 6 、 F 2 0 3 9 、 G 2 0 4 0 、
T 2 0 9 8 、 W 2 1 0 1 、 D 2 1 0 2 、 Y 2 1 0 5 及び F 2 1 0 8 から選択される 2 、 3
、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 個以上の突然変異を含み、ここで、野生型アミノ酸は、
任意の他の天然型アミノ酸に突然変異されている。実施形態では、変異体 F R B は、E 2
0 3 2 において突然変異を含み、ここで、E 2 0 3 2 は、フェニルアラニン (E 2 0 3 2
F) 、メチオニン (E 2 0 3 2 M) 、アルギニン (E 2 0 3 2 R) 、バリン (E 2 0 3 2
V) 、チロシン (E 2 0 3 2 Y) 、イソロイシン (E 2 0 3 2 I) 又はロイシン (E 2 0
3 2 L) に突然変異されている。実施形態では、変異体 F R B は、T 2 0 9 8 において突
然変異を含み、ここで、T 2 0 9 8 は、フェニルアラニン (T 2 0 9 8 F) 又はロイシン
(T 2 0 9 8 L) に突然変異されている。実施形態では、変異体 F R B は、E 2 0 3 2 及
び T 2 0 9 8 において突然変異を含み、ここで、E 2 0 3 2 は、任意のアミノ酸に突然
変異され、且つ T 2 0 9 8 は、任意のアミノ酸に突然変異されている。実施形態では、変
異体 F R B は、E 2 0 3 2 I 及び T 2 0 9 8 L の突然変異を含む。実施形態では、変
異体 F R B は、E 2 0 3 2 L 及び T 2 0 9 8 L の突然変異を含む。

20

【0 4 0 4】

30

【表3】

表10. 二量体化分子に対して増加した親和性を有する例示的な変異体 FRB

FRB 変異体	アミノ酸配列
E2032I 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGP QTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSgnVKDLTQAWDL YYHVFRRIKSCTS (配列番号 56)
E2032L 変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGP QTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSgnVKDLTQAWDL YYHVFRRIKSCTS (配列番号 57)
T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGP QTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSgnVKDLLQAWDL YYHVFRRIKSCTS (配列番号 58)
E2032、T2098 変異体	ILWHEMWHEGLXEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGP QTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSgnVKDLXQAWDL YYHVFRRIKSCTS(配列番号 59)
E2032I、T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGP QTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSgnVKDLLQAWDL YYHVFRRIKSCTS(配列番号 60)
E2032L、T2098L 変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGP QTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSgnVKDLLQAWDL YYHVFRRIKSCTS(配列番号 61)

10

20

30

40

50

【0405】

他の好適な二量体化スイッチとしては、GyrB-GyrBベースの二量体化スイッチ、ジベレリンベースの二量体化スイッチ、タグ/バインダー二量体化スイッチ及びhalo-tag/snap-tag二量体化スイッチが挙げられる。本明細書に提供される指針に従えば、このようなスイッチ及び関連する二量体化分子は、当業者に明らかであろう。

【0406】

二量体化分子

スイッチドメイン間の会合は、二量体化分子によって促進される。二量体化分子の存在下では、スイッチドメイン間の相互作用又は会合は、第1のスイッチドメインと関連する、例えば第1のスイッチドメインに融合されたポリペプチドと、第2のスイッチドメインと関連する、例えば第2のスイッチドメインに融合されたポリペプチドとの間のシグナル伝達を可能にする。非限定レベルの二量体化分子の存在下では、シグナル伝達は、例えば、本明細書に記載の系で測定されるとき、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.5、10、50、100倍まで増加される。

【0407】

ラパマイシン及びラパマイシン類似体（ときにラバログとも称される）、例えばRAD001は、本明細書に記載のFKBP/FRBベースの二量体化スイッチにおける二量体化分子として使用することができる。実施形態では、二量体化分子は、ラパマイシン（シリコリムス）、RAD001（エベロリムス）、ゾタロリムス、テムシリコリムス、AP-23573（リダホロリムス）、バイオリムス及びAP21967から選択することができる。FKBP/FRBベースの二量体化スイッチと使用するのに好適な追加のラパマイシン類似体は、「併用療法」と題されたセクション又は「例示的なmTOR阻害剤」と題されたサブセクションでさらに記載されている。

【0408】

2つ以上のキメラ膜タンパク質を含む系

一態様では、本発明は、細胞中で発現されると、例えば2つ以上の抗原、例えば腫瘍抗原（例えば、本明細書に記載される）に対して特性を有するTCRの形成をもたらすキメラ膜タンパク質の系を提供する。このような系は、これらが本明細書に記載の二量体化ドメインを必要としないが（これらが含む場合があるが）、抗原結合ドメインがTCRの2つ以上の構成要素に連結するため、TCRが組み立てられると、TCRは、抗原結合ドメインの抗原に対して変更された特異性を有するという点で有利である。この系は、1つ以上の細胞内共刺激ドメインをさらに含む。理論に束縛されるものではないが、1つ以上の細胞内共刺激ドメインの封入は、抗原認識時のCD3ドメイン及び1つ又は複数の共刺激ドメインを通る両方のシグナル伝達を可能にする。

10

【0409】

従って、本発明は、

第1の抗原結合ドメイン及びCD3、又はの細胞外ドメインに由来する第1の細胞外ドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及びCD3、又は以外のタンパク質に由来する第1の細胞内共刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む第1のキメラ膜タンパク質、及び

第2の抗原結合ドメイン及びCD3、又はの細胞外ドメインに由来する第2の細胞外ドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、任意選択によりCD3、又は以外のタンパク質に由来する第2の細胞内共刺激ドメインを含む第2のキメラ膜タンパク質

20

を含む系を提供し、第1の抗原結合ドメインと第2の抗原結合ドメインとは、同一ではなく、CD3、又はの第1の細胞外ドメインとCD3、又はの第2の細胞外ドメインとは、同一ではない。

【0410】

キメラ膜タンパク質の例示的な実施形態は、図41に示されている。

【0411】

実施形態では、第1のCD3、又は細胞外ドメインは、CD3、又は細胞外ドメイン全体を含む。

30

【0412】

実施形態では、第2のCD3、又は細胞外ドメインは、CD3、又は細胞外ドメイン全体である。

【0413】

実施形態では、a) 第1のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み、及び第2のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み；b) 第1のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み、及び第2のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み；又はc) 第1のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含み、及び第2のキメラタンパク質は、CD3 細胞外ドメイン全体を含む。

40

【0414】

実施形態では、第1のキメラタンパク質は、CD3、又はタンパク質の全体、例えばCD3、又はタンパク質の細胞外、膜貫通及び細胞内ドメインを含む。

【0415】

実施形態では、第2のキメラタンパク質は、CD3、又はタンパク質の全体、例えばCD3、又はタンパク質の細胞外、膜貫通及び細胞内ドメインを含む。

【0416】

他の実施形態では、第1のキメラタンパク質は、CD3、又はタンパク質に由来するいかなる細胞内ドメインも含まない。実施形態では、第2のキメラタンパク質は、CD3、又はタンパク質に由来するいかなる細胞内ドメインも含まない。

50

【0417】

実施形態では、第1のキメラタンパク質及び／又は第2のキメラタンパク質の膜貫通ドメインは、CD3、又はの膜貫通ドメインを含まない。

【0418】

実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、CD3、又はに由来する前記第1の細胞外ドメインに対してN末端に位置する。実施形態では、第2の抗原結合ドメインは、CD3、又はに由来する前記第2の細胞外ドメインに対してN末端に位置する。実施形態では、第1のキメラタンパク質、第2のキメラタンパク質又は第1及び第2のキメラタンパク質の両方は、前記第1及び／又は第2の抗原結合ドメインに対してN末端に位置する第3の抗原結合ドメインを含む。

【0419】

実施形態では、第1の抗原結合ドメインと、CD3、又はに由来する前記第1の細胞外ドメインとは、第1のリンカー、例えば本明細書に記載のリンカー（例えば、(GGGS)_nリンカー（配列番号68）（式中、nは、0～10の整数であり、例えば、nは、4に等しい）によって結合され、及び／又は第2の抗原結合ドメインと、CD3、又はに由来する前記第2の細胞外ドメインとは、第2のリンカー、例えば本明細書に記載のリンカー（例えば、(GGGS)_nリンカー（配列番号68）又は(GGGS)_nリンカー（配列番号69）（式中、nは、0～10の整数であり、例えば、nは、4に等しい）によって結合されている。或いは、当技術分野において既知であるように、剛直なリンカー（例えば、プロリンリッチリンカー）が使用され得る。

【0420】

実施形態では、系の2つのキメラ膜タンパク質の1つのみが、細胞内共刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の細胞内共刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。実施形態では、前記キメラ膜タンパク質は、1つのみの細胞内共刺激ドメインからなる。他の実施形態では、前記膜タンパク質は、2つ以上の（例えば、2つの）細胞内シグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態では、両方の第1のキメラ膜タンパク質及び第2のキメラ膜タンパク質は、それぞれCD3、又は以外のタンパク質に由来する細胞内共刺激ドメインを含む。実施形態では、細胞内共刺激ドメインは、同一のものである（例えば、両方が4-1BB共刺激ドメインである）。他の実施形態では、これらは、異なる（例えば、一方が4-1BB共刺激ドメインであり、他方がCD28共刺激ドメインである）。これらの共刺激ドメインは、本明細書に記載の共刺激ドメインから選択される。実施形態では、共刺激ドメインは、膜貫通ドメインに直接隣接して（例えば、C末端の直近に）配置される。他の実施形態では、共刺激ドメインは、CD3、又はドメインの細胞内部分に対して、例えばCD3、若しくはの細胞内部分全体又はCD3、若しくは切断部分に対してC末端に配置される。

【0421】

実施形態では、抗原結合ドメインは、本明細書に記載される通りである。実施形態では、1つ以上の抗原結合ドメインは、抗体又は抗体様分子である。実施形態では、抗原結合ドメインの1つ以上（例えば、系に存在する抗原結合ドメインのそれぞれ）は、scFvである。実施形態では、両方の第1及び第2の抗原結合ドメインは、腫瘍抗原に結合する。実施形態では、両方の第1及び第2の抗原結合ドメインは、B-細胞抗原（例えば、本明細書に記載されるような）に結合する。好ましい実施形態では、B-細胞抗原は、CD19及びCD20、CD20及びCD22又はCD19及びCD22である。他の実施形態では、1つの抗原結合ドメインは、B-細胞抗原（例えば、本明細書に記載されるような）、例えばCD19、CD20又はCD22に結合し、他方は、固形腫瘍抗原（例えば、本明細書に記載されるような）、例えばメソテリン又はEGFRVIIIに結合する。

【0422】

実施形態では、キメラ膜タンパク質の1つ以上は、2つ以上、例えば2つの抗原結合ドメインを含む。例として、このような抗原結合ドメインは、任意選択によりそれらの間に配置されたリンカーを伴うタンデムscFv抗原結合ドメインとして表示され得る。このようなタンデムscFv配置は、図41に示されている。

10

20

30

40

50

【 0 4 2 3 】

本明細書に企図される系を用いて組み立てられた T C R の特定の例は、図 4 2、図 4 3、図 4 4、図 4 5 又は図 4 6 に示されている。

【 0 4 2 4 】

実施形態では、本発明のキメラ膜タンパク質の 1 つ以上の天然の相同体（例えば、天然の C D 3 、又は 相同体）の発現を低減又は排除することが有益であり得る。従って、本発明は、本明細書に記載の系を含む細胞を提供し、この細胞は、系がタンパク質のキメラ変形を含む場合の低減又は排除された内因性 C D 3 、及び / 又は タンパク質の発現をさらに有する。従って、例えば、実施形態において系が C D 3 の細胞外ドメインのすべて又は一部を含む第 1 のキメラ膜タンパク質と、 C D 3 の細胞外ドメインのすべて又は一部を含む第 2 のキメラ膜タンパク質とを含む場合、前記系を含む細胞も、低減又は排除された内因性 C D 3 及び / 又は C D 3 の発現を有する。理論に束縛されるものではないが、キメラ膜タンパク質の内因性対応物のこのような低減又は排除された発現は、キメラタンパク質による T C R 形成を好み、系の 1 つのみのキメラ膜タンパク質によるか又はキメラ膜タンパク質を含まずに形成される細胞表面上の T C R を低減又は排除することになると考えられる。このような T C R の 1 つ以上の内因性構成要素の発現を低減又は排除するのに有用な分子及び系としては、 s i R N A 、 s h R N A 及び本明細書に記載の遺伝子編集（例えば、 C R I S P R 、 T A L E N 及び Z F N 遺伝子編集）系が挙げられる。

【 0 4 2 5 】

【表4】

表2. 例示的な配列

配列番号	コメント	配列
77	例示的なヒト CD3 ε(P07766) (ECD:下線部;膜貫通: 太字)	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQ <u>HNDKNIGGDEDDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYV</u> CYPRGSKP E ANFYLYLRARVCENC M EDVMSVATI VIVDICITGGLLLVYYWSKRNKAKAKPVTRGAGAG GRQRGQNKERPPVPNP D YEP I RKGQRDLYSGLNQRRI
78	例示的なヒト CD3 ε ECD	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQ HNDKNIGGDED D DKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYV CYPRGSKP E ANFYLYLRARVCENC M EMD
79	例示的なヒト CD3 ε 膜貫通ドメイン	VMSVATIV I VDICITGGLLL V YYWS
80	例示的なヒト CD3 ε ECD 及び 膜貫通ドメイン	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQ HNDKNIGGDED D DKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYV CYPRGSKP E ANFYLYLRARVCENC M EDVMSVATIV IVDICITGGLLL V YYWS
81	例示的な CD3 ε ECD TM-41BB	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQ HNDKNIGGDED D DKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYV CYPRGSKP E ANFYLYLRARVCENC M EDVMSVATIV IVDICITGGLLL V YYWS K RGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
82	例示的なヒト CD3 δ (P04234)(ECD: 下線部;膜貫通:太字)	FKIPIEELED R FVNCNTSITWVEGTVGTL L SDITRLDL <u>GKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCV</u> ELDPATVAG I H T VDVIAT L LLALGVFCFAGHETGRLSG AADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARN K
83	例示的なヒト CD3 δ ECD	FKIPIEELED R FVNCNTSITWVEGTVGTL L SDITRLDL GKRILDPRGIYRCNGTDIY K DKESTVQVHYRMCQSCV ELDPATVA
84	例示的なヒト CD3 δ 膜貫通 ドメイン	GIIVTDVIAT L LLALGVFCFA
85	例示的なヒト CD3 δ ECD 及び 膜貫通ドメイン	FKIPIEELED R FVNCNTSITWVEGTVGTL L SDITRLDL GKRILDPRGIYRCNGTDIY K DKESTVQVHYRMCQSCV ELDPATVAG I IIVTDVIAT L LLALGVFCFA
86	例示的な CD3 δ ECD TM-41BB	FKIPIEELED R FVNCNTSITWVEGTVGTL L SDITRLDL GKRILDPRGIYRCNGTDIY K DKESTVQVHYRMCQSCV ELDPATVAG I IIVTDVIAT L LLALGVFCFA K RGRKKLLYI FKQPFMRPV Q TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

10

20

30

【0426】

【表5】

配列番号 87	例示的なヒト CD3 γ (P09693(ECD: 下線部; 膜貫通: 太字))	<u>QSIKGHNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDG</u> <u>KMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKS</u> <u>KPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVG</u> <u>VYFIAGQDGVRQSRASDKQTLLPNQDLYQPLKDRED</u> <u>DQYSHLQGNQLRRN</u>
配列番号 88	例示的なヒト CD3 γ ECD	QSIKGHNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDG KMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKS KPLQVYYRMCQNCIELNAATIS
配列番号 89	例示的なヒト CD3 γ 膜貫通ドメイン	GFLFAEIVSIFVLAVGVYFIA
配列番号 90	例示的なヒト CD3 γ ECD 及び 膜貫通ドメイン	QSIKGHNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDG KMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKS KPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGV YFIA
配列番号 91	例示的なCD3 γ ECD TM-41BB	QSIKGHNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDG KMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKS KPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGV YFIAKGRKRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEggcel
配列番号 70	CD19scFv-G4S- CD3eECDTM-41BB (リンカー:下線部)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTI SKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYYGGSY AMDYWGQGTLTVTSS <u>GGGGSDGNEEMGGITQTPYKV</u> SISGTTVILTCPQYPGEIWLQHNDKNIGGDEDDKNIGS DEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYL RARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYW SKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
配列番号 71	CD19scFv-G4S- CD3dECDTM- 41BB(リンカー:下線部)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTI SKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYYGGSY AMDYWGQGTLTVTSS <u>GGGGSFKIPIEELEDRVFVNCNT</u> TSITWVEGTVGTLSSITRLDLGKRILDPRGIYRCNGT DIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIA TLLALGVFCFAKGRKRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEggcel
配列番号 72	CD19scFv-G4S- CD3gECDTM- 41BB(リンカー:下線部)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTI SKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYYGGSY AMDYWGQGTLTVTSS <u>GGGGSQSIKGHNHLVKVYDYQE</u> DGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMICFLTEDKKKWNL GSNAKDPRGMYQCKGSQNKSPLQVYYRMCQNCIEL NAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAKGRKRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEggcel

10

20

30

40

【0427】

【表6】

配列番号 73	CD22-65scFv-G4S- CD3eECDTM- 41BB(リンカー:下線部)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLSNSDTWN WIRQSPSRGLEWLGR T YHRSTWYDDYASSVRGRVSIN VDTSKNQYSLQLNAVTPE <u>D</u> TGVYYCARVRLQDGNSW SDAFDVWGQGTMTVSSGGGGSGGGGS GGG SQSA LTQPASASGP <u>G</u> QSVTISCTGTSSDVGGYNVSWYQQ HPGKAPKLM I YDVSNRPSGVSNRFS <u>G</u> SKSGNTASLTIS GLQAEDEA <u>D</u> YYCSSY <u>T</u> SSSTLYVFGTGTQLTV <u>L</u> GGGG <u>S</u> QDGNEEMGGITQTPYKVSI <u>G</u> TTVILTCPQYP <u>G</u> SEILW QHNDKNIGGDED <u>D</u> DKNIGSDE <u>H</u> LSLKEFSELE <u>Q</u> SGYY VCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATI VIVDICITG G LLL V YYWSKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QT T QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
配列番号 74	CD22-65scFv-2G4S- CD3eECDTM- 41BB(リンカー:下線部)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLSNSDTWN WIRQSPSRGLEWLGR T YHRSTWYDDYASSVRGRVSIN VDTSKNQYSLQLNAVTPE <u>D</u> TGVYYCARVRLQDGNSW SDAFDVWGQGTMTVSSGGGGSGGGGS GGG SQSA LTQPASASGP <u>G</u> QSVTISCTGTSSDVGGYNVSWYQQ HPGKAPKLM I YDVSNRPSGVSNRFS <u>G</u> SKSGNTASLTIS GLQAEDEA <u>D</u> YYCSSY <u>T</u> SSSTLYVFGTGTQLTV <u>L</u> GGGG <u>S</u> GGGGSQDGNEEMGGITQTPYKVSI <u>G</u> TTVILTCPQYP GSEILWQHNDKNIGGDED <u>D</u> DKNIGSDE <u>H</u> LSLKEFSELE QSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDV MSVATIVIVDICITG G LLL V YYWSKRGRKKLLYIFKQ P FMRPVQT T QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
配列番号 75	CD22-65scFv-G4S- CD3gECDTM- 41BB(リンカー:下線部)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLSNSDTWN WIRQSPSRGLEWLGR T YHRSTWYDDYASSVRGRVSIN VDTSKNQYSLQLNAVTPE <u>D</u> TGVYYCARVRLQDGNSW SDAFDVWGQGTMTVSSGGGGSGGGGS GGG SQSA LTQPASASGP <u>G</u> QSVTISCTGTSSDVGGYNVSWYQQ HPGKAPKLM I YDVSNRPSGVSNRFS <u>G</u> SKSGNTASLTIS GLQAEDEA <u>D</u> YYCSSY <u>T</u> SSSTLYVFGTGTQLTV <u>L</u> GGGG <u>S</u> QSIKGHN L V K V D YQEDGSVLLTCDAEAKN I TWFKD GKMIGFLTEDKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQN K SKPLQVYYRCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVG VYFIAKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT T QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
配列番号 76	CD22-65scFv-2G4S- CD3gECDTM- 41BB(リンカー:下線部)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSMLSNSDTWN WIRQSPSRGLEWLGR T YHRSTWYDDYASSVRGRVSIN VDTSKNQYSLQLNAVTPE <u>D</u> TGVYYCARVRLQDGNSW SDAFDVWGQGTMTVSSGGGGSGGGGS GGG SQSA LTQPASASGP <u>G</u> QSVTISCTGTSSDVGGYNVSWYQQ HPGKAPKLM I YDVSNRPSGVSNRFS <u>G</u> SKSGNTASLTIS GLQAEDEA <u>D</u> YYCSSY <u>T</u> SSSTLYVFGTGTQLTV <u>L</u> GGGG <u>S</u> GGGGSQSIKGHN L V K V D YQEDGSVLLTCDAEAKN I TWFKDGKMI G FLTEDKKWNLGSNAKDPRGMYQCK GSQNKS K PLQVYYRCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIF VLAVG V YFI A KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT T QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

10

20

30

40

【0428】

C A R をコードする核酸構築物

本発明は、本明細書に記載の1つ以上のキメラタンパク質構築物をコードする核酸分子も提供する。一態様では、この核酸分子は、メッセンジャーRNA転写物として提供される。一態様では、この核酸分子は、DNA構築物として提供される。

【0429】

所望の分子をコードする核酸配列は、例えば、標準的技術を使用して、遺伝子を発現す

50

る細胞からライプラリをスクリーニングすることによって、遺伝子を、それを含むことが知られているベクターから誘導することによって、又は遺伝子を含有する細胞及び組織から直接単離することによってなど、当技術分野において既知の組換え法を使用して得ることができる。或いは、目的の遺伝子は、クローニングよりむしろ合成的に生成することができる。

【0430】

本発明は、本発明のDNAが挿入されている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から誘導されるベクターは、これらが導入遺伝子の長期の安定した組み込み及び娘細胞中のその増殖を可能にするために、長期の遺伝子移入を達成するのに適切なツールである。レンチウイルスベクターは、これらが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に由来するベクターを超える追加の利点を有する。これらは、低免疫原性という追加の利点も有する。レトロウイルスベクターは、例えば、レトロウイルスベクターであり得る。

レトロウイルスベクターは、例えば、プロモーター、パッケージングシグナル()、プライマー結合部位(PBS)、1つ以上の(例えば、2つの)長い末端反復LTR及び目的の導入遺伝子、例えばキメラタンパク質をコードする遺伝子を含み得る。レトロウイルスベクターは、gag、pol及びenvなどのウイルス構造遺伝子を欠如し得る。例示的なレトロウイルスベクターとしては、ネズミ白血病ウイルス(MLV)、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)及び骨髄増殖性肉腫ウイルス(MPSV)並びにこれらから誘導されたベクターが挙げられる。他のレトロウイルスは、例えば、Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vector: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6):677-713に記載されている。

【0431】

別の実施形態では、本発明の所望のCAR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(A5/35)である。別の実施形態では、キメラタンパク質をコードする核酸の発現は、スリーピングビューティー(sleeping beauty)、crysper、CAS9及び亜鉛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。以下のJune et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10:704-716(参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

【0432】

細胞の供給源

増殖及び遺伝子改変又は他の改変に先立って、細胞、例えばT細胞又はナチュラルキラー(NK)細胞の供給源を対象から得ることができる。「対象」という用語は、免疫応答が誘発され得る生存生物(例えば、哺乳動物)を含むように意図される。対象の例としては、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、マウス、ラット及びこ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、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸膜滲出液、脾臓組織及び腫瘍を含む多数の供給源から得ることができる。

【0433】

本発明の特定の態様において、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞を、Ficoll(商標)分離など、当業者に知られるあらゆる技術を使用して、対象から採取した血液の単位から得ることができる。ある好ましい態様において、個体の循環血液からの細胞をアフェレーシスにより得る。アフェレーシス産物は、典型的にはT細胞、单球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含むリンパ球、赤血球及び血小板を含む。一態様において、アフェレーシスにより採取した細胞は、血漿画分を除去するために洗浄し、任意選択により細胞を続くプロセシング過程のために適切な緩衝液又は媒体に入れる。本発明の一態様において、細胞をリン酸緩衝化食塩水(PBS)で洗浄する。別の実施形態において、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、又は全てではないにしても多くの

10

20

30

30

40

50

二価カチオンを欠き得る。

【0434】

カルシウム非存在下の初期活性化過程は、活性化の増強に至り得る。当業者に容易に認識されるように、洗浄工程は、製造業者の指示に従う半自動化「フロースルー」遠心分離（例えば、Cobe 2991 cell processor、Baxter Cyt oMate又はHaemonetics Cell Saver 5）により達成され得る。洗浄後、細胞を、例えば無Ca、無Mg PBS、PlasmaLyte A又は他の緩衝剤を含む又は含まない食塩水溶液など、多様な生体適合性緩衝液に再懸濁し得る。代わりに、アフェレーシス試料の望ましくない要素を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁し得る。

10

【0435】

本出願の方法は、5%以下、例えば2%の、ヒトAB血清を含む培養培地条件を利用して、既知培養培地条件及び組成物、例えばSmith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31に記載のものを用い得ることが認識される。

20

【0436】

一態様において、T細胞は、赤血球を溶解し、例えばPERCOLL（商標）勾配による遠心分離又は向流遠心溶出法により単球を枯渇させることにより、末梢血リンパ球から単離する。

【0437】

本明細書に記載の方法は、例えば、本明細書に記載される、例えば陰性選択技術を使用する、例えばT制御性細胞枯渇集団、CD25+枯渇細胞である、免疫エフェクター細胞の特異的亜集団、例えばT細胞の選択を含み得る。好ましくは、T制御性枯渇細胞集団は、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満のCD25+細胞を含む。

30

【0438】

一実施形態において、T制御性細胞、例えばCD25+T細胞を、抗CD25抗体又はそのフラグメント又はCD25結合リガンド、IL-2を使用して集団から除去する。一実施形態において、抗CD25抗体又はそのフラグメント又はCD25結合リガンドを基質、例えばビーズにコンジュゲートするか又は他に基質、例えばビーズ上に被覆させる。一実施形態において、抗CD25抗体又はそのフラグメントを本明細書に記載の基質にコンジュゲートさせる。

【0439】

一実施形態において、T制御性細胞、例えばCD25+T細胞を、Miltenyi（商標）からのCD25枯渇剤を使用して集団から除去する。一実施形態において、細胞対CD25枯渇剤の比は、1e7細胞対20μL、又は1e7細胞対15μL、又は1e7細胞対10μL、又は1e7細胞対5μL、又は1e7細胞対2.5μL、又は1e7細胞対1.25μLである。一実施形態において、例えばT制御性細胞、例えばCD25+枯渇のために5億細胞/mLを使用する。さらなる態様において、6億、7億、8億又は9億細胞/mLの細胞濃度を使用する。

40

【0440】

一実施形態において、枯渇すべき免疫エフェクター細胞集団は、約 6×10^9 CD25+T細胞を含む。他の態様において、枯渇すべき免疫エフェクター細胞集団は、約 1×10^9 ~ 1×10^{10} （及びその間の任意の整数値）CD25+T細胞を含む。一実施形態において、得られたT制御性枯渇細胞集団は、 2×10^9 T制御性細胞、例えばCD25+細胞又はそれ未満（例えば、 1×10^9 、 5×10^8 、 1×10^8 、 5×10^7 、 $1 \times$

50

10^7 又はそれ未満の CD25+ 細胞) を含む。

【0441】

一実施形態において、T 制御性細胞、例えば CD25+ 細胞を、例えばチューピング 162-01 など、枯渇チューピングセットと共に Clinimac 系を使用して集団から除去する。一実施形態において、Clinimac 系を例えば DEPLETION 2.1 などの枯渇設定において動かす。

【0442】

特定の理論に拘束されることを望まないが、アフェレーシス前又はキメラタンパク質発現細胞産物の製造中の対象における免疫細胞の負のレギュレーターのレベルの減少(例えば、望まない免疫細胞、例えば T_{REG} 細胞の数の減少)は、対象の再発リスクを減らし得る。例えば、T_{REG} 細胞を枯渇する方法は、当技術分野で知られている。例えば、T_{REG} 細胞を減少させる方法は、シクロホスファミド、抗 GITR 抗体(抗 GITR 本明細書に記載の抗体)、CD25 枯渇及びそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

10

【0443】

一部の実施形態において、製造方法は、キメラタンパク質発現細胞製造前の T_{REG} 細胞の数の減少(例えば、枯渇)を含む。例えば、製造方法は、例えば、試料、例えばアフェレーシス試料を抗 GITR 抗体及び/又は抗 CD25 抗体(又はそのフラグメント又は CD25 結合リガンド)と接触させ、キメラタンパク質発現細胞(例えば、T 細胞、NK 細胞)産物の製造前に T_{REG} 細胞を枯渇させることを含む。

20

【0444】

一実施形態において、対象は、細胞採取前に T_{REG} 細胞を減らす 1 つ以上の治療で前処置されており、それにより対象が細胞処置を再び必要とするリスクを軽減する。一実施形態において、T_{REG} 細胞を低減する方法は、対象へのシクロホスファミド、抗 GITR 抗体、CD25 枯渇又はこれらの組み合わせの 1 つ以上の投与を含むが、これらに限定されない。シクロホスファミド、抗 GITR 抗体、CD25 枯渇又はこれらの組み合わせの 1 つ以上の投与は、細胞産物注入前、注入中又は注入後に行われ得る。

【0445】

一実施形態において、除去すべき細胞集団は、制御性 T 細胞又は腫瘍細胞ではなく、細胞の増殖及び/又は機能に他に負に影響する細胞、例えば CD14、CD11b、CD33、CD15 又は潜在的免疫抑制性細胞により発現される他のマーカーを発現する細胞である。一実施形態において、このような細胞は、制御性 T 細胞及び/又は腫瘍細胞と同時に、又は前記枯渇後に、又は別の順番で除去することが意図される。

30

【0446】

本明細書に記載の方法は、2 つ以上の選択工程、例えば 2 つ以上の枯渇工程を含み得る。陰性選択による T 細胞集団の富化は、例えば、陰性に選択される細胞に独特な表面マーカーを指向する抗体の組み合わせにより達成できる。1 つの方法は、陰性に選択される細胞に存在する細胞表面マーカーを指向するモノクローナル抗体のカクテルを使用する陰性磁気免疫粘着又はフローサイトメトリーによる細胞選別及び/又は選択である。例えば、陰性選択により CD4+ 細胞を富化するために、モノクローナル抗体カクテルは、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR 及び CD8 に対する抗体を含み得る。

40

【0447】

本明細書に記載の方法は、腫瘍抗原、例えば CD25 を含まない腫瘍抗原、例えば CD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14 又は CD11b を発現する細胞集団からの除去をさらに含み、それによりキメラタンパク質の発現に適する T 制御性枯渇、例えば CD25+ 枯渇及び腫瘍抗原枯渇細胞集団を提供する。一実施形態において、腫瘍抗原発現細胞は、T 制御性、例えば CD25+ 細胞と同時に除去される。例えば、抗 CD25 抗体又はそのフラグメント及び抗腫瘍抗原抗体又はそのフラグメントと同じ基質、例えばビーズに結合でき、これを細胞の除去に使用でき、又は抗 CD25 抗体又はそ

50

のフラグメント及び抗腫瘍抗原抗体又はそのフラグメントを別のビーズに結合でき、その混合物を細胞の除去に使用できる。他の実施形態において、T制御性細胞、例えばCD25+細胞の除去及び腫瘍抗原発現細胞の除去は、逐次的であり、例えばいずれの順番でも生じ得る。

【0448】

チェックポイント阻害剤、例えば本明細書に記載のチェックポイント阻害剤を発現する細胞、例えばPD1+細胞、LAG3+細胞及びTIM3+細胞の1つ以上の集団からの除去を含み、それによりT制御性枯渇、例えばCD25+枯渇細胞及びチェックポイント阻害剤枯渇細胞、例えばPD1+、LAG3+及び/又はTIM3+枯渇細胞集団を提供する方法も提供される。例示的なチェックポイント阻害剤は、B7-H1、B7-1、CD160、P1H、2B4、PD1、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5)、LAG3、TIGIT、CTLA-4、BTLA及びLAIR1を含む。一実施形態において、チェックポイント阻害剤発現細胞は、T制御性、例えばCD25+細胞と同時に除去される。例えば、抗CD25抗体又はそのフラグメント及び抗チェックポイント阻害剤抗体又はそのフラグメントを同じビーズに結合でき、それを細胞の除去に使用でき、又は抗CD25抗体又はそのフラグメント及び抗チェックポイント阻害剤抗体又はそのフラグメントを別のビーズに結合でき、その混合物を細胞の除去に使用できる。他の実施形態において、T制御性細胞、例えばCD25+細胞の除去及びチェックポイント阻害剤発現細胞の除去は、逐次的であり、例えばいずれ順序の順番でも生じ得る。

10

20

30

【0449】

本明細書に記載の方法は、陽性選択工程を含み得る。例えば、T細胞を、所望のT細胞の陽性選択に十分な時間にわたり、DYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 Tなどの抗CD3/抗CD28(例えば、3×28)コンジュゲートビーズとインキュベーションすることにより単離することができる。一実施形態において、時間は、約30分である。さらなる実施形態において、時間は、30分~36時間又はそれより長い範囲及びその間の任意の整数値である。さらなる実施形態において、時間は、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間又は6時間である。さらに別の実施形態において、時間は、10~24時間、例えば24時間である。腫瘍組織又は免疫不全状態個体から腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)を単離するような、他の細胞型と比較してT細胞が少ないあらゆる状況において、T細胞を単離するために長いインキュベーション時間が使用され得る。さらに、長いインキュベーション時間の使用は、CD8+T細胞の捕獲効率を高め得る。そのため、単にT細胞をCD3/CD28ビーズと結合させる時間を短くするか若しくは長くし、及び/又はビーズ対T細胞比を増加若しくは減少させる(さらに本明細書に記載のとおり)ことにより、T細胞の亜集団は、培養開始時のために若しくはそれに対して又は過程中の他の時点で優先的に選択され得る。さらに、ビーズ又は他の表面上の抗CD3及び/又は抗CD28抗体比を増加又は減少させることにより、T細胞の亜集団は、培養開始時のために若しくはそれに対して又は他の所望の時点で優先的に選択され得る。

40

【0450】

一実施形態において、IFN-、TNF、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムB及びパーフォリン又は他の適切な分子、例えば他のサイトカインの1つ以上を発現するT細胞集団を選択できる。細胞発現についてスクリーニングする方法は、例えば、国際公開第2013/126712号パンフレットに記載する方法により決定できる。

【0451】

陽性又は陰性選択により所望の細胞集団を単離するために、細胞及び表面(例えば、ビーズなどの粒子)の濃度は、変わり得る。一態様において、細胞とビーズとの最大接触を確実にするために、ビーズと細胞とを一緒に混合する体積を有意に低下させる(例えば、細胞濃度を増加させる)ことが望まれ得る。例えば、一態様において、100億細胞/m

50

1、90億細胞 / m¹、80億細胞 / m¹、70億細胞 / m¹、60億細胞 / m¹又は50億細胞 / m¹の濃度を使用する。一態様において、10億細胞 / m¹の濃度を使用する。さらなる態様において、細胞の7500万、8000万、8500万、9000万、9500万又は1億細胞 / m¹の濃度を使用する。さらなる態様において、1億2500万又は1億5000万細胞 / m¹の濃度を使用できる。

【0452】

高濃度を使用して細胞収率、細胞活性化及び細胞増殖を増加できる。さらに、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの目的的標的抗原を弱く発現し得る細胞の、又は多くの腫瘍細胞が存在する試料（例えば、白血病性血液、腫瘍組織など）からのより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞集団は、治療的価値を有し得、取得することが望ましい。例えば、高濃度細胞の使用は、通常CD28発現が弱いCD8+T細胞のより効率的な選択を可能にする。

10

【0453】

関連する態様において、低濃度の細胞を使用することが望ましいことがある。T細胞と表面（例えば、ビーズなどの粒子）との混合物を有意に希釈することにより、粒子と細胞との相互作用が最小化される。これは、粒子に結合する所望の抗原を高量で発現する細胞で選択する。例えば、CD4+T細胞は、高レベルのCD28を発現し、希釈濃度でCD8+T細胞より効率的に捕獲される。一態様において、使用する細胞の濃度は5×10⁶/m¹である。他の態様において、使用する濃度は約1×10⁵/m¹～1×10⁶/m¹及びその間の任意の整数値であり得る。

20

【0454】

他の態様において、細胞を、種々の長さの時間、種々の速度で2～10又は室温においてロータリーフレーバーでインキュベートし得る。

【0455】

刺激のためのT細胞はまた、洗浄工程後凍結させ得る。理論に拘束されることを望まないが、凍結と続く解凍工程は、細胞集団から顆粒球及びある程度単球を除去することにより、より均一な産物を提供する。血漿及び血小板を除去する洗浄工程後、細胞を凍結溶液に懸濁し得る。多くの凍結溶液及びパラメータが当技術分野で知られ、これに関連して有用であるが、ある方法は、20%DMSO及び8%ヒト血清アルブミンを含むPBS又は10%Dextran 40及び5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミン及び7.5%DMSO又は31.25%Plasmalyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45%NaCl、10%Dextran 40及び5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミン及び7.5%DMSOを含む培養培地、又は例えばHespan及びPlasmalyte Aを含む他の適当な細胞凍結媒体を使用し、次いで細胞を1°/分の速度で-80に凍結し、気相の液体窒素貯蔵タンクに保存する。制御凍結の他の方法並びに直接-20又は液体窒素の非制御凍結も使用できる。

30

【0456】

特定の態様において、凍結保存細胞を本明細書に記載のように解凍し、洗浄し、本発明の方法を使用する活性化前に室温で1時間休息させる。

40

【0457】

本発明に関連して、本明細書に記載の増殖細胞が必要となり得る時点の前の期間における対象からの血液試料又はアフェレーシス産物の収集も企図されている。従って、増殖する細胞の供給源を必要な任意の時点で採取でき、T細胞などの所望の細胞を、本明細書に記載のものなどの免疫エフェクター細胞療法からの利益があるであろう任意の数の疾患及び状態について、免疫エフェクター細胞治療におけるその後の使用のために単離及び凍結できる。一態様において、血液試料又はアフェレーシスを一般に健常対象から採取する。一態様において、血液試料又はアフェレーシスを、一般に、疾患を発症するリスクにあるが、依然として疾患を発症していない健常対象から採取し、目的の細胞をその後の使用のために単離及び凍結する。一態様において、T細胞をその後の時点で増殖、凍結及び使用し得る。一態様において、試料を、本明細書に記載の特定の疾患の診断の直後に、しかし

50

、何らかの処置前に患者から採取する。さらなる態様において、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法剤、放射線、シクロスボリン、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、CAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスボリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228及び照射などの抗体又は他の免疫除去剤による処置を含むが、これらに限定されない、任意の数の関連する処置モダリティの前に対象からの血液試料又はアフェレーシスから細胞を単離する。

【0458】

本発明のさらなる態様において、T細胞を、対象に機能的T細胞を残す処置後、患者から直接得る。ある癌処置、特に免疫系を損傷させる薬物での処置後、処置の直後、患者が、通常、その処置から回復するまでの間、得られるT細胞の品質がエクスピボで増殖する能力について最適であり得るか又は改善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使用するエクスピボ操作後、これらの細胞は、生着及びインビボ増殖増強について好ましい状態であり得る。そのため、本発明に関連して、T細胞、樹状細胞又は造血細胞系統の他の細胞を含む血液細胞をこの回復期に採取することが企図される。さらに、一態様において、可動化（例えば、GM-CSFでの可動化）及びコンディショニングレジメンを使用して、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生及び/又は増殖に好都合である条件を、特に治療後の定められた時間枠中に対象に形成できる。細胞型の例は、T細胞、B細胞、樹状細胞及び免疫系の他の細胞を含む。

【0459】

一実施形態において、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する免疫エフェクター細胞は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤を受けた対象から得る。一実施形態において、CARを発現するように操作される免疫エフェクター細胞集団、例えばT細胞を、対象又は対象から採取したPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞のレベル又はPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比が少なくとも一過性に増加するように、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤の投薬から十分な時間後又は十分な用量の後に採取する。

【0460】

他の実施形態において、免疫エフェクター細胞の集団を、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の数を増やすか又はPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比を増やす量のmTOR阻害剤と接触させることにより、エクスピボで処理できる。

【0461】

一実施形態において、T細胞集団は、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)欠損である。DGK欠損細胞は、DGK RNA又はタンパク質を発現しないか、又はDGK活性が低下した又は阻害された細胞である。DGK欠損細胞は、DGK発現を低減又は阻止するための遺伝的方法、例えばRNA干渉剤、例えばsiRNA、shRNA、miRNAの投与により産生できる。代わりに、DGK欠損細胞は、本明細書に記載のDGK阻害剤での処置により産生できる。

【0462】

一実施形態において、T細胞集団は、イカロス欠損である。イカロス欠損細胞は、イカロスRNA又はタンパク質を発現しないか、又はイカロス活性が低下した又は阻害された細胞を含み、イカロス欠損細胞は、イカロス発現を低減又は阻止するための遺伝的方法、例えばRNA干渉剤、例えばsiRNA、shRNA、miRNAの投与により産生できる。代わりに、イカロス欠損細胞は、イカロス阻害剤、例えばレナリドマイドでの処置により産生できる。

【0463】

実施形態において、T細胞集団は、DGK欠損及びイカロス欠損であり、例えばDGK及びイカロスを発現せず、又はDGK及びイカロス活性が低下又は阻害されている。このようなDGK及びイカロス欠損細胞は、本明細書に記載の方法のいずれかにより産生でき

10

20

30

40

50

る。

【0464】

一実施形態において、NK細胞を対象から得る。別の実施形態において、NK細胞は、NK細胞株、例えばNK-92細胞株(Conkwest)である。

【0465】

同種細胞

本明細書に記載の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、同種免疫エフェクター細胞、例えばT細胞又はNK細胞であり得る。例えば、細胞は、同種T細胞、例えば機能的T細胞受容体(TCR)及び/又はヒト白血球抗原(HLA)、例えばHLAクラスI及び/又はHLAクラスIIの発現を欠く同種T細胞である。

10

【0466】

機能的TCRを欠くT細胞は、例えば、その表面に何ら機能的TCRを発現しないように操作され、機能的TCRを含む1つ以上のサブユニットを発現しないように操作され、又はその表面に微少の機能的TCRを產生するように操作され得る。代わりに、T細胞は、例えば、TCRのサブユニットの1つ以上の変異した又は切断型の発現により、実質的に障害されたTCRを発現し得る。用語「実質的に障害されたTCR」は、このTCRが宿主で有害な免疫反応を惹起しないことを意味する。

【0467】

本明細書に記載のT細胞は、例えば、その表面に機能的HLAを発現しないように操作され得る。例えば、本明細書に記載のT細胞は、細胞表面発現HLA、例えばHLAクラスI及び/又はHLAクラスIIが下方制御されるように操作され得る。

20

【0468】

一部の実施形態において、T細胞は、機能的TCR及び機能的HLA、例えばHLAクラスI及び/又はHLAクラスIIを欠き得る。

【0469】

機能的TCR及び/又はHLAの発現を欠く修飾T細胞は、TCR又はHLAの1つ以上のサブユニットのノックアウト又はノックダウンを含む任意の適当な手段により得ることができる。例えば、T細胞は、siRNA、shRNA、群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)転写アクティベータ様エフェクタースクレアーゼ(TALEN)又は亜鉛フィンガーエンドスクレアーゼ(ZFN)を使用したTCR及び/又はHLAのノックダウンを含み得る。

30

【0470】

一部の実施形態において、同種細胞は、例えば、本明細書に記載の方法のいずれかにより、阻害性分子を発現しないか又は低レベルで発現する細胞であり得る。例えば、細胞は、阻害分子を発現しないか又は阻害分子を低レベルで発現する細胞であり得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3及び/又はCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4及びTGF β を含む。DNA、RNA又はタンパク質レベルでの阻害による阻害分子の阻害は、細胞性能を最適化できる。実施形態において、例えば本明細書に記載の阻害性核酸、例えば阻害性核酸、例えばdsRNA、例えばsiRNA又はshRNA、群生性等間隔短回文反復配列(CRISPR)、転写アクティベータ様エフェクタースクレアーゼ(TALEN)又は亜鉛フィンガーエンドスクレアーゼ(ZFN)を使用できる。

40

【0471】

TCR又はHLAを阻害するためのsiRNA及びshRNA

一部の実施形態において、TCR発現及び/又はHLA発現を、T細胞におけるTCR及び/又はHLAをコードする核酸を標的とするsiRNA又はshRNAを使用して阻害できる。

【0472】

T細胞中のsiRNA及びshRNAの発現は、例えば、レンチウイルス発現系などの

50

任意の従来の発現系を使用して達成することができる。

【0473】

T C R の構成要素の発現をダウンレギュレートする例示的な s h R N A は、例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 3 2 1 6 6 7 号明細書に記載されている。H L A クラス I 及び / 又は H L A クラス I I 遺伝子の発現をダウンレギュレートする例示的な s i R N A 及び s h R N A は、例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 3 6 7 7 3 号明細書に記載されている。

【0474】

T C R 又は H L A を阻害するための C R I S P R

本明細書で使用される場合、「C R I S P R」又は「T C R 及び / 又は H L A に対する C R I S P R」若しくは「T C R 及び / 又は H L A を阻害するための C R I S P R」は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートの組又はこのようなりピートの組を含む系を指す。本明細書で使用される場合、「C a s」は、C R I S P R 関連タンパク質を指す。「C R I S P R / C a s」系は、T C R 及び / 又は H L A 遺伝子を発現停止させるか又は変異させるために使用することができる、C R I S P R 及び C a s から誘導された系を指す。

【0475】

天然型 C R I S P R / C a s 系は、配列決定された真正細菌ゲノムのおよそ 4 0 % 及び配列決定された古細菌のおよそ 9 0 % で見出されている。G r i s s a e t a l . (2 0 0 7) B M C B i o i n f o r m a t i c s 8 : 1 7 2 。この系は、プラスミド及びファージなどの外来遺伝子エレメントに耐性を与えて、後天的免疫の一形態を提供する 1 種の原核生物免疫系である。B a r r a n g o u e t a l . (2 0 0 7) S c i e n c e 3 1 5 : 1 7 0 9 - 1 7 1 2 ; M a r r a g i n i e t a l . (2 0 0 8) S c i e n c e 3 2 2 : 1 8 4 3 - 1 8 4 5 。

【0476】

従って、C R I S P R / C a s 系は、T C R 及び / 又は H L A 遺伝子を編集する（塩基対を付加するか又は欠失させる）ために、或いは T C R 及び / 又は H L A の発現を結果として減少させる未成熟終止を導入するために使用することができる。或いは、C R I S P R / C a s 系は、R N A 干渉のように使用することができ、T C R 及び / 又は H L A 遺伝子を可逆的な方法で遮断する。例えば、哺乳動物細胞では、R N A は、C a s タンパク質を T C R 及び / 又は H L A プロモーターまで導き、R N A ポリメラーゼを立体的にプロックすることができる。

【0477】

当技術分野で知られる技術、例えば米国特許出願公開第 2 0 1 4 0 0 6 8 7 9 7 号明細書及び C o n g (2 0 1 3) S c i e n c e 3 3 9 : 8 1 9 - 8 2 3 に記載のものを使用して、T C R 及び / 又は H L A を阻害する人工 C R I S P R / C a s 系を產生できる。例えば、T s a i (2 0 1 4) N a t u r e B i o t e c h n o l . , 3 2 : 6 5 6 9 - 5 7 6 、米国特許第 8 , 8 7 1 , 4 4 5 号明細書；同第 8 , 8 6 5 , 4 0 6 号明細書；同第 8 , 7 9 5 , 9 6 5 号明細書；同第 8 , 7 7 1 , 9 4 5 号明細書；及び同第 8 , 6 9 7 , 3 5 9 号明細書に記載されるもののような、T C R 及び / 又は H L A を阻害する当技術分野で知られる他の人工 C R I S P R / C a s 系も產生できる。

【0478】

T C R 及び / 又は H L A を阻害するための T A L E N

「T A L E N」、又は「H L A 及び / 又は T C R に対する T A L E N」、又は「H L A 及び / 又は T C R を阻害するための T A L E N」は、H L A 及び / 又は T C R 遺伝子の編集に使用できる人工ヌクレアーゼである転写アクティベータ様エフェクターヌクレアーゼを指す。

【0479】

H L A 及び / 又は T C R を阻害するための亜鉛フィンガーヌクレアーゼ

「Z F N」、又は「亜鉛フィンガーヌクレアーゼ」、又は「H L A 及び / 又は T C R に

10

20

30

40

50

対するZFN」、又は「HLA及び／又はTCRを阻害するためのZFN」は、HLA及び／又はTCR遺伝子の編集に使用できる人工ヌクレアーゼである亜鉛フィンガーヌクレアーゼを指す。

【0480】

TALENと同様に、ZFNは、DNA結合ドメインに融合したFok Iヌクレアーゼドメイン（又はその誘導体）を含む。ZFNの場合、DNA結合ドメインは、1つ以上の亜鉛フィンガーを含む。Carroll et al. (2011) Genetics Society of America 188: 773-782；及びKim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 1156-1160を参照されたい。10

【0481】

テロメラーゼ発現

何らかの特定の理論に拘束されることを望まないが、一実施形態において、治療的T細胞は、T細胞における短縮されたテロメアのために患者における残留性が短く、従って、テロメラーゼ遺伝子を用いるトランスフェクションは、T細胞のテロメアを延長し、患者におけるT細胞の残留性を改善し得る。Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117: 1466-1476 (2007)を参照されたい。そのため、一実施形態において、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞、異所性にテロメラーゼサブユニット、例えばテロメラーゼの触媒的サブユニット、例えばTERT、例えばhTERTを発現する。いくつかの態様において、本開示は、細胞をテロメラーゼサブユニット、例えばテロメラーゼの触媒的サブユニット、例えばTERT、例えばhTERTをコードする核酸と接触させることを含む、細胞を產生する方法を提供する。細胞を、キメラタンパク質をコードする構築物と接触させる前に、同時に又は後に核酸と接触させ得る。20

【0482】

免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の活性化及び増殖

T細胞などの免疫エフェクター細胞は、例えば、米国特許第6,352,694号明細書；同第6,534,055号明細書；同第6,905,680号明細書；同第6,692,964号明細書；同第5,858,358号明細書；同第6,887,466号明細書；同第6,905,681号明細書；同第7,144,575号明細書；同第7,067,318号明細書；同第7,172,869号明細書；同第7,232,566号明細書；同第7,175,843号明細書；同第5,883,223号明細書；同第6,905,874号明細書；同第6,797,514号明細書；同第6,867,041号明細書；及び米国特許出願公開第20060121005号明細書に記載する方法を使用して一般的に活性化及び増殖できる。30

【0483】

一般に、免疫エフェクター細胞、例えばT制御性細胞枯渇細胞の集団を、CD3/TCR複合体結合シグナルを刺激する薬剤が結合したその表面とT細胞の表面上の共刺激性分子を刺激するリガンドを接触させることにより増殖できる。特に、T細胞集団は、表面上に固定された抗CD3抗体若しくはその抗原結合フラグメント又は抗CD2抗体との接触又はカルシウムイオノフォアと組み合わせたタンパク質キナーゼCアクティベータ（例えば、ブリオスタチン）との接触により、本明細書に記載のように刺激し得る。T細胞表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子と結合するリガンドを使用する。例えば、T細胞集団を、T細胞の増殖刺激に適する条件下で抗CD3抗体及び抗CD28抗体と接触させ得る。CD4+T細胞又はCD8+T細胞の増殖を刺激するために、抗CD3抗体及び抗CD28抗体を使用できる。抗CD28抗体の例は、9.3、B-T3、XR-CD28を含み(Diagclone, Besancon, France)、当技術分野で一般に知られる他の方法のように使用できる(Berg et al., Transplant Proc. 30(8): 3975-3977, 1998; Haane40

n et al., J. Exp. Med. 190 (9) : 13191328, 1999;
 Garland et al., J. Immunol. Meth. 227 (1-2) : 5
 3-63, 1999).

【0484】

特定の態様において、T細胞のための一次刺激シグナル及び共刺激シグナルは、異なるプロトコルにより提供され得る。例えば、各シグナルを提供する薬剤は、溶液中でも表面と結合し得る。表面に結合しているとき、薬剤は、同じ表面（即ち「シス」形態）又は別の表面（即ち「rans」形態）に結合し得る。代わりに、一方の薬剤が表面に結合し、他方が溶液にあり得る。一態様において、共刺激シグナルを提供する薬剤は、細胞表面に結合し、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、溶液中であるか又は表面と結合する。一態様において、両剤は、溶液中にあり得る。一態様において、薬剤は、不溶性形態であり、Fc受容体又は抗体又は薬剤と結合する他の結合剤を発現する細胞などの表面に架橋され得る。この点に関して、例えば本発明におけるT細胞の活性化及び増殖のために意図される人工抗原提示細胞（aAPC）について、米国特許出願公開第20040101519号明細書及び同第20060034810号明細書を参照されたい。

【0485】

一態様において、2剤は、ビーズに、同じビーズ、即ち「シス」又は別のビーズ、即ち「rans」で固定化される。例として、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、抗CD3抗体又はその抗原結合フラグメントであり、共刺激シグナルを提供する薬剤は、抗CD28抗体又はその抗原結合フラグメントであり、両剤は、均等な分子量で同じビーズに共固定化される。一態様において、CD4+T細胞増殖及びT細胞増殖のためのビーズに結合した1:1比の各抗体を使用する。本発明の一態様において、1:1比を使用して観察された増殖と比較して、T細胞増殖の増殖が観察されるように、ビーズに結合した抗CD3:CD28抗体の比を使用する。特定の一態様において、1:1比を使用して観察された増殖と比較して約1～約3倍増加が観察される。一態様において、ビーズに結合したCD3:CD28抗体比は、100:1～1:100及びその間の全ての整数値の範囲である。一態様において、抗CD3抗体より多くの抗CD28抗体が粒子に結合しており、即ちCD3:CD28比が1未満である。一態様において、ビーズに結合した抗CD28抗体対抗CD3抗体比は、2:1より大きい。特定の一態様において、ビーズに結合した1:100 CD3:CD28比の抗体を使用する。一態様において、ビーズに結合した1:75 CD3:CD28比の抗体を使用する。さらなる態様において、ビーズに結合した1:50 CD3:CD28比の抗体を使用する。一態様において、ビーズに結合した1:30 CD3:CD28比の抗体を使用する。ある好ましい態様において、ビーズに結合した1:10 CD3:CD28比の抗体を使用する。一態様において、ビーズに結合した1:3 CD3:CD28比の抗体を使用する。さらなる態様において、ビーズに結合した3:1 CD3:CD28比の抗体を使用する。

【0486】

1:500～500:1及びその間の任意の整数値の粒子対細胞比をT細胞又は他の標的細胞の刺激のために使用し得る。当業者に容易に認識され得るように、粒子対細胞比は、標的細胞に対する粒子径に依存し得る。例えば、小さいサイズのビーズは、少ない細胞にのみ結合でき、大きいビーズは、多く結合できる。一態様において、細胞対粒子比は、1:100～100:1及びその間の任意の整数値の範囲であり、さらなる態様において1:9～9:1及びその間の任意の整数値からなる比をT細胞刺激に使用し得る。T細胞刺激をもたらす抗CD3及び抗CD28結合粒子対T細胞の比は、上記のように変わり得るが、しかしながら、ある好ましい値は、1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1及び15:1を含み、1つの好ましい比は少なくとも1:1粒子対T細胞である。一態様において、1:1以下の粒子対細胞比を使用する。特定の一態様において、好ましい粒子:細胞比は、1:5である。さらなる態様において、粒子対細胞比は、刺激の日によ

10

20

30

40

50

り変わり得る。例えば、一態様において、粒子対細胞比は、1日目は1：1～10：1であり、さらなる粒子をその後10日目まで連日又は隔日で細胞に添加し、最終比1：1～1：10である（添加の比の細胞数に基づく）。特定の一態様において、粒子対細胞比は、刺激1日目に1：1であり、刺激3日目及び5日に1：5に調節する。一態様において、粒子を、1日目の1：1及び刺激3日目及び5日の1：5の最終比に基づき、連日又は隔日で添加する。一態様において、粒子対細胞比は、刺激1日目は2：1であり、刺激3日目及び5日に1：10に調節する。一態様において、粒子を、1日目の1：1及び3日目及び5日の1：10の最終比に基づき、連日又は隔日で添加する。当業者は、多様な他の比が本発明における使用に適し得ることを認識する。特に、比は、粒子径並びに細胞サイズ及びタイプによる。一態様において、使用するための最も典型的な比は、1日目の1：1、2：1及び3：1付近である。

10

【0487】

さらなる態様において、T細胞などの細胞を薬剤被覆ビーズと組み合わせ、ビーズ及び細胞をその後分離し、次いで細胞を培養する。異なる態様において、培養前に薬剤被覆ビーズ及び細胞を分離するが、一緒に培養する。さらなる態様において、ビーズ及び細胞を磁気力などの力の適用によりまず濃縮し、細胞表面マーカーのライゲーションを増加させ、それにより細胞刺激を誘導する。

【0488】

例として、細胞表面タンパク質を、抗CD3及び抗CD28が結合した常磁性ビーズ（ 3×28 ビーズ）とT細胞を接触させることにより、ライゲートし得る。一態様において、細胞（例えば、 10^4 ～ 10^9 T細胞）及びビーズ（例えば、DYNAビーズS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズを1：1比）を緩衝液、例えばPBS（カルシウム及びマグネシウムなどの二価カチオンなし）中で合わせる。再び、任意の細胞濃度を使用し得ることが当業者に容易に認識され得る。例えば、標的細胞は、試料中で極めて稀であり、試料の0.01%のみが含まれるか又は試料全体（即ち100%）が目的の標的細胞で構成され得る。従って、あらゆる細胞数が本発明に関連して一体となる。一態様において、細胞と粒子との最大接触を確実にするために、粒子及び細胞を混合する体積を有意に減少させる（即ち細胞の濃度を高める）ことが望ましいことがある。例えば、一態様において、約100億細胞/m¹、90億/m¹、80億/m¹、70億/m¹、60億/m¹、50億/m¹又は20億細胞/m¹の濃度を使用する。一態様において、1億細胞/m¹超を使用する。さらなる態様において、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万又は5000万細胞/m¹の細胞濃度を使用する。さらなる態様において、細胞の7500万、8000万、8500万、9000万、9500万又は1億細胞/m¹の濃度を使用する。さらなる態様において、1億2500万又は1億5000万細胞/m¹の濃度を使用できる。高濃度を使用して、細胞収率、細胞活性化及び細胞増殖を増加できる。さらに、高細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞のより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞集団は、治療的価値を有し得、及び特定の態様では得ることが望ましいであろう。例えば、高濃度細胞の使用は、通常、CD28発現が弱いCD8+T細胞のより効率的な選択を可能にする。

20

【0489】

一実施形態において、本明細書に記載の核酸が形質導入された細胞を例えば本明細書に記載の方法により増殖する。一実施形態において、細胞を数時間（例えば、約2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、15時間、18時間、21時間）～約14日（例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日又は14日）の期間の培養により増殖する。

30

【0490】

T細胞の培養期間が60日以上となり得るような数サイクルの刺激も望まれ得る。T細胞培養に適する条件は、血清（例えば、胎児ウシ又はヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN-、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-1

40

50

0、IL-12、IL-15、TGF 及びTNF - 又は当業者に知られる細胞増殖のための任意の他の添加剤を含む、増殖及び生存能に必要な因子を含み得る、適切な培地(例えば、最小必須培地又はRPMI培地1640又はX-vivo 15(Lonza))を含む。細胞の増殖のための他の添加剤は、界面活性剤、プラスマネート、及びN-アセチル-システイン、及び2-メルカプトエタノールなどの還元剤を含むが、これらに限定されない。培地は、無血清又は適切な量の血清(又は血漿)が添加されたか、又は規定された組のホルモン及び/又はT細胞の増殖及び拡大に十分な量のサイトカインが添加されたRPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、-MEM、F-12、X-Vivo 15及びX-Vivo 20、Optimiz erを含み得る。抗生物質、例えばペニシリン及びストレプトマイシンは、実験的培養においてのみ包含され、対象に注入すべき細胞の培養に含まれない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件、例えば適切な温度(例えば、37)及び雰囲気(例えば、空気+5%CO₂)で維持される。

【0491】

一実施形態において、細胞は、例えば、フローサイトメトリーなどの本明細書に記載の方法により測定して、14日の増殖期間にわたり、細胞の少なくとも200倍(例えば、200倍、250倍、300倍、350倍)増加をもたらす1つ以上のインターロイキンを含む適切な培地(例えば、本明細書に記載の培地)で増殖させる。一実施形態において、細胞は、IL-15及び/又はIL-7(例えば、IL-15及びIL-7)の存在下で増殖させる。

【0492】

実施形態において、本明細書に記載の方法は、T制御性細胞、例えばCD25+T細胞を、例えば抗CD25抗体又はそのフラグメント又はCD25結合リガンド、IL-2を使用して細胞集団から除去することを含む。細胞集団からT制御性細胞、例えばCD25+T細胞を除去する方法は、本明細書に記載される。実施形態において、方法、例えば製造方法は、細胞集団(例えば、CD25+T細胞などのT制御性細胞が枯渇されている細胞集団;又は抗CD25抗体、そのフラグメント又はCD25結合リガンドと前に接触された細胞集団)とIL-15及び/又はIL-7との接触をさらに含む。例えば、細胞集団(例えば、抗CD25抗体、そのフラグメント又はCD25結合リガンドと先に接触されている)をIL-15及び/又はIL-7の存在下で増殖させる。

【0493】

一部の実施形態において、本明細書に記載の細胞を、インターロイキン-15(IL-15)ポリペプチド、インターロイキン-15受容体(IL-15Ra)ポリペプチド又はIL-15ポリペプチドとIL-15Raポリペプチドの組み合わせ、例えばhet IL-15を含む組成物と細胞の製造中に例えばエクスピボで接触させることを含む。実施形態において、本明細書に記載の細胞を細胞の製造中に例えばエクスピボで、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。実施形態において、本明細書に記載の細胞を細胞の製造中に例えばエクスピボで、IL-15ポリペプチド及びIL-15Raポリペプチドの両方の組み合わせを含む組成物と接触させる。

【0494】

一実施形態において、本明細書に記載の細胞を、エクスピボ増殖中、het IL-15を含む組成物と接触させる。一実施形態において、本明細書に記載の細胞を、エクスピボ増殖中、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。一実施形態において、本明細書に記載の細胞を、エクスピボ増殖中、IL-15ポリペプチド及びIL-15Raポリペプチドの両方を含む組成物と接触させる。一実施形態において、接触は、リンパ球亞集団、例えばCD8+T細胞の生存及び増殖をもたらす。

【0495】

種々の刺激時間に曝されているT細胞は、異なる特徴を示し得る。例えば、典型的な血液又はアフェレーシスした末梢血単核細胞産物は、細胞毒性又はサプレッサーT細胞集団(TC、CD8+)より大きいヘルパーT細胞集団(TH、CD4+)を有する。CD3及びCD28受容体での刺激によるT細胞のエクスピボ増殖は、約8~9日目前まで主に

10

20

30

40

50

T H 細胞からなる T 細胞集団を產生するが、約 8 ~ 9 日目後、T 細胞集団は、徐々に大きくなる T C 細胞集団を含む。従って、処置の目的により、主に T H 細胞を含む T 細胞集団を対象に注入することは有利であり得る。同様に、T C 細胞の抗原特異的サブセットが単離されている場合、このサブセットを大きい程度まで増殖させることが有利であり得る。

【 0 4 9 6 】

さらに、C D 4 及び C D 8 マーカーに加えて、他の表現型マーカーは、細胞増殖過程の経過中、有意に、しかし、主に再現性よく変化する。そして、このような再現性は、特定の目的のために活性化 T 細胞産物をもたらす能力を可能とする。

【 0 4 9 7 】

治療適用

別の態様において、対象を処置する、例えば対象における過増殖性状態又は障害（例えば、癌）、例えば固形腫瘍、軟部組織腫瘍又は転移性病変を軽減又は緩和する方法が提供される。本明細書で使用される用語「癌」は、病理組織学的型又は侵襲性のステージとは無関係に、全ての型の癌性増殖又は発癌過程、転移性組織又は悪性形質転換細胞、組織又は臓器を含むことを意味する。固形腫瘍の例は、肝臓、肺、乳房、リンパ系、消化管（例えば、結腸）、尿生殖路（例えば腎細胞、尿路上皮細胞）、前立腺及び咽頭に影響を及ぼすものなどの種々の臓器系の悪性腫瘍、例えば肉腫、腺癌及び癌腫を含む。腺癌は、大部分の結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、肺の非小細胞癌、小腸の癌及び食道の癌などの悪性腫瘍を含む。一実施形態において、癌は、黒色腫、例えば進行したステージの黒色腫である。前述の癌の転移性病変も本発明の方法及び組成物を使用して処置又は予防することができる。処置され得る他の癌の例としては、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚又は眼内の悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣の癌、外陰癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ性白血病を含む慢性又は急性白血病、小児固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓癌又は尿管癌、腎孟癌、中枢神経系（C N S）新生物、原発性 C N S リンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、T 細胞リンパ腫、アスペストにより誘発された癌を含む環境的に誘発された癌及び前記癌の組み合わせが挙げられる。転移性癌、例えば P D - L 1 を発現する転移性癌（I w a i e t a l . (2 0 0 5) I n t . I m m u n o l . 1 7 : 1 3 3 - 1 4 4 ）の処置は、本明細書に記載の抗体分子を使用して達成され得る。

【 0 4 9 8 】

増殖が阻害され得る例示的な癌は、典型的には免疫療法に応答性の癌を含む。処置のための癌の非限定的な例は、黒色腫（例えば、転移性悪性黒色腫）、腎臓癌（例えば、明細胞癌）、前立腺癌（例えば、ホルモン難治性前立腺癌）、乳癌、結腸癌及び肺癌（例えば、非小細胞性肺癌）を含む。さらに、難治性又は再発性悪性腫瘍は、本明細書に記載の分子を使用して処置することができる。

【 0 4 9 9 】

一態様において、本発明は、対象における癌を処置する方法に関する。この方法は、癌が対象において処置されるように、対象に本発明の細胞を投与することを含む。一態様において、本明細書に記載の癌関連抗原の発現と関連する癌は、血液癌である。一態様において、血液癌は、白血病又はリンパ腫である。一態様において、本明細書に記載の癌関連抗原の発現に関連する癌は、限定されないが、例えば B 細胞急性リンパ性白血病（「B A L L 」）、T 細胞急性リンパ性白血病（「T A L L 」）、急性リンパ性白血病（A L L ）を例えば含むがそれに限定されない 1 つ以上の急性白血病、慢性骨髓性白血病（C M L ）、慢性リンパ性白血病（C L L ）を例えば含むがそれに限定されない 1 つ以上の慢性白血病を含めた癌及び悪性腫瘍を含む。本明細書に記載の癌関連抗原の発現に関連するさらなる癌又は血液学的病態は、限定されないが、例えば B 細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、濾胞

性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型又は大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ球増殖性病態、M A L T リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄形成異常及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンシュトレーームマクログロブリン血症及び骨髄性血球細胞の無効な産生（又は異形成）によってまとめられる様々な血液学的病態の群である「前白血病」などを含む。さらに、本明細書に記載の癌関連抗原に関連する疾患としては、これらに限定されないが、例えば、本明細書に記載の癌関連抗原の発現に関連する、非定型的及び／又は非典型的な癌、悪性腫瘍、前癌状態又は増殖性疾患が挙げられる。

【 0 5 0 0 】

参考により本明細書に組み込まれる米国特許第5,199,942号明細書に記載する造血幹細胞及び前駆細胞のエクスピボ増殖のための方法を本発明の細胞に適用できる。他の適当な方法は、当技術分野で知られ、従って、本発明は、細胞のエクスピボ増殖の特定の方法に限定されない。簡潔には、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞、N K 細胞）のエクスピボ培養及び増殖は、（1）哺乳動物からの採取した末梢血又は髄外植体からのC D 3 4 + 造血幹細胞及び前駆細胞回収、及び（2）エクスピボでのこのような細胞の増殖を含む。米国特許第5,199,942号明細書に記載される細胞増殖因子に加えて、f l t 3 L 、I L - 1 、I L - 3 及びc - k i t リガンドなどの他の因子を細胞の培養及び増殖に使用できる。

【 0 5 0 1 】

エクスピボ免疫化の点で細胞ベースのワクチンを使用するのに加えて、本発明は、患者における抗原に対する免疫応答を惹起するための、インビボ免疫化のための組成物及び方法も提供する。

【 0 5 0 2 】

血液癌

血液癌状態は、白血病、リンパ腫並びに血液、骨髄及びリンパ系に影響する悪性リンパ増殖状態などの癌の型である。

【 0 5 0 3 】

白血病は、急性白血病及び慢性白血病に分類できる。急性白血病は、急性骨髓性白血病（A M L ）及び急性リンパ性白血病（A L L ）としてさらに分類され得る。慢性白血病は、慢性骨髓性白血病（C M L ）及び慢性リンパ系白血病（C L L ）を含む。他の関連する状態は、骨髓球性血液細胞の産生不良（又は異形成）によりまとめられる血液学的状態の多様な集合であり、A M L に形質転換するリスクがある骨髄異形成症候群（M D S 、以前は「前白血病状態」として知られる）を含む。

【 0 5 0 4 】

リンパ腫は、リンパ球から生じる血液細胞腫瘍の群である。例示的なリンパ腫は、非ホジキンリンパ腫及びホジキンリンパ腫を含む。

【 0 5 0 5 】

本発明は、癌を治療するための組成物及び方法を提供する。一態様では、癌は、白血病又はリンパ腫である血液癌が挙げられるが、これらに限定されない血液癌である。一態様では、本発明の細胞は、例えば、B 細胞急性リンパ性白血病（「B A L L 」）、T 細胞急性リンパ性白血病（「T A L L 」）、急性リンパ性白血病（A L L ）が挙げられるが、これらに限定されない例えば急性白血病；例えば、慢性骨髓性白血病（C M L ）、慢性リンパ性白血病（C L L ）が挙げられるが、これらに限定されない1つ以上の慢性白血病；例えば、B 細胞前リンパ性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、有毛細胞性白血病、小細胞又は大細胞性濾胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性病態、M A L T リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞腫瘍、ワルデンシュトレーームマクログロブリン血症及び骨髄性血液細胞の無効な産生（又は異形成）によって合併された血液学的状態の多様な集合である「前白血病」などが挙げられるが、これらに限定されない追加

10

20

30

40

50

の血液癌又は血液学的状態などであるが、これらに限定されない癌及び悪性腫瘍を治療するために使用することができる。さらなる本明細書に記載されるような癌関連抗原の発現に関連する疾患としては、本明細書に記載されるような癌関連抗原を発現する例えは異型及び／又は非古典的癌、悪性腫瘍、前癌状態又は増殖性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0506】

本発明は、本明細書に記載の癌関連抗原を発現する細胞（例えは、本明細書に記載の癌関連抗原を発現する血液癌又は非定型癌）と関連する疾患を予防、処置及び／又は管理する方法も提供し、本方法は、本明細書に記載の癌関連抗原を発現する細胞に結合する本発明のT細胞又はNK細胞を、必要とする対象に投与することを含む。一態様において、対象は、ヒトである。本明細書に記載の癌関連抗原を発現する細胞と関係する障害の非限定的な例は、自己免疫性障害（狼瘡など）、炎症性障害（アレルギー及び喘息など）及び癌（本明細書に記載の癌関連抗原を発現する血液癌又は非定型癌など）を含む。

10

【0507】

本発明は、本明細書に記載の癌関連抗原を発現する細胞と関連する疾患を予防、処置及び／又は管理する方法も提供し、本方法は、本明細書に記載の癌関連抗原を発現する細胞に結合する本発明のT細胞又はNK細胞を、必要とする対象に投与することを含む。一態様において、対象は、ヒトである。

20

【0508】

本発明は、本明細書に記載の癌関連抗原を発現する細胞と関連する癌の再発を予防する方法も提供し、本方法は、本明細書に記載の癌関連抗原を発現する細胞に結合する本発明のT細胞又はNK細胞を、それを必要とする対象に投与することを含む。一態様において、方法は、処置を必要とする対象に、本明細書に記載の癌関連抗原を発現する細胞と結合する有効量の本明細書に記載のT細胞又はNK細胞を有効量の別の治療と組み合わせて投与することを含む。

20

【0509】

医薬組成物及び処置

本発明の医薬組成物は、本明細書に記載のように、キメラタンパク質発現細胞、例えは複数のキメラタンパク質発現細胞を1つ以上の薬学的に又は生理学的に許容される担体、希釈剤又は添加物と組み合わせて含む。このような組成物は、中性緩衝化食塩水、リン酸緩衝化食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；グリシンなどのポリペプチド又はアミノ酸；抗酸化剤；EDTA又はグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えは、水酸化アルミニウム）；及び防腐剤を含み得る。本発明の組成物は、1つの態様において静脈内投与用に製剤される。

30

【0510】

本発明の医薬組成物を、処置する（又は予防する）疾患に適する方法で投与し得る。投与の量及び頻度は、患者の状態及び患者の疾患のタイプ及び重症度などの因子により決定されるが、適切な用量は、臨床試験により決定され得る。

40

【0511】

一実施形態において、医薬組成物は、例えは、エンドトキシン、マイコプラズマ、複製可能レンチウイルス（RCL）、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留抗CD3／抗CD28被覆ビーズ、マウス抗体、貯留ヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地要素、ベクター・パッケージング細胞又はプラスミド成分、細菌及び真菌からなる群から選択される汚染物が実質的になく、例えは検出可能なレベルで存在しない。一実施形態において、細菌は、アルガリゲネス・フェカリス（*Alcaligenes faecalis*）、カンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）、エシエリキア・コリ（*Escherichia coli*）、ヘモフィルス・インフルエンザ（*Haemophilus influenza*）、ナイセリア・メンингイティディス（*Neisseria meningitidis*）、シュードモナス・エルジノーサ（*P*

50

seudomonas aeruginosa)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) 及びストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) A 群からなる群から選択される少くとも 1 つである。

【0512】

「免疫学的に有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」又は「治療量」が示されるとき、本発明の組成物の投与すべき正確な量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染の程度又は転移及び患者(対象)の状態の個体差を考慮して医師が決定できる。本明細書に記載の免疫エフェクター細胞(例えば、T 細胞、NK 細胞)を含む医薬組成物を、 10^4 ~ 10^9 細胞 / kg 体重、いくつかの例において 10^5 ~ 10^6 細胞 / kg 体重の範囲の用量(これらの範囲内の全整数値を含む)で投与し得ると一般に述べることができる。T 細胞組成物をまたこの用量で複数回投与し得る。細胞を、免疫療法において一般に知られる注入技術を使用して投与できる(例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988 を参照されたい)。

10

【0513】

特定の態様において、活性化免疫エフェクター細胞(例えば、T 細胞、NK 細胞)を対象に投与し、次いで血液を採り(又はアフェレーシスを実施し)、本発明に従ってそれからの免疫エフェクター細胞(例えば、T 細胞、NK 細胞)を活性化し、これらの活性化し、且つ増殖させた免疫エフェクター細胞(例えば、T 細胞、NK 細胞)を患者に再注入することが望ましいことがある。この過程を数週間ごとに複数回実施できる。一態様において、免疫エフェクター細胞(例えば、T 細胞、NK 細胞)を 10 cc ~ 400 cc の採血した血液から活性化できる。一態様において、免疫エフェクター細胞(例えば、T 細胞、NK 細胞)を 20 cc、30 cc、40 cc、50 cc、60 cc、70 cc、80 cc、90 cc 又は 100 cc の採血した血液から活性化する。

20

【0514】

対象組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、留置又は移植を含む任意の簡便な方法により実施し得る。本明細書に記載の組成物を患者に経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内(i.v.)注射により又は腹腔内に投与し得る。1つの態様において、本発明の T 細胞組成物を患者に皮内又は皮下注射により投与する。1つの態様において、本発明の T 細胞組成物を i.v. 注射により投与する。免疫エフェクター細胞(例えば、T 細胞、NK 細胞)の組成物を腫瘍、リンパ節又は感染部位に直接注射し得る。

30

【0515】

特定の例示的態様において、対象は、白血球を採取し、エクスピボで富化又は枯渇させて、目的の細胞、例えば T 細胞を選択及び/又は単離する白血球除去を受け得る。これらの T 細胞単離体を当技術分野で知られる方法により増殖させ、1つ以上の本発明の構築物が導入され、それにより本発明の T 細胞が創製されるように処理し得る。処置を必要とする対象を、その後、高用量の化学療法剤と続く末梢血幹細胞移植の標準的処置に付し得る。一態様において、移植後又は移植と同時に、対象は、増殖させた本発明の T 細胞の注入を受ける。さらなる態様において、増殖細胞を手術前又は後に投与する。

40

【0516】

患者に投与すべき上記の処置の用量は、処置する状態の正確な性質及び処置のレシピエントにより変わる。ヒト投与のためのスケーリングは、当技術分野で認識されている習慣に従って実施できる。CAMPATH の用量は、例えば、概して成人患者に 1 ~ 約 100 mg の範囲であり、通常、連日で 1 ~ 30 日の期間にわたって投与する。好ましい 1 日用量は、1 ~ 10 mg / 日であるが、いくつかの例において最大までの高用量である。

【実施例】

【0517】

本発明は、以下の実験例を参照することによって詳細にさらに説明される。これらの実

50

施例は、例示のみを目的として提供されており、特に指定のない限り、限定することを意図するものではない。従って、本発明は、以下の実施例に決して限定されると解釈されるべきではなく、むしろ本明細書に提供される教示の結果として明らかになるあらゆるすべての変形態を包含するように解釈されるべきである。

【 0 5 1 8 】

実施例 1：細胞内ヘテロ二量体化ドメインを使用する構成的活性型 T C A R
一過性発現及び活性化アッセイ

材料及び方法

構成的活性型 T C A R 構築物の合成

プラスミド D N A の対を D N A 2 . 0 によって外部的に合成した。名目上調節不可能な C A R 構築物、 C D 1 9 s c F v - B B Z 、配列番号 1 を対照として使用した。 T C A R について、様々な細胞内ヘテロ二量体化ドメインを、図 1 に示されるような T C A R 構築物の異なるドメインに連結させることができる。

【 0 5 1 9 】

「 T C A R 1 」は、構築物の対を含む。第 1 の構築物では、 C D 1 9 s c F v を C D 8 ヒンジ及び膜貫通ドメイン、続いて共刺激ドメイン 4 - 1 B B 及び C 末端におけるヘテロ二量体化ドメイン V P S 2 8 でクローニングした（配列番号 2 ）。対応する第 2 の構築物を、ヘテロ二量体化ドメイン V P S 3 6 を C D 3 の C 末端においてリinkerに融合させることによって設計した（配列番号 3 ）。「 T C A R 2 」は、構築物の対を含む。第 1 の構築物では、 C D 1 9 s c F v を C D 8 ヒンジ及び膜貫通ドメイン、続いて共刺激ドメイン 4 - 1 B B 及び C 末端におけるヘテロ二量体化ドメイン m J U N でクローニングした（配列番号 4 ）。対応する第 2 の構築物を、ヘテロ二量体化ドメイン m F o s を C D 3 の C 末端においてリinkerに融合させることによって設計した（配列番号 5 ）。

C D 1 9 s c F v - B B Z (配列番号 1)

【 化 5 】

GSATMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
LNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
QGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSET
LSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRTVTISKDNS
KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLTVSSTTTPAPRP
PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVIT
LYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFRSADAP
AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

C D 1 9 s c F v - B B - V P S 2 8 (配列番号 2)

10

20

30

【化6】

GSATMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
 QGNTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
 VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL
 KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSTTPAPRPPTPAPTI
 ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCSLK
 RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELMFNAKYVAEATGNFI
 TVMDALKLNYNAKDQLHPLLAELLISINRVTRDDFENRSKLIDWIVRINKLSIGDTL
 TETQIRELLFDLELAYKSFYALLD

10

C D 3 e - V P S 3 6 (配列番号3)

【化7】

GSMQSGTHWRVLGLCLLSVGWQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP
 GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDAN
 FYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTR
 GAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRIGSGSGSGGGSG
 GSGSSGASADVSTWVCPICMVSNETQGEFTKDTLPTPICINCGVPADYELTKSSIN
 CSNAIDPNANPRNQFG

20

C D 1 9 s c F V - B B - m J U N (配列番号4)

【化8】

GSATMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
 QGNTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
 VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL
 KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSTTPAPRPPTPAPTI
 ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCSLK
 RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRIARLEEEVKTLEAQN
 SELASTANMLEEQVAQLKQKV

30

C D 3 e - m F o s (配列番号5)

【化9】

40

GSMQSGTHWRVLGLCLLSVGWQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP
 GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDAN
 FYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTR
 GAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRIGSGSGSLTDLQ
 AKTDQLKDEKSALQT KIANLLKEKEKLEFIL

【0520】

C A R 機能の初期特性評価のためのジャーカットレポーター細胞株の生成

50

一次 T 細胞形質導入及び活性化の代わりとして、ジャーカット - N F A T レポーター細胞株を用いて C A R 構築物の機能活性を評価することができる。ジャーカット T 細胞株 (E 6 - 1) を N F A T - ルシフェラーゼレポーター構築物でトランスフェクトし、N F A T - L U C レポーターを有する安定なクローニング細胞株ジャーカット細胞 (J N L) を P M A 及びイオノマイシン刺激後の N F A T レポーターの強い誘導に基づいてさらなる特性評価のために選択した。

【 0 5 2 1 】

ジャーカットレポーター細胞株のトランスフェクション及び N F A T の活性化

N F A T - L U C レポーターを有するジャーカット細胞 (J N L) を、2 m M のグルタミン及び 10 % のウシ胎児血清を 0 . 5 μ g / m l のピューロマイシンと共に含有する R P M I - 1 6 4 0 培地中で 0 . 5 ~ 1 . 0 \times 1 0 ⁶ / m l の密度まで増殖させた。各トランスクレクションについて、2 . 0 \times 1 0 ⁶ 個細胞を 1 0 0 g で 1 0 分間遠心分離した。対照 C A R の共トランスクレクションには 1 μ g の D N A を、又は単一のトランスクレクションには 2 μ g をトランスクレクションごとに使用した。A m a x a N u c l e o f e c t o r 溶液 V 及びサプリメント I を混合して、1 0 0 μ l を、D N A 構築物を入れたチューブに添加した。次いで、混合物を細胞に添加し、エレクトロポレーションキュベットに移した。A m a x a N u c l e o f e c t o r I I 装置を使用して X - 0 0 1 の設定下でエレクトロポレーションを行った。2 m M のグルタミン及び 10 % の F B S を含有する R P M I - 1 6 4 0 培地 0 . 4 m l をエレクトロポレーションの直後に添加し、混合物を 6 ウェルプレートの 1 つのウェル中の 0 . 2 5 m l の増殖培地に移し、少なくとも 3 時間回復させた。細胞回復中、白色ソリッドボトム組織培養処理プレートを抗 C D 1 9 イディオタイプ抗体又は無関係なヒト I g G 1 - F c 陰性対照のいずれかで 2 時間コーティングし、続いて F B S 中の 5 % の B S A で 3 7 、5 % の C O ₂ において 3 0 分間プロックした。次いで、ブロッキングバッファーを吸引した。トランスクレクトされたジャーカット構築物のそれぞれ 1 0 0 μ L を 3 通りで播種した。一晩のインキュベーション後、O n e - G l o ルシフェラーゼ (P r o m e g a) 試薬 1 0 0 μ L を各ウェルに添加した。陰性対照ウェルに対する抗イディオタイプウェルの相対的な活性化倍率を決定するために、次いでプレートを 5 分間インキュベートして、ルシフェラーゼシグナルを平衡化させて E n v i s i o n マルチラベルリーダーを用いて読み取った。

【 0 5 2 2 】

トランスクレクトされたジャーカット (J N L) 細胞中の I L - 2 発現

J N L 細胞のトランスクレクション及び活性化を、3 7 、5 % の C O ₂ において 4 0 ~ 4 8 時間であるインキュベーションを除いて J N L R G A アッセイで上記記載の通りに行つた。3 0 0 \times g で 1 0 分間の遠心分離によって上清を細胞から採取した。I L - 2 発現のレベルを、M e s o s c a l e D i s c o v e r y H u m a n I L - 2 キット (M e s o s c a l e) を使用して測定した。すべての提供された試薬を製造業者の指示通りに調製した。採取した上清 (ニートな) 及び調製した標準物 5 0 μ L をプレコート M S D プレートに添加し、振蕩しながら室温で 2 時間インキュベートした。プレートを 3 0 0 μ L の P B S + T w e e n 2 0 で 3 回洗浄し、2 5 μ L の検出抗体溶液を各ウェルに添加した。プレートを振蕩しながら室温で 2 時間再度インキュベートし、上記条件で洗浄し、1 5 0 μ L の 2 \times R e a d B u f f e r T を各ウェルに添加した。プレートをヒト I L - 2 レベルについて M S D 機器上で即時読み取った。

【 0 5 2 3 】

一過性発現の結果

T C A R 1 及び T C A R 2 の J N L 細胞のエレクトロポレーションを介した一過性トランスクレクションは、図 2 に示されるようなレポーター遺伝子アッセイにおける抗原依存性シグナル伝達を証明した。T C A R 1 、V P S 2 8 / V P S 3 6 ベースの二量体は、R G A アッセイにおいて、陽性対照 C A R 、C D 1 9 s c F V - B B Z と比べてバックグラウンド活性化を超える同様の倍率を証明した。活性化から 4 0 時間後の I L 2 の発現も評価した。抗原依存性 I L 2 発現は、T C A R 1 についても観察したが、J N L R G A ア

10

20

30

40

50

ッセイにおける低い固有のシグナルのため、T C A R 2 は評価されなかった。リンカー長さを介してヘテロ二量体化ドメインの配向を最適化し、ヘテロ二量体化ドメインの互いに対する親和性を向上させ、及び / 又は C D 3 界面の T C R 複合体の残部に対する親和性を向上させることにより、シグナル伝達及び I L 2 発現におけるさらなる増強が期待されるであろう。

【 0 5 2 4 】

レンチウイルス形質導入一次ヒトT細胞の產生

T C A R 1 は、C D 1 9 s c F v - B B Z と比べて、レンチウイルス形質導入を介して產生された一次ヒトT細胞を使用してインピトロでも評価した。

【 0 5 2 5 】

レンチウイルスの產生

1 0 % の F B S 及び非必須アミノ酸で補充した D M E M で増殖させた L e n t i - X 2 9 3 T 細胞 (C l o n t e c h) を、 L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 (I n v i t r o g e n) トランスフェクション試薬を使用して、 p R S V . r e v 、 p M D L . g / p . r r e 及び p V S V g パッケージングプラスミドと共にレンチウイルスベクター・プラスミドで共トランスフェクトした。上清を含有するレンチウイルスベクターをトランスフェクションから 4 8 時間後に採取し、 L e n t i - X C o n c e n t r a t o r (C l o n t e c h) を使用して濃縮させ、 1 , 5 0 0 × g で 4 5 分間遠心分離した。濃縮させたベクターを後に使用するまで - 8 0 で保存した。

【 0 5 2 6 】

レンチウイルスベクター力値を、 1 0 % の F B S で補充した R P M I - 1 6 4 0 中で培養した S u p - T 1 細胞 (A T C C) での限界希釈を用いて決定した。ベクターを 3 倍系列希釈し、次いで 5 0 μ L の希釈したベクターを、 S u p - T 1 細胞を含有する平底マイクロタイタープレートに添加した。7 2 時間後に細胞を採取し、タンパク質 - L を使用して、 F A C S を介して s c F v 発現について分析した。1 m L 当たりの形質導入単位 (T U / m L) での力値を、以下の等式を用いて、 S u p - T 1 細胞における陽性発現の % が 2 0 % 未満であるが、 5 % 超であるベクター希釈物から算出した。

$$T U / m L = (\text{陽性 \%} / 1 0 0) \times 2 E ^ 4 \times \text{希釈倍率} \times 2 0$$

【 0 5 2 7 】

T細胞の単離及び一次T細胞へのウイルス形質導入

正常ドナーT細胞を、 C e l l u l a r T e c h n o l o g y L i m i t e d から得たヒトP B M C からの M A C S 隱性選択 (M i l t e n y i パンT細胞単離キット) により単離した。精製T細胞を、 1 0 % の F B S 、 1 0 0 U / m l のペニシリン、 1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシン、 1 0 m M の H E P E S 及び 1 m M の非必須アミノ酸を補充した R P M I 中で培養し、 D y n a b e a d s ヒトT - アクティベータ C D 3 / C D 2 8 ビーズ (I n v i t r o g e n) を用いて、 3 : 1 のビーズ対細胞の比で活性化した。活性化から 1 8 ~ 2 4 時間後に T 細胞をレンチウイルスベクターにより 5 の感染多密度 (M O I) で形質導入した。形質導入 T 細胞を、 1 m L 当たりおよそ 7 5 万個の細胞密度を維持しながら、 2 ~ 3 日ごとに 1 0 日間増殖させた。細胞を等分して低温凍結した。

【 0 5 2 8 】

細胞傷害性及び I L 2 アッセイ

形質導入 T 細胞を、標的発現細胞株を殺傷するそれらの能力及び増殖のための代理として使用されるサイトカイン I L 2 の分泌について分析した。1 0 % の F B S を含む R P M I 中で培養した標的発現細胞株 N a l m 6 (C D 1 9) 及び 1 0 % の F B S を含む I M D M 中で培養した K 5 6 2 (隱性対照) を、すべてピューロマイシンの選択下でホタルルシフェラーゼを安定して発現するように操作した。簡単に言うと、解凍させた形質導入 T 細胞を、 C A R 発現のパーセントについて F A C S を介して分析した。単離し、増殖させた凍結 / 解凍非形質導入 T 細胞で希釈することにより、すべての構築物を 1 0 % の C A R 陽性発現に正規化した。次いで、形質導入正規化 T 細胞を様々なエフェクター対標的の比において 2 0 0 μ L の培地中に培養し、標的細胞を 2 . 5 E ^ 4 細胞 / ウェルで一定に保持し

10

20

30

40

50

た。標的細胞をエフェクター細胞の存在なしに単独で播種して、最大ルミネセンスを決定した。18～20時間後に100μLの培養物上清を後のIL2分析のために取り出し、100μLのOneGlo (Promega) ルシフェラーゼ基質を残りの上清及び細胞に添加した。インキュベーションから10分後にルミネセンスをEnvisionプレートリーダーで測定した。特異的溶解パーセントを、以下の等式を用いて算出した。

$$\text{特異的溶解 (\%)} = (1 - (\text{試料のルミネセンス} / \text{平均最大ルミネセンス})) * 100$$

採取した上清をMSD E L I S Aにより製造業者の指示通りにIL2の量について分析した。

【0529】

一次ヒトT細胞の結果

図3及び図4は、対照CD19scFv-BBZに対する「TCAR1」の機能活性を示す。再指示溶解アッセイ及びIL2発現結果の両方から観察されたように、TCAR1は、機能性の低下を示した。両方の構築物が形質導入条件下においてT細胞中で発現される場合、両方のヘテロ二量体化ドメインを含有する両方の構築物の同じ細胞中での同時発現を確実にするためにさらなる最適化が必要とされ得ることは、明らかではない。さらに、リンカー長さを介してヘテロ二量体化ドメインの配向を最適化させるか、又はヘテロ二量体化ドメインの互いに対する親和性を向上させることにより、さらなる増強が必要になり得る。しかしながら、一過性シグナル伝達の結果は、これらのタイプのキメラ抗原受容体の可能性を証明した。

【0530】

実施例2：細胞内ヘテロ二量体化ドメインを使用する増殖が向上した構成的活性型TCAR(図5～9)

複数の共刺激ドメインを有する構成的活性型TCAR構築物の合成

プラスミドDNAの対をDNA2.0によって外部的に合成した。名目上調節不可能なCAR構築物、CD19scFv-BBZ、配列番号1を対照として使用する。

【0531】

「TCAR1」は、構築物の対を含む。第1の構築物では、CD19scFvをCD8ヒンジ及び膜貫通ドメイン、続いて共刺激ドメイン4-1BB及びC末端におけるヘテロ二量体化ドメインVPS28でクローン化した(配列番号2)。対応する第2の構築物を、ヘテロ二量体化ドメインVPS36をCD3のC末端においてリンカーに融合させることによって上記のように設計した(配列番号3)。「TCAR3」(図5)は、構築物の対を含む。第1の構築物では、CD19scFvをCD8ヒンジ及び膜貫通ドメイン、続いて共刺激ドメイン4-1BB及びC末端におけるヘテロ二量体化ドメインVPS28でクローン化する(配列番号2)。対応する第2の構築物は、CD28の細胞内共刺激ドメイン、続いてVPS36をCD3細胞外及び膜貫通ドメインのC末端に融合させることによって設計されるであろう(配列番号6)。

CD3eECDTM-CD28-VPS36(配列番号6)

【化10】

```
GSMQSGTHWRVLGLLLSVGVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP
GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDAN
FYLRLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYWSRSKRSRLLHSDYM
NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAAYRSGSGSGGGSGSGSSGASADVST
WVCPICMVSNETQGEFTKDTLPTPICINCGVPADYELTKSSINCSNAIDPNANPRNQF
G
```

【0532】

ジャーカットレポーター細胞株のトランスフェクション及びNFATの活性化

抗原結合ドメインの標的抗原エンゲージメント後の活性化は、NFAT-LUCレポーターを有するジャーカット細胞(JNL)レポーター細胞株を用いて、実施例1に記載さ

10

20

30

40

50

れるように測定される。トランスフェクトされた細胞を標的プレートに1ウェル当たり100μlで添加する。ルシフェラーゼOne G10試薬100μlをウェルごとに添加する。試料を5分間インキュベートし、次いでルミネセンスを記載のように測定する。

【0533】

トランスフェクトされたジャーカット(JNL)細胞中のIL-2発現

JNL細胞のトランスフェクション及び活性化を、37、5%のCO₂において40~48時間であるインキュベーションを除いてJNL-RGAアッセイで上記記載の通りに実施する。分泌されたIL-2の測定を実施例1に記載の通りに実施する。

【0534】

実施例3: CD3を介してTCR複合体中に融合された構成的活性型TCARe(fus TCARe)(図10~11) 10

一過性発現及び活性化アッセイ

fus TCARe構築物の合成

プラスミドDNAをDNA2.0によって外部的に合成した。名目上調節不可能なCAR構築物、CD19scFv-BBZ、配列番号1を対照として使用した。fus TCAReについて、標的化ドメインは、追加の細胞内共刺激及びシグナル伝達ドメインを含むか又は含まないTCR複合体の異なるメンバーに直接融合することができる。

【0535】

「fus TCARe1」(図12)では、CD19scFvを完全CD3タンパク質にN末端融合体としてクローニングした(配列番号7)。「fus TCARe2」(図13)を完全CD3タンパク質へのN末端融合体として、続いて4-1BBの細胞内共刺激ドメインへのC末端融合体としてクローニングした(配列番号8)。「fus TCARe3」(図14)は、内部内因性ITAMドメインを欠如する。CD19scFvをCD3細胞外及び膜貫通ドメインのN末端上に、続いて細胞内共刺激ドメイン4-1BB上にクローニングした(配列番号9)。

CD19scFv-CD3e(配列番号7)

【化11】

GSATMALPV TALLPL ALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
LNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
QGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCT
VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKS RVTISKDNSKNQVSL
KLSSVTAADTA VYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSGGGSDGNEEMGG
ITQTPYKV SISGTTV ILTCPQ YPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFS
ELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIVDICITGGL
LLL VYYWSKNRKA KAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDL
YSGLNQRRI

CD19scFv-CD3e-41BB(配列番号8)

20

30

40

【化12】

GSATMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
 QGNTLPYTFQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
 VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL
 KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGSDGNEEMGG
 ITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFS
 ELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITGGL
 LLLVYYWSKRNKAAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDL
 YSGLNQRRIGSGSGGSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
 L

10

C D 1 9 s c F v - C D 3 e E C D T M - 4 1 B B (配列番号9)

【化13】

GSATMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
 QGNTLPYTFQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
 VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL
 KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGSDGNEEMGG
 ITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFS
 ELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITGGL
 LLLVYYWSKGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

20

【0536】

ジャーカットレポーター細胞株のトランスフェクション及びN F A T の活性化

30

抗原結合ドメインの標的抗原エンゲージメント後の活性化を、実施例1に記載されたようにN F A T - L U C レポーターを含むジャーカット細胞（J N L ）レポーター細胞株を用いて測定した。トランスフェクトされた細胞を標的プレートに1ウェル当たり100μlで添加した。ルシフェラーゼOne G10試薬100μlをウェルごとに添加した。試料を5分間インキュベートし、次いでルミネセンスを記載されたように測定した。

【0537】

トランスフェクトされたジャーカット（J N L ）細胞中のI L - 2 発現

J N L 細胞のトランスフェクション及び活性化を、37、5%のCO₂において40~48時間であるインキュベーションを除いてJ N L R G A アッセイで上記記載の通りに行った。抗原依存性I L 2 発現の測定を実施例1に記載の通りに実施した。

40

【0538】

一過性発現の結果

J N L 細胞への一過性トランスフェクションを介したf u s T C A R 1、f u s T C A R 2 及びf u s T C A R 3 の初期スクリーニングは、図15に示されるように、抗原依存性シグナル伝達を証明した。重要なことに、シグナル伝達は、切断され且つC D 3 のI T A M シグナル伝達ドメインを欠如したf u s T C A R 3 でなお観察された。I T A M シグナル伝達ドメインを含有する構築物のトランスフェクションは、従って、f u s T C A R の活性にとって前提条件ではない。標的化ドメインをT C R 複合体と関連付けることにより、シグナル伝達は、複合体のすべてのメンバーを通して仲介され、標的化ドメインに融合されたシグナル伝達ドメインに由来するものに排他的に限定されるものではない。

50

【0539】

レンチウイルス形質導入一次ヒトT細胞の產生

fusTCARは、それらの活性について一次ヒトT細胞中でも試験された。レンチウイルスの產生前に、追加の構築物を、従来のCAR構築物のインビトロ活性に対する機能的ITAMSの依存性及び機能的ITAMSの存在又は非存在に無関係なT CARと無関係な活性を確認するためにも設計した。プラスミドDNAをDNA2.0によって外部的に合成した。初代のCAR設計構築物、CD19scFv-、配列番号10を合成し、CD19scFvをCD8aリンカー及び膜貫通ドメインへの、続いて細胞内シグナル伝達ドメインCD3へのN末端融合体としてクローニングした。第2の構築物（配列番号11）を、リン酸化されていると注釈付けされたCD3内のすべての細胞内チロシン残基が細胞内ホスホチロシンシグナル伝達を無効にするためにフェニルアラニンに切り替えられていることを除いて同様にクローニングした。細胞内共刺激ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの組み合わせは、典型的なCAR構築物に有益であることが以前に証明されているため、最終構築物を、CD19scFvをCD8aリンカー及び膜貫通ドメインに、続いて4-1BBにN末端融合させることによってクローニングし、CD3シグナル伝達ドメインは、この構築物に含まれなかった（配列番号12）。最後に、類似のfusT CARを合成してCD19scFV-__7YtoFとした。「fusT CAR4」は、内部内因性ITAMドメインを欠如する。CD19scFv、配列番号13を、リン酸化されていると注釈付けされたこれらのチロシンがフェニルアラニンに変異され、CD3ITAMに関連する固有のシグナル伝達経路を不活性にさせたことを除いて、完全CD3タンパク質へのN末端融合体としてクローニングした。

CD19scFv-（配列番号10）

【化14】

GSMALPV TALLPL ALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTL PYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL
 TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQ
 VSLKLSSVTAADTA VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTPAPRPPTPA
 PTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
 RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNP
 QEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQ
 ALPPR

CD19scFv-__7YtoF（配列番号11）

10

20

30

【化15】

GSMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL
 TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQ
 VSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSTTPAPRPPTPA
 PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
 RVKFSRSADAPAFKQGQNQLFNELNLGRREEFDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
 EGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALP
 PR

10

C D 1 9 s c F v - B B (配列番号12)

【化16】

GSMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL
 TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQ
 VSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSTTPAPRPPTPA
 PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

20

C D 1 9 s c F v - C D 3 e _ 2 Y t o F (配列番号13)

【化17】

GSMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGSDGNEEMGGIT
 QTPYKVSIISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSEL
 EQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDICITGGLLL
 LVYYWSKNRKA KAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDFEPIRKGQRDLFSG
 LNQRRI

30

40

【0540】

レンチウイルス產生及び一次T細胞へのウイルス形質導入

実施例1に記載されるようにレンチウイルスを產生し、単離された一次ヒトT細胞中に形質導入した。形質導入T細胞及び非形質導入対照T細胞を増殖させて後の分析のために凍結した。

【0541】

細胞傷害性及びIL2アッセイ

一次ヒトT細胞を標的腫瘍細胞に架橋することによって誘導された細胞傷害性及びIL2產生を実施例1に記載された通りに評価した。

50

【0542】

一次ヒトT細胞の結果

図16及び図17で観察することができるよう、従来のCARは、標的細胞及びIL2の産生の最大のT細胞に再指示された溶解を引き出すために機能的内因性ITAMシグナル伝達ドメインを必要とする。CD3が41BBで置き換えられているか、又はCD3中のITAMSを不活性化するために変異された構築物は、両方の要素を欠いていた。対照的に、図18及び図19は、fusTCAR活性が内因性機能的ITAMに特異的且つ無関係の両方であることを証明している。再指示された溶解の活性及びIL2分泌は、共刺激ドメインの存在若しくは非存在又は順番に無関係に観察された。さらに、シグナル伝達に関する重要なチロシンの突然変異又はCD3の細胞内ドメインの完全な除去のいずれもTCARの機能的インビトロ活性における明らかな損失をもたらさなかった。

【0543】

実施例4：ラパログスイッチを使用する調節可能なTCAR(rTCAR)(図20～24)

ラパログスイッチ仲介rTCAR構築物の合成

プラスミドDNAの対をDNA2.0によって外部的に合成した。名目上調節不可能なCAR構築物、CD19scFv-BBZ、配列番号1を対照として使用した。rTCARについて、様々なヘテロ二量体化ドメインをrTCAR構築物の異なるドメインに連結することができる。

【0544】

「rTCAR1」(図25)は、構築物の対を含む。第1の構築物では、CD19scFvをCD8ヒンジ及び膜貫通ドメイン、続いて共刺激ドメイン4-1BB及びC末端におけるFKBPでクローン化した(配列番号14)。対応する第2の構築物を、RAD001に対する向上した親和性を有する変異型FRBドメインをCD3のC末端においてリンカーに融合させることによって設計した(配列番号15)。「rTCAR2」(図26)は、構築物の対を含む。第1の構築物では、CD19scFvをCD8ヒンジ及び膜貫通ドメイン、続いて共刺激ドメイン4-1BB及びC末端におけるFKBPでクローン化した(配列番号14)。対応する第2の構築物を、RAD001に対する向上した親和性を有する変異型FRBドメインをCD3のC末端においてリンカーに融合させることによって設計した。さらに、CD3のITAMドメイン内の2つのチロシンをフェニルアラニンに変異させて、CD3から固有のシグナル伝達経路を除去し、シグナル伝達がTCR複合体全体から仲介されることを証明した(配列番号16)。

CD19scFV-BB-FKBP(配列番号14)

【化18】

GSATMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LNWyQQKPGQAPRLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
 QGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
 VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRTISKDNSKNQVSL
 KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSSTTPAPRPPTPAPTI
 ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYCSLK
 RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELMGVQVETISPGDGRTF
 PKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPDKFMLGKQEVRGWEVGVAQMSVG
 QRALKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

CD3e-FRB mutant(配列番号15)

10

20

30

40

【化19】

GSMQSGTHWRVLGLCLLSVGWQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP
 GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDAN
 FYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYWSKNRKA
AKPVTR
 GAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEPIRKQQRDLYSGLNQRRIGSGSGGSILWHEM
 WHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLME
 AQEWCRKYMKGNSVKDLLQAWDLYYHVFRISK

10

C D 3 e - Y t o F d o u b l e - F R B m u t a n t (配列番号16)

【化20】

GSMQSGTHWRVLGLCLLSVGWQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP
 GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDAN
 FYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYWSKNRKA
AKPVTR
 GAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEPIRKQQRDLYSGLNQRRIGSGSGGSILWHEM
 WHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLME
 AQEWCRKYMKGNSVKDLLQAWDLYYHVFRISK

20

【0545】

N F A T 活性化に対するラパログの用量応答

抗原結合ドメインの標的抗原エンゲージメント後のラパログ依存性シグナル活性化を証明するためのR C A R 構築物の能力を、実施例1に記載したようにN F A T - L U C レポーターを有するジャーカット細胞（J N L ）レポーター細胞株を用いて測定した。トランスフェクトされた細胞を標的プレートに1ウェル当たり100μlで添加し、様々な濃度のR A D 0 0 1と共に18時間共インキュベートした。ルシフェラーゼOne G lo 試薬100μlをウェルごとに添加した。試料を5分間インキュベートし、次いでルミネンスを記載の通りに測定した。

30

【0546】

トランスフェクトされたジャーカット（J N L ）細胞中のI L - 2 発現

J N L 細胞のトランスフェクション及び活性化を、37 、5 % のC O₂において40時間であるインキュベーションを除いてJ N L R G A アッセイで上記記載の通りに行つた。分泌されたI L 2 の測定を実施例1に記載の通りに実施した。

【0547】

結果

J N L 細胞への一過性トランスフェクションを介したr T C A R 1 の初期スクリーニングは、図27に示されるように、R A D 0 0 1 に仲介され、且つ抗原依存性のシグナル伝達及びI L 2 発現を証明した。後続の実験では、r T C A R 1 を、一過性にトランスフェクトされたC D 3 のI T A M シグナル伝達が対応するチロシンのフェニルアラニンへの突然変異によって無効にされているr T C A R 2 と比較した。r T C A R 2 についての低減したシグナル及び発現が予想されていたにも関わらず、R A D 0 0 1 による用量応答がレポーター遺伝子アッセイ及び抗原誘導I L 2 発現の両方においてr T C A R 1 及びr T C A R 2 について観察された（図28）。I T A M シグナル伝達ドメインを含有する構築物のトランスフェクションは、従って、r T C A R の活性にとって前提条件ではない。標的化ドメインをT C R 複合体と関連付けることにより、シグナル伝達は、複合体のすべてのメンバーを通して仲介され、標的化ドメインに融合されたシグナル伝達ドメインに由来することに排他的に限定されるものではない。

40

【0548】

50

実施例 6：切断型 C D 3 細胞外ドメインを介して T C R 複合体に融合された構成的活性型 T C A R (f u s T C A R)

抗 C D 3 モノクローナル抗体 O K T 3 の F a b フラグメントと複合体を形成する C D 3 及び の結晶構造 (K j e r - N i e l s e n e t . a l . , 2 0 0 4) 並びに抗 C D 3 モノクローナル A b U C H T 1 の s c F v と複合体を形成する C D 3 及び の結晶構造 (A r n e t t e t . a l . , 2 0 0 4) が報告されている。これらの構造は、と他の付属タンパク質との相互作用が、膜に近接する シートを通して仲介されることを証明している。従って、シートを含有する配列から構成される標的化ドメインの C D 3 細胞外ドメインの切断型への融合は、f u s T C A R 活性のための唯一の前提条件であり得る。

10

【 0 5 4 9 】

一過性発現

f u s T C A R 構築物の合成

プラスミド D N A を D N A 2 . 0 によって外部的に合成した。名目上調節不可能な C A R 構築物、C D 1 9 s c F v - B B Z 、配列番号 1 を対照として使用した。

【 0 5 5 0 】

「 f u s T C A R 5 」において、C D 1 9 s c F v を C D 3 細胞外及び膜貫通ドメインの N 末端切断型、続いて細胞内共刺激ドメイン 4 - 1 B B への N 末端融合体としてクローン化した(配列番号 1 7)。「 f u s T C A R 6 」、「 f u s T C A R 7 」及び「 f u s T C A R 8 」を「 f u s T C A R 5 」と同様にクローン化し、他の T C R 複合体メンバーとの相互作用の仲介において分子内ジスルフィド結合に関与すると思われない C D 3 中の 2 つの膜近位システインの役割を明らかにした。「 f u s T C A R 6 」(配列番号 1 8)について、第 1 のシステインをセリンに変異させた。「 f u s T C A R 7 」(配列番号 1 9)について、第 2 のシステインをセリンに変異させた。最後に、「 f u s T C A R 8 」(配列番号 2 0)について、両方のシステインをセリンに変異させた。この実施例でのすべての 4 つの構築物は、固有の細胞内 I T A M シグナル伝達ドメインを欠いている。

20

C D 1 9 s c F v - C D 3 e _ m i n i m a l E C D T M - 4 1 B B (配列番号 1 7)
【 化 2 1 】

GSATMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
LNWYQQKPGQAPRLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
QGNTLPYTFQGQGTKLEIKGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETYYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL
KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVSSGGGSPEDANFYLYL
YLRARVCENCMEMDVMsvATIVIDICITGGLLLVYYWSKGRGRKKLLYIFKQPFM
RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

30

C D 1 9 s c F v - C D 3 e _ m i n i m a l E C D - 1 s t C y s t o S e r - T M -
4 1 B B (配列番号 1 8)

40

【化22】

GSATMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
 QGNTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
 VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL
 KLSSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGGSPEDANFYLYLRARVSENCMEMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYWSKGRRKLLYIFKQPFM
 RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

10

C D 1 9 s c F v - C D 3 e _ m i n i m a l E C D T M - 2 n d C y s t o S e r - T M - 4 1 B B (配列番号19)

【化23】

GSATMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
 QGNTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
 VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL
 KLSSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGGSPEDANFYLYLRARVCENS MEMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYWSKGRRKLLYIFKQPFM
 RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

20

C D 1 9 s c F v - C D 3 e _ m i n i m a l E C D T M - 2 x C y s t o S e r - T M - 4 1 B B (配列番号20)

【化24】

GSATMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
 QGNTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
 VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL
 KLSSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGGSPEDANFYLYLRARVSENS MEMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYWSKGRRKLLYIFKQPFM
 RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

30

【0551】

ジャーカットレポーター細胞株のトランスフェクション及びN F A T の活性化

抗原結合ドメインの標的抗原エンゲージメント後の活性化を、実施例1に記載されたようにN F A T - L U C レポーターを含むジャーカット細胞(J N L)レポーター細胞株を用いて測定した。トランスフェクトされた細胞を標的プレートに1ウェル当たり100 μ lで添加した。ルシフェラーゼOne G lo試薬100 μ lをウェルごとに添加した。試料を5分間インキュベートし、次いでルミネセンスを記載されたように測定した。

40

【0552】

一過性発現の結果

標的依存性シグナル伝達は、切断型細胞外ドメインを使用する一過性発現されたf u s T C A Rで観察されなかった。その後のF A C 分析は、構築物の細胞表面上での検出可能な発現がないことを証明した。

【0553】

50

レンチウイルス形質導入一次ヒトT細胞の產生

低い発現がレポーター細胞株に特有であるかどうかを決定するために、単一の代表的な切断型融合構築物、fusTCAR6もCD19scFv-BBZに対する活性について一次ヒトT細胞中で試験した。

【0554】

レンチウイルス產生及び一次T細胞へのウイルス形質導入

実施例1に記載されるようにレンチウイルスを產生し、単離された一次ヒトT細胞中に形質導入した。形質導入T細胞及び非形質導入対照T細胞を増殖させて後の分析のために凍結した。

【0555】

細胞傷害性及びIL2アッセイ

一次ヒトT細胞を標的腫瘍細胞に架橋することによって誘導された細胞傷害性及びIL2產生を実施例1に記載された通りに評価した。

【0556】

一次ヒトT細胞の結果

図29で観察することができるよう、fusTCAR6は、対照CD19scFv-BBZ CARに対して匹敵する細胞溶解活性を証明した。ITAMシグナル伝達ドメインの非存在にも関わらず、再指示された溶解の活性が観察されたことに留意することが重要である。対照的に、図30に示すように、fusTCAR6は、IL2発現の低減をもたらした。構築物のさらなる最適化が、シートを安定化させるため又は切断型CD3とTCRの残りの内因性構成要素との相互作用を改善するためのいずれかに必要である。それにも関わらず、この結果は、CD3の細胞外領域の細胞外ドメイン全体が細胞溶解活性を維持するために必要とされるわけではないことを証明した。

【0557】

実施例7：代替的共刺激ドメインを有するCD3を介してTCR複合体に融合された構成的活性型TCAR

従来のCARは、4-1BB以外の代替的共刺激ドメインで機能的であることが証明されている。

【0558】

レンチウイルス形質導入一次ヒトT細胞の產生

fusTCAR構築物の合成

プラスミドDNAをDNA2.0によって外部的に合成する。名目上調節不可能なCAR構築物、CD19scFv-BBZ、配列番号1を対照として使用し、「fusCAR3」をTCAR対照として使用する（配列番号9）。

【0559】

以下の表に列挙されたfusTCARにおいて、CD19scFvをCD3細胞外及び膜貫通ドメイン、続いて細胞内共刺激ドメインへのN末端融合体として指定通りにクローニングする。「fusTCAR9」～「fusTCAR13」は、固有の細胞内ITAMシグナル伝達ドメインを欠いている。

【0560】

10

20

30

40

【表7】

“FusTCAR”	共刺激ドメイン	配列番号
fusTCAR9	CD27	21
fusTCAR10	CD28	22
fusTCAR11	OX40	23
fusTCAR12	ICOS	24
fusTCAR13	CD2	25

10

【0561】

C D 1 9 s c F v - C D 3 e E C D T M - C D 2 7 (配列番号21)

【化25】

GSMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSGGGSDGNEEMGGIT
 QTPYKVSIGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSEL
 EQSGYYCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDICITGGLL
 LVYYWSQRRKYRSNKGESPVPAEPC
 HYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

20

C D 1 9 s c F v - C D 3 e E C D T M - C D 2 8 (配列番号22)

【化26】

30

GSMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSGGGSDGNEEMGGIT
 QTPYKVSIGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSEL
 EQSGYYCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDICITGGLL
 LVYYWSRSKRSRLLHSDYMNMTPRRGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

40

C D 1 9 s c F v - C D 3 e E C D T M - O X 4 0 (配列番号23)

【化27】

GSMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWQGTLTVSSGGGSDGNEEMGGIT
 QTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSEL
 EQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDICITGGLLL
 LVYYWSRRDQRLLPPDAHKPPGGGSFRTPHQEEQADAHSTLAKI

C D 1 9 s c F v - C D 3 e E C D T M - I C O S (配列番号24)

【化28】

GSMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWQGTLTVSSGGGSDGNEEMGGIT
 QTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSEL
 EQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDICITGGLLL
 LVYYWSTKKYSSSVHDPNGEYMFRAVNTAKKSRLTDVTL

C D 1 9 s c F v - C D 3 e E C D T M - C D 2 (配列番号25)

【化29】

GSMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWQGTLTVSSGGGSDGNEEMGGIT
 QTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSEL
 EQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDICITGGLLL
 LVYYWSKRKKQRSRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPATSQHPPPP
 PGHRSQAPSHRPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVHQKGPPPLPRPRVQPKPPHGA
 AENSLSPSSN

【0562】

レンチウイルス産生及び一次T細胞へのウイルス形質導入

実施例1に記載されるようにレンチウイルスを産生し、単離された一次ヒトT細胞中に形質導入した。形質導入T細胞及び非形質導入対照T細胞を増殖させて後の分析のために凍結した。

【0563】

細胞傷害性及びIL2アッセイ

一次ヒトT細胞を標的腫瘍細胞に架橋することによって誘導された細胞傷害性及びIL2産生を実施例1に記載された通りに評価した。

10

20

30

40

50

【0564】

一次ヒトT細胞の結果

図31及び図32は、fusTCARが任意の共刺激ドメインと共に使用され得、構築物内のITAMドメインの欠如にも関わらず、標的依存性細胞溶解活性をなお維持し、且つIL2発現を誘導することができることを証明している。

【0565】

実施例8：CD3、CD3及びCD3を介してTCR複合体に融合された構成的活性型TCAR(fusTCAR)

TCR複合体の複雑な多タンパク質構造を考慮に入れると、TCARについての活性は、CD3との共有結合及び非共有結合融合に限定されるものではなく、例えばCD3、CD3及びCD3などの複合体中の他の付属タンパク質との非共有結合及び共有結合融合も活性TCARを产生することができる。さらに、免疫シナプスは、標的細胞とT細胞との間の距離によって仲介され得るため、腫瘍標的化アームと、これらの付属タンパク質との融合体との間の異なる長さのリンカーを使用することにより、最適な長さを仲介することが必要となり得る。10

【0566】

一過性発現及び活性化アッセイ

fusTCAR構築物の合成

プラスミドDNAをDNA2.0によって外部的に合成する。名目上調節不可能なCAR構築物、CD19scFv-BBZ、配列番号1を対照として使用する。20

【0567】

「fusTCAR14」では、CD19scFvをCD3細胞外及び膜貫通ドメイン、続いて細胞内共刺激ドメイン4-1BBへの2xG4Sリンカー（配列番号62）とのN末端融合体としてクローニングする（配列番号26）。「fusTCAR15」（配列番号27）を、scFvとCD3細胞外ドメインとの間のリンカーが4xG4Sリンカー（配列番号45）であることを除いて、同様にクローニングする。

【0568】

「fusTCAR16」では、CD19scFvをCD3細胞外及び膜貫通ドメイン、続いて細胞内共刺激ドメイン4-1BBへのN末端融合体としてクローニングした（配列番号28）。「fusTCAR17」（配列番号29）及び「fusCAR18」（配列番号30）を、scFvとCD3細胞外ドメインとの間でそれぞれ2xG4S（配列番号62）及び4xG4S（配列番号45）リンカーを用いたことを除いて同様にクローニングした。30

【0569】

「fusTCAR19」では、CD19scFvをCD3細胞外及び膜貫通ドメイン、続いて細胞内共刺激ドメイン4-1BBへのN末端融合体としてクローニングした（配列番号31）。「fusTCAR20」（配列番号32）及び「fusTCAR21」（配列番号33）を、scFvとCD3細胞外ドメインとの間でそれぞれ2xG4S（配列番号62）及び4xG4S（配列番号45）リンカーを用いたことを除いて同様にクローニングした。40

CD19scFv-CD3e_2G4S_ECDTM-41BB（配列番号26 / 配列番号62として開示された「2G4S」）

【化30】

GSMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGSGGGSDGNEE
 MGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSL
 KEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMsvATIVIDICI
 TGGLLLLVYYWSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

C D 1 9 s c F v - C D 3 e _ 4 G 4 S _ E C D T M - 4 1 B B (配列番号27 / 配列番号45として開示された「4 G 4 S」)

【化31】

GSMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFQGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGSGGGSGGGSGGGGS
 GGGGSDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDK
 NIGSDEDHSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVM
 SVATIVIDICITGGLLLVYYWSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
 EEEGGCEL

C D 1 9 s c F v - C D 3 d _ E C D T M - 4 1 B B (配列番号28)

【化32】

GSATMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LN W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y H T S R L H S G I P A R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P E D F A V Y F C Q
 Q G N T L P Y T F Q G Q G T K L E I K G G G G S G G G S G G G S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T
 V S G V S L P D Y G V S W I R Q P P G K G L E W I G V I W G S E T T Y S S S L K S R V T I S K D N S K N Q V S L
 K L S S V T A A D T A V Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D Y W G Q G T L T V S S G G G S F K I P I E E L E D
 R V F V N C N T S I T W V E G T V G T L L S D I T R L D L G K R I L D P R G I Y R C N G T D I Y K D K E S T V Q V
 H Y R M C Q S C V E L D P A T V A G I I V T D V I A T L L A L G V F C F A K R G R K K L L Y I F K Q P F M R P V
 Q T T Q E E D G C S C R F P E E E E G G C E L

C D 1 9 s c F v - C D 3 d _ 2 G 4 S _ E C D T M - 4 1 B B (配列番号29 / 配列番号62として開示された「2 G 4 S」)

10

20

30

40

【化33】

GSMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFQGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSKIPIEE
 LEDR VFVN CNTSITW VEGT VGTL SDIT RL DLGKRILD PRGIYRCNG TDYKDKEST
 VQVHYRMCQSCVELDPATVAGII VTDVIATLLLALGVFCFAKGRKKLLYIFKQPF
 MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

10

C D 1 9 s c F v - C D 3 d _ 4 G 4 S _ E C D T M - 4 1 B B (配列番号30 / 配列番号45として開示された「4 G 4 S」)

【化34】

GSMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFQGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSGGGGS
 GGGGSFKIPIEELEDR VFVN CNTSITW VEGT VGTL SDIT RL DLGKRILD PRGIYRCN
 GTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGII VTDVIATLLLALGVFCFAKGRGR
 KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

20

C D 1 9 s c F v - C D 3 g E C D T M - 4 1 B B (配列番号31)

【化35】

GSATMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKY
 LN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ
 QGNTLPYTFQGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCT
 VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSL
 KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGSQSIKGHNHLV
 K VYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMY
 QCKGSQNKS KPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAKGRK
 KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

30

40

C D 1 9 s c F v - 2 G 4 S _ C D 3 g E C D T M - 4 1 B B (配列番号32 / 配列番号62として開示された「2 G 4 S」)

【化36】

GSMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGSQSIKG
 NHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKWNLGSNAKDP
 RGMYQCKGSQNKSPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAK
 RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

C D 1 9 s c F v - 4 G 4 S _ C D 3 g E C D T M - 4 1 B B (配列番号33 / 配列番号45として開示された「4 G 4 S」)

【化37】

GSMALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
 NTLPYTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL
 SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGSQGGGS
 GGGGSQSIKGHNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKK
 WNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIF
 VLAVGVYFIAKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

【0570】

ジャーカットレポーター細胞株のトランスフェクション及びN F A Tの活性化

抗原結合ドメインの標的抗原エンゲージメント後の活性化を、実施例1に記載されたようにN F A T - L U C レポーターを含むジャーカット細胞（J N L）レポーター細胞株を用いて測定した。トランスフェクトされた細胞を標的プレートに1ウェル当たり100 μlで添加した。ルシフェラーゼOne G10試薬100 μlをウェルごとに添加した。試料を5分間インキュベートし、次いでルミネセンスを記載されたように測定した。

【0571】

一過性トランスフェクションの結果

図33は、T C A Rが機能的であり、C D 3 又はC D 3 のいずれかが構築物中の融合体に使用されるかに無関係にN F A T経路を介するシグナル伝達をもたらすことを証明している。さらに、所望の結果を得るために、様々な長さのリンカーを用いて結合ドメインをT C A Rの残部に融合させ得る。C D 3 に融合させた構築物は、F A C Sに基づくとレポーター細胞の細胞表面上で一過性発現せず、このアプローチに基づくこれらの好適性に関する決定を行うことができず、評価を一次ヒトT細胞に代えて行った。

【0572】

レンチウイルス形質導入一次ヒトT細胞の產生

f u s T C A Rは、それらの活性について一次ヒトT細胞中でも試験した。レンチウイルスの產生前に、追加の構築物を、C D 3 の細胞外及び膜貫通ドメインをその細胞内ドメインの非存在下で使用することができるかを試験するために設計した。プラスミドD N AをD N A 2 . 0によって外部的に合成した。「f u s T C A R 2 2」では、C D 1 9 s c F vをC D 3 細胞外及び膜貫通ドメイン、続いて細胞内共刺激ドメイン4 - 1 B BへのN末端融合体としてクローン化した（配列番号34）。

10

20

30

40

50

C D 1 9 s c F v - C D 3 z E C D T M - 4 1 B B (配列番号 3 4)

【化 3 8】

GSMALPVTA L L P L A L L H A A R P E I V M T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q D I S K Y L N
WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG
NTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRTISKDNSKNQVSLKL
SSVTAADTA VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTSSGGGSQSFGLDPKLC
YLLDGILFIYGVILTALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG

10

CEL

【0 5 7 3】

レンチウイルス産生及び一次T細胞へのウイルス形質導入

実施例1に記載されるようにレンチウイルスをf u s T C A R 3、f u s T C A R 1 6、f u s T C A R 1 9及びf u s T C A R 2 2に対して産生し、単離された一次ヒトT細胞中に形質導入した。形質導入T細胞及び非形質導入对照T細胞を増殖させて後の分析のために凍結した。

【0 5 7 4】

細胞傷害性及びI L 2 アッセイ

一次ヒトT細胞を標的腫瘍細胞に架橋することによって誘導された細胞傷害性及びI L 2 産生を実施例1に記載された通りに評価した。

20

【0 5 7 5】

一次ヒトT細胞の結果

図34及び図35で観察することができるよう、C D 3 、C D 3 及びC D 3 上のf u s T C A R は、対照C D 1 9 s c F v - B B Z C A Rに対して明らかな活性を証明した。I T A Mシグナル伝達ドメインの非存在にも関わらず、再指示された溶解活性及びI L 2 分泌が観察されたことに留意することが重要である。対照的に、図36に示されるように、C D 3 上のf u s T C A R は、低減された溶解活性をもたらした。F A C S 分析は、この構築物に関する低い細胞表面発現がT C Rの構造及び腫瘍標的化ドメインの付加による可能性が高く、構築物設計の追加の最適化が発現を改善し、且つ活性を最大化するために必要であることを証明した。

30

【0 5 7 6】

実施例9：代替的結合ドメインを有するC D 3 を介してT C R複合体に融合された構成的活性型T C A R

T C A Rは、様々な結合ドメイン及び標的抗原を使用して、固体腫瘍及び血液腫瘍に対する幅広い適用性を証明するべきである。メソテリンは、広範囲の腫瘍型で発現される興味深い1つの抗原である。

【0 5 7 7】

f u s T C A R構築物の合成

40

プラスミドD N AをD N A 2 . 0によって外部的に合成する。名目上調節不可能なC A R構築物、M S L N 5 s c F v - B B Z、配列番号35を対照として使用する。

【0 5 7 8】

「f u s T C A R 2 3」では、C D 1 9 s c F vをC D 3 細胞外及び膜貫通ドメイン、続いて細胞内共刺激ドメイン4 - 1 B BへのG 4 Sリンカー（配列番号52）とのN末端融合体としてクローニングする（配列番号36）。「f u s T C A R 2 5」を、C D 8 a リンカーがC D 3 細胞外及び膜貫通ドメイン、続いて4 - 1 B BのN末端に融合するために使用されたことを除いて同様にクローニングした（配列番号37）。

【0 5 7 9】

「f u s T C A R 2 5」をC D 3 細胞外及び膜貫通ドメイン、続いて細胞内共刺激ド

50

メイン C D 2 7 の G 4 S リンカー（配列番号 5 2 ）との N 末端融合体としてクローン化した（配列番号 3 8 ）。「 f u s T C A R 2 3 」、「 f u s T C A R 2 4 」及び「 f u s T C A R 2 5 」は、固有の細胞内 I T A M シグナル伝達ドメインを欠いている。

M S L N 5 s c F v - B B Z (配列番号 3 5)

【化 3 9 】

GSMALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDY
 YMHWVRQAPGQGLEWMGINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR
 LRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGTLTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSDIV
 MTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKTTTPAPRPPPTAP
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCK
 RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEESEGCGELRVKFSRSADAPAYKQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLKDERRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE
 AYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

M S L N 5 s c F v - C D 3 e E C D T M - 4 1 B B (配列番号 3 6)

【化 4 0 】

GSMALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDY
 YMHWVRQAPGQGLEWMGINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR
 LRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGTLTVSSGGGGGGGGGGGGGGSDIV
 MTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKGGGGSDGNEEM
 GGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKE
 FSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDICITG
 GLLLL VYYWSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEESEGCGEL

M S L N 5 s c F v - C D 8 h i n g e - C D 3 e E C D T M - 4 1 B B (配列番号 3 7)

【化 4 1 】

GSMALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHW
 VRQAPGQGLEWMGINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRISLRSDDTAVYY
 CASGWDFDYWGQGTLTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRV
 TITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRSGSGSGTDFTLTISLQPEDF
 ATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKTTTPAPRPPPTAPIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGL
 DTGGGSDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSD
 EDHSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMDVMSVATIVIDIC
 ITGGLLL VYYWSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEESEGCGEL

M S L N 5 s c F v - C D 3 e E C D T M - C D 2 7 (配列番号 3 8)

10

20

30

40

【化42】

GSMALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDY
 YMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR
 LRSDDTAVYYCAGWDFDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGGSDIV
 MTQSPSSLASVGDRVTITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKGGGGSDGNEEM
 GGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKE
 FSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITG
 GLLLL VYYWSQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACS
 P

10

【0580】

レンチウイルス産生及び一次T細胞へのウイルス形質導入

実施例1に記載されるようにレンチウイルスを産生し、単離された一次ヒトT細胞中に形質導入した。形質導入T細胞及び非形質導入対照T細胞を増殖させて後の分析のために凍結した。

20

【0581】

細胞傷害性及びIL2アッセイ

一次ヒトT細胞を標的腫瘍細胞に架橋することによって誘導された細胞傷害性及びIL2産生を実施例1に記載された通りに評価した。天然にメソテリンを過剰発現し、ホタルルシフェラーゼで形質導入されたOVCA R 8を、標的細胞株として代用した。

30

【0582】

一次ヒトT細胞の結果

CD19標的化TCARを利用する他の実施例と同様に、メソテリン抗原を標的とするTCARは、強力な細胞傷害性分子である。エンゲージメント時の細胞傷害性活性及びIL2発現（それぞれ図37及び38）は、ITAMを活性のための前提条件として必要とせず、両方のCD27及び4-1BB細胞内共刺激ドメインは、良好な機能活性を証明した。図39及び40に示されるように、腫瘍標的化ドメインとTCR付属タンパク質との間のリンクは、TCARの機能活性を調節することができ、且つ所望の特性を得るために調整され得る。

【0583】

実施例10：メソテリン及びCD19を標的とするTCAR

キメラ膜タンパク質構築物の合成

プラスミドDNAをDNA2.0によって外部的に合成する。名目上調節不可能なCAR構築物、MSLN5scFv-BBZ、配列番号35及び/又は名目上調節不可能なCAR構築物、CD19scFv-BBZ、配列番号1を対照として使用する。前の実施例で記載されたキメラ膜タンパク質に加えて、以下のキメラ膜タンパク質も使用される。

40

MSLN5scFv-CD3dECDTM-41BB（配列番号63）

【化43】

GSMALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDY
 YMHWVRQAPGQGLEWMGINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR
 LRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIV
 MTQSPSSLASVGDRVITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPS
 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKGGGGSFKIPIEEL
 EDRVFCNCNTSITWVEGTVGTLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTV
 QVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAKRGKKLLYIFKQPFM
 RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

10

M S L N 5 s c F v - C D 3 g E C D T M - 4 1 B B (配列番号64)

【化44】

GSMALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDY
 YMHWVRQAPGQGLEWMGINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR
 LRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIV
 MTQSPSSLASVGDRVITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPS
 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKGGGGSQSIKGHN
 LVKVDYQEDGSVLLCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKWNLGSAKDPRG
 MYQCKGSQNKSPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAKRG
 RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

20

M S L N 5 s c F v - C D 3 g (全体) (配列番号65)

【化45】

GSMALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDY
 YMHWVRQAPGQGLEWMGINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR
 LRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIV
 MTQSPSSLASVGDRVITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPS
 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKGGGGSQSIKGHN
 LVKVDYQEDGSVLLCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKWNLGSAKDPRG
 MYQCKGSQNKSPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAQGQ
 DGVRQSRASDKQTLLPDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN

30

40

M S L N 5 s c F v - C D 3 g (全体) - 4 1 B B (配列番号66)

【化46】

GSMALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDY
 YMHWVRQAPGQGLEWMGINPNNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR
 LRSDDTAVYYCAGWDFDYWGQGTLTVSSGGGSGGGSGGGGSGGGSDIV
 MTQSPSSLASAVGDRVTITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPS
 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKGGGSQSICKNH
 LVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKWNLGSNAKDPRG
 MYQCKGSQNKSQPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQ
 DGVRQRSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRNKRGRKKLLYIFK
 QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

10

M S L N 5 s c F v - C D 3 e (全体) - 4 1 B B (配列番号 6 7)

【化47】

GSMALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDY
 YMHWVRQAPGQGLEWMGINPNNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR
 LRSDDTAVYYCAGWDFDYWGQGTLTVSSGGGSGGGSGGGGSGGGSDIV
 MTQSPSSLASAVGDRVTITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPS
 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKGGGSDGNEEM
 GGITQTPYKVSISGTTVILTCPYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKE
 FSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITG
 GLLLVLVYYWSKNRKA KAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQR
 DLYSGLNQRRIKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

20

【0584】

30

レンチウイルス産生及び一次T細胞へのウイルス形質導入

実施例1に記載されるようにレンチウイルスを産生し、単離された一次ヒトT細胞中に形質導入した。形質導入T細胞及び非形質導入対照T細胞を増殖させて後の分析のために凍結する。細胞を、下記のようにCD19標的化キメラ分子と、メソテリン標的化キメラ分子とをコードするレンチウイルスで形質導入し、CD19標的化キメラ分子のみ若しくはメソテリン標的化キメラ分子のみをコードするレンチウイルスで形質導入された細胞又は非形質導入細胞と比較した。以下の構築物をコードするレンチウイルスで形質導入された細胞を生成し、以下に記載のアッセイで試験する。

【0585】

【表8】

細胞ID	CD19 標的化キメラ分子	メソテリン標的化キメラ分子
陰性対照	なし	なし
CD19 対照	配列番号 8	なし
メソテリン対照	なし	配列番号 67
CD19-e-BB/MESO-g-なし	配列番号 28	配列番号 65
CD19-e-28/MESO-g-なし	配列番号 22	配列番号 65
CD19-e-none/MESO-d-BB	配列番号 7	配列番号 63
CD19-e-none/MESO-g-BB	配列番号 7	配列番号 64
CD19-e-28/MESO-d-BB	配列番号 22	配列番号 63
CD19-e-28/MESO-g-BB	配列番号 22	配列番号 64
CD19-d-BB/MESO-g-なし	配列番号 28	配列番号 65
CD19-d-BB/MESO-g-BB	配列番号 28	配列番号 64
CD19-g-BB/MESO-d-BB	配列番号 31	配列番号 63

10

20

【0586】

細胞傷害性及びIL2アッセイ

標的腫瘍細胞に応答して、この実施例のように操作されたヒトT細胞によって誘導された細胞傷害性及びIL2産生を実施例1に記載された通りに評価する。ホタルルシフェラーゼで形質導入されたNa1m6(CD19+)、OVCA R8(メソテリン+)又はNa1m6とOVCA R8との組み合わせを標的細胞株として使用し、K562(ホタルルシフェラーゼで形質導入されたCD19-及びメソテリン-(陰性対照))と比較する。

【0587】

実施例11：2つの異なるTCARを発現するT細胞は、二重特異性を示す

CD22に対する特異性を有するTCAR(CD22-65scFv-G4S-CD3e ECDTM-41BB、「CD22 TCAR」、配列番号73)及びCD19に対する特異性を有するTCAR(CD19scFv-G4S-CD3g ECDTM-41BB、「CD19-TCAR」、配列番号72)をレンチウイルスCAR発現ベクター中にクローン化した。2つの異なる特異性を有するTCARを発現するT細胞が、標的タンパク質のいずれか又は両方を発現する標的細胞にも特異的応答を及ぼしたかどうかを試験した。

30

【0588】

TCARレンチウイルスの生成

TCARをコードするレンチウイルス輸送ベクターを用いて、VSVgシュードタイプ化レンチウイルス粒子中にパッケージされたゲノム物質を生成した。TCARをコードするレンチウイルス輸送ベクターDNAを、Lenti-X 293T細胞をトランسفクトするためのリポフェクタミン2000試薬(Clontech)と組み合わせて、3つのパッケージング構成要素VAVg、gag/pol及びrevと混合し、続けて12~18時間後に培地交換した。培地交換から30時間後に培地を採取し、濾過し、Lenti-X濃縮器(Clontech)を用いて濃縮し、小分けにして-80°で保存した。

40

【0589】

TCAR JNL細胞の生成

ジャーカットNFKATルシフェラーゼ(JNL)レポーター細胞株は、急性T細胞白血

50

病ジャーカット細胞株に基づいている。この細胞株を、活性化T細胞核内因子（NFKB）応答エレメントの制御下でルシフェラーゼを発現するように改変した。TCARによる形質導入について、12ウェルプレートの400,000個のJNL細胞／ウェルを1.5の多重感染度（MOI）で形質導入した。凍結したウイルス含有上清を室温で解凍し、それぞれのウェルに添加した。それぞれ1つのウェルにそれぞれMOI=1.5で、CD19-TCAR、CD22-TCAR又はCD19-TCAR+CD22-TCAR（「CD19/22二重TCAR」）を導入した。プレートを6日間培養した。

【0590】

単一T細胞上の2つのTCARの機能発現の評価

TCAR発現T細胞をそれらの標的結合能力についてフローサイトメトリーにより試験した。非形質導入（UTD）JNL細胞、CD19-TCAR、CD22-TCAR及び

CD19/22二重TCARを発現するJNL細胞を試験し、細胞をCD22-Fcで4において30分間染色した。洗浄後、細胞を抗Fc二次抗体で4において30分間染色した。2回目の洗浄後、細胞をCD19-CAR抗イディオタイプ抗体（Ab）で4において30分間染色した。次いで、最後の洗浄後にFACSLSRFortessaで細胞を分析した。データは、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。UTD

JNL細胞は、染色試薬のいずれにも結合せず、CD22-Fcの低い結合をバックグラウンド結合として解釈した（図47A）。CD19-TCAR発現細胞は、CD19-CAR抗イディオタイプAb染色によって検出されたようにTCARの正確な折り畳み及び発現を示した一方、CD22-Fcに結合しなかった（図47B）。CD22-TCAR発現細胞は、CD22-Fcに結合したが、CD19-CAR抗イディオタイプAbで染色されなかった（図47C）。対照的に、両方のウイルス、CD19/22二重TCARで形質導入されたJNL細胞は、CD22に結合し、且つCD19-CAR抗イディオタイプの結合を示した（図47D）。

【0591】

TCARに再指示されたJNL細胞の有効性

TCARの機能的能力を評価するために、非形質導入JNL細胞及び1つ又は両方のTCARコードウイルスで形質導入された細胞を標的癌細胞と共に培養し、ルシフェラーゼ発現を定量化することにより、それらの活性化を読み出した。JNL CART細胞を、CD19又はCD22を過剰発現する慢性骨髄性白血病（CML）細胞株K562と共に培養した。親K562細胞株は、陰性対照として機能した。共培養を384ウェルプレートにおいて1:3、1:1及び1:0.3のエフェクター対標的（E:T）比で設定し、24時間インキュベートし、その後、活性化JNL TCAR T細胞によるルシフェラーゼの発現をbrightelite plus Reporter Gene Assay System（PerkinElmer, Waltham, MA）によって定量化した。各ウェルからの発光の量（ルミネセンス）は、それぞれのTCARによるJNL活性化の直接読み出しであった。CD19/22二重TCAR細胞は、両方のCD19発現及びCD22発現K562細胞によって活性化され、それらの二重特異性を証明した（図48A及び48B）。二重TCAR T細胞の活性化の程度は、それぞれの抗原による单一TCAR細胞の活性化に非常に類似しており、すなわち、CD19 TCAR細胞は、K562-CD19によって活性化され、且つCD22 TCARは、K562-CD22によって活性化された。单一TCAR細胞は、非同族抗原によって活性化されなかつた（図48A及び48B）。また、親K562細胞株は、TCARのいずれの活性もたらさず、それらの特異性を証明した（図48C）。

【0592】

結論

2つの異なるTCARをコードするウイルスで形質導入されたJNL細胞は、2つの正確に折りたたまれたTCARを細胞表面上で同時に発現することができた。これは、CD19/22二重TCAR細胞のCD22-Fcに結合する能力及びCD19-CAR抗イディオタイプ抗体による染色によって証明された（図47D）。細胞表面上の発現に加え

10

20

30

40

50

て、T CARは、JNLの標的依存性活性化を仲介した(図48A及び48B)。CD19/22二重T CAR細胞のみが両方のK562-CD19及びCD22によって活性化され、これらの細胞の二重特異性を証明した(48A及び48B)。

【0593】

実施例12：2つの異なるT CARを発現するT細胞のインビトロ及びインビボでの検討

ヒトリンパ球を対象から採取し、生体外に提供し、抗CD3/CD28ビーズを使用して刺激し、EF1プロモーターの制御下でT CARをコードする1つ又は2つのレンチウイルスベクターで形質導入した。異なる特異性を有する2つのT CARをこの実験で使用し、一方は、CD19に対して特異的なT CARであり、他方は、CD22に対して特異的なT CARであった。T細胞は、これらのT CARのいずれかをコードする1つのベクター又は両方のベクターで同時に形質導入される。加えて、単一のビシストロニック(bisistronic)レンチウイルスベクターを構築し、これは、すべてEF1プロモーターの制御下において、介在するP2A部位を伴うCD19 T CAR及びCD22

T CARの両方をコードし、単一のウイルスによる形質導入で二重T CAR細胞の生成を可能にするものである。T CAR T細胞の増殖、サイトカイン放出及び細胞傷害性を、本明細書に開示された方法を使用して(例えば、国際公開第2014/130657号パンフレットに記載されるように)、CD19+/CD22-細胞、CD19-/CD22+細胞、CD19+/CD22+細胞及びCD19-/CD22+細胞とCD19+/CD22+細胞とを含む細胞の集団に対してアッセイする。定着腫瘍を有する免疫不全NOD/SCID/共通鎖マウスに細胞を静脈内投与することにより、細胞をインビボでさらにアッセイする(増殖、長期持続性及び腫瘍毒性、例えば国際公開第2014/130657号パンフレットに記載された方法によって)。インビトロでのアッセイについて、CD19+/CD22-細胞、CD19-/CD22+細胞、CD19+/CD22+細胞及びCD19-/CD22+細胞とCD19+/CD22+細胞とを含む細胞の集団を試験する。CAR T細胞の持続性、増殖/拡大及び抗腫瘍効果を監視する。二重T CARが、それぞれの抗原の1つのみ又は両方を発現する癌細胞の混合集団からなる腫瘍を拒絶することができるかどうかを検討する。

【0594】

均等物

本明細書に引用するそれぞれの及び全ての特許、特許出願及び刊行物の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本発明は、具体的な態様を参照して開示しているが、本発明の他の態様及び変形形態は、本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱することなく他の当業者によって考案され得ることが明らかである。下記の特許請求の範囲は、全てのこのような態様及び均等な変形形態を含むと解釈されることを意図する。

10

20

30

【図1】

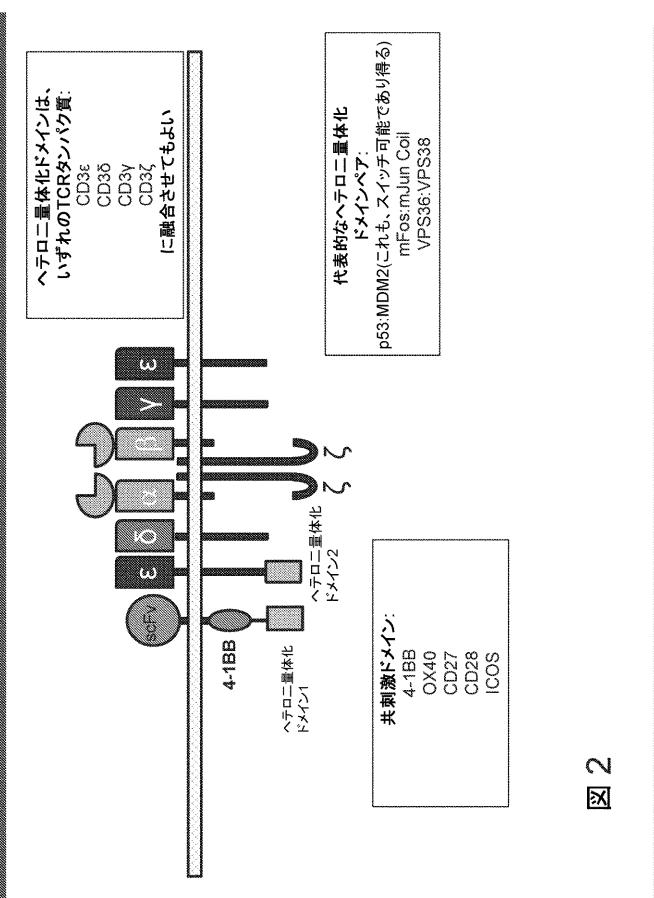
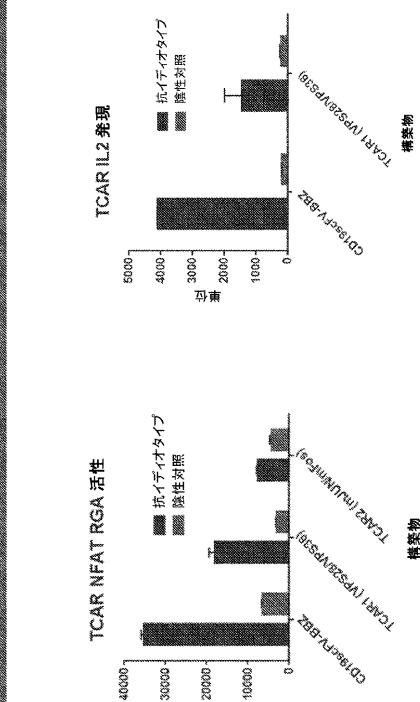


図1

【図2】



【図3】

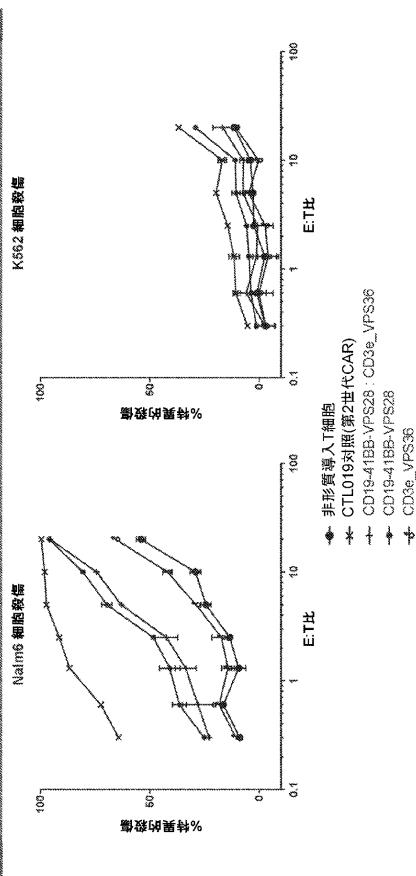


図3

【図4】

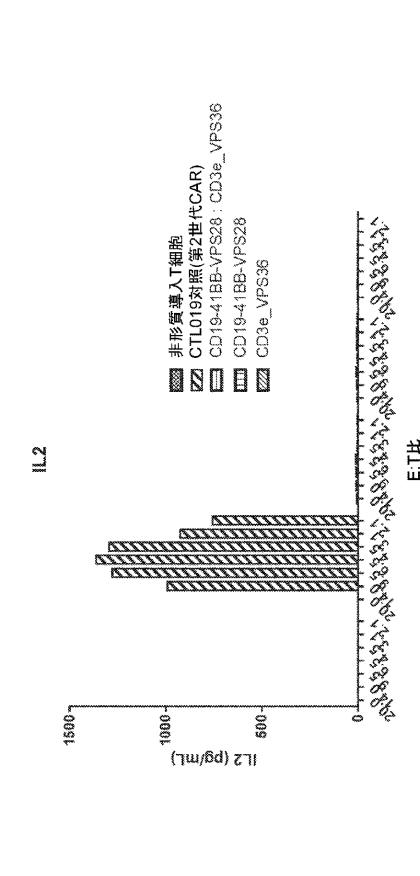
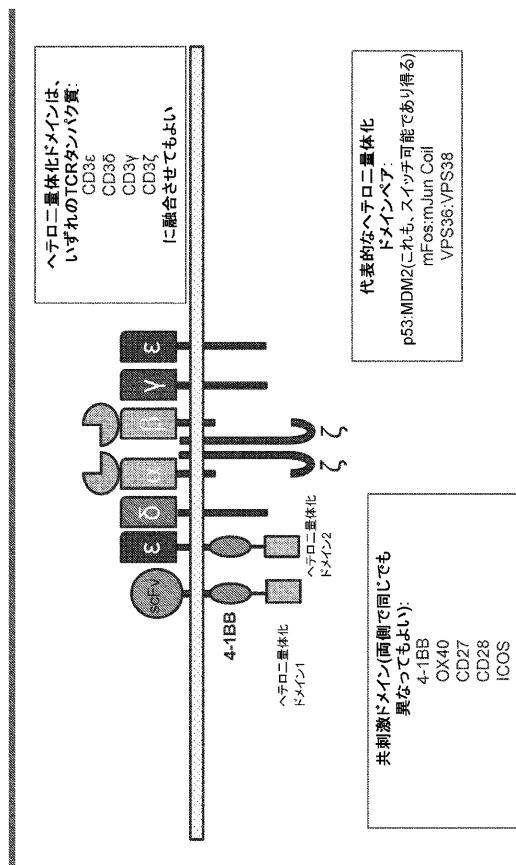
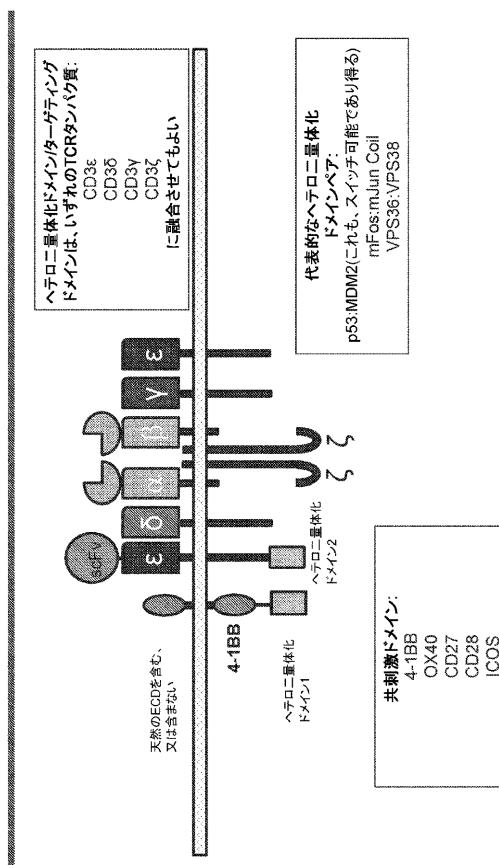


図4

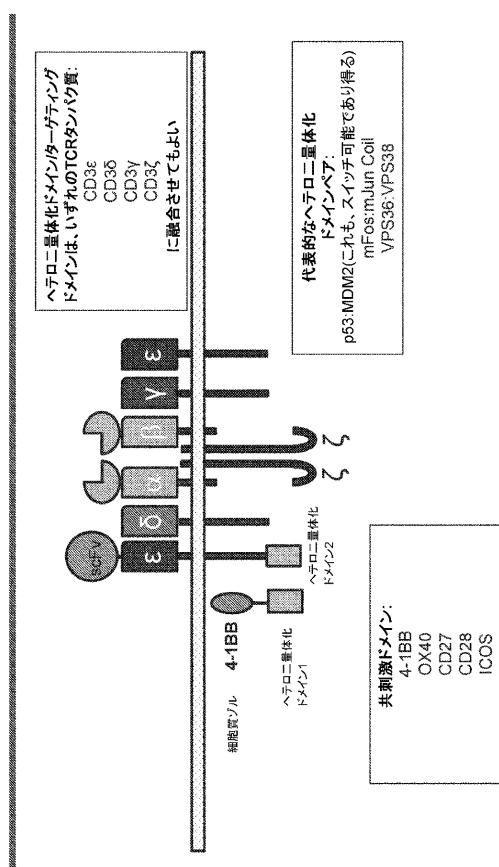
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

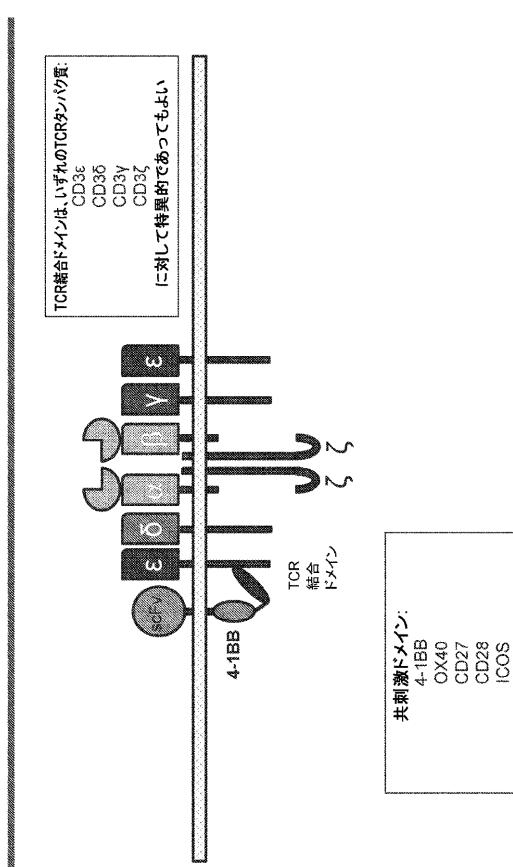
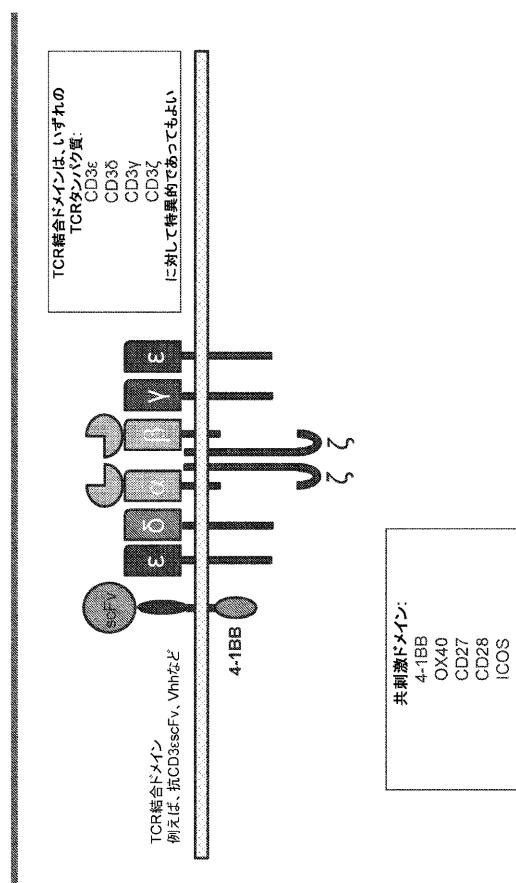


図7

図8

【図 9】



【図 11】

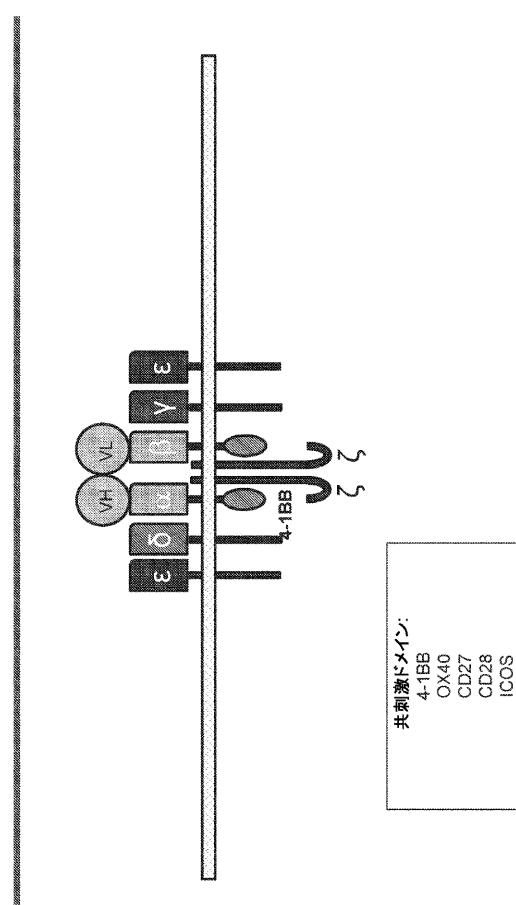


図 11

【図 10】

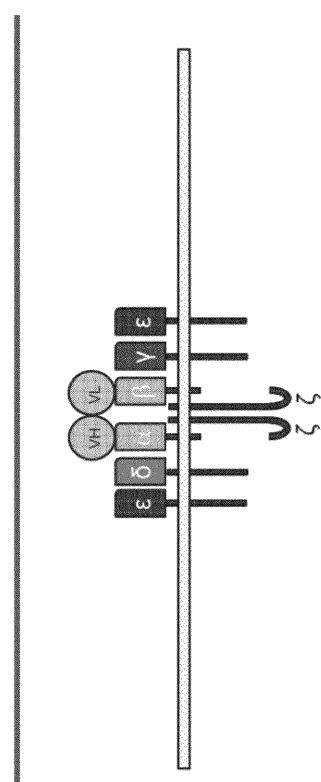


Fig. 10

【図 12】

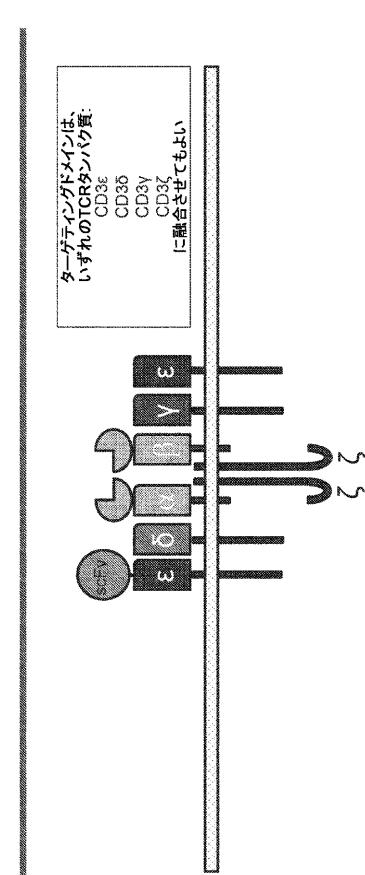
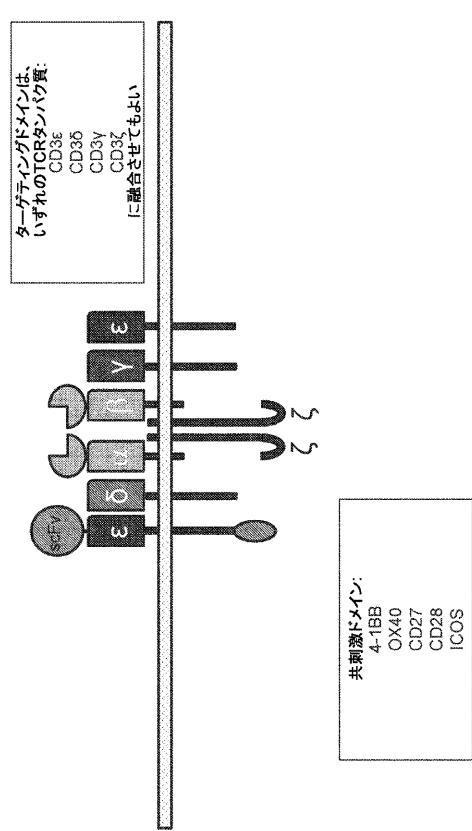


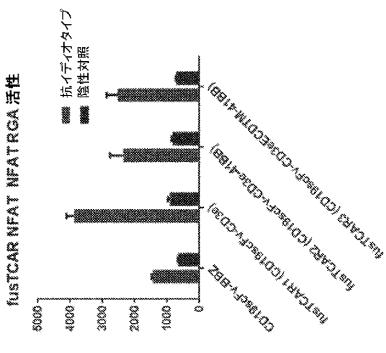
図 12

【図13】



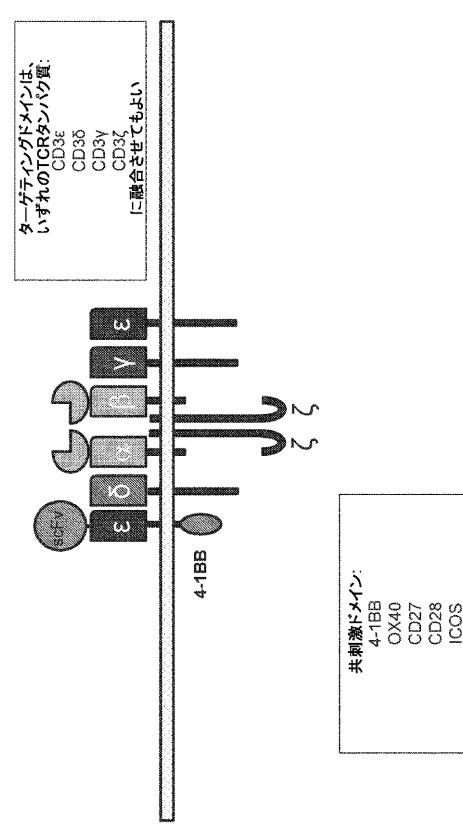
13
四

【 図 1 5 】



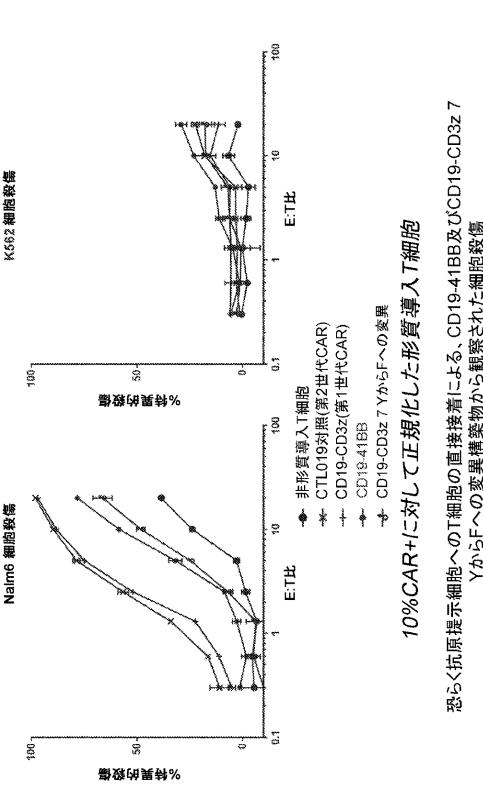
15

【図14】



14

【図16】



16

【図 17】

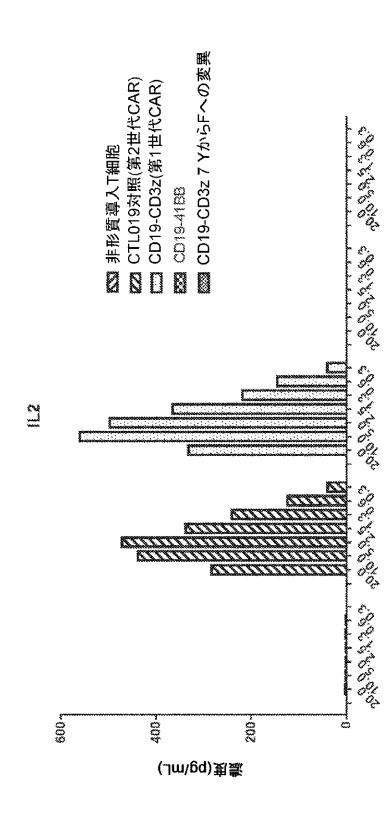


図 17

【図 19】

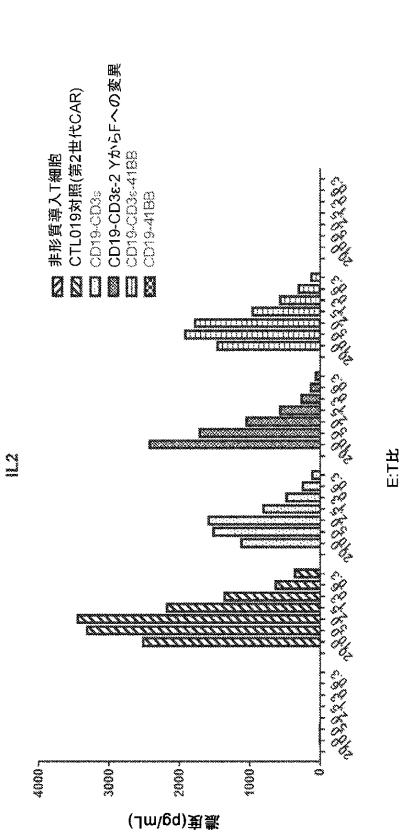


図 19

【図 18】

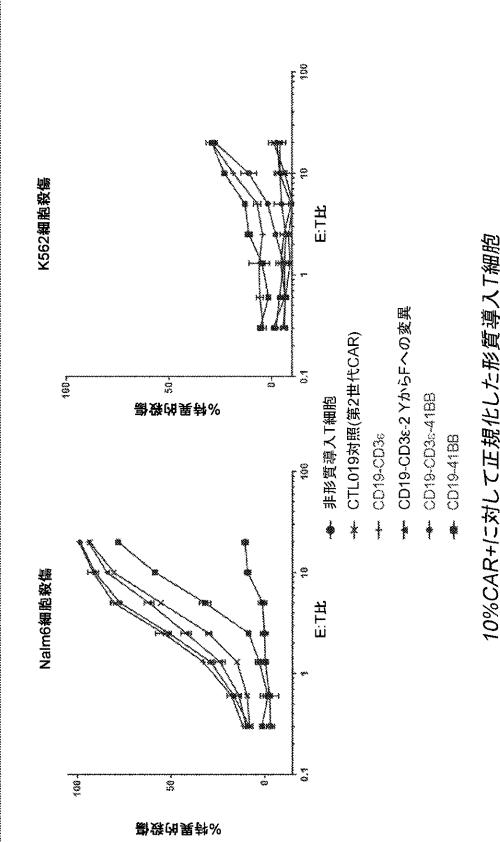


図 18

【図 20】

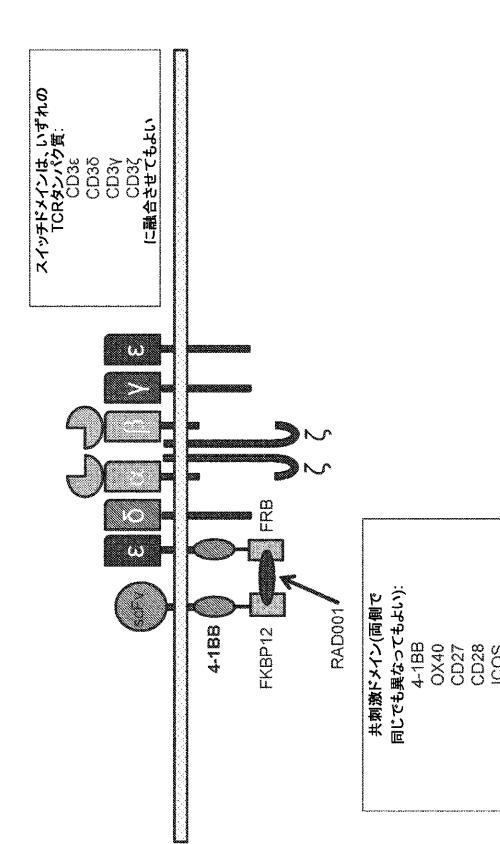
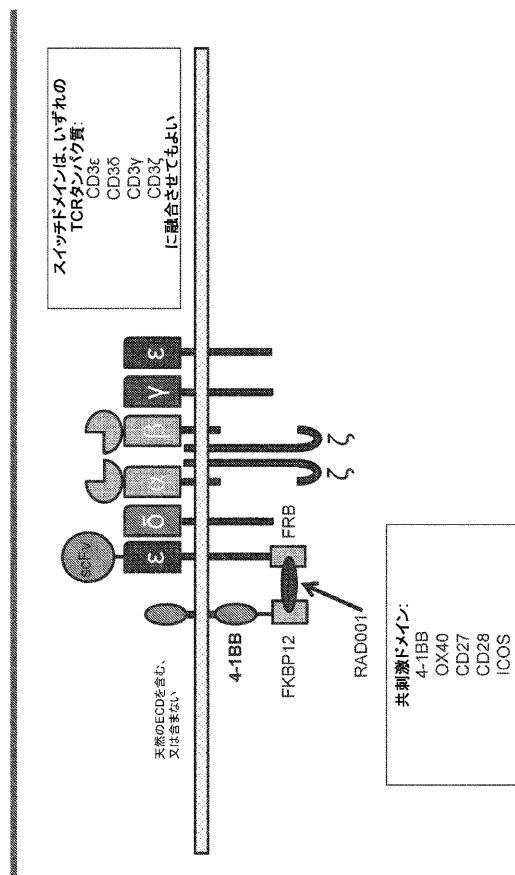
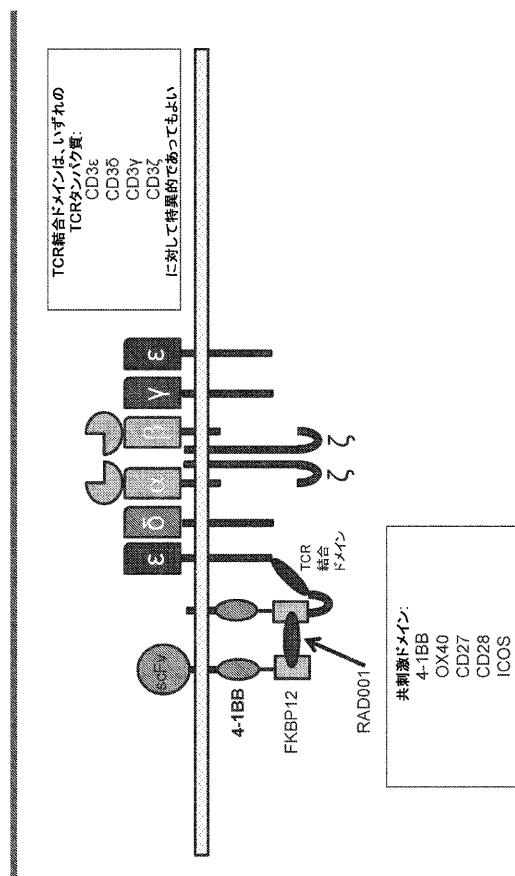


図 20

【図21】

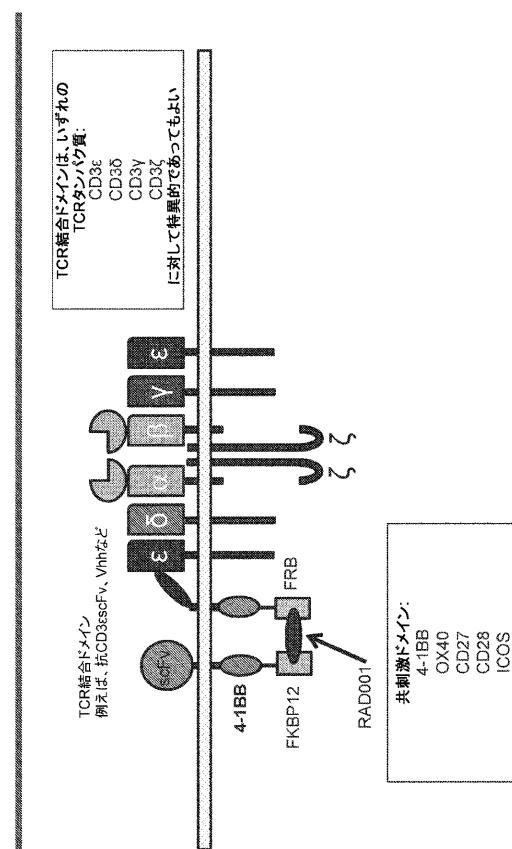


【図23】

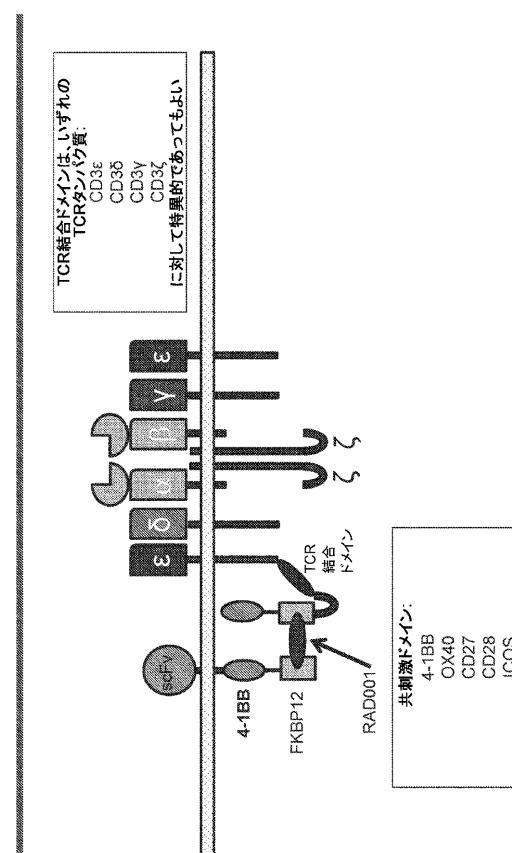


23

【 図 2 2 】



【 図 2 4 】



【図 25】

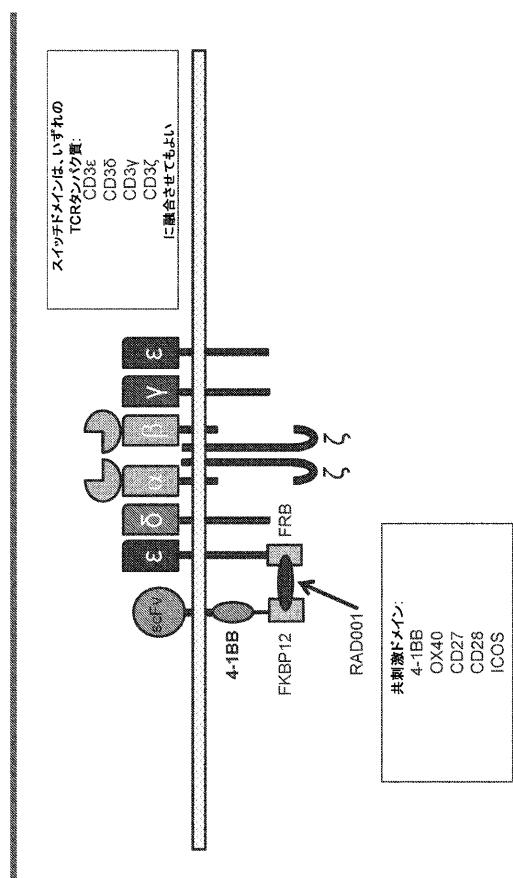


図 25

【図 26】

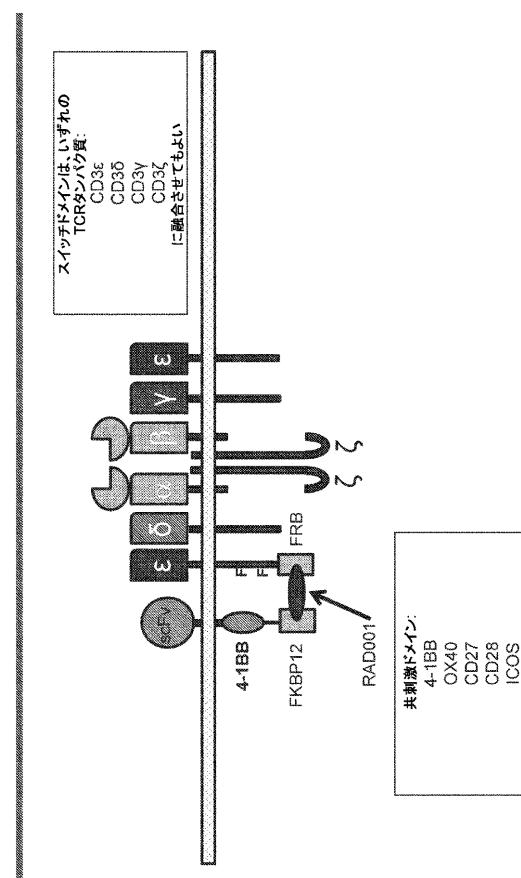


図 26

【図 27】

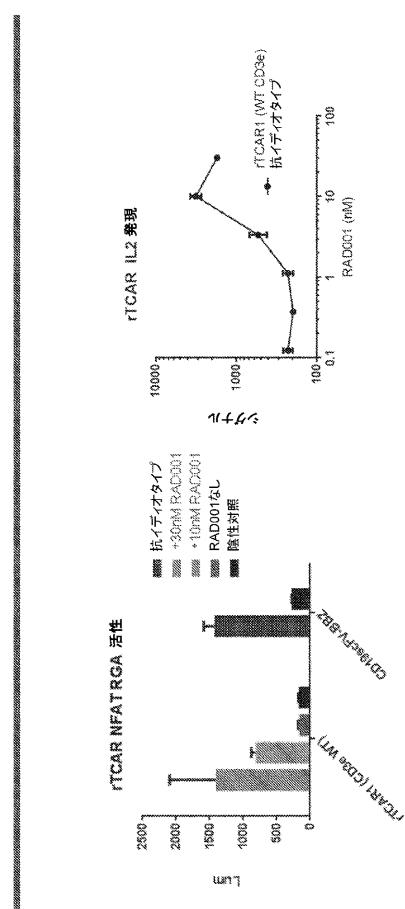


図 27

【図 28】

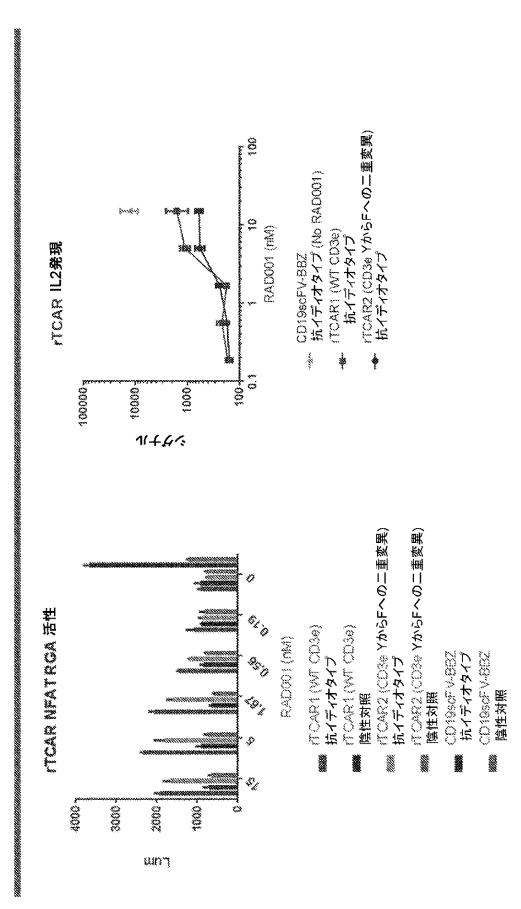
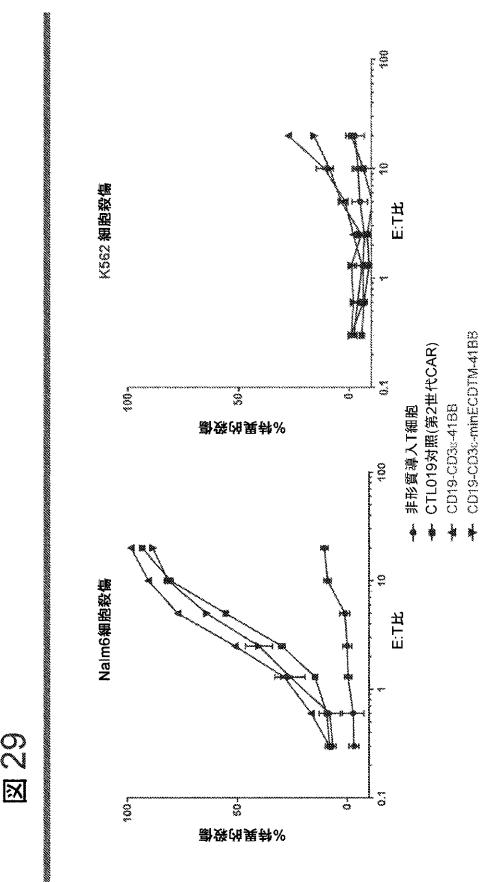


図 28

【図 29】



【図 30】

10%CAR+に対して正規化した形質導入T細胞

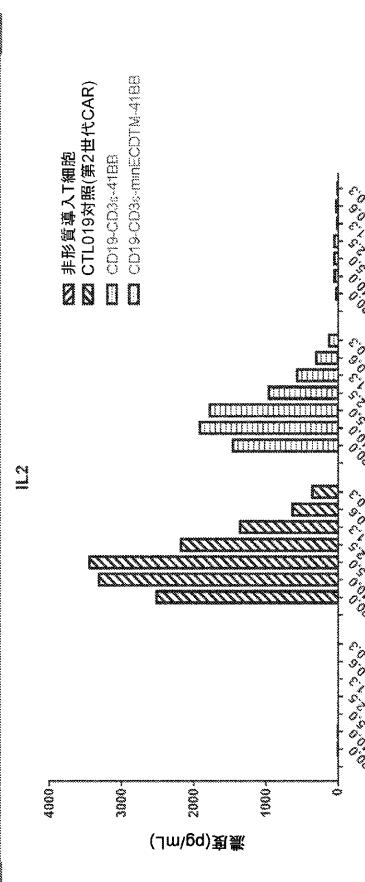


図 29

【図 31】

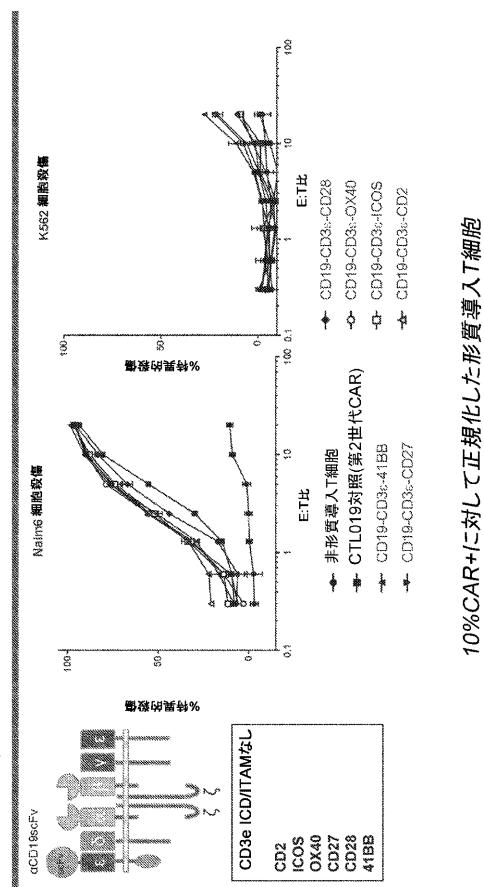


図 30

【図 32】

10%CAR+に対して正規化した形質導入T細胞

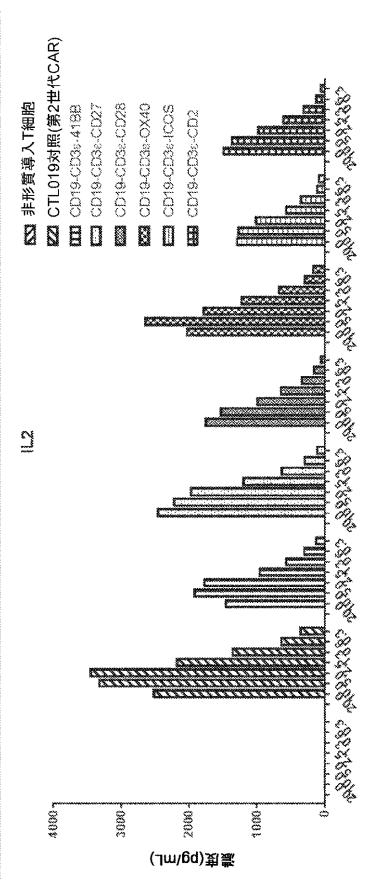
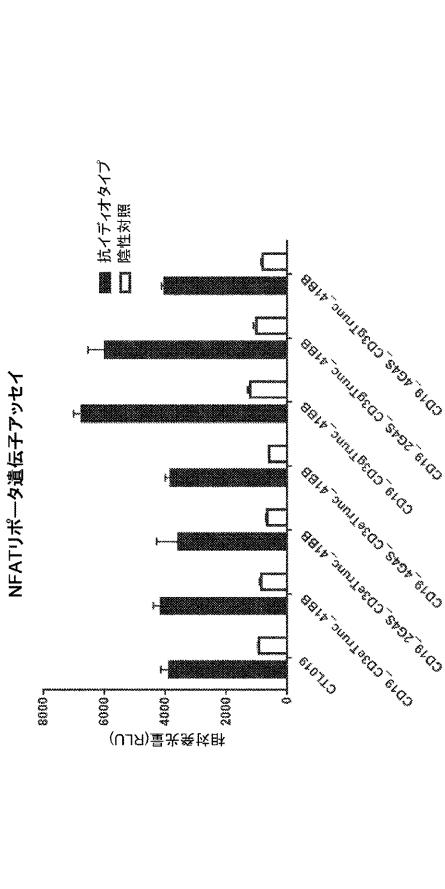


図 31

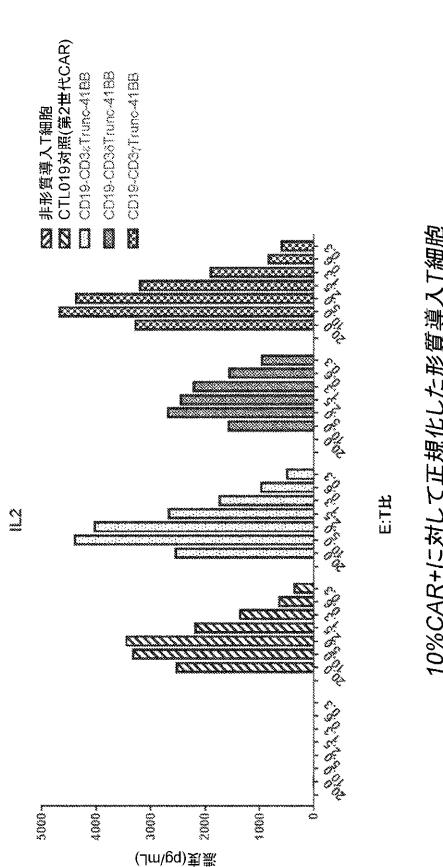
図 32

10%CAR+に対して正規化した形質導入T細胞

【 図 3 3 】

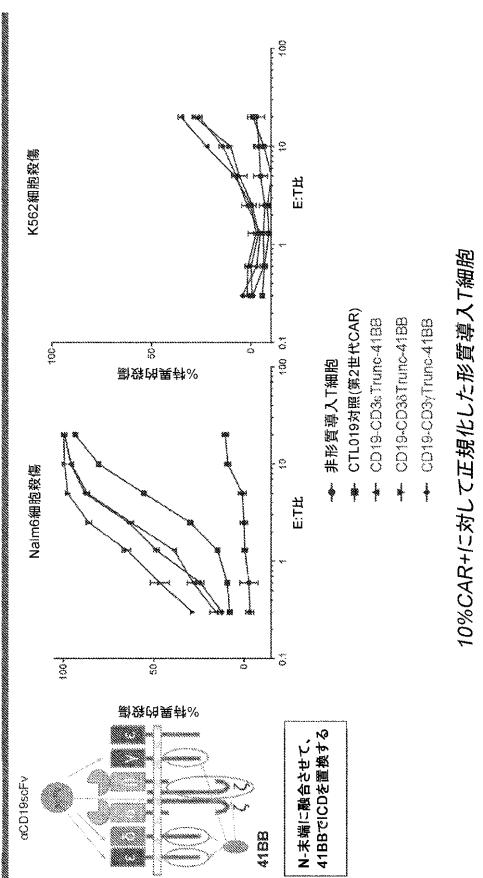


【 図 3 5 】



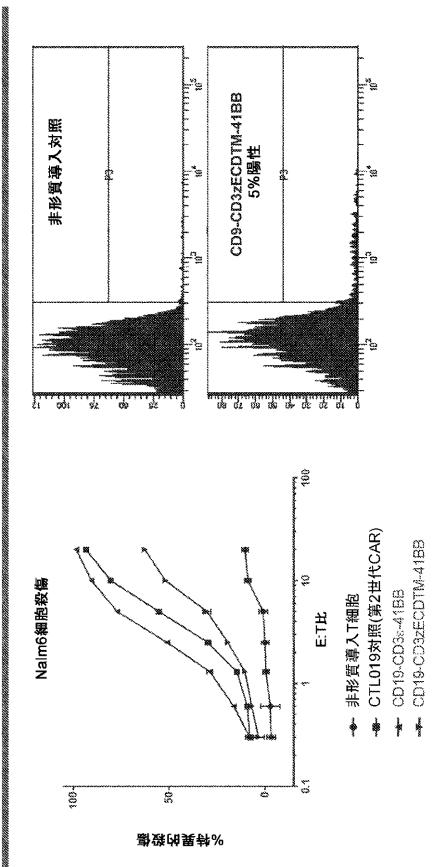
35

【 図 3 4 】



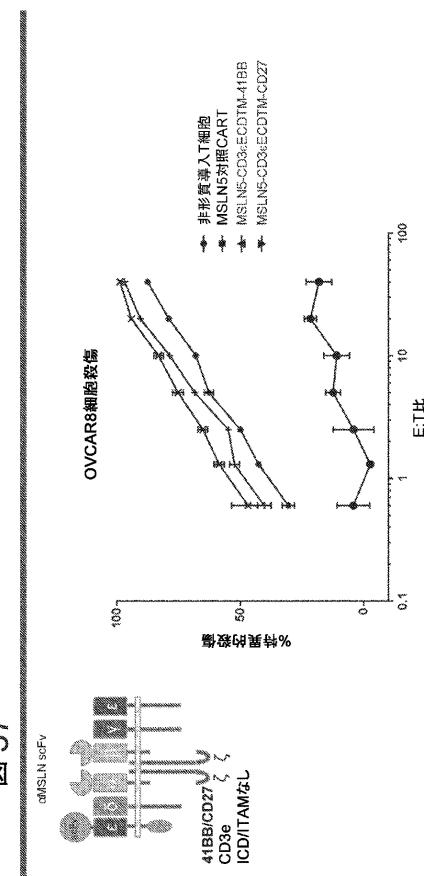
34

【 図 3 6 】



融合したCD34は、限定的な発現を有したため、5%CAR+で分析した

【図 37】



【図 39】

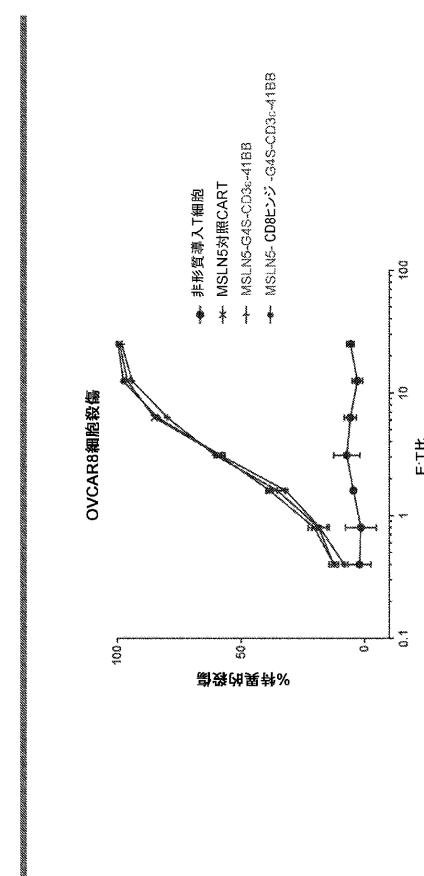
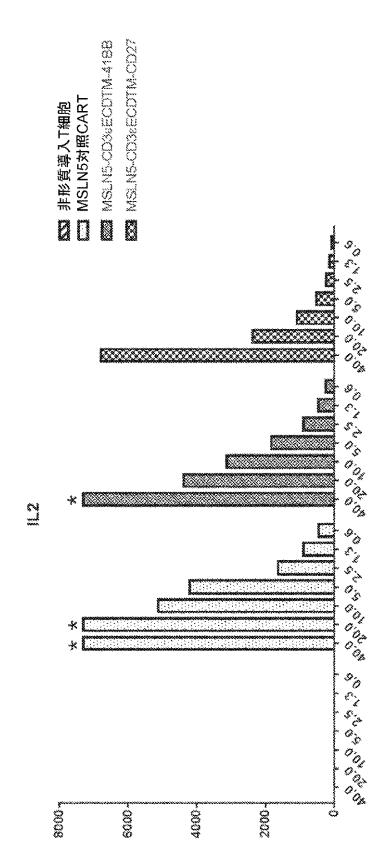


図 37

【図 38】



【図 40】

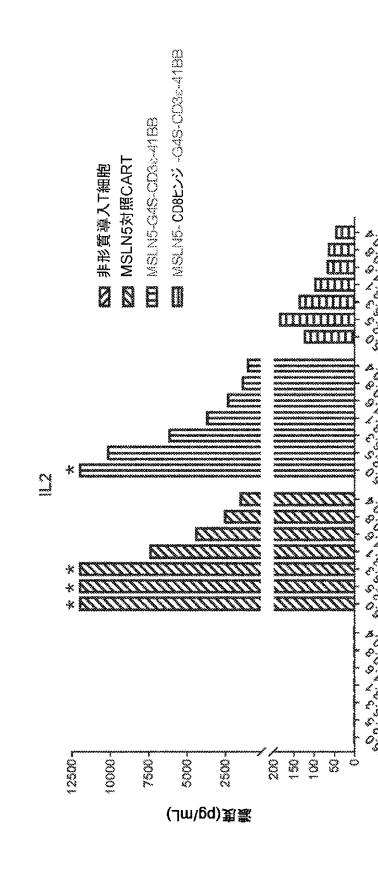


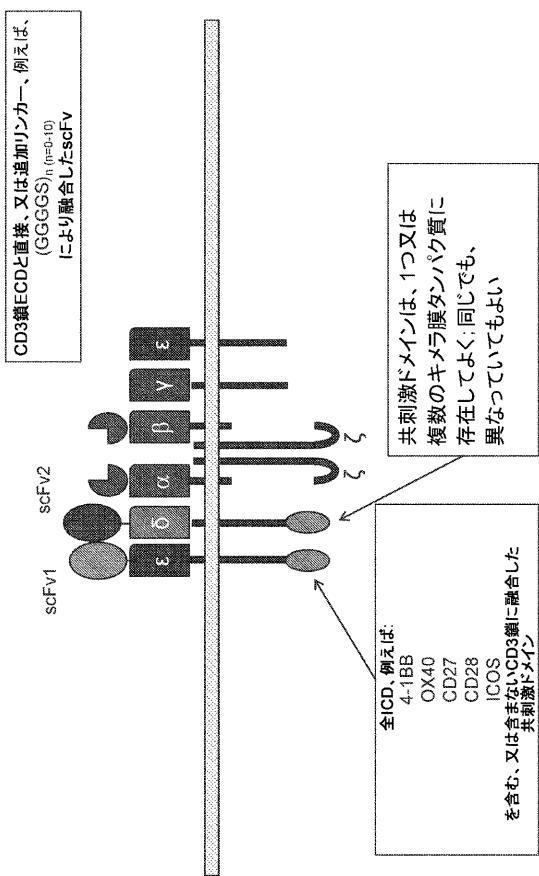
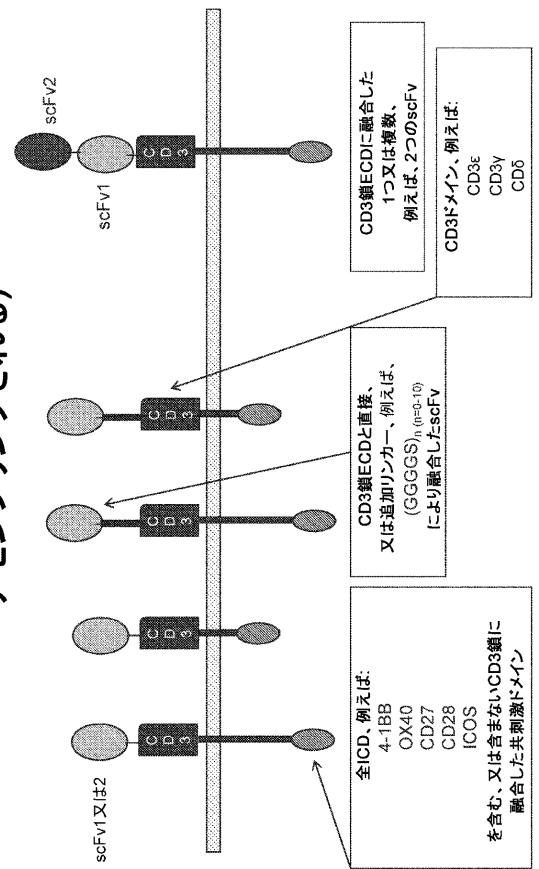
図 38

35%CAR+に対して正規化した形質導入T細胞

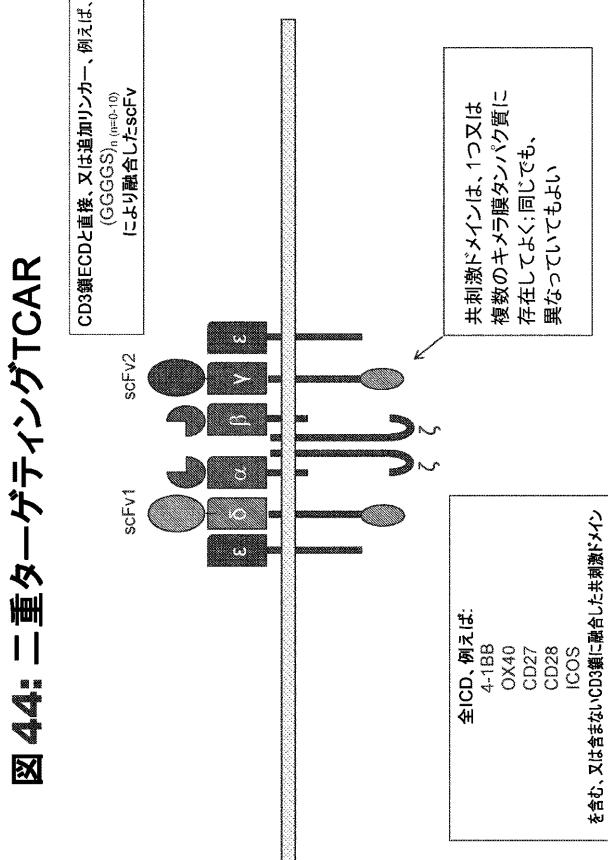
* 定量上限を超える
35%CAR+に対して正規化した形質導入T細胞

E:T比
定量上限を超える
*

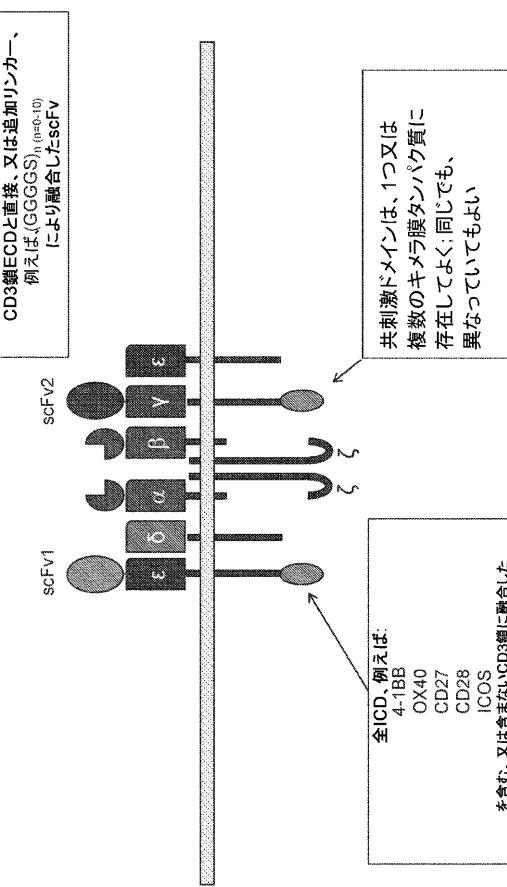
【図43】二重ターゲティングTCAR

【図41】キメラ膜タンパク質例(TCARに
アセンブリングされる)

【図42】二重ターゲティングTCAR



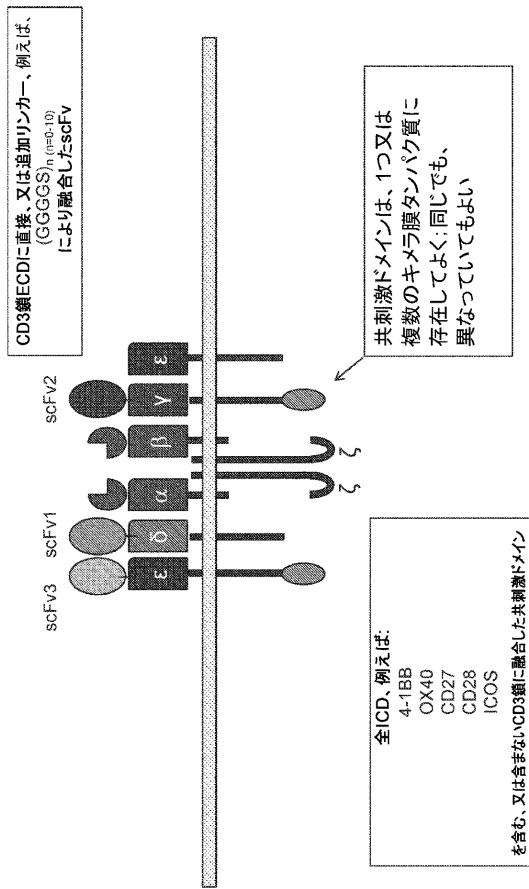
【図43】二重ターゲティングTCAR



【図44】二重ターゲティングTCAR

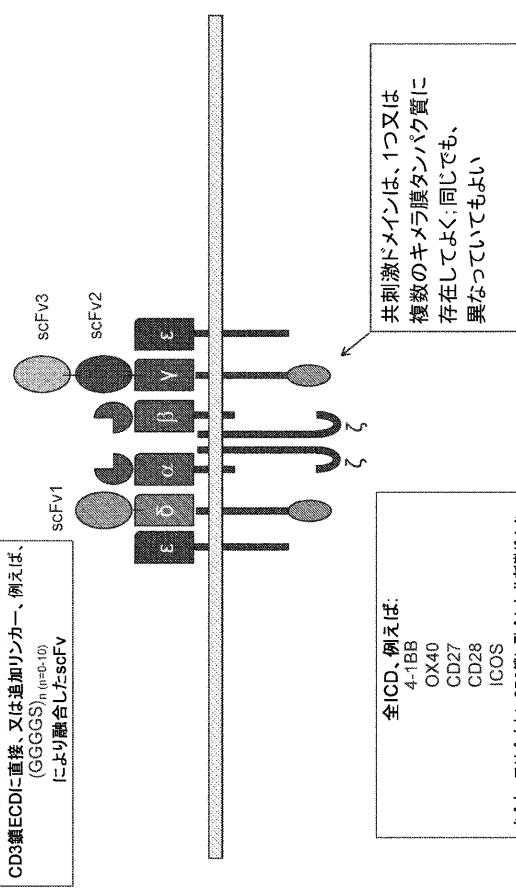
【図 4 5】

図 45: 3標的TCAR

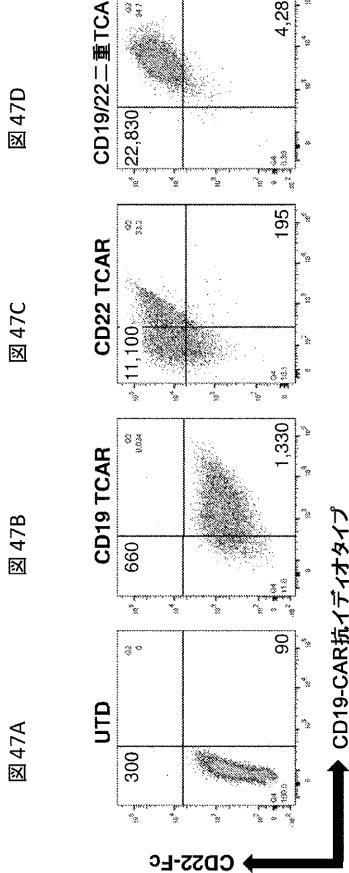


【図 4 6】

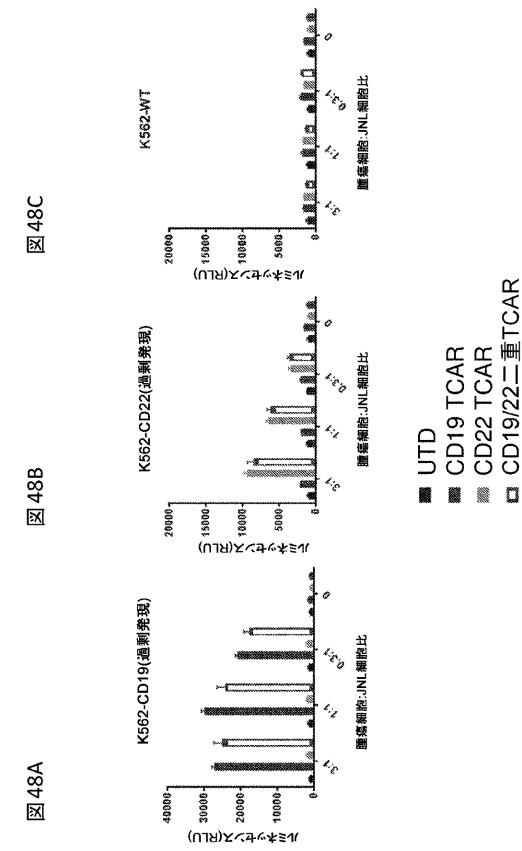
図 46: 3標的TCAR



【図 4 7 A - 4 7 D】



【図 4 8 A - 4 8 C】



【配列表】

2020506700000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2018/016139
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/725 C07K16/30 ADD.		
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) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTOPHER C KLOSS ET AL: "Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 31, no. 1, 16 December 2012 (2012-12-16), pages 71-75, XP055130697, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2459 abstract; figure 3 ----- WO 2016/187349 A1 (TCR2 INC [US]) 24 November 2016 (2016-11-24) claims 1-112; figures 1,4 ----- -/-	1-71 1-71 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 April 2018		Date of mailing of the international search report 30/04/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Behrens, Joyce

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/016139

Box No. I 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/US2018/016139

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	K F NOLAN ET AL: "Advances in Brief Bypassing Immunization: Optimized Design of "Designer T Cells" against Carcinoembryonic Antigen (CEA)-expressing Tumors, and Lack of Suppression by Soluble CEA 1", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 5, 1 January 1999 (1999-01-01), XP055455165, abstract page 3931 -----	1-71
A	WO 2016/054520 A2 (CALIFORNIA INST BIOMEDICAL RES [US]) 7 April 2016 (2016-04-07) claims 1-118; figure 1 & DATABASE Geneseq [Online] 2 June 2016 (2016-06-02), "CD3e-41BB fusion protein, SEQ ID 32.", retrieved from EBI accession no. GSP:BCP03684 Database accession no. BCP03684 sequence -----	1-71
A	WO 2016/130598 A1 (UNIV FLORIDA [US]) 18 August 2016 (2016-08-18) claims 1-27; figure 1 -----	1-71
A, P	WO 2017/027392 A1 (NOVARTIS AG [CH]; UNIV PENNSYLVANIA [US]; LOEW ANDREAS [US]; GRANDA BR) 16 February 2017 (2017-02-16) the whole document -----	1-71
A	SJOUKJE J. C. VAN DER STEGEN ET AL: "The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors", NATURE REVIEWS. DRUG DISCOVERY, vol. 14, no. 7, 1 July 2015 (2015-07-01), pages 499-509, XP055276028, GB ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/nrd4597 the whole document -----	1-71
A	DANIEL ABATE-DAGA ET AL: "CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function", MOLECULAR THERAPY - ONCOLYTICS, vol. 3, 1 January 2016 (2016-01-01), page 16014, XP055378713, ISSN: 2372-7705, DOI: 10.1038/mto.2016.14 the whole document ----- -/-	1-71
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2018/016139

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATTHEW E. CALL ET AL: "The Organizing Principle in the Formation of the T Cell Receptor-CD3 Complex", CELL, vol. 111, no. 7, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 967-979, XP055466473, AMSTERDAM, NL ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/S0092-8674(02)01194-7 the whole document -----	1-71
A	ANONYMOUS: "Pilot Study of Autologous T-cells Redirected to Mesothelin and CD19 With a Chimeric Antigen Receptor in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer (NCT02465983 on 2016_01_20)", INTERNET CITATION, 20 January 2016 (2016-01-20), XP002770264, Retrieved from the Internet: URL: https://clinicaltrials.gov/archive/NCT02465983/2016_01_20 [retrieved on 2017-05-17] the whole document -----	1-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/016139

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 2016187349 A1	24-11-2016	AU	2016264323 A1		14-12-2017
		CA	2986254 A1		24-11-2016
		EP	3298033 A1		28-03-2018
		US	2017166622 A1		15-06-2017
		WO	2016187349 A1		24-11-2016

WO 2016054520 A2	07-04-2016	NONE			

WO 2016130598 A1	18-08-2016	EP	3256492 A1		20-12-2017
		US	2018022815 A1		25-01-2018
		WO	2016130598 A1		18-08-2016

WO 2017027392 A1	16-02-2017	NONE			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	C 0 7 K 14/715	
C 0 7 K 14/74 (2006.01)	C 0 7 K 14/74	
C 0 7 K 14/73 (2006.01)	C 0 7 K 14/73	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
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 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/17	Z
	A 6 1 K 39/00	H

(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,R0,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,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 ポリス・エンヘルス

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25
0 番

(72)発明者 ブライアン・ウォルター・グランダ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 カルラ・ギマラエス

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 アンドレアス・レーヴ

アメリカ合衆国 0 2 1 1 8 マサチューセッツ州ボストン、ショウマット・アベニュー 4 7 6 番、アパートメント 6

(72)発明者 メリッサ・ラモネス

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア 2 0 0 番、
ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ

F ターム(参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C085 AA03 BB01 CC03 DD62 EE01 GG02
4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 BB65 CA04 NA05 ZB09 ZB21 ZB26
ZB27
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA42 DA50 DA51 DA76 EA28
FA74