

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-526856

(P2022-526856A)

(43)公表日 令和4年5月26日(2022.5.26)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全80頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-560665(P2021-560665)	(71)出願人	500429103
(86)(22)出願日	令和2年4月11日(2020.4.11)		ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ
(85)翻訳文提出日	令和3年11月24日(2021.11.24)		ティ オブ ペンシルバニア
(86)国際出願番号	PCT/US2020/027859		アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ
(87)国際公開番号	WO2020/210768		ニア州 フィラデルフィア シビック セ
(87)国際公開日	令和2年10月15日(2020.10.15)		ンター プールパード 3 6 0 0 ナインス
(31)優先権主張番号	62/833,456		フロア
(32)優先日	平成31年4月12日(2019.4.12)	(74)代理人	100102978
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/892,343	(74)代理人	100102118
(32)優先日	令和1年8月27日(2019.8.27)		弁理士 春名 雅夫
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100119507
	最終頁に続く		弁理士 刑部 俊
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 臨床的に意義のある E G F R 変異型タンパク質との交差反応性を有する高親和性キメラ抗原受容体 (C A R) を含む、組成物および方法

(57)【要約】

本発明は、臨床的に意義のあるEGFR変異型タンパク質との交差反応性を有する高親和性キメラ抗原受容体 (C A R) を利用する、組成物および方法を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする単離された核酸分子であって、CARが、上皮増殖因子受容体 (EGFR) の複数のアイソフォームに結合することが可能な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、単離された核酸分子。

【請求項 2】

EGFRアイソフォームが、野生型EGFR (wtEGFR)、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFRR108K、EGFRR108G、EGFRG598V、EGFRD126Y、EGFRC628F、EGFRR108K/A289V、EGFRR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、およびEGFRバリエーションIIからなる群より選択される、請求項1記載の単離された核酸。

10

【請求項 3】

抗原結合ドメインが、抗体、scFv、Fab、またはその任意の断片からなる群より選択される、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 4】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 31、SEQ ID NO : 79、SEQ ID NO : 81、SEQ ID NO : 83、およびSEQ ID NO : 85からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 5】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 32、SEQ ID NO : 80、SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 84、およびSEQ ID NO : 86からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載の単離された核酸。

20

【請求項 6】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 27、およびSEQ ID NO : 30からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 7】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 4、SEQ ID NO : 26、およびSEQ ID NO : 29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項1記載の単離された核酸。

30

【請求項 8】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 5、6、および7からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (LCDR) を含む、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 9】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 8、9、および10からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 (HCDR) を含む、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 10】

CARが、ヒンジ領域をさらに含む、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 11】

ヒンジ領域が、SEQ ID NO : 11またはSEQ ID NO : 71のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項10記載の単離された核酸。

40

【請求項 12】

膜貫通ドメインが、SEQ ID NO : 12またはSEQ ID NO : 73のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 13】

細胞内ドメインが、SEQ ID NO : 13またはSEQ ID NO : 75のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 14】

細胞内ドメインが、SEQ ID NO : 14またはSEQ ID NO : 77を含むヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1記載の単離された核酸。

50

【請求項15】

細胞内ドメインが、SEQ ID NO : 13およびSEQ ID NO : 14を含むヌクレオチド配列またはSEQ ID NO : 75およびSEQ ID NO : 77を含むヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項16】

CARが、SEQ ID NO : 21、64、66、または68からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項17】

膜貫通ドメインおよび/または細胞内ドメインが、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) を含む、請求項1記載の単離された核酸。

10

【請求項18】

DAP12をコードする核酸をさらに含む、請求項17記載の単離された核酸。

【請求項19】

CARが、SEQ ID NO : 22、65、67、および69からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項20】

CARが、EGFRホモ二量体、EGFRヘテロ二量体、EGFRオリゴマー、および/またはEGFR/ErbBオリゴマーに結合することが可能である、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項21】

前記請求項のいずれか一項記載の単離された核酸を含む、ベクター。

20

【請求項22】

交差反応性キメラ抗原受容体 (CAR) を含む改変された細胞であって、CARが、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な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、改変された細胞。

【請求項23】

EGFRアイソフォームが、野生型EGFR (wtEGFR)、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFRR108K、EGFRR108G、EGFRG598V、EGFRD126Y、EGFRC628F、EGFRR108K/A289V、EGFRR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、およびEGFRバリアントIIからなる群より選択される、請求項22記載の改変された細胞。

30

【請求項24】

抗原結合ドメインが、抗体、scFv、Fab、またはその任意の断片からなる群より選択される、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項25】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 31、SEQ ID NO : 79、SEQ ID NO : 81、SEQ ID NO : 83、およびSEQ ID NO : 85からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項26】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 32、SEQ ID NO : 80、SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 84、およびSEQ ID NO : 86からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項22記載の改変された細胞。

40

【請求項27】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 27、およびSEQ ID NO : 30からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項28】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 4、SEQ ID NO : 26、およびSEQ ID NO : 29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項29】

50

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 5、6、および7からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (LCDR) を含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項30】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 8、9、および10からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 (HCDR) を含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項31】

CARが、ヒンジ領域をさらに含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項32】

ヒンジ領域が、SEQ ID NO : 72のアミノ酸配列を含む、請求項31記載の改変された細胞。

10

【請求項33】

膜貫通ドメインが、SEQ ID NO : 74のアミノ酸配列を含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項34】

細胞内ドメインが、SEQ ID NO : 76のアミノ酸配列を含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項35】

細胞内ドメインが、SEQ ID NO : 78のアミノ酸配列を含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項36】

細胞内ドメインが、SEQ ID NO : 76およびSEQ ID NO : 78のアミノ酸配列を含む、請求項22記載の改変された細胞。

20

【請求項37】

CARが、SEQ ID NO : 21、64、66、または68からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項38】

膜貫通ドメインおよび/または細胞内ドメインが、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) を含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項39】

DAP12をコードする核酸をさらに含む、請求項38記載の改変された細胞。

30

【請求項40】

CARが、SEQ ID NO : 22、65、67、および69からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項41】

CARが、EGFRホモ二量体、EGFRヘテロ二量体、EGFRオリゴマー、および/またはEGFR/ErbBオリゴマーに結合することが可能である、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項42】

T細胞である、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項43】

自己細胞である、請求項22記載の改変された細胞。

40

【請求項44】

ヒト細胞である、請求項22記載の改変された細胞。

【請求項45】

請求項22~44のいずれか一項記載の改変された細胞を対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象におけるがんを処置するための方法。

【請求項46】

CARを含む改変された細胞を対象に投与する段階を含む、それを必要とする対象におけるがんを処置するための方法であって、

CARが、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な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、

50

方法。

【請求項 47】

EGFRアイソフォームが、野生型EGFR (wtEGFR)、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFRR108K、EGFRR108G、EGFRG598V、EGFRD126Y、EGFRC628F、EGFRR108K/A289V、EGFRR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、およびEGFRバリエーションIIからなる群より選択される、請求項46記載の方法。

【請求項 48】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 31、SEQ ID NO : 79、SEQ ID NO : 81、SEQ ID NO : 83、およびSEQ ID NO : 85からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項46記載の方法。

10

【請求項 49】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 32、SEQ ID NO : 80、SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 84、およびSEQ ID NO : 86からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 50】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 27、およびSEQ ID NO : 30からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 51】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 4、SEQ ID NO : 26、およびSEQ ID NO : 29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項46記載の方法。

20

【請求項 52】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 5、6、および7からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (LCDR) を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 53】

抗原結合ドメインが、SEQ ID NO : 8、9、および10からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 (HCDR) を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 54】

CARが、SEQ ID NO : 21、64、66、または68からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項46記載の方法。

30

【請求項 55】

CARが、SEQ ID NO : 22、65、67、および69からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 56】

追加的な処置を対象に施す段階をさらに含む、請求項45～55のいずれか一項記載の方法。

【請求項 57】

追加的な処置が、免疫チェックポイント阻害 (ICB) を含む、請求項56記載の方法。

【請求項 58】

ICBが、抗PD-1処置、抗PD-L1処置、抗TIM3処置、および抗CTLA-4処置からなる群より選択される、請求項57記載の方法。

40

【請求項 59】

処置が局所的に送達される、請求項45～58のいずれか一項記載の方法。

【請求項 60】

改変された細胞が、ミニボディーをさらに含む、請求項45または46記載の方法。

【請求項 61】

ミニボディーが、PD-1に特異的なscFvとヒトIgG CH3ドメインとを含む、請求項60記載の方法。

【請求項 62】

ミニボディーが、CTLA-4に特異的なscFvとヒトIgG CH3ドメインとを含む、請求項6

50

0記載の方法。

【請求項63】

ミニボディーが、TIM-3に特異的なscFvとヒトIgG CH3ドメインとを含む、請求項60記載の方法。

【請求項64】

ミニボディーが、PD-L1に特異的なscFvとヒトIgG CH3ドメインとを含む、請求項60記載の方法。

【請求項65】

それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、

対象に由来するGBMオルガノイド(GBO)と一緒に複数のCAR T細胞を培養する段階、
複数のCAR T細胞から、最高の効力を有するCAR T細胞を選択する段階、および
最高の効力を有するCAR T細胞を対象に投与し、それによって対象におけるがんを処置
する段階

10

を含む、方法。

【請求項66】

複数のCAR T細胞が、複数のCARを含む複数の改変されたT細胞を含み、各CARが、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、請求項65記載の方法。

【請求項67】

抗原結合ドメインが、CD19、EGFR、EGFRの複数のアイソフォーム(例えば、野生型E
GFR(wtEGFR)、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFR
R108K、EGFRR108G、EGFRG598V、EGFRD126Y、EGFRC628F、EGFRR108K
/A289V、EGFRR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、お
よびEGFRバリエーションII)、PSMA、PSCA、および任意の腫瘍関連抗原(TAA)からな
る群より選択される抗原に結合することが可能である、請求項66記載の方法。

20

【請求項68】

GBOが対象由来の生検材料から生成される、請求項65記載の方法。

【請求項69】

最高の効力が、最高度のアポトーシスおよび/または腫瘍細胞死滅として測定される、請
求項65記載の方法。

【請求項70】

追加的な処置を対象に施す段階をさらに含む、請求項65記載の方法。

30

【請求項71】

追加的な処置が、免疫チェックポイント阻害(ICB)を含む、請求項66記載の方法。

【請求項72】

ICBが、抗PD-1処置、抗PD-L1処置、抗TIM3処置、および抗CTLA-4処置からなる群
より選択される、請求項67記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

40

本出願は、米国特許法第119条(e)の下、2019年4月12日付で出願された米国仮特許
出願第62/833,456号および2019年8月27日付で出願された米国仮特許出願第62/89
2,343号への優先権を主張し、それらの出願の各々は、参照によりその全体が本明細書
に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

膠芽腫(GBM)または神経膠腫グレードIVは、3.19人/100,000人/年の年間発生率
(約10,000人)であり、標準治療の外科手術、放射線療法、および化学療法後に14.6
ヶ月の生存期間中央値を有する、壊滅的ながんである。過去20年間に処置の進歩はほと

50

んど実現されておらず、2年生存率は25%近くのままである。近年、低強度の交流電場がいくらかの潜在性を示したとはいえ、新規な処置の必要性は依然として大きい。

【0003】

過去20年にわたる研究は、がんが免疫系によって自然に認識され、免疫逃避が発がんの中心的部分であることを実証している。これは、黒色腫および非小細胞肺癌（NSCLC）などのがんにおいてプログラム死1（PD-1）および細胞傷害性Tリンパ球アテニューエーター4（CTLA-4）によって媒介される自然免疫チェックポイントが破壊された場合に観察される劇的な臨床反応によって、最も明白に例証されている。自然免疫がより限定される急性リンパ性白血病などのがんにおいても、チサゲンレクルユーセル（KYMRIA）（登録商標）およびアキシカブタゲンシロルユーセル（YESCARTA（登録商標））のような合成キメラ抗原受容体（CAR）ベースの免疫療法が、持続可能な腫瘍制御を生み出すT細胞の莫大な細胞傷害潜在能を実証している。

10

【0004】

GBMは、ネオ抗原が不足しており、T細胞受容体（TCR）ベースの免疫療法の難易度が上がっている。Cancer Genome Atlas（TCGA）全エクソーム解析データに基づくと、GBM内の変異荷重は他の腫瘍型と比較して中等度である。しかし、GBMの変異頻度の中央値は、黒色腫、NSCLCおよび膀胱がんなどの免疫原性腫瘍よりも1~2桁小さく、入手可能な証拠は、遺伝子変異量が免疫チェックポイント阻害（ICB）に対する応答と最も高く相関するものの一つであることを裏付けている。低い遺伝子変異量および不十分なT細胞浸潤は、抗体のような大分子を血液脳関門（BBB）を通して送達する課題と一緒に、今日までにGBMでのPD-1阻害剤療法に対して観察された概して不十分な応答を説明し得る。

20

【0005】

上皮増殖因子受容体（EGFR）（ErbB1）座位内の変化は、GBM中の最高頻度の遺伝子変化に相当する。GBMにおいて二重微小染色体としてのEGFR座位の局所的増幅によって媒介されるものなどのEGFRの過剰発現が長い間認識されており、症例の30%に見出される。EGFRの変異もまた頻度が高い。エクソン2~7を欠如する発がん性EGFRバリエーション（EGFRvIII）が、GBMの約30%に見出される。

【0006】

再発性GBMにおける自己EGFRvIII特異的CART細胞（CART-EGFRvIII）療法のヒト臨床試験が完了した。安全性を実証したことに加えて、CART注入後のGBMの特定領域の生検により、CART-EGFRvIII細胞がBBBを透過し、GBMに浸潤し、オンターゲット活性を媒介可能であることが証明された。免疫組織化学（IHC）分析およびRNAインサイチュウハイブリダイゼーション（ISH）により、腫瘍浸潤T細胞がGBM生組織の領域内のCD8+ グランザイムB+ CD25+ CART細胞の増加によって表される活性化表現型を呈したことが示された。これらの観察は、処置された一連の患者にわたり見られた7~10日目での末梢生着ピークと一致してCART注入の7~14日後の間に観察された。7つの処置標本中5つにおいて領域特異的な抗原編集およびEGFRvIIIの低減が観察され、これは治療によって産生された標的特異的活性を裏付けた。HER-2およびIL-13R 2を標的とするCART細胞の臨床活性もGBMで報告されている。

30

40

【0007】

腫瘍の不均一性および免疫抑制性の腫瘍微小環境（TME）が、GBMにおけるCART療法の大きな障害である。CART療法後のEGFRvIIIにおける部位特異的低下は、GBMにおけるこの変化の観察される腫瘍内不均一性と一致する。重要なことに、組織のIHC分析により、CART活性化の時系列を密接にたどるGBM TME内の適応免疫応答の存在が実証された。IDO1、PD-L1、IL10およびTGFβ はどれも、処置後にCART細胞近位の腫瘍組織内で増加した。これらの免疫調節経路は、腫瘍免疫の逃避に役割を果たすことが知られており、GBMに対するCART細胞の抗腫瘍活性をさらに鈍らせる可能性がある適応免疫耐性の出現と一致する。

【0008】

50

複数の抗原を標的とするのみならず、GBM TME内の免疫抑制シグナルを回避する新規なCART療法の必要性が依然存在する。本発明はこの必要性に取り組むものである。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、臨床的に意義のあるEGFR変異型タンパク質との交差反応性を有する高親和性キメラ抗原受容体(CAR)の発見に基づく。

【0010】

一局面では、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離された核酸分子であって、CARが、上皮増殖因子受容体(EGFR)の複数のアイソフォームに結合することが可能な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、単離された核酸分子を提供する。

10

【0011】

別の局面では、本発明は、本明細書において開示される単離された核酸のいずれかを含むベクターを提供する。

【0012】

別の局面では、本発明は、交差反応性キメラ抗原受容体(CAR)を含む改変された細胞であって、CARが、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な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、改変された細胞を提供する。

【0013】

別の局面では、本発明は、それを必要とする対象におけるがんを処置するための方法を提供する。該方法は、本明細書において開示される改変された細胞のいずれかを対象に投与する段階を含む。

20

【0014】

別の局面では、本発明は、それを必要とする対象におけるがんを処置するための方法を提供する。方法は、CARを含む改変された細胞を対象に投与する段階を含む。CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な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。

【0015】

本明細書において示される本発明の上記局面または任意の他の局面の様々な態様では、EGFRアイソフォームは、野生型EGFR(wtEGFR)、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFRR108K、EGFRR108G、EGFRG598V、EGFRD126Y、EGFRC628F、EGFRR108K/A289V、EGFRR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、およびEGFRバリエーションIIからなる群より選択される。

30

【0016】

ある特定の例示的な態様では、抗原結合ドメインは、抗体、scFv、Fab、またはその任意の断片からなる群より選択される。

【0017】

ある特定の例示的な態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、およびSEQ ID NO: 85からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の例示的な態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、およびSEQ ID NO: 86からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【0018】

ある特定の例示的な態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 27、およびSEQ ID NO: 30からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の例示的な態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 26およびSEQ ID NO: 29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0019】

50

ある特定の例示的な態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 5、6、および7からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (LCDR) を含む。ある特定の例示的な態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 8、9、および10からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 (HCDR) を含む。

【0020】

ある特定の例示的な態様では、CARは、ヒンジ領域をさらに含む。ある特定の例示的な態様では、ヒンジ領域は、SEQ ID NO : 11またはSEQ ID NO : 71のヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の例示的な態様では、ヒンジ領域は、SEQ ID NO : 72のアミノ酸配列を含む。

【0021】

ある特定の例示的な態様では、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO : 12またはSEQ ID NO : 73のヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の例示的な態様では、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO : 74のアミノ酸配列を含む。

【0022】

ある特定の例示的な態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO : 13またはSEQ ID NO : 75のヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の例示的な態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO : 14またはSEQ ID NO : 77を含むヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の例示的な態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO : 13およびSEQ ID NO : 14を含むヌクレオチド配列またはSEQ ID NO : 75およびSEQ ID NO : 77を含むヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の例示的な態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO : 76のアミノ酸配列を含む。ある特定の例示的な態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO : 78のアミノ酸配列を含む。ある特定の例示的な態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO : 76およびSEQ ID NO : 78のアミノ酸配列を含む。

【0023】

ある特定の例示的な態様では、CARは、SEQ ID NO : 21、64、66、または68からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の例示的な態様では、CARは、SEQ ID NO : 22、65、67、および69からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0024】

ある特定の例示的な態様では、膜貫通ドメインおよび/または細胞内ドメインは、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) を含む。

【0025】

ある特定の例示的な態様では、核酸は、DAP12をコードする核酸をさらに含む。

【0026】

ある特定の例示的な態様では、CARは、EGFRホモ二量体、EGFRヘテロ二量体、EGFRオリゴマー、および/またはEGFR/ErbBオリゴマーに結合することが可能である。

【0027】

ある特定の例示的な態様では、細胞はT細胞である。ある特定の例示的な態様では、細胞は自己細胞である。ある特定の例示的な態様では、細胞はヒト細胞である。

【0028】

ある特定の例示的な態様では、方法は、追加的な処置を対象に施す段階をさらに含む。ある特定の例示的な態様では、追加的な処置は、免疫チェックポイント阻害 (ICB) を含む。ある特定の例示的な態様では、ICBは、抗PD-1処置、抗PD-L1処置、抗TIM3処置、および抗CTLA-4処置からなる群より選択される。

【0029】

ある特定の例示的な態様では、処置は局所的に送達される。

【0030】

ある特定の例示的な態様では、改変された細胞はミニボディーをさらに含む。ある特定の例示的な態様では、ミニボディーは、PD-1に特異的なscFvとヒトIgG CH3ドメインと

10

20

30

40

50

を含む。ある特定の例示的な態様では、ミニボディーは、CTLA-4に特異的なscFvとヒトIgG CH3ドメインとを含む。ある特定の例示的な態様では、ミニボディーは、TIM-3に特異的なscFvとヒトIgG CH3ドメインとを含む。ある特定の例示的な態様では、ミニボディーは、PD-L1に特異的なscFvとヒトIgG CH3ドメインとを含む。

【0031】

別の局面では、本発明は、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法を提供する。方法は、対象に由来するGBMオルガノイド（GBO）と一緒に複数のCAR T細胞を培養する段階、複数のCAR T細胞から最高の効力を有するCAR T細胞を選択する段階、および最高の効力を有するCAR T細胞を対象に投与し、それによって対象におけるがんを処置する段階を含む。ある特定の例示的な態様では、複数のCAR T細胞は、複数のCARを含む複数の改変されたT細胞を含み、その際、各CARは、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。ある特定の例示的な態様では、抗原結合ドメインは、CD19、EGFR、EGFRの複数のアイソフォーム（例えば、野生型EGFR（wtEGFR）、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFR108K、EGFR108G、EGFRG598V、EGFRD126Y、EGFRC628F、EGFR108K/A289V、EGFR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、およびEGFRバリエーションII）、PSMA、PSCA、および任意の腫瘍関連抗原（TAA）からなる群より選択される抗原に結合することが可能である。

10

【0032】

ある特定の例示的な態様では、GBOは、対象由来の生検材料から生成される。最高の効力は、最高度のアポトーシスおよび/または腫瘍細胞死滅として測定される。

20

【0033】

ある特定の例示的な態様では、方法は、対象に追加的な処置を施す段階をさらに含む。ある特定の例示的な態様では、追加的な処置は、免疫チェックポイント阻害（ICB）を含む。ある特定の例示的な態様では、ICBは、抗PD-1処置、抗PD-L1処置、抗TIM3処置、および抗CTLA-4処置からなる群より選択される。

【0034】

本発明の具体的な態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読む場合に、より一層理解されるであろう。本発明を例証する目的で、図面に例示的な態様が表示されている。しかしながら、本発明は、図面に示された態様の正確な構成および手段に限定されないことを理解すべきである。

30

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1Aは、抗EGFR 806-4-1BBz CARレンチウイルスベクター構築物の略図である。図1Bは、CARをコードするレンチウイルスベクターを形質導入した後の初代CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞におけるEGFR特異的806 BBz CARの表面発現を示す代表的なヒストグラムである。ビオチン化ヤギ抗マウスF(ab)₂に続いてストレプトアビジン-APCを使用するフローサイトメトリーによってCARの発現を分析した。

【図2】図2は、ヒトGBM細胞に対する806 CARの活性を示す。異なるT細胞対腫瘍細胞比を用いる4時間のクロム放出アッセイで、EGFR発現GBM細胞株、EGFRvIII発現GBM細胞株、およびEGFRA289V発現GBM細胞株における806-4-1BBz CAR T細胞の抗原特異的細胞溶解活性を評価した。それぞれEGFRvIIIおよびEGFR野生型を認識するEGFRvIII特異的2173およびセツキシマブ（C225）CARを陽性対照として使用した。CD19 BBz CART細胞を陰性対照として使用した。U87 wtEGFRは、EGFRの基礎レベルを有するU87 MG親GBM細胞株に過剰発現野生型EGFRが形質導入されたものである。

40

【図3】図3は、4時間クロム放出アッセイでEGFRvIIIおよびEGFRミスセンス変異R108Kを形質導入されたU87 MG細胞株における806 4-1BBz CAR T細胞のインビトロ細胞溶解を示す。野生型EGFR特異的C10 4-1BBzおよびEGFRvIII特異的2173 4-1BBz CARを陽性対照として使用し、CD19 4-1BBz CARを陰性対照として使用した。

【図4】図4Aは、806 KIR CARレンチウイルスベクターの構築の略図である。図4Bは

50

、CARの発現を示す代表的なヒストグラムである。初代ヒトT細胞を抗CD3 / 抗CD28 T細胞活性化ビーズで24時間刺激した。806 KIR CARをコードするレンチウイルスベクターをT細胞に形質導入し、細胞を10日間拡大増殖させた。ビオチン化ヤギ-抗マウスF(ab)2に続いてストレプトアビジン-APCを使用するフローサイトメトリーによってCARの発現を分析した。

【図5】図5は、ルシフェラーゼを発現している生きた腫瘍細胞を検出する一晚のルシフェラーゼベースのアッセイでEGFR発現GBM細胞株、EGFRvIII発現GBM細胞株、およびEGFRA289V発現GBM細胞株における806 KIR CAR T細胞の抗原特異的細胞溶解活性を示す。EGFRvIII特異的2173およびwtEGFR特異的セツキシマブ(C225) CARを陽性対照として使用し、CARを有しないT細胞(非形質導入)を陰性対照として使用した。

10

【図6】図6Aは、親U87 MG GBM細胞およびEGFR形質導入クローンにおける野生型EGFRの表面染色を示す。図6Bは、EGFRvIII特異的抗体を用いたEGFRvIIIバリエーションの表面染色を示す。

【図7】図7は、ヒトGBM腫瘍で観察されたEGFRの細胞外ドメイン中のミスセンス変異を示す図である。EGFRvIIIバリエーションについて、エクソン2~7が完全長EGFRから欠失している。

【図8】図8は、CFPおよびEGFR変異体を同時発現するレンチウイルスベクターの図である。

【図9】図9は、wtEGFRを形質導入されたU87 MG細胞株(U87 wtEGFR)におけるEGFRミスセンス変異体の同時発現を示す。Geneart遺伝子合成および部位特異的変異誘発(Thermo fisher)によって、細胞外ドメインに特異的な表示のEGFRミスセンス変異をEGFR遺伝子内に導入した。CFPおよびEGFR変異を同時発現するレンチウイルスベクター(図8)をU87 wtEGFRに形質導入し、蛍光標識細胞分取によってCFP陽性細胞を選別した。

20

【図10】図10は、U87 MG細胞株におけるEGFRミスセンス変異体の同時発現を示す。Geneart遺伝子合成および部位特異的変異誘発(Thermo fisher)によって、細胞外ドメインに特異的な表示のEGFRミスセンス変異をEGFR遺伝子内に導入した。CFPおよびEGFR変異を同時発現するレンチウイルスベクター(図8)をU87 MGに形質導入し、CFP陽性細胞を蛍光標識細胞分取によって選別した。

30

【図11】図11は、キメラ806の重鎖および軽鎖(それぞれSEQ ID NO: 34および33)、ヒト化806の重鎖および軽鎖(SEQ ID NO: 26および27)、ならびに親和性成熟されたヒト化806の重鎖および軽鎖(SEQ ID NO: 29および30)についてのアミノ酸配列を示す。

【図12】図12は、キメラ806の重鎖および軽鎖(それぞれSEQ ID NO: 4および3)、ヒト化806の重鎖および軽鎖(SEQ ID NO: 23および24)、ならびに親和性成熟されたヒト化806の重鎖および軽鎖(SEQ ID NO: 62および63)についてのDNA配列を示す。

【図13】図13は、キメラ806 CAR構築物全体についてのDNA配列(SEQ ID NO: 64)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 65)を示す。

40

【図14】図14は、ヒト化806 CAR構築物全体についてのDNA配列(SEQ ID NO: 66)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 67)を示す。

【図15】図15は、親和性成熟されたヒト化806 CAR構築物全体についてのDNA配列(SEQ ID NO: 68)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 69)を示す。

【図16】図16A-16Bは、皮下腫瘍が806-BBz CARおよび抗PD1抗体の組み合わせ療法で処置された実験からのデータを示す。図16Aは、PBSまたは抗PD-1抗体のいずれかと非形質導入T細胞または806 BBz CAR T細胞との組み合わせで処置された皮下U87 wtEGFR/EGFRvIII細胞株からのデータを示す。組み合わせ療法は、生物発光によって決定された相対腫瘍変化に、より大きな減少を示した。図16Bは、CAR T注入の16日後のPBS + 非形質導入(UTD)細胞と比べた%腫瘍変化を示す。

50

【図17A】図17A-17Cは、(図17A)U87 wtEGFR側腹部腫瘍および(図17B)U87 wtEGFR/EGFRvIII側腹部腫瘍に対する806 KIRのインビボ抗腫瘍活性を示す。腫瘍モデルは、野生型EGFRを単独でまたはEGFR変異の共存下で過剰発現していた。このペア形成は、野生型EGFRの過剰発現の非存在下でのEGFR変異の単独発現よりも大きな生理学的表象である。図17Cは、U87 wtEGFR/EGFRvIII側腹部腫瘍に対する806 BBzのインビボ抗腫瘍活性を示す。

【図17B】図17Aの説明を参照。

【図17C】図17Aの説明を参照。

【図18A】図18A-18Bは、806 CAR T細胞のインビトロ効力を示す。図18Aは、表示されたエフェクター対標的比で24時間ルシフェラーゼアッセイにおけるEGFR発現U87MGおよびU87 wtEGFR細胞株ならびにそのバリエーションEGFRvIII、EGFR R108K/GおよびEGFR A289D/T/V発現U87MGおよびU87 wtEGFR細胞株における806および2173 CAR T細胞の抗原特異的細胞溶解活性を示す。wtEGFR、EGFRvIII、およびその変異体バリエーションを認識するC225 BBz CARおよびC225 KIR CARを陽性対照として、CD19 BBz CARを陰性対照として使用した。図18Bは、表示のエフェクター対標的比で4時間クロム放出アッセイにおけるEGFR発現K562細胞およびそのバリエーションを発現するK562細胞における806 CAR T細胞および2173 CAR T細胞の抗原特異的細胞溶解活性を示す。K562細胞は塩基性EGFRを発現せず、抗原特異性を試験するためのクリーンな背景を提供する。

10

【図18B】図18Aの説明を参照。

20

【図19A】図19A-19Cは、806 CAR T細胞のインビトロ効力を示す。図19A-19Bは、wtEGFR、EGFRvIII、またはEGFR変異体を発現するK562細胞が806 CAR T細胞と48時間共培養され、IFN- γ 、TNF- α およびIL2の分泌がELISAによって測定された実験からの結果を示す。図19Cは、wtEGFR、EGFRvIII、またはEGFR変異体を発現するK562細胞と4時間共培養された場合のCAR T細胞のCD107aの脱顆粒を示す。CD3+細胞上のCD107a発現のパーセンテージとして結果を表す。

【図19B】図19Aの説明を参照。

【図19C】図19Aの説明を参照。

【図20A】図20A-20Cは、初代星状細胞および角化細胞における806 CAR T細胞の抗腫瘍効力を示す。図20Aは、ヒト初代星状細胞および角化細胞へのフローサイトメトリーによって評価されたEGFRの表面発現を示す。図20Bは、初代星状細胞および角化細胞が4時間のクロムアッセイにおいて表示の比の806 CAR T細胞と共培養された実験からの結果を示す。図20Cは、初代星状細胞および角化細胞が806 CAR T細胞と1:5のエフェクター対標的比で共培養され、37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベーションされた後に上清からIFN- γ が測定された実験からの結果を示す。

30

【図20B】図20Aの説明を参照。

【図20C】図20Aの説明を参照。

【図21A】図21A-21Cは、CAR T細胞と共培養された患者由来GBMオルガノイド(GBO)を示す。図21Aは、806 BBz、2173 BBz、およびCD19 BBz CAR T細胞との共培養の24および72時間後のGBOの免疫蛍光染色を示す。図21B-21Cは、(図21B)CD3および(図21C)切断型カスパーゼ3についての細胞免疫染色の定量を示す。CD3発現に有意差がなかったものの、カスパーゼ活性は有意に異なり、806 BBz CAR T細胞が2173 BBz CAR T細胞と比較して増加した腫瘍死滅をもたらしたことを示唆していた。8167 GBOは内因性の増幅されたwtEGFR、EGFRvIII、およびEGFR A289Vを発現し、標準的な神経膠腫幹細胞株よりもGBMの大きな生理学的表象を描写していた。

40

【図21B】図21Aの説明を参照。

【図21C】図21Aの説明を参照。

【発明を実施するための形態】

【0036】

詳細な説明

50

定義

特に定義されない限り、本明細書において用いられる科学用語および技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものに類似する、またはそれと等価である任意の方法および材料を本発明の試験のための実施に使用することができるものの、好ましい材料および方法が本明細書に記載される。本発明を説明および請求するにあたり、以下の用語が使用される。

【0037】

本明細書において使用される用語法は、特定の態様だけを説明することを目的とし、限定的であることは意図しないことも理解されたい。

【0038】

「1つの(a)」および「1つの(an)」という冠詞は、本明細書においてその冠詞の文法的対象物の1つまたは1つよりも多く(すなわち、少なくとも1つ)をいうように用いられる。例として、「1つの(an)要素」は、1つの要素または1つよりも多い要素を意味する。

【0039】

量、時間的持続期間などのような測定可能な値をいう場合に本明細書において用いられる「約」は、特定された値から $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 1\%$ 、なおより好ましくは $\pm 0.1\%$ のばらつきを包含するものとするが、これはそのようなばらつきが、開示された方法を実施する上で妥当なためである。

【0040】

本明細書において用いられる「活性化」とは、検出可能な細胞増殖を誘導するように十分に刺激されたT細胞の状態のことを指す。活性化はまた、誘導されたサイトカイン産生、および検出可能なエフェクター機能に関連することができる。「活性化T細胞」という用語は、特に、細胞分裂を起こしているT細胞のことを指す。

【0041】

本明細書において用いられる「抗体」という用語は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子をいう。抗体は、天然供給源または組み換え供給源に由来する無傷の免疫グロブリンであることができ、無傷の免疫グロブリンの免疫応答性部分であることができる。抗体は、典型的には、免疫グロブリン分子の四量体である。本発明における抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)₂、ならびに一本鎖抗体(scFv)およびヒト化抗体を含む、種々の形態で存在し得る(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。

【0042】

「抗体フラグメント」という用語は、無傷の抗体の一部をいい、無傷の抗体の抗原決定可変領域をいう。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメント、直鎖状抗体、scFv抗体、ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられるが、それに限定されるわけではない。

【0043】

本明細書において用いられる「抗体重鎖」は、天然に存在する立体配座にある全抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち大きい方をいう。

【0044】

本明細書において用いられる「抗体軽鎖」は、天然に存在する立体配座にある全抗体分子中に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうち小さい方をいう。カッパおよびラムダ軽鎖は、2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプをいう。

【0045】

本明細書において用いられる用語「合成抗体」とは、例えば、本明細書において記述されるバクテリオファージによって発現される抗体のような、組み換えDNA技法を用いて生

10

20

30

40

50

成された抗体を意味する。この用語はまた、抗体タンパク質またはその抗体を規定するアミノ酸配列を発現する抗体コードDNA分子の合成によって生成された抗体であって、そのDNA配列またはアミノ酸配列が、利用可能でかつ当技術分野において周知であるDNA配列またはアミノ酸配列の合成技術を用いて得られた抗体も意味すると見なされるべきである。

【0046】

本明細書において用いられる「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を引き起こす分子と定義される。この免疫応答には、抗体産生、または特異的免疫適格細胞の活性化のいずれかまたは両方が含まれ得る。当業者は、事実上、すべてのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原として働くことができることを理解するであろう。さらに、抗原は、組み換えDNAまたはゲノムDNAに由来することができる。当業者は、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、それゆえ、本明細書においてその用語が用いられるとおりの「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列のみによってコードされる必要はないことを理解するであろう。本発明が、1つよりも多い遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含むが、これに限定されるわけではないこと、およびこれらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発するために様々な組み合わせで配置されることは、容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要はまったくないことを理解するであろう。抗原が生物学的試料から生成、合成または由来することができることは、容易に明らかである。そのような生物学的試料は、組織試料、腫瘍試料、細胞または生体液を含むことができるが、それに限定されるわけではない。

10

20

【0047】

本明細書において用いられる場合、「自己由来」という用語は、後にその個体に再び導入される、同じ個体に由来する任意の材料をいうよう意図される。

【0048】

「同種の」は、同じ種の異なる動物に由来する任意の材料を指す。「異種の」は、異なる種の動物に由来する任意の材料を指す。

【0049】

本明細書に使用される「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、免疫エフェクター細胞上に発現され、抗原に特異的に結合するように操作された人工T細胞受容体を指す。CARは、養子細胞移入を用いた治療法として使用され得る。T細胞が、患者から取り出され、特定の形態の抗原に特異的な受容体を発現するように改変される。いくつかの態様では、CARは、選択された標的、例えばB細胞表面受容体に対して特異性を有する。CARはまた、細胞内活性化ドメインと、膜貫通ドメインと、腫瘍関連抗原結合領域を含む細胞外ドメインとを含む場合がある。いくつかの局面では、CARは、CD3ゼータ膜貫通および細胞内ドメインと融合した、抗B細胞結合ドメインを含む細胞外ドメインを含む。

30

【0050】

「切断する」という用語は、核酸分子の骨格などにおける共有結合の破壊またはペプチド結合の加水分解を指す。切断は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解を含むが、それに限定されるわけではない多種多様な方法によって開始することができる。一本鎖切断および二本鎖切断の両方が可能である。二本鎖切断は、2つの別個の一本鎖切断事象の結果として起こることができる。DNAの切断は、平滑末端または付着末端のいずれかの産生を生じることができる。ある特定の態様では、融合ポリペプチドは、切断された二本鎖DNAを標的とするために使用される場合がある。

40

【0051】

本明細書において用いられる「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に顕著に影響も、それを変更もしないアミノ酸改変を指すことが意図される。そのような保存的改変は、アミノ酸の置換、付加および欠失を含む。改変は、部位特

50

異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発などの、当技術分野において公知の標準的な技法により本発明の抗体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、類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、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は、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ-分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。したがって、抗体のCDR領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基と置き換えることができ、変更された抗体は、抗原に結合する能力について、本明細書に記載される機能的アッセイを用いて試験されることができる。

10

【0052】

「共刺激リガンド」は、この用語が本明細書で使用される場合、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上の分子であって、T細胞上の同族共刺激分子と特異的に結合し、それによって、例えばペプチドが負荷されたMHC分子とのTCR/CD3複合体の結合によって提供される一次シグナルに加えて、増殖、活性化、分化などを非限定的に含むT細胞応答を媒介するシグナルを提供する、分子を含む。共刺激リガンドは、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド（ICOS-L）、細胞間接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンホトキシンベータ受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体と結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3と特異的に結合するリガンドを含むことができるが、それに限定されるわけではない。共刺激リガンドはまた、とりわけ、非限定的に、CD27、CD28、4-1BB、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などのT細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体、およびCD83と特異的に結合するリガンドも包含する。

20

30

【0053】

「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、非限定的に増殖などのT細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受容体が含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0054】

「共刺激シグナル」は、本明細書において使用される場合、TCR/CD3の連結などの一次シグナルとの組み合わせで、T細胞増殖および/または鍵となる分子のアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションを導くシグナルを指す。

【0055】

「疾患」は、動物が恒常性を維持できず、疾患が改善されなければその動物の健康が悪化し続ける、動物の健康状態である。対照的に、動物における「障害」は、その動物が恒常性を維持できるが、その動物の健康状態が障害のない場合よりも好ましくない健康状態である。未処置のまま放置されても、障害が必ずしも動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすとは限らない。

40

【0056】

用語「ダウンレギュレーション」は、本明細書において使用される場合、1つまたは複数の遺伝子の遺伝子発現の減少または消失を指す。

【0057】

「有効量」または「治療的有效量」は、本明細書において互換的に用いられ、特定の生物

50

学的結果を達成するのに有効な、または治療的もしくは予防的利益をもたらす、本明細書において記述される化合物、製剤、材料または組成物の量のことを指す。そのような結果には、当技術分野において適切な任意の手段により決定された抗腫瘍活性が含まれ得るが、それに限定されるわけではない。

【0058】

「コードする」とは、定義されたヌクレオチド（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）配列または定義されたアミノ酸配列のいずれかを有する、生物学的過程において他のポリマーおよび高分子の合成のための鋳型として働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAのようなポリヌクレオチドにおける特定のヌクレオチド配列の固有の特性ならびにそれに起因する生物学的特性をいう。したがって、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によって細胞または他の生体系においてタンパク質が産生される場合、タンパク質をコードする。mRNA配列と同一であり通常は配列表に示されるヌクレオチド配列であるコード鎖も、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として用いられる非コード鎖も共に、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードするということができる。

10

【0059】

本明細書において用いられる場合、「内因性」とは、生物、細胞、組織もしくは系の内部に由来するか、またはそれらの内部で産生される、任意の材料をいう。

【0060】

本明細書において用いられる場合、「外因性」という用語は、生物、細胞、組織もしくは系の外部から導入されるか、またはそれらの外部で産生される、任意の材料をいう。

20

【0061】

本明細書において用いられる「増大する」という用語は、T細胞の数の増加のように、数が増加することをいう。一態様では、エクスピボで増大したT細胞は、培養物中に当初存在している数と比べて数が増加する。別の態様では、エクスピボで増大したT細胞は、培養物中の他の細胞型と比べて数が増加する。本明細書において用いられる「エクスピボ」という用語は、生物（例えば、ヒト）から取り出され、生物の外側で（例えば、培養皿、試験管、またはバイオリアクタ中で）繁殖させた細胞をいう。

【0062】

本明細書において用いられる「発現」という用語は、そのプロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳と定義される。

30

【0063】

「発現ベクター」とは、発現されるべきヌクレオチド配列に機能的に連結された発現制御配列を含む組み換えポリヌクレオチドを含むベクターをいう。発現ベクターは、発現のために十分なシス作用性エレメントを含み；発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、またはインビトロ発現系において供給されることができる。発現ベクターには、組み換えポリヌクレオチドを組み入れたコスミド、プラスミド（例えば、裸のもの、またはリポソーム中に含まれるもの）ならびにウイルス（例えば、センダイウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）のような、当技術分野において公知のすべてのものが含まれる。

40

【0064】

本明細書において用いられる「相同の」は、2つのポリマー分子の間、例えば、2つの核酸分子、例えば2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子の間、または2つのポリペプチド分子の間のサブユニット配列の同一性を指す。2つの分子の両方におけるサブユニットの位置が、同じモノマーサブユニットによって占められている場合；例えば、2つのDNA分子の各々における位置がアデニンによって占められているならば、それらはその位置で相同である。2つの配列の間の相同性は、マッチする位置または相同の位置の数の一次関数であり；例えば、2つの配列中の位置の半分（例えば、10サブユニット長のポリマーで5つの位置）が相同ならば、これら2つの配列は50%相同であり；位置の90%（例えば、10個のうち9つ）がマッチするまたは相同ならば、これら2つの配列は90%相同である。

50

【0065】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含んだキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列のような）である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）由来の残基が、所望の特異性、親和性および容量を有するマウス、ラットまたはウサギのような非ヒト種（ドナー抗体）のCDR由来の残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、持ち込まれたCDRまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含むことができる。これらの改変は、抗体の性能をさらに洗練および最適化するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、かつFR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つの、および典型的には2つの、可変ドメインの実質的にすべてを含む。また、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを任意で含む。さらなる詳細については、Jones et al., *Nature*, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596, 1992を参照されたい。

10

【0066】

「完全ヒト」は、分子全体がヒト起源であるか、または抗体のヒト形態と同一のアミノ酸配列からなる、抗体などの免疫グロブリンを指す。

20

【0067】

本明細書において用いられる「同一性」とは、2つのポリマー分子間の、特に2つのポリペプチド分子間のような2つのアミノ酸分子間のサブユニット配列の同一性をいう。2つのアミノ酸配列が同じ位置に同じ残基を有する場合；例えば、2つのポリペプチド分子の各々における位置がアルギニンによって占有されているなら、それらはその位置で同一である。2つのアミノ酸配列がアライメントにおいて同じ位置に同じ残基を有する同一性または程度は、百分率として表現されることが多い。2つのアミノ酸配列間の同一性は、一致しているまたは同一である位置の数の一次関数である；例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、10アミノ酸長のポリマーにおける5つの位置）が同一であるなら、2つの配列は50%同一であり；位置の90%（例えば、10中9）が一致しているまたは同一であるなら、2つのアミノ酸配列は90%同一である。

30

【0068】

本明細書に使用される「免疫グロブリン」または「Ig」という用語は、抗体として機能するタンパク質のクラスとして定義される。B細胞によって発現される抗体は、時に、BCR（B細胞受容体）または抗原受容体と呼ばれる。このクラスのタンパク質に含まれる5つのメンバーは、IgA、IgG、IgM、IgD、およびIgEである。IgAは、唾液、涙液、母乳、消化管分泌物ならびに呼吸器および尿生殖器の粘液分泌物などの身体分泌物中に存在する一次抗体である。IgGは、最も多く見られる循環抗体である。IgMは、大部分の対象における一次免疫応答において産生される主な免疫グロブリンである。これは、凝集、補体結合、および他の抗体応答における最も効率的な免疫グロブリンであり、細菌およびウイルスに対する防御に重要である。IgDは、抗体の機能が分からない免疫グロブリンであるが、抗原受容体として役立つ場合がある。IgEは、アレルゲンに曝露された際にマスト細胞および好塩基球からのメディエーターの放出を引き起こすことにより即時型過敏反応を媒介する免疫グロブリンである。

40

【0069】

本明細書において用いられる「免疫応答」という用語は、リンパ球が抗原分子を外来と特定し、抗体の形成を誘導し、かつ/またはリンパ球を活性化して抗原を除去した場合に起こる、抗原に対する細胞応答として定義される。

50

【0070】

「免疫学的有効量」、「自己免疫疾患阻害有効量」、または「治療量」を表示する場合、投与されるべき本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および状態における個別の差を考慮して医師または研究者によって決定されることができる。

【0071】

本明細書において用いられる「説明資料」は、本発明の組成物および方法の有用性を伝達するために使用することができる刊行物、記録、図、または任意の他の表現媒体を含む。本発明のキットの説明資料は、例えば、本発明の核酸、ペプチド、および/もしくは組成物が入った容器に貼付される場合があり、または核酸、ペプチド、および/もしくは組成物が入った容器と一緒に輸送される場合がある。あるいは、説明資料は、その説明資料および化合物がレシピエントによって協同的に使用される意図で容器と別々に輸送される場合がある。

10

【0072】

本明細書に使用される「アイソフォーム」という用語は、類似であるが同一でないアミノ酸配列を有し、かつ異なる遺伝子によって、または異なるエクソンが除去された同じ遺伝子からのRNA転写物によってコードされる、2つ以上の機能的に類似のタンパク質のいずれかを意味する。

【0073】

「単離された」は、自然状態から変更された、または取り出されたことを意味する。例えば、生きた動物中に自然に存在する核酸またはペプチドは「単離されて」いないが、その自然状態の共存材料から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは、「単離されている」。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができる、または例えば宿主細胞などの非天然環境中に存在することができる。

20

【0074】

「KIR」は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体を意味する。KIRは、ヒトおよび非ヒト霊長類において特徴付けられており、NK細胞およびいくつかのT細胞を含むリンパ球のある特定のサブセット上に存在する多型1型膜貫通分子である。KIRは、MHCクラスI分子のアルファ1ドメインおよびアルファ2ドメイン中の決定基と相互作用することによってNK細胞の死滅機能を調節する。この相互作用によって、それらはウイルス感染細胞または腫瘍細胞を検出できるようになる。大部分のKIRは阻害性であり、これは、KIRがMHCを認識することが、KIRを発現するNK細胞の細胞傷害活性を抑制することを意味する。限られた数のKIRだけが細胞を活性化する能力を有する。KIR遺伝子ファミリーは、19番染色体上に位置する白血球受容体複合体（LRC）の100～200Kb領域（19q13.4）内にコードされる少なくとも15個の遺伝子座位（KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3）および2つの偽遺伝子（KIR2DP1およびKIR3DP1）を有する。LRCは、特有のIg様細胞外ドメインを有する他の細胞表面分子をコードする遺伝子を含有する、急速に進化している免疫遺伝子の大きな1Mbの密なクラスターを構成する。加えて、拡張されたLRCは、膜貫通アダプター分子DAP10およびDAP12をコードする遺伝子を含有する。

30

40

【0075】

本明細書において用いられる「ロックダウン」という用語は、1つまたは複数の遺伝子の遺伝子発現における減少を指す。

【0076】

本明細書において用いられる「ロックアウト」という用語は、1つまたは複数の遺伝子の遺伝子発現の消失を指す。

【0077】

本明細書において用いられる「レンチウイルス」は、レトロウイルス科の属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染することができる点がレトロウイルスの中で独特であり

50

；レンチウイルスは、宿主細胞のDNA内にかなりの量の遺伝情報を送達することができるので、遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIV、およびFIVは、すべて、レンチウイルスの例である。レンチウイルス由来のベクターは、かなりのレベルのインビボ遺伝子導入を達成する手段を与える。

【0078】

本明細書において用いられる「限られた毒性」という用語は、インビトロまたはインビボのいずれかで健康な細胞、非腫瘍細胞、非罹患細胞、非標的細胞またはそのような細胞の集団に対して実質的にマイナスの生物学的効果、抗腫瘍効果、または実質的にマイナスの生理的症状の欠如を明らかに示す本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および/または抗体を指す。

10

【0079】

本明細書において用いられる用語「改変された」とは、本発明の分子または細胞の変化した状態または構造を意味する。分子は化学的に、構造的に、および機能的になど、多くの方法で改変され得る。細胞は、核酸の導入によって改変され得る。

【0080】

本明細書において用いられる用語「モジュレートする」とは、処置もしくは化合物の非存在下での対象における応答のレベルと比較して、および/または他の点では同一であるが処置を受けていない対象における応答のレベルと比較して、対象における応答のレベルの検出可能な増加または減少を媒介することを意味する。この用語は、対象、好ましくはヒトにおいて、天然のシグナルもしくは応答を攪乱させ、かつ/またはそれに影響を与え、それにより有益な治療応答を媒介することを包含する。

20

【0081】

本発明の文脈において、一般的に存在する核酸塩基に関する以下の略語が用いられる。「A」はアデノシンをいい、「C」はシトシンをいい、「G」はグアノシンをいい、「T」はチミジンをいい、そして「U」はウリジンをいう。

【0082】

特別の定めのない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重型である、かつ同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という語句はまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、型によってはイントロンを含み得る限り、イントロンを含み得る。

30

【0083】

「機能的に連結された」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間の機能的連関であって、後者の発現をもたらす機能的連関を指す。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列との機能的関係に置かれた場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と機能的に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響するならば、プロモーターは該コード配列に機能的に連結されている。一般的に、機能的に連結されたDNA配列は隣接しており、必要な場合、2つのタンパク質コード領域を同じリーディングフレーム内につないでいる。

【0084】

「過剰発現された」腫瘍抗原または腫瘍抗原の「過剰発現」という用語は、患者の特定の組織または器官内の固形腫瘍のような疾患区域からの細胞における腫瘍抗原の発現が、その組織または器官由来の正常細胞内の発現レベルと比べて異常なレベルであることを示すよう意図される。腫瘍抗原の過剰発現によって特徴付けられる固形腫瘍または血液悪性腫瘍を有する患者は、当技術分野において公知の標準的なアッセイによって決定されることができる。

40

【0085】

免疫原性組成物の「非経口」投与は、例えば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)、もしくは胸骨内注射、または注入技術を含む。

【0086】

50

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖と定義される。さらに、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書において用いられる核酸およびポリヌクレオチドは互換的である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、それらは単量体「ヌクレオチド」に加水分解することができるという一般知識を有する。単量体ヌクレオチドは、ヌクレオチドに加水分解することができる。本明細書において用いられる場合、ポリヌクレオチドには、非限定的に、組み換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCR（商標）などを用いた組み換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングを含む、当技術分野において利用可能な任意の手段により、ならびに合成手段により得られるすべての核酸配列が含まれるが、それに限定されるわけではない。

10

【0087】

本明細書において用いられる場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、互換的に用いられ、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基で構成される化合物をいう。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成することができるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって相互につなが合わされた2つまたはそれよりも多いアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書において用いられる場合、この用語は、例えば、当技術分野において一般的にはペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーともいわれる短鎖と、当技術分野において一般にタンパク質といわれる長鎖の両方をいい、その中には多くのタイプがある。「ポリペプチド」には、とりわけ、例えば、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組み換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

20

【0088】

本明細書に使用される「プロモーター」という用語は、ポリヌクレオチド配列の特定の転写を開始するために必要とされる、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列と定義される。

【0089】

本明細書に使用される、「プロモーター/調節配列」という用語は、プロモーター/調節配列と機能的に連結された遺伝子産物の発現に必要とされる核酸配列を意味する。いくつかの例では、この配列はコアプロモーター配列の場合があり、他の例では、この配列はエンハンサー配列および遺伝子産物の発現に必要とされる他の調節エレメントも含む場合がある。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。

30

【0090】

「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合、細胞のほとんどまたはすべての生理条件の下で、遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列である。

【0091】

「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合、実質的にはプロモーターに対応する誘導物質が細胞内に存在する場合にのみ遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列である。

40

【0092】

「組織特異的」プロモーターは、遺伝子によってコードまたは特定されるポリヌクレオチドと機能的に連結された場合、実質的には細胞が、プロモーターに対応する組織型の細胞である場合にのみ遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列である。

【0093】

「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播に役割を演じる多種多様なシグナル伝達分子間の生化学的関係を指す。「細胞表面受容体」とい

50

う語句は、シグナルを受け取り、細胞の形質膜を通過してシグナルを伝播することが可能な分子および分子の複合体を含む。

【0094】

抗体に関して本明細書において用いられる用語「特異的に結合する」とは、特異的抗原を認識するが、試料中の他の分子を実質的に認識またはそれと結合しない抗体を意味する。例えば、1つの種由来の抗原に特異的に結合する抗体が、1つまたは複数の種由来のその抗原にも結合する場合がある。しかし、そのような異種間反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。別の例において、抗原に特異的に結合する抗体が、その抗原の異なる対立遺伝子型にも結合する場合がある。しかし、そのような交差反応性はそれ自体で、特異的としての抗体の分類を変化させることはない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語を、抗体、タンパク質またはペプチドと第2の化学種との相互作用に関連して用いて、相互作用が化学種上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味することができる；例えば、抗体は、タンパク質全体ではなく特定のタンパク質構造を認識し、それに結合する。抗体がエピトープ「A」に特異的であるなら、標識された「A」およびその抗体を含む反応物中にエピトープAを含む分子（または遊離した、標識されていないA）が存在することにより、その抗体に結合した標識されたAの量が低減するであろう。

10

【0095】

「刺激」という用語は、刺激分子（例えば、TCR/CD3複合体）がその同族リガンドと結合し、それによって、非限定的に、TCR/CD3複合体を介するシグナル伝達のような、シグナル伝達事象を媒介することにより誘導される一次応答を意味する。刺激は、TGF-βのダウンレギュレーション、および/または細胞骨格構造の再編成などのような、ある特定の分子の発現の変化を媒介することができる。

20

【0096】

「刺激分子」とは、この用語が本明細書において用いられる場合、抗原提示細胞上に存在する同族刺激リガンドと特異的に結合する、T細胞上の分子を意味する。

【0097】

本明細書において用いられる「刺激リガンド」は、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）に存在する場合、T細胞上の同族結合パートナー（本明細書において「刺激分子」といわれる）と特異的に結合でき、それによって、活性化、免疫応答の開始、増殖などを含むが、それに限定されるわけではない、T細胞による一次応答を媒介するリガンドを意味する。刺激リガンドは当技術分野において周知であり、とりわけ、ペプチドが負荷されたMHCクラスI分子、抗CD3抗体、スーパーアゴニスト抗CD28抗体、およびスーパーアゴニスト抗CD2抗体を包含する。

30

【0098】

「対象」という用語は、免疫応答を誘発することができる生物（例えば、哺乳動物）を含むよう意図される。ここで用いられる「対象」または「患者」は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物であり得る。非ヒト哺乳動物には、例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコおよびマウス哺乳動物のような、家畜およびペットが含まれる。好ましくは、対象はヒトである。

40

【0099】

本明細書において用いられる「実質的に精製された」細胞は、他の細胞型を本質的に有しない細胞である。実質的に精製された細胞は、その天然状態で通常は関連している他の細胞型から分離された細胞も指す。いくつかの例では、実質的に精製された細胞の集団は、細胞の相同な集団を指す。他の例では、この用語は、それらの自然状態でもともと関連する細胞から分離された細胞を指すだけである。いくつかの態様では、細胞はインビトロで培養される。他の態様では、細胞はインビトロで培養されない。

【0100】

「標的部位」または「標的配列」は、結合が起こるために十分な条件下で結合分子が特異的に結合し得る核酸の一部を定義するゲノム核酸配列を指す。

50

【0101】

本明細書において用いられる「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、抗原の提示に
 応答してT細胞の活性化に關与する膜タンパク質複合体を指す。TCRは、主要組織適合
 抗原複合体分子に結合した抗原を認識することを担う。TCRは、アルファ（ α ）およびベ
 ータ（ β ）鎖のヘテロ二量体から構成されるとはいえ、いくつかの細胞では、TCRは、
 ガンマおよびデルタ（ γ/δ ）鎖からなる。TCRは、アルファ/ベータ形態およびガン
 マ/デルタ形態で存在する場合があります、それらの形態は構造的に類似するが、別個の解剖
 学的位置および機能を有する。各鎖は、2つの細胞外ドメイン、すなわち可変および定常
 ドメインから構成される。いくつかの態様では、TCRは、例えば、ヘルパーT細胞、細胞
 傷害性T細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、およびガンマデ
 ルタT細胞を含む、TCRを含む任意の細胞で改変される場合がある。

10

【0102】

本明細書において用いられる「治療的」という用語は、処置および/または予防を意味す
 る。治療効果は、疾患状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。

【0103】

本明細書において用いられる「トランスフェクションされた」または「形質転換された」
 または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入される
 過程をいう。「トランスフェクションされた」または「形質転換された」または「形質導
 入された」細胞は、外因性核酸でトランスフェクションされた、形質転換された、または
 形質導入されたものである。この細胞には初代対象細胞およびその子孫が含まれる。

20

【0104】

疾患を「処置する」とは、この用語が本明細書において用いられる場合、対象が被ってい
 る疾患または障害の少なくとも1つの徴候または症状の頻度または重症度を低減すること
 を意味する。

【0105】

処置の送達を指すために本明細書において使用される場合の「局所の」または「局所的に
 」によって、髄腔内、腫瘍内、または非経口ではない他の形態の処置送達が意味される。

【0106】

本明細書に使用される「転写制御下で」または「機能的に連結された」という語句は、R
 NAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するためにプロ
 モーターがポリヌクレオチドに関して正しい位置および方向にあることを意味する。

30

【0107】

「ベクター」は、単離された核酸を含み、かつ単離された核酸を細胞の内部に送達するた
 めに使用できる材料の組成物である。直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性
 化合物と結び付いたポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを含むが、それに限定
 されるわけではない、多数のベクターが当技術分野において公知である。したがって、「
 ベクター」という用語は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。この用語
 はまた、例えばポリリシン化合物、リポソームなどのような、細胞内への核酸の移入を容
 易にする非プラスミド性および非ウイルス性の化合物を含むと解釈されるべきである。ウ
 イルスベクターの例としては、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ア
 デノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙
 げられるが、それに限定されるわけではない。

40

【0108】

範囲：本開示の全体を通じて、本発明の様々な局面を範囲の形式で提示することができる
 。範囲の形式の記述は、単に便宜および簡略化のためのものであり、本発明の範囲に対す
 る柔軟性のない制限と解釈されるべきではないことが理解されるべきである。したがって
 、範囲の記述は、可能なすべての部分範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示
 したものと見なされるべきである。例えば、1~6のような範囲の記述は、1~3、1~4
 、1~5、2~4、2~6、3~6などのような部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数、
 例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を具体的に開示したものと見なされるべき

50

である。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0109】

説明

本発明は、臨床的に意義のあるEGFR変異型タンパク質との交差反応性を有する高親和性キメラ抗原受容体（CAR）およびその使用方法を提供する。ある特定の態様では、CARは、上皮増殖因子受容体（EGFR）の複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。ある特定の態様では、CARはヒト化CARである。ある特定の態様では、CARは親和性成熟されたヒト化CARである。ある特定の態様では、CARはKIR CARである。ある特定の局面では、本発明は、本発明のCARを投与することによる、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法を含む。

10

【0110】

キメラ抗原受容体（CAR）

本発明は、複数のEGFRアイソフォームに結合する／親和性を有することが可能なキメラ抗原受容体（CAR）を提供する。該CARをコードする核酸、該核酸をコードするベクター、および該CAR、ベクター、または核酸を含む改変された細胞（例えば、改変されたT細胞）も提供される。

【0111】

本発明の対象CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な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。本発明の対象CARは、任意でヒンジドメインを含み得る。したがって、本発明の対象CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと、ヒンジドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含む。ある特定の態様では、対象CARのドメインの各々は、リンカーによって隔てられている。

20

【0112】

抗原結合ドメインは、細胞における発現のために、本明細書の他の箇所にそれぞれ記載される膜貫通ドメインまたは細胞内ドメインなどのCARの別のドメインに機能的に連結されている場合がある。一態様では、抗原結合ドメインをコードする第1の核酸配列は、膜貫通ドメインをコードする第2の核酸に機能的に連結され、共刺激シグナル伝達ドメインをコードする第3の核酸配列にさらに機能的に連結されている。

30

【0113】

本明細書に記載される抗原結合ドメインを、膜貫通ドメインのいずれか、細胞内ドメインのいずれか、または本発明のCARに含まれ得る本明細書に記載される他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。

【0114】

一局面では、本発明は、上皮増殖因子受容体（EGFR）の複数のアイソフォームに結合することが可能な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単離されたCARを含む。CARが結合することが可能なEGFRアイソフォームは、野生型EGFR（wtEGFR）、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFR108K、EGFR108G、EGFRG598V、EGFRD126Y、EGFRC628F、EGFR108K/A289V、EGFR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、およびEGFRパリアントIIを含むが、それに限定されるわけではない。

40

【0115】

一局面では、本発明は、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと、CD8ヒンジドメインと、CD8膜貫通ドメインと、4-1BBZ細胞内ドメインとを含む単離されたCARを含む。別の局面では、本発明は、CARをコードする単離された核酸であって、CARが、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと、CD8ヒンジドメインと、CD8膜貫通ドメインと、4-1BBZ細胞内ドメインとを含む、単離された核酸を含む。本発明の別の局面は、CARを含む単離されたポリペプチドであって、CARが、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原

50

結合ドメインと、CD8ヒンジドメインと、CD8膜貫通ドメインと、4-1BBZ細胞内ドメインとを含む、単離されたポリペプチドを含む。

【0116】

一局面では、本発明は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）ベースのCARを含む。KIR-CARは、ナチュラルキラー（NK）細胞によって通常発現されるキラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）に基づく。ある特定の態様では、本発明は、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと、KIR膜貫通ドメインと、KIR細胞内（細胞質）ドメインとを含むKIR-CARを含む。ある特定の態様では、本発明は、KIR-CARをコードする単離された核酸であって、KIR-CARが、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと、KIR膜貫通ドメインと、KIR細胞内（細胞質）ドメインとを含む、単離された核酸を含む。ある特定の態様では、本発明は、KIR-CARを含む単離されたポリペプチドであって、KIR-CARが、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと、KIR膜貫通ドメインと、KIR細胞内（細胞質）ドメインとを含む、単離されたポリペプチドを含む。

10

【0117】

一局面では、本発明は、ヒト化EGFR CARを含む。一局面では、本発明は、親和性成熟されたヒト化EGFR CARを含む。

【0118】

（表1）アミノ酸配列およびヌクレオチド配列

SEQ ID NO:		
1	806-scFv (VH>VL)	GATGTCCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTAGCCTGGTCAAGCCTA GCCAGAGCCTGAGCCTGACATGTACCGTGACCGGCTACAGCA TCACCAGCGACTTCGCCTGGAAGTGGATCAGACAGTTCCTCCGG CAACAAGCTGGAATGGATGGGCTACATCAGCTACAGCGGCAA CACCCGGTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCTCCATCACC AGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCTGCAGCTGAACAGC

20

30

40

50

		GTGACCATCGAGGACACCGCCACCTACTACTGTGTGACAGCCG GCAGAGGCTTCCCTTATTGGGGACAGGGAACCCTGGTCACAGT GTCTGCTGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCTTCTGGC GGTGGCTCTGATATCCTGATGACACAGAGCCCCAGCAGCATGT CTGTGTCCCTGGGCGATACCGTGTCCATCACCTGTACAGCAG CCAGGACATCAACAGCAACATCGGCTGGCTGCAGCAGAGGCC TGGCAAGTCTTTAAGGGCCTGATCTACCACGGCACCACCTG GATGATGAGGTGCCAGCAGATTTCCGGCTCTGGAAGCGGA GCCGACTACTCCCTGACAATCAGCAGCCTGGAAGCGAGGAC TTCGCCGATTACTACTGCGTGCAGTACGCCAGTTTCTTGA CCTTTGGAGGCGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG
2	806-scFv (VH>VL)	DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSDFAWNWIRQFPGNK LEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDT ATYYCVTAGRFPYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSSGGGSDIL MTQSPSSMSVSLGDTVSIHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFGLIY HGTNLDDEVPSRFSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQY A QF PWTFGGGTKLEIKR
3I	806 scFv (VL>VH)	GATATTCTGATGACTCAATCTCCGCTTCTATGAGCGTGAGCTT GGGTGACACCGTCAGCATCACCTGTCAATCCAGCCAGGATATA AACTCAAATATCGGCTGGCTCCAGCAACGCCAGGCAAGTCA TTCAAGGGGCTTATTTATCATGGCACCAATCTTGACGATGAAG TCCCATCACGCTTCAGCGGATCAGGCTCAGGTGCGGACTATTC CTTGACTATAAGTTCCTCGAATCTGAGGATTTCCGCCACTAT TATTGCGTACAATACGCCAGTTTCCCTGGACCTTCGGAGGCG GCACCAAATTGGAGATAAAAAGGGGTGGAGGAGGATCAGGC GGGGGTGGAAGCGGCGGAGGAGGCAGCGACGTACAACCTGCA AGAATCCGGGCCGAGTTTGGTCAAGCCCTCTCAATCTCTTCT CTCACTTGACCGGTCACCGGATACTCCATAACCAGCGATTTG CGTGGAATTGGATTCGACAATTTCCAGGGAATAAATTGGAATG GATGGGATATATCAGTTATTCTGGTAATACCAGATACAACCCG TCATTTGAAAAGTTCGATCTCTATAACACGAGACACTTCAAAGA ATCAGTTCTTCTCAGCTCAATCTGTAACCATCGAAGATACT GCTACTTATTACTGTGTAACGGCGGGTCGAGGATCCCCTACT GGGGCCAGGGTACACTGGTACTGTTCCGCC
32	806 scFv (VL>VH)	DILMTQSPSSMSVSLGDTVSIHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKG LIYHGTNLDDEVPSRFSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQESGPSLV KPSQSLSLTCTVTGYSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGN TRYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGP PYWGQGLVTVSA
3	キメラ 806 VL	DILMTQSPSSMSVSLGDTVSIHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKG LIYHGTNLDDEVPSRFSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR
33	キメラ 806 VL	gatatcctgatgacacagagcccagcagcatgtctgttccctggcgataccgtgtcatcacctgtc acagcagccagacatcaacagcaacatcggctggctgcagcagagcctggcaagtctfttaagg cctgatctaccacggcaccacactggatgatgagggtcccagcagatttccggctctggaagcggag ccgactactccctgacaatcagcagcctggaagcgaggacttcgacgattactactcgtgcagtacg cccagttccctggacctftggagcggcacaagctggaaatcaagcgg
4	キメラ 806 VH	DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSDFAWNWIRQFPGNK LEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDT ATYYCVTAGRFPYWGQGLVTVSA
34	キメラ 806 VH	gatgtccagctgcaagagctgtgacctagcctgtcaagcctagccagagcctgagcctgacatgtac cgtgaccggctacagatcacaccagcacttcgctggaactggatcagacagttccccggcaacaagc tggaaatggatggctacatcagctacagcggcaacaccggctacaaccagcctgaagtcgggat

10

20

30

40

50

		ctccatcaccagagaccagcaagaaccagttctctcagctgaacagcgtgaccatcgaggaca cggccacactactgtgtgacagccggcagaggctccctattggggacagggaaacctggtcaca gtgtctgct
5	LCDRI	HSSQDINSNIG
6	LCDR2	HGTNLDD
7	LCDR3	VQYAQFPWT
8	HCDR1	GYSITSDFAWN
9	HCDR2	GYISYSGNTRYNPSLK
10	HCDR3	VTAGRGFPYW
11	CD8 ヒンジ	ACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCA TCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACC CGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCC TGCGAT
71	CD8 ヒンジ	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCCGGCGCCCACC ATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGC CAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCG CCTGTGAT
72	CD8 ヒンジ	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
12	CD8 膜貫通 ドメイン	ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTTGC TGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGT
73	CD8 膜貫通 ドメイン	ATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTGC TGCTGTCCCTGGTCATCACCTGTACTGC
74	CD8 膜貫通 ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
13	4-1BB 細胞内 ドメイン	AAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCT TCATGAGGCCGTGTCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTT CATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTG
75	4-1BB 細胞内 ドメイン	AAGCGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCC TTCTGCGGCTGTGTCAGACCACAGGAAGAGGACGGCTGT AGCTGTAGATTCCCCGAGGAAGAGGAAGGCGGCTGCGAGCTG
76	4-1BB 細胞内 ドメイン	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
14	CD3 ゼータ	CGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAG CAGGGGCAGAACAGCTCTACAACGAACCAATCTTGGTCCGG AGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGA CCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGA GGCCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGC CTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAA AGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAA GGACACCTATGACGCTCTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
77	CD3 ゼータ	AGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTATCAG CAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGA CGGGAGGAATACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCGCGGA CCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCCCAGGA AGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC CTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCA AGGGCCATGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAA GA
78	CD3 ゼータ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDP

10

20

30

40

50

		EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
15	CD8 シグナル認識 ペプチド	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGC TGCTCCACGCCGCCAGGCCG
70	CD8 シグナル認識 ペプチド	MALPVTALLLPLALLLHAARP
16	DAP12	ATGGGGGGACTTGAACCCCTGCAGCAGGTTCCCTGCTCCTGCCTC TCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGTCCAGGC CCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGCTG GCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATT GCCCTGGCCGTGTACTTCCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGC GAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAAACAGCGTATCACTG AGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGG ATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAA
17	T2A	GTCGAGGGCGGGAGAGGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGC GGTGACGTGGAGGAGAAATCCCGGCCCTAGG
18	リンカー+ KIRS2	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGGGGTTCCCTCACCCACTGAA CCAAGCTCCAAAACCGGTAACCCAGACACCTGCATGTTCTGA TTGGGACCTCAGTGGTCAAATCCCTTTTACCATCCTCCTCTTC TTTCTCCTTCATCGCTGGTGCTCCAACAAAAAAAATGCTGCTG TAATGGACCAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGCG AGGATTCTGATGAACAAGACCATCAGGAGGTGTCATACGCAT AA
19	806-BBZ- CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGC TGCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCGATGTCCAGCTGCAAG AGTCTGGCCCTAGCCTGGTCAAGCCTAGCCAGAGCCTGAGCCT GACATGTACCGTGACCGGCTACAGCATCACCAGCGACTTCGCC TGGAAGTGGATCAGACAGTTCCCGGCAACAAGCTGGAATGG ATGGGCTACATCAGCTACAGCGGCAACACCCGGTACAACCC AGCCTGAAGTCCCGGATCTCCATCACCAGAGACACCAGCAAG AACAGTTCTTCTGTCAGCTGAACAGCGTGACCATCGAGGACA CCGCCACCTACTACTGTGTGACAGCCGGCAGAGGCTTCCCTTA TTGGGGACAGGGAAACCTGGTACAGTGTCTGCTGGTGGCGG AGGATCTGGCGGAGGCCGATCTTCTGGCGGTGGCTCTGATATC CTGATGACACAGAGCCCCAGCAGCATGTCTGTGTCCCTGGGCG ATACCGTGTCCATCACCTGTCACAGCAGCCAGGACATCAACAG CAACATCGGCTGGCTGCAGCAGAGGCCTGGCAAGTCTTTTAAG GGCCTGATCTACCACGGCACCAACCTGGATGATGAGGTGCC AGCAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGAGCCGACTACTCCCTGA CAATCAGCAGCCTGGAAAGCGAGGACTTCGCCGATTACTACT GCGTGCAGTACGCCAGTTTCTTGGACCTTTGGAGGCGGCAC AAAGCTGGAATCAAGCGGGCTAGCACCCTACCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTG TCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCC GTGCATAACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTT GGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACT CGTGATCACTTTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGCTG TACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTC AAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCAGAGGAGGAGG AAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGCAGCGCAG ATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCCAGCTCTACAACG AACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACA

10

20

30

40

50

		AGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGC AGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAG GATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAAGG GAACGCAGAAGAGGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGG ACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATG CAGGCCCTGCCGCTCGGTGA
20	806-BBZ-CAR	MALPVTALLPLALLLHAARPGSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTC TVTGYSTITDFAWNIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKS RISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYCVTAGRGFPYWGQTL VTVSAGGGGSSGGSSGGSDILMTQSPSSMSVSLGDTVSTCHS SQDINSNIGWLQORPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGAD YSLTISSESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKRASTTTPAP RPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHGDLQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
21	806-KIR-CAR	ATGGGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGTTCTGCTCCTGCCTC TCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGTCCAGGC CCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGCTG GCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATT GCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGC GAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGAAACAGCGTATCACTG AGCCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGG ATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAG TCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCG GTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGATGGCCTTACCAG TGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGC CAGGCCGGGATCCGATGTCCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTAG CCTGGTCAAGCCTAGCCAGAGCCTGAGCCTGACATGTACCGTG ACCGGTACAGCATCACCAGCGACTTCGCTGGAAGTGGATCA GACAGTTCCCCGGCAACAAGCTGGAATGGATGGGTACATCA GCTACAGCGGCAACACCCGGTACAACCCAGCCTGAAGTCCC GGATCTCCATCACCAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCTC GCAGCTGAACAGCGTGACCATCGAGGACACCGCCACCTACTA CTGTGTGACAGCCGGCAGAGGCTTCCCTTATTGGGGACAGGG AACCTGGTACAGTGTCTGCTGGTGGCGGAGGATCTGGCGG AGGCGGATCTTCTGGCGGTGGCTCTGATATCCTGATGACACAG AGCCCAGCAGCATGTCTGTGTCCCTGGGCGATACCGTGTCCA TCACCTGTACAGCAGCCAGGACATCAACAGCAACATCGGCT GGCTGCAGCAGAGGCTGGCAAGTCTTTTAAGGGCCTGATCTA CCACGGCACCAACCTGGATGATGAGGTGCCAGCAGATTTTCC GGTCTGGAAGCGGAGCCGACTACTCCCTGACAATCAGCAGC CTGGAAGCGAGGACTTCGCCGATFACTACTGCGTGCAGTACG CCCAGTTTCTTGGACCTTTGGAGGCGGCACAAAGCTGGAAT CAAGCGGGCTAGCGGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGGGGTT CTCACCCACTGAACCAAGCTCCAAAACCGGTAACCCAGACA CCTGCATGTTCTGATIGGGACCTCAGTGGTCAAAAATCCCTTTC ACCATCTCTCTTCTTCTCTCTTCTCCTTCATCGCTGGTGCTCCA AAAAATGCTGCTGTAATGGACCAAGAGCCTGCAGGGAACAG AACAGTGAACAGCGAGGATTCTGATGAACAAGACCATCAGGA GGTGTACATACGCATAA
22	806-KIR-CAR	MGGLEPCSRFLLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLAG IVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRQKITETESP

10

20

30

40

50

		YQELQQRSDVYSDLNTQRPYYKVEGGEGRGSLLTCGDVEEN PGPRMALPVTALLLPLALLLHAARPGSDVQLQESGPSLVKPSQSL SLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPS LKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQ GTLVTVSAGGGGSSGGSSGGSDILMTQSPSSMSVSLGDTVIT CHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGS GADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKRASGG GGSGGGSSPTEPSSKTGNPRHLHVLIGTSVVKIPFTILLFLLHR WCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA
23	ABT-806 (ヒト化 806) VH	CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCTA GCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTACAGCAT CAGCAGCGACTTCGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGC AAAGGACTGGAATGGATGGGCTACATCAGCTACAGCGGCAAC ACCAGATACCAGCCTAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCAGC AGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCCTGAAGCTGAACAGC GTGACAGCCGCCGATACCGCCACCTACTATTGTGTGACAGCTG GCAGAGGCTTCCCCTATTGGGGACAGGGAACACTGGTCACCG TTAGCTCT
24	ABT-806 (ヒト化 806) VL	GATATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCATGTCCGTGTCC GTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTACAGCAGCCAGGAC ATCAACAGCAACATCGGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGCAAG TCTTTTAAGGGCCTGATCTACCACGGCACCAACCTGGATGATG GCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTA CACCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACC TATTACTGCGTGCAGTACGCCAGTTTCTTGGACCTTTGGAG GCGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG
25	ABT-806 (ヒト化 806) scFv	CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCTA GCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTACAGCAT CAGCAGCGACTTCGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGC AAAGGACTGGAATGGATGGGCTACATCAGCTACAGCGGCAAC ACCAGATACCAGCCTAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCAGC AGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCCTGAAGCTGAACAGC GTGACAGCCGCCGATACCGCCACCTACTATTGTGTGACAGCTG GCAGAGGCTTCCCCTATTGGGGACAGGGAACACTGGTCACCG TTAGCTCTGATATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCATGTC CGTGTCCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTACAGCAG CCAGGACATCAACAGCAACATCGGCTGGCTGCAGCAGAAGCC CGGCAAGTCTTTTAAGGGCCTGATCTACCACGGCACCAACCTG GATGATGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCA CCGACTACACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTT CGCCACCTATTACTGCGTGCAGTACGCCAGTTTCTTGGACC TTTGGAGGCGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG
79	ABT-806 (ヒト化 806) scFv VH>VL	CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCTA GCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTACAGCAT CAGCAGCGACTTCGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGC AAAGGACTGGAATGGATGGGCTACATCAGCTACAGCGGCAAC ACCAGATACCAGCCTAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCAGC AGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCCTGAAGCTGAACAGC GTGACAGCCGCCGATACCGCCACCTACTATTGTGTGACAGCTG GCAGAGGCTTCCCCTATTGGGGACAGGGAACACTGGTCACCG TTAGCTCTGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCTTCTGG CGTGGCTCTGATATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCAT GTCCGTGTCCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTACAGC AGCCAGGACATCAACAGCAACATCGGCTGGCTGCAGCAGAAG

10

20

30

40

		CCCAGCAAGTCTTTTAAGGGCCTGATCTACCACGGCACCAACC TGGATGATGGCGTGCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGG CACCGACTACACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGAC TTCGCCACCTATTACTGCGTGCAGTACGCCAGTTTCCTTGGAC CCTTTGGAGGCGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG
81	ABT-806 (ヒト化 806) scFv VL>VH	GGCGAACTAAAGGTGCAAAACACGGCGGAGGTTTCCAGGTTCC TTTACCCGCATGACGTGCGTCATTATCCACCGCTTCAGGAGT CCGACGTCCGATCTATAACCAGTCCACATCAGCCACGGTCTCG GCGACGGTCTTTTAGACGACCCGTGCGGTAGTAGGTCCAACCA CGGCACCATCTAGTCCGGAATTTTCTGAACGGCCCCGAAGACG ACGTGGTTCGGCTACAACGACAACACTACAGGACCGACGACACT GTCCACTACCAGTGAGACAGAGGGTGCCTGTGCCTGTACGAC GACCCGAGACACAGTAGACCTATAGTCTCGGTGGCGGTCTTC TAGGCGGAGGCGGTCTAGGAGGCGGTGGTCTCGATTGCCACT GGTCACAAGGGACAGGGTTATCCCCTTCGGAGACGGTTCGAC AGTGTGTTATCATCCACCGCCATAGCCGCCGACAGTGCACAA GTCAAGTCTTCTTGACCAAGAACGACCACAGAGACGACTA CCACTAGGCCCTGAAGTCCGATCCGACCATAGACCACAACGG CGACATCGACTACATCGGGTAGGTAAGGTCAGGAAACGGTCC TCCGACAGACTAGGTCAAGGTCCGCTTCAGCGACGACTACGA CATCGGCCTGTCCATGTCCAGTCCGAGTCACAAACCGATCCG AACTGGTCCGGTCCCGGTCTGAGAACGTCGACTTGGAC
26	ABT-806 (ヒト化 806) VH アミノ酸 配列	QVQ LQE SGP GLV KPS QTL SLT CTV SGY SIS SDF AWN WIR QPP GKG LEW MGY ISY SGN TRY QPS LKS RIT ISR DTS KNQ FFL KLN SVT AAD TAT YYC VTA GRG FPY WGQ GTL VTV SS
27	ABT-806 (ヒト化 806) VL	DIQ MTQ SPSS MSVS VGDR VTIT CHSS QDIN SNIG WLQQ KPGK SFGGLIYHG TNLD DGVP SRFS GSGS GTDY TLTI SSLQ PEDF ATYY CVQY AQFP WTFG GGTK LEIKR
28	ABT-806 (ヒト化 806) scFv VH>VL	QVQ LQE SGP GLV KPS QTL SLT CTV SGY SIS SDF AWN WIR QPP GKG LEW MGY ISY SGN TRY QPS LKS RIT ISR DTS KNQ FFL KLN SVT AAD TAT YYC VTA GRG FPY WGQ GTL VTV SSDIQ MTQ SPSS MSVS VGDR VTIT CHSS QDIN SNIG WLQQ KPGK SFGGLIYHG TNLD DGVP SRFS GSGS GTDY TLTI SSLQ PEDF ATYY CVQY AQFP WTFG GGTK LEIKR
80	ABT-806 (ヒト化 806) scFv VH>VL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYISISDFAWNWIRQPPGKG LEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRLTISRDTSKNQFFLKLNSVTAAD TATYYCVTAGRFPYWGQGLVTVSSGGGGSSGGGSSGGGSDI QMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGL IYHGTNLDGVPFRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYA QFPWTFGGGKLEIKR
82	ABT-806 (ヒト化 806) scFv VL>VH	RKIELKTGGGFTWPFQAYQVCYYTAFDEPQLSSITLTYDTGSGSG SFRSPVDDLNTGHYLKGFSKGPQQLWGINSDQSSHCTITVR DGVSVSMSSPSQTMQIDSGGGSSGGGSSGGGSSVTVLTGQGW YFGRGATVCYYTATDAATVSNLKLFFQNKSTDRSITIRSKLSPQ YRTNGSYSIYGMWELGKPPQRIWNWAFDSSISYGSVTCTLSLTQ SPKVLGPGSEQLQVQ
29	親和性 成熟 ヒト化 806 VH	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYISIRDFAWNWIRQPPGKG LEWMGYISYNGNTRYQPSLKSRLTISRDTSKNQFFLKLNSVTAAD TATYYCVTASRFPYWGQGLVTVSS
30	親和性 成熟 ヒト化 806 VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSFK GLIYHGTNLDGVPFRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGKLEIK

10

20

30

40

50

62	親和性 成熟 ヒト化 806 VH	GAGG TTCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCTA GCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTACAGCAT CAGCAGAGACTTCGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGG CAAAGGACTGGAATGGATGGGCTACATCAGCTACAACGGCAA CACCAGATAACCAGCCTAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCTCC AGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCTGAAGCTGAACAGC GTGACAGCCGCCGATAACCGCCACCTACTATTGTGTGACAGCCA GCAGAGGCTTCCCCTATTGGGGACAGGGAACCCTGGTCAACAG TTAGCTCT
63	親和性 成熟 ヒト化 806 VL	GATATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCATGTCCGTGTCC GTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTACAGCAGCCAGGAC ATCAACAGCAACATCGGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGCAAG TCTTTTAAAGGGCCTGATCTACCACGGCACCAACCTGGATGATG GCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTA CACCTGACCATACTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACC TATTACTGCGTGCAGTACGCCAGTTTCTTGGACCTTTGGAG GCGGCACAAAGCTGGAAATCAAG
83	親和性 成熟 ヒト化 806 scFv VH>VL	GAGG TTCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCTA GCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTACAGCAT CAGCAGAGACTTCGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGG CAAAGGACTGGAATGGATGGGCTACATCAGCTACAACGGCAA CACCAGATAACCAGCCTAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCTCC AGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCTGAAGCTGAACAGC GTGACAGCCGCCGATAACCGCCACCTACTATTGTGTGACAGCCA GCAGAGGCTTCCCCTATTGGGGACAGGGAACCCTGGTCAACAG TTAGCTCTGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCTTCTGG CGGTGGCTCTGATATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCAT GTCCGTGTCCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTACAGC AGCCAGGACATCAACAGCAACATCGGCTGGCTGCAGCAGAAG CCCGGCAAGTCTTTTAAAGGGCCTGATCTACCACGGCACCAACC TGGATGATGGCGTGGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGG CACCGACTACACCCTGACCATACTAGCCTGCAGCCTGAGGAC TTCGCCACCTATTACTGCGTGCAGTACGCCAGTTTCTTGGAA CCTTTGGAGGCGGCACAAAGCTGGAAATCAAG
84	親和性 成熟 ヒト化 806 scFv VH>VL	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISRDFAWNWIROPKKG LEWMGYISYNGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNSVTAAD TATYYCVTASRFPYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSSGGGSDIQ MTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQPKPKSFKGLI YHGTNLDDGVPSRFSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQ FPWTFGGGTKLEIK
85	親和性 成熟 ヒト化 806 scFv VL>VH	GAACTAAAGGTCGAAACACGGCGGAGGTTTCCAGGTTCTTTG ACCCGCATGACGTGCGTCATTATCCACCGCTTCAGGAGTCCGA CGTCCGATCTATACCAGTCCCACATCAGCCACGGTCTCGGCGA CGGTCTTTTACAGCACCCTGCGGTAGTAGGTCCAACCACGGC ACCATCTAGTCCGGGAATTTTCTGAACGGCCCCGAAGACGACGT CGGTCCGCTACAACGACAACACTACAGGACCGACGACTGTCC ACTACCAGTGAGACAGAGGGTGCCTGTGCCTGTACGACGACC CCGAGACACAGTAGACCTATAGTCTCGGTGGCGGTCTTCTAGG CGGAGGCGGTCTAGGAGGCGGTGGTCTCGATTGACACTGGTC CCAAGGGACAGGGTTATCCCCTTCGGAGACGACCGACAGTG TGTTATCATCCACCGCATAGCCGCCGACAGTGCGACAAGTCG AAGTCTTCTTGACCAAGAACCACAGAGACCTTACCCT

10

20

30

40

50

		AGGCCCTGAAGTCCGATCCGACCATAGACCACAACGGCAACA TCGACTACATCGGGTAGGTAAGGTCAGGAAACGGTCCTCCGA CAGACTAGGTCAAGGTCCGCTTCAGAGACGACTACGACATCG GCCTGTGCCATGTCCAGTCCGAGTCACAAACCGATCCGAACGT GTCCGGTCCCCTGCTGAGAACGTCGACTTGGAG	
86	親和性 成熟 ヒト化 806 scFv VL>VH	KIELKTGGGFTWPFQAYQVCYYTAFDEPQLSSITLTYDTGSGSGS FRSPVGGDDLNTGHYILGKFSKGPQQLWGINSNIDQSSHCTITVR DGVSVSMSSPSQTMQIDSGGGSSGGGSSGGGSSVTVLTGQGW YPFGRSATVCYYTATDAATVSNLKLFFQNKSTDRSITIRSKLSPQY RTNGNYSIYGMWELGKPPQRIWNWAFDRSISYGSVTCTLSLTQ SPKVLGPGSEQLQVE	
48	リンカー	GGGGSGGGSSGGGS	10
49	リンカー	GGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCTTCTGGCGGTGGC TCT	
64	キメラ 806 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGC TGCTCCACGCCAGCCAGCCGGATGTCCAGCTGCAAGAGTCTGG CCCTAGCCTGGTCAAGCCTAGCCAGAGCCTGAGCCTGACATGT ACCGTGACCGGCTACAGCATCACCAGCGACTTCGCCTGGAAC GGATCAGACAGTTCGCCGGCAACAAGCTGGAATGGATGGGCT ACATCAGCTACAGCGGCAACACCCGGTACAACCCAGCCTGA AGTCCCGGATCTCCATCACCAGAGACACCAGCAAGAACCAGT TCTTCTGCAGCTGAACAGCGTGACCATCGAGGACACCGCCAC CTACTACTGTGTGACAGCCGGCAGAGGCTTCCCTTATTGGGA CAGGAAACCTGGTACAGTGTCTGCTGGTGGCGGAGGATCT GGCGGAGGCGGATCTTCTGGCGGTGGCTCTGATATCCTGATGA CACAGAGCCCCAGCAGCATGTCTGTGTCCCTGGGCGATACCGT GTCCATCACCTGTCACAGCAGCCAGGACATCAACAGCAACAT CGGCTGGCTGCAGCAGAGCCTGGCAAGTCTTTAAGGGCCTG ATCTACCACGGCACCAACCTGGATGATGAGGTGCCAGCAGA TTTTCCGGCTCTGGAAGCGGAGCCGACTACTCCCTGACAATCA GCAGCCTGGAAGCGAGGACTTCGCCGATTACTACTGCGTGC AGTACGCCAGTTTCCCTTGGACCTTTGGAGGCGGCACAAAGCT GGAATCAAGCGGACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAAC ACCGGCGCCACCATCGCGTCCGAGCCCTGTCCCTGCGCCCA GAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGG GGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCCCTCTGG CCGGCACCTGTGGCGTGTGCTGCTGTCCCTGGTCATCACCT GTACTGCAAGCGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAA GCAGCCCTCATGCGGCTGTGCAGACCACACAGGAAGAGGA CGGCTGTAGCTGTAGATTCCCCGAGGAAGAGGAAGGCGGCTG CGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGC CTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCT GGGCAGACGGGAGGAATACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAG GCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCAGACGGAAGAACC CCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGG CCGAGGCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGAA GAGGCAAGGGCCATGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCG CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC CTCCAAGA	20
65	キメラ 806 CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLQESGPSLVKPSQSLTCTV TGY SITSDFAWN WIRQFPGNKLEW MGYISYSGNTRYNPSLKSRSI TRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQTLVTV SAGGGGSGGGSSGGSDILMTQSPSSMSVSLGDTV SITCHSSQDI NSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNL DDEVPSRFSGSGSADYSLT	30
			40

ある特定の態様では、本発明のCARは、上皮増殖因子受容体（EGFR）の複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインを含む。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、EGFRの複数のアイソフォームと交差反応性である。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、EGFRの複数のアイソフォームに特異的に結合する。ある特定の態様では、本発明の抗原結合ドメインは、複数のEGFR分子に結合することが可能な抗体またはその断片を含む。好ましくは、抗原結合ドメインは、複数のEGFRアイソフォームに結合することが可能なscFv抗体である。EGFRアイソフォームは、野生型EGFR（wtEGFR）、変異型EGFR、EGFRA289V、およびEGFRR108Kを含むが、それに限定されるわけではない。ある特定の態様では、対象CARは、野生型EGFR（wtEGFR）、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFRR108K、EGFRR108G、EGFRG598V、EGFRR108K/A289V、EGFRR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、およびEGFRバリエーションIIからなる群より選択される1つまたは複数のEGFRアイソフォームに結合することが可能である。

【0121】

ある特定の態様では、CARの抗原結合ドメインは、二量体化EGFRに結合する。例えば、CARは、2つの同じEGFRアイソフォームを含むEGFRホモ二量体に結合することが可能である。CARはまた、2つの異なるEGFRアイソフォームを含むEGFRヘテロ二量体、または同じもしくは異なるEGFRアイソフォームの複数のコピーを含むオリゴマーに結合することが可能である。ある特定の態様では、CARは、EGFR/ErbBヘテロ二量体またはオリゴマーに結合することが可能である。

【0122】

本明細書に記載されるように、標的細胞上の特異的標的抗原（例えば、EGFR）に対して親和性を有する本開示のCARは、標的的特異的結合ドメインを含み得る。いくつかの態様では、標的的特異的結合ドメインはマウス標的的特異的結合ドメインであり、例えば、標的的特異的結合ドメインはマウス起源である。いくつかの態様では、標的的特異的結合ドメインはヒト標的的特異的結合ドメインであり、例えば標的的特異的結合ドメインはヒト起源である。例示的な態様では、標的細胞上のEGFRに対して親和性を有する本開示のCARは、EGFR結合ドメインを含み得る。いくつかの態様では、Tn-MUC1結合ドメインはマウスEGFR結合ドメインであり、例えば、EGFR結合ドメインはマウス起源である。いくつかの態様では、EGFR結合ドメインはヒト化EGFR結合ドメインである。いくつかの態様では、EGFR結合ドメインはヒトEGFR結合ドメインであり、例えば、EGFR結合ドメインはヒト起源である。

【0123】

抗原結合ドメインは、抗原に結合する任意のドメインを含むことができ、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、非ヒト抗体、およびそれらの任意の断片を含み得るが、それに限定されるわけではない。したがって、一態様では、抗原結合ドメイン部分は、哺乳動物抗体またはその断片を含む。別の態様では、CARの抗原結合ドメインは、抗EGFR抗体またはその断片からなる群より選択される。いくつかの態様では、抗原結合ドメインは、抗体、抗原結合断片（Fab）、および単鎖可変断片（scFv）からなる群より選択される。いくつかの態様では、本発明のEGFR結合ドメインは、EGFR特異的抗体、EGFR特異的Fab、およびEGFR特異的scFvからなる群より選択される。一態様では、EGFR結合ドメインはEGFR特異的抗体である。一態様では、EGFR結合ドメインはEGFR特異的Fabである。一態様では、EGFR結合ドメインはEGFR特異的scFvである。

【0124】

本明細書において用いられる「単鎖可変断片」または「scFv」という用語は、免疫グロブリン（例えば、マウスまたはヒト）の重鎖（VH）および軽鎖（VL）の可変領域が共有結合的に連結してVH::VLヘテロ二量体を形成した融合タンパク質である。重鎖（VH）および軽鎖（VL）は、直接つながっているか、またはVHのN末端をVLのC末端と、もしくはVHのC末端をVLのN末端と接続するペプチドをコードするリンカーもしくはスパー

サーによりつながっている。「リンカー」および「スペーサー」という用語は、本明細書において互換的に使用される。いくつかの態様では、抗原結合ドメイン（例えば、Tn-MUC1結合ドメイン）は、N末端からC末端にかけて、VH - リンカー - VLの配置を有するscFvを含む。いくつかの態様では、抗原結合ドメイン（例えば、Tn-MUC1結合ドメイン）は、N末端からC末端にかけて、VL - リンカー - VHの配置を有するscFvを含む。当業者は、本発明における使用に適した配置を選択することができよう。

【0125】

リンカーは通常、可動性のためのグリシンに加えて、可溶性のためのセリンまたはトレオニンが豊富である。リンカーは、細胞外抗原結合ドメインの重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを連結することができる。リンカーの非限定的な例は、Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) および国際公開公報第2014/087010号に開示されており、それらの内容は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。グリシンセリン(GS)リンカー、例えば(GS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 36)、(GGGS)_n (SEQ ID NO: 37)、および(GGGGS)_n (SEQ ID NO: 38) [式中、nは、少なくとも1の整数を表す]を含むが、それに限定されるわけではない様々なリンカー配列が、当技術分野において公知である。例示的なリンカー配列は、GGSG (SEQ ID NO: 39)、GGSGG (SEQ ID NO: 40)、GSGSG (SEQ ID NO: 41)、GSGGG (SEQ ID NO: 42)、GGGSG (SEQ ID NO: 43)、GSSSG (SEQ ID NO: 44)、GGGGS (SEQ ID NO: 45)、GGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 46)などを含むが、それに限定されるわけではないアミノ酸配列を含むことができる。当業者は、本発明に使用するために適したリンカー配列を選択することができよう。一態様では、本発明の抗原結合ドメイン（例えば、EGFR結合ドメイン）は、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、ここで、VHおよびVLは、核酸配列 ggtggcggtggctcgggcggtgggtgggtcgggctggatct (SEQ ID NO: 47)

によってコードされるアミノ酸配列GGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 46)を有するリンカー配列によって隔てられている。ある特定の態様では、リンカーはSEQ ID NO: 48のアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、リンカーは、SEQ ID NO: 49の核酸配列によりコードされる。

【0126】

本明細書において用いられる「Fab」は、抗原に結合する抗体構造の断片であるが、一価であり、Fc部分を有しない断片を指し、例えば、酵素パパイニンによって消化された抗体は、2つのFab断片およびFc断片（例えば、重(H)鎖定常領域；抗原に結合しないFc領域）をもたらす。

【0127】

本明細書において用いられる「F(ab')₂」は、全IgG抗体のペプシン消化によって生成される抗体断片を指し、ここで、この断片は、2つの抗原結合(ab')（二価）領域を有し、各(ab')領域は、H鎖の一部および軽(L)鎖が抗原との結合のためにS-S結合によって連結した2つの別々のアミノ酸鎖を含み、残りのH鎖部分同士と一緒に連結している。「F(ab')₂」断片は2つの個別のFab'断片に分割することができる。

【0128】

いくつかの例では、抗原結合ドメインは、CARが最終的に使用される種と同じ種に由来する場合がある。例えば、ヒトでの使用のために、CARの抗原結合ドメインは、本明細書においての他の箇所に記載されるヒト抗体またはその断片を含み得る。いくつかの態様では、非ヒト抗体は、ヒト化されており、ヒト化では、ヒトにおいて自然に産生された抗体との類似性を増加させるように抗体の特定の配列または領域が改変される。一態様では、抗原結合ドメイン部分はヒト化されている。

【0129】

ヒト化抗体は、CDRグラフティング（例えば、その各々がその全体で参照により本明細書に組み入れられるEP 239,400；国際公開公報第91/09967号；ならびに米国特許第

10

20

30

40

50

5,225,539号、同第5,530,101号、および同第5,585,089号を参照されたい)、ベニヤリング (veneering) またはリサーフェシング (resurfacing) (例えば、その各々がその全体で参照により本明細書に組み入れられるEP 592,106およびEP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; および Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973を参照されたい)、鎖シャッフリング (chain shuffling) (例えば、その全体で参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,565,332号を参照されたい)、ならびに例えば、その各々がその全体で参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2005/0042664号、米国特許出願公開第2005/0048617号、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公開公報第9317105号、T 10
an et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002)、Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000)、Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000)、Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997)、Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996)、Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995)、Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22 (1995)、Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994)、および Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994)に開示された技法を含むが、それに限定されるわけではない、当技術分野において公知の多様な技法を用いて産生されることができる。多くの場合、抗原結合を変化させる、例えば改善するために、フレームワーク領域中のフレームワーク残基がCDRドナー抗体からの対応する残基により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同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデル化、ならびに特定位置での珍しいフレームワーク残基を同定するための配列比較により同定される。(例えば、その全体で参照により本明細書に組み入れられるQueenら、米国特許第5,585,089号; および Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0130】

ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からその中に1つまたは複数のアミノ酸残基が導入されている。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的に「移入 (import)」可変ドメインから取り込まれる「移入」残基と呼ばれる。したがって、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリン分子由来の1つまたは複数のCDRおよびヒト由来のフレームワーク領域を含む。抗体のヒト化は、当技術分野において周知であり、本質的に、Winterおよび共同研究者らの方法 (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)) にしたがって、げっ歯類CDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換すること、すなわちCDRグラフィティングによって行うことができる(その内容がその全体で参照により本明細書に組み入れられるEP 239,400; PCT公報番号WO91/09967; および米国特許第4,816,567号; 同第6,331,415号; 同第5,225,539号; 同第5,530,101号; 同第5,585,089号; 同第6,548,640号)。そのようなヒト化キメラ抗体では、無傷のヒト可変ドメインに実質的に満たないものが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基および場合によってはいくつかのフレームワーク (FR) 残基がげっ歯類抗体における類似の部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

【0131】

ある特定の態様では、本発明のCARは、複数のEGFRアイソフォームに結合することが可能なEGFR結合ドメイン、例えばEGFR特異的scFvを含む。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体mAb 806に由来する抗体またはその断片を含む (Binder et al. (2018) *Cancer cell*, 34(1), pp.163-177)。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO: 32に示されるアミノ酸配列を含む。ある

特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 1に示されるヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 31に示されるヌクレオチド配列によってコードされる。

【0132】

ある特定の態様では、本発明のCARは、ヒト化されている、複数のEGFRに結合することが可能なEGFR結合ドメインを含む。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、ヒト化されているモノクローナル抗体mAb 806に由来する抗体またはその断片を含む。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、一般的にSEQ ID NO : 28に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 80に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 82に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、一般的に、SEQ ID NO : 25に示されるヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 79に示されるヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 81に示されるヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【0133】

ある特定の態様では、本発明のCARは、親和性成熟およびヒト化された、複数のEGFRに結合することが可能なEGFR結合ドメインを含む。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、親和性成熟およびヒト化された、モノクローナル抗体mAb 806に由来する抗体またはその断片を含む。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 84に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 86に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 83に示されるヌクレオチド配列によってコードされる。ある特定の態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 85に示されるヌクレオチド配列によってコードされる。

20

【0134】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 33によってコードされる、SEQ ID NO : 3に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む。抗原結合ドメインの軽鎖可変領域は、3つの軽鎖相補性決定領域(CDR)を含む。本明細書に使用される「相補性決定領域」または「CDR」は、特定の抗原に結合する抗原結合分子の可変鎖の領域を指す。したがって、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 5に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ; SEQ ID NO : 6に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; およびSEQ ID NO : 7に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。

30

【0135】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 24に示される核酸配列によってコードされる、SEQ ID NO : 27に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 30に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0136】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 34によってコードされる、SEQ ID NO : 4に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)を含む。EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 8に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ; SEQ ID NO : 9に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; およびSEQ ID NO : 10に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域を含み得る。

40

【0137】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 23に示される核酸配列によってコードされる、SEQ ID NO : 26に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 29に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0138】

50

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 62に示されるアミノ酸配列を含むVHおよび/またはSEQ ID NO : 63に示されるアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0139】

ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、ID NO : 4、26、および29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)ならびに/またはSEQ ID NO : 3、27、および30からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、SEQ ID NO : 43、23、および62からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる重鎖可変領域(VH)ならびに/またはSEQ ID NO : 33、24、および63からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる軽鎖可変領域(VL)を含む。

10

【0140】

EGFRとの特異的結合を保ちながらのEGFR結合ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 2~10、26~30、32、80、82、84、または86に示されるアミノ酸配列のいずれかと少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、EGFR結合ドメインは、SEQ ID NO : 1、23~25、31、33、34、62~63、79、81、83、または85に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

20

【0141】

抗原結合ドメインは、共に本明細書の他の箇所に記載される膜貫通ドメインまたは細胞内ドメインなどのCARの別のドメインに機能的に連結され得る。一態様では、抗原結合ドメインをコードする核酸は、膜貫通ドメインをコードする核酸および細胞内ドメインをコードする核酸に機能的に連結されている。

30

【0142】

EGFRに結合する抗体またはその断片などの、本明細書に記載される抗原結合ドメインは、本明細書に記載される膜貫通ドメインのいずれか、本明細書に記載される細胞内ドメインのいずれか、またはCARに含まれ得る本明細書に記載される他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。

【0143】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、本発明のCAR(例えば、交差反応性EGFR CAR)は、抗原結合ドメインを細胞内ドメインと接続する膜貫通ドメインを含むよう設計され得る。対象のCARの膜貫通ドメインは、細胞(例えば、免疫細胞またはその前駆細胞)の形質膜を貫通することが可能な領域である。膜貫通ドメインは、細胞膜、例えば、真核生物細胞膜内への挿入のためのものである。いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、CARの抗原結合ドメインと細胞内ドメインとの間に挟まれている。

40

【0144】

一態様では、膜貫通ドメインは、CARにおけるドメインの1つまたは複数に自然に関連している。いくつかの例では、膜貫通ドメインは、このようなドメインと、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとの結合を回避するように、選択またはアミノ酸置

50

換によって修飾して、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限にすることができる。

【0145】

膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来する場合がある。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質、例えば、I型膜貫通タンパク質に由来し得る。供給源が合成である場合、膜貫通ドメインは、細胞膜へのCARの挿入を容易にする任意の人工配列、例えば、人工疎水性配列であり得る。本発明における特定の使用の膜貫通領域の例は、非限定的に、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD2、CD27、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、CD278 (ICOS)、CD357 (GITR)、KIR、Toll様受容体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8およびTLR9に由来する(すなわち、これらの少なくとも膜貫通領域を含む)膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、合成であり得るが、この場合、それは、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含むであろう。好ましくは、合成膜貫通ドメインの各末端で、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンの3つ組が見出されるであろう。

10

【0146】

本明細書に記載の膜貫通ドメインを、本明細書に記載の抗原結合ドメインのいずれか、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインのいずれか、または対象のCARに含まれる本明細書に記載の他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。

20

【0147】

いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、ヒンジ領域をさらに含む。本発明の対象のCARはまた、ヒンジ領域も含み得る。CARのヒンジ領域は、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置する親水性領域である。いくつかの態様では、このドメインは、CARにふさわしいタンパク質フォールディングを容易にする。ヒンジ領域は、CARの任意の成分である。ヒンジ領域は、抗体のFcフラグメント、抗体のヒンジ領域、抗体のCH2領域、抗体のCH3領域、人工的なヒンジ配列またはそれらの組み合わせより選択されるドメインを含み得る。ヒンジ領域の例は、非限定的に、CD8aヒンジ、3つのグリシン (Gly) ほどの小ささであり得るポリペプチドから構成される人工的なヒンジ、ならびにIgG (ヒトIgG4など)のCH1ドメインおよびCH3ドメインを含む。

30

【0148】

いくつかの態様では、本開示の対象のCARは、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインと接続してこれを次いで細胞内ドメインに接続する、ヒンジ領域を含む。ヒンジ領域は、好ましくは、抗原結合ドメインが標的細胞上の標的抗原を認識してこれに結合することを支援することが可能である(例えば、Hudecek et al., Cancer Immunol. Res. (2015) 3(2): 125-135を参照されたい)。いくつかの態様では、ヒンジ領域は、可動性ドメインであり、その結果、抗原結合ドメインが、腫瘍細胞などの細胞上の標的抗原の特異的な構造および密度を最適に認識する構造を有することが可能となる。そのヒンジ領域の可動性は、ヒンジ領域が多く異なる立体配座をとることを許容する。

40

【0149】

いくつかの態様では、ヒンジ領域は、免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域である。いくつかの態様では、ヒンジ領域は、受容体に由来するヒンジ領域ポリペプチド(例えば、CD8由来ヒンジ領域)である。

【0150】

ヒンジ領域は、約4アミノ酸~約50アミノ酸、例えば、約4 aa~約10 aa、約10 aa~約15 aa、約15 aa~約20 aa、約20 aa~約25 aa、約25 aa~約30 aa、約30 aa~約40 aa、または約40 aa~約50 aaの長さを有することができる。

【0151】

適切なヒンジ領域を、容易に選択することができ、いくつかの適切な長さ、例えば、4ア

50

ミノ酸～10アミノ酸、5アミノ酸～9アミノ酸、6アミノ酸～8アミノ酸、または7アミノ酸～8アミノ酸を含む、1アミノ酸（例えば、Gly）～20アミノ酸、2アミノ酸～15アミノ酸、3アミノ酸～12アミノ酸のいずれかであることができ、1、2、3、4、5、6、または7アミノ酸であることができる。

【0152】

例えば、ヒンジ領域は、グリシンポリマー(G)_n、グリシン-セリンポリマー（例えば、(GS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO: 36)および(GGGS)_n (SEQ ID NO: 37)を含み、ここで、nは少なくとも1の整数である）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、および当技術分野において公知の他の可動性リンカーを含む。グリシンポリマーおよびグリシン-セリンポリマーを使用することができる；GlyおよびSerの両方は、相対的に構造不定であり、したがって、成分間の中性の繋ぎ鎖（tether）として役立つことができる。グリシンポリマーを使用することができる；グリシンは、アラニンより有意に多く - 空間にアクセスし、より長い側鎖を有する残基よりもはるかに制限を受けない（例えば、Scheraga, Rev. Computational. Chem. (1992) 2: 73-142を参照されたい）。例示的なヒンジ領域は、非限定的にGGSG (SEQ ID NO: 39)、GGSGG (SEQ ID NO: 40)、GSGSG (SEQ ID NO: 41)、GSGGG (SEQ ID NO: 42)、GGGSG (SEQ ID NO: 43)、GSSSG (SEQ ID NO: 44)などを含むアミノ酸配列を含むことができる。

10

【0153】

いくつかの態様では、ヒンジ領域は、免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域である。免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列は、当技術分野において公知である；例えば、Tan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87(1):162-166；およびHuck et al., Nucleic Acids Res. (1986) 14(4): 1779-1789を参照されたい。非限定的な例として、免疫グロブリンヒンジ領域は、以下のアミノ酸配列：

20

DKTHT (SEQ ID NO: 50); CPPC (SEQ ID NO: 51); CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO: 52)

（例えば、Glaser et al., J. Biol. Chem. (2005) 280:41494-41503を参照されたい）；

ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:

53); KSCDKTHTTCP (SEQ ID NO: 54); KCCVDCP (SEQ ID NO: 55); KYGPPCP (SEQ

30

ID NO: 56); EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 57) (ヒトIgG1ヒンジ);

ERKCCVECPCP (SEQ ID NO: 58) (ヒトIgG2ヒンジ); ELKTPLGDTTHTCPRCP

(SEQ ID NO: 59) (ヒトIgG3ヒンジ); SPNMVPHAHHAQ (SEQ ID NO: 60) (ヒト

IgG4ヒンジ)

などのうちの1つを含むことができる。

【0154】

ヒンジ領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4ヒンジ領域のアミノ酸配列を含むことができる。一態様では、ヒンジ領域は、野生型（天然に存在する）ヒンジ領域と比較して、1つまたは複数のアミノ酸置換および/または挿入および/または欠失を含むことができる。例えば、ヒトIgG1ヒンジのHis229は、Tyrにより置換することができ、それによって、ヒンジ領域は、配列

40

EPKSCDKTYTCP (SEQ ID NO: 61)

を含む；例えば、Yan et al., J. Biol. Chem. (2012) 287: 5891-5897を参照されたい。一態様では、ヒンジ領域は、ヒトCD8に由来するアミノ酸配列またはそのバリエーションを含むことができる。

【0155】

50

ある特定の態様では、膜貫通ドメインは、CD8 膜貫通ドメインを含む。ある特定の態様では、膜貫通ドメインは、CD8 ヒンジドメインとCD8 膜貫通ドメインとを含む。ある特定の態様では、対象CARは、SEQ ID NO：12に示される核酸配列によってコードされるCD8 膜貫通ドメインを含む。ある特定の態様では、対象CARは、SEQ ID NO：11の核酸配列によってコードされるヒンジドメインと、SEQ ID NO：12に示される核酸配列によってコードされる膜貫通ドメインとを含む。

【0156】

ある特定の態様では、膜貫通ドメインは、KIRドメインを含む。ある特定の態様では、膜貫通ドメインは、KIRS2ドメインを含む。

【0157】

その意図される機能を保ちながらの膜貫通および/またはヒンジドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO：11に示されるアミノ酸配列のいずれかと少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、いくつかの態様では、ヒンジ膜貫通ドメインは、SEQ ID NO：12に示される核酸配列のいずれかと少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸配列によってコードされる。

【0158】

膜貫通ドメインは、任意のヒンジドメインと組み合わせられる場合および/または本明細書に記載される1つまたは複数の膜貫通ドメインを含む場合がある。本明細書に記載される膜貫通ドメインは、本明細書に記載される抗原結合ドメインのいずれか、本明細書に記載される共刺激シグナル伝達ドメインもしくは細胞内ドメインもしくは細胞質ドメインのいずれか、またはCARに含まれ得る本明細書に記載される他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。

【0159】

一態様では、膜貫通ドメインは、合成であり得、その場合、これはロイシンおよびバリンなどの主に疎水性の残基を含むであろう。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットが、合成膜貫通ドメインの各末端に見られるであろう。

【0160】

CARの細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、またはCARの細胞内ドメインと膜貫通ドメインとの間に、スペーサドメインが組み込まれ得る。本明細書において用いられる「スペーサドメイン」という用語は、一般的に、膜貫通ドメインをポリペプチド鎖内の細胞外ドメインまたは細胞内ドメインのいずれかに連結するように機能する任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。スペーサドメインは、最大で300個のアミノ酸、例えば、10~100個のアミノ酸、または25~50個のアミノ酸を含み得る。いくつかの態様では、スペーサドメインは、短鎖オリゴペプチドまたはポリペプチドリンカー、例えば2から10アミノ酸長のものであり得る。例えば、グリシン-セリンダブレットは、対象CARの膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間に特に適切なリンカーを提供する。

【0161】

細胞内ドメイン

本発明の対象CARは、細胞内ドメインも含む。CARの細胞内ドメインは、CARが発現されている細胞（例えば、免疫細胞）のエフェクター機能の少なくとも1つの活性化を担う。細胞内ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞（例えば、免疫細胞）が、その専門の機能、例えば、標的細胞を傷つけることおよび/または破壊することを果たすように方向づける。

【0162】

CARの細胞内ドメインまたはさもないければ細胞質ドメインは、CARが発現されている細胞の活性化を担う。本発明に使用するための細胞内ドメインの例は、表面受容体、共刺激分子、およびT細胞においてシグナル伝達を開始するように協調して作用する任意の分子の細胞質部分に加えて、これらのエレメントおよび同じ機能的特性を有する任意の合成配列の任意の誘導体またはバリエーションを含むが、それに限定されるわけではない。

10

【0163】

ある特定の態様では、細胞内ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、4-1BBおよびCD3ゼータを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、4-1BBを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、CD3ゼータを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、KIRS2を含む。

【0164】

一態様では、CARの細胞内ドメインは、1種または複数種の共刺激分子の任意の部分を含む共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3、CD8、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、PD-1、それらの任意の誘導体またはバリエーション、同じ機能的特性を有するそれらの任意の合成配列、およびそれらの任意の組み合わせからの少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含む。

20

【0165】

細胞内シグナル伝達ドメインの例は、非限定的に、T細胞受容体複合体の鎖またはそのホモログのいずれか、例えば、鎖、FcγRI および 鎖、MB 1 (Iga) 鎖、B29 (Ig) 鎖など、ヒトCD3ゼータ鎖、CD3ポリペプチド(、および)、sykファミリーチロシンキナーゼ (Syk、ZAP 70など)、srcファミリーチロシンキナーゼ (Lck、Fyn、Lynなど)、ならびに、CD2、CD5およびCD28などのT細胞形質導入に關与する他の分子を含む。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3ゼータ鎖、FcγRIII、FcγRI、Fc受容体の細胞質尾部、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) 保有細胞質受容体、およびそれらの組み合わせであり得る。

30

【0166】

細胞内ドメインの他の例には、TCR、CD3ゼータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD86、共通FcRガンマ、FcRベータ (FcイプシロンRib)、CD79a、CD79b、FcガンマRIIIa、DAP10、DAP12、T細胞受容体 (TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIRファミリータンパク質、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、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIG HTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、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)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、Toll様受容体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、

40

50

TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、任意のKIR、例えばKIR2、KIRS2、KIR2DS2、本明細書に記載される他の共刺激分子、それらの任意の誘導體、バリエーション、またはフラグメント、同じ機能的能力を有する共刺激分子の任意の合成配列、およびそれらの任意の組み合わせを含むが、それに限定されるわけではない1つまたは複数の分子または受容体に由来するフラグメントまたはドメインが含まれる。

【0167】

細胞内ドメインの追加的な例には、非限定的に、CD3、B7ファミリー共刺激受容体および腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリー受容体を含む第1、第2および第3世代のT細胞シグナル伝達タンパク質を非限定的に含む、数種類の様々な他の免疫シグナル伝達受容体の細胞内シグナル伝達ドメインが含まれる(例えば、Park and Brentjens, *J. Clin. Oncol.* (2015) 33(6): 651-653を参照されたい)。追加的に、細胞内シグナル伝達ドメインは、NK細胞およびNKT細胞によって使用されるシグナル伝達ドメイン(例えば、Hermanson and Kaufman, *Front. Immunol.* (2015) 6: 195を参照されたい)、例えば、NKp30(B7-H6)(例えば、Zhang et al., *J. Immunol.* (2012) 189(5): 2290-2299を参照されたい)、およびDAP12(例えば、Topfer et al., *J. Immunol.* (2015) 194(7): 3201-3212を参照されたい)、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10、およびCD3zのシグナル伝達ドメインを含み得る。

10

【0168】

本発明の対象のCARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、CARの活性化(すなわち、抗原および二量体化剤によって活性化される)に反応して別個のかつ検出可能なシグナル(例えば、細胞による1つまたは複数のサイトカインの産生の増加; 標的遺伝子の転写の変化; タンパク質の活性の変化; 細胞挙動の変化、例えば、細胞死; 細胞増殖; 細胞分化; 細胞生存; 細胞シグナル伝達応答のモジュレーションなど)を提供する任意の所望のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、以下に記載のような少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つなど)のITAMモチーフを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP10/CD28型シグナル伝達鎖を含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、膜結合CARに共有結合することなく、代わりに細胞質中に拡散される。

20

【0169】

本発明の対象のCARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)含有細胞内シグナル伝達ポリペプチドを含む。いくつかの態様では、ITAMモチーフは、細胞内シグナル伝達ドメイン内で二度反復され、そこで、ITAMモチーフの第1および第2の例は、6~8アミノ酸により互いに隔てられている。一態様では、対象のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、3つのITAMモチーフを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、非限定的に、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIC、FcγRIIIA、FcRL5などの、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含有するヒト免疫グロブリン受容体のシグナル伝達ドメインを含む(例えば、Gillis et al., *Front. Immunol.* 5:254を参照されたい)。

30

40

【0170】

適切な細胞内シグナル伝達ドメインは、ITAMモチーフを含有するポリペプチドに由来する、ITAMモチーフ含有部分であることができる。例えば、適切な細胞内シグナル伝達ドメインは、任意のITAMモチーフ含有タンパク質由来のITAMモチーフ含有ドメインであることができる。したがって、適切な細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来するタンパク質全体の配列全体を含有する必要はない。適切なITAMモチーフ含有ポリペプチドの例は、DAP12、FCER1G(FcεR1受容体Iγ鎖)、CD3D(CD3デルタ)、CD3E(CD3ε)、CD3G(CD3γ)、CD3Z(CD3ゼータ)、およびCD79A(抗原受容体複合体関連タンパク質α鎖)を含むが、それに限定されるわけではない。

50

【0171】

一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP12 (TYROBP ; TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質 ; KARAP ; PLOSL ; DNAX活性化タンパク質12 ; KAR関連タンパク質 ; TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質 ; キラー活性化受容体関連タンパク質 ; キラー活性化受容体関連タンパク質などとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、FCER1G (FCRG ; Fcイプシロン受容体Iガンマ鎖 ; Fc受容体ガンマ鎖 ; fc-イプシロンRI-ガンマ ; fcRガンマ ; fceRIガンマ ; 高親和性免疫グロブリンイプシロン受容体サブユニットガンマ ; 免疫グロブリンE受容体、高親和性ガンマ鎖などとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3デルタ鎖 (CD3D ; CD3-DELTA ; T3D ; CD3抗原、デルタサブユニット ; CD3デルタ ; CD3d抗原、デルタポリペプチド (TiT3複合体) ; OKT3、デルタ鎖 ; T細胞受容体T3デルタ鎖 ; T細胞表面糖タンパク質CD3デルタ鎖などとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖 (CD3e、T細胞表面抗原T3/Leu-4イプシロン鎖、T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖、A1504783、CD3、CD3イプシロン、T3eなどとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3ガンマ鎖 (CD3G、T細胞受容体T3ガンマ鎖、CD3-GAMMA、T3G、ガンマポリペプチド (TiT3複合体) などとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞表面糖タンパク質CD3ゼータ鎖 (CD3Z、T細胞受容体T3ゼータ鎖、CD247、CD3-ZETA、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZなどとしても知られている) に由来する。一態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD79A (B細胞抗原受容体複合体関連タンパク質アルファ鎖 ; CD79a抗原 (免疫グロブリン関連アルファ) ; MB-1膜糖タンパク質 ; Ig-アルファ ; 膜結合免疫グロブリン関連タンパク質 ; 表面IgM関連タンパク質などとしても知られている) に由来する。一態様では、本開示の対象のCARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、DAP10/CD28型シグナル伝達鎖を含む。一態様では、本開示の対象のCARにおいて使用するために適した細胞内シグナル伝達ドメインは、ZAP70ポリペプチドを含む。いくつかの態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79bまたはCD66dの細胞質シグナル伝達ドメインを含む。一態様では、CAR中の細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3ゼータの細胞質シグナル伝達ドメインを含む。

10

20

30

【0172】

通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、必ずしも鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断型部分が使用される範囲内で、そのような切断型部分は、エフェクター機能シグナルを伝達する限り、無傷の鎖の代わりに使用され得る。細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断型部分を含む。

【0173】

本明細書に記載の細胞内ドメインを、本明細書に記載の抗原結合ドメインのいずれか、本明細書に記載の膜貫通ドメインのいずれか、またはCARに含まれ得る本明細書に記載の他のドメインのいずれかと組み合わせることができる。

40

【0174】

ある特定の態様では、対象CARの細胞内ドメインは、4-1BB共刺激ドメインを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO : 13に示される核酸配列によってコードされる。ある特定の態様では、対象CARの細胞内ドメインは、CD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO : 14に示される核酸配列によってコードされる。ある特定の態様では、対象CARの細胞内ドメインは、4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO : 13およびSEQ ID NO : 14を含む核酸配列によって

50

コードされる。

【0175】

ある特定の態様では、細胞内ドメインはDAP12ドメインを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインはKIRドメインを含む。細胞内ドメインは、本明細書に記載される1つまたは複数の細胞内ドメインを含み得る。ある特定の態様では、CARは、KIRS2膜貫通および細胞内ドメインを含む。ある特定の態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 18を含むヌクレオチド配列によってコードされる。

【0176】

特異的活性を保ちながらの細胞内ドメインの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様では、細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 13、14および/または18に示される核酸配列のいずれかと少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

10

【0177】

別の態様では、CARの抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間、またはCARの細胞内ドメインと膜貫通ドメインとの間にスペーサドメインが組み入れられる場合がある。本明細書に使用される「スペーサドメイン」という用語は、一般的に、ポリペプチド鎖内の抗原結合ドメインまたは細胞内ドメインのいずれかに膜貫通ドメインを連結するように機能する任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。一態様では、スペーサドメインは、最大300個のアミノ酸、好ましくは10~100個のアミノ酸、最も好ましくは25~50個のアミノ酸を含み得る。別の態様では、好ましくは2から10アミノ酸長の間の短いオリゴペプチドまたはポリペプチドリッカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞内ドメインとの間に連結を形成する場合がある。リンカーの例は、グリシン-セリンダブレットを含む。

20

【0178】

KIR-CAR

ある特定の局面では、本発明は、ナチュラルキラー（NK）細胞上に見出される受容体の成分を含むCAR設計である「KIR-CAR」に関する。本明細書に提供されるKIR-CARは、上皮増殖因子受容体（EGFR）の複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと、KIR膜貫通ドメインおよび/またはKIR細胞内（細胞質）ドメインとを含む。

30

【0179】

したがって、本発明は、KIR-CARを含む組成物、KIR-CARを含む単離された核酸、KIR-CARを含む単離されたポリペプチド、およびKIR-CARを含む組み換えT細胞を提供し；その際、KIR-CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインを含む。

40

【0180】

NK細胞は、骨髄中でリンパ球前駆細胞から発生する単核細胞である。形態的特徴は、典型的に、細胞表面での分化クラスター（cluster determinant）（CD）CD16、CD56、および/またはCD57の発現ならびにアルファ/ベータまたはガンマ/デルタTCR複合体の非存在を含む。生物学的特性は、典型的には「自己」主要組織適合複合体（MHC）/ヒト白血球抗原（HLA）タンパク質を発現しない標的細胞に結合し、それを死滅させる能力、および活性化NK受容体に対するリガンドを発現する腫瘍細胞または他の罹患細胞を死滅させる能力を含む。NK細胞は、事前の免疫処置の必要も活性化の必要もなしにNK細胞がいくつかの種類の腫瘍細胞株に結合し、それを死滅させる能力によって特徴付けられる。NK細胞はまた、免疫系への調節効果を発揮する可溶性タンパク質およびサイ

50

トカインを放出することができ；複数ラウンドの細胞分裂を受け、親細胞と類似の生物学的特性を有する娘細胞を産生することができる。インターフェロンおよび/またはサイトカインによる活性化を受けて、NK細胞は、NK細胞と標的細胞との間の直接の物理的接触を必要とする機序により、腫瘍細胞および細胞内病原体に感染した細胞の溶解を媒介する。標的細胞の溶解は、NK細胞から結合した標的の表面への細胞傷害性顆粒の放出、ならびに標的の形質膜を透過しアポトーシスまたはプログラム細胞死を誘導するパーフォリンおよびグランザイムBなどのエフェクタータンパク質を伴う。通常、健康な細胞はNK細胞による溶解から保護されている。NK細胞活性は、刺激シグナルおよび阻害シグナルの両方を伴う複合機序により調節される。

【0181】

簡潔には、NK細胞の溶解活性は、標的細胞上のリガンドとの相互作用を受けて正の細胞内シグナルまたは負の細胞内シグナルのいずれかを伝達する様々な細胞表面受容体によって調節される。これらの受容体を介して伝播される正のシグナルと負のシグナルとの間のバランスは、標的細胞がNK細胞によって溶解（死滅）されるかどうかを決定する。NK細胞刺激シグナルは、NKp30、NKp44、およびNKp46などの自然細胞傷害性受容体（Natural Cytotoxicity Receptor）（NCR）；ならびにNKG2C受容体、NKG2D受容体、ある特定の活性化キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、および他の活性化NK受容体（Lanier, Annual Review of Immunology 2005; 23:225-74）によって媒介されることができる。NK細胞阻害シグナルは、Ly49、CD94/NKG2Aのような受容体、ならびに主要組織適合複合体（MHC）クラスI分子を認識するある特定の阻害性KIR

【0182】

キラー細胞免疫グロブリン様受容体とも呼ばれるKIRは、ヒトおよび非ヒト霊長類において特徴付けられており、NK細胞およびいくつかのT細胞を含むリンパ球のある特定のサブセット上に存在する多型1型膜貫通分子である。KIRは、MHCクラスI分子のアルファ1および2ドメイン中の決定基と相互作用し、本明細書においての他の箇所に記載されるように、互いに異なるKIRがNK細胞に対して刺激性または阻害性のいずれかである。

【0183】

KIRについての命名法は、細胞外ドメインの数（KIR2DおよびKIR3Dはそれぞれ2つおよび3つの細胞外Igドメインを有する）および細胞質尾部が長い（KIR2DLもしくはKIR3DL）短い（KIR2DSもしくはKIR3DS）に基づく。所与のKIRの存在または非存在は、単一の個体中に存在するNK集団内でNK細胞毎に変動する。ヒトの間でもまた、KIR遺伝子の比較的高レベルの多型があり、ある特定のKIR遺伝子が、すべてでなくいくつかの個体に存在する。NK細胞上のKIRアレルの発現は、確率的に調節されており、それは、所与の個体において当該個体の遺伝子型に応じて所与のリンパ球が1つ、2つ、またはそれ以上の異なるKIRを発現し得ることを意味する。単一の個体のNK細胞は、典型的には異なる組み合わせのKIRを発現し、MHCクラスI分子に対して異なる特異性を有するNK細胞のレパートリーを提供する。

【0184】

ある特定のKIR遺伝子産物は、適切なりガンドに結合した場合にリンパ球活性の刺激を引き起こす。活性化KIRは、すべて、NK細胞に刺激シグナルを伝達する免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を有するアダプター分子と会合する荷電膜貫通残基を有する短い細胞質尾部を有する。対照的に、阻害性KIRは、それらのMHCクラスIリガンドの結合を受けてNK細胞に阻害シグナルを伝達する免疫受容抑制性チロシンモチーフ（ITIM）を含有する長い細胞質尾部を有する。公知の阻害性KIRは、KIR2DLおよびKIR3DLサブファミリーのメンバーを含む。2つのIgドメイン（KIR2DL）を有する阻害性KIRはHLA-Cアロタイプを認識し、KIR2DL2（以前の名称はp58.2）および近縁のアレル産物KIR

10

20

30

40

50

2DL3は、どちらも「グループ1」HLA-Cアロタイプ（HLA-Cw1、-3、-7、および-8を含む）を認識し、一方、KIR2DL1（p58.1）は、「グループ2」HLA-Cアロタイプ（HLA-Cw2、-4、-5、および-6）を認識する。KIR2DL1による認識は、HLA-Cアレルの位置80でのLys残基の存在によって指示される。KIR2DL2およびKIR2DL3の認識は、HLA-Cの位置80でのAsn残基の存在によって指示される。重要なことに、HLA-Cアレルの大部分は、位置80にAsn残基またはLys残基のいずれかを有する。したがって、KIR2DL1、-2、および-3は、一括して、ヒトに見出される本質的にすべてのHLA-Cアロタイプを認識する。3つのIgドメインを有する1つのKIR、KIR3DL1（p70）は、HLA-Bw4アレルによって共有されるエピトープを認識する。最後に、KIR3DL2（p140）、3つのIgドメインを有する分子のホモ二量体は、HLA-A3および-A11を認識する。

10

【0185】

しかし、本発明は、ITIMを含有する細胞質尾部を含む阻害性KIRに限定されるべきではない。むしろ、阻害シグナルと関連する細胞質ドメインを有する任意の阻害性タンパク質を、本発明のCARの構築に使用することができる。阻害性タンパク質の非限定的な例は、CTLA-4、PD-1などを含むが、それに限定されるわけではない。これらのタンパク質は、T細胞活性化を阻害することが知られている。

【0186】

したがって、本発明は、別にKIRまたはその断片に融合した抗原結合ドメインとも呼ばれる標的特異的結合エレメントを含む細胞外ドメインを含むKIR-CARを提供する。一態様では、KIRは、NK細胞に刺激シグナルを伝達する免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を有するアダプター分子と会合する短い細胞質尾部を含む活性化KIRである。

20

【0187】

場合によっては、KIR-CARを構築する場合にヒンジ領域を除去する／含まないことが望ましい。特定の理論に縛られることを望むわけではないが、KIR-CARのヒンジ領域を除去することが増加した細胞溶解活性をもたらす場合がある。

【0188】

ある特定の態様では、本発明は、EF1アルファ配列、DAP12配列、T2A配列、806-scFv配列、KIR膜貫通ドメイン配列、およびKIR細胞質（細胞内）ドメイン配列を含む単離された核酸を提供する。

【0189】

所望の分子をコードする核酸配列は、当技術分野において公知の組み換え方法を用いて、例えば、遺伝子を発現している細胞からのライブラリーをスクリーニングすることによって、それを含むことが知られているベクターから遺伝子を導き出すことによって、または標準的な技法を用いて細胞およびそれを含有する組織から直接単離することによって得られることができる。あるいは、関心対象の遺伝子は、クローニングではなく合成的に産生されることができる。

30

【0190】

ある特定の態様では、本発明は、806-scFvを含む抗原結合ドメイン、KIR膜貫通ドメイン、および／またはKIR細胞内ドメインを含むKIR-CARを提供する。KIR-CARは、任意で、DAP12ドメインを含む場合があり、またはKIR-CARは、DAP12と共発現される場合がある。

40

【0191】

ある特定の態様では、KIRは、KIRS2、KIR2DS2およびKIR2からなる群より選択される。ある特定の態様では、リンカーは短いグリシン-セリンリンカーである。

【0192】

EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能なKIR-CARを含む遺伝的に改変された細胞もまた、本発明に含まれる。ある特定の態様では、KIR-CARは、806-scFv、KIR膜貫通ドメイン、および／またはKIR細胞内ドメインを含む。

【0193】

CAR配列

50

本発明の対象CARは、EGFRの複数のアイソフォーム（例えば、wtEGFR、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFRR108K、EGFRR108G、およびEGFRG598V）に対して親和性を有するCARである。一態様では、本発明のEGFR CARは、SEQ ID NO：19に示される核酸配列によってコードされ得る、SEQ ID NO：20に示されるアミノ酸配列を含む。

【0194】

別の態様では、CARは、SEQ ID NO：21に示される核酸配列によってコードされ得る、SEQ ID NO：22に示されるアミノ酸配列を含む。別の態様では、CARは、SEQ ID NO：64に示される核酸配列によってコードされ得る、SEQ ID NO：65に示されるアミノ酸配列を含む。別の態様では、CARは、SEQ ID NO：66に示される核酸配列によってコードされ得る、SEQ ID NO：67に示されるアミノ酸配列を含む。別の態様では、CARは、SEQ ID NO：68に示される核酸配列によってコードされ得る、SEQ ID NO：69に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0195】

特異的活性を保ちながらのCARの許容されるバリエーションは、当業者に公知であろう。例えばいくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO：22、SEQ ID NO：20、SEQ ID NO：65、SEQ ID NO：67、またはSEQ ID NO：69に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えばいくつかの態様では、CARは、SEQ ID NO：19、SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：64、SEQ ID NO：66、またはSEQ ID NO：68に示される核酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

20

30

【0196】

したがって、本発明の対象CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとを含む。一態様では、CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとを含み、その際、膜貫通ドメインはCD8ヒンジ領域を含む。別の態様では、CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとを含み、その際、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。別の態様では、CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとを含み、その際、膜貫通ドメインは、CD8ヒンジ領域とCD8膜貫通ドメインとを含む。別の態様では、CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとを含み、その際、膜貫通ドメインはKIR膜貫通ドメインを含む。

40

【0197】

したがって、本発明の対象CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な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。一態様では、CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な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み、その際、細胞内ドメインは、4-1BBドメインを含む。別の態様では、CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な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み、その際、細胞内ドメインは、CD3ゼータドメインを含む。別の態様では、CARは、EGFRの複数のアイソフォーム

50

に結合することが可能な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み、その際、細胞内ドメインは、4-1BBドメインおよびCD3ゼータドメインを含む。一態様では、CARは、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能な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み、その際、細胞内ドメインはKIRドメインを含む。

【0198】

したがって、本発明は、本明細書に記載されるEGFRの複数のアイソフォームに対して親和性を有するキメラ抗原受容体(CAR)を含む改変された免疫細胞またはその前駆細胞、例えば、改変されたT細胞を提供する。

【0199】

処置方法

本明細書に記載される改変された細胞(例えば、EGFRの複数のアイソフォームに結合することが可能なCARを含むT細胞)は、免疫療法のための組成物に含まれる場合がある。組成物は、薬学的組成物を含む場合があり、薬学的に許容される担体をさらに含む場合がある。改変されたT細胞を含む薬学的組成物の治療有効量が投与される場合がある。

【0200】

一局面では、本発明は、それを必要とする対象におけるがんを処置するための方法であって、本発明の改変されたT細胞のいずれかを含む組成物を対象に投与する段階を含む方法を含む。

【0201】

別の局面では、本発明は、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって：
a) GBMオルガノイド(GBO)と共に複数のCAR T細胞を培養する段階、b) 複数のCAR T細胞から最高の効力を有するCAR T細胞を選択する段階、およびc) 最高の効力を有するCAR T細胞を対象に投与し、それにより対象におけるがんを処置する段階を含む方法を含む。ある特定の態様では、複数のCAR T細胞は、複数のCARを含む複数の改変されたT細胞を含み、その際、各CARは、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。ある特定の態様では、抗原結合ドメインは、CD19、EGFR、EGFRの複数のアイソフォーム(例えば、野生型EGFR(wtEGFR)、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFR108K、EGFR108G、EGFRG598V、EGFRD126Y、EGFRC628F、EGFR108K/A289V、EGFR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、およびEGFRパリアントII)、PSMA、PSCA、および任意の腫瘍関連抗原(TAA)からなる群より選択される抗原に結合することが可能である。ある特定の態様では、GBOは、対象由来の生検材料から生成される。そのような態様では、GBOは対象に特異的であり、それにより、がんの処置(例えば、CARの選択)がその対象に個別化される。CART処置は、二次処置(例えば、免疫チェックポイント阻害(ICB))と組み合わせることができる。二次処置は、CART処置の前、途中、または後に施すことができる。

【0202】

ある特定の態様では、処置されるべきがんは膠芽腫(GBM)である。ある特定の態様では、本明細書に記載される方法によりGBMを処置することは、GBMの腫瘍内抗原不均一性および/または適応免疫耐性を克服するために役立つ。

【0203】

本発明の改変された細胞(例えば、CAR T細胞)は、EGFRの1つまたは複数のアイソフォームを発現している細胞(例えば、がん/腫瘍細胞)に結合し、それによりEGFRの発現に関連する疾患または障害(例えば、がん)を処置することが可能である。CAR T細胞が結合することが可能な細胞上のEGFRアイソフォームは、野生型EGFR(wtEGFR)、変異型EGFR、EGFRA289V、EGFRA289D、EGFRA289T、EGFR108K、EGFR108G、EGFRG598V、EGFRD126Y、EGFRC628F、EGFR108K/A289V、EGFR108K/D126Y、EGFRA289V/G598V、EGFRA289V/C628F、およびEGFRパリアントIIを含むが、それに限定されるわけではない。

10

20

30

40

50

【0204】

養子細胞療法のための免疫細胞の投与のための方法は公知であり、提供される方法および組成物に関連して使用される場合がある。例えば養子T細胞療法は、例えば、Gruenbergらの米国特許出願公開第2003/0170238号；Rosenbergの米国特許第4,690,915号；Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)に記載されている。例えば、Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933；Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9；Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338を参照されたい。いくつかの態様では、細胞療法、例えば、養子T細胞療法は、細胞療法を受けることになる対象もしくはそのような対象に由来する試料から細胞が単離され、かつ/またはその他の方法で調製される、自己移植によって実行される。したがって、いくつかの局面では、細胞は、処置を必要とする対象、例えば患者に由来し、細胞は、単離および処理の後に同じ対象に投与される。

10

【0205】

いくつかの態様では、細胞療法、例えば、養子T細胞療法は、細胞療法を受けることになる、または最終的に受ける対象以外の対象、例えば、第1の対象から細胞が単離され、かつ/または他の方法で調製される、同種移植によって実行される。そのような態様では、次いで細胞が同じ種の異なる対象、例えば第2の対象に投与される。いくつかの態様では、第1および第2の対象は遺伝的に同一である。いくつかの態様では、第1および第2の対象は遺伝的に類似である。いくつかの態様では、第2の対象は、第1の対象と同じHLAクラスまたは上位タイプを発現する。

20

【0206】

いくつかの態様では、対象は、細胞または細胞を含有する組成物の投与前に、疾患または状態、例えば、腫瘍を標的とする治療剤で処置されている。いくつかの局面では、対象は、他の治療剤に抗療性または非応答性である。いくつかの態様では、対象は、例えば、化学療法、放射線照射、および/または造血幹細胞移植(HSCT)、例えば、同種HSCTを含む別の治療的介入を用いた処置後に、持続性疾患または再発した疾患を有する。いくつかの態様では、投与は、対象が別の治療法に抵抗性になったにもかかわらず、対象を効果的に処置する。

【0207】

いくつかの態様では、対象は他の治療剤に応答性であり、治療剤を用いた処置は疾病負荷を低減する。いくつかの局面では、対象は当初、治療剤に応答性であるが、時間と共に疾患または状態の再発を示す。いくつかの態様では、対象は再発していない。いくつかのそのような態様では、対象は、再発のリスクが高いなどの、再発のリスクがあると決定されており、したがって、例えば再発の可能性を低減するためまたは再発を予防するために、細胞が予防的に投与される。いくつかの局面では、対象は、別の治療剤を用いた事前処置を受けていない。

30

【0208】

本発明の改変された免疫細胞は、がんを処置するために動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに投与されることができる。加えて、疾患を処置または軽減することが望ましい場合、本発明の細胞は、がんに関係する任意の状態の処置のために、特に、腫瘍細胞に対する細胞媒介性免疫応答のために使用されることができる。本発明の改変された細胞または薬学的組成物を用いて処置されるべきがんの種類は、がん腫、芽腫、および肉腫、ならびにある特定の白血病またはリンパ系腫瘍、良性および悪性腫瘍、ならびに悪性病変、例えば、肉腫、がん腫、および黒色腫を含む。他の例示的ながんは、乳がん、頸部がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、結腸直腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がん、甲状腺がんなどを含むが、それに限定されるわけではない。がんは、非固形腫瘍(血液腫瘍など)または固形腫瘍であり得る。成人腫瘍/がんおよび小児腫瘍/がんもまた含まれる。一態様では、がんは固形腫瘍または血液腫瘍である。一態様では、がんはがん腫である。一態様では、がんは肉腫である。一態様では、がんは白血病である。一態様では、がんは固形腫瘍である。一態様では、が

40

50

んは乳がんである。一態様では、がんはGBMである。

【0209】

本発明の細胞は、適切な前臨床および臨床の実験および治験で決定されるべき投薬量および経路および時間に投与されることができる。細胞組成物は、これらの範囲内の投薬量で複数回投与される場合がある。本発明の細胞の投与は、当業者によって決定されるような、所望の疾患または状態を処置するために有用な他の方法と組み合わせられ得る。投与されるべき本発明の細胞は、治療を受けている対象に関して自己であり得る。

【0210】

本発明の細胞および組成物の投与は、当業者に公知の任意の好都合な方法で実行される場合がある。本発明の細胞および組成物は、エアロゾル吸入、注射、経口摂取、輸注、植込みまたは移植によって対象に投与される場合がある。本明細書に記載される組成物は、患者に経動脈、皮下、皮内、腫瘍内、節内、髄内、筋肉内、髄腔内に、静脈内(i.v.)注射により、または腹腔内に投与される場合がある。他の例では、本発明の細胞は、対象における炎症部位、対象における局所疾患部位、リンパ節、器官、腫瘍などに直接注射される。

10

【0211】

いくつかの態様では、細胞は、いくつかの局面で細胞もしくは細胞型の所望の用量もしくは数および/または細胞型の所望の比を含む所望の投薬量で投与される。したがって、細胞の投薬量は、いくつかの態様で細胞の合計数(または体重1kgあたりの数)およびCD4+対CD8+の比などの個別の集団またはサブタイプの所望の比に基づく。いくつかの態様では、細胞の投薬量は、個別の集団中または個別の細胞型の細胞の所望の合計数(または体重1kgあたりの数)に基づく。いくつかの態様では、投薬量は、所望の数の合計細胞、所望の比、および個別の集団中の細胞の所望の合計数などの特徴の組み合わせに基づく。

20

【0212】

疾患の予防または治療のために適切な投薬量は、処置されるべき疾患の種類、細胞または組み換え受容体の種類、疾患の重症度および経過、細胞が予防目的それとも治療目的で投与されるか、治療歴、細胞に対する対象の臨床歴および応答、ならびに担当医師の判断に依存する場合がある。組成物および細胞は、いくつかの態様で、対象に1回でまたは一連の処置にわたり適切に投与される。

30

【0213】

ある特定の態様では、対象に二次処置が提供される。二次処置は、化学療法、放射線照射、外科手術、および投薬を含むが、それに限定されるわけではない。

【0214】

ある特定の態様では、細胞は、組み合わせ処置の一部として、例えば抗体または操作された細胞もしくは受容体または細胞傷害剤もしくは治療剤などの薬剤などの別の治療的介入と同時にまたは任意の順序で順次に投与される。細胞は、いくつかの態様で1つまたは複数の追加的な治療剤と共にまたは別の治療的介入に関連して、同時にまたは任意の順序で順次に共投与される。いくつかの状況で、細胞は、細胞集団が1つまたは複数の追加的な治療剤の効果を高めるまたはその逆のために十分に近い時間で別の治療法と共投与される。いくつかの態様では、細胞は、1つまたは複数の追加的な治療剤の前に投与される。いくつかの態様では、細胞は、1つまたは複数の追加的な治療剤の後に投与される。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加的な薬剤は、例えば、持続性を高めるためのIL-2などのサイトカインを含む。いくつかの態様では、方法は、化学療法剤の投与を含む。

40

【0215】

ある特定の態様では、CARを含む改変された細胞は、免疫チェックポイント阻害剤(例えば、PD-1、CTLA-4、PD-L1、またはTIM-3の阻害剤)と組み合わせて対象に投与され得る。例えば、改変された細胞は、例えば、PD-1(プログラム死1タンパク質)を標的とする抗体または抗体断片と組み合わせて投与される場合がある。抗PD-1抗体の例は、ペムプロリズマブ(KEYTRUDA(登録商標)、旧名ランプロリズマブ、MK-3475と

50

しても知られる)、およびニボルマブ(BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、OPDIVA(登録商標))またはその抗原結合断片を含むが、それに限定されるわけではない。ある特定の態様では、改変された細胞は、抗PD-L1抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて投与される場合がある。抗PD-L1抗体の例は、BMS-936559、MPDL3280A(TECENTRIQ(登録商標)、アテゾリズマブ)、およびMEDI4736(デュルバルマブ、Imfinzi)を含むが、それに限定されるわけではない。ある特定の態様では、改変された細胞は、抗CTLA-4抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて投与される場合がある。抗CTLA-4抗体の例は、イピリムマブ(販売名Yervoy)を含むが、それに限定されるわけではない。ある特定の態様では、改変された細胞は、抗T細胞阻害性受容体Tim-3(T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有-3)抗体と組み合わせて投与される場合がある。小分子、siRNA、miRNA、およびCRISPRシステムを含むが、それに限定されるわけではない他の種類の免疫チェックポイント阻害剤も使用される場合がある。免疫チェックポイント阻害剤は、CARを含む改変された細胞の前、後、またはそれと同時に投与される場合がある。

10

【0216】

ある特定の態様では、本発明のCAR細胞は、血液脳関門(BBB)を通過する局所送達ビヒクルとして役立つことができる。「ミニボディー」、またはブロックタンパク質は、チェックポイント分子(例えば、PD-1、CTLA-4、TIM-3)を標的とするscFv配列をヒトIgG CH3領域と組み合わせたものであって、これはCARレンチウイルスにコードされることができる。CAR細胞は、GBMにおけるネオ抗原に再方向づけされ、ブロックタンパク質を局所的に分泌することができ、それにより、中枢神経系における免疫チェックポイント阻害剤の取り込みの潜在的限界を克服する。T細胞はBBBを効率的に通り返ける能力を有するので、T細胞にタンパク質治療薬の産生能を賦与することは、さもなければ中枢神経系への限られた薬物透過性を克服するための特に魅力的な戦略である。このターゲティング送達戦略は、ICBの全身オフターゲット効果のリスクも低減する。

20

【0217】

核酸の導入

核酸を細胞内に導入する方法は、物理的、生物学的および化学的方法を含む。RNAなどのポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、微量注入、エレクトロポレーションなどを含む。RNAは、エレクトロポレーション(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830(BTX)(Harvard Instruments, Boston, Mass.))またはGene Pulser II(BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator(Eppendorf, Hamburg Germany)を含む市販の方法を用いて標的細胞内に導入することができる。RNAは、リポフェクションを用いて、ポリマー封入を用いて、ペプチド媒介トランスフェクションを用いて、または「遺伝子銃」などのバイオリスティック粒子送達システムを用いて、細胞内に導入することもできる(例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70(2001)を参照されたい。

30

【0218】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための生物学的方法は、DNAおよびRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物に、例えば、ヒト細胞に挿入するための最も広く使用される方法になった。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス1、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来することができる。例えば、米国特許第5,350,674号および同第5,585,362号を参照されたい。

40

【0219】

宿主細胞中にポリヌクレオチドを導入するための化学的手段は、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む脂質ベース系などのコロイド分散系を含む。インビトロおよびインビボ送達媒体として用いられる例示的なコロイド系は、リポソーム(例えば、人工膜

50

小胞)である。

【0220】

使用に適した脂質は、商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(「DMPC」)は、Sigma, St. Louis, MOから得ることができ；リン酸ジセチル(「DCP」)はK & K Laboratories (Plainview, NY)から得ることができ；コレステロール(「Choi」)は、Calbiochem-Behringから得ることができ；ジミリスチルホスファチジルグリセロール(「DMPG」)および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)から得られる場合がある。脂質のクロロホルムまたはクロロホルム/メタノール溶液の原液は、約-20℃で保管することができる。クロロホルムは、メタノールよりも容易に蒸発するので唯一の溶媒として使用される。「リポソーム」は、封入された脂質二重層または凝集物の生成により形成される多様な単一および多重膜脂質ビヒクルを包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部水性媒質を有する小胞構造を有すると特徴付けることができる。多重膜リポソームは、水性媒質により分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質を過剰の水溶液中に懸濁した場合に自然に形成する。閉じた構造の形成前に、脂質成分は自己再編成を受け、水および溶解した溶質を脂質二重層の間に閉じ込める(Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10)。しかしながら、溶液状態で通常の小胞構造と異なる構造を有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造を呈するか、または単に脂質分子の非均一凝集物として存在する場合がある。リポフェクタミン-核酸複合体も企図される。

10

20

【0221】

宿主細胞中に外因性核酸を導入するためまたはその他の方法で細胞を本発明の阻害剤に曝露するために使用される方法に関わらず、宿主細胞中の核酸の存在を確認するために多様なアッセイが行われる場合がある。そのようなアッセイには、例えば、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、RT-PCRおよびPCRなどの当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ；特定のペプチドの存在または非存在を検出することなどの「生化学的」アッセイ、例えば、免疫学的手段(ELISAおよびウエスタンブロット)によるもの、または本発明の範囲内に入る作用物質を特定するための本明細書に記載されるアッセイによるものが含まれる。

【0222】

そのうえ、核酸は、拡大増殖されたT細胞に形質導入すること、拡大増殖されたT細胞に形質移入すること、および拡大増殖されたT細胞にエレクトロポレーションすることなどの任意の手段によって導入される場合がある。1つの核酸が1つの方法により導入される場合があり、別の核酸が別の方法によりT細胞内に導入される場合がある。

30

【0223】

RNA

一態様では、宿主細胞中に導入される核酸はRNAである。別の態様では、RNAは、インビトロ転写されたRNAまたは合成RNAを含むmRNAである。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により生成された鋳型を使用するインビトロ転写によって産生される。任意の供給源からの関心対象のDNAを、PCRにより、適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを使用して、インビトロmRNA合成のための鋳型に直接変換することができる。DNAの供給源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列または任意の他の適切なDNA供給源であり得る。インビトロ転写のための所望のテンプレートはキメラ膜タンパク質である。例としてテンプレートは、抗体、抗体の断片または抗体の一部をコードする。別の例として、テンプレートは、抗CD3などの抗体の単鎖可変ドメインを含む細胞外ドメインと、共刺激分子の細胞内ドメインとを含む。一態様では、RNAキメラ膜タンパク質のためのテンプレートは、共刺激分子に対する抗体に由来する抗原結合ドメインを含む細胞外ドメインと、CD28および4-1BBの細胞内ドメインの一部に由来する細胞内ドメインとを含むキメラ膜タンパク質をコードする。

40

【0224】

50

PCRは、mRNAのインビトロ転写のための鋳型を生成するために使用される場合があり、そのmRNAが次いで細胞中に導入される。PCRを行うための方法は、当技術分野において周知である。PCRに使用するためのプライマーは、PCRのための鋳型として使用されるべきDNA領域と実質的に相補的な領域を有するように設計される。本明細書に用いられる「実質的に相補的」は、プライマー配列中の塩基の大部分もしくはすべてが相補的であるか、または1つもしくは複数の塩基が非相補的もしくはミスマッチした、ヌクレオチド配列を指す。実質的に相補的な配列は、PCRのために使用されるアニーリング条件下で目的となるDNA標的とアニールまたはハイブリダイズすることが可能である。プライマーは、DNA鋳型の任意の部分と実質的に相補的であるように設計することができる。例えば、プライマーは、5' UTRおよび3' UTRを含む、細胞において通常転写される遺伝子部分（オープンリーディングフレーム）を増幅するように設計することができる。プライマーはまた、関心対象の特定のドメインをコードする遺伝子の部分を増幅するように設計される場合がある。一態様では、プライマーは、5' UTRおよび3' UTRのすべてまたは部分を含む、ヒトcDNAのコード領域を増幅するように設計される。PCRに有用なプライマーは、当技術分野において周知の合成方法により生成される。「フォワードプライマー」は、増幅されるべきDNA配列の上流であるDNA鋳型上のヌクレオチドと実質的に相補的なヌクレオチド領域を含有するプライマーである。「上流」は、本明細書において、コード鎖に対して増幅されるべきDNA配列の5位を指すために使用される。「リバースプライマー」は、増幅されるべきDNA配列の下流である二本鎖DNA鋳型と実質的に相補的なヌクレオチド領域を含有するプライマーである。「下流」は、本明細書において、コード鎖に対して増幅されるべきDNA配列の3'位を指すために使用される。

10

20

【0225】

RNAの安定性および/または翻訳効率を促進する能力を有する化学構造も使用される場合がある。RNAは、好ましくは5' UTRおよび3' UTRを有する。一態様では、5' UTRは、0~3000ヌクレオチド長である。コード領域に付加されるべき5' UTR配列および3' UTR配列の長さは、UTRの異なる領域にアニールするPCR用プライマーを設計することを非限定的に含む、異なる方法により変更することができる。このアプローチを使用して、当業者は、転写されたRNAのトランスフェクション後に最適な翻訳効率を達成するために必要な5' UTRおよび3' UTRの長さを改変することができる。

【0226】

5' UTRおよび3' UTRは、関心対象の遺伝子についての天然の内因性5' UTRおよび3' UTRであることができる。あるいは、関心対象の遺伝子に内因性でないUTR配列を、フォワードプライマーおよびリバースプライマー中にUTR配列を組み込むことによって、または鋳型の任意の他の改変によって付加することができる。関心対象の遺伝子に内因性でないUTR配列の使用は、RNAの安定性および/または翻訳効率を改変するために有用であることができる。例えば、3' UTR配列中のAUに富むエレメントはmRNAの安定性を減少させ得ることが公知である。したがって、転写されたRNAの安定性を当技術分野において周知であるUTRの特性に基づいて増加させるように、3' UTRを選択または設計することができる。

30

【0227】

一態様では、5' UTRは、内因性遺伝子のKozak配列を含有することができる。あるいは、関心対象の遺伝子に内因性でない5' UTRが上記のようなPCRにより付加される場合、5' UTR配列を付加することによりコンセンサスKozak配列を再設計することができる。Kozak配列は、いくつかのRNA転写物の翻訳効率を増加させることができるが、すべてのRNAが効率的な翻訳を可能にするために必要であるとは思えない。多くのmRNAにとってのKozak配列の必要性は、当技術分野において公知である。他の態様では、5' UTRは、RNAゲノムが細胞中で安定なRNAウイルスに由来することができる。他の態様では、mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨害するために、様々なヌクレオチド類似体を3' UTRまたは5' UTR中に使用することができる。

40

【0228】

50

遺伝子クローニングの必要なしにDNA鋳型からのRNA合成を可能にするために、転写プロモーターは、転写されるべき配列の上流のDNA鋳型に結び付けられるべきである。RNAポリメラーゼについてのプロモーターとして機能する配列がフォワードプライマーの5'末端に付加される場合、RNAポリメラーゼプロモーターは、PCR産物中の転写されるべきオープンリーディングフレームの上流に組み込まれるようになる。一態様では、プロモーターは、本明細書における他の箇所に記載されるようなT7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターには、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが含まれるが、それに限定されるわけではない。T7、T3およびSP6プロモーターについてのコンセンサスヌクレオチド配列は、当技術分野において公知である。

【0229】

10

一態様では、mRNAは、5'末端上のキャップおよび3'ポリ(A)尾部の両方を有しており、これらが、リボソームの結合、翻訳開始および細胞中でのmRNAの安定性を決定する。環状DNA鋳型、例えばプラスミドDNA上で、RNAポリメラーゼは、真核細胞における発現に適さない長いコンカテマー産物を産生する。3' UTRの末端で直鎖状にされたプラスミドDNAの転写は、通常サイズのmRNAを生じ、このmRNAは、転写後にポリアデニル化された場合であっても真核生物のトランスフェクションに有効でない。

【0230】

直鎖DNA鋳型上で、ファージT7 RNAポリメラーゼは、鋳型の最終塩基を超えて転写物の3'末端を延長することができる (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)。

20

【0231】

DNAテンプレート内へのポリA/Tストレッチの組み入れの従来方法は、分子クローニングである。しかし、プラスミドDNAに組み入れられたポリA/T配列は、プラスミド不安定性を引き起こす可能性があり、それは、細菌細胞から得られたプラスミドDNAテンプレートに欠失および他の異常がしばしば高く混入する理由である。これは、クローニング手順を手間および時間がかかるものにするだけでなく、しばしばその信頼度を低下させる。そういうことから、クローニングなしでポリA/Tの3'ストレッチを有するDNAテンプレートの構築を可能にする方法が極めて理想的である。

【0232】

30

転写DNA鋳型のポリA/Tセグメントは、100T尾部などのポリT尾部 (サイズは50~5000Tであることができる) を含有するリバースプライマーを使用することによりPCRの間に、または非限定的にDNAの連結もしくはインビトロ組み換えを含む任意の他の方法によりPCRの後に、産生することができる。ポリ(A)尾部はまた、RNAに安定性を提供し、それらの分解を低減する。一般的に、ポリ(A)尾部の長さは、転写されたRNAの安定性と正に相関する。一態様では、ポリ(A)尾部は、100~5000アデノシンである。

【0233】

RNAのポリ(A)尾部は、インビトロ転写後に大腸菌 (*E. coli*) ポリAポリメラーゼ (E-PAP) などのポリ(A)ポリメラーゼの使用によりさらに伸長することができる。一態様では、ポリ(A)尾部の長さを100ヌクレオチドから300~400ヌクレオチドへと増加させることは、RNAの翻訳効率に約2倍の増加をもたらす。追加的に、3'末端への異なる化学基の付加は、mRNAの安定性を増加させることができる。そのような付加は、修飾/人工ヌクレオチド、アプタマーおよび他の化合物を含有することができる。例えば、ATP類似体を、ポリ(A)ポリメラーゼを使用してポリ(A)尾部に組み込むことができる。ATP類似体は、RNAの安定性をさらに増加させることができる。

40

【0234】

5'キャップもまた、RNA分子に安定性を提供する。好ましい態様では、本明細書に開示される方法により産生されるRNAは、5'キャップを含む。5'キャップは、当技術分野において公知の技法および本明細書に記載される技法を使用して提供される (Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*,

50

7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330: 958-966 (2005))。

【0235】

本明細書に開示される方法によって産生されるRNAは、配列内リボソーム進入部位 (IRES) 配列も含有することができる。IRES配列は、mRNAへのcap非依存性リボソーム結合を開始し、翻訳の開始を促進する、任意のウイルス、染色体または人工設計配列であり得る。細胞の透過性および生存度を促進する、糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤、および界面活性剤などの因子を含有することができる、細胞エレクトロポレーションに適する任意の溶質が含まれることができる。

【0236】

いくつかの態様では、RNAは、インビトロ転写RNAなどのRNAが、細胞内にエレクトロポレーションされる。

【0237】

開示される方法は、遺伝子改変されたT細胞が標的がん細胞を死滅させる能力の評価を含む、がん、幹細胞、急性および慢性感染、ならびに自己免疫疾患の分野の基礎研究および治療法におけるT細胞活性のモジュレーションに適用することができる。

【0238】

これらの方法はまた、例えば、プロモーターまたは投入RNAの量を変化させることにより、発現レベルを広い範囲で制御する能力を提供し、発現レベルを個別に調節することを可能にする。さらに、PCRに基づくmRNA産生の技法は、異なる構造およびそれらのドメインの組み合わせを有するmRNAの設計を極めて容易にする。

【0239】

本発明のRNAトランスフェクション法の1つの利点は、RNAトランスフェクションが本質的に一過性であり、ベクターを用いないことである。RNA導入遺伝子は、リンパ球に送達することができ、いかなる追加的なウイルス配列の必要もなしに、最小の発現カセットとして、短時間のインビトロ細胞活性化後にその中で発現させることができる。これらの条件下では、宿主細胞ゲノム中への導入遺伝子の組み込みは、起こる可能性が低そうである。RNAのトランスフェクション効率およびリンパ球集団全体を均一に改変するRNAの能力により、細胞のクローニングは不必要である。

【0240】

インビトロ転写されたRNA (IVT-RNA) によるT細胞の遺伝的改変は、共に様々な動物モデルにおいて試験に成功した2つの異なる戦略を利用する。インビトロ転写されたRNAは、リポフェクションまたはエレクトロポレーションにより細胞にトランスフェクションされる。移入されたIVT-RNAの長期発現を達成するために、様々な改変を使用してIVT-RNAを安定化することが望ましい。

【0241】

インビトロ転写のための鋳型として標準的に利用されるIVTベクターであって、安定化されたRNA転写物が産生されるように遺伝的に改変されているいくつかのIVTベクターが文献から公知である。現在、当技術分野において使用されるプロトコルは、以下の構造を有するプラスミドベクターに基づく：RNA転写を可能にする5'RNAポリメラーゼプロモーターに続いて、3'および/または5'のいずれかに非翻訳領域 (UTR) が隣接する関心対象の遺伝子、ならびに50~70個のAヌクレオチドを含有する3'ポリアデニルカセット。インビトロ転写の前に、II型制限酵素により環状プラスミドがポリアデニルカセットの下流で直鎖状にされる (認識配列は切断部位に対応する)。したがって、ポリアデニルカセットは、転写物中のその後のポリ (A) 配列に対応する。この手順の結果として、いくつかのヌクレオチドは、直鎖状にされた後に酵素切断部位の部分として残り、ポリ (A) 配列を3'末端で伸長またはマスクする。この非生理的オーバーハングがそのような構築物から細胞内で産生されるタンパク質の量に影響するかどうかは明らかでない。

【0242】

RNAは、より従来のプラスミドまたはウイルスのアプローチと比べていくつかの利点

10

20

30

40

50

を有する。RNA起源からの遺伝子発現は、転写を必要とせず、タンパク質産物は、トランスフェクション後に速やかに産生される。さらに、RNAは、核よりも細胞質にアクセスしなければならないだけであるので、典型的なトランスフェクション方法で極めて高いトランスフェクション率が生じる。加えて、プラスミドベースのアプローチは、関心対象の遺伝子の発現を駆動するプロモーターが試験中の細胞で活性であることを必要とする。

【0243】

別の局面では、RNA構築物は、エレクトロポレーションによって細胞内に送達される。例えば、US 2004/0014645、US 2005/0052630A1、US 2005/0070841A1、US 2004/0059285A1、US 2004/0092907A1に教示されるような、哺乳動物細胞内への核酸構築物のエレクトロポレーションの公式化および方法論を参照されたい。任意の公知の細胞型のエレクトロポレーションに必要な電場の強さを含む様々なパラメータは、関連する研究文献ならびに本分野の数多くの特許および出願から一般的に公知である。例えば、米国特許第6,678,556号、同第7,171,264号、および同第7,173,116号を参照されたい。エレクトロポレーションの治療的応用のための装置は、市販されており、例えば、MedPulser (商標) DNAエレクトロポレーション治療システム (Inovio/Genetronics, San Diego, Calif.) であり、米国特許第6,567,694号；同第6,516,223号、同第5,993,434号、同第6,181,964号、同第6,241,701号、および同第6,233,482号などの特許に記載されており；エレクトロポレーションはまた、例えばUS20070128708A1に記載されるように、細胞のインピトロでのトランスフェクションのために使用される場合がある。エレクトロポレーションはまた、核酸を細胞内にインピトロで送達するために利用される場合がある。したがって、当業者に公知の多数の利用可能なデバイスおよびエレクトロポレーションシステムのいずれかを利用した、発現構築物を含む核酸の細胞内へのエレクトロポレーション媒介投与は、関心対象のRNAを標的細胞に送達するための刺激的な新しい手段を提示する。

【0244】

T細胞の供給源

ある特定の態様では、T細胞の供給源は対象から得られる。対象の非限定的な例は、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種を含む。好ましくは、対象はヒトである。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、臍帯、および腫瘍を含むいくつかの供給源から得られることができる。ある特定の態様では、当技術分野において入手可能な任意の数のT細胞株が使用される場合がある。ある特定の態様では、T細胞は、当業者に公知の任意の数の技法、例えばフィコール分離を用いて対象から収集された血液のユニットから得られることができる。一態様では、個体の循環血由来の細胞は、アフエーシスまたは白血球アフエーシスによって得られる。アフエーシス産物は、典型的にT細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含むリンパ球を含有する。アフエーシスによって収集された細胞は、洗浄されて、血漿画分が除去され、細胞がリン酸緩衝食塩水 (PBS) または洗浄溶液などの適切な緩衝液または培地中に入れられる場合があり、洗浄溶液は、その後の処理段階のためにカルシウムを欠如し、かつマグネシウムを欠如する場合またはすべての二価陽イオンでないにしろ多くを欠如する場合がある。洗浄後、細胞は、例えば、Ca不含、Mg不含PBSなどの多様な生体適合性緩衝液中に再懸濁される場合がある。あるいは、アフエーシス試料の望ましくない成分が除去され、細胞が培地中に直接再懸濁される場合がある。

【0245】

別の態様では、T細胞は、赤血球を溶解することおよび単球を枯渇させることによって、例えば、PERCOLL (商標) 勾配による遠心分離により、末梢血から単離される。あるいは、T細胞は、臍帯から単離することができる。任意の事象では、T細胞の特定の部分集団を正または負の選択技法によりさらに単離することができる。

【0246】

そのように単離された臍帯血単核細胞は、非限定的にCD34、CD8、CD14、CD19、およびCD56を含む、ある特定の抗原を発現している細胞を枯渇していることができる。こ

これらの細胞の枯渇は、単離された抗体、抗体を含む生物学的試料、例えば腹水、物理的支持体に結合した抗体、細胞と結合した抗体を使用して成し遂げることができる。

【0247】

負の選択によるT細胞集団の濃縮は、負の選択をされた細胞に独特な表面マーカーに対する抗体の組み合わせを使用して成し遂げることができる。好ましい方法は、負の選択をされた細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用する負磁気免疫接着 (negative magnetic immunoadherence) またはフローサイトメトリーを介する細胞選別および/または選択である。例えば、負の選択によりCD4+細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。

10

【0248】

正または負の選択により細胞の所望の集団を単離するために、細胞濃度および表面(例えば、ビーズなどの粒子)を変化させることができる。ある特定の態様では、ビーズおよび細胞と一緒に混合される体積を顕著に減少させて(すなわち、細胞の濃度を増加させて)、細胞とビーズとの最大の接触を保証することが望ましい場合がある。例えば、一態様では、20億個/mlの細胞濃度が使用される。一態様では、10億個/mlの細胞濃度が使用される。さらなる態様では、細胞1億個/ml超が使用される。さらなる態様では、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個/mlの細胞濃度が使用される。なお別の態様では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個/mlの細胞濃度が使用される。さらなる態様では、1億2500万または1億5000万個/mlの細胞濃度を使用することができる。高濃度を使用することは、増加した細胞収量、細胞活性化、および細胞増大をもたらすことができる。

20

【0249】

T細胞はまた、単球の除去段階を必要としない洗浄段階の後に凍結することができる。理論に縛られることを望むわけではないが、凍結およびその後の解凍段階は、細胞集団中の顆粒球およびある程度の単球を除去することによって、より均一な産物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄段階の後で、細胞が凍結溶液中に懸濁される場合がある。多数の凍結溶液およびパラメーターが当技術分野において公知であり、この状況で有用であろうものの、非限定的な例では、1つの方法は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または他の適切な細胞凍結媒を使用することを伴う。次いで細胞は、1 / 分の速度で-80 に凍結され、液体窒素保存タンクの気相中で保管される。制御凍結の他の方法および-20 または液体窒素中での即時の非制御凍結が使用される場合もある。

30

【0250】

一態様では、T細胞集団は、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、T細胞の精製集団、およびT細胞株などの細胞中に含まれる。別の態様では、末梢血単核細胞は、T細胞集団を含む。なお別の態様では、精製T細胞は、T細胞集団を含む。

【0251】

T細胞の増大

ある特例の態様において、本明細書に開示される改変された細胞は、約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれ超、およびそれらの間の任意およびすべての整数 (whole integer) および分数 (partial integer) 倍にすることができる。一態様では、T細胞は約20倍~約50倍の範囲で増大する。

40

【0252】

培養に続き、改変された細胞は、培養装置に入れた細胞培地中で、一定期間、または細胞が集密に達する、もしくは別の培養装置に細胞を継代する前の最適な継代のための高い細胞密度に達するまで、インキュベートすることができる。培養装置は、細胞をインビトロ

50

培養するために一般に使用される任意の培養装置であることができる。好ましくは、集密のレベルは、別の培養装置に細胞を継代する前に70%またはそれよりも大きい。より好ましくは、集密のレベルは、90%またはそれよりも大きい。期間は、インビトロ細胞培養に適した任意の時間であることができる。T細胞培地は、任意の時間でのT細胞の培養の間に交換される場合がある。好ましくは、T細胞培地は、約2~3日毎に交換される。次いでT細胞は、培養装置から回収され、そこからT細胞を直ちに使用することができ、または凍結保存して、後で使用するために保管することができる。一態様では、本発明は、増大したT細胞を凍結保存することを含む。凍結保存されたT細胞は、T細胞中に核酸を導入する前に解凍される。

【0253】

別の態様では、方法は、T細胞を単離する段階およびT細胞を増大させる段階を含む。別の態様では、本発明は、増大の前にT細胞を凍結保存する段階をさらに含む。なお別の態様では、凍結保存されたT細胞は、キメラ膜タンパク質をコードするRNAをエレクトロポレーションするために解凍される。

【0254】

細胞をエクスピボ増大させるための別の手順は、米国特許第5,199,942号(参照により本明細書に組み入れられる)に記載されている。米国特許第5,199,942号に記載されるような増大は、本明細書に記載される増大の他の方法の代替または追加であることができる。簡潔には、T細胞のエクスピボ培養および増大は、米国特許第5,199,942号に記載されるものなどの細胞増殖因子または他の因子、例えばflit3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドへの追加を含む。一態様では、T細胞を増大することは、flit3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドからなる群より選択される因子と共にT細胞を培養することを含む。

【0255】

本明細書に記載されるような培養する段階(本明細書に記載されるような作用物質との接触またはエレクトロポレーション後)は、非常に短く、例えば、24時間未満、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23時間であることができる。本明細書にさらに記載されるような培養する段階(本明細書に記載されるような作用物質との接触)は、より長く、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、またはそれ超の日数であることができる。

【0256】

培養細胞を説明するために様々な用語が使用される。細胞培養物は、一般的に、生きた生物から取得され、制御された条件下で成長させた細胞を指す。初代細胞培養物は、生物から直接取得された細胞、組織または器官の培養物であって、最初の植え継ぎ前の培養物である。細胞の成長および/または分裂を容易にしてより大きい細胞集団をもたらす条件下で細胞が成長培地中に入れられた場合に、細胞は培養において増大される。細胞が培養において増大される場合、細胞の増殖速度は、典型的には細胞が数を倍加するために必要な時間、別の言い方で倍加時間として知られる時間により測定される。

【0257】

植え継ぎの各ラウンドは、継代と称される。細胞が植え継がれたとき、それらの細胞は継代されたと称される。特定の細胞集団または細胞株は、時に、継代された回数により称される、または特徴付けられる。例えば、10回継代された培養細胞集団は、P10培養物と称される場合がある。初代培養物、すなわち、組織から細胞を単離後の最初の培養物は、P0と呼ばれる。1回目の植え継ぎの後、細胞は二次培養物(P1または継代1)と説明される。2回目の植え継ぎの後、細胞は三次培養物(P2または継代2)になる、など。継代期間の間に多数の集団倍加があり得ることが、当業者により理解されるであろう;したがって、培養物の集団倍加数は、継代数よりも大きい。継代の間の期間中の細胞の増大(すなわち、集団倍加数)は、非限定的に播種密度、基質、培地、および継代間隔を含む多数の要因に依存する。

【0258】

10

20

30

40

50

一態様では、細胞は、数時間（約3時間）～約14日間またはその間の任意の時間整数値の間培養される場合がある。T細胞培養に適した条件は、血清（例えば、ウシ胎児血清またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN-ガンマ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF-ベータ、およびTNF-、または当業者に公知の細胞の成長のための任意の他の添加剤を含む、増殖および生存に必要な因子を含有し得る適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640または、X-vivo 15、（Lonza））を含む。細胞の成長のための他の添加剤には、界面活性剤、プラスマネート（plasmanate）、ならびにN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤が含まれるが、それに限定されるわけではない。培地は、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンが添加され、無血清の、または適切な量の血清（または血漿）もしくは所定のセットのホルモンならびに/もしくはT細胞の成長および増大に十分な量のサイトカインが補充された、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20、Optimizerを含むことができる。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験培養物中にのみ含まれ、対象に注入されるべき細胞の培養物中には含まれない。標的細胞は、成長を支援するために必要な条件、例えば、適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5% CO₂）下で維持される。

10

【0259】

T細胞を培養するために使用される培地は、T細胞を共刺激することができる作用物質を含む場合がある。例えば、CD3を刺激することができる作用物質は、CD3に対する抗体であり、CD28を刺激することができる作用物質は、CD28に対する抗体である。なぜなら、本明細書に開示されるデータに示されるように、本明細書に開示される方法によって単離される細胞は、約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、またはそれ超増大されることができる。一態様では、T細胞は、エレクトロポレーションした集団を培養することで、約20倍～約50倍、またはそれ超の範囲で増大する。

20

【0260】

一態様では、T細胞を増大する方法は、増大されたT細胞をさらなる適用のために単離する段階をさらに含むことができる。別の態様では、増大する方法は、増大されたT細胞のその後のエレクトロポレーションとそれに続く培養をさらに含むことができる。後続のエレクトロポレーションは、作用物質をコードする核酸を導入すること、例えば、増大されたT細胞を形質導入すること、増大されたT細胞をトランスフェクションすること、または増大されたT細胞に核酸をエレクトロポレーションして、増大されたT細胞集団にすることを含む場合があり、ここで、作用物質は、T細胞をさらに刺激する。作用物質は、例えば、さらなる増大、エフェクター機能、または別のT細胞機能を刺激することによって、T細胞を刺激する場合がある。

30

【0261】

薬学的組成物

本発明の薬学的組成物は、本明細書に記載のとおりの変更されたT細胞を、1つまたは複数の薬学的にまたは生理学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせる。そのような組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；酸化防止剤；EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および保存料を含み得る。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与用に製剤化される。

40

【0262】

本発明の薬学的組成物は、治療（または予防）されるべき疾患に適した様式で投与される。投与の量および頻度は、患者の状態ならびに患者の疾患の種類および重症度のような

50

要因によって決定されるが、適切な投与量は臨床試験によって決定され得る。

【0263】

投与されるべき本発明の細胞は、療法を受ける対象に対して自家、同種または異種であり得る。

【0264】

本発明の細胞は、適切な前臨床および臨床の実験および試験で決定される投与量および経路かつ時間で投与することができる。細胞組成物は、これらの範囲内の投与量で複数回投与され得る。本発明の細胞の投与は、当業者によって決定されるような所望の疾患または状態を治療するのに有用な他の方法と併用してもよい。

【0265】

一般に、本明細書に記載の改変されたT細胞を含む薬学的組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞/kg体重、いくつかの場合では、 $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞/kg体重（これらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与され得ると規定することができる。T細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与され得る。細胞は、免疫療法において一般に知られている注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988を参照のこと）。特定の患者に対する最適な投与量および治療レジメンは、医学分野の当業者が、疾患の徴候について患者をモニタリングし、それに応じて治療を調整することによって、容易に決定することができる。

【0266】

本発明の改変されたT細胞の投与は、当業者に公知の任意の簡便な手法で行われ得る。本発明の細胞は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、インプランテーションまたは移植によって対象に投与され得る。本明細書に記載の組成物は、患者に対して、経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、結節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内（i.v.）注射によって、または腹腔内に投与され得る。他の場合には、本発明の細胞は、対象における炎症の部位、対象における局所疾患部位、リンパ節、臓器、腫瘍などに直接注射される。

【0267】

本発明において有用であろう方法および組成物は、実施例に示される特定の製剤に限定されることが理解されるべきである。以下の実施例は、当業者に、本発明の細胞、拡大増殖法および培養法ならびに治療法をどのように作製および使用すればよいかの徹底した開示および説明を提供する目的で提示されるものであって、本発明者らが自分たちの発明と見なしていることの範囲を限定することを意図するものではない。

【0268】

本発明の実施は、別途指示のない限り、十分に当業者の技能の範囲内にある分子生物学（組み換え技法を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技法を用いる。そのような技法は、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", fourth edition (Sambrook, 2012); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002); "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002)などの文献中に十分に説明されている。これらの技法は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作製に適用可能であり、よって、本発明の策定および実施において考慮してもよい。特定の態様にとって特に有用な技法を後続の項で考察する。

【実施例】

【0269】

実験例

これから以下の実施例を参照して本発明を説明する。これらの実施例は、例証だけの目的で提供されるものであって、本発明は、これらの実施例に限定されるわけではなく、本明

10

20

30

40

50

細書において提供される教示の結果として明白であるすべての変形を包含する。

【0270】

実施例1：U87細胞内でのEGFRミスセンス変異体の発現

上皮増殖因子受容体（EGFR）（ErbB1）座位内の変化は、GBM中の最高頻度の遺伝子変化に相当する。GBMにおいて二重微小染色体としてのEGFR座位の限局した増幅によって媒介されるものなどのEGFRの過剰発現が長い間認識されており、症例の60%に見出される。EGFRの変異もまた頻度が高い。エクソン2～7を欠如する発がん性EGFRバリエーション（EGFRvIII）は、GBMの約30%に見出される。GBM症例の次世代シーケンシングデータに加えてTCGAデータを使用して、発がん活性を有するミスセンス変異が、EGFR細胞外ドメイン（ECD）の位置108、289、および598に同定された（図7）。遡及的分析により、これらの変異を有する患者が全生存率の不良を示すことが示された。EGFRが増幅されたGBMの60%超はECDにおける変異を示し、これらの変異は、交差反応性CART細胞によって標的とされることができた。

【0271】

EGFR特異的CAR T細胞の機能を試験するために、GBMに意味づけられるEGFRの変異体をコードするレンチウイルス発現系を生成した（図8）。Geneart遺伝子合成および部位特異的変異誘発（Thermo fisher）によってEGFRミスセンス変異をEGFR遺伝子に導入した。CFPおよびEGFR変異を同時発現するレンチウイルスベクターをU87 wtEGFR細胞株およびU87 MG細胞株内に形質導入し、蛍光標識細胞分取によってCFP陽性細胞を選別した。wtEGFR（U87 wtEGFR）を形質導入されたU87 MG細胞株におけるEGFR変異体およびCFPの同時発現を図9に示す。U87 MG GBM細胞におけるEGFR変異体およびCFPの同時発現を図10に示す。

【0272】

実施例2：交差反応性EGFR特異的CAR T細胞によるGBM細胞の標的指向性細胞溶解

本明細書において複数のEGFRアイソフォームに対して広い特異性を誘発するキメラ抗原受容体（CAR）T細胞を生成した。モノクローナル抗体mAb806由来のscFvと、CD8ヒンジドメインと、CD8膜貫通ドメインと、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインとをコードするレンチウイルス発現ベクターを構築した（図1A）。初代ヒトCD4+ T細胞およびCD8+ T細胞にCARをコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。6日インキュベーション後、約60%のT細胞が細胞表面にEGFR特異的806-4-1BB CARを発現した（図1B）。

【0273】

モノクローナル抗体mAb806は、複数のEGFRミスセンス変異により共有される構造特徴を検出する（Binder et al. (2018) Cancer Cell, 34, 1; 163-177）。したがって、806scFvを組み入れるCAR T細胞は、不均一なEGFR腫瘍細胞集団の広い特異性およびターゲティングを可能にするはずである。806-41BB CAR T細胞の抗原特異的細胞溶解活性をヒトGBM細胞株に対して試験した（図2）。これらのGBM細胞株は、基礎レベルのEGFRを有するU87 MG親GBM細胞株をベースとし、それに野生型EGFR（U87 wtEGFR）またはそのバリエーションEGFRvIII（U87 wtEGFR/EGFRvIII）もしくはEGFRA289V（U87 wtEGFR/EGFRA289V）のいずれかが形質導入されていた。4時間のクロム放出アッセイで種々のCAR T細胞対腫瘍細胞比を用いて抗原特異的細胞溶解活性を測定した。EGFRvIIIに特異的な2173 CAR、および野生型EGFRに特異的なセツキスマブ（C225）CARを陽性対照として使用した。CD19 CART細胞を陰性対照として使用した。806-41BB CAR T細胞は、複数のEGFRアイソフォームに対して抗原特異的細胞溶解活性を示した（図2）。

【0274】

4時間のクロム放出アッセイでEGFRミスセンス変異R108KおよびA289VならびにEGFRバリエーションVIIIを形質導入されたU87親細胞株において806 4-1BB CAR T細胞によるインビトロ細胞溶解が実証された。EGFR野生型特異的C10 4-1BB、およびVIII特異的2173、4-1BB CARを陽性対照として使用した。CD19 4-1BB CARを陰性対照とし

て使用した。806 CAR T細胞は、野生型および変異体EGFR発現U87細胞を特異的に溶解することができたのに対し、対照Nalm6細胞であるEGFRを発現しない前駆B細胞株は標的とされなかった(図3)。まとめると、これらのデータによって、806-41BB CAR T細胞が多様なEGFR発現細胞を特異的にターゲティングおよび死滅できることが実証された。

【0275】

ヒト化形態のmAb806の配列、ABT-806を図11(DNA)および図12(アミノ酸)に示す。

【0276】

実施例3: 806 KIR CAR T細胞によるEGFR特異的細胞のターゲティング

10

本明細書において複数のEGFRアイソフォームに対する広い特異性を誘発するKIR CARもまた生成した。806-scFv、KIR膜貫通および細胞内ドメイン、ならびにDAP12配列を含有するレンチウイルスベクターを構築した(図4A)。抗CD3/抗CD28 T細胞活性化ビーズで初代ヒトT細胞を24時間刺激した。次いで、T細胞に806-KIRレンチウイルスベクターを形質導入し、インビトロで10日間拡大増殖させた。ビオチン化ヤギ-抗マウスF(ab)2に続いてストレプトアビジン-APCを用いるフローサイトメトリーによって分析した場合、約44%のT細胞が806 KIR CARを発現した(図4B)。EGFR発現GBM細胞株ならびにそのバリエーションvIII発現GBM細胞株およびA289V発現GBM細胞株に対する806-KIR CAR Tの抗原特異的細胞溶解活性を、生存細胞についてのレポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用いて測定した(図5)。806 KIR CAR T細胞は、U87 MG、U87 MG EGFRvIII、U87 wtEGFR、U87 wtEGFR/EGFRvIII、およびU87 wtEGFR/EGFR A289V細胞株を溶解することができた。EGFRvIIIおよびEGFR野生型を認識するEGFRvIII特異的2173 CARおよびセツキシマブ(C225) CARを陽性対照として使用した。データにより、806 KIR CAR T細胞の抗原特異的細胞溶解活性が実証された。

20

【0277】

実施例4: GBM交差反応性EGFR特異的ヒト化CAR T細胞の標的指向性細胞溶解

ヒト化ABT806 scFvを4-1BBz CAR中にコードするレンチウイルス発現ベクターおよびヒト化ABT806 scFvをKIR-CAR中にコードする別のベクターを創出した。ヒト化配列はSEQ ID NO. 23~28に対応する。初代ヒトCD4+ T細胞およびCD8+ T細胞にベクターを形質導入し、6日のインキュベーション後に顕著な陽性を実証した。ヒト化モノクローナルABT806 4-1BBz CARおよびヒト化モノクローナルABT806 KIR CARは、どちらも、EGFR変異体を用いて改変されたU87 MG細胞株またはEGFR変異体を用いて改変されたU87 wtEGFR細胞株に対して細胞溶解活性を示した。

30

【0278】

実施例5: ヒト化806-41BB CARとの組み合わせ処置

ヒト化806-41BBz CARを用いて皮下の動物組み合わせ実験を行い、抗PD-1阻害剤をU87 wtEGFR/EGFRvIIIに対して試験した(図16A~16B)。最も良い臨床効力を達成するために、複数の注入を用いて抗PD-1阻害およびCAR T細胞の両方の投与計画を比較する。806-41BBz CAR T細胞の追加的な腫瘍成長阻害研究のために同所腫瘍モデルを使用する。806 41BBzおよび806 KIR CARの静脈内および髄腔内投与を用いて送達経路を比較する。

40

【0279】

ペムブロリズマブ、ニボルマブ、およびアテゾリズマブのscFvを使用して、2つのバージョンのPD-1/PD-L1ブロッカーを生成し、各々のミニボディーおよびIFN γ のシグナル伝達ドメインとシスのscFvという6つの構築物をもたらす。「PD-1/PD-L1ブロッカー分泌型の806BBz」をコードするプラスミドを293T細胞にトランスフェクトする。トランスフェクションの72時間後に上清を収集し、直接ELISAによるPD-1/PD-L1結合アッセイに使用する。

【0280】

PD-1/PD-L1ブロッカー分泌型の806 BBz CAR T細胞からの上清を収集し、直接ELIS

50

AによるPD-1/PD-L1結合アッセイに使用する。PD-1/PD-L1ブロッカー分泌型の806 BBz CAR T細胞を形質導入されたT細胞上に806 BBz CARのCAR発現が検出される。

【0281】

PD-1/PD-L1ブロッカー分泌型の806 BBz CAR T細胞をU87 wtEGFR/EGFRvIII陽性標的細胞と共培養する。共培養の16時間後にフローベースの細胞内サイトカイン染色によってサイトカインの分泌を評価する。

【0282】

腫瘍の皮下植え込み後、尾静脈を經由してUTD T細胞、806 BBz CAR T細胞、ブロッカー分泌型の806 BBz CAR T細胞またはブロッカー分泌T細胞を注入する。腫瘍サイズおよびBLISIGNAL伝達は、ブロッカー分泌型の806 BBz CAR T細胞の腫瘍成長阻害活性の増加を示す。

10

【0283】

実施例6：ヒトGBMに対するCAR T細胞組み合わせ療法のインビボおよびインビトロ投与
806 BBz CARと抗PD1 抗体との併用療法で皮下腫瘍を処置した(図16A~16B)。PBSまたは抗PD-1抗体のいずれかと非形質導入T細胞または806 BBz CAR T細胞との組み合わせで皮下U87 wtEGFR/EGFRvIII細胞株を処置した。併用療法によって、生物発光によって決定される場合の相対腫瘍変化に、より大きな減少が実証された(図16A)。CAR T注入の16日後のPBS + 非形質導入(UTD)細胞に対する腫瘍変化率を図16Bに示す。

【0284】

20

U87 wtEGFR(図17A)およびU87 wtEGFR/EGFRvIII(図17B)側腹部腫瘍に対する806 KIR CARのインビボ抗腫瘍活性が実証された。腫瘍モデルは、単独で、または付随するEGFR変異の存在下のいずれかで野生型EGFRの過剰発現を有した。このペア形成は、野生型EGFRの過剰発現の非存在下でのEGFR変異の単独発現よりもより大きな生理学的表象である。U87 wtEGFR/EGFRvIII側腹部腫瘍に対する806 BBzのインビボ抗腫瘍活性もまた実証された(図17C)。

【0285】

806 CAR T細胞のインビトロ効力もまた実証された(図18A~18Bおよび19A~19C)。EGFRならびにそのバリエーションEGFRvIII、EGFR108K/GおよびEGFRΔ289D/T/Vを発現しているU87MGおよびU87 wtEGFRにおける806および2173 CAR T細胞の抗原特異的細胞溶解活性を、24時間のルシフェラーゼアッセイにおいて表示のエフェクター対標的比の細胞株で示した(図18A)。wtEGFR、EGFRvIII、およびその変異体バリエーションを認識するC225 BBzおよびC225 KIR CARを陽性対照として使用し、CD19 BBz CARを陰性対照として使用した。EGFRおよびそのバリエーションを発現するK562細胞における806および2173 CAR T細胞の抗原特異的細胞溶解活性を、表示のエフェクター対標的比の4時間のクロム放出アッセイで実証した(図18B)。K562細胞は基礎EGFRを発現せず、それに対して抗原特異性を試験すべきクリーンな背景を提供する。

30

【0286】

wtEGFR、EGFRvIII、またはEGFR変異体を発現しているK562細胞を806 CAR T細胞と共に48時間共培養し、IFN- γ 、TNF- α およびIL2の分泌をELISAによって測定した(19A~19B)。wtEGFR、EGFRvIII、またはEGFR変異体を発現しているK562細胞と4時間共培養した場合のCAR T細胞のCD107a脱顆粒を測定した。結果をCD3+細胞上のCD107a発現のパーセンテージとして表す(図19C)。

40

【0287】

初代星状細胞および角化細胞において806 CAR T細胞の抗腫瘍効力が実証された(図20A~20C)。ヒト初代星状細胞および角化細胞上のEGFRの表面発現をフローサイトメトリーによって評価した(図20A)。初代星状細胞および角化細胞を806 CAR T細胞と表示の比で4時間のクロムアッセイで共培養した(図20B)。806 CAR T細胞と初代星状細胞および角化細胞を1:5のエフェクター対標的比で共培養し、37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベーション後の上清からIFN- γ を測定した(図20C)。

50

【0288】

実施例7：CAR T処置の臨床効力をリアルタイムで予測するための進歩したバイオマーカープラットフォームの開発

GBMオルガノイド（GBO）をCAR T細胞と共培養した（図21A～21C）。GBOは、Jacob et al. (2019) Cell 180:1;188-204.e22に詳細に記載されており、その内容は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。簡潔には、GBOを以下の方法により生成した。

【0289】

膠芽腫組織試料および末梢血試料を膠芽腫の患者から収集した。外科切除された新鮮膠芽腫組織を無菌リン酸緩衝食塩水中に入れ、直ちに取り出して、担当の神経病理学者が高グレード神経膠腫の予備的診断を確認した。大量の塊状組織が入手可能な場合、腫瘍内不均一性の分析のために組織を解剖学的に別個の小領域に細分した。膠芽腫の予備的診断を確定した後、組織を分配し、4に保ったHibernate A培地（BrainBits）中に入れた。外科的除去と組織の処理との間の時間が延長するとGBO作製の信頼度が低減したので、信頼できるオルガノイドの生成のためには組織を直ちに処理することが不可避であった。ラミナーフローバイオセーフティーキャビネット内の実体顕微鏡（Zeiss）下での解剖のために、Hibernate A、1×GlutaMax（Thermo Fisher Scientific）、1×PenStrep（Thermo Fisher Scientific）、および1×アンホテリシンB（Thermo Fisher Scientific）を含有するH+GPSA培地が入った無菌ガラス皿に組織を移した。受け入れた膠芽腫組織の量は、体積0.5～2mLの範囲であった。切除された腫瘍を、精密解剖用はさみ（Fine Science Tools）を使用して直径約0.5～1mmの小片に刻み、H+GPSA培地で洗浄して細胞デブリを除去した。かなりの量の壊死または周辺脳組織を含有する小片を除去した。腫瘍片を1×RBC溶解緩衝液（Thermo Fisher Scientific）中、やさしく回転させながら室温で10分間インキュベートして、大部分の混入赤血球を溶解させた。RBC溶解緩衝液を吸引し、腫瘍片をH+GPSA培地で洗浄した。バルクRNAシーケンシングおよび全エクソーム解析のためにいくつかの腫瘍片を急速凍結させた。組織学的研究のために、DPBS（Thermo Fisher Scientific）中4%に希釈したメタノール不含ホルムアルデヒド（Polysciences）中にいくつかの腫瘍片を室温で1時間やさしく回転させながら直接入れた。固定後、プラスチック製の型（Electron Microscopy Sciences）に腫瘍片を入れ、ドライアイス上の組織凍結媒液（General Data）中で急速凍結させた。処理まで凍結組織を-80で保存した。

【0290】

RNAシーケンシング、全エクソーム解析、または組織学のために取り置かれなかった残りの腫瘍片を、ウェル1つあたり4mLの50% DMEM:F12（Thermo Fisher Scientific）、50% Neurobasal（Thermo Fisher Scientific）、1×GlutaMax（Thermo Fisher Scientific）、1×NEAAs（Thermo Fisher Scientific）、1×PenStrep（Thermo Fisher Scientific）、1×N2サプリメント（Thermo Fisher Scientific）、1×B27 w/oビタミンAサプリメント（Thermo Fisher Scientific）、1×2-メルカプトエタノール（Thermo Fisher Scientific）、および2.5mg/mlヒトインスリン（Sigma）を含有するGBO培地を有する超低接着性6ウェル培養プレート（Corning）中に分配し、37、5% CO₂、および湿度90%の無菌インキュベーター内の120rpmで回転するオービタル攪拌機上に置いた。プレートを角度45°に傾け、沈んだGBOの上の培地を吸引することによって培地のおよそ75%を48時間毎に交換した。1週間以内の培養で、腫瘍片から細胞デブリおよび血液デブリが脱落し、培地がわずかに混濁するが多かった。脱落はすぐに止まり、腫瘍片は、組織の質および患者特異的な腫瘍成長特性に応じて一般的に1～2週間以内に球形のオルガノイドを形成した。所与の患者の腫瘍からのGBOの樹立成功の基準は、精密解剖された腫瘍片が2週間生存し、球状形態を発生し、培養で連続的に成長したことであった。長期間（>1ヶ月）培養されたGBOを、精密解剖用はさみを使用して日常的に直径約200～500mmの小片に切断して、養分および酸素の拡散の制限による中心部の実質的な壊死を防止した。RNAシーケンシング、

全エクソーム解析、および組織学のためにGBOを採取した。

【0291】

806 BBZ、2173 BBz、およびCD19 BBz CAR T細胞との共培養の24および72時間後に、GBOの免疫蛍光染色を行った(図21A)。CD3についての細胞染色および切断されたカスパーゼ3の定量をそれぞれ図21Bおよび図21Cに示す。CD3発現に有意差がなかったものの、カスパーゼ活性は有意に異なり、806 BBz CAR T細胞が2173 BBz CAR T細胞と比較して腫瘍死滅の増加をもたらしたことを実証した。8167 GBOは、内因性増幅wtEGFR、EGFRvIII、およびEGFRA289Vを発現し、標準的な神経膠腫幹細胞株よりもGBMの大きな生理学的表象を描写していた。

【0292】

他の態様

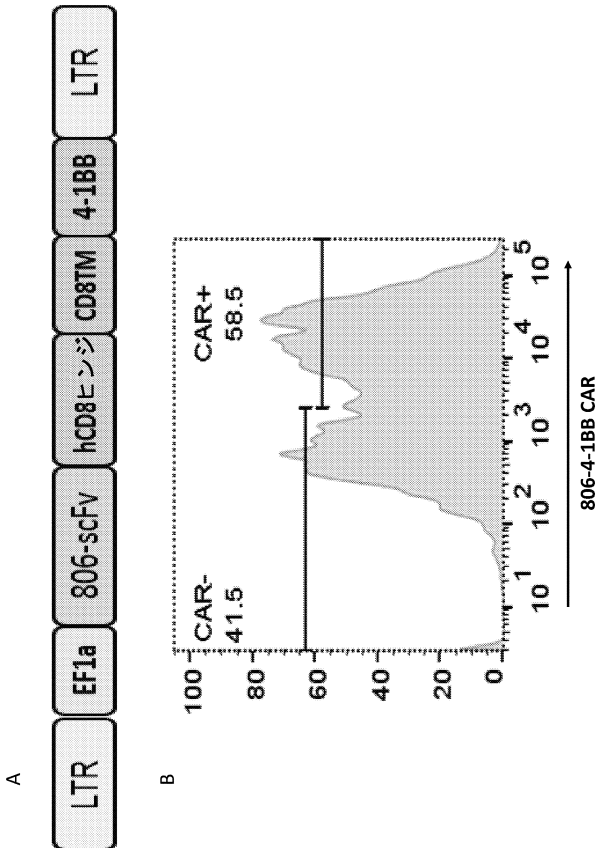
本明細書における変数の任意の定義における要素の一覧の詳述は、記載された要素の任意の単一の要素または組み合わせ(または小組み合わせ)としてのその変数の定義を含む。本明細書における態様の詳述は、任意の単一の態様としての態様または任意の他の態様もしくはその部分との組み合わせた態様を含む。

【0293】

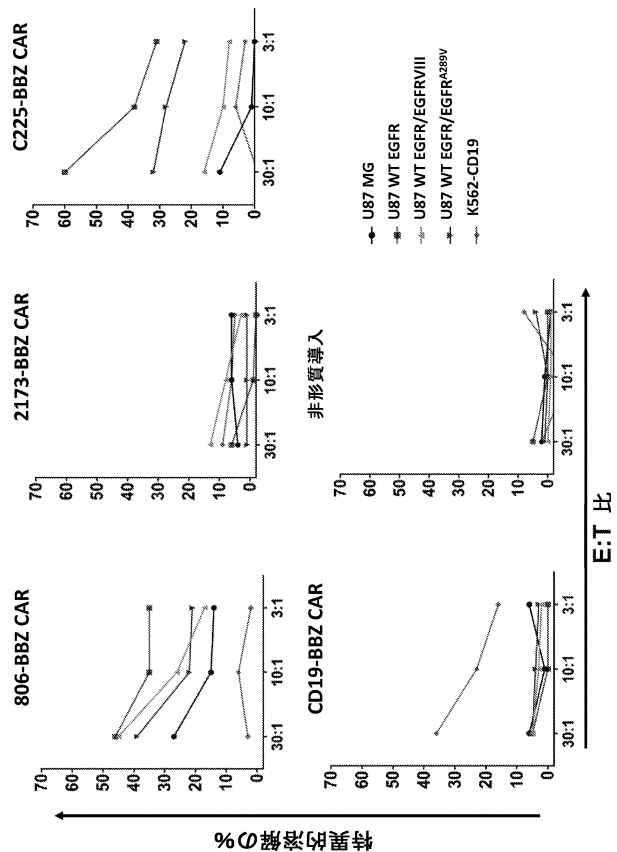
本明細書において引用される特許、特許出願、および刊行物の開示は、いずれも皆、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。本発明は具体的な態様に関連して開示されているが、本発明の他の態様および変形は、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく他の当業者によって考案され得ることが明らかである。添付の特許請求の範囲は、すべてのそのような態様および等価の変形を含むように解釈されることが意図される。

【図面】

【図1】



【図2】



A

B

30

40

50

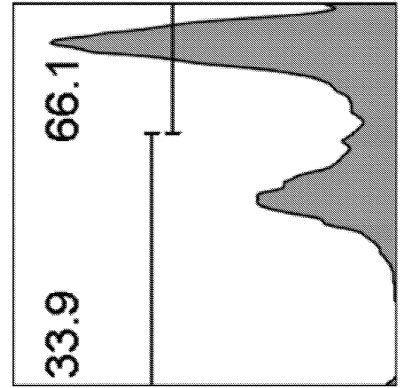
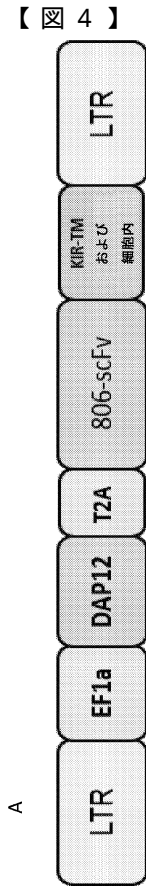
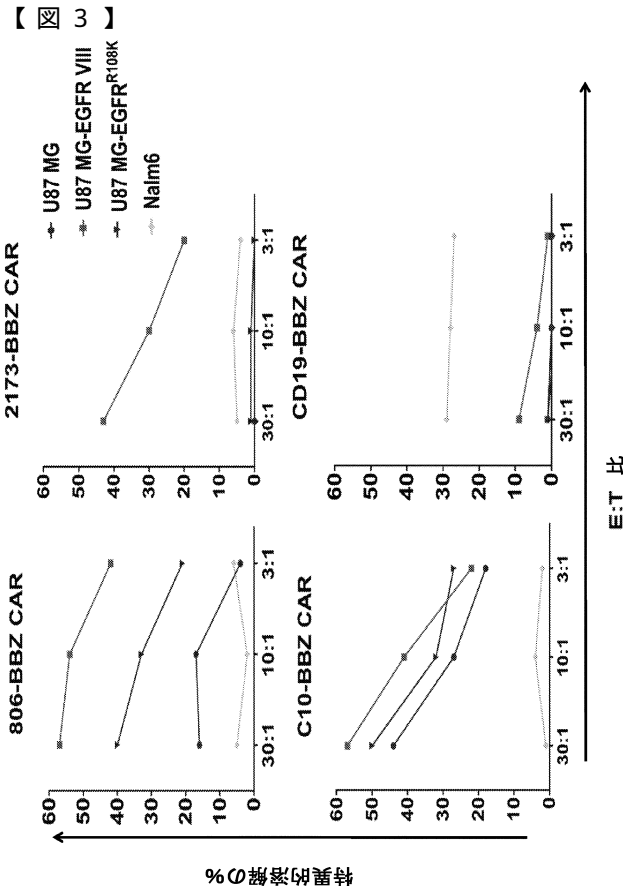
60

70

80

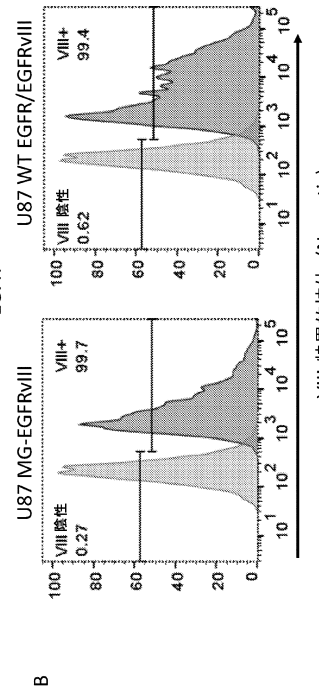
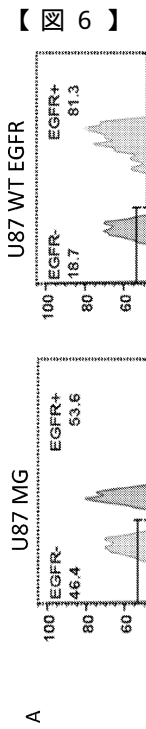
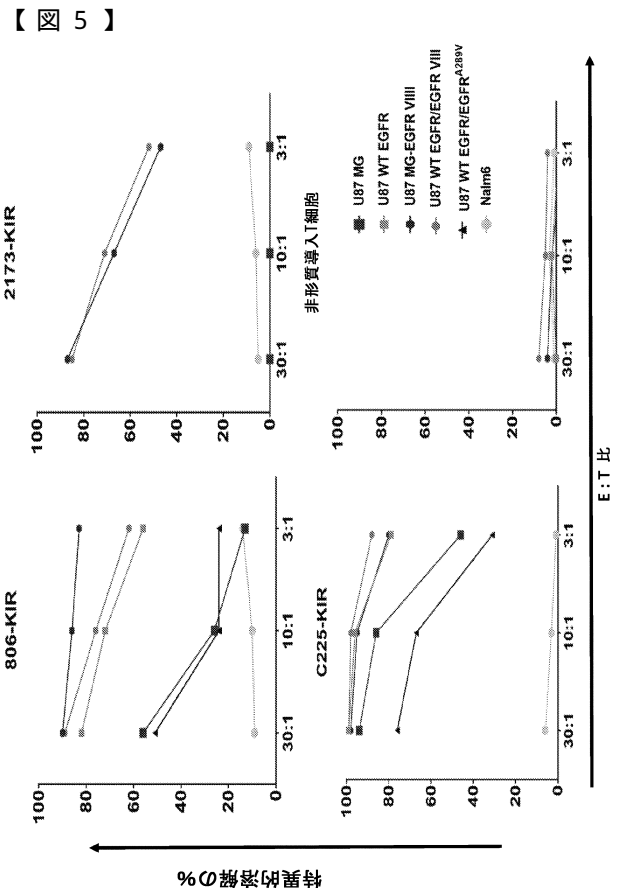
90

100



10

20

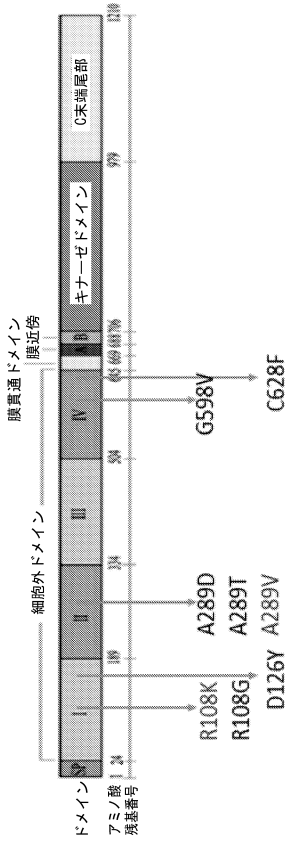


30

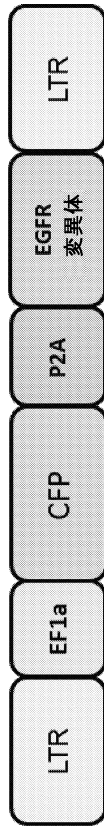
40

50

【 図 7 】



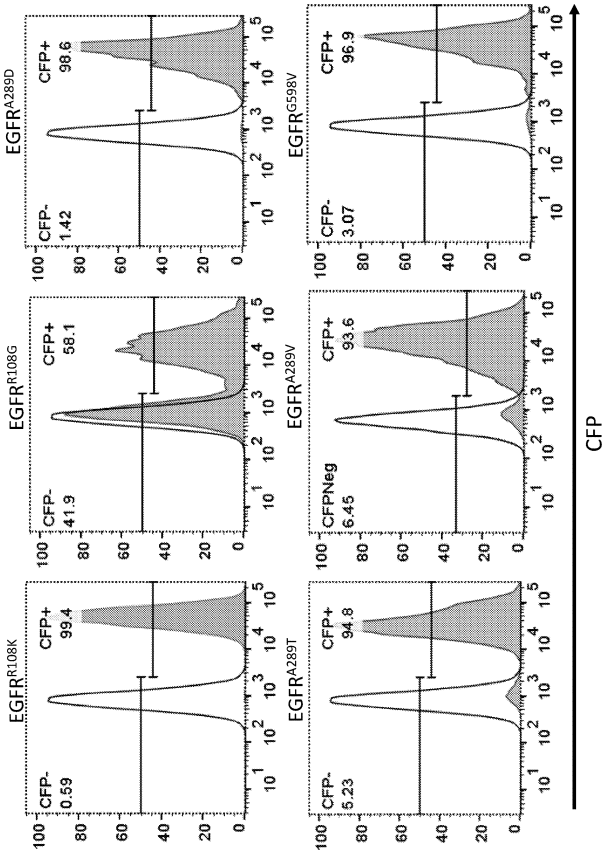
【 図 8 】



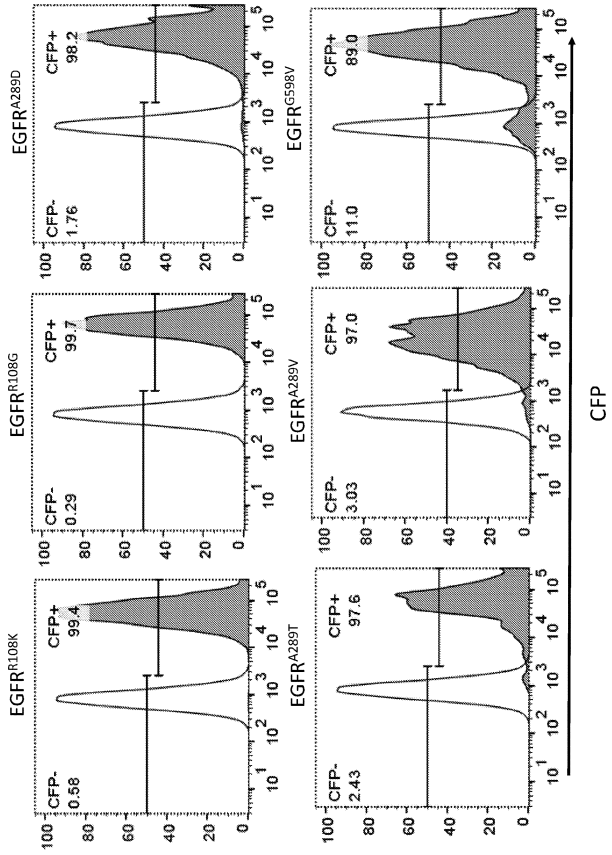
10

20

【 図 9 】



【 図 10 】

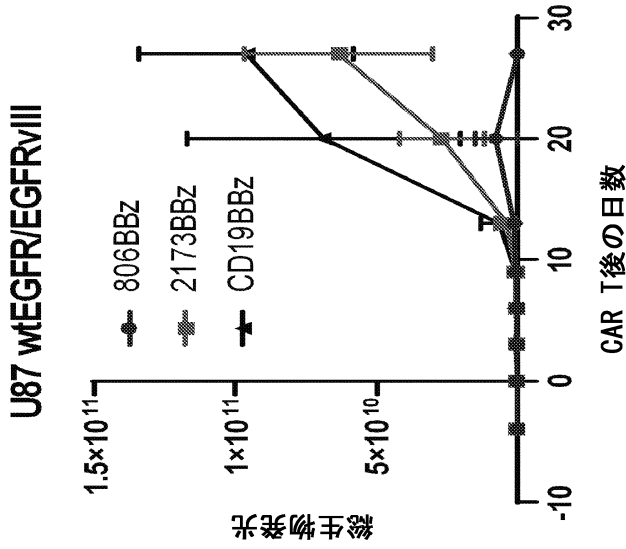


30

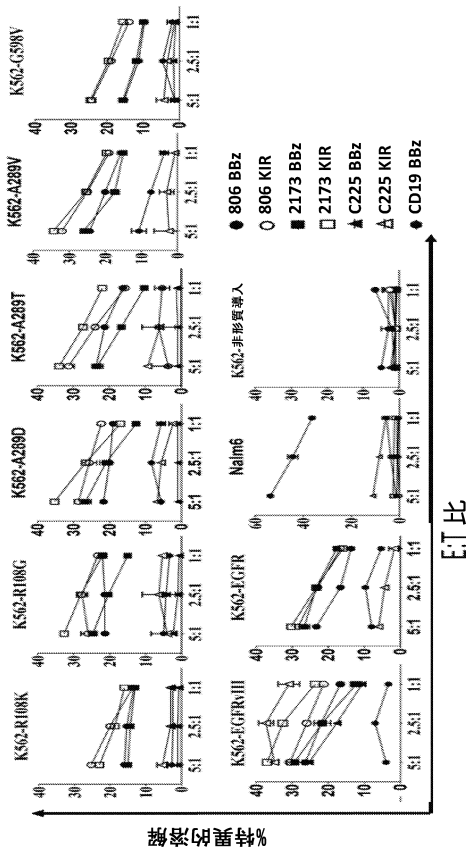
40

50

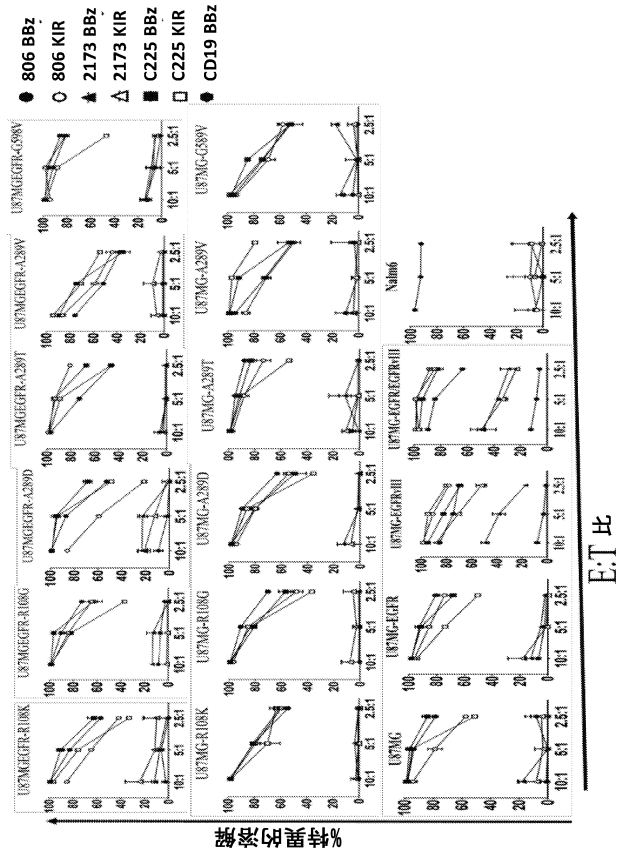
【 図 17 C 】



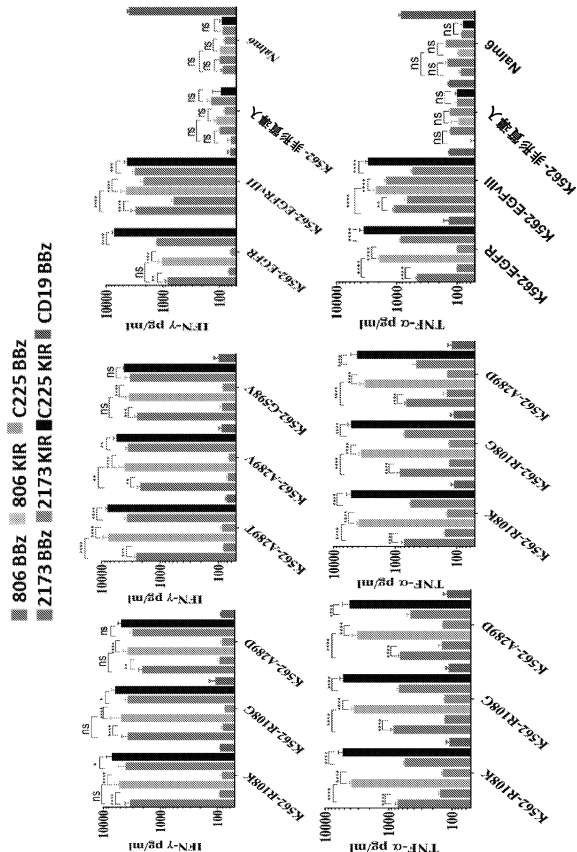
【 図 18 B 】



【 図 18 A 】



【 図 19 A 】



10

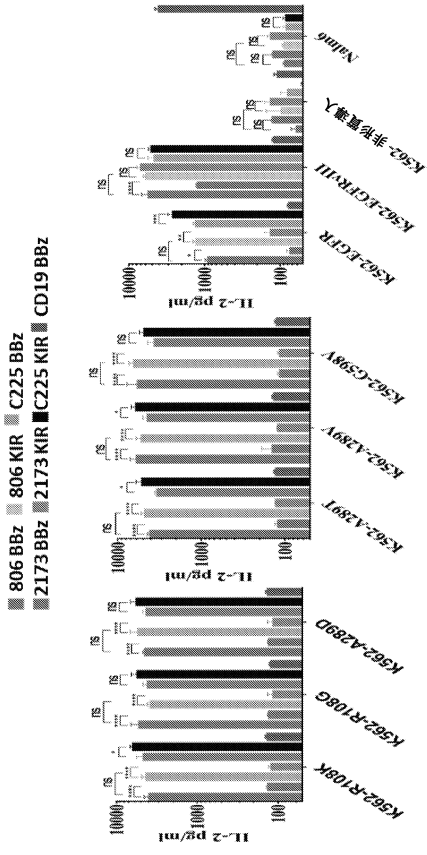
20

30

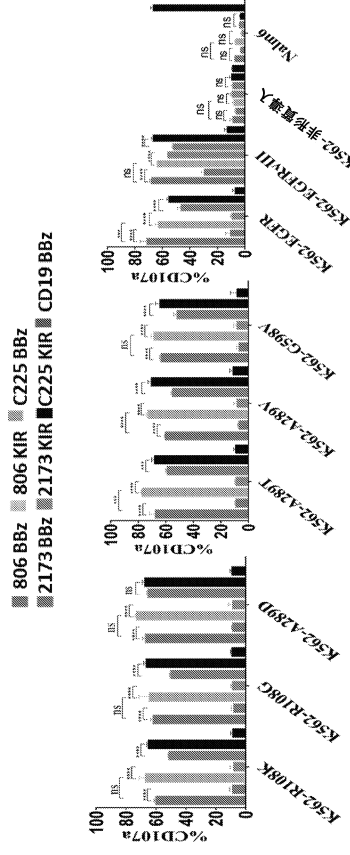
40

50

【 図 19 B 】



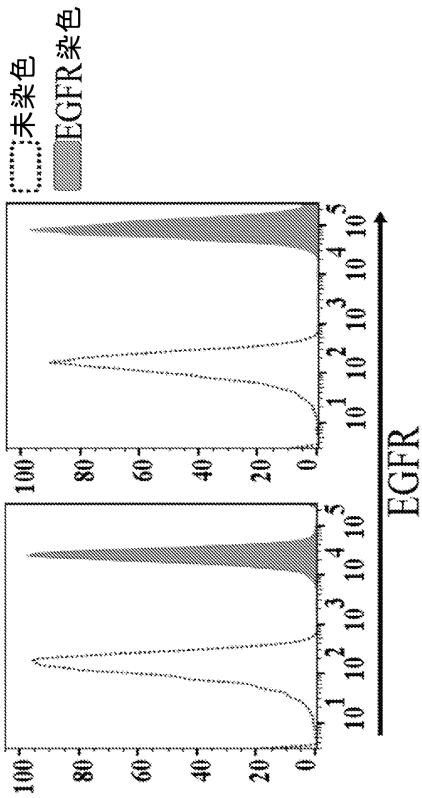
【 図 19 C 】



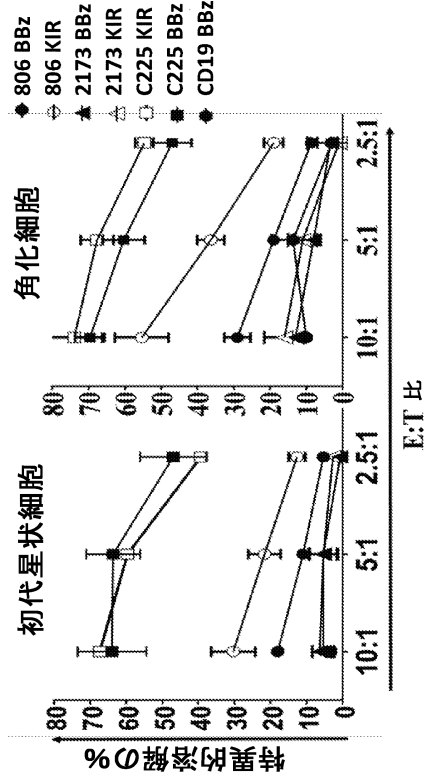
10

20

【 図 20 A 】



【 図 20 B 】

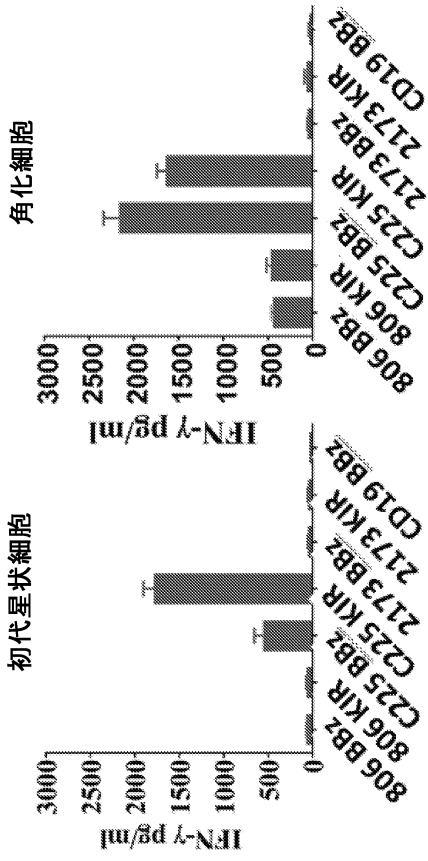


30

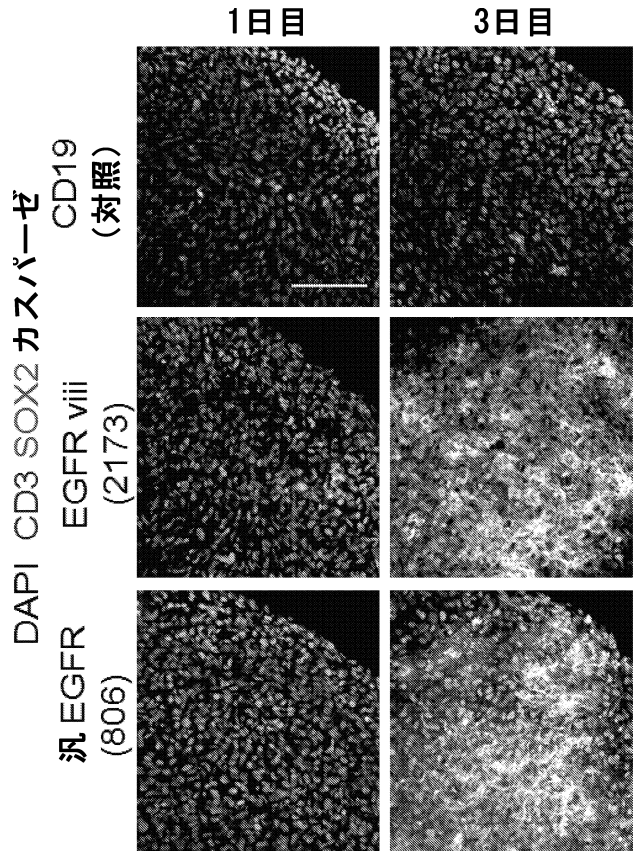
40

50

【 図 2 0 C 】



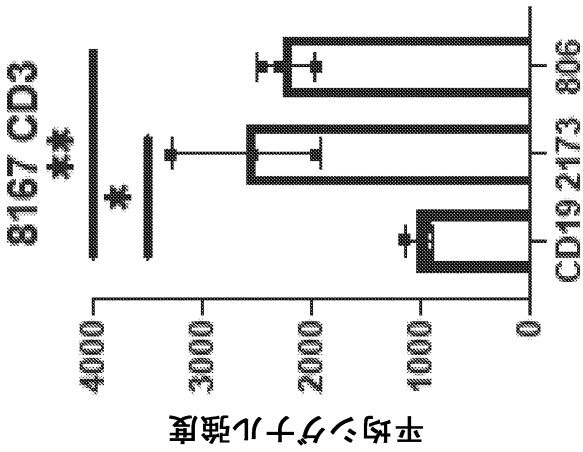
【 図 2 1 A 】



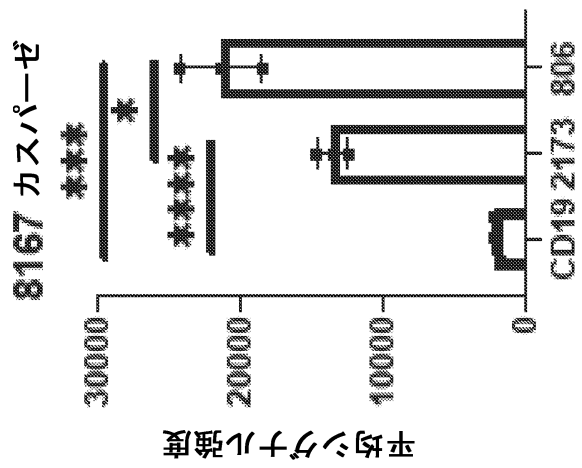
10

20

【 図 2 1 B 】



【 図 2 1 C 】



30

40

50

【配列表】

2022526856000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/27859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC - A61K 35/12, A61K 35/17, A61K 35/763, A61K 39/00 (2020.01)
 CPC - A61K 35/17, C12N 15/86, C12N 5/0636, C12N 5/0646, C07K 16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — — A	US 2015/0017120 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 15 January 2015 (15.01.2015) para [0039], [0103], [0189-0190], [0057], [0013], [0222], [0196], [0240]	1-3, 10, 20, 21/(1-3, 10, 20) ----- 11-13, 17-18, 21/(11-13, 17-18) ----- 4-9, 16, 19, 21/(4-9, 16, 19)
Y	WO 2017/117112 A1 (NOVARTIS AG et al.) 6 July 2017 (06.07.2017) Abstract, pg 134, ln 14-26; pg 135, ln 4-7; pg 176, ln 30-31 - pg 177, ln 3; pg 34, ln 7-11; SEQ ID NOS: 129-131	11-13, 17-18, 21/(11-13, 17-18)
A	WO 2018/102795 A2 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 07 June 2018 (07.06.2018) Claim 14; SEQ ID NO 591	4, 21/4
A	WO 2014/138306 A1 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 12 September 2014 (12.09.2014) para [0024], SEQ ID NO 8	5-9, 21/(5-9)
A	WO 2014/145252 A2 (MILONE et al.) 18 September 2014 (18.09.2014) pg 73, ln 21; SEQ ID NO 6; pg 73, ln 21; SEQ ID NO 7	16, 19, 21/(16,19)

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 July 2020

Date of mailing of the international search report
04 SEP 2020

40

Name and mailing address of the ISA/US
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
 Lee Young
 Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/27859

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 56-64
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

-----Please see Supplemental Sheet-----

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-13, 16-20 and 21(in part), limited to SEQ ID NOs: 1-13, 21, 22

20

30

Remark on Protest

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

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 20/27859

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

Group I+, claims 1-21, directed to an isolated nucleic acid molecule encoding a chimeric antigen receptor (CAR) and a vector comprising the isolated nucleic acid. The isolated nucleic acid molecule will be searched to the extent that the CAR nucleic acid encompasses wherein the antigen binding domain is encoded by a nucleotide sequence SEQ ID NO: 1, and comprises amino acid sequence SEQ ID NO: 2 (comprising light chain variable region SEQ ID NO: 3, heavy chain variable region SEQ ID NO: 4, LCDRs SEQ ID NOs: 5, 6, 7, HCDR2 SEQ ID NOs: 8, 9, 10), wherein the hinge region is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11, wherein the transmembrane domain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 12, wherein the intracellular domain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 13, wherein the CAR is encoded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 21, and wherein the CAR comprises amino acid sequence SEQ ID NO: 22. It is believed that claims 1-13, 16-20 and 21(in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the CAR nucleic acid encompasses SEQ ID NOs: 1-13, 21 and 22. Additional CAR nucleic acid(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected CAR nucleic acid(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a CAR nucleic acid comprising, in addition the sequences of the first invention, wherein the antigen binding domain is encoded by a nucleotide sequence SEQ ID NO: 31, and comprises amino acid sequence SEQ ID NO: 32, wherein the hinge region is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 71, wherein the transmembrane domain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 73, wherein the intracellular domain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 75, wherein the CAR is encoded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 64, wherein the CAR comprises amino acid sequence SEQ ID NO: 65, (claims 1-13, 16-20 and 21(in part)).

10

Group II, claims 22-44, directed to a modified cell comprising a cross-reactive CAR.

Group III+, claims 45-55, directed to a method for treating cancer in a subject comprising administering to the subject a modified cell comprising a CAR, wherein the CAR comprises an antigen binding domain capable of binding multiple isoforms of EGFR. Group III+ will be searched upon payment of additional fees. The method may be searched, for example, to encompass CAR sequences SEQ ID NOs: 1-13, 21 and 22 for an additional fee and election as such. It is believed that claims 45-55 read on this exemplary invention. Additional CAR sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected CAR sequence(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be SEQ ID NOs: 31, 32, 64, 65, 71, 73 and 75 (claims 45-55).

20

Group IV, claims 65-72, directed to a method for treating cancer in a subject comprising culturing a plurality of CAR T cells with a GBM organoid (GBO) derived from the subject.

The inventions listed as Groups I+, II, III+ and IV do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I has the special technical feature of a composition consisting of an isolated nucleic acid or a vector, that is not required by Group II, III+, IV.

Group II has the special technical feature of a composition consisting of a modified cell, that is not required by Group I+, III+, IV.

Group III+ has the special technical feature of administering to a subject a modified cell comprising a CAR that comprises an antigen binding domain capable of binding multiple isoforms of EGFR, that is not required by Group I+, II, IV.

30

Group IV has the special technical feature of culturing a plurality of CAR T cells with a GBM organoid (GBO) derived from a subject, and selecting from the plurality of CAR T cells, a CAR T cell having the highest efficacy, that is not required by Group I+, II, III+.

The inventions of Groups I+ and III+ each include the special technical feature of unique CAR nucleic acid and amino acid sequences, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

The inventions of Group I+, II and III+ share the common technical feature of a cross-reactive chimeric antigen receptor (CAR), wherein the CAR comprises an antigen binding domain capable of binding multiple isoforms of EGFR, a transmembrane domain, and an intracellular domain.

The inventions of Group II and III+ further share the common technical feature of a modified cell comprising said CAR.

--continued on next sheet--

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/27859

-continued from previous sheet-

The inventions of Group III+ and IV share the common technical feature of a method for treating cancer in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a modified cell comprising a CAR.

No technical features are shared between the CAR nucleic acid and amino acid sequences of Groups I+, II and III+ and accordingly these groups lack unity a priori.

Additionally, even if the inventions listed as Groups I+ and III+ were considered to share the technical features of including:

- an isolated nucleic acid molecule encoding a chimeric antigen receptor (CAR), wherein the CAR comprises an antigen binding domain capable of binding multiple isoforms of epidermal growth factor receptor (EGFR), a transmembrane domain, and an intracellular domain, and

- a method for treating cancer in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a modified cell comprising said CAR,

these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

The features shared by Groups I+, II, III+ and IV and the features shared by the inventions listed as Group I+ and III+ are taught by US 2015/0017120 A1 to Massachusetts Institute of Technology (hereinafter "MIT").

MIT teaches an isolated nucleic acid molecule encoding a chimeric antigen receptor (CAR) (para [0039] - "In one embodiment, transferred cells are engineered to express a chimeric antigen receptor (CAR)."; para [0103] - "The isolated nucleic acid molecules of the invention can include fragments not found as such in the natural state."; para [0189-0190] - "(C) T Cells Genetically Modified to Express a T Cell Receptor (TCR) that Specifically Recognizes a Tumor Antigen...Genes encoding TCRs can be isolated from T cells that specifically recognize cancer antigens with high avidity."; para [0057] - "In an embodiment, the peptides of the invention are encoded by a nucleotide sequence. Nucleotide sequences of the invention can be useful for a number of applications, including: cloning, gene therapy, protein expression and purification, mutation introduction, DNA vaccination of a host in need thereof...In an embodiment, the nucleotide sequence of the invention comprises, consists of, or consists essentially of, a nucleotide sequence selected from SEQ ID NOs: 1"), wherein the CAR comprises an antigen binding domain capable of binding multiple isoforms of epidermal growth factor receptor (EGFR) (para [0013] - "In one embodiment, the CAR contains an antigen binding domain, a costimulatory domain, and a CD3 zeta signalling domain."; para [0222] - "In one embodiment, the tumor antigen is an epidermal growth factor receptor (EGFR) antigen. The EGFR antigen can be an EGFR variant 1 antigen, an EGFR variant 2 antigen, an EGFR variant 3 antigen and/or an EGFR variant 4 antigen."), a transmembrane domain, and an intracellular domain (para [0196] - "In their simplest form, CARs contain an antigen binding domain coupled with the transmembrane domain"; para [0240] - "the entire intracellular signaling domain can be used, in many cases a portion of the intracellular domain may be used, so long as the selected portion transduces the effector function signal.").

MIT further teaches a method for treating cancer in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a modified cell comprising the CAR (para [0015] - "T cells genetically engineered to express a chimeric antigen receptor (CAR), and administering a therapeutic antibody to the subject, wherein the therapeutic antibody and the CAR recognize the same tumor antigen"; Claim 4 - "A method of treating cancer or promoting tumor regression in a subject, comprising administering to the subject an adoptive cell therapy (ACT)").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+, II, III+ and IV inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of Item 4 above: claims 56-64 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/0783(2010.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 K 35/17 (2015.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/0783
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 K 35/17 Z
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 K 45/00

テーマコード (参考)

,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,D
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
 A(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,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
 ,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,
 MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,
 RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 オルーク ドナルド
 アメリカ合衆国 1 9 0 9 6 ペンシルベニア州 ウィンウッド グリーンヒル レーン 2 4

(72)発明者 バインダー ゼヴ
 アメリカ合衆国 1 9 0 6 6 ペンシルベニア州 メリオン ステーション カルバート ロード 3 4 9

(72)発明者 ミローネ マイケル
 アメリカ合衆国 0 8 0 0 2 ニュージャージー州 チェリー ヒル サリー ロード 3 1 4

(72)発明者 トーカーラ ラディカ
 アメリカ合衆国 1 9 1 3 1 ペンシルベニア州 フィラデルフィア コンショホッケン アベニュー
 3 6 0 0 アpartment 1 8 1 2

F ターム (参考) 4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
 4C084 AA19 NA05 ZB092
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 CA04 CA12 MA67 NA14 ZB21
 ZB26 ZC41