

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-83821
(P2019-83821A)

(43) 公開日 令和1年6月6日(2019.6.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z N A Z	4 B O 2 9
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 B O 6 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C O 8 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 7

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-38969 (P2019-38969)	(71) 出願人	506139369
(22) 出願日	平成31年3月4日 (2019.3.4)		フレッド ハッチンソン キャンサー リ
(62) 分割の表示	特願2016-540620 (P2016-540620)		サーチ センター
	の分割		アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
原出願日	平成26年12月22日 (2014.12.22)		フェアビュー アベニュー ノース 1
(31) 優先権主張番号	61/919, 201		1 0 0
(32) 優先日	平成25年12月20日 (2013.12.20)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タグ化キメラエフェクター分子およびそのレセプター

(57) 【要約】

【課題】操作された細胞（例えば、操作された免疫細胞（例えば、T細胞））を同定、効率的に単離/ソート、選択的に増殖、インピボで追跡および制御もしくは除去するための組成物および方法を提供する。

【解決手段】本開示は、疎水性部分によって接続された細胞外成分および細胞内成分を含む単鎖融合タンパク質であって、ここで上記細胞外成分は、標的を特異的に結合する結合ドメイン、タグカセット、およびヒンジを含むコネクター領域を含み、上記細胞内成分は、エフェクタードメインを含むものに関する。いくつかの局面において、本開示は、(a)細胞外結合ドメインのアミノ末端に位置するか、(b)細胞外結合ドメイン内に埋め込まれるか、または(c)細胞外結合ドメインとエフェクタードメインを含む細胞内成分との間に配置されてかつこれらを接続している、1個以上の細胞外タグカセットを有する融合タンパク質を含むキメラ抗原レセプター分子に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2013年12月20日に提出された米国仮出願第61/919,201号(この出願は、その全体が参考として本明細書に援用される)に対する利益を主張する。

10

【0002】

(政府の権利に関する陳述)

本発明は、国立衛生研究所により授与された助成金/契約番号CA136551の下で、政府支援によって行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

(配列表に関する陳述)

本願に関する配列表は、紙コピーの代わりにテキスト形式で提供され、本明細書に参考として援用される。この配列表を含むテキストファイルの名称は、360056__426WO__SEQUENCE__LISTING.txtである。このテキストファイルは、32.3KBであり、2014年12月22日に作成されたものであり、EFS-Webを通じて電子的に提出されている。

20

【背景技術】

【0004】

(背景)

(技術分野)

本開示は、タグカセットを含む融合タンパク質、ならびにより具体的には、タグ化キメラエフェクター分子(Key-CHEM)およびタグ化キメラ抗原レセプター分子(T-CHARM)、ならびにこのような融合タンパク質を生成する組換え宿主細胞であって、ここで上記組換え宿主細胞は、同定され得、単離され得、ソートされ得、増殖するように誘発され得、追跡され得、除去され得、および/または治療剤(例えば、養子免疫療法において)として使用され得るものに関する。

30

【0005】

(関連分野の説明)

T細胞ベースの免疫療法は、腫瘍反応性T細胞が腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団の中で見出されたときに開発され始めた(Clark et al., Cancer Res. 29:705, 1969)。1つの戦略(養子T細胞移入として公知)は、腫瘍反応性に関して予備選択される腫瘍浸潤リンパ球の単離、IL-2の存在下で抗CD3抗体および抗CD28抗体によって誘発される上記腫瘍反応性T細胞のクローン性増殖、および上記増殖させた細胞集団を上記腫瘍を有する患者に最終的に注入し戻すこと(化学療法およびIL-2の反復投与とともに)を包含する(Dudley et al., Science 298:850, 2002)。腫瘍浸潤リンパ球での養子T細胞療法のこの形態は、技術的に扱いづらく、黒色腫を有する患者のうちのごく僅かな割合においてのみ完全な寛解をもたらす、他の癌において有効なのは希である(Besse et al., Clin. Cancer Res. 16:2646, 2010)。

40

【0006】

腫瘍反応性T細胞クローンの単離は、別の免疫療法的アプローチ、すなわち、特定の抗原に対して特異的な組換えT細胞レセプター(TCR)の生成(これは、T細胞へとベクター送達系を使用して導入されて、腫瘍細胞上で発現されるMHC分子によって呈示される腫瘍関連ペプチドに対して特異性を付与する)の開発をもたらした。類似のアプローチ

50

は、キメラ抗原レセプター（CAR）といわれる合成レセプターを導入し、これは、例えば、抗腫瘍治療の状況において、エフェクタードメイン（例えば、TCRおよび/もしくは共刺激シグナル伝達ドメイン）を含む1以上の細胞内成分に連結された、腫瘍特異的抗原もしくは腫瘍関連抗原に結合し得る抗原結合ドメインを含む。TILとは異なり、TCRもしくはCAR T細胞免疫療法の基本的な手順は、ヒトT細胞を、腫瘍標的化部分をコードする導入遺伝子で遺伝的に改変すること、上記組換えT細胞のエキソピボでの増殖、および上記増殖させた組換えT細胞を患者に輸注し戻すことである。CAR T細胞での養子療法の場合には、上記合成CAR構造の組成、ならびに上記遺伝的に操作したT細胞の質および純度は、インピボでの腫瘍に対する治療効力を決定する。しかし、上記組換え細胞集団を増殖および選択すること、ならびに重篤な自己免疫副作用を回避するためにインピボで十分に上記細胞が有効でありかつ特異的であることを確実にすることには、困難がある。

10

【0007】

現在では、操作された細胞（例えば、操作された免疫細胞（例えば、T細胞））を同定、効率的に単離/ソート、選択的に増殖、インピボで追跡、および制御もしくは除去するための組成物および方法が、免疫療法分野で必要なままである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Clarkら、Cancer Res. (1969) 29: 705

20

【非特許文献2】Dudleyら、Science (2002) 298: 850

【非特許文献3】Besserら、Clin. Cancer Res. (2010) 16: 2646

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

（要旨）

ある種の局面において、本開示は、疎水性部分によって接続された細胞外成分および細胞内成分を含む単鎖融合タンパク質であって、ここで上記細胞外成分は、標的を特異的に結合する結合ドメイン、タグカセット、およびヒンジを含むコネクター領域を含み、上記細胞内成分は、エフェクタードメインを含むものに関する。

30

【0010】

いくつかの局面において、本開示は、(a)細胞外結合ドメインのアミノ末端に位置するか、(b)細胞外結合ドメイン内に埋め込まれるか、または(c)細胞外結合ドメインとエフェクタードメインを含む細胞内成分との間に配置されてかつこれらを接続している、1個以上の細胞外タグカセットを有する融合タンパク質を含むキメラ抗原レセプター分子に関する。

【0011】

さらなる局面において、本開示は、細胞外成分と細胞内成分との間に配置されてかつこれらを接続している疎水性部分を含む単鎖融合タンパク質であって、ここで上記細胞外成分は、タグカセットとヒンジを含むコネクター領域とを含み、上記細胞内成分は、エフェクタードメインを含むものに関する。

40

【0012】

なおさらなる局面において、本開示は、細胞（例えば、T細胞（例えば、非天然のT細胞））を活性化するための方法に関し、上記方法は、細胞と、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程を包含し、ここで上記細胞は、本開示に従う融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、上記タグカセットに対して特異的な結合ドメインは、固体表面に結合される。

【0013】

なおさらなる局面において、本開示は、細胞増殖（例えば、T細胞増殖）を促進するた

50

めの方法に関し、上記方法は、細胞（例えば、非天然のT細胞）と、タグカセットに対して特異的な結合ドメインおよび増殖因子サイトカインとを、細胞増殖を可能にするために十分な時間にわたって接触させる工程であって、ここで上記細胞は、本開示に従う融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、上記タグカセットに対して特異的な結合ドメインは、固体表面に結合される工程を含む。

【0014】

ある種の他の局面において、本開示は、細胞（例えば、T細胞）を同定するための方法に関し、上記方法は、細胞（例えば、T細胞（例えば、非天然のT細胞））を含むサンプルと、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程であって、ここで上記細胞は、本開示に従う融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、上記タグカセットに対して特異的な結合ドメインは、検出可能な部分を含む、工程、ならびに上記サンプルにおいて融合タンパク質を発現する細胞の存在を検出する工程を包含する。

10

【0015】

ある種のさらなる局面において、本開示は、T細胞をソートするために方法に関し、上記細胞は、非天然のT細胞を含むサンプルと、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程であって、ここで上記非天然のT細胞は、本開示に従う融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、上記タグカセットに対して特異的な結合ドメインは、検出可能な部分を含む工程、ならびに上記サンプルにおいて、融合タンパク質を発現する上記非天然のT細胞を、融合タンパク質を発現しない他の細胞からソートする工程を包含する。

20

【0016】

ある種の局面において、本開示は、T細胞を富化もしくは単離するための方法に関し、上記方法は、非天然のT細胞を含むサンプルと、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程であって、ここで上記非天然のT細胞は、本開示に従う融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、上記タグカセットに対して特異的な結合ドメインは、検出可能な部分を含む、工程、ならびに上記サンプルにおいて、融合タンパク質を発現する上記非天然のT細胞を、融合タンパク質を発現しない他の細胞から富化もしくは単離する工程を包含する。

【0017】

さらなる局面において、本開示は、ある種のT細胞を枯渇させるための方法に関し、上記方法は、非天然のT細胞と、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程であって、ここで上記非天然のT細胞は、本開示に従う融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、上記タグカセットに対して特異的な結合ドメインの結合は、融合タンパク質を発現する上記T細胞の細胞死をもたらす工程を包含する。

30

【0018】

本発明のこれらおよび他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照すれば明らかになる。本明細書で開示される全ての参考文献は、各々が個々に援用されるかのように、それらの全体において参考として援用される。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

疎水性部分によって接続された細胞外成分および細胞内成分を含む単鎖融合タンパク質であって、ここで前記細胞外成分は、標的を特異的に結合する結合ドメイン、タグカセット、およびヒンジを含むコネクタ領域を含み、そして前記細胞内成分は、エフェクタードメインを含む、単鎖融合タンパク質。

40

(項目2)

前記結合ドメインは、scFv、scTCR、レセプターエクトドメイン、もしくはリガンドである、項目1に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目3)

前記標的は、CD3、CEACAM6、c-Met、EGFR、EGFRvIII、Erbb2、Erbb3、Erbb4、EphA2、IGF1R、GD2、O-アセチルG

50

D 2、O - アセチル G D 3、G H R H R、G H R、F L T 1、K D R、F L T 4、C D 4 4 v 6、C D 1 5 1、C A 1 2 5、C E A、C T L A - 4、G I T R、B T L A、T G F B R 2、T G F B R 1、I L 6 R、g p 1 3 0、L e w i s A、L e w i s Y、T N F R 1、T N F R 2、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、H V E M、M A G E - A、メソセリン、N Y - E S O - 1、P S M A、R A N K、R O R 1、T N F R S F 4、C D 4 0、C D 1 3 7、T W E A K - R、H L A、H L A に結合される腫瘍もしくは病原体関連ペプチド、H L A に結合される h T E R T ペプチド、H L A に結合されるチロシナーゼペプチド、H L A に結合される W T - 1 ペプチド、L T R、L I F R、L R P 5、M U C 1、O S M R、T C R、T C R、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 2 5、C D 2 8、C D 3 0、C D 3 3、C D 5 2、C D 5 6、C D 8 0、C D 8 1、C D 8 6、C D 1 2 3、C D 1 7 1、C D 2 7 6、B 7 H 4、T L R 7、T L R 9、P T C H 1、W T - 1、R o b o 1、 α -フェトプロテイン (A F P)、F r i z z l e d、O X 4 0、または C D 7 9 b を含む、項目 1 または 2 に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 4)

前記コネクター領域は、リンカーモジュールをさらに含む、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 5)

前記リンカーモジュールは、 $(G l y \times S e r y)_n$ であり、ここで n は、1 ~ 1 0 の整数であり、x および y は、独立して 0 ~ 1 0 の整数であるが、ただし x および y は、両方が 0 ではない、項目 4 に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 6)

前記リンカーモジュールは、C H 2 C H 3 もしくは C H 3 である、項目 4 に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7)

前記コネクター領域は、前記タグカセットのうちの 1 以上を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 8)

前記コネクター領域は、1 ~ 5 個のタグカセットを含む、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 9)

前記コネクター領域は、1 ~ 5 個のタグカセットを含み、ここで各タグカセットは、 $(G l y \times S e r y)_n$ を含む 1 もしくは 2 個のリンカーモジュールに接続され、ここで n は、1 ~ 1 0 の整数であり、x および y は、独立して、0 ~ 1 0 の整数であるが、ただし x および y は、両方が 0 ではない、項目 7 または 8 に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 10)

前記リンカーモジュールは、アミノ酸配列 G l y - G l y - G l y - G l y - S e r (配列番号 10)、 $(G l y - G l y - G l y - G l y - S e r)_2$ (配列番号 11)、 $(G l y - G l y - G l y - S e r)_2 - G l y - G l y - S e r$ (配列番号 12)、もしくはこれらの任意の組み合わせを有する、項目 9 に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 11)

前記結合ドメインは、1 個以上のタグカセットを含む、項目 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 12)

前記タグカセットは、前記結合ドメインに対してアミノ末端側に、前記結合ドメインに対してカルボキシ末端側に、もしくは両方に位置する、項目 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 13)

前記結合ドメインは、可変領域リンカーを含む、s c F v もしくは s c T C R であり、ここで前記可変領域リンカーは、1 個以上のタグカセットを含む、項目 1 1 に記載の単鎖融合タンパク質。

10

20

30

40

50

(項目14)

前記タグカセットは、Streptタグ、Hisタグ、Flagタグ、Xpressタグ、Aviタグ、カルモジュリンタグ、ポリグルタメートタグ、HAタグ、Mycタグ、Nusタグ、Sタグ、Xタグ、SBPタグ、Softタグ、V5タグ、CBP、GST、MBP、GFP、チオレドキシントグ、もしくはこれらの任意の組み合わせであるかまたはこれらを含む、項目1～13のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目15)

前記タグカセットは、アミノ酸配列 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号1) もしくは Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (配列番号2) を有する Streptタグであるかまたはこれを含む、項目14に記載の単鎖融合タンパク質。

10

(項目16)

前記コネクタ領域は、1個以上のタグカセットに隣接するリンカーモジュールをさらに含み、ここで前記リンカーモジュールおよび隣接するタグカセットはまとめて、アミノ酸配列

【化2】

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(配列番号 20), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (配列番号

21), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-

20

Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号 22), Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-

Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (配列番号 23), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-

Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号 24) または

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-

Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-

Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (配列番号 25)

30

を有する、項目1～15のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目17)

前記疎水性部分は、膜貫通ドメインである、項目1～16のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目18)

前記膜貫通ドメインは、CD4、CD8、CD28もしくはCD27膜貫通ドメインである、項目17に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目19)

前記エフェクタードメインもしくはそのエフェクター部分は、4-1BB (CD137)、CD3、CD3、CD3、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、OX40 (CD134)、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2、もしくはこれらの任意の組み合わせである、項目1～18のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

40

(項目20)

前記エフェクタードメインもしくはそのエフェクター部分は、CD3ならびに4-1BB (CD137)、CD27、CD28およびOX40 (CD134)のうち1以上を含む、項目1～19のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

50

(項目 2 1)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外結合ドメイン、タグカセット、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 2 2)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外結合ドメイン、第 1 のコネクター領域、タグカセット、ヒンジを含む第 2 のコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 2 3)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外結合ドメイン、第 1 のタグカセット、第 1 のコネクター領域、第 2 のタグカセット、ヒンジを含む第 2 のコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

10

(項目 2 4)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外結合ドメイン、第 1 のタグカセット、第 1 のコネクター領域、第 2 のタグカセット、第 2 のコネクター領域、第 3 のタグカセット、ヒンジを含む第 3 のコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

20

(項目 2 5)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：タグカセット、細胞外結合ドメイン、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 2 6)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外結合ドメイン、2 ~ 5 個のタグカセット、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 2 7)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：前記可変領域の間に配置されかつタグカセットを含む可変領域リンカーを含む細胞外 s c F v もしくは s c T C R 結合ドメイン、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

30

(項目 2 8)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外 s c F v もしくは s c T C R 結合ドメイン、タグカセット、I g G ヒンジを含むコネクター領域、膜貫通ドメイン、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含み、ここで前記エフェクタードメインは、4 - 1 B B および C D 3 、 C D 2 7 および C D 3 、 C D 2 8 および C D 3 、 O X 4 0 および C D 3 、 C D 2 8 、 4 - 1 B B および C D 3 、 O X 4 0 、 4 - 1 B B および C D 3 、または C D 2 8 、 O X 4 0 および C D 3 を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

40

(項目 2 9)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：レセプターエクトドメインを含む細胞外結合ドメイン、タグカセット、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含み、ここで前記エフェクタードメインは、4 - 1 B B 、 C D 2 7 、 C D 2 8 、もしくは O X 4 0 を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 3 0)

抗原に対して特異的に結合する細胞外結合ドメインとエフェクタードメインを含む細胞

50

内成分との間に配置されかつこれらを接続する 1 個以上の細胞外タグカセットを有する融合タンパク質を含む、キメラ抗原レセプター分子。

(項目 3 1)

前記 1 個以上のタグカセットは、1 個のタグカセットを含む、項目 3 0 に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目 3 2)

前記 1 個以上のタグカセットは、2 ~ 5 個のタグカセットを含む、項目 3 0 に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目 3 3)

前記キメラ抗原レセプター分子は、 $(Gly_x Ser_y)_n$ を含む 1 個以上のリンカーモジュールをさらに含み、ここで n は、1 ~ 10 の整数であり、 x および y は、独立して 0 ~ 10 の整数であるが、ただし x および y は、両方が 0 ではない、項目 3 0 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

10

(項目 3 4)

前記融合タンパク質は、前記結合ドメインと前記 1 個以上のタグカセットとの間に配置された $(Gly_x Ser)_n$ リンカーモジュールをさらに含み、ここで x は、2 ~ 4 の整数であり、 n は、1 ~ 3 の整数である、項目 3 0 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目 3 5)

前記融合タンパク質は、前記 1 個以上のタグカセットとエフェクタードメインを含む前記細胞内成分との間に配置された細胞外 $(Gly_x Ser)_n$ リンカーモジュールをさらに含み、ここで x は、2 ~ 4 の整数であり、 n は、1 ~ 3 の整数である、項目 3 0 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

20

(項目 3 6)

前記融合タンパク質は、2 個の細胞外 $(Gly_x Ser)_n$ リンカーモジュールをさらに含み、ここで x は、2 ~ 4 の整数であり、 n は、1 ~ 3 の整数であり、第 1 の前記リンカーモジュールは、前記 1 個以上のタグカセットのうちの少なくとも 1 個に対してアミノ末端側にあり、第 2 の前記リンカーモジュールは、前記 1 個以上のタグカセットのうちの少なくとも 1 個に対してカルボキシ末端側にある、項目 3 0 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

30

(項目 3 7)

前記 1 個以上のタグカセットは、2 個のタグカセットを含み、前記分子は、2 個の細胞外 $(Gly_x Ser)_n$ リンカーモジュールをさらに含み、ここで x は、2 ~ 4 の整数であり、 n は、1 ~ 3 の整数であり、ここで第 1 のタグカセットは、前記結合ドメインと第 1 の前記リンカーモジュールとの間に配置され、第 2 のタグカセットは、第 1 の前記リンカーモジュールと第 2 の前記リンカーモジュールとの間に配置され、第 2 の前記リンカーモジュールは、前記第 2 のタグカセットと前記エフェクタードメインとの間に配置される、項目 3 0 に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目 3 8)

前記融合タンパク質は、第 3 のタグカセットおよび第 3 の細胞外 $(Gly_x Ser)_n$ リンカーモジュールをさらに含み、ここで前記第 3 のタグカセットは、第 2 の前記リンカーモジュールと第 3 の前記リンカーモジュールとの間に配置され、第 3 の前記リンカーモジュールは、前記第 3 のタグカセットと前記エフェクタードメインとの間に配置される、項目 3 7 に記載のキメラ抗原レセプター分子。

40

(項目 3 9)

前記融合タンパク質は、細胞外ヒンジおよび細胞外 CH_2CH_3 リンカーモジュールをさらに含み、ここで前記ヒンジは、前記結合ドメインに隣接し、前記 CH_2CH_3 リンカーモジュールは、エフェクタードメインを含む前記細胞内成分に隣接し、前記 1 個以上のタグカセットのうちの少なくとも 1 個は、前記ヒンジと前記 CH_2CH_3 リンカーモジュールとの間に配置される、項目 3 0 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載のキメラ抗原レセプター

50

分子。

(項目40)

前記融合タンパク質は、細胞外ヒンジおよび細胞外CH3リンカーモジュールをさらに含み、ここで前記ヒンジは、前記結合ドメインに隣接し、前記CH3リンカーモジュールは、エフェクタードメインを含む前記細胞内成分に隣接し、前記1個以上のタグカセットのうち少なくとも1個および/もしくは各々は、前記ヒンジと前記CH3リンカーモジュールとの間に配置される、項目30~38のいずれか1項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目41)

前記1個以上のタグカセットのうち少なくとも1個は、Strepタグ、Hisタグ、Flag(登録商標)タグ、Xpress(登録商標)タグ、Aviタグ、カルモジュリンタグ、ポリグルタメートタグ、HAタグ、Mycタグ、Nusタグ、Sタグ、Xタグ、SBPタグ、Softag、V5タグ、CBP、GST、MBP、GFP、チオレドキシントグ、もしくはこれらの任意の組み合わせであるかまたはこれらを含む、項目30~40のいずれか1項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

10

(項目42)

前記1個以上のタグカセットのうち少なくとも1個は、アミノ酸配列 Trp - Ser - His - Pro - Gln - Phe - Glu - Lys(配列番号1)もしくは Trp - Arg - His - Pro - Gln - Phe - Gly - Gly(配列番号2)を有する Strepタグであるかまたはこれを含む、項目41に記載のキメラ抗原レセプター分子。

20

(項目43)

前記結合ドメインは、scFv、scTCR、レセプターエクトドメイン、もしくはリガンドである、項目30~40のいずれか1項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目44)

前記抗原は、CD3、CEACAM6、c-Met、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、IGF1R、GD2、O-アセチルGD2、O-アセチルGD3、GHRHR、GHR、FLT1、KDR、FLT4、CD44v6、CD151、CA125、CEA、CTLA-4、GITR、BTLA、TGFBR2、TGFBR1、IL6R、gp130、Lewis A、Lewis Y、TNFR1、TNFR2、PD1、PD-L1、PD-L2、HVEM、MAGE-A、メソセリン、NY-ESO-1、PSMA、RANK、ROR1、TNFRSF4、CD40、CD137、TWEAK-R、HLA、HLAに結合される腫瘍もしくは病原体関連ペプチド、HLAに結合されるhTERTペプチド、HLAに結合されるチロシナーゼペプチド、HLAに結合されるWT-1ペプチド、LTR、LIFR、LRP5、MUC1、OSMR、TCR、TCR、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CD81、CD86、CD123、CD171、CD276、B7H4、TLR7、TLR9、PTCH1、WT-1、Robo1、 α -フェトプロテイン(AFP)、Frizzled、OX40、もしくはCD79bであるかまたはこれを含む、項目30~43のいずれか1項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

30

40

(項目45)

前記エフェクタードメインは、4-1BB、CD3、CD3、CD3、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、NKG2D、OX40、SLAMF1、Slp76、pT、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2、もしくはこれらの任意の組み合わせである、項目30~44のいずれか1項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目46)

前記エフェクタードメインは、CD3ならびに4-1BB、CD27、CD28、およびOX40のうち1種以上を含む、項目30~45のいずれか1項に記載のキメラ抗

50

原レセプター分子。

(項目47)

前記エフェクタードメインは、4-1BBおよびCD3、CD27およびCD3、CD28およびCD3、またはCD28、4-1BBおよびCD3を含む、項目30~45のいずれか1項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目48)

前記結合ドメインは、レセプターエクトドメインを含み、前記エフェクタードメインは、4-1BB、CD27、CD28、もしくはOX40を含む、項目30~45のいずれか1項に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目49)

前記タグカセットは、前記レセプターエクトドメインに対してカルボキシ末端側に位置する、項目48に記載のキメラ抗原レセプター分子。

(項目50)

細胞外成分と細胞内成分との間に配置された疎水性部分を含む単鎖融合タンパク質であって、ここで前記細胞外成分は、タグカセットとヒンジを含むコネクター領域とを含み、前記細胞内成分は、エフェクタードメインを含む、単鎖融合タンパク質。

(項目51)

前記コネクター領域は、リンカーモジュールをさらに含む、項目50に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目52)

前記リンカーモジュールは、 $(Gly_x Ser)_n$ であり、ここでxは、1~5の整数であり、nは、1~10の整数である、項目51に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目53)

前記リンカーモジュールは、 CH_2CH_3 もしくは CH_3 である、項目51に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目54)

1個以上のタグカセットは、前記コネクター領域に対してアミノ末端側にある、項目50~53のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目55)

前記融合タンパク質は、1~5個のタグカセットを含む、項目50~54のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目56)

各タグカセットは、 $(Gly_x Ser_y)_n$ を含む1もしくは2個のリンカーモジュールに接続され、ここでnは、1~10の整数であり、xおよびyは、独立して0~10の整数であるが、ただしxおよびyは、両方が0ではない、項目55に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目57)

前記リンカーモジュールは、アミノ酸配列 $Gly-Gly-Gly-Gly-Ser$ (配列番号10)、 $(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_2$ (配列番号11)、 $(Gly-Gly-Gly-Ser)_2-Gly-Gly-Ser$ (配列番号12)、もしくはこれらの任意の組み合わせを有する、項目56に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目58)

1個以上のタグカセットは、リンカーモジュールによって前記コネクター領域に連結される、項目50~57のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目59)

前記リンカーモジュールは、 $(Gly_x Ser)_n$ であるかまたはこれを含み、ここでxは、1~5の整数であり、nは、1~10の整数である、項目58に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目60)

前記リンカーモジュールは、 $(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_2$ (配列番

10

20

30

40

50

号 1 1) であるかまたはこれを含む、項目 5 8 に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 6 1)

1 個以上のタグカセットは、S t r e p タグ、H i s タグ、F l a g (登録商標) タグ、X p r e s s (登録商標) タグ、A v i タグ、カルモジュリンタグ、ポリグルタメートタグ、H A タグ、M y c タグ、N u s タグ、S タグ、X タグ、S B P タグ、S o f t a g、V 5 タグ、C B P、G S T、M B P、G F P、チオレドキシントグ、もしくはこれらの任意の組み合わせであるかまたはこれらを含む、項目 5 0 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 6 2)

1 個以上のタグカセットは、アミノ酸配列 T r p - S e r - H i s - P r o - G l n - P h e - G l u - L y s (配列番号 1) もしくは T r p - A r g - H i s - P r o - G l n - P h e - G l y - G l y (配列番号 2) を有する S t r e p タグであるかまたはこれを含む、項目 6 1 に記載の単鎖融合タンパク質。

10

(項目 6 3)

前記融合タンパク質は、1 個以上のタグカセットに隣接するリンカーモジュールをさらに含み、ここで前記リンカーモジュールおよび隣接する前記タグカセットは、アミノ酸配列

【化 3】

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号

20

20), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (配列番号 21),

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号 22), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (配列番号 23), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号 24) または Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (配列番号 25)

30

を有する、項目 5 0 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 6 4)

前記疎水性部分は、膜貫通ドメインである、項目 5 0 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 6 5)

前記膜貫通ドメインは、C D 4、C D 8、C D 2 8 もしくは C D 2 7 膜貫通ドメインである、項目 6 4 に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 6 6)

前記エフェクタードメインは、C D 3、C D 3、C D 3、C D 2 7、C D 2 8、C D 7 9 A、C D 7 9 B、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C A R D 1 1、D A P 1 0、F c R、F c R、F c R、F y n、H V E M、I C O S、L c k、L A G 3、L A T、L R P、N K G 2 D、N O T C H 1、N O T C H 2、N O T C H 3、N O T C H 4、R O R 2、R y k、S L A M F 1、S l p 7 6、p T、T C R、T C R、T R I M、Z a p 7 0、P T C H 2、もしくはこれらの任意の組み合わせである、項目 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

40

(項目 6 7)

前記エフェクタードメインは、C D 3 ならびに 4 - 1 B B (C D 1 3 7)、C D 2 7、C D 2 8、および O X 4 0 (C D 1 3 4) のうちの 1 種以上を含む、項目 5 0 ~ 6 6 の

50

いずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 6 8)

前記エフェクタードメインは、LRP、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、もしくはRykを含む、項目50～66のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 6 9)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：タグカセット、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目50～68のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 0)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：第1のコネクター領域、タグカセット、ヒンジを含む第2のコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目50～68のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 1)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：第1のタグカセット、第1のコネクター領域、第2のタグカセット、ヒンジを含む第2のコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目50～68のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 2)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：第1のタグカセット、第1のコネクター領域、第2のタグカセット、第2のコネクター領域、第3のタグカセット、ヒンジを含む第3のコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目50～68のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 3)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：2～5個のタグカセット、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目50～68のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 4)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：タグカセット、IgGヒンジを含むコネクター領域、膜貫通ドメイン、ならびに4-1BBおよびCD3、CD27およびCD3、CD28およびCD3、またはCD28、4-1BBおよびCD3を含むエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目50～68のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 5)

前記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：タグカセット、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびLRP、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、もしくはRykを含むエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む、項目50～68のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 6)

前記融合タンパク質は、非共有結合的に会合した結合ドメインをさらに含む、項目50～75のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 7)

前記非共有結合的に会合した結合ドメインは、タグカセットと会合する、項目76に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 8)

前記非共有結合的に会合した結合ドメインは、scFv、scTCR、レセプターエクストドメイン、もしくはリガンドである、項目76または77に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 7 9)

10

20

30

40

50

前記非共有結合的に会合した結合ドメインは、二重特異的であり、ここでその第1の結合末端は、前記タグカセットに対して特異的であり、その第2の結合末端は、前記タグカセット以外の標的に対して特異的である、項目76~78のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目80)

前記非共有結合的に会合した結合ドメインは、CD3、CEACAM6、c-Met、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、IGF1R、GD2、O-アセチルGD2、O-アセチルGD3、GHRHR、GHR、FLT1、KDR、FLT4、CD44v6、CD151、CA125、CEA、CTLA-4、GITR、BTLA、TGFBR2、TGFBR1、IL6R、gp130、Lewis A、Lewis Y、TNFR1、TNFR2、PD1、PD-L1、PD-L2、HVEM、MAGE-A、メソセリン、NY-ESO-1、PSMA、RANK、ROR1、TNFRSF4、CD40、CD137、TWEAK-R、HLA、HLAに結合される腫瘍もしくは病原体関連ペプチド、HLAに結合されるhTERTペプチド、HLAに結合されるチロシナーゼペプチド、HLAに結合されるWT-1ペプチド、LTR、LIFR、LRP5、MUC1、OSMR、TCR、TCR、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CD81、CD86、CD123、CD171、CD276、B7H4、TLR7、TLR9、PTCH1、WT-1、Robo1、 α -フェトプロテイン(AFP)、Frizzled、OX40、もしくはCD79bに対して特異的である、項目79に記載の単鎖融合タンパク質。

10

20

(項目81)

前記結合ドメインは、二重特異的であり、ここでその第1の結合末端および第2の結合末端は、前記タグカセットに対して特異的である、項目76~78のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目82)

前記結合ドメインは、多重特異的であり、ここで第1の末端は、前記タグカセットに結合し、第2の末端は、前記タグカセット以外の1個以上の標的に対して特異的である、項目76~78のいずれか1項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目83)

少なくとも1個の結合ドメインは、CD3、CEACAM6、c-Met、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、IGF1R、GD2、O-アセチルGD2、O-アセチルGD3、GHRHR、GHR、FLT1、KDR、FLT4、CD44v6、CD151、CA125、CEA、CTLA-4、GITR、BTLA、TGFBR2、TGFBR1、IL6R、gp130、Lewis A、Lewis Y、TNFR1、TNFR2、PD1、PD-L1、PD-L2、HVEM、MAGE-A、メソセリン、NY-ESO-1、PSMA、RANK、ROR1、TNFRSF4、CD40、CD137、TWEAK-R、HLA、HLAに結合される腫瘍もしくは病原体関連ペプチド、HLAに結合されるhTERTペプチド、HLAに結合されるチロシナーゼペプチド、HLAに結合されるWT-1ペプチド、LTR、LIFR、LRP5、MUC1、OSMR、TCR、TCR、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CD81、CD86、CD123、CD171、CD276、B7H4、TLR7、TLR9、PTCH1、WT-1、Robo1、 α -フェトプロテイン(AFP)、Frizzled、OX40、もしくはCD79bに対して特異的である、項目82に記載の単鎖融合タンパク質。

30

40

(項目84)

前記結合ドメインは、抗体である、項目76に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目85)

前記タグカセットは、アミノ酸配列 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Ph

50

e - G l u - L y s (配列番号 1) もしくは T r p - A r g - H i s - P r o - G l n - P h e - G l y - G l y (配列番号 2) を有する S t r e p タグであり、前記会合した結合ドメインは、ビオチン結合タンパク質である、項目 7 6 に記載の単鎖融合タンパク質。
(項目 8 6)

前記結合ドメインは、細胞傷害性薬剤、放射性同位体、放射性金属、もしくは検出可能な因子をさらに含む、項目 7 6 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の単鎖融合タンパク質。

(項目 8 7)

前記融合タンパク質は、細胞傷害性薬剤、放射性同位体、放射性金属、もしくは検出可能な因子をさらに含む、項目 1 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

(項目 8 8)

項目 1 ~ 8 5 または 5 0 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質あるいは項目 3 0 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載のキメラ抗原レセプターをコードする核酸分子。

(項目 8 9)

項目 8 8 に記載の核酸分子を含むベクター。

(項目 9 0)

前記ベクターは、ウイルスベクターである、項目 8 9 に記載のベクター。

(項目 9 1)

前記ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターである、項目 9 0 に記載のベクター。

(項目 9 2)

項目 1 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質もしくはキメラ抗原レセプターをコードする核酸分子を含む宿主細胞。

(項目 9 3)

前記宿主細胞は、T細胞である、項目 9 2 に記載の宿主細胞。

(項目 9 4)

細胞を活性化するための方法であって、前記方法は、項目 1 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質もしくはキメラ抗原レセプターおよび/または項目 8 8 に記載の核酸分子を含む細胞と、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程を包含する、方法。

(項目 9 5)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、固体表面に結合され、そして/または前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、同系レセプター、抗タグ抗体、および/もしくは抗タグ s c F v である、項目 9 4 に記載の方法。

(項目 9 6)

前記タグカセットは、アミノ酸配列 T r p - S e r - H i s - P r o - G l n - P h e - G l u - L y s (配列番号 1) もしくは T r p - A r g - H i s - P r o - G l n - P h e - G l y - G l y (配列番号 2) を有する S t r e p タグである、項目 9 4 または 9 5 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、ビオチン結合タンパク質もしくは抗 S t r e p タグ抗体である、項目 9 4 ~ 9 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9 8)

前記結合ドメインは、平らな表面、アガロース、樹脂、3Dファブリックマトリクス、もしくはビーズに結合される、項目 9 4 ~ 9 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9 9)

前記結合ドメインは、マイクロビーズもしくはナノビーズに結合される、項目 9 4 ~ 9 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 0 0)

前記活性化は、インピボもしくはエキソピボで行われる、項目 9 4 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目101)

前記細胞は、T細胞であり、そして/またはヒトT細胞である、項目94~100のいずれか1項に記載の方法。

(項目102)

細胞増殖を促進するための方法であって、前記方法は、項目1~85のいずれか1項に記載の融合タンパク質もしくはキメラ抗原レセプターおよび/または項目88に記載の核酸分子を含む非天然の細胞と、タグカセットに対して特異的な結合ドメインおよび増殖因子サイトカインとを、細胞増殖を可能にするために十分な時間にわたって接触させる工程を包含する、方法。

(項目103)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、固体表面に結合され、そして/または前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、同系レセプター、抗タグ抗体、もしくは抗タグs c F vである、項目102に記載の方法。

(項目104)

前記タグカセットは、アミノ酸配列 Trp - Ser - His - Pro - Gln - Phe - Glu - Lys (配列番号1)もしくはTrp - Arg - His - Pro - Gln - Phe - Gly - Gly (配列番号2)を有するStreptタグである、項目102または103に記載の方法。

(項目105)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、ビオチン結合タンパク質もしくは抗Strept抗体である、項目102~104のいずれか1項に記載の方法。

(項目106)

前記結合ドメインは、平らな表面、アガロース、樹脂、3Dファブリックマトリクス、もしくはビーズに結合される、項目102~105のいずれか1項に記載の方法。

(項目107)

前記結合ドメインは、マイクロビーズもしくはナノビーズに結合される、項目102~106のいずれか1項に記載の方法。

(項目108)

前記増殖因子サイトカインは、IL2、IL15、もしくは両方である、項目102~107のいずれか1項に記載の方法。

(項目109)

前記方法は、前記細胞を、抗CD27結合ドメイン、抗CD28結合ドメイン、抗CD137結合ドメイン、抗OX40結合ドメインもしくはこれらの任意の組み合わせとともにインキュベートする工程をさらに包含し、ここで前記結合ドメインは、固体表面に結合されている、項目102~108のいずれか1項に記載の方法。

(項目110)

前記抗CD27結合ドメイン、前記抗CD28結合ドメイン、前記抗CD137結合ドメイン、前記抗OX40結合ドメインもしくはこれらの任意の組み合わせは、平らな表面、アガロース、樹脂、3Dファブリックマトリクス、もしくはビーズに結合されている、項目109に記載の方法。

(項目111)

前記増殖は、インビボもしくはエキソビボで誘発される、項目102~110のいずれか1項に記載の方法。

(項目112)

前記細胞は、T細胞であり、そして/または前記細胞は、ヒトT細胞である、項目102~111のいずれか1項に記載の方法。

(項目113)

前記T細胞は、機能的T細胞である、項目112に記載の方法。

(項目114)

前記機能的T細胞は、ウイルス特異的T細胞、腫瘍抗原特異的細胞傷害性T細胞、メモ

10

20

30

40

50

リーシステム T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、もしくは CD 4 + CD 2 5 + 調節性 T 細胞である、項目 1 1 3 に記載の方法。

(項目 1 1 5)

前記増殖は、項目 1 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質もしくはキメラ抗原レセプターの結合ドメインが標的細胞リガンドを結合する場合にインビボで誘発される、項目 1 0 2 ~ 1 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 1 6)

前記標的細胞リガンドは、T 細胞サプレッサー細胞リガンドである、項目 1 1 5 に記載の方法。

(項目 1 1 7)

前記 T 細胞サプレッサー細胞リガンドは、PD - L 1 もしくは PD - L 2 である、項目 1 1 6 に記載の方法。

(項目 1 1 8)

細胞を同定するための方法であって、前記方法は、

項目 1 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質もしくはキメラ抗原レセプターおよび / または項目 8 8 に記載の核酸分子を含む細胞を含むサンプルと、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程であって、ここで前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、検出可能な部分を含む、工程、ならびに

前記サンプル中の細胞の存在を検出する工程、
を包含する、方法。

(項目 1 1 9)

細胞もしくは細胞集団をソートもしくは選択するための方法であって、前記方法は、

項目 1 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質もしくはキメラ抗原レセプターおよび / または項目 8 8 に記載の核酸分子を含む T 細胞を含むサンプルと、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程、ならびに

前記結合ドメインによって特異的に結合される細胞を、他の細胞から選択もしくはソートし、それによって、前記細胞もしくは前記細胞集団を他の細胞から選択もしくはソートする工程、

を包含する、方法。

(項目 1 2 0)

前記結合ドメインは、検出可能な部分を含み、前記部分は、蛍光マーカである、項目 1 1 8 または 1 1 9 に記載の方法。

(項目 1 2 1)

前記結合ドメインは、検出可能な部分を含み、前記部分は、APC もしくは FITC である、項目 1 1 8 ~ 1 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 2 2)

前記サンプルは血液である、項目 1 1 8 ~ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 2 3)

前記細胞は、フローサイトメトリーを使用して検出もしくはソートされる、項目 1 1 8 ~ 1 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 2 4)

前記細胞は、非天然の細胞であるか、T 細胞であるか、そして / またはヒト T 細胞である、項目 1 1 8 ~ 1 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 2 5)

細胞もしくはその集団を富化するもしくは単離するための方法であって、前記方法は

、
項目 8 8 に記載の核酸分子および / または項目 1 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質もしくはレセプターを含む前記細胞を含むサンプルと、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程、ならびに

前記サンプルにおいて、前記細胞を、前記融合タンパク質もしくは前記レセプターを発

10

20

30

40

50

現しない他の細胞から富化もしくは単離する工程、
を包含する、方法。

(項目126)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、同系レセプター、抗タグ抗体、
もしくは抗タグ s c F v である、項目125に記載の方法。

(項目127)

前記タグカセットは、アミノ酸配列 Trp - Ser - His - Pro - Gln - Phe - Glu - Lys (配列番号1) もしくは Trp - Arg - His - Pro - Gln - Phe - Gly - Gly (配列番号2) を有する Streptタグである、項目125または
126に記載の方法。

(項目128)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、ビオチン結合タンパク質もし
しくは抗 Strept抗体である、項目125 ~ 127のいずれか1項に記載の方法。

(項目129)

前記結合ドメインは、平らな表面、アガロース、樹脂、3Dファブリックマトリクス、
もしくはビーズに結合される、項目125 ~ 128のいずれか1項に記載の方法。

(項目130)

前記結合ドメインは、マイクロビーズもしくはナノビーズに結合される、項目125 ~
129のいずれか1項に記載の方法。

(項目131)

活性化は、エキソピボで行われる、項目125 ~ 130のいずれか1項に記載の方法。

(項目132)

富化もしくは単離の前に、項目102 ~ 117のいずれか1項に記載のサンプルにおい
て前記細胞集団を増殖させる工程をさらに包含する、項目125 ~ 131のいずれか1項
に記載の方法。

(項目133)

前記細胞は、非天然の細胞であり、T細胞であり、そして/またはヒトT細胞である、
項目125 ~ 132のいずれか1項に記載の方法。

(項目134)

前記細胞は、前記サンプルの他の成分から、磁性カラムクロマトグラフィーによって富
化もしくは単離される、項目125 ~ 132のいずれか1項に記載の方法。

(項目135)

富化もしくは単離された前記細胞もしくは前記細胞集団を同定する工程をさらに包含し
、ここで前記同定する工程は、前記細胞と、前記タグカセットに対して特異的であり、か
つ検出可能な部分を有する結合ドメインとを接触させることを包含する、項目125 ~ 1
34のいずれか1項に記載の方法。

(項目136)

前記検出可能な部分は、蛍光マーカである、項目135に記載の方法。

(項目137)

前記検出可能な部分は、APC、PE、パシフィックブルー、Alex fluor、
もしくはFITCである、項目135または136に記載の方法。

(項目138)

細胞もしくは集団は、フローサイトメトリーを使用して検出される、項目135 ~ 13
7のいずれか1項に記載の方法。

(項目139)

前記サンプルは、血液もしくは血液由来サンプルである、項目125 ~ 138のいずれ
か1項に記載の方法。

(項目140)

細胞を枯渇させるための方法であって、前記方法は、

項目88に記載の核酸分子または項目1 ~ 85のいずれか1項に記載のタンパク質もし

10

20

30

40

50

くはレセプターを含む細胞と、タグカセットに対して特異的な結合ドメインとを接触させる工程であって、ここで前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインの結合は、前記融合タンパク質もしくは前記キメラレセプターを発現する前記細胞の細胞死をもたらす、工程、

を包含する、方法。

(項目141)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、同系レセプター、抗タグ抗体、抗タグs c F v、または抗タグ結合ドメインをその細胞表面に有する細胞である、項目140に記載の方法。

(項目142)

前記タグカセットは、アミノ酸配列 Trp - Ser - His - Pro - Gln - Phe - Glu - Lys (配列番号1)もしくはTrp - Arg - His - Pro - Gln - Phe - Gly - Gly (配列番号2)を有するStreptタグである、項目140または141に記載の方法。

(項目143)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、ビオチン結合タンパク質、抗Streptタグ抗体、または抗Streptタグ結合ドメインをその細胞表面に発現する細胞である、項目140～142のいずれか1項に記載の方法。

(項目144)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、二重特異的結合ドメインであり、ここで第1の結合ドメインは、前記タグカセットに対して特異的であり、その第2の結合ドメインは、CD3に対して特異的である。項目140～143のいずれか1項に記載の方法。

(項目145)

前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、細胞傷害性薬剤、放射性同位体、放射性金属、もしくは検出可能な因子をさらに含む、項目140～143のいずれか1項に記載の方法。

(項目146)

非天然のT細胞をインビボで追跡する工程をさらに包含し、ここで前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、検出可能な因子を含む、項目145に記載の方法。

(項目147)

タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、被験体に投与される、項目140～146のいずれか1項に記載の方法。

(項目148)

前記被験体はヒトである、項目147に記載の方法。

(項目149)

前記方法は、前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインを投与した後に、前記被験体におけるサイトカインレベルをモニターする工程をさらに包含する、項目147または148に記載の方法。

(項目150)

前記方法は、前記被験体において前記細胞を追跡する工程をさらに包含する、項目147～149のいずれか1項に記載の方法。

(項目151)

前記インビボで追跡する工程は、磁性粒子、超常磁性酸化鉄(SPIO)、フルオロデオキシグルコース(18F)、蛍光化合物、またはこれらの任意の組み合わせに結合体化した前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインの使用を含む、項目150に記載の方法。

(項目152)

前記インビボで追跡する工程は、MRI、PET、もしくは近赤外線画像化の使用を含む、項目150または151に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目153)

望ましい細胞集団を生成するための方法であって、前記方法は、非天然の前駆細胞を含むサンプルと、タグカセットに対して特異的な結合ドメインおよび増殖因子とを、細胞増殖および分化を可能にするために十分な時間にわたって接触させる工程であって、ここで前記非天然の前駆細胞は、項目50～85のいずれか1項に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、前記タグカセットに対して特異的な前記結合ドメインは、固体表面に結合される、工程を包含する、方法。

(項目154)

前記前駆細胞は、幹細胞である、項目153に記載の方法。

(項目155)

増殖させた前記前駆細胞集団は、項目125～139のいずれか1項に記載の方法を使用してさらに単離もしくは富化される、項目153に記載の方法。

(項目156)

被験体における疾患を処置する方法であって、前記方法は、項目92または93に記載の宿主細胞を被験体に投与する工程を包含する、方法。

(項目157)

前記疾患は、ウイルス疾患、細菌疾患、癌、炎症性疾患、免疫疾患、もしくは加齢関連疾患である、項目156に記載の方法。

(項目158)

前記被験体はヒトである、項目156または157に記載の方法。

(項目159)

前記宿主細胞は、T細胞もしくは自己由来T細胞である、項目156～158のいずれか1項に記載の方法。

(項目160)

前記T細胞は、調節性T細胞である、項目159に記載の方法。

(項目161)

前記T細胞は、CD8⁺T細胞もしくはCD4⁺T細胞である、項目159に記載の方法。

(項目162)

前記宿主細胞は、幹細胞である、項目156～158のいずれか1項に記載の方法。

(項目163)

免疫細胞の局所活性化のためのインビボでの方法であって、前記方法は、被験体に、タグカセットに対する結合ドメインおよび共刺激分子に対する結合ドメインを含むマトリクス組成物を投与する工程、ならびに項目92に記載の宿主細胞を投与する工程を包含し、ここで前記マトリクス組成物中の前記結合ドメインと、前記宿主細胞との会合は、前記宿主細胞を活性化する、方法。

(項目164)

局所活性化のためのインビボでの方法であって、ここでマトリクス組成物は、アルギネート、基底膜マトリクス、もしくはバイオポリマーを含む、方法。

(項目165)

局所活性化のためのインビボでの方法であって、ここで免疫細胞はT細胞である、方法。

(項目166)

免疫細胞の局所活性化のためのインビボでの方法であって、前記方法は、被験体に、タグカセットに対する結合ドメインおよび共刺激分子に対する結合ドメインを含むデバイスを投与する工程、ならびに項目92に記載の宿主細胞を投与する工程を包含し、ここでマトリクス組成物中の前記結合ドメインと、前記宿主細胞との会合は、前記宿主細胞を活性化する、方法。

(項目167)

局所活性化のためのインビボでの方法であって、ここでデバイスは、平らな表面、アガ

10

20

30

40

50

ロースビーズ、樹脂、3Dファブリックマトリクス、もしくはビーズを含む、方法。

(項目168)

局所活性化のためのインビボでの方法であって、ここで免疫細胞は、T細胞である、方法。

(項目169)

細胞を追跡する方法であって、前記方法は、被験体に、検出可能な部分を含む結合分子を投与する工程であって、ここで前記被験体は、項目92もしくは93に記載の細胞を投与されたか、または前記方法は、項目92もしくは93に記載の細胞の投与をさらに包含し、前記結合分子は、融合タンパク質もしくはキメラレセプター内に含まれるタグカセットに特異的に結合する、工程、ならびに前記投与の後に、前記被験体においてインビボで、または前記被験体から得られたサンプル中で、前記分子の存在を検出し、それによって前記被験体またはその組織もしくは体液中で前記細胞を検出する工程を包含する、方法。

(項目170)

前記方法は、前記細胞の前記投与をさらに含み、ここで前記細胞および前記結合分子は、同時に投与される、項目169に記載の方法。

(項目171)

前記結合分子および前記細胞は、複合体として投与される、項目170に記載の方法。

(項目172)

前記結合分子は、磁性粒子、超常磁性酸化鉄(SPIO)、フルオロデオキシグルコース(18F)、蛍光化合物、もしくはこれらの任意の組み合わせに結合体化される、項目150に記載の方法。

(項目173)

前記追跡する工程は、インビボで実行され、MRI、PET、もしくは近赤外線画像化の使用を含む、項目150または151に記載の方法。

(項目174)

タグカセットに対する結合ドメインおよび免疫細胞共刺激分子に対する結合ドメインを含む、マトリクス組成物。

(項目175)

アルギネート、基底膜マトリクス、もしくはバイオポリマーをさらに含む、項目174に記載のマトリクス組成物。

(項目176)

タグカセットに対する結合ドメインおよび免疫細胞共刺激分子に対する結合ドメインを含む、デバイス。

(項目177)

前記結合ドメインのうち的一方もしくは両方は、表面、アガロースビーズ、樹脂、3Dファブリックマトリクス、もしくはビーズに配置される、項目176に記載のデバイス。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1A~1Hは、1個以上のアフィニティータグカセット(A~D、本明細書ではKey-ChEMといわれる)を含み、そして1個以上の特異的結合ドメイン(E~G、本明細書ではT-CHARMといわれる)を必要に応じて含む、種々の単鎖キメラエフェクター分子の実例を示す。上記単鎖ChEMおよびCHARMは、細胞内ドメインを含む。上記タグカセットは、アフィニティータグ(例えば、Streptタグ(登録商標)II(配列番号1)、Mycタグ(配列番号7)、V5タグ(配列番号8)、Flag(登録商標)タグ(配列番号3)、Hisタグ、または非内因性同系(cognate)結合パートナー(例えば、レセプター、タンパク質、抗体)によって認識される他のペプチドもしくは分子のいずれかのタイプであり得る。示されるように、Key-ChEMは、(A, B)1個のタグカセット、(C)2個のタグカセット(Key-ChEM²)、(D)3個のタグカセット(Key-ChEM³)、またはより多くを含み得る。さらに、上記キメラ分子は、複数のエフェクタードメインを有し得(例えば、AおよびC~Gの分子

10

20

30

40

50

は、2個のエフェクタードメインを有する一方で、Bに示される分子は、3個のエフェクタードメインを有する)、上記タグカセットは、Key - ChEMもしくはT - ChARM分子の種々の異なる領域に配置され得る。これら具体例において、T - ChARMは、上記特異的結合ドメインと上記エフェクタードメインとの間に(E)、上記特異的結合ドメインの遠位末端(例えば、アミノ末端)に(F)、上記特異的結合ドメイン内に組み込まれて(G)(例えば、scFvのVH鎖とVL鎖との間の可撓性リンカー内に位置する)配置された1個のタグカセット、および2個の異なるタグ(一方は、結合ドメインのC末端、一方は結合ドメインのN末端)を有する(H)を有する。上記T - ChARMはまた、上記Key - ChEMについて示されるように、2個、3個もしくはより多くのタグカセットを有し得る。これら実例において明らかであるように、タグカセットは、別のKey - ChEMもしくはT - ChARM成分または別のタグへと、リンカーモジュール(例えば、可撓性(Gly_xSer)_nリンカーモジュール)を介して接続され得る。上記リンカーの長さは、特異的結合ドメインと、標的リガンドもしくは抗原との最良の相互作用を達成するように、および上記ChEMもしくはT - ChARMを発現する細胞と、標的細胞との間の最良の相互作用を達成するように、より長くもしくはより短く調整され得る。

10

【図2】図2A~2Dは、CD19もしくはROR1(コントロール)を発現するようにトランスフェクトしたK562白血病細胞、CD19⁺/ROR1⁺Rajiリンパ腫細胞、および膜結合した抗CD3 mAb単鎖抗体(OKT3 scFv)を発現して、全てのエフェクターT細胞を活性化するEBV形質転換B細胞に対する、種々の種の抗CD19 T - ChARMおよび従来の抗CD19 CAR(タグカセットを欠いており、かつ短スペーサー、中間スペーサー、および長スペーサードメインを有する)を発現するヒトエフェクターT細胞の細胞溶解活性を示す。

20

【図3】図3A~3Fは、種々の抗CD19 T - ChARM(A~C)および従来の抗CD19 CAR(D~F)を発現するT細胞を、CD19(AおよびD)もしくはROR1(陰性コントロール; BおよびE)のいずれかを発現するK562細胞とともに、およびPMA/イオノマイシン(陽性コントロール; CおよびF)とともに共培養して24時間後に得られた上清の多重サイトカインアッセイ(Luminesx(登録商標))の結果を示す。

30

【図4】図4Aおよび4Bは、種々の抗CD19 T - ChARM(A)およびCD19 CAR(B)を発現するT細胞をCD19⁺Raji細胞と共培養して24時間後に得られた上清の多重サイトカインアッセイ(Luminesx(登録商標))の結果を示す。

【図5-1】図5は、T細胞増殖アッセイの結果を示し、ここでカルボキシフルオレセイン色素希釈物は、T - ChARM(1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む)もしくは従来のCAR(CD19(長))を発現する抗CD19 CD8⁺T細胞がCD19を発現する腫瘍細胞(青色)に応じて増殖していたが、ROR1を発現する腫瘍細胞(赤色)の存在下では増殖していなかったことを示す。

【図5-2】図5は、T細胞増殖アッセイの結果を示し、ここでカルボキシフルオレセイン色素希釈物は、T - ChARM(1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む)もしくは従来のCAR(CD19(長))を発現する抗CD19 CD8⁺T細胞がCD19を発現する腫瘍細胞(青色)に応じて増殖していたが、ROR1を発現する腫瘍細胞(赤色)の存在下では増殖していなかったことを示す。

40

【図5-3】図5は、T細胞増殖アッセイの結果を示し、ここでカルボキシフルオレセイン色素希釈物は、T - ChARM(1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む)もしくは従来のCAR(CD19(長))を発現する抗CD19 CD8⁺T細胞がCD19を発現する腫瘍細胞(青色)に応じて増殖していたが、ROR1を発現する腫瘍細胞(赤色)の存在下では増殖していなかったことを示す。

【図5-4】図5は、T細胞増殖アッセイの結果を示し、ここでカルボキシフルオレセイン色素希釈物は、T - ChARM(1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む)もし

50

くは従来のCAR (CD19 (長)) を発現する抗CD19 CD8⁺ T細胞がCD19を発現する腫瘍細胞 (青色) に応じて増殖していたが、ROR1を発現する腫瘍細胞 (赤色) の存在下では増殖していなかったことを示す。

【図6A】図6A~6Eは、T-CHARM (1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む) もしくは従来のCAR (短もしくは中間コネクタ領域を含む) のいずれかを発現する抗CD19ヒトT細胞が、NSGマウスにおいて確立されたRaji腫瘍を根絶し得ることを示す。これら実験において、上記Raji細胞は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するようにトランスフェクトされ、腫瘍増殖は、上記マウスへのルシフェリンの注射およびバイオルミネッセンス画像化によって測定される。

【図6B】図6A~6Eは、T-CHARM (1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む) もしくは従来のCAR (短もしくは中間コネクタ領域を含む) のいずれかを発現する抗CD19ヒトT細胞が、NSGマウスにおいて確立されたRaji腫瘍を根絶し得ることを示す。これら実験において、上記Raji細胞は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するようにトランスフェクトされ、腫瘍増殖は、上記マウスへのルシフェリンの注射およびバイオルミネッセンス画像化によって測定される。

【図6C】図6A~6Eは、T-CHARM (1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む) もしくは従来のCAR (短もしくは中間コネクタ領域を含む) のいずれかを発現する抗CD19ヒトT細胞が、NSGマウスにおいて確立されたRaji腫瘍を根絶し得ることを示す。これら実験において、上記Raji細胞は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するようにトランスフェクトされ、腫瘍増殖は、上記マウスへのルシフェリンの注射およびバイオルミネッセンス画像化によって測定される。

【図6D】図6A~6Eは、T-CHARM (1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む) もしくは従来のCAR (短もしくは中間コネクタ領域を含む) のいずれかを発現する抗CD19ヒトT細胞が、NSGマウスにおいて確立されたRaji腫瘍を根絶し得ることを示す。これら実験において、上記Raji細胞は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するようにトランスフェクトされ、腫瘍増殖は、上記マウスへのルシフェリンの注射およびバイオルミネッセンス画像化によって測定される。

【図6E】図6A~6Eは、T-CHARM (1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む) もしくは従来のCAR (短もしくは中間コネクタ領域を含む) のいずれかを発現する抗CD19ヒトT細胞が、NSGマウスにおいて確立されたRaji腫瘍を根絶し得ることを示す。これら実験において、上記Raji細胞は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するようにトランスフェクトされ、腫瘍増殖は、上記マウスへのルシフェリンの注射およびバイオルミネッセンス画像化によって測定される。

【図7-1】図7は、抗CD19 CARおよびT-CHARMを発現するヒトT細胞が、Rajiリンパ腫を接種したNSGマウスへの養子移入後に血液中で存続し得ることを示す。ヒトT細胞は、ヒトCD8およびCD45細胞表面分子に対して特異的なモノクローナル抗体で染色することによって区別される。

【図7-2】図7は、抗CD19 CARおよびT-CHARMを発現するヒトT細胞が、Rajiリンパ腫を接種したNSGマウスへの養子移入後に血液中で存続し得ることを示す。ヒトT細胞は、ヒトCD8およびCD45細胞表面分子に対して特異的なモノクローナル抗体で染色することによって区別される。

【図7-3】図7は、抗CD19 CARおよびT-CHARMを発現するヒトT細胞が、Rajiリンパ腫を接種したNSGマウスへの養子移入後に血液中で存続し得ることを示す。ヒトT細胞は、ヒトCD8およびCD45細胞表面分子に対して特異的なモノクローナル抗体で染色することによって区別される。

【図7-4】図7は、抗CD19 CARおよびT-CHARMを発現するヒトT細胞が、Rajiリンパ腫を接種したNSGマウスへの養子移入後に血液中で存続し得ることを示す。ヒトT細胞は、ヒトCD8およびCD45細胞表面分子に対して特異的なモノクローナル抗体で染色することによって区別される。

【図7-5】図7は、抗CD19 CARおよびT-CHARMを発現するヒトT細胞が

10

20

30

40

50

、R a j i リンパ腫を接種したNSGマウスへの養子移入後に血液中で存続し得ることを示す。ヒトT細胞は、ヒトCD8およびCD45細胞表面分子に対して特異的なモノクローナル抗体で染色することによって区別される。

【図7-6】図7は、抗CD19 CARおよびT-ChARMを発現するヒトT細胞が、R a j i リンパ腫を接種したNSGマウスへの養子移入後に血液中で存続し得ることを示す。ヒトT細胞は、ヒトCD8およびCD45細胞表面分子に対して特異的なモノクローナル抗体で染色することによって区別される。

【図7-7】図7は、抗CD19 CARおよびT-ChARMを発現するヒトT細胞が、R a j i リンパ腫を接種したNSGマウスへの養子移入後に血液中で存続し得ることを示す。ヒトT細胞は、ヒトCD8およびCD45細胞表面分子に対して特異的なモノクローナル抗体で染色することによって区別される。

【図7-8】図7は、抗CD19 CARおよびT-ChARMを発現するヒトT細胞が、R a j i リンパ腫を接種したNSGマウスへの養子移入後に血液中で存続し得ることを示す。ヒトT細胞は、ヒトCD8およびCD45細胞表面分子に対して特異的なモノクローナル抗体で染色することによって区別される。

【図7-9】図7は、抗CD19 CARおよびT-ChARMを発現するヒトT細胞が、R a j i リンパ腫を接種したNSGマウスへの養子移入後に血液中で存続し得ることを示す。ヒトT細胞は、ヒトCD8およびCD45細胞表面分子に対して特異的なモノクローナル抗体で染色することによって区別される。

【図8-1】図8A~8Dは、T-ChARM発現T細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製T-ChARM T細胞は、発現マーカーtEGFR(A)によって検出されるか、抗Streptag II(STII)(B)によって検出されるか、またはStreptactin APC(C,D)で検出される。

【図8-2】図8A~8Dは、T-ChARM発現T細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製T-ChARM T細胞は、発現マーカーtEGFR(A)によって検出されるか、抗Streptag II(STII)(B)によって検出されるか、またはStreptactin APC(C,D)で検出される。

【図8-3】図8A~8Dは、T-ChARM発現T細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製T-ChARM T細胞は、発現マーカーtEGFR(A)によって検出されるか、抗Streptag II(STII)(B)によって検出されるか、またはStreptactin APC(C,D)で検出される。

【図8-4】図8A~8Dは、T-ChARM発現T細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製T-ChARM T細胞は、発現マーカーtEGFR(A)によって検出されるか、抗Streptag II(STII)(B)によって検出されるか、またはStreptactin APC(C,D)で検出される。

【図8-5】図8A~8Dは、T-ChARM発現T細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製T-ChARM T細胞は、発現マーカーtEGFR(A)によって検出されるか、抗Streptag II(STII)(B)によって検出されるか、またはStreptactin APC(C,D)で検出される。

【図8-6】図8A~8Dは、T-ChARM発現T細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製T-ChARM T細胞は、発現マーカーtEGFR(A)によって検出されるか、抗Streptag II(STII)(B)によって検出されるか、またはStreptactin APC(C,D)で検出される。

【図8-7】図8A~8Dは、T-ChARM発現T細胞が、タグ特異的結合剤を使用す

10

20

30

40

50

るフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

【図 8 - 8】図 8 A ~ 8 D は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

【図 8 - 9】図 8 A ~ 8 D は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

10

【図 8 - 10】図 8 A ~ 8 D は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

【図 8 - 11】図 8 A ~ 8 D は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

20

【図 8 - 12】図 8 A ~ 8 D は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

【図 8 - 13】図 8 A ~ 8 D は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

30

【図 8 - 14】図 8 A ~ 8 D は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

【図 8 - 15】図 8 A ~ 8 D は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

40

【図 8 - 16】図 8 A ~ 8 D は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、タグ特異的結合剤を使用するフローサイトメトリーによって同定され得ることを示す。上記例において、精製 T - C h A R M T 細胞は、発現マーカー t E G F R (A) によって検出されるか、抗 S t r e p タグ I I (S T I I) (B) によって検出されるか、または S t r e p T a c t i n A P C (C , D) で検出される。

【図 9 - 1】図 9 は、T - C h A R M 発現 T 細胞が、蛍光色素に連結されたタグ特異的結

50

合剤で低純度（例では15%）から高純度（例では99%）までフローサイトメトリーによってソートされ得ることを示す。例において、上記タグは、StreptタグIIであり、上記タグ特異的結合剤は、蛍光色素に連結された抗STII mAbである。

【図9-2】図9は、T-CHARM発現T細胞が、蛍光色素に連結されたタグ特異的結合剤で低純度（例では15%）から高純度（例では99%）までフローサイトメトリーによってソートされ得ることを示す。例において、上記タグは、StreptタグIIであり、上記タグ特異的結合剤は、蛍光色素に連結された抗STII mAbである。

【図9-3】図9は、T-CHARM発現T細胞が、蛍光色素に連結されたタグ特異的結合剤で低純度（例では15%）から高純度（例では99%）までフローサイトメトリーによってソートされ得ることを示す。例において、上記タグは、StreptタグIIであり、上記タグ特異的結合剤は、蛍光色素に連結された抗STII mAbである。

【図9-4】図9は、T-CHARM発現T細胞が、蛍光色素に連結されたタグ特異的結合剤で低純度（例では15%）から高純度（例では99%）までフローサイトメトリーによってソートされ得ることを示す。例において、上記タグは、StreptタグIIであり、上記タグ特異的結合剤は、蛍光色素に連結された抗STII mAbである。

【図10-1】図10は、種々のサイズのStrept-Tactin（登録商標）ビーズを使用することによる、T-CHARM発現T細胞（3個のStreptタグ タグカセットを含む）の直接富化を示す。左側のパネルは、富化画分の染色を示し、右側のパネルは、流出液（非富化画分）を示す。

【図10-2】図10は、種々のサイズのStrept-Tactin（登録商標）ビーズを使用することによる、T-CHARM発現T細胞（3個のStreptタグ タグカセットを含む）の直接富化を示す。左側のパネルは、富化画分の染色を示し、右側のパネルは、流出液（非富化画分）を示す。

【図10-3】図10は、種々のサイズのStrept-Tactin（登録商標）ビーズを使用することによる、T-CHARM発現T細胞（3個のStreptタグ タグカセットを含む）の直接富化を示す。左側のパネルは、富化画分の染色を示し、右側のパネルは、流出液（非富化画分）を示す。

【図10-4】図10は、種々のサイズのStrept-Tactin（登録商標）ビーズを使用することによる、T-CHARM発現T細胞（3個のStreptタグ タグカセットを含む）の直接富化を示す。左側のパネルは、富化画分の染色を示し、右側のパネルは、流出液（非富化画分）を示す。

【図10-5】図10は、種々のサイズのStrept-Tactin（登録商標）ビーズを使用することによる、T-CHARM発現T細胞（3個のStreptタグ タグカセットを含む）の直接富化を示す。左側のパネルは、富化画分の染色を示し、右側のパネルは、流出液（非富化画分）を示す。

【図10-6】図10は、種々のサイズのStrept-Tactin（登録商標）ビーズを使用することによる、T-CHARM発現T細胞（3個のStreptタグ タグカセットを含む）の直接富化を示す。左側のパネルは、富化画分の染色を示し、右側のパネルは、流出液（非富化画分）を示す。

【図10-7】図10は、種々のサイズのStrept-Tactin（登録商標）ビーズを使用することによる、T-CHARM発現T細胞（3個のStreptタグ タグカセットを含む）の直接富化を示す。左側のパネルは、富化画分の染色を示し、右側のパネルは、流出液（非富化画分）を示す。

【図11】図11は、タグ配列に対する結合リガンド（Strept-Tactin（登録商標））に連結したビーズとともに共培養した、T-CHARM（1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む）もしくは従来の抗CD19 CARを発現するT細胞（CD19 長）の光学顕微鏡写真を示す。この顕微鏡写真は、T-CHARM T細胞の選択的クラスター化および増殖を実証する。

【図12】図12は、Strept-Tactin（登録商標）マイクロビーズとの10日間の培養にわたるT-CHARM発現T細胞（1個、2個もしくは3個のタグカセットを

10

20

30

40

50

含む)の増殖曲線を示す。

【図13-1】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞の活性化を示す。刺激の(A)24時間後および(B)48時間後のデータを示す。

【図13-2】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞の活性化を示す。刺激の(A)24時間後および(B)48時間後のデータを示す。

10

【図13-3】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞の活性化を示す。刺激の(A)24時間後および(B)48時間後のデータを示す。

【図13-4】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞の活性化を示す。刺激の(A)24時間後および(B)48時間後のデータを示す。

20

【図13-5】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞の活性化を示す。刺激の(A)24時間後および(B)48時間後のデータを示す。

【図13-6】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞の活性化を示す。刺激の(A)24時間後および(B)48時間後のデータを示す。

30

【図13-7】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞の活性化を示す。刺激の(A)24時間後および(B)48時間後のデータを示す。

【図13-8】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞の活性化を示す。刺激の(A)24時間後および(B)48時間後のデータを示す。

40

【図13-9】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞の活性化を示す。刺激の(A)24時間後および(B)48時間後のデータを示す。

【図13-10】図13Aおよび13Bは、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗Streptag II mAbのみのいずれかによって、または抗CD28 mAbとの組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後にCD25およびCD69のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM発現T細胞

50

の活性化を示す。刺激の (A) 24 時間後および (B) 48 時間後のデータを示す。

【図 13 - 11】図 13 A および 13 B は、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗 Streptag II mAb のみのいずれかによって、または抗 CD 28 mAb との組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後に CD 25 および CD 69 のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM 発現 T 細胞の活性化を示す。刺激の (A) 24 時間後および (B) 48 時間後のデータを示す。

【図 13 - 12】図 13 A および 13 B は、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗 Streptag II mAb のみのいずれかによって、または抗 CD 28 mAb との組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後に CD 25 および CD 69 のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM 発現 T 細胞の活性化を示す。刺激の (A) 24 時間後および (B) 48 時間後のデータを示す。

【図 13 - 13】図 13 A および 13 B は、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗 Streptag II mAb のみのいずれかによって、または抗 CD 28 mAb との組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後に CD 25 および CD 69 のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM 発現 T 細胞の活性化を示す。刺激の (A) 24 時間後および (B) 48 時間後のデータを示す。

【図 13 - 14】図 13 A および 13 B は、Streptactin マイクロビーズ、ナノビーズもしくは抗 Streptag II mAb のみのいずれかによって、または抗 CD 28 mAb との組み合わせにおいて、上記タグカセットの結合後に CD 25 および CD 69 のアップレギュレーションによって決定されるとおり、T-CHARM 発現 T 細胞の活性化を示す。刺激の (A) 24 時間後および (B) 48 時間後のデータを示す。

【図 14 A】図 14 A および 14 B は、T-CHARM 発現 T 細胞の選択的増殖を示す。ソートされていない T-CHARM¹/4-1BB および T-CHARM¹/CD 28 形質導入 T 細胞 (CD 8 + および CD 4 +) を、抗 Streptag / 抗 CD 28 - MB とともに 9 日間培養した。T-CHARM 細胞のパーセンテージを、(A) 培養前後の T 細胞上の Streptag 発現をフロー検出によって評価した。抗 CD 3 / 抗 CD 28 - MB のみで処理した培養細胞をコントロールとして使用した。(B) CD 19 + 不死化 B 細胞株 (TM-LCL) 増殖後の FACS ソートした EGFR + 抗 CD 19 CHARM T 細胞。それぞれ、抗 EGFR 抗体 (上の行) および抗 Streptag II 抗体 (下の行) で染色。

【図 14 B】図 14 A および 14 B は、T-CHARM 発現 T 細胞の選択的増殖を示す。ソートされていない T-CHARM¹/4-1BB および T-CHARM¹/CD 28 形質導入 T 細胞 (CD 8 + および CD 4 +) を、抗 Streptag / 抗 CD 28 - MB とともに 9 日間培養した。T-CHARM 細胞のパーセンテージを、(A) 培養前後の T 細胞上の Streptag 発現をフロー検出によって評価した。抗 CD 3 / 抗 CD 28 - MB のみで処理した培養細胞をコントロールとして使用した。(B) CD 19 + 不死化 B 細胞株 (TM-LCL) 増殖後の FACS ソートした EGFR + 抗 CD 19 CHARM T 細胞。それぞれ、抗 EGFR 抗体 (上の行) および抗 Streptag II 抗体 (下の行) で染色。

【図 15 - 1】図 15 は、種々の量の Strep-Tactin (登録商標) ビーズで刺激して 7 日後の Ki-67 タンパク質のレベルによって測定した場合の、抗 CD 19 T-CHARM 発現 T 細胞 (1 個、2 個もしくは 3 個のタグカセットを含む) の増殖を示す。下パネルにおいて、CD 19⁺ EBV-LCL (TM-LCL) での T-CHARM の抗 CD 19 結合成分を介して刺激した後の T-CHARM 発現 T 細胞における Ki-67 の発現が示される。

【図 15 - 2】図 15 は、種々の量の Strep-Tactin (登録商標) ビーズで刺激して 7 日後の Ki-67 タンパク質のレベルによって測定した場合の、抗 CD 19 T-CHARM 発現 T 細胞 (1 個、2 個もしくは 3 個のタグカセットを含む) の増殖を示す。下パネルにおいて、CD 19⁺ EBV-LCL (TM-LCL) での T-CHARM の抗 CD 19 結合成分を介して刺激した後の T-CHARM 発現 T 細胞における Ki-6

10

20

30

40

50

7の発現が示される。

【図15-3】図15は、種々の量のStreptactin（登録商標）ビーズで刺激して7日後のKi-67タンパク質のレベルによって測定した場合の、抗CD19 T-CHARM発現T細胞（1個、2個もしくは3個のタグカセットを含む）の増殖を示す。下パネルにおいて、CD19⁺ EBV-LCL（TM-LCL）でのT-CHARMの抗CD19結合成分を介して刺激した後のT-CHARM発現T細胞におけるKi-67の発現が示される。

【図16】図16は、種々の種のStreptactin、抗StreptタグIIもしくは抗CD3/抗CD28結合体化ビーズで培養したT-CHARM発現T細胞の増殖曲線を示す。

【図17-1】図17Aおよび17Bは、Streptactinビーズ（A）上での抗CD19 T-CHARM発現T細胞の選択的増殖を示す。抗CD19 T-CHARM発現T細胞は、その後、CD19⁺ LCL（B）での抗CD19キメラレセプターを介した刺激によって増殖され得る。

【図17-2】図17Aおよび17Bは、Streptactinビーズ（A）上での抗CD19 T-CHARM発現T細胞の選択的増殖を示す。抗CD19 T-CHARM発現T細胞は、その後、CD19⁺ LCL（B）での抗CD19キメラレセプターを介した刺激によって増殖され得る。

【図18A】図18A~18Dは、T細胞が、抗CD3/抗CD28ビーズでの事前活性化なしにIL-7およびIL-15の存在下で培養した後に、2タイプのT-CHARM（4-1BB/CD3のエフェクタードメイン（AおよびB）もしくはCD28/CD3（CおよびD））で形質導入され得ることを示す。形質導入したT-CHARM発現T細胞は、抗StreptタグIIビーズを培養物に添加する（BおよびD）ことによって（抗CD3/抗CD28ビーズ刺激の非存在下ですら）選択的に増殖および富化され得るが、抗StreptタグIIビーズが培養物に添加されない（AおよびC）場合には増殖されない。

【図18B】図18A~18Dは、T細胞が、抗CD3/抗CD28ビーズでの事前活性化なしにIL-7およびIL-15の存在下で培養した後に、2タイプのT-CHARM（4-1BB/CD3のエフェクタードメイン（AおよびB）もしくはCD28/CD3（CおよびD））で形質導入され得ることを示す。形質導入したT-CHARM発現T細胞は、抗StreptタグIIビーズを培養物に添加する（BおよびD）ことによって（抗CD3/抗CD28ビーズ刺激の非存在下ですら）選択的に増殖および富化され得るが、抗StreptタグIIビーズが培養物に添加されない（AおよびC）場合には増殖されない。

【図18C】図18A~18Dは、T細胞が、抗CD3/抗CD28ビーズでの事前活性化なしにIL-7およびIL-15の存在下で培養した後に、2タイプのT-CHARM（4-1BB/CD3のエフェクタードメイン（AおよびB）もしくはCD28/CD3（CおよびD））で形質導入され得ることを示す。形質導入したT-CHARM発現T細胞は、抗StreptタグIIビーズを培養物に添加する（BおよびD）ことによって（抗CD3/抗CD28ビーズ刺激の非存在下ですら）選択的に増殖および富化され得るが、抗StreptタグIIビーズが培養物に添加されない（AおよびC）場合には増殖されない。

【図18D】図18A~18Dは、T細胞が、抗CD3/抗CD28ビーズでの事前活性化なしにIL-7およびIL-15の存在下で培養した後に、2タイプのT-CHARM（4-1BB/CD3のエフェクタードメイン（AおよびB）もしくはCD28/CD3（CおよびD））で形質導入され得ることを示す。形質導入したT-CHARM発現T細胞は、抗StreptタグIIビーズを培養物に添加する（BおよびD）ことによって（抗CD3/抗CD28ビーズ刺激の非存在下ですら）選択的に増殖および富化され得るが、抗StreptタグIIビーズが培養物に添加されない（AおよびC）場合には増殖されない。

10

20

30

40

50

【図19】図19A~19Dは、Strep-Tactin（登録商標）マイクロビーズでの刺激によって増殖された抗CD19 T-ChARM¹ T細胞が、抗CD19 CAR（短）（CD19-S）を発現するコントロールT細胞としてのCD19陽性腫瘍細胞（A. K562/CD19； B. Raji）での再刺激の際に、サイトカイン（GM-CSF、インターフェロン-、IL-2、およびTNF-）を産生する匹敵するかもしくはより優れた能力を保持することを示す。K562細胞（C）およびPMA-イオノマイシン（D）を、それぞれ、陰性コントロールおよび陽性コントロールとして供した。

【図20】図20は、T-ChARM発現T細胞が、抗Strepタグビーズのみで、または抗Strepタグと抗CD27抗体とを含むビーズもしくは抗Strepタグと抗CD28抗体とを含むビーズで、クラスターを形成し増殖するように誘発され得ることを示す。

【図21】図21は、CD19+不死化B細胞株（TM-LCL）増殖後にFACSソートしたEGFR+抗CD19 ChARM T細胞のフローサイトメトリー分析（MFI）を示す。それぞれ、抗EGFR抗体（上の行）および抗StrepタグII抗体（下の行）で染色。

【図22】図22は、CD19で形質導入したK562細胞（K562/CD19）もしくはROR1で形質導入したK562細胞（K562/ROR1）、またはCD19+Raji腫瘍細胞（標的）に対する、種々の抗CD19 ChARM形質導入T細胞（エフェクター）の細胞溶解効果を調べるためのクロム放出アッセイの結果を示す。E/T = エフェクター/標的比。

【図23】図23Aおよび23Bは、（A）抗CD19 短、T-ChARM¹、T-ChARM²、T-ChARM³とCD28/CD3 エフェクタードメインを発現する、ならびに（B）抗ROR1 R12 短およびT-ChARM¹と41BB/CD3 エフェクタードメインとを有する、T細胞の細胞溶解活性を示す。上記細胞を、CD19で形質導入したK562細胞（K562/CD19）もしくはROR1で形質導入したK562細胞（K562/ROR1）、またはCD19+Raji腫瘍細胞（標的）に対する細胞溶解活性を試験した。E/T = エフェクター/標的比。

【図24】図24は、CD19で形質導入したK562細胞（K562/CD19）もしくはROR1で形質導入したK562細胞（K562/ROR1）、またはCD19+Raji腫瘍細胞（標的）に対する種々の抗CD19 T-ChARM形質導入T細胞（エフェクター）のIL2/IFN-産生を示す。

【図25】図25A~25Cは、ChARM形質導入T細胞とCD19+Raji細胞（1:4比）との24時間後の三連の共培養上清のlumines多重サイトカイン分析を示す。そのデータは、種々のドナーに由来するT細胞を使用する3回の独立した実験から得られ、全てのデータは、平均±SDとして表される。スチューデントのt検定を行った。*P<0.01。（A）抗CD19 CARと長い（CH3-CH2-ヒンジ）、中間（CH3-ヒンジ）、および短い（ヒンジのみ）スペーサーを発現するCD8+ T細胞によるサイトカイン産生の比較。3回の独立した実験の多重サイトカインデータを正規化した（CD19-CAR「長/41BB」によるサイトカイン放出=1）；（B）抗CD19 CAR-短と4-1BB/CD3 エフェクタードメインと比較した場合の、抗CD19 T-ChARM¹（1ST）、T-ChARM²（2ST）、T-ChARM³（3ST）と、4-1BB/CD3 エフェクタードメインとを発現するCD8+ T細胞によるサイトカイン産生の比較。3回の独立した実験の多重サイトカインデータを正規化した（CD19-CAR-短：Hi/4-1BBによるサイトカイン放出=1）；ならびに（C）抗CD19 CAR-短とCD28/CD3 エフェクタードメインと比較した場合の、抗CD19 T-ChARM¹（1ST）、T-ChARM²（2ST）、T-ChARM³（3ST）とCD28/CD3 エフェクタードメインとを発現するCD8+ T細胞によるサイトカイン産生の比較。3回の独立した実験の多重サイトカインデータを正規化した（CD19-CAR-短：Hi/CD28によるサイトカイン

10

20

30

40

50

放出 = 1)。

【図26】図26は、外因性サイトカインの添加なしにCD19+ Raji腫瘍細胞(塗りつぶしのグレー)もしくは培地のみ(グレーの線)での刺激から5日後の、抗CD19 4-1BBもしくはCD28 ChARMを発現するT細胞の増殖を測定するために使用されるCFSE色素希釈を示す。

【図27-1】図27A~27Dは、FACSソートしたEGFR+ 抗CD19 ChARMを示す：(A)CD8+ T細胞(CD19-Hi/4-1BB、ST-CD19/4-1BB、CD19(VH-ST-VL)/4-1BB; CD19-1ST/4-1BB、CD19-2ST/4-1BB、CD19-3ST/4-1BB CAR); (B)CD4+T細胞(CD19-Hi/4-1BB、ST-CD19/4-1BB、CD19(VH-ST-VL)/4-1BB; CD19-1ST/4-1BB、CD19-2ST/4-1BB、CD19-3ST/4-1BB CAR); (C)抗CD19 ChARM CD8+ T細胞(CD19-Hi/CD28、CD19-1ST/CD28、CD19-2ST/CD28、CD19-3ST/CD28 CAR); ならびに(D)抗ROR1 R12 ChARM T細胞(R12-Hi/4-1BB、R12-1ST/4-1BB)。これらを、IL2との培養において、Streptactin被覆マイクロビーズ(Streptactin-MB)、抗Streptag抗体もしくは抗Streptag/抗CD28抗体被覆マイクロビーズ(Streptag-MBおよびStreptag/CD28-MB)で刺激した。刺激の48時間後に、上記細胞を採取し、T細胞活性化マーカーCD25を、フローサイトメトリーによって評価した。非処理細胞(培地)をコントロールとして使用した。

【図27-2】図27A~27Dは、FACSソートしたEGFR+ 抗CD19 ChARMを示す：(A)CD8+ T細胞(CD19-Hi/4-1BB、ST-CD19/4-1BB、CD19(VH-ST-VL)/4-1BB; CD19-1ST/4-1BB、CD19-2ST/4-1BB、CD19-3ST/4-1BB CAR); (B)CD4+T細胞(CD19-Hi/4-1BB、ST-CD19/4-1BB、CD19(VH-ST-VL)/4-1BB; CD19-1ST/4-1BB、CD19-2ST/4-1BB、CD19-3ST/4-1BB CAR); (C)抗CD19 ChARM CD8+ T細胞(CD19-Hi/CD28、CD19-1ST/CD28、CD19-2ST/CD28、CD19-3ST/CD28 CAR); ならびに(D)抗ROR1 R12 ChARM T細胞(R12-Hi/4-1BB、R12-1ST/4-1BB)。これらを、IL2との培養において、Streptactin被覆マイクロビーズ(Streptactin-MB)、抗Streptag抗体もしくは抗Streptag/抗CD28抗体被覆マイクロビーズ(Streptag-MBおよびStreptag/CD28-MB)で刺激した。刺激の48時間後に、上記細胞を採取し、T細胞活性化マーカーCD25を、フローサイトメトリーによって評価した。非処理細胞(培地)をコントロールとして使用した。

【図28】図28は、IL2の存在下でStreptactin-MB、Streptag-MBおよびStreptag/CD28-MBで刺激した、FACSソートしたEGFR+ 抗CD19 4-1BB ChARM T細胞(CD8+)の代表的顕微鏡画像を示す。非処理細胞(培地)をコントロールとして使用した。顕微鏡画像は、刺激の48時間後に撮った。

【図29】図29Aおよび29Bは、ChARM T細胞の増殖曲線を示す。FACSソートしたEGFR+ 抗CD19 ChARM (A) CD8+および(B)CD4+ T細胞を、CTL培地中で、IL2の存在下でStreptactin-MB、Streptag-MBおよびStreptag/CD28-MBとともに培養した。

【図30A】図30A~30Fは、抗CD19-1ST/4-1BBもしくはCD19-1ST/CD28 CARで形質導入した抗CD3/抗CD28 マイクロビーズ刺激CD8+ T細胞を示す; EGFR染色およびソートの後、純粋なCAR T細胞を、TM-LCLまたはStreptag-MBもしくはStreptag/CD28-MBと

10

20

30

40

50

もに8日間増殖させた。インビトロ機能性試験を行って、増殖前(CD3/CD28-MB)あるいは増殖後(TM-LCLまたはStreptag-MBもしくはStreptag/CD28-MB)に、CAR T細胞機能を評価した。(A)クロム放出アッセイを行って、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)に対するChARM T細胞の細胞溶解効果を試験した。E/T:エフェクター/標的比;(B)サイトカイン産生をELISAによって測定して、 5×10^4 抗CD19 ChARM T細胞と、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)との共培養の24時間後に得られた上清中のIFN- γ およびIL2を評価した。PMA/イオノマイシン刺激T細胞を、陽性コントロールとして使用した($n=3$; * $P<0.05$);(C)外因性サイトカインの添加なしに標的細胞(K562/CD19)(塗りつぶしのグレー)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)(グレーの線)での刺激の5日後の、ChARM T細胞のCFSE増殖アッセイ。分析のために、三連のウェルをプールし、生きている(PI-)EGFR陽性CAR T細胞の増殖を分析した;(D)増殖前(CD3/CD28-MB)もしくは増殖後(TM-LCLまたはStreptag-MBもしくはStreptag/CD28-MB)のChARM T細胞でのCD45RO、CD62L、CD28およびCD27発現のフロー検出;(E)マウスのコホートに、1日目に尾静脈注射によってRaji-ffluを接種し、次いで、CD19+ B LCLもしくはStreptag/CD28-MBのいずれかに対して増殖させた 5×10^6 CD8+ ChARM T細胞(CD19-Hi/4-1BBおよびCD19-1ST/4-1BB)を、腫瘍移植の7日後に投与した。腫瘍の進行および分布を、ルシフェリン基質の注射後に連続バイオルミネッセンス画像化によって評価した;ならびに(F)NSG/Rajiマウスへの養子移入後の抗CD19 ChARM T細胞の存続。T細胞注入後の種々の時点で種々のChARM形質導入T細胞で処置したマウスのコホートの末梢血(眼の出血(eye bleed))中のChARM T細胞のフローサイトメトリー分析。CD8+ tEGFR+およびChARM+ T細胞の頻度を、生きている末梢血球のパーセンテージとして使用した。

【図30B】図30A~30Fは、抗CD19-1ST/4-1BBもしくはCD19-1ST/CD28 CARで形質導入した抗CD3/抗CD28 マイクロビーズ刺激CD8+ T細胞を示す;EGFR染色およびソートの後、純粋なCAR T細胞を、TM-LCLまたはStreptag-MBもしくはStreptag/CD28-MBとともに8日間増殖させた。インビトロ機能性試験を行って、増殖前(CD3/CD28-MB)あるいは増殖後(TM-LCLまたはStreptag-MBもしくはStreptag/CD28-MB)に、CAR T細胞機能を評価した。(A)クロム放出アッセイを行って、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)に対するChARM T細胞の細胞溶解効果を試験した。E/T:エフェクター/標的比;(B)サイトカイン産生をELISAによって測定して、 5×10^4 抗CD19 ChARM T細胞と、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)との共培養の24時間後に得られた上清中のIFN- γ およびIL2を評価した。PMA/イオノマイシン刺激T細胞を、陽性コントロールとして使用した($n=3$; * $P<0.05$);(C)外因性サイトカインの添加なしに標的細胞(K562/CD19)(塗りつぶしのグレー)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)(グレーの線)での刺激の5日後の、ChARM T細胞のCFSE増殖アッセイ。分析のために、三連のウェルをプールし、生きている(PI-)EGFR陽性CAR T細胞の増殖を分析した;(D)増殖前(CD3/CD28-MB)もしくは増殖後(TM-LCLまたはStreptag-MBもしくはStreptag/CD28-MB)のChARM T細胞でのCD45RO、CD62L、CD28およびCD27発現のフロー検出;(E)マウスのコホートに、1日目に尾静脈注射によってRaji-ffluを接種し、次いで、CD19+ B LCLもしくはStreptag/CD28-MBのいずれかに対して増殖させた 5×10^6 CD8+ ChARM T細胞(CD19-Hi/4-1BBおよびCD19-1ST/4-1BB)を、腫瘍移植の7日後に投

10

20

30

40

50

与した。腫瘍の進行および分布を、ルシフェリン基質の注射後に連続バイオルミネッセンス画像化によって評価した；ならびに(F)NSG/Rajiマウスへの養子移入後の抗CD19 ChARM T細胞の存続。T細胞注入後の種々の時点で種々のChARM形質導入T細胞で処置したマウスのコホートの末梢血(眼の出血(eye bleed))中のChARM T細胞のフローサイトメトリー分析。CD8+ tEGFR+およびChARM+ T細胞の頻度を、生きている末梢血球のパーセンテージとして使用した。

【図30C】図30A~30Fは、抗CD19-1ST/4-1BBもしくはCD19-1ST/CD28 CARで形質導入した抗CD3/抗CD28 マイクロビーズ刺激CD8+ T細胞を示す；EGFR染色およびソートの後、純粋なCAR T細胞を、TM-LCLまたは Streptタグ-MBもしくは Streptタグ/CD28-MBとともに8日間増殖させた。インビトロ機能性試験を行って、増殖前(CD3/CD28-MB)あるいは増殖後(TM-LCLまたは Streptタグ-MBもしくは Streptタグ/CD28-MB)に、CAR T細胞機能を評価した。(A)クロム放出アッセイを行って、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)に対するChARM T細胞の細胞溶解効果を試験した。E/T：エフェクター/標的比；(B)サイトカイン産生をELISAによって測定して、 5×10^4 抗CD19 ChARM T細胞と、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)との共培養の24時間後に得られた上清中のIFN- γ およびIL2を評価した。PMA/イオノマイシン刺激T細胞を、陽性コントロールとして使用した(n=3；*P<0.05)；(C)外因性サイトカインの添加なしに標的細胞(K562/CD19)(塗りつぶしのグレー)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)(グレーの線)での刺激の5日後の、ChARM T細胞のCFSE増殖アッセイ。分析のために、三連のウェルをプールし、生きている(PI-)EGFR陽性CAR T細胞の増殖を分析した；(D)増殖前(CD3/CD28-MB)もしくは増殖後(TM-LCLまたは Streptタグ-MBもしくは Streptタグ/CD28-MB)のChARM T細胞でのCD45RO、CD62L、CD28およびCD27発現のフロー検出；(E)マウスのコホートに、1日目に尾静脈注射によってRaji-ffluocを接種し、次いで、CD19+ B LCLもしくは Streptタグ/CD28-MBのいずれかに対して増殖させた 5×10^6 CD8+ ChARM T細胞(CD19-Hi/4-1BBおよびCD19-1ST/4-1BB)を、腫瘍移植の7日後に投与した。腫瘍の進行および分布を、ルシフェリン基質の注射後に連続バイオルミネッセンス画像化によって評価した；ならびに(F)NSG/Rajiマウスへの養子移入後の抗CD19 ChARM T細胞の存続。T細胞注入後の種々の時点で種々のChARM形質導入T細胞で処置したマウスのコホートの末梢血(眼の出血(eye bleed))中のChARM T細胞のフローサイトメトリー分析。CD8+ tEGFR+およびChARM+ T細胞の頻度を、生きている末梢血球のパーセンテージとして使用した。

【図30D】図30A~30Fは、抗CD19-1ST/4-1BBもしくはCD19-1ST/CD28 CARで形質導入した抗CD3/抗CD28 マイクロビーズ刺激CD8+ T細胞を示す；EGFR染色およびソートの後、純粋なCAR T細胞を、TM-LCLまたは Streptタグ-MBもしくは Streptタグ/CD28-MBとともに8日間増殖させた。インビトロ機能性試験を行って、増殖前(CD3/CD28-MB)あるいは増殖後(TM-LCLまたは Streptタグ-MBもしくは Streptタグ/CD28-MB)に、CAR T細胞機能を評価した。(A)クロム放出アッセイを行って、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)に対するChARM T細胞の細胞溶解効果を試験した。E/T：エフェクター/標的比；(B)サイトカイン産生をELISAによって測定して、 5×10^4 抗CD19 ChARM T細胞と、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)との共培養の24時間後に得られた上清中のIFN- γ およびIL2を評価した。PMA/イオノマイシン刺激T細胞を、陽性コントロールとして使用した(n=3；*P<0.05)；(C)外因性サイトカインの添加なしに標的細胞(K

10

20

30

40

50

562 / CD19) (塗りつぶしのグレー) もしくはコントロール細胞 (K562 / ROR1) (グレーの線) での刺激の5日後の、ChARM T細胞のCFSE増殖アッセイ。分析のために、三連のウェルをプールし、生きている (PI-) EGFR陽性CAR T細胞の増殖を分析した; (D) 増殖前 (CD3 / CD28 - MB) もしくは増殖後 (TM - LCL または Strepタグ - MB もしくは Strepタグ / CD28 - MB) のChARM T細胞でのCD45RO、CD62L、CD28およびCD27発現のフロー検出; (E) マウスのコホートに、1日目に尾静脈注射によってRaji - flucを接種し、次いで、CD19+ B LCL もしくは Strepタグ / CD28 - MBのいずれかに対して増殖させた 5×10^6 CD8+ ChARM T細胞 (CD19 - Hi / 4 - 1BB および CD19 - 1ST / 4 - 1BB) を、腫瘍移植の7日後に投与した。腫瘍の進行および分布を、ルシフェリン基質の注射後に連続バイオルミネッセンス画像化によって評価した; ならびに (F) NSG / Raji マウスへの養子移入後の抗CD19 ChARM T細胞の存続。T細胞注入後の種々の時点で種々のChARM形質導入T細胞で処置したマウスのコホートの末梢血 (眼の出血 (eye bleed)) 中のChARM T細胞のフローサイトメトリー分析。CD8+ tEGFR+ およびChARM+ T細胞の頻度を、生きている末梢血球のパーセンテージとして使用した。

【図30E】図30A~30Fは、抗CD19 - 1ST / 4 - 1BB もしくはCD19 - 1ST / CD28 CARで形質導入した抗CD3 / 抗CD28 マイクロビーズ刺激CD8+ T細胞を示す; EGFR染色およびソートの後、純粋なCAR T細胞を、TM - LCL または Strepタグ - MB もしくは Strepタグ / CD28 - MBとともに8日間増殖させた。インビトロ機能性試験を行って、増殖前 (CD3 / CD28 - MB) あるいは増殖後 (TM - LCL または Strepタグ - MB もしくは Strepタグ / CD28 - MB) に、CAR T細胞機能を評価した。(A) クロム放出アッセイを行って、標的細胞 (K562 / CD19) もしくはコントロール細胞 (K562 / ROR1) に対するChARM T細胞の細胞溶解効果を試験した。E / T: エフェクター / 標的比; (B) サイトカイン産生をELISAによって測定して、 5×10^4 抗CD19 ChARM T細胞と、標的細胞 (K562 / CD19) もしくはコントロール細胞 (K562 / ROR1) との共培養の24時間後に得られた上清中のIFN- γ およびIL2を評価した。PMA / イオノマイシン刺激T細胞を、陽性コントロールとして使用した ($n = 3$; * $P < 0.05$); (C) 外因性サイトカインの添加なしに標的細胞 (K562 / CD19) (塗りつぶしのグレー) もしくはコントロール細胞 (K562 / ROR1) (グレーの線) での刺激の5日後の、ChARM T細胞のCFSE増殖アッセイ。分析のために、三連のウェルをプールし、生きている (PI-) EGFR陽性CAR T細胞の増殖を分析した; (D) 増殖前 (CD3 / CD28 - MB) もしくは増殖後 (TM - LCL または Strepタグ - MB もしくは Strepタグ / CD28 - MB) のChARM T細胞でのCD45RO、CD62L、CD28およびCD27発現のフロー検出; (E) マウスのコホートに、1日目に尾静脈注射によってRaji - flucを接種し、次いで、CD19+ B LCL もしくは Strepタグ / CD28 - MBのいずれかに対して増殖させた 5×10^6 CD8+ ChARM T細胞 (CD19 - Hi / 4 - 1BB および CD19 - 1ST / 4 - 1BB) を、腫瘍移植の7日後に投与した。腫瘍の進行および分布を、ルシフェリン基質の注射後に連続バイオルミネッセンス画像化によって評価した; ならびに (F) NSG / Raji マウスへの養子移入後の抗CD19 ChARM T細胞の存続。T細胞注入後の種々の時点で種々のChARM形質導入T細胞で処置したマウスのコホートの末梢血 (眼の出血 (eye bleed)) 中のChARM T細胞のフローサイトメトリー分析。CD8+ tEGFR+ およびChARM+ T細胞の頻度を、生きている末梢血球のパーセンテージとして使用した。

【図30F】図30A~30Fは、抗CD19 - 1ST / 4 - 1BB もしくはCD19 - 1ST / CD28 CARで形質導入した抗CD3 / 抗CD28 マイクロビーズ刺激CD8+ T細胞を示す; EGFR染色およびソートの後、純粋なCAR T細胞を、TM - LCL または Strepタグ - MB もしくは Strepタグ / CD28 - MBとと

10

20

30

40

50

もに8日間増殖させた。インビトロ機能性試験を行って、増殖前(CD3/CD28-MB)あるいは増殖後(TM-LCLまたはStreptag-MBもしくはStreptag/CD28-MB)に、CAR T細胞機能を評価した。(A)クロム放出アッセイを行って、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)に対するChARM T細胞の細胞溶解効果を試験した。E/T:エフェクター/標的比;(B)サイトカイン産生をELISAによって測定して、 5×10^4 抗CD19 ChARM T細胞と、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)との共培養の24時間後に得られた上清中のIFN- γ およびIL2を評価した。PMA/イオノマイシン刺激T細胞を、陽性コントロールとして使用した($n=3$; * $P<0.05$);(C)外因性サイトカインの添加なしに標的細胞(K562/CD19)(塗りつぶしのグレー)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)(グレーの線)での刺激の5日後の、ChARM T細胞のCFSE増殖アッセイ。分析のために、三連のウェルをプールし、生きている(PI-)EGFR陽性CAR T細胞の増殖を分析した;(D)増殖前(CD3/CD28-MB)もしくは増殖後(TM-LCLまたはStreptag-MBもしくはStreptag/CD28-MB)のChARM T細胞でのCD45RO、CD62L、CD28およびCD27発現のフロー検出;(E)マウスのコホートに、1日目に尾静脈注射によってRaji-ffluを接種し、次いで、CD19+ B LCLもしくはStreptag/CD28-MBのいずれかに対して増殖させた 5×10^6 CD8+ ChARM T細胞(CD19-Hi/4-1BBおよびCD19-1ST/4-1BB)を、腫瘍移植の7日後に投与した。腫瘍の進行および分布を、ルシフェリン基質の注射後に連続バイオルミネセンス画像化によって評価した;ならびに(F)NSG/Rajiマウスへの養子移入後の抗CD19 ChARM T細胞の存続。T細胞注入後の種々の時点で種々のChARM形質導入T細胞で処置したマウスのコホートの末梢血(眼の出血(eye bleed))中のChARM T細胞のフローサイトメトリー分析。CD8+ tEGFR+およびChARM+ T細胞の頻度を、生きている末梢血球のパーセンテージとして使用した。

【図31】図31は、外因性サイトカインの添加なしにCD19(K562/CD19)、ROR1(K562/ROR1)、培地のみ、もしくはCD19+ Raji腫瘍細胞で刺激して5日後の抗CD19 CAR-短、T-ChARM¹、T-ChARM³、およびMyc-ChARM/4-1BB T細胞の増殖を測定するために使用されるCFSE色素希釈を示す。

【図32】図32は、標的細胞(K562/CD19)もしくはコントロール細胞(K562/ROR1)に対する抗CD19 CAR-短、T-ChARM¹、T-ChARM³、およびMyc-ChARM/4-1BB T細胞の細胞溶解効果を試験するために行ったクロム放出アッセイを示す。E/T:エフェクター/標的比。

【発明を実施するための形態】

【0020】

(詳細な説明)

本開示は、1個以上のアフィニティタグカセットを含む種々の融合タンパク質(これは、「鍵」のように機能して、種々の生物学的経路のうちのいずれかにアクセスしこれを操作する(すなわち、スイッチを入れるもしくは切るまたは調節する)キメラエフェクター分子(ChEM)である)を生成するための組成物および方法を提供する。これらキメラエフェクター分子は、本明細書でKey-ChEMといわれる。このような融合タンパク質をコードする核酸分子は、特異的細胞応答(例えば、増殖もしくは死滅)が誘発されるか、制御されるかもしくはその両方である、改変された宿主細胞を生成するために使用され得る。例えば、あるタイプの前駆細胞は、被験体から得られ得、タグカセットを含む融合タンパク質を発現するように改変され得、増殖するように誘発され得、次いで、具体的治療効果(例えば、被験体の消耗した免疫系を再構成する)のために被験体へと注入し戻され得る。あるいは、タグを含むこのような融合タンパク質は、特定の標的(例えば、腫瘍抗原)に対して特異的な結合ドメインをさらに有し得る。このような例では、これら

融合タンパク質は、特定の細胞へ導入され得、次いでその改変された細胞を同定、ソート、活性化、もしくは増殖するために使用され得るタグ化キメラ抗原レセプター分子（T - C h A R M）である。ある種の実施形態において、このようなタグ化キメラ分子は、細胞（例えば、免疫細胞（例えば、T細胞））へと形質導入され、発現される。

【0021】

ある種の局面において、本開示は、1個以上のタグカセットを有する融合タンパク質（Key - C h E MもしくはT - C h A R M）をコードする核酸分子を含む細胞（例えば、T細胞）を選択的に活性化する、増殖を促進する、同定する、ソートする、富化する、単離する、追跡するもしくは枯渇させるための方法をさらに提供する。さらに、本開示は、Key - C h E MもしくはT - C h A R M、ならびに本開示のKey - C h E MもしくはT - C h A R Mを種々の治療適用（被験体における疾患（例えば、癌、感染性疾患、炎症性疾患、免疫疾患、加齢関連疾患）の処置が挙げられる）において使用するための細胞、組成物および方法を提供する。

10

【0022】

本開示をより詳細に示す前に、本明細書で使用される予定のある種の用語の定義を提供することは、その理解に役立ち得る。さらなる定義は、本開示全体を通じて示される。

【0023】

この説明において、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比の範囲、もしくは整数範囲は、別段示されなければ、記載される範囲内にある任意の整数の値、および適切である場合には、その有理分数（例えば、ある整数の $1/10$ および $1/100$ ）を含むと理解されるべきである。また、任意の物理的特徴（例えば、ポリマーサブユニット、サイズもしくは厚み）に関して本明細書で記載される任意の数値範囲は、別段示されなければ、その記載される範囲内の任意の整数を含むと理解されるべきである。本明細書で使用される場合、用語「約」は、別段示されなければ、その示された範囲、値、もしくは体系（structure）の $\pm 20\%$ を意味する。用語「1つの（a）」および「1つの（an）」は、本明細書で使用される場合、挙げられる成分の「1以上」に言及することが理解されるべきである。選択肢（例えば、「または」）の使用は、上記選択肢のうちのいずれか一方、両方、もしくはその任意の組み合わせを意味すると理解されるべきである。本明細書で使用される場合、用語「含む（include）」、「有する」および「含む（comprise）」は、類義語として使用され、これら用語およびその変形は、限定しないと解釈されるものとされる。

20

30

【0024】

さらに、個々の化合物もしくは化合物群（本明細書で記載される構造および置換基の種々の組み合わせから得られる）が、あたかも各化合物もしくは化合物群が個々に示されるのと同程度まで本願によって開示されることは理解されるべきである。従って、特定の構造もしくは特定の置換基の選択は、本開示の範囲内である。

【0025】

用語「から本質的になる」とは、特許請求の範囲を、特定された材料もしくは工程に、または特許請求された発明の基本的特徴に本質的に影響を及ぼさないものに限定する。例えば、タンパク質ドメイン、領域、モジュールもしくはカセット（例えば、結合ドメイン、ヒンジ領域、リンカーモジュール、タグカセット）またはタンパク質（これは、1個以上のドメイン、領域、モジュールもしくはカセットを有し得る）は、ドメイン、領域、モジュール、カセットもしくはタンパク質のアミノ酸配列が、伸長、欠失、変異、もしくはこれらの組み合わせ（例えば、アミノ末端もしくはカルボキシ末端にあるか、またはドメインの間にあるアミノ酸）を含む場合に、特定のアミノ酸配列「から本質的になる」。上記伸長、欠失、変異、もしくはこれらの組み合わせは、組み合わせにおいて、ドメイン、領域、モジュール、カセットもしくはタンパク質の長さのうちの最大で 20% （例えば、最大で 15% 、 10% 、 8% 、 6% 、 5% 、 4% 、 3% 、 2% もしくは 1% ）に寄与しかつ上記ドメイン、領域、モジュール、カセットもしくはタンパク質の活性（例えば、結合タンパク質もしくはタグカセットの標的結合アフィニティー）に実質的に影響を及ぼさな

40

50

い(すなわち、上記活性を50%を超えて低減しない(例えば、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、もしくは1%以下))。

【0026】

「結合ドメイン」(「結合領域」もしくは「結合部分」ともいわれる)は、本明細書で使用される場合、標的分子(例えば、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソセリン、PD-L1、PD-L2、PSMA)と特異的にかつ非共有結合的に会合、合体、もしくは化合する能力を有する分子(例えば、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質)をいう。結合ドメインは、目的の生物学的分子もしくは他の標的に対する任意の天然に存在する、合成の、半合成の、もしくは組換え生成される結合パートナーを含む。いくつかの実施形態において、上記結合ドメインは、抗原結合ドメイン(例えば、抗体もしくはT細胞レセプター(TCR)または機能的結合ドメインもしくはその抗原結合フラグメント)である。例示的な結合ドメインとしては、単鎖抗体可変領域(例えば、ドメイン抗体、sFv、scFv、Fab)、レセプターエクドメイン(例えば、TNF-)、リガンド(例えば、サイトカイン、ケモカイン)、T細胞レセプター(TCR)の抗原結合領域(例えば、単鎖TCR(scTCR))、または生物学的分子に結合する特異的能力に対して選択される合成ポリペプチドが挙げられる。

10

【0027】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」とは、 10^5 M^{-1} 以上のアフィニティーもしくは K_a (すなわち、単位 $1/\text{M}$ での特定の結合相互作用の平衡会合定数)での、一方でサンプル中の任意の他の分子もしくは成分と有意に会合も合体もしない、標的分子への結合ドメインもしくはその融合タンパク質の会合もしくは合体をいう。結合ドメイン(もしくはその融合タンパク質)は、「高アフィニティー」結合ドメイン(もしくはその融合タンパク質)または「低アフィニティー」結合ドメイン(もしくはその融合タンパク質)として分類され得る。「高アフィニティー」結合ドメインとは、少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも 10^{12} M^{-1} 、もしくは少なくとも 10^{13} M^{-1} の K_a を有する結合ドメインをいう。「低アフィニティー」結合ドメインとは、最大で 10^7 M^{-1} 、最大で 10^6 M^{-1} 、最大で 10^5 M^{-1} までの K_a を有する結合ドメインをいう。あるいは、アフィニティーは、Mの単位(例えば、 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$)での特定の結合相互作用の平衡解離定数(K_d)として定義され得る。ある種の実施形態において、結合ドメインは、「増強されたアフィニティー」を有し得、これは、野生型(もしくは親)の結合ドメインより標的抗原へのより強い結合を有する選択もしくは操作された結合ドメインをいう。例えば、増強されたアフィニティーは、上記野生型結合ドメインのものより高い標的抗原に対する K_a (平衡会合定数)に起因し得るか、または上記野生型結合ドメインのものより低い標的抗原に対する K_d (解離定数)に起因し得るか、または上記野生型結合ドメインのものより低い標的抗原に対するオフレート(off rate)(K_{off})に起因し得る。種々のアッセイが、特定の標的を特異的に結合する本開示の結合ドメインを同定するために、ならびに結合ドメインもしくは融合タンパク質のアフィニティーを決定するために公知である(例えば、ウェスタンブロット、ELISA、およびBiacore(登録商標)分析(例えば、Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; および米国特許第5,283,173号、同第5,468,614号もしくはその均等物もまた参照のこと)。

20

30

40

【0028】

本明細書で使用される場合、「異種の」もしくは「非内因性の」もしくは「外因性の」とは、宿主細胞もしくは被験体にとって生来のものではない任意の遺伝子、タンパク質、化合物、分子もしくは活性をいうか、または宿主もしくは宿主細胞にとって生来のものであるが、構造、活性もしくはその両方が天然の分子と変異させた分子との間で異なるような、変化させたもしくは変異させた任意の遺伝子、タンパク質、化合物、分子もしくは活性である。ある種の実施形態において、異種、非内因性、もしくは外因性の分子(例えば

50

、レセプター、リガンド)は、宿主細胞もしくは被験体に対して内因性でなくてもよいが、代わりに、このような分子をコードする核酸は、結合体化、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーションなどによって宿主細胞に付加されていてもよく、ここで上記付加された核酸分子は、宿主細胞ゲノムへと組みこまれ得るか、または染色体外遺伝物質として(例えば、プラスミドもしくは他の自己複製ベクターとして)存在し得る。用語「相同な」もしくは「ホモログ」とは、ある宿主細胞、種もしくは系統において見出されるかもしくはこれらから得られる分子もしくは活性をいう。例えば、異種もしくは外因性の分子または上記分子をコードする遺伝子は、それぞれ、天然の宿主もしくは宿主細胞分子もしくは上記分子をコードする遺伝子にとって相同であり得るが、変化した構造、配列、発現レベルもしくはその組み合わせを有し得る。非内因性の分子は、同じ種、異なる種もしくはその組み合わせに由来し得る。

10

【0029】

本明細書で使用される場合、用語「内因性」もしくは「天然の」とは、宿主もしくは宿主細胞に通常存在する遺伝子、タンパク質、化合物、分子もしくは活性をいう。

【0030】

本明細書で使用される場合、「タグカセット」とは、目的のタンパク質に固定されているか、融合されているかもしくはその一部である特有のペプチド配列であって、これに異種もしくは非内因性の同系結合分子(例えば、レセプター、リガンド、抗体、もしくは他の結合パートナー)が特異的に結合し得るものをいう。ここで、特にタグ化タンパク質がタンパク質もしくは他の物質の不均質な集団の一部である場合に、またはタグ化タンパク質を発現する細胞が細胞の不均質な集団(例えば、末梢血のような生物学的サンプル)の一部である場合に、結合特性は、タグ化タンパク質もしくはタグ化タンパク質を発現する細胞を検出、同定、単離もしくは精製、追跡、富化、または標的化するために使用され得る。ある種の実施形態において、タグ化タンパク質を発現する細胞は、異種もしくは非内因性の同系結合分子と接触させられて生物学的応答を誘発し得る(例えば、細胞活性化、細胞増殖もしくは細胞死を促進し得る)。上記提供される融合タンパク質において、上記タグカセットが上記同系結合分子によって特異的に結合される能力は、上記結合ドメインが上記標的分子に特異的に結合する能力とは別個であってもよいし、この能力に加えてであってもよい。上記タグカセットは一般に、抗原結合分子ではなく、例えば、抗体でもTCRでもこれらの抗原結合部分でもない。

20

30

【0031】

本明細書で使用される場合、「ヒンジ領域」もしくは「ヒンジ」とは、(a)免疫グロブリンヒンジ配列(例えば、アッパー領域およびコア領域から作られる)またはその機能的フラグメントもしくは改変体、(b)タイプI ICレクチンインタードメイン(ストーク(stalk))領域またはその機能的フラグメントもしくは改変体、あるいは(c)分化抗原群(CD)分子ストーク領域もしくはその機能的改変体をいう。本明細書で使用される場合、「野生型免疫グロブリンヒンジ領域」とは、抗体の重鎖において見出される、CH1ドメインとCH2との間に(IgG、IgA、およびIgDに関して)挿入されかつ接続するかまたはCH1ドメインとCH3ドメインとの間に(IgEおよびIgMに関して)挿入されかつ接続する、天然に存在するアッパーおよびミドルヒンジアミノ酸配列をいう。ある種の実施形態において、ヒンジ領域は、ヒトのヒンジ領域であり、特定の実施形態では、ヒトのIgGヒンジ領域を含む。

40

【0032】

本明細書で使用される場合、「コネクター領域」とは、融合タンパク質において2以上のタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ドメイン、領域、モジュール、カセット、モチーフもしくはこれらの任意の組み合わせを繋ぐ、1以上のタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ドメイン、領域、モジュール、カセット、モチーフもしくはこれらの任意の組み合わせをいう。例えば、コネクター領域は、2個の単鎖融合タンパク質の相互作用もしくは1個以上の結合ドメインの配置を促進するためにスーパー機能を提供し得る。その結果、得られるポリペプチド構造は、標的分子に対する

50

特異的結合アフィニティーを維持するかまたはシグナル伝達活性（例えば、エフェクタードメイン活性）を維持するかまたは両方を維持する。ある種の実施形態において、コネクタ領域は、リンカーによって接続された2つの領域、ドメイン、モチーフ、カセットもしくはモジュールの間でのコンホメーション運動（*conformational movement*）のための可撓性および余地を提供し得る、約2アミノ酸から最大で約500アミノ酸までを有するアミノ酸配列である「リンカーモジュール」を含み得る。例示的リンカーモジュールとしては、1～約10反復の $Gly_x Ser_y$ （ここでxおよびyは、独立して0～10の整数であるが、ただしxおよびyは両方が0ではない（例えば、 $(Gly_4 Ser)_2$ （配列番号67）、 $(Gly_3 Ser)_2$ （配列番号68）、 $Gly_2 Ser$ 、もしくはこれらの組み合わせ（例えば、 $(Gly_3 Ser)_2 Gly_2 Ser$ （配列番号69）））を有するものが挙げられる。ある種の他の実施形態において、コネクタ領域は、1個以上の免疫グロブリン重鎖定常領域（例えば、CH3のみもしくはCH2CH3）を含むリンカーモジュールを有し得る。さらなる実施形態において、コネクタ領域は、ヒンジ領域もしくはタグカセットを含み得る。各このようなコネクタ成分は、相互に排他的ではない。例えば、コネクタ領域は、ヒンジおよび1個以上のリンカーモジュールを含んでいてもよいし、コネクタ領域は、ヒンジ、1個以上のリンカーモジュール、および1個以上のタグカセットを含んでいてもよい。例示的コネクタ領域は、長さにおいて、例えば、約5～約500アミノ酸、もしくは約10～約350アミノ酸、もしくは約15～約100アミノ酸、もしくは約20～約75アミノ酸、もしくは約25～約35アミノ酸まで変動し得る。

10

20

【0033】

「疎水性部分」とは、本明細書で使用される場合、細胞膜の中で熱力学的に安定であり、一般に、長さにおいて約15アミノ酸～約30アミノ酸の範囲に及ぶ三次元構造を有する任意のアミノ酸配列を意味する。疎水性ドメインの構造は、ヘリックス、バレル、シート、ヘリックス、もしくはこれらの任意の組み合わせを含み得る。

【0034】

本明細書で使用される場合、「エフェクタードメイン」とは、適切なシグナルを受ける場合に細胞の中で生物学的もしくは生理学的応答を直接的もしくは間接的に促進し得る融合タンパク質もしくはレセプターの細胞内部分である。ある種の実施形態において、エフェクタードメインは、結合した場合にシグナルを受け取るタンパク質もしくはタンパク質複合体の一部であるか、またはこれは、標的分子（これは、上記エフェクタードメインからのシグナルの引き金となる）に直接結合する。エフェクタードメインは、これが1個以上のシグナル伝達ドメインもしくはモチーフ（例えば、イムノレセプターチロシンベースの活性化モチーフ（ITAM））を含む場合に、細胞応答を直接的に促進し得る。他の実施形態において、エフェクタードメインは、細胞応答を直接的に促進する1種以上の他のタンパク質と会合することによって、細胞応答を間接的に促進する。

30

【0035】

「可変領域リンカー」とは、具体的には、重鎖免疫グロブリン可変領域を軽鎖免疫グロブリン可変領域に接続するか、またはT細胞レセプターV_H鎖およびC_H鎖を接続する（例えば、V_H-C_H、V_H-C_H、V_H-V_H）か、または各V_H-C_H対、V_H-C_H対、V_H-V_H対をヒンジドメインもしくは疎水性ドメイン（これは、上記2個のサブ結合ドメインの相互作用のために十分なスペーサー機能および可撓性を提供する）を接続し、その結果、得られた単鎖ポリペプチドが抗体もしくはT細胞レセプターと同じ標的分子に対して特異的結合アフィニティーを保持する、5～約35アミノ酸配列に言及する。ある種の実施形態において、可変領域リンカーは、約10～約30アミノ酸もしくは約15～約25アミノ酸を含む。特定の実施形態において、可変領域リンカーペプチドは、1～10回反復の $Gly_x Ser_y$ （ここでxおよびyは、独立して0～10の整数であるが、ただしxおよびyは両方が0ではなく（例えば、 $Gly_4 Ser$ （配列番号10）、 $Gly_3 Ser$ （配列番号71）、 $Gly_2 Ser$ 、もしくは $(Gly_3 Ser)_n$ （ $Gly_4 Ser$ ）₁（配列番号72）、 $(Gly_3 Ser)_n$ （ $Gly_2 Ser$ ）_n

40

50

(配列番号73)、(Gly₃Ser)_n(Gly₄Ser)_n(配列番号72)、もしくは(Gly₄Ser)_n(配列番号10)(ここでnは、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10の整数である)を含み、ここで連結された可変領域は、機能的な免疫グロブリン様結合ドメイン(例えば、scFv、scTCR)を形成する。例示的可変領域リンカーとしては、配列番号44、配列番号65~69、および配列番号71~73、ならびに(Gly₄Ser)_n(配列番号10)(ここでnは、配列番号57に示されるアミノ酸配列を有するT-CHARMで見出されるように、3である)に示されるアミノ酸配列が挙げられる。

【0036】

「接合部アミノ酸」もしくは「接合部アミノ酸残基」とは、ポリペプチドの2個の隣接するモチーフ、領域もしくはドメインの間(例えば、結合ドメインと隣接するリンカー領域との間または疎水性ドメインと隣接するエフェクタードメインとの間または2個のモチーフ、領域もしくはドメインを繋ぐリンカー領域の一方の末端もしくは両方の末端に(例えば、リンカーと、隣接する結合ドメインとの間および/またはリンカーと、隣接するヒンジとの間)にある1個以上(例えば、約2~20個)のアミノ酸残基に言及する。接合部アミノ酸は、融合タンパク質の構築物設計から生じ得る(例えば、融合タンパク質をコードする核酸分子の構築の間に制限酵素部位を使用することから生じるアミノ酸残基)。例えば、単一の接合部アミノ酸、アスパラギンは、配列番号58に示される核酸配列によってコードされるT-CHARMにおいて、分泌シグナル配列をコードする核酸配列(配列番号63)とタグカセットをコードする配列(配列番号38)の間に見出されるAATコドンによってコードされる。同様に、アスパラギン(N)接合部アミノ酸は、配列番号54に示されるアミノ酸配列を有するT-CHARMで見出される、可撓性リンカーアミノ酸配列GGSSGG(配列番号65)とアミノ酸タグ配列WSHPQFEK(配列番号1)の間で見出される。

【0037】

抗体技術の分野の人々によって理解される用語は、本明細書で異なって明確に定義されなければ、各々当該分野で獲得された意味を与えられる。用語「抗体」とは、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む無傷の抗体、ならびに標的分子を結合する能力を有するかもしくは保持する無傷の抗体の抗原結合部分をいう。モノクローナル抗体もしくはその抗原結合部分は、非ヒト、キメラ、ヒト化、もしくはヒト、好ましくは、ヒト化もしくはヒトのものであり得る。免疫グロブリン構造および機能は、例えば、Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988)において総説されている。

【0038】

例えば、用語「V_L」および「V_H」とは、それぞれ、抗体軽鎖および重鎖の可変結合領域をいう。上記可変結合領域は、「相補性決定領域」(CDR)および「フレームワーク領域」(FR)として公知の不連続の十分に定義された部分領域から構成される。用語「CL」とは、「免疫グロブリン軽鎖定常領域」もしくは「軽鎖定常領域」、すなわち、抗体軽鎖由来の定常領域をいう。用語「CH」とは、「免疫グロブリン重鎖定常領域」もしくは「重鎖定常領域」であって、これは、抗体アイソタイプに依存して、CH1、CH2、およびCH3ドメイン(IgA、IgD、IgG)またはCH1、CH2、CH3、およびCH4ドメイン(IgE、IgM)へとさらに分けられ得るものをいう。「Fab」(フラグメント抗原結合)は、抗原に結合しかつ鎖間ジスルフィド結合を介して、上記軽鎖に連結された上記重鎖の可変領域およびCH1を含む、抗体の一部である。

【0039】

本明細書で使用される場合、「Fc領域部分」とは、抗体に由来する上記Fcフラグメントの重鎖定常領域セグメント(「フラグメント結晶化可能」領域もしくはFc領域)であって、1個以上の定常ドメイン(例えば、CH2、CH3、CH4、もしくはこれらの

10

20

30

40

50

任意の組み合わせ)を含み得るものをいう。ある種の実施形態において、Fc領域部分は、IgG、IgA、もしくはIgD抗体のCH2ドメインおよびCH3ドメイン、またはこれらの任意の組み合わせ、あるいはIgMもしくはIgE抗体のCH3ドメインおよびCH4ドメインならびにこれらの任意の組み合わせを含む。他の実施形態において、CH2CH3もしくはCH3CH4の構造は、同じ抗体アイソタイプに由来する部分領域ドメインを有し、ヒト(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、もしくはIgM)である(例えば、ヒトIgG1由来のCH2CH3)。背景として、Fc領域は、免疫グロブリンのエフェクター機能(例えば、ADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害)、CDC(補体依存性細胞傷害)および補体結合、Fcレセプター(例えば、CD16、CD32、FcRn)への結合、Fc領域を欠いているポリペプチドと比較してより長いインビボでの半減期、プロテインA結合、ならびにおそらくさらに胎盤通過(placental transfer))を担う(Capon et al., Nature 337:525, 1989を参照のこと)。ある種の実施形態において、本開示の融合タンパク質において見出されるFc領域部分は、これらエフェクター機能のうち1以上を媒介し得るか、または例えば、当該分野で公知の1以上の変異によってこれら活性のうち1以上もしくは全てを欠いている。

10

【0040】

さらに、抗体は、Fab領域とFc領域との間に代表的には位置するヒンジ配列を有する(しかし上記ヒンジの下側の部分は、上記Fc領域のアミノ末端部分を含み得る)。背景として、免疫グロブリンヒンジは、上記Fab部分が空間の中で自由に動くことを可能にするように、可撓性スペーサーとして作用する。定常領域とは対照的に、ヒンジは、免疫グロブリンクラス間で、そしてさらにはサブクラス間でも配列および長さの両方において変動して、構造的に多様である。例えば、ヒトIgG1ヒンジ領域は、自由に可撓性であり、これは、Fabフラグメントが対称的にそれらの軸の周りを回転しかつ2つの重鎖間ジスルフィド架橋の第1のものに中心がある球内で動くことを可能にする。比較によれば、ヒトIgG2ヒンジは比較的短く、4個の重鎖間ジスルフィド架橋によって安定化された剛性のポリプロリン二重らせんを含み、これは、可撓性を制限する。ヒトIgG3ヒンジは、その特有の伸長したヒンジ領域(IgG1ヒンジの約4倍程度の長さ)によって他のサブクラスとは異なり、62アミノ酸(21プロリンおよび11システインを含む)を含み、可撓性を欠くポリプロリン二重らせんを形成し、FabフラグメントがFcフラグメントからは比較的遠く離れているので、より大きな可撓性を提供する。ヒトIgG4ヒンジは、IgG1より短い、IgG2と同じ長さを有し、その可撓性は、IgG1とIgG2のものとの間の中間である。

20

30

「T細胞レセプター」(TCR)とは、CD3と会合して、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子に結合した抗原の認識を概して担う、T細胞(もしくはTリンパ球)の表面に見出される分子をいう。上記TCRは、大部分のT細胞において非常に可変性の鎖および鎖(それぞれ、TCRおよびTCRとしても公知)のジスルフィド結合したヘテロダイマーを有する。T細胞の小さな部分セットにおいて、上記TCRは、可変性の鎖および鎖(それぞれ、TCRおよびTCRとしても公知)のヘテロダイマーから構成される。上記TCRの各鎖は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、1個のN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1個の免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、およびC末端に短い細胞質テールを有する(Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997を参照のこと)。TCRは、本開示で使用される場合、種々の動物種(ヒト、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ヤギ、ウマ、もしくは他の哺乳動物が上げられる)に由来し得る。TCRは、細胞結合している(すなわち、膜貫通領域もしくはドメインを有する)か、または可溶性形態にあり得る。

40

【0041】

「主要組織適合遺伝子複合体分子」(MHC分子)とは、ペプチド抗原を細胞表面に送

50

達する糖タンパク質をいう。MHCクラスI分子は、膜にまたがる鎖（3つのドメインを有する）および非共有結合的に会合した2ミクログロブリンからなるヘテロダイマーである。MHCクラスII分子は、2つの膜貫通糖タンパク質であるおよびから構成され、これら両方が、膜にまたがる。各鎖は、2つのドメインを有する。MHCクラスI分子は、サイトゾルに端を発して細胞表面へとペプチドを送達する。ここでペプチド：MHC複合体は、CD8⁺ T細胞によって認識される。MHCクラスII分子は、小胞系に端を発して細胞表面へとペプチドを送達する。ここでそれらは、CD4⁺ T細胞によって認識される。MHC分子は、種々の動物種（ヒト、マウス、ラット、もしくは他の哺乳動物が挙げられる）に由来し得る。

【0042】

「ベクター」とは、別の核酸を輸送し得る核酸分子である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、もしくはファージであり得る。「発現ベクター」とは、適切な環境の中で存在する場合に、上記ベクターが有する1個以上の遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を指向し得るベクターである。

【0043】

「レトロウイルス」とは、RNAゲノムを有するウイルスである。「ガンマレトロウイルス」とは、レトロウイルス科の属をいう。例示的なガンマレトロウイルスとしては、マウス幹細胞ウイルス、マウス白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス、およびトリ細網内皮症ウイルスが挙げられる。

【0044】

「レンチウイルス」とは、分裂中の細胞および分裂していない細胞に感染し得るレトロウイルスの属をいう。レンチウイルスのいくつかの例としては、HIV（ヒト免疫不全ウイルス：HIVタイプ1、およびHIVタイプ2が挙げられる）；ウマ伝染性貧血ウイルス；ネコ免疫不全ウイルス（FIV）；ウシ免疫不全ウイルス（BIV）；ならびにサル免疫不全ウイルス（SIV）が挙げられる。

【0045】

「造血前駆細胞」は、成熟細胞タイプ（例えば、T細胞系統の細胞）へのさらなる分化が可能で、造血幹細胞もしくは胎児組織に由来する細胞である。ある種の実施形態において、CD24^{low} Lin⁻ CD117⁺ 造血前駆細胞は有用である。本明細書で定義される場合、造血前駆細胞は、胚性幹細胞を含み得、これは、上記T細胞系統の細胞へとさらに分化し得る。造血前駆細胞は、種々の動物種（ヒト、マウス、ラット、もしくは他の哺乳動物が挙げられる）に由来し得る。「胸腺細胞前駆細胞」もしくは「胸腺細胞」は、胸腺に存在する造血前駆細胞である。

【0046】

「造血幹細胞」とは、インビボで自己再生し得るか、インビトロで本質的に無制限に増殖し得、そしてT細胞系統の細胞を含む他の細胞タイプへと分化し得る未分化の造血細胞をいう。造血幹細胞は、胎児肝臓、骨髄、臍帯血から例えば単離され得るが、これらに限定されない。

【0047】

「胚性幹細胞」もしくは「ES細胞」もしくは「ESC」とは、発生中の胚の生殖細胞系へと組み込まれかつその一部になる能力を有する未分化の胚性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、造血前駆細胞、および任意の組織もしくは器官へと分化し得る。本明細書での使用に適している胚性幹細胞としては、J1 ES細胞株、129J ES細胞株、マウス幹細胞株D3（アメリカンタイプカルチャーコレクション）、129/Svマウスに由来するR1もしくはE14K細胞株、Balb/cおよびC57Bl/6マウスに由来する細胞株、およびヒト胚性幹細胞（例えば、WiCell Research Institute, WI；もしくはES cell International, Melbourne, Australiaのもの）に由来する細胞が挙げられる。

【0048】

「T細胞系統の細胞」とは、この細胞を他のリンパ系細胞ならびに赤血球系統および骨

10

20

30

40

50

髄系統の細胞から区別するT細胞またはその前駆体 (p r e c u r s o r) または前駆細胞 (p r o g e n i t o r) の少なくとも1つの表現型の特徴を示す細胞をいう。このような表現型の特徴は、T細胞に対して特異的な1種以上のタンパク質 (例えば、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$)、またはT細胞に対して特異的な生理学的、形態的、機能的もしくは免疫学的な特徴の発現を含み得る。例えば、上記T細胞系統の細胞は、T細胞系統に系統決定された前駆細胞または前駆体細胞； $CD25^+$ 未成熟および不活性化T細胞； $CD4$ もしくは $CD8$ 系統決定を受けた細胞； $CD4^+CD8^+$ 二重陽性である胸腺細胞前駆細胞；単一陽性 $CD4^+$ もしくは $CD8^+$ ；TCR もしくはTCR ；または成熟および機能的もしくは活性化T細胞であり得る。

【0049】

「核酸分子」、もしくはポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNAの形態にあり得る。これらとしては、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが挙げられる。核酸分子は、2本鎖もしくは1本鎖であり得、1本鎖の場合には、コード鎖もしくは非コード鎖 (アンチセンス鎖) であり得る。コード分子は、当該分野で公知のコード配列に同一なコード配列を有していてもよいし、遺伝コードの重複性もしくは縮重の結果として、またはスプライシングによって、同じポリペプチドをコードし得る異なるコード配列を有していてもよい。

【0050】

「処置する」もしくは「処置」または「改善する」とは、被験体 (例えば、ヒトもしくは非ヒト哺乳動物 (例えば、霊長類、ウマ、イヌ、マウス、ラット)) の疾患、障害もしくは状態の医学的管理をいう。一般に、本開示のKey - ChEMもしくはT - ChARMを発現する宿主細胞、および必要に応じてアジュバントを含む適切な用量または処置レジメンは、治療利益もしくは予防利益を誘発するために十分な量で投与される。治療的もしくは予防的 / 防止的利益としては、臨床転帰の改善；疾患と関連した症状の低減もしくは緩和；症状の発生の低下；クオリティ・オブ・ライフの改善；より長期の疾患が無い状態；疾患の程度の低減、疾患状態の安定化；疾患進行の遅延；退縮；生存；生存の長期化；またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0051】

本開示の融合タンパク質 (例えば、Key - ChEM、T - ChARM) もしくは融合タンパク質を発現する細胞の「治療上有効な量」もしくは「有効量」とは、統計的に有意な様式で処置されている疾患の1以上の症状の改善を生じるために十分な、化合物もしくは細胞の量をいう。単独で投与される、個々の活性成分もしくは単一の活性成分を発現する細胞に言及する場合、治療上有効な用量とは、その成分もしくはその成分単独を発現する細胞の効果をいう。組み合わせに言及する場合、治療上有効な用量とは、逐次的に投与されようが同時に投与されようが、活性成分の組み合わせられた量もしくは補助的活性成分と治療効果を生じる活性成分を発現する細胞との組み合わせに言及する。別の組み合わせは、2種の異なるT - ChARM、T - ChARMおよびTCR、T - ChARMおよびCAR、またはこれらの組み合わせのような1種より多くの活性成分を発現する細胞であり得る。

【0052】

さらなる定義は、本開示全体を通じて提供される。

【0053】

(Key - ChEMおよびT - ChARM)

ある種の局面において、本開示は、単鎖融合タンパク質 (Key - ChEMといわれ、疎水性部分によって接続された細胞外成分および細胞内成分を含み、ここで上記細胞外成分は、タグカセットとヒンジを含むコネクター領域とを含み、上記細胞内成分は、エフェクタードメインを含む) を提供する。ある種の実施形態において、コネクター領域は、リンカーモジュールをさらに含むか、または1個以上のタグカセットは、上記コネクター領域内に位置する。ある種の他の実施形態において、1個以上のタグカセットは、リンカーモジュールによって上記コネクター領域に連結される。

10

20

30

40

50

【0054】

さらなるKey - ChEM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：タグカセット、ヒンジを含むコネクタ領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む（例えば、図1Aおよび1Bを参照のこと）。なおさらなるKey - ChEM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：第1のコネクタ領域、タグカセット、ヒンジを含む第2のコネクタ領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む。またさらなるKey - ChEM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：第1のタグカセット、第1のコネクタ領域、第2のタグカセット、ヒンジを含む第2のコネクタ領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む（例えば、図1Cを参照のこと）。いっそうさらなるKey - ChEM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：第1のタグカセット、第1のコネクタ領域、第2のタグカセット、第2のコネクタ領域、第3のタグカセット、ヒンジを含む第3のコネクタ領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む（例えば、図1Dを参照のこと）。

10

【0055】

ある種の他のKey - ChEM実施形態において、上記融合タンパク質は、非共有結合的に会合した結合ドメイン（例えば、上記タグカセットと会合した結合ドメイン（すなわち、多重鎖T - ChARM））をさらに含む。さらに他のKey - ChEM実施形態において、上記非共有結合的に会合した結合ドメインは、二重特異的であり、ここでその第1の結合末端は、上記タグカセットに対して特異的であり、その第2の結合末端は、上記タグカセット以外の標的に対して特異的であるか、またはその第1および第2の結合末端は、両方が上記タグカセットに対して特異的である。なお他のKey - ChEM実施形態において、上記非共有結合的に会合した結合ドメインは、多重特異的であり、ここで第1の末端は、タグカセットに結合し、第2の末端は、上記タグカセット以外の1個以上の標的に対して特異的である。このような実施形態において、Key - ChEMは、マルチマータンパク質を含む。いくつかの実施形態において、1個以上の非共有結合的に会合した結合ドメインを含むこのようなKey - ChEMは、ヘテロマルチマーを含む。

20

【0056】

他の局面において、本開示は、単鎖融合タンパク質（T - ChARMといわれ、疎水性部分によって接続された細胞外成分および細胞内成分を含み、ここで上記細胞外成分は、標的を特異的に結合する結合ドメイン、タグカセット、およびヒンジを含むコネクタ領域を含み、上記細胞内成分は、エフェクタードメインを含む）を提供する。ある種の実施形態において、T - ChARM結合ドメインは、scFv、scTCR、レセプターエクストドメイン、もしくはリガンドである。

30

【0057】

さらなるT - ChARM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外結合ドメイン、タグカセット、ヒンジを含むコネクタ領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む（例えば、図1Eを参照のこと）。なおさらなるT - ChARM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外結合ドメイン、第1のコネクタ領域、タグカセット、ヒンジを含む第2のコネクタ領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む。またさらなるT - ChARM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外結合ドメイン、第1のタグカセット、第1のコネクタ領域、第2のタグカセット、ヒンジを含む第2のコネクタ領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む。いっそうさらなるT - ChARM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：細胞外結合ドメイン、第1のタグカセット、第1のコネクタ領域、第2のタグカセット、第2のコネクタ領域、第3のタグカセット、ヒンジを含む第3のコネクタ領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む。

40

50

【0058】

ある種の他のT - ChARM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：タグカセット、細胞外結合ドメイン、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む（例えば、図1Fを参照のこと）。さらに他のT - ChARM実施形態において、上記融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端へと：可変領域間に配置された（例えば、可変領域リンカーのN末端にもしくはN末端近くに、可変領域リンカーC末端にもしくはC末端近くに、または可変領域リンカーの中央部付近に埋め込まれる）タグカセットを含む可変領域リンカーを含む細胞外scFvもしくはscTCR結合ドメイン、ヒンジを含むコネクター領域、疎水性部分、およびエフェクタードメインを含む細胞内成分を含む。可変領域リンカーの中に埋め込まれる例示的なタグカセットは、GGSGSG(X)_nWSHPQFEKGGSGSG（配列番号45）を含み、ここでXは、任意選択のものであり、任意のアミノ酸であってよく、nは、0、1、2、3、4もしくは5である。配列番号54において、埋め込まれたタグを有するこのような可変領域リンカーが存在し、ここでnは1であり、Xはアスパラギン(N)である。

10

【0059】

Key - ChEMもしくはT - ChARMは、細胞に結合されていてもよいし（例えば、細胞表面に発現される）または可溶性形態にあってもよい。ある種の実施形態において、Key - ChEMもしくはT - ChARM融合タンパク質をコードする核酸分子は、ある種の細胞タイプ（例えば、T細胞）において発現を増強もしくは最大化するようにコード最適化され得る（Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135, 2006）。

20

【0060】

他の実施形態において、Key - ChEMもしくはT - ChARMは、細胞傷害性成分（例えば、化学療法薬（例えば、抗有糸分裂薬（例えば、ビンデシン）、葉酸代謝拮抗薬（antifolate）、アルキル化剤（例えば、テモゾロミド）、細菌毒素、リシン、抗ウイルス薬、放射性同位体、放射性金属）をさらに含み得、これは、癌細胞、感染した細胞もしくは他の病的な細胞を特異的に死滅させるかまたは無力にするために有用である。さらなる実施形態において、Key - ChEMもしくはT - ChARMは、検出可能な成分（例えば、ビオチン、蛍光部分、放射性核種）をさらに含み得、これは、癌細胞、感染した細胞もしくは他の組織（例えば、自己免疫攻撃を受けている組織）を追跡もしくは画像化するために有用である。なおさらなる実施形態において、Key - ChEMもしくはT - ChARMは、機能的成分（例えば、免疫刺激部分、サイトカイン、免疫モジュレーター、免疫グロブリンタンパク質など）をさらに含み得る。

30

【0061】

本開示の融合タンパク質の成分部分は、本明細書で詳細にさらに記載される。

【0062】

（タグカセット）

本開示に従う単鎖融合タンパク質（例えば、Key - ChEMもしくはT - ChARM）に含まれるタグカセットは、高アフィニティーもしくはアビディティーで同系レセプターもしくは結合パートナー（例えば、抗体）に特異的に結合し得る細胞外成分であり、ここで上記同系レセプターもしくは結合パートナーは、Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現する宿主もしくは細胞に対して異種もしくは非内因性である。単鎖融合タンパク質構造内では、タグカセットは、（a）コネクター領域に対してすぐアミノ末端側に、（b）リンカーモジュール間に配置されかつリンカーモジュールを接続して、（c）結合ドメインに対してすぐカルボキシ末端側に、（d）結合ドメイン（例えば、scFv）とエフェクタードメインとの間に挿入されかつ結合ドメインをエフェクタードメインに接続して、（e）結合ドメインのサブユニット間に挿入されかつ接続して、または（f）本開示の単鎖融合タンパク質のアミノ末端に、位置し得る。ある種の実施形態において、1個以上の接合部アミノ酸が、タグカセットと疎水性部分との間に配置されてかつこれらを

40

50

接続し得るか、またはタグカセットとコネクタ領域との間に配置されてかつこれらを接続し得るか、またはタグカセットとリンカーモジュールとの間に配置されてかつこれらを接続し得るか、またはタグカセットと結合ドメインとの間に配置されてかつこれらを接続し得る。

【0063】

例示的タグカセットとしては、Streptタグ（これは、元のStrept（登録商標）タグ、Strept（登録商標）タグII、もしくはこれらの任意の改変体をいう；例えば、米国特許第7,981,632号を参照のこと（このStreptタグは、本明細書に参考として援用される））、Hisタグ、Flagタグ（配列番号3）、Xpressタグ（配列番号4）、Aviタグ（配列番号5）、カルモジュリンタグ（配列番号19）、ポリグルタメートタグ、HAタグ（配列番号6）、Mycタグ（配列番号7）、Nusタグ、Sタグ、SBPタグ、Softag 1（配列番号9）、Softag 3（配列番号32）、V5タグ（配列番号8）、CREB結合タンパク質（CBP）、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質（MBP）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、チオレドキシントグ、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。ある種の実施形態において、タグカセットは、アミノ酸配列 Trp - Ser - His - Pro - Gln - Phe - Glu - Lys（配列番号1）もしくは Trp - Arg - His - Pro - Gln - Phe - Gly - Gly（配列番号2）を有するStreptタグである。他の実施形態において、タグカセットは、遺伝子操作されたアフィニティー部位（例えば、最小キレート化部位（例えば、HGHHG、配列番号33））であり得る。

10

20

【0064】

タグカセットは、本開示の融合タンパク質の中に複数のコピーで存在し得る。例えば、本開示の融合タンパク質は、1個、2個、3個、4個もしくは5個のタグカセット（例えば、Streptタグ）を有し得る。ある種の実施形態において、Key-ChEMもしくはT-ChARMのコネクタ領域は、1個のタグカセット、2個のタグカセット、3個のタグカセット、4個のタグカセット、もしくは5個のタグカセットを含む。上記複数のタグカセットの各々は、同じであっても異なってもよい。例示的な実施形態は、StreptタグおよびStreptタグカセット、またはHisタグおよびStreptタグカセット、またはHAタグおよびStreptタグカセット、またはMycタグおよびStreptタグカセットを有するKey-ChEMもしくはT-ChARMを含む。あるいは、Key-ChEMもしくはT-ChARMは、同じタイプもしくは同じアミノ酸配列の複数のタグカセット（例えば、2個、3個、4個もしくは5個のStreptタグカセット（例えば、StreptタグII））を有する。

30

【0065】

例えば、Key-ChEMもしくはT-ChARMは、少なくとも2個の異なるタグカセットを有し得る。いくつかの実施形態において、第1のタグカセットは、刺激シグナルを提供し得、別個の第2のタグカセットは、検出試薬と会合させるために、または抗体-毒素結合体もしくは抗体-画像化剤結合体と会合させるために使用され得る。さらなる実施形態において、上記2個以上の第1のタグカセットは、Key-ChEMもしくはT-ChARMの異なる領域に位置し得る。ある種の実施形態において、第1のタグカセットは、コネクタ領域中に位置し、第2のタグカセットは、Key-ChEMもしくはT-ChARMのアミノ末端もしくはカルボキシ末端もしくはその両方に位置する（例えば、図1Hを参照のこと）。

40

【0066】

ある種の実施形態において、タグカセットは、約5～約500アミノ酸、もしくは約6～約100アミノ酸、もしくは約7～約50アミノ酸、もしくは約8～約20アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、タグカセットは、7～10アミノ酸を有する。好ましくは、タグカセットは、非免疫原性もしくは最小限に免疫原性である。本質的に、タグカセットは、ハンドルもしくはビーコンとして機能して、Key-ChEMもしくはT-ChARMを発現する細胞の同定、富化、単離、増殖の促進、活性化、追跡、もしくは除

50

去を可能にし得る。

【 0 0 6 7 】

ある種の実施形態において、タグカセットは、本開示の融合タンパク質のコネクター領域内に位置する。例えば、コネクター領域は、タグカセットに隣接するリンカーモジュールをさらに含み得、ここで上記タグカセットを有する上記リンカーモジュールは、アミノ酸配列

【 0 0 6 8 】

【 化 1 】

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号 20), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (配列番号 21), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号 22), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (配列番号 23), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号 24) または Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (配列番号 25)

10

20

【 0 0 6 9 】

を有する。

【 0 0 7 0 】

本明細書に記載されるとおりの1個以上のタグカセットを含む単鎖融合タンパク質は、同系結合パートナーと会合し得、ここで上記同系結合パートナーは、本明細書に記載されるとおりのタグカセットを含む融合タンパク質を発現する宿主もしくは細胞に対して異種である。ある種の実施形態において、本開示の単鎖 Key - ChEMもしくはT - ChARMに存在するタグカセットは、Streptタグであり、これは、同系結合パートナーとしてストレプトアビジン、streptactinもしくはその両方を有するか、またはStreptタグに対して特異的な抗体によって認識される。ある種の実施形態において、上記同系結合パートナー(例えば、レセプター、タンパク質、抗体)は、可溶性であってもよいし、マトリクス組成物の一部であってもよいし、固体表面(例えば、プレート、ビーズ)に結合体化されてもよい。例示的な固体表面は、ビーズおよび粒子(例えば、マイクロおよびナノ)(例えば、磁性ビーズおよび粒子)を含む。

30

【 0 0 7 1 】

単鎖T - ChARM融合タンパク質実施形態において、タンパク質複合体は、融合タンパク質と同系タグカセット結合パートナーとの間で形成し得、これは、上記タグカセットと上記結合パートナーとの間の結合の結果である。ある種の実施形態において、T - ChARMは、scFvもしくはscTCR結合ドメインを含み、ここで上記タグカセットは、上記可変領域リンカー内に(上記結合ドメインサブユニット間に)位置する。他の実施形態において、T - ChARMは、上記結合ドメインのアミノ末端に位置したタグカセットを有する。このようなタンパク質複合体もしくは融合タンパク質構造において、T - ChARM結合ドメインは、その標的特異性もしくはその特異的標的結合アフィニティーを保持する。

40

【 0 0 7 2 】

(コネクター領域およびヒンジ)

本開示に従う単鎖融合タンパク質の中のヒンジを含むコネクター領域は、(a)疎水性部分に対して直ぐアミノ末端側に、(b)タグカセット(例えば、Streptタグ)とエ

50

フェクタードメインとの間に挿入されかつ接続して、(c)結合ドメインに対して直ぐカルボキシ末端側に、または(d)リンカーモジュールとエフェクタードメインとの間に挿入されかつ接続して、位置し得る。本明細書に記載されるとおりの、ヒンジを有するコネクタ領域を含む単鎖融合タンパク質は、もう1つの単鎖融合タンパク質と会合して、ダイマー(例えば、ホモダイマーもしくはヘテロダイマー)を形成し得、ここでKey-CH_{EM}もしくはT-CHARMダイマーは、同系結合パートナーを結合し得る1個以上のタグカセットを含み、T-CHARMダイマーは、その標的特異性もしくはその特異的標的結合アフィニティを保持する結合ドメインをさらに含む。

【0073】

コネクタ領域は、ヒンジのみ、リンカーモジュールのみ、ヒンジおよびリンカーモジュール、またはヒンジ、1個以上のリンカーモジュールおよび1個以上のタグカセットから構成され得る。ある種の実施形態において、リンカーモジュールは、可撓性構造を形成する約2~約20アミノ酸を含む。例示的リンカーモジュールとしては、免疫グロブリンCH₂CH₃、免疫グロブリンCH₃、もしくは1個以上のGly_xSer_y(ここでxおよびyは、独立して0~10の整数であるが、ただしxおよびyは、両方が0ではない(例えば、(Gly₄Ser)₂(配列番号67)、(Gly₃Ser)₂(配列番号68)、Gly₂Ser、もしくはこれらの組み合わせ(例えば、(Gly₃Ser)₂Gly₂Ser)(配列番号69))が挙げられる。さらなる実施形態において、コネクタ領域は、タグカセットを含む。例えば、コネクタ領域は、1~5個のタグカセットを含み、ここで各タグカセットは、(Gly_xSer_y)_n(ここでnは、1~10の整数であり、xおよびyは独立して0~10の整数であるが、ただしxおよびyは両方が0ではない)を含む1個もしくは2個のリンカーモジュールに接続される。例示的リンカーモジュールは、アミノ酸配列 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(配列番号10)、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂(配列番号11)、(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Ser(配列番号12)を有し、これらは、コネクタ領域内に任意の組み合わせで存在し得る。

【0074】

ある種の実施形態において、本開示の単鎖Key-CH_{EM}もしくはT-CHARMに存在するヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域(例えば、野生型免疫グロブリンヒンジ領域もしくはその変化した免疫グロブリンヒンジ領域)であり得る。ある種の実施形態において、ヒンジは、野生型ヒト免疫グロブリンヒンジ領域である。ある種の実施形態において、1個以上のアミノ酸残基は、融合タンパク質構築物設計の一部として野生型免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端に付加され得る。例えば、1個、2個もしくは3個のさらなる接合部アミノ酸残基は、ヒンジアミノ末端もしくはカルボキシ末端に存在し得るか、またはヒンジは、末端もしくは内部欠失を含み得、かつ1個、2個もしくは3個のさらなる接合部アミノ酸残基が付加し戻され得る。

【0075】

ある種の実施形態において、ヒンジは、変化した免疫グロブリンヒンジであり、ここで野生型免疫グロブリンヒンジ領域の中の1個以上のシステイン残基は、1個以上の他のアミノ酸残基で置換されている。例示的な変化した免疫グロブリンヒンジとしては、野生型ヒトIgG1、IgG2もしくはIgG4のヒンジの中に見出される1個、2個もしくは3個のシステイン残基が1個、2個もしくは3個の異なるアミノ酸残基(例えば、セリンもしくはアラニン)で置換されている免疫グロブリンヒトIgG1、IgG2もしくはIgG4のヒンジ領域が挙げられる。ある種の実施形態において、ヒンジポリペプチドは、野生型免疫グロブリンヒンジ領域(例えば、野生型ヒトIgG1ヒンジ、野生型ヒトIgG2ヒンジ、もしくは野生型ヒトIgG4ヒンジ)と少なくとも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

10

20

30

40

50

99%同一である配列を含むかまたはその配列である。

【0076】

さらなる実施形態において、本開示の単鎖 Key - ChEMもしくはT - ChARMに存在するヒンジは、免疫グロブリンヒンジに基づかないもしくはこれに由来しない（すなわち、野生型免疫グロブリンヒンジでも変化した免疫グロブリンヒンジでもない）ヒンジであり得る。このようなヒンジの例としては、タイプII CレクチンもしくはCD分子のストーク領域の約5～約150アミノ酸のペプチド（約8～約25アミノ酸のペプチドもしくは約7～約18アミノ酸のペプチドもしくはこれらの改変体を含む）を含む。

【0077】

タイプII CレクチンもしくはCD分子の「ストーク領域」とは、Cタイプレクチン様ドメイン（CTLD；例えば、ナチュラルキラー細胞レセプターのCTLDに類似）と疎水性部分（膜貫通ドメイン）との間に位置するタイプII CレクチンもしくはCD分子の細胞外ドメインの一部をいう。例えば、ヒトCD94（GenBankアクセッション番号AAC50291.1）の細胞外ドメインは、アミノ酸残基34～179に相当するが、上記CTLDは、アミノ酸残基61～176に相当し、その結果、上記ヒトCD94分子のストーク領域は、疎水性部分（膜貫通ドメイン）とCTLDとの間に位置するアミノ酸残基34～60を含む（Boyington et al., Immunity 10:75, 1999を参照のこと；他のストーク領域の説明に関しては、Beavil et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:753, 1992；およびFigdor et al., Nat. Rev. Immunol. 2:77, 2002もまた参照のこと）。これらタイプII CレクチンもしくはCD分子はまた、上記ストーク領域と上記膜貫通領域もしくは上記CTLDとの間に接合部アミノ酸を有し得る。別の例では、233アミノ酸ヒトNKG2Aタンパク質（GenBankアクセッション番号P26715.1）は、アミノ酸71～93の範囲に及ぶ疎水性部分（膜貫通ドメイン）およびアミノ酸94～233の範囲に及ぶ細胞外ドメインを有する。上記CTLDは、アミノ酸119～231を含み、上記ストーク領域は、アミノ酸99～116を含み、これらには、さらなる接合部アミノ酸が隣接し得る。他のタイプII CレクチンもしくはCD分子、ならびにそれらの細胞外リガンド-結合ドメイン、ストーク領域、およびCTLDは、当該分野で公知である（例えば、GenBankアクセッション番号NP_001993.2；AAH07037.1；NP_001773.1；AAL65234.1；CAA04925.1を；それぞれ、ヒトCD23、CD69、CD72、NKG2AおよびNKG2Dの配列ならびにそれらの説明について参照のこと）。

【0078】

タイプII CレクチンもしくはCD分子のストーク領域ヒンジ、もしくはこれらのフラグメントの「誘導体」は、約8～約150アミノ酸配列を含み、ここで野生型タイプII CレクチンもしくはCD分子のストーク領域の1個、2個もしくは3個のアミノ酸は、欠失、挿入、置換、もしくはこれらの任意の組み合わせを有する。例えば、誘導体は、1個以上のアミノ酸置換および/もしくはアミノ酸欠失を含み得る。ある種の実施形態において、ストーク領域の誘導体は、野生型ストーク領域配列（例えば、NKG2A、NKG2D、CD23、CD64、CD72、もしくはCD94の約8～約20アミノ酸に由来するもの）と比較してタンパク質分解切断に対してより抵抗性がある。

【0079】

ある種の実施形態において、ストーク領域ヒンジは、約7～約18アミノ酸を含み得、らせんコイルドコイル構造を形成し得る。ある種の実施形態において、ストーク領域ヒンジは、0個、1個、2個、3個、もしくは4個のシステインを含む。例示的なストーク領域ヒンジは、上記ストーク領域のフラグメント（例えば、CD69、CD72、CD94、NKG2AおよびNKG2Dのストーク領域に由来する約10～約150アミノ酸を含む部分）を含む。

【0080】

10

20

30

40

50

本開示の単鎖 Key - ChEMもしくはT - ChARMにおいて使用され得る代替のヒンジは、免疫グロブリンV様ドメインもしくは免疫グロブリンC様ドメインを接続する細胞表面レセプターの一部（ドメイン間領域）に由来する。上記細胞表面レセプターが複数のIg V様ドメインをタンデムに含むIg V様ドメインの間の領域、および上記細胞表面レセプターが複数のタンデムIg C様領域を含むIg C様ドメインの間の領域はまた、本開示の単鎖 Key - ChEMもしくはT - ChARMにおいて有用なヒンジとして企図される。ある種の実施形態において、細胞表面レセプタードメイン間領域から構成されるヒンジ配列は、1個以上のジスルフィド結合を提供して、上記Key - ChEMもしくはT - ChARMダイマー形成を安定化するために、天然に存在するかもしくは付加されたモチーフ（例えば、IgGコアヒンジ配列）をさらに含み得る。ヒンジの例としては、CD2、CD4、CD22、CD33、CD48、CD58、CD66、CD80、CD86、CD150、CD166、もしくはCD244の上記Ig V様領域とIg C様領域との間のドメイン間領域が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0081】

ある種の実施形態において、ヒンジ配列は、約5～約150アミノ酸、約5～約10アミノ酸、約10～約20アミノ酸、約20～約30アミノ酸、約30～約40アミノ酸、約40～約50アミノ酸、約50～約60アミノ酸、約5～約60アミノ酸、約5～約40アミノ酸、例えば、約8～約20アミノ酸もしくは約10～約15アミノ酸を有する。上記ヒンジは、主に可撓性であり得るが、より剛性の特徴を提供してもよいし、最小限のβ-シート構造を有する主にβ-ヘリックス構造を含んでいてもよい。

【0082】

ある種の実施形態において、ヒンジ配列は、血漿および血清中で安定であり、タンパク質分解切断に抵抗性である。例えば、IgG1アップパーヒンジ領域中の第1のリジンは、タンパク質分解切断を最小限にするために変異させられ得るかもしくは欠失させられ得、ヒンジは、接合部アミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態において、ヒンジ配列は、天然に存在するかもしくは付加されたモチーフ（例えば、1個以上のジスルフィド結合を形成して、ダイマー形成を安定化する能力を付与する免疫グロブリンヒンジコア構造CPPCP（配列番号26））を含み得る。

【0083】

（疎水性部分）

本開示の単鎖融合タンパク質（例えば、Key - ChEMもしくはT - ChARM）に含まれる疎水性部分は、本開示の融合タンパク質が細胞膜と会合し、その結果、上記融合タンパク質の一部が細胞外に位置し（例えば、タグカセット、コネクタドメイン、結合ドメイン）、一部が細胞内に位置する（例えば、エフェクタドメイン）ことを可能にする。疎水性部分は一般に、細胞膜リン脂質二重層内に配置される。ある種の実施形態において、1個以上の接合部アミノ酸は、疎水性部分とエフェクタドメインとの間に配置されてかつこれらを接続し得るか、または疎水性部分とコネクタ領域との間に配置されてかつこれらを接続し得るか、または疎水性部分とタグカセットとの間に配置されてかつこれらを接続し得る。

【0084】

ある種の実施形態において、疎水性ドメインは、膜貫通ドメイン（例えば、内在性膜タンパク質（例えば、レセプター、分化抗原群（CD）分子、酵素、輸送体、細胞接着分子など）に由来するもの）である。特定の実施形態において、疎水性部分は、CD4、CD8、CD27、もしくはCD28に由来する膜貫通ドメインである。ある種の実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号16に示されるとおりのアミノ酸を有するCD28膜貫通ドメインである。

【0085】

（エフェクタドメイン）

本開示の単鎖融合タンパク質（例えば、Key - ChEMもしくはT - ChARM）に含まれるエフェクタドメインは、細胞内成分であり、機能的シグナルを細胞に伝達し得

る。ある種の実施形態において、単鎖 Key - ChemもしくはT - ChARMは、それぞれ、第2の単鎖 Key - ChemもしくはT - ChARMとダイマー化し、ここで上記ダイマー化は、エフェクタードメインを含む上記細胞内成分が近位に存在し、かつ適切なシグナルに曝される場合にシグナル伝達を促進することを可能にする。このようなダイマータンパク質複合体を形成することに加えて、上記エフェクタードメインは、他のシグナル伝達因子（例えば、共刺激因子）とさらに会合して、細胞内シグナルを生成する多重タンパク質複合体を形成し得る。ある種の実施形態において、エフェクタードメインは、細胞応答を直接的に促進する1個以上の他のタンパク質と会合することによって、細胞応答を間接的に促進する。エフェクタードメインは、1個、2個、3個もしくはより多くのレセプターシグナル伝達ドメイン、共刺激ドメイン、もしくはこれらの組み合わせを含み得る。種々のシグナル伝達分子（例えば、シグナル伝達レセプター）のうちのいずれかに由来するエフェクタードメイン、共刺激ドメインもしくはその両方を含む任意の細胞内成分は、本開示の融合タンパク質において使用され得る。

【0086】

本開示の融合タンパク質において有用なエフェクタードメインは、以下のタンパク質に由来し得る：Wntシグナル伝達経路（例えば、LRP、Ryk、ROR2）、NOTCHシグナル伝達経路（例えば、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4）、Hedgehogシグナル伝達経路（例えば、PTCH、SMO）、レセプターチロシンキナーゼ（RTK）（例えば、上皮増殖因子（EGF）レセプターファミリー、線維芽細胞増殖因子（FGF）レセプターファミリー、肝細胞増殖因子（HGF）レセプターファミリー、インスリンレセプター（IR）ファミリー、血小板由来増殖因子（PDGF）レセプターファミリー、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）レセプターファミリー、トロポミオシン（tropomyosin）レセプターキナーゼ（Trk）レセプターファミリー、エフリン（Eph）レセプターファミリー、AXLレセプターファミリー、白血球チロシンキナーゼ（LTK）レセプターファミリー、免疫グロブリン様およびEGF様ドメインを有するチロシンキナーゼ1（tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1）（TIE）レセプターファミリー、レセプターチロシンキナーゼ様オーファン（ROR）レセプターファミリー、ジスコイジンドメイン（DDR）レセプターファミリー、トランスフェクション中再配列（rearranged during transfection）（RET）レセプターファミリー、チロシン-タンパク質キナーゼ様（PTK7）レセプターファミリー、レセプターチロシンキナーゼ関連（RYK）レセプターファミリー、筋特異的キナーゼ（MusK）レセプターファミリー）；Gプロテイン共役レセプター、GPCR（Frizzled、Smoothened）；セリン/スレオニンキナーゼレセプター（BMPR、TGF α ）；またはサイトカインレセプター（IL1R、IL2R、IL7R、IL15R）。

【0087】

ある種の実施形態において、エフェクタードメインは、リンパ球レセプターシグナル伝達ドメインを含むか、または1以上のイムノレセプターチロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を有するアミノ酸配列を含む。なおさらなる実施形態において、エフェクタードメインは、細胞質シグナル伝達タンパク質と会合する細胞質部分を含み、ここで上記細胞質シグナル伝達タンパク質は、リンパ球レセプターもしくはそのシグナル伝達ドメイン、複数のITAMを含むタンパク質、共刺激因子、またはこれらの任意の組み合わせである。

【0088】

例示的エフェクタードメインとしては、4-1BB（例えば、配列番号17）、CD3、CD3（例えば、配列番号18）、CD27、CD28（例えば、配列番号35）、CD79A、CD79B、CARD11、DAP10、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NOTCH1、Wnt、NKG2D、OX40、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76

10

20

30

40

50

、pT、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2、またはこれらの任意の組み合わせに由来するものが挙げられる。

【0089】

特定の実施形態において、本開示のKey-CHEMもしくはT-CHARMのエフェクタードメインは、CD3およびCD28であるか、CD3および4-1BBであるか、またはCD3、CD28および4-1BBである。

【0090】

(結合ドメイン)

本明細書に記載される場合、本開示のT-CHARM単鎖融合タンパク質は、標的を特異的に結合する結合ドメインを含む。上記結合ドメインによる標的の結合は、上記標的(例えば、レセプターもしくはリガンド)と別の分子との間の相互作用をブロックし得、例えば、上記標的のある種の機能(例えば、シグナル伝達)に干渉、低減もしくは除去し得るか、または標的の結合は、ある種の生物学的経路を誘発し得るか、または除去のための標的を同定し得る。

10

【0091】

結合ドメインは、目的の標的を特異的に結合する任意のペプチドであり得る。結合ドメインの供給源としては、ヒト、齧歯類、トリ、もしくはヒツジを含む種々の種に由来する抗体可変領域(これは、抗体、sFv、scFv、Fab、scFvベースのグラバボディー(grababody)、または可溶性VHドメインもしくはドメイン抗体の形態にあり得る)が挙げられる。結合ドメインのさらなる供給源としては、他の種(例えば、ラクダ科の動物(ラクダ、ヒトコブラクダ、もしくはリヤマに由来する; Ghahroudi et al., FEBS Lett. 414:521, 1997; Vincke et al., J. Biol. Chem. 284:3273, 2009; Hamers-Casterman et al., Nature 363:446, 1993 and Nguyen et al., J. Mol. Biol. 275:413, 1998)、テンジクザメ(Roux et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 95:11804, 1998)、スポットテッドラットフィッシュ(Nguyen et al., Immunogen. 54:39, 2002)、またはヤツメウナギ(Herrin et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 105:2040, 2008およびAlder et al. Nat. Immunol. 9:319, 2008))に由来する抗体の可変領域が挙げられる。これら抗体は、重鎖可変領域のみを使用して抗原結合領域を形成し得る。すなわち、これら機能的抗体は、重鎖のみのホモダイマー(「重鎖抗体」といわれる)である(Jespers et al., Nat. Biotechnol. 22:1161, 2004; Cortez-Retamozo et al., Cancer Res. 64:2853, 2004; Baral et al., Nature Med. 12:580, 2006; およびBarthelemy et al., J. Biol. Chem. 283:3639, 2008)。

20

30

【0092】

本開示の結合ドメインの代替供給源としては、ランダムペプチドライブラリーをコードする配列または以下の代替の非抗体足場のループ領域における操作された多様性のアミノ酸をコードする配列が挙げられる:例えば、scTCR(例えば、Lake et al., Int. Immunol. 11:745, 1999; Maynard et al., J. Immunol. Methods 306:51, 2005; 米国特許第8,361,794号を参照のこと)、フィブリノゲンドメイン(例えば、Weisel et al., Science 230:1388, 1985を参照のこと)、Kunitzドメイン(例えば、米国特許第6,423,498号を参照のこと)、設計されたアンキリン反復タンパク質(DARpins)(Binz et al., J. Mol. Biol. 332:489, 2003およびBinz et

40

50

al., Nat. Biotechnol. 22:575, 2004)、フィブロネクチン結合ドメイン(アドネクチンもしくはモノボディー)(Richards et al., J. Mol. Biol. 326:1475, 2003; Parker et al., Protein Eng. Des. Selec. 18:435, 2005およびHackel et al. (2008) J. Mol. Biol. 381:1238-1252)、システインノットミニタンパク質(Vita et al. (1995) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 92:6404-6408; Martin et al. (2002) Nat. Biotechnol. 21:71, 2002およびHuang et al. (2005) Structure 13:755, 2005)、テトラトリコペプチド反復ドメイン(Main et al., Structure 11:497, 2003およびCortajarena et al., ACS Chem. Biol. 3:161, 2008)、ロイシンリッチ反復ドメイン(Stump et al., J. Mol. Biol. 332:471, 2003)、リボカリンドメイン(例えば、WO 2006/095164、Beste et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 96:1898, 1999およびSchoenfeld et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 106:8198, 2009を参照のこと)、V様ドメイン(例えば、米国特許出願公開第2007/0065431号を参照のこと)、Cタイプレクチンドメイン(Zelensky and Gready, FEBS J. 272:6179, 2005; Beavil et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 89:753, 1992およびSato et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 100:7779, 2003)、mAb²もしくはFcab^{T M}(例えば、PCT特許出願公開番号WO 2007/098934; WO 2006/072620を参照のこと)、アルマジロ反復タンパク質(例えば、Madhurantakam et al., Protein Sci. 21:1015, 2012; PCT特許出願公開番号WO 2009/040338を参照のこと)、アフィリン(Ebersbach et al., J. Mol. Biol. 372:172, 2007)、アフィボディー(affibody)、アビマー(avimer)、ノッティン(knottin)、フィノマー(fynommer)、アトリマー(atrimer)、細胞傷害性T-リンパ球関連タンパク質-4(Weidle et al., Cancer Gen. Proteo. 10:155, 2013)など(Nord et al., Protein Eng. 8:601, 1995; Nord et al., Nat. Biotechnol. 15:772, 1997; Nord et al., Euro. J. Biochem. 268:4269, 2001; Binz et al., Nat. Biotechnol. 23:1257, 2005; Boersma and Plueckthun, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849, 2011)。

【0093】

本開示の結合ドメインは、本明細書に記載されるとおりにもしくは当該分野で公知の種々の方法によって生成され得る(例えば、米国特許第6,291,161号および同第6,291,158号を参照のこと)。例えば、本開示の結合ドメインは、Fabファミリーを、目的の標的に特異的に結合するFabフラグメントに関してスクリーニングすることによって同定され得る(Hoet et al., Nat. Biotechnol. 23:344, 2005を参照のこと)。さらに、従来のシステム(例えば、マウス、HuMAbマウス(登録商標)、TCマウス^{T M}、KM-マウス(登録商標)、リヤマ、ニワトリ、ラット、ハムスター、ウサギなど)において免疫原として目的の標的を使用するハイブリドーマ開発のための旧来の戦略は、本開示の結合ドメインを開発するために使用され得る。

10

20

30

40

50

【0094】

いくつかの実施形態において、結合ドメインは、目的の標的に対して特異的なV_H領域およびV_L領域を含む単鎖Fc_vフラグメント(scFv)である。ある種の実施形態において、上記V_H領域およびV_L領域は、ヒトである。例示的なV_H領域およびV_L領域としては、抗CD19特異的モノクローナル抗体FMC63のセグメントが挙げられる(例えば、それぞれ、配列番号51および52を参照のこと)。

【0095】

ある種の実施形態において、結合ドメインは、軽鎖可変領域(V_L)のアミノ酸配列(例えば、FMC63からは、配列番号52; R12からは、配列番号56)または重鎖可変領域(V_H)のアミノ酸配列(例えば、FMC63からは、配列番号51; R12からは、配列番号55)と少なくとも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%、少なくとも99.5%、もしくは100%同一である配列、またはその両方を含むかまたはその配列であり、ここで各CDRは、目的の標的(例えば、CD19、ROR1)に特異的に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメントもしくは誘導體から、ゼロ変化、もしくは最大で1、2、もしくは3つの変化を含む。

【0096】

ある種の実施形態において、本開示の結合ドメインV_H領域は、既知のモノクローナル抗体のV_Hから得られ得るかもしくはこれに基づき得、既知のモノクローナル抗体のV_Hと比較した場合に、1以上の(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10の)挿入、1以上の(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10の)欠失、1以上の(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10の)アミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換もしくは非保存的アミノ酸置換)、または上記の変化の組み合わせを含む。挿入、欠失もしくは置換は、V_H領域の中のどこかにあり得る(この領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端もしくはその両方を含むが、ただし各CDRは、ゼロ変化または最大で1、2もしくは3つの変化を含み、ただし上記改変されたV_H領域を含む結合ドメインは、その標的を、野生型結合ドメインに類似のアフィニティーでなお特異的に結合し得る)。

【0097】

さらなる実施形態において、本開示の結合ドメインにおけるV_L領域は、既知のモノクローナル抗体のV_Lから得られ得るかもしくはこれに基づき得、既知のモノクローナル抗体のV_Lと比較した場合に、1以上の(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10の)挿入、1以上の(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10の)欠失、1以上の(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10の)アミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)、または上記の変化の組み合わせを含む。挿入、欠失もしくは置換は、V_L領域の中のどこかにあり得る(この領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端もしくはその両方を含むが、ただし各CDRは、ゼロ変化または最大で1、2もしくは3つの変化を含み、ただし上記改変されたV_L領域を含む結合ドメインは、その標的を、野生型結合ドメインに類似のアフィニティーでなお特異的に結合し得る)。

【0098】

上記V_HドメインおよびV_Lドメインは、いずれかの配向において(すなわち、アミノ末端からカルボキシ末端へ、V_H-V_LもしくはV_L-V_H)配置され得、スペーサー機能を提供し得るアミノ酸配列(例えば、長さ約5~約35アミノ酸を有する)によって繋がれ得、その結果、その2つのサブ結合ドメインは相互作用して、機能的結合ドメインを形成し得る。ある種の実施形態において、V_HドメインおよびV_Lドメインを繋ぐ可変領域リンカーとしては、(Gly_nSer)_n(Gly₄Ser)₁(配列番号72)、(Gly₃Ser)₁(Gly₄Ser)_n(配列番号72)、(Gly₃Ser)_n(Gly₄Ser)_n(配列番号72)、もしくは(Gly₄Ser)_n(配列番号10)(ここでnは、1~5の整数である)が挙げられる。ある種の実施形態において、上記リンカーは、(Gly-Gly-G

10

20

30

40

50

ly - Gly - Ser)₃ (配列番号13) もしくは Gly - Gly - Gly - Ser)₄ (配列番号14) である。ある種の実施形態において、これら (Gly_n Ser)_n ベースのリンカーは、結合ドメインの中で上記 V_H ドメインおよび V_L ドメインを連結するために使用され、これらリンカーはまた、上記結合ドメインをコネクタ領域もしくはタグカセットへと連結するか、またはタグカセットをエフェクタードメインへと連結するために、使用され得る。ある種の他の実施形態において、タグカセットは、結合ドメインの V_H ドメインおよび V_L ドメインを連結するために使用される (Gly_n Ser)_n ベースのリンカーの一部であるかもしくはこのリンカー内に位置する。なおさらなる実施形態において、(Gly_n Ser)_n ベースのリンカーは、1個以上のタグカセットを T - ChARM 結合ドメインの N 末端に接続するために使用され得る。

10

【0099】

いくつかの実施形態において、結合ドメインは、V_H / C_H 鎖および V_L / C_L 鎖 (例えば、V_H - C_H、V_L - C_L、V_H - V_L) を含むかもしくは目的の標的 (例えば、ペプチド - MHC 複合体) に特異的な V_H - C_H、V_L - C_L、V_H - V_L 対を含む単鎖 T 細胞レセプター (scTCR) である。

【0100】

ある種の実施形態において、結合ドメインは、TCR V_H、V_L、C_H、もしくは C_L のアミノ酸配列と少なくとも 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%、少なくとも 99.5%、もしくは 100% 同一である配列を含むかまたはその配列であり、ここで各 CDR は、目的の標的に特異的に結合する TCR またはそのフラグメントもしくは誘導体からゼロ変化または最大で 1、2、もしくは 3 つの変化を含む。

20

【0101】

ある種の実施形態において、本開示の結合ドメイン V_H、V_L、C_H、もしくは C_L 領域は、既知の TCR (例えば、高アフィニティー TCR) の V_H、V_L、C_H、もしくは C_L から得られ得るかもしくはこれに基づき得、既知の TCR の V_H、V_L、C_H、もしくは C_L と比較した場合に、1以上の (例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 の) 挿入、1以上の (例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 の) 欠失、1以上の (例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 の) アミノ酸置換 (例えば、保存的アミノ酸置換もしくは非保存的アミノ酸置換)、または上記の変化の組み合わせを含む。挿入、欠失もしくは置換は、V_H、V_L、C_H、もしくは C_L 領域の中のどこかにあり得る (この領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端もしくはその両方を含むが、ただし各 CDR は、ゼロ変化または最大で 1、2 もしくは 3 つの変化を含み、ただし改変された V_H、V_L、C_H、もしくは C_L 領域を含む結合ドメインは、その標的を、野生型結合ドメインに類似のアフィニティーでなお特異的に結合し得る)。

30

【0102】

標的分子 (これは、本開示の T - ChARM 単鎖融合タンパク質に含まれる結合ドメインによって特異的に結合される) は、目的の細胞 (「標的細胞」) 上にまたは関連して見出され得る。例示的な標的細胞としては、癌細胞、自己免疫疾患もしくは障害とまたは炎症性疾患もしくは障害と関連した細胞、および感染性生物もしくは細胞 (例えば、細菌、ウイルス、ウイルス感染細胞) が挙げられる。感染性生物 (例えば、哺乳動物の寄生生物) の細胞はまた、標的細胞として企図される。

40

【0103】

ある種の実施形態において、本開示の T - ChARM 単鎖融合タンパク質の結合ドメインは、腫瘍抗原、B 細胞標的、TNF レセプタースーパーファミリーメンバー、Hedgehog ファミリーメンバー、レセプターチロシンキナーゼ、プロテオグリカン関連分子、TGF-β スーパーファミリーメンバー、Wnt 関連分子、T 細胞標的、樹状細胞標的、NK 細胞標的、単球/マクロファージ細胞標的、または血管形成標的から選択される標的を認識する。さらなる実施形態において、本開示の T - ChARM 単鎖融合タンパク質

50

の結合ドメインは、レセプタータンパク質（例えば、表在性膜レセプタータンパク質もしくは膜貫通レセプタータンパク質）を結合する。

【0104】

ある種の実施形態において、本開示の T - ChARM 単鎖融合タンパク質は、標的、例えば、CD3、CEACAM6、c-Met、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、IGF1R、GD2、O-アセチルGD2、O-アセチルGD3、GHRHR、GHR、FLT1、KDR、FLT4、CD44v6、CD151、CA125、CEA、CTLA-4、GITR、BTLA、TGFB2、TGFB1、IL6R、gp130、Lewis A、Lewis Y、TNFR1、TNFR2、PD1、PD-L1、PD-L2、HVEM、MAGE-A、メソセリン、NY-ESO-1、PSMA、RANK、ROR1、TNFRSF4、CD40、CD137、TWEAK-R、HLA、HLAに結合した腫瘍もしくは病原体由来ペプチド（例えば、hTERT、チロシナーゼ、もしくはWT-1に由来する）、LTR、LIFR、LRP5、MUC1、OSMR、TCR、TCR、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CD81、CD86、CD123、CD171、CD276、B7H4、TLR7、TLR9、PTCH1、PTCH1、Robo1、 α -フェトプロテイン（AFP）、Frizzled、OX40（CD134ともいわれる）、またはCD79bを特異的に結合する。ある種の実施形態において、本開示の T - ChARM 単鎖融合タンパク質は、感染細胞上で発現される病原体特異的分子、例えば、アデノウイルス、ブニヤウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス）、パポウイルス、パピローマウイルス（例えば、ヒトパピローマウイルス、HPV）、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、ラブドウイルス（例えば、狂犬病）、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザ）、ボックスウイルス（例えば、ワクシニア）、レオウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス（例えば、ヒト免疫不全ウイルス、HIV）、フラビウイルス（例えば、C型肝炎ウイルス、HCV；B型肝炎ウイルス、HBV）に由来する分子を特異的に結合する。

10

20

【0105】

（宿主細胞および核酸）

ある種の局面において、本開示は、本明細書に記載される Key - ChEMもしくは T - ChARMのうちのいずれか1以上をコードする核酸分子を提供する。このような核酸分子は、目的の宿主細胞（例えば、造血前駆細胞、T細胞）の中に導入するために、適切なベクター（例えば、ウイルスベクターもしくは非ウイルスプラスミドベクター）へと挿入され得る。

30

【0106】

本明細書で使用される場合、用語「組換え」もしくは「非天然の」とは、少なくとも1種の遺伝的変化を含むかまたは外因性核酸分子の導入によって改変された、生物、微生物、細胞、核酸分子、もしくはベクターであって、ここでこのような変化もしくは改変が、遺伝子操作によって導入されるものに言及する。遺伝的変化としては、例えば、タンパク質、融合タンパク質もしくは酵素をコードする発現可能な核酸分子を、または他の核酸分子の付加、欠失、置換もしくは細胞の遺伝物質の他の機能的破壊を導入する改変が挙げられる。さらなる改変は、例えば、上記改変が遺伝子もしくはオペロンの発現を変化させる非コード調節領域を含む。ある種の実施形態において、被験体から得られる細胞（例えば、T細胞）は、本明細書に記載されるとおりの Key - ChEMもしくは T - ChARMをコードする核酸を導入し、それによって上記細胞が細胞表面に位置した Key - ChEMもしくは T - ChARMを発現することによって、非天然のもしくは組換えの細胞（例えば、非天然のもしくは組換えのT細胞）へと変換され得る。

40

【0107】

コアウイルスをコードするベクターは、本明細書では「ウイルスベクター」といわれる。ヒト遺伝子治療適用のために同定されたものを含め、本開示の組成物とともに使用する

50

のに適した多数の利用可能なウイルスベクターがある (Pfeifer and Verma, Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177, 2001を参照のこと)。適切なウイルスベクターとしては、RNAウイルスベースのベクター (例えば、レトロウイルス由来ベクター、例えば、モロニーマウス白血病ウイルス (MLV) 由来ベクター) が挙げられ、より複雑なレトロウイルス由来ベクター、例えば、レンチウイルス由来ベクターが挙げられる。HIV-1由来ベクターは、このカテゴリーに属する。他の例としては、HIV-2、FIV、ウマ伝染性貧血ウイルス、SIV、およびマエディービスナウイルス (ヒツジレンチウイルス) に由来するレンチウイルスベクターが挙げられる。レトロウイルスおよびレンチウイルスのウイルスベクター、ならびにキメラ抗原レセプター導入遺伝子を含むウイルス粒子で哺乳動物宿主細胞を形質導入するためのパッケージング細胞を使用するための方法は当該分野で公知であり、例えば、米国特許第8,119,772号; Walchli et al., PLoS One 6:327930, 2011; Zhao et al., J. Immunol. 174:4415, 2005; Engels et al., Hum. Gene Ther. 14:1155, 2003; Frecha et al., Mol. Ther. 18:1748, 2010; Verhoeven et al., Methods Mol. Biol. 506:97, 2009において既に記載されている。レトロウイルスおよびレンチウイルスのベクター構築物および発現系もまた、市販されている。

10

【0108】

20

ある種の実施形態において、ウイルスベクターは、Key-CHEMをコードする非内因性核酸配列もしくは標的に特異的なT-CHARMをコードする非内因性核酸配列を導入するために使用される。ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターであり得る。ウイルスベクターはまた、形質導入のためのマーカーをコードする核酸配列を含み得る。ウイルスベクターのための形質導入マーカーは、当該分野で公知であり、薬物耐性を付与し得る選択マーカー、または検出可能なマーカー (例えば、蛍光マーカーもしくはフローサイトメトリーのような方法によって検出され得る細胞表面タンパク質) を含む。特定の実施形態において、ウイルスベクターは、緑色蛍光タンパク質、ヒトCD2の細胞外ドメインもしくは短縮型ヒトEGFR (huEGFRt; Wang et al., Blood 118:1255, 2011を参照のこと) を含む形質導入のための遺伝子マーカーをさらに含む。ウイルスベクターゲノムが、別個の転写物として宿主細胞で発現される複数の核酸配列を含む場合、上記ウイルスベクターはまた、上記2つ (もしくはより多く) の転写物の間にさらなる配列を含み得、バイシストロン性もしくはマルチシストロン性の発現を可能にする。ウイルスベクターにおいて使用されるこのような配列の例としては、内部リボソーム侵入部位 (IRES)、フーリン切断部位、ウイルス2Aペプチド、もしくはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

30

【0109】

他のベクターはまた、DNAウイルスベクター (例えば、アデノウイルスベースのベクターおよびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベースのベクターが挙げられる); 単純ヘルペスウイルス (HSV) 由来のベクター (アンプリコンベクター、複製欠損HSVおよび弱毒化HSVが挙げられる (Krisky et al., Gene Ther. 5:1517, 1998)) を含め、ポリヌクレオチド送達のために使用され得る。

40

【0110】

遺伝子治療用途のために近年開発された他のベクターはまた、本開示の組成物および方法とともに使用され得る。このようなベクターとしては、バキュロウイルスおよびウイルスに由来するもの (Jolly, D. J. 1999. Emerging Viral Vectors. pp 209-40 in Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab), もしくはプラスミドベクター (例えば、sleeping beautyトランスポゾンも

50

しくは他のトランスポゾンベクター)が挙げられる。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターもしくはプラスミドベクターは、形質導入のための遺伝子マーカー(例えば、緑色蛍光タンパク質、h u E G F R t)をさらに含む。

【0111】

ある種の実施形態において、造血前駆細胞もしくは胚性幹細胞は、本開示のKey - ChEMもしくはT - ChARMをコードする非内因性核酸分子を含むように改変される。造血前駆細胞は、胸腺細胞前駆細胞もしくは人工多能性幹細胞を含み得、これらは、胎児肝組織、骨髄、臍帯血、もしくは末梢血に由来し得るかもしくはこれらから起こり得る。上記造血前駆細胞は、ヒト、マウス、ラット、もしくは他の哺乳動物に由来し得る。特定の実施形態において、CD24^{1°} Lin⁻ CD117⁺胸腺細胞前駆細胞が使用される。

10

【0112】

ある種の実施形態において、培養条件は、本開示の融合タンパク質を発現する造血前駆細胞を、増殖もしくは分化を誘発するために十分な時間にわたって培養する工程を要する。上記細胞は、概して約3~約5日間、もしくは約4~約10日間、もしくは約5~約20日間にわたって培養物中で維持される。上記細胞が望ましい結果、すなわち、望ましい細胞組成物もしくは増殖レベルを達成するために必要な適切な時間量にわたって維持され得ることは理解される。例えば、主に未成熟かつ不活性なT細胞を含む細胞組成物を生成するために、細胞は、約5~約20日間にわたって培養物中で維持され得る。細胞は、主に成熟したT細胞を含む細胞組成物を生成するために、約20~約30日間にわたって培養物中で維持され得る。非接着性の細胞はまた、種々の時点で(例えば、約数日から約25日まで)培養物から集められ得る。ある種の実施形態において、造血幹細胞は、間質細胞株上で共培養される(米国特許第7,575,925号; Schmitt et al., Nat. Immunol. 5:410, 2004; Schmitt et al., Immunity 17:749, 2002)。

20

【0113】

造血前駆細胞の拘束(commitment)もしくは分化を促進する1種以上のサイトカインは、上記培養物に添加され得る。上記サイトカインは、ヒトであってもよいし非ヒトであってもよい。使用され得るサイトカインの代表例としては、FGFファミリーの全てのメンバー(FGF-4およびFGF-2が挙げられる); Flt-3-リガンド、幹細胞因子(SCF)、トロンボポエチン(TPO)、およびIL-7が挙げられる。サイトカインは、グリコサミノグリカン(例えば、ヘパリン硫酸)と併用され得る。

30

【0114】

いくつかの実施形態において、細胞表面に本開示の融合タンパク質を発現し得る細胞は、T細胞(ヒト、マウス、ラット、もしくは他の哺乳動物に由来する初代細胞もしくは細胞株が挙げられる)である。哺乳動物から得られる場合、T細胞は、多くの供給源(血液、骨髄、リンパ節、胸腺、または他の組織もしくは流体が挙げられる)から得られ得る。T細胞は、富化もしくは精製され得る。T細胞系統は当該分野で周知であり、これらのうちのいくつかは、Sandberg et al., Leukemia 21:230, 2000に記載されている。ある種の実施形態において、TCR鎖および鎖の内因性発現を欠いているT細胞が使用される。このようなT細胞は、TCR鎖および鎖の内因性発現を天然に欠いていてもよいし、発現をブロックする(例えば、TCR鎖および鎖を発現しないトランスジェニックマウス由来のT細胞、またはTCR鎖および鎖の発現を阻害するように操作された細胞)かもしくはTCR鎖、TCR鎖、もしくは両方の遺伝子をノックアウトするように改変されていてもよい。ある種の実施形態において、細胞表面に本開示の融合タンパク質を発現し得る細胞は、T細胞でもT細胞系統の細胞でもないが、前駆細胞、幹細胞もしくは細胞表面抗CD3を発現するように改変された細胞である。

40

【0115】

ある種の実施形態において、本開示のKey - ChEMもしくはT - ChARMを発現

50

するようにトランスフェクトされた宿主T細胞は、機能的T細胞（例えば、ウイルス特異的T細胞、腫瘍抗原特異的細胞傷害性T細胞、ナイーブT細胞、メモリーステムT細胞、セントラルもしくはエフェクターメモリーT細胞、またはCD4+ CD25+調節性T細胞）である。

【0116】

本開示のKey-ChEMもしくはT-ChARMを発現するT細胞の増殖を促進する1種以上の増殖因子サイトカインは、培養物に添加され得る。上記サイトカインは、ヒトであっても非ヒトであってもよい。T細胞増殖を促進するために使用され得る例示的増殖因子サイトカインとしては、IL2、IL15などが挙げられる。

【0117】

（使用）

本開示で記載されるとおりのKey-ChEMもしくはT-ChARMを発現する細胞で処置され得る疾患としては、癌、感染性疾患（ウイルス、細菌、原生動物の感染）、免疫疾患（例えば、自己免疫）、または加齢関連疾患（例えば、老化）が挙げられる。養子免疫および遺伝子治療は、種々のタイプの癌（Morgan et al., Science 314:126, 2006; Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009; June, J. Clin. Invest. 117:1466, 2007）および感染性疾患（Kitchen et al., PLoS One 4:38208, 2009; Rossi et al., Nat. Biotechnol. 25:1444, 2007; Zhang et al., PLoS Pathog. 6:e1001018, 2010; Luo et al., J. Mol. Med. 89:903, 2011）のための有望な処置である。

【0118】

広く種々の癌（固形腫瘍および白血病を含む）は、本明細書で開示される組成物および方法に適している。処置され得る癌の例示的タイプとしては、乳房、前立腺、および結腸の腺癌；肺の気管支原性癌の全形態；骨髓性白血病；黒色腫；肝癌；神経芽腫；乳頭腫；アブドーマ；分離腫；鰓腫；悪性カルチノイド症候群；カルチノイド心臓疾患；および癌腫（例えば、Walker癌、基底細胞癌、基底有棘細胞癌、ブラウン・ピアース癌、腺管癌、エールリッヒ腫瘍、Krebs 2、メルケル細胞癌、粘液性癌腫、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭癌、硬性癌、細気管支癌、気管支原性癌、扁平細胞癌、および移行上皮癌）が挙げられる。処置され得る癌のさらなるタイプとしては、組織球性障害；悪性組織球症；白血病；ホジキン病；免疫増殖性小腸疾患（immunoproliferative small）；非ホジキンリンパ腫；形質細胞腫；細網内皮症；黒色腫；軟骨芽細胞腫；軟骨腫；軟骨肉腫；線維腫；線維肉腫；巨細胞腫；組織球腫；脂肪腫；脂肪肉腫；中皮腫；粘液腫；粘液肉腫；骨腫；骨肉腫；脊索腫；頭蓋咽頭腫；未分化胚細胞腫；過誤腫；間葉腫；中腎腫；筋肉腫；エナメル上皮腫；セメント質腫；歯牙腫；奇形腫；胸腺腫；絨毛性腫瘍が挙げられる。さらに、以下の癌のタイプもまた、処置に適していると企画される：腺腫；胆管腫；真珠腫；円柱腫（cyclindroma）；嚢胞腺癌；嚢胞腺腫；顆粒膜細胞腫；半陰陽性卵巣腫瘍；肝癌；汗腺腫；睪島細胞腫瘍；ライディッヒ細胞腫瘍；乳頭腫；セルトリ細胞腫瘍；卵胞膜細胞腫；平滑筋腫；平滑筋肉腫；筋芽細胞腫；筋腫；筋肉腫；横紋筋腫；横紋筋肉腫；上衣腫；神経節細胞腫（ganglioneuroma）；神経膠腫；髓芽細胞腫；髓膜腫；神経鞘腫；神経芽腫；神経上皮腫；神経線維腫；神経腫；傍神経節腫；非クロム親和性傍神経節腫。処置され得る癌のタイプとしてはまた、以下が挙げられる：角化血管腫；好酸球増加随伴性血管類リンパ組織増殖症；硬化性血管腫；血管腫症；グロムス血管腫；血管内皮腫；血管腫；血管外皮細胞腫；血管肉腫；リンパ管腫；リンパ管筋腫；リンパ管肉腫；松果体腫；癌肉腫；軟骨肉腫；葉状嚢肉腫；線維肉腫；血管肉腫；平滑筋肉腫；白血肉腫（leukosarcoma）；脂肪肉腫；リンパ管肉腫；筋肉腫；粘液肉腫；卵巣癌；横紋筋肉腫；肉腫；新生物；神経線維腫症；および子宮頸部異形成。

10

20

30

40

50

【0119】

Key - ChEMもしくはT - ChARMの治療に適した種々の過剰増殖性障害を例示すると、B細胞癌（B細胞リンパ腫（例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（NHL））もしくは中枢神経系リンパ腫の種々の形態）、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、ヘアリーセル白血病、慢性骨髄性白血病のB細胞幼若化（B cell blast transformation）および骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）が挙げられる）がある。さらなるB細胞癌としては、小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病（B-cell prolymphocytic leukemia）、リンパ形質細胞性リンパ腫（lymphoplasmacytic lymphoma）、脾臓辺縁帯リンパ腫、形質細胞骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、骨外性形質細胞腫、粘膜関連リンパ組織（MALT）の節外辺縁帯B細胞性リンパ腫、節性辺縁帯B細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、縦隔性（胸腺性）大細胞型B細胞性リンパ腫（mediastinal（thymic）large B-cell lymphoma）、血管内大細胞型B細胞性リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、パーキットリンパ腫/白血病、悪性の可能性を持つB細胞増殖（B-cell proliferations of uncertain malignant potential）、リンパ腫様肉芽腫症、および移植後リンパ増殖性疾患が挙げられる。

10

【0120】

炎症性疾患および自己免疫疾患としては、以下が挙げられる：関節炎、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、変形性関節症、多発性軟骨炎、乾癬性関節炎、乾癬、皮膚炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、封入体筋炎、炎症性筋炎（inflammatory myositis）、中毒性表皮壊死症、全身性强皮症および全身性硬化症、クレスト症候群、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、呼吸窮迫症候群、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、髄膜炎、脳炎、ぶどう膜炎、大腸炎、糸球体腎炎、アレルギー状態、湿疹、喘息、T細胞の浸潤および慢性炎症応答が関わる状態、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性心筋炎、白血球接着不全症、全身性エリテマトーデス（SLE）、亜急性皮膚エリテマトーデス、円板状ループス、ループス脊髄炎、ループス脳炎、若年発症糖尿病、多発性硬化症、アレルギー性脳脊髄炎、視神経脊髄炎、リウマチ熱、シデナム舞踏病、サイトカインおよびTリンパ球によって媒介される急性および遅延型過敏症と関連する免疫応答、結核、サルコイドーシス、ヴェーゲナー肉芽腫症およびチャージストラウス病（Churg - Strauss disease）を含む肉芽腫症、顆粒球減少症、血管炎（過敏性血管炎/脈管炎、ANCAおよびリウマチ性血管炎（rheumatoid vasculitis）を含む）、再生不良性貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、自己免疫溶血性貧血（AIHA）を含む免疫溶血性貧血、悪性貧血、赤芽球ろう（PRCA）、第VII因子欠乏症、血友病A、自己免疫性好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球遊出が関わる疾患、中枢神経系（CNS）炎症障害、多臓器障害症候群（multiple organ injury syndrome）、重症筋無力症、抗原 - 抗体複合体媒介性疾患（antigen - antibody complex mediated disease）、抗糸球体基底膜抗体病（glomerular basement membrane disease）、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病、キャッスルマン症候群（Castlemans syndrome）、グッドパスチャー症候群、ランバート・イートン筋無力症症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群、固形臓器移植拒絶、移植片対宿主病（GVHD）、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、自己免疫性多内分泌腺症（autoimmune polyendocrinopathies）、血清反応陰性脊椎関節症（seronegative spondyloarthropathies）、ライター病、ステイフ・マン症候群、巨細胞性動脈炎、免疫複合体腎炎、IgA腎症、IgM多発性ニューロパチーもしくはIgM媒介性ニューロパチー、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、自己免疫性血

20

30

40

50

小板減少症、自己免疫性精巣炎および卵巣炎を含む精巣および卵巣の自己免疫疾患、原発性甲状腺機能低下症；自己免疫性内分泌疾患（自己免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎（橋本病）、亜急性甲状腺炎、特発性甲状腺機能低下症、アジソン病、グレーブス病、多腺性自己免疫症候群（もしくは多腺性内分泌腺障害症候群（polyglandular endocrinopathy syndromes））、インスリン依存性糖尿病（IDDM）ともいわれるI型糖尿病およびシーハン症候群を含む）；自己免疫性肝炎、リンパ性間質性肺炎（HIV）、閉塞性細気管支炎（非移植性）、非特異性間質性肺炎（NSIP）、ギラン・バレー症候群、大型血管炎（large vessel vasculitis）（リウマチ性多発筋痛および巨細胞性動脈炎（高安動脈炎）を含む）、中型血管炎（medium vessel vasculitis）（川崎病および結節性多発動脈炎を含む）、結節性多発動脈炎（PAN）強直性脊椎炎、パージャー病（IgA腎症）、急速進行性糸球体腎炎、原発性胆汁性肝硬変、セリアックスブルー（グルテン性腸症）、クリオグロブリン血症、肝炎と関連するクリオグロブリン血症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、冠動脈疾患、家族性地中海熱、顕微鏡的多発血管炎、コーガン症候群、ウイスコット・オルドリッチ症候群および閉塞性血栓性血管炎。

10

【0121】

特定の実施形態において、本明細書で開示されるとおりのKey-chemもしくはT-CHARMで被験体を処置するための方法は、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、および慢性骨髄性白血病を含む。

20

【0122】

感染性疾患としては、感染性因子と関連するものが挙げられ、種々の細菌（例えば、病原性E.coli、S.typhimurium、P.aeruginosa、B.anthraxis、C.botulinum、C.difficile、C.perfringens、H.pylori、V.cholerae、Listeria spp.、Rickettsia spp.、Chlamydia spp.など）、マイコプラズマ、および寄生生物（原生動物のうちの任意の公知の寄生生物メンバーが挙げられる）のうちのいずれかを含む。感染性ウイルスとしては、真核生物のウイルス（例えば、アデノウイルス、ブニヤウイルス、ヘルペスウイルス、パポウイルス、パピローマウイルス（例えば、HPV）、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、ラブドウイルス（例えば、狂犬病）、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザ）、ポックスウイルス（例えば、ワクシニア）、レオウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス（例えば、HIV）、フラビウイルス（例えば、HCV、HBV）など）が挙げられる。ある種の実施形態において、抗原がプロセッシングされかつMHCクラスI分子とともに呈示されるサイトゾルの病原体による感染は、本開示のKey-chemもしくはT-CHARMで処置される。

30

【0123】

本開示のKey-chemもしくはT-CHARMは、細胞結合形態で被験体に投与され得る（例えば、標的細胞集団（成熟T細胞（例えば、CD8⁺もしくはCD4⁺T細胞）またはT細胞系統の他の細胞）の遺伝子治療）。特定の実施形態において、被験体に投与されてKey-chemもしくはT-CHARMを発現するT細胞系統の細胞は、同一遺伝子の、同種異系の、もしくは自己由来の細胞である。他の実施形態において、Key-chemもしくはT-CHARMは、可溶性形態で被験体に投与され得る。可溶性TCRは、当該分野で公知である（例えば、Molloy et al., Curr. Opin. Pharmacol. 5:438, 2005；米国特許第6,759,243号を参照のこと）。

40

【0124】

本開示のKey-chemもしくはT-CHARMを含む薬学的組成物は、医療分野の当業者によって決定されるように処置（もしくは防止）される疾患もしくは状態に適切な様式で投与され得る。上記組成物の適切な用量、適切な継続時間、および投与頻度は、患者の状態、サイズ、疾患のタイプおよび重篤度、活性成分の特定の形態、ならびに投与方

50

法のような要因によって決定される。本開示は、本明細書で開示されるとおりの Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現する細胞および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤もしくは賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。適切な賦形剤としては、水、食塩水、デキストロース、グリセロールなどおよびこれらの組み合わせが挙げられる。

【0125】

本開示の利点は、患者に投与される Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現する細胞が、タグカセットに対する上記同系結合パートナーを使用して枯渇され得ることである。ある種の実施形態において、本開示は、上記タグカセットに対して特異的な抗体を使用するか、上記タグカセットに対して特異的な同系結合パートナーを使用するか、またはCARを発現しかつ上記タグカセットに対して特異性を有する第2のT細胞を使用することによって、Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現するT細胞を枯渇させるための方法を提供する。ある種の実施形態において、タグカセットは、本開示の Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現するT細胞の免疫枯渇 (immunodepletion) を可能にする。操作されたT細胞の除去は、タグカセットに特異的な枯渇剤を使用して達成され得る。例えば、Streptタグが使用される場合、細胞傷害性試薬 (例えば、毒素、放射性金属) に各々融合されるかもしくは結合体化された抗Streptタグ抗体、抗StreptタグscFv、もしくはStreptactinが使用されてもよいし、抗Streptタグ/抗CD3二重特異的scFv、もしくは抗StreptタグCAR T細胞が使用されてもよい。

10

【0126】

ある種の実施形態において、本開示の Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現する細胞は、ビーズ、細胞培養プレート、アガロース、もしくは任意の他の固体表面マトリクスに結合体化されている、タグカセットに対して特異性を有する抗体 (例えば、抗タグ抗体) への結合によって、またはタグカセットを特異的に結合する他のタンパク質 (例えば、上記Streptタグに結合するStreptactin) によって、同定、ソート、富化もしくは単離され得る。ある種の実施形態において、このような細胞は、アフィニティークラムを使用することによってソート、富化もしくは単離される。

20

【0127】

ある種の実施形態において、本開示は、Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現する非天然のもしくは組換えT細胞と、タグカセットに対して特異的でありかつ固体表面にもしくは生体適合性マトリクス (例えば、アルギネート、基底膜マトリクス (Matrigel (登録商標))、バイオポリマー) の一部として結合された結合ドメインとを接触させることによって、T細胞を選択的に活性化させるための方法を提供する。上記組換えT細胞は、本開示の Key - ChEMもしくはT - ChARM融合タンパク質をコードする外因性核酸分子を含む。例えば、Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現するT細胞は、上記タグカセットに特異的な同系結合パートナー (例えば、抗体) で被覆されるかもしくは結合体化されたビーズで活性化され得る。例えば、上記タグカセットがStreptタグである場合、Streptactin被覆ビーズもしくは抗Streptタグ抗体結合体化ビーズが、T細胞活性化を誘発するために使用され得る。ある種の実施形態において、上記方法は、本開示の Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現し、キメラ抗原レセプター (CAR) を必要に応じてさらに発現する組換えT細胞をエキソピボで活性化する工程を包含する。このような活性化されたT細胞は、本明細書に記載される疾患処置法において有用である。

30

40

【0128】

別の局面において、本開示は、本開示の Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現する組換えT細胞の増殖を選択的に促進するための方法を提供する。ある種の実施形態において、上記方法は、タグ結合パートナー (例えば、抗体) を使用して、Key - ChEMもしくはT - ChARMを発現するT細胞の選択的エキソピボ増殖を包含する。さらなる実施形態において、上記方法は、機能的T細胞 (例えば、ウイルス特異的、TAA (腫瘍関連抗原) 特異的CTL、もしくは特異的T細胞部分セット (例えば、ナイーブT細胞

50

胞、メモリーSTEM T細胞、セントラルもしくはエフェクターメモリーT細胞、CD4 + CD25 + 調節性T細胞)を、タグ結合パートナー(例えば、抗体)で増殖させる工程を包含し、この工程は、必要に応じて、共刺激分子結合パートナー(例えば、抗CD27もしくは抗CD28抗体)の存在下で行われ得る。ある種の実施形態において、抗タグ結合パートナーは、Key-ChEM(例えば、WntもしくはNotch Key-ChEM)形質導入された造血幹細胞、胚性幹細胞、もしくは組織幹細胞(例えば、神経幹細胞)を活性化して、自己再生させるか、増殖させるかもしくは治療用途に望ましい1以上の表現型へと分化させるために使用され得る。

【0129】

なおさらなる実施形態において、Key-ChEMもしくはT-ChARMは、本開示のKey-ChEMもしくはT-ChARMを発現する場合に、インビボでのT細胞増殖の選択的促進を可能にする。ある種の実施形態において、タグカセットを含むCARを発現するT細胞は、リガンド(例えば、T細胞サプレッサー細胞リガンドであるPD-L1、PD-L2が挙げられる)を発現する細胞を接触させる場合に、インビボで上記CAR T細胞の増殖を可能にする。このような増殖させたT細胞は、本明細書に記載される疾患処置法において有用である。ある種の実施形態において、本明細書で開示されるとおりのKey-ChEMもしくはT-ChARMを発現する細胞の増殖(proliferation)または増殖(expansion)は、インビボで誘発され、これは、タグカセット結合パートナー(例えば、抗タグ抗体)および必要に応じて共刺激分子結合パートナー(例えば、抗CD27もしくは抗CD28抗体)で誘発され得る。

【0130】

ある種のさらなる実施形態において、本明細書で開示されるとおりのKey-ChEMもしくはT-ChARMを発現する細胞は、インビボで(例えば、腫瘍の部位で)活性化される。例えば、タグカセット結合パートナー(例えば、抗タグ抗体)および共刺激分子結合パートナー(例えば、抗CD27もしくは抗CD28抗体)を含む組成物(例えば、アルギネート、基底膜マトリクス(Matrigel(登録商標))、バイオポリマー、もしくは他のマトリクス)またはキャリア(例えば、マイクロビーズ、ナノ粒子、もしくは他の固体表面)は、腫瘍(例えば、固形腫瘍)の部位で、本明細書で開示されるとおりのKey-ChEMもしくはT-ChARMを発現するT細胞を局所的に活性化するために使用され得る。

【0131】

ある種の実施形態において、Key-ChEMもしくはT-ChARMを発現する組換え細胞は、タグカセットへ特異性をもって結合する抗体(例えば、抗タグ抗体)を使用することによって、または上記タグカセット配列を特異的に結合する他の同系結合タンパク質(例えば、Streptタグに結合するStreptactin)によって、インビボで検出もしくは追跡され得、そして上記タグカセットの結合パートナーは、X線、CTスキャン、MRIスキャン、PETスキャン、超音波、フローサイトメトリー、近赤外線画像化システム、もしくは他の画像化モダリティによる検出のために、当該分野で公知の蛍光色素、放射性トレーサー、酸化鉄ナノ粒子もしくは他の画像化剤に結合体化される(例えば、Yuet al., Theranostics 2:3, 2012を参照のこと)。

【0132】

さらなる実施形態において、本開示のKey-ChEMもしくはT-ChARMを発現する細胞は、診断法もしくは画像化法(本明細書で同定される適応症もしくは状態に関連して使用される方法を含む)において使用され得る。

【実施例】

【0133】

実施例1: Key-キメラエフェクター分子(Key-ChEM)およびタグ化キメラ抗原レセプター分子(T-ChARM)、ならびにこれらの誘導体

1個以上のアフィニティータグカセットを含む例示的キメラ融合タンパク質は、図1に

10

20

30

40

50

図示される。上記タグカセットは、概して小さく（すなわち、最小限に免疫原性もしくは非免疫原性）、宿主もしくは宿主細胞に対して内因性のいかなる分子とも会合も結合もしない。上記タグは、異種の同系レセプター（例えば、リガンド、抗体、もしくは他の結合パートナー）に特異的に結合し、その結合は、種々の細胞経路のうちいずれかにアクセスしかつこれを操作する（すなわち、スイッチを入れるかもしくは切るかまたは調節する）ための「鍵」（本明細書ではKey-ChEMともいわれる）として、これらキメラエフェクター分子（ChEM）の状況において使用され得る。これらタグ化キメラ融合タンパク質は、特定の標的（例えば、腫瘍抗原）に特異的な結合ドメインをさらに含み得る。例えば、上記タグ化キメラ融合タンパク質は、キメラ抗原レセプター分子（本明細書ではT-ChARMともいわれる）を含む。

10

【0134】

Key-ChEM（図1A）をコードする例示的核酸分子は、以下のエレメントを（5' 3'に）含む：Strepタグ（登録商標）II（配列番号1に示されるとおりのペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lysをコードする配列番号38）、リンカーモジュール（配列番号11に示されるとおりのペプチド（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser）₂をコードする配列番号42）および改変されたIgG4ヒンジ（配列番号15に示されるとおりのペプチドGlu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Cys-Proをコードする配列番号27）を含むコネクター部分、CD28膜貫通ドメイン（配列番号16に示されるとおりのペプチドをコードする配列番号27）、ならびに4-1BB部分（配列番号17に示されるとおりのペプチドをコードする配列番号29）およびCD3部分（配列番号18に示されるとおりのペプチドをコードする配列番号30；Kowolik et al., Cancer Res. 66:10995, 2006）を含むエフェクタードメインを含む細胞内成分。このKey-ChEM（単一タグ）コード核酸分子を、Yam et al. (Mol. Ther. 5:479, 2002)およびWang et al. (Blood 118:1255, 2011)によって記載されるとおりに、epHIV7レンチウイルスベクターへとクローニングした。

20

【0135】

上記epHIV7レンチウイルスベクターを、pHIV7のサイトメガロウイルスプロモーターをEF-1プロモーターで置換することによって、pHIV7ベクターから得た（Wang et al., 2011; Yam et al., 2002）。上記レンチウイルスベクターはまた、細胞外N末端リガンド結合ドメインおよび細胞内レセプターチロシンキナーゼ活性を欠いているが、天然のアミノ酸配列、I型膜貫通細胞表面局在化、および抗EGFRモノクローナル抗体セツキシマブ（Wang et al., 2011）に対するコンホメーションとして無傷な結合エピトープを保持する、短縮型ヒトEGFRポリペプチド（huEGFRt）をコードする。上記レンチウイルスベクターは、自己切断T2A配列（Szymczak et al., Nat. Biotechnol. 22:589, 2004）によって分離されているKey-ChEMおよびhuEGFRt（ここで上記huEGFRtは、抗ビオチン免疫磁性マイクロビーズとともにビオチン化セツキシマブを使用することによって、Key-ChEM陽性細胞に対する代替の選択エピトープとして働く）を協調して発現する。

30

40

【0136】

T-ChARM（図1E）をコードする例示的核酸分子は、以下のエレメントを含む：CD19特異的FMC63モノクローナル抗体のVHおよびVL遺伝子セグメントを含むscFv（配列番号36；Wang et al., 2011）、Strepタグ（登録商標）II（配列番号38、配列番号1に示されるとおりのペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lysをコードする）、リンカーモジュール（配列番号11に示されるとおりのペプチド（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser）₂をコードする配列番号39、40もしくは41）およびIgG4ヒンジ（配列番号27）を含むコネクター部分、CD28膜貫通ドメイン（配列番号28）、ならびに4-

50

1BB部分(配列番号29)およびCD3部分(配列番号30)を含むエフェクタードメインを含む細胞内成分。2個のタグを含む例示的T-CHARM(T-CHARM²)は、第1と第2のStreptタグとの間に第2のリンカーモジュール(配列番号12に示されるとおりのペプチド(Gly-Gly-Gly-Ser)₂-Gly-Gly-Serをコードする)を含むことによって、上記単一タグT-CHARM(T-CHARM¹)とは異なる。3個のタグを含む例示的T-CHARM(T-CHARM³)は、第2と第3のStreptタグとの間に第3のリンカーモジュール(配列番号11に示されるとおりのペプチド(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂をコードする)を含むことによって、上記二重タグT-CHARMとは異なる。ある種の実施形態において、scFvは、配列番号57に示されるとおりのROR1特異的R12モノクローナル抗体(Yanget al., PLoS One 6:e21018, 2011)のVHおよびVL領域、ならびに配列番号13に示されるとおりの可変ドメインリンカーを含む。さらに、抗CD19および抗ROR1 T-CHARMは両方とも、4-1BB部分の代わりにCD28部分(配列番号35)を含むエフェクタードメインを含む細胞内成分で代替的に構築した。

10

【0137】

ある種の実施形態において、本明細書に記載される融合タンパク質のうちのいずれも、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下を含む：細胞外scFvもしくはscTCR結合ドメイン、タグカセット、IgGヒンジを含むコネクタ領域、膜貫通ドメイン、ならびにエフェクタードメインを含む細胞内成分。いくつかの実施形態において、エフェクタードメインは、4-1BBおよびCD3、CD27およびCD3、CD28およびCD3、OX40およびCD3、CD28、4-1BBおよびCD3、OX40、4-1BBおよびCD3、またはCD28、OX40およびCD3という対合を含む。本明細書で定義される場合、これら分子のうちのいずれかに関するエフェクタードメインは、細胞内部分全体を含んでいてもよいし、選択された分子のエフェクター部分のみを含んでいてもよい。

20

【0138】

N末端タグを有するT-CHARM(N¹CHARM;図1F;配列番号58)をコードする例示的核酸分子は、以下のエレメントを含む：分泌シグナル配列(配列番号47に示されるとおりのペプチドMLLLVTSLLLCLELPHPAFLLIIP(これは、成熟タンパク質から切断される)をコードする配列番号63)、アスパラギン接合部アミノ酸、Streptタグ(登録商標)II(配列番号1に示されるとおりのペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lysをコードする配列番号38)、リンカーモジュール(配列番号11に示されるとおりのペプチド(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂をコードする配列番号42)、CD19特異的FMC63モノクローナル抗体のVHおよびVL遺伝子セグメントのscFv(配列番号36;Wanget al., 2011)、IgG4ヒンジ(配列番号27)、CD28膜貫通ドメイン(配列番号28)、ならびに4-1BB部分(配列番号29)およびCD3部分(配列番号30)を含むエフェクタードメインを含む細胞内成分。

30

【0139】

可変領域リンカーに埋め込まれたタグを有するT-CHARM(Ch¹ARM;図1G;配列番号59)をコードする例示的核酸分子は、以下のエレメントを含む：分泌シグナル配列(配列番号47に示されるとおりのペプチドMLLLVTSLLLCLELPHPAFLLIIP(これは、成熟タンパク質から切断される)をコードする配列番号63)、CD19特異的FMC63モノクローナル抗体のVH遺伝子セグメント(配列番号51に示されるとおりのアミノ酸配列をコードする)、第1のリンカーモジュール(配列番号65に示される通りのペプチドGly-Gly-Ser-Gly-Ser-Glyをコードする)、アスパラギン接合部アミノ酸、Streptタグ(登録商標)II(配列番号1に示されるとおりのペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lysをコードする配列番号38)、第2のリンカーモジュール(配列番号66に示される

40

50

とおりのペプチド Gly - Ser - Gly - Ser - Gly をコードする)、CD19 特異的 FMC63 モノクローナル抗体の VL 遺伝子セグメント (配列番号 52 に示されるとおりのアミノ酸配列をコードする)、IgG4 ヒンジ (配列番号 27)、CD28 膜貫通ドメイン (配列番号 28)、ならびに 4-1BB 部分 (配列番号 29) および CD3 部分 (配列番号 30) を含むエフェクタードメインを含む細胞内成分。

【0140】

これら例示的 T - ChARM (例えば、単一、二重もしくは三重タグ化した、N末端タグ化した、埋め込まれたタグ、示された scFv) の各々をコードする核酸分子を、Yam et al. (Mol. Ther. 5:479, 2002) によって記載されるように ePHIV7 レンチウイルスベクターへと個々にクローニングし、本明細書中の実施例に記載されるように T 細胞を形質導入するために使用した。ある種の実施形態において、本開示の Key - ChARM をコードする核酸分子を、上記 ePHIV7 レンチウイルスベクターへとクローニングする前にコドン最適化した。上記 T - ChARM コード レンチウイルス上清を、Calphostin 転スフェクション試薬 (Clontech, Mountain View, CA) を使用して、上記 レンチウイルスベクタープラスミドの各々ならびにパッケージングベクター pCHGP-2、pCMV-Rev2 および pCMV-G で共トランスフェクトした 293T 細胞において生成した。培地をトランスフェクションの 16 時間後に交換し、レンチウイルスを 24 時間、48 時間および 72 時間後に集めた。

10

【0141】

実施例 2: 組換え T 細胞の生成および T - ChARM の発現

CD8+ および CD4+ を、CD8+ / CD4+ T 細胞単離キット (Miltenyi Biotec) を使用して正常なドナーの PBMC から単離し、抗 CD3 / CD28 ビーズ (Life Technologies) で製造業者の説明に従って活性化し、0.8 μg/mL ポリブレン (Millipore, Bedford, MA) を補充した レンチウイルス上清 (各実施例に記載されるとおり) (MOI = 3) で、2,100 rpm において 45 分間、32 での遠心分離による活性化後 3 日目に、形質導入した。T 細胞を、組換えヒト (rh) IL-2 を終濃度 50 U/mL まで 48 時間毎に補充した、RPMI、10% ヒト血清、2 mM L-グルタミン および 1% ペニシリン - ストレプトマイシン (CTL 培地) 中で増殖させた。増殖後、各形質導入した T 細胞系統のアリコート を、ビオチン結合体化抗 EGFR 抗体 および ストレプトアビジン - PE (Miltenyi, Auburn, CA) で染色した。上記 tEGFR+ T 細胞を、FACS - Aria 細胞ソーター (Becton Dickinson) でソートすることによって単離した。上記 tEGFR+ T 細胞部分セットを、その後、T 細胞 : LCL 比 1 : 7 の照射した (8,000 ラド) CD19+ B - LCL で刺激し、48 時間毎に 50 U/mL rh IL-2 を追加しながら 8 日間にわたって CTL 培地中で、または R12 T - ChARM のための迅速増殖プロトコル (Riddell and Greenberg, J. Immunol. Methods 128:189, 1990) を使用して増殖させた。

20

30

【0142】

以下の結合体化抗体を、フローサイトメトリーによる表現型決定および分析のために使用した: CD4、CD8、CD25、CD137、CD45、アネキシン V、CD62L、CD27、CD28 (BD Biosciences)、抗 Strep タグ II 抗体 (Genscript)、EGFR 抗体 (ImClone Systems Incorporated, Branchburg, NJ); strepTavidin - PE (BD Biosciences, San Jose, CA)。ヨウ化プロピジウム (PI, BD Biosciences) での染色を、生細胞 / 死細胞弁別のために製造業者によって指示されるとおりに行った。フロー分析を、FACS Canto II で、ソート - 精製を FACS Aria II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) で行い、FlowJo ソフトウェア (TreeSt

40

50

ar, Ashland, OR) を使用してデータを分析した。

【0143】

T-ChARMの細胞表面発現を調べるために、形質導入したT細胞を、EGFRt発現に関してソートし、蛍光色素標識抗StreptagmAbでの染色によって評価した。EGFR染色の平均蛍光強度(MFI)は、T-ChARMおよびCD19-短CARの各々で形質導入したT細胞に関して類似であり、このことは、タグをCARへと導入して、ChARMを生成することが、導入遺伝子発現に干渉しなかったことを示す(図21)。抗StreptagmAbは、各ChARMにおけるタグ配列の位置もしくは数とは無関係に、上記種々のT-ChARMで形質導入したT細胞を特異的に染色した。抗StreptagmAb染色のMFIは、T-ChARM¹と比較して、抗体-蛍光色素結合体を結合するための各T-ChARM²およびT-ChARM³上のより多くの部位におそらく起因して、T-ChARM²およびT-ChARM³で形質導入したT細胞に関してより高かった(図21)。

10

【0144】

実施例3: T-ChARMを発現するT細胞の細胞溶解活性

抗CD19(scFv) T-ChARM¹、T-ChARM²、もしくはT-ChARM³を発現するように操作されたCD8+ バルクT細胞のインビトロエフェクター機能を、クロム放出アッセイにおいて、それぞれ、種々の長さ、すなわち、IgG4ヒンジのみ(短)、IgG4CH3およびヒンジ(中間)、およびIgG4CH2CH3とヒンジ(長)のコネクター領域を含む抗CD19CARを発現するように操作されたT細胞のエフェクター機能と比較した。簡潔には、標的細胞を⁵¹Cr(PerkinElmer, Norwalk, CT)で一晩標識し、洗浄し、1~2×10³細胞/ウェルにおいてエフェクターT細胞とともに、種々のエフェクター対標的(E:T)比で、三連でインキュベートした。上清を、4時間インキュベートした後、カウントのために採取し、標準式を使用して特異的溶解(specific lysis)を計算した。上記使用した標的細胞は、Raji/ROR1(天然にはCD19+、関係ない抗原ROR1を発現するように形質導入した)およびK562/CD19(CD19を発現するように形質導入した)であり、K562/ROR1(天然にはCD19-、関係ない抗原ROR1を発現するように形質導入した)を陰性コントロールとして使用し、LCL-OKT3細胞(細胞表面抗CD3を発現するように形質導入した)を陽性コントロールとして使用した。膜結合した抗CD3scFvを発現するように操作したリンパ芽球様細胞株(LCL)細胞(LCL-OKT3)を、T細胞系統の最大活性化能力の参照標準として使用した。なぜならこれらOKT3発現細胞は、CD3複合体を結合することによってT細胞を活性化するからである。

20

30

【0145】

上記種々の抗CD19 T-ChARMおよびCAR構築物の各々を発現するT細胞は、K562/ROR1細胞に対して細胞傷害性ではなかった(図2C)が、抗CD3発現LCL/OKT3細胞の存在下では細胞溶解性であるように活性化された(図2D)。さらに、上記T-ChARMもしくはCAR発現T細胞は、CD19+細胞、Raji細胞(図2B)およびK562/CD19(図2A)に対して特異的細胞溶解活性を付与した。類似の結果は、上記タグがT-ChARMのアミノ末端に位置する場合(^{N1}ChARM)に、もしくはscFvの中に埋め込まれている場合(VH-tag-VL; Ch¹ARM)に得られた(図22を参照のこと)。さらに、溶解の効率は、エフェクタードメインによっても(4-1BBの代わりにCD28; 図23Aを参照のこと)、結合ドメインによっても(抗CD19の代わりに抗ROR1; 図23Bを参照のこと)、使用されたタグによっても(図32は、Mycタグ化ChARMの細胞溶解効果を示す)影響されなかった。上記T-ChARM発現細胞は、上記短い、中間および長いIgG4Fcスペーサーを含むCARと同程度に効率的に、腫瘍細胞を死滅させた。

40

【0146】

実施例4: K562細胞と共培養したT-ChARMを発現するT細胞によるサイトカ

50

イン放出

サイトカイン分泌の分析のために、エフェクター（E）細胞（抗CD19 T-CHARMおよびCARを発現するT細胞）および標的（T）細胞（K562/CD19およびK562/ROR1、陰性コントロール）を、E:T比4:1において三連で共培養し、24時間インキュベートし、次いで、その上清を、多重サイトカインイムノアッセイ（Luminox（登録商標））を使用して、GM-CSF、IFN- γ 、IL-2、およびTNF- α レベルについて測定した。

【0147】

その結果（図3D）は、短いコネクター領域を有する抗CD19 CARを発現する細胞が、中間もしくは長コネクター領域を有する抗CD19 CARを発現するT細胞より、標的細胞の結合後により多量のサイトカインを生成することを示す。類似のパターンは、抗CD19 T-CHARM発現細胞で観察され、ここで（図3A）より短いリンカーおよび単一のタグを有するT-CHARM¹細胞は、T-CHARM²もしくはT-CHARM³細胞（それぞれ、2個のタグおよび3個のタグを有する）より、標的細胞の結合後により多量のサイトカインを生成する。生成されたサイトカインのレベルは、抗CD19 T-CHARMおよび抗CD19 CAR細胞に関して類似であったが、T-CHARM発現細胞は、CAR発現細胞より有意に高いレベルのIFN- γ 生成を誘発した。図3Bおよび図3Eは、サイトカイン産生が、CD19を発現しないK562細胞では誘発されなかったことを示す。図3Cおよび図3Fは、陽性コントロールの結果（これは、PMA/イオノマイシンでの刺激である）を示す。類似の結果を、N¹CHARMおよびCh¹ARM構築物を調べた場合に観察した（図24を参照のこと）。さらに、抗CD19 ChARMで形質導入したT細胞のサイトカイン産生および増殖の階層は、ChARMで使用される共刺激ドメイン（4-1BBもしくはCD28）とは無関係であった（図25）。

【0148】

実施例5：Raji B細胞リンパ腫細胞と共培養されたT-CHARM分子を発現するT細胞によるサイトカイン放出

種々の抗CD19 T-CHARMもしくはCARを発現するT細胞を、CD19+ Raji細胞とともに24時間共培養し、その上清を、多重サイトカインアッセイ（Luminox（登録商標））で試験した。サイトカイン分泌の分析のために、エフェクター（E）細胞（抗CD19 T-CHARMおよびCARを発現するT細胞）および標的（T）細胞（Raji）を、E:T比2:1において三連で共培養し、24時間インキュベートし、次いで、その上清を、多重サイトカインイムノアッセイ（Luminox（登録商標））を使用して、GM-CSF、IFN- γ 、IL-2、およびTNF- α レベルについて測定した。

【0149】

その結果は、1個、2個もしくは3個のタグカセットを有する抗CD19 T-CHARMを発現するT細胞が、従来の抗CD19 CARのうちのいずれかを発現するT細胞（図4B）と比較した場合、Raji細胞と共培養した場合に、遙かにより高いレベルのIFN- γ およびGM-CSFを生成できたことを示す（図4A）。

【0150】

実施例6：T-CHARM分子を発現するT細胞の増殖

細胞増殖の分析のために、抗CD19 T-CHARMもしくはCARを発現するT細胞を、0.2 μ M カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE, Invitrogen）で標識した。これは細胞内タンパク質に結合し、上記細胞をFITCチャンネルにおいてフローサイトメトリーによって可視化する。標識後、上記細胞を洗浄し、外因性サイトカインなしのCTL培地の中で刺激細胞とともに比4:1（K562/CD19もしくはK562/ROR1、陰性コントロール）で三連でプレートした。72時間インキュベートした後、細胞をPIで標識して、上記分析から死細胞を排除した。サンプルをフローサイトメトリーによって分析し、生きているCD3+ T細胞の細胞

10

20

30

40

50

分裂を、CFSE希釈の程度によって評価した（すなわち、色素希釈は、増殖のインジケータである。なぜなら標識の強度は、各々の細胞分裂で半分に希釈されるからである）。

【0151】

分析のために、三連の細胞をプールし、生きているCD8⁺ T細胞の増殖を測定した。最も左の列は、細胞の総数の前方散乱/側方散乱プロットであり、中央の列は、CD8⁺ T細胞でゲート制御したプロットであり、最も右の列は、CD8⁺ T細胞部分セットにおけるCFSE希釈を示すヒストグラムである（希釈が左へと増大する）。最も右の列における赤色のピークは、細胞分裂なしを示し、青色のピークは、3、2、もしくは1細胞分裂を表し、上記ヒストグラムの各々における3つの数字は、CFSEを希釈し、それぞれ、3より大きい、2、もしくは1細胞分裂をおこした細胞のパーセントを示す。このヒストグラムは、T-CHARMおよびCAR発現T細胞が、K562/CD19細胞での共培養刺激後に72時間の間に激しく増殖した（青色）が、陰性コントロール細胞K562/ROR1では増殖しなかった（赤色）ことを示す（図5）。細胞分裂の平均数は、T-CHARM³発現T細胞もしくはCAR（長）発現T細胞のいずれかと比較した場合に、T-CHARM¹発現T細胞およびT-CHARM²発現T細胞においてより高かった。同様に、増殖のレベルは、CHARMにおいて使用される共刺激ドメイン（4-1BBもしくはCD28）とは無関係であり（図26）、使用されるタグとは無関係である（図31は、Mycタグが使用される場合の等しい増殖を示す）。

10

【0152】

実施例7：T-CHARM分子を発現するT細胞のインビボ養子移入

6~8週齢の雌性NOD.CB17-Prkdcscid/J(NOD/SCID)もしくはNOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)マウスを、Jackson Laboratoryから得たか、または施設内で繁殖させた。マウスに、ホタルルシフェラーゼ(Raji-ffluc)でトランスフェクトした0.5×10⁶ Rajiリンパ腫腫瘍細胞を尾静脈を介して静脈内(i.v.)注射し、腫瘍の生着を6日間行った。7日目に、マウスに、抗CD19(scFv)T-CHARM¹、T-CHARM²、T-CHARM³、CAR(短)、CAR(中間)、およびCAR(長)ヒトT細胞のうちの一つでトランスフェクトした5×10⁶のT細胞の単回静脈内(i.v.)注射を与えた。腫瘍の生着を確認するために、Raji-ffluc接種後6日目に生体発光画像化を行った(図6A)。養子T細胞治療の抗腫瘍活性をモニターするために、生体発光画像化を、T細胞投与後の7日目(図6B)、11日目(図6C)、18日目(図6D)、および26日目(図6E)に行った。

20

30

【0153】

腫瘍細胞の生体発光画像化のために、マウスに、PBS中に再懸濁(15μg/g 体重)したルシフェリン基質(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)の腹腔内(i.p.)注射を与えた。マウスに、誘導チャンバの中でイソフルランにより麻酔し、1秒~1分間の獲得時間において小ビンギングモードでルシフェリンの注射の10分後、12分後および14分後に、Xenogen IVIS In Vivo Imaging System(Caliper Life Sciences)を使用して画像化して、不飽和画像(unsaturated image)を得た。ルシフェラーゼ活性を、Living Image Software(Caliper Life Sciences)を使用して分析し、光子フラックスを、各個々のマウスの身体全体を覆った目的の領域内で分析した。

40

【0154】

生体発光画像は、抗CD19 T-CHARM¹、T-CHARM²、もしくはT-CHARM³を発現するT細胞が抗CD19 CAR(短)もしくはCAR(中間)を発現するT細胞と同程度に効率的に腫瘍を根絶させた一方で、CAR(長)を発現するT細胞は、この特定の構築物および/もしくは標的に対してそれほど有効ではなかったことを示す(図6)。

50

【0155】

実施例8：T-CHARM分子を発現するT細胞のインビボ存続

Raji腫瘍を有するNSGマウスのコホートを、 5×10^6 抗CD19 CAR/huEGFRtもしくはT-CHARM/huEGFRt発現ヒトT細胞で処置し、3週間後に、末梢血（眼の出血）を、抗huEGFR、抗ヒトCD8、および抗ヒトCD45モノクローナル抗体を使用してフローサイトメトリーによって分析した。CD8+ huEGFRt+ (Wang et al., 2011) T細胞の頻度は、図7において生きている末梢血球のパーセンテージとして示される。検出可能なhuEGFRtのレベルは、T-CHARM発現T細胞のレベルに相関する。

【0156】

抗CD19 CAR（長）発現T細胞は三週間後に一貫して顕著ではなかったが、他の全ての抗CD19 CARおよびT-CHARM発現T細胞は、養子移入および腫瘍根絶後少なくとも3週間にわたって、NSGマウスの末梢血中で容易に検出された。これら結果は、抗CD19 CARおよびT-CHARM発現T細胞が、長期にわたってインビボで存続し得、抗腫瘍活性を媒介し得ることを示す。

【0157】

実施例9：T-CHARM分子を発現するT細胞の同定

抗CD19 T-CHARM/huEGFRt発現T細胞を、EGFR Ab-ビオチン/Streptavidin-PE、抗Streptag II-FITC、Strept-Tagactin（登録商標）-APC（アロフィコシアニン）で染色し、次いで、フローサイトメトリーによって分析した。抗CD19 CAR（短）形質導入T細胞を、コントロールとして使用した。形質導入したT-CHARMおよび抗CD19 CAR（短）T細胞は全て、抗EGFR mAbで陽性に染色された。このことは、それらが形質導入され、huEGFRtを発現したことを示す（図8A）。

【0158】

その結果は、T-CHARM² およびT-CHARM³ 形質導入T細胞が、T-CHARM細胞において発現されるタグ配列を染色した試薬で、形質導入していない細胞から容易に区別できたことを示す（図8B, C）。上記T-CHARM¹、T-CHARM² およびT-CHARM³ 形質導入T細胞は、抗Streptag II-FITC抗体で陽性に染色したが、上記抗CD19 CAR（短）形質導入T細胞は陽性に染色しなかった（図8B）。上記タグ配列のより多くのコピーを有するものが、増大した染色シグナルを有した。上記T-CHARM細胞はまた、Streptactin APCで染色した（図8C）。このことは、Streptagの場合、1種より多くの染色試薬が上記T細胞を検出するために使用され得ることを示す。

【0159】

実施例10：T-CHARM分子を発現するT細胞のソート

T-CHARM² 形質導入T細胞を、抗Streptag-FITC標識抗体で染色し、次いで、卓上型FACSセルソーター（BD FACSAria IIセルソーター、BD Biosciences, San Jose, CA）を使用してソートした。図9は、ソート前（上の行）およびソート後（下の行）の細胞集団を示す。もっとも右のパネル（ソート後）は、T-CHARM² 発現T細胞が、15.8%の細胞集団から、99%超のT-CHARM² T細胞である細胞集団まで富化されたことを示す。

【0160】

実施例11：免疫磁性選択を使用するT-CHARM分子を発現するT細胞の富化

細胞を、Streptactin-マイクロビーズもしくはナノビーズ（IBA, Goettingen, Germany）とともにインキュベートし、次いで、マグネティックセパレーターの中でMACSカラム（Miltenyi Biotec）にロードした。カラムを3ml MACS緩衝液で3回洗浄した。次いで、カラムを上記セパレーターから外し、Streptagを発現するT細胞が結合したStreptactin（登録商標）磁性ビーズを、プランジャーをカラムの中へとしっかりと押し込むことによって

10

20

30

40

50

流し出した。コントロールT細胞と混合したT - ChARM³形質導入T細胞を、以下のビーズタイプのうちの1つ：Strep - Tactinマイクロビーズ1#（一般にタンパク質精製のために使用され、サイズは約0.5~1.5μm）；Strep - Tactinマイクロビーズ2#（一般にFab Streptamers（登録商標）[Strepタグ化Fabフラグメント]での細胞単離のために使用され、サイズは約0.5μm）；Strep - Tactinナノビーズ3#（一般にMHC I Streptamers [Strepタグ化MHC Iモノマー]での細胞単離のために使用され、サイズは約100nm）で標識し；MACS（登録商標）カラム（Miltenyi）にロードし、マグネティックセパレーターへと挿入した。直接流出液および保持された画分を、抗Strepタグ - FITC標識固体で個々に染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

10

【0161】

図10の最初の行は、Strep - Tactinビーズカラムに適用される前の細胞集団を示す一方で、図10の第2の行、第3の行および第4の行は、それぞれ、ビーズカラム1#、2#、および3#を通過した後の各サンプルからの細胞集団を示す。第2の行は、いくらかの細胞喪失があったことを示し、これは、いくらかの細胞をカラムに通過させないStrep - Tactinマイクロビーズ1#のサイズに起因し得る。全体として、データは、試験したStrep - Tactinビーズのいずれのタイプも、T - ChARM発現T細胞を直接富化するために有用であったことを示す。

【0162】

実施例12：タグ結合試薬での、細胞表面T - ChARMを発現するT細胞の活性化
T細胞活性化および増殖は、T細胞抗原特異的レセプター（TCR）の結合を通じて媒介される2つのシグナルおよび共刺激シグナル、最も代表的には、CD80およびCD86によるCD28の結合を要する（Ledbetter et al., Blood 75:1531, 1990）。よって、抗CD3/CD28 mAb被覆マイクロビーズを開発して、両方の必須のシグナルを提供し、臨床適用のためにT細胞を非特異的に活性化および増殖させた（Riddell and Greenberg, 1990）。T細胞の抗CD3/CD28刺激はまた、CARをコードするレトロウイルスもしくはレンチウイルスベクターでの形質導入を促進するが、形質導入したT細胞を選択的に増殖させない。

20

30

【0163】

抗CD19 T - ChARM³で形質導入したT細胞を、いずれの処理もなし（陰性コントロール）もしくは以下の処理のうちの1つを伴って、CTL培地中で48時間培養した：（a）Strep - Tactin（登録商標）マイクロビーズ1#；（b）Strep - Tactinマイクロビーズ2#；（c）Strep - Tactinナノビーズ3#；（d）プロテインGビーズに結合体化した抗Strepタグ抗体（サイズは約2μm）；（e）抗Strepタグ抗体/抗CD28抗体二重結合体化プロテインGビーズ、または（f）照射したTM - LCL細胞と50U/ml IL2での共培養（陽性コントロール）。上記細胞が、24時間および48時間にわたって培養した後に活性化されていたか否かを決定するために、細胞を、免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーを使用して、CD25/CD69の存在について調べた。T細胞は、T細胞表面レセプターを介した活性化後に、またはCD3を発現するCARを介したシグナル伝達によって、デノボ活性化分子（CD69およびCD25を含む）を発現する。CD69は、最初期の細胞表面活性化マーカーのうちの1つであり、継続している活性化プロセスと関わっている可能性がある。CD25合成（IL2レセプター鎖）は、IL2自体とともに、最初に抗原に遭遇するときのT細胞活性化によって誘発される。

40

【0164】

上記データは、Strep - Tactinもしくは抗Strepタグ抗体被覆ビーズのいずれかを通じたT - ChARM発現T細胞のStrepタグ結合が、これらT細胞を有意に活性化したことを予測外にも示し、そしてさらには、ビーズサイズがまた、T細胞活

50

性化のレベルに対して影響を有し得ることを示す(図13)。

【0165】

さらなる構築物でのさらなる実験において、Strep-Tactinマイクロビーズは、ChARM²およびChARM³を発現するCD8⁺ T細胞(図27A)およびCD4⁺ T細胞(図27B)でのCD25アップレギュレーションを誘発したが、ChARM¹もしくはタグを欠いているCARを発現するT細胞では誘発しなかった。このことは、Strep-Tactinマイクロビーズを結合するためのChARM¹アフィニティーが、ChARMベースのT細胞活性化において最適ではないことを示す。しかし、抗Strepタグ抗体被覆マイクロビーズ(これは、Strep-Tactin($K_D = \sim 1 \mu M$)より約100倍高いStrepタグに対する結合アフィニティー($K_D = \sim 10$ nM)を有する)は、ChARMにおけるタグのコピー数もしくは位置とは無関係に、種々のChARM T細胞を活性化した(図27Aおよび図27B)。顕著なことには、Strepタグ結合媒介性活性化は、4-1BB ChARM T細胞およびCD28 ChARM T細胞(図27C)、ならびに非CD19標的化ChARM T細胞(図27D、ROR1標的化R12 ChARM¹)の両方において見出され得る。

10

【0166】

実施例13: タグ結合試薬での、細胞表面T-ChARMを発現するT細胞の増殖

抗CD19 T-ChARM¹、T-ChARM²、T-ChARM³およびCAR(長)(陰性コントロール)形質導入T細胞を、Strep-Tactin(登録商標)マイクロビーズおよび50 U/ml IL2を有するCTL培地中で個々に培養した。5日目の顕微鏡画像化から、T-ChARM²およびT-ChARM³発現T細胞が、上記ビーズの周りに大きなクラスターを驚くべきことに発生させたことが明らかになり、このことは、Strep-Tactinビーズ上での細胞増殖を示し、抗CD19 CAR(長)発現T細胞では明らかにならなかった(図11)。上記T-ChARM¹発現T細胞は、それほど大きくない細胞クラスターを示したが、陰性コントロールと比較すると、プレート上で目に見える細胞がより多く存在したので、細胞増殖は明らかであった。さらなる実験において、種々の異なるChARM発現T細胞(N¹ChARMおよびCh¹ARMを含む)は、StrepTactinマイクロビーズもしくは抗Strepタグ抗体マイクロビーズのいずれかでの刺激後ちょうど48時間以内に出現する増殖クラスターを有した(図28)。従来の短いスペーサーのCAR T細胞(CD19-Hi)を、陰性コントロールとして使用した。

20

30

【0167】

Strep-Tactin(登録商標)マイクロビーズ上で培養したT-ChARM発現T細胞の増殖曲線を決定した(図12および図29を参照のこと)。合計で約 1×10^6 抗CD19 T-ChARM¹、T-ChARM²、およびT-ChARM³形質導入T細胞を、50 U/ml IL2および5 ng/ml IL15の存在下で、Strep-Tactinマイクロビーズ、抗Strepタグ mAb、もしくは抗Strepタグ/抗CD28 mAb被覆マイクロビーズとともにCTL培地中に個々にプレートし(図28)、10日間培養した。各ウェルの細胞数を、3日目、6日目および9日目に計数した。そのデータは、T-ChARM³形質導入T細胞が、Strep-Tactinビーズによって刺激した場合に9日間にわたって最高の増殖速度を有したことを示す。Strep-Tactinビーズ刺激があると、CD8⁺もしくはCD4⁺抗CD19 ChARM-T細胞が、約20~約100倍増殖し、ChARM³ T細胞において最大の増殖が観察された(図29Aおよび図29B)。抗Strepタグおよび抗Strepタグ/抗CD28 mAb被覆ビーズは、合計ChARM T細胞数においてさらに大きな増殖(100~250倍)を誘発し、StrepTactinビーズ刺激とは異なって、ChARM¹を発現するCD8⁺およびCD4⁺ T細胞は、ChARM²もしくはChARM³を発現するT細胞より大きな増殖の傾向を示した。CD28 ChARMもしくは抗ROR1 ChARMを発現するT細胞はまた、抗Strepタグ/抗CD28ビーズで効率的に増殖した。このことは、異なる共刺激ドメインおよび異なる腫瘍標的に対す

40

50

る特異性を有するChARM⁺T細胞（データは示さず）を増殖させるためのこのアプローチの適用可能性を示す。

【0168】

別の増殖曲線アッセイにおいて、合計で約 5×10^5 抗CD19⁺T-ChARM³形質導入T細胞を、 50 U/ml IL2および以下のビーズのうちの1つ：(a) Strep-Tactinマイクロビーズ1#、(b) Strep-Tactinマイクロビーズ2#、(c) Strep-Tactinナノビーズ3#、(d) プロテインGビーズに結合体化した抗Strepタグ抗体、(e) 抗Strepタグ抗体/抗CD28抗体二重結合体化プロテインGビーズ、または(f) 抗CD3/抗CD28二重抗体ビーズ（陽性コントロール）を有するCTL培地にプレートし；7日間培養した。各ウェルの細胞数を、3日目、5日目および7日目に計数した。そのデータは、抗Strepタグ抗体/抗CD28抗体二重結合体化プロテインGビーズが、5日目までに最大のT-ChARM³発現T細胞増殖を促進し、これは、抗CD3/抗CD28陽性コントロールより有意に良好であったことを示す（図16）。Strep-Tactinマイクロビーズ2#以外の上記Strepタグ結合試薬は、抗CD3/抗CD28陽性コントロールとほぼ同じレベルまでT-ChARM³発現T細胞の増殖を促進した。

10

【0169】

T-ChARM³発現T細胞の増殖をさらに確認するために、増殖の代理尺度として、Ki-67タンパク質のレベルを測定した。Ki-67は、細胞増殖と関連してかつおそらく細胞増殖に必要とされる核タンパク質である。抗CD19⁺T-ChARM³で形質導入されたT細胞を、以下の処理のうちの1つの存在下でCTL培地中、5日間培養した：(a) Strep-Tactin（登録商標）マイクロビーズ1#；(b) Strep-Tactinマイクロビーズ2#；(c) Strep-Tactinナノビーズ3#；(d) プロテインGビーズに結合体化した抗Strepタグ抗体；(e) 抗Strepタグ抗体/抗CD28抗体二重結合体化プロテインGビーズ、または(f) 抗CD3/抗CD28二重抗体ビーズ（陽性コントロール）。5日間培養した後、上記細胞を固定し、透過性にし、抗Ki-67-FITC結合体化抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

20

【0170】

これらデータは、Strep-Tactinビーズもしくは抗Strepタグビーズが選択的細胞増殖を促進し得ることを示し、Ki-67染色によって測定した場合の増殖は、抗CD3/抗CD28陽性コントロールで観察されたものより良好であった（図14）。

30

【0171】

Ki-67タンパク質のさらなるレベルを、抗CD19⁺T-ChARM¹、T-ChARM²、もしくはT-ChARM³で形質導入したT細胞で行い、以下の存在下でCTL培地中で7日間培養した：(a) 処理なし；(b) 1×10^6 細胞あたり $15 \mu\text{g}$ 、 $50 \mu\text{g}$ 、もしくは $150 \mu\text{g}$ の用量でのStrep-Tactin（登録商標）マイクロビーズ1#；または(c) 照射したTM-LCL細胞と 50 U/ml IL2との共培養（陽性コントロール）。7日間培養した後、上記細胞を固定し、透過性にし、抗Ki-67-FITC結合体化抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。これら結果はまた、使用されるビーズの量に関わらず（特に、T-ChARM²細胞およびT-ChARM³細胞に関しては）、Strep-Tactinビーズが、T-ChARM³発現T細胞における増殖を促進し得ることを示す（図15）。さらに、T-ChARM³発現T細胞の各々は、Strep-Tactinビーズの存在下でおよび/またはTM-LCL陽性コントロール刺激より良好に増殖した。

40

【0172】

実施例14：T-ChARM分子を発現するT細胞の選択的増殖

合計で約 5×10^5 ヒトCD8⁺T細胞を、抗CD3/抗CD28ビーズで刺激した。2日目に、上記処理した細胞を、抗CD19⁺T-ChARM¹/huEGFRtを

50

コードする核酸分子を含むレンチウイルスで形質導入した。5日目に、上記抗CD3/抗CD28ビーズを除去した。この時点で、上記処理した細胞を2群に分け、一方の群にはいかなる処置もさらには行わず、他方の群は、Strep-Tactin(登録商標)マイクロビーズ(約0.5 μ m~約1.5 μ m)で処理した。10日目に、各群の細胞を採取し、免疫蛍光抗Strepタグ抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。その増殖曲線は、上記抗CD3/抗CD28ビーズの除去後に、Strep-Tactinマイクロビーズを添加すると、有意なT細胞増殖を促進し続けたことを示す(図17A)。フローサイトメトリー分析からは、コントロール群(上のパネル)と比較して、Strep-Tactinマイクロビーズ処理群(下のパネル)において、T-ChARM発現T細胞が有意により高いパーセンテージで存在していたので(huEGFRt染色によって測定される場合)、増殖していた細胞は実際に、T-ChARM発現T細胞であったことが示される(図17B)。次いで、各群の細胞を、huEGFRtマーカを使用してさらにソートし、次いで、 5.0×10^5 細胞を、CD19+ TM-LCLでの刺激によって増殖させた。StrepTactinマイクロビーズで予め処理した細胞は、コントロール群のわずか 4.0×10^6 細胞と比較して、7日間で約 8.0×10^7 細胞のレベルへと有意かつ迅速な増殖をおこした。このことは、T-ChARMのタグ配列を介するStrep-Tactinマイクロビーズ刺激後に、T-ChARMの抗CD19 s c F v成分を介する次の再刺激が、非常に有効であることを実証する。

10

【0173】

抗CD3/抗CD28ビーズ刺激が、T-ChARM発現T細胞を増殖させるために本当に必要とされたか否かを決定するために、本発明者らは、T細胞が、サイトカイン刺激のみで、T-ChARMを発現するように形質導入され、その後抗Strepタグビーズのみでの処理によって選択的に増殖され得るか否かを調べた。合計で約 5×10^5 ヒトCD8+T細胞を、5ng/mL IL-7および10ng/mL IL-15とともに24時間培養し、次いで、2タイプの抗CD19 T-ChARM³(41BBもしくはCD28エフェクタードメイン)をコードする同じ力価のウイルスで形質導入した。この形質導入した細胞を、2日目にプロテインGビーズに結合体化した抗Strepタグ抗体で処理し、次いで、7日目に採取し、免疫蛍光抗StrepタグII抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

20

【0174】

データは、プロテインGビーズに結合体化した抗Strepタグ抗体が、抗CD3/抗CD28ビーズ刺激の非存在下での培養物中の細胞の60%より高くまでT-ChARM発現T細胞の増殖を促進したことを示す(図18Bおよび18D)。形質導入した細胞が抗Strepタグ抗体ビーズに曝されなかった場合、形質導入した細胞のうちの1%未満が増殖する(図18Aおよび18C)。

30

【0175】

抗Strepタグ単独もしくは抗Strepタグ/抗CD28 mAb被覆マイクロビーズで増殖させた後のChARM T細胞の機能性を、上記ChARMを介する刺激が、インビトロもしくはインビボでの腫瘍認識に対して有害な影響を有しないことを確実にするために試験した。設計における共刺激ドメインとは無関係に、抗Strepタグマイクロビーズで増大させたChARM T細胞は、強力な細胞溶解活性を示し、サイトカインを効率的に放出し、増殖前もしくは抗原駆動増殖(TM-LCL)後の細胞と比較して、抗原刺激の間に広範な増殖能を保持した(図30A~30C)。選択的増殖の後、上記ChARM T細胞は高い生存性を有し(>90%)、そして大部分が共刺激レセプター(CD27/CD28)ならびにセントラルメモリーT細胞マーカーCD45ROおよびCD62Lの発現を保持し(図30D)、NSGマウスにおいてRaji腫瘍を除去でき(図30E)、CD19+ B細胞での刺激によって増殖したCAR T細胞も同様に持続し得た(図30F)。

40

【0176】

実施例15: T-ChARMを発現するT細胞によるサイトカイン放出に対するタグ結

50

合試薬の結合の効果

抗CD19 CAR (短) 発現T細胞 (TM-LCL 刺激によって増殖) もしくは T-CHARM¹ 発現T細胞 (TM-LCL もしくは StrepTactin マイクロビーズ 刺激によって増殖) を、24 時間にわたって Raji 細胞 (図19C)、または CD19 (図19A) もしくは ROR1 (陰性コントロール) (図19B) のいずれかを発現する K562 細胞とともに共培養した。PMA/イオノマイシンを、陽性コントロールとして 使用した (図19D)。上清を採取し、多重サイトカインアッセイ (Luminex (登録商標)) を使用して分析した。Strep-Tactin マイクロビーズで培養した抗 CD19 T-CHARM¹ 発現T細胞によるサイトカイン放出のレベルは、TM-LCL 細胞で刺激した T-CHARM¹ 発現T細胞について観察されたものより (IFN-
を除いて) 高かった (図19A、図19C、および図19D)。条件に拘わらず、K562/ROR1 細胞共培養群 (陰性コントロール) は、いかなる検出可能なサイトカインをも生じなかった (図19B)。興味深いことに、TM-LCL 刺激群と比較して、Strep-Tactin ビーズ誘発培養物において IL2 生成は有意に高いレベルであった (10 倍より高い増大)。

10

【0177】

実施例16: 抗 Strep タグ抗体と抗 CD27 もしくは抗 CD28 抗体とを組み合わせ せて増強された増殖

精製抗 CD19 T-CHARM³ 発現T細胞 (5×10^5) を、0 日目に、CTL 培地と 50 U/ml IL2 中に入れ、次いで、2 μ g G プロテイン磁性ビーズ (NEB
)、抗 Strep タグ II (0.5 μ g) / 抗 CD27 抗体 (0.5 μ g) 結合体化 G プロテインビーズ、もしくは抗 Strep タグ II (0.5 μ g) / 抗 CD28 抗体 (0.5 μ g) 結合体化 G プロテインビーズを、上記細胞培養物に添加した。上記培養培地のみの中の細胞を、陰性コントロールとして使用した。5 日目に、上記細胞を顕微鏡下で検査した。

20

【0178】

図20は、抗 Strep タグ II 抗体結合体化プロテインGビーズが、T-CHARM 発現T細胞の増殖を促進したこと、および抗 Strep タグ II と抗 CD28 抗体もしくは抗 CD27 抗体のいずれかとを組み合わせると、T-CHARM 発現T細胞の増殖をよりさらに効率的に促進することを示す。

30

【0179】

上記の種々の実施形態は、さらなる実施形態を提供するために組み合わせられ得る。本明細書で参照されるおよび/または出願データシートの中で列挙される米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許刊行物の全ては、それらの全体において本明細書に参考として援用される。上記実施形態の局面は、まださらなる実施形態を提供するために、種々の特許、出願および刊行物の概念を採用するために必要であれば、改変され得る。

【0180】

これらおよび他の変更は、上記の詳細な説明に鑑みて、上記実施形態に対して行われ得る。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、特許請求の範囲を、本明細書の中および請求項の中で開示される具体的実施形態に限定するとは解釈されるべきでなく、全ての考えられる実施形態を、このような請求項が権利を与えられる均等物の全範囲とともに含むと解釈されるべきである。よって、特許請求の範囲は、開示によって限定されるべきではない。

40

【 図 1 】

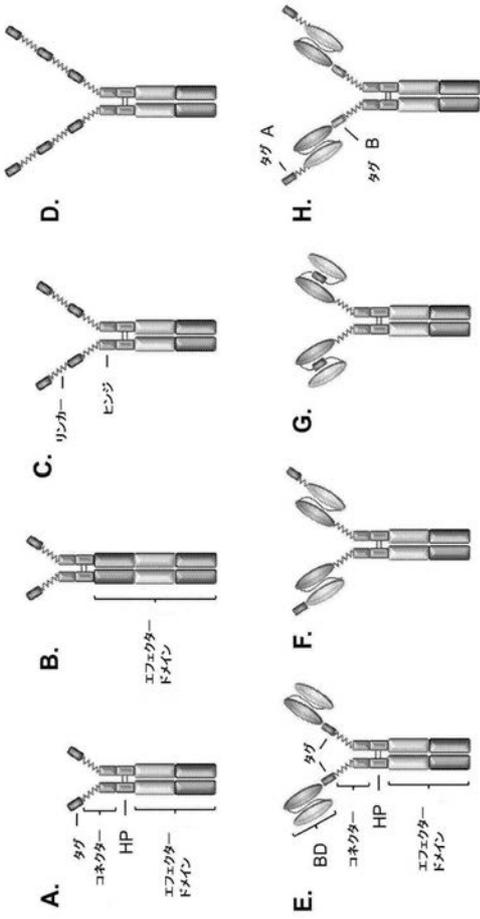
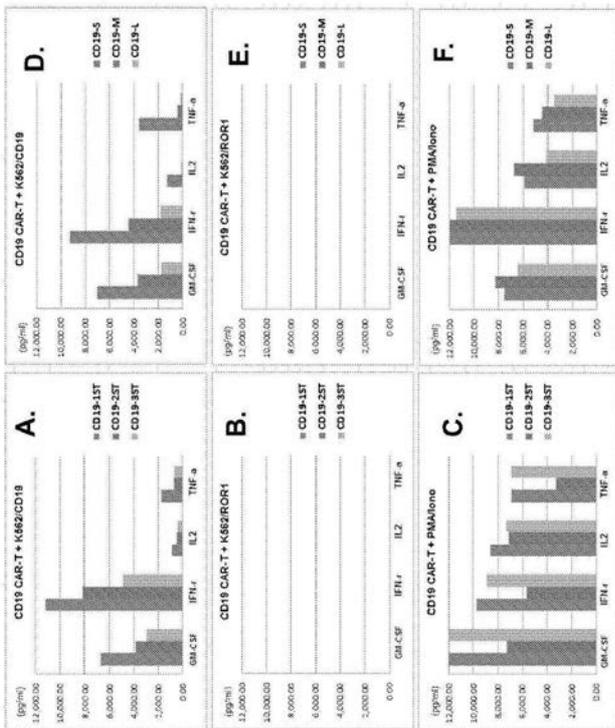


Fig. 1

【 図 3 】



24時間培養
サイトカイン放出

Fig. 3

【 図 2 】

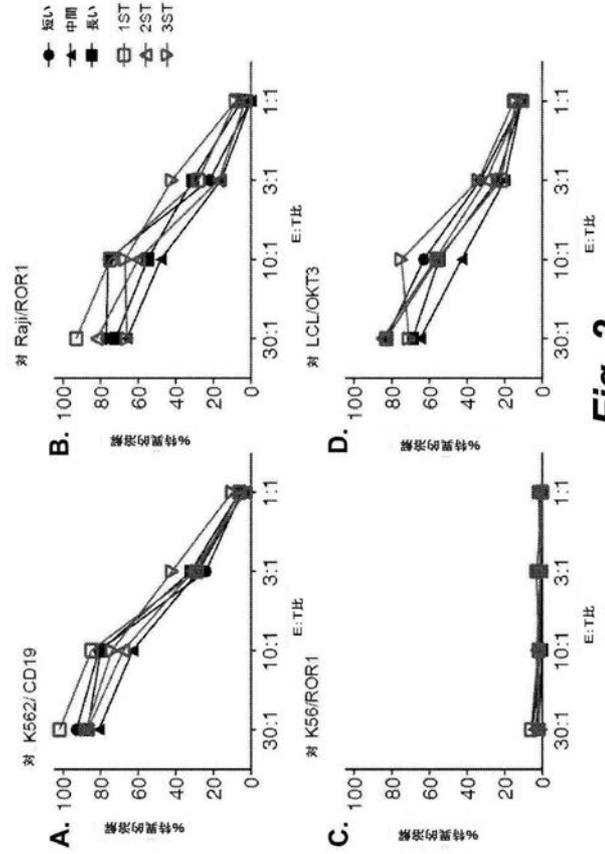


Fig. 2

【 図 4 】

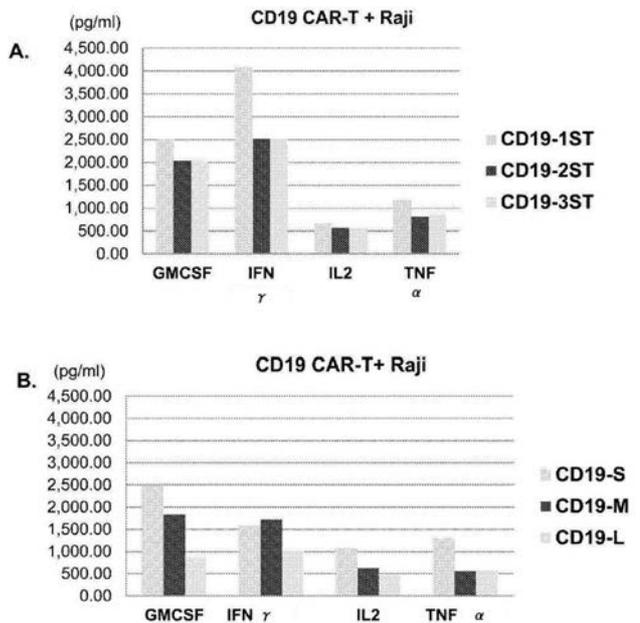


Fig. 4

【 5 - 1 】

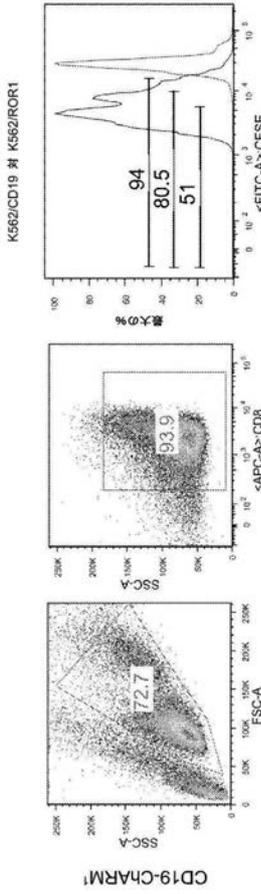


Fig. 5

【 5 - 2 】

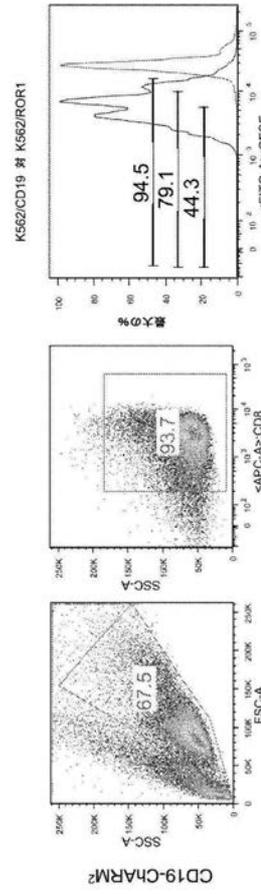


Fig. 5 (続き)

【 5 - 3 】

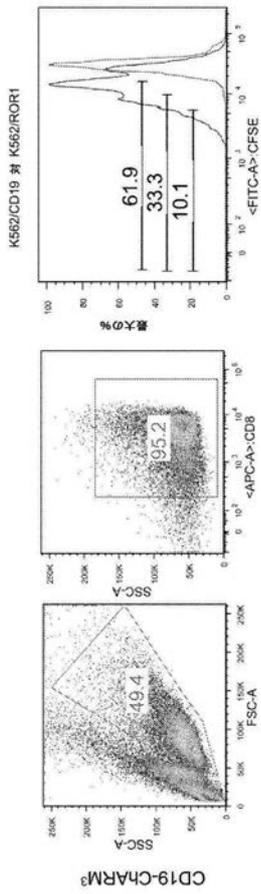


Fig. 5 (続き)

【 5 - 4 】

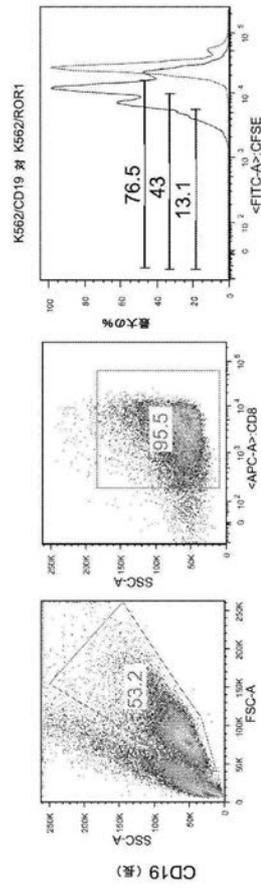


Fig. 5 (続き)

【 図 6 A 】

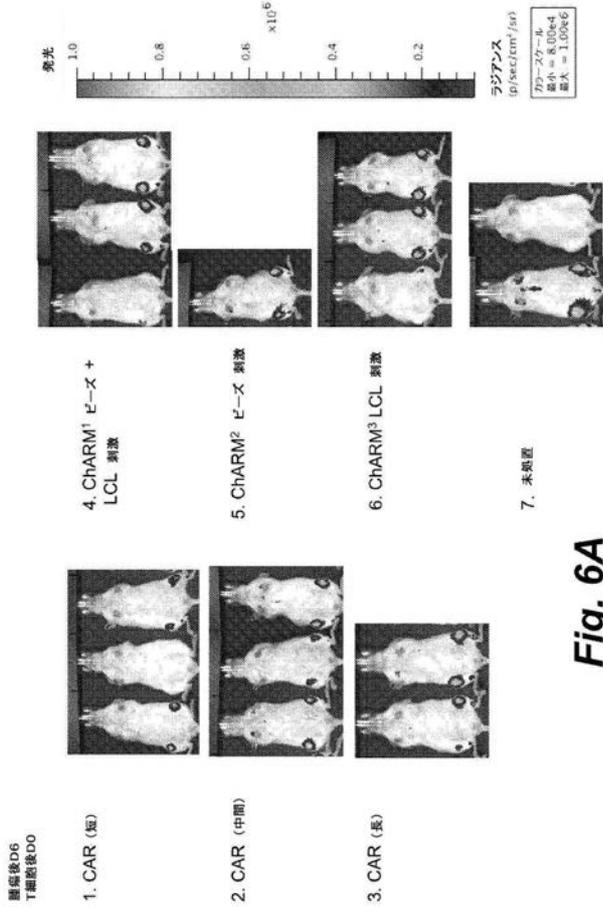


Fig. 6A

【 図 6 B 】

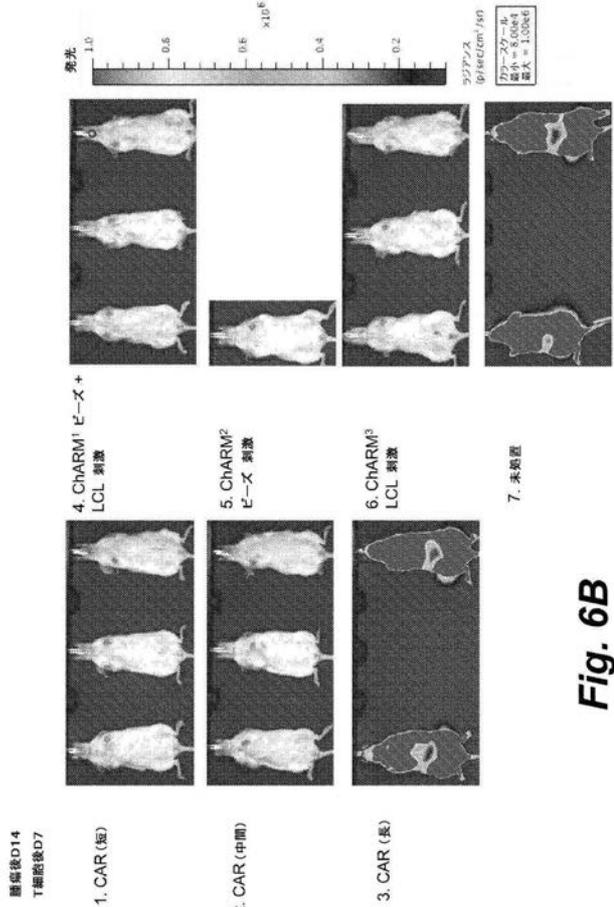


Fig. 6B

【 図 6 C 】

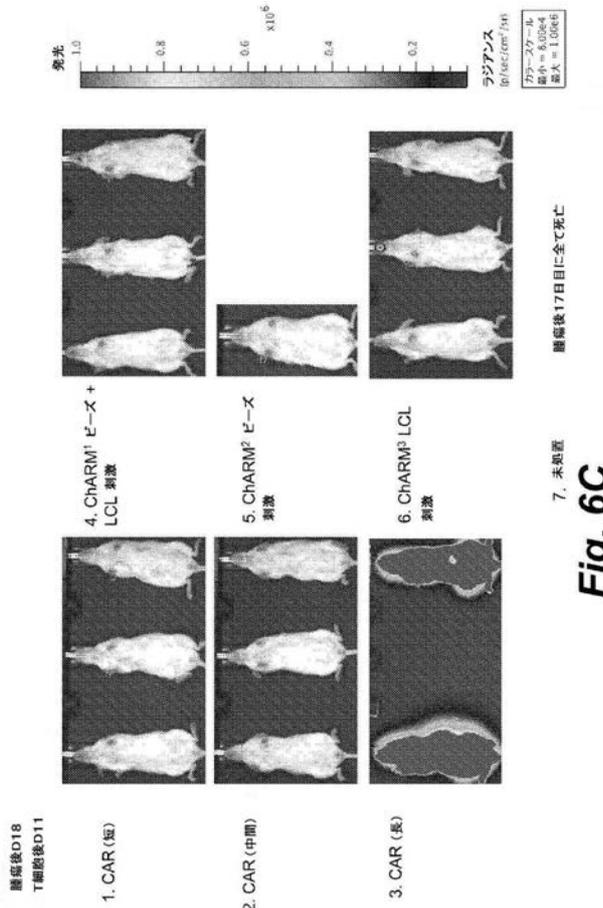


Fig. 6C

【 図 6 D 】

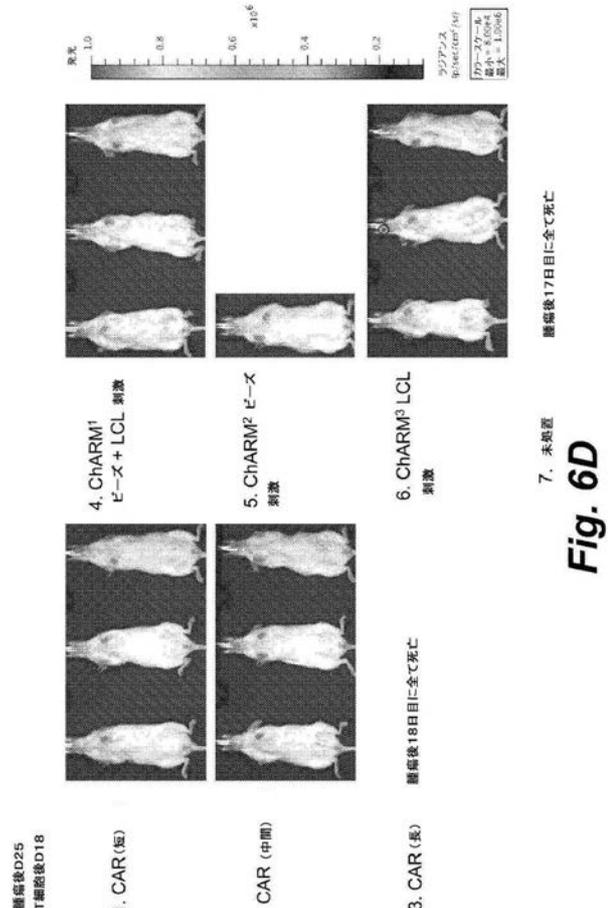
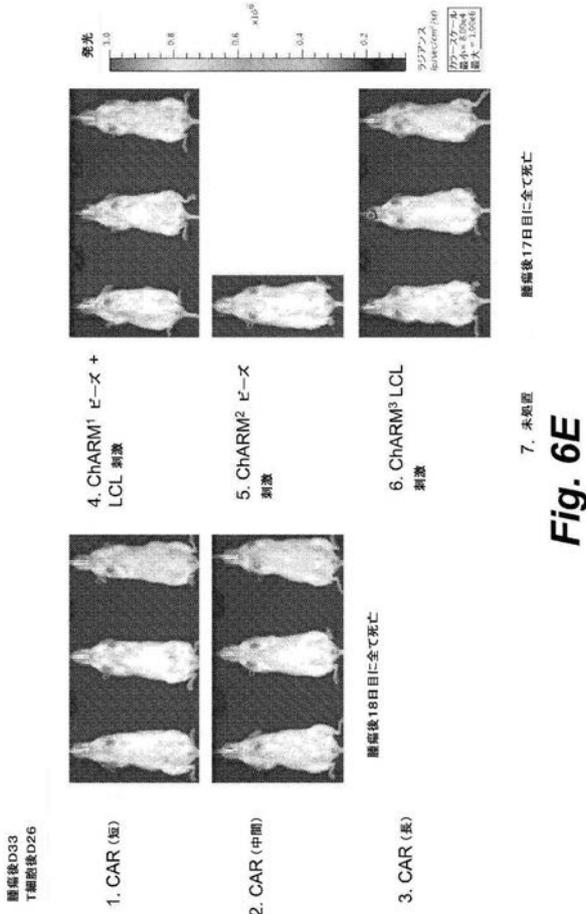


Fig. 6D

【 図 6 E 】



【 図 7 - 1 】

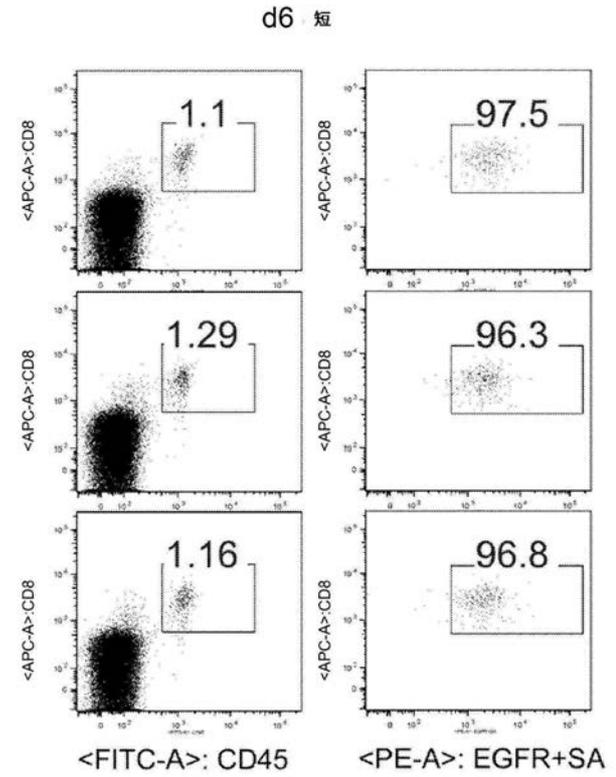


Fig. 7

【 図 7 - 2 】

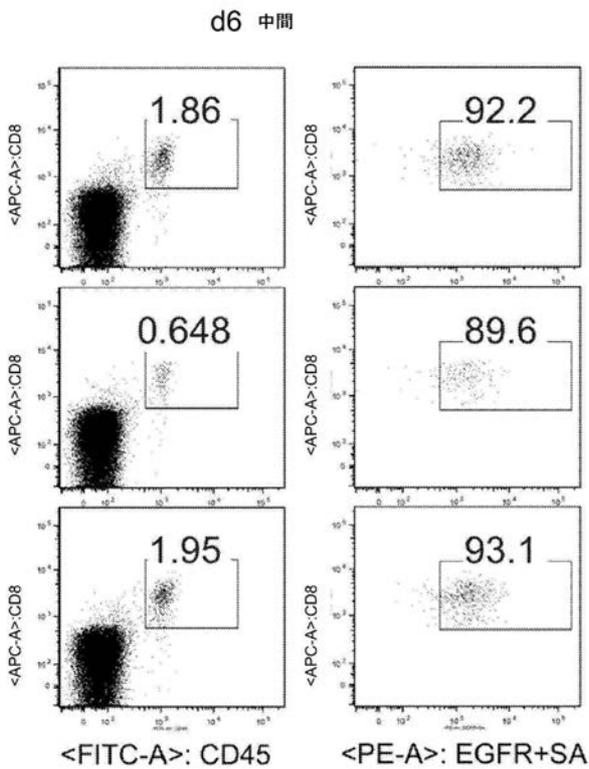


Fig. 7 (続き)

【 図 7 - 3 】

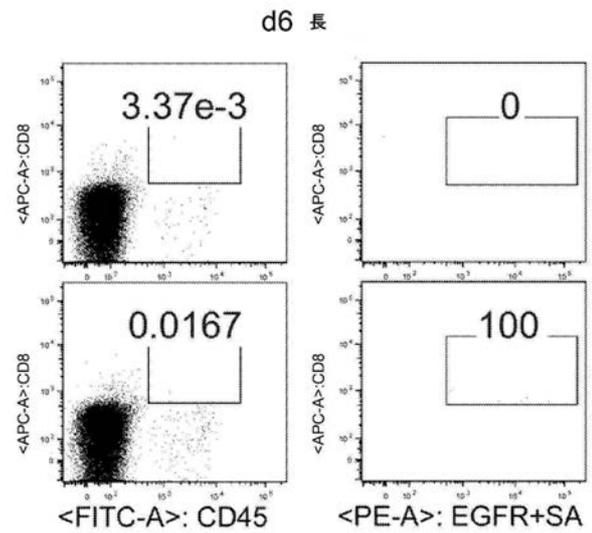


Fig. 7 (続き)

【 図 7 - 4 】

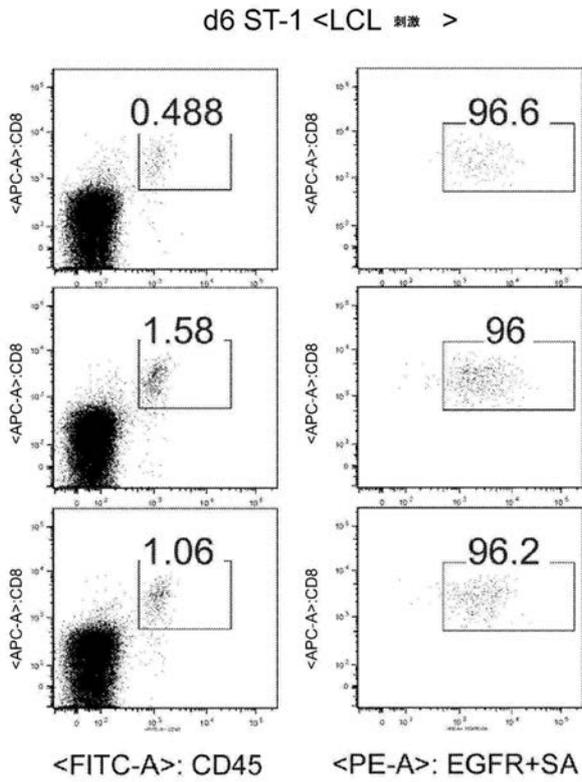


Fig. 7 (続き)

【 図 7 - 5 】

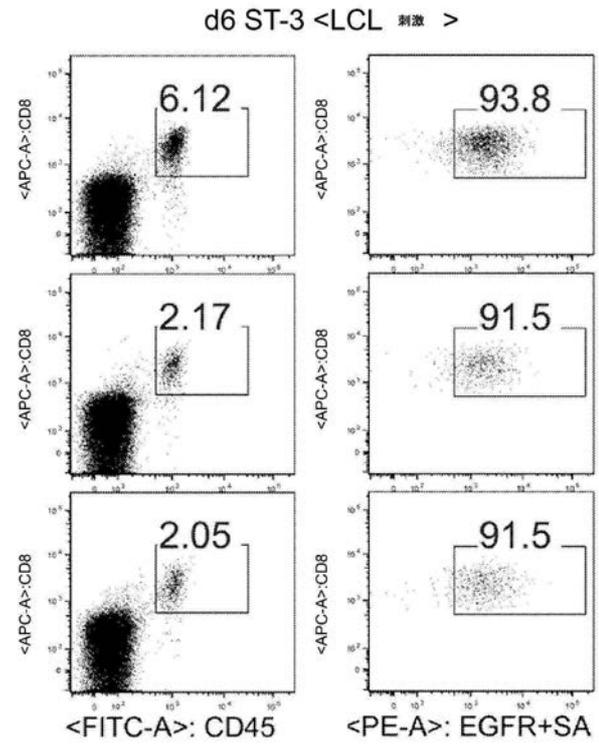


Fig. 7 (続き)

【 図 7 - 6 】

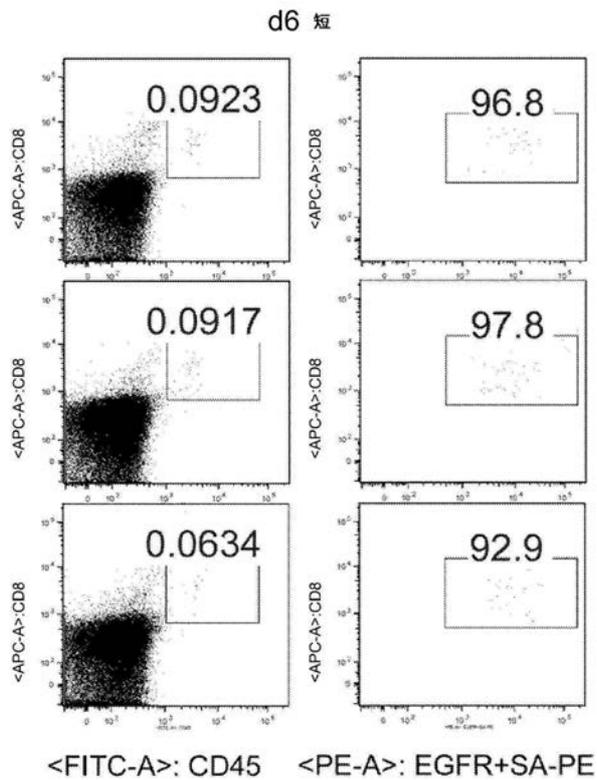


Fig. 7 (続き)

【 図 7 - 7 】

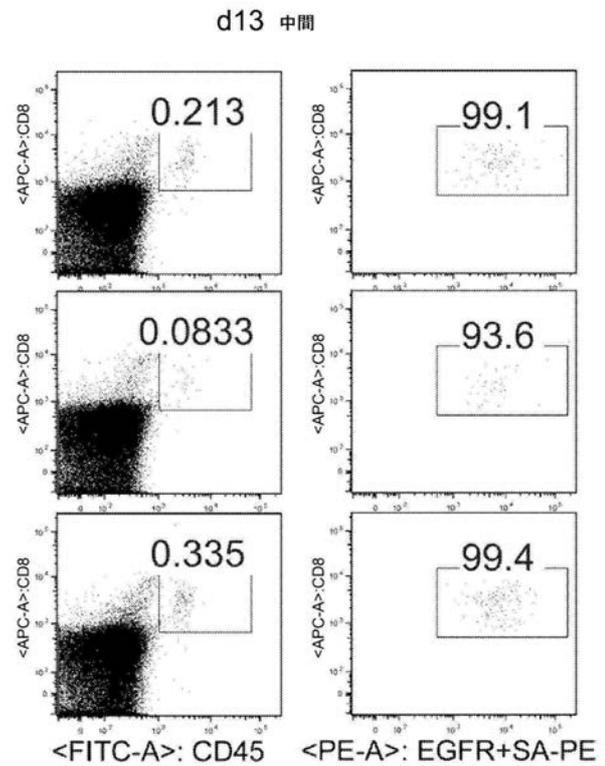


Fig. 7 (続き)

【 図 7 - 8 】

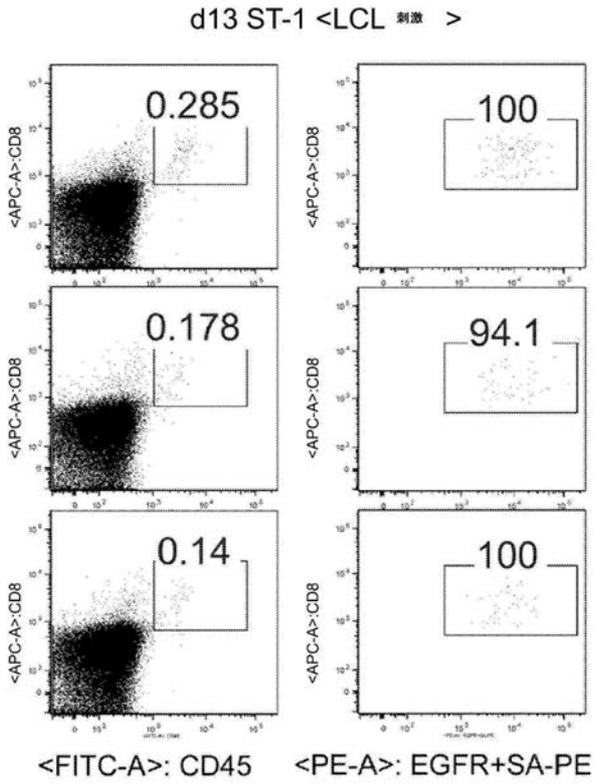


Fig. 7 (続き)

【 図 7 - 9 】

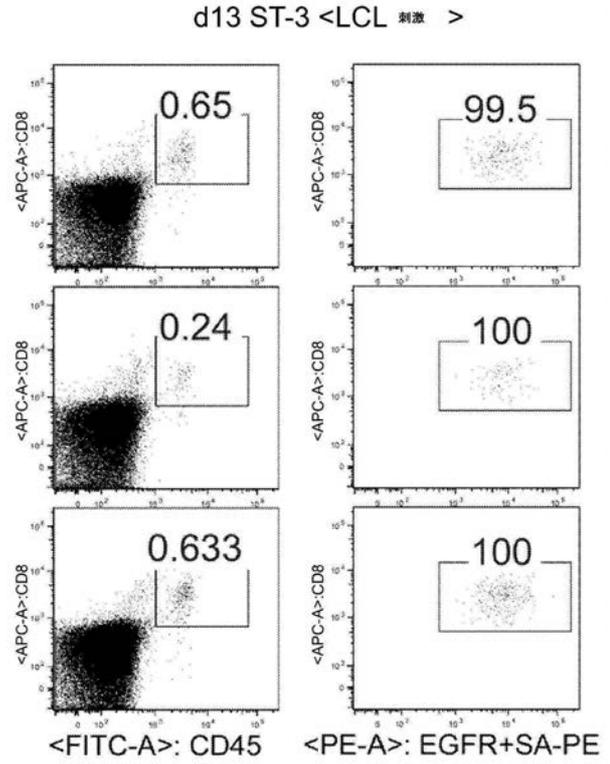


Fig. 7 (続き)

【 図 8 - 1 】

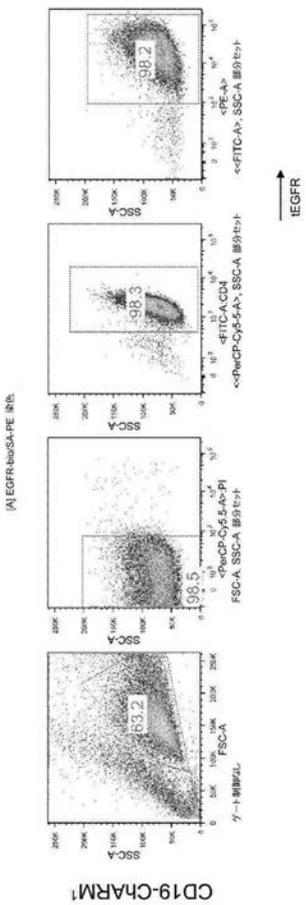


Fig. 8A

【 図 8 - 2 】

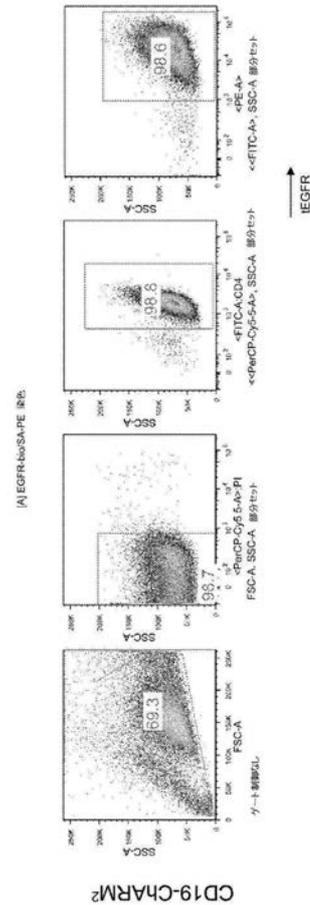


Fig. 8A (続き)

【 8 - 3 】

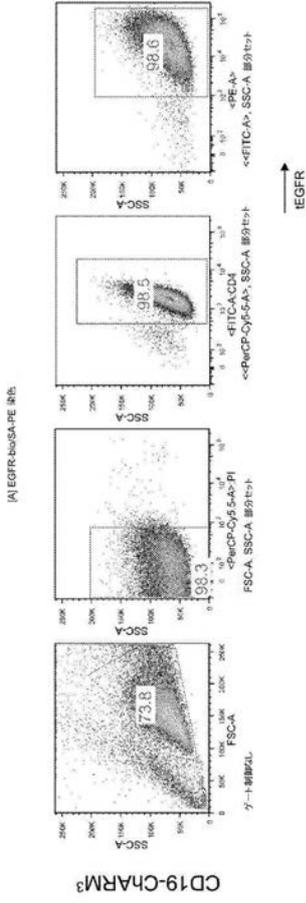


Fig. 8A (続き)

【 8 - 4 】

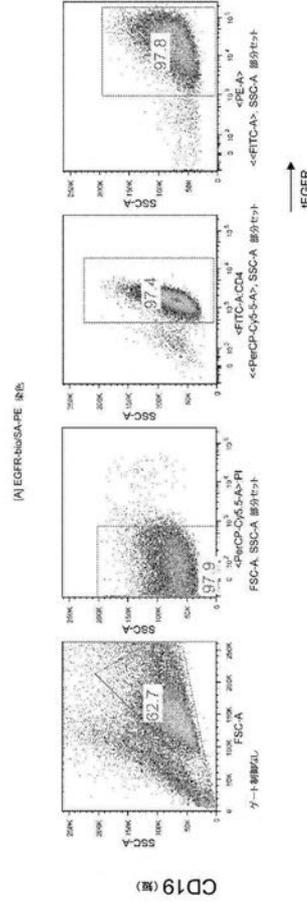


Fig. 8A (続き)

【 8 - 5 】

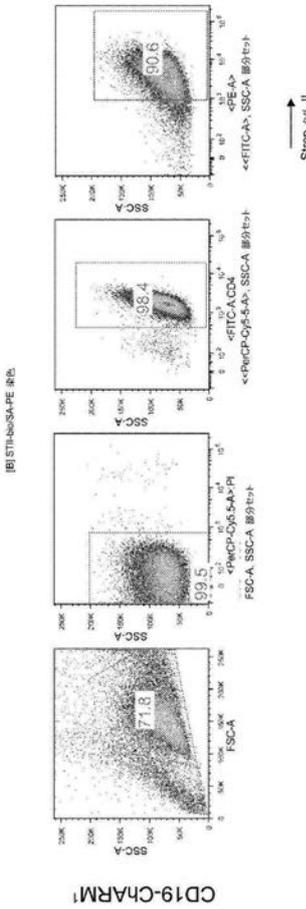


Fig. 8B

【 9 - 8 - 6 】

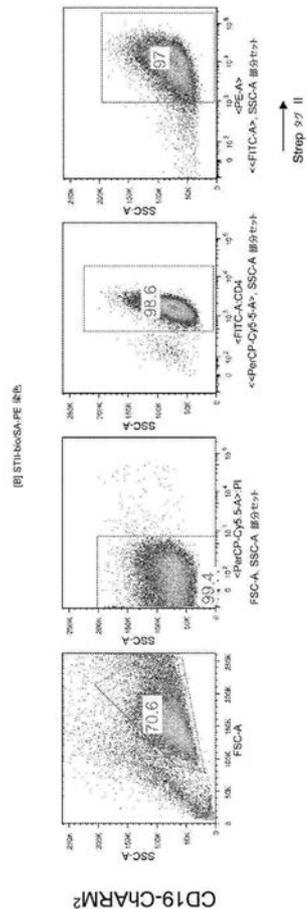


Fig. 8B (続き)

【 8 - 7 】

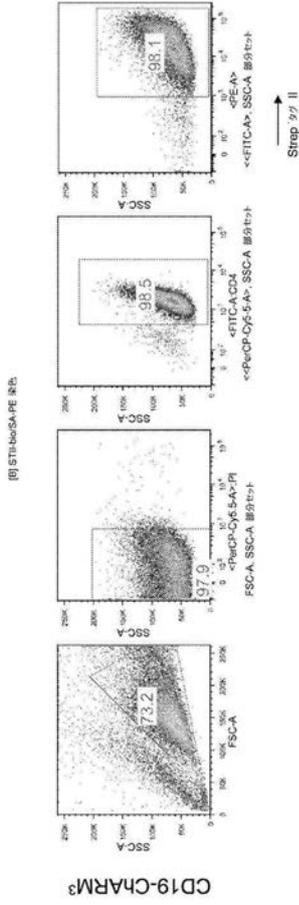


Fig. 8B (続き)

【 8 - 8 】

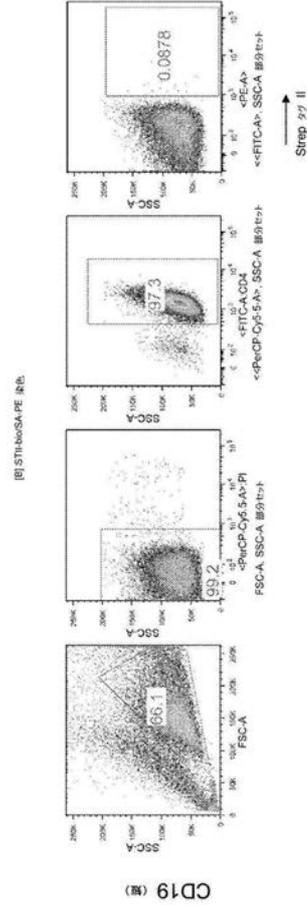


Fig. 8B (続き)

【 6 - 8 】

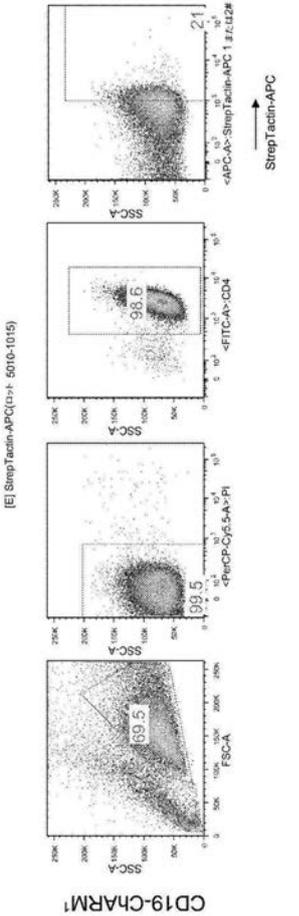


Fig. 8C

【 0 1 - 8 】

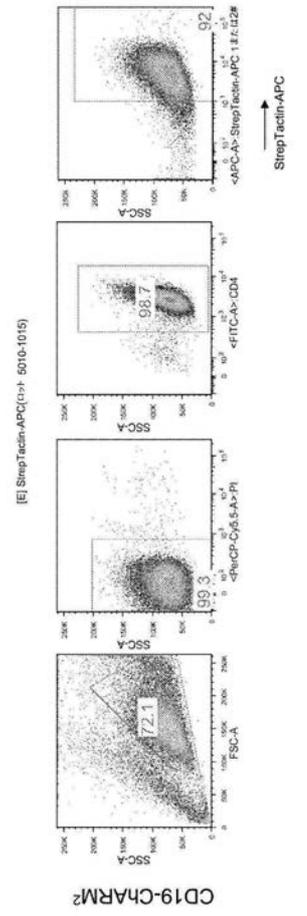


Fig. 8C (続き)

【 8 - 1 1 】

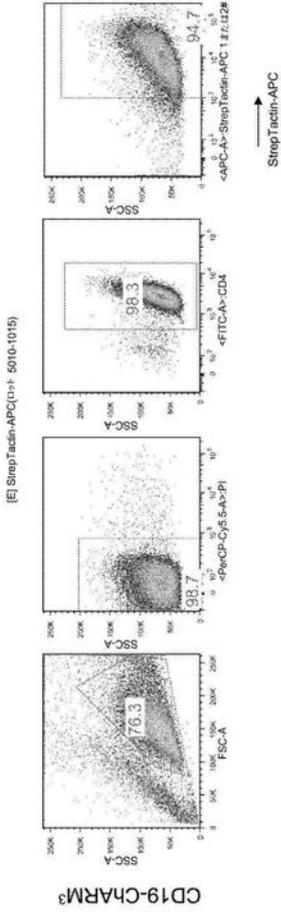


Fig. 8C (続き)

【 8 - 1 2 】

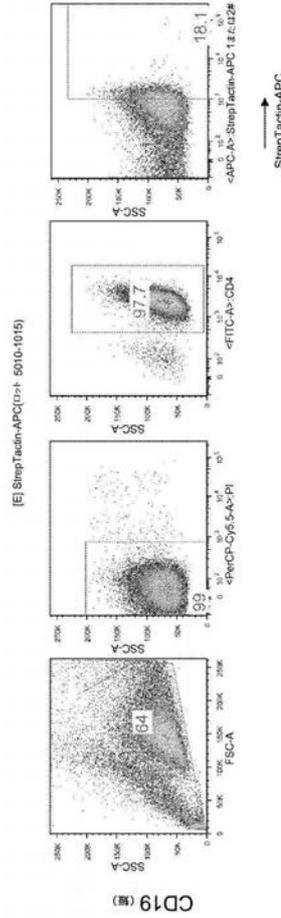


Fig. 8C (続き)

【 8 - 1 3 】

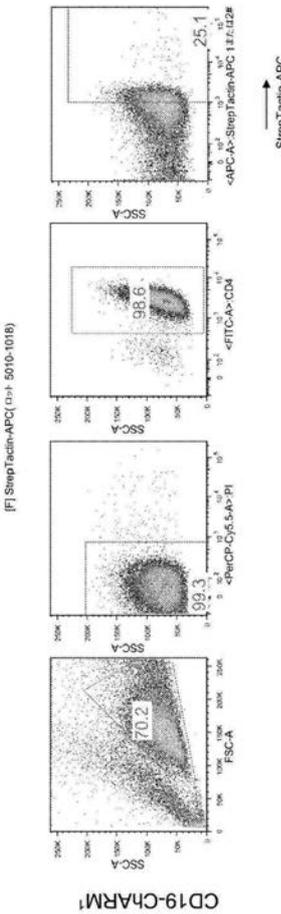


Fig. 8D

【 8 - 1 4 】

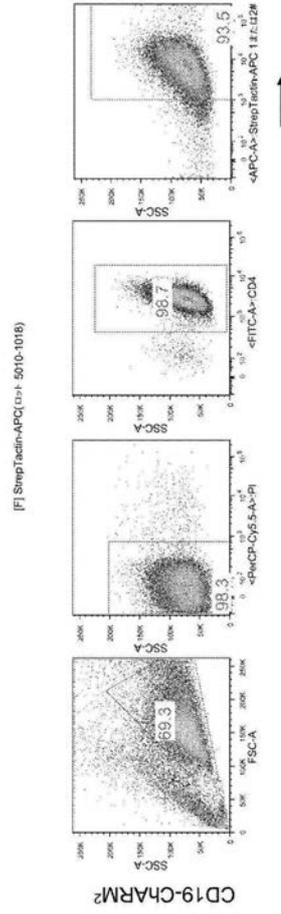
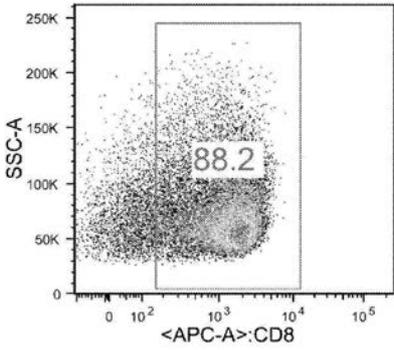


Fig. 8D (続き)

【 図 9 - 3 】



↓ FACS
ソート

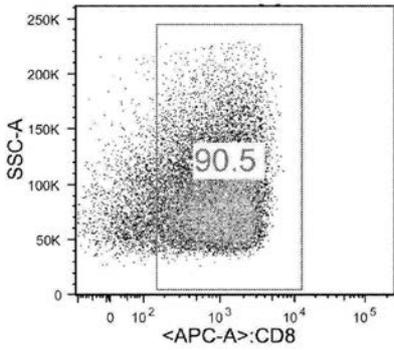
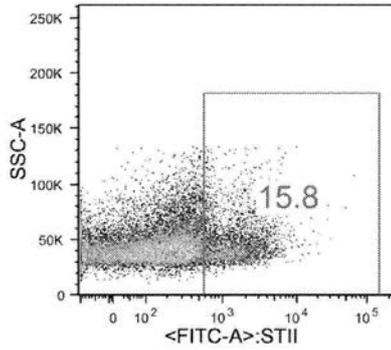


Fig. 9 (続き)

【 図 9 - 4 】



↓ FACS
ソート

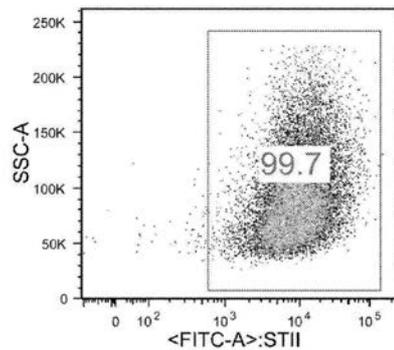


Fig. 9 (続き)

【 図 10 - 1 】

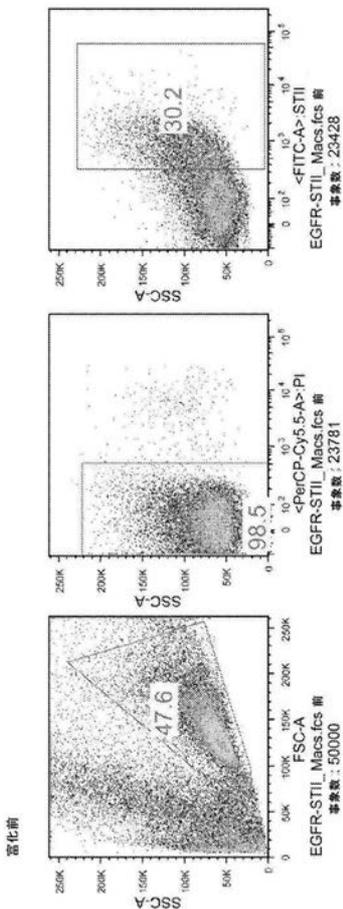


Fig. 10

【 図 10 - 2 】

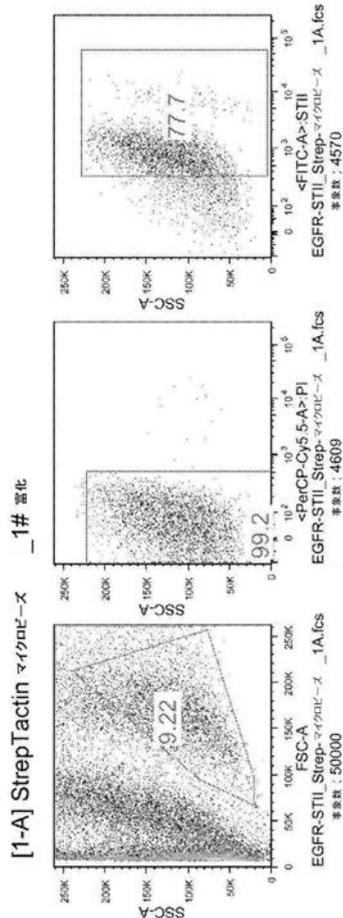
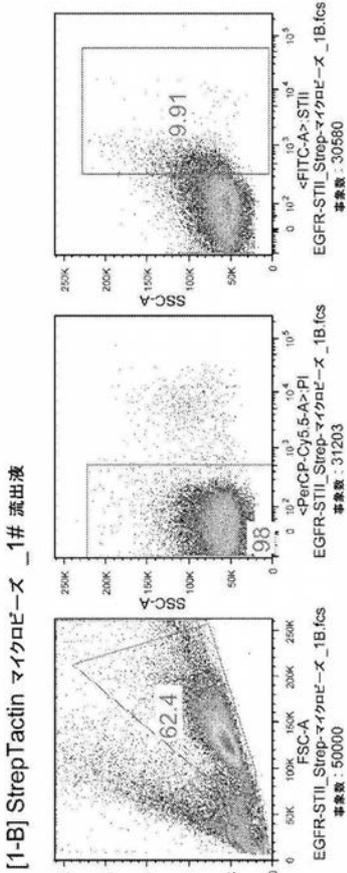
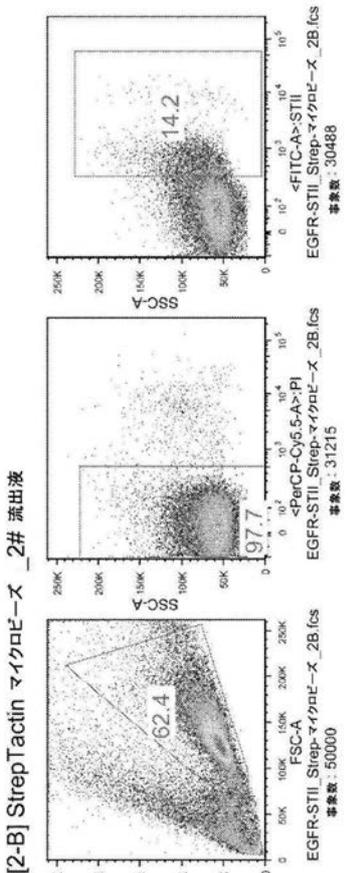


Fig. 10 (続き)

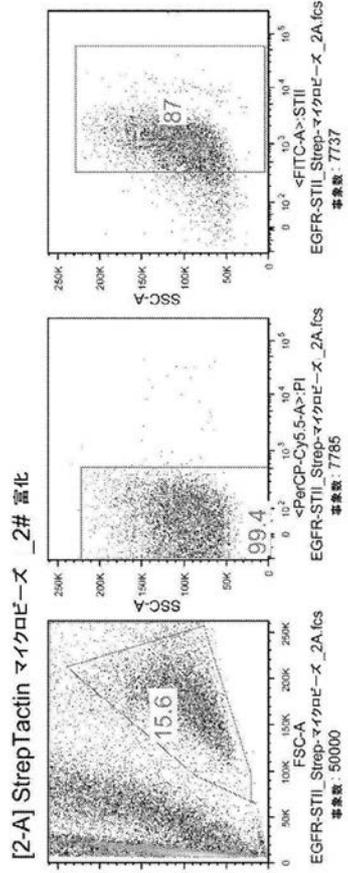
【 図 10 - 3 】



【 図 10 - 5 】



【 図 10 - 4 】



【 図 10 - 6 】

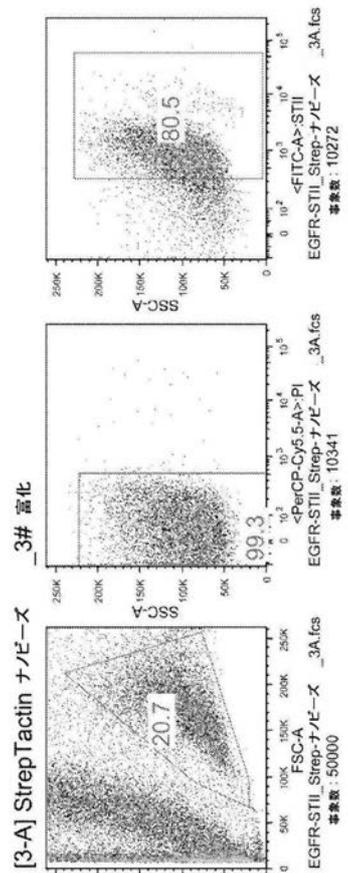


Fig. 10 (続き)

Fig. 10 (続き)

Fig. 10 (続き)

Fig. 10 (続き)

【 図 1 0 - 7 】

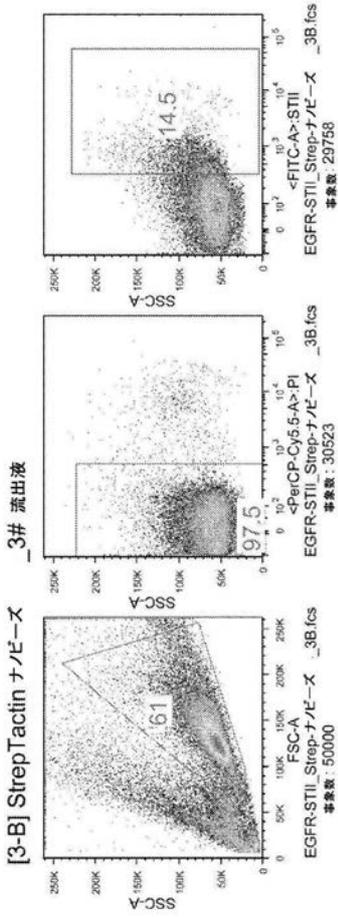


Fig. 10 (続き)

【 図 1 2 】

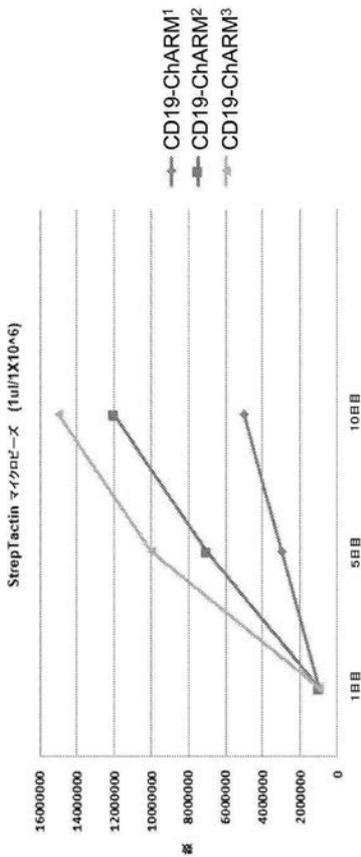


Fig. 12

【 図 1 1 】

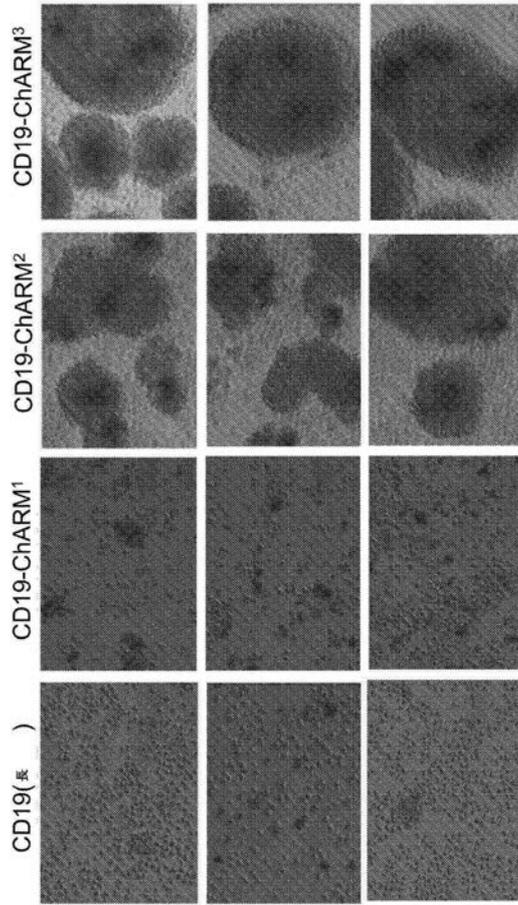


Fig. 11

【 図 1 3 - 1 】

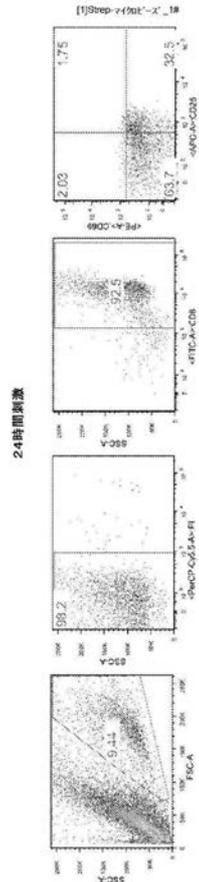


Fig. 13A

【 図 13 - 2 】

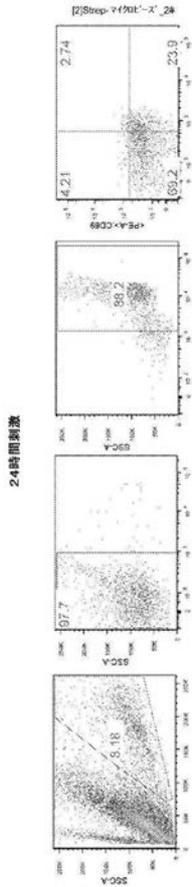


Fig. 13A (続き)

【 図 13 - 3 】

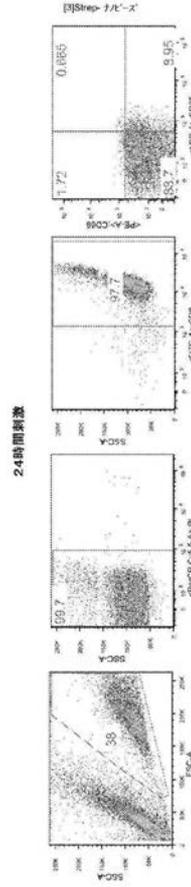


Fig. 13A (続き)

【 図 13 - 4 】

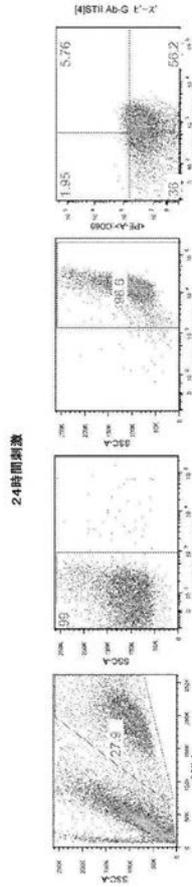


Fig. 13A (続き)

【 図 13 - 5 】



Fig. 13A (続き)

【 図 13 - 6 】

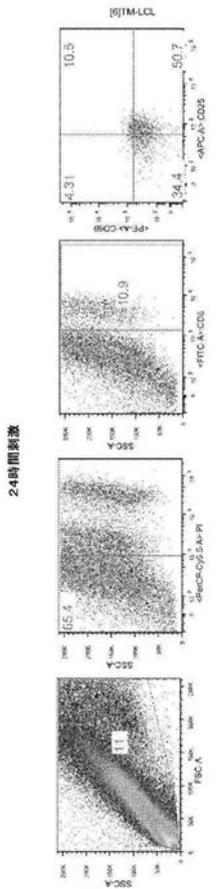


Fig. 13A (続き)

【 図 13 - 7 】

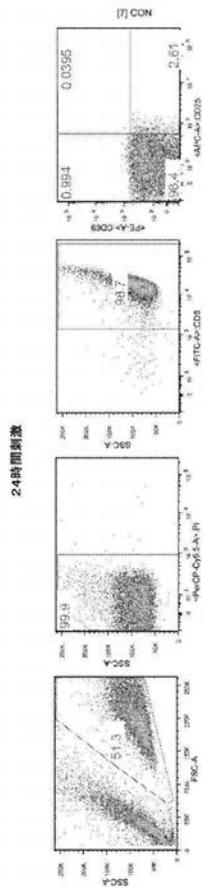


Fig. 13A (続き)

【 図 13 - 8 】

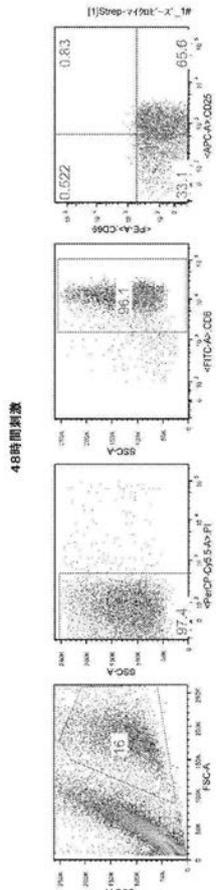


Fig. 13B

【 図 13 - 9 】

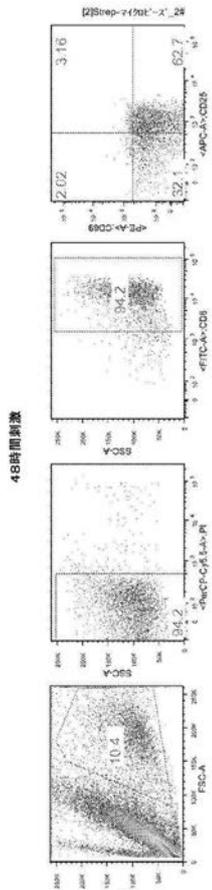


Fig. 13B (続き)

【 図 13 - 10 】

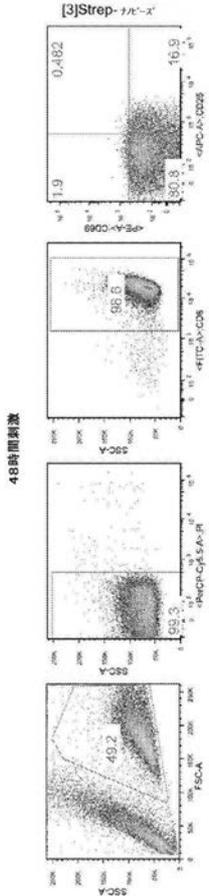


Fig. 13B (続き)

【 図 13 - 11 】

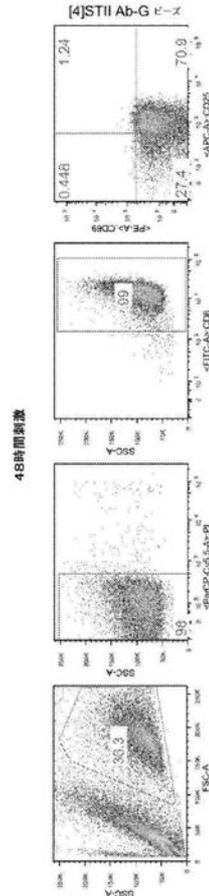


Fig. 13B (続き)

【 図 13 - 12 】

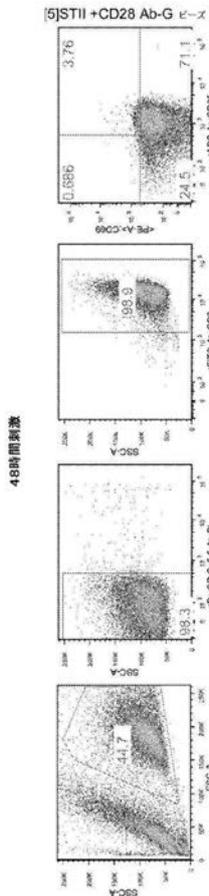


Fig. 13B (続き)

【 図 13 - 13 】

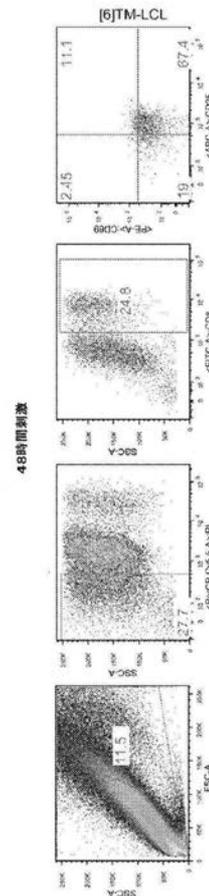


Fig. 13B (続き)

【 図 13 - 14 】

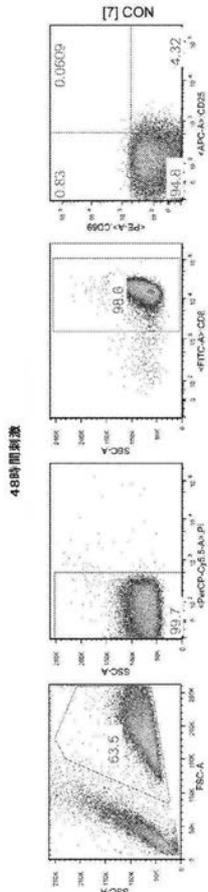


Fig. 13B (続き)

【 図 14 A 】

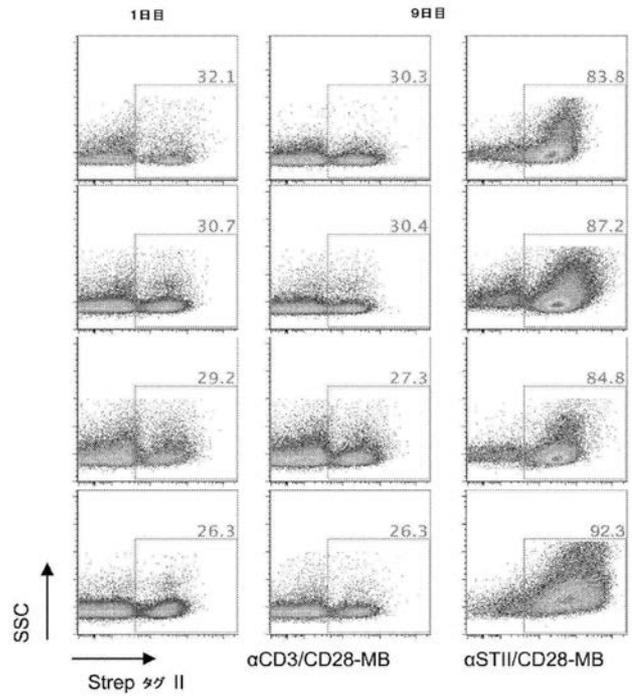


Fig. 14A

【 図 14 B 】

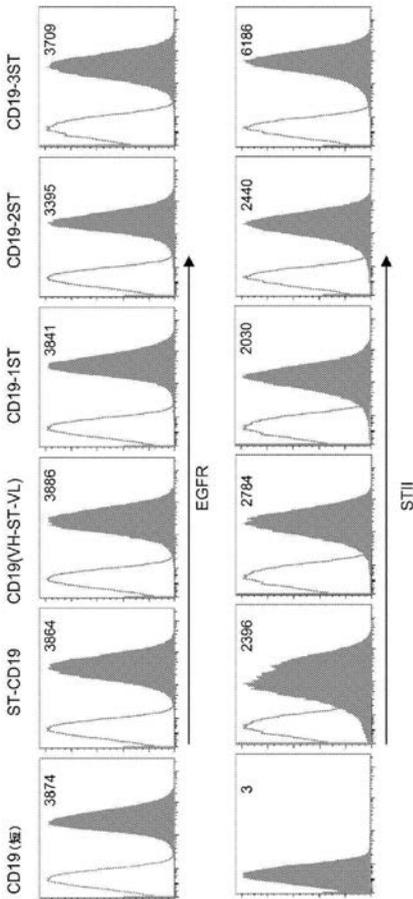


Fig. 14B

【 図 15 - 1 】

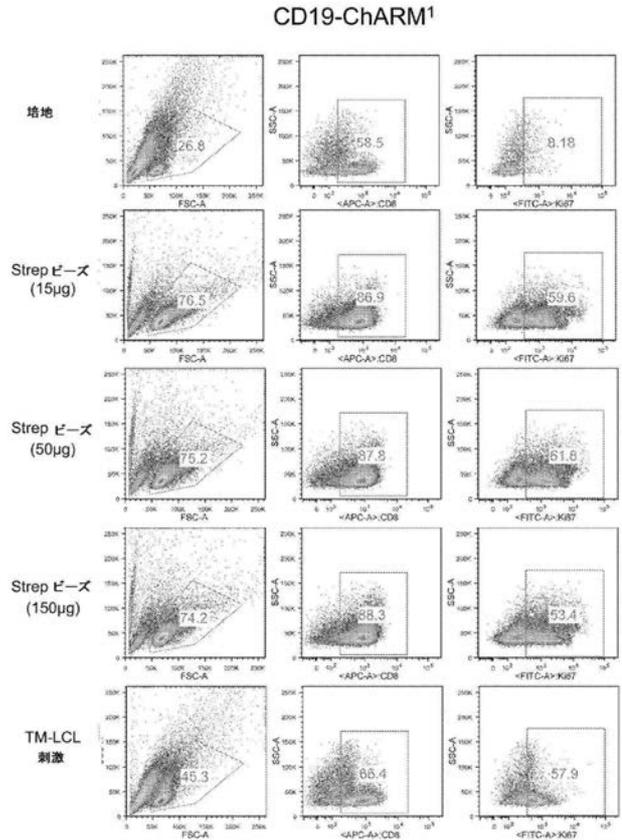


Fig. 15

【 図 1 5 - 2 】

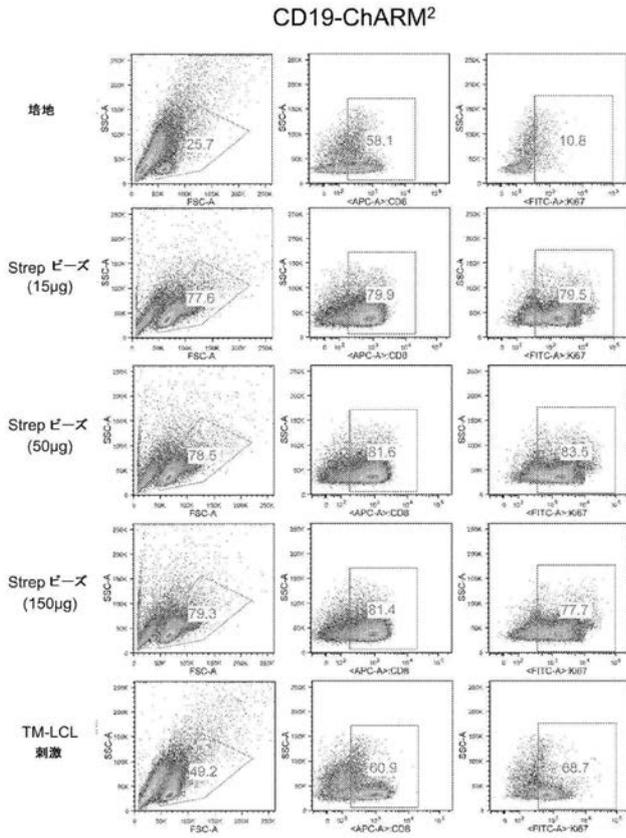


Fig. 15 (続き)

【 図 1 5 - 3 】

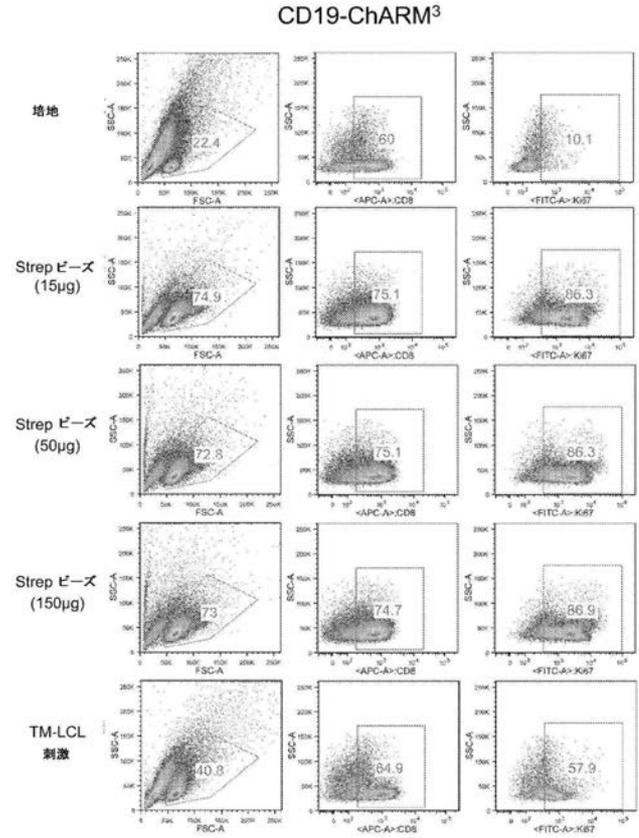


Fig. 15 (続き)

【 図 1 6 】

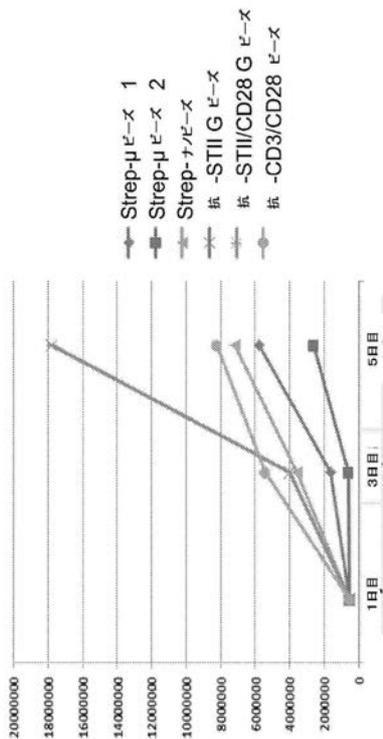
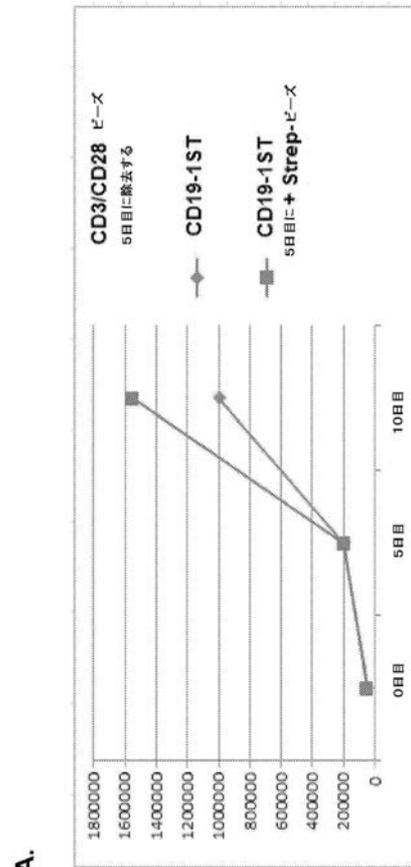


Fig. 16

【 図 1 7 - 1 】



A.

Fig. 17

【 図 17 - 2 】

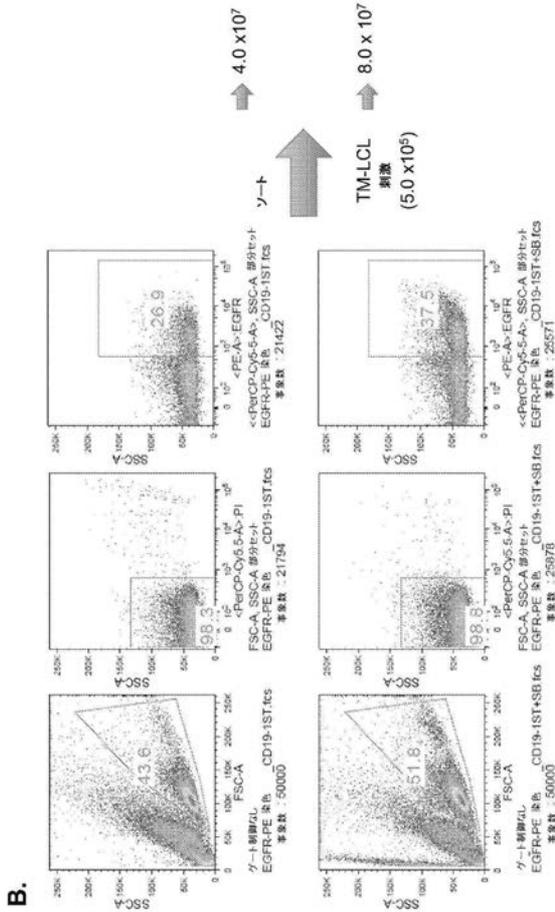


Fig. 17

【 図 18 A 】

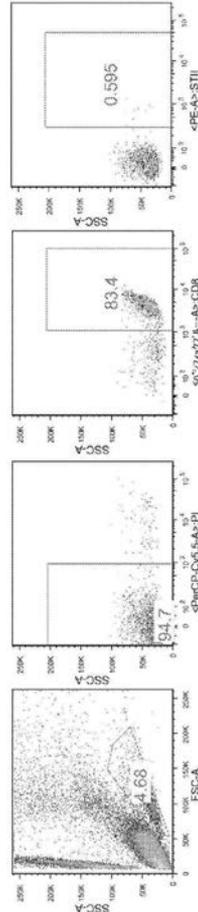


Fig. 18A

【 図 18 B 】

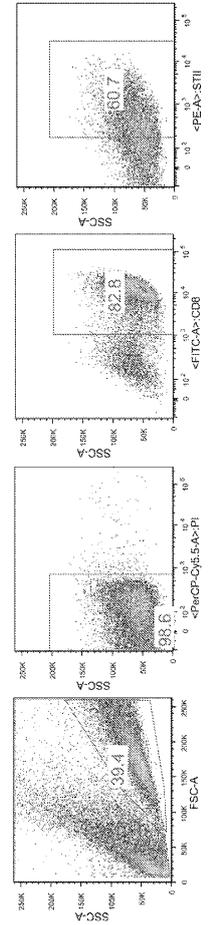


Fig. 18B

【 図 18 C 】

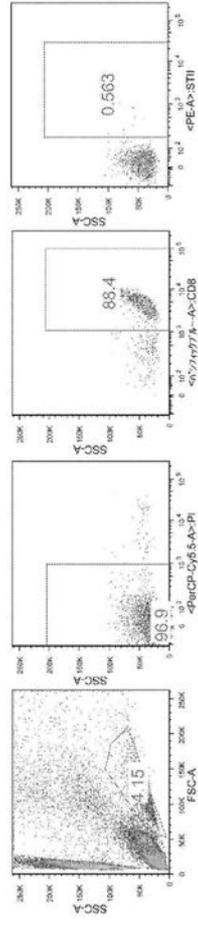


Fig. 18C

【 18 D 】

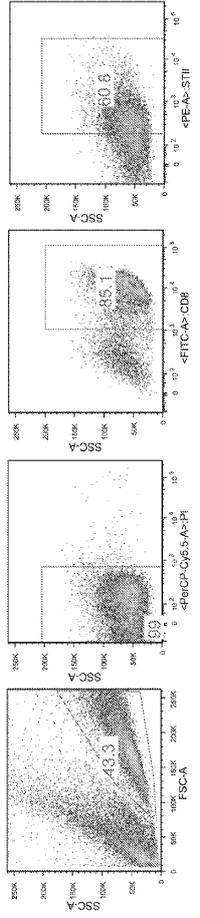


Fig. 18D

【 20 】

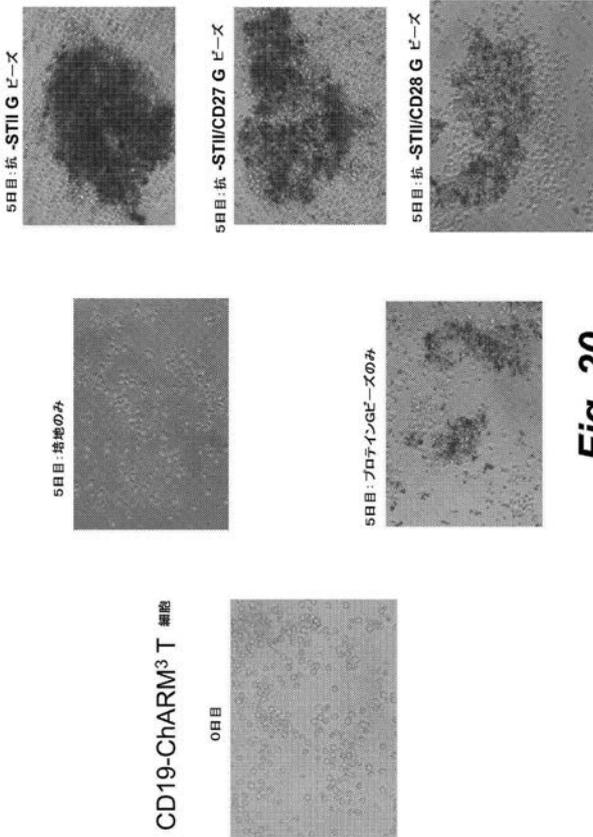


Fig. 20

【 19 】

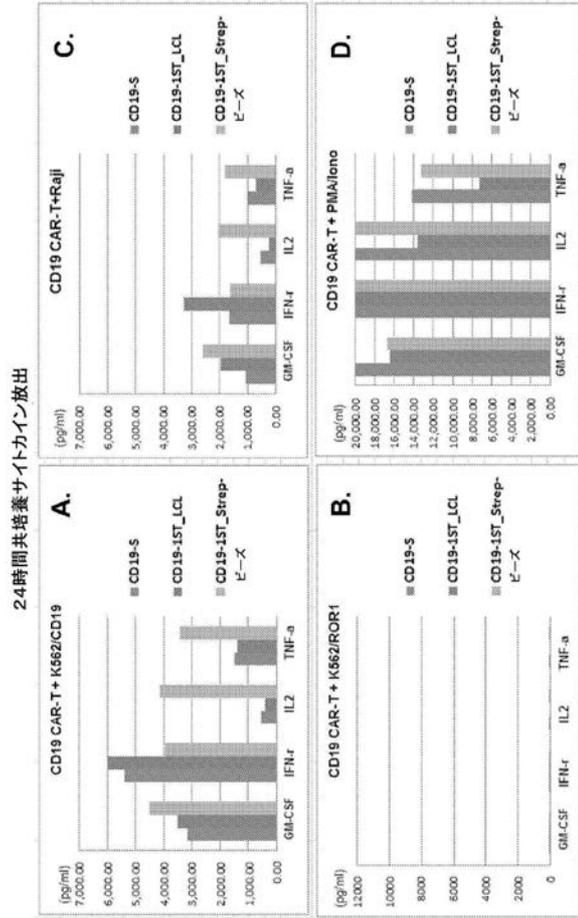


Fig. 19

【 21 】

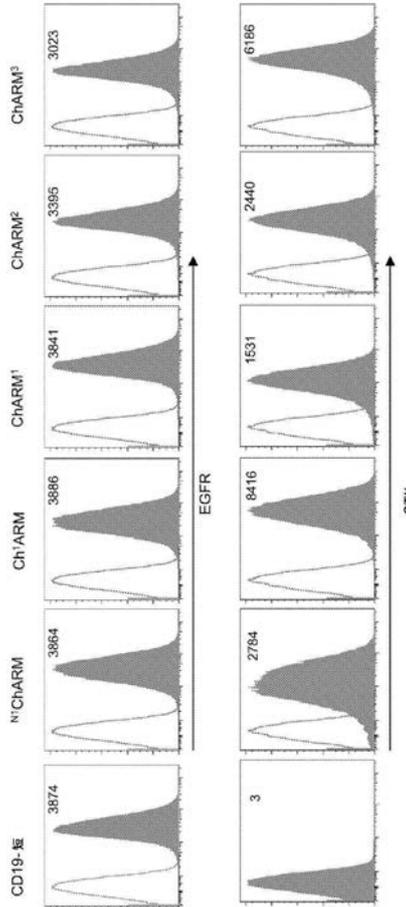


Fig. 21

【 2 2 】

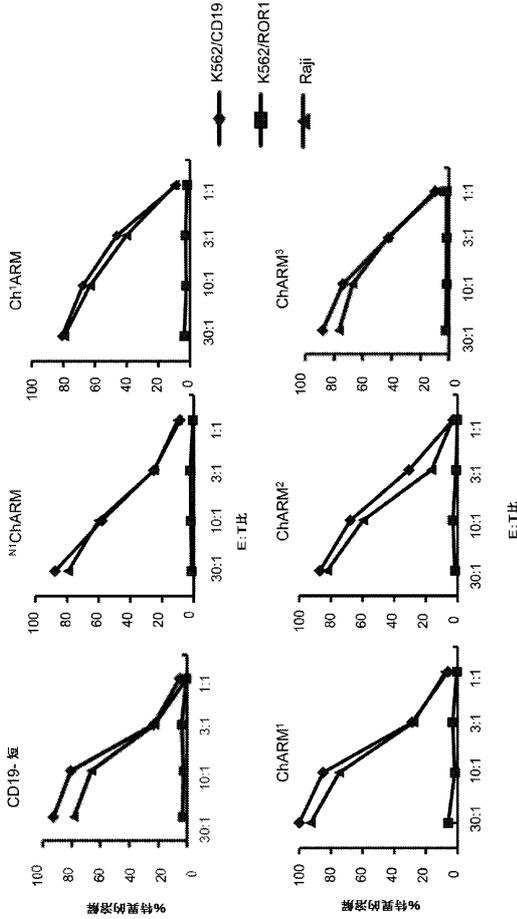


Fig. 22

【 2 3 】

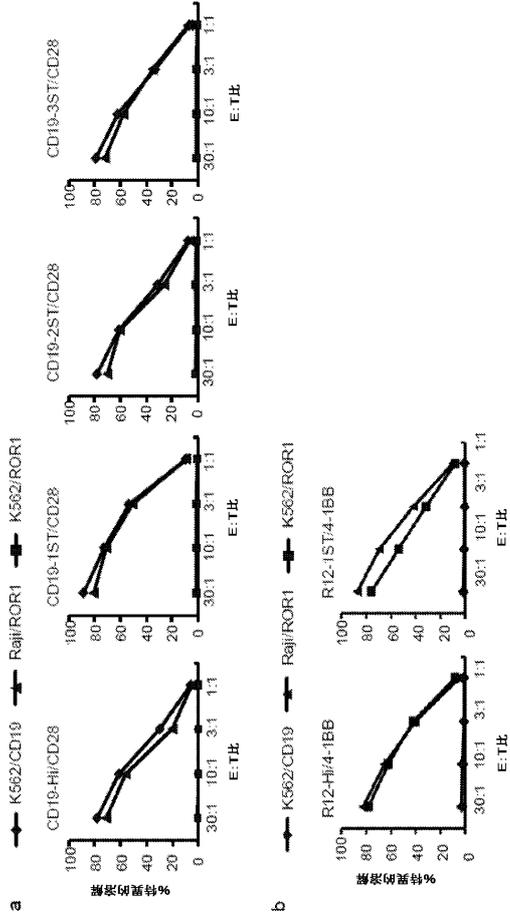


Fig. 23

【 2 4 】

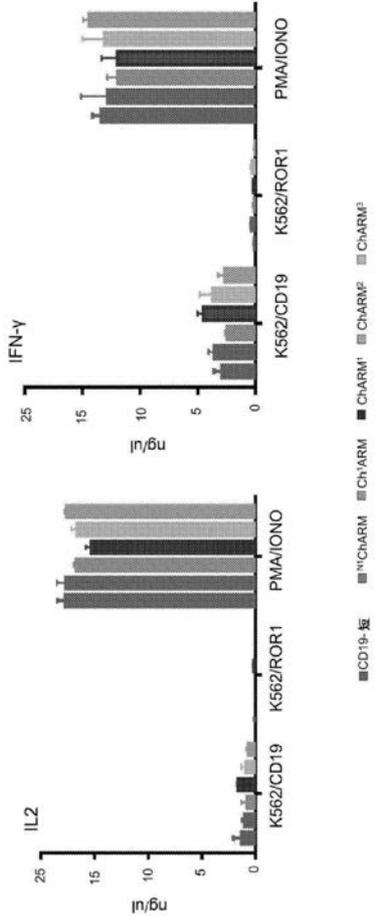


Fig. 24

【 2 5 】

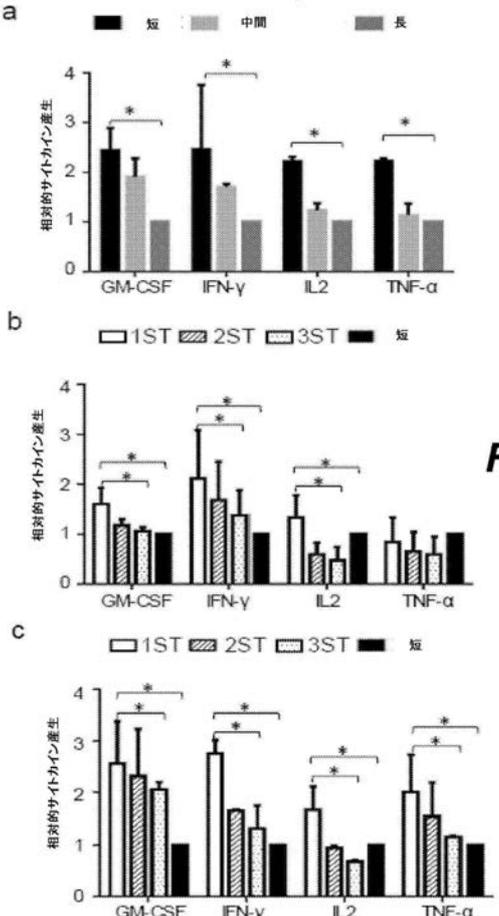


Fig. 25

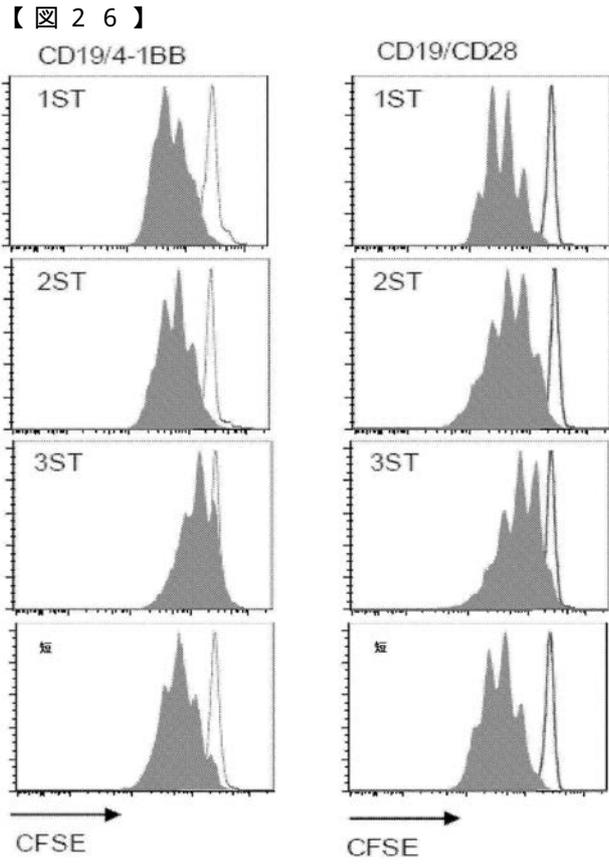


Fig. 26

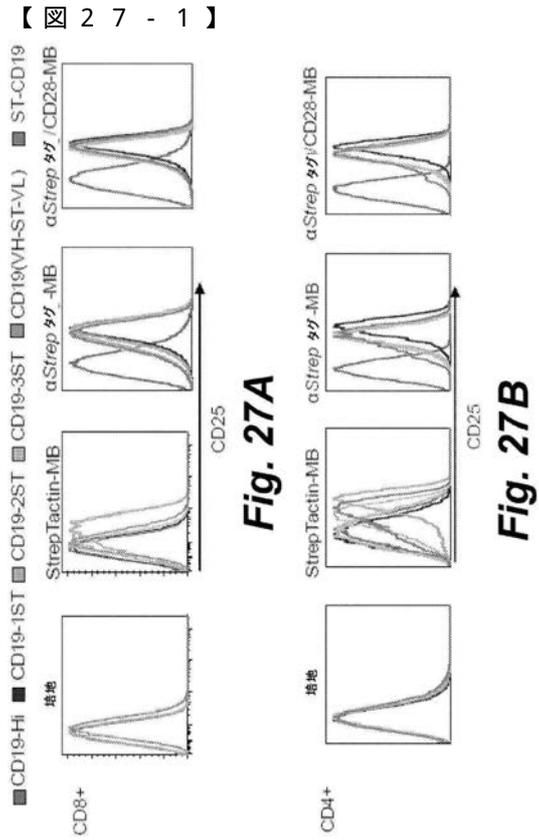


Fig. 27A

Fig. 27B

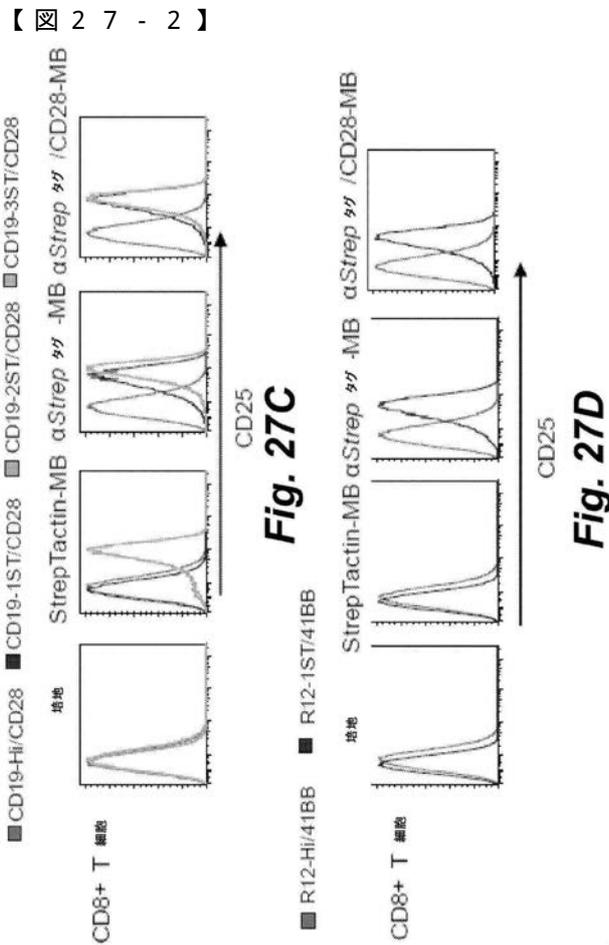


Fig. 27C

Fig. 27D

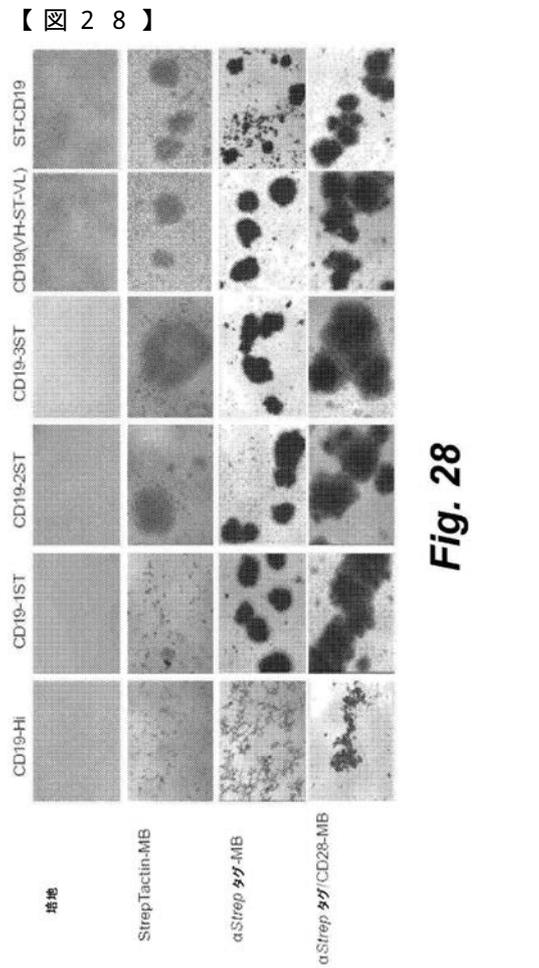


Fig. 28

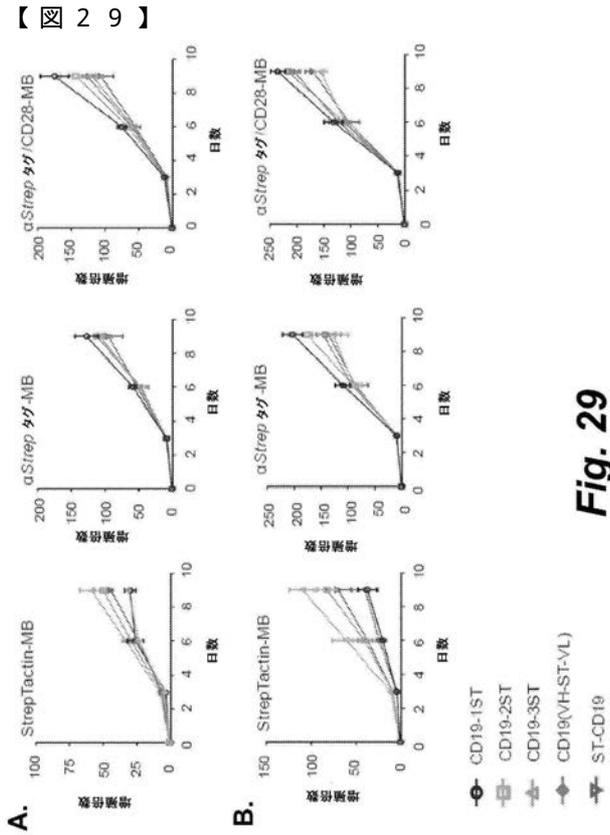


Fig. 29

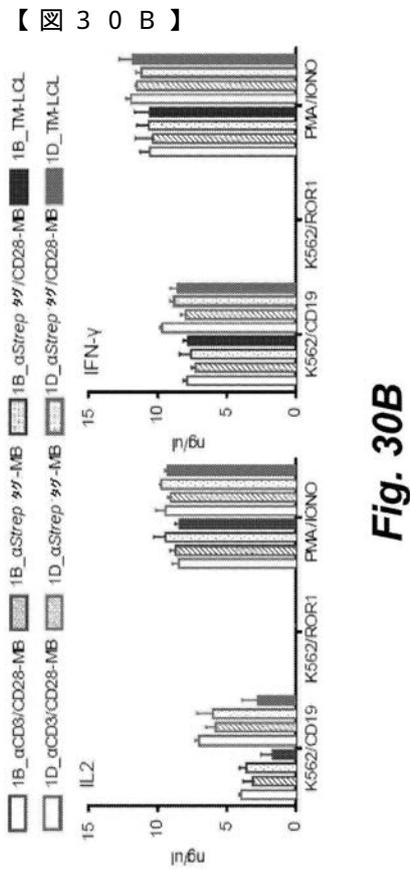


Fig. 30B

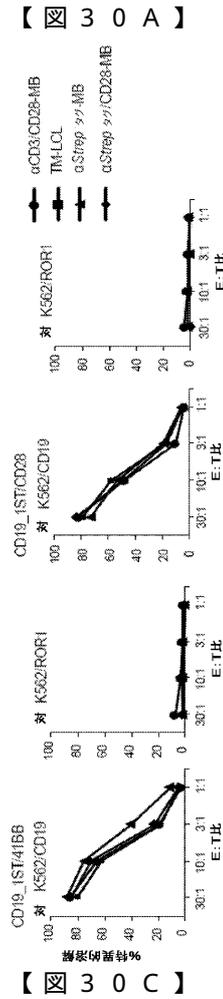


Fig. 30A

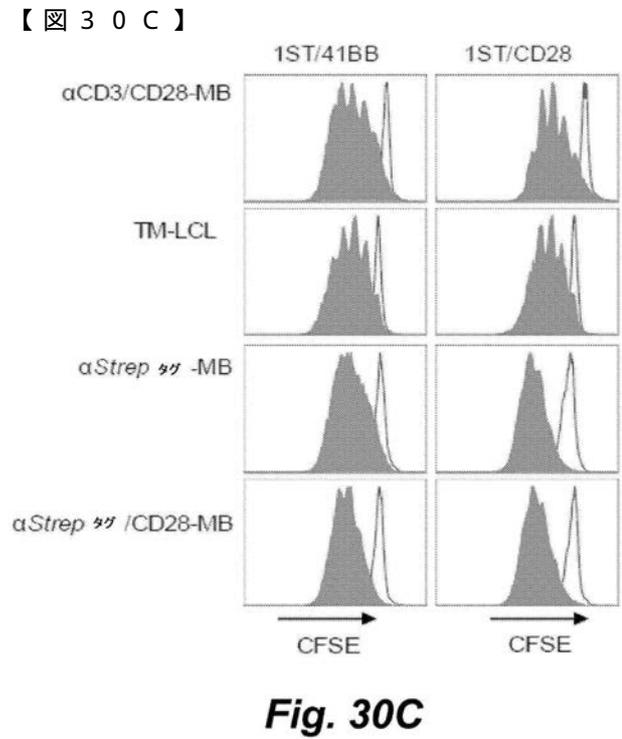


Fig. 30C

【 30 D 】

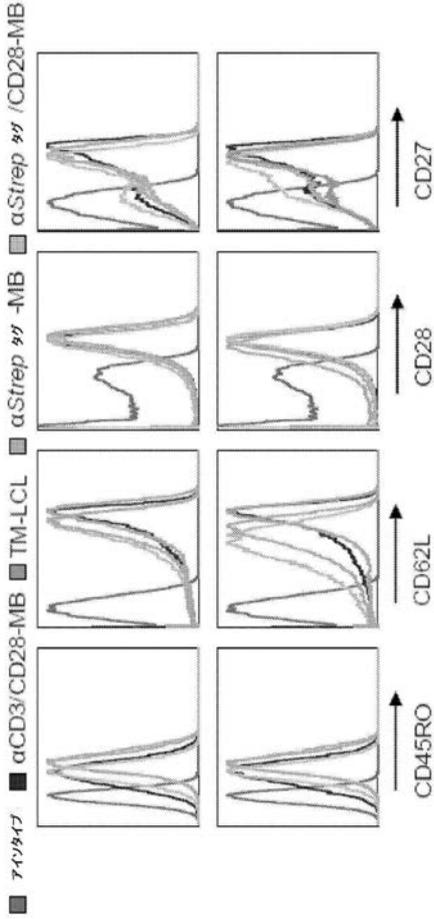


Fig. 30D

【 30 E 】

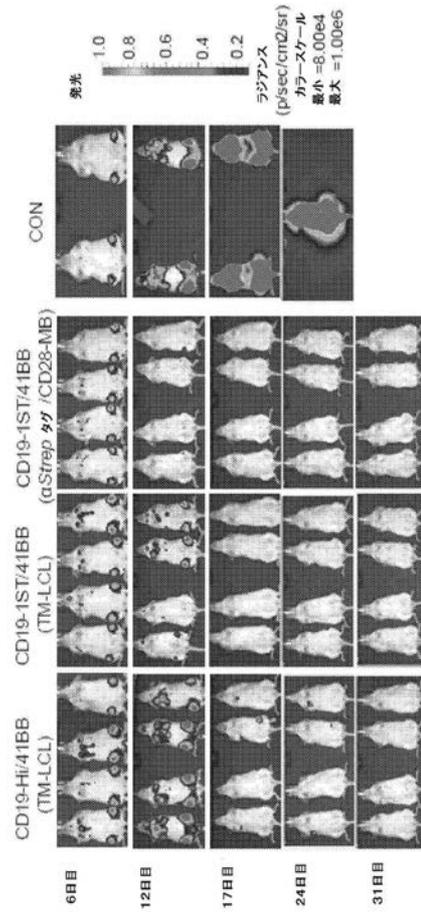


Fig. 30E

【 30 F 】

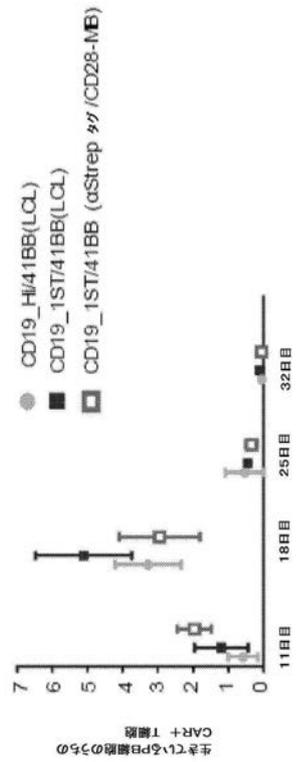


Fig. 30F

【 31 】

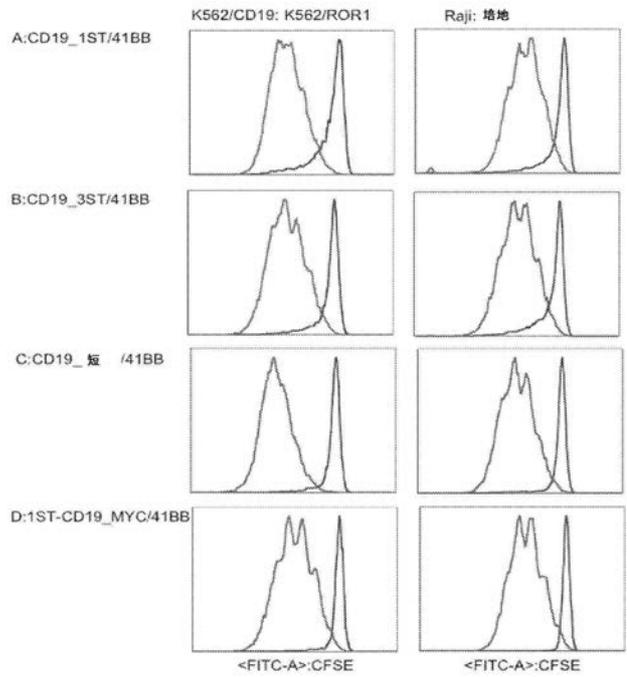


Fig. 31

【 图 3 2 】

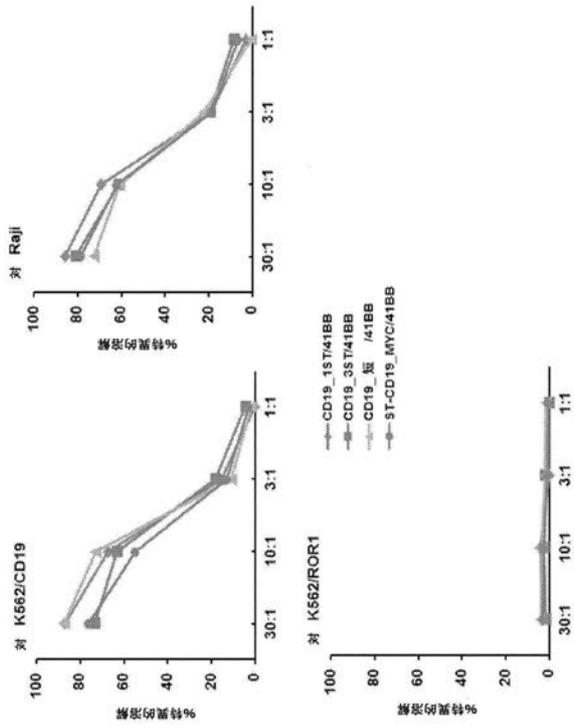


Fig. 32

【 配列表 】

2019083821000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00	T
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	A
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 7
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 7

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 スタンリー アール . リデル

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 7 5 , サマミッシュ , 2 6 8 ティーエイチ プレイス
サウスイースト 1 7 6 3

(72)発明者 リンフェン リウ

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 2 , シアトル , ボイルストン アベニュー イースト
5 2 0 , アpartment 2 0 1

F ターム(参考) 4B029 AA07 BB11 FA01

4B063 QA01 QA18 QQ08 QR48 QS33 QX02

4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA24 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 BA02 BA03 BA23 BA41 BA44 CA53 CA59 NA14 ZB071

ZB111 ZB222 ZB261 ZB331 ZB351 ZC521 ZC751

4C087 AA01 AA02 BB37 BB44 BB57 BB64 BB65 CA12 NA14 ZB07

ZB11 ZB22 ZB26 ZB33 ZB35 ZC52

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 DA50 DA76 EA20 EA50 FA74

【外国語明細書】

2019083821000001.pdf

专利名称(译)	标记的嵌合效应分子及其受体		
公开(公告)号	JP2019083821A	公开(公告)日	2019-06-06
申请号	JP2019038969	申请日	2019-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	弗莱德哈钦森癌症研究中心		
申请(专利权)人(译)	弗雷德·哈钦森癌症研究中心		
[标]发明人	スタンリーアールリデル		
发明人	スタンリー アール. リデル リンフェン リウ		
IPC分类号	C12N15/62 C12N15/13 C12N15/12 C07K19/00 C07K16/18 C07K14/705 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/0783 C12N1/00 C12Q1/04 C12M1/34 A61K35/12 A61K35/17 A61K35/28 A61K38/02 A61P31/12 A61P31/04 A61P35/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	A61K35/17 A61K35/545 A61K38/1774 A61K38/2013 A61K38/2086 A61K2039/507 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/705 C07K14/7051 C07K16/2803 C07K16/2818 C07K16/2878 C07K2317/64 C07K2319/03 C07K2319/20 C07K2319/22 C07K2319/33 C07K2319/95 A61K2300/00 A61K39/395 A61K2035/124 A61K2039/505 C07K14/70521 C07K14/70578 C07K2317/622 C12N5/0637 C12N5/0638 C12N2501/2302 C12N2510/00 G01N33/56972		
FI分类号	C12N15/62.ZNA.Z C12N15/13 C12N15/12 C07K19/00 C07K16/18 C07K14/705 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/0783 C12N1/00.T C12Q1/04 C12M1/34.A A61K35/12 A61K35/17.Z A61K35/28 A61K38/02 A61P31/12 A61P31/04 A61P35/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P43/00.107 G01N33/53.Y G01N33/543.597 C12N15/62.ZZN.A		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/FA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA02 4C084/BA03 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB222 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZC521 4C084/ZC751 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/BB44 4C087/BB57 4C087/BB64 4C087/BB65 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB07 4C087/ZB11 4C087/ZB22 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4C087/ZB35 4C087/ZC52 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/919201 2013-12-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于鉴定，有效分离/分选，选择性增殖，追踪和控制或去除体内工程细胞（例如，工程化免疫细胞（例如，T细胞））的组合物。并提供一种方式。本公开内容是单链融合蛋白，其包含通过疏水部分连接的细胞外和细胞内组分，其中细胞外组分是特异性结合靶标的结合结构域。标签盒和包含铰链的连接区域，其中所述细胞内组分涉及包含效应结构域的组分。在一些方面，本公开是（a）位于细胞外结合结构域的氨基末端，（b）包埋在细胞外结合结构域内，或（c）细胞外结合结构域和效应结构域。嵌合抗原受体分子包含融合蛋白，所述融合蛋白具有一个或多个细胞外标签盒，所述细胞外标签盒设置在所述细胞外标签盒之间并连接包含所述细胞外标签盒【选择图表】无

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z N A Z 4 B O 2 9
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 B O 6 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C O 8 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 7

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-38969 (P2019-38969)	(71) 出願人	506139389
(22) 出願日	平成31年3月4日 (2019.3.4)	フレッド ハッチンソン キャンサー リサーチ センター	
(62) 分割の表示	特願2016-540620 (P2016-540620) の分割	アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル	
原出願日	平成26年12月22日 (2014.12.22)	フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0	
(31) 優先権主張番号	61/919,201	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成25年12月20日 (2013.12.20)	弁理士 山本 秀敏	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100181674
		弁理士 森下 夏樹	100181674
		(74) 代理人	100181641
		弁理士 飯田 貴敏	100181641
		(74) 代理人	100181641
		弁理士 石川 大輔	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タグ化キメラエフェクター分子およびそのレセプター