

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-514188

(P2021-514188A)

(43) 公表日 令和3年6月10日(2021.6.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 119 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-543746 (P2020-543746)  
 (86) (22) 出願日 平成31年2月14日 (2019. 2. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月5日 (2020. 10. 5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/018112  
 (87) 国際公開番号 W02019/161133  
 (87) 国際公開日 令和1年8月22日 (2019. 8. 22)  
 (31) 優先権主張番号 62/631, 465  
 (32) 優先日 平成30年2月15日 (2018. 2. 15)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 500213834  
 メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275  
 (71) 出願人 511071522  
 エウレカ セラピューティクス, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94608, エメリービル, スイート 362, ホールトン ストリート 5858  
 (74) 代理人 100094569  
 弁理士 田中 伸一郎

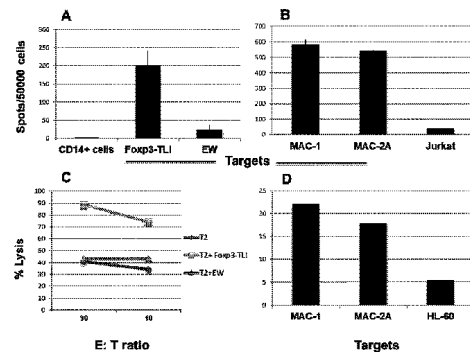
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F O X P 3 標的因子組成物と養子細胞療法のための使用方法

(57) 【要約】

本明細書で提供されるものは、養子細胞療法のための細胞を作製するための組成物、キット及び方法であり、前記組成物は (a) 操作された受容体、操作された受容体をコードするベクター、又はそのような操作された受容体を発現するか若しくはそのようなベクターを含む操作された免疫細胞、並びにFoxP3標的因子を含む。

FIG. 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

操作された免疫細胞を作製する方法であって、複数の免疫細胞を含むサンプルを (a) 操作された受容体をコードするベクター、及び (b) フォークヘッドボックスP3 (FoxP3) 標的因子と接触させる工程を含み、それによってベクターを含む操作された免疫細胞を作製する、前記方法。

## 【請求項 2】

複数の免疫細胞が1つ以上の末梢血単核細胞 (PBMC) を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

1つ以上のPBMCがT細胞を含む、請求項2に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

T細胞が、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞又は制御性T細胞である、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 5】

細胞傷害性T細胞が分化抗原群8陽性 (CD8+) T細胞である、請求項4に記載の方法。

## 【請求項 6】

ヘルパーT細胞が分化抗原群4陽性 (CD4+) T細胞である、請求項4に記載の方法。

## 【請求項 7】

複数の免疫細胞が、1つ以上のFoxP3陽性 (FoxP3<sup>+</sup>) 細胞を含むか、又は1つ以上のFoxP3<sup>+</sup>細胞及びFoxP3を発現しない1つ以上の細胞を含む、請求項1 - 6のいずれか1項に記載の方法。

20

## 【請求項 8】

サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程が、サンプル中のFoxP3<sup>+</sup>細胞の数を減少させる、請求項1 - 7のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 9】

サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程が、FoxP3標的因子との接触前のサンプル中のFoxP3<sup>+</sup>細胞の数と比較して、サンプル中のFoxP3<sup>+</sup>細胞の数を少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれより多く減少させるか、又はFoxP3標的因子と接触させたことがないコントロールサンプル中のFoxP3<sup>+</sup>細胞の数と比較して、サンプル中のFoxP3<sup>+</sup>細胞の数を少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれより多く減少させる、請求項8に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

1つ以上のFoxP3<sup>+</sup>細胞の少なくとも1つがFoxP3を発現しない細胞から分離される、請求項7 - 9のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 11】

サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程が、サンプルを2つ以上の異なるFoxp3標的因子と接触させる工程を含む、請求項1 - 10のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 12】

ベクターと接触させる前に、時を同じくして、又は後でサンプルをFoxP3標的因子と接触させる、請求項1 - 11のいずれか1項に記載の方法。

40

## 【請求項 13】

操作された受容体が、キメラ抗原受容体 (CAR)、キメラ抗体T細胞受容体 (caTCR)、及び操作T細胞受容体 (eTCR) から成る群から選択される、請求項1 - 12のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 14】

CARが、少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメイン及び/又は少なくとも1つの細胞内シグナリングドメインを含む、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 15】

少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメインが単鎖可変領域フラグメント (scFv) を含み、及び/又は少なくとも1つの細胞内シグナリングドメインがCD3 ポリペプチド又はその

50

フラグメントを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

操作された受容体が細胞表面抗原と結合する、請求項1から15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

細胞表面抗原が、分化抗原群19 (CD19)、CD20、CD47、グリピカン3 (GPC-3)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (ROR1)、ROR2、B細胞成熟抗原 (BCMA)、Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5メンバーD (GPC5D)、及びFc受容体様5 (FCRL5) から成る群から選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

操作された受容体が、ペプチド及び主要組織適合性複合体 (MHC) タンパク質を含む複合体と結合する、請求項1から15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

ペプチドが、ウィルムス腫瘍遺伝子1 (WT-1)、アルファ-フェトプロテイン (AFP)、ヒトパピローマウイルス16 E7タンパク質 (HPV16-E7)、ニューヨーク食道扁平上皮癌1 (NY-ESO-1)、メラノーマの優先的発現抗原 (PRAME)、エプスタイン-バーウイルス潜伏膜タンパク質2アルファ (EBV-LMP2A)、ヒト免疫不全ウイルス1 (HIV-1)、KRAS、ヒストンH3.3、及び前立腺特異的抗原 (PSA) から成る群から選択されるタンパク質に由来する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

操作された受容体をコードするベクターが、哺乳動物発現ベクター、レンチウイルスベクター又はトランスポゾンベクターである、請求項1から19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

FoxP3標的因子が、抗体、CAR、caTCR、若しくはeTCRである抗原結合タンパク質を含むか、又はその抗原結合フラグメントを含むか、又は、FoxP3標的因子がTCR分子であるか、又はTCR分子の抗原結合部分を含む、請求項1 - 20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

FoxP3標的因子が、FoxPs由来ペプチド及びMHCタンパク質を含む複合体と結合する抗原結合タンパク質を含む、請求項1 - 21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

抗原結合タンパク質が固体支持体に結合される、請求項21又は22に記載の方法。

【請求項24】

抗原結合タンパク質が二重特異性抗体であって、前記二重特異性抗体が、(a) FoxP3ペプチド及びMHCタンパク質を含む複合体に特異的な抗原結合ドメイン、及び(b) 分化抗原群3 (CD3) に特異的な抗原結合ドメインを含む、請求項21 - 23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

FoxP3標的因子が抗FoxP3 CAR-T細胞である、請求項21又は22に記載の方法。

【請求項26】

FoxP3由来ペプチドフラグメントが、配列番号:2に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-1又はその部分、配列番号:3に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-2又はその部分、配列番号:4に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-3又はその部分、配列番号:5に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-4又はその部分、配列番号:6に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-5又はその部分、配列番号:7に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-6又はその部分、及び配列番号:8に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-7又はその部分から選択される、請求項21から25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

FoxP3標的因子が以下を含む抗原結合タンパク質を含む、請求項26に記載の方法:

(a) 配列番号:16に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1; 配列番号:17に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2; 配列番号:18に示されるアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

重鎖可変領域CDR3；配列番号:19に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:21に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；

(b) 配列番号:22に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:23に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:24に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:26に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:27に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；

(c) 配列番号:28に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:29に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:30に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:31に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:32に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:33に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；

(d) 配列番号:34に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:36に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:38に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:39に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；

(e) 配列番号:40に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:41に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:42に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:43に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:44に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:45に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；

(f) 配列番号:46に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:47に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:48に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:49に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:50に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:51に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；

(g) 配列番号:52に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:53に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:54に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:55に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:56に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:57に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；又は

(h) 配列番号:58に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:59に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:60に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:61に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:62に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:63に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3。

【請求項 28】

サンプルをベクターと接触させる工程が、サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程の少なくとも12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、又は144時間前に発生するか、サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程が、サンプルをベクターと接触させる工程の少なくとも4、6、8、10、12、16、20、24、36、又は48時間前に発生する、請求項12-27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 29】

(a) 操作された免疫細胞（ここで前記操作された免疫細胞は操作された受容体を発現する）及び(b) FoxP3標的因子を含む、組成物。

【請求項 30】

(a) 操作された受容体をコードするベクター及び(b) FoxP3標的因子を含む、組成物。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願の相互引用) 本出願は、米国仮特許出願No. 62/631,465 (2018年2月15日出願) (前記出願の完全な内容は参照によって本明細書に含まれる) に対して優先権を主張する。

(政府支援に関する申立て) 本発明は、米国立衛生研究所により提供されたAI073736、AI095692、AR068118、R01 CA55349、P01 CA23766、GM100477、及びAI118224の下に政府の支援を受けて達成された。当該政府は本発明で一定の権利を有する。

(技術分野)

10

## 【背景技術】

## 【0002】

養子T細胞療法及び操作されたT細胞療法は、多様な疾患(例えば感染症(例えばHIV)及び癌)のための重要な治療法として近年出現し、前記T細胞にはキメラ抗原受容体(CAR) T細胞、T細胞受容体(TCR) 操作T細胞、及び抗原受入れT細胞が含まれる。第一世代CARは、scFvをCD3 鎖の細胞内シグナリングドメインに融合することによって設計され、一方、次世代CARは改変されて、T細胞活性化及び有効性の改善のために共同刺激分子(CD28、CD80、及び4-1BB) 及び活性化分子(例えばCD3 )を含む。しかしながら、T制御性細胞(Treg) 及びTreg様細胞による免疫抑制は、免疫療法の成功にとって主要な障害となっている。

20

転写因子フォークヘッドボックスp3(Foxp3)はTreg及びTreg様細胞で過剰発現され、これらの細胞の抑制性機能で中心的役割を果たす。養子細胞療法に用いられる細胞サンプル(操作された免疫細胞の調製に用いられる免疫細胞サンプルを含む)は、FoxP3陽性免疫抑制細胞(例えばTreg) 及びFoxP3陰性免疫アクチベーター細胞の混合物を含む。免疫抑制細胞の存在は、養子細胞療法のための細胞集団の作製に負の影響を与え得る。したがって、本明細書で開示されるものは、操作された免疫細胞の作製を改善し、養子細胞療法の有効性を高めるための組成物、キット及び方法である。

## 【発明の概要】

## 【0003】

ある種の実施態様では、本明細書で提供されるものは、操作された免疫細胞を作製する方法であり、複数の免疫細胞を含むサンプルを(a)操作された受容体をコードするベクター、及び(b)フォークヘッドボックスP3(FoxP3) 標的因子と接触させる工程を含み、それによってベクターを含む操作された免疫細胞を作製する。いくつかの実施態様では、複数の免疫細胞は、1つ以上の末梢血単核細胞(PBMC)を含む。いくつかの実施態様では、1つ以上のPBMCは白血球である。いくつかの実施態様では、白血球はリンパ球である。いくつかの実施態様では、リンパ球はT細胞である。いくつかの実施態様では、T細胞はエフェクターT細胞である。いくつかの実施態様では、エフェクターT細胞は細胞傷害性T細胞である。いくつかの実施態様では、細胞傷害性T細胞は分化抗原群8陽性(CD8+) T細胞である。いくつかの実施態様では、エフェクター細胞はヘルパーT細胞である。いくつかの実施態様では、ヘルパーT細胞は分化抗原群4陽性(CD4+) T細胞である。いくつかの実施態様では、T細胞は制御性T細胞である。いくつかの実施態様では、複数の免疫細胞は、1つ以上のFoxP3発現細胞を含む。いくつかの実施態様では、複数の免疫細胞は、FoxP3を発現しない1つ以上の細胞を含む。いくつかの実施態様では、複数の免疫細胞は、1つ以上のFoxP3発現細胞及びFoxP3を発現しない1つ以上の細胞を含む。いくつかの実施態様では、1つ以上のFoxP3発現細胞の少なくとも1つは溶解又は殺滅される。いくつかの実施態様では、1つ以上のFoxP3発現細胞の少なくとも1つは、FoxP3を発現しない細胞から分離される。いくつかの実施態様では、サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程は、サンプルを2つ以上の異なるFoxp3標的因子と接触させる工程を含む。いくつかの実施態様では、1つ以上のFoxP3発現細胞の少なくとも1つは溶解又は殺滅され、さらに1つ以上のFoxP3発現

30

40

50

細胞の少なくとも1つは、Foxp3を発現しない細胞から分離される。いくつかの実施態様では、サンプルは、ベクターとの接触前にFoxp3標的因子と接触される。いくつかの実施態様では、サンプルはFoxP3標的因子及びベクターと時を同じくして接触される。いくつかの実施態様では、サンプルは、ベクターとの接触後にFoxp3標的因子と接触される。

【0004】

いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞の操作された受容体は、キメラ抗原受容体 (CAR)、キメラ抗体T細胞受容体 (caTCR)、及び操作T細胞受容体 (eTCR) から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、操作された受容体はCARである。いくつかの実施態様では、CARは少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメインは単鎖可変領域フラグメント (scFv) を含む。いくつかの実施態様では、CARは少なくとも1つの細胞内シグナリングドメインを含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの細胞内シグナリングドメインはCD3ゼータポリペプチド又はそのフラグメントを含む。いくつかの実施態様では、操作された受容体はcaTCRである。いくつかの実施態様では、caTCRは少なくとも1つのトランスメンブレンドメインを含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つのトランスメンブレンドメインはTCRのトランスメンブレンドメインに由来する。いくつかの実施態様では、TCRのトランスメンブレンドメインはガンマ-デルタTCRのトランスメンブレンドメインである。いくつかの実施態様では、caTCRは少なくとも1つの定常領域を含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの定常領域は重鎖定常領域又はそのフラグメントを含む。いくつかの実施態様では、重鎖定常領域は1つ以上のドメインを含む。いくつかの実施態様では、重鎖定常領域は3つのドメインを含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの定常領域は軽鎖定常領域又はそのフラグメントを含む。いくつかの実施態様では、軽鎖定常領域は少なくとも1つのドメインを含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの定常領域はTCRの定常領域に由来する。いくつかの実施態様では、TCRの定常領域はガンマ-デルタTCRの定常領域である。

【0005】

いくつかの実施態様では、caTCRは、(a) VH抗体ドメインを含む第一の抗原結合ドメイン及び第一のTCRトランスメンブレンドメイン (TCR-TM) を含む第一のTCRドメイン (TCRD) を含む第一のポリペプチド鎖；並びに (b) VL抗体ドメインを含む第二の抗原結合ドメイン及び第二のTCR-TMを含む第二のTCRDを含む第二のポリペプチド鎖を含み、ここで、第一の抗原結合ドメインのVHドメイン及び第二の抗原結合ドメインのVLドメインは、標的抗原と特異的に結合する抗原結合モジュールを形成し、さらに第一のTCRD及び第二のTCRDは、少なくとも1つのTCR関連シグナリングモジュールを動員することができるTCRモジュール (TCRM) を形成する。いくつかの実施態様では、第一のTCR-TMは、第一の天然に存在するTCRのトランスメンブレンドメインの1つに由来し、第二のTCR-TMは、第一の天然に存在するTCRの他のトランスメンブレンドメインに由来する。いくつかの実施態様では、第一の天然に存在するTCRはガンマ-デルタTCRである。いくつかの実施態様では、第一のポリペプチド鎖はさらにまた、第一の抗原結合ドメインと第一のTCRDとの間に第一のペプチドリンカーを含み、第二のポリペプチド鎖はさらにまた、第二の抗原結合ドメインと第二のTCRDとの間に第二のペプチドリンカーを含む。いくつかの実施態様では、第一及び/又は第二のペプチドリンカーは、個々に免疫グロブリン又はTCRサブユニット由来の定常ドメイン又はそのフラグメントを含む。いくつかの実施態様では、第一及び/又は第二のペプチドリンカーは、個々にCH1、CH2、CH3、CH4、若しくはCL抗体ドメイン又はそのフラグメントを含む。いくつかの実施態様では、第一及び/又は第二のペプチドリンカーは、個々にC<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、若しくはC<sub>4</sub> TCRドメイン又はそのフラグメントを含む。

【0006】

いくつかの実施態様では、操作された受容体はTCRである。いくつかの実施態様では、eTCRは抗原/MHC結合領域を含む。いくつかの実施態様では、抗原/MHC結合領域は、天然に存在するTCRの抗原/MHC結合領域に由来する。いくつかの実施態様では、操作された受容体は細胞表面抗原と結合する。いくつかの実施態様では、細胞表面抗原はタンパク質、炭

10

20

30

40

50

水化物、及び脂質から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、細胞表面抗原は、分化抗原群19 (CD19)、CD20、CD47、グリピカン3 (GPC-3)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (ROR1)、ROR2、B細胞成熟抗原 (BCMA)、Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5メンバーD (GPCR5D)、及びFc受容体様5 (FCRL5) から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、細胞表面抗原はCD19である。いくつかの実施態様では、操作された受容体は、ペプチド及び主要組織適合性複合体 (MHC) タンパク質を含む複合体と結合する。いくつかの実施態様では、ペプチドは以下から成る群から選択されるタンパク質に由来する：ウィルムス腫瘍遺伝子1 (WT-1)、アルファ-フェトプロテイン (AFP)、ヒトパピローマウイルス16 E7タンパク質 (HPV16-E7)、ニューヨーク食道扁平上皮癌1 (NY-ESO-1)、メラノーマの優先的発現抗原 (PRAME)、エプスタイン-バーウイルス潜伏膜タンパク質2アルファ (EBV-LMP2A)、ヒト免疫不全ウイルス1 (HIV-1)、KRAS、ヒストンH3.3、及び前立腺特異的抗原 (PSA)。いくつかの実施態様では、ペプチドはAFPに由来する。いくつかの実施態様では、AFP由来ペプチドはFMNKFIYEIの配列を含む。いくつかの実施態様では、MHCタンパク質はMHCクラスIタンパク質である。いくつかの実施態様では、MHCクラスIタンパク質はHLA-A02対立遺伝子のHLA-A\*02:01サブタイプである。いくつかの実施態様では、操作受容体は多重特異性である。いくつかの実施態様では、操作受容体は一特異性である。いくつかの実施態様では、操作受容体をコードするベクターは哺乳動物発現ベクターである。いくつかの実施態様では、哺乳動物発現ベクターは、レンチウイルスベクター又はトランスポゾンベクターである。

10

20

30

40

50

#### 【0007】

いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、抗体、CAR、caTCR、又はeTCRであるか、又はその抗原結合フラグメントを含む。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子はTCR分子であるか、又はTCR分子の抗原結合部分を含む。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、FoxP3由来ペプチド及びMHCタンパク質を含む複合体と結合する抗原結合タンパク質を含む。いくつかの実施態様では、MHCタンパク質はMHCクラスIタンパク質である。いくつかの実施態様では、MHCクラスIタンパク質は、ヒト白血球抗原 (HLA) クラスI分子である。いくつかの実施態様では、HLAクラスI分子はHLA-Aである。いくつかの実施態様では、HLA-AはHLA-A2である。いくつかの実施態様では、HLA-A2はHLA-A\*02:01である。いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質は抗体、CAR、又はcaTCRである。いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質は一特異性である。いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質は完全長抗体である。いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質はIgGである。いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質は固体支持体に結合される。いくつかの実施態様では、固体支持体は、ビーズ、マイクロウェル、及び平らなガラス表面から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、ビーズは、磁性ビーズ、架橋ポリマービーズ、及びビーズ状アガロースから成る群から選択される。いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質は多重特異性である。いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質は二重特異性抗体である。いくつかの実施態様では、二特異性抗体は、(a) FoxP3ペプチド及びMHCタンパク質を含む複合体に特異的な抗原結合ドメイン、及び(b) 分化抗原群3 (CD3) に特異的な抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質はキメラ抗原受容体 (CAR) である。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は抗FoxP3 CAR-T細胞である。いくつかの実施態様では、FoxP3由来ペプチドフラグメントは8 - 12アミノ酸の長さを有する。いくつかの実施態様では、FoxP3由来ペプチドフラグメントは以下から選択される：配列番号:2に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-1又はその部分、配列番号:3に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-2又はその部分、配列番号:4に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-3又はその部分、配列番号:5に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-4又はその部分、配列番号:6に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-5又はその部分、配列番号:7に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-6又はその部分、及び配列番号:8に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-7又はその部分。いくつかの実施態様では、FoxP3由来ペプチドフラグメントは、配列番号:8に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-7又はその部分である。いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質は以下を含む：(a) 配

列番号:16に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:17に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:18に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:19に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:21に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(b)配列番号:22に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:23に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:24に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:26に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:27に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(c)配列番号:28に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:29に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:30に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:31に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:32に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:33に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(d)配列番号:34に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:36に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:38に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:39に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(e)配列番号:40に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:41に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:42に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:43に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:44に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:45に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(f)配列番号:46に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:47に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:48に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:49に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:50に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:51に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(g)配列番号:52に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:53に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:54に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:55に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:56に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:57に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；又は(h)配列番号:58に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:59に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:60に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:61に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:62に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:63に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3。

#### 【0008】

いくつかの実施態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号:46に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:47に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:48に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:49に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:50に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:51に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。

いくつかの実施態様では、サンプルをベクターと接触させる工程は、サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程の少なくとも12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、又は144時間前に発生する。いくつかの実施態様では、サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程は、サンプルをベクターと接触させる工程の少なくとも4、6、8、10、12、16、20、24、36、又は48時間前に発生する。

いくつかの実施態様では、サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程は、サンプル中のFoxP3陽性(FoxP3+)細胞の数を減少させる。いくつかの実施態様では、サンプルをFox

10

20

30

40

50



p3標的因子と接触させる工程は、FoxP3標的因子との接触前のサンプル中のFoxP3+細胞の数と比較して、サンプル中のFoxP3+細胞の数を少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれより多く減少させる。いくつかの実施態様では、サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程は、FoxP3標的因子と接触させたことがないコントロールサンプル中のFoxP3+細胞の数と比較して、サンプル中のFoxP3+細胞の数を少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれより多く減少させる。

【0009】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメイン又は抗原結合モジュールはCD19と結合し、さらに以下を含む：(a) (i) 重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3、それぞれ配列番号:105、106、及び107と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み、及び/又は(ii) 軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3、それぞれ配列番号:109、110、又は111と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；(b) (i) 重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3、それぞれ配列番号:105、106、及び108と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み、及び/又は(ii) 軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3、それぞれ配列番号:109、110、又は111と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；(c) (i) 重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3、それぞれ配列番号:105、106、及び107と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み、及び/又は(ii) 軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3、それぞれ配列番号:109、110、又は112と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；又は(d) (i) 重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3、それぞれ配列番号:105、106、及び108と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み、及び/又は(ii) 軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3、それぞれ配列番号:109、110、又は112と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む。

【0010】

いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子はキメラ抗原受容体(CAR)であり、ここで、CARは、FoxP3ペプチド及び主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質を含む複合体と結合する。いくつかの実施態様では、FoxP3標的CARは、FoxP3ペプチド及び主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質を含む複合体と結合するscFvを含む。いくつかの実施態様では、FoxP3標的CARはさらにまた、scFvと融合されたCD28-CD3ゼータペプチドを含む。いくつかの実施態様では、FoxP3標的CARは、配列番号:12と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するscFv-CD28-CD3ゼータ融合物を含む。いくつかの実施態様では、FoxP2標的CARはさらにまた、scFvと融合された41BB-CD3ゼータペプチドを含む。いくつかの実施態様では、FoxP3標的CARは、配列番号:13と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するscFv-41BB-CD3ゼータ融合物を含む。

いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子はキメラ抗体TCR(caTCR)であり、ここで、caTCRは、FoxP3ペプチド及び主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質を含む複合体と結合する。いくつかの実施態様では、caTCRはTCRのガンマ鎖を含む。いくつかの実施態様では、caTCRはさらにまたTCRのデルタ鎖を含む。いくつかの実施態様では、TCRのガンマ鎖は、FoxP3と結合する免疫グロブリン分子の軽鎖に融合される。いくつかの実施態様では、TCRのデルタ鎖は、FoxP3と結合する免疫グロブリン分子の重鎖に融合される。いくつかの実施態様では、FoxP3標的caTCRは、(a) VH抗体ドメインを含む第一の抗原結合ドメイン及び第一のTCRトランスメンブレンドメイン(TCR-TM)を含む第一のTCRドメイン(TCRD)を含む第一のポリペプチド鎖；及び(b) VL抗体ドメインを含む第二の抗原結合ドメイン及び第二のTCR-TMを含む第二のTCRDを含む第二のポリペプチド鎖を含み、ここで、第一の抗原結合ドメインのVHドメイン及び第二の抗原結合ドメインのVLドメインは、標的抗原と特異的に結合する抗原結合モジュールを形成し、第一のTCRD及び第二のTCRDは、少なくと

10

20

30

40

50

も1つのTCR関連シグナリングモジュールを動員することができるTCRモジュール (TCRM) を形成する。いくつかの実施態様では、第一のTCR-TMは、第一の天然に存在するTCRのトランスメンブレンドメインの1つに由来し、第二のTCR-TMは、第一の天然に存在するTCRの他のトランスメンブレンドメインに由来する。いくつかの実施態様では、第一の天然に存在するTCRはガンマ-デルタTCRである。いくつかの実施態様では、caTCRは、配列番号:15と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する抗FoxP3軽鎖/ガンマ鎖融合物を含む。いくつかの実施態様では、caTCRは、配列番号:14と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する抗FoxP3重鎖/デルタ鎖融合物を含む。

#### 【0011】

ある種の実施態様では、本明細書で提供されるものはまた、操作受容体を発現する操作された免疫細胞を含む治療組成物中のFoxP3陽性細胞を枯渇させる方法であり、前記方法は、治療組成物をFoxP3標的因子と接触させる工程を含む。

ある種の実施態様では、本明細書で提供されるものはまた、サンプル中の操作受容体発現細胞傷害性T細胞を濃縮する方法であり、前記方法は、サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程を含む。

ある種の実施態様では、本明細書で提供されるものはまた組成物であり、前記組成物は、(a) 操作受容体を発現する操作された免疫細胞及び (b) FoxP3標的因子を含む。

ある種の実施態様では、本明細書で提供されるものはまた組成物であり、前記組成物は、(a) 操作受容体をコードするベクター及び (b) FoxP3標的因子を含む。

ある種の実施態様では、本明細書で提供されるものはまた、操作された免疫細胞を作製するための組成物、キット、及び方法である。

ある種の実施態様では、本明細書で提供されるものはまた、その必要がある対象動物で疾患を治療するための組成物、キット、及び方法である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図1】 Foxp3-TLIはペプチド特異的T細胞応答を誘発することを示す。(A) HLA-A0\*201+ Foxp3ドナーからのCD3 T細胞をFoxp3-TLIペプチドで4ラウンド刺激し、T細胞応答をTLIペプチドに対して試験するか、又は無関係のペプチドEWを用いて刺激してIFN-ガンマ酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイによって試験した。CD14+APCは陰性コントロールとして機能する。(B) TLI刺激細胞はまたMAC-1及びMAC-2A細胞を認識するが、HLA-A0\*201-細胞株Jurkatは認識しない(C) 及び(D)。HLA-A\*02:01+ドナー由来T細胞を5ラウンド刺激し、刺激ペプチドパルスしたT2細胞(C) に対して<sup>51</sup>Cr放出アッセイにより、又は非パルス標的細胞(D) に対して<sup>51</sup>Cr放出アッセイによって細胞傷害性を測定した。HLA-A\*02:01陰性AML細胞株HL-60を陰性コントロールとして用いた。各データ点は3複製培養物の平均+/-SDを表す。データは、複数のドナーによる同様な複数の実験の結果を表す。

【図2】 二重特異性抗体の結合特性を示す。(A) 表示の二重特異性mAb構築物とFoxp3+/HLA-A2+ Tリンパ腫細胞株MAC-2A及びコントロール細胞株Jurkatとの結合。二重特異性mAb構築物はmycタグ付きであったので、結合は、細胞を二重特異性mAbで染色し続いて二次mAb (FITC結合マウス抗myc) で染色することによって試験された。コントロールは、非染色細胞(ライン#1)、コントロール二重特異性mAbクローンNC-16 (1 µg/mL (ライン#2) 及び0.1 µg/mL (ライン#3))、又は二次mAb GA6xHis (ライン#4) を含む。Foxp3-#32二重特異性mAbを1 µg/mL (ライン#5) 又は0.1 µg/mL (ライン#6) で用いた。(B) 同様に、マウスmAb Foxp3-#32 (ライン#2) 又はそのアイソタイプコントロール(ライン#1) の結合を1 µg/mLで用いた。(C) HLA-A\*02発現は、表示のように抗A2 mAb BB7 (ライン#2) 及びそのアイソタイプコントロールマウスIgG2b (ライン#1) で細胞を染色することによって測定された。結合強度は中央値蛍光強度によって示される。

【図3】 二重特異性抗体のエピトープ特異性を示す。(A) Foxp3-TLIペプチド配列を1、2、3、4、5、7、8、9位(表3の配列) でアラニンにより、又は10位でグリシン(G10) により置換し、T2細胞を表示のペプチド(50 µg/mL) でパルスし、Foxp3-#32二重特異性mAbの

10

20

30

40

50

結合をフローサイトメトリーで測定した。(B)細胞を抗HLA-A2 mAb、クローンBB7.2で同時に染色し、ペプチドとHLA-A2分子との相対的結合を測定した。

【図4】Foxp3-#32 mAbと健康なドナーからのPBMC中の天然のTreg細胞との特異的結合を示す。PBMCをCD4、CD25、CD127及びFoxp3-#32マウスIgG1に特異的なmAbで染色した。データは、mAb Foxp3-#32はCD4+CD25highCD127low Tregとのみ結合し、CD4+CD25highCD127high集団と結合せず(A)、HLA-A\*02:01陰性ドナーからのCD4+CD25highCD127low Tregとも結合しない(B)ことを示す。データは異なる個体の3セットの代表的な結果を示す。

【図5】Foxp3-#32 mAbとHLA-A\*02:01+ドナーからin vitroで生成したTreg細胞との結合を示す。CD4+ T細胞をFACS仕分けし、刺激細胞及びフィーダー細胞の両方としてMAC-2A細胞(A)又はアロPBMC(B)とともに、1週毎に刺激用にIL-2(100ユニット)及びTGF- $\beta$  (10ng/mL)の存在下で刺激した。細胞を、表面CD4、CD25、細胞内Foxp3に対するmAb及びmAb Foxp3-#32/APCで染色した。Mab Foxp3-#32結合は、DAPI-、CD4及びCD25二重陽性細胞に対してゲート分離することによって決定した。データは、Foxp3-#32プラスFoxp3タンパク質二重染色、並びにFoxp3に対するmAbに対するそのアイソタイプコントロールマウスIgG1及びラットアイソタイプコントロール(二重コントロール)、並びにFoxp3タンパク質に対するmAbプラスFoxp3-#32 mAbについてのアイソタイプコントロールマウスIgG1の重層を示す。(C)細胞株MAC-2A及びHLA-A\*02:01形質導入C5MJを細胞内Foxp3に対するmAb対Foxp3-#32マウスmAbで染色した。Foxp3-#32 mAb及びFoxp3タンパク質二重陽性細胞、#32 mAbについてのアイソタイプによって結合されないFoxp3タンパク質陽性細胞、及び細胞内Foxp3タンパク質及び#32 mAbの両方に関するアイソタイプコントロールが示される(上段2つのパネル)。ヒストグラムは対応する細胞株におけるHLA-A2発現を示す(下段パネル)。

【図6】Foxp3+/HLA-A02:01+細胞に対するFoxp3-Foxp3-#32二重特異性mAb媒介T細胞殺滅を示す。PBMCをTLIパルスしたT2細胞とともにインキュベートした。(A)T2単独に対してFoxp3-#32二重特異性mAb(ライン#1);T2単独に対してコントロール二重特異性mAb(ライン#2);TLIペプチドでパルスしたT2に対してFoxp3-#32二重特異性mAb(ライン#3);TLIペプチドでパルスしたT2に対してコントロール二重特異性mAb(ライン#4);EWペプチドでパルスしたT2に対してFoxp3-#32二重特異性mAb(ライン#5);コントロールペプチドでパルスしたT2に対してコントロール二重特異性mAb(ライン#6);HL-60(B)、MAC-1(C)又はMAC-2A(D)標的細胞、E:T比は50:1、1 $\mu$ g/mLから0.0003 $\mu$ g/mLの濃度の二重特異性mAbを添加又は非添加。MAC-2A(E)、Jurkat(F)、C5MJ/A2(G)又はC5MJ(H)に対するエフェクター細胞として活性化T細胞をE:T比30:1で使用。細胞傷害性は5時間の $^{51}\text{Cr}$ 放出アッセイによって測定した。データは、3複製マクロウェル培養の平均値を表す。データは複数の実験の結果を表す。

【図7】健康なドナー及び患者のサンプル中のTregの代表的フローサイトメトリープロットを示す。(A)培養2日後のHLA-A\*02:01+ドナーからのCD4+CD127高又は低集団の頻度が左の3つのカラムに示された。CD25+Foxp3発現は、CD4+CD127低集団で中央のカラムにさらにCD4+CD127高集団で右のカラムに示された。(B)CD4+CD127高(下段3パネル)又は低集団(上段3パネル)を同じ細胞のCD45RA対Foxp3発現に基づいてさらに分析した。各画分の頻度が示された。(C)同様なゲート分離戦略を培養3日後の細胞に用いた。データは、同じドナーに由来するCD4+CD127低集団(中央3つのカラム)におけるCD4+Foxp3細胞(中央2つのカラム)又はCD45RA対Foxp3+細胞(右2つのカラム)を示す。データは3つの同様な実験の1つを表す。(D)卵巣癌を有しFoxp3-#32二重特異性mAbで2日間処置されたHLA-A\*02:01+患者の腹水細胞を上記Tregマーカーで染色した。細胞をまず初めにリンパ球についてゲート分離し、側方散乱及び前方散乱で大きな腫瘍細胞及び単球集団を除去した。続いて、CD4+集団を2つのTregマーカーセット(CD25高対細胞内Foxp3又はCD127低細胞内Foxp3)で分析した。データは同じ患者でかつ合計3人の患者に由来する2つの同様な実験の1つを表す。

【図8】正常PBMCに対する二重特異性mAb媒介細胞傷害性を示す。HLA-A\*02:01陽性又は陰性ドナーからのコントロール細胞又はPBMCを、0.2若しくは1 $\mu$ g/mLのFoxp3-#32二重特異性mAb又はそのコントロールの存在下若しくは非存在下で一晩インキュベートした。細胞

を洗浄し、ヒトCD3、CD19及びCD33に対するmAbで染色して、これらの細胞系列が二重特異性mAbによって殺滅されるか否かを決定した。共培養後の各細胞系列の残存細胞パーセンテージを示す。表の上段では、MAC-1細胞は、エフェクター細胞として30：1のE：T比でHLA-A\*02:01陰性PBMCとともに、二重特異性mAb（1 µg/mL）の存在下若しくは非存在下でインキュベートされた。細胞を採集し、HLA-A2（BB7.2クローン）に対するmAbで染色した。MAC1細胞のみがHLA-A2陽性であるので、HLA-A2+集団の減少又は消失はMAC-1の殺滅を示す。表の下段は、HLA-A\*02:01陽性PBMC（左）又はHLA-A\*02:01陰性PBMC（右）の殺滅を示す。有意な殺滅はどちらのHLAタイプでも観察されなかった。データは異なるドナーによる3つの同様な実験のうちの一つを表す。

【図9】Foxp3-#32 mAbは、HLA-A\*02:01陽性ドナーからのCD3+CD8+ T細胞と結合しないことを示す。（A）Foxp3-#32 mAbを当該mAbとHLA-A\*02:01陽性健康ドナー由来のCD3/CD8二重陽性細胞との結合について試験した。ヒストグラムオーバーレイによって示されるように、コントロールmAbと比較して結合は観察されなかった。データは、複数のドナーからのフローサイトメトリーデータの1つを表す。（B）Foxp3-#32二重特異性mAb（1 µg/mL）で1日から3日間処置した1人のHLA-A\*02:01陽性ドナーからの健康な全PBMCのリンパ球のパーセンテージ。リンパ球パーセンテージは、前方及び側方散乱プロットでリンパ球集団についてゲート分離することによって示された。2日及び3日処理後のFoxp3-#32二重特異性mAb処置グループでわずかな減少が観察された。各データ点は3複製染色 + SDを示す。データは2つの同様な実験の1つを表す。

【図10】図10AはFoxp3+Tregは、健康なHLA-A\*02:01陰性ドナーでは枯渇されていないことを示す。図7に示した同じ実験で、健康なHLA-A\*02:01陰性ドナーからのPBMCをFoxp3-#32二重特異性mAbで2日間処理し、TregマーカーCD4、CD25、CD127、CD45RA表面染色及びFoxp3細胞内染色を用いてFoxp3+ Treg枯渇を測定した。上段3パネル：無処理PBMC、中段3パネル：Foxp3-#32二重特異性mAb処理PBMC、下段3パネル：コントロール二重特異性mAb処理PBMC。データは2つの同様な実験の代表的データを表す。図10Bは、Foxp3-#32 Fc-増強ヒトIgG1による卵巣癌患者腹水中のFoxp3+Tregの枯渇を示す。腹水細胞を、Foxp3-#32-Fc-増強mAb（濃度10 µg/mL）で2日間（上段パネル）及び3日間（下段パネル）処理した。代表的プロットは、CD4+CD127低集団におけるCD45RA対Foxp3染色を示す。データは2つの同様な実験の1つを表す。

【図11】図11Aは、HLA-A\*02:01+ドナーから *in vitro* で作製したTregに対するFoxp3-#32二重特異性mAb媒介T細胞殺滅を示す。HLA-A2陰性ドナーからの精製CD3+ T細胞を、Foxp3-#32又はコントロール二重特異性mAb（1 µg/mL）の存在下若しくは非存在下で、HLA-A\*02:01+ドナーから作製したTregラインとともに5：1のE：T比で一晩インキュベートした。HLA-A\*02:01+ T細胞中のFoxp3+細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーで決定した。HLA-A2+Foxp3+細胞の減少はFoxp3-#32二重特異性mAb媒介T細胞殺滅を示す。上段左四分枠は、エフェクター細胞単独とTregラインとの培養及びHLA-A2による染色対細胞内Foxp3タンパク質に対するmAbによる染色を示す。上段右四分枠は、コントロール二重特異性mAbの存在下におけるエフェクター細胞とTregラインとの培養を示すが、X軸は細胞内Foxp3タンパク質に対するアイソタイプコントロールによる染色であり、他の3パネルにおけるFoxp3に対するmAbの特異的結合を示す。下段2つのパネルは、Foxp3-#32-mAb（左）又はコントロールmAb（右）の存在下におけるエフェクターとTregラインとの培養を示す。データは、2複製培養の代表的なフローサイトメトリーのデータを示す。図11Bは、11Aに記載した2つのTregラインにおける試験と同様な結果の要旨を提供する。図11Cは、二重特異性mAb（1 µg/mL）の存在下若しくは非存在下で合計3日間、HLA-A\*02:01陰性ドナーからのPBMCとともに30：1のE：T比でインキュベートした、GFP/ルシフェラーゼ形質導入MAC-2A細胞を示す。画像化前にルシフェリン30 µgを各ウェルに添加した。表示の時点で総バイオ発光を測定した。データは3つのマイクロウェル培養の平均を表す。

【図12】ヒトタンパク質由来の多様なHLA-A2結合ペプチド（5 µg/mL）でパルスしたT2細胞で、材料と方法に記載したようにフローサイトメトリーで測定されたFoxp3-#32-マウスmAbの結合を示す。Foxp3-#32 mAbは、Foxp3-TLIペプチドとの結合に加えて、2つのペ

10

20

30

40

50

プチド（ペプチド11及び14（マイクロウェルプレートの011の位置及び014の位置））（マイナー組織適合性抗原HA-1及びHA-8に由来）と結合した。

【図13】本明細書に記載した実施態様で有用な核酸及びアミノ酸配列の表が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本開示は本出願に記載する個別の実施態様に関して限定されるべきではなく、それら実施態様は本開示の個々の特徴の一例示として意図される。本開示の多様な実施態様が全て本明細書に記載されるわけではない。当業者には明白であるように、本開示の多くの改変及び変型がその範囲を逸脱することなく為され得る。本明細書に列挙する方法及び装置に加え、本開示の範囲内の機能的に等価なものは前述の記載から当業者には明白であろう。そのような改変及び変型は添付の特許請求の範囲内に入ると考えられる。本開示は、添付の特許請求の範囲とともに、当該特許請求の範囲が資格を付与する全範囲の等価物によってのみ限定されるべきである。

本開示は、個別の使用、方法、試薬、化合物、組成物又は生物学的な系に限定されず、もちろん変動し得ることは理解されるべきである。本明細書で用いられる用語は単に個別の実施態様を説明する目的のためであり、制限することを意図しないこともまた理解されるべきである。

加えて、本開示の特色又は特徴がマーカッシュグループに関して記述される場合、それによって、本開示は、当該マーカッシュグループのメンバーの任意の個々のメンバー又はサブグループに関して記述されていることを当業者は認識するであろう。

当業者には理解されるように、一切の目的のために、特に書面による記述の提供に関して、本明細書に開示する全ての範囲はまた、一切の可能な部分範囲及び前記の部分範囲の組合せを包含する。任意の記載された範囲は十分に記載されていると容易に認識され、当該同じ範囲は少なくとも等しい1/2、1/3、1/4、1/5、1/10などに分解され得る。非限定的な例として、本明細書で考察される各範囲は、小さい方の1/3、中間の1/3及び大きい方の1/3などに容易に分解することができる。当業者にはまた理解されるであろうが、全ての言葉、例えば“まで”、“少なくとも”“～より大きい”、“～より少ない”などは記載された数を含み、上記で考察したように続いて部分範囲に分解することができる。最後に、当業者に理解されるように、範囲は個々の数の各々を含む。したがって、例えば、1-3個の細胞を有するグループは、1、2、又は3個の細胞を有するグループを指す。同様に、1-5個の細胞を有するグループは、1、2、3、4、又は5個の細胞を有するグループを指し、以下同様である。

【0014】

#### 定義

特段の規定がなければ、本明細書で用いられる全ての技術用語及び学術用語は、本開示が属する分野の業者が通常的に理解する意味を有する。以下の参考文献は、本発明で用いられる多くの用語の一般的定義を当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd ed., 1994; The Cambridge Dictionary of Science and Technology, Walker ed., 1988; The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al., eds., Springer Verlag, 1991; 及びHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, 1991。本明細書で用いられるように、以下の用語は、特段の指定がなければ、それら用語に帰属する下記の意味を有する。本明細書で用いられる用語は個別の実施態様を記載するという目的のためにのみ用いられ、本開示を限定しようとするものではない。

本明細書で用いられるように、単数形“a”、“an”及び“the”は、文脈が明瞭にそうではないことを示していないかぎり、複数形も同様に含むことが意図される。

本明細書で用いられるように、“約（about, approximately）”という用語は、当業者によって決定される個別の値について許容可能な誤差範囲内であることを意味し、この用語は、当該値がどのように測定されるか又は決定されるか（すなわち測定系の限界）に部

10

20

30

40

50

分的に左右されるであろう。例えば、“約”は、当業界の慣行にしたがって3又は4以上の標準偏差内を意味することができる。また別には、“約”は、与えられた値の20%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%まで、さらに好ましくは1%までの範囲を意味することができる。また別に、特に生物学的な系又はプロセスに関しては、当該用語は、ある値の好ましくは5倍内、より好ましくは2倍内を意味することができる。

本明細書で用いられるように、ある因子のある対象動物への“投与”という用語は、当該因子の目的の機能を達成するために、対象動物に因子を導入又はデリバリーする任意のルートを含む。投与は、任意の適切なルート（静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下及び本明細書に記載する他の適切なルートを含むが、ただし前記に限定されない）によって実施され得る。投与は自己投与及び別人による投与を含む。

10

#### 【0015】

本明細書で用いられるように、“細胞集団”という用語は、同様な又は異なる表現型を発現する少なくとも2つの細胞のグループを指す。非限定的な例では、細胞集団は、同様な又は異なる表現型を発現する、少なくとも約10、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900、少なくとも約1000細胞、少なくとも約10,000細胞、少なくとも約100,000細胞、少なくとも約 $1 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^{10}$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^{11}$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^{12}$ 細胞、またはそれより多い細胞を含むことができる。

20

“アミノ酸”という用語は、天然に存在するアミノ酸及び天然に存在しないアミノ酸とともに、天然に存在するアミノ酸に類似する態様で機能するアミノ酸アナログ及びアミノ酸模倣物を指す。天然にコードされるアミノ酸は、20の通常のアミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリン）並びにピロリジン及びセレノシステインである。アミノ酸アナログは、天然に存在するアミノ酸と同じ化学構造を有する物質を指す。すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基及びR基と結合する炭素を有し、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムである。そのようなアナログは修飾されたR基（例えばノルロイシン）又は修飾されたペプチドバックボーンを有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。いくつかの実施態様では、ポリペプチドを形成するアミノ酸はD型である。いくつかの実施態様では、ポリペプチドを形成するアミノ酸はL型である。いくつかの実施態様では、ポリペプチドを形成する第一の多数のアミノ酸はD型であり、第二の多数のアミノ酸はL型である。

30

アミノ酸は、本明細書ではそれらの一般的に公知の3文字記号によって、又はIUPAC-IUB生化学命名委員会の推奨する1文字記号によって示される。同様に、ヌクレオチドはそれらの一般的に許容される一文字コードによって示される。

#### 【0016】

“ポリペプチド”、“ペプチド”、及び“タンパク質”という用語は本明細書では互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。当該用語は、天然に存在するアミノ酸のポリマーとともに、1つ以上のアミノ酸残基が天然に存在しないアミノ酸（例えばアミノ酸アナログ）であるアミノ酸ポリマーに適用される。当該用語は、任意の長さのアミノ酸鎖（完全長タンパク質）を包含し、ここで、アミノ酸残基は共有ペプチド結合によって連結される。

40

本明細書で用いられるように、“コントロール”は、比較の目的のために実験で用いられるまた別のサンプルである。コントロールは“陽性”も“陰性”もあり得る。例えば、実験の目的が、疾患の個別のタイプの治療について治療因子の有効性の相関性を決定することである場合、典型的には陽性コントロール（所望の治療効果を示すことが判明している組成物）及び陰性コントロール（当該治療法を与えられない若しくはプラセボを与えら

50

れる対象動物又はサンプル)が用いられる。

本明細書で用いられるように、“有効量”又は“治療的に有効な量”という用語は、所望される治療効果を達成するために十分な因子の量を指す。治療薬の適用に関する文脈では、対象動物に投与される治療ペプチドの量は、感染のタイプ及び重篤度並びに個体の特徴(例えば一般的な健康状態、年齢、性別、体重及び薬剤耐性)に左右されることがあり、また疾患の程度、重篤度及びタイプに左右され得る。当業者は、これらの要件及び他の要件にしたがって適切な投薬量を決定することができる。

【0017】

本明細書で用いられるように、“発現”という用語は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス、及び/又は転写されたmRNAがその後でペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は真核細胞でのmRNAのスプライシングを含むことができる。遺伝子の発現レベルは、細胞若しくは組織サンプル中のmRNA又はタンパク質の量を測定することによって決定できる。ある特徴では、1つのサンプルの遺伝子の発現レベルは、コントロール又は参照サンプルにおける当該遺伝子の発現レベルと直接比較することができる。別の特徴では、1つのサンプルの遺伝子の発現レベルは、本明細書に開示の組成物を投与した後の同じサンプルにおける当該遺伝子の発現レベルと直接比較することができる。“発現”という用語はまた以下の事象の1つ以上を指す：(1)細胞内でのDNA配列から(例えば転写による)RNA鋳型の生成；(2)細胞内でのRNA転写物の(例えばスプライシング、編集、5'キャップ形成、及び/又は3'末端形成による)プロセッシング；(3)細胞内でのRNA配列のポリペプチド又はタンパク質への翻訳；(4)細胞内でのポリペプチド又はタンパク質の翻訳後修飾；(5)ポリペプチド又はタンパク質の細胞表面の提示；及び(6)細胞からポリペプチド又はタンパク質の分泌若しくは提示若しくは放出。

【0018】

“リンカー”という用語は、2つの配列を接続又は連結する(例えば2つのポリペプチドドメインを連結する)合成配列(例えばアミノ酸配列)を指す。いくつかの実施態様では、リンカーは1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10アミノ酸の配列を含む。

本明細書で用いられるように、“免疫細胞”という用語は、免疫応答で役割を果たす任意の細胞を指す。免疫細胞は造血性起原であり、リンパ球(例えばB細胞及びT細胞)、ナチュラルキラー細胞、骨髄系細胞(例えば単球、マクロファージ、樹状細胞、好酸球、好中球、肥満細胞、好塩基球及び顆粒球)を含む。

本明細書で用いられるように、“自然のままの免疫細胞”という用語は、免疫系に天然に存在する免疫細胞を指す。

本明細書で用いられるように、“操作された免疫細胞”という用語は、遺伝的に改変された免疫細胞を指す。

“リンパ球”という用語は、全ての未成熟、成熟、未分化及び分化リンパ球集団(組織特異的及び特殊化変形を含む)を指す。非限定的な例として、前記用語はB細胞、T細胞、NKT細胞及びNK細胞を包含する。いくつかの実施態様では、リンパ球は全てのB細胞系列を含み、前記には、前B細胞、前駆B細胞、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大きい前B細胞、小さい前B細胞、未成熟B細胞、成熟B細胞、血漿B細胞、メモリーB細胞、B-1細胞、B-2細胞及びアネルギーAN1/T3細胞集団が含まれる。

【0019】

本明細書で用いられるように、“T細胞”という用語は、ナイーブT細胞、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、メモリーT細胞、活性化T細胞、アネルギーT細胞、耐性T細胞、キメラB細胞、及び抗原特異的T細胞を含む。

本明細書で用いられるように、“養子細胞治療薬組成物”は、養子細胞移入に適切な細胞を含む任意の組成物を指す。例示的な実施態様では、養子細胞治療薬組成物は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、TCR(すなわち異種T細胞受容体)改変リンパ球(例えばeTCR T細胞及びcaTCR T細胞)及びCAR(すなわちキメラ抗原受容体)改変リンパ球(例えばCAR T細胞)から成る群から選択される細胞タイプを含む。別の実施態様では、養子細胞治療薬組

10

20

30

40

50

成物は、T細胞、CD8+ T細胞、CD4+細胞、NK細胞、デルタ-ガンマT細胞、制御性T細胞、及び末梢血単核細胞から成る群から選択される細胞タイプを含む。別の実施態様では、TIL、T細胞、CD8+細胞、CD4+細胞、NK細胞、デルタ-ガンマT細胞、制御性T細胞、又は末梢血単核細胞は、養子細胞治療薬組成物を形成する。ある実施態様では、養子細胞治療薬組成物はT細胞を含む。

本明細書で用いられるように、“腫瘍浸潤リンパ球”又はTILは、血流を去って腫瘍に浸潤した白血球を指す。

#### 【0020】

本明細書で用いられるように、“抗体”という用語は、完全な抗体分子だけでなく免疫原結合能力を保持する抗体分子のフラグメントも意味する。そのようなフラグメントはまた当業界で周知であり、*in vivo*及び*in vitro*の両方で頻繁に用いられる。したがって、本明細書で用いられるように、“抗体”という用語は、完全な免疫グロブリン分子だけでなく、周知の活性フラグメント $F(ab')_2$ 及びFabを意味する。 $F(ab')_2$ 、及び完全抗体のFcフラグメントを欠くFabフラグメントは、より迅速に循環から除去され、完全抗体の非特異的な組織結合を少なくすることができる(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325, 1983)。本発明の抗体は、自然のままの全抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、Fab、Fab'、単鎖V領域フラグメント(scFv)、単ドメイン抗体(例えばナノボディ及び単ドメインラクダ抗体)、 $V_{NAR}$ フラグメント、二重特異性T細胞嵌合(BiTE)抗体、ミニボディ、ジスルフィド結合Fv(dsFv)、及び抗イディオタイプ(抗Id)抗体、イントラボディ、融合ポリペプチド、非慣例抗体(unconventional antibody)、及び上記のいずれかの抗原結合フラグメントを含む。特に、抗体には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント(すなわち抗原結合部位を含む分子)が含まれる。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ(例えばIgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)又はサブクラスであり得る。

#### 【0021】

ある種の実施態様では、抗体は、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)鎖及び2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書では $V_H$ と略する)及び重鎖定常( $C_H$ )領域で構成される。重鎖定常領域は3つのドメイン(CH1、CH2及びCH3)で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書では $V_L$ と略する)及び軽鎖定常( $C_L$ )領域で構成される。軽鎖定常領域は1つのドメイン、 $C_L$ で構成される。 $V_H$ 及び $V_L$ 領域はさらにまた、超可変領域(相補性決定領域(CDR)と呼ばれる)に細分割され、フレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存された領域が点在する。各 $V_H$ 及び $V_L$ は3つのCDR及び4つのFRで構成され、それらは、アミノ末端からカルボキシ末端へ以下の順序で並んでいる:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫グロブリンと宿主組織又は因子(免疫系の多様な細胞(例えばエフェクター細胞)及び古典的補体系の第一の成分(C1q)を含む)との結合を媒介することができる。本明細書では互換的に用いられるように、抗体の“抗原結合部分”、“抗原結合フラグメント”、又は“抗原結合領域”という用語は、抗原と結合し、さらに抗体、抗原結合タンパク質のフラグメントに抗原特異性を付与する抗体の領域又は部分を指す。例えば、抗体は、抗原と特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上のフラグメントを含む(例えばペプチド/HLA複合体)。抗体の抗原結合機能は完全長抗体のフラグメントによって発揮され得ることが示されている。抗体の“抗体フラグメント”という用語に包含される抗原結合部分の例には以下が含まれる:Fabフラグメント、 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 及びCH1ドメインから成る一価フラグメント;  $F(ab)_2$ フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結される2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント;  $V_H$ 及びCH1ドメインから成るFdフラグメント; 抗体の単腕の $V_L$ 及び $V_H$ ドメインから成るFvフラグメント; dAbフラグメント(Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989)、前記は $V_H$ ドメインから成る; 及び単離された相補性決定領域(CDR)。

10

20

30

40

50



## 【0022】

抗体及び抗体フラグメントは、全体的に又は部分的に哺乳動物（例えばヒト、非ヒト霊長動物、ヤギ、モルモット、ハムスター、ウマ、マウス、ラット、ウサギ、及びヒツジ）又は非哺乳類抗体生成動物（例えばニワトリ、アヒル、カモ、ヘビ、有尾両生類）から誘導することができる。抗体及び抗体フラグメントは動物で生成するか、又は動物以外、例えば酵母若しくはファージから（例えば単一抗体若しくは抗体フラグメントとして又は抗体ライブラリーの部分として）生成することができる。本明細書で用いられるように、“～に由来する（～から誘導される）”という語句は、抗体の野生型（すなわち自然のままの）配列又はその変種/変異体若しくはホモログから作製された抗体及びフラグメントを含む。

10

さらにまた、Fvフラグメントの2つのドメイン（ $V_L$ 及び $V_H$ ）は別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を用い合成リンカーによって結合させることができる。リンカーはそれらを単一タンパク質鎖とすることができ、当該単一鎖で $V_L$ 及び $V_H$ 領域ペアは一価分子を形成する（単鎖Fv（scFv）として公知である）（例えば以下を参照されたい：Bird et al., Science 242:423-426, 1988；及びHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883, 1988）。これらの抗体フラグメントは当業者に公知の通常的な技術を用いて入手され、フラグメントは、完全な抗体と同じ態様で有用性についてスクリーニングされる。

“単離抗体”又は“単離された抗原結合タンパク質”は、同定されてその天然の環境成分から単離及び/又は回収されたものである。“合成抗体”又は“組換え抗体”は、一般的には、組換え技術を用いて又は当業者に公知のペプチド合成技術を用いて作製される。

20

本明細書で用いられるように、“単鎖可変フラグメント”又は“scFv”という用語は、免疫グロブリン（例えばマウス又はヒト）の重鎖（ $V_H$ ）及び軽鎖（ $V_L$ ）の可変領域の融合タンパク質であり、前記領域は共有結合されて $V_H$ ： $V_L$ ヘテロダイマーを形成する。重鎖（ $V_H$ ）及び軽鎖（ $V_L$ ）は直接結合されるか、又はペプチドコードリンカー（例えば約10、15、20、25アミノ酸）によって結合される。リンカーは、 $V_H$ のN-末端を $V_L$ のC-末端に接続するか、又は $V_H$ のC-末端を $V_L$ のN-末端に接続する。通常、リンカーは可撓性のためにグリシンに富むとともに、可溶性のためにセリン又はスレオニンに富む。リンカーは、細胞外抗原結合ドメインの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を連結することができる。

30

## 【0023】

定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、scFvタンパク質は本来の免疫グロブリンの特異性を保持する。単鎖Fvポリペプチド抗体は、Hustonらが記載した $V_H$ -及び $V_L$ -コード配列を含む核酸から発現され得る（Huston, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988）。さらに米国特許5,091,513号、5,132,405号及び4,956,778号並びに米国特許公開No. 20050196754及びNo. 20050196754も参照されたい。阻害活性を有するアンタゴニストscFvは記載されている（例えば以下を参照されたい：Zhao et al., (2008) Hybridoma (Larchmt) 27(6):455-51；Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2012；Shieh et al. (2009) J Immunol 183(4):2277-85, 2009；Giomarelli et al. (2007) Thromb Haemost 97(6):955-63；Fife et al. (2006) J Clin Invest 116(8):2252-61；Brocks et al. (1997) Immunotechnology 3(3): 173-84；Moosmayer et al. (1995) Ther Immunol 2(10):31-40）。刺激活性を有するアンタゴニストscFvは記載されている（例えば以下を参照されたい：Peter et al. (2003) J Biol Chem 278(38):36740-7；Xie et al. (1997) Nat Biotech 15(8):768-71；Ledbetter et al. (1997) Crit Rev Immunol 17(5-6):427-55；Ho et al. (2003) Biochim Biophys Acta 1638(3):257-66）。

40

## 【0024】

本明細書で用いられるように、“F(ab)”は、抗原と結合するが一価でありかつFc部分を持たない抗体構造のフラグメントを指す。例えば、酵素パパイニンによって消化された抗体は、2つのF(ab)及びFcフラグメント（例えば重（H）鎖定常領域；抗原と結合しないFc領域）を生じる。

本明細書で用いられるように、“F(ab')<sub>2</sub>”は、全IgG抗体のペプシン消化によって生

50

成される抗体を指し、ここで、前記フラグメントは2つの抗原結合 (ab') (二価) 領域を有し、各 (ab') 領域は2つの別々のアミノ酸鎖、S-S結合によって連結された抗原結合のためのH鎖の部分及び軽(L)鎖を含み、さらに残余のH鎖部分は一緒に連結される。“F(ab')<sub>2</sub>”フラグメントは2つの個々のFab'に分割され得る。

本明細書で用いられるように、“CDR”は抗体の相補性決定領域アミノ酸配列と定義され、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の超可変領域である。例えば以下を参照されたい：Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1987。一般的には、抗体は、可変領域に3つの重鎖及び3つの軽鎖CDR又はCDR領域を含む。CDRは、抗体と抗原又はエピトープとの結合のために接触残基の大部分を提供する。ある種の実施態様では、CDR領域はKabat系を用いて輪郭が示される (Kabat, E. A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991)。

10

#### 【0025】

本明細書で用いられるように、“親和性”という用語は結合強度の測定を意味する。理論に拘束されないが、親和性は、抗体結合部位と抗原決定基との間の立体化学的適合性の近さ、それらの間の接触面積のサイズ、並びに荷電基及び疎水基の分布に左右される。親和性はまた“アビディティー”という用語を含み、(例えば一価又は多価の)可逆性複合体形成後の抗原-抗体結合の強度を指す。抗原に対する抗体の親和性を計算する方法は当業界では公知であり、前記方法は親和性計算のための結合実験の使用を含む。機能アッセイ (例えばフローサイトメトリーアッセイ)における抗体活性もまた抗体親和性を反映する。抗体と親和性は表現型的に特徴づけることができ、機能アッセイ (例えばフローサイトメトリーアッセイ)を用いて比較することができる。本開示案件で有用な核酸分子には、ポリペプチド又はそのフラグメントをコードする任意の核酸分子が含まれる。ある種の実施態様では、本開示案件で有用な核酸分子には、抗体又はその抗原結合部分をコードする核酸分子が含まれる。そのような核酸分子は、内因性核酸配列と100%同一である必要はないが、典型的には実質的な同一性を示すであろう。内在性配列に対して“実質的相同性”又は“実質的同一性”を有するポリヌクレオチドは、典型的には二本鎖核酸分子の少なくとも一方の鎖とハイブリダイズすることができる。“ハイブリダイズ”とは、相補的ポリヌクレオチド配列 (例えば本明細書に記載の遺伝子) 又はその部分との間で、種々のストリンジェンシー条件下で二本鎖分子を形成するペアを意味する (例えば以下を参照されたい：Wahl, G. M. and S. L. Berger, Methods Enzymol. 152:399, 1987; Kimmel, A. R. Methods Enzymol. 152:507, 1987)。

20

30

#### 【0026】

“実質的に相同”又は“実質的に同一”という用語は、参照アミノ酸配列 (例えば本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか1つ) 又は核酸配列 (例えば本明細書に記載の核酸配列のいずれか1つ) に対して少なくとも50%若しくはそれより高い相同性又は同一性を示すポリペプチド又は核酸分子を意味する。例えば、そのような配列は、比較に用いられる配列 (例えば野生型又は自然のままの配列) に対して、アミノ酸レベル又は核酸で少なくとも約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、若しくは約99%相同性又は同一性である。いくつかの実施態様では、実質的に相同又は実質的に同一のポリペプチドは、比較に用いられる配列と対比して1つ以上のアミノ酸置換、挿入、又は欠失を含む。いくつかの実施態様では、実質的に相同又は実質的に同一のポリペプチドは、相同配列の置き換えに1つ以上の非天然アミノ酸又はアミノ酸アナログ (D-アミノ酸及び逆向き鏡像アミノを含む) を含む。

40

配列相同性又は配列同一性は、典型的には配列分析ソフトウェア (例えば、ジネティクスコンピュータグループの配列分析ソフトウェアパッケージ (the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)、BLAST、BESTFIT、GAP、又はPILEUP/PRETTYBOXプログラム)を用いて測定される。そのようなソフトウェアは、種々の置換、欠失及び/又は修飾に対して相同

50

性の程度を選定することによって同一又は類似配列を一致させる。同一性の程度を決定する例示的アプローチでは、近縁配列を示す $e^{-3}$ から $e^{-100}$ の間の確率スコアを用いてBLASTプログラムを利用することができる。

本明細書で用いられるように、“アナログ”という用語は、参照ポリペプチド又は核酸分子の機能を有する構造的に関連するポリペプチド又は核酸分子を指す。

#### 【0027】

本明細書で用いられるように、“保存的配列改変”は、アミノ酸改変であって、当該改変が、当該アミノ酸配列を含む本開示の操作された受容体（例えば操作された受容体の細胞外抗原結合ドメイン）の結合特性に有意に影響しないか又は結合特性を変化させないアミノ酸改変を指す。保存的改変は、アミノ酸置換、付加及び欠失を含むことができる。改変は、本開示の操作された受容体のヒトscFvに当業界で公知の標準技術（例えば、位置特異的変異誘導及びPCR媒介変異誘導）によって導入することができる。アミノ酸は、それらの物理化学的特性（例えば荷電及び極性）にしたがってグループに分類することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同じグループ内のアミノ酸で入れ換えられる置換である。例えば、アミノ酸は荷電によって分類できる。すなわち、陽性荷電アミノ酸にはリジン、アルギニン、ヒスチジンが含まれ、陰性荷電アミノ酸にはアスパラギン酸、グルタミン酸が含まれ、中性荷電アミノ酸にはアラニン、アスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリンが含まれる。加えて、アミノ酸は極性によって分類できる。すなわち、極性アミノ酸にはアルギニン（塩基性極性）、アスパラギン、アスパラギン酸（酸性極性）、グルタミン酸（酸性極性）、グルタミン、ヒスチジ（塩基性極性）、セリン、スレオニン、及びチロシンが含まれ、非極性アミノ酸にはアラニン、システイン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、及びバリンが含まれる。したがって、CDR領域内の1つ以上のアミノ酸残基を同じグループ内の他のアミノ酸残基と入れ換え、保持されている機能（すなわち上記(c)から(1)に示す機能）について本明細書に記載の機能アッセイを用いて改変抗体を試験することができる。ある種の実施態様では、特定の配列又はCDR領域で2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上の残基が変更されることはない。

10

20

30

#### 【0028】

本明細書で用いられるように、“リガンド”という用語は受容体と結合する分子を指す。特に、リガンドは別の細胞上の受容体と結合し、細胞対細胞認識及び/又は相互作用を可能にする。

本明細書で用いられるように、“共同刺激シグナリングドメイン”又は“共同刺激ドメイン”という用語は、共同刺激分子の細胞内ドメインを含む操作された受容体の部分を指す。共同刺激分子は抗原受容体又はFc受容体以外の細胞表面分子であり、抗原との結合に際してTリンパ球の効率的な活性化及び機能に必要な第二のシグナルを提供する。そのような共同刺激分子の例には、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、CD30、CD40、PD-1、ICOS（CD278）、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、B7-H2、及びCD83と特異的に結合するリガンドが含まれる。したがって、本開示はCD28及び4-1BBに由来する例示的な共同刺激ドメインを提供するが、他の共同刺激ドメインも本明細書に記載する操作された受容体との使用のために意図される。1つ以上の共同刺激シグナリングドメインの含有は、操作された受容体を発現するT細胞の有効性及び増殖を増強することができる。細胞内シグナリング及び共同刺激シグナリングドメインは、トランスメンブレンドメインのカルボキシル末端にタンデムに任意の順序で連結することができる。

40

本明細書で用いられるように、“キメラ共同刺激受容体”又は“CCR”という用語は、抗原と結合し共同刺激シグナルを提供するが、T細胞活性化シグナルは提供しないキメラ受容体を指す。

#### 【0029】

本明細書で用いられるように、核酸分子の調節領域は、作動できるように連結されてい

50

る遺伝子の発現に正又は負の方向に影響を与えるcis-作用性ヌクレオチド配列を意味する。調節領域は、遺伝子の発現に誘発性発現（すなわち、転写増加のために物質又は刺激を必要とする）を付与するヌクレオチドの配列を含む。誘発物質が存在するか又は増加濃度にあるときは、遺伝子発現を増加させることができる。調節領域はまた、遺伝子発現の抑制（すなわち、物質又は刺激が転写を低下させる）を付与する配列を含む。抑制因子が存在するか又は増加濃度にあるときは、遺伝子発現を低下させることができる。調節因子は、多くのin vivo生物学的活性（細胞増殖、細胞の成長及び死、細胞分化及び免疫調整を含む）に影響し、調整し又は制御することが知られている。調節領域は、典型的には1つ以上のtrans-作用性タンパク質と結合する（前記タンパク質は遺伝子の転写増加又は低下をもたらす）。

10

遺伝子調節領域の具体的な例はプロモーター及びエンハンサーである。プロモーターは、転写又は翻訳開始部位辺りに、典型的には翻訳開始部位の5'の位置に存在する配列である。プロモーターは通常は翻訳開始部位の1Kb以内に存在するが、さらに離れて、例えば2Kb、3Kb、4Kb、5Kb又はそれより遠く10Kb以下に存在することもできる。エンハンサーは、遺伝子の5'又は3'に位置するとき、又はエクソン若しくはイントロン内又はその部分に位置するとき、遺伝子発現に影響することが知られている。エンハンサーはまた、遺伝子から著しい距離で、例えば約3Kb、5Kb、7Kb、10kB、15Kb又はそれより遠い距離で影響を与えることができる。

調節領域にはまた、プロモーター領域に加えて以下が含まれる（ただしそれらに限定されない）：翻訳を促進する配列、イントロンのため、遺伝子の正確なリーディングフレームの維持（mRNAのインフレーム翻訳を可能にする）のためのスプライシングシグナル、並びに終止コドン、リーダー配列及び融合パートナー配列、マルチ遺伝子又はポリシストロンメッセージ生成のための内部リボソーム結合部位（IRES）エレメント、ポリアデニル化シグナル（問題の遺伝子の転写物の適切なポリアデニル化を提供する）、及び終止コドン（場合によって発現ベクターに含まれ得る）。

20

#### 【0030】

本明細書で用いられるように、核酸配列、領域、エレメント又はドメインと関連して“作動できるように連結される”とは、核酸領域が互いに機能的に関係することを意味する。例えば、リーダーペプチドをコードする核酸を、ポリペプチドをコードする核酸と作動できるように連結することができ、それによって核酸は転写及び翻訳されて機能的な融合タンパク質を発現することができ、ここで、リーダーペプチドは融合ポリペプチドの分泌を達成する。いくつかの事例では、第一のポリペプチド（例えばリーダーペプチド）をコードする核酸は、第二のポリペプチドをコードする核酸に作動できるように連結され、当該核酸は単一のmRNA転写物として転写されるが、当該mRNA転写物は発現される2つのポリペプチドの1つを生じる。例えば、第一のポリペプチドをコードする核酸と第二のポリペプチドをコードする核酸との間に、アンバー終止コドンを配置することができ、その結果、部分的アンバーサプレッサー細胞に導入されるときには、生成された単一mRNA転写物は翻訳されて、第一及び第二のポリペプチドを含む融合タンパク質を生じるか、又は翻訳されて第一のポリペプチドのみを生じることができる。別の例では、プロモーターをポリペプチドをコードする核酸に作動できるように連結することができ、それによってプロモーターは核酸の転写を調節又は媒介する。

30

40

本明細書で用いられるように、例えば合成核酸分子又は合成遺伝子又は合成ペプチドと関連して“合成”とは、組換え方法によって及び/又は化学合成方法によって生成される核酸分子又はポリペプチド分子を指す。本明細書で用いられるように、組換えDNA方法の使用によって組換え手段を用いる生成は、クローン化DNAによってコードされるタンパク質を発現するために、周知の分子生物学的方法を使用することを意味する。

#### 【0031】

本明細書で用いられるように、“発現”はポリペプチドがポリヌクレオチドの転写及び翻訳によって生成されるプロセスを指す。ポリペプチドの発現のレベルは当業界で公知の任意の方法、例えば宿主細胞から生成されるポリペプチドの量を決定する方法を用いて評

50

価され得る。そのような方法には、ELISAによる細胞溶解物中のポリペプチドの定量、ゲル電気泳動後のクーマシーブルー染色、ロウリータンパク質アッセイ及びブラッドフォードタンパク質アッセイが含まれるが、ただしそれらに限定されない。

本明細書で用いられるように、“宿主細胞”は、ベクターを受け取り、維持し、再生し、増幅するときに用いられる細胞である。宿主細胞はまた、ベクターによってコードされるポリペプチドの発現のために用いられ得る。ベクターに含まれる核酸は、宿主細胞が分裂するときに複製され、それによって核酸は増幅される。

本明細書で用いられるように、“ベクター”は複製可能な核酸であり、適当な宿主細胞がベクターで形質転換されるとき1つ以上の異種タンパク質が当該ベクターから発現され得る。ベクターと言えば、ポリペプチド又はそのフラグメントをコードする核酸が、典型的には消化及び連結によってその中に導入されるベクターが含まれる。ベクターと言えば、ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターが含まれる。核酸の増幅又は核酸によってコードされるポリペプチドの発現/提示のために、ベクターを用いて、ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞に導入する。ベクターは典型的にはエピソーム性のものであるが、ゲノムの染色体への遺伝子又はその部分の組み込み達成するように設計することができる。意図されるものはまた、人工染色体であるベクター、例えば酵母人工染色体及び哺乳動物人工染色体である。そのようなビヒクルの選択及び使用は当業者には周知である。

#### 【0032】

本明細書で用いられるように、ベクターにはまた“ウイルスベクター”又は“ウイルス性ベクター”が含まれる。ウイルス性ベクターは操作されたウイルスであり、前記操作ウイルスは、(ビヒクル又はシャトルとして)外因性遺伝子を細胞に移入するために、当該外因性遺伝子に作動できるように連結される。

本明細書で用いられるように、“発現ベクター”にはDNAを発現させることができるベクターが含まれ、前記DNAは、そのようなDNAフラグメントの発現を達成することができる調節配列(例えばプロモーター領域)とともに作動できるように連結される。そのような追加のセグメントは、プロモーター及びターミネーター配列を含むことができ、さらに場合によって1つ以上の複製起点、1つ以上の選別可能マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどを含むことができる。発現ベクターは、一般的には、プラスミド又はウイルスDNAから誘導されるか、又は両方のエレメントを含むことができる。したがって、発現ベクターは、組換えDNA又はRNA構築物(例えばプラスミド、ファージ、組換えウイルス又は他のベクター)を指し、適当な宿主細胞へ導入したときクローン化DNAの発現をもたらす。適当な発現ベクターは当業者には周知であり、真核細胞及び/又は原核細胞で複製可能なもの、及びエピソーム性のもので又は宿主細胞ゲノムに組み込まれるもの

含まれる。本明細書で用いられるように、“疾患”は細胞、組織又は器官の正常な機能を損なうか又は正常な機能に干渉する任意の症状又は異常を指す。疾患の例には、細胞の新形成又は病原体感染が含まれる。

#### 【0033】

“有効量”(又は“治療的に有効な量”)は、治療に際して有益な又は所望される臨床成果を与えるために十分な量である。有効量は1用量以上で対象動物に投与され得る。治療に関して、有効量は、疾患(例えば新形成)の進行を緩和、改善、安定化するために、逆転させるために又は遅らせるために、或いは疾患(例えば新形成)の病理学的な結果を軽減するために十分な量である。有効量は、一般的には症例ごとに医師によって決定され、当業者の技量の範囲内である。有効量に達する適切な投薬量を決定するときには、典型的にはいくつかの要件が考慮される。これらの要件には、対象動物の年齢、性別及び体重、治療される症状、症状の重篤度、並びに投与される操作された免疫細胞の形態及び有効濃度が含まれる。

本明細書で用いられるように、“新形成”という用語は、細胞又は組織の病理学的増殖及びその後続く他の組織又は器官への遊走又は侵襲を特徴とする疾患である。新形成増殖は典型的には非制御性及び進行性であり、正常細胞の増殖を引き出さない又は正常細胞

10

20

30

40

50

の増殖の停止を引起す条件下で発生する。新形成は、多様な細胞タイプ、組織又は器官に影響を及ぼすことができる。前記には、膀胱、結腸、骨、脳、乳房、軟骨、神経膠、食道、卵管、胆嚢、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺臓、リンパ節、神経組織、卵巣、胸膜、膵臓、前立腺、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、泌尿生殖管、尿管、尿道、子宮及び膈から成る群から選択される器官（ただし前記に限定されない）、又は前記の組織若しくは細胞タイプが含まれる。新形成には癌、例えば肉腫、癌腫、又は形質細胞腫（形質細胞の悪性腫瘍）が含まれる。

#### 【0034】

本明細書で用いられるように、“異種核酸分子又はポリペプチド”という用語は、細胞又は細胞から得られるサンプルで通常では存在しない核酸分子（例えばcDNA、DNA又はRNA分子）又はポリペプチドを指す。この核酸は別の器官に由来することがあり、又は、例えば細胞若しくはサンプルで通常では発現されないmRNA分子であり得る。

本明細書で用いられるように、“免疫応答細胞”という用語は、免疫応答で機能する細胞又はその前駆細胞若しくは子孫細胞を指す。

本明細書で用いられるように、“調整する”という用語は正又は負の方向に変化させることを指す。例示的な調整は、約1%、約2%、約5%、約10%、約25%、約50%、約75%、又は約100%の変化を含む。

本明細書で用いられるように、“増加する”という用語は、正の方向に少なくとも約5%変化することを指し、約5%、約10%、約25%、約30%、約50%、約75%、又は約100%を含むが、ただしこれらに限定されない。

本明細書で用いられるように、“減少する”という用語は、負の方向に少なくとも約5%変化することを指し、約5%、約10%、約25%、約30%、約50%、約75%、又は約100%を含むが、ただしこれらに限定されない。

本明細書で用いられるように、“単離細胞”という用語は、通常は当該細胞に随伴する分子性及び/又は細胞性成分から分離される細胞を指す。

#### 【0035】

本明細書で用いられるように、“単離される”、“精製される”又は“生物学的に純粋”という用語は、ある物質の自然のままの状態に当該物質に通常は随伴する成分から様々な程度で解放されている当該物質を指す。“単離する”は、本来の供給源又は環境からの分離度を指す。“精製する”は単離よりもさらに高い分離度を示す。“精製された”又は“生物学的に純粋な”タンパク質は他の物質から十分に解放され、その結果、いずれの不純物も当該タンパク質の生物学的特性に実質的に影響せず、又は有害な結果を引起さない。すなわち、本開示の対象の核酸又はポリペプチドは、組換えDNA技術によって生成されるときに細胞性物質、ウイルス性物質又は培地から実質的に解放されるならば、又は化学的に合成されるときに化学的前駆体若しくは他の化学物質から実質的に解放されるならば精製されている。純度及び均質度は典型的には、分析化学技術、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動又は高速液体クロマトグラフィーを用いて決定される。“精製される”という用語は、核酸又はタンパク質が電気泳動ゲルで本質的に1本のバンドを生じることを示す。改変（例えばリン酸化又はグリコシル化）に付すことができるタンパク質に対し、異なる改変は異なる単離タンパク質を生じることができ、前記を別々に精製することができる。

本明細書で用いられるように、“分泌される”という用語は、小胞体、ゴルジ装置から分泌経路を介して、さらに細胞の形質膜と一過性に融合し細胞外部にタンパク質を放出する小胞として、細胞から放出されるポリペプチドを意味する。小分子、例えば医薬もまた膜から拡散によって細胞外部に分泌され得る。

本明細書で用いられるように、“特異的に結合する”又は“～と特異的に結合する”又は“特異的に標的とする”という用語は、問題の生物学的分子（例えばポリペプチド）を認識及び結合するが、腫瘍抗原を含むか又は腫瘍抗原を発現するサンプル（例えば生物学的サンプル）中の他の分子は実質的に認識及び結合しないポリペプチド又はそのフラグメントを意味する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 6 】

本明細書で用いられるように、“治療する”又は“治療”という用語は、治療される個体又は細胞の疾患経過を変化させる試みにおける臨床的介入を指し、予防のため又は臨床病変の過程で実施され得る。治療における治癒的効果には、疾患の出現又は再発の予防、症候の改善、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の消失、転移の予防、疾患進行速度の低下、症状の改善又は緩和、並びに寛解又は予後改善が含まれるが、ただし前記に限定されない。疾患又は異常の進行を予防することによって、治療は、罹患した若しくは診断を受けた対象動物又は疾患を有すると疑われる対象動物で異常による悪化を予防することができるだけでなく、治療はまた、異常のリスクがあるか若しくは異常を有すると疑われる対象動物で異常の開始又は異常の症候を予防することができる。

10

本明細書で用いられるように、“対象動物”という用語は、任意の動物（例えば哺乳動物）を指し、前記には人間、非ヒト霊長動物、げっ歯類などが含まれるが、ただしそれらに限定されない（例えば、前記動物は個別の治療のレシピエントであるか、又は前記動物から細胞が採集される）。

## 【 0 0 3 7 】

概括

操作T細胞の養子移入は、多様な疾患（例えば癌及び感染症）のための効果的な治療法であることが示されている。しかしながら、Treg及びTreg様細胞による免疫抑制は、免疫療法の成功の主要な障害となる。この免疫抑制性疾患のミクロ環境を打破するためにより強力な潜在能力及び機構が必要とされるが、一方、プロトコルの改善もまた、患者への養子移入の前に操作された免疫細胞をex vivoで作製する間に生じるTregの免疫抑制作用を低下させるために要求される。Tregの免疫抑制機能におけるFoxp3の役割を考えるならば、Foxp3はTreg及びTreg様細胞を排除するための選択的で利用的な標的である。したがって、FoxP3を標的とする因子を操作された免疫細胞の作製プロセスに添加することによって、サンプル中のFoxP3陽性免疫抑制細胞の数を枯渇させ、それによってFoxP3陰性免疫アクチベーター細胞を濃縮することができる。本明細書で提供されるものは、前記問題に対応する、操作された免疫細胞及びFoxP3標的因子を含む組成物並びにその使用方法である。

20

加えて、本明細書で提供されるものは、操作された受容体（例えば操作された受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、操作された受容体をコードするポリヌクレオチド、操作された受容体を発現する操作された免疫細胞）及びFoxP3標的因子を含む組成物、並びに操作された免疫細胞の作製のためにそのような組成物を使用する方法である。理論に拘束されないが、操作された免疫細胞を作製するプロセスにおけるFoxP3標的因子の使用によって、免疫アクチベーター細胞である操作された免疫細胞の収量増加、及び/又はFoxP3+免疫抑制細胞である操作された免疫細胞の収量減少が期待される。操作された免疫細胞を作製するためのサンプルはしばしば免疫アクチベーター細胞及び免疫抑制細胞の混合物を含むので、生成される操作された免疫細胞もまた免疫アクチベーター細胞及び免疫抑制細胞の混合物である。サンプルをFoxP3標的因子で処理することによって、FoxP3+免疫抑制細胞がサンプルから枯渇され、免疫アクチベーター細胞である操作された免疫細胞のより高い収量及び/又は免疫抑制細胞である免疫操作細胞の減少収量をもたらす。

30

40

## 【 0 0 3 8 】

いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、標的抗原（例えば腫瘍抗原又はウイルスタンパク質）と結合するT細胞受容体（TCR）又は他の表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、T細胞受容体は野生型又は自然のままのT細胞受容体である。いくつかの実施態様では、TCRは操作された受容体である。いくつかの実施態様では、操作された受容体は操作TCR（eTCR）である。いくつかの実施態様では、操作された受容体はキメラ抗体TCR（caTCR）である。いくつかの実施態様では、操作された受容体はキメラ抗原受容体（CAR）である。

例示的な実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、ウイルムス腫瘍

50

タンパク質1 (WT1) 腫瘍抗原と結合する操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) 又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、MHC分子との関係で提示されるWT1腫瘍抗原と結合する操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) 又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、HLA-A2分子との関係で提示されるWT1腫瘍抗原と結合する操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) 又は他の細胞表面リガンドを発現する。WT1は重要かつ検証済のNCI最上位癌標的抗原である。WT1は胚における泌尿生殖系の発生で必須のジンクフィンガー転写因子である。WT1は、大半の白血病 (AML、CML、ALL及びMDSを含む) とともに骨髄腫及びいくつかの固形腫瘍 (特に卵巣癌及び中皮腫) で高度に発現される。WT1ワクチンは、多様な癌を有する患者について臨床試験まで進んでいる。WT1は、クローン原性白血病細胞の生存に重要であること、及び異種移植NOD/SCIDマウスにおけるWT1ペプチドに特異的なT細胞による腫瘍治療能力 (正常な造血に悪影響を与えない) で際立っている。WT1ペプチドワクチン免疫は、疾患の完全又は部分的寛解及び延命に関係している。

10

#### 【0039】

例示的な実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体2 (ROR2) と結合する操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) 又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、MHC分子との関係で提示されるROR2と結合する操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) 又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、HLA-A2分子との関係で提示されるROR2と結合する操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) 又は他の細胞表面リガンドを発現する。ROR2は、発生生物学で重要なI型トランスメンブレン受容体チロシンキナーゼである。ROR2の細胞外領域は、免疫グロブリン (Ig) ドメイン、システイン富裕ドメイン (CRD) (フリズルドドメインとも呼ばれる)、及びクリングル (Kr) ドメインを含む。3つ全てのドメインがタンパク質-タンパク質相互作用に必要である。細胞内では、ROR2は、2つのセリン/スレオニン富裕ドメインに跨がれたチロシンキナーゼ (TK) ドメイン及びプロリン富裕ドメイン (RPD) を含む。通常ROR2は発生時に高レベルで発現されて骨格及び神経の器官形成で重要な役割を果たすが、その後の成人組織では発現は抑制される。ROR2は、細胞の極性の確立及び腫瘍様行動 (例えば細胞遊走及び細胞侵襲) で役割を果たすことが示されている。ROR2は、ヒト癌のいくつかのタイプ (例えばOS、腎細胞癌腫、胃癌、悪性メラノーマ、口腔扁平上皮癌腫、前立腺癌、平滑筋肉腫、胃腸管間質腫瘍 (GIST) 及びNB) で高度に発現される。ROR2はOSの大半でトランス活性化され、OS細胞株におけるROR2のノックダウンは、細胞増殖、遊走及び侵襲の顕著な阻害をもたらす。OSにおいてWnt5及びROR2を結び付ける証拠が存在し、OSにおいて、ROR2は、細胞外マトリックスの分解及び浸潤突起形成で追加の役割を有する。口腔扁平上皮癌腫及びメラノーマ転移結節の悪性度が上昇するにつれ、ROR2の発現は増加傾向にあることを研究は示している。異種移植転移モデルで、ROR2のサイレンシングはメラノーマ細胞の肺転移を有意に低下させた。そのマウス対応物と同様に、ヒトROR2発現は、胃及び甲状腺での低レベル発現を除き正常な成人組織で検出できない。ROR2の過剰発現は、NBを有する患者の極めて低い生存率と強い相関性を有するようと思われる。ヒト癌と正常組織間のROR2のこの弁別的発現は前記を優れた治療標的とする。

20

30

40

#### 【0040】

例示的な実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、分化抗原群19 (CD19) と結合する操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) 又は他の細胞表面リガンドを発現する。CD19と結合する例示的な操作された受容体は国際公開WO2017070608に記載される (参照によってその全体が本明細書に含まれる)。

例示的な実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、アルファ-フェトプロテイン (AFP) と結合する操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) 又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作さ

50



れた免疫細胞は、MHC分子との関係で提示されるAFPと結合する操作された受容体（例えばCAR、caTCR又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、HLA-A2分子との関係で提示されるAFPと結合する操作された受容体（例えばCAR、caTCR又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する。AFPと結合する例示的な操作された受容体は、国際公開WO2016161390に記載される（参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

#### 【0041】

例示的な実施態様では、本明細書で提供されるFoxP3標的因子は抗原結合タンパク質であり、FoxP3に特異的な抗体、キメラ抗原受容体（CAR）、キメラ抗体TCR（caTCR）、操作されたTCR（eTCR）が含まれる。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子はFoxP3ポリペプチドのエピトープに特異的である。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、MHC分子との関係で提示されるFoxP3（例えばFoxP3/MHC複合体）と結合する。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、HLA-A分子との関係で提示されるFoxP3（例えばFoxP3/HLA-A複合体）と結合する。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、HLA-A2分子との関係で提示されるFoxP3（例えばFoxP3/HLA-A2複合体）と結合する。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、HLA-A\*02:01分子との関係で提示されるFoxP3（例えばFoxP3/HLA-A\*02:01複合体）と結合する。

例示的な実施態様では、本明細書で提供されるFoxP3標的因子は二重特異性抗体である。いくつかの実施態様では、二重特異性抗体は、FoxP3ポリペプチド又はそのフラグメント及び細胞表面タンパク質と結合する。いくつかの実施態様では、細胞表面タンパク質はCD3又はCD16である。

例示的な実施態様では、FoxP3標的因子は操作された免疫細胞であり、FoxP3と結合する操作された受容体（例えばCAR、caTCR又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は操作された免疫細胞であり、MHC分子との関係で提示されるFoxP3と結合する操作された受容体（例えばCAR、caTCR又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は操作された免疫細胞であり、HLA-A2分子との関係で提示されるFoxP3と結合する操作された受容体（例えばCAR、caTCR又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する。

#### 【0042】

##### 操作された免疫細胞の標的誘導リガンド及び標的抗原

いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、標的抗原（すなわち細胞表面抗原）、例えば腫瘍抗原又はウイルスタンパク質と結合するT細胞受容体（TCR）又は細胞表面リガンドを発現する。細胞表面リガンドは、免疫細胞を標的部位（例えば腫瘍部位）へ導く任意の分子であり得る。例示的な細胞表面リガンドには、例えば内因性受容体、操作された受容体、又は免疫細胞の標的部位への標的誘導を達成するための他の特異的リガンドが含まれる。いくつかの実施態様では、受容体はT細胞受容体である。いくつかの実施態様では、T細胞受容体は、標的抗原と結合する野生型又は自然のままのT細胞受容体である。いくつかの実施態様では、受容体、例えばT細胞受容体は、自然のままではない（例えば免疫細胞にとって内因性ではない）受容体である。いくつかの実施態様では、TCRは操作された受容体である。いくつかの実施態様では、操作された受容体は操作TCR（eTCR）である。いくつかの実施態様では、操作された受容体はキメラ抗体TCR（caTCR）である。いくつかの実施態様では、操作された受容体はキメラ抗原受容体（CAR）である。

いくつかの実施態様では、標的抗原（すなわち細胞表面抗原）は、タンパク質、炭水化物及び脂質から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、標的抗原（すなわち細胞表面抗原）は腫瘍細胞によって発現される。いくつかの実施態様では、標的抗原は腫瘍細胞の表面で発現される。いくつかの実施態様では、標的抗原は細胞表面受容体である。いくつかの実施態様では、標的抗原は細胞表面糖タンパク質である。いくつかの実施態様では、標的抗原は腫瘍細胞によって分泌される。いくつかの実施態様では、標的抗原は腫瘍のミクロ環境に局在する。いくつかの実施態様では、標的抗原は、細胞外マトリックス

又は腫瘍ミクロ環境の間質に局在する。いくつかの実施態様では、標的抗原は、細胞外マトリックス又は腫瘍ミクロ環境内に位置する1つ以上の細胞によって発現される。

【0043】

いくつかの実施態様では、標的抗原（すなわち細胞表面抗原）は以下から選択される：5T4、アルファ5 1-インテグリン、707-AP、A33、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、Bcl-2、  
-カテニン、Bcr-Abl、MN/C IX抗体、CA125、CA19-9、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CDC27/m、CD33、CD37、CD45、CD52、CD56、CD80、CD123、CDK4/m、CEA、c-Met、CS-1、CT、Cyp-B、サイクリンB1、DAGE、DAM、EBNA、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、エフリンB2、エストロゲン受容体、ETV6-AML1、FAP、フェリチン、葉酸結合タンパク質、GAGE、G250、GD-2、GM2、GnT-V、gp75、gp100（Pmel 17）、  
HAGE、HER-2/neu、HLA-A\*0201-R170I、HPV E6、HPV E7、Ki-67、HSP70-2M、HST-2、hTERT（又はhTRT）、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、KRAS、LAGE、LDLR/FUT、LRP、LMP2、MAGE、MART、MART-1/メラニン-A、MART-2/Ski、MC1R、メゾテリン、MUC、MUM-1-B、myc、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NYESO-1、NY-Eso-B、p53、PD1、プロテイナーゼ-3、p190マイナー-bcr-abl、Pml/RAR、PRAME、プロジェステロン受容体、PSA、PSM、PSMA、ras、RAGE、RU1又はRU2、ROR1、ROR2、SART-1又はSART-3、サバイピン、TEL/AML1、TGF、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、テナシン、TSTAチロシナーゼ、VEGF、及びWT1。ある種の実施態様では、標的抗原は以下から選択される：ROR2、WT1（主としてメラノーマの発現抗原（PRAME））、カーステンラット肉腫ウイルスオンコジーン（KRAS）、プログラム細胞死1（PD1）、潜伏性膜タンパク質2（LMP2）、及びアルファフェトプロテイン（AFP）。いくつかの実施態様では、標的抗原（すなわち細胞表面抗原）は、CD19、CD20、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D、及びFCRL5から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、標的抗原はCD19である。いくつかの実施態様では、標的抗原（すなわち細胞表面抗原）は、ペプチド及び主要組織適合性複合体（MHC）タンパク質を含む。いくつかの実施態様では、ペプチドは、WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、ヒストンH3.3、及びPSAから成る群から選択されるタンパク質に由来する。いくつかの実施態様では、ペプチドは由来する。

【0044】

TCR又は操作された免疫細胞上で発現される他の細胞表面リガンドが結合することができる、例示的な標的抗原及び標的抗原内のエピトープは、例えば以下に記載される：WO2015/070061、WO2016/142768、WO2015/011450、WO2017/070608、WO2017/066136、WO2016/191246、WO2016/165047、WO2016/210129、WO2016/201124、WO2016/161390（参照によってその全体（その中で提供される配列表を含む）が本明細書に含まれる）。

いくつかの実施態様では、標的抗原はROR2である。ヒトROR2のある実施態様をコードするDNA配列は、下記の配列番号:328として本明細書で提供される：

【0045】

ATGGCCCGGGGCTCGGCGCTCCCGCGGCGGCCGCTGCTGTGCATCCCGGCCGTCTGGGCGGCCGCCGCGCTTCTGCTCTC  
AGTGTCCCGGACTTCAGGTGAAGTGGAGTTCTGGATCCGAACGACCCTTTAGGACCCCTTGATGGGCAGGACGGCCCGA  
TTCCAACCTCTGAAAGGTTACTTTCTGAATTTTCTGGAGCCAGTAAACAATATCACCATTGTCCAAGGCCAGACGGCAATT  
CTGCACTGCAAGGTGGCAGGAAACCCACCCCTAACGTGCGGTGGCTAAAGAATGATGCCCCGGTGGTGCAGGAGCCGCG  
GCGGATCATCATCCGGAAGACAGAAATATGGTTTCACGACTGCGAATCCAGGACCTGGACACGACAGACTGGCTACTACC  
AGTGGCTGGCCACCAACGGGATGAAGACCATTACCGCCACTGGCGTCTGTTTTGTGCGGCTGGGTCCAACGCACAGCCCA  
AATCATAACTTTCAGGATGATTACCACGAGGATGGGTTCTGCCAGCCTTACCGGGGAATTGCCGTGCACGCTTCATTGG  
CAACCGGACCATTATGTGGACTCGCTTCAGATGCAGGGGAGATTGAAAACCGAATCACAGCGGCCCTTACCATGATCG  
GCACGTCTACGCACCTGTGCGACCAGTGCTCACAGTTCGCCATCCCATCCTTCTGCCACTTCGTGTTTTCTCTGTGCGAC  
GCGCGCTCCCGGACACCCAAGCCGCGTGAGCTGTGCCGCGACGAGTGCGAGGTGCTGGAGAGCGACCTGTGCCGCCAGGA  
GTACACCATCGCCGCTCCAACCGCTCATCCTCATGCGGCTTCAGCTGCCCAAGTGTGAGGCGCTGCCCATGCCGTGAGA  
GCCCGACGCTGCCAACTGCATGCGCATTGGCATCCAGCCGAGAGGCTGGGCCGCTACCATCAGTGCTATAACGGCTCA  
GGCATGGATTACAGAGGAACGGCAAGCACCACCAAGTCAGGCCACCAGTGCCAGCCGTGGGCCCTGCAGCACCCCCACAG  
CCACCACCTGTCCAGCACAGACTTCCCTGAGCTTGGAGGGGGGACGCCTACTGCCGGAACCCCGGAGGCCAGATGGAGG

GCCCCTGGTGCTTTACGCAGAATAAAAAACGTACGCATGGAACGTGTGTGACGTACCCTCGTGTAGTCCCCGAGACAGCAGC  
 AAGATGGGGATTCTGTACATCTTGGTCCCCAGCATCGCAATTCCTACTGGTTCATCGCTTGGCTTTTCTTCTTGGTTTGCAT  
 GTGCCGGAATAAGCAGAAGGCATCTGCGTCCACACCCGACGCGGCGACAGCTGATGGCCTCGCCAGCCAAGACATGGAAA  
 TGCCCCTCATTAAACCAGCACAAAACAGGCCAAACTCAAAGAGATCAGCCTGTCTGCGGTGAGGTTTCATGGAGGAGCTGGGA  
 GAGGACCGGTTTGGGAAAGTCTACAAAGTACCTGTTTCGGCCCTGCCCGGGGAGCAGACCCAGGCTGTGGCCATCAA  
 AACGCTGAAGGACAAAGCGGAGGGGCCCTGCGGGAGGAGTTCCGGCATGAGGCTATGCTGCGAGCACGGCTGCAACACC  
 CCAACGTCGTCTGCCTGCTGGGCGTGGTGACCAAGGACCAGCCCTGAGCATGATCTTCAGCTACTGTTTCGCACGGCGAC  
 CTCCACGAATTCCTGGTTCATGCGCTCGCCGCACTCGGACGTGGGCAGCACCGATGATGACCCGACGGTGAAGTCCGCCCT  
 GGAGCCCCCGACTTCGTGCACCTTGTGGCACAGATCGCGGCGGGGATGGAGTACCTATCCAGCCACCACGTGGTTTACA  
 AGGACCTGGCCACCCGCAATGTGCTAGTGTACGACAAGCTGAACGTGAAGATCTCAGACTTGGGCCTCTCCGAGAGGTG  
 TATGCCGCCGATTACTACAAGCTGCTGGGAACTCGCTGCTGCCTATCCGCTGGATGGCCCCAGAGGCCATCATGTACGG  
 CAAGTTCTCCATCGACTCAGACATCTGGTCTACGGTGTGGTCTGTGGGAGGTCTTCAGCTACGGCCTGCAGCCCTACT  
 GCGGGTACTCCAACCAGGATGTGGTGGAGATGATCCGGAACCGGCAGGTGCTGCCTTGGCCCGATGACTGTCCCGCCTGG  
 GTGTATGCCCTCATGATCGAGTGTGGAACGAGTTCCCCAGCCGCGGCCCGCTTCAAGGACATCCACAGCCGGCTCCG  
 AGCCTGGGGCAACCTTTCAAACACTACAACAGCTCGGCGCAGACCTCGGGGGCCAGCAACACCACGCAGACCAGCTCCCTGA  
 GCACCAGCCCAGTGAGCAATGTGAGCAACGCCCGCTACGTGGGGCCCAAGCAGAAGGCCCGCCCTTCCACAGCCCCAG  
 TTCATCCCCATGAAGGGCCAGATCAGACCCATGGTGGCCCGCCGAGCTCTACGTCCCGTCAACGGCTACCAGCCGGT  
 GCCGGCCTATGGGGCCTACCTGCCCAACTTCTACCCGGTGCAGATCCCAATGCAGATGGCCCCGACGAGGTGCCTCCTC  
 AGATGGTCCCCAAGCCCAGCTCACACCACAGTGGCAGTGGCTCCACCAGCACAGGCTACGTACCACGGCCCCCTCCAAC  
 ACATCCATGGCAGACAGGGCAGCCCTGCTCTCAGAGGGCGCTGATGACACACAGAACGCCCCAGAAGATGGGGCCAGAG  
 CACCGTGCAGGAAGCAGAGGAGGAGGAGGAAAGCTCTGTCCAGAGACTGAGCTGCTGGGGGACTGTGACACTCTGCAGG  
 TGGACGAGGCCCAAGTCCAGCTGGAAGCTTGA ( 配列番号 : 328 ) 。

10

20

## 【 0 0 4 6 】

ヒトROR2のある実施態様のポリペプチド配列は、下記の配列番号 : 329として本明細書で  
 提供される :

## 【 0 0 4 7 】

MARGSALPRRPLLCIPAVWAAAALLLSVSRTSGEVEVLDPNDPLGPLDGQDGP|PTLKGYFLNFLEPVNNITIVQGQTA|  
 LHCKVAGNPPPNVRWLKNDAPVVQEPRR||IRKTEYGSRLR|QDLDTTDTGYQCVATNGMKT|TATGVLFVRLGPTHSP  
 NNFQDDYHEDGFCQPYRG|ACARF|GNRT|YVDSLQMQGE|ENR|TAAFTM|GTSTHLSQCSQFA|PSFCHFVFLCD  
 ARSRTPKPRELCRDECEVLES DLCRQEYI|ARSNPL|LMRLQLPKCEALPMPESPDAANCMR|G|IPAERLGRYHQCYNGS  
 GMDYRGTASTTKSGHQCPWALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHAYCRNPGGQMEGPWCFTQNKNVRMELCDVPSCSPRDSS  
 KMG|LY|LVPS|A|PLV|ACLFFLVCMCRNKQKASASTPQRRQLMASPSQDMEML|NQHKQAKLKE|SLSAVRFMEELG  
 EDRFGKVVYKHLFGPAPGEQTQAVA|KTLKDKAEGPLREEFRHEAMLRLRQLQHPNVVCLLGVVTKDQPLSM|FSYCSHGD  
 LHEFLVMRSPHSDVGSDDRTVKSALPEPPDFVHLVAQ|AAGMEYLSSHVVHKDLATRNVLVYDKLVN|SDLGLFREV  
 YAADYYKLLGNLLP|RWMPEA|MYGKFS|DSD|WSYGVVLEWVFSYGLQPYCYGYSNQDVVEM|RNRQVLPCPDPCPAW  
 VYALM|ECWNEFPSSRRPRFKD|HSRLRAWGNLSNYNSSAQTSGASNTTQTSSLSTSPVSNVSNARYVGPQKAPPFPQPQ  
 F|PMKGQ|IRPMVPPPQLYVPVNGYQVPYAYGAYLPNFYVPVQ|IPMQMAPQVPPQMPKPSHSHSGSGSTSTGYVTTAPSN  
 TSMADRAALLSEGADDTQNAPEQSTVQEAEEEEEGSVPETELLGDCDTLQVDEAQQVLEA ( 配列番号 : 329 )  
 。

30

40

## 【 0 0 4 8 】

いくつかの実施態様では、標的抗原はROR2のエピトープである。いくつかの実施態様で  
 は、ROR2のエピトープは以下から選択されるアミノ酸配列を有する : KTITATGVLFVRLGP (   
 配列番号 : 330 ) 、 TGYQCVATNGMKT ( 配列番号 : 331 ) 、 RGIACARFIGNRTIY ( 配列番号 : 332 )  
 、 CQPYRGIACARFIGNRTIY ( 配列番号 : 333 ) 、 QCSQFAIPSFCHFVFLCD ( 配列番号 : 334 ) 、 EL  
 CRDECEVLES DLC ( 配列番号 : 335 ) 、 及び ANCMRIGIPAERLGR ( 配列番号 : 336 ) 。 いくつかの実  
 施態様では、エピトープはKTITATGVLFVRLGP ( 配列番号 : 330 ) である。

いくつかの実施態様では、標的抗原はROR2の細胞外ドメイン又はそのフラグメントであ  
 る。ある種の実施態様では、ROR2の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、下記の配列番号 : 3  
 37として本明細書に記載される :

EVEVLDPNDPLGPLDGQDGP|PTLKGYFLNFLEPVNNITIVQGQTA|LHCKVAGNPPPNVRWLKNDAPVVQEPRR||IRK

50

TEYGSRLR IQDLDTTDTGYQQCVATNGMKT IATGVLVRLGPTHSPNHNFDQDYHEDGFCQPYRG IACARF IGNRT IYV  
 DSLQMQGE IENR I TAAFTM IGTSTHLSQCSQFA I PSFCHFVFP LCDARSRTPKPRELCRDECEVLES D LCRQEYTIARS  
 NPL ILMRLQLPKCEALPMPESPDAANCMR IGI PAERLGRYHQCYN GSGMDYRGTASTTKSGHQCPWALQHPHSHHLSST  
 DFPELGGGHAYCRNPGGQMEGPWCFTQKNKVRMELCDVPSCSPRDSSKMG (配列番号:337)。

いくつかの実施態様では、標的抗原はWT1である。いくつかの実施態様では、標的抗原はWT1のエピトープである。いくつかの実施態様では、WT1のエピトープはRMFPNAPYL (配列番号:190)のアミノ酸配列を有する。

#### 【0049】

いくつかの実施態様では、標的抗原関連疾患は癌である。いくつかの実施態様では、癌は以下から選択される：急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性骨髄性/骨髄原性白血病 (AML)、副腎皮質癌腫、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、胆管癌腫、慢性骨髄細胞性白血病 (CML)、慢性骨肉腫、結腸直腸癌、食道癌、胃腸管癌、神経膠芽腫、神経膠腫、肝細胞癌腫、頭頸部癌、腎癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、中皮腫、多発性骨髄腫 (MM)、骨髄異形成症候群 (MDS)、神経芽腫、口腔扁平上皮癌腫、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、褐色細胞腫、形質細胞腫、前立腺癌、腎癌、肉腫、胃癌、甲状腺癌、及び子宮癌。

10

いくつかの実施態様では、標的抗原関連疾患はウイルス感染である。いくつかの実施態様では、ウイルス感染は以下から成る群から選択されるウイルスによって引き起こされる：サイトメガロウイルス (CMV)、エプスタイン-バーウイルス (EBV)、肝炎Bウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV)、ヒトパピローマウイルス (HPV)、伝染性軟属腫ウイルス (MCV)、ヒトT細胞白血病ウイルス1 (HTLV-1)、HIV (ヒト免疫不全ウイルス)、及び肝炎Cウイルス (HCV)。

20

CD19陽性癌の例にはB細胞リンパ腫が含まれるが、ただし前記に限定されない。B細胞リンパ腫の例にはホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫が含まれる。非ホジキンリンパ腫の例には、びまん性大B細胞リンパ腫 (DLBCL)、濾胞性リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫 (MZL) 又は粘膜関連リンパ組織リンパ腫 (MALT)、小リンパ球性リンパ腫 (慢性リンパ球性白血病 (CLL) としても知られている)、及びマントル細胞リンパ腫 (MCL) が含まれる。

AFP陽性癌の例には、肝癌並びに卵巣及び精巣の非セミノーマ胚細胞腫が含まれるが、ただしそれらに限定されない。卵巣及び精巣の非セミノーマ胚細胞腫には卵黄嚢癌腫及び胎生期癌腫が含まれる。

30

ROR2陽性癌の例には慢性OS、腎細胞癌腫、胃癌、悪性メラノーマ、口腔扁平上皮癌腫、前立腺癌、骨肉腫、及び神経芽腫が含まれるが、ただしそれらに限定されない。

WT1陽性癌の例には、慢性骨髄細胞性白血病、多発性骨髄腫 (MM)、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性骨髄性/骨髄原性白血病 (AML)、骨髄異形成症候群 (MDS)、中皮腫、卵巣癌、胃腸管癌、乳癌、前立腺癌、及び神経膠芽腫が含まれるが、ただしそれらに限定されない。

#### 【0050】

典型的な治療用抗癌mAb (例えばCD19と結合するもの)は、細胞表面タンパク質を認識する (細胞表面タンパク質は細胞タンパク質のごくわずかな部分を構成するのみである)。大半の変異又は発癌性の腫瘍関連タンパク質は核性又は細胞質性である。ある種の事例では、これらの細胞内タンパク質はプロテアソームで分解され処理されて、T細胞受容体 (TCR) によって認識されるT細胞エピトープとしてMHCクラスI分子により細胞表面に提示され得る。TCR機能を模倣する ("TCR模倣性 (TCRm)" 又は "TCR様" (すなわち重要な細胞内タンパク質のペプチド抗原を細胞表面のMHCとの関係において認識する)) mAbの開発は、強力なmAbによって宛先に到達させることができる腫瘍標的の潜在的レパートリーを大きく拡大させる。とりわけ、メラノーマ抗原 (NY-ESO-1、hTERT、MART 1、gp100、及びPR1) に特異的なTCRm Fab又はscFv及びマウスIgGが開発されている。そのような抗体の抗原結合部分を本明細書提供の操作された受容体に取り込むことができる。HLA-A2は、US A及びEUでもっとも通常的なHLAハプロタイプである (集団の約40%)。したがって、HLA-

40

50

A2の関係で提示される腫瘍抗原に対する強力なTCRm mAb及び自然のままのTCRは大集団の治療で有用である。

したがって、いくつかの実施態様では、標的抗原はMHC分子との関係で提示される腫瘍抗原である。いくつかの実施態様では、MHCタンパク質はMHCクラスIタンパク質である。いくつかの実施態様では、MHCクラスIタンパク質は、HLA-A、HLA-B又はHLA-C分子である。いくつかの実施態様では、標的抗原は、HLA-A2分子との関係で提示される腫瘍抗原である。表面HLA-A2分子との関係で提示される細胞内WT1及びROR2抗原に対するmAbは以前に開発されている。IgG1、非フコシル化Fc型、二重特異性抗体及び操作T細胞様式（複数の前臨床動物モデルで強力な治療活性を示す）が作製されている。そのような抗体又はその部分は、本明細書に記載したように、MHC分子との関係で標的細胞（例えば腫瘍細胞）の表面に存在する標的抗原の認識のために利用することができる。

10

#### 【0051】

##### 操作された受容体

いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は、少なくとも1つの操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）を発現する。いくつかの実施態様では、操作された受容体は、関心のある特異性を免疫エフェクター細胞に移植又は付与する。例えば、操作された受容体を用いて、モノクローナル抗体の特異性を免疫細胞（例えばT細胞）に移植できる。いくつかの実施態様では、操作された受容体のコード配列の導入は、核酸ベクター（例えばレトロウイルスベクター）によって促進される。

いくつかの実施態様では、操作された受容体はCARである。これまでのところ3世代のCARが存在する。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は“第一世代”CARを発現する。“第一世代”CARは典型的にはT細胞受容体（TCR）鎖の細胞質/細胞内ドメインに融合されたトランスメンブレンドメインに融合された細胞外抗原結合ドメイン（たとえば単鎖可変フラグメントscFv）で構成される。“第一世代”CARは典型的にはCD3鎖由来の細胞内ドメインを有し、前記ドメインは内因性TCRのシグナルの主要な伝達因子である。“第一世代”CARはde novoな抗原認識を提供し、HLA媒介抗原提示から独立して単一融合分子のCD3鎖シグナリングドメインを介してCD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞の両方の活性化を引き起こすことができる。

20

いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は“第二世代”CARを発現する。“第二世代”CARは、多様な共同刺激分子（例えばCD28、4-1BB、ICOS、OX40）由来の細胞内ドメインをCARの細胞質テールに付加して、T細胞に追加のシグナルを提供する。“第二世代”CARは、共同刺激（例えばCD28又は4-1BB）及び活性化（例えばCD3）の両方を提供するものを含む。前臨床試験は、“第二世代”CARはT細胞の抗腫瘍活性を改善できることを示している。例えば、“第二世代”CARによって改変されたT細胞の強烈な有効性は、慢性リンパ芽球性白血病（CLL）及び急性リンパ芽球性白血病（ALL）を有する患者でCD19を標的とする臨床試験で明示された。

30

いくつかの実施態様では、本明細書で提供される操作された免疫細胞は“第三世代”CARを発現する。“第三世代”CARは、複数の共同刺激（例えばCD28及び4-1BB）及び活性化（例えばCD3）を提供するものを含む。

40

#### 【0052】

本開示の趣旨にしたがえば、本明細書で提供される操作された免疫細胞のCARは、細胞外抗原結合ドメイン、トランスメンブレンドメイン及び細胞内ドメインを含む。

いくつかの実施態様では、操作された受容体はcaTCRである。いくつかの実施態様では、caTCRはそれ自体でTCR関連シグナリング分子（例えばCD3、CD3、及び/又はCD3）、少なくとも機能的分子又はその機能的フラグメントでないものを含まない。いくつかの実施態様では、caTCRは抗原結合モジュール（すなわち細胞外抗原結合ドメイン）を含み、前記モジュールは、抗原特異性及びT細胞受容体モジュール（TCRM）（CD3動員及びシグナリングを可能にする）を提供する。抗原結合モジュール（すなわち細胞外抗原結合ドメイン）は、天然に存在するT細胞受容体の抗原結合部分ではない。いくつかの実施態様では、抗原結合モジュール（すなわち細胞外抗原結合ドメイン）は、TCRMのポリペプチ

50

ド鎖のアミノ末端に連結される。いくつかの実施態様では、抗原結合モジュール（すなわち細胞外抗原結合ドメイン）は抗体の部分である。いくつかの実施態様では、抗体の部分は、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv、又は単鎖Fv（scFv）である。TCRMは、1つ以上のTCRのトランスメンブレンドメイン（TCR-TM）に由来するトランスメンブレンドモジュール（例えば及び/又は TCR）を含み、場合によってさらにTCRの接続ペプチド又はそのフラグメント及び/又は1つ以上の細胞内ドメイン又はそのフラグメントの一方又は両方を含む。いくつかの実施態様では、TCRMは2つのポリペプチド鎖を含み、各ポリペプチド鎖は、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて接続ペプチド、トランスメンブレンドメイン、及び場合によってTCR細胞内ドメインを含む。いくつかの実施態様では、TCRMは、1つ以上の天然には存在しないTCRドメインを含む。例えば、いくつかの実施態様では、TCRMは1つ又は2つの天然には存在しないTCRトランスメンブレンドメインを含む。天然に存在しないTCRドメインは天然に存在するTCRの対応するドメインであることができ、1つ以上のアミノ酸の置換によって、及び/又は対応するドメインの一部分の別のTCR由来のアナログの一部分による入れ換えによって改変され得る。caTCRは第一のポリペプチド鎖及び第二のポリペプチド鎖を含むことができ、ここで第一及び第二のポリペプチド鎖は一緒になって抗原結合モジュール及びTCRMを形成する。いくつかの実施態様では、第一及び第二のポリペプチド鎖は分離したポリペプチド鎖であり、さらにcaTCRはマルチマー（例えばダイマー）である。いくつかの実施態様では、第一及び第二のポリペプチド鎖は共有結合によって、例えばペプチド結合によって、又は別の化学結合によって、例えばジスルフィド結合によって連結される。いくつかの実施態様では、第一のポリペプチド鎖及び第二のポリペプチド鎖は少なくとも1つのジスルフィド結合によって連結される。いくつかの実施態様では、caTCRはさらに1つ以上のT細胞共同刺激シグナリング配列を含む。caTCRの例は例えば以下に記載される：国際公開WO2017/070608及び米国仮特許出願62/490,576（2017年4月26日出願）（両文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

10

20

30

40

50

#### 【0053】

いくつかの実施態様では、操作された受容体はeTCRである。いくつかの実施態様では、eTCRは、天然に存在するTCRの抗原/MHC結合領域が改変されているという点で天然に存在するTCRと異なる。いくつかの実施態様では、eTCRは、アルファ鎖TRAC定常ドメイン配列及び/又はベータ鎖TRBC1又はTRBC2定常ドメイン配列を含む。いくつかの実施態様では、アルファ及びベータ鎖定常ドメイン配列は、末端短縮化又は置換によって改変されて、TRACのエクソン2のCys4とTRBC1又はTRBC2のエクソン2のCys2との間の自然のままのジスルフィド結合を欠失する。アルファ及び/又はベータ鎖定常ドメイン配列はまた、TRACのThr48及びTRBC1又はTRBC2のSer57のシステイン残基による置換によって改変され得る（前記システインは、TCRのアルファ及びベータ定常ドメインの間にジスルフィド結合を形成する）。eTCRは単鎖様式であり得る（例えばWO 2004/033685参照）。単鎖様式は、V-L-、-L-V、V-C-L-、Va-L-Vb-Cb、V-C-L-Vb-Cbタイプの TCRポリペプチドを含み、ここで、Va及びVbはそれぞれTCRアルファ及びベータ可変領域であり、Ca及びCbはそれぞれTCRアルファ及びベータ定常領域であり、Lはリンカー配列である。ある種の実施態様では、単鎖eTCRは、WO2004/033685に記載されているように、それぞれの定常ドメインの残基の間に導入されたジスルフィド結合を有することができる。eTCRの例は例えば国際公開WO 2015/011450に記載される（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

#### 【0054】

##### 操作された受容体の細胞外抗原結合ドメイン：

いくつかの実施態様では、操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の細胞外抗原結合ドメインは、標的抗原（例えば細胞表面抗原）と結合する。ある種の実施態様では、操作された受容体の細胞外抗原結合ドメインは特異的に腫瘍抗原と結合する。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、標的抗原（すなわち細胞表面抗原、例えば腫瘍抗原又はウイルスタンパク質）と結合するモノクローナル抗体（mAb）から誘導される。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインはscFvを含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインはFabを含み、場合によって架橋される。いくつかの実施態

様では、細胞外抗原結合ドメインはF(ab)<sub>2</sub>を含む。いくつかの実施態様では、前述の分子のいずれかは異種配列を用いた融合タンパク質に含まれて、細胞外抗原結合ドメインを形成する。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、腫瘍抗原と特異的に結合するヒトscFvを含む。ある種の実施態様では、scFvは、腫瘍抗原-Fc融合タンパク質を用いてscFvファージライブラリーをスクリーニングすることによって同定される。

#### 【0055】

ある種の実施態様では、本開示の操作された受容体の細胞外抗原結合ドメインは、腫瘍抗原（例えば哺乳動物腫瘍抗原、例えばヒト腫瘍抗原）に対して高い結合特異性及び高い結合親和性を有する。例えば、いくつかの実施態様では、操作された受容体の細胞外抗原結合ドメイン（例えばヒトscFv又はそのアナログとして具体化される）は、個別の腫瘍抗原と約 $1 \times 10^{-5}$ M以下の解離定数（ $K_d$ ）で結合する。ある種の実施態様では、 $K_d$ は、約 $5 \times 10^{-6}$ M以下、約 $1 \times 10^{-6}$ M以下、約 $5 \times 10^{-7}$ M以下、約 $1 \times 10^{-7}$ M以下、約 $5 \times 10^{-8}$ M以下、約 $1 \times 10^{-8}$ M以下、約 $5 \times 10^{-9}$ M以下、約 $4 \times 10^{-9}$ M以下、約 $3 \times 10^{-9}$ M以下、約 $2 \times 10^{-9}$ M以下、約 $1 \times 10^{-9}$ M以下、約 $1 \times 10^{-10}$ M以下、約 $1 \times 10^{-11}$ M以下、約 $1 \times 10^{-12}$ M以下、約 $1 \times 10^{-13}$ M以下、約 $1 \times 10^{-14}$ M以下、約 $1 \times 10^{-15}$ M以下である。ある種の実施態様では、 $K_d$ は約 $5 \times 10^{-7}$ M以下である。ある種の実施態様では、 $K_d$ は約 $3 \times 10^{-9}$ M以下である。ある種の実施態様では、 $K_d$ は約 $1 \times 10^{-13}$ M以下である。ある種の実施態様では、 $K_d$ は約 $1 \times 10^{-13}$ Mから約 $5 \times 10^{-7}$ Mである。ある種の実施態様では、 $K_d$ は約 $3 \times 10^{-9}$ Mから約 $2 \times 10^{-7}$ Mである。

#### 【0056】

本開示の腫瘍抗原を標的とする操作された受容体の細胞外抗原結合ドメイン（例えばヒトscFv又はそのアナログの態様）の結合は、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射性免疫アッセイ（RIA）、FACS分析、パイオアッセイ（例えば増殖阻害）、又はウェスタンブロットアッセイによって確認することができる。これらのアッセイの各々は一般的には、関心を有する個別のタンパク質-抗体複合体の存在を、当該関心のある複合体に特異的な標識試薬（例えば抗体又はscFv）を用いることによって検出する。例えば、scFvを放射性標識し、放射性免疫アッセイ（RIA）で用いる（例えば以下の著作を参照されたい：Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986（参照によって本明細書に含まれる））。放射性同位体は、ガンマカウンター若しくはシンチレーションカウンターのよう手段によって、又はオートラジオグラフィーによって検出できる。ある種の実施態様では、腫瘍抗原を標的とする操作された受容体の細胞外抗原結合ドメインは、蛍光マーカーによって標識される。蛍光マーカーの非限定的な例には、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（例えばEBFP、EBFP2、アズライト及びmKalamal）、シアン蛍光タンパク質（例えばECFP、セルレアン、及びCyPet）、及び黄色蛍光タンパク質（例えばYFP、シトリン、ヴィーナス、及びYPet）が含まれる。ある種の実施態様では、本開示の腫瘍抗原標的の操作された受容体のヒトscFvはGFPで標識される。

いくつかの実施態様では、発現される操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の細胞外抗原結合ドメインは、腫瘍細胞によって発現される腫瘍抗原と結合する。いくつかの実施態様では、発現される操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の細胞外抗原結合ドメインは、腫瘍細胞の表面で発現される腫瘍抗原と結合する。いくつかの実施態様では、発現される操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の細胞外抗原結合ドメインは、MHCタンパク質と結合して腫瘍細胞の表面で発現される腫瘍抗原と結合する。いくつかの実施態様では、MHCタンパク質はMHCクラスIタンパク質である。いくつかの実施態様では、MHCクラスIタンパク質はHLA-A、HLA-B、又はHLA-C分子である。いくつかの実施態様では、発現される操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の細胞外抗原結合ドメインは、MHCタンパク質と組み合わされずに腫瘍細胞の表面で発現される腫瘍抗原（すなわち細胞表面抗原、例えば腫瘍抗原又はウイルス抗原）と結合する。

#### 【0057】

いくつかの実施態様では、発現される操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の

細胞外抗原結合ドメインは、以下から選択されるタンパク質と結合する：5T4、アルファ5  
 1-インテグリン、707-AP、A33、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、Bcl-2、 $\beta$ -カテニン、Bcr-A  
 bl、MN/CIX抗体、CA125、CA19-9、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD3、CD4、CD5、CD19、CD20  
 、CD21、CD22、CD25、CDC27/m、CD33、CD37、CD45、CD52、CD56、CD80、CD123、CDK4/m、  
 CEA、c-Met、CS-1、CT、Cyp-B、サイクリンB1、DAGE、DAM、EBNA、EGFR、ErbB3、ELF2M、  
 EMMPRIN、EpCam、エフリンB2、エストロゲン受容体、ETV6-AML1、FAP、フェリチン、葉酸  
 結合タンパク質、GAGE、G250、GD-2、GM2、GnT-V、gp75、gp100 (Pmel 17)、HAGE、HER-  
 2/neu、HLA-A\*0201-R1701、HPV E6、HPV E7、Ki-67、HSP70-2M、HST-2、hTERT (又はhTRT  
 )、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、K1AA0205、KRAS、LAGE、LDLR/FUT、LRP、LMP2、MAGE、M  
 ART、MART-1/メラニン-A、MART-2/Ski、MC1R、メゾテリン、MUC、MUM-1-B、myc、MUM-2、MU  
 M-3、NA88-A、NYESO-1、NY-Eso-B、p53、PD1、プロテイナーゼ-3、p190マイナーbcr-abl  
 、Pml/RAR、PRAME、プロジェステロン受容体、PSA、PSM、PSMA、ras、RAGE、RU1又はRU  
 2、ROR1、ROR2、SART-1又はSART-3、サーバイピン、TEL/AML1、TGF $\beta$ 、TPI/m、TRP-1、TR  
 P-2、TRP-2/INT2、テナシン、TSTAチロシナーゼ、VEGF、及びWT1。ある種の実施態様では  
 、発現される操作された受容体 (例えばCAR、caTCR、eTCR) の細胞外抗原結合ドメインは  
 、ROR2、WT1、PRAME、KRAS、PD1、LMP2、及びAFP又は前記のフラグメントから選択される  
 タンパク質と結合する。ある種の実施態様では、発現される操作された受容体 (例えばCA  
 R、caTCR、eTCR) の細胞外抗原結合ドメインはROR2又はそのフラグメントと結合する。あ  
 る種の実施態様では、発現される操作された受容体 (例えばCAR、caTCR、eTCR) の細胞外  
 抗原結合ドメインはWT1又はそのフラグメントと結合する。

10

20

#### 【0058】

ある種の実施態様では、TCR又は細胞表面リガンドは2つ以上の標的抗原と結合する。い  
 くつかの実施態様では、TCR又は細胞表面リガンドは2つ以上の細胞外抗原結合ドメインを  
 含む。いくつかの実施態様では、TCR又は細胞表面リガンドは、二重特異性抗体である細  
 胞外抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施態様では、二重特異性抗体は、三機能性抗  
 体、化学的に連結されたFab、又は二重特異性T細胞嵌合体である。いくつかの実施態様で  
 は、TCR又は細胞表面リガンドは、第一の細胞外抗原結合ドメイン又はそのフラグメント  
 を含み、前記ドメインは以下から選択されるタンパク質と結合する：ROR2、WT1、PRAME、  
 KRAS、PD1、LMP2、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、ヒストンH3.3、  
 PSA、CD19、CD20、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPCR5D、及びFCRL5。いくつかの実  
 施態様では、TCR又は細胞表面リガンドは、第二の標的抗原と結合する第二の細胞外抗原  
 結合ドメインを含む。いくつかの実施態様では、第二の標的抗原は細胞表面タンパク質 (例  
 えばCD3) である。

30

例示的な細胞外抗原結合ドメイン並びにそのようなドメイン及び関連するCARを作製す  
 る方法は、例えば以下に記載される：WO2015/070061、WO2016/142768、WO2015/011450、W  
 O2017/070608、WO2016/191246、WO2016/165047、WO2016/210129、WO2016/201124、WO2016  
 /161390、WO2016/191246、WO2017/023859、WO2015/188141、WO2015/070061、WO2012/1358  
 54、WO2014/055668 (参照によってその全体 (そこで提供される配列表を含む) が本明細  
 書に含まれる)。

#### 【0059】

##### CD19と結合する操作された受容体の細胞外抗原結合ドメイン：

いくつかの実施態様では、発現される操作された受容体 (例えばCAR、caTCR、eTCR) の  
 細胞外抗原結合ドメインはCD19と結合する。

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインはCD19又はそのフラグメントと結合す  
 る。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:101の配列を有する  
 アミノ酸を含む重鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。いくつか  
 の実施態様では、細胞外抗原結合ドメイン (例えばヒトscFv) は、配列番号:102の配列を  
 有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。い  
 くつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインはヒトscFvであり、配列番号:101に示さ  
 れる配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種

40

50



、及び配列番号:102に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を、場合によって重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間の(iii)リンカー配列(例えばリンカーペプチド)とともに含む。ある種の実施態様では、リンカーは、配列番号:118(SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA)に示される配列を有するアミノ酸を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、ヒトscFv-Fc融合タンパク質又はV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を有する完全長ヒトIgGである。

【0060】

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:101と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>を含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:101と約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:101に示される配列を有するアミノ酸を含むV<sub>H</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:101と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>を含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:102と約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:102に示される配列を有するアミノ酸を含むV<sub>L</sub>を含む。

10

20

【0061】

いくつかの実施態様では、特定の配列(例えば配列番号:101及び102)に対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%(例えば、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%)相同性を有するV<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>アミノ酸配列は、当該特定の配列と対比して置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、それぞれの標的抗原と結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、合計1から10アミノ酸が、配列番号:101及び102で置換され、挿入され及び/又は欠失される。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、細胞外抗原結合ドメインのCDRの外側領域で(例えばフレームワーク領域(FR)で)生じる。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:101及び102から成る群から選択されるV<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>配列(当該配列の翻訳後修飾を含む)を含む。

30

いくつかの実施態様では、操作された受容体はCD19と結合するcaTCRである。いくつかの実施態様では、caTCRは、配列番号:103と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むTCRデルタ鎖を含む。いくつかの実施態様では、caTCRは、配列番号:104と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むTCRガンマ鎖を含む。

【0062】

いくつかの実施態様では、操作された受容体は、(a)配列番号:105と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、(b)配列番号:106と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び(c)配列番号:107又は108と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む。いくつかの実施態様では、重鎖CDR3は、配列番号:107と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様では、操作された受容体は、(a)配列番号:109と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、(b)配列番号:110と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び(c)配列番号:111又は112と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少な

40

50

くとも95%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの実施態様では、軽鎖CDR3は、配列番号:111と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

CD19と結合する追加の細胞外抗原結合ドメイン（scFv並びにCDRアミノ酸及びヌクレオチド配列を含む）は、WO2017070608（参照によってその全体（その中で提供される配列表を含む）が本明細書に含まれる）に記載される。

### 【0063】

AFPと結合する操作された受容体の細胞外抗原結合ドメイン：

いくつかの実施態様では、発現された操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の細胞外抗原結合ドメインはAFPと結合する。いくつかの実施態様では、発現された操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の細胞外抗原結合ドメインは、MHC分子との関係で提示されるAFPと結合する。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、HLA-A2分子との関係で提示されるAFPと結合する。

10

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、AFP又はそのフラグメントと結合する。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:98の配列を有するアミノ酸を含むscFv又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:98に示される配列を有するアミノ酸を含むヒトscFv又はその機能的フラグメント若しくは変種で、場合によって重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間に（iii）リンカー配列（例えばリンカーペプチド）を有する。ある種の実施態様では、リンカーは、配列番号:118（SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA）に示される配列を有するアミノ酸を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、ヒトscFv-Fc融合タンパク質又はV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を有する完全長ヒトIgGである。ある種の実施態様では、scFvはCD28-CD3ゼータペプチドと融合される。いくつかの実施態様では、CD28-CD3ゼータペプチドは、配列番号:99に示される配列を有するアミノ酸を含む。いくつかの実施態様では、scFvは41BB-CD3ゼータペプチドと融合される。いくつかの実施態様では、41BB-CD3ゼータペプチドは以下の配列を有する：TGTTTTAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR（配列番号:100）。

20

30

### 【0064】

いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、（a）配列番号:98と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むscFv、及び（b）配列番号:99と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むCD28-CD3ゼータペプチドを含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、（a）配列番号:98と少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むscFv、及び（b）配列番号:99と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むCD28-CD3ゼータペプチドを含む。

40

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、（a）配列番号:98と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むscFv、及び（b）配列番号:100と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むCD28-CD3ゼータペプチドを含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、（a）配列番号:98と少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むscFv、及び（b）配列番号:100と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むCD28-CD3ゼータペプチドを含む。

50

## 【 0 0 6 5 】

いくつかの実施態様では、操作された受容体は、(a) 配列番号:92と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、(b) 配列番号:93と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、及び(c) 配列番号:94と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む。いくつかの実施態様では、操作された受容体は、(a) 配列番号:95と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、(b) 配列番号:96と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び(c) 配列番号:97と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む。

AFPと結合する追加の細胞外抗原結合ドメイン(scFv並びにCDRアミノ酸及びヌクレオチド配列を含む)は、WO2016161390(参照によってその全体(その中で提供される配列表を含む)が本明細書に含まれる)に記載される。

## 【 0 0 6 6 】

WT1と結合する操作された受容体の細胞外抗原結合ドメイン:

いくつかの実施態様では、発現された操作された受容体(例えばCAR、caTCR、eTCR)の細胞外抗原結合ドメインはWT1腫瘍抗原と結合する。いくつかの実施態様では、発現された操作された受容体(例えばCAR、caTCR、eTCR)の細胞外抗原結合ドメインは、MHC分子との関係で提示されるWT1腫瘍抗原と結合する。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、HLA-A2分子との関係で提示されるWT1腫瘍抗原と結合する。

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、WT1腫瘍抗原又はそのフラグメントと結合する。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:134 - 140から選択される配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメイン(例えばヒトscFv)は、配列番号:141 - 147から選択される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインはヒトscFvであり、配列番号:134 - 140から選択される配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種、及び配列番号:141 - 147から選択される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を、場合によって重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間の(iii)リンカー配列(例えばリンカーペプチド)とともに含む。ある種の実施態様では、リンカーは、配列番号:118(SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA)に示される配列を有するアミノ酸を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、ヒトscFv-Fc融合タンパク質又はV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を有する完全長ヒトIgGである。

## 【 0 0 6 7 】

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:134 - 140から選択される配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>を含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:134 - 140から選択される配列と約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:134 - 140から選択される配列を有するアミノ酸を含むV<sub>H</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:141 - 147から選択される配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>を含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:141 - 147から選択される配列と約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合

ドメインは、配列番号:141 - 147から選択される配列を有するアミノ酸を含むV<sub>L</sub>を含む。

いくつかの実施態様では、特定の配列（例えば配列番号:141 - 147）に対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%（例えば、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%）相同性を有するV<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>アミノ酸配列は、当該特定の配列と対比して置換（例えば保存的置換）、挿入又は欠失を含むが、それぞれの標的抗原と結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、合計1から10アミノ酸が、配列番号:141 - 147で置換され、挿入され及び/又は欠失される。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、細胞外抗原結合ドメインのCDRの外側領域で（例えばフレームワーク領域（FR）で）生じる。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:141 - 147から成る群から選択されるV<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>配列（当該配列の翻訳後修飾を含む）を含む。

10

#### 【0068】

いくつかの実施態様では、操作された受容体は以下を含む：（A）（i）配列番号:148、149及び150と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）可変領域、並びに配列番号:151、152及び153と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）可変領域；（ii）配列番号:154、155及び156と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）可変領域、並びに配列番号:157、158及び159と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）可変領域；（iii）配列番号:160、161及び162と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）可変領域、並びに配列番号:163、164及び165と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）可変領域；（iv）配列番号:166、167及び168と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）可変領域、並びに配列番号:169、170及び171と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）可変領域；（v）配列番号:172、173及び174と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）可変領域、並びに配列番号:175、176及び177と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）可変領域；又は（vi）配列番号:178、179及び180と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）可変領域、並びに配列番号:181、182及び183と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）可変領域；又は（B）配列番号:134及び141、135及び142、136及び143、137及び144、138及び145からそれぞれ選択される第一及び第二のアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>；又は（C）配列番号:184 - 189から選択されるアミノ酸配列。

20

30

40

WT1と結合する追加の細胞外抗原結合ドメイン（抗WT1抗体、scFv並びにCDRアミノ酸及びヌクレオチド配列を含む）は、WO2015/070061（参照によってその全体（その中で提供される配列表を含む）が本明細書に含まれる）に記載され、本明細書で提供する方法のいずれかで用いることができる。

#### 【0069】

50

ROR2と結合する操作された受容体の細胞外抗原結合ドメイン：

いくつかの実施態様では、発現された操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の細胞外抗原結合ドメインはROR2タンパク質と結合する。いくつかの実施態様では、発現された操作された受容体（例えばCAR、caTCR、eTCR）の細胞外抗原結合ドメインは、MHC分子との関係で提示されるROR2タンパク質と結合する。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、HLA-A2分子との関係で提示されるROR2タンパク質と結合する。

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、ROR2タンパク質又はそのフラグメントと結合する。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:191 - 203の配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメイン（例えばヒトscFv）は、配列番号:204 - 216の配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインはヒトscFvであり、配列番号:191 - 203に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種、及び配列番号:204 - 216に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を、場合によって重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間の（iii）リンカー配列（例えばリンカーペプチド）とともに含む。ある種の実施態様では、リンカーは、配列番号:118（SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA）に示される配列を有するアミノ酸を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、ヒトscFv-Fc融合タンパク質又はV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を有する完全長ヒトIgGである。

**【0070】**

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:191 - 203と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>を含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:191 - 203と約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:191 - 203に示される配列を有するアミノ酸を含むV<sub>H</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:204 - 216と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>を含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:204 - 216と約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:204-216に示される配列を有するアミノ酸を含むV<sub>L</sub>を含む。

**【0071】**

いくつかの実施態様では、特定の配列（例えば配列番号:191 - 216）に対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%（例えば、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%）相同性を有するV<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>アミノ酸配列は、当該特定の配列と対比して置換（例えば保存的置換）、挿入又は欠失を含むが、それぞれの標的抗原と結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、合計1から10アミノ酸が、配列番号:191-216で置換され、挿入され及び/又は欠失される。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、細胞外抗原結合ドメインのCDRの外側領域で（例えばフレームワーク領域（FR）で）生じる。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:191 - 216から成る群から選択されるV<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>配列（当該配列の翻訳後修飾を含む）を含む。

いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:203のアミノ酸配列を有するV<sub>H</sub>を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:242のヌクレオチド配列によってコードされるV<sub>H</sub>を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:216のアミノ酸配列を有するV<sub>L</sub>を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:241のヌクレオチド配列によってコードされる

10

20

30

40

50

$V_L$ を含む。いくつかの実施態様では、 $V_H$ 及び $V_L$ 鎖は、 $(GGGS)_n$  (配列番号:120) (式中 $n=3$ )のアミノ酸配列を有するリンカーによって連結される。

【0072】

いくつかの実施態様では、操作された受容体は以下を含む：(i)配列番号:243 - 245と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:246 - 248と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(ii)配列番号:249 - 251と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:252 - 254と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(iii)配列番号:255 - 257と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:258 - 260と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(iv)配列番号:261 - 263と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:264 - 266と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(v)配列番号:267 - 269と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:270 - 272と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(vi)配列番号:273 - 275と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:276 - 278と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(vii)配列番号:279 - 281と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:282 - 284と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(viii)配列番号:285 - 287と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:288 - 290と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(ix)配列番号:291 - 293と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:294 - 296と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(x)配列番号:297 - 299と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)可変領域、並びに配列番号:300 - 302と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(xi)配列番号:303 - 305と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少

なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）可変領域、並びに配列番号:306 - 308と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）可変領域；（xii）配列番号:309 - 311と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）可変領域、並びに配列番号:312 - 314と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）可変領域；又は（xiii）配列番号:315 - 317と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2及びHC-CDR3を含む重鎖（HC）可変領域、並びに配列番号:318 - 320と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2及びLC-CDR3を含む軽鎖（LC）可変領域。

ROR2と結合する追加の細胞外抗原結合ドメイン（scFv並びにCDRアミノ酸及びヌクレオチド配列を含む）は、WO2016/142768に記載される（前記文献は参照によってその全体（その中で提供される配列表を含む）が本明細書に含まれる）。

#### 【0073】

##### CD3と結合する細胞外抗原結合ドメイン：

いくつかの実施態様では、TCRはCD3と結合する細胞外抗原結合ドメインを発現する。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、CD3と結合するscFv（例えば抗CD3 scFv）を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:113のアミノ酸配列を有するscFv又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:113と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むscFvを含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:113と約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むscFvを含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:113に示される配列を有するアミノ酸を含むscFvを含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:114と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるポリヌクレオチド配列によってコードされるscFvを含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:114と約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一であるポリヌクレオチドによってコードされるscFvを含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:114に示される配列を有するポリヌクレオチド配列によってコードされるscFvを含む。

#### 【0074】

いくつかの実施態様では、特定の配列（例えば配列番号:113）に対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%（例えば、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%）相同性を有するscFvアミノ酸配列は、当該特定の配列と対比して置換（例えば保存的置換）、挿入又は欠失を含むが、それぞれの標的抗原と結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、合計1から10アミノ酸が、配列番号:113で置換され、挿入され及び/又は欠失される。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、細胞外抗原結合ドメインのCDRの外側領域で（例えばフレームワーク領域（FR）で）生じる。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:113のscFv（当該配列の翻訳後修飾を含む）を含む。

本明細書で用いられるように、2つのアミノ酸の間のパーセント相同性は、2つの配列間のパーセント同一性と等価である。2つの配列間のパーセント同一性は、当該配列によって共有される同一位置の数の関数（すなわち、%相同性 = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100

）であり、2つの配列の最適アラインメントのために導入する必要があるギャップの数、各ギャップの長さが考慮される。配列の比較及び2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成できる。

2つのアミノ酸配列の間のパーセント相同性は、メイヤーとミラーのアルゴリズムを用いて決定できる (E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17, 1988)。前記アルゴリズムは、ALIGNプログラム (バージョン2.0) に取り込まれ、PAM120分子量残基表、12のギャップ長ペナルティー及び4のギャップペナルティーが用いられる。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント相同性は、ニードルマンとウンシュのアルゴリズム (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453, 1970) を用いて決定することができる。前記アルゴリズムは、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラム (www.gcg.comで入手できる) に取り込まれ、Blossum 62マトリックス又はPAM250マトリックスのどちらか、及びギャップ重16、14、12、10、8、6又は4及び長さ重1、2、3、4、5又は6が用いられる。

#### 【0075】

加えて或いはまた別に、本開示の趣旨のアミノ酸配列をさらに“クエリー配列”として用いて公開データベースに対して検索を実施し、例えば関連配列を同定できる。そのような検索は、アルチュルらのXBLASTプログラム (バージョン2.0) を用いて実施できる (Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-10)。BLASTプログラム (スコア=50、ワード長=3) でBLASTタンパク質検索を実施し、本明細書に開示する特定の配列と相同なアミノ酸配列を入手することができる。比較目的のギャップ付加アラインメントを得るために、アルチュルらの記載 (Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402) のように、ギャップ付加BLSTを利用することができる。BLAST及びギャップ付加BLASTプログラムを利用するときは、それぞれのプログラム (例えばXBLAST及びNBLAST) のデフォルトパラメーターを用いることができる。

ある種の非限定的実施態様では、本開示の操作された受容体の細胞外抗原結合ドメインは、当該細胞外抗原結合ドメインの重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを接続するリンカーを含む。本明細書で用いられるように、“リンカー”という用語は、2つ以上のポリペプチド又は核酸を、それらが互いに接続されるように共有結合でつなぐ (例えば化学的又はポリペプチド) 機能基を指す。本明細書で用いられるように、“ペプチドリンカー”は、2つのタンパク質を一緒に連結する (例えば $V_H$ 及び $V_L$ を連結する) ために用いられる1つ以上のアミノ酸を指す。ある種の実施態様では、リンカーは、配列番号:118 (SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA) に示される配列を有するアミノ酸を含む。ある種の実施態様では、配列番号:118 (SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA) のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号:119 (ctagagggtggtagcggcgccgctctggtggtggatcc) で示される。

加えて、細胞外抗原結合ドメインは、新生タンパク質を小胞体に導くリーダー又はシグナルペプチドを含むことができる。シグナルペプチド又はリーダーは、操作された受容体がグリコシル化され細胞膜に固着される場合には必須であり得る。シグナル配列又はリーダーは、新しく合成されるタンパク質のN-末端に存在するペプチド配列 (約5、約10、約15、約20、約25、又は約30アミノ酸の長さ) であり、分泌経路へのそれらの進入を指令することができる。ある種の実施態様では、シグナルペプチドは、細胞外抗原結合ドメインのN-末端に共有結合される。ある種の実施態様では、シグナルペプチドは、下記に提供される配列番号:122に示される配列を有するアミノ酸を含むCD8シグナルポリペプチドを含む:MALPVTALLLPLALLLHAARP (配列番号:122)。

配列番号:123のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、下記に提供される配列番号:123に示される: atggccctgccagtaacggctctgctgctgccacttgctctgctcctccatgcagccaggcct (配列番号:123)。

#### 【0076】

操作された二重特異性受容体 :

いくつかの実施態様では、操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) 又は他の細胞表面リガンドは二重特異性である。いくつかの実施態様では、二重特異性TCR又は細胞

10

20

30

40

50



表面リガンドは、(a) 標的抗原（例えば細胞表面抗原）と特異的に結合する抗体部分、及び(b) TCR関連シグナリングモジュールを動員することができるTCRモジュール（TCRM）を含む。そのような二重特異性TCR又は細胞表面リガンドの例は、WO2017/070608（参照によってその全体（その中で提供される配列表を含む）が本明細書に含まれる）に記載される。

いくつかの実施態様では、操作された二重特異性受容体又は細胞表面リガンドは、(a) 第一の標的抗原又はそのフラグメントと結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び(b) 第二の標的抗原又はそのフラグメントと結合する第二の細胞外抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施態様では、第一の標的抗原はCD19、AFP1、ROR2又はWT1である。いくつかの実施態様では、第二の標的抗原は細胞表面タンパク質である。いくつかの実施態様では、細胞表面タンパク質はCD3である。

#### 【0077】

いくつかの実施態様では、二重特異性TCR又は細胞表面リガンドは、(a) ROR2と結合する第一の細胞外抗原結合ドメイン、及び(b) CD3と結合する第二の細胞外抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施態様では、二重特異性TCR又は細胞表面抗原は配列番号:321のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、ROR2と結合する細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:241のポリヌクレオチド配列によってコードされる軽鎖可変領域（ $V_L$ ）（例えば抗ROR2  $V_L$ ）を含む。いくつかの実施態様では、ROR2と結合する細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:216のアミノ酸配列を有する $V_L$ を含む。いくつかの実施態様では、ROR2と結合する細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:242のポリヌクレオチド配列によってコードされる重鎖可変領域（ $V_H$ ）（例えば抗ROR2  $V_H$ ）を含む。いくつかの実施態様では、ROR2と結合する細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:203のアミノ酸配列を有する $V_H$ を含む。いくつかの実施態様では、CD3と結合する細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:114のポリヌクレオチド配列によってコードされるscFv（例えば抗CD3 scFv）を含む。いくつかの実施態様では、CD3と結合する細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:113のアミノ酸配列を有するscFvを含む。いくつかの実施態様では、抗ROR2  $V_L$ はリンカーを介して抗ROR2  $V_H$ と結合される。いくつかの実施態様では、抗ROR2  $V_L$ と抗ROR2  $V_H$ を接続するリンカーは、配列番号:119のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施態様では、抗ROR2  $V_L$ と抗ROR2  $V_H$ を接続するリンカーは配列番号:118のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、抗ROR2  $V_H$ はリンカーを介して抗CD3 scFvと結合される。いくつかの実施態様では、抗ROR2  $V_H$ と抗CD3 scFvを接続するリンカーは、配列番号:121のポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施態様では、抗ROR2  $V_H$ と抗CD3 scFvを接続するリンカーは、配列番号:120のアミノ酸配列を有する。

#### 【0078】

##### 操作された受容体のトランスメンブレンドメイン：

ある種の非限定的な実施態様では、操作された受容体（例えばCAR、caTCR又はeTCR）は、少なくとも膜の一部を跨ぐ疎水性アルファヘリックスを含む。異なるトランスメンブレンドメインは異なる受容体安定性をもたらす。抗原認識後、受容体は集合し、シグナルが細胞に伝達される。本開示の趣旨にしたがえば、操作された受容体のトランスメンブレンドメインは、CD8ポリペプチド、CD28ポリペプチド、CD3 ポリペプチド、CD4ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、配列番号:129、CTLA-4ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、BTLAポリペプチド、合成ペプチド（例えば免疫応答関連タンパク質を土台にしないトランスメンブレンドメインペプチド）、又は前記の組合せを含む。

ある種の実施態様では、本開示の操作された受容体のトランスメンブレンドメインはCD28ポリペプチドを含む。CD28ポリペプチドは、NCBI参照番号PI0747又はNP006130（配列番号:125）を有する配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は100%相同であるアミノ酸配列又はそのフラグメントを有することができ、及び/又は場合によって1つまで、2つまで又は3つまでの保存的アミノ酸置換を含むことができる。ある種の実施態様では、CD28ポリペプチドは、配列番号:125の連続する部分である

アミノ酸配列を有することができ、長さが少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、又は少なくとも50アミノ酸で、さらに220までのアミノ酸である。また別に或いはさらに加えて、非限定的な実施態様では、CD28ポリペプチドは、配列番号:125のアミノ酸1から220、1から50、50から100、100から150、114から220、150から200、又は200から220のアミノ酸配列を有する。ある種の実施態様では、本開示の操作された受容体は、CD28ポリペプチドを含むトランスメンブレンドメイン、及びCD28ポリペプチドを含む共同刺激シグナリング領域を含む細胞内ドメインを含む。ある種の実施態様では、トランスメンブレンドメイン及び細胞内ドメインに含まれるCD28ポリペプチドは、配列番号:125のアミノ酸114から220のアミノ酸配列を有する。

【0079】

配列番号:125は下記に提供される：MLRLLALNLFPISQVTGNKILVKQSPMLVAYDNALSCKYSYNLFSREFRSLHKGLDSAVEVCWYGNYSQQQLQVYSKTFNCDGKLGNESVTFYLNLYQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPFWWLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP R D F A A Y R S (配列番号:125)。

本開示の趣旨にしたがえば、“CD28核酸分子”は、CD28ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。ある種の実施態様では、本開示の操作された受容体のトランスメンブレンドメイン及び細胞内ドメイン(例えば共同刺激シグナリング領域)に含まれるCD28ポリペプチド(配列番号:125のアミノ酸114から220)をコードするCD28核酸分子は、下記に提供する配列番号:126に示される配列を有する核酸を含む：attgaagtattgatcctcctctcttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaaggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagcccttttgggtgctgggtgggtgggtgggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtgccctttattatttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggccccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc(配列番号:126)

ある種の実施態様では、トランスメンブレンドメインはCD8ポリペプチドを含む。CD8ポリペプチドは、下記に提供する配列番号:124又はそのフラグメントと少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は100%相同であるアミノ酸配列を有することができ、及び/又は場合によって1つまで、2つまで又は3つまでの保守的アミノ酸置換を含むことができる(本明細書で相同とはBLASTのような標準的なソフトウェアを用いて決定することができる)。ある種の実施態様では、CD8ポリペプチドは、配列番号:124の連続する部分であるアミノ酸配列を有することができ、長さが少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、又は少なくとも50アミノ酸で、さらに235までのアミノ酸である。また別に或いはさらに加えて、非限定的な実施態様では、CD8ポリペプチドは、配列番号:124のアミノ酸1から235、1から50、50から100、100から150、150から200、又は200から235のアミノ酸配列を有する。

配列番号:124は下記に提供される：MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPDLRTWNLGETVELKQCQVLSNPTSGCSWLFQPRGAAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPWKSGDKPSSLARYV(配列番号:124)。

【0080】

本開示の趣旨にしたがえば、“CD8核酸分子”はCD8ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

ある種の実施態様では、操作された受容体はまた、細胞外抗原結合ドメインをトランスメンブレンドメインに連結するスペーサー領域を含む。スペーサー領域は十分に可撓性であり、抗原結合ドメインを種々の方向に位置付けて操作された受容体(例えばCAR、caTCR又はeTCR)の活性化活性を温存しつつ抗原認識を促進することができる。ある種の実施態様では、スペーサー領域は、IgG1由来のヒンジ領域、免疫グロブリンのCH2CH3及びCD3の部分、CD28ポリペプチドの部分(例えば配列番号:125)、CD8ポリペプチドの部分(例えば配列番号:124)、前述のいずれかの変種(それらに対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%相同である)、又は合成スペーサー配列であり得る。ある種の実施態様では、スペーサー領域

10

20

30

40

50

は、約1 - 50 (例えば5 - 25、10 - 30、又は30 - 50) アミノ酸の長さを有することができる。

#### 【0081】

##### 操作された受容体の細胞内ドメイン：

ある種の非限定的な実施態様では、CARの細胞内ドメインはCD3 ポリペプチドを含むことができ、細胞 (例えばリンパ系系列の細胞、例えばT細胞) を活性化又は刺激することができる。CD3 は3つのITAMを含み、抗原結合後に活性化シグナルを細胞 (例えばリンパ系系列の細胞、例えばT細胞) に伝達する。CD3 ポリペプチドは、NCBI参照番号NP\_932170を有する配列と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約100%相同であるアミノ酸配列又はそのフラグメントを有することができ、及び/又は場合によって1つまで又は2つまで又は3つまでの保存的アミノ酸置換を含むことができる。非限定的なある種の実施態様では、CD3 ポリペプチドは、配列番号:115の連続する部分であるアミノ酸配列を有することができ、長さが少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、又は少なくとも50アミノ酸で、さらに164までのアミノ酸である。また別に或いはさらに加えて、非限定的な種々の実施態様では、CD3 ポリペプチドは、配列番号:115のアミノ酸1から164、1から50、50から100、100から150、又は150から164のアミノ酸配列を有する。ある種の実施態様では、CD3 ポリペプチドは、配列番号:115のアミノ酸52から164のアミノ酸配列を有する。

配列番号:115は下記に提供される：MKWKALFTAAIQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGLLFIYGVIL  
TALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKQRRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  
GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号:115)

#### 【0082】

ある種の実施態様では、CD3 ポリペプチドは配列番号:116に示されるアミノ酸配列を有し、配列番号:116は下記に提供される：RVKFSRSAEPPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRRGRD  
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号:116)。

本開示の趣旨にしたがえば、“CD3 核酸分子”はCD3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。ある種の実施態様では、本開示の操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) の細胞内ドメインに含まれるCD3 ポリペプチドをコードするCD3 核酸分子 (配列番号:117) は、下記に提供される配列番号:117に示されるヌクレオチド配列を含む：agagtgaagttcagcaggagcgcagagcccccgctaccagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatc  
taggacgaagagaggagtagcatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaag  
aacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcga  
gcgccggaggggcaagggggcacgatggcctttaccagggctcagtagacccaccaaggacacctacgacgcccttcaca  
tgaggccctgccccctcgcg (配列番号:117)。

ある種の非限定的な実施態様では、操作された受容体 (例えばCAR、caTCR又はeTCR) の細胞内ドメインはさらにまた少なくとも1つのシグナリング領域を含む。少なくとも1つのシグナリング領域には、例えばCD28ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、配列番号:29、DAP-10ポリペプチド、PD-1ポリペプチド、CTLA-4ポリペプチド、LAG-3ポリペプチド、2B4ポリペプチド、BTLAポリペプチド、合成ペプチド (免疫応答関連タンパク質を土台にしない)、又は前記の組合せが含まれ得る。

#### 【0083】

ある種の実施態様では、シグナリング領域は共同刺激シグナリング領域である。ある種の実施態様では、共同刺激シグナリング領域は少なくとも1つの共同刺激分子を含み、前記分子は最適なリンパ球活性化を提供することができる。本明細書で用いられるように、“共同刺激分子”は、抗原受容体又はそれらのリガンド以外の、抗原に対するリンパ球の効果的な応答に要求される細胞表面分子を指す。前記少なくとも1つの共同刺激シグナリング領域は、CD28ポリペプチド、4-1BBポリペプチド、OX40ポリペプチド、配列番号:29、DAP-10ポリペプチド、又は前記の組合せを含むことができる。共同刺激分子は共同刺激リガンドと結合することができる。前記リガンドは、細胞表面で発現されるタンパク質であ

り、その受容体との結合時に共同刺激応答（すなわち細胞内応答）を生じる。前記細胞内応答は、抗原が操作された受容体の細胞外抗原結合ドメインと結合するときに提供される刺激の効果を発揮させる。共同刺激リガンドにはCD80、CD86、CD70、OX40L、4-1BBL、CD48、及びTNFRSF14が含まれるが、ただしこれらに限定されない。一例として、4-1BBLリガンド（すなわち4-1BBL）は4-1BB（“CD37”としてもまた知られている）と結合して細胞内シグナルを提供し、前記シグナルは、細胞外シグナルと一緒にあって、操作されたT細胞のエフェクター細胞機能を誘発する。4-1BB、ICOS又はDAP-10を含む共同刺激シグナリング領域を含む細胞内ドメインを含む操作された受容体は、US 7,446,190に開示される（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。ある種の実施態様では、操作された受容体の細胞内ドメインは、CD28ポリペプチドを含む共同刺激シグナリング領域を含む。ある種の実施態様では、操作された受容体の細胞内ドメインは、2つの共同刺激分子（CD28及び4-1BB又はCD28及びOX40）を含む共同刺激シグナリング領域を含む。

10

#### 【0084】

4-1BBは腫瘍壊死因子（TNF）リガンドとして作用し、刺激活性を有することができる。4-1BBポリペプチドは、NCBI参照番号P41273又はNP\_001552を有する配列（配列番号127）と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約100%相同であるアミノ酸配列又はそのフラグメントを有することができ、及び/又は場合によって1つまで又は2つまで又は3つまでの保存的アミノ酸置換を含むことができる。

配列番号:127は下記に提供される：MGNSCYNIVATLLLVLFNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDDNRRNQICSPCPNNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLGTKERDWCSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQII SFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSWKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL（配列番号:127）。

20

本開示の主題にしたがえば、“4-1BB核酸分子”は4-1BBポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

OX40ポリペプチドは、NCBI参照番号P43489又はNP\_003318を有する配列（配列番号:128）と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約100%相同であるアミノ酸配列又はそのフラグメントを有することができ、及び/又は場合によって1つまで又は2つまで又は3つまでの保存的アミノ酸置換を含むことができる。

配列番号:128は下記に提供される：MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGM/SRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDWSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQQPSTRPV E V P G G R A V A A I L G L G L V L G L L G P L A I L L A L Y L L R R D Q R L P P D A H K P P G G G S F R T P I Q E E Q A D A H S T L A K I（配列番号:128）。

30

本開示の主題にしたがえば、“OX40核酸分子”はOX40ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

ICOSポリペプチドは、NCBI参照番号NP\_036224を有する配列（配列番号:129）と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約100%相同であるアミノ酸配列又はそのフラグメントを有することができ、及び/又は場合によって1つまで又は2つまで又は3つまでの保存的アミノ酸置換を含むことができる。

配列番号:129は下記に提供される：MKSGLWYFFLFCLRIKVLGTGEINGSAN YEMFI FHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHANYFCNLSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFWVICLGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRATAKKSRLTDVTL（配列番号:129）。

40

#### 【0085】

CTLA-4は活性化T細胞によって発現される阻害性受容体であり、その対応するリガンドによって嵌合されるとき（それぞれCD80及びCD86、B7-1及びB7-2）、活性化T細胞阻害又はアネルギーを媒介する。前臨床及び臨床試験の両方で、全身性抗体輸液によるCTLA-4遮断は内因性抗腫瘍応答を増強するが、臨床設定では予期せぬ顕著な毒性を示した。

CTLA-4は細胞外ドメイン、トランスメンブレンドメイン及び細胞質テールを含む。種々のアイソフォームをコードするまた別のスプライス変種の特徴が調べられている。膜結合

50

アイソフォームはジスルフィド結合によって接続されるホモダイマーとして機能するが、一方、可溶性アイソフォームはモノマーとして機能する。細胞内ドメインはCD28のそれと同様で、すなわち固有の触媒活性をもたず、かつPI3K、PP2A及びSHP-2と結合できる1つのYVKMモチーフ及びSH3含有タンパク質と結合できる1つのプロリン富裕モチーフを含む。T細胞応答阻害におけるCTLA-4の1つの役割は、TCR近位シグナリングタンパク質（例えばCD3及びLAT）のSHP-2及びPP2A脱リン酸化を直接的に媒介するように思われる。CTLA-4はまた、CD80/86結合についてCD28と競合することにより間接的にシグナリングに影響を与えることができる。CTLA-4はまた、PI3K、CD80、AP2M1及びPPP2R5Aと結合及び/又は相互作用することが示されている。

本開示の主題にしたがえば、CTLA-4ポリペプチドは、UniProtKB/Swiss-Prot Ref.No.P16410.3（配列番号:130）と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約100%相同であるアミノ酸配列又はそのフラグメントを有することができる（本明細書の相同性は標準的ソフトウェア（例えばBLAST又はFASTA）を用いて決定することができる）、及び/又は場合によって1つまで又は2つまで又は3つまでの保存的アミノ酸置換を含むことができる。

配列番号:130は下記に提供される：MACLGFRHKAQLNLRTRWPCTLLFFLLFIPVFCAMHVAQPAWLAASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPYPPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN（配列番号:130）。

本開示の主題にしたがえば、“CTLA-4核酸分子”はCTLA-4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

#### 【0086】

リンパ球活性化タンパク質3（LAG-3）は免疫細胞の負の免疫調節因子である。LAG-3は免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーに属し、4つの細胞外Ig様ドメインを含む。LAG3遺伝子は8つのエクソンを含む。配列データ、エクソン/イントロン構成、及び染色体上の局在性は全てLAG3対CD4の近縁関係を示している。LAG3はまた、CD223（分化抗原群223）と称されている。

本開示の趣旨にしたがえば、LAG-3ポリペプチドは、UniProtKB/Swiss-Prot Ref.No.P18627.5（配列番号:131）と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約100%相同であるアミノ酸配列又はそのフラグメントを有することができる、及び/又は場合によって1つまで又は2つまで又は3つまでの保存的アミノ酸置換を含むことができる。

配列番号:131は下記に提供される：MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEPWWAQEGAPQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRQGASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFNRNGQGRVVPRESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPEPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTFRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSAQAQAGTYTCHIHLEQEQQLNATVTLAIIITVTPKSFSGPSGLKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSPPGAQRSGRAPGALPAGHLLFLILGVLSLLLLVTGAFGFHLWRRQRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL（配列番号:131）

#### 【0087】

本開示の趣旨にしたがえば、“LAG-3核酸分子”はLAG-3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。ナチュラルキラー細胞受容体2B4（2B4）は、非MHC拘束細胞殺滅をNK細胞及びT細胞サブセット上で媒介する。今日でも、2B4の機能はなお究明中であり、2B4-Sアイソフォームは活性化受容体であると考えられ、2B4-Lアイソフォームは免疫細胞の負の免疫調節因子と考えられている。2B4は、その高親和性リガンド（CD48）との結合に際して嵌合される。2B4はチロシン系スイッチモチーフ（タンパク質が多様なホスファターゼと関係することを可能にする）を含む。2B4はまたCD244（分化抗原群244）と称されている。

本開示の趣旨にしたがえば、2B4ポリペプチドは、UniProtKB/Swiss-Prot Ref.No.Q9BZW

10

20

30

40

50

8.2 (配列番号:132) と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約100%相同であるアミノ酸配列又はそのフラグメントを有することができ、及び/又は場合によって1つまで又は2つまで又は3つまでの保存的アミノ酸置換を含むことができる。

配列番号:132は下記に提供される: MLGQWTLILLKLVYQGGKGCQGSADHWSISGVPLQLQPNSIQTKVDSIAWKKLLPSQNGFHHILKWENGLSPSNTSNDRFVSIVKNLSLLIKAAQQQDSGLYCLEVTSISGKVQTATFQVVFESLLPDKVEKPRLLQGGKILDRGRQCVALSCLVSRDGNVSYAWYRGSKLIQTAGNLTYLDEEVDINGHTHTYTCNVSNPVSWE SHTLNLTDQCQNAHQEFRFPFLVIVIVLSALFLGTLACFCVWRRKRKEKQSETSPKEFLT IYEDVKDLKTRRNHEQEQT FPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSRSRKRNRHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYS (配列番号:132)。

10

本開示の趣旨にしたがえば、“2B4核酸分子”は2B4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

#### 【0088】

B及びTリンパ球減衰因子(BTLA)発現は、T細胞の活性化時に誘発され、BTLAはTh1細胞では発現されたままであるが、Th2細胞ではそうではない。PD1及びCTLA4と同様に、BTLAはB7ホモログ、B7H4と相互作用する。しかしながら、PD-1及びCTLA4と異なり、BTLAは、腫瘍壊死因子ファミリー受容体との相互作用を介して(まさに細胞表面受容体のB7ファミリーとの相互作用ではなく)T細胞阻害を提示する。BTLAは、腫瘍壊死因子(受容体)スーパーファミリー、メンバー14(TNFRSF14)(ヘルペスウイルス侵入媒介因子(HVEM)としても知られている)に対するリガンドである。BTLA-HVEM複合体はT細胞免疫応答を負の方向に調節する。BTLA活性化は、ヒトCD8<sup>+</sup>癌特異的T細胞の機能を阻害することが示されている。BTLAはまたCD272(分化抗原群272)と称されている。

20

本開示の趣旨にしたがえば、2B4ポリペプチドは、UniProtKB/Swiss-Prot Ref.No.Q7Z6A9.3(配列番号:133)と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約100%相同であるアミノ酸配列又はそのフラグメントを有することができ、及び/又は場合によって1つまで又は2つまで又は3つまでの保存的アミノ酸置換を含むことができる。

配列番号:133は下記に提供される: MKTLPAMLGTGKLFWVFFLI PYLDIWN IHGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNI SFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIES HSTTLVYTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYRLLPLGLPLLITTCFCLFCLRRHQKQNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASIC VRS (配列番号:133)。

30

本開示の趣旨にしたがえば、“BTLA核酸分子”はBTLAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

#### 免疫細胞

本開示の趣旨は操作された免疫細胞を提供し、前記細胞は、操作された受容体(例えばCAR、caTCR又はeTCR)、又は細胞外抗原結合ドメイン、トランスメンブレンドメイン及び細胞内ドメインを含む他のリガンドを発現し、ここで、細胞外抗原結合ドメインは腫瘍抗原と特異的に結合する(上記に記載の腫瘍受容体又はリガンドを含む)。ある種の実施態様では、免疫細胞は、操作された受容体をコードする本開示のベクターを形質導入されて操作された受容体を発現する。本開示の趣旨はまた、そのような細胞を腫瘍治療のために用いる方法を提供する。本開示の趣旨の操作された免疫細胞は、リンパ系系列又は骨髄系系列の細胞であり得る。リンパ系系列(B、T、及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む)は、抗体の生成、細胞性免疫系の調節、血中の外来性抗原の検出、宿主にとって外来性の細胞の検出などを提供する。リンパ系系列の免疫細胞の非限定的な例には、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、胚性幹細胞、及び多能性幹細胞(例えばリンパ系細胞を分化させ得る細胞)が含まれる。T細胞は、胸腺で成熟し主として細胞媒介免疫に应答できるリンパ球であり得る。T細胞は養子免疫系で必要とされる。本開示の趣旨のT細胞は任意のタイプのT細胞でよく、以下が含まれる(ただしそれらに限定されない): Tヘルパー細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞(中枢メモリーT細胞、幹細胞様メモリーT細胞(又は幹

40

50

様メモリーT細胞)、及びエフェクターメモリーT細胞の2つのタイプ(例えば $T_{EM}$ 細胞及びTEMRA細胞)を含む)、調節T細胞(サブレッサーT細胞としても知られている)、ナチュラルキラーT細胞、粘膜関連インヴァリアントT細胞、及びT細胞。細胞傷害性T細胞(CTL又はキラーT細胞)は、感染体細胞又は腫瘍細胞の死を誘発することができるTリンパ球のサブセットである。ある種の実施態様では、操作T細胞はFoxp3を発現して、T制御性表現型を達成及び維持する。

#### 【0089】

ナチュラルキラー(NK)細胞は、細胞媒介免疫の一部であり、自然免疫応答時に機能するリンパ球であり得る。NK細胞は、標的細胞に対してそれらの細胞傷害作用を果たすために事前の活性化を要しない。

本開示の趣旨の操作された免疫細胞は、癌の治療のために(例えば固形腫瘍の治療のために)、腫瘍抗原と特異的に結合する細胞外抗原結合ドメイン(例えばヒトscFv、場合によって架橋されるFab、又は $F(ab)_2$ )を発現することができる。そのような操作された免疫細胞は、その必要がある対象動物(例えばヒト対象動物)に、癌の治療のために投与され得る。いくつかの実施態様では、免疫細胞はリンパ球、例えばT細胞、B細胞又はナチュラルキラー(NK)細胞である。ある種の実施態様では、操作された免疫細胞はT細胞である。T細胞は $CD4^+$ T細胞又は $CD8^+$ T細胞である。ある種の実施態様では、T細胞は $CD4^+$ T細胞である。ある種の実施態様では、T細胞は $CD8^+$ T細胞である。

#### 【0090】

本開示の操作された免疫細胞はさらにまた、少なくとも1つの組換え又は外因性共同刺激リガンドを含むことができる。例えば、本開示の操作された免疫細胞はさらにまた、少なくとも1つの共同刺激リガンドを形質導入されて、腫瘍抗原を標的とする操作された受容体及び少なくとも1つの共同刺激リガンドを共同発現するか又は共同発現するように誘導され得る。腫瘍抗原標的の操作された受容体と少なくとも1つの共同刺激リガンドとの間の相互作用は、免疫細胞(例えばT細胞)の完全な活性化のため重要な抗原非特異性シグナルを提供する。共同刺激リガンドには、腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーのメンバー及び免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーリガンドが含まれるが、ただし前記に限定されない。TNFは全身性炎症に必要とされるサイトカインであり、急性期反応を刺激する。その主要な役割は免疫細胞の調節にある。TNFスーパーファミリーのメンバーは多くの共通の特徴を共有する。TNFスーパーファミリーメンバーの大半は、短い細胞質セグメント及び比較的長い細胞外領域を含むII型トランスメンブレンタンパク質(細胞外C-末端)として合成される。TNFスーパーファミリーメンバーには、神経成長因子(NGF)、 $CD40L(CD40L)/CD154$ 、 $CD137L/4-1BBL$ 、TNF-a、 $CD134L/OX40L/CD252$ 、 $CD27L/CD70$ 、Fasリガンド(FasL)、 $CD30L/CD153$ 、腫瘍壊死因子ベータ(TNFP)/リンホトキシン-アルファ(Lta)、リンホトキシン-ベータ(O-T)、 $CD257/B$ 細胞活性化因子(BAFF)/Bly s/THANK/Tail-1、グルココルチコイド誘発TNF受容体リガンド(GITRL)、及びTGF- $\beta$ -関連アポトーシス誘発リガンド(TRAIL)、LIGHT(TNFSF14)が含まれる(ただし前記に限定されない)。免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーは、細胞の認識、結合、又は接着プロセスに必要な細胞表面及び可溶性タンパク質の大きなグループである。前記タンパク質は免疫グロブリンと構造的な特徴を共有する(それらは免疫グロブリンドメイン(巽)を有する)。免疫グロブリンスーパーファミリーリガンドには、 $CD80$ 及び $CD86$ (ともに $CD28$ のリガンド)、 $PD-L1/(B7-H1)$ ( $PD-1$ のリガンド)が含まれるが、ただし前記に限定されない。ある種の実施態様では、少なくとも1つの共同刺激リガンドは、 $4-1BBL$ 、 $CD80$ 、 $CD86$ 、 $CD70$ 、 $OX40L$ 、 $CD48$ 、TNFRSF14、 $PD-L1$ 、及び前記の組合せから成る群から選択される。ある種の実施態様では、操作された免疫細胞は、1つの組換え共同刺激リガンドを含み、前記リガンドは $4-1BBL$ である。ある種の実施態様では、操作された免疫細胞は2つの組換え共同刺激リガンドを含み、前記リガンドは $4-1BBL$ 及び $CD80$ である。少なくとも1つの共同刺激リガンドを含む操作された受容体は米国特許8,389,282号に記載される(参照によってその全体が本明細書に含まれる)。

#### 【0091】

10

20

30

40

50

さらにまた、本開示の操作された免疫細胞は少なくとも1つの外因性サイトカインを含むことができる。例えば、本開示の操作された免疫細胞はさらにまた少なくとも1つのサイトカインを形質導入されて、少なくとも1つのサイトカインを分泌するとともに腫瘍抗原を標的とする操作された受容体を発現することができる。ある種の実施態様では、少なくとも1つのサイトカインは、IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17、及びIL-21から成る群から選択される。ある種の実施態様では、サイトカインはIL-2である。

操作された免疫細胞は末梢のドナーリンパ球、例えば以下の文献に開示されたものから作製することができる：Sadelain, M., et al., Nat Rev Cancer 3 :35-45, 2003 (CARを発現するように遺伝子工学的に改変された末梢ドナーリンパ球を開示する)；Morgan, R. A. et al. (2006) Science 314: 126-129 (完全長腫瘍抗原認識T細胞受容体複合体(及びヘテロダイマーを含む)を発現するように遺伝子工学的に改変された末梢ドナーリンパ球を開示する)；Panelli et al. (2000) J Immunol 164:495-504及びPanelli et al. (2000) J Immunol 164:4382-4392 (腫瘍生検標本中の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)に由来するリンパ球培養を開示する)；並びにDupont et al. (2005) Cancer Res 65:5417-5427及びPapanicolaou et al. (2003) Blood 102:2498-2505 (人工抗原提示細胞(AAPC)又はパルス処理樹状細胞を利用する選択的v/Yro-増殖末梢血白血球を開示する)。操作された免疫細胞(例えばT細胞)は自家性又は非自家性(例えばアロジェニック)でもよく、又は操作前駆細胞若しくは幹細胞から誘導してもよい。

#### 【0092】

ある種の実施態様では、本開示の操作された免疫細胞(例えばT細胞)は、細胞当たり、本開示の腫瘍抗原標的の操作された受容体の約1から約5ベクターコピー数、約1から約4、約2から約5、約2から約4、約3から約5、約3から約4、約4から約5、約1から約2、約2から約3、約3から約4、又は約4から約5ベクターコピー数を発現する。

例えば、操作された免疫細胞における操作された受容体発現レベルが高ければ高いほど、操作された免疫細胞はより強い細胞傷害性及びサイトカイン生成を示す。高い腫瘍抗原標的の操作された受容体発現レベルを有する操作された免疫細胞(例えばT細胞)は、抗原特異性サイトカイン生成又は分泌を誘発することができ、及び/又は腫瘍抗原標的の操作された受容体の低発現レベルを有する、例えば細胞当たり約200以下、約1000以下、約900以下、約800以下、約700以下、約600以下、約500以下、約400以下、約300以下、約200以下、約100以下の腫瘍抗原結合部位を有する組織又は細胞に対して細胞傷害性を示す。加えて或いはまた別に、本開示の操作された免疫細胞(例えばT細胞)の細胞傷害性及びサイトカイン生成は、標的組織又は標的細胞の腫瘍抗原の発現レベルと比例する。例えば、標的におけるヒト腫瘍抗原の発現レベルが高ければ高いほど、操作された免疫細胞はより強い細胞傷害性及びサイトカイン生成を示す。

本明細書に記載されるように、FoxP3標的因子の使用は、疾患のミクロ環境からFoxP3+免疫抑制細胞(例えばTreg及びTreg様細胞)を枯渇させることによって操作された免疫細胞の細胞傷害作用を増加させる。ある種の実施態様では、本開示の操作された免疫細胞は、FoxP3標的因子の非存在下での操作された免疫細胞の細胞傷害作用よりも、腫瘍抗原発現細胞に対して少なくとも約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、又は約100倍大きい細胞傷害作用を示す。

#### 【0093】

非精製免疫細胞源は当業界で公知の任意の供給源、例えば骨髄、胎児、新生児若しくは成人又は他の造血細胞源、例えば胎児肝臓、末梢血又は臍帯血であり得る。多様な技術を利用して細胞を分離することができる。例えば、負の選別方法では最初に非免疫細胞を除去することができる。モノクローナル抗体は、正及び負の両選別について個別の細胞系列及び/又は分化ステージに関連するマーカーを同定するために特に有用である。

最終分化細胞の大部分が比較的大雑把な分離によって最初に除去される。例えば、磁性ビーズ分離を用いて多数の無関係の細胞を最初に除去することができる。いくつかの実施

10

20

30

40

50



態様では、全造血細胞の少なくとも80%、通常は少なくとも70%が細胞単離前に除去されるであろう。

分離手順には、密度勾配遠心分離；細胞密度を改変する粒子との結合；抗体被覆磁性ビーズによる磁性分離；親和性クロマトグラフィー；mAbと結合させて又はmAbと併せて用いられる細胞傷害性因子（補体及び細胞毒素が含まれるが、ただし前記に限定されない）；固体マトリックス（例えばプレート、チップ）に結合させた抗体による選別；エルトリエーション又は任意の他の便利な技術が含まれるが、ただし前記に限定されない。

分離及び分析のための技術にはフローサイトメトリーが含まれるが、ただし前記に限定されない。フローサイトメトリーは様々な程度の精巧性、例えば複数のカラーチャンネル、低アングル及び鈍い光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルを有し得る。

死細胞と結合する色素（例えばヨウ化プロピジウム（PI））を利用することによって、死細胞から細胞を選別することができる。いくつかの実施態様では、細胞は、2%ウシ胎児血清（FCS）若しくは0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）を含む媒体又は任意の他の適切な好ましくは無菌的等張性媒体中に収集される。

#### 【0094】

また別に、或いは無関係の細胞の分離又は除去に加えて、FoxP3標的因子を操作された免疫細胞の作製に用いることができる。いくつかの実施態様では、操作された受容体をコードするベクターによる形質導入又はトランスフェクションの前に、FoxP3標的因子は細胞サンプルに投与される。他の実施態様では、操作された受容体をコードするベクターによる形質導入又はトランスフェクションの最中に、FoxP3標的因子は細胞サンプルに投与される。他の実施態様では、操作された受容体をコードするベクターによる形質導入又はトランスフェクションの後で、FoxP3標的因子は細胞サンプルに投与される。

操作された免疫細胞の作製時のFoxP3標的因子の使用は、FoxP3<sup>+</sup>免疫抑制細胞（例えばTreg及びTreg様細胞）を細胞サンプルから枯渇させることによって、エフェクター細胞である操作された免疫細胞の収量を増加させることができる。ある種の実施態様では、FoxP3標的因子の存在下で作製された操作された免疫細胞を含む組成物は、FoxP3標的因子の非存在下で作製されるエフェクター細胞の数よりも、少なくとも約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、又は約100倍多いエフェクター細胞を含む。

いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞は1つ以上の追加の改変を含む。例えば、いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞は、第二の抗原（腫瘍抗原とは異なる）と結合する抗原認識受容体を含みかつ発現する（発現させるために形質導入される）。本開示の操作された受容体に加えて抗原認識受容体を操作された免疫細胞に追加することによって、操作された受容体又はそれを含む操作された免疫細胞の標的細胞に対するアピディティを高めることができる。特に、当該操作された受容体は、個別の腫瘍抗原に対して低い結合親和性、例えば約 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 以上、約 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 以上、約 $8 \times 10^{-8} \text{M}$ 以上、約 $9 \times 10^{-8} \text{M}$ 以上、約 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 以上、約 $2 \times 10^{-7} \text{M}$ 以上、又は約 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 以上の $K_D$ を有するものである。

#### 【0095】

ある種の実施態様では、抗原認識受容体はキメラ共同刺激受容体（CCR）である。CCRは下記文献に記載される：Krause et al. (1998) J. Exp. Med. 188(4):619-626；及びUS20020018783（前記の内容は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。CCRは共同刺激シグナルを模倣するが、操作された受容体とは異なり、T細胞活性化シグナルを提供しない。例えば、CCRはCD3 ポリペプチドを欠く。CCRは、抗原提示細胞の天然の共同刺激リガンドの非存在下で、共同刺激、例えばCD28様シグナルを提供する。コンビナトリアル抗原認識、すなわち操作された受容体と組合わせたCCRの使用は、二重抗原発現細胞に対するT細胞反応性を増大させ、それによって選択的腫瘍標的照準を改善する。Klossらはつぎのような戦略を記載している：コンビナトリアル抗原認識、分割シグナリング及び特にT細胞活性化と共同刺激のバランスのとれた強さを統合して、組合せ抗原を発現する標的細胞を排除し、一方、各抗原を個々に発現する細胞を温存する（Kloss et al. (2013) Nature Biotechnology 31(1):71-75）。このアプローチでは、T細胞活性化は1つの抗原の操作

された受容体媒介認識を必要とし、一方、共同刺激は二番目の抗原に特異的なCCRによって別個に媒介される。腫瘍選択性を達成するために、コンビナトリアル抗原認識アプローチは、T細胞活性化の有効性を、第二の抗原のCCR同時認識によって提供されるレスキューがなければ無効であるレベルまで減少させる。ある種の実施態様では、CCRは、選択された腫瘍抗原とは異なる抗原と結合する細胞外抗原結合ドメイン、トランスメンブレンドメイン、及び少なくとも1つの共同刺激分子（CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、CTLA-4、LAG-3、2B4及びBTLAが含まれるが、ただしそれらに限定されない）を含む共同刺激シグナリング領域を含む。ある種の実施態様では、CCRの共同刺激シグナリング領域は1つの共同刺激シグナリング分子を含む。ある種の実施態様では、1つの共同刺激シグナリング分子はCD28である。ある種の実施態様では、1つの共同刺激シグナリング分子は4-1BBである。ある種の実施態様では、CCRの共同刺激シグナリング領域は、2つの共同刺激シグナリング分子を含む。ある種の実施態様では、2つの共同刺激シグナリング分子はCD28及び4-1BBである。第二の抗原は、選択腫瘍抗原及び第二の抗原の両方の発現が標的細胞（例えば癌性組織又は癌性細胞）に限定されるように選択される。操作された受容体と同様に、細胞外抗原結合ドメインは、scFv、Fab、F(ab)<sub>2</sub>であるか、又は細胞外抗原結合ドメインを形成するための異種配列との融合タンパク質であり得る。ある種の実施態様では、CCRは、CD138と結合するscFv、CD28ポリペプチドを含むトランスメンブレンドメイン、及び2つの共同刺激シグナリング分子（CD28及び4-1BB）を含む共同刺激シグナリング領域を含む。

10

#### 【0096】

ある種の実施態様では、抗原認識受容体は短縮型CARである。“短縮型CAR”は、細胞内シグナリングドメインを欠くことによってCARと相違する。例えば、短縮型CARは、細胞外抗原結合ドメイン及びトランスメンブレンドメインを含み、細胞内シグナリングドメインを欠く。本開示の趣旨にしたがえば、短縮型CARは、標的細胞（例えばミエローマ細胞）で発現される第二の抗原に対して高い結合親和性を有する。短縮型CARは、本開示の操作された受容体（特に腫瘍抗原に対して低い結合親和性を有するもの）のアビディティを増強する接着分子として機能し、それによって本開示の操作された受容体又は前記受容体を含む操作された免疫細胞（例えばT細胞）の有効性を改善する。ある種の実施態様では、短縮型CARは、CD138と結合する細胞外抗原結合ドメイン、CD8ポリペプチドを含むトランスメンブレンドメインを含む。本開示のT細胞は、腫瘍抗原を標的とする本開示の操作された受容体及びCD138を標的とする短縮型CARを含むか、又はそれらを発現するように形質導入される。ある種の実施態様では、標的細胞は固形腫瘍細胞である。

20

30

#### 【0097】

いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞はさらにまた、1つ以上の遺伝子の発現を抑制するように改変される。いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞はさらにまた、ゲノム編集を介して改変される。ゲノムDNAの標的照準開裂のための多様な方法及び組成物が記載されている。そのような標的照準開裂事象を利用して、例えば標的照準変異誘導、細胞DNA配列の標的照準欠失を誘発し、さらに予め決定した染色体遺伝子座における組換えを促進することができる。例えば、下記を参照されたい：米国特許7,888,121号、7,972,854号、7,914,796号、7,951,925号、8,110,379号、8,409,861号、8,586,526号、米国特許公開20030232410、20050208489、20050026157、20050064474、20060063231、201000218264、20120017290、20110265198、20130137104、20130122591、20130177983及び20130177960（前記の開示は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。これらの方法は、二本鎖亀裂（DSB）又は標的DNA配列のニック誘発のためにしばしば操作開裂系を必要とし、エラー媒介プロセス（例えば非相同末端結合（NHEJ）又は修復鋳型を用いる修復（相同性指向修復又はHDR））による亀裂の修復によって、遺伝子のノックアウト又は問題の配列の挿入（標的照準組込み）が生じ得る。開裂は、特異的なヌクレアーゼ（操作ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN））を使用するか、又はCRISPR/Cas系を特異的開裂誘導のために操作crRNA/tracrRNA（‘単一ガイドRNA’）とともに用いることによってもたらされ得る。いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞は、内因性T細胞受容体遺伝子の破壊又は発現低下のため

40

50

に改変される（例えばWO 2014153470（参照によってその全体が本明細書に含まれる）を参照されたい）。いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞は、PD1、PDL-1又はCTLA-4の破壊若しくは阻害（例えば米国特許公開20140120622を参照されたい）、又は当業界で公知の他の免疫抑制因子の破壊若しくは阻害（Wu et al. (2015) Oncoimmunology 4(7) : e1016700 ; 及びMahoney et al. (2015) Nature Reviews Drug Discovery 14, 561-584）を生じるように改変される。

#### 【0098】

##### FoxP3標的因子

いくつかの実施態様では、本明細書で提供されるものは、標的抗原（例えば腫瘍抗原又はウイルス抗原）と結合するT細胞受容体（TCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞の有効性の増強に使用されるFoxP3標的因子である。本明細書で提供されるものはまた、標的抗原（例えば腫瘍抗原又はウイルス抗原）と結合するT細胞受容体（TCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞の作製に使用されるFoxP3標的因子である。

10

いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は抗原結合因子であり、前記には抗体、キメラ抗原受容体（CAR）、キメラ抗体TCR（caTCR）、及び/又はFoxP3由来ペプチドフラグメントのFoxP3ポリペプチドに特異的な操作TCRが含まれる。いくつかの実施態様では、FoxP3ポリペプチドは配列番号:1に示されるアミノ酸配列を含む。

いくつかの実施態様では、FoxP3由来ペプチドフラグメントは8 - 12アミノ酸の長さを有する。いくつかの実施態様では、FoxP3由来ペプチドフラグメントは、配列番号:2に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-1又はその部分、配列番号:3に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-2又はその部分、配列番号:4に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-3又はその部分、配列番号:5に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-4又はその部分、配列番号:6に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-5又はその部分、配列番号:7に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-6又はその部分、及び配列番号:8に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-7又はその部分から選択される。いくつかの実施態様では、FoxP3由来ペプチドフラグメントは、配列番号:8に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-7又はその部分である。

20

いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、MHC分子との関係で提示されるFoxP3（例えばFoxP3/MHC複合体）と結合する。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、HLA-A分子との関係で提示されるFoxP3（例えばFoxP3/HLA-A複合体）と結合する。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、HLA-A2分子との関係で提示されるFoxP3（例えばFoxP3/HLA-A2複合体）と結合する。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、HLA-A\*02:01分子との関係で提示されるFoxP3（例えばFoxP3/HLA-A\*02:01複合体）と結合する。

30

#### 【0099】

例示的实施態様では、本明細書で提供されるFoxP3標的因子は二重特異性抗体である。いくつかの実施態様では、二重特異性抗体は、FoxP3ポリペプチド又はそのフラグメント及び細胞表面タンパク質と結合する。いくつかの実施態様では、細胞表面タンパク質はCD3又はCD16である。

例示的实施態様では、FoxP3標的因子は、FoxP3と結合する操作された受容体（例えばCAR、caTCR、又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞である。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、MHC分子との関係で提示されるFoxP3と結合する操作された受容体（例えばCAR、caTCR、又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞である。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子は、HLA-A2分子との関係で提示されるFoxP3と結合する操作された受容体（例えばCAR、caTCR、又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞である。いくつかの実施態様では、FoxP3と結合するTCR又は他の細胞表面リガンドは、上記に記載する、操作された受容体のトランスメンブレンドメイン、操作された受容体の細胞内ドメイン、及び/又は操作された受容体のリンカーを含む。いくつかの実施態様では、FoxP3と結合するTCR（すなわち操作された受容体）又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞は、上記に記載の免疫細胞である。いくつかの実施態様では、FoxP3と結合するTCR又は他の細

40

50

胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞は、上記に記載の抗原標的と結合するTCR又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞の1つ以上の特徴を含む。

例示的实施態様では、操作された免疫細胞は、MHC分子との関係で提示されるFoxP3と結合する単一タイプの操作された受容体又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞は、MHC分子との関係で提示されるFoxP3と結合する2つ以上の操作された受容体（例えばCAR、caTCR、又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する。いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞は、MHC分子との関係で提示されるFoxP3と結合する1つ以上の操作された受容体（例えばCAR、caTCR、又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現し、さらにまた異なる細胞表面受容体（例えばCD19）と結合する1つ以上の追加の操作された受容体（例えばCAR、caTCR、又はeTCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する。

【0100】

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:16に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:17に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:18に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:19に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:21に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:22に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:23に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:24に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:26に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:27に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:28に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:29に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:30に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:31に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:32に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:33に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:34に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:36に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:38に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:39に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:40に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:41に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:42に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:43に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:44に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:45に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:46に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:47に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:48に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:49に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:50に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:51に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:52に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:53に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:54に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:55に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:56に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:57に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:58に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列

10

20

30

40

50

番号:59に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:60に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:61に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:62に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:63に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0101】

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:64 - 77の配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメイン（例えばヒトscFv）は、配列番号:78 - 91の配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を含む。いくつかの実施態様では、細胞外抗原結合ドメインはヒトscFvであり、配列番号:64 - 77の配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種、及び配列番号:78 - 91に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域又はその機能的フラグメント若しくは変種を、場合によって当該重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間の（iii）リンカー配列（例えばリンカーペプチド）とともに含む。ある種の実施態様では、リンカーは、配列番号:118（SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA）に示される配列を有するアミノ酸を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、ヒトscFv-Fc融合タンパク質又はV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を有する完全長ヒトIgGである。

10

【0102】

ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:64 - 77と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>を含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:64 - 77と約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:64 - 77に示される配列を有するアミノ酸を含むV<sub>H</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:78 - 91と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>を含む。例えば、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:78 - 91と約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一であるアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>を含む。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:78 - 91に示される配列を有するアミノ酸を含むV<sub>L</sub>を含む。

20

30

いくつかの実施態様では、特定の配列（例えば配列番号:64 - 91）に対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%（例えば、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%）相同性を有するV<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>アミノ酸配列は、当該特定の配列と対比して置換（例えば保存的置換）、挿入又は欠失を含むが、それぞれの標的抗原と結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、合計1から10アミノ酸が、配列番号:64 - 91で置換され、挿入され及び/又は欠失される。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、細胞外抗原結合ドメインのCDRの外側領域で（例えばフレームワーク領域（FR）で）生じる。ある種の実施態様では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号:64 - 91から成る群から選択されるV<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>配列（当該配列の翻訳後修飾を含む）を含む。

40

【0103】

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、配列番号:69に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号:83に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、WO2017/124001に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、WO2017/124001に示

50

されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域CDR1を含む（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、WO2017/124001に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域CDR2を含む（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、WO2017/124001に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域CDR3を含む（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

#### 【0104】

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、WO2017/124001に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域CDR1を含む（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、WO2017/124001に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域CDR2を含む（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、WO2017/124001に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域CDR3を含む（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、WO2017/124001に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

いくつかの実施態様では、FoxP3に特異的な抗原結合タンパク質は、WO2017/124001に示されるアミノ酸配列を有するscFvを含む（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

WO2017/124001に記載される全てのFoxP3 scFv、抗体、及びCARは、参照によってその全体（WO2017/124001で提供されるアミノ酸及びヌクレオチド配列を含む）が本明細書に含まれる。これらの配列には、WO2017/124001の表1、2、及び3、並びに付録A、B、C、D、E、F、及びGのアミノ酸及びヌクレオチド配列が含まれるが、ただし前記に限定されない。前記アミノ酸及びヌクレオチド配列は、選択されたFoxP3抗体scFv、軽鎖、重鎖、及びCDR配列のアミノ酸及びヌクレオチド配列を含む。上記配列のいずれも、本明細書に記載するFoxP3標的因子の部分として取り込むことができる。

#### 【0105】

##### ベクター

多くの発現ベクターが入手可能で当業者に公知であり、本明細書で提供されるポリペプチドの発現のために用いることができる。発現ベクターの選択は宿主発現系の選択によって影響を受けるであろう。そのような選択は十分に当業者の技量レベル内である。一般的には、発現ベクターは、転写プロモーター及び場合によってエンハンサー、翻訳シグナル、並びに転写及び翻訳終了シグナルを含むことができる。安定な形質転換に用いられる発現ベクターは典型的には選別可能マーカーを含み、形質転換細胞の選別及び維持を可能にする。いくつかの事例では、複製起点を用いて細胞内のベクターのコピー数を増幅させることができる。

ベクターはまた、繋がれた核酸分子に作動できるように連結される追加のヌクレオチド配列、例えばエピトプタグ（例えば位置決定用タグ、例えば6Hisタグ又はmycタグ）、ヘマグルチニンタグ、又は精製用タグ、例えばGST融合、並びにタンパク質の分泌及び/又は膜結合を指令するための配列を含むことができる。

#### 【0106】

抗体又はその抗原結合フラグメントの発現は、当業界で公知の任意のプロモーター/エンハンサーによって制御することができる。適切な細菌性プロモーターは当業界で周知であり、下記に記載される。哺乳動物細胞、酵母細胞及び昆虫細胞のための適切な他のプロモーターも当業界で周知でありいくつかは下記で具体化される。異種核酸の発現を指令す

るために用いられるプロモーターの選択は個別の用途に左右され、当業者の技量レベル内である。使用可能なプロモーターには以下が含まれるがただしそれらに限定されない：真核細胞発現ベクターに含まれるSV40初期プロモーター (Bernoist and Chambon, *Nature* 290:304-310, 1981)、ラウス肉腫ウイルスの3'ロングターミナルリピートに含まれるプロモーター (Yamamoto et al. (1980) *Cell* 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster et al. (1982) *Nature* 296:39-42)；原核細胞発現ベクター、例えば -ラクタマーゼプロモーター (Jay et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5543) 又はtacプロモーター (DeBoer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50:21-25) (以下もまた参照されたい：“Useful Proteins from Recombinant Bacteria” (1980) in *Scientific American* 242:79-94)；宿物発現ベクターに含まれるノパリンシターゼプロモーター (Herrera- Estrella et al. (1984) *Nature* 505:209-213) 又はカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター (Gardner et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9:2871)、及び光合成酵素リブ्रोースビスホスフェートカルボキシラーゼ (Herrera-Estrella et al. (1984) *Nature* 510: 115-120)；酵母及び他の真菌由来プロモーターエレメント、例えばGal4プロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター；及び以下の動物転写制御領域 (組織特異性を示しトランスジェニック動物で用いられている)、エラストーゼI遺伝子制御領域 (膵腺房細胞で活性を有する) (Swift et al. (1984) *Cell* 55:639-646; Ornitz et al. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald (1987) *Hepatology* 7:425-515)、インスリン遺伝子制御領域 (膵β細胞で活性を有する) (Hanahan et al. (1985) *Nature* 515: 115-122)、免疫グロブリン遺伝子制御領域 (リンパ系細胞で活性を有する) (Grosschedl et al. (1984) *Cell* 55:647-658; Adams et al. (1985) *Nature* 515:533-538; Alexander et al. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7: 1436-1444)、マウス乳房腫瘍ウイルス制御領域 (精巣、乳房、リンパ系及び肥満細胞で活性を有する) (Leder et al. (1986) *Cell* 15:485-495)、アルブミン遺伝子制御領域 (肝臓で活性を有する) (Pinckert et al. (1987) *Genes and Devel.* 1:268-276)、アルファフェトプロテイン遺伝子制御領域 (肝臓で活性を有する) (Krumlauf et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-403; Hammer et al. (1987) *Science* 255:53-58)、アルファ-1アンチトリプシン遺伝子制御領域 (肝臓で活性を有する) (Kelsey et al. (1987) *Genes and Devel.* 7:161-171)、ベータグロビン遺伝子制御領域 (骨髄系細胞で活性を有する) (Magram et al. (1985) *Nature* 515:338-340; Kollias et al. (1986) *Cell* 5:89-94)、ミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (脳の希突起樹状細胞で活性を有する) (Readhead et al. (1987) *Cell* 15:703-712)、ミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (骨格筋で活性を有する) (Shani (1985) *Nature* 514:283-286)、及び性腺刺激放出性ホルモン遺伝子制御領域 (視床下部の性腺刺激細胞で活性を有する) (Mason et al. (1986) *Science* 254: 1372- 1378)。

#### 【0107】

プロモーターに加えて、発現ベクターは典型的には転写ユニット又は発現カセットを含み、抗体又はその部分の発現に宿主細胞で要求される全ての追加エレメントを収納する。典型的な発現カセットは、抗体鎖をコードする核酸配列に作動できるように連結されるプロモーター並びに転写物の効率的ポリアデニル化、リボソーム結合部位、及び翻訳終了に必要なシグナルを含む。カセットの追加エレメントはエンハンサーを含むことができる。加えて、カセットは典型的には、構造遺伝子の下流に転写終了領域を含み、効率的な終了を提供する。終了領域はプロモーター配列と同じ遺伝子から入手でき、異なる遺伝子から入手してもよい。

いくつかの発現系は、遺伝子増幅を提供するマーカー (例えばチミジンキナーゼ及びジヒドロホレートラクターゼ) を有する。また別には、遺伝子増幅を必要としない高収量発現系もまた適切であり、例えばポリヘドロンプロモーター又は他の強力なバキュロウイルスプロモーターの指令下で生殖細胞系列の抗体鎖をコードする核酸配列を有するバキュ

10

20

30

40

50

ロウイルスベクターを昆虫細胞で用いる。

DNAフラグメントのベクターへの挿入のために当業者に公知の任意の方法を用いて、本明細書で提供されるポリペプチドのいずれかをコードする核酸を含む発現ベクターを構築できる。これらの方法には、*in vitro*組換えDNA及び合成技術並びに*in vivo*組換え（遺伝子組み換え）が含まれる。クローニングベクターへの挿入は、例えばDNAフラグメントをクローニングベクター（相補性付着端を有する）に結合させることによって達成できる。DNAのフラグメント化に用いられる相補性制限部位がクローニングベクターに存在しない場合、DNA分子の末端を酵素により改変することができる。また別に、ヌクレオチド配列（リンカー）をDNA末端に結合させることによって所望される部位を作製することができる。これらの結合リンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする、化学的に合成された特異的な核酸を含むことができる。

10

#### 【0108】

本明細書で提供されるポリペプチドを作製するために有用な例示的プラスミドは、強力なプロモーター（例えばHCMV最初期エンハンサー/プロモーター又はMHCクラスIプロモーター）、転写物のプロセッシングを増強するイントロン（例えばHCMV最初期遺伝子イントロンA）、及びポリアデニル化（ポリA）シグナル（例えば後期SV40ポリAシグナル）を含む。

操作された免疫細胞（例えばT細胞、NK細胞）の遺伝子改変は、組換えDNA又はRNA構築物を用いて実質的に均質な細胞組成物を形質導入することによって達成できる。ベクターはレトロウイルスベクター（例えばガンマレトロウイルスベクター）であり得る。レトロウイルスベクターは、DNA又はRNA構築物を宿主細胞ゲノムに導入するために利用される。例えば、腫瘍抗原標的的操作された受容体及びFoxP3標的因子をコードするポリヌクレオチドをレトロウイルスベクターでクローニングし、その内因性プロモーターで、レトロウイルスロングターミナルリピートで、或いはまた別の内部プロモーターで発現を駆動することができる。

20

非ウイルスベクター又はRNAも同様に用いることができる。染色体へのランダム組込み、又は標的照準組込みを用いることができる。標的照準組込みには例えば以下が用いられる：ヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、及び/又はクラスター化し規則的に配置される短いパンドロームリピート（CRISPR）、又はトランスジーン発現（例えば天然の又は化学的に改変されたRNAを用いる）。

30

#### 【0109】

腫瘍抗原標的的操作受容体及び/又はFoxP3標的因子を発現する細胞を提供するか、又はFoxP3標的因子を作製するための細胞の初期遺伝子改変のため、レトロウイルスベクターを形質導入に利用することができる。しかしながら、細胞の遺伝子改変には、他の任意の適切なウイルスベクター又は非ウイルスデリバリー系を用いてもよい。細胞を続いて遺伝子改変して、少なくとも2つの共同刺激リガンドを含む抗原提示複合体を含む細胞を提供するために、レトロウイルス遺伝子移入（形質導入）は同様に有効であることが判明している。レトロウイルスベクター及び適切なパッケージング株の組合せもまた適切であり、この場合、キャプシドタンパク質はヒト細胞の感染のために機能するであろう。多様な両種指向性ウイルス生成細胞株が公知であり、PA12 (Miller et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437) ; PA317 (Miller et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902) ; 及びCRIP (Danos et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464) が含まれるが、ただし前記に限定されない。非両種指向性粒子もまた適切であり、例えば、VSVG、RD114又はGALVエンベロープを有する偽型粒子及び当業界で公知の任意の他の粒子である。

40

形質導入の可能な方法にはまた、生産細胞との細胞の直接共培養（例えば下記文献記載の方法 (Bregni et al. (1992) Blood 80: 1418-1422) ) 又はウイルス上清単独若しくは濃縮ベクターストックとの適切な増殖因子及びポリカチオン存在下若しくは非存在下での培養（例えば下記文献記載の方法 (Xu et al. (1994) Exp. Hemat. 22:223-230 ; 及びHughes et al. (1992) J. Clin. Invest. 89: 1817) ) が含まれる。

50



## 【 0 1 1 0 】

操作された免疫細胞で共同刺激リガンドを発現させ、及び/又はサイトカイン（例えば4-1BBL及び/又はIL-12）を分泌させるためにウイルスベクター形質導入を用いることができる。いくつかの実施態様では、選択されたベクターは高い感染効率並びに安定な組み込み及び発現を示す（例えば以下を参照されたい：Cayouette et al. (1997) *Human Gene Therapy* 8:423-430；Kido et al. (1996) *Current Eye Research* 15:833-844；Bloomer et al. (1997) *Journal of Virology* 71 :6641-6649；Naldini et al. (1996) *Science* 272:263-267；及びMiyoshi et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 10319）。用いることができる他のウイルスベクターには、例えばアデノウイルス、レンチウイルス、及びアデノ関連ウイルスベクター、ワクシニアウイルス、ウシバピローマウイルス、又はヘルペスウイルス（例えばエプスタイン-バーウイルス）が含まれる（例えば以下のベクターもまた参照されたい：Miller (1990) *Human Gene Therapy* 15-14；Friedman (1989) *Science* 244: 1275-1281；Eglitis et al. (1988) *BioTechniques* 6:608-614；Tolstoshev et al. (1990) *Current Opinion in Biotechnology* 1:55-61；Sharp (1991) *The Lancet* 337: 1277-1278；Cornetta et al. (1987) *Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311-322；Anderson (1984) *Science* 226:401-409；Moen (1991) *Blood Cells* 17:407-416；Miller et al. (1989) *Biotechnology* 7:980-990；Le Gal La Salle et al. (1993) *Science* 259:988-990；及びJohnson (1995) *Chest* 107:77S-83S）。レトロウイルスベクターは特に良く開発され、臨床環境で用いられている（Rosenberg et al. (1990) *N. Engl. J. Med* 323:370；Anderson et al., U.S. Pat. No. 5,399,346）。

10

20

## 【 0 1 1 1 】

ある種の非限定的な実施態様では、本開示の腫瘍抗原標的的操作受容体を発現するベクターは、レトロウイルスベクター（例えばオンコレトロウイルスベクター）である。いくつかの事例では、レトロウイルスベクターはSFGレトロウイルスベクター又はネズミ幹細胞ウイルス（MSCV）レトロウイルスベクターである。ある種の非限定的な実施態様では、本開示の腫瘍抗原標的的操作受容体を発現するベクターはレンチウイルスベクターである。ある種の非限定的な実施態様では、本開示の腫瘍抗原標的的操作受容体を発現するベクターはトランスポゾンベクターである。

非ウイルスアプローチもまた細胞でのタンパク質発現に利用することができる。例えば、リポフェクションの存在下で（Feigner et al. (1987) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413；Ono et al. (1990) *Neuroscience Letters* 17:259；Brigham et al. (1989) *Am. J. Med. Sci.* 298:278；Staubinger et al. (1983) *Methods in Enzymology* 101:512）、アジアロオロソムコイド-ポリリジン複合化によって（Wu et al. (1988) *Journal of Biological Chemistry* 263: 14621；Wu et al. (1989) *Journal of Biological Chemistry* 264: 16985）、又は外科的条件下のマイクロインジェクションによって（Wolff et al. (1990) *Science* 247: 1465）核酸分子を細胞に導入することができる。遺伝子移入のための他の非ウイルス手段には、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、及びプロトプラスト融合を用いるin vitroトランスフェクションが含まれる。リポソームもまたDNAを細胞にデリバリーするために潜在的に有益であり得る。対象動物の影響を与えたい組織への正常な遺伝子の移植もまた、正常な核酸を培養可能な細胞タイプ（例えば自己又は異種初代細胞又はその子孫細胞）にex vivoで移入し、その後で当該細胞（又はその子孫）を標的組織に又は全身的注射することによって達成することができる。組換え受容体もまた、トランスポザーゼ又は標的照準ヌクレアーゼ（例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ又はTALENヌクレアーゼ）を用いて誘導又は入手することができる。一過性発現はRNAエレクトロポレーションによって達成できる。

30

40

## 【 0 1 1 2 】

ポリヌクレオチド療法で使用されるcDNA発現は、任意の適切なプロモーター（例えばヒトサイトメガロウイルス（CMV）、サルウイルス40（SV40）、又はメタロチオネインプロモーター）から誘導され、任意の適切な哺乳動物調節エレメント又はイントロン（例えば伸長因子Iaエンハンサー/プロモーター/イントロン構造）によって調節され得る。例えば

50

、所望の場合には、もっぱら特異的な細胞タイプで遺伝子発現を誘導することが知られているエンハンサーを用いて、核酸発現を誘導することができる。用いられるエンハンサーには、組織又は細胞特異的エンハンサーと特徴付けられるものが含まれるが、ただし前記に限定されない。また別には、ゲノムクローンが治療用構築物として用いられる場合は、調節は、同族の調節配列によって、又は所望の場合は異種供給源に由来する調節配列（上記に記載のプロモーター又は調節エレメントのいずれかが含まれる）によって媒介される。

得られた細胞を非改変細胞のための条件と同様な条件下で増殖させ、それによって改変細胞を増殖させ、多様な目的のために用いることができる。VI. ポリペプチド及びアナログ及びポリヌクレオチド。

#### 【0113】

本開示の趣旨に含まれるものはまた、腫瘍抗原（例えばヒト腫瘍抗原）、CD3、CD8、CD28などポリペプチド及びそのフラグメントと特異的に結合する細胞外抗原結合ドメイン（例えばscFv（例えばヒトscFv）、Fab、又は(Fab)<sub>2</sub>）、並びに前記をコードするポリヌクレオチドであり、それらは、操作された免疫細胞で発現されるとき、それらの抗腫瘍活性を増強する態様で改変される。本開示の趣旨は、アミノ酸配列又は核酸配列を当該配列に変化を生み出すことによって最適化する方法を提供する。そのような変化は、一定の変異、欠失、挿入、又は翻訳後改変を含むことができる。本開示の趣旨はさらにまた、本開示の趣旨の天然に存在するポリペプチドのいずれかのアナログを含む。アナログは、本開示の趣旨の天然に存在するポリペプチドとはアミノ酸配列の相違によって、翻訳後改変によって、又はその両方によって相違し得る。本開示の趣旨のアナログは、一般的には、本開示の趣旨の天然に存在するアミノ酸配列の全部又は部分に関して少なくとも約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%若しくは前記を超える同一性又は相同性を示すことができる。配列比較の長さは、少なくとも約5、約10、約15、約20、約25、約50、約75、約100又はこれを超えるアミノ酸残基である。繰り返せば、同一性の程度を決定する例示的アプローチでは、BLASTプログラムを近縁配列を示す $e^{-3}$ から $e^{-100}$ の間の確率スコアとともに用いることができる。改変は、ポリペプチドのin vivo及びin vitroの化学的誘導、例えばアセチル化、カルボキシル化、リン酸化、又はグリコシル化を含み、そのような改変は、ポリペプチド合成時に、又は単離された改変酵素によるプロセッシング若しくはその後の処理の間に発生し得る。アナログはまた、本開示の趣旨の天然に存在するポリペプチドとは一次配列の変化によって相違し得る。前記には遺伝的変種（天然及び誘導変種の両方）が含まれる。誘導変種は、例えば照射若しくは硫酸エタンメチルへの暴露によるランダム変異誘導、又は文献に記載の位置特異的変異誘導によって生じる（Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), CSH Press, 1989; 又はAusubel et al. (上掲書)）。環状化ペプチド、分子及び、L-アミノ酸以外の残基、例えばD-アミノ酸又は天然に存在しない若しくは合成アミノ酸（例えばベータ( )又はガンマ( )アミノ酸）を含むアナログも含まれる。

#### 【0114】

完全長ポリペプチドに加えて、本開示の趣旨はまた、それらのポリペプチド又はペプチドドメインのいずれか1つのフラグメントを提供する。フラグメントは少なくとも約5、約10、約13、又は約15アミノ酸であり得る。いくつかの実施態様では、フラグメントは、連続する少なくとも約20アミノ酸、連続する少なくとも約30アミノ酸、又は連続する少なくとも約50アミノ酸である。いくつかの実施態様では、フラグメントは、少なくとも約60から約80、約100、約200、約300又は前記より大きい連続するアミノ酸である。本開示の趣旨のフラグメントは、当業者に公知の方法によって生成されるか、又は通常タンパク質プロセッシング（例えば新生ポリペプチドから生物学的活性に要求されないアミノ酸の除去、或いはまた選択的mRNAスプライシング若しくはまた代替タンパク質プロセッシング事象によるアミノ酸の除去）からもたらされ得る。

非タンパク質アナログは、本発明のタンパク質の機能的活性を模倣するために設計さ

10

20

30

40

50

れた化学構造を有する。そのようなアナログは、本開示の趣旨の方法にしたがって投与される。そのようなアナログは、本来のポリペプチドの生理学的活性を超えることができる。アナログ設計の方法は当業界で周知であり、アナログの合成は、そのような方法にしたがって化学構造を改変することによって実施でき、得られたアナログは、操作された免疫細胞で発現されるとき本来のポリペプチドの抗腫瘍活性を増強する。これらの化学的改変には、代替R基による置換及び指示ポリペプチドの特定の炭素原子の飽和度の変更が含まれるが、ただし前記に限定されない。タンパク質アナログはin vivo分解に対して比較的耐性であり、投与に際してより長期の治療効果をもたらすことができる。機能的活性の測定のためのアッセイには下記の実施例に記載するものが含まれるが、ただしそれらに限定されない。

10

本開示の趣旨にしたがえば、腫瘍抗原（例えばヒト腫瘍抗原）、CD3、CD8、CD28と特異的に結合する細胞外抗原結合ドメイン（例えばscFv（例えばヒトscFv）、Fab、又は(Fab)<sub>2</sub>）をコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化によって改変することができる。コドン最適化は、天然に存在する遺伝子配列及び組換え遺伝子配列の両方を変化させて、任意の与えられた発現系で可能な最高の生産性レベルを達成することができる。タンパク質発現の種々の局面で必要とされる因子には、コドン適応性、mRNA構造、並びに転写及び翻訳における多様なcis-エレメントが含まれる。任意の適切なコドン最適化方法又は当業者に公知の技術を用いて、本開示の趣旨のポリヌクレオチドを改変することができる。前記技術には、OptimumGene<sup>TM</sup>、Encor最適化、及びBlue Heronが含まれるが、ただしそれらに限定されない。

20

#### 【0115】

##### 投与

本開示の趣旨の腫瘍抗原標的的操作受容体を発現する操作された免疫細胞及びFoxP3標的因子は、疾患（例えば新形成又はウイルス感染）の治療及び予防のために、対象動物に全身的に又は直接的に提供できる。ある種の実施態様では、操作された免疫細胞及び/又はFoxP3標的因子は問題の器官（例えば新形成に冒されている器官）に直接注射される。また別に或いは付け加えて、操作された免疫細胞及び/又はFoxP3標的因子は、問題の器官に間接的に、例えば循環系（例えば腫瘍血管構造）に投与することによって提供される。増殖及び分化因子は、操作された免疫細胞及び/又はFoxP3標的因子の投与前、投与中、又は投与後に提供できる。

30

本開示の趣旨の腫瘍抗原標的的操作受容体を発現する操作された免疫細胞及びFoxP3標的因子は、任意の生理学的に許容できるビヒクル中で、全身的に又は局部的に、通常は血管内に、腹腔内に、髄腔内に、又は胸腔内に投与することができるが、ただしそれらは骨又は他の便利な部位に導入され、当該部位で細胞は再生及び分化のための適切な部位を発現することができる（例えば胸腺）。ある種の実施態様では、少なくとも $1 \times 10^5$ 細胞が投与され、最終的には $1 \times 10^{10}$ 以上に達し得る。ある種の実施態様では、少なくとも $1 \times 10^6$ 細胞を投与することができる。操作された免疫細胞を含む細胞集団は精製細胞集団を含むことができる。当業者は、多様な周知の方法（例えば蛍光活性化細胞仕分け（FACS））を用いて、細胞集団中の操作された免疫細胞のパーセンテージを容易に決定することができる。操作された免疫細胞を含む細胞集団の純度の範囲は、約50%から約55%、約55%から約60%、約65%から約70%、約70%から約75%、約75%から約80%、約80%から約85%、約85%から約90%、約90%から約95%、又は約95%から約100%であり得る。当業者は投与量を容易に調整することができる（例えば純度の低下は投与量の増加を要求し得る）。操作された免疫細胞及び/又はFoxP3標的因子は注射、カテーテルなどによって導入できる。所望の場合は、複数の因子を加えることができる。当該因子には、インターロイキン、例えばIL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21とともに他のインターロイキン、コロニー刺激因子、例えばG-、M-及びGM-CSF、インターフェロン、例えば -インターフェロンが含まれるが、ただしそれらに限定されない。

40

#### 【0116】

ある種の実施態様では、本開示の趣旨の組成物は医薬組成物を含み、前記組成物は、腫

50

瘍抗原標的操作受容体を発現する操作された免疫細胞及びFoxP3標的因子を医薬的に許容で来る担体とともに含む。投与は自家的又は非自家的であり得る。例えば、腫瘍抗原標的操作受容体を発現する操作された免疫細胞及びFoxP3標的因子及びこれらを含む組成物は、1人の対象動物から入手でき、同じ対象動物に投与、又は別の適合し得る対象動物に投与できる。本開示の趣旨の末梢血由来T細胞又はその子孫（例えばin vivo又はex vivo由来）は、局所注射（カテーテル投与を含む）、全身注射、局所注射、静脈内注射、又は非経口投与を介して投与できる。本開示の趣旨の医薬組成物（例えば腫瘍抗原標的操作受容体を発現する操作された免疫細胞及びFoxP3標的因子を含む医薬組成物）を投与するとき、ユニット投薬量の注射可能な形態（溶液、懸濁液、エマルジョン）で処方され得る。

【0117】

#### 処方物

腫瘍抗原標的操作受容体を発現する操作された免疫細胞及びFoxP3標的因子並びに前記を含む組成物は、便利には無菌的液体調製物、例えば等張水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液又は粘稠組成物として提供でき、前記調製物は選択pHに緩衝化できる。液体調製物は、通常はゲル、他の粘稠組成物及び固形組成物よりも容易に調製される。加えて、液体組成物は投与（特に注射による投与）にはいくらか都合がよい。他方で、粘稠組成物は適切な粘性範囲内で処方して、特異的組織とのより長い接触期間を提供することができる。液体又は粘稠組成物は担体を含むことができ、例えば水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、流動ポリエチレングリコールなど）、及び適切な前記の混合物を含む溶媒又は分散媒体であり得る。

無菌的な注射可能溶液は、本開示趣旨の組成物（例えば操作された免疫細胞を含む組成物）を多様な量の所望される他の成分とともに必要な量の適切な溶媒に取り込むことによって調製できる。そのような組成物は、適切な担体、希釈剤、又は賦形剤（例えば無菌的な水、生理学的食塩水、グリコール、デキストロースなど）との混合物であり得る。組成物はまた凍結乾燥させることができる。組成物は、補助物質、例えば湿潤剤、分散剤、又は乳化剤（例えばメチルセルロース）、pH緩衝剤、ゲル化又は粘性増強添加物、保存料、香料、着色剤などを、所望される投与ルート及び調製物に応じて含むことができる。標準的なテキスト（例えば、“REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE”，17th edition, 1985（参照によってその全体が本明細書に含まれる））を参考にして、煩雑な実験を行うことなく適切な調製物を作製することができる。

【0118】

組成物の安定性及び無菌性を増強する多様な添加物（抗微生物性保存料、抗酸化剤、キレート剤、及び緩衝剤を含む）を添加することができる。微生物作用の予防は、多様な抗菌及び抗真菌剤（例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸など）によって担保することができる。注射可能な長期吸収製薬形は、吸収を遅らせる因子（例えば一ステアリン酸アルミニウム及びゼラチン）の使用によってもたらされ得る。しかしながら本開示の趣旨にしたがえば、いずれのビヒクル、希釈剤又は添加物も本開示趣旨の操作された免疫細胞及びFoxP3標的因子と適合性でなければならない。

本組成物は等張性であってよく、すなわち、本組成物は血液及び体液と同じ浸透圧を有し得る。本開示趣旨の組成物の所望される等張性は、塩化ナトリウム、又は他の医薬的に許容できる因子（例えばデキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコール、又は他の無機若しくは有機溶質）を用いて達成できる。塩化ナトリウムが、いくつかの実施態様では、特にナトリウムイオンを含む緩衝剤のために好ましい。

所望の場合は、組成物の粘性は、医薬的に許容できる増粘剤を用いて選択されるレベルに維持できる。メチルセルロースは入手が容易で経済的であり、かつ作業が容易であるので用いることができる。他の適切な増粘剤には、例えばキサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどが含まれる。増粘剤の濃度は選択される因子に左右され得る。重要な点は選択される粘性を達成する量を用いることである。明らかに、適切な担体及び他の添加物の選択は、厳密な投与ルート及び個別の剤型（例えば液体剤形）の性質（例えば組成物が溶液、懸濁液、ゲル又は別の液体形（例えば経時的放

10

20

30

40

50

出形又は液体充填形)に処方されるか否か)に左右されるであろう。

【0119】

組成物の成分は化学的に不活性であるように、さらに、本開示の趣旨に記載の操作された免疫細胞の生命活性又は有効性に影響を与えないように選択されるべきであることは当業者には認識されるであろう。このことは当業者に化学的及び医薬的原理における問題を全く提示せず、或いは、標準的なテキストを参考することによって若しくは本開示及び本明細書に引用される資料に基づいて単純な実験(煩雑な実験を必要とせずに)によって問題は容易に回避され得る。

本開示の趣旨の操作された免疫細胞(いくつかの事例では操作された免疫細胞であるFoxP3標的因子を含む)の治療的使用に関する1つの懸念は、最適な効果を達成するために必要な細胞の量である。投与されるべき細胞の量は、治療される対象物について変動するであろう。ある種の実施態様では、約 $10^2$ から約 $10^{12}$ 、約 $10^3$ から約 $10^{11}$ 、約 $10^4$ から約 $10^{10}$ 、約 $10^5$ から約 $10^9$ 、又は約 $10^6$ から約 $10^8$ の本開示の趣旨の操作された免疫細胞が対象動物に投与される。より有効な細胞はより少数で投与できる。いくつかの実施態様では、少なくとも約 $1 \times 10^8$ 、約 $2 \times 10^8$ 、約 $3 \times 10^8$ 、約 $4 \times 10^8$ 、約 $5 \times 10^8$ 、約 $1 \times 10^9$ 、約 $5 \times 10^9$ 、約 $1 \times 10^{10}$ 、約 $5 \times 10^{10}$ 、約 $1 \times 10^{11}$ 、約 $5 \times 10^{11}$ 、約 $1 \times 10^{12}$ 又はそれより多い本開示の趣旨の操作された免疫細胞がヒト対象動物に投与される。何が有効な用量と考えられるかの正確な決定は、各対象動物の個々の要件を基準にすることができる。前記要件には個別の対象動物のサイズ、年齢、性別、体重、及び症状が含まれる。投薬量は、本開示及び当業界における知識から当業者は容易に決定することができる。

【0120】

当業者は、本開示の趣旨の方法で投与されるべき組成物中の細胞及び最適な添加物、ビヒクル、及び/又は担体の量を容易に決定することができる。典型的には、いずれの添加物も(活性細胞及び/又は因子に加えて)リン酸緩衝食塩水の溶液に約0.001%から約50質量%の量で存在し、活性成分は、マイクログラムからミリグラムの規模で、例えば約0.0001 wt%から約5 wt%、約0.0001 wt%から約1 wt%、約0.0001 wt%から約0.05 wt%、約0.001 wt%から約20 wt%、約0.01 wt%から約10 wt%、又は約0.05 wt%から約5 wt%で存在する。動物又は人間に投与されるいずれの組成物についても、及びいずれの個別の投与方法についても、毒性は、例えば適切な動物モデル(例えばげっ歯類(例えばマウス))の致死用量(LD)及びLD50、並びに組成物の投薬量、その中の成分の濃度及び適切な応答を引き出す組成物の投与タイミングを決定することによって決定されるべきである。そのような決定は、当業者の知識、本開示及び本明細書に引用される資料に基づけば煩雑な実験を必要としない。さらに、連続投与のための時間は煩雑な実験無しに確認することができる。

【0121】

治療方法

治療のためには、本明細書で提供される操作された免疫細胞の投与量は、所望の効果(例えば癌若しくは感染症又は癌若しくは感染症の1つ以上の症候の治療)を生じるために有効な量である。有効な量は、本明細書で提供される操作された免疫細胞及び/又はFoxP3標的因子の一回又は一連の投与で提供され得る。有効な量は、ポラス又は持続輸液によって提供され得る。抗原特異的T細胞を用いる養子免疫のためには、典型的には約 $10^6$ から約 $10^{10}$ の範囲の細胞用量が輸液される。本開示の趣旨の操作された免疫細胞は当業界で公知の任意の方法によって投与できる。前記方法には、胸膜投与、静脈内投与、皮下投与、結節内投与、腫瘍内投与、髄腔内投与、胸腔内投与、腹腔内投与、及び胸腺への直接投与が含まれる(ただし前記に限定されない)。ある種の実施態様では、操作された免疫細胞及び前記を含む組成物は、その必要がある対象動物に静脈内投与される。養子細胞療法(例えばドナーリンパ球輸液を含む)及びT細胞療法のために細胞を投与する方法、並びに投与レジメンは当業界で公知であり、それらを本明細書提供の操作された免疫細胞の投与で利用することができる。

本開示の趣旨は、本明細書で提供される、腫瘍抗原標的的操作受容体(例えばCAR、caTCR

、又はeTCR)を発現する操作された免疫細胞(例えばT細胞)を用いる多様な方法を提供する。例えば、本開示の趣旨は、対象動物で腫瘍負荷を減少させる方法を提供する。ある非限定的な例では、腫瘍負荷を減少させる方法は、本開示の操作された免疫細胞の有効な量を対象動物に投与し、それによって対象動物で腫瘍細胞死を誘発する工程を含む。

#### 【0122】

本開示の操作された免疫細胞は、対象動物の腫瘍細胞数を減少させ、腫瘍サイズを低下させ、及び/又は腫瘍を根絶することができる。ある種の実施態様では、腫瘍負荷を減少させる方法は、対象動物に操作された免疫細胞の有効量を投与し、それによって対象動物で腫瘍細胞死を誘発する工程を含む。適切な腫瘍の非限定的な例には、副腎癌、膀胱癌、血液癌、骨癌、脳の癌、乳癌、癌腫、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮体癌、耳鼻咽喉頭(ENT)癌、子宮内膜癌、食道癌、胃腸管癌、頭頸部癌、ホジキン症、腸管癌、腎癌、喉頭癌、急性及び慢性白血病、肝癌、リンパ節癌、リンパ腫、肺癌、メラノーマ、中皮腫、骨髄腫、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、口腔癌、卵巣癌、膵癌、陰茎癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、肉腫、精上皮種、皮膚癌、胃癌、テラトーマ、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、腔癌、血管腫、及び前記の転移が含まれる。いくつかの実施態様では、癌は再発癌又は難治癌である。いくつかの実施態様では、癌は1つ以上の癌療法、例えば1つ以上の化学療法剤に耐性である。

本開示の趣旨はまた、新形成(例えば腫瘍)を有する対象動物の生存を高め又は延長する方法を提供する。ある非限定的な例では、新形成(例えば腫瘍)を有する対象動物の生存を高め又は延長する方法は、本開示の操作された免疫細胞の有効量を対象動物に投与し、それによって対象動物の生存を高め又は延長する工程を含む。本開示の趣旨はさらにまた、対象動物で新形成(例えば腫瘍)を治療又は予防する方法を提供し、前記方法は、本開示の操作された免疫細胞を対象動物に投与する工程を含む。

#### 【0123】

本開示の趣旨の操作された免疫細胞を用いてその増殖を阻止できる癌は、典型的には免疫療法応答性の癌を含む。治療する癌の非限定的な例には、多発性骨髄腫、神経芽腫、神経膠腫、急性骨髄性白血病、結腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、小細胞肺癌、及びNK細胞リンパ腫が含まれる。ある種の実施態様では、癌は多発性骨髄腫である。

加えて、本開示の趣旨は、癌細胞又はウイルス感染細胞に応答して免疫を活性化するサイトカイン生成を対象動物で高める方法を提供する。ある非限定的な例では、前記方法は、本開示の操作された免疫細胞及びFoxP3標的因子を対象動物に投与する工程を含む。免疫活性化サイトカインは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、インターフェロン調節因子7(IRF7)、及び前記の組合せであり得る。ある種の実施態様では、本開示の趣旨の腫瘍抗原特異的操作受容体を含む操作された免疫細胞は、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、及び/又はTNF- $\alpha$ の生成を高める。

治療法に適切なヒト対象動物は、典型的には臨床基準によって区別できる2つの治療グループを含む。“進行性症状”又は“高い腫瘍負荷”を有する対象動物は臨床的に測定可能な腫瘍(例えば多発性骨髄腫)を有する対象動物である。臨床的に測定可能な腫瘍は、腫瘍塊に基づいて検出することができる腫瘍である(例えば触診、CATスキャン、超音波画像、乳房レントゲン画像又はX線による(腫瘍自体の生化学的又は組織病理学マーカーの陽性はこの集団と同定するには不十分である))。本開示の趣旨で具体化された医薬組成物をこれらの患者に症状緩和の目的で投与して抗腫瘍応答を引き出す。理想的には、腫瘍塊の減少が結果として生じるが、いずれの臨床的改善も有益である。臨床的改善は、腫瘍(例えば多発性骨髄腫)の進行リスク若しくは進行速度の低下又は病理学的結果の緩和を含む。

#### 【0124】

適切な対象動物の第二のグループは“アジュバントグループ”として当業界で知られている。このグループは、新形成(例えば多発性骨髄腫)歴を有しているが、別の治療法様式に応答している個体である。先行治療法を含むことができるが、外科的切除、放射線療

法、及び伝統的な化学療法に制限されない。結果として、前記個体は臨床的に測定可能な腫瘍を持たない。しかしながら、前記個体は、腫瘍原発部位近くに又は転移により疾患の進行リスクがあると考えられる。このグループはさらにまた高リスク及び低リスク個体に細分割され得る。細分割は初期の治療の前後に観察された特徴を基準に実施される。これらの特徴は臨床分野では公知であり、異なる新形成の各々について適切に定義される。高リスクサブグループに典型的な特徴は、腫瘍（例えば多発性骨髄腫）が近傍の組織に侵襲した個体、又はリンパ節の関与を示す個体である。別のグループは新形成（例えば多発性骨髄腫）に遺伝的素因を有するが、腫瘍（例えば多発性骨髄腫）の臨床徴候は未だに示されていない。例えば、乳癌関連遺伝子変異検査について陽性であるがなお妊娠可能年齢である女性は、新形成発生を防ぐために予防的に本明細書に記載の組成物の1つ以上の投与を、予防手術を実施することが適切であるまで希望することができる。

対象動物は、疾患（例えば多発性骨髄腫）の進行型を有することができ、前記症例では、治療の目的は、疾患進行の緩和又は逆転及び/又は副作用の緩和を含むことができる。対象動物は当該症状歴を有することが可能で、当該症状のために既に治療を受けている。前記症例では、治療の目的は典型的には再発リスクの減少又は再発の遅延を含むであろう。

#### 【0125】

更なる改変を腫瘍抗原標的的操作受容体発現操作された免疫細胞（例えばT細胞）に導入して、免疫学的合併症（“悪性T細胞形質転換”として知られている）、例えば移植片対宿主病（GvHD）、又は健康な組織が腫瘍細胞と同じ標的抗原を発現してGvHDと類似する結果をもたらすときにそのリスクを回避するか又は最小限に抑えることができる。操作された免疫細胞の改変は、自殺遺伝子の腫瘍抗原標的的操作受容体発現T細胞への導入を含むことができる。適切な自殺遺伝子には、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（hsv-tk）、誘導性カスパーゼ9自殺遺伝子（iCasp-9）、及び短縮型ヒト表皮増殖因子受容体（EGFRt）ポリペプチドが含まれるが、ただし前記に限定されない。ある種の実施態様では、自殺遺伝子はEGFRtポリペプチドである。EGFRtポリペプチドは、抗EGFRモノクローナル抗体（例えばセツキシマブ）を投与することによってT細胞の排除を可能にできる。EGFRtは、腫瘍抗原標的的操作受容体の細胞内ドメインのC-末端に共有結合させることができる。自殺遺伝子は、本開示の腫瘍抗原標的的操作受容体をコードする核酸を含むベクターに加えることができる。自殺遺伝子とともに取り込まれた本開示の操作された免疫細胞（例えばT細胞）は、CAR T細胞輸液後の時点でいつでも先制的に排除されるか、又は毒性徴候の最も早い時点で根絶され得る。

#### 【0126】

##### 操作された免疫細胞を作製する方法

いくつかの実施態様では、標的抗原と結合するT細胞受容体（TCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞は、FoxP3標的因子の非存在下で作製される。そのような事例では、操作された免疫細胞は、当業界で公知の任意の方法によって作製される。FoxP3標的因子の非存在下で操作された免疫細胞を作製する例示的な方法は、例えばWO2016/191246、WO2015/011450、WO2017/070608、及びWO2017/124001に記載される（参照によってその全体が本明細書に含まれる）。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子の非存在下で作製される操作された免疫細胞は、FoxP3標的因子とともに対象動物に共同投与される。

他の実施態様では、標的抗原と結合するT細胞受容体（TCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞は、FoxP3標的因子の存在下で作製される。いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞を作製する方法は、（a）操作された受容体をコードするベクターと細胞を接触させる工程（ここで、ベクターは、標的抗原（すなわち細胞表面抗原）と結合する細胞外抗原結合ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む）、及び（b）FoxP3標的因子と細胞を接触させる工程を含む。いくつかの実施態様では、FoxP3標的因子と接触させる前に操作された受容体をコードするベクターと細胞を接触させる。他の実施態様では、操作された受容体をコードするベクターと接触させる前にFoxP3標的因

子と細胞を接触させる。他の実施態様では、操作された受容体をコードするベクター及びFoxP3標的因子を同時に細胞と接触させる。

#### 【0127】

いくつかの実施態様では、当該方法はさらにまた、操作された受容体をコードするベクターとの接触の前に、細胞を刺激及び増殖させる工程を含む。いくつかの実施態様では、細胞を刺激及び増殖させる工程は、細胞をCD3及び/又はCD28ビーズと接触させる工程を含む。いくつかの実施態様では、細胞を刺激及び増殖させる工程はインターロイキン2(IL-2)の存在下で生じる。いくつかの実施態様では、細胞を刺激及び増殖させる工程はFoxP3標的因子の存在下で生じる。

いくつかの実施態様では、細胞は複数の細胞を含むサンプルに存在する。いくつかの実施態様では、細胞をFoxP3標的因子と接触させる工程はサンプルからFoxP3<sup>+</sup>細胞の枯渇をもたらす。いくつかの実施態様では、サンプルのFoxP3<sup>+</sup>細胞の枯渇は、FoxP3標的因子と接触させなかったサンプルと比較して、サンプル中のFoxP3<sup>+</sup>細胞の数の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、又は300%の減少をもたらす。いくつかの実施態様では、細胞をFoxP3標的因子と接触させる工程はサンプルでFoxP3<sup>-</sup>細胞の濃縮をもたらす。いくつかの実施態様では、サンプルのFoxP3<sup>-</sup>細胞の濃縮は、FoxP3標的因子と接触させなかったサンプルと比較して、サンプル中のFoxP3<sup>-</sup>細胞の数の少なくとも25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、又は300%の増加をもたらす。

#### 【0128】

##### 製品及びキット

本開示の趣旨は、疾患（例えば新形成（例えば固形腫瘍）又は感染症）の治療又は予防のためのキットを提供する。ある種の実施態様では、キットは腫瘍抗原標的的操作受容体（例えばCAR、caTCR、又はeTCR）を含む操作された免疫細胞の有効量を含む治療用又は予防用組成物を含む。個別の実施態様では、細胞はさらにまた少なくとも1つの共同刺激リガンドを発現する。

所望する場合、操作された免疫細胞は、新形成（例えば固形腫瘍）を発症するリスクがある対象動物に操作された免疫細胞を投与するための指示書と一緒に提供され得る。指示書は、一般的には新形成（例えば固形腫瘍）の治療又は予防のために組成物の使用に関する情報を含むであろう。他の実施態様では、指示書は下記の少なくとも1つを含む：治療因子についての記載；投薬スケジュール及び新形成（例えば固形腫瘍）若しくはその症候の治療又は予防のための投与；注意事項；警告；指示；禁忌；過剰投与情報；有害反応；動物薬理学；臨床試験；及び/又は参考文献。指示書は、容器に直接（存在する場合）、又は容器に添付されたラベルとして、又は別々のシート、パンフレット、カード、又は容器の中に若しくは容器と一緒に供給されるフォルダーとして印刷され得る。

本明細書で提供されるものはまた、標的抗原（例えば腫瘍抗原又はウイルスタンパク質）と結合するT細胞受容体（TCR）又は他の細胞表面リガンドを発現する操作された免疫細胞の作製に使用されるキットである。ある種の実施態様では、キットは、(a)操作された受容体をコードするベクター、及び(b)FoxP3標的因子を含む。

いくつかの実施態様では、本明細書で提供されるキットは無菌的容器を含み、そのような容器は、箱、アンプル、ビン、バイアル、チューブ、バッグ、ポーチ、プリスターパック、又は当業界で公知の他の適切な容器形であり得る。そのような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属フォイル、又は医薬品を保持するために適切な他の材料から作製される。いくつかの実施態様では、無菌容器は治療用又は予防用ワクチンを含む。

#### 【0129】

##### 実施例

本発明の実施は、特段の指定がなければ、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の通常技術（当業者の技術範囲内である）を利用する。そのような技術は、例えば下記文献で完全に説明される：“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition, Sambrook, 1989；“Oligonucleotide Synthesis”,

10

20

30

40

50



Gait, 1984; "Animal Cell Culture", Freshney, 1987; "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology", Weir, 1996; "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells", Miller and Calos, 1987; "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel, 1987; "PCR: The Polymerase Chain Reaction", Mullis, 1994; "Current Protocols in Immunology", Coligan, 1991。これらの技術を本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの生成に応用することができ、したがって本発明の製造及び実施で参考にすることができる。個別の実施態様のために特に有用な技術は以下のセクションで考察されるであろう。

下記の実施例は、本発明の組成物の作製及び使用の仕方、並びにアッセイ、スクリーニング、及び治療方法の完全な開示及び説明を当業者に提供するために提出され、本発明者が発明とみなすものの範囲を制限しようとするものではない。

10

【実施例 1】

【0130】

抗FoxP3抗体の合成

本実施例は、例示的なFoxP3標的因子、例えばFoxP3由来エピトープに特異的なTCR模倣モノクローナル抗体（例えばFoxP3由来エピトープに特異的なscFv及びFoxP3-BsAb）の合成及びFoxP3を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）T細胞を記載する。

FoxP3を標的とするscFvクローンは以前に同定され、国際公開No.WO2017124001に記載される（参照によってその全体が本明細書に含まれる）。FoxP3標的scFvクローンの非限定例の重鎖及び軽鎖の相補性決定領域（CDR）は下記の表に示される。これらのscFvクローンを操作して、完全長ヒトIgG1、二重特異性抗体（BsAb）、及び/又はキメラ抗原受容体（CAR）T細胞にする。

20

【0131】

【表 A】

FoxP3 scFv1 重鎖 CDR (HCDR) 及び軽鎖 CDR (LCDR) の例

クローン	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
EXT017-17	GDYFSVA (配列番号:16)	IPIFGTP (配列番号:17)	ARSLYRSEYDH (配列番号:18)	SSNIGAGYD (配列番号:19)	GNS (配列番号:20)	QSYDSSLGCV (配列番号:21)
EXT017-18	GYTFSNY (配列番号:22)	INPSGTT (配列番号:23)	ARDWGGQMYDG (配列番号:24)	SSNIGSNT (配列番号:25)	SNN (配列番号:26)	AAWDLSLNGCV (配列番号:27)
EXT017-20	GGTFSSVA (配列番号:28)	IPIFGTA (配列番号:29)	ARYSYKYGELDT (配列番号:30)	SSNIGAGYD (配列番号:31)	GNS (配列番号:32)	QSYDSSLGCV (配列番号:33)
EXT017-27	GYTFTNY (配列番号:34)	IRPSGGIT (配列番号:35)	ARSWDYFASNDF (配列番号:36)	NIGSES (配列番号:37)	DDD (配列番号:38)	QVWDRSSDHW (配列番号:39)
EXT017-28	GGTFSTVA (配列番号:40)	IPIFGTA (配列番号:41)	ARAEVYVGEVDQ (配列番号:42)	SSNIGAGYD (配列番号:43)	GNS (配列番号:44)	QSYDSSLGCV (配列番号:45)
EXT017-32	GTFENNA (配列番号:46)	ISFDGDK (配列番号:47)	SRDPYHFASGSYSYFDY (配列番号:48)	NIGSKS (配列番号:49)	YDS (配列番号:50)	QVWSSSDHY (配列番号:51)
EXT017-53	GYTFTNY (配列番号:52)	IRPSGGNT (配列番号:53)	ARSWNSRDVDS (配列番号:54)	SGSIASHY (配列番号:55)	ENN (配列番号:56)	QSYDRSNHW (配列番号:57)
EXT017-54	GGTFSSVA (配列番号:58)	IPIFGTA (配列番号:59)	ARPSYYSIKSANDH (配列番号:60)	TSNIGKNG (配列番号:61)	NDH (配列番号:62)	ATWDDTLDLPL (配列番号:63)

10

20

30

【 0 1 3 2 】

選択scFvフラグメントを用いた完全長ヒトIgG1の構築：

選択ファージクローンの完全長ヒトIgG1をHEK293及びチャイニーズハムスター卵巣（CH0）細胞株で生産した。簡単に記せば、適合ラムダ又はカッパ軽鎖定常配列及びIgG1サブクラスFcと共に、抗体可変領域を哺乳動物発現ベクターでサブクローニングした。精製完全長IgG1抗体の分子量を、還元及び非還元条件の両方で電気泳動により測定した。

40

クローンEXT017-32の完全長IgG1の重鎖配列は下記に示される：

EVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFNNHAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGDDKIFYADSVKGRFTISRDNSRNTLFLQMNLRPEDTAVYYCSRDPYHFASGSYSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKITISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号：9）。

クローンEXT017-32の完全長IgG1の軽鎖配列は下記に示される：

50

QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAG  
DEADYYCQVWDSDDHYVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG  
VETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS ( 配列番号:10 ) 。

【 0 1 3 3 】

FoxP3-BsAbの構築、発現及び精製：

FoxP3-#32 BsAbを以前に記載されたように操作した ( Dao et al. (2015) Nat Biotechnol. 33(10):1079-86 ) 。 mAb#32 scFvのN-末端をマウスモノクローナル抗体の抗ヒトCD3 scFvのC-末端に可撓性リンカーによって連結した。2つのmAbのscFvをコードするDNAフラグメントをGeneArt ( InVitrogen ) によって合成し、エウレカ ( Eureka ) の哺乳動物発現ベクター-pGSN-Hygで標準的なDNA技術を用いてサブクローニングした。BsAbの検出及び精製のために、#32 BsAbの下流のC-末端に6ヒスタミン ( His ) タグを挿入した。

チャイニーズハムスター卵巣 ( CHO ) 細胞にFoxP3-#32BsAb発現ベクターをトランスフェクトし、メチオニンスルホキシミン ( MSX ) ( グルタミンシンセターゼ ( GS ) による方法 ) を用い標準的な因子選別によって安定的発現を達成した。分泌されたFoxP3-#32 BsAb分子を含むCHO細胞上清を収集した。FoxP3-#32 BsAbをHisTrap HPカラム ( GE healthcare ) を用いFPLC AKTA系によって精製した。簡単に記せば、CHO細胞培養を清澄化し、低イミダゾール濃度 ( 20mM ) でカラムにローディングし、続いて無勾配高イミダゾール濃度の溶出緩衝液 ( 500mM ) を用いて結合FoxP3-#32 BsAbを溶出させた。Fox3-#32 scFvの代わりに無関係のヒトIgG1抗体 ( Cat#ET901, Eureka Therapeutics ) から陰性コントロールBsAbを構築した。

FoxP3-#32 BsAbの配列は下記に提供される：

QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAG  
DEADYYCQVWDSDDHYVFGTGTKVTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSEMAEVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFN  
NHAMHWRQAPGKGLEWVAVISFDGDDKIFYADSVKGRFTISRDNSRNTLFLQMNLRPEDTAVYYCSRDPYHFASGSYSY  
FDYWGQGTLLVTVSSTSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTN  
YADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLLVTVSSGEGTSTGSGGGSGGGGADDI  
VLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDA  
ATYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIKHHHHHH ( 配列番号:11 ) 。

【 0 1 3 4 】

FoxP3を標的とするCAR T細胞の構築：

FoxP3 scFv配列を用いて、FoxP3を標的とする第二世代CARを作製する。可変重鎖及び軽鎖 ( Gly<sub>4</sub>Ser )<sub>3</sub> リンカーで接続される) 並びにc-mycタグを付加して、フローサイトメトリによるCAR発現の検出を可能にする。必要な場合には、CARを最適化してCD28トランスメンブレンドメインの上流にスペーサードメインを加え、前記をSFGレトロウイルスベクターでクローニングする。前記ベクターは、CD28及びCD3ゼータ又は4-1BB又は当業界で公知の他の同様なシグナリングCAR形を含む ( 例えばPark (2016) ) 。安定な293ウイルス生成細胞株を作製し、以前に記載されたように ( Rafiq (2017) ) 初代ヒトT細胞の形質導入に用いる。形質導入に続いて、CAR発現をFoxP3-CARに取り込まれたc-mycタグを染色してフローサイトメトリーで検証する。初代ヒトT細胞のレトロウイルス形質導入は以前に記載されている ( Koneru (2015) ) 。

CARベクターのFoxP3 scFv-CD28-CD3ゼータの配列は下記に示される：

QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAG  
DEADYYCQVWDSDDHYVFGTGTKVTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSEMAEVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFN  
NHAMHWRQAPGKGLEWVAVISFDGDDKIFYADSVKGRFTISRDNSRNTLFLQMNLRPEDTAVYYCSRDPYHFASGSYSY  
FDYWGQGTLLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFLFPGSPKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFII  
FWWRKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNLGRREEYDVL  
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR ( 配列番号:12 ) 。

CARベクターのFoxP3 scFv-41BB-CD3ゼータの配列は下記に示される：

QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAG

DEADYYCQVWDSDDHYVFGTGTKVTVLGSRRGGGGSGGGGSSLEMAEVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFN  
 NHAMHWRQAPGKGLEWVAVISFDGDDKIFYADSVKGRFTISRDNSRNTLFLQMNLRPEDTAVYYCSRDPYHFASGSYSY  
 FDYWGQGTLLVTVSSSTGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV  
 ITLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNLGRREEYD  
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR  
 (配列番号:13)

【0135】

FoxP3を標的とするキメラ抗体/T細胞受容体 (caTCR) の構築 :

FoxP3を標的とするcaTCRを国際公開No.WO2017/070608に記載されたように作製する(前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる)。簡単に記せば、FoxP3を標的とするIgG1重鎖の定常及び可変領域をT細胞受容体(TCR)のデルタ鎖に結合させて、caTCRの重鎖を作製する。FoxP3を標的とするIgG1軽鎖の定常及び可変領域をT細胞受容体(TCR)のガンマ鎖に結合させて、caTCRの重鎖を作製する。これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドをベクターでクローニングする。ベクターでT細胞を形質導入してcaTCRを発現させ、それによって抗FoxP3 caTCR T細胞を生成する。

FoxP3を標的とするcaTCRの重鎖配列は下記に示される:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFNNHAMHWRQAPGKGLEWVAVISFDGDDKIFY  
 ADSVKGRFTISRDNSRNTLFLQMNLRPEDTAVYYCSRDPYHFASGSYSYFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK  
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDK  
 RVEPKSCEVKT DSTDHSV KPKETENTKQPSKSKCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (配  
 列番号:14)。

FoxP3を標的とするcaTCRの軽鎖配列は下記に示される:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGQSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSGIPER  
 FSGNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDSDDHYVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD  
 FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPIKTDV  
 ITMDPKDNCSKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS (配列番号:15)

【実施例2】

【0136】

抗CD19 caTCR-T細胞集団の作製におけるFoxP3標的因子の使用

実施例2a-2fは、抗CD19 caTCR-T細胞集団作製の改善における多様なFoxP3標的因子の効果  
 を評価する。いくつかの実施例では、CD19と結合する操作された受容体をコードする  
 ベクターと接触させた後で、FoxP3標的因子を細胞サンプルに添加する。他の実施例では  
 、CD19と結合する操作された受容体をコードするベクターと接触させる前に、FoxP3標的  
 因子を細胞サンプルに添加する。

実施例2a: FoxP3標的二重特異性抗体(BsAb)の存在下での抗CD19 caTCR-T細胞集団の作製

この実施例では、抗CD19 caTCR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3 BsAbの  
 能力が精査される。実施例1に記載の代表的な抗FoxP3 BsAb(配列番号:11)及びレンチウ  
 イルスベクター(代表的な抗CD19 caTCR構築物をコードする)を本実施例で用いる。caTC  
 R構築物は抗CD19 IgVH-TCRデルタ鎖及び抗CD19 IgVL-TCRガンマ鎖を有する。

抗CD19 IgVH-TCRデルタ鎖の配列は下記に示される:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMIYIPGDSDRYSPSFQGGVTVISADKSI  
 STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSNWYVNLDSWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCEVKT  
 DSTDHSV KPKETENTKQPSKSKCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (配列番号:103)。

抗CD19 IgVL-TCRガンマ鎖の配列は下記に示される:

LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTI SRVEAG  
 DEADYYCQVWDSDDYVVFVGGGKTLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG  
 VETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPIKTDVITMDPKDNCSKDANDTLLLQ  
 LTNTSAYMYLLLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS (配列番号:104)。

## 【 0 1 3 7 】

PBMCを患者から入手してCD3/CD28ビーズで処理し、0日目にT細胞を単離及び刺激する。1日目に、刺激/活性化T細胞を6つのグループに分ける：グループ1（プロセスを通して抗CD19 caTCRコードベクターも抗FoxP3 BsAbも添加されない）、グループ2-6はいずれも1日目に抗CD19 caTCRコードベクターが添加される。グループ2はプロセスを通して抗FoxP3 BsAbを添加されないが、グループ3、4、5、及び6はそれぞれ1、2、3、及び4日目に抗FoxP3 BsAbを添加される。CD3/CD28ビーズ及び抗CD19 caTCRウイルスベクターは5日目に除去され、T細胞は3日又は4日間増殖させる。抗FoxP3 BsAbは、5日目に、又は8日目若しくは9日目頃のT細胞採集前に洗い流される。

免疫抑制Treg枯渇の有効性を抗体染色（例えばCD4、CD25及びFoxP3抗体）及びフローサイトメトリー分析によって評価する。抗CD19 caTCR-T細胞の作製効率又は有効性の改善は、より高い増殖能及びLDH殺滅活性の増加によって決定される。増殖アッセイ及びLDH殺滅アッセイを国際公開No.WO2017070608に記載されたように実施する（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる）。簡単に記せば、増殖アッセイについては、抗CD19 caTCR-T細胞をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル色素（CFSE）で標識し、標的癌細胞（例えばNALM6又はRaji）とともにインキュベートし、caTCR-T細胞の増殖性能をCFSE FACSシグナルによって提示する。より高い増殖能は、操作された抗CD19 caTCR-T細胞の機能の改善と相関する。LDH殺滅アッセイについては、抗CD19 caTCR-T細胞を標的癌細胞（例えばNALM6又はRaji）とともにインキュベートし、上清の殺滅活性をLDHアッセイによって決定する。加えて、抗CD19 caTCR-T細胞のin vivo癌細胞殺滅有効性を、NOD SCIDガンマ（NSG）マウスのCD19陽性ヒトリンパ腫異種移植モデルで試験する。

## 【 0 1 3 8 】

実施例2b：FoxP3標的IgG抗体処理による抗CD19 caTCR-T細胞集団の作製

この実施例では、抗CD19 caTCR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3 IgG抗体の能力が精査される。実施例1に記載の代表的な抗FoxP3 IgG1（配列番号：9及び配列番号：10）及びレンチウイルスベクター（実施例2aに記載の同じ代表的な抗CD19 caTCR構築物をコードする）が本実施例で用いられる。

PBMCを患者から入手し、CD3/CD28ビーズ無しに抗FoxP3 IgG1で処理する。これは、NKの存在下でPBMC内のTreg細胞を殺滅するためである。PBMCの一部は抗FoxP3 IgG1で処理しないで陰性コントロールとして供する。抗FoxP3 IgG1で4時間から2日間（例えば4、6、8、10、12、14、16、20、24、36、又は48時間）処理した後で、IgG1を洗い流してPBMCをCD3/CD28ビーズで処理し、T細胞を単離及び活性化する。この日を0日目とみなす。続いて、活性化T細胞に抗CD19 caTCRコードレンチウイルスを形質導入し、形質導入は1日目開始し、CD3/CD28ビーズの存在下で3-5日間続く。CD3/CD28ビーズ及び抗CD19 caTCRウイルスベクターを4-6日目に除去し、T細胞を3又は4日間増殖させる。抗CD19 caTCR T細胞を8日目又は9日目頃に採集する。

免疫抑制Treg枯渇の有効性は、T細胞活性化の前に抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって評価され、形質導入T細胞を採集するときに確認される。抗CD19 caTCR T細胞の作製効率又は有効性改善は、実施例2aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

## 【 0 1 3 9 】

実施例2c：FoxP3標的CAR-T細胞の処理による抗CD19 caTCR T細胞集団の作製

この実施例では、抗CD19 caTCR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3 CAR-T細胞の能力が精査される。実施例1に記載の代表的な抗FoxP3 CAR（例えば配列番号：12及び配列番号：13）及びレンチウイルスベクター（実施例2aに記載の同じ代表的な抗CD19 caTCR構築物、例えば配列番号：103及び配列番号：104をコードする）を本実施例で用いる。

PBMCを患者から入手し、0日目にCD3/CD28ビーズで処理してT細胞を単離及び刺激する。1日目に、活性化T細胞を3つのグループの細胞に分ける。グループ1は抗CD19 caTCRコードベクターが形質導入され、グループ2は抗FoxP3 CARコードベクターが形質導入され、一方、グループ3は擬似形質導入が実施される（どちらのベクターも用いられない）。形質導

入から4, 5又は6日後に、ウイルスベクターを洗い流し、さらにCD3/CD28ビーズをグループ1及びグループ2から除去する。グループ1の細胞(抗CD19 caTCR形質導入T細胞)を2つのグループに分割する: グループ1aの細胞をグループ2の細胞と混合して抗FoxP3 CAR T細胞がTreg細胞を殺滅し、一方、コントロールとしてグループ1bをグループ3細胞と混合する。細胞混合物を2、3、4、又は5日間インキュベートした後、抗FoxP3 CAR T細胞を下記のどちらの方法により除去する: 例えば下記文献に記載の方法: Lim and June (2017) Cell 168:724-740; Wang et al. (2011) Blood 118:1255-1263; 及びStasi et al. (2011) N Engl J Med 365:1673-1683(例えばiCasp9又はEGFRの細胞外ドメインの発現による)(前記文献の各々は参照によってその全体が本明細書に含まれる)、又は例えば抗イディオタイプ抗体による抗CD19 caTCR T細胞の正の選別。

10

抗CD19 caTCR T細胞を8日目又は9日目頃に採集する。免疫抑制Treg枯渇の有効性は、抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって実施例2aに記載されたように評価される。抗CD19 caTCR T細胞の作製効率又は有効性改善は、実施例2aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

#### 【0140】

**実施例2d:** FoxP3標的caTCR-T細胞の処理による抗CD19 caTCR T細胞集団の作製

この実施例では、抗CD19 caTCR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3 caTCR-T細胞の能力が精査される。実施例1に記載の代表的な抗FoxP3 caTCR(例えば配列番号:14及び配列番号:15)及びレンチウイルスベクター(実施例2aに記載の同じ代表的な抗CD19 caTCR構築物、例えば配列番号:103及び配列番号:104をコードする)を本実施例で用いる。

20

本実施例は、抗FoxP3 caTCRをコードするレンチウイルスベクターを抗FoxP3 CARをコードするベクターの代わりに用いる点を除いて、実施例2に記載の方法と同じ方法で実施される。

抗CD19 caTCR T細胞は8日目又は9日目頃に採集される。免疫抑制Treg枯渇の有効性は、抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって実施例2aに記載されたように評価される。抗CD19 caTCR T細胞の作製効率又は有効性改善は、実施例2aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

30

#### 【0141】

**実施例2e:** 抗FoxP3マイクロビーズ処理による抗CD19 caTCR T細胞集団の作製

この実施例では、抗CD19 caTCR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3マイクロビーズの能力が精査される。抗FoxP3抗体(IgG、IgA、IgD、IgM、又はIgE、完全長抗体又は抗原結合部分を含む抗体フラグメント)を磁性ビーズ(例えばCliniMACSアンチピオチンマイクロビーズ(Miltenyl Biotec Cat#130-019-201)、ダイナビーズ(商標)(Dynabeads)ピオチンバインダー(ThermoFisher Scientific Cat#11047))に、作製業者の指示にしたがい結合させる。

0日目にPBMCを患者から入手し、2つのグループに分割する。試験グループを抗FoxP3磁性ビーズで処理してFoxP3陽性免疫抑制Tregを枯渇させ、一方、コントロールグループは処理しない。続いて、PBMCをCD3/CD28ビーズで処理し、T細胞を単離及び刺激する。1日目に、T細胞に抗CD19 caTCRコードレンチウイルスベクターを4-6日間形質導入する。8日目又は9日目頃に、抗CD19 caTCR T細胞を採集する。

40

免疫抑制Treg枯渇の有効性は、T細胞活性化の前に抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって評価され、形質導入T細胞を採集するときに確認される。抗CD19 caTCR T細胞の作製効率又は有効性改善は、実施例2aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

#### 【0142】

**実施例2f:** 抗FoxP3マイクロビーズ(物理的にTregを分離するため)及び抗FoxP3 BsAb/CAR-T/caTCR-T(T細胞によるTregの殺滅を誘発するため)又は遊離IgG(NK細胞によるTre

50

gの殺滅を誘発するため)の組合せ処理による抗CD19 caTCR T細胞集団の作製

この実施例では、抗CD19 caTCR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する、抗FoxP3マイクロビーズ、抗FoxP3 BsAB、抗FoxP3 CAR-T細胞、及び抗FoxP3 caTCR-T細胞の能力が精査される。抗FoxP3マイクロビーズは実施例2に記載のように作製され、抗FoxP3 BsAB及び抗FoxP3 IgG1は実施例1に記載のように作製され、抗FoxP3 CAR-T細胞は実施例2cに記載のように作製され、さらに抗FoxP3 caTCR-T細胞は実施例2dに記載のように作製される。加えて、実施例2aに記載の同じ代表的な抗CD19 caTCR構築物(例えば配列番号:103及び配列番号:104)をコードするレンチウイルスベクターが本実施例で用いられる。

0日目に、PBMCを患者から入手し、2つのグループに(グループ1及び2)に分ける。グループ1は抗FoxP3磁性ビーズで処理されてFoxP3陽性免疫抑制Tregを枯渇させ、一方、グループ2は処理されない。続いて、グループ1及び2のPBMCをCD3/CD28ビーズで処理して、T細胞を単離及び刺激する。1日目に、T細胞に抗CD19 caTCRコードレンチウイルスベクターを4-6日間形質導入する。8日目又は9日目頃に、抗CD19 caTCR T細胞を採集する。

#### 【0143】

グループ1及び2の抗CD19 caTCR T細胞をさらに下記に示すようにサブグループに分割する：

サブグループ	グループ	
	グループ1	グループ2
A	抗FoxP3標的因子の追加無し	
B	抗FoxP3 BsAB	
C	抗FoxP3 IgG1	
D	抗FoxP3 CAR-T細胞	
E	抗FoxP3 caTCR-T細胞	

#### 【0144】

上記の表に示すように、グループ1及び2をさらに5つのサブグループに分割する。サブグループAはIgG1又はいずれの追加の抗FoxP3標的因子とも混合されない。サブグループBは実施例2aに記載されたように抗FoxP3 BsAbと混合される。サブグループCは実施例2bに記載されたように抗FoxP3 IgG1と混合される。サブグループDは実施例2cに記載されたように抗FoxP3 CAR-T細胞と混合される。サブグループEは実施例2dに記載されたように抗FoxP3 caTCR-T細胞と混合される。

免疫抑制Treg枯渇の有効性は、実施例2a及びeに記載されたように抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって評価される。抗CD19 caTCR T細胞の作製効率又は有効性改善は、実施例2aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

#### 【実施例3】

#### 【0145】

##### 抗AFP caTCR-T細胞集団の作製におけるFoxP3標的因子の使用

実施例3a-3fは、抗AFP caTCR-T細胞集団作製の改善における多様なFoxP3標的因子の効果の評価する。いくつかの実施例では、AFPと結合する操作された受容体をコードするベクターと接触させた後で、FoxP3標的因子を細胞サンプルに添加する。他の実施例では、AFPと結合する操作された受容体をコードするベクターと接触させる前に、FoxP3標的因子を細胞サンプルに添加する。

実施例3a：FoxP3標的的二重特異性抗体(BsAb)の存在下での抗AFP caTCR-T細胞集団の作製

この実施例では、抗アルファ胎児タンパク質(AFP)caTCR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3 BsAbの能力が精査される。実施例2aで用いられる代表的な抗FoxP3 BsAb及び代表的な抗AFP CAR構築物をコードするレンチウイルスベクターが本実施例で用いられる。抗AFP CAR構築物は、AFPペプチド及びMHCクラスIタンパク質を含む複合体と特異

的に結合するがAFPペプチド又はMHC単独とは結合しないscFvを有する。抗AFP CAR構築物は、scFvフラグメントと融合したCD28及びCD3ゼータのフラグメントを有する。

抗AFP scFvの配列は下記に示される：

QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDYVNNRPSEVSNRFSGSKSGNTASLTSGL  
QAEDEADYYCSSYTTGSRAVFGGGTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLMAEVQLVQSGAEVKKPGESLTSCKASGYS  
FPNYWITWVRQMSGGGLEWMMGRIDPGDSYTTYNPSFQGHVTSIDKSTNTAYLHWNSLKASDTAMYCYARYVSLVDIWG  
QGTLVTVSS (配列番号:98)。

抗AFP scFvと融合したCD28-CD3ゼータフラグメントの配列は下記に示される：

AAAIEMVYPPPYLDNEKSNGTIIVKKGKHLCPSPFLFPGSPKPFWWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSD  
YMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPR  
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (配列番号:99)。

10

#### 【0146】

PBMCを患者から入手し、0日目にCD3/CD28ビーズで処理してT細胞を単離及び刺激する。1日目に、刺激/活性化T細胞を5グループに分ける：グループ1はプロセスを通して抗AFP CARコードベクターも抗FoxP3 BsAbも添加されず、グループ2-5はいずれも1日目に抗AFP CARコードベクターが添加され、グループ2はプロセスを通して抗FoxP3 BsAbを添加されないが、グループ3、4、及び5はそれぞれ1、3、及び5日目に抗FoxP3 BsAbを添加される。抗FoxP3 BsAbは、8日目又は9日目にT細胞を採集する前に洗い流される。

免疫抑制Treg枯渇の有効性を抗体染色（例えばCD4、CD25及びFoxP3抗体）及びフローサイトメトリー分析によって評価する。抗AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性の改善は、より高い増殖能及びLDH殺滅活性の増加によって決定される。増殖アッセイについては、抗AFP CAR-T細胞をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル色素（CFSE）で標識し、標的癌細胞（例えばHEPG2及びSK-HEP1-MiniG、AFP158ミニジーンカセットをトランスフェクトされたSK-HEP1細胞株）とともにインキュベートし、caTCR-T細胞の増殖性能をCFSE FACSシグナルによって提示する。より高い増殖能は、操作された抗AFP CAR-T細胞の機能の改善と相関する。LDH殺滅アッセイについては、抗AFP CAR-T細胞を標的癌細胞（例えばHEPG2及びSK-HEP1-MiniG、AFP158ミニジーンカセットをトランスフェクトされたSK-HEP1細胞株）とともにインキュベートし、上清の殺滅活性をLDHアッセイによって決定する。加えて、抗AFP CAR-T細胞のin vivo癌細胞殺滅有効性を、NOD SCIDガンマ（NSG）マウスのAFP陽性ヒト肝細胞癌腫異種移植モデルで試験する。

20

30

#### 【0147】

**実施例3b**：FoxP3標的IgG抗体処理による抗AFP CAR-T細胞集団の作製

この実施例では、抗AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3 IgG抗体の能力が精査される。この実施例では、抗CD19 CARコードレンチウイルスベクターを用いて抗CD19 CAR T細胞を生成する代わりに、抗AFP CARコードレンチウイルスベクター（実施例3aに記載）を用いて抗AFP CAR-T細胞が生成されるという点を除いて、実施例2bの態様とほとんど同一の態様で抗AFP CAR-T細胞の作製が実施される。

免疫抑制Treg枯渇の有効性は、T細胞活性化の前に抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって評価され、形質導入T細胞を採集するときに確認される。抗AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性の改善は、実施例3aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

40

#### 【0148】

**実施例3c**：FoxP3標的CAR-T細胞の処理による抗AFP CAR-T細胞集団の作製

この実施例では、抗AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3 CAR-T細胞の能力が精査される。この実施例では、抗CD19 CARコードレンチウイルスベクターを用いて抗CD19 CAR T細胞を生成する代わりに、抗AFP CARコードレンチウイルスベクター（実施例3aに記載）を用いて抗AFP CAR-T細胞が生成されるという点を除いて、実施例2cの態様とほとんど同一の態様で抗AFP CAR-T細胞の作製が実施される。

抗AFP CAR T細胞を8日目又は9日目頃に採集する。免疫抑制Treg枯渇の有効性は、抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって実施例3aに記載されたように評価される。抗

50



AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性の改善は、実施例3aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

【0149】

実施例3d：FoxP3標的caTCR-T細胞の処理による抗AFP CAR-T細胞集団の作製

この実施例では、抗AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3 caTCR-T細胞の能力が精査される。この実施例では、抗CD19 CARコードレンチウイルスベクターを用いて抗CD19 CAR T細胞を生成する代わりに、抗AFP CARコードレンチウイルスベクター（実施例3aに記載）を用いて抗AFP CAR-T細胞が生成されるという点を除いて、実施例2dの態様とほとんど同一の態様で抗AFP CAR-T細胞の作製が実施される。

10

免疫抑制Treg枯渇の有効性は、抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって実施例3aに記載されたように評価される。抗AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性の改善は、実施例3aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

【0150】

実施例3e：抗FoxP3マイクロビーズ処理による抗AFP CAR-T細胞集団の作製

この実施例では、抗AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する抗FoxP3マイクロビーズの能力が精査される。この実施例では、抗CD19 CARコードレンチウイルスベクターを用いて抗CD19 CAR T細胞を生成する代わりに、抗AFP CARコードレンチウイルスベクター（実施例3aに記載）を用いて抗AFP CAR-T細胞が生成されるという点を除いて、実施例2e

20

の態様とほとんど同一の態様で抗AFP CAR-T細胞の作製が実施される。免疫抑制Treg枯渇の有効性は、T細胞活性化の前に抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって評価され、形質導入T細胞を採集するときに確認される。抗AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性の改善は、実施例3aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

【0151】

実施例3f：抗FoxP3マイクロビーズ（物理的にTregを分離するため）及び抗FoxP3 BsAb/CAR-T/caTCR-T（T細胞によるTregの殺滅を誘発するため）又は遊離IgG（NK細胞によるTregの殺滅を誘発するため）の組合せ処理による抗AFP caTCR-T細胞集団の作製

この実施例では、抗AFP caTCR-T細胞の作製効率又は有効性を改善する、抗FoxP3マイクロビーズ、抗FoxP3 BsAb、抗FoxP3 CAR-T細胞、及び抗FoxP3 caTCR-T細胞の能力が精査される。抗FoxP3マイクロビーズは実施例2eに記載のように作製され、抗FoxP3 BsAb及び抗FoxP3 IgG1は実施例1に記載のように作製され、抗FoxP3 CAR-T細胞は実施例2cに記載のように作製され、さらに抗FoxP3 caTCR-T細胞は実施例2dに記載のように作製される。加えて、実施例3aに記載の同じ代表的な抗AFP caTCR構築物（例えば配列番号：98及び配列番号：99）をコードするレンチウイルスベクターが本実施例で用いられる。

30

この実施例では、抗CD19 CARコードレンチウイルスベクターを用いて抗CD19 CAR T細胞を生成する代わりに、抗AFP CARコードレンチウイルスベクター（実施例3aに記載）を用いて抗AFP CAR-T細胞が生成されるという点を除いて、実施例2fの態様とほとんど同一の態様で抗AFP CAR-T細胞の作製が実施される。

40

免疫抑制Treg枯渇の有効性は、実施例3a及びeに記載のように抗体染色及びフローサイトメトリー分析によって評価される。抗AFP CAR-T細胞の作製効率又は有効性の改善は、実施例3aに記載されたように、より高い増殖能及びin vitroのLDH殺滅活性の増加並びにin vivoでのより高い抗腫瘍活性によって決定される。

【実施例4】

【0152】

FoxP3標的因子を用いるROR2標的svFvを発現するCAR T細胞の合成

いくつかの実施態様では、操作された免疫細胞はROR2を標的とするCARを発現する。本実施例では、ROR2を標的とするscFvを含むCARを発現する操作された免疫細胞を作製する方法を記載する。

50

ROR2を標的とするCARの配列：

いくつかの実施態様では、CARは抗ROR2抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。各抗体について、情報は下記のように構成される：

1. 抗体の名称；
2. 軽鎖可変領域（LCVR）のDNA配列；
3. 軽鎖可変領域（LCVR）のタンパク質配列；
4. 重鎖可変領域（HCVR）のDNA配列；及び
5. 重鎖可変領域（HCVR）のタンパク質配列。

本明細書に開示するCARは、下記に記載する抗ROR2抗体のLCVR及び/又はHCVRのタンパク質又はDNA配列を有するLCVR及び/又はHCVRを含むことができる。また別には、或いは加えて、本明細書に記載するCARは、下記に記載する抗ROR2抗体の軽鎖相補性決定領域（LCDR）又は重鎖CDR（HCDR）のタンパク質又はDNA配列を有するLCVR及び/又はHCVRを含むことができる（WO2016142768A1の表5及び6もまた参照されたい（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる））。

## 【 0 1 5 3 】

## 1) 抗体ROR2クローン#016

016 - ラムダ軽鎖可変領域（DNA配列）

tcttctgagctgactcaggacctgctgtgtctgtggccttgggacagacagt caggatcacatgccaaaggagacagcct  
cagaagctattatgcaagctggtaccagcagaagccaggacaggccctgtacttgtcatctatggtaaaaacaaccggc  
cctcagggatcccagaccgat tctctggctccagctcaggaaacacagcttcttgaccatcactggggctcaggcggaa  
gatgaggctgactattactgtaactcccgggacagcagtggttaacctctggtattcggcggaggggaccaagctgaccgt  
cctagg（配列番号：217）

016 - ラムダ軽鎖可変領域（アミノ酸配列）

SSELTQDPVAVSVALGQTVRI TCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLI YGKNNRPSG I PDRFSGSSSGNTASLT I TGAQAE  
DEADYYCNSRDSSGNHLVFGGGTKLTVLG（配列番号：204）

016 - 重鎖可変領域（DNA配列）

gaggtccagctggtacagctctggggctgagg tgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttctggata  
caccttaccgactactatatacactgggtgctggcaggccctggacaagggtggagtggtggatggatggatgaacccta  
acagtgggaactcagctctgacacagaagtccagggcagagtcaccatgaccaggataacctccataaacacagcctac  
atggagctgagcagcctgacatctgacgacacggccgtgtattactgtgctgcaactctgaaatggcatccgtgggggtta  
ctacgattactggggcaaggctctggtgaccgtctcctca（配列番号：218）

016 - 重鎖可変領域（アミノ酸配列）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYIHWVRQAPGQGLEWMGMNPNSGNSVSAQKFQGRVTMTRDTSINTAY  
MELSSLTSDDTAVYYCARNSEWHPWGYDYWGQGLTVVSS（配列番号：191）

## 【 0 1 5 4 】

## 2) 抗体ROR2クローン#023

023 - カッパ軽鎖可変領域（DNA配列）

gaaacgacactcacgcagctccaggcaccctgtctgtgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtc  
gagtgtagcagcaacttagcctggtaccagcagaaacgtggccaggctcccaggctcctcatctatggtgctgtacc  
ggccactggtatcccagtcaggttcagtgccagtggtctgggacagagttcactctcaccatcagcagattggagcct  
gaagatttgcagtgat tactgtcagcagataggtaggtcaccgctcacttctcgccggaggggaccaaagtggatatca  
acgt（配列番号：219）

023 - カッパ軽鎖可変領域（アミノ酸配列）

ETTLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKRGQAPRLI YGASTRATG I PVRFSGSGSGTEFTL I SRLEP  
EDFAVYYCQQYGRSPLTFGGGTKVDIKR（配列番号：205）

023 - 重鎖可変領域（DNA配列）

gaagtcagctggtgagctctggagcagagtgaaaaagccggggagctctctgaagatctcctgtcagggttctggata  
caggttcagcaagctaggatcggctgggtgctggccagatgcccgggaaaggcctggagtggtggatggggatcatctatcctg  
tgactctgat accagat acagcccgtccttccaaggccaggtcaccatctcagccgacaagttccatcagcaccgcctac  
ctgcagtgagcagcctgaaggcctcggacaccgcatgtattactgtgctgctcttctctcttctcatctacgatta

ctggggtcaaggtactctgggtgaccgtctcctca ( 配列番号:220 )

023 - 重鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCGQSGYRFSKYWIGWVRQMPGKGLEWMMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTVI SADKSI STAY LQWSSLKASDTAMYYCARSFSSFIYDYWGQGLTVTVS ( 配列番号:192 )

【 0 1 5 5 】

3 ) 抗体ROR2クローン#024

024 - カッパ軽鎖可変領域 ( DNA配列 )

gaaattgtgatgacacagctctccagccacccctgtctgtgtctccaggggaaagtgccaccctctcctgcagggccagtcagggtgtggcatcaacttagcctggtagcagagaccctggccagccctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacaggccactggcatcccagccaggtcagtgccagtggtctgggacagattcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagctctattactgtcagcaatactatagttttccgtggacgttcggccaggggaccaaggtggaaatcaaacgt ( 配列番号:221 )

10

024 - カッパ軽鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

EIVMTQSPATLSVSPGESATLSCRASQGVGINLAWYQQRPGQPPRLIIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSPWTFGQGTKVEIKR ( 配列番号:206 )

024 - 重鎖可変領域 ( DNA配列 )

gaggtgcagctgggtgcagctctggggcagaggtgaaaaagcccggggagctctctgaaaatctcctgtaaggcttctggatacagcttagcaactactggatcggctgggtgcgccagatgcccgggaaaggcctggagtggtggggatcatctatcctgatgactctgataccagatacagcccgtccgtccaaggccaggtcacctctcagccgacaagttccatcagcaccgcctactgcagtggtacagcctgaaggtcgcgacaccgccaataattactgtgtgcgccctaggggggcttttgatatctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctca ( 配列番号:222 )

20

024 - 重鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMMGIIYPDDSDTRYSPSVQGGVTVI SADKSI STAY LQWYSLKQVADTAKYYCVRPRGAFDIWGQGTTVTVSS ( 配列番号:193 )

【 0 1 5 6 】

4 ) 抗体ROR2クローン#027

027 - 軽鎖可変領域 ( DNA配列 )

cagctctgtctgacgcagccgcccctcagtgctctggggccccagggcagaggggtcacgatctcctgcactgggagtagctccaacatcggggcaggtcatgctgtacactggtagcagcaacttccaggaacagccccaaactcctcatctatgataaccgaatcgggccctcaggggtcccgtaccgatctctctggctcccagctctggcactcagccctcccggccatcaccggactccagactggggacgagggcgaattattactgcggaacatgggatgacagcccagtgcttatgtcttcggaactgggacaaaggtcaccgtcctaggt ( 配列番号:223 )

30

027 - 軽鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGHAVHWYQLPGTAPKLLIYDNANRPSGVPDRFSGSQSGTSASLITGLQTGDEADYYCGTWDDSPSAYVFGTGTKVTVLG ( 配列番号:207 )

027 - 重鎖可変領域 ( DNA配列 )

caggtgcagctgggtggagctctggggcagaggtgaaaaagcccggggagctctctgaaaatctcctgtaaggcttctggatacagcttagcaactactggatcggctgggtgcgccagatgcccgggaaaggcctggagtggtggggatcatctatcctgatgactctgataccagatacagcccgtccttccaaggccaggtcacctctcagccgacaagttccatcagcaccgcctactgcagtggtacagcctgaaggtcgcgacaccgccaataattactgtgtgcgccctaggggggcttttgatatctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctca ( 配列番号:224 )

40

027 - 重鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

QVQLVESGAEVKKPGESLKISCKASGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMMGIIYPDDSDTRYSPSFQGGVTVI SADKSI STAY LQWYSLKQVADTAKYYCVRPRGAFDIWGQGTTVTVSS ( 配列番号:194 )

【 0 1 5 7 】

5 ) 抗体ROR2クローン#084

084 - カッパ軽鎖可変領域 ( DNA配列 )

gatgtgtgatgactcagctctccactctcccgtcccgtcacccttggacagccggcctccatctcctgcaggcttagtcaaacctcgttcacagtgtgaaacacctacttgaattggtttcagcagagggccaggccaatctccaaggcgcctaatatataaagttctagccgggactctggggctcccagatagattcagcggcactgggtcaggcactgatttcacactgaaaatc

50

agcaggggtggaggctgaagatgttggcgtttattactgcatgcaaaccacacactggcctccgacgttcggccaaggac  
caagtgagatcaaact ( 配列番号:225 )

084 - カッパ軽鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSSRDSGVPDRFSGTGSSTDFTLKI  
SRVEAEDVGVYYCMQTTHTWPPFTFGQGTKVEIKR ( 配列番号:208 )

084 - 重鎖可変領域 ( DNA配列 )

caggtgcagctggaggctctgggggaggcttgggtccagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt  
caccttagtagctattggatgagctgggtccgcccaggctccagggaagggtggagtggtggccaacataaagcaag  
atggaagtgagaaatactatgtggactctgtgaggggcccattcaccaatctccagagacaacgccaagaactcactgtat  
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacaccgcatgtattactgtgctgctgcttacgacagtgatct  
gtgggtcaaggctctgggtgaccgtctcctca ( 配列番号:226 )

10

084 - 重鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVGRFTISRDNAKNSLY  
LQMNSLRAEDTAMYYCARGSFYSYSDSLWGQGLTVTVSS ( 配列番号:195 )

6 ) 抗体ROR2クローン#90

090 - 軽鎖可変領域 ( DNA配列 )

cagcctgtgctgactcagccacctcagcgtctgggacccccgggcagaggggtcaccaatctctgttctggaagcagctc  
caacatcgggagtgattatgtatcctggtagcaaacagctcccaggaacggcccccaaacctcctcatctataggaatgatc  
agcggccctcaggggtccctgaccgatctctggctccaagctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccgg  
tccgaggatgaggctgattattactgtgtagcatgggatgacagcctgagtggttatgtcttcggaagtgggaccaagg  
caccgtcctaggt ( 配列番号:227 )

20

090 - 軽鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

QPVLTPPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSDYVSWYQLPGTAPKLLIYRNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR  
SEDEADYYCVAWDDSLSGYVFGSGTKVTVLG ( 配列番号:209 )

090 - 重鎖可変領域 ( DNA配列 )

gaggtgcagctggaggctctggcccaggactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggagg  
ctccatcagcagtggtggttactactggagctggatccgcccagcaccagggaagggtggagtggtatgggtacatct  
attacagtgaggaccctactacaaccgtcccacaagagtcgagttacatatcagtagacacgtccaagaaccagttc  
tccctgaagctgagctctgtgaccgctgcccagaccgcatgtattactgtgctgctgctgactggacttactc  
tcaggatgtttggggccaaggctctgggtgaccgtctcctca ( 配列番号:228 )

30

090 - 重鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

EVQLVESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQF  
SLKLSVTAADTAMYYCARGGLYWTYSQDVGQGLTVTVSS ( 配列番号:196 )

【 0 1 5 8 】

7 ) 抗体ROR2クローン#093

093 - カッパ軽鎖可変領域 ( DNA配列 )

gaaattgtgatgacgcagctctccagccacctgtctttgtctccaggggaaagagccacctctcctgctggggccagtc  
gagtgtagcagcagctacttagcctggtagcagaaacctggcctggcggccaggctcctcatctatgatacatcca  
gaagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtggtctgggacagacttactctcaccaatcagcagactggag  
ccggaagatttgagtgattactgtcttactatggtcgctcacctccggtcactttcggcggagggaaccaagggtgga  
gatcaaact ( 配列番号:229 )

40

093 - カッパ軽鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQKPLAPRLLIYDTSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI  
SRLEPEDFAVYYCLHYGRSPPVTFGGGTKVEIKR ( 配列番号:210 )

093 - 重鎖可変領域 ( DNA配列 )

cagatgcagctgggtgcagctctgggggaggctgggtccagcctgggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt  
cacctcagtaactatgacatgcactgggtccgcccgggtccaggcaagggtggagtggtggcagttatcatatg  
atggaagtaataatfactatgcagactccgtgaagggccgattcaccaatctccagagacaattccaagaacacgctgtat  
ctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggccgtgtattactgtgctgctctctgcttgggtgggtgggttt  
cctgtctggtagtgactgggtcaaggctctgggtgaccgtctcctca ( 配列番号:230 )

50

093 - 重鎖可変領域 (アミノ酸配列)

QMQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYDMHWVRRAPGKGLEWVAVISYDGSNNYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARSSAWVGGGFLSGTDDWGQGLVTVSS (配列番号:197)

【0159】

8) 抗体ROR2クローン#096

096 - 軽鎖可変領域 (DNA配列)

gaaatgtgctgactcagctccactctccctgcccgtcacccttggacagccggcctccatctcctgcaggctctagtca  
aagcctcgatacagtgatggaaacacctacttgaattgggttccaccagaggccaggccaatctccaaggcgctaatct  
ataaggttcttaagcgggactctggggtccagacagattcagcggcagtgaggctcaggcactgatttccactgagaatc  
agcagggtggaggctgaggatgttgggatttatctgcatgcaaggtacacactggcctcacacttccggcctgggac  
caaagtggatatcaaact (配列番号:231)

10

096 - 軽鎖可変領域 (アミノ酸配列)

EIVLTQSPVLSPLPVTLGQPASISCRSSQSLAYSDGNTYLNWFHQRPQGSPRRLLYKVKSRDQSGVPDRFSGSGSGTDFTLRIS  
SRVEAEDVGIYYCMQGTHTWPHFTFGPGTKVDIKR (配列番号:211)

096 - 重鎖可変領域 (DNA配列)

gaagtgcagctgggtgcagctctgggggaggcttgggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt  
cagcctcaatgactattacatggactgggtccgccaggctccaggggaggggctggagtgggttggccgtattagagaca  
aagctcacggtgacaccacagaaatacctcgctctgtgaaagacagatttatcgctccaagagatgactccaagaactca  
ctgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacaccgcatgtattactgtgctgctgggttgacgactaccagggt  
ttactggatctgggtcttaccacgatttctggggtcaaggtactctgggtgaccgtctcctca (配列番号:232)

20

096 - 重鎖可変領域 (アミノ酸配列)

EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLNDYYMDWVRQAPGEGLEWVGRIRDKAHGDTTEYIASVKDRFIVSRDDSKNS  
LYLQMNSLKTEDTAMYYCARWVDDYQGYWISYHDFWGQGLVTVSS (配列番号:198)

【0160】

9) 抗体ROR2クローン#121

121 - 軽鎖可変領域 (DNA配列)

tcctatgtgctgactcagccaccctcagtgctccgtgtccccaggacagacagccagcgtcacctgttctggatatagatt  
gagagagaagtagtcttccctggatcaacagaggccaggccactccccgtcttgggtcatctatgaagataactaagaggc  
cttcagggatccctgagcgtatctctggctccaattctggggacacagccactctgaccatcagagggaccaggctata  
gatgaggctgactattactgtcaggcgtgggacagcagcgtgatcttcggcggaggggaccaagctgaccgtcctagggt (

30

配列番号:233)

121 - 軽鎖可変領域 (アミノ酸配列)

SYVLTQPPSVSVSPGQTASVTCSGYRLREKYVSWYQQRPGHSPVLVLYEDTKRPSGIPERFSGSNSGDTATLTI RGTQAI  
DEADYYCQAWDSSVIFGGGTKLTVLG (配列番号:212)

121 - 重鎖可変領域 (DNA配列)

cagggtgcagctgggtgcagctctgggggaggcttgggtacagcctggggggctccctgagactctcctgtgcagccactggatt  
cacctttagcagctatgccaatgagttgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtgggtctcagttattagtggta  
gtgggtggtagcacaactacgcagactccgtgaaggggccggtcaccatctccagagacaattccaagaacacgttgtat  
ctgcaaatgaacagcctgagagccgacgacactgccgtgtattactgtgctgctccatfactactctctgatctctgggg  
tcaaggtactctgggtgaccgtctcctca (配列番号:234)

40

121 - 重鎖可変領域 (アミノ酸配列)

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRADDTAVYYCARHYSSDSWGQGLVTVSS (配列番号:199)

【0161】

10) 抗体ROR2クローン#159

159 - 軽鎖可変領域 (DNA配列)

caatctgccctgactcagcctgccctccgtgtctgggtctcctggacagctcgatcaccaatctcctgcactggaaccagcag  
tgacgttgggtggttataactatgtctcttgggtaccaacagcaccaggcaaaagcccccaaatcatgatattatgatgtca  
gtaagcggccctcagggtgttctaatcgctctcttggctccaagtctggcaacacggcctccctgaccatctctgggctc  
caggctgaggacgaggctgatattactgctggctcatctacaagcagcatcacttatgtcttcggaactgggaccaaggt

50

caccgtcctaggt ( 配列番号:235 )

159 - 軽鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKFMIDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI SGL  
QAEDEADYYCGSFTSSI TYVFGTGTKVTVLG ( 配列番号:213 )

159 - 重鎖可変領域 ( DNA配列 )

cagatgcagctgggtgcagctctggggctgagg tgaagaagcc tggggcctcag tgaagg t t t cctgcaaggcatctggata  
caccttcaccagctactataatgcactgggtgcgacaggcccc tggacaagggcttgag tggatgggaataatcaacccta  
gtggtagcacaagctacgcacagaag tccagggcagag taccatgaccagggacacgtccacgagcacag tctac  
atggagctgagcagctgagatctgaggacactgcccgtgtat t actgtgcgcgcgg tgg t tacactgg t tgg tctccgtc  
tga tccgtgggg tcaagg t actctgg t gaccgtctcctca ( 配列番号:236 )

10

159 - 重鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

QMQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMMGII NPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY  
MELSSLRSEDTAVYYCARGGYTGWSPSDPWGQGLTVTVSS ( 配列番号:200 )

【 0 1 6 2 】

11) 抗体ROR2クローン#173

173 - ラムダ軽鎖可変領域 ( DNA配列 )

cagctctgtgtgactcagccacctcag tgtcag tggccccaggaaagacggccaggat tacc t g t g g t g g a g a c a a c a t  
tggacgtaaaagtgtgcactgg taccagcagaagccaggccaggcccc t g t g c t g g t c a t c t a t t a t g a t a g c g a c c g g c  
cctcagggatccctgagcga t t c t c t g g c t c c a c c t c t g g g a a c a c g g c c a c c c t g a c c a t c a g t a g g g t c g a a g c c g g g  
gatgaggccgactat t a c t g t c a g g t g t g g g a t c g t a g t a g t g a c c t t t a t g t c t t c g g a a c t g g g a c c a a g g t c a c c g t  
cctaggt ( 配列番号:237 )

20

173 - ラムダ軽鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGRKSVMHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSTSGNTATLTI SRVEAG  
DEADYYCQVWDRSSDLVYVFGTGTKVTVLG ( 配列番号:214 )

173 - 重鎖可変領域 ( DNA配列 )

caggtgcagctgg tgcag tctggggctgagg tgaagaagcc tggggcctcag tgaagg t c t c c t g c a a g g c t t c t g g t t a  
cacct t t a c c a g c t a t g g t a t c a g c t g g g t g c g a c a g g c c c c t g g a c a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a t g g a t c a g c g c t t  
a a a t g g t a a c a c a a a c t a t g c a c a g a a g c t c c a g g g c a g a g t c a c c a t g a c c a c a g a c a c a t c c a c g a g c a c a g c c t a c  
a t g g a g c t g a g g a g c c t g a g a t c t g a c g a c a c g g c t g t g t a t t a c t g t g c g c g c c a t c t g g g t c c g a t g g g t a t g t a c g a  
c t g g t c t t t c g a t a a a t g g g g t c a a g g t a c t c t g g t g a c c g t c t c c t c a ( 配列番号:238 )

30

173 - 重鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYGII SWVRQAPGQGLEWMMGWI SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAY  
MELRSLRSDDTAVYYCARHLGPMGMWDWSFDKWGQGLTVTVSS ( 配列番号:201 )

【 0 1 6 3 】

12) 抗体ROR2クローン#240

240 - 軽鎖可変領域 ( DNA配列 )

caatctgccctgactcagcctgcc tccgtgtctgggtctcctggacag t cgat caccatctcctgcactggaaccagcgg  
tgacgttggcgg t tataactatgtctcctgg t accaacaccaccaggcaaaagccccaaactcataat t t a t g a t g t c a  
a t a a g c g g c c c t c a g g t t t t c t g a t c g g t t c t c t g g c t c c a a g t c t g g c a a c a c g g c c t c c c t g a c a a t c t c t g g g c t c  
c a g g c t g a g g a c g a g g c t g a t t a t t a c t g c a g c t c a t a t a c a a g c a c c a g c a c c g t c t t c g g c g g a g g g a c c a a g c t g a c  
c g t c c t a g g t ( 配列番号:239 )

40

240 - 軽鎖可変領域 ( アミノ酸配列 )

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSGDVGGYNYVSWYQHHPGKAPKLIIDVNVKRP SGFSDRFSGSKSGNTASLTI SGL  
QAEDEADYYC SSYTSTSTVFVGGGTKLTVLG ( 配列番号:215 )

240 - 重鎖可変領域 ( DNA配列 )

cagatcacct t g a a g g a g t c t g g t c c t g a g c t g g t g a a a c c c a c a c a g a c c c t c a c a c t g a c c t g c a c c t t t t c t g g g t t  
c t c a c t c a g c a c t a g t g g a a t g t c t g t g a g c t g g a t c c g t c a g c c c c a g g g a a g g c c c t g g a g t g g c t t g c a c g c a t t g  
a t t g g g a t g a t g a t a a a t a c t a c a g c a c a t c t c t g a a g a c c a g g c t c a c c a t c t c c a a g g a c a c c t c c a a a a a c c a g g t g  
g t c c t t a c a a t g a c c a a c a c g g a c c c t g t g g a c a c a g c c a c g t a t t a c t g t g c g c g c g g t t t c t a c c t g g c t t a c g g t t c  
t t a c g a t t c t t g g g g t c a a g g t a c t c t g g t g a c c g t c t c c t c a ( 配列番号:240 )

50

## 240 - 重鎖可変領域 (アミノ酸配列)

QITLKESGPELVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVSWIRQPPGKALEWLARIDWDDDKYYSTSLKTRLTI SKDTSKNQV  
VLTMTNTDPVDTATYYCARGFYLAYGSYDSWGGQTLVTVSS (配列番号:202)

【 0 1 6 4 】

## 13) 抗体ROR2クローン#241

## 241 - 軽鎖可変領域 (DNA配列)

tcctatgagctgactcagccactctcagtgctcagtgggccctgggacagacggccaggattacctgtgggggaaacaacat  
tggaaagtaaaaatgtgcactggaccagcagaagccaggccaggcccccctgtgctggctcatctatagggatagcaaccggc  
cctctgggatccctgagcgattctctggctccaactcggggaacacggccaccctgaccatcagcagagcccaagccggg  
gatgaggctgactattactgtcagggtgggacagcagattgtggattcggcggagggaccaagctgaccgtcctagg  
t (配列番号:241)

10

## 241 - 軽鎖可変領域 (アミノ酸配列)

SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRAQAG  
DEADYYCQVWDSIVVFGGGTKLTVLG (配列番号:216)

## 241 - 重鎖可変領域 (DNA配列)

gaagtgcagctgggtgcagctctggggctgaggngaagaagccctggggcctcagtggaaggttctctgcaaggcatctggata  
caccttcaccaattactatatacacctgggtgagcagggccctggacaagggttgagtggaatgggaataatcaacccta  
caagtggtaggacaaggtacgcacagaggttccagggcagagtcaccatgaccagggacacgtccacgaacacagctctac  
atggacctgagcagctgagatctgaagacaccgcatgtattactgtgagcgcctctgggtactactgggggtgtaacgg  
tgatcagtggggtcaaggctactctggtgaccgtctcctca (配列番号:241)

20

## 241 - 重鎖可変領域 (アミノ酸配列)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPTSGRTRYAQRFRVMTTRDTSNTVY  
MDLSSLRSEDAMYYCARSGYYWGVNGDQWGGQTLVTVSS (配列番号:203)

【 0 1 6 5 】

【表 1】

表 1: 抗 ROR2 クロノンの保存された CDR モチーフのアミノ酸配列

抗体 クローン#	HCDR1 (配列番号)	HCDR2 (配列番号)	HCDR3 (配列番号)	LCDR1 (配列番号)	LCDR2 (配列番号)	LCDR3 (配列番号)
ROR2-16	GYFTDY (243)	MNPNSGNS (244)	ARNSEHPWGYDY (245)	SLRSY (246)	GKN (247)	NSRDSGNHLY (248)
ROR2-23	GYRFSKYW (249)	IYPGSDT (250)	ARSSFSFIYDY (251)	QSVSN (252)	GAS (253)	QQYGRSPLT (254)
ROR2-24	GYSFNWW (255)	IYPDSDT (256)	VRPRGAFDI (257)	QQVGIN (258)	DAS (259)	QQYYSFPWT (260)
ROR2-27	GYSFNWW (261)	IYPDSDT (262)	VRPRGAFDI (263)	SSNIGAGHA (264)	DNA (265)	GTWDDSPSAV (266)
ROR2-84	GFTFSYW (267)	IKQDGEK (268)	ARGSFYSIDL (269)	QSLVHSDGNTY (270)	KVS (271)	MQTHHPPT (272)
ROR2-90	GGSSGGY (273)	IYVSGT (273)	ARGGLVWTVSQDV (275)	SSNIGSDY (276)	RND (277)	VAWDDSLSGV (278)
ROR2-93	GFTSNVD (279)	ISYDGSNN (280)	ARSSAWGGFSLCTDD (281)	QSVSSY (282)	DTS (283)	LHVGRSPPT (284)
ROR2-96	GFLNDYY (285)	IRDKAHGDIT (286)	ARWDDYQGYWVWVHD F (287)	QSLVSDGNTY (288)	KVS (289)	MQTHHPPT (290)
ROR2-121	GFTFSVA (291)	ISGSGGT (292)	ARHYSSDS (293)	RLREKY (294)	EDT (295)	QAWDSSVI (296)
ROR2-159	GYFTSY (297)	INPFGGT (298)	ARGGYTGWSPDP (299)	SSDVGGVNY (300)	DVS (301)	GSFTSSITVW (302)
ROR2-173	GYFTSYG (303)	ISAVNGT (304)	ARHLGPMGWDFDX (305)	NIGRKS (306)	YDS (307)	QWDRSSDLVY (308)
ROR2-240	GFLSTSGMS (309)	IDWDDK (310)	ARGFLVAGSYDS (311)	SGDVGGVNY (312)	DVN (313)	SSYTSISTV (314)
ROR2-241	GYFTNYY (315)	INPFGGT (316)	ARSGYVGVGIDQ (317)	NIGSKN (318)	RDS (319)	QWDDSSITVW (320)

10

20

30

【 0 1 6 6 】

RORを標的とするCAR T細胞の合成：

ROR2 scFv配列を用いてROR2を標的とする第二世代CARを作製する。いくつかの実施態様では、ROR2 scFv配列は上記に記載のLCVR、HCVR、LCDR、及びHCDRのいずれかを含む。可変重鎖及び軽鎖 ((Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> リンカーで接続される) 及び検出可能タグ (例えばc-mycタグ) を付加してフローサイトメトリーによるCAR発現の検出を可能にする。必要な場合には、CD28トランスメンブレンドメインの上流にスペーサードメインを含めてCARを最適化する。前記をSFGレトロウイルスベクターにクローニングする。前記レトロウイルスベクターは、CD28及びCD3ゼータ又は4-1BB、又は当業界で周知の他の同様なシグナリングCAR形 (例えばPark (2016)) を含む。安定な293ウイルス生成細胞株を作製し、ウイルス上清を用いて初代ヒトT細胞に形質導入する。コントロールサンプル及び試験サンプルに形質導入する。コントロールサンプルは、レトロウイルス形質導入の前にFoxP3標的因子で処理されない初代ヒトT細胞を含む。試験サンプルは、レトロウイルス形質導入前にFoxP3標的因子 (例えば抗FoxP3/抗CD3二重特異性抗体) で処理された初代ヒトT細胞を含む。コ

40

50



ントロール及び試験サンプルのレトロウイルス形質導入は、Rafiq (2017) 及びKoneru (2015) に記載のように実施される。形質導入に続いて、ROR2-CARに取り込まれたc-mycタグに対して染色し、フローサイトメトリーによってCAR発現を検証する。加えて、コントロール及び試験サンプル中のエフェクター細胞 (FoxP3陰性細胞) 及び免疫抑制細胞 (FoxP3陽性細胞) の数をフローサイトメトリーによって決定する。

【実施例5】

【0167】

選択したscFvフラグメントを用いたROR2を標的とするCAR T細胞の合成

この実施例では、抗原特異的scFvフラグメントを用いてROR2を標的とするCAR T細胞を作製する方法が記載される。ファージディスプレイ技術は抗原特異的scFvフラグメントの迅速な選別及び生産を可能にするが、Fcドメインを有する完全なmAbはscFvを超える多くの利点を有する。第一に、Fc保持抗体のみが、免疫学的機能 (例えば補体依存細胞傷害 (CDC) 及び抗体依存細胞傷害 (ADCC) ) を示す。第二に、二価モノクローナル抗体 (mAb) は、モノマーFab又はscFv Abよりも強力な抗原結合アビディティを提供する。第三に、血中半減期及び腎クリアランスは、完全長IgGと比較してFab又はscFvではるかに急速である。第四に、二価mAbは、対応する一価Fab又はscFvと比較してより迅速に内在化され得る。Fc領域に結合されたアルファ放出体は標的の殺滅に内在化される必要はないが、多くの因子及び毒素が免疫複合体の内在化により利益を得るであろう。

競合ELISA及びフローサイトメトリーを用いて決定されるROR2陽性癌細胞株に対する細胞表面結合を通して得られた親和性ランキングの結果に基づいて、ROR2を特異的に認識する高いROR2結合親和性を有する5つのファージディスプレイクローンを選択して、CAR T細胞について操作する。これらの選択クローンのscFvを完全長ヒトIgG1組換え抗体に再構築し、それら組換え抗体を操作された受容体 (例えばCAR、caTCR、eTCR) に取り込む。

選択したscFvをHEK293細胞を用いて完全長モノクローナルIgGに再構築する。Tomimatsuらの方法を用いる (Tomimatsu et al. (2009) Biosci Biotechnol Biochem 73 (7) 1465-1469)。WO2016142768A1に開示の哺乳動物発現ベクターで、適合するカップ又はラムダ軽鎖定常領域及びIgG1サブクラスFcを用い抗体可変領域を当業界で公知の通常的な技術によりサブクローニングする (WO2016142768A1の図9a及び9bを参照されたい (前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる) )。

【0168】

hIgG1のラムダ軽鎖定常領域の1つの実施態様のポリペプチド配列は、下記の配列番号:322として本明細書で提供される:

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS  
HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号:322)

hIgG1のラムダ軽鎖定常領域の1つの実施態様をコードするコード配列は、下記の配列番号:323として本明細書で提供される:

cagcctaaggccaaccctaccgtgacctgttcccccatcctccgaggaactgcaggccaacaaggccaccctcgtgtg  
cctgatctccgacttctaccctggcgccgtgacctggcctggaaggctgatggatctcctgtgaaggccggcggtggaa  
ccaccaagccctccaagcagtcacaacaacaatacggccctcctcctacctgtccctgaccctgagcagtggaagtcc  
caccggtcctacagctgccaagtgaccacgagggctccaccgtggaaaagaccgtggctcctaccgagtgtccttag (配列番号:323)

hIgG1のカップ軽鎖定常領域の1つの実施態様のポリペプチド配列は、下記の配列番号:324として本明細書で提供される:

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK  
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:324)

hIgG1のカップ軽鎖定常領域の1つの実施態様をコードするコード配列は、下記の配列番号:325として本明細書で提供される:

accgtggccgctccctccgtgttcatcttcccacctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcttctgtcgtgtgcct  
gctgaacaacttctacccccgagggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccccgcagagcggcaactcccaggaat  
ccgtgaccgagcaggactccaaggacagcacctactccctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaag

10

20

30

40

50

cacaaggtgtacgctgccaagtgaccaccaggccctgtctagccccgtgaccaagtttcaaccggggcgagtgtatg ( 配列番号:325 )

【 0 1 6 9 】

hlgG1の重鎖定常領域の1つの実施態様のポリペプチド配列は、下記の配列番号:326として本明細書で提供される:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK ( 配列番号:326 )

10

hlgG1の重鎖定常領域の1つの実施態様をコードするコード配列は、下記の配列番号:327として本明細書で提供される:

gtctcctcagcttccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcggc cctgggctgctggtaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctggtggaactcaggcgccctgaccagcggcgctgc acaccttcccggcgtcctacagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtagccgtgccctccagcagcttgggc acccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaacaccaaggtggacaagaaggttagcccaaatcttgtga caaaactcacatgcccaccgtgccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaccca aggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctgggtggtagcgttagccacgaagacctgagggtcaag tccaactggtagctggagggctgaggggtgataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaaacagcagctaccg tgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaagccc tcccagccccatcgagaaaaccttccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagggtgtacacctgccccatcc cgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgctggtaaaaggttctatcccagcgcacatcgccgtggagt ggagagcaatgggagcgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctaca gcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaac cactacacgcagaagagccttccccgttctccgggtaaatga ( 配列番号:327 )

20

【 0 1 7 0 】

完全長抗ROR2抗体を用いて、ROR2を標的とするCARを作製する。いくつかの実施態様では、ROR2 scFv配列は上記に記載の軽鎖又は重鎖定常領域のいずれかを含む。可変重鎖及び軽鎖 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> リンカーで接続される)及び検出可能タグ(例えばc-mycタグ)を付加してフローサイトメトリーによるCAR発現の検出を可能にする。必要な場合には、CD28 トランスメンブレンドメインの上流にスペーサードメインを含めてCARを最適化する。前記をSFGレトロウイルスベクターでクローニングする。前記レトロウイルスベクターは、CD28及びCD3ゼータ又は4-1BB、又は当業界で周知の他の同様なシグナリングCAR形(例えばPark(2016))を含む。安定な293ウイルス生成細胞株を作製し、ウイルス上清を用いて初代ヒトT細胞に形質導入する。初代ヒトT細胞を含むコントロールサンプル及び試験サンプルに形質導入する。コントロール及び試験サンプルのレトロウイルス形質導入は、Rafiq(2017)及びKoneru(2015)に記載のように実施される。形質導入に続いて、試験サンプルをFoxP3標的因子(例えば抗FoxP3/MHC二重特異性抗体)を補充した培地中で培養し、一方、コントロールサンプルを培地のみで培養する(FoxP3標的因子を補充しない)。続いて、試験サンプル及びコントロールサンプルにおけるCAR発現を、ROR2-CARに取り込まれたc-mycタグに対して染色しフローサイトメトリーによって検証する。加えて、コントロール及び試験サンプル中のエフェクター細胞(FoxP3陰性細胞)及び免疫抑制細胞(FoxP3陽性細胞)の数をフローサイトメトリーによって決定する。

30

40

【 実施例 6 】

【 0 1 7 1 】

FoxP3標的因子を用いるpMSCV-602-90GA-BBz-ires-EGFP CAR及びpMSCV-901scFv-BBz-ires-EGFP CARの合成

この実施例では、FoxP3標的因子を用いるpMSCV-602-90GA-BBz-ires-EGFP CAR及びpMSCV-901scFv-BBz-ires-EGFP CARの合成方法が記載される。抗ROR2抗体を操作してキメラ抗体受容体にして、レトロウイルス哺乳動物発現系によりT細胞の表面で発現させる。PG13(G

50

al V偽型)パッケージング細胞株をpMSCVプラスミドのトランスフェクションに用いる。ヒトT細胞を、インターロイキン-2(30U/mL)の存在下でCD3/CD28ビーズ(Dynabeads(商標)(Invitrogen))で4日間刺激及び増殖させた後で形質導入に用い(コントロールサンプル)、一方、さらに加えてFoxP3標的因子(例えば抗FoxP3抗体)で処理する。PG13ウイルス生成細胞株のトランスフェクションから48及び72時間後のPG13パッケージング細胞株の無細胞上清をろ過し、レトロネクチン(Takara)被覆6ウェルプレートのT細胞に適用する。

形質導入効率は、ビオチン化タンパク質-L(一次)抗体(GeneScript)及びPE-結合(二次)抗体(BD Biosciences)を用いFACSによって評価される。加えて、コントロール及び試験サンプル中のエフェクター細胞(FoxP3陰性細胞)及び免疫抑制細胞(FoxP3陽性細胞)の数をFACSによって決定する。その後、72時間で及び3-4日毎に繰り返しFACS分析を実施する。

10

#### 【実施例7】

#### 【0172】

##### FoxP3標的因子を用いるWT1標的CAR T細胞の合成

この実施例では、WT1を標的とするCARを発現する操作された免疫細胞の作製方法が記載される。ESK1 scFv配列を用いて、WT1を標的とする第二世代CARを作製する。ESK1 scFvアミノ酸及びヌクレオチド配列の非限定的な例は下記の表に示される。可変重鎖及び軽鎖(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>リンカーで接続される)及び検出可能タグ(例えばc-mycタグ)を付加してフローサイトメトリーによるCAR発現の検出を可能にする。必要な場合には、CD28トランスメンブレンドメインの上流にスペーサードメインを含めてCARを最適化する。前記をSFGレトロウイルスベクターでクローニングする。前記レトロウイルスベクターは、CD28及びCD3ゼータ又は4-1BB、又は当業界で周知の他の同様なシグナリングCAR形を含む(例えば、Park (2016) Blood 127(26):3312-20)。安定な293ウイルス生成細胞株を作製し、ウイルス上清を用いて初代ヒトT細胞に形質導入する。ウイルス上清を用いてコントロールサンプルにレトロウイルスにより形質導入し、一方、試験サンプルにはFoxP3標的因子(例えば抗FoxP3抗体)を補充したウイルス上清を用いてレトロウイルスにより形質導入する。レトロウイルス形質導入は文献に記載されたように実施する(Rafiq et al. (2017) Leukemia 31(8):1788-1797; 及びKoneru et al. (2015) Oncoimmunology 4(3):e994446)。形質導入に続いて、CAR発現を、WT1-CARに取り込まれたc-mycタグに対して染色し、フローサイトメトリーによって検証する。加えて、コントロール及び試験サンプル中のエフェクター細胞(FoxP3陰性細胞)及び免疫抑制細胞(FoxP3陽性細胞)の数をフローサイトメトリーによって決定する。

20

30

#### 【0173】



## 【 0 1 7 4 】

Foxp3ペプチド/HLA-A\*02複合体と反応するTCR模倣モノクローナル抗体を用いる制御性T細胞の枯渇

腫瘍のミクロ環境におけるT制御性細胞 (Treg) の枯渇は、癌免疫療法の成功のための重要な戦略の1つである。しかしながら、Treg枯渇のための従来のアプローチは特異性の欠如による制約がある。従来のアプローチはまた抗腫瘍エフェクターT細胞の同時枯渇を生じる。転写因子フォークヘッドボックスp3 (Foxp3) は、Tregの発達及び抑制機能で中心的な役割を果たしてTreg排除のための理想的な因子であろうが、Foxp3は細胞内にあり薬を開発しにくいタンパク質である。T細胞受容体模倣mAbが作製され、Foxp3-#32と命名された。前記mAbは、HLA-A\*02:01との関係においてFoxp3-由来エピトープと反応性である。mAb Foxp3-#32は、CD4+CD25+CD127低かつFoxp3+であるTreg及びTreg様T悪性細胞株 (Foxp3及びHLA-A\*02:01の両方を発現する) を選択的に認識して、ADCCを介してこれらを枯渇させる。細胞内Foxp3エピトープを標的とするTCRm mAbはしたがって、ヒト癌の免疫療法の設定でTregを枯渇させる新規なアプローチであり得る。

10

材料と方法ペプチド合成 :

この研究で用いられるペプチドはいずれも業者から購入された (Genemed Synthesis, Inc., San Antonio, TX)。ペプチドは無菌的で、80%から90%を超える純度であった。ペプチドをDMSOに溶解し食塩水で5mg/mLに希釈して-80°Cで保存した。HLA-A\*02:01のために用いられたコントロールペプチドは、ユーイング肉腫由来ペプチドEW (QLQNPSYDK) 及びコリントランスポーター様タンパク質4由来ペプチドCT (KLLLVGGVGV) であった。ピオチン化単鎖Foxp3p/HLA-A\*02:01複合体は、ペプチドを組換えHLA-A\*02及びベータ2ミクログロビン (2M) と共にエウレカファーマシューティクス社 (Eureka Therapeutics, Inc., Emeryville, CA) で再折畳みすることによって合成された。

20

## 【 0 1 7 5 】

サイトカイン、抗体及び細胞 :

ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン (IL)-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$  及びプロスタグランジンE2 (PGE2)、TGF- $\beta$  は、業者 (R&D Systems, Minneapolis, MN) から購入した。ベータ2-ミクログロブリン (2-m) 及びヒトIFN- $\gamma$  は、業者 (Sigma, St. Louis, MO) から購入した。CD14及びCD3に関する細胞単離キットは、業者 (Miltenyi Biotec., Bergisch Gladbach, Germany) から購入した。ヒトTreg単離キットは、業者から購入した (Stem Cell Technology, Canada)。Foxp3+及びHLA-A\*02:01+皮膚Tリンパ腫細胞株MAC-1及びMAC-2Aは、アンダーソン博士 (Dr. Mads H. Anderson, at University of Denmark) から寄贈された。ヒトT白血病ウイルス (HTLV) 陽性細胞株C5MJは、ラデンスキー博士 (Dr. Alexander Rudensky laboratory (MSK, New York) から寄贈され、前記細胞に文献 (Latouche et al. (2000) Nat Biotech 18:405-409) に記載のようにHLA-A\*02:01分子を形質導入した。HLA-A\*02:01 SFGベクターはMSKCCのサデレイン博士 (Dr. Michelle Sadelain) から寄贈された。Luc/GFPをコードするプラスミドを含むレトロウイルスベクターを用いて、MAC-1及びMAC-2A細胞株を操作し、高レベルのGFP-ルシフェラーゼ融合タンパク質を発現させた。10%FCS、ペニシリン、ストレプトマイシン、2mmol/L-グルタミン及び2-メルカプトエタノールを補充したRPMI1640で、細胞株を37°C/5%CO2で培養した。マイコプラズマについて定期的に細胞をチェックした。mAb表現型又は遺伝子型によって、細胞の同一性を確認した。スローンケタリング研究所 (Memorial Sloan-Kettering Institution) 審査委員会承認プロトコルに関してインフォームドコンセントを得た後で、健康なドナーから末梢血単核細胞 (PBMC) を及び外科手術を受けた卵巣癌患者から腫瘍サンプルを入手した。

30

40

マウスIgG1のFoxp3-#32二重特異性抗体 (フローサイトメトリー用) 及びそれらのそれぞれのコントロールをエウレカファーマシューティクス社で作製した (Veomett et al. (2014) Clin Cancer Res 20 (15): 4036-4046; Dao et al. (2015) Nat Biotech 33 (10): 1079-1086)。Foxp3-#32のマウスIgG1形及びそのコントロールへのAPC結合は、ライトニ

50

ング-リンクAPC抗体標識キットを製造業者 (Novus Biologicals) の指示にしたがって用いることによって実施した。以下に対するmAbは業者 (BD Biosciences, San Diego, CA) から購入した: ヒトHLA A\*02 (クローンBB7.2)、そのアイソタイプコントロールマウスIgG2b (クローンMPC-11)、ヒトCD3 (クローンHIT3A及びOKT3)、CD4 (クローンRPA-T4)、CD8 (クローンRPA-T8)、CD25 (クローン2A3)、CD33 (クローンWM53)、マウス抗HisタグmAb (クローンF24-796) (FITC又はPEに結合される)。以下に特異的なmAbは業者 (eBioscience) から購入した: ヒトFoxp3クローンPCH101、そのアイソタイプコントロールラットIgG2aカッパ、クローン236A/E7及びそのアイソタイプコントロールマウスIgG1カッパ、CD4 (クローンOKT4)、CD127 (クローンHIL-7R-M21)。細胞内染色のための固定及び透過性処理キットは業者から購入した。

10

## 【0176】

フローサイトメトリー分析:

細胞表面染色のために、細胞を30分間氷上で適切なmAbとインキュベートして洗浄し、さらに必要な時には二次抗体試薬とインキュベートした。Foxp3-#32二重特異性mAb染色のためには、ヒトT細胞又は癌細胞を種々の濃度のFoxp3-#32二重特異性mAb又はコントロール二重特異性mAbと30分間氷上でインキュベートして洗浄し、さらにHis-タグに対する二次mAbとインキュベートした。フローサイトメトリーデータをベックマンディッキソソフオルテサ (Beckman Dickinson Fortesa) で収集し、FlowJo9.8.1及びFlowJo10ソフトウェアで分析した。

20

in vitro刺激及びヒトT細胞:

HLA-A\*02:01の健康なドナー由来のPBMCをフィコール密度遠心分離によって入手する。磁性ビーズに結合させたヒトCD14に対するmAbを用いて、CD14+単球を陽性選別によって単離し、T細胞の第一の刺激に用いた。汎T細胞単離キットを用い負の免疫磁性細胞分離により、PBMCのCD14-画分をCD3の単離に用いた。細胞の純度は常に98%を超えていた。5%自己血漿 (AP)、20 µg/mL合成ペプチオ、2 µg/mL 2-m、及び5 - 10ng/mLのIL-15を補充したRPMI1640の存在下で、7日間T細胞を刺激した。1%AP、500ユニット/mL組換えIL-4及び1,000ユニット/mL GM-CSFを補充したRPMI1640中で細胞を培養することによって、単球由来樹状細胞 (DC) をCD14+細胞から生成させた。インキュベーション2日目及び4日目に、IL-4及びGM-CSFを含む新しい培養液を添加するか、又は培養液の半分を入れ替えた。5日目に、20 µg/mLのクラスIIペプチドを未成熟DCに添加した。6日目に、成熟サイトカインカクテル (IL-4、GM-CSF、500 IU/mL IL-1、1,000 IU/mL IL-6、10ng/mL TNF- $\alpha$ 、及び1 µg/mL PGE-2) を添加した。7又は8日目に、T: APC比が30:1の成熟DCを用いIL-15によりT細胞を再刺激した。抗原提示細胞 (APC) として自己DC又はCD14+細胞を用い、同じ態様で細胞を3から5回刺激した。最終刺激から1週間後に、ペプチド特異的T細胞応答を、IFN- $\gamma$  ( ) 酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイによって試験した (May et al. (2007) Clin Cancer Res 13: 4547-4555; Dao et al. (2009) Plos One 4(8): e6730)。

30

## 【0177】

IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイ:

HA-マルチスクリーンプレート (Millipore) をPBS中のマウス抗ヒトIFN- $\gamma$  抗体 (10Ag/mL; クローン1-D1K; Mabtech) の100 µLで被覆し、一晚4°Cでインキュベートし、PBSで洗浄して非結合抗体を除去し、RPMI1640/10%自己血漿 (AP) で37°C2時間ブロックした。CD3+T細胞を自己CD14+ (E: APC比、10:1) 又は自己DC (E: APC比、30:1) のどちらかとともにプレートした。多様な試験ペプチドをウェルに20 µg/mLで加えた。陰性コントロールウェルは、APC及びT細胞をペプチド無しで又は無関係のペプチドとともに含んでいた。陽性コントロールウェルは、T細胞 + APC + 20 µg/mLのフィトヘマグルチニン (PHA; Sigma) を含んでいた。全条件を3複製で実施した。マイクロタイタープレートを37°Cで20時間インキュベートし、続いてPBS/0.05%Tweenで十分に洗浄し、ヒトIFN- $\gamma$  に対する100 µL/ウェルのビオチン化検出抗体 (2 µg/mL; クローン7-B6-1; Mabtech) を添加した。プレートをさらに2時間37°Cでインキュベートし、スポットを文献 (7-9) の記載にしたがって発生させた。スポット数は、コンピューター補助ビデオ画像アナライザーでKS ELISPOT

40

50

4.0ソフトウェア (Carl zeiss Vision) により自動的に決定された (May et al., 2007 及び Dao et al., 2009)。

#### <sup>51</sup>クロム放出アッセイ:

特異的なCTLの存在を文献の記載に (May et al., 2007 及び Dao et al., 2009) にしたがって標準的なクロム放出アッセイで測定した。簡単に記せば、 $\text{Na}_2 \text{}^{51}\text{CrO}_4$  (NEN Life Science Products, Inc.) の50  $\mu\text{Ci}/100$ 万細胞を用いて標的細胞を標識した。十分に洗浄した後で、標的細胞を種々のエフェクター: 標的比 (E:T) のT細胞とともにインキュベートする。全条件を3複製で実施した。プレートを5%  $\text{CO}_2$  下で4-5時間インキュベートした。上清を採集し、放射能をガンマカウンターで測定した。特異的溶解パーセンテージを下記式により決定した: [(実験における放出 - 偶発放出)/(最大放出 - 偶発放出)]  $\times$  100%。最大放出は、1% SDSにおける放射性標識標的の溶解によって決定された。

10

#### **【 0 1 7 8 】**

#### ファージスクリーニング、Foxp3由来エピトープに特異的なscFvの選別:

mAbクローンの選別のために、ヒトscFv抗体ファージディスプレイライブラリー (7  $\times$  10<sup>10</sup> クローン) を以前に記載されたように用いた (Dao et al. (2013) Sci Transl Med 5(176): 176ra33; Chang et al. (2017) J Clin Invest 127 (7): 2705-2718)。簡単に記せば、無関係のピオチン化ペプチド/HLA-A\*02:01複合体を用いて、HLA-A\*02:01と結合する可能性がある一切のクローンを除去した。残りのクローンをFoxp3p/HLA-A\*02:01複合体についてスクリーニングした。選別クローンを3-4回の精選ラウンドで濃縮した。ピオチン化単鎖Foxp3/HLA-A\*02:01複合体に対して標準的ELISAの方法によって陽性クローンを決定した。陽性クローンをさらに、生細胞上のペプチド/HLA-A\*2複合体とのそれらの結合についてTAP-欠損、HLA-A\*02:01+細胞株、T2 (内因性HLA関連ペプチドの提示が不完全である) を用い、フローサイトメトリーによって試験した。無血清RPMI1640培養液中で20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の2Mの存在下で、T2細胞を陽性ペプチド及び複数のコントロールペプチド (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いてパルス処理した。細胞を洗浄し、下記の工程で染色を実施した。まず初めに細胞を精製scFvファージクローンで染色し、続いてマウス抗M13 (バクテリオファージ) mAbで染色し、最後にFITC又はPE結合ヤギFab2抗マウスIgGで染色した。各染色工程を氷上で30-60分実施し、細胞を各染色工程の間に2回洗浄した (Dao et al., 2013 及び Chang et al., 2017)。

20

#### 選別scFvフラグメントを用いて完全長ヒトIgG1を操作する:

文献 (Dao et al., 2009) の記載のように、選別ファージクローンの完全長ヒトIgG1をHEK293及びチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株で生成した。簡単に記せば、適合ラムダ又はカッパ軽鎖定常配列及びIgG1サブクラスFcを用いて、抗体可変領域を哺乳動物発現ベクターでサブクローニングした。精製完全長IgG抗体の分子量を還元及び非還元条件下で電気泳動により測定した。

30

#### **【 0 1 7 9 】**

#### Foxp3-#32二重特異性mAbの構築、発現及び精製:

典型的二重特異性T細胞嵌合因子のFoxp3-#32二重特異性様式は、以前に記載されたように (Veomett et al., 2014) 操作して得られた。mAb Foxp3-#32 scFvのN-末端を、マウスモノクローナル抗体の抗ヒトCD3 scFvのC-末端に可撓性リンカーによって連結した。2つのmAbのscFvをコードするDNAフラグメントをGeneArt (Invitrogen) によって合成し、標準的なDNA技術を用いてエウレカの哺乳動物発現ベクターpGSN-Hygでサブクローニングした。二重特異性mAbの検出及び精製のために、6ヒスタミン (His) タグをFoxp3-#32二重特異性mAbの下流でC-末端に挿入した。

40

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞にFoxp3-二重特異性mAb発現ベクターをトランスフェクトし、メチオニンスルフォキシミン (MSX)、グルタミンシンターゼ (GS) による方法を用いる標準的な因子選別によって安定な発現を達成した。分泌されたFoxp3-#32二重特異性mAb分子を含むCHO細胞上清を収集した。Foxp3二重特異性mAbをHisTrap HPカラム (GE healthcare) を用いFPLC AKTA系によって精製した。簡単に記せば、CHO細胞培養を清澄化し、低イミダゾール濃度 (20mM) でカラムにローディングし、続いて無勾配高イ

50

ミダゾール濃度の溶出緩衝液（500mM）を用いて結合Foxp3二重特異性mAbタンパク質を溶出させた。Fox3-#32 scFvの代わりに無関係のヒトIgG1抗体（Cat#ET901, Eureka Therapeutics）から陰性コントロール二重特異性mAb抗体を構築した。

Foxp3ペプチド/HLA-A\*02:01複合体に対する完全長ヒトIgG1の特徴付け：

Foxp3ペプチド/A2複合体に対する完全にヒトのIgG1 mAbの特異性を、Foxp3ペプチド若しくは種々のアナログ又はコントロールペプチドでパルスした又はパルスしないT2細胞の直接又は間接染色によって決定した。フローサイトメトリーによって蛍光強度を測定した。同じ方法を用いて、細胞株とmAbの結合を決定した。

【0180】

Treg生成、表現型分析及びFoxp3-#32 mAb結合：

CD4+ T細胞を健康なHLA-A\*02:01陽性ドナー由来PBMCからFACS仕分けによって精製し、刺激細胞及びフィーダー細胞としてアロPBMC（HLA-A\*02:01陰性）（エフェクター：刺激細胞（E:S）は1:5-10）により、又は腫瘍細胞（E:Sは1:1）により組換えヒトIL-2（100ユニット）及びTGF- $\beta$ （10ng/mL）の存在下で1から2週間刺激し、さらに同じ刺激を繰返してTreg細胞を維持した（Levings et al. (2002) J Exp Med 196(10): 1335-1346 ; Lu et al. (2010) Plos One 5(12): e15150 ; Godfrey et al. (2004) Blood 104 (2): 453-461）。Treg表現型を、APC結合CD4、CD25+、CD127、CD45RA、マウスFoxp3 mAb-Foxp3-#32を用い氷上で30分の細胞表面染色し、洗浄することによって決定した。Foxp3発現は、ヒトFoxp3（クローンPCH101、又はそのアイソタイプコントロールラットIgG2aカッパ）に対するmAbによる細胞内タンパク質染色を実施し、Cytofix/CytoPermキット（eBiosciences）を製造業者の指示にしたがって用いて測定した。分析はベックマンディッキソンフォルテサでフローサイトメトリーによって実施した。

【0181】

HLA-A\*02:01の関係でTregに特異的なFoxp3-#32二重特異性mAbの細胞傷害性：

4つの方法を用いてFoxp3-#32二重特異性mAbによるTregに対するADCCを測定した。第一に、ナチュラルTregについて、HLA-A\*02:01陽性又は陰性である健康なドナーに由来するPBMCを、1  $\mu$ g/mLのFoxp3-#32二重特異性mAb若しくは無関係コントロール二重特異性mAbの存在下又は非存在下で1から3日間インキュベートした。細胞を採集して洗浄し、CD4、CD25、CD127、CD45RAに対するmAbで染色し、続いてFoxp3に対するmAb又はそのアイソタイプコントロールで細胞内染色を実施した。Treg減少は十分に定義されたTregマーカーの発現で評価した。簡単に記せば、リンパ球を前方及び側方散乱光によりゲート分類し、続いてCD4+CD127高又はCD4+CD127低集団についてゲート分類した。CD4+CD127高又はCD4+CD127低集団をさらにまた、Tregマーカーの2セット（CD25対Foxp3、又はCD45RA対Foxp3）によって決定した。第二に、ナチュラルTregは数パーセントのCD4+ T細胞を有するだけであるので、したがってTreg殺滅で十分な読取りを得るために、生成Tregはまた標的としてin vitroで用いられた。Tregの殺滅は、フローサイトメトリーによるTreg集団の減少によって決定された。簡単に記せば、エフェクターとして用いられたHLA-A\*02:01陰性ドナーから陰性選別によって精製されたCD3T細胞を、HLA-A\*02:01+ドナーから生成したTregとE:T比5:1で、Foxp3-#32二重特異性mAb（1  $\mu$ g/mL）若しくはそのコントロール二重特異性mAbの存在下又は非存在下で一晩インキュベートした。細胞を洗浄し、CD4、CD25、Foxp3及びHLA-A\*02に対するmAbで染色した。HLA-A\*02陽性細胞をゲート分類し（Treg標的として）、HLA-A\*02:01+細胞中のCD4+CD25+Foxp3+細胞のパーセンテージの減少を、エフェクターのみ又はエフェクター+コントロール二重特異性mAb下のコントロール培養と比較することによって、Treg殺滅を決定した。第三に、<sup>51</sup>Cr-放出アッセイによるADCCで、Treg様Tリンパ腫細胞株MAC-2A、又は白血病細胞株C5MJ/A2（Foxp3+/HLA-A\*02:01+）を標的として用いた。第四に、<sup>51</sup>Cr-放出アッセイは長期ADCCの決定には利用できないので、in vitro生体発光画像化（BLI）を用いてFoxp3-#32二重特異性mAbのADCC活性を試験した。簡単に記せば、HLA-A\*02:01陰性ドナー由来のPBMCを、GFP/ルシフェラーゼを形質導入したMAC-1又はMAC-2A（E:T比は30:1）とともに、Foxp3-#32二重特異性mAb又はそのコントロール二重特異性mAb（1  $\mu$ g/mL）の存在下で3日間インキュベートし、続いて画像化の前に各ウェルに3

10

20

30

40

50



0 µgのルシフェリンを添加した。腫瘍増殖を3複製のマイクロウェル培養の発光シグナルの平均によって算出した。

加えて、mAbが正常細胞に対して何らかの非特異的又はオフターゲット毒性を示すか否かを調べるために、HLA-A\*02:01陽性又は陰性の健康なドナーからのPBMCを、0.2若しくは1 µg/mLのFoxp3-#32二重特異性mAb又はそのコントロール二重特異性mAbの存在下若しくは非存在下で一晩インキュベートした。細胞を洗浄し、ヒトCD3、CD19及びCD33に対するmAbで染色し、これらの細胞系列が特異的mAbによって殺滅されるか否かを決定した。全細胞数はトリパンブルー排除染色によって測定した。

#### 抗体依存細胞性細胞傷害 (ADCC) :

ADCCに用いられる標的細胞は、Foxp3-TL1p又は無関係のコントロールペプチドでパルスされた若しくはパルスされないT2細胞、又はFoxp3+及びHLA-A\*02:01+又は陰性細胞株、MA C2A、C5MJ/A2、C5MJ、Jurkat及びHL-60であり、前記はペプチドでパルスされなかった。種々の濃度のFoxp3-#32二重特異性mAb又はそのアイソタイプコントロールを、標的細胞及び新鮮なPBMC、又はHLA-A\*02:01-ドナー由来の活性化T細胞(種々のE:T比)とともに4-5時間インキュベートした。細胞傷害性は標準的な<sup>51</sup>Cr-放出アッセイによって測定した。エフェクターとして活性化T細胞を用いるときは、負の選別によって単離したCD3 T細胞を、ダイナビーズヒトTアクチベーターCD3/CD28 (Gibco™ 11131D, Gibco) で5-7日間刺激した。

#### 【0182】

##### 結果

#### HLA-A\*02:01の関係のFoxp3由来エピトープの選別 :

T細胞応答を誘導し得るFoxp3に由来するエピトープに関する情報はほとんどない。したがって、Foxp3に対して傷害性CD8 T細胞を発生させる可能性がある免疫原性エピトープを同定した。全ヒトFoxp3タンパク質配列を、3つのコンピュータ依存予想アルゴリズム、BIMAS ([www.bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken\\_parker\\_comboform](http://www.bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform))、SYFPEITHI ([www.syfpeithi.de/](http://www.syfpeithi.de/)) 及びRANKPEP ([bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html](http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html)) を用いてスクリーニングし、HLA-A\*02:01に対する潜在的な高親和性結合分子を同定した。HLA-A\*02:01分子との関係におけるCD8 T細胞に関するヒトFoxp3に由来する多数の潜在のエピトープを選択し、当該ペプチドが特異的なCD8 T細胞応答を誘発することができるか否かを試験した(表3)。重要な事に、全ての選択HLA-A\*02:01結合ペプチドがC-末端で切断されることが予想され、プロテアソームによってプロセッシングされるより高い確率が示唆された。

表3 : Foxp3由来ペプチドの配列

位置	配列
p344-353	TLIRWAILEA (配列番号:328)
p252-260	KLSAMQAHL (配列番号:329)
p390-398	SLHKCFVRV (配列番号:330)
p304-312	SLFAVRRHL (配列番号:331)
p388-396	NLSLHKCFV (配列番号:332)
p95-103	LLQDRPHFM (配列番号:333)
p69-77	LQLPTLPLV (配列番号:334)

#### 【0183】

#### HLA-A\*02:01分子状況下のペプチド特異的T細胞応答 :

コンピュータアルゴリズムがin vitro及びin vivo活性を常に予測するとは限らないので、予測されるペプチドが、T2細胞におけるHLA-A\*02結合により、HLA-A\*02:01+ドナーからのペプチド特異的CD8 T細胞を刺激する能力による当該予測ペプチドの免疫原性を試験した。最初に、7つのペプチドを選択してT細胞応答を試験した(表3)。7ペプチドのうち6つが(ペプチド304-312が除かれる)、複数のドナーで一定してペプチド特異的T細胞

胞応答を誘発した。ヒトFoxp3は関連するタンパク質の大きなフォークヘッドファミリーのメンバーであるので、このファミリータンパク質内で共有される潜在的なオプターゲットを回避するために、他の免疫原性エピトープから特にペプチドTLIRWAILLEA (位置344 - 353; "TLI") を、焦点を当てるべきもののエピトープとして選択した。なぜならば、TLIは他のFoxpファミリーメンバー (例えばFox1、2及び4) と最小限の相同性を有するからである。興味深いことに、このペプチドはまた強力なペプチド特異的CD8+ T細胞応答を誘発することが示され、前記細胞応答はFoxp3+/HLA-A\*02:01+皮膚リンパ腫細胞を認識する (Larsen et al. (2013) Leukemia 27: 2332-2340)。

複数のHLA-A\*02:01+ドナーからのCD3+ T細胞をTLIペプチドで3から5回刺激し、ペプチド特異的T細胞応答をIFN- ELISPOT及び<sup>51</sup>Cr放出アッセイによって測定した。4ラウンドの刺激後、T細胞は、TLIペプチドでパルスした自己CD14+単球を認識したが、CD14+APCのみ又は無関係のHLA-A\*02:01結合ペプチドEWでパルスしたものはIFN- ELISPOTアッセイで認識しなかった (図1A)。重要なことに、T細胞応答はまた、HLA-A\*02:01+Foxp3+皮膚リンパ腫細胞株MAC-1及びMAC-2Aに対して観察されたが、Foxp3陰性/HLA-A\*02:01陰性T白血病細胞株Jurkatでは観察されず、TLI刺激T細胞は、HLA-A\*02:01分子によって提示される天然にプロセッシングされたFoxp3エピトープを認識する可能性があることを示唆する (図1B)。IFN- 分泌の結果と一致して、TLIペプチド刺激T細胞は、TLIペプチドパルスT2細胞並びにペプチド非パルスMAC-1及びMAC-2A細胞を殺滅したが、HLA-A\*02:01陰性Foxp3+細胞株、HL-60は殺滅しなかった (図1C及びD)。

#### 【0184】

HLA-A\*02:01分子の状況下におけるFoxp3ペプチドTILに特異的なTCR模倣mAbのファージディスプレイ技術による選別:

Foxp3-TILペプチドは、Foxp3タンパク質発現腫瘍細胞を認識する、エピトープ特異的T細胞応答を誘発することができることを確認することによって、TLI/HLA-A\*02:01複合体に特異的なTCRm mAbが、以前に記載のファージディスプレイ技術 (Dao et al., 2013) によって生成された。TLI又はコントロールペプチドでパルスした生T2細胞との結合について選別クローンを試験した。TILペプチド無し又はHLA-A\*02:01結合とは無関係のペプチドによるT2細胞との結合を示したクローンはいずれも除去した。これらのデータ並びにFoxp3及びHLA-A\*02:01を発現する生細胞との結合に基づいて、8つのscFvクローンを更なる特徴付けのために選択した。

Foxp3-TIL/HLA-A\*02:01複合体に特異的な二重特異性mAbの特徴付け:

TCR及びTCRmの標的に関する細胞表面エピトープ密度は、細胞表面タンパク質を認識する典型的なmAbに対する標的よりも50 - 100倍低いと予想され、そのことは細胞溶解活性を制限する可能性がある。したがって、TCRmの細胞傷害性を増強する戦略として、Foxp3-TLIペプチド/HLA-A\*02:01複合体と反応する8つの選別クローンの二重特異性T細胞嵌合 (二重特異性mAb) 構築物を作製した (Dao et al., 2015)。この二重特異性mAbを、Foxp3-TIL若しくは無関係ペプチドでパルスした又はパルスしなかったT2細胞、さらにまたペプチドでパルスしなかった細胞株MAC-1、MAC-2A及びJurkatに対して試験した。全ての二重特異性mAb構築物がFoxp3-TILペプチドでパルスしたT2細胞との結合を示したが、それらのいずれもT2細胞のみ又はコントロールペプチド処理T2細胞とは結合しなかった。さらにまた、二重特異性mAb Foxp3-#32だけがMAC-1及びMAC-2A細胞の両方と結合し、前記mAbは天然にプロセッシングされたエピトープを認識するために十分なアビディティを有することを示唆した (図2AはMAC-2Aのデータを示す)。Foxp3-#32二重特異性mAbはまたCD3+T細胞株Jurkatと結合し、二重特異性mAbの抗CD3アームによるCD3との結合を示した。Jurkat細胞との非特異的結合を排除するために、Foxp3-#32 mAbのマウスIgG1形を用いて、MAC-2A及びJurkat両細胞との結合を試験した。mAb-Foxp3-#32はMAC-2Aとのみ結合しJurkatとは結合せず (図2B)、当該結合はHLA-A\*02:01発現を必要とすることが確認された (MAC-2AはHLA-A2陽性であるがJurkatはそうではない (図2C))。

当該ペプチドに対するFoxp3-#32 mAbのアミノ酸特異性はさらにまた、TLIペプチドアナログでパルスしたT2細胞とのFoxp3-#32二重特異性mAbの結合によって分析された。TLI

ペプチドを1、2、3、4、5、7、8及び9位でアラニンにより又は10位でグリシンにより置換した。6位はすでにアラニンでありそのままにした。変異ペプチドをT2細胞にローディングし、Foxp3-二重特異性mAb結合について試験した。2、5、8、9又は10位におけるアラニン又はグリシン置換はFoxp3-二重特異性mAb結合を大きく低下させ、4及び7位のアラニン置換もまたFoxp3-#32 mAb結合を低下させたが、自然のままのTILペプチドと比較してその度合いは小さかった(図3A)。2位における結合の低下及び10位における小さな度合いの結合の低下は、HLA-A\*02分子とのペプチド結合の低下のためであろう。なぜならば、両ペプチドはT2安定化アッセイで結合低下を示したからである。一方、4及び7位における変化は結合を高める(図3B)。全体として、mAb Foxp3-#32は結合のためにペプチド全体におけるアミノ酸要求性を示した。これらの結果はさらにまた、TLIペプチド/HLA-A\*02:01複合体に対するFoxp3-二重特異性mAbの特異性を示した。

10

【0185】

Foxp3-#32 mAbによるヒトTreg並びにFoxp3及びHLA-A\*02:01を発現する腫瘍細胞の認識

:

Foxp3-#32 mAbは、TLIペプチドでパルスしたT2細胞との選択的結合を示したが、TLIエピトープがプロセッシングされ、天然に存在するTreg及び誘発TregでHLA-A\*02:01分子によって提示されるか否かを試験することは極めて重要であった。健康なドナーからのHLA-A\*02:01陽性又は陰性PBMC由来のTregとのFoxp3-#32 mAbの結合を比較した。CD4+ T細胞をCD25高/CD127低集団(天然のTregの特徴)についてゲート分類した。Foxp3-#32 mAbによる結合は、HLA-A\*02:01+ドナーからのアイソタイプコントロールと比較して主としてCD4+ CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>集団で観察されたが(図4A、下段右のヒストグラム)、CD4+CD25<sup>int/hi</sup>CD127<sup>hi</sup>細胞では観察されなかった(図4A、下段左のヒストグラム)。mAb Foxp3-#32は、HLA-A\*02:01陰性ドナーからの同じCD4+CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> Treg集団と結合せず(図4B)、HLA-A\*02:01陽性ドナーからのCD3/CD8二重陽性T細胞とも結合しなかった(補充の図1A)。

20

研究のために相当数のTregを生じる、in vitroでTregを作製する多くの方法がある(Levings et al., 2002; Lu et al., 2010; Godfrey et al., 2004)。したがって、Foxp3-#32 mAbsがまた誘導性Tregを認識する可能性があるか否かを試験するために、アロPBMC又はMAC-2A腫瘍細胞による(腫瘍細胞はTregを誘発することが示されたからである(上掲書))HLA-A\*02:01+ドナー由来の精製CD4+ T細胞の反復刺激によってIL-2及びTGF- $\beta$ の存在下でTregクローンを作製した。腫瘍刺激によって生成されたT細胞は、74%のCD4+CD25+細胞の集団を生じ(図5A、上段左パネル)、細胞質内Foxp3タンパク質及びFoxp3-#32 mAbの両方について陽性であった(図5A、下段左パネル)。二重アイソタイプコントロールはFoxp3タンパク質ともFoxp3-#32 mAbとも結合を示さなかった。CD4+CD25+集団をゲート分類したとき、mAb Foxp3-#32の強い結合が、そのアイソタイプコントロールと比較して示された(図5A、上段右パネル)。mAb-Foxp3-#32のCD4+CD25陰性集団との弱い結合が認められた。同様な結果がまた、HLA-A\*02:01陰性ドナーを用いたアロPBMC刺激によって得られたTregで観察された(図5B)。同じゲート分類マーカーを保持するTregに加えて、Foxp3は、活性化CD4 T細胞で一過性に発現され得るという可能性、又はアービトラルゲートは必ずしもTreg集団を厳密に反映し得ないという可能性がある。にもかかわらず、これらの結果は、Foxp3-#32 mAbは2つの異なる調製方法に由来するヒトTreg細胞を認識できることを示している。

30

40

【0186】

多くのタイプのヒト癌がFoxp3を発現し、Foxp3は予後不良及び強い転移潜在性と関連する(Karanikas et al. (2008) J Transl Med 6: 19-26; Truiulzi et al. (2013) J Cell Physiol 228: 30-35)。特に、T細胞悪性疾患は、Tregの特徴を表現型としても機能としても共有することが示された。したがって、Foxp3標的mAbはまた、Foxp3を発現する腫瘍細胞を潜在的に殺滅する可能性がある。MAC-1及びMAC-2A Tリンパ腫細胞株に加えて、T白血病ウイルスを形質導入された細胞株、C5MJもまたFoxp3を発現した。したがって、Foxp3-#32 mAbがまたこれらの細胞で当該エピトープを認識し得るか否かを試験するために、HLA-A\*02:01を有するC5MJ細胞株に形質導入を実施した。Foxp3タンパク質に対するmAb(マウ

50

スIgG2K)及びFoxp3-#32(マウスIgG1)の両mAbに対する二重アイソタイプコントロールは両mAbについて陰性であったが、一方、Foxp3-#32 mAbは、MAC-2A及びC5-MJ/A2細胞の両方で細胞質Foxp3+集団とのみ結合した。対照的に、Foxp3-#32 mAbに対するマウスIgG1アイソタイプは細胞質Foxp3タンパク質陽性集団とは結合しなかった。したがって、これらの結果は、Foxp3-#32 mAbのFoxp3+/HLA-A\*02:01陽性癌細胞との結合を示す。しかしながら、生命活性を有するA02+/Foxp3ノックアウト株は入手できなかったため、他の可能なオフターゲット、交差反応性ペプチドと比較して、これらの癌細胞株との結合がTLIペプチドの発現に起因する程度は決定されなかった。

【0187】

HLA-A\*02:01との関係における、Foxp3+ Treg細胞及び腫瘍細胞に対するFoxp3-#32二重特異性mAb媒介T細胞細胞傷害性：

Foxp3-#32とFoxp3+HLA-A2+細胞との結合が明らかにされたので、次にFoxp3-#32二重特異性mAbが細胞溶解性活性(例えばADCC)を媒介するか否かを試験した。最初に、TIL又はコントロールHLA-A\*02:01結合ペプチドCTでパルスしたT2細胞を、Foxp3-#32二重特異性mAb又はそのコントロール二重特異性mAbの存在下若しくは非存在下で、エフェクターとして用いられるヒトPBMCとともにインキュベートした。Foxp3-#32二重特異性mAbは、TLIペプチドでパルスしたT2細胞に対して特異的で効果的な殺滅活性を媒介したが、T2細胞のみ若しくはコントロールペプチドパルスT2細胞(図6A)又はFoxp3陰性/HLA-A\*02:01陰性細胞株HL-60(図6B-D)に対しては殺滅活性を媒介しなかった。同様に、Foxp3-#32二重特異性mAbの存在下のPBMCは、Treg様Tリンパ腫細胞株MAC-1及びMAC-2A細胞に対して表示の濃度で用量依存殺滅を示した(図6C及びD)。MAC-1及びMAC-2A細胞株はCD3を発現せず、これらの細胞株に対するT細胞細胞傷害性は、抗CD3 mAbのscFvアームによって媒介されなかった。

活性化T細胞をエフェクターとして用いたとき、Foxp3-#32二重特異性mAb媒介殺滅はMAC-2A細胞に対してさらに増強された。加えて、Foxp3-#32二重特異性mAbは、HLA-A\*02:01を形質導入された別のTreg様T白血病細胞株C5MJに対してT細胞殺滅を媒介したが、その親細胞C5MJの殺滅もJurkat細胞の殺滅も媒介しなかった。これらの結果はさらにまた、Foxp3-#32二重特異性mAbはFoxp3及びHLA-A\*02:01の両方を発現する腫瘍細胞を殺滅することができることを確認させるとともに、同様に反応性に寄与し得るオフターゲット交差反応性ペプチドの役割について上記に書き留めた同様な警告も存在する(図6E-H)。

【0188】

Foxp3-#32二重特異性mAbのADCC機能によって天然のTregをPBMCから選択的に枯渇させることができるか否かを、Tregマーカーパネルを用いてフローサイトメトリー分析によって試験した。このmAbはFoxp3由来エピトープを標的とするので、真性のTregマーカーを発現するPBMC中のFoxp3+集団の減少は、Foxp3+ Tregの枯渇のより直接的な証拠を提供しよう。HLA-A\*02:01陽性又は陰性ドナーからのPBMCをFoxp3-#32二重特異性mAb又はコントロール二重特異性mAbとともに1から3日間インキュベートした。下記のいくつかのゲート分離戦略を利用した。第一に、リンパ球集団について、続いてCD4+CD127高(通常のT細胞)又はCD127低(Treg)集団についてゲート分離し、その後2セットのマーカー(CD25対細胞質内Foxp3又はCD45RA対細胞質内Foxp3)を用いてゲート分離を実施した。インキュベーション2日後の代表的なフローサイトメトリー分析を示す(図7A)。PBMCのみ及びコントロール二重特異性mAb処理PBMC(それぞれ上段の行及び下段の行)は、ほぼ30%のCD4+CD127高集団及び5%のCD4+CD127低集団を含む同様なパターンを示した。Foxp3-#32二重特異性mAbで処理された細胞(中央の行)は、これら2つの集団のパーセンテージをごくわずく変化させた(左の列のパネル)。さらにまた、CD25+細胞質内Foxp3+細胞はCD4+CD127低集団でのみ検出されたが、CD4+CD127高集団では検出されなかった。なぜならば、休止中の通常T細胞はCD25もFoxp3も発現しないからである(中央パネル対右パネルを参照)。コントロール二重特異性mAb処理又は二重特異性mAb無処理細胞と比較して、Foxp3-#32二重特異性mAbで処理したCD25+Foxp3+細胞に約60%の減少が認められた。これらのデータは、PBMCにおけるTreg集団の選択的枯渇と一致する。

## 【 0 1 8 9 】

CD4+CD127低集団はFoxp3-#32二重特異性mAb処理グループで増加したので、Foxp3+ Tregの絶対枯渇対相対枯渇としての細胞減少をさらに確認するために、これら2つの集団をより詳細なマーカーセットを用いてさらに分析した(図7B)。PBMC及びコントロール二重特異性mAb処理PBMCは、2つのTregサブセットの同様なパーセンテージを示した(明確にするために、これらのサブセットは第一のパネルでローマ数字IからVで標識され、ゲートボックス内の各細胞タイプのパーセンテージは数字で示される)。上段パネルはCD127低細胞を示し、下段パネルはCD127高細胞を示す。Foxp3-#32二重特異性mAbで処理したとき、FoxP3陽性細胞の全集団(画分I(ナイーブTreg)及びII(エフェクター及び最終分化Treg)及び画分III(非Treg: CD45RA-、Foxp3低))が枯渇した。画分I及びIIの全Tregは2つのコントロールグループで約28%である。驚くべきことに、#32二重特異性mAbで処理された細胞はこれらの細胞で60%近い減少を示した。注目すべきことに、画分IIIのFoxp3低集団のパーセンテージは減少してFoxp3特異的枯渇を示したが、ただし画分IIIのこれらの細胞は古典的Tregではない。対照的に、CD45RA+T細胞は、コントロール二重特異性mAbグループと比較して、Foxp3-#32二重特異性mAb処理グループで4倍を超える増加を示した。これは、#32二重特異性mAbを介するTreg標的細胞による嵌合に際して、ナイーブT細胞は活性化されてエフェクター細胞になることを示唆している。活性化した通常のT細胞は、#32二重特異性mAb処理によって枯渇されないか又はわずかしかな枯渇されないこともまた示唆された。Foxp3+細胞は、3つのグループ全て(下段3パネル)のCD45RA+/CD4+/CD127高集団で観察されなかった。

10

20

## 【 0 1 9 0 】

3日間の処理後に同じ態様で細胞を分析したとき、CD4+/CD127低/CD25+/Foxp3+ Treg集団は更なる枯渇を示した。すなわち、コントロール二重特異性mAb処理グループの78%の残留と比較して、Foxp3-#32二重特異性mAb処理細胞集団で残留は14%であった(82%の減少)(図7C)。さらにまた、コントロール二重特異性mAbで29%の残留と比較して、CD45RA低/Foxp3+ナイーブ及びCD45RA-/Foxp3高エフェクターTregは集団の7%に減少した。

Foxp3-#32二重特異性mAb処理グループのCD4+CD25+CD127低及びFoxp3+細胞の減少は、処理後早くも1日目に観察された。CD4+CD127低集団は、PBMC、Foxp3-#32二重特異性mAb処理及びコントロール二重特異性mAb処理グループで約4%であった。しかしながら、CD25+Foxp3+細胞は、これら3グループで62.3%、42.5%及び57%であり、30%減少を示した。CD8+(無CD4+)CD127低集団にはCD25+Foxp3+細胞は存在しなかった。加えて、2つの別々の実験のグループ間で、処理の1から3日後の全細胞数に有意な変化は示されなかった。しかしながら、リンパ球のパーセンテージはFoxp3-#32二重特異性mAb処理細胞でわずかな減少を示した(図9B)。

30

同じ実験で、Foxp3+TregはHLA-A\*02:01陰性ドナーでは枯渇しなかった(図10A)。これらの結果は、HLA-A\*02:01分子との関係で、Foxp3-#32二重特異性mAbはFoxp3+細胞を選択的に枯渇させることを示した。

HLA-A\*02:01陽性の卵巣癌患者由来の腹水を用いる同様な実験を実施した。Foxp3-#32二重特異性mAb処理の2日後に、CD4+CD25高/Foxp3+ Tregは32%(コントロール二重特異性mAb)から4%に低下した(図7D)。このことは別のマーカーセットにより確認された。すなわち、CD4+CD127低/Foxp3+集団は24%(コントロール)から3%に低下した。細胞はまた、ADCC改善のために変異させたFc領域を有するFoxP3-#32 IgGで処理された。なぜならば、CD33+CD14+単球/マクロファージ浸潤が患者の腹水で観察されたからである。エフェクターTreg(画分II)の枯渇は、特異的なTCRmによる処理後2日で明白であり(図10B、上段パネル)、この集団は、3日後の非処理細胞(4.8%)及びコントロールmAb処理細胞(3.4%)と比較して0.4%に低下した(図10B、下段パネル)。2日目では典型的なナイーブTreg集団(画分I)は存在しなかった。同様な表現型はまた他のタイプの癌でも示され、これは腫瘍サンプルの不均質性のためである(Tanaka et al. (2017) Cell Res 27: 109-118)。

40

## 【 0 1 9 1 】

50

これらの結果をさらに確認するために、HLA-A\*02:01+ドナーから複数のTreg株（図5Bに表現型を示す）を作製し、Treg標的として用いた。標的として用いるTreg株を、Foxp3-#32二重特異性mAb又はコントロール二重特異性mAbの存在下又は非存在下で、HLA-A\*02:01-ドナー由来の精製T細胞とともにインキュベートした。その後で、HLA-A\*02:01+ T細胞集団中のFoxp3+細胞のパーセンテージを、HLA-A2及び細胞内Foxp3タンパク質に対するmAbで細胞を染色することによって測定した。HLA-A\*02:01+細胞は標的Treg株にのみ存在するので、HLA-A\*02:01及びFoxp3二重陽性細胞の減少は、当該Tregに対するFoxp3-#32二重特異性mAb媒介細胞傷害性の指標であった（図11A）。エフェクター-PBMCのみで処理されたコントロール細胞培養（上段左パネル）又はコントロール二重特異性mAbとともにエフェクターで処理されたコントロール細胞培養（下段右パネル）は、当該共培養で9-10%のHLA-A\*02:01/Foxp3二重陽性細胞を示し、一方、HLA-A\*02:01+/Foxp3+ T細胞のパーセンテージはFoxp3-#32二重特異性mAbの存在下で60%を超える低下を示した（下段左パネル）。Foxp3+/HLA-A\*02:01陰性細胞（エフェクター-T細胞、おそらくTregアロ刺激によって活性化される）はFoxp3-#32 mAbによって殺滅されず、mAb認識のためにHLA-A2拘束を示した。同様な結果は第二のTregライン#2から得られた（図11B）。これらの結果は、Foxp3-#32二重特異性mAbは、HLA-A\*02:01分子の状況下でヒトTregを認識しT細胞細胞傷害性を媒介できることを示した。

Foxp3+/HLA-A\*02:01+細胞に対するFoxp3-#32二重特異性mAbの長期細胞傷害作用を試験するために、GFP/ルシフェラーゼ+ MAC-1又はMAC-2A細胞をHLA-A\*02:01陰性ドナーからのエフェクター-PBMCとともに、Foxp3-#32二重特異性又はコントロール二重特異性mAbの存在下でインキュベートし、3日後の全生物発光強度（BLI）を測定した。標的BLIシグナルがほとんど残らなかったほど、MAC-2Aに対するFoxp3-#32二重特異性mAbの有意な細胞傷害性が観察され、MAC-2Aは、Foxp3-#32二重特異性mAbの存在下で殺滅されたことが示された（図11C）。同様な結果はまたMAC-1細胞株で観察された。

#### 【0192】

##### HLA-A\*02:01状況下におけるMab Foxp3-#32の潜在的オフターゲット：

TCRは他のペプチド/MHC複合体と有意な交差反応性を有することが知られている（Oates et al. (2015) Mol Immunol 67: 67-74 ; Attaf et al. (2015) Clin Exp Immunol 181: 1-18）。理論的には、TCRm mAbは同様な特性を持つ可能性があり、確かに同様な特性を有する。なぜならば、TCR及びTCRm mAbは両方とも、MHCクラスI結合溝内に埋め込まれた短い線状ペプチドエピトープを認識し、エキソームの他のペプチドは、アミノ酸相同性又は結合を可能にする物理化学的特徴を共有するからである。多様なタンパク質に由来する95のHLA-A2結合ペプチドを、当該ペプチドでパルスしたT2細胞を用いてスクリーニングした。Foxp3-#32 mAbは、2つのマイナー抗原HA-1及びHA-8に由来する2つのペプチドのみを認識した（図12）。これら2つのペプチドは、Foxp3-TLIエピトープとC-末端のロイシン及びグルタミン酸を共有する。上記（図3）に示すように、TLIの#8位は、Foxp3-#32 mAbによって認識される重要な残基の1つであった。

しかしながら、Foxp3-#32 mAbが、これらの細胞で発現された可能性があるオフターゲットエピトープの結果として、正常な造血細胞に対する細胞傷害性の能力を有したか否かを試験するために、3人の正常で健康なドナーからのPBMC（HLA-A\*02:01陽性又は陰性）を、Foxp3-#32二重特異性mAbの存在下で一晩インキュベートした。コントロールMAC-1細胞はFoxp3-#32二重特異性mAbによって完全に殺滅されたが（図8）、T（CD3+）、B（CD19+）及び単球（CD33+）の有意な減少は、HLA-A\*02:01陽性又は陰性ドナーで検出されなかった。

#### 【0193】

##### 考察

Treg特異的表面マーカーも新薬につながるようなTreg特異的経路も全く存在しないので、抗腫瘍免疫を損なうことなくTreg機能を枯渇又は妨害するという治療薬開発戦略にこれまで困難であった。Tregの特異的枯渇のための障害の1つは、Treg及びエフェクター-T細胞の両方が、活性化表現型を、特に重要な細胞表面タンパク質の発現パターンとして示すことがあるということである。すなわち、両細胞タイプは高レベルのCD25、CTLA-4、OX40及

びGITRを発現する (Schaer et al. (2012) *Curr Opin Immunol* 24 (2): 217-224)。TregはCTLA-4を発現するが、臨床試験の結果は、抗CTLA-4処置の効果は主としてエフェクターT細胞の活性化増加によることを示唆している (Colombo et al. (2007) *Nat Rev Cancer* 7: 880-887)。最近の研究は、C-Cケモカイン受容体4 (CCR4) (CCケモカインCCL17及びCCL22の同族受容体) はもっぱらメラノーマ患者のTIL中のエフェクターTreg (eTregs; CD45RA-Foxp3<sup>hi</sup> CD4+) で発現されるが、多様な他の細胞タイプでも発現されることを示している。前記集団の抗CCR4 mAbによる *in vitro* 枯渇は、NY-ESO-1ペプチドで刺激したときT細胞応答を増強し (Sugiyama et al. (2013) *PNAS* 110 (44): 17945-17950)、さらにT細胞白血病-リンパ腫を有する処置患者では、Treg画分は減少しNY-ESO-1特異的CD8 T細胞応答は増大する (Ogura et al. (2014) *J Clin Oncol* 32 (11): 1157-1163; Ishida et al. (2017) *Cancer Sci* 108 (10): 2022-2029)。同様に、同族リガンド又はアゴニストmAbを用いるGITR標的照準は、ネズミ癌モデルで有効であることが示された。しかしながらそのような戦略の臨床有効性は、人間の臨床試験でこれから精査されねばならない。

10

20

30

40

50

#### 【0194】

Foxp3+ Treg細胞は癌細胞によって動員され、癌患者の腫瘍ミクロ環境、末梢血又は腹水で顕著にその濃度が増加する。TILにおけるエフェクターT細胞対Treg比によって、多様な癌 (卵巣癌、乳癌、非小細胞肺癌、肝細胞癌、腎細胞癌、膵臓癌及び胃癌を含む) で疾患の結末を予測することができる (Delleuw et al. (2012) *Clin Cancer Res* 18: 3022-3029; Colombo, 2007)。興味深いことに、Foxp3の免疫抑制機能はTreg細胞に限定されず、そのことは、腫瘍抑制性ミクロ環境におけるFoxp3の重要な役割をさらに支持する (Karaniakas, 2008; Truiulzi, 2013)。Foxp3発現は大半の膵臓癌で検出され (Hinz et al. (2007) *Cancer Res* 2007; 67 (17): 8344-8350)、これらの細胞は完全なT細胞増殖阻害を *in vitro* で誘発した (前記作用は、siRNAを用いてFoxp3遺伝子発現のサイレンシングによって部分的に停止された)。Foxp3の免疫抑制機能はまた成人T白血病 (ALT) 患者で示唆されている (前記患者は、白血病細胞のCD4及びCD25の構成的発現並びに顕著な免疫不全状態を特徴とする) (Heid et al. (2009) *J Invest Dermatol* 129: 2875-2885; Matsubara et al. (2005) *Leukemia* 19: 482-483)。

#### 【0195】

Foxp3はTregを識別し選択的に殺滅するための有望な標的であり、Foxp3特異的細胞傷害性CD8 T細胞はヒトPBMCで、特に癌患者で検出できる (Larsen, 2013)。本研究の前の研究は、ペプチド特異的CTLを用いるアプローチによって細胞内Foxp3を標的とする可能性を示した。本明細書のこれらの結果はこの初期の研究と一致し、このエピトープに対するTCRm mAb作製のための前提を形成する。

活性化T細胞 (非Treg) もまた一過性にFoxp3を発現できる (Wang et al. (2007) *EJ Immunol* 37: 129-138)。しかしながら、活性化CD4+CD25+T細胞及びTregは、CD127、IL-7受容体のアルファ鎖の発現レベルによって区別することができる (Seddiki et al. (2006) *J Exp Med* 203 (7): 1693-1700; Liu et al. (2006) *J Exp Med* 203 (7): 1701-1711)。

W. Liuらによれば、CD127発現はFoxp3及びヒトCD4+ Treg細胞の抑制機能と反比例する。Tregは低レベルのCD127を発現し、一方、通常のT細胞は高レベルのCD127を発現する。TCRm mAb Foxp3-#32は、HLA-A\*02:01+の健康なドナーからのCD4+ T細胞のCD127低/CD25高/Foxp3高集団とのみ結合した (図4)。注目すべきことに、この小さなTreg集団のFoxp3-#32二重特異性mAbによる選択的枯渇は、HLA-A\*02:01+ドナーからのPBMCを当該mAbで処理したときに検出された。この選択性は別のマーカーセット (CD45RA対Foxp3発現) を用いて確認された。エフェクターTreg及びナイーブ (休止) Tregの両方 (画分I及びII) が画分III (図7A) と併せて枯渇された。卵巣癌を有するHLA-A\*02:01陽性患者の腹水の "TIL" における、Foxp3-#32二重特異性mAb及びFc増強IgG1によるFoxp3選択的枯渇もまた検出された (図7D及び補充図1B)。

#### 【0196】

同様に、*in vitro* 誘発TregをmAb Foxp3-#32との結合について試験したとき、mAbはCD4+CD25<sup>hi</sup>集団とだけ結合し、CD25<sup>lo</sup>/陰性集団とは結合しなかった。ペプチド/MHCエピトー

ブは標的細胞上で典型的には極めて低密度で見出され、認識及び細胞傷害を困難にさせる。したがって、Foxp3 TCRm mAbは最高のFoxp3発現を有する細胞とだけ結合するであろう。このことは、まず初めにFoxp3エピトープに誘導されるTCRm mAbを用いてTregを枯渇させ、続いてエフェクターT細胞を活性化及び増殖させる戦略（例えばワクチン免疫又はチェックポイント遮断）を用いることによって効果的な併用療法を設計するという、可能な治療薬の突破口及びアプローチを開く。加えて、治療用抗Treg抗体の目標は、T細胞のバランスを動揺させてCD8及びCD4 T細胞の抗癌活性を有利に導くことであるので、標的Treg細胞の完全な排除は必ずしも必要ではない。これは癌細胞自体に誘導される抗体の状況とは相違し、したがって絶対的な特異性は要求されないであろう。

TCRm mAbがそれらの標的と結合する特性は、典型的な抗体の結合の特性とは、臨床的利用を制限する潜在性を有するというような様式で相違する。ペプチドは、TCRmによって認識されるために十分な量でプロセッシングされかつ提示されなければならない、これらのプロセスの理解はなお貧弱で、さらに当該細胞の活性化状況によってこのプロセスが影響を受ける可能性がある（Chang et al. (2016) Expert Opin Biol Ther 16 (8): 979-987）。エピトープはHLA溝という拘束内の線状ペプチドであるので、オフターゲットペプチドとの結合は、他の細胞によって提示されるならば、TCR及びTCRm mAbの両方で観察されたように可能であるかもしれない（Chang et al. (2016); Ataie et al. (2016) J. Mol. Biol 428 (1): 194-205）。しかしながら、結合は細胞傷害性と常に同等とみなされるとは限らない。このTCRmの二重特異性mAb様式によってはいずれのPBMCに対しても有意な殺滅は認められず（図8）、HLA-A\*02:01と結合することが判明している95の他のペプチドのうち93に対しても結合は認められなかったが、他の細胞上で（分子レベル及び細胞レベルの両方で）提示される可能なオフターゲットは、TCRmを進める前に、例えば全身的な臨床使用の前にさらに明確にされる必要がある。

【0197】

下記は本発明の実施態様の非限定的なリストである。

実施態様1：操作された免疫細胞を作製する方法であって、前記方法は、複数の免疫細胞を含むサンプルを（a）操作された受容体をコードするベクター、及び（b）フォークヘッドボックスP3（FoxP3）標的因子と接触させる工程を含み、それによって当該ベクターを含む操作された免疫細胞を作製する。

実施態様2：複数の免疫細胞が1つ以上の末梢血単核細胞（PBMC）を含む、実施態様1に記載の方法。

実施態様3：1つ以上のPBMCが白血球を含む、実施態様2に記載の方法。

実施態様4：白血球がリンパ球である、実施態様3に記載の方法。

実施態様5：リンパ球がT細胞である、実施態様4に記載の方法。

実施態様6：T細胞がエフェクターT細胞である、実施態様5に記載の方法。

実施態様7：エフェクターT細胞が細胞傷害性T細胞である、実施態様6に記載の方法。

実施態様8：細胞傷害性T細胞が分化抗原群8陽性（CD8+）T細胞である、実施態様7に記載の方法。

実施態様9：エフェクター細胞がヘルパーT細胞である、実施態様6に記載の方法。

実施態様10：ヘルパーT細胞が分化抗原群4陽性（CD4+）T細胞である、実施態様9に記載の方法。

実施態様11：T細胞が制御性T細胞である、実施態様5に記載の方法。

実施態様12：複数の免疫細胞が1つ以上のFoxP3発現細胞（すなわちFoxP3+細胞）を含む、実施態様1から11のいずれか1項に記載の方法。

実施態様13：複数の免疫細胞がFoxP3を発現しない1つ以上の細胞を含む、実施態様1から12のいずれか1項に記載の方法。

実施態様14：複数の免疫細胞が、1つ以上のFoxP3発現細胞及びFoxP3を発現しない1つ以上の細胞を含む、実施態様1から13のいずれか1項に記載の方法。

実施態様15：サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程が、サンプル中のFoxP3陽性（FoxP3+）細胞の数を減少させる、実施態様1から14のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50



実施態様16：サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程が、FoxP3標的因子との接触前のサンプル中のFoxP3+細胞の数と比較して、サンプル中のFoxP3+細胞の数を少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれより多く減少させる、実施態様15に記載の方法。

実施態様17：サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程が、FoxP3標的因子と接触させたことがないコントロールサンプル中のFoxP3+細胞の数と比較して、サンプル中のFoxP3+細胞の数を少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれより多く減少させる、実施態様15に記載の方法。

実施態様18：1つ以上のFoxP3発現細胞の少なくとも1つが溶解又は殺滅される、実施態様12から17のいずれか1項に記載の方法。

実施態様19：1つ以上のFoxP3発現細胞の少なくとも1つが、Foxp3を発現しない細胞から分離される、実施態様12から18のいずれか1項に記載の方法。

#### 【0198】

実施態様20：1つ以上のFoxP3発現細胞の少なくとも1つが溶解又は殺滅され、1つ以上のFoxP3発現細胞の少なくとも1つが、Foxp3を発現しない細胞から分離される、実施態様12から19のいずれか1項に記載の方法。

実施態様21：サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程が、当該サンプルを2つ以上の異なるFoxP3標的因子と接触させる工程を含む、実施態様1から20のいずれか1項に記載の方法。

実施態様22：サンプルをベクターとの接触前にFoxp3標的因子と接触させる、実施態様1から20のいずれか1項に記載の方法。

実施態様23：サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程が、サンプルとベクターとの接触前少なくとも4、6、8、10、12、16、20、24、36、又は48時間に発生する、実施態様22に記載の方法。

実施態様24：サンプルがFoxP3標的因子及びベクターと時を同じくして接触される、実施態様1から20のいずれか1項に記載の方法。

実施態様25：サンプルがベクターとの接触後にFoxp3標的因子と接触される、実施態様1から20のいずれか1項に記載の方法。

実施態様26：サンプルをベクターと接触させる工程が、サンプルとFoxP3標的因子との接触前少なくとも12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132又は144時間に発生する、実施態様25に記載の方法。

実施態様27：操作された受容体が、キメラ抗原受容体（CAR）、キメラ抗体T細胞受容体（caTCR）、及び操作T細胞受容体（eTCR）から成る群から選択される、実施態様1から26のいずれか1項に記載の方法。

実施態様28：操作された受容体がCARである、実施態様27に記載の方法。

実施態様29：CARが少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメインを含む、実施態様28に記載の方法。

実施態様30：少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメインが単鎖可変領域フラグメント（scFv）を含む、実施態様29に記載の方法。

実施態様31：CARが少なくとも1つの細胞内シグナリングドメインを含む、実施態様28から30のいずれか1項に記載の方法。

実施態様32：少なくとも1つの細胞内シグナリングドメインが、CD3ポリペプチド又はそのフラグメントを含む、実施態様31に記載の方法。

実施態様33：操作された受容体がcaTCRである、実施態様27に記載の方法。

実施態様34：caTCRが、（a）VH抗体ドメインを含む第一の抗原結合ドメイン及び第一のTCRトランスメンブレンドメイン（TCR-TM）を含む第一のTCRドメイン（TCRD）を含む第一のポリペプチド鎖；並びに（b）VL抗体ドメインを含む第二の抗原結合ドメイン及び第二のTCR-TMを含む第二のTCRDを含む第二のポリペプチド鎖を含み、ここで、第一の抗原結合ドメインのVHドメイン及び第二の抗原結合ドメインのVLドメインは、標的抗原と特異的に結合する抗原結合モジュールを形成し、さらに第一のTCRD及び第二のTCRDは、少なくとも

10

20

30

40

50

1つのTCR関連シグナリングモジュールを動員することができるTCRモジュール（TCRM）を形成する、実施態様33に記載の方法。

実施態様35：第一のTCR-TMが、第一の天然に存在するTCRのトランスメンブレンドメインの1つに由来し、第二のTCR-TMが、第一の天然に存在するTCRの他のトランスメンブレンドメインに由来する、実施態様34に記載の方法。

実施態様36：第一の天然に存在するTCRがガンマ-デルタTCRである、実施態様35に記載の方法。

実施態様37：第一のポリペプチド鎖がさらにまた、第一の抗原結合ドメインと第一のTCRDとの間に第一のペプチドリンカーを含み、第二のポリペプチド鎖がさらにまた、第二の抗原結合ドメインと第二のTCRDとの間に第二のペプチドリンカーを含む、実施態様34から36のいずれか1項に記載の方法。

実施態様38：第一及び/又は第二のペプチドリンカーが、個々に免疫グロブリン又はTCRサブユニット由来の定常ドメイン又はそのフラグメントを含む、実施態様37に記載の方法。

実施態様39：第一及び/又は第二のペプチドリンカーが、個々にCH1、CH2、CH3、CH4、若しくはCL抗体ドメイン又はそのフラグメントを含む、実施態様38に記載の方法。

#### 【0199】

実施態様40：第一及び/又は第二のペプチドリンカーが、個々にC<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>若しくはC<sub>4</sub> TCRドメイン又はそのフラグメントを含む、実施態様39に記載の方法。

実施態様41：操作された受容体がTCRである、実施態様27に記載の方法。

実施態様42：eTCRが抗原/MHC結合領域を含む、実施態様41に記載の方法。

実施態様43：抗原/MHC結合領域が天然に存在するTCRの抗原/MHC結合領域に由来する、実施態様42に記載の方法

実施態様44：操作された受容体が細胞表面抗原と結合する、実施態様1から43のいずれか1項に記載の方法。

実施態様45：細胞表面抗原がタンパク質、炭水化物、及び脂質から成る群から選択される、実施態様44に記載の方法。

実施態様46：細胞表面抗原が、分化抗原群19（CD19）、CD20、CD47、グリピカン3（GPC-3）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）、ROR2、B細胞成熟抗原（BCMA）、Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5メンバーD（GPRC5D）、及びFc受容体様5（FCRL5）から成る群から選択される、実施態様45に記載の方法。

実施態様47：細胞表面抗原がCD19である、実施態様46に記載の方法。

実施態様48：操作された受容体が、ペプチド及び主要組織適合性複合体（MHC）タンパク質を含む複合体と結合する、実施態様1から43のいずれか1項に記載の方法。

実施態様49：ペプチドが、ウィルムス腫瘍遺伝子1（WT-1）、アルファ-フェトプロテイン（AFP）、ヒトパピローマウイルス16 E7タンパク質（HPV16-E7）、ニューヨーク食道扁平上皮癌1（NY-ESO-1）、メラノーマの優先的発現抗原（PRAME）、エプスタイン-バーウイルス潜伏膜タンパク質2アルファ（EBV-LMP2A）、ヒト免疫不全ウイルス1（HIV-1）、KRAS、ヒストンH3.3、及び前立腺特異的抗原（PSA）から成る群から選択されるタンパク質に由来する、実施態様48に記載の方法。

実施態様50：ペプチドがAFPに由来する、実施態様49に記載の方法。

実施態様51：AFP由来ペプチドがFMNKFIYEIの配列を含む、実施態様50に記載の方法。

実施態様52：MHCタンパク質がMHCクラスIタンパク質である、実施態様48に記載の方法。

実施態様53：MHCクラスIタンパク質がHLA-A\*02:01サブタイプである、実施態様52に記載の方法。

実施態様54：操作された受容体が多重特異性である、実施態様1から53のいずれか1項に記載の方法。

実施態様55：操作された受容体が一特異性である、実施態様1から53のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

実施態様56：操作された受容体をコードするベクターが哺乳動物発現ベクターである、実施態様1から55のいずれか1項に記載の方法。

実施態様57：哺乳動物発現ベクターが、レンチウイルスベクター又はトランスポゾンベクターである、実施態様56に記載の方法。

実施態様58：FoxP3標的因子が、抗体、CAR、caTCR、又はeTCRであるか、又はその抗原結合フラグメントを含む、実施態様1から57のいずれか1項に記載の方法。

実施態様59：FoxP3標的因子がTCR分子であるか、又はTCR分子の抗原結合部分を含む、実施態様1から57のいずれか1項に記載の方法。

【0200】

実施態様60：FoxP3標的因子が、FoxP3由来ペプチド及びMHCタンパク質を含む複合体と結合する抗原結合タンパク質を含む、実施態様1から59のいずれか1項に記載の方法。

実施態様61：MHCタンパク質がMHCクラスIタンパク質である、実施態様60に記載の方法。

実施態様62：MHCクラスIタンパク質がヒト白血球抗原（HLA）クラスI分子である、実施態様61に記載の方法。

実施態様63：HLAクラスI分子がHLA-Aである、実施態様62に記載の方法。

実施態様64：HLA-AがHLA-A2である、実施態様63に記載の方法。

実施態様65：HLA-A2がHLA-A\*02:01である、実施態様64に記載の方法。

実施態様66：抗原結合タンパク質が抗体、CAR、又はcaTCRである、実施態様60から65のいずれか1項に記載の方法。

実施態様67：抗原結合タンパク質が一特異性である、実施態様66に記載の方法。

実施態様68：抗原結合タンパク質が完全長抗体である、実施態様66に記載の方法。

実施態様69：抗原結合タンパク質がIgGである、実施態様68に記載の方法。

実施態様70：抗原結合タンパク質が固体支持体に結合している、実施態様68又は69に記載の方法。

実施態様71：固体支持体が、ビーズ、マイクロウェル、及び平らなガラス表面から成る群から選択される、実施態様70に記載の方法。

実施態様72：ビーズが、磁性ビーズ、架橋ポリマービーズ、及びビーズ状アガロースから成る群から選択される、実施態様71に記載の方法。

実施態様73：抗原結合タンパク質が多重特異性である、実施態様66に記載の方法。

実施態様74：抗原結合タンパク質が二重特異性抗体である、実施態様73に記載の方法。

実施態様75：二重特異性抗体が、(a) FoxP3ペプチド及びMHCタンパク質を含む複合体に特異的な抗原結合ドメイン、及び(b) 分化抗原群3 (CD3) に特異的な抗原結合ドメインを含む、実施態様74に記載の方法。

実施態様76：抗原結合タンパク質がキメラ抗原受容体 (CAR) である、実施態様66、67及び73のいずれか1項に記載の方法。

実施態様77：FoxP3標的因子が抗FoxP3 CAR-T細胞である、実施態様76に記載の方法。

実施態様78：FoxP3由来ペプチドフラグメントが8 - 12アミノ酸の長さを有する、実施態様60から77のいずれか1項に記載の方法。

実施態様79：FoxP3由来ペプチドフラグメントが、配列番号:2に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-1又はその部分、配列番号:3に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-2又はその部分、配列番号:4に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-3又はその部分、配列番号:5に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-4又はその部分、配列番号:6に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-5又はその部分、配列番号:7に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-6又はその部分、及び配列番号:8に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-7又はその部分から選択される、実施態様60から78のいずれか1項に記載の方法。

【0201】

実施態様80：FoxP3由来ペプチドフラグメントが、配列番号:8に示されるアミノ酸配列を有するFoxP3-7又はその部分である、実施態様79に記載の方法。

実施態様81：抗原結合タンパク質が以下を含む実施態様79に記載の方法：(i) 配列番

10

20

30

40

50

号:16に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:17に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:18に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:19に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:21に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(ii)配列番号:22に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:23に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:24に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:26に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:27に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(iii)配列番号:28に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:29に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:30に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:31に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:32に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:33に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(iii)配列番号:34に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:36に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:38に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:39に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(iv)配列番号:40に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:41に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:42に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:43に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:44に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:45に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(v)配列番号:46に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:47に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:48に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:49に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:50に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:51に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；(vi)配列番号:52に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:53に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:54に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:55に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:56に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:57に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3；又は(vii)配列番号:58に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:59に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:60に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:61に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:62に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:63に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3。

#### 【0202】

実施態様82：抗原結合タンパク質が、配列番号:46に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号:47に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号:48に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号:49に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号:50に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；及び配列番号:51に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む、実施態様81に記載の方法。

実施態様83：実施態様29の少なくとも1つの細胞外抗原結合ドメイン又は実施態様34の抗原結合モジュールがCD19と結合し、さらに、(i)重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3(それぞれ配列番号:105、106、及び107と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む)；及び/又は(ii)軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3(それぞれ配列番号:109、110、又は111と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む)；(ii)重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3(それぞれ配列番号:105、106、及び108と少なくとも80%、少なくとも85%、少な

10

20

30

40

50

くとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む)；及び/又は(ii)軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3(それぞれ配列番号:109、110、又は111と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む)；(iii)重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3(それぞれ配列番号:105、106、及び107と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む)；及び/又は(ii)軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3(それぞれ配列番号:109、110、又は112と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む)；又は(iv)重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3(それぞれ配列番号:105、106、及び108と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む)；及び/又は(ii)軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3(それぞれ配列番号:109、110、又は112と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む)を含む、実施態様29又は実施態様34に記載の方法。

10

### 【0203】

実施態様84：FoxP3標的因子がFoxP3標的CARを含み、当該FoxP3標的CARがFoxP3ペプチド及び主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質を含む複合体と結合する、実施態様1から58のいずれか1項に記載の方法。

実施態様85：FoxP3標的CARが、FoxP3ペプチド及び主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質を含む複合体と結合するscFvを含む、実施態様84に記載の方法。

実施態様86：FoxP3標的CARがさらにまた、scFvと融合したCD28-CD3ゼータペプチドを含む、実施態様85に記載の方法。

20

実施態様87：FoxP3標的CARが、配列番号:12と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するscFv-CD28-CD3ゼータ融合物を含む、実施態様86に記載の方法。

実施態様88：FoxP2標的CARがさらにまた、scFvと融合した41BB-CD3ゼータペプチドを含む、実施態様85に記載の方法。

実施態様89：FoxP3標的CARが、配列番号:13と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するscFv-41BB-CD3ゼータ融合物を含む、実施態様88に記載の方法。

実施態様90：FoxP3標的因子がFoxP3標的caTCRを含み、当該FoxP3標的caTCRが、FoxP3ペプチド及び主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質を含む複合体と結合する、実施態様1から58のいずれか1項に記載の方法。

30

実施態様91：FoxP3標的caTCRが、(a)VH抗体ドメインを含む第一の抗原結合ドメイン及び第一のTCRトランスメンブレンドメイン(TCR-TM)を含む第一のTCRドメイン(TCRD)を含む第一のポリペプチド鎖；及び(b)VL抗体ドメインを含む第二の抗原結合ドメイン及び第二のTCR-TMを含む第二のTCRDを含む第二のポリペプチド鎖を含み、ここで、第一の抗原結合ドメインのVHドメイン及び第二の抗原結合ドメインのVLドメインが、標的抗原と特異的に結合する抗原結合モジュールを形成し、第一のTCRD及び第二のTCRDが、少なくとも1つのTCR関連シグナリングモジュールを動員することができるTCRモジュール(TCRM)を形成する、実施態様90に記載の方法。

実施態様92：第一のTCR-TMが、第一の天然に存在するTCRのトランスメンブレンドメインの1つに由来し、第二のTCR-TMが、第一の天然に存在するTCRの他のトランスメンブレンドメインに由来する、実施態様91に記載の方法。

40

実施態様93：第一の天然に存在するTCRがガンマ-デルタTCRである、実施態様92に記載の方法。

実施態様94：caTCRが、配列番号:15と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する抗FoxP3軽鎖/ガンマ鎖融合物を含む、実施態様91に記載の方法。

実施態様95：caTCRが、配列番号:14と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する抗FoxP3重鎖/デルタ鎖融合物を含む、実施態様91に記載の方法。

50

実施態様96：操作された受容体を発現する操作された免疫細胞を含む治療組成物中のFoxP3陽性細胞を枯渇させる方法であって、前記方法が、当該治療組成物をFoxP3標的因子と接触させる工程を含む、前記方法。

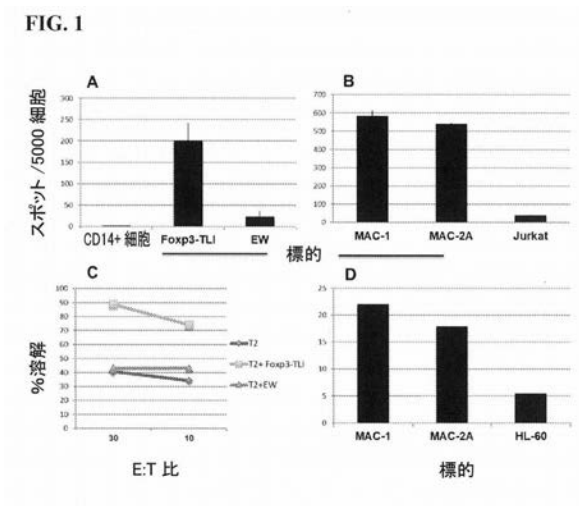
実施態様97：サンプル中の操作された受容体発現細胞傷害性T細胞を濃縮する方法であって、前記方法が、当該サンプルをFoxP3標的因子と接触させる工程を含む、前記方法。

実施態様98：(a)操作された受容体を発現する操作された免疫細胞及び(b)FoxP3標的因子を含む、組成物。

実施態様99：(a)操作された受容体をコードするベクター及び(b)FoxP3標的因子を含む、組成物。

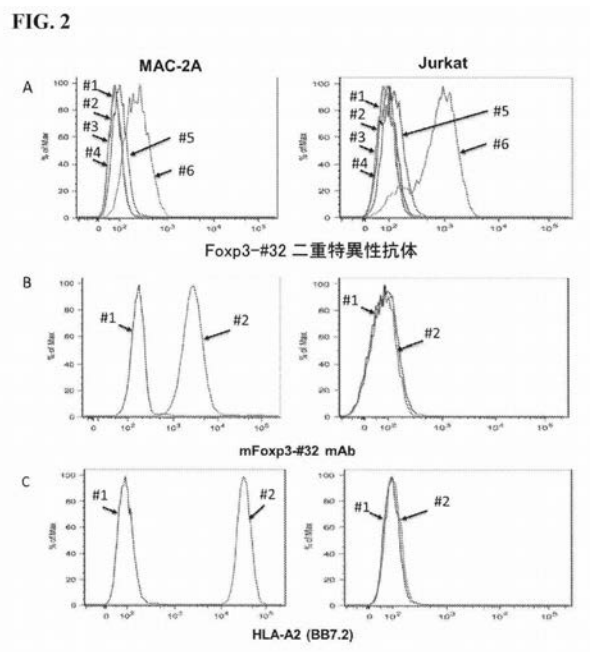
【 図 1 】

FIG. 1



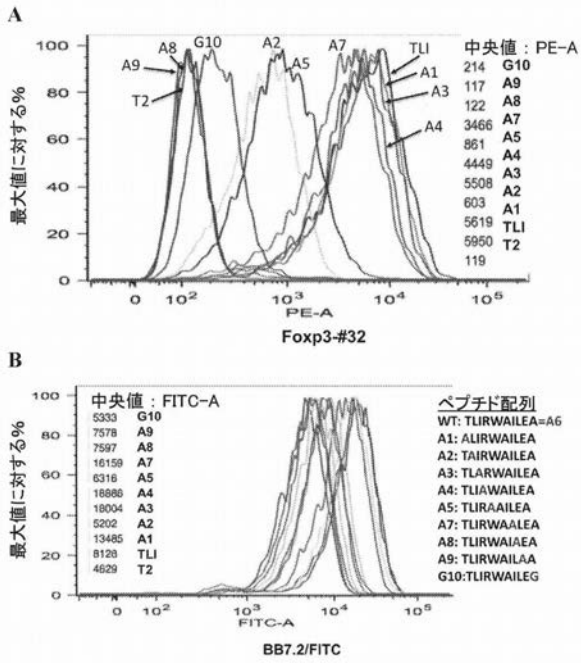
【 図 2 】

FIG. 2



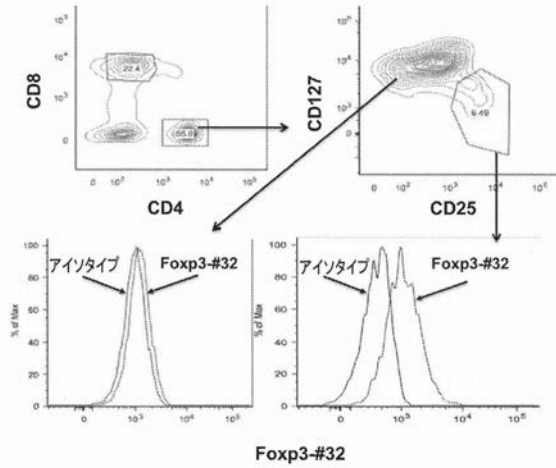
【 図 3 】

FIG. 3



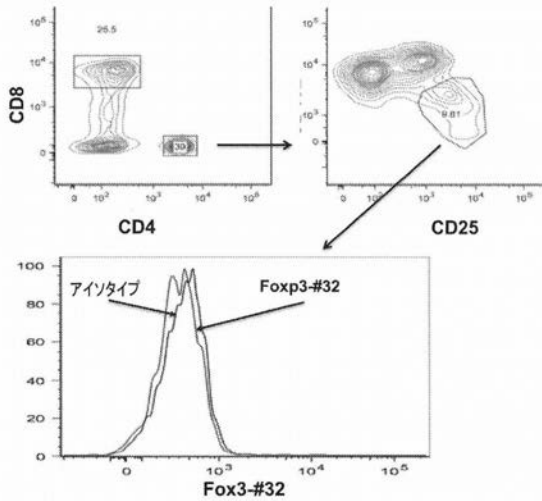
【 図 4 A 】

FIG. 4A



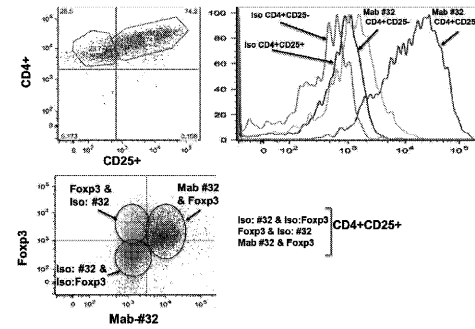
【 図 4 B 】

FIG. 4B



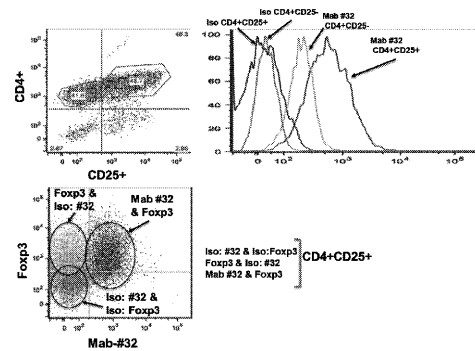
【 図 5 A 】

FIG. 5A



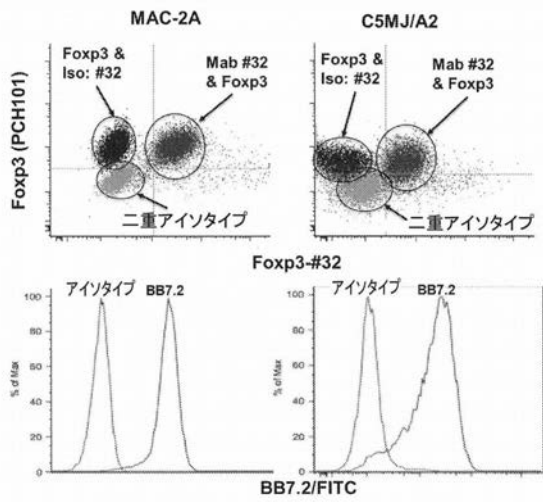
【 図 5 B 】

FIG. 5B



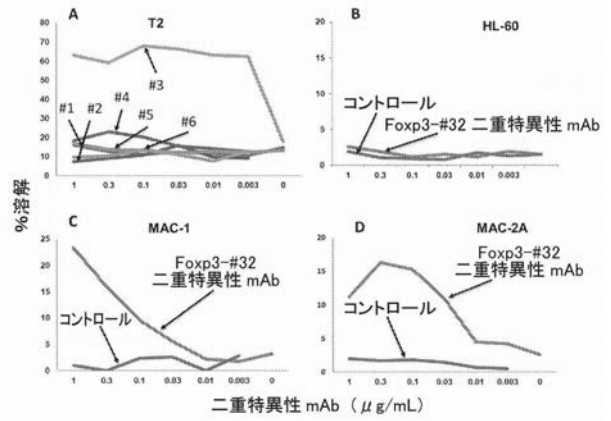
【 図 5 C 】

FIG. 5C



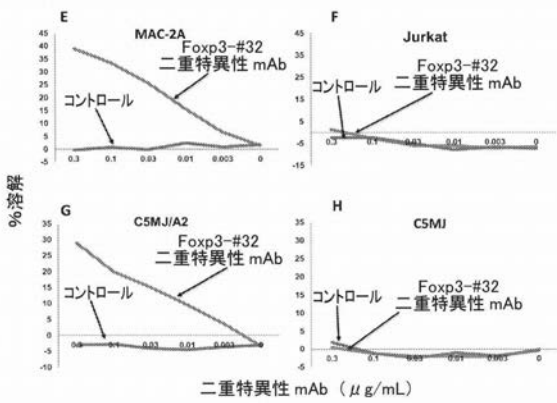
【 図 6 A - D 】

FIG. 6A-D



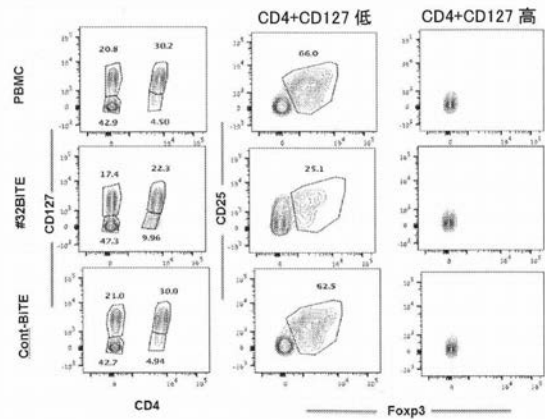
【 図 6 E - H 】

FIG. 6E-H



【 図 7 A 】

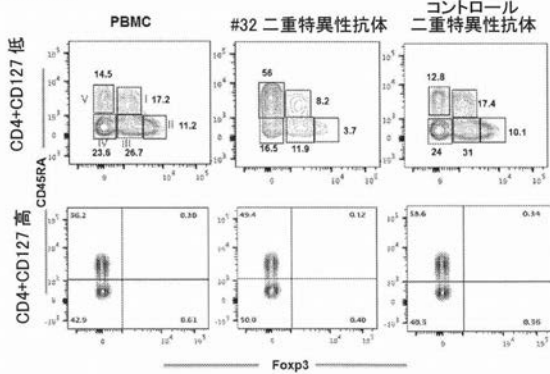
FIG. 7A





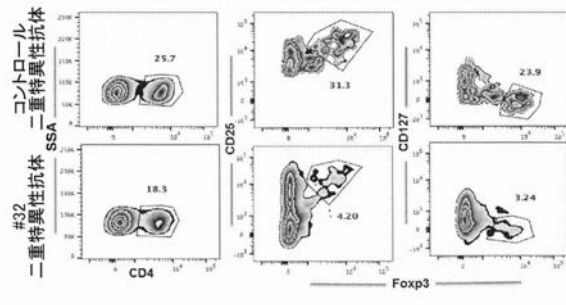
【 図 7 B 】

FIG. 7B



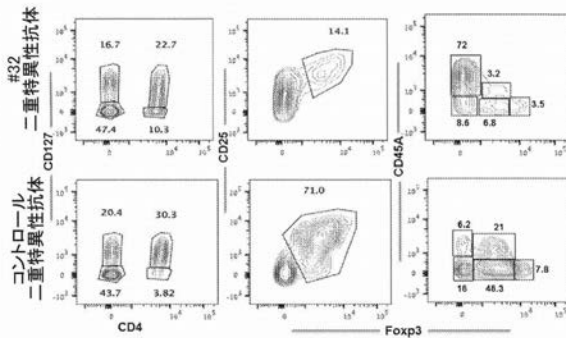
【 図 7 D 】

FIG. 7D



【 図 7 C 】

FIG. 7C



【 図 8 】

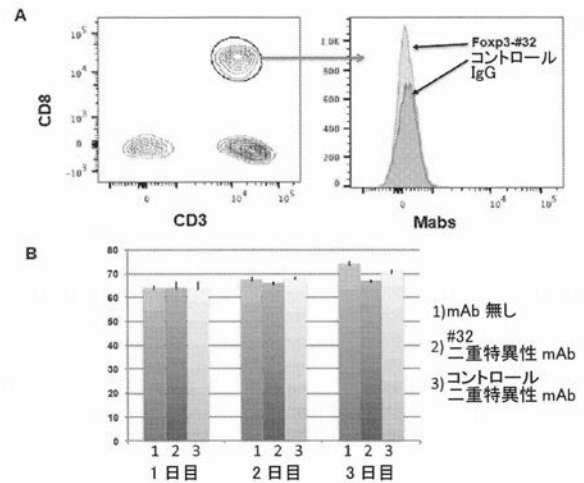
FIG. 8

健康なドナーの PBMC に対する Fxp3-#32 二重特異性 mAb による細胞傷害性

共培養グループ	実験のコントロール					
	MAC1 のみ A*02:01+	PBMC のみ A*02:01-	MAC1+ PBMC プラス 1 μg/mL コントロール 二重特異性 mAb	MAC1+ PBMC プラス 1 μg/mL Fxp3-#32 二重特異性 mAb		
共培養後の 残留 HLA-A2+ 細胞	100%	0%	100%	0%		
実験の試験グループ						
処理後の 残留細胞	HLA-A*02:0.1 陽性 PBMC			HLA-A*02:0.1 陰性 PBMC		
	CD3	CD19	CD33	CD3	CD19	CD33
PBMC のみ	71%	8%	13%	62%	6%	14%
Fxp3-#32 二重特異性 mAb 1 μg/mL	71%	7%	12%	62%	6%	14%
Fxp3-#32 二重特異性 mAb 0.2 μg/mL	69%	7%	14%	64%	7%	14%
コントロール 二重特異性 mAb 1 μg/mL	69%	9%	13%	62%	7%	16%
コントロール 二重特異性 mAb 0.2 μg/mL	69%	8%	14%	66%	7%	11%

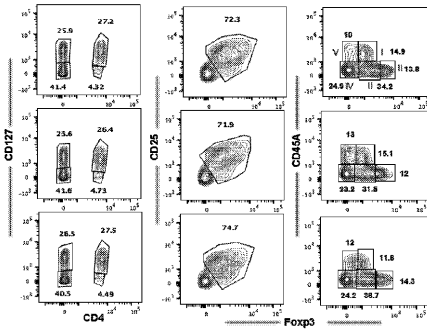
【 図 9 】

FIG. 9



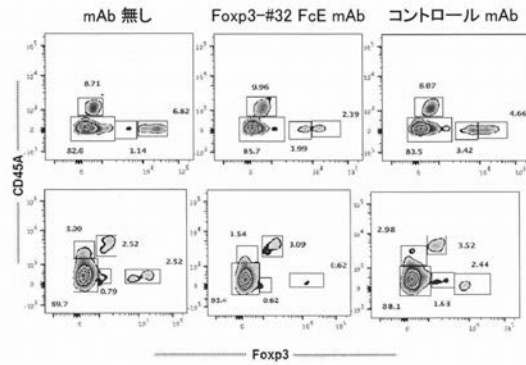
【 図 1 0 A 】

FIG. 10A



【 図 1 0 B 】

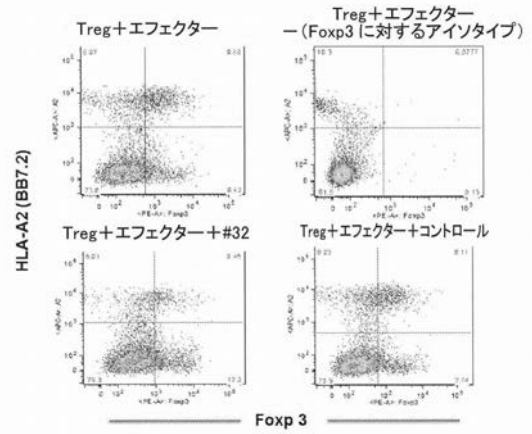
FIG. 10B



【 図 1 1 A 】

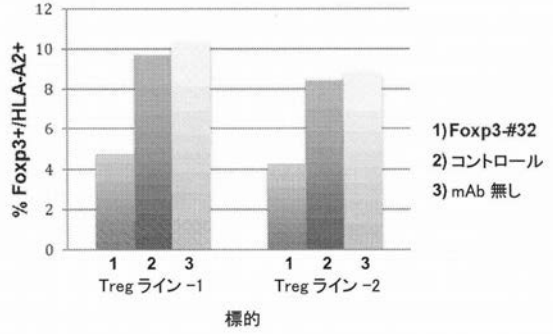
【 図 1 1 A 】

FIG. 11A



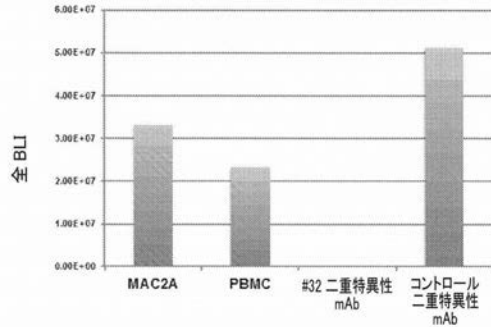
【 図 1 1 B 】

FIG. 11B



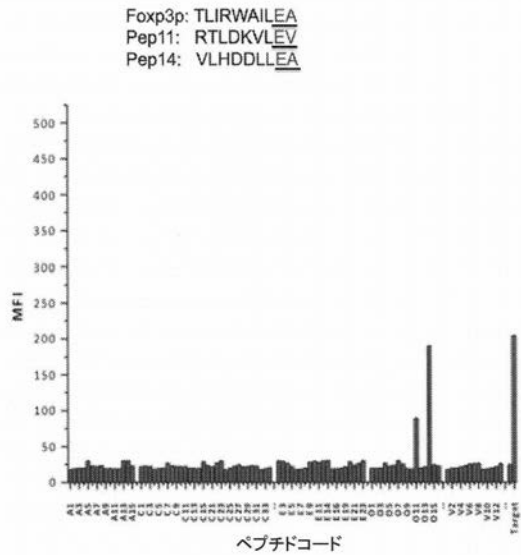
【 図 1 1 C 】

FIG. 11C



【 図 1 2 】

FIG. 12



【 図 1 3 - 1 】

FIG. 13

配列番号	種類	配列
1.	FoxP3 完全長ペプチド	MPNPRPGKPSAPSLALGSPGASPSWRAAPKASDLLGARPGGTFQGRDLRGGAAHSSSSINPMPPSOLQPLPLVMVAFSGARLGPLHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLOWHPLESPAMISLTPFTTATGVSLKARPLGPPGINVASLEWVSREPALCTFPNPSAPRKDSTLSAVPSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEPEDFLKHCOADHLLDEKGRAOCLLQREMVQSLQVLEKELKSAMQAGKALMALTAKASSVASSDKGCCIVAAAGSQPVPVPAWSPREAPDSLFAVRRLHWGSHGNSTFPEFLHNDYFKFHNMRPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFRNHPATWKNARHNLHLKCFVRVESEKGAVVTVDELFRRKRSQRSPRCSNPTPGP
2.	FoxP3-1 ペプチド	KLSAMQAHL
3.	FoxP3-2 ペプチド	SLHKCFVRV
4.	FoxP3-3 ペプチド	SLFAVRRLH
5.	FoxP3-4 ペプチド	NLSLHKCFV
6.	FoxP3-5 ペプチド	LLQDRPHFM
7.	FoxP3-6 ペプチド	LQLPTLPLV
8.	FoxP3-7 ペプチド	TLIRWAILEA
9.	FoxP3 クローン EXT017-32 重鎖	EVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFNHMHMWRVQAPGKGLEWVAVISFDGDDKDYADSVKGRFTISRNSRNTLFLQMNLRPEDTAVYCSRDPYHFASGSYSYFDYWGQGLTVTSVASTKGPSVFLPSSKSTSGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTYICNVNHPKSTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYTRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNYTKQSLSLSPGK
10.	FoxP3 クローン EXT017-32 軽鎖	QSVLTQPPSVSVAPGKTRITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYVYDSRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYQCQVWSSSDHYVFGTGKTVLGLGPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPKSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【 図 1 3 - 2 】

11.	抗 FoxP3/ 抗 CD3 BsAb	QSVLTQPPSVSVAPGKTRITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYVYDSRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYQCQVWSSSDHYVFGTGKTVLGLGSRGGGGGGGGGGGGGSLAEVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFNHMHMWRVQAPGKGLEWVAVISFDGDDKDYADSVKGRFTISRDNRSRNTLFLQMNLRPEDTAVYCSRDPYHFASGSYSYFDYWGQGLTVLTVSSSTGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFRYTMHWVVRQAPGQGLEWIGYINPSRQYNTYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLSRSEDATYTCARYYDDHYCLD YWGQGTITVTVSSGEGTSTGSGSGGGGGADDIVLQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNYWYQKPKGAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSDYSLTINSLEAEDAATYQCQWSSNPLTFGGGKTKVEIKHHHHHH
12.	EXT017-32 scFv-CD28-CD3 ゼータ CAR	QSVLTQPPSVSVAPGKTRITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYVYDSRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYQCQVWSSSDHYVFGTGKTVLGLGSRGGGGGGGGGGGGGSLAEVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFNHMHMWRVQAPGKGLEWVAVISFDGDDKDYADSVKGRFTISRDNRSRNTLFLQMNLRPEDTAVYCSRDPYHFASGSYSYFDYWGQGLTVLTVSSAAAEVYPPYLDNEKSNGTIIVKGGKHLCPSPFLFPGSPKPFWVLLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFVRSKRRLHSDYMNMTPRRPGTRKHYPYAPPRDFAAYSRVRKFSRSADAPAYQQGQNLNELNLRREYDVLDRKRRGDRPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKTDYDALHMQALPPR
13.	EXT017-32 scFv-41BB-CD3 ゼータ CAR	QSVLTQPPSVSVAPGKTRITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYVYDSRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYQCQVWSSSDHYVFGTGKTVLGLGSRGGGGGGGGGGGGGSLAEVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFNHMHMWRVQAPGKGLEWVAVISFDGDDKDYADSVKGRFTISRDNRSRNTLFLQMNLRPEDTAVYCSRDPYHFASGSYSYFDYWGQGLTVLTVSSGTITPAPRPTPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIWIWAPLAGTGWLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPMRPVQTTQEEEDGSCRFPEEPEGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNLRREYDVLDRKRRGDRPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKTDYDALHMQALPPR
14.	EXT017-32-HvHc-TCR デルタ (caTCR)	METDITLLVWLLLVVPGSTGEVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFNHMHMWRVQAPGKGLEWVAVISFDGDDKDYADSVKGRFTISRDNRSRNTLFLQMNLRPEDTAVYCSRDPYHFASGSYSYFDYWGQGLTVLTVSSASTKGPSVFLPSSKSTSGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTYICNVNHPKSTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYTRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNYTKQSLSLSPGK

【 図 1 3 - 3 】

		KETENTKQPKSCHPKPAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNLLTAKLFFL
15.	EXT017-32-LvLo-TCR ガンマ (caTCR)	METDITLLVWLLLVVPGSTGQSVLTQPPSVSVAPGKTRITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYVYDSRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYQCQVWSSSDHYVFGTGKTVLGLGPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPKSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPIKTDVITMDPKDNCCKDANDTLLQLLNTSAYMYLHLLKLSVVYFAITCCLLRRATFCCNGEKS
16.	抗 FoxP3 HCVR-CDR1	GDTFRSYA
17.	抗 FoxP3 HCVR-CDR2	IIPIFGTP
18.	抗 FoxP3 HCVR-CDR3	ARSIYRYSEYDH
19.	抗 FoxP3 LCVR-CDR1	SSNIGAGYD
20.	抗 FoxP3 LCVR-CDR2	GNS
21.	抗 FoxP3 LCVR-CDR3 FoxP3 配列番号 :14	QSYDSSLGSYV
22.	抗 FoxP3 HCVR-CDR1	GYTFNSYY
23.	抗 FoxP3 HCVR-CDR2	INPSVGMT
24.	抗 FoxP3 HCVR-CDR3	ARDWGWQMMYDG
25.	抗 FoxP3 LCVR-CDR1	SSNIGSNT
26.	抗 FoxP3 LCVR-CDR2	SNN
27.	抗 FoxP3 LCVR-CDR3	AAWDDSLNGQGV
28.	抗 FoxP3 HCVR-CDR1	GGTFSSYA
29.	抗 FoxP3 HCVR-CDR2	IIPIFGTA
30.	抗 FoxP3 HCVR-CDR3	ARYSYKYGELDT

【 図 1 3 - 4 】

31.	抗 FoxP3 LCVR-CDR1	SSNIGAGYD
32.	抗 FoxP3 LCVR-CDR2	GNS
33.	抗 FoxP3 LCVR-CDR3	QSYDSSLGSV
34.	抗 FoxP3 HCVR-CDR1	GYTFNTYY
35.	抗 FoxP3 HCVR-CDR2	IRPSGGIT
36.	抗 FoxP3 HCVR-CDR3	ARSWDYFASNDF
37.	抗 FoxP3 LCVR-CDR1	NIGSES
38.	抗 FoxP3 LCVR-CDR2	DDD
39.	抗 FoxP3 LCVR-CDR3	QVWDRSSDHW
40.	抗 FoxP3 HCVR-CDR1	GGTFSTYA
41.	抗 FoxP3 HCVR-CDR2	IIPIFGTA
42.	抗 FoxP3 HCVR-CDR3	ARAEVYGEYDQ
43.	抗 FoxP3 LCVR-CDR1	SSNIGAGYD
44.	抗 FoxP3 LCVR-CDR2	GNS
45.	抗 FoxP3 LCVR-CDR3	QSYDSSLGSYV
46.	抗 FoxP3 HCVR-CDR1	GFTFNHHA
47.	抗 FoxP3 HCVR-CDR2	ISFDGDDK
48.	抗 FoxP3 HCVR-CDR3	SRDPYHFASGSYSYFDY
49.	抗 FoxP3 LCVR-CDR1	NIGSKS
50.	抗 FoxP3 LCVR-CDR2	YDS
51.	抗 FoxP3 LCVR-CDR3	QVWSSSDHYV
52.	抗 FoxP3 HCVR-CDR1	GYTFNTYY
53.	抗 FoxP3 HCVR-CDR2	IRPSGGNT

【 図 1 3 - 5 】

54.	抗 FoxP3 HCVR-CDR3	ARSWNSRDVDS
55.	抗 FoxP3 LCVR-CDR1	SGSIASHY
56.	抗 FoxP3 LCVR-CDR2	ENN
57.	抗 FoxP3 LCVR-CDR3	QSYDRSNHV
58.	抗 FoxP3 HCVR-CDR1	GGTFSSYA
59.	抗 FoxP3 HCVR-CDR2	IIPIFGTA
60.	抗 FoxP3 HCVR-CDR3	ARPSYYSIKS
61.	抗 FoxP3 LCVR-CDR1	TSNIGKNG
62.	抗 FoxP3 LCVR-CDR2	NDH
63.	抗 FoxP3 LCVR-CDR3	ATWDDTLDLPL
64.	抗 FoxP3 HCVR	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDTFSRYAISWV RQAPGQGLEWMGRIIPFGTANYAQKFGQRVITITADEF TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYRYSEYDHWGQG TLVTVSS
65.	抗 FoxP3 HCVR	EVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSKASGYTFSNYIHWV RQAPGQGLEWMGAINPSVGTITTYAQNFQGRVMTSD TSTSTVYMESSLTSEDYAVYYCARDWGQMMYDG WGQGLVTVSS
66.	抗 FoxP3 HCVR	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWV RQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFGQRVITITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYSYKYGELDTWQ GTLVTVSS
67.	抗 FoxP3 HCVR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYIHW VRQAPGQGLEWMGIRPISGKITNYAQKFGQRVITITADK TSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSDYFASDFWQ QGTLVTVSS
68.	抗 FoxP3 HCVR	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYAIWV RQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFGQRVITITADKS TSTAYMEVRLRSEDTAVYYCARAEYVYGEYDQWG QGTLVTVSS
69.	抗 FoxP3 HCVR	EVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGTFNNHAMHW VRQAPGKLEWVAVISFDGDDKIFYADSVKGRFTISR NSRNTLFLQMNNLRPEDTAVYYCSRDPYHFASGSYSY FDYWGQGLVTVSS

【 図 1 3 - 6 】

70.	抗 FoxP3 HCVR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYIHW VRQAPGEGLEWMGIIRPSSGGNTNYAQKFGQRVITMTR DTSTRVYMESSLRSEDTAVYYCARSWNSRDVDSW QGGLVTVSS
71.	抗 FoxP3 HCVR	QMQLVQSGAEVKKPGASVKLSCASGGTFSSYAIWV RQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFGQRVITITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPSYYSIKSAWDHWG QGTLVTVSS
72.	抗 FoxP3 HCVR	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYNFASEWIGWV RQMPGKLEWMLIYPAESEIHYSPSQGGQVTVSDKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARAWDANYIYMDIWG QGTLVTVSS
73.	抗 FoxP3 HCVR	QVQLVQSGGGLVQPGGSLKSCAASGFAFSGSLHWV RQASGKLEWVGRITSKAYNYATLYAASVKGRFTISR DDSKNTAYLQMNLSLQTEDTAVYYCTQTGDSASAYWQ GTLVTVSS
74.	抗 FoxP3 HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSCAASGTFSSYWMWV VRQAPGKLEWVAVISFDGDDKIFYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNLSLQTEDTAVYYCARYGGGYPDSWG QGTLVTVSS
75.	抗 FoxP3 HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSCAASGTFSSYAMWV RQAPGKLEWVAVISGRGGSIIHYADSVKGRFTISRDN SQTSTVFLQMNLSLQTEDTAVYYCAKSEEDYFYHMDAW GIGTITVTVSS
76.	抗 FoxP3 HCVR	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRSCAASGTFSSYAMWV IRQSPRGLLEWLRITRYRKYWYIYAPSVRITINRD TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSTGTFDYWGQGT LTVTVSS
77.	抗 FoxP3 HCVR	QMQLVQSGGGVQPGSRSLRSCAASGTFSSYAMHW VRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYIYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNLSLQTEDTAVYYCARDRHVYVMDVW GKGTITVTVSS
78.	抗 FoxP3 LCVR	QSVLTQPPSVSGAPQRVITISCTGSSNIGAGYDVHWY QLPGTAPKLLIYGNNSRPSGVPDRFSGSKSGTASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLGTVYFGTGTVTVLG
79.	抗 FoxP3 LCVR	QAVLTQPPSVSGAPQRVITISCTGSSNIGAGYDVHWY QLPGTAPKLLIYGNNSRPSGVPDRFSGSKSGTASLAI GLQSEDEADYYCAAQWSSLSGTVYFGTGTVTVLG
80.	抗 FoxP3 LCVR	QSVVTPPPSVSAPGQKVTISCTGSSNIGAGYDVHWY QLPGTAPKLLIYGNNSRPSGVPDRFSGSKSGTASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLGTVYFGGGLVTVLG

【 図 1 3 - 7 】

81.	抗 FoxP3 LCVR	QAVLTQPPSVSAPGKTARITCGGNNIGSEVHWYQ KPGQAPLVVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDRSSDHWVFGGGTKLTVLG
82.	抗 FoxP3 LCVR	QSVLTQPPSVSGAPQRVITISCTGSSNIGAGYDVHWY QLPGTAPKLLIYGNNSRPSGVPDRFSGSKSGTASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLGTVYFGTGTVTVLG
83.	抗 FoxP3 LCVR	QSVLTQPPSVSAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQ KPGQAPLVVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDRSSDHWVFGGGTKLTVLG
84.	抗 FoxP3 LCVR	NFMLTPHVSSESPGKTVITISCTGSSNIGAGYDVHWY QRPGSSPTTIVYENNRQPSGVPDRFSGSDSSNSASLTI SGLKTEDEADYYCQSYDRSNHVVFGGGTKLTVLG
85.	抗 FoxP3 LCVR	QAVLTQPPSVSGAPQRVITISCTGSSNIGAGYDVHWY QLPGKAPKLLIYDHLSSGSDRPSGSKSGTASLAI GLQSDDEADYYCATWDDTLDLPLFGGGTKVTVLG
86.	抗 FoxP3 LCVR	QSVVTPPPSVSGAPQGVITICTGSSNIGAGYDVHWY QLPGTAPKLLIYGNNSRPSGVPDRFSGSKSGTASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLGTVYFGGGLVTVLG
87.	抗 FoxP3 LCVR	SYELTQPPSVSAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQ KPGQAPLVVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDRSSDHWVFGGGTKLTVLG
88.	抗 FoxP3 LCVR	SYELTQPPSVSAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQ KPGQAPLVVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDRSSDHWVFGGGTKLTVLG
89.	抗 FoxP3 LCVR	SYVLTQPPSVSAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQ KPGQAPLVVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDRSSDHWVFGGGTKLTVLG
90.	抗 FoxP3 LCVR	SYVLTQPPSVSAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQ KPGQAPLVVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDRSSDHWVFGGGTKLTVLG
91.	抗 FoxP3 LCVR	QSVLTQPPSVSAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQ KPGQAPLVVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDRSSDHWVFGGGTKLTVLG
92.	抗 AFP HCDR1	GSYFFNYW
93.	抗 AFP HCDR2	IDPQDSYT
94.	抗 AFP HCDR3	ARYVYSLVDI
95.	抗 AFP LCDR1	SSDVGGYNY
96.	抗 AFP LCDR2	DVN
97.	抗 AFP LCDR3	SSYTTGSRVAV

【 図 1 3 - 8 】

98.	抗 AFP scFv	QSVLTQPPSVSAPGQVITISCTGSSNIGAGYDVHWY QHPGKAPKLLIYDNNRPSVSNRPSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCQSYDSSRVAVFGGGTKLTVLGS GGGSGGGGGGGGGGLEMALVQLVQSGAEVKKPGES LTISSKASGYSPFNWYITWVVRQMSGGGLEWMLRDPG DSYTYNPSFQGHVITISDKSTNTAYLHWNSLKASDTA MYYCARYVYVSLVDIWGQGLVTVSS
99.	CD28-CD3 ゼータ	AAAEVVMYPPYVLDNEKSNIGIIVKGGKHLCPSPFP SKPFWLVVYGGVLAICYSLVTVAFIHWVRSKRSL HSDYMNMPRRPGRTRKHYPYAPRDFAAVRSRVK SRADAPAYQQGQNLNELNLGRREYDVLDKRR RDEPMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGM KGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
100.	41BB-CD3 ゼータ	TGTTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCVGLLVLVITLYCKRGRK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRPEEEEGCELVR KFSRSDAPAYQQGQNLNELNLGRREYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEI GMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
101.	抗 CD19 抗体の IgVHドメイン	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYFTSYWIGWVR QMPGKLEWMLIYVPGSDTRYSPSQGGQVTVISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSN WVYVYDSSDHWVFGGGTKLTVLG
102.	抗 CD19 抗体の IgVLドメイン	LPVLTQPPSVSAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQ KPGQAPLVVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDRSSDHWVFGGGTKLTVLG
103.	抗 CD19 クロ 5-13 caTCR デルタ	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYFTSYWIGWVR QMPGKLEWMLIYVPGSDTRYSPSQGGQVTVISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSN WVYVYDSSDHWVFGGGTKLTVSSASTKPSVFLPAPSSKTS GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNGLKPSVTEQVTHFPAV LQSSGLYSVSVTVPSSSLGTQYICNVNHTKPSVTKVDR VEPKSCEVKTDSITDHVKPKETENTKQPSKCHKPKAIVH TEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNELLAKLFFL
104.	抗 CD19 クロ 5-13 caTCR ガンマ	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYFTSYWIGWVR QMPGKLEWMLIYVPGSDTRYSPSQGGQVTVISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSN WVYVYDSSDHWVFGGGTKLTVSSASTKPSVFLPAPSSKTS GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNGLKPSVTEQVTHFPAV LQSSGLYSVSVTVPSSSLGTQYICNVNHTKPSVTKVDR VEPKSCEVKTDSITDHVKPKETENTKQPSKCHKPKAIVH TEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNELLAKLFFL
105.	抗 CD19 HCDR1	GSYFTSYW



【 図 1 3 - 1 3 】

146.	抗 WT1 LCVR	QSVLTQPPSVSGAPQQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQ QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTASLAISG LQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGTGKLTVLG
147.	抗 WT1 LCVR	QAVVTPPPASGTPGQRVTISCTGSSNIGSNVNTVWYQQ VPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTASLAISGL QSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGKLTVLGQPKA NPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DGSPPKAGVETKPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSH RSVSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS*
148.	抗 WT1 HC- CDR1	GGTFSSYAIS
149.	抗 WT1 HC- CDR2	GIIPFGTANYAQKFGQ
150.	抗 WT1 HC- CDR3	RIPPPYGMDEV
151.	抗 WT1 LC- CDR1	SGSSSNIGSNVYVY
152.	抗 WT1 LC- CDR2	RSNQRPS
153.	抗 WT1 LC- CDR3	AAWDDSLNGVV
154.	抗 WT1 HC- CDR1	GDSVSSNSAAWN
155.	抗 WT1 HC- CDR2	RTYYGSKWYNDYAVSVKS
156.	抗 WT1 HC- CDR3	GRLGDAFDI
157.	抗 WT1 LC- CDR1	RASQSISSYN
158.	抗 WT1 LC- CDR2	AASSLQS
159.	抗 WT1 LC- CDR3	QQSYSTPLT
160.	抗 WT1 HC- CDR1	GYSFTNFWIS
161.	抗 WT1 HC- CDR2	RVDPPGYSYSTYSPSFQ
162.	抗 WT1 HC- CDR3	VQYSYDWFDP
163.	抗 WT1 LC- CDR1	SGSSSNIGSNVTVN
164.	抗 WT1 LC- CDR2	SNNQRPS
165.	抗 WT1 LC- CDR3	AAWDDSLNGWV

【 図 1 3 - 1 4 】

166.	抗 WT1 HC- CDR1	GYNFSNKWIG
167.	抗 WT1 HC- CDR2	IIPYGSIDITYSPSFQ
168.	抗 WT1 HC- CDR3	HTALAGFDY
169.	抗 WT1 LC- CDR1	RASQNKWLA
170.	抗 WT1 LC- CDR2	KASSLES
171.	抗 WT1 LC- CDR3	QQYNSYAT
172.	抗 WT1 HC- CDR1	GFTFDDYGMS
173.	抗 WT1 HC- CDR2	GINWNGGTYGADSVRG
174.	抗 WT1 HC- CDR3	ERGYGYHDPHDY
175.	抗 WT1 LC- CDR1	GRNNIGSKSVH
176.	抗 WT1 LC- CDR2	DDSDRPS
177.	抗 WT1 LC- CDR3	QVWDSDDHVV
178.	抗 WT1 HC- CDR1	GFSVSGTYMG
179.	抗 WT1 HC- CDR2	LLYSGGGTYHPASLQG
180.	抗 WT1 HC- CDR3	GGAGGGHFD
181.	抗 WT1 LC- CDR1	TGSSSNIGAGYDVH
182.	抗 WT1 LC- CDR2	GNSNRPS
183.	抗 WT1 LC- CDR3	AAWDDSLNGYV
184.	抗 WT1 scFv	QTVVTPPPASGTPGQRVTISCTGSSNIGSNVYVYWYQQ LPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTASLAISG RSVDEADYYCAAWDDSLNGVFGGKLTVLGSRGG GGSGGGGGGGSLEMAQVQLVQSGAEVKKPSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMMGGIPIGTAN YAQKFGQGRVTITADESTAYMELSLRSEDYAVYYCA RRIPPPYGMDEVWQGGTIVTVSS
185.	抗 WT1 scFv	DIQMTQSPSSLASVGDVRRITCRASQSISSYLWYVQPK GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFLTITSSIQPE

【 図 1 3 - 1 5 】

		DFATYYCQSYSTPLTGGGGTKVDIKRSRGGGGGGGG GSGGGGSLEMAQVQLQSGPGLVKPQSLTSLCAISGL SVSSNSAAWNWIRQSPRGLWLRGTYGSKWYNDYA VYSKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGR LGDADFIWQGGTIVTVSS
186.	抗 WT1 scFv	QAVVTPPPASGTPGQRVTISCTGSSNIGSNVNTVWYQQ VPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTASLAISGL QSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGKLTVLGSRGG GSGGGGGGGGSLEMAQVQLVQSGAEVKKPESLRIS CKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKLEWMMGRVDPGYSY STYSPFQGHVITISADKSTAYLQWNSLKASDTAMYY CARVQYSGYDWFDPWQGGTIVTVSS
187.	抗 WT1 scFv	DIQMTQSPSSLASVGDVRRITCRASQSISSYLWYVQPK RPGKAPQLLIYKASSLESQVPSRFSGSGTGYEYTLTSSLQ PDDFATYYCQYNSYATFGQGTVEIKRSRGGGGGGGG GSGGGGGGSLEMAQVQLVQSGAEVKKPESLCKISCKGS GYNFSNKWIGVVRQLPGRGLEWIAIIPYSDITYSPSFQ GRVITISADTSINTAYLHWHSLKASDTAMYYCVRHTALA GFDYWGGLTIVTVSS
188.	抗 WT1 scFv	QSVVTPPPSVAPGKTRITCRNIGSKSVHWYQK PGQAPVLYVYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLISRVE AGDEADYYCQVWDDSDHVFVGGGKLTVLGSRGGG GSGGGGGGSLEMAEVQLVQSGGGVVRPGLSLRSCA ASGTFDDYGMVWVRQAPGKLEWVSGINWNGGTYG ADSVRGRFTISRDNKAKNSLYLQMNLRADTALYYCAR ERGGYHDPHDYWGQGLTIVTVSS
189.	抗 WT1 scFv	QSVLTQPPSVSGAPQQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQ QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTASLAISG LQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGTGKLTVLGSRGG GSGGGGGGSLEMAEVQLVETGGGLLPFGGSLR LSCAASGFSVSGTYMGWVVRQAPGKLEWVALLYSGG TYHPASLQGRFVSRDSSKNMYYLQMNLSKAEADTAVYY CAKGGAGGGHFDVWQGGTIVTVSS
190.	WT1 エピトープ	RMPFNAPYL
191.	抗 ROR2 HCVR	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFDYIHWV RQAPGGLEWMMGNPNPNSGNSVSAQKFGQGRVMTTRD TSINTAYMELSLSDTAVYYCARNSEWHPWGYDY WQGGTIVTVSS
192.	抗 ROR2 HCVR	EVQLVQSGAEVKKPESLCKISCKGSGYRFSKYWIGWVR QMPGKLEWMMGIHPDSDTRYSPSFQGOVTISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYYCARFSFSFYDYWGQGLTIV TVSS
193.	抗 ROR2 HCVR	EVQLVQSGAEVKKPESLCKISCKASGYSFNSYWIGWVR QMPGKLEWMMGIHPDSDTRYSPSFQGOVTISADKSI

【 図 1 3 - 1 6 】

		TAYLQWYSLKVAADTAKYYCVRPRGAFDIWQGGTIVTV SS
194.	抗 ROR2 HCVR	QVQLVESGAEVKKPESLCKISCKASGYSFNSYWIGWVR QMPGKLEWMMGIHPDSDTRYSPSFQGOVTISADKSI TAYLQWYSLKVAADTAKYYCVRPRGAFDIWQGGTIVTV SS
195.	抗 ROR2 HCVR	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYWMVWR QAPGKLEWVAVISYDGSNNYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAMYYCARGFSYDSDLWGQGLT IVTVSS
196.	抗 ROR2 HCVR	EVQLVESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYVSWI RQHPGKLEWIGIYIYSGSTYVNSPKSRVITISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAMYYCARGGLYWTYSQDVWQGG TLVTVSS
197.	抗 ROR2 HCVR	QMQLVQSGGGVQVPRSLRSCAASGTFSSYDMHWV RRAPGKLEWVAVISYDGSNNYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNLSRAEDTAMYYCARSSAWVGGFLSGTD DWQGGTIVTVSS
198.	抗 ROR2 HCVR	EVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLNDYMDWV RQAPGKLEWVGRIRDKAHGDTTEYIASVKDRFIVSRD DSKNSLYLQMNLSKTEDTAMYYCARWVDYQYGIW SYHDFWQGGTIVTVSS
199.	抗 ROR2 HCVR	QVQLVQSGGGVQPGGSLRSCAAGTFSSYAMVWVR QAPGKLEWVAVISYDGSNNYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNLSRAEDTAMYYCARHYSYSSDWSWQGGTIVTV SS
200.	抗 ROR2 HCVR	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFYIHWV RQAPGQGLEWMMGIHPDSDTRYSPSFQGOVTISADKSI STSTVYMELSLRSEDYAVYYCARGGYTGWSPDPWQ GTLVTVSS
201.	抗 ROR2 HCVR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFYIHWV RQAPGQGLEWMMGIHPDSDTRYSPSFQGOVTISADKSI STSTVYMELSLRSEDYAVYYCARHLPMPGMVDWVDF KQGGTIVTVSS
202.	抗 ROR2 HCVR	QITLQESGPELVKPTQTLTCTFSGFLSTSGMSVWIR QPPGKALEWLRARIDWDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKN QVLTMTNTPDVTATYYCARGFYLAYSYDSWQGGT IVTVSS
203.	抗 ROR2 HCVR	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFYIHWV RQAPGQGLEWMMGIHPDSDTRYSPSFQGOVTISADKSI TNTVYMDLSSLRSEDYAVYYCARGFYLAYSYDSWQGG QGLTIVTVSS
204.	抗 ROR2 LCVR	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYSYASWYQK PGQAPVLYVYKNNRPSGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQ AEDEADYYCNSRSDSSGNHVLVFGGKLTIVLG



【 図 1 3 - 2 1 】

		g ccttacaatgaccaacacgaccctgfgacacagccacgtattactgtgcgcggt tctactcgtgcttaccgttcttaccgattcttgggtcaagctctgctgacgtctctca
241.	抗 ROR2 LCVR ポリヌクレオチド	tctactgagctgactcagccactcagctcagctcagctggccctggacagagccagatt accctgggggaacaacattggaagtaaaatgctcactggtaccagagagccag gcccagccctctgctgctcactatagggatagcaaccgcccctcctggatccctgag cgattctgctcctcaactcgggaacagccaccctgaccatcagcagagcccaag cggggatgaggctgacttactgctcagctgfggacagcagattgtgattcggcg gagggacaacagctgaccctcctggt
242.	抗 ROR2 HCVR ポリヌクレオチド	gaagtgcagctggctcagctcgggctgaggtgaagaagcctgggcccctcagtgagg tttctgcgaagcactgatacactccaactcaactatactatgctgctgacagagcc cctggacagggctgagtgagtgaggaataatcaaccctcagctgtagagcaagta cgacagaggttccagggcagagtcaccatgaccagggacagctccacgaacacagct ctacatgacctgagcagctgagatctgaagacaccgcatgtattactgtgcgctc tggttactcgggctgtaacaggtgatcagctgggtcaagctcctggtgaccgtctct ca
243.	抗 ROR2 HC- CDR1	GYTFTDYY
244.	抗 ROR2 HC- CDR2	MNPNSGNS
245.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARNSEWHPWGYDY
246.	抗 ROR2 LC- CDR1	SLRSYY
247.	抗 ROR2 LC- CDR2	GKN
248.	抗 ROR2 LC- CDR3	NSRDSSGNHLV
249.	抗 ROR2 HC- CDR1	GYRFSKYW
250.	抗 ROR2 HC- CDR2	IYPGDSDT
251.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARSFSSFIYDY
252.	抗 ROR2 LC- CDR1	QSVSSN
253.	抗 ROR2 LC- CDR2	GAS
254.	抗 ROR2 LC- CDR3	QQYGRSPLT
255.	抗 ROR2 HC- CDR1	GYFSNYYW
256.	抗 ROR2 HC- CDR2	IYPDSDT
257.	抗 ROR2 HC- CDR3	VRPRGAFDI

【 図 1 3 - 2 2 】

258.	抗 ROR2 LC- CDR1	QVGVGIN
259.	抗 ROR2 LC- CDR2	DAS
260.	抗 ROR2 LC- CDR3	QYYSFPWT
261.	抗 ROR2 HC- CDR1	GYFSNYYW
262.	抗 ROR2 HC- CDR2	IYPDSDT
263.	抗 ROR2 HC- CDR3	VRPRGAFDI
264.	抗 ROR2 LC- CDR1	SSNIGAGHA
265.	抗 ROR2 LC- CDR2	DNA
266.	抗 ROR2 LC- CDR3	GTWDDSPSAYV
267.	抗 ROR2 HC- CDR1	GFTFSYYW
268.	抗 ROR2 HC- CDR2	IKQDSEK
269.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARGSFYSDSL
270.	抗 ROR2 LC- CDR1	QSLVHSDGNTY
271.	抗 ROR2 LC- CDR2	KVS
272.	抗 ROR2 LC- CDR3	MQTTHWPPT
273.	抗 ROR2 HC- CDR1	GGSSGGYY
274.	抗 ROR2 HC- CDR2	IYYSST
275.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARGGLYWTYSQDV
276.	抗 ROR2 LC- CDR1	SSNIGSDY
277.	抗 ROR2 LC- CDR2	RND
278.	抗 ROR2 LC- CDR3	VAWDDSLSGYV
279.	抗 ROR2 HC- CDR1	GFTFSNYD
280.	抗 ROR2 HC- CDR2	ISYDGSNN

【 図 1 3 - 2 3 】

281.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARSSAWVGGGFLSGTDD
282.	抗 ROR2 LC- CDR1	QSVSSSY
283.	抗 ROR2 LC- CDR2	DTS
284.	抗 ROR2 LC- CDR3	LHYGRSPVPT
285.	抗 ROR2 HC- CDR1	GFSLNDYY
286.	抗 ROR2 HC- CDR2	IRDKAHGDTT
287.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARWVDDYQGYWIWSYHDF
288.	抗 ROR2 LC- CDR1	QSLAYS DGNTY
289.	抗 ROR2 LC- CDR2	KVS
290.	抗 ROR2 LC- CDR3	MQGTHWPHT
291.	抗 ROR2 HC- CDR1	GFTFSYA
292.	抗 ROR2 HC- CDR2	ISGSGGST
293.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARHYSSDS
294.	抗 ROR2 LC- CDR1	RLREKY
295.	抗 ROR2 LC- CDR2	EDT
296.	抗 ROR2 LC- CDR3	QAWDSSVI
297.	抗 ROR2 HC- CDR1	GYFTSY
298.	抗 ROR2 HC- CDR2	INPSGGST
299.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARGGYTGWSPSDP
300.	抗 ROR2 LC- CDR1	SSDVGGINY
301.	抗 ROR2 LC- CDR2	DVS
302.	抗 ROR2 LC- CDR3	GSFTSSITYV
303.	抗 ROR2 HC- CDR1	GYFTSYG

【 図 1 3 - 2 4 】

304.	抗 ROR2 HC- CDR2	ISAYNGNT
305.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARHLGPMGMYDWSFDK
306.	抗 ROR2 LC- CDR1	NIGRKS
307.	抗 ROR2 LC- CDR2	YDS
308.	抗 ROR2 LC- CDR3	QVWDRSSDLYV
309.	抗 ROR2 HC- CDR1	GFSLSTSGMS
310.	抗 ROR2 HC- CDR2	IDWDDDK
311.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARGFLAYGSYDS
312.	抗 ROR2 LC- CDR1	SGDVGGINY
313.	抗 ROR2 LC- CDR2	DVN
314.	抗 ROR2 LC- CDR3	SSYTSTTV
315.	抗 ROR2 HC- CDR1	GYFTNY
316.	抗 ROR2 HC- CDR2	INPTSGRT
317.	抗 ROR2 HC- CDR3	ARSGYYWGVNGDQ
318.	抗 ROR2 LC- CDR1	NIGSKN
319.	抗 ROR2 LC- CDR2	RDS
320.	抗 ROR2 LC- CDR3	QVWSSIVV
321.	抗 ROR2 / 抗 CD3 BsAb	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQK PQAPVLVIYRDSNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRAQ AGDEADYYCQVWDSIVVFGGGTKLTVLGSRGGGSG GGSGGGGSLMAEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYFTNYIHWVRQAPGQGLEWMIINPTSGRTRYAQ RFQGRVTMTDRSTNTVYMDLSSLRSEDTAMYVCARS GYWGVNGDQWGGILVTVSSGGGSDVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCASGYFTFRYTMHWVRQAPGQGLE WIGYINPSRGYTNVADSVKGRFTITTDKSTAYMELSS LRSEDTATYVCARYDDHYCLDYGWGGITVTVSSGEG TSTGSGGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR.A SOSVSYMNWYQKPGKAPKRWIYDTSKYASGVPARFS



【 図 1 3 - 2 5 】

		GS GSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQWSSNPLTFGGGT KVEIKHHHHH
322.	ラムダ軽鎖 定常領域 (ポリペプチド)	QPKANPTVTLFPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADGSPVKAQVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPAQ WKSRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS
323.	ラムダ軽鎖 定常領域 (ポリヌクレオチド)	cagcctaaaggccaacctaccgtgacctgttccccatctccaggaactgcagc caacaaggccacctgtgacctgacatctaccctggccgctgacctgctgc ctggaaggctgatgacctctctggaaggccggctggaaccaaccagccctcaag cagtcacaacaataacgcgcctctctctactctgctccagccctgagcagtgaa gtccccaggtctctacagctgcgaagtgaccacagggctccaccctggaanaagc gtggctctaccagtgctctcag
324.	カッパ軽鎖 定常領域 (ポリペプチド)	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSLSLTLKSKD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKFSNRGEC
325.	カッパ軽鎖 定常領域 (ポリヌクレオチド)	accgtggccgctccctcctgctgctcaatctccaccctccagcagcagctgaagtcggc accgtctctgctgctgctgctgaacaactctaccctccagcagcagctgctgag aaggtggacaagccctcagagcgcgcacctccaggaatcctgaccagcagcagc tccaagacagaccctaccctctccaccctcagccctcgaagcgcagctcagc gaagcacaaggtgtagcctgcgaagtgaccacagggcctctgtagccccgtgacc aagctctcaaccagcagctgctcag
326.	重鎖 定常領域 (ポリペプチド)	ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHPFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEKSKDKHTHTCPPAPEL LGGPSVFPLPDKDITLMSRTPETVTVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISAKGQPREPQV YTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPLVDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SYMHEALHNHYTQKLSLSPGK
327.	重鎖 定常領域 (ポリヌクレオチド)	gtctccagctcaccagggccatcctgcttccccctggaccctctcccaagc acctctggggcaccagcgcctggcctgctgcaagactctccccgaacc tgacgtctgctgacctcagccctcagcagcagcagctgcaacctccccgct ctcactctcctcagactctcctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc ggcaccaccagctcactctgcaagctgaatcaaacgcacacacacacacacac aagaaggtgagcccaactctgcaacaacacacacacacacacacacacacacac tgaactctggaggaccctgactctctctcccccaaaaacacacacacacacac gatctccccaccctgagctcactctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct gagctcaagctcaactgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct cgcggagagcagctcaaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc ccaggactgctgaagcagagctcaagctgcaagctcctcaaacagccctccca gccccatcgagaac tacacccctgccccaccggagagagagagagagagagagagagagagagagag tggctcaaggtctctaccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc ggagac cagcaagctcaccctggacacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc

【 図 1 3 - 2 6 】

		gfgatgatgaggctctgcacaaccaacacacagagaagcctctccctgctccgggt aaatba
328.	ROR2 ポリヌクレオチド	ATGGCCCGGGGCTCGGCGCTCCCGGGCGGCGGCTGC TGTGCATCCCGGCGCTGGGGCGCCCGCGCTTCT GCTCTCAGTGTCCCGGACTTCAAGTAAAGTGGAGGTT CTGGATTCGAACACACCTTTTAGGACCTTGAATGGG AGGACGGCCGATTCACACTCTGAAGGTTACTTTCT GAATTTTCTGGAGCGATAACAATATACCATTTGTC CAAGGCCAGACGGCAATTTCTGACTGCAAGGTGGCA GGAAACCCACCCCTAACCTGGCGGCTAAAGAATG ATGCCCGGTGGTCAAGGACCGCGGGGATCATCAT CCGGAAGACAGAATATGGTTACAGACTGCGCAATCCAG GACCTGGACAGACAGACTGGCTACTACAGTGGC TGGCCCAACGGGATGAAGACATTACCGCCACTGG CGTCTGTTTGTGGCGGTGGTCCAACGCACAGCCCA AATCATAACTTTAGGATGATTACACAGGATGGGT TCTGCCAGCTTACCGGGGAATTGCCTGTGCACGCTT CAITGGCAACCGGACATTTATGTGGACTCGCTTACG ATGACGGGGGAGATTGAAAACGAATACAGCGGGC TTCACCATGATCGGCAGCTTACGCACCTGTCCGACC AGTGCTCACAGTCCGCTCCATCTCTTCCACTTCT GTGTTTCTCTGTGGCAGCGCGCTCCCGGACACCA AGCCGCGTGGCTGTGGCGGACGAGTGGAGGTTGCT GGAGAGCGACTGTGGCGGACGAGTACCATCGCC CGCTCAACCCGCTCATCTCATGGGCTTCACTGCC CAAGTGTGAGCGCTGCCACTGCTGAGACCCCGGAC GCTGCCAATCGATCGGCAATGGCATCCAGCGGAGA GGCTGGCCGCTACGACTGTGACTGAGACTGGT CATGGATTACAGAGGAACGGCAAGCACCACCAAGTC AGGCCACCAGTCCAGCGCTGGCCCTGACAGCACC CACAGCCACACTGTCCAGCACAGACTTCCCTGAGC TTGGAGGGGGGCGCGCTACTCCCGGAACCCCGGAG GCCAGATGGAGGGCCCTGGTCTTACCCAGAATAA AAACGTACGCATGGAAGTGTGACTGAGACTGGT AGTCCCGGAGCAGCAGCAAGATGGGGATTCTGTACA TCTTGGTCCCAGCACTGCTGACTGAGACTGCTGCT TGCTTTTCTTCTGGTGTGATGTGGCGGAATAAGCA GAAGGACTCTGCTGCCACACCGCAGCGGCGACAGCTG ATGGCTCGCCAGCCAAAGCAATGGAATGCCCTCA TTAACAGCACAAACAGCGCAACTCAAAGAGATCA GCCTGTCTGCGGTGAGGTTCAATGAGGAGCTGGGAGA GGACCGGTTTGGAGGTTCACTAAAGGTCACTGTTC GGCCCTGCCCGGGGGAGCAGCCAGGCTGTGGCC ATCAAACCGTGAAGGACAAAGCGGAGGGGCGCTG CGGAGGAGTTCGGCATAGGCTATGCTGCGAGCAC GGCTGCAACACCCAGTCTGTGCTGCTGGCGGT GGTGACCAAGGACAGCCCTGAGCATGATCTTACG

【 図 1 3 - 2 7 】

		TACTGTTGCGACGGCAGCTCCACGAATTCCTGGTCA TGCGCTCGCGCACTCGGACGTGGGACGACCGATGA TGACCGCAGGTTGAAGTCCGCGCTGGAGCCCGCGAC TTCTGACCTTGTGGCACAGATCGCGGGGATGG AGTACCTTACAGCCACACGTTGTTCAAAAGCACT GGCCACCGCAATGTGCTAGTACGACAAGCTGAAC GTGAAGATCTCAGACTTGGGCTTCCGAGAGGTT ATGCCCGGATTAACAAAGCTGTGGGGAACCTCGT GCTGCTATCCGCTGGATGGCCCCAGAGGCCATCATG TACGGCAAGTTCTCATCGACTACAGACTCTGGTCT ACGGTGTGGTCTGTGGGAGGTTCTCAGCTACGGCCT GCAGCCCTACTGCGGACTCTCAACAGGATGTGGTG GAGATGATCCGGAACCGGCGAGTGTGCTTCCCGCG ATGACTGTCCCGCTGGGTGATGCTCCATGATCGA GTGCTGGAACGAGTTCACAGCGCGGCGCCCGCTT AAGGACATCCACAGCGGCTCCGAGCTGGGGCAAC CTTCCAACTACAACAGCTCGGCGCAGACTCGGGG CCAGAACACACAGCAGACAGCTCCCTGAGCACAG CCAAGTGAAGATGTGAGCAACGCGCTACTGTTGGG CCCAAGCAGAAGCGCCCGCTTCCACAGCCAGT TCACTCCATGAAGGGCAGATCAAGCCATGGTGGC CCGCGCGAGCTCTACGCTCCCGTCAACGGCTACAG CCGGTCCCGCTTGGGGCTACTGCCCACCTTCT ACCCGGTGCAGATCCCAATGAGATGGCCCGCAGCA GGTGTCTCTCAGATGGTCCCAAGCCAGCTACGTC CACAGTGGCAGTGGCTCCACAGCAGAGGCTACGTC CCACGGCCCTCCAAACATCATGGCAGACAGGGC AGCCTGTCTCAGAGGGCGCTGATGACACAGAAC GCCCCAGAAGATGGGCCCAGAGCAGCTGCAAGAA GCAGAGGAGGAGGAGGAGGCTCTGTCCAGAGACT GAGCTGTGGGGAGTGTGACACTTGCAGTGGACG AGGCCAAAGTCCAGCTGGAAGCTTGA
329.	ROR2 ポリペプチド	MARGSLPRRLPCLIPAVVAAAALLSVSRSTGEVEVL DPNDPLGLDGDGPIPTLKGYFLNLEPNNITIVQGQT AILHCKVAGNPPNVRWLKNDAPVQEPRIIRKTEYG SRLRIQDLDTDTGYQCVATNGMKTITATGVFLRGL PHTSPNHFODDYHEDGFCOPYRGIACARFIGNRTIYD SLQMGEIENRITAFTMIGTSTHLSQCQFAPISFCHF VFPLCDARSRTPKPRELRCDEVEVLESDLCRQEIARSN PLILMLRLQPKCEALPMPESPDAANCMRIGIPAERLGRY HOCYNGSGMDYVGTASTKSGHQCPWALQHPHSHLL SSTDFPELGGHAYCRNPGQMEGPWCFTQKNVSRME LCDVPCSPRDSKMGILYILVPSIAPLVIACLFFLVCMC RNKQKASASTPQRRLMASPSQDMEMPLINQHKQAKL KEISLAVRFMEELGEDRFQVYKGHLPAPGQEQTA VAIKTLKDAEGLREFRHEAMRLARLQHPNVCLLG VVTKDQPLSMIFSVCYSHGDLHEFLVMSRSHDVGSTDD

【 図 1 3 - 2 8 】

		DRTVKSALPPDFVHLVAQIAAGMEYLSHHVHVKDLA TRNVLYDKLVNKISDLGLFRREYVADYYKLLGNSLLPI RWMAPAEIMYKGFSDSDIWSYGVVLEWVFSYGLQPYC GNSQNDVVMIRNQRVLPDPPCAWVYALMIECWN FPRSRRPRFKDIHSLRAWGNLNSYNSAQTSGASNTTQT SSLSYVSNVSNARYVGPQKAPFPQFIPMKQIRP MVPVPPQYVVPVNGYQVPAAYGALPNFYVPIPMQMAP QVPPQMVPKPSHSHSGGSTSTGYVTTAPSNMSADR AALLSEGGADTQNAPEDEGAQSTVQEAEHEEESVPEL LGDCTLQVDEAOVQLEA
330.	ROR2 ペプチド	KTITATGVFLVRLGP
331.	ROR2 ペプチド	TGYQCVATNGMKT
332.	ROR2 ペプチド	RGIACARFIGNRTIY
333.	ROR2 ペプチド	CQPYRGIACARFIGNRTIY
334.	ROR2 ペプチド	QCSQFAIPSFCHFVPLCD
335.	ROR2 ペプチド	ELCRDECEVEVLESDLC
336.	ROR2 ペプチド	ANCMRIGIPAERLGR
337.	ROR2 細胞外 ドメイン	EVEVLDPNDPLGLDGDGPIPTLKGYFLNLEPNNITI VQQTAILHCKVAGNPPNVRWLKNDAPVQEPRIIR KTEYGRSLRIQDLDTDTGYQCVATNGMKTITATGVFL VRLGPHSPNHFODDYHEDGFCOPYRGIACARFIGNR TIYVDSLQMQGEIENRITAFTMIGTSTHLSQCQFAPIS FCHFVFPLCDARSRTPKPRELRCDEVEVLESDLCRQEI ARSNPLILMLRLQPKCEALPMPESPDAANCMRIGIPAE RLGRYHOCYNGSGMDYVGTASTKSGHQCPWALQHPH SHLLSSTDFPELGGHAYCRNPGQMEGPWCFTQKNV RMELCDVPCSPRDSKMG

【配列表】

2021514188000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/18112

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

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/18112

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

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 8-28  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 19/18112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC(B) - C12N 5/0783, C07K 14/725, C12N 15/86 (2019.01)  
 CPC - C12N 5/0636, C07K 14/7051, C12N 15/86, C12N 2510/00, C12N 2830/001

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

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

See Search History Document

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

See Search History Document

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2017/124001 A2 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER, et al.) 20 July 2017 (20.07.2017) claims 60-68	29, 30 1-7
Y	YOON, et al. FVIII-specific human chimeric antigen receptor T-regulatory cells suppress T- and B-cell responses to FVIII. Blood, 12 January 2017, Vol 129, No 2, pg 238-245; Abstract, pg 239, col 1	1-7

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

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 April 2019

Date of mailing of the international search report

17 MAY 2019

Name and mailing address of the ISA/US

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

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774

## 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 16/46 (2006.01) C 0 7 K 16/46

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (74) 代理人 100103610  
 弁理士 吉田 和彦
- (74) 代理人 100109070  
 弁理士 須田 洋之
- (74) 代理人 100119013  
 弁理士 山崎 一夫
- (74) 代理人 100123777  
 弁理士 市川 さつき
- (74) 代理人 100111796  
 弁理士 服部 博信
- (74) 代理人 100111501  
 弁理士 滝澤 敏雄
- (72) 発明者 シャインバーグ デイヴィッド エイ  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 6 5 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1 2 7 5  
 メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター内
- (72) 発明者 リウ チェン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8 エメリービル コモドア ドライブ 4 ユニ  
 ット ディー 3 3 4
- (72) 発明者 ヤン ジーユアン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 7 0 6 オールバニー ピアス ストリート 5 5 5  
 アpartment 5 0 5
- (72) 発明者 リウ リアンシン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 2 2 サンフランシスコ トゥウェンティース アベ  
 ニュー 1 3 8 5 アpartment 2
- (72) 発明者 シュー シャオファ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 3 2 サンフランシスコ ヴァーノン ストリート  
 7 5
- (72) 発明者 ワン ペイ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 7 0 6 オールバニー ピアス ストリート 5 5 5  
 アpartment 5 0 5
- (72) 発明者 シュー イーヤン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 8 8 プレザントン チェスナット ウェイ 7 6 5  
 2

F ターム(参考) 4B065 AA91X AA93X AA94X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 DA50 DA76 EA22 FA72 FA74