

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7684691号
(P7684691)

(45)発行日 令和7年5月28日(2025.5.28)

(24)登録日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
請求項の数 10 (全41頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-502186(P2021-502186)	(73)特許権者	304021417	
(86)(22)出願日	令和2年2月21日(2020.2.21)		国立大学法人東京科学大学	
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/007038		東京都目黒区大岡山二丁目12番1号	
(87)国際公開番号	WO2020/175366	(74)代理人	110001047	
(87)国際公開日	令和2年9月3日(2020.9.3)		弁理士法人セントクレスト国際特許事務	
審査請求日	令和5年2月20日(2023.2.20)		所	
(31)優先権主張番号	特願2019-31858(P2019-31858)	(72)発明者	川又 紀彦	
(32)優先日	平成31年2月25日(2019.2.25)		東京都文京区湯島一丁目5番45号 国	
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		立大学法人東京医科歯科大学内	
(31)優先権主張番号	特願2019-197465(P2019-197465)	(72)発明者	青山 慧	
(32)優先日	令和1年10月30日(2019.10.30)		東京都文京区湯島一丁目5番45号 国	
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		立大学法人東京医科歯科大学内	
		審査官	西澤 龍彦	
最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 キメラ抗原受容体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

キメラ抗原受容体であって、

第1の抗原に結合する領域と、膜貫通領域と、プロテアーゼサブユニット領域とを含み、
前記プロテアーゼサブユニット領域は、前記キメラ抗原受容体に1つ存在し、第1の抗原と第1の抗原に結合する領域とが結合した際に、ホモ多量体化することによってプロテアーゼ活性を奏するものであり、かつ、前記キメラ抗原受容体は、前記プロテアーゼ活性によって切断される部位を含まない、

キメラ抗原受容体。

【請求項2】

前記プロテアーゼサブユニット領域がH I Vプロテアーゼである、請求項1に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項3】

前記プロテアーゼサブユニット領域が、W h i s k e r 配列が除外されているH I Vプロテアーゼである、請求項1に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項4】

下記(a)に記載のキメラ抗原受容体と下記(b)に記載のキメラ抗原受容体との組み合わせ物：

(a) 請求項1～3のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体

(b) 第2の抗原に結合する領域と、膜貫通領域と、前記プロテアーゼ活性によって切

断される部位と、シグナル伝達因子とを含む、キメラ抗原受容体。

【請求項 5】

下記 (a) に記載のキメラ抗原受容体と下記 (b) に記載のキメラ抗原受容体との組み合わせ物：

(a) 請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体

(b) 第 2 の抗原に結合する領域と、膜貫通領域と、前記 プロテアーゼ活性 によって切断される部位と、シグナル伝達因子とを含み、前記シグナル伝達因子が、細胞膜の内側に存在している場合に機能する、膜局在型シグナル伝達因子である、キメラ抗原受容体。

【請求項 6】

下記 (a) に記載のキメラ抗原受容体と下記 (b) に記載のキメラ抗原受容体との組み合わせ物：

(a) 請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体

(b) 第 2 の抗原に結合する領域と、膜貫通領域と、前記 プロテアーゼ活性 によって切断される部位と、シグナル伝達因子とを含み、前記シグナル伝達因子が、前記 プロテアーゼ活性 によって前記部位が切断され、細胞膜より遊離した場合に機能する、遊離性シグナル伝達因子である、キメラ抗原受容体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチドと、請求項 4 ~ 6 のうちのいずれか一項の (b) に記載のキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチドとの組み合わせ物、又は

請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列、及び、請求項 4 ~ 6 のうちのいずれか一項の (b) に記載のキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチドを含むベクターと、請求項 4 ~ 6 のうちのいずれか一項の (b) に記載のキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチドを含むベクターとの組み合わせ物、又は

請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列、及び、請求項 4 ~ 6 のうちのいずれか一項の (b) に記載のキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列を含む、ベクター。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体と、請求項 4 ~ 6 のうちのいずれか一項の (b) に記載のキメラ抗原受容体とを発現する細胞。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の細胞を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キメラ抗原受容体、当該キメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド、該ヌクレオチドを含むベクター、前記キメラ抗原受容体を発現する細胞、及び該細胞を含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、がん等に対する治療法として、キメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor: CAR) を発現する免疫細胞 (主に、CAR-T 細胞) による免疫治療が開発され、注目されている。特に CD19 を標的抗原とする CAR-T 細胞を用いた血液悪性腫瘍に対する免疫治療は、実臨床でも優れた治療効果を示している。

【0003】

現在、実臨床で使用されている CAR は、細胞外領域に抗原結合部位となる単鎖型抗原受容体 (一本鎖抗体、single chain Fv fragment: scFv) を

10

20

30

40

50

持ち、T細胞を活性化するための共刺激分子(CD28、4-1BB等)と、T細胞受容体シグナルを構成する分子であるCD3zeta(CD3)細胞内ドメインを連結した構造を有している。CARを遺伝子導入したT細胞等では、scFvが特異的に認識する標的細胞と接触することで、CD3zetaのリン酸化を介し、T細胞による細胞障害が誘導される。現在、固形がんを含めてCAR-T細胞療法の標的疾患を拡大する試みが続けられている。

【0004】

しかしながら、現在のCAR-T細胞は、単一抗原のみを認識するため、特異性の観点から対象とする疾患に制限がある。例えば、当該単一抗原が正常細胞においても発現していれば、CAR-T細胞により細胞障害をもたらされ、副作用が生じてしまう。特に固形がんのモデルでは正常組織への攻撃を抑制できず、重篤な臓器障害をきたし得る。

10

【0005】

そこで、がん細胞等の標的細胞特異的に細胞障害をもたらすために、例えば、非特許文献1に記載のとおり、CARの細胞内構造を分割して複数のscFvに連結してなるシステム等、複数の抗原を認識するCAR-T細胞の開発が試みられている。しかしながら、未だにそのようなCAR-T細胞のシステムは実用化されていない。

【0006】

また、実臨床において、過剰に活性化したCAR-T細胞による高サイトカイン血症(Cytokine Release Syndrome: CRS)に伴う有害事象が、報告されている。抗IL-6抗体(tocilizumab)等を用いた治療が行われるものの、時に致命的な経過を辿り得ることが示されており、CAR-T細胞の活性制御は実臨床での課題となっている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Kloss C C.ら、Biotechnol., 2013年1月、31巻、1号、71~75ページ

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、複数の抗原を認識し、標的細胞特異的に細胞障害等を奏する、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞を、提供することを目的とする。また、細胞障害等の活性を制御することが可能なCAR発現細胞を提供することも目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、前記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、標的抗原に結合する領域及びプロテアーゼを含む、キメラ抗原受容体(以下、「切断用CAR」とも称する)と、標的抗原に結合する領域、前記プロテアーゼによって切断される部位及びシグナル伝達分子を含む、キメラ抗原受容体(以下、「活性化用CAR」とも称する)とを、発現する細胞システムを、構想した。

40

【0010】

具体的には、図1に示す、前記シグナル伝達分子として、細胞膜より遊離した場合に機能する遊離性シグナル伝達因子を用いる系(ポジティブシステム)を構想した。当該系においては、がん細胞等の標的細胞において発現する2つの標的抗原を、切断用CAR及び活性化用CARが各々抗原結合領域を介して認識した際に、活性化された前記プロテアーゼによる活性化用CARの切断が生じ、前記シグナル伝達因子は、細胞膜より遊離することにより機能することが想定される。そして、これらCARを発現する細胞は活性化され、標的細胞に細胞障害等をもたらすことが可能となると考えられる。また、正常細胞が、前記2つの標的抗原のうちのいずれか一方の抗原しか発現していない場合には、切断用C

50

A R 及び活性化用 C A R を発現する細胞は活性化されないため、当該細胞に細胞障害等をもたらされないことも想定される。

【 0 0 1 1 】

さらに、前述のポジティブシステムにおいて、前記プロテアーゼに対する阻害剤を用い、前記活性化用 C A R の切断を抑制することによって、前記 C A R を発現する細胞の活性を抑制できることが想定される。

【 0 0 1 2 】

また、図 2 に示す、前記シグナル伝達分子として、細胞膜の内側に存在している場合に機能する、膜局在型シグナル伝達因子を用いる系（ネガティブシステム）も構想した。当該系においては、正常細胞において発現する 2 つの抗原を、切断用 C A R 及び活性化用 C A R が各々抗原結合領域を介して認識した際には、当該シグナル伝達因子は、活性化されたプロテアーゼによる活性化用 C A R の切断によって細胞膜から遊離することにより不活化され、正常細胞には細胞障害等を及ぼされないことが想定される。一方、標的細胞において、切断用 C A R が認識する抗原は発現せず、活性化用 C A R が認識する抗原が発現する場合には、前記プロテアーゼは活性化されることなく、従来の C A R 同様に、活性化用 C A R の標的抗原認識に応じ、前記シグナル伝達分子は細胞膜内側にて機能し、これら C A R を発現する細胞は活性化され、標的細胞に細胞障害等をもたらすことが可能となる。

【 0 0 1 3 】

そこで、本発明者らは、活性化用 C A R に相当する、抗原結合領域として a n t i - C D 1 9 - s c F v、膜貫通領域を含む C D 2 8、H I V プロテアーゼ（H I V P R）によって切断される部位（c l e a v a g e s i t e : C S）及び蛍光タンパク質 m C h e r r y が連結されてなる C A R（a n t i - C D 1 9 - C D 2 8 - C S - m C h e r r y C A R、図 3 参照）を設計した。また、切断用 C A R に相当する、抗原結合領域として a n t i - C D 1 9 - s c F v、膜貫通領域を含む C D 2 8 及び H I V P R が連結されてなる C A R（a n t i - C D 1 9 - C D 2 8 - H I V P R C A R、図 9 参照）を設計した。そして、これら C A R を 2 9 3 T 細胞において発現させた。

【 0 0 1 4 】

その結果、a n t i - C D 1 9 - C D 2 8 - C S - m C h e r r y C A R（以下「a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R」とも称する）のみを発現させた 2 9 3 T 細胞は、標的抗原である C D 1 9 が発現している細胞と共培養することによって、m C h e r r y シグナルの局在は変化した。すなわち、図 2 の左側に示すように、標的抗原である C D 1 9 を認識し、当該 C A R は、細胞膜に集合し得ることが示唆された。

【 0 0 1 5 】

しかしながら、a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R を、a n t i - C D 1 9 - C D 2 8 - H I V P R C A R（以下「C D 2 8 - H I V P R C A R」とも称する）と共発現させた場合には、図 1 に示したコンセプトとは異なり、標的細胞非存在下でも、a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R は切断され、m C h e r r y の細胞質への遊離が生じてしまった。

【 0 0 1 6 】

本発明者らは、この抗原認識非依存的な a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R の切断は、C D 2 8 - H I V P R C A R から遊離した H I V P R が活性化することによって生じていると想定した。より具体的には、C D 2 8 の細胞内ドメインにおいて H I V P R による自己切断が生じることによって H I V P R が遊離し、その遊離した H I V P R が更に二量体化することによって活性化し、a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R の切断が生じたものと想定した。

【 0 0 1 7 】

そこで、C D 2 8 - H I V P R C A R から、H I V P R の二量体化に必要な配列及び C D 2 8 の細胞内ドメイン内に想定される H I V P R 切断部位を除外した C A R（a n t i - C D 1 9 - C D 2 8 I C D - H I V P R 4 C A R、図 9 参照）を設計し、a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R と共に 2 9 3 T 細胞において発現させた。

【0018】

その結果、標的細胞非存在下では、anti-CD19-mCherry CAR中のプロテアーゼ認識配列は切断されることなく、mCherryが細胞膜に局在することが認められた。すなわち、上述のような抗原認識非依存的な切断は生じていないことが明らかになった。一方、標的細胞存在との共培養では、anti-CD19-mCherry CARから遊離したmCherryを検出することができた。

【0019】

したがって、図1及び2に示したコンセプトとおり、切断用CAR（上述のanti-CD19-CD28 IC D-HIVPR 4 CARに相当）がその標的抗原を認識した場合のみ、当該CAR中のプロテアーゼ（上述のHIVPR 4に相当）が活性化される。そして、当該活性化されたプロテアーゼにより活性化用CARが切断されることにより、シグナル伝達因子（上述のmCherryに相当）が細胞質中に遊離されることを明らかにした。

10

【0020】

また、標的抗原を2種類とした場合においても、標的細胞依存的な切断用CARによる切断が生じることを確認し、さらに、図2に示したコンセプトとおり、切断用CARは、標的細胞の表面抗原の発現パターン依存的に活性化用CARによるT細胞の活性化を調節することも確認し、本発明を完成するに至った。

【0021】

すなわち、本発明は、キメラ抗原受容体、当該キメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド、該ヌクレオチドを含むベクター、前記キメラ抗原受容体を発現する細胞、及び該細胞を含む医薬組成物に関し、より具体的には、以下のとおりである。

20

<1> 第1の抗原に結合する領域と、膜貫通領域と、プロテアーゼとを含み、かつ、前記プロテアーゼによって切断される部位を含まない、キメラ抗原受容体。

<2> 第2の抗原に結合する領域と、膜貫通領域と、<1>に記載のプロテアーゼによって切断される部位と、シグナル伝達因子とを含む、キメラ抗原受容体。

<3> 前記シグナル伝達因子が、細胞膜の内側に存在している場合に機能する、膜局在型シグナル伝達因子である、<2>に記載のキメラ抗原受容体。

<4> 前記シグナル伝達因子が、<1>に記載のプロテアーゼによって前記部位が切断され、細胞膜より遊離した場合に機能する、遊離性シグナル伝達因子である、<2>に記載のキメラ抗原受容体。

30

<5> <1>～<4>のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド。

<6> <5>に記載のヌクレオチドを含むベクター。

<7> <1>に記載のキメラ抗原受容体と、<2>～<4>のうちのいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体とを発現する細胞。

<8> T細胞又はナチュラルキラー細胞である、<7>に記載の細胞。

<9> <7>又は<8>に記載の細胞を含む、医薬組成物。

【発明の効果】

【0022】

40

本発明によれば、標的細胞又は正常細胞において発現する2つの抗原を、2種類のCAR（切断用CAR及び活性化用CAR）が各々認識することにより、これらCARを発現する細胞によって、正常細胞への細胞障害等を抑えつつ、標的細胞に細胞障害等をもたらすことが可能となる。

【0023】

さらに、上述のとおり、切断用CARが有するプロテアーゼに対する阻害剤を用い、活性化用CARの活性化を抑制することによって、前記CARを発現する細胞の活性の強さ、その持続性を制御することも可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

50

【図1】本発明のキメラ抗原受容体（CAR）の一実施態様（ポジティブシステム）を示す模式図である。ポジティブシステムでは、抗原Aを認識する一本鎖抗体（scFv）にプロテアーゼ切断配列を挟んで細胞質内で活性を持つシグナル伝達因子（遊離性シグナル伝達因子）を接続してなるCAR（活性化用CAR）と、抗原Bを認識するscFvに前記プロテアーゼを接続してなるCAR（切断用CAR）とを、T細胞において発現させる。標的細胞（例えば、腫瘍細胞）において抗原A及びB双方が発現している場合、当該T細胞において、前記各scFvが前記各抗原を各々認識した際に、プロテアーゼが活性化され、活性化用CAR中の前記配列が切断されることになる。そして、当該切断によって、T細胞活性化因子が細胞膜から解放され、細胞質に遊離することにより、T細胞は活性化することとなる。

10

【図2】本発明のキメラ抗原受容体（CAR）の一実施態様（ネガティブシステム）を示す模式図である。ネガティブシステムでは、標的抗原Aを認識するscFvにプロテアーゼ切断配列を挟んで細胞膜で活性を持つシグナル伝達因子（膜局在型シグナル伝達因子）を接続してなるCAR（活性化用CAR）と、標的抗原Bを認識するscFvに前記プロテアーゼを接続してなるCAR（切断用CAR）とを、T細胞において発現させる。標的細胞（例えば、腫瘍細胞）において抗原Aが発現しているが、抗原Bが発現していない場合、当該T細胞において、活性化用CARが有するscFvが抗原Aを認識することにより、シグナル伝達因子が活性化され、T細胞は活性化することとなる。一方、非標的細胞（正常細胞）が抗原A及びB双方を発現している場合、切断用CARが有するscFvが抗原Bを認識することにより、プロテアーゼが活性化され、活性化用CAR中の前記配列が切断されることになる。そして、当該切断によって、シグナル伝達因子が細胞膜から解放されることにより、非標的細胞に対するT細胞の活性化が抑制される。

20

【図3】本発明検証用CARの概略を示す、模式図である。上段に、代表的な公知の第2世代CARの構造を示し、下段に、本発明検証用CAR（anti-CD19-CD28-CS-mCherry CAR）の構造を示す。当該CARは、第2世代CARの構造を基にし、膜貫通領域（TM）を含むCD28下流にアンカー配列（gp41）を挟んで、CD3 zetaの代わりに、8アミノ酸からなるHIVプロテアーゼ切断部位（配列番号：9に記載のアミノ酸配列）と、局在変化等を検出するため、蛍光タンパク質（mCherry）とを配置した。

【図4】anti-CD19-CD28-CS-mCherry CAR（以下「anti-CD19-mCherry CAR」とも称する）を発現させた293T細胞を観察した結果を示す、蛍光顕微鏡写真である。293T細胞に、当該CARをコードするベクターを遺伝子導入し、24時間後に観察した。左にmCherryのみを検出した結果を示し、右に核染色との重層イメージを示す。観察は、オールインワン蛍光顕微鏡BZ-8100（60倍）にて行い、ISO感度は200に設定した。mCherryの露光時間は3.5秒にて撮影した（観察及び撮影条件については、図5及び6において同様である）。

30

【図5】anti-CD19-mCherry CARを発現させた293T細胞と、K562細胞又はRaji細胞との共培養を、観察した結果を示す、蛍光顕微鏡写真である。293T細胞に、当該CARをコードするベクターを遺伝子導入し、24時間後に、K562細胞又はRaji細胞を添加し、6時間の共培養を行った。図中、矢頭にてmCherryの集積スポットを示す。

40

【図6】anti-CD19-mCherry CAR及びanti-CD19-CD28-HIVPR CAR（以下「CD28-HIVPR CAR」とも称する）を共発現させた293T細胞を観察した結果を示す、蛍光顕微鏡写真である。293T細胞に、各CARをコードするベクターを等量にて遺伝子導入し、24時間後に観察した。anti-CD19-CD28-HIVPR CARについては、図9を参照のほど。

【図7】anti-CD19-mCherry CARを発現させた293T細胞をウエスタンブロットにて解析した結果を示す、写真である。図中、「HIVPR(-)」は、anti-CD19-mCherry CARのみを発現させた細胞の結果を示し、「H

50

「I V P R (+)」は、anti-CD19-mCherry CAR及びCD28-HIVPR CARを共発現させた細胞の結果を示す。「TCL」、「CE」及び「PM」は、細胞の全タンパク質抽出画分、細胞質タンパク質画分及び細胞膜タンパク質画分を各々解析した結果を示す。また図中、黒矢頭は、全長のanti-CD19-mCherry CARに由来するバンド(約70 kDa)を示す。Anti-RFP抗体(mCherryを認識する抗体)にて検出した結果を示す写真において、白矢頭は、HIVPRによって切断され細胞質中に遊離されたmCherry単体に由来するバンド(約30 kDa)を示す。Anti-Myc tag抗体(anti-CD19のN末端側に接続されたMyc tagを認識する抗体)にて検出した結果を示す写真において、アスタリスクは、HIVPRによって切断されmCherryが除去された、細胞外～膜貫通領域に由来するバンド(約40 kDa)を示す。「 α -actin」は、細胞質のマーカーとして当該タンパク質を検出した結果を示し、「Syn-4」は、細胞膜のマーカーとして当該タンパク質(Syntaxin-4)を検出した結果を示す。

10

【図8】anti-CD19-mCherry CARを発現させた293T細胞を、HIVPR阻害剤を添加した後に、ウエスタンブロットにて解析した結果を示す、写真である。293T細胞に、anti-CD19-mCherry CARをコードするベクター及びCD28-HIVPR CARをコードするベクターを等量にて遺伝子導入し、8時間後にHIVPR阻害剤を添加した。添加後24時間で細胞を回収し、ウエスタンブロットの解析に供した。図中、黒矢頭は、全長のanti-CD19-mCherry CARに由来するバンド(約70 kDa)を示す。白矢頭は、HIVPRによって切断され遊離されたmCherry単体に由来するバンド(約30 kDa)を示す。

20

【図9】本発明のCAR(切断用CAR)の概略を示す、模式図である。上段に図6～8に示す実験にて用いたCD28-HIVPR CAR(anti-CD19-CD28-HIVPR CAR)の構造を示す。中段に、CD28-HIVPR CARから、HIVPRのN末端4アミノ酸(Whisker配列)を除去したもの(anti-CD19-CD28-HIVPR 4 CAR、以下「CD28-HIVPR 4 CAR」とも称する)の構造を示す。下段に、更にCD28細胞内ドメインを除去したもの(anti-CD19-CD28 ICD-HIVPR 4 CAR、以下「CD28 ICD-HIVPR 4 CAR」又は「anti-CD19-Scissors-CAR」とも称する)の構造を示す。

30

【図10】CD28-HIVPR CAR及びその変異体を発現させた293T細胞を、ウエスタンブロットにて解析した結果を示す、写真である。図9に示したCD28-HIVPR CAR等をコードするベクターを、293T細胞に遺伝子導入し、24時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロットに供した。図中、「Intact CD28-HIVPR」、「Intact CD28-HIVPR 4」及び「CD28 ICD-HIVPR 4」は、CD28-HIVPR CAR、CD28-HIVPR 4 CAR及びCD28 ICD-HIVPR 4 CARを各々発現させた細胞を解析した結果を示す。黒矢頭は、全長のCD28 ICD-HIVPR 4 CARに由来するバンド(約50 kDa)を示す。アスタリスクは、HIVPRによって切断されmCherryが除去された、細胞外～膜貫通領域に由来するバンド(約40 kDa)を示す。

40

【図11】YFPを融合させたCD28-HIVPR CARを発現させた293T細胞を、蛍光顕微鏡にて観察した結果と、YFPシグナルを検出した結果とを示す、図である。YFPを融合させたCD28-HIVPR CARをコードするベクターを293T細胞に遺伝子導入し、24時間後に蛍光顕微鏡(BZ-X800)を用いて600倍にて観察し、YFPの露光時間を1/2.3秒として撮影した(図中の上部写真を参照)。また、当該写真において、(カラーでの表示下)赤線上のYFPのシグナル強度を解析した(図中の下部ヒストグラムを参照)。図中の写真において、右下の白線(スケールバー)は20 μ mを表す。図中のヒストグラムにおいて、縦軸はYFPシグナルの強度を示し、横軸は当該写真の(カラーでの表示下の)赤線において、左方向から右方向への線上の位置を示す。

50

【図12】YFPを融合させたCD28-HIVPR 4 CARを発現させた293T細胞を、蛍光顕微鏡にて観察した結果と、YFPシグナルを検出した結果とを示す、図である。実験方法及び図中の表記等については、図11と同様である。

【図13】YFPを融合させたCD28 ICD-HIVPR 4 CARを発現させた293T細胞を、蛍光顕微鏡にて観察した結果と、YFPシグナルを検出した結果とを示す、図である。実験方法及び図中の表記等については、図11と同様である。

【図14】anti-CD19-mCherry CAR及びCD28 ICD-HIVPR 4 CARを共発現させた293T細胞を観察した結果を示す、蛍光顕微鏡写真である。293T細胞に、anti-CD19-mCherry CAR及びCD28 ICD-HIVPR 4 CARを各々コードするベクターを、10:1の重量比(9.34:1のモル比)になるよう遺伝子導入し、24時間後に観察した。観察は、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-8100(20倍)にて観察し、ISO感度は200に設定した。露光時間は1.1秒にて撮影した。

10

【図15】anti-CD19-mCherry CAR及びCD28 ICD-HIVPR 4 CARを共発現させた293T細胞を、Raji細胞と共培養し、ウエスタンブロットにて解析した結果を示す、写真である。293T細胞に、anti-CD19-mCherry CAR及びCD28 ICD-HIVPR 4 CARを各々コードするベクターを、図中に示す重量比(10:0、10:1又は10:2、モル比に換算すると、各々10:0、9.34:1又は9.34:2)にて遺伝子導入し、24時間後から共培養を実施した。そして、48時間の共培養後、細胞を回収し、ウエスタンブロットに供した。なお、293T細胞は、6wellプレートに 3×10^5 細胞/wellになるよう播種して遺伝子導入を実施し、共培養には1wellあたり 1×10^7 細胞のRaji細胞を用いた。図中、「Raji細胞との共培養(-)」は、前記293T細胞のみを培養した結果を示し、「Raji細胞との共培養(+)」は、前記293T細胞とRaji細胞とを共培養した結果を示す。図中、黒矢頭は、全長のanti-CD19-mCherry CARに由来するバンド(約70kDa)を示す。白矢頭は、HIVPRによって切断され遊離されたmCherry単体に由来するバンド(約30kDa)を示す。

20

【図16】HER2を生来発現しているSK-BR-3細胞と、CD19発現ベクターを導入したSK-BR-3細胞とにおける、CD19及びHER2の発現をフローサイトメトリーにて解析した結果を示す、ドットプロット図である。なお、pcDNA3(-)-Hygro emptyベクター及びpcDNA3(-)-CD19-Hygroベクターを各々遺伝子導入したSK-BR-3細胞を100µg/mL Hygromycin存在下に培養し、SK-BR-3/empty細胞及びSK-BR-3/CD19細胞を樹立した。細胞表面におけるHER2及びCD19の発現量をフローサイトメーターにて解析した。

30

【図17】anti-HER2-mCherry CAR及びanti-CD19 Scissors CAR(CD28 ICD-HIVPR 4 CAR)の双方を過剰発現した293T細胞と、SK-BR-3細胞とを共培養した結果を、蛍光免疫染色にて解析した結果を示す、顕微鏡写真である。なお、293T細胞にpcDNA3-anti-HER2(4D5-3)-CD28-cleave site-mCherry-CARベクターとpcDNA3-anti-CD19-CD28(ICD)-HIVPR(4)ベクターを重量比5:1にて遺伝子導入し、24時間後から共培養を開始した。共培養は10cmディッシュ上にて、それぞれ 2×10^5 細胞の293T細胞及びSK-BR-3細胞を用いて行なった。4日間の共培養ののちに細胞を観察した。これらの観察はBZ-8100にて60倍にて観察し、ISO感度は200に設定した。mCherryの露光時間は3.5秒にて撮影した。

40

【図18】anti-CD19 Effector CAR-T2A-YFP発現ベクターにおけるコーディング領域の概略を示す模式図である。なお、CD28下流のHIVPR認識配列にCD3-zeta細胞内ドメインを接続した。Effector CAR発現細胞を追跡評価するため、T2A配列を介しYFP遺伝子を接続した。

50

【図19】K562細胞又はRaji細胞と共培養した、anti-CD19 Effector CAR-T2A-YFP発現ベクターを導入したJurkat細胞における、CD69及びYFPの発現を、フローサイトメトリーにて解析した結果を示す、ドットプロット図である。なお、Jurkat細胞に対してpcDNA3-anti-CD19 Effector CAR-T2A-YFPを遺伝子導入し、24時間後から共培養を開始した。96well丸底プレートを用い、1ウェルごとに 1×10^5 細胞ずつ播種した。24時間の共培養ののちに細胞を回収し、FACS AriaIIを用いて解析した。CD69は、CD19陽性のRaji細胞特異的なT細胞活性化マーカーである。YFPは、T2A配列を介してシストロニックに発現するanti-CD19 Effector CARの発現を反映する。

10

【図20】K562細胞又はRaji細胞と共培養した、anti-CD19 Effector CAR-T2A-YFP発現ベクターを導入したJurkat細胞における、IL-2 mRNA発現量を示すグラフである。なお、図19に示すゲートを設け、YFP陽性・CD69-PE陽性細胞を単離し、qRT-PCR法にてIL-2遺伝子発現を評価した。内在コントロールとしてGAPDHを用い、Ct法にて解析した。K562共培養群を1として、相対的なIL-2 mRNA発現量を示した。

【図21】各種標的細胞との共培養後の、anti-CD19 Effector CARを安定的に発現する細胞(anti-CD19 Effector CAR/Jurkat)における、CD69及びYFPの発現を、フローサイトメトリーにて解析した結果を示す、ドットプロット図である。なお、pcDNA3-anti-CD19 Effector CAR-T2A-YFPを遺伝子導入したJurkat細胞を1000µg/mL G418存在下に培養し、anti-CD19 Effector CAR/Jurkat細胞を樹立した。K562細胞、Raji細胞、SK-BR-3/empty細胞又はSK-BR-3/CD19細胞と1:1の細胞数にて24時間の共培養したのちに細胞を回収し、FACS Caliburを用いて解析した。

20

【図22】anti-CD19 Effector CAR/Jurkat細胞と、anti-HER2(4D5-3)-Scissors-CAR-T2A-mCherry発現ベクター又はanti-HER2(4D5-8)-Scissors-CAR-T2A-mCherry発現ベクターを導入した前記Jurkat細胞とにおける、YFP及びmCherryの発現をフローサイトメトリーにて解析した結果を示す、ドットプロット図である。なお、anti-CD19 Effector CAR/Jurkat細胞(図21参照)に対してpcDNA3.1(-)-Hygro Emptyベクター、pcDNA3(-)-anti-HER2(4D5-3) Scissors CAR-T2A-mCherry-Hygroベクター又はpcDNA3(-)-anti-HER2(4D5-8) Scissors CAR-T2A-mCherry-Hygroベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入後24時間後より、1000µg/mL G418及び200µg/mL Hygromycin存在下に培養し、anti-CD19 Effector CAR+empty/Jurkat細胞、anti-CD19 Effector CAR+anti-HER2(4D5-3) Scissors/Jurkat細胞、及びanti-CD19 Effector CAR+anti-HER2(4D5-3) Scissors/Jurkat細胞を樹立した。FACS AriaIIを用いてYFP及びmCherryの発現を解析した。YFPは、T2A配列を介してシストロニックに発現するanti-CD19 Effector CARの発現を反映する。mCherryは、T2A配列を介してシストロニックに発現するanti-HER2(4D5-3)-Scissors-CARの発現を反映する。図中、紫で示したゲートに含まれる細胞を選別し、図23及び24に示す共培養実験に供した。

30

40

【図23】Raji細胞又はSK-BR-3/CD19細胞と共培養した、anti-CD19 Effector CAR+empty/Jurkat細胞又はanti-CD19 Effector CAR+anti-HER2(4D5-3) Scissors/Jurkat細胞における、CD69発現を解析した結果を示す、ヒストグラムである。

50

図中、灰色のヒストグラムはanti-CD19 Effector CAR+empty / Jurkat細胞の解析結果を示し、実線で表すヒストグラムでanti-CD19 Effector CAR+anti-HER2(4D5-3) Scissors / Jurkat細胞の解析結果を示す。なお、細胞数1:1にて24時間の共培養を行った後に細胞を回収し、FACS Caliburを用いてYFP陽性細胞におけるCD69の発現を解析した。

【図24】Raji細胞、SK-BR-3細胞又はSK-BR-3 / CD19細胞と共培養した、anti-CD19 Effector CAR+empty / Jurkat細胞、anti-CD19 Effector CAR+anti-HER2(4D5-3) Scissors / Jurkat細胞、又はanti-CD19 Effector CAR+anti-HER2(4D5-8) Scissors / Jurkat細胞における、CD69発現を解析した結果を示す、ヒストグラムである。図中、灰色のヒストグラム（一番左側のヒストグラム）はSK-BR-3細胞との共培養の結果を示し、（カラーでの表示下）赤色の実線で表すヒストグラム（左から2番目のヒストグラム）はSK-BR-3 / CD19細胞との共培養の結果を示し、黒色の実線で表すヒストグラム（左から3番目のヒストグラム）はRaji細胞との共培養の結果を示す。なお、細胞数1:1にて24時間の共培養を行った後に細胞を回収し、FACS Caliburを用いてYFP陽性細胞におけるCD69の発現を解析した。

【発明を実施するための形態】

【0025】

後述の実施例、並びに図1及び2において示すとおり、下記2種のキメラ抗原受容体を発現させたT細胞は、各キメラ抗原受容体を介して2種の抗原を認識することにより、正常細胞には細胞障害等をもたらすことなく、がん細胞等の標的細胞に対しては細胞障害等を奏することが可能となる。

【0026】

第1の抗原に結合する領域と、膜貫通領域と、プロテアーゼとを含み、かつ、前記プロテアーゼによって切断される部位を含まない、キメラ抗原受容体（以下、「切断用CAR」とも称する）

第2の抗原に結合する領域と、膜貫通領域と、前記プロテアーゼによって切断される部位と、シグナル伝達因子とを含む、キメラ抗原受容体（以下、「活性化用CAR」とも称する）。

【0027】

したがって、本発明はこれらキメラ抗原受容体、及びそれらの組み合わせを提供するものである。

【0028】

<キメラ抗原受容体>

本発明において、「キメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor: CAR）」は、細胞外領域となる、抗原に結合する領域と、膜貫通領域と、細胞内領域とが、その順にてN末端側から配置され、直接又は間接的に連結されてなる、キメラタンパク質を意味する。

【0029】

本発明において、「抗原に結合する領域（抗原結合領域）」は、抗原のエピトープに特異的に結合する領域を意味し、抗体又はその機能的断片を用いることができる。抗体の「機能的断片」とは、抗体の一部分であって、抗原に特異的に結合し得るものであればよく、例えば、一本鎖抗体（scFv）、シングルドメイン抗体（sdAb、VHH、VNAR）、sc(Fv)2、Fab、Fab'、F(ab')2、可変領域断片（Fv）、ジスルフィド結合Fv、ダイアボディー、多特異性抗体が挙げられるが、通常CARには、scFvが用いられる。

【0030】

「scFv」は、モノクローナル抗体（免疫グロブリン）の軽鎖可変領域（VL）と重

10

20

30

40

50

鎖可変領域（VH）がリンカーを介して連結された構造体であり、抗原との結合能を保持している。リンカーとしては、例えばペプチドリンカーを用いることができる。リンカーの長さは特に限定されない。例えば、アミノ酸数が5～25個のリンカーを用いることができる。リンカーの長さは好ましくは8～25アミノ酸、さらに好ましくは15～20アミノ酸である。ペプチドリンカーの好適な例として、グリシン及びセリンから構成されるリンカー（GGSリンカー、GSリンカー等）が挙げられる。GGSリンカー及びGSリンカーを構成するアミノ酸であるグリシンとセリンは、それ自体のサイズが小さく、リンカー内で高次構造が形成されにくいという利点を有する。

【0031】

s c F vの基となるモノクローナル抗体としては、特に制限はないが、例えば、非ヒト動物（マウス、ラット、ウサギ等の齧歯類）由来の抗体が挙げられる。かかるモノクローナル抗体の作製方法としては、ハイブリドーマを用いて作製する方法や、遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで宿主を形質転換して作製する方法や、トランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで作製する方法が挙げられる。

【0032】

また、本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体等であってもよい。ヒト化抗体は、他の動物種（例えばマウスやラット）のモノクローナル抗体の構造をヒトの抗体の構造に類似させた抗体であり、抗体の定常領域のみをヒト抗体のものに置換したヒト型キメラ抗体、及び定常領域及び可変領域に存在するCDR（相補性決定領域）以外の部分をヒト抗体のものに置換したヒト型CDR移植（CDR-grafted）抗体（P. T. Johonsら、Nature 321, 522（1986）参照）を含む。ヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を高めるため、マウス抗体と相同性の高いヒト抗体フレームワーク（FR）を選択する方法、相同性の高いヒト型化抗体を作製する方法、ヒト抗体にマウスCDRを移植した後さらにFR領域のアミノ酸を置換する方法の改良技術もすでに開発され（米国特許第5585089号、米国特許第5693761号、米国特許第5693762号、米国特許第6180370号、欧州特許第451216号、欧州特許第682040号、特許第2828340号参照）、ヒト化抗体の作製に利用することもできる。

【0033】

本発明において、「抗原」、第1の抗原及び第2の抗原としては、特に制限はなく、例えば、がん細胞又はその前駆細胞（がん幹細胞等）に特異的に発現する生体分子（腫瘍特異抗原、Tumor-specific antigens：TSA）、がん細胞等において正常細胞と比して発現が亢進している生体分子（腫瘍関連抗原、Tumor-associated antigens：TAA）等のがん抗原が挙げられる。

【0034】

がん抗原としては、例えば、CD19、HER2（ERBB2、NEU）、BCMA、CD5、CD7、CD10、CD13、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44v6、CD52、CD74、CD123、CD133、CD138、CD160、CD171、CS-1、CLL-1、CA19-9、CA72-4、CA125、CAM17.1、CA15-3、CA195、CA242、CA-50、CAM43、c-Met、A33、EGFR、EGFRvIII、VEGFR2、FOLR、GD2、GD3、PSCA、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、メソテリン、ビメンチン、IL-11Ra、PRSS21、Lewis Y、CD24、CD68、CD79a、CD79b、CD72、CD97、CD179a、CO-029、FGF-5、G250、TEM1/CD248、CD300LF、PDGFR-、SSEA-4、葉酸受容体、葉酸受容体、MUC1、MUC16、NCAM、プロスタザーゼ、PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-IR、CAIX、LMP2、gp100、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、チロシナーゼ、EphA2、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMW

MAA、o - アセチル - GD2、TEM7R、CLDN6、GPRC5D、CXORF61、ALK、ポリシアル酸、PLAC1、GloboH、NY - BR - 1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY - ESO - 1、LAGE - 1a、MAGE - 1、MAGE - 3、MAGE - A1、MAGE - 4、MAGE - 5、MAGE - 6、BAGE、GAGE - 1、GAGE - 2、RAGE、p15、p16、レグマイン、EBVA、HPV E6、E7、ETV6 - AML、XAGE1、Tie2、MAD - CT - 1、MAD - CT - 2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、Ras、K - ras、Ras変異体、プロステイン、Survivin、WT1、テロメラゼ、hTERT、PCTA - 1 / ガレクチン8、メラノA / MART1、ML - IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、RhoC、TRP - 1、TRP - 2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY - TES1、LCK、AKAP - 4、SSX2、RU1、RU2、muthsp70 - 2、LAIR1、FCAR、LILRA2、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、TSP - 180、nm - 23H1、NuMa、Mum - 1、43 - 9F、5T4、791Tgp72、HTgp - 175、MA - 50、MG7 - Ag、MOV18、NB / 70K、NY - CO - 1、RCAS1、SDCCAG16、TA - 90、TAAL6、TLP、TPSが挙げられる。

【0035】

また、本発明に係る抗原としては、感染症に特異的な抗原も含まれる。かかる抗原としては、感染症の原因となるウイルス、細菌において特異的に発現する物質であればよく、例えば、HIV特異的抗原 (HIV gp120等)、HBV特異的抗原、EBV特異的抗原、CMV特異的抗原、HPV特異的抗原、ラッサウイルス特異的抗原、インフルエンザウイルス特異的抗原、真菌特異的抗原が挙げられる。

【0036】

さらに、本発明に係る抗原としては、炎症性疾患に特異的な抗原も含まれる。かかる抗原としては、例えば、AOC3 (VAP - 1)、CAM - 3001、CCL11、CD125、CD147、CD154 (CD40L)、CD2、CD20、CD23、CD25、CD3、CD4、CD5、IFN γ 、IFN γ 、IgE、IgE Fc領域、IL - 1、IL - 12、IL - 23、IL - 13、IL - 17、IL - 17A、IL - 22、IL - 4、IL - 5、IL - 5、IL - 6、IL - 6受容体、インテグリン α 4、インテグリン α 4 β 7、ラマ・グラマ (Lama glama)、LFA - 1 (CD11a)、MEDI - 528、ミオスタチン、OX - 40、rhuma β 7、スクレロシン (sclerostin)、SOST、TGF β 1、TNF - α 、VEGF - Aが挙げられる。

【0037】

さらにまた、本発明においては、図2に示すように、上述の疾患等に関する抗原のみならず、正常細胞において発現する抗原も、本発明のCARの対象となる。例えば、骨髄腫に関し、典型的な骨髄腫細胞ではCD19 (-) CD138 (+) であるのに対し、正常形質細胞はCD19 (+) CD138 (+) である。そのため、かかる場合、CD19が、本発明に係る正常細胞において発現する抗原として好適に用いられ得る。また、このように、当業者であれば、がん細胞等の標的細胞と正常細胞との発現の相違に関する公知の情報に基づき、骨髄腫に限らず、各疾患に適した正常細胞において発現する抗原を選択することができる。

【0038】

また、本発明において、図1及び2に示すように、第1の抗原と第2の抗原とは、通常異なる抗原となる。

【0039】

本発明において「膜貫通領域」は、細胞膜を貫通する機能を有し、CARを細胞膜に繫留し得るポリペプチドであれば特に制限はない。膜貫通領域を担うポリペプチドの由来となるタンパク質としては、例えば、CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、

10

20

30

40

50

CD5、CD8、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、GITR、T細胞受容体の鎖及び鎖が挙げられる。

【0040】

本発明において「細胞内領域」は、切断用CARと活性化用CARとで異なる態様をとる。

【0041】

切断用CARにおける「細胞内領域」は、プロテアーゼを少なくとも有する。「プロテアーゼ」としては、切断用CAR及び活性化用CARが、対応する各々の抗原に結合し、細胞膜において集合した際に、近接した活性化用CARを、膜貫通領域とシグナル伝達因子との間で切断できる、エンド型のプロテアーゼであれば特に制限はなく、例えば、アスパラギン酸プロテアーゼ（HIVプロテアーゼ（HIVPR）、セクレターゼ等）、システインプロテアーゼ（カスパーゼ、タパコエッチウイルス（TEV）プロテアーゼ等）、セリンプロテアーゼ（第Xa因子、フューリン等）、金属プロテアーゼ（ADAMタンパク質、マトリックスメタロプロテアーゼ等）が挙げられる。

【0042】

本発明に係るプロテアーゼとしては、活性化用CARの切断が、切断用CARの抗原結合依存的により生じ易いという観点から、抗原結合領域が抗原に結合した際に活性化するプロテアーゼが好ましい。このようなプロテアーゼとしては、多量体化することによってプロテアーゼ活性を奏するプロテアーゼが挙げられ、より具体的には、HIVプロテアーゼ、カスパーゼ9が挙げられる。

【0043】

また、基質特異性に優れ、内在タンパク質を分解しないという観点からは、本発明に係るプロテアーゼとして、本発明のCARが発現する細胞の由来とは異なる生物（ウイルスを含む）由来のプロテアーゼが好ましい。当該細胞の由来がヒトである場合には、非ヒト由来のプロテアーゼが好ましく、より具体的には、HIVプロテアーゼ、TEVプロテアーゼが挙げられる。

【0044】

また、プロテアーゼ活性を低分子化合物によって抑制することにより、活性化用CARの切断を制御し、ひいては本発明のCARが発現する細胞の活性も制御し得るという観点から、プロテアーゼ阻害剤による制御可能なプロテアーゼが好ましい。かかるプロテアーゼとしては、例えば、サキナビル、ネルフィナビル、アタザナビル、ホスアンブレナビル、ロピナビル、ダルナビル、リトナビル、チプラナビル、アンブレナビル、インジナビル等のプロテアーゼ阻害剤に対応する、HIVプロテアーゼ、L-685,458、DBZ、LY450139（セマガセスタット）、GSI-953、GS155（ベガセスタット）、R-フルルビプロフェン（タレンフルビル）、GSM-1、-ペプチド6等のプロテアーゼ阻害剤に対応する、セクレターゼが挙げられる。

【0045】

さらに、以上全ての特徴を満たすという観点から、本発明に係るプロテアーゼとして、HIVプロテアーゼが特に好ましく、さらに、後述の実施例に示すとおり、多量体化（二量体化）に必要なWhisker配列が除外されているHIVプロテアーゼが、より好ましい。

【0046】

一方、活性化用CARにおける「細胞内領域」は、プロテアーゼによって切断される部位と、シグナル伝達因子とを少なくとも有する。

【0047】

「プロテアーゼによって切断される部位」は、活性化用CARにおいて、前述の膜貫通領域とシグナル伝達因子との間に配置される。当業者であれば、公知の情報に基づき、上述のプロテアーゼが認識し切断する配列を、適宜理解し、前記領域因子間に配置することができる。しかしながら、後述の実施例に示すとおり、通常のCARにおいて用いられる

10

20

30

40

50

CD28細胞内ドメインには、HIVプロテアーゼ等のアスパラギン酸プロテアーゼの切断部位が存在する。そのような場合には、前記プロテアーゼ切断部位を新たに挿入しなくとも、本発明の活性化用CARとして好適に用いることができる。

【0048】

なお、通常のCARとは、既存のCARを意味し、一般的に、細胞内領域として、T細胞受容体(TCR)及びCD3複合体の活性化シグナル伝達ドメインのみを有するもの(第1世代CAR)、活性化シグナル伝達ドメインに加えて共刺激分子由来の共刺激シグナル伝達ドメイン(例えば、CD28又は4-1BBの細胞内ドメイン)を有するもの(第2世代CAR)、活性化シグナル伝達ドメインに加えて複数の共刺激シグナル伝達ドメイン(例えば、CD28及び4-1BBの細胞内ドメイン)を有するもの(第3世代CAR)がある。

10

【0049】

「シグナル伝達因子」は、前述の抗原結合領域が抗原に結合した際に、細胞内にエフェクター機能の発揮に必要なシグナルを伝達することが可能な因子を意味する。活性化用CARが含むシグナル伝達因子の数は、1つに限定されず、複数のシグナル伝達因子を含むこともできる(例えば、1~5個、1~3個、又は1個若しくは2個のシグナル伝達因子を含むこともできる)。この場合、活性化用CARが含む複数のシグナル伝達因子は、同じものであってもよいし、異なるものであってもよい。

【0050】

また、本発明に係る「シグナル伝達因子」には、膜局在型シグナル伝達因子、遊離性シグナル伝達因子がある。

20

【0051】

「膜局在型シグナル伝達因子」は、細胞膜の内側に存在している場合に機能する、膜局在型シグナル伝達因子を意味し、通常のCARにおいて用いられる、一次シグナルに関与するタンパク質の活性化シグナル伝達ドメインを用いることができる。一次シグナル伝達には、免疫受容体活性化チロシンモチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)が関与することが知られている。ITAMを有するタンパク質としては、例えば、CD3、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、DAP10、DAP12が挙げられる。

30

【0052】

「遊離性シグナル伝達因子」は、細胞膜より遊離した場合に機能するシグナル伝達因子を意味し、例えば、変異型RHOA(p.Gly17Val変異型等)、変異型VAV(1-67アミノ酸欠損型、p.Asp797Asn変異型等)、変異型ZAP-70、RAS、NICD(Notch細胞内ドメイン)、NFAT(TCRシグナル伝達に寄与する転写因子)が挙げられる。なお、変異型RHOAについては、Sakata-Yanagimoto M.ら、Nat Genet. 2014年2月、46巻、2号、171~175ページ、Ng SY.ら、Blood. 2018年8月30日、132巻、9号、935~947ページ 参照のほど。変異型VAVについては、Kataoka K.ら、Nat Genet.、2015年11月、47巻、11号、1304~1315ページ、Abate F.ら、Proc Natl Acad Sci USA.、2017年1月24日、114巻、4号、764~769ページ 参照のほど。

40

【0053】

本発明のCARは、上述の抗原結合領域、膜貫通領域、並びに、プロテアーゼ、又はプロテアーゼ切断部位及びシグナル伝達因子に加えて、他のドメインを含むこともできる。他のドメインの例としては、共刺激伝達ドメイン、スペーサー配列、シグナルペプチド等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

T細胞上に発現する共刺激分子は、抗原提示細胞上に発現する各共刺激分子に特異的なリガンドとの結合により、細胞内に共刺激シグナルを伝達し、T細胞の活性化を補助する

50

ことが知られている（二次シグナル伝達）。本発明において、「共刺激シグナル伝達ドメイン」とは、前記のような共刺激分子の共刺激シグナル伝達に關与する細胞内ドメインを意味する。共刺激分子の例としては、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、ICOS、CD2、CD4、CD5、CD8、CD8、CD154等が挙げられる。本発明のCARは、これら共刺激分子の共刺激シグナル伝達ドメインを含むことができる。

【0055】

本発明のCARが含み得る共刺激シグナル伝達ドメインの数は、1つに限定されず、複数であってもよい。本発明のCARは、共刺激シグナル伝達ドメインを、例えば、1～5個、1～3個、又は1個若しくは2個含むことができる。本発明のCARが、複数の共刺激シグナル伝達ドメインを含む場合、当該ドメインは、同じものであってもよく、また異なるものであってもよい。

10

【0056】

本発明において「スペーサー配列」は、各領域等の間を連結する配列を意味する。スペーサー配列のアミノ酸数としては特に制限されるものではないが、通常2～300アミノ酸、好ましく5～200アミノ酸であり、さらに好ましくは7～100アミノ酸である。抗原結合領域と膜貫通領域とを連結する配列としては、抗原結合領域の抗原結合能を抑制しないものであれば特に制限はないが、例えば、ヒトロドプシン由来の9アミノ酸（C9配列）、IgG、IgA、IgD、CD8、CD8、CD28、CD4等の細胞外ヒンジドメイン、上述のグリシン及びセリンから構成されるリンカーが挙げられる。また、膜貫通領域又は共刺激シグナル伝達ドメインと、プロテアーゼ又はそれによって切断される部位とを連結する配列としては、プロテアーゼ、シグナル伝達因子若しくは共刺激シグナル伝達ドメインの活性を抑制しないもの、又は該プロテアーゼによる接岸を抑制しないものであれば特に制限はないが、例えば、HIV gp41のアンカー配列、上述のグリシン及びセリンから構成されるリンカーが挙げられる。

20

【0057】

本発明において「シグナルペプチド」は、CARの分泌を促すため、または細胞膜への局在化を指示するためのペプチドを意味し、リーダー配列とも称される。シグナルペプチドは、通常、抗原結合領域のN末端に直接又は間接的に結合され得る。また任意で、細胞プロセッシング及び細胞膜へのCARの局在化中に抗原結合領域から、シグナルペプチドは切断されてもよい。かかるシグナルペプチドの例としては、T細胞受容体の鎖及び鎖、CD8、CD8、CD3、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、GITR、ヒトGM-CSF受容体等のシグナルペプチドが挙げられる。

30

【0058】

また、本発明のCARは、上述の共刺激伝達ドメイン、スペーサー配列及びシグナルペプチドの他、他の機能性タンパク質を有していてもよい。他の機能性タンパク質としては特に制限はなく、本発明のCARに付与したい機能に応じて適宜選択される。例えば、CARの精製及び検出を容易にする目的で用いる機能性タンパク質としては、Mycタグ、Hisタグ、HAタグ、FLAGタグ（登録商標、Sigma-Aldrich社）、蛍光タンパク質タグ（GFP等）等が挙げられる。

40

【0059】

以上、本発明のCARにおける各領域等の例について説明したが、これら領域等に関する具体的なアミノ酸配列は、当業者であれば、公知の文献やNCBI（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>）等のデータベースを検索して適宜入手することができる。また、そのようにして入手できる典型的なアミノ酸配列（例えば、NCBI レファレンスシーケンス）に限らず、本発明に係る領域等は、当該領域が担う機能を維持している限り、それら典型的なアミノ酸配列に対する改変体、相同体も含み得る。また、かかる改変体、相同体は、典型的なアミノ酸配列に対し、通常高い相

50

同性を有する。高い相同性は、通常 60% 以上であり、好ましくは 70% 以上、より好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上（例えば、95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、99% 以上）である。

【0060】

上述のとおり、本発明の「切断用 CAR」は、N 末端側から順に少なくとも、抗原結合領域、膜貫通領域及びプロテアーゼが、直接又は間接的に連結されてなるものであればよいが、N 末端側から順に、シグナルペプチド、抗原結合領域、スペーサー配列、膜貫通領域、スペーサー配列及びプロテアーゼが連結されてなるものが好ましい。

【0061】

なお、後述の実施例において示すとおり、自己切断によって遊離したプロテアーゼによる、抗原認識非特異的な活性化用 CAR の切断を抑制するという観点から、本発明の「切断用 CAR」は、前記プロテアーゼによって切断される部位を含まない。CAR が当該部位を含まないことは、当業者であれば、例えば、ペプチドデータベース（MEROPS、<https://www.ebi.ac.uk/merops/>等）を検索することによって、確認することができる。

【0062】

本発明の「活性化用 CAR」は、N 末端側から順に少なくとも、抗原結合領域、膜貫通領域、プロテアーゼによって切断される部位及びシグナル伝達因子が、直接又は間接的に連結されてなるものであればよいが、N 末端側から順に、シグナルペプチド、抗原結合領域、スペーサー配列、膜貫通領域、共刺激伝達ドメイン、スペーサー配列、プロテアーゼによって切断される部位及びシグナル伝達因子が、直接又は間接的に連結されてなるものが好ましい。

【0063】

<キメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド>

本発明は、本発明の CAR をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0064】

一本鎖抗体等の抗原結合領域をコードするヌクレオチド配列の情報については、標的とする抗原を認識するモノクローナル抗体を作製し、かかるモノクローナル抗体のアミノ酸配列をエドマン法等の公知の方法で決定し、かかるアミノ酸配列に基づいて入手することもできる。また、当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのヌクレオチド配列を解析することによっても入手することができる。

【0065】

また、抗原結合領域を含め、本発明の CAR における各領域等をコードする具体的なヌクレオチド配列は、当業者であれば、公知の文献や NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 等のデータベースを検索しても適宜入手することができる。さらに、上記領域等をコードするヌクレオチド配列は、公知のものに限定されず、上記各領域等をコードするヌクレオチド配列であれば用いることができる。遺伝子コードの縮重により、1つのアミノ酸に対応するコドンは複数存在する。したがって、同一のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は多数存在する。本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、本発明の CAR をコードする限り、遺伝子コードの縮重によって生じる複数のヌクレオチド配列のいずれであってもよい。さらにまた、CAR を発現する細胞細胞における発現を最適化するために、本発明の CAR における各領域等をコードするヌクレオチド配列において、アミノ酸をコードするための選択されるコドンは改変されてもよい。

【0066】

そして、当業者であれば、このようなヌクレオチド配列情報に基づき、化学合成する方法（ホスホロアミダイト法等）や、PCR によって増幅する方法等の公知の技術を用い、各領域等をコードするポリヌクレオチドを作製することができる。さらに、このようにして得られた各領域等をコードするポリヌクレオチドを、直接又はスペーサー介して連結することにより、本発明の CAR をコードするポリヌクレオチドを得ることができる。なお

、各領域等をコードするポリヌクレオチドの連結は、後述の実施例において示すように、例えば、オーバーラップ伸長PCR法(overlap extension PCR)等の公知の方法を用いて行うことができる。

【0067】

<キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクター>

本発明は、上述のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。本発明のベクターとしては直鎖状でも環状でもよく、例えば、ウイルスベクター、プラスミドベクター、エピソーマルベクター、人工染色体ベクター、トランスポゾンベクターが挙げられる。

【0068】

ウイルスベクターとしては、例えば、レンチウイルス等のレトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、シルビスウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、オルソミクソウイルスベクターが挙げられる。

10

【0069】

プラスミドベクターとしては、例えば、pcDNA3.1、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo等の、動物細胞発現用プラスミドベクターが挙げられる。

【0070】

エピソーマルベクターは、染色体外で自律複製可能なベクターである。エピソーマルベクターを用いる具体的手段は、公知である(Yura, Science, 2009年、324, 797-801ページ、参照)。エピソーマルベクターとしては、例えば、EBV、SV40等に由来する自律複製に必要な配列をベクター要素として含むベクターが挙げられる。自律複製に必要なベクター要素としては、具体的には、複製開始点と、複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子であり、例えば、EBVにあっては複製開始点oriPとEBNA-1遺伝子、SV40にあっては複製開始点oriとSV40LT遺伝子が挙げられる。

20

【0071】

人工染色体ベクターとしては、例えば、YAC(Yeast artificial chromosome)ベクター、BAC(Bacterial artificial chromosome)ベクター、PAC(P1-derived artificial chromosome)ベクターが挙げられる。

30

【0072】

これらベクターにおいて、増殖が緩やかな細胞であっても高効率に遺伝子を導入し易く、また安定発現株の樹立が容易であるという観点から、レトロウイルスベクターが好ましく、レンチウイルスがより好ましい。

【0073】

本発明のベクターには、上述のCARをコードするポリヌクレオチドの他に、プロモーター、エンハンサー、ポリA付加シグナル、ターミネーター等の発現制御配列、複製開始点や複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、他のタンパク質をコードするヌクレオチド等を含んでいてもよい。

40

【0074】

上述のCARをコードするポリヌクレオチドや後述の他のタンパク質をコードするヌクレオチドは、プロモーターの下流に作動可能に配置することで、各ポリヌクレオチドを効率よく転写することが可能となる。かかる「プロモーター」としては、例えば、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRプロモーター、SV40初期プロモーター、レトロウイルスのLTR、RSV(ラウス肉腫ウイルス)プロモーター、HSV-TK(単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ)プロモーター、EF1プロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター等が挙げられる。

【0075】

50

「他のタンパク質をコードするヌクレオチド」としては、例えば、蛍光タンパク質遺伝子、レポーター遺伝子、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子、サイトカイン等のT細胞活性化に関与する分子をコードする遺伝子等を挙げることができる。また、例えば、IRES、2Aペプチド配列（例えば、Thosea asigna由来の2Aペプチド（T2A））をコードするDNA等を用いることにより、前記他のタンパク質は上述のCARと共にポリシストロニックに発現させることが可能となる。

【0076】

さらに、CARを発現する細胞を投与した対象（がん患者等）の体内で、投与したCAR発現細胞のアポトーシスを適宜誘導するため、自殺遺伝子を「他のタンパク質をコードするヌクレオチド」として、本発明のベクターは含み得る。自殺遺伝子としては、例えば、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（HSV-TK）、誘導性カスパーゼ9（inducible caspase 9: iCasp9）が挙げられる。また、かかる遺伝子の機能を活性化する薬剤としては、HSV-TKに対してはガンシクロビル、iCasp9に対しては二量体誘導化合物（chemical induction of dimerization: CID）であるAP1903等を挙げることができる（Cooper L.J.ら、Cytotherapy. 2006; 8(2): 105-17ページ、Jensen M.C.ら、Biol Blood Marrow Transplant. 2010 Sep; 16(9): 1245-56ページ、Jones B.S.、Front Pharmacol. 2014 Nov 27; 5: 254.、Minagawa K.、Pharmaceuticals (Basel). 2015 May 8; 8(2): 230-49ページ、Bole-Richard E.、Front Pharmacol. 2015 Aug 25; 6: 174 参照）。

【0077】

また、本発明において、切断用CARをコードするポリヌクレオチドと、活性化用CARをコードするポリヌクレオチドとは、単一のベクターに組み込んでもよく、各々別々のベクターに組み込んでもよいが、かかるベクターにより形質転換され、切断用CAR及び活性化用CARを発現するT細胞の、抗原認識非依存的な活性化をより抑制し易くなるという観点から、別々のベクターに組み込むことが望ましい。また、単一のベクターに組み込む際には、例えば、IRES、2Aペプチド配列をコードするDNA等を該ベクターに挿入することにより、ポリシストロニックに切断用CAR及び活性化用CARを発現させることが可能となる。

【0078】

<キメラ抗原受容体を発現する細胞>

本発明は、本発明のCARを発現する細胞を提供する。本発明の細胞は、上述の本発明のCARをコードするポリヌクレオチド又はベクターを、細胞に導入することにより得ることができる。

【0079】

本発明のポリヌクレオチド又はベクターが導入される「細胞」は、哺乳動物由来の細胞であることが好ましく、例えば、ヒト由来の細胞、又は齧歯類（マウス、ラット等）、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ブタ、サル等の非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いることができる。細胞の種類は、特に限定されず、血液、骨髓液等の体液や、脾臓、胸腺、リンパ節等の組織、腫瘍やがん性腹水等から採取された細胞等を使用することができる。好ましい例としては、免疫細胞を挙げることができ、末梢血から分離された末梢血単核球等を好適に用いることができる。末梢血単核球に含まれる細胞の中でも、特に好ましい細胞としては、T細胞、NK細胞、及びこれらの前駆細胞を挙げられる。T細胞の種類は、特に限定されず、T細胞、T細胞、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、細胞傷害性T細胞（CTL）、腫瘍浸潤T細胞、エフェクターメモリーT細胞（TEM）、セントラルメモリーT細胞（TCM）、ナチュラルキラーT細胞等のいずれのT細胞であってもよい。

【0080】

本発明に係る細胞は、過剰な免疫反応等を抑えるタンパク質（免疫チェックポイント物

10

20

30

40

50

質等)の機能が抑制されている細胞であってもよい。かかるタンパク質としては、例えば、Programmed Death 1 (PD1)、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM (CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5等)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9が挙げられる。

【0081】

また、本発明に係る細胞は、多家移植をし易くするために、内在性のTCR、HLA等のタンパク質の機能が抑制されている細胞であってもよい。

10

【0082】

タンパク質の機能を抑制する方法としては、前記タンパク質をコードする遺伝子を標的とするノックアウト法、前記遺伝子の転写産物と相補的なdsRNA (二重鎖RNA、例えばsiRNA)を用いる方法、当該転写産物と相補的なアンチセンスRNAを用いる方法、前記転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAを用いる方法が挙げられる。また、部位特異的なヌクレアーゼ (例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、CRISPR-Cas9等のDNA二本鎖切断酵素)を利用して、標的遺伝子を改変する方法であるゲノム編集法も、前記物質の機能を抑制するために好適に用いられる。

【0083】

20

本発明のポリヌクレオチド又はベクターを細胞に導入する方法としては、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等を挙げることができる。また、本発明のベクターがレトロウイルスベクターである場合、ベクターが有しているLTR配列及びパッケージングシグナル配列に基づいて適切なパッケージング細胞を選択し、これを使用してレトロウイルス粒子を調製してもよい。パッケージング細胞としては、例えば、PG13、PA317、GP+E-86、GP+envAm-12、Psi-Cripが挙げられる。また、トランスフェクション効率の高い293細胞や293T細胞をパッケージング細胞として用いることもできる。

【0084】

30

本発明において、切断用CARをコードするベクターと、活性化用CARをコードするベクターとを別々に細胞に導入する場合、導入するベクターの比率は、当業者であれば、各CARの発現に用いるベクターの種類及びプロモータの強さ、並びにプロテアーゼの種類等を考慮しながら、適宜調整することができる。例えば、これらベクターにより形質転換され、切断用CAR及び活性化用CARを発現するT細胞の、抗原認識非依存的な活性化がより抑制され易くなるという観点から、細胞に導入するこれらベクターの重量比又はモル比 (切断用CARをコードするベクターの重量又はモル量：活性化用CARをコードするベクターの重量又はモル量)は、5：1～100：1であることが好ましく、10：1～50：1であることがより好ましい。

【0085】

40

また、本発明のポリヌクレオチド又はベクターを細胞に導入した後、当該細胞のCARの発現は、フローサイトメトリー、RT-PCR、ノーザンブロッティング、ウエスタンブロッティング、ELISA、蛍光免疫染色等の公知の方法により確認することができる。

【0086】

<医薬組成物等>

後述の実施例、並びに図1及び2において示すとおり、切断用CAR及び活性化用CARを発現させたT細胞は、各CARを介して2種の抗原を認識することにより、正常細胞には細胞障害等をもたらすことなく、標的細胞に対しては細胞障害等を奏することが可能となる。

【0087】

50

具体的には、図 1 に示す、前記シグナル伝達分子として、細胞膜より遊離した場合に機能する遊離性シグナル伝達因子を用いる系（ポジティブシステム）においては、標的細胞において発現する 2 つの標的抗原を、切断用 C A R 及び活性化用 C A R が各々抗原結合領域を介して認識した際に、活性化された前記プロテアーゼによる活性化用 C A R の切断が生じ、前記シグナル伝達因子は、細胞膜より遊離することにより機能する。そして、これら C A R を発現する細胞は活性化され、標的細胞に細胞障害等をもたらすことが可能となる。また、正常細胞が、前記 2 つの標的抗原のうちのいずれか一方の抗原しか発現していない場合には、切断用 C A R 及び活性化用 C A R を発現する細胞は活性化されないため、当該細胞に細胞障害等をもたらされない。

【 0 0 8 8 】

10

また、図 2 に示す、前記シグナル伝達分子として、細胞膜の内側に存在している場合に機能する、膜局在型シグナル伝達因子を用いる系（ネガティブシステム）においては、正常細胞において発現する 2 つの抗原を、切断用 C A R 及び活性化用 C A R が各々抗原結合領域を介して認識した際には、当該シグナル伝達因子は、活性化されたプロテアーゼによる活性化用 C A R の切断によって細胞膜から遊離することにより不活化され、正常細胞に細胞障害等は及ぼされない。一方、標的細胞において、切断用 C A R が認識する抗原は発現せず、活性化用 C A R が認識する抗原が発現する場合には、前記プロテアーゼは活性化されることなく、従来の C A R 同様に、活性化用 C A R の標的抗原認識に応じ、前記シグナル伝達分子は細胞膜内側にて機能し、これら C A R を発現する細胞は活性化され、標的細胞に細胞障害等をもたらされる。

20

【 0 0 8 9 】

したがって、本発明は、本発明の細胞を含む、標的細胞が関与する疾患を治療又は予防するための医薬組成物を提供する。

【 0 0 9 0 】

かかる疾患としては、特に制限はなく、例えば、がん、感染症、炎症性疾患が挙げられる。「がん」としては、より具体的に、慢性リンパ性白血病（標的抗原：C D 1 9、C D 5 等）、B 細胞性慢性リンパ性白血病（標的抗原：C D 1 9、C D 5 2、C D 1 6 0 等）、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（標的抗原：C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2 等）、急性骨髄性白血病（標的抗原：C D 1 3、C D 3 3 等）、多発性骨髄腫（標的抗原：B C M A、C D 1 3 8 等）、乳がん（標的抗原：H E R 2、M U C 1 等）、神経芽細胞腫（標的抗原：G D 2、N C A M、A L K）、神経膠腫（標的抗原：E G F R、ビメンチン等）、結腸直腸がん（標的抗原：葉酸受容体、C A 1 2 5 等）、腎細胞がん（標的抗原：炭酸脱水酵素 I X（C A I X）、G 2 5 0 等）、前立腺がん（標的抗原：P S M A 等）、大腸がん（標的抗原：A 3 3 等）が挙げられる。「感染症」としては、より具体的に、H I V、H B V、E B V、C M V、H P V、ラッサウイルス、インフルエンザウイルス、真菌等の感染症が挙げられる。「炎症性疾患」としては、より具体的に、全身性エリテマトーデス（S L E）、糖尿病、関節リウマチ（R A）、反応性関節炎、多発性硬化症（M S）、尋常性天疱瘡、セリアック病、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、自己免疫性甲状腺疾患、X 連鎖無ガンマグロブリン血症が挙げられる。

30

【 0 0 9 1 】

40

本発明の医薬組成物は、本発明の細胞に加えて、薬学的に許容される担体等の他の成分を含んでいてもよい。薬学的に許容される担体としては、細胞培養培地、生理食塩水、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液が挙げられる。また、更なる他の成分として、サイトカイン等の T 細胞活性化因子、免疫賦活剤、免疫チェックポイント阻害剤、他の C A R を発現する細胞、抗癌剤、抗炎症剤等を挙げることができるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 2 】

また、上述のとおり、本発明の細胞を用いることにより、標的細胞が関与する疾患を治療又は予防することが可能となる。したがって、本発明は、下記治療又は予防方法も提供し得る。

【 0 0 9 3 】

50

切断用CAR及び活性化用CARを発現する細胞、又は該細胞を含む医薬組成物を、対象に投与する工程を含む、前記第2の抗原を少なくとも発現する標的細胞が関与する疾患を治療又は予防する方法。

【0094】

本発明の細胞又は医薬組成物の対象への投与は、特に制限されることはなく、例えば、注射（静脈内投与等）又は輸注によって行なうことができる。また、標的細胞が存在する部位（例えば、腫瘍内）に直接注入等することにより投与してもよい。

【0095】

本発明の細胞又は医薬組成物の投与量は、治療的に有効な量であればよく、当業者であれば、投与対象の年齢、性別及び体重等、疾患の種類、進行度及び症状等、並びに投与方法等により、投与量及び投与間隔を、適宜調整することができる。例えば、投与量としては、1回の投与において、投与細胞の個数として、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$ 個/kg（体重）、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$ 個/kg（体重）、より好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 個/kg（体重）とすることができる。投与間隔としては、例えば、1週毎、10～30日毎、1月毎、3～6月毎、1年毎等とすることができる。また、本発明の細胞は、投与対象の体内で自律的に増殖できるため、1回きりの投与とすることもできる。また、投与後に体内の本発明の細胞数をモニタリングし、その結果に応じて投与時期を決定するようにしてもよい。

【0096】

また、プロテアーゼ阻害剤による制御可能なプロテアーゼを有する切断用CARを発現する本発明の細胞を用いた場合、当該細胞が過剰に活性化することにより、高サイトカイン血症等の有害事象が生じた場合には、対象にプロテアーゼに対する阻害剤を投与することによって、本発明の細胞の活性を抑制することもできる。

【実施例】

【0097】

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。また、本実施例は、下記材料及び方法を用いて行なった。

【0098】

（細胞と試薬）

293T細胞及びSK-BR-3細胞は、10%ウシ胎仔血清（FBS；Sigma Aldrich, St. Louis, MO, lot # 14M067）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM；Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan）にて培養した。なお、SK-BR-3細胞は、東京医科歯科大学 分子遺伝分野及び分子細胞遺伝分野より分与頂いた。

【0099】

K562細胞、Raji細胞及びJurkat細胞は、10%FBSを添加したRPMI-1640（FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan）にて培養した。

【0100】

HIVプロテアーゼ（HIVPR）阻害剤であるサキナビル（Saquinavir）及びネルフィナビル（Nelfinavir）（NIH AIDS Research and Reference Reagent Program）は、東京医科歯科大学 ウイルス制御学分野より分与頂いた。

【0101】

抗RFPウサギポリクローナル抗体（PM005, lot # 045）は、Medica l and Biological Laboratories（Nagoya, Japan）より、抗Myc Tagウサギポリクローナル抗体（06-549, lot # 24165）は、Upstate Biotechnology（Lake Placid, NY）より、抗Syntaxin4マウスモノクローナル抗体（QQ-17, lot # F2118）は、Santa Cruz Biotechnology（Santa Cru

10

20

30

40

50

z, CA)より、抗 - actinマウスモノクローナル抗体 (A1978, lot # 117K4873)は、Sigma Aldrichより、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギIgG抗体 (NA934-1ML, lot # 16836138) 及びHRP標識抗マウスIgG抗体 (NA9310-1mL, lot # 14975046) は、GE Healthcare (Chicago, IL)より購入した。マウス (G3A1) mAb IgG1 アイソタイプコントロール (5415, lot # 10)はCell Signaling Technology (Danvers, MA)より購入した。PE標識抗ヒトCD69抗体 (310905, lot # B258745) 及びPerCP/Cy5.5標識抗ヒトHER2抗体 (324415, lot # B236448) は、Biolegend (San Diego, CA)より購入した。APC マウス抗ヒトCD19抗体 (555415, lot # 7108612)はBD Pharmingen (San Diego, CA)より購入した。

10

【0102】

(発現ベクター)

図3、9及び18に示す各キメラ抗原受容体 (CAR) 等をコードするプラスミドベクターを作成するため、材料として、pHR__PGK__antiCD19__synNotch__TetRVP64 (Addgene plasmid # 79126)、pHR__PGK__antiHer24D5-3__synNotch__Gal4VP64 (Addgene plasmid # 85422)、pHR__PGK__antiHer24D5-8__synNotch__Gal4VP64 (Addgene plasmid # 85425)、pCDNA3.1-PS11-scFvFc-CD28-gp41 (706-713) (Addgene plasmid # 60606)、pCDNA3/GFP-PR (Addgene plasmid # 20253)、pGEM-human TCR zeta/2470 (Addgene plasmid # 11507)、及びpCry2PHR-mCh-RhoA (Addgene plasmid # 42958)は、Addgene (Watertown, MA)より購入した。蛍光タンパク質mCherryをコードするcDNAプラスミドはNathan C Shanerより分与を受けた (Nathan C Shanerら、Nat Biotechnol.、2004年12月、22巻、12号、1567-1572ページ 参照)。

20

【0103】

pHR__PGK__antiCD19__synNotch__TetRVP64プラスミドを鋳型とし、anti-CD19 outer Fプライマー及びanti-CD19-CD28 inner Rプライマーを用い、PCRを行なった。また、pCDNA3.1-PS11-scFvFc-CD28-gp41 (706-713) プラスミドを鋳型とし、anti-CD19-CD28 inner Fプライマー及びCD28-outer Rプライマーを用い、PCRを行なった。そして、これらPCRによって得られた2種類の増幅産物を鋳型とし、更にanti-CD19 outer Fプライマー及びCD28 outer Rプライマーを用いたPCRを行なうことにより、anti-CD19 scFvとCD28細胞内ドメインとが融合されたポリペプチドをコードするcDNAを増幅した。

30

40

【0104】

さらに、当該cDNAを鋳型とし、anti-CD19 outer Fプライマーと、内部にHIVPR認識配列を組み込んだCD28-CV1 inner Rプライマーとを用い、PCRを行なった。また、pCry2PHR-mCh-RhoAプラスミドを鋳型とし、CV1-mCherry inner Fプライマー及びmCherry outer Rプライマーを用い、PCRを行なった。そして、これらPCRによって得られた2種類の増幅産物を鋳型とし、更にanti-CD19 outer FプライマーとmCherry outer Rプライマーを用いたPCRを行なうことにより、HIVPR認識配列をコードするcDNAを介在させたうえでmCherry遺伝子を、前記anti-CD19 scFv及びCD28細胞内ドメインをコードするcDNAの3'末に接続した

50

。なお、このように異なる配列をPCRにて接続するために、15merの重複配列を含んだプライマーによるoverlap extension PCRを用いた。

【0105】

そして、得られたCD19 scFv、CD28細胞内ドメイン、HIVPR認識配列及びmCherryをコードするcDNAの5'末端はEcoRIにて、3'-末端はXhoIにて制限酵素処理を行い、pcDNA3.1(+)ベクター(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)に組み込み、anti-CD19-CD28-CS-mCherry CAR(図3 参照)をコードするベクター(pcDNA3-anti-CD19-CD28-cleave site-mCherryベクター)を作成した。

10

【0106】

また、pcDNA3-anti-CD19-CD28-cleave site-mCherryベクター及びpGEM-human TCR zeta/2470ベクターを基に、overlap extension PCRにより、CD3-zeta細胞内ドメイン及びT2A配列を介在したうえでYFP遺伝子を接続し、pcDNA3-anti-CD19-CD28-cleave site-CD3zeta(ICD)-T2A-YFPベクターを作成した(図18 参照のほど)。当該ベクターのことを、以下「pcDNA3-anti-CD19-Effector-CAR-T2A-YFPベクター」又は「anti-CD19 Effector CAR-T2A-YFP発現ベクター」とも称する。また、当該ベクターがコードする活性化用CARを「anti-CD19-Effector-CAR」とも称する。

20

【0107】

また、前記同様overlap extension PCRにて、anti-CD19 scFv、CD28細胞内ドメイン及びHIVPRをコードするcDNAを作成し、EcoRI及びXhoIにて制限酵素処理を行ったうえでpcDNA3.1(+)ベクターに挿入し、anti-CD19-CD28-HIVPR CAR(図9 参照)をコードするベクター(pcDNA3-anti-CD19-CD28-HIVPRベクター)を作成した。

【0108】

CD28の細胞内ドメインのC末端を欠失させるべく、さらにHIVPRのN末端も欠失させるべく、pcDNA3-anti-CD19-CD28-HIVPRベクターを基にPCRにて目的配列を除去し、anti-CD19-CD28-HIVPR 4 CAR及びanti-CD19-CD28 ICD-HIVPR 4 CAR(共に図9 参照)を各々コードするベクター(pcDNA3-anti-CD19-CD28-HIVPR(4)ベクター及びpcDNA3-anti-CD19-CD28(ICD)-HIVPR(4)ベクター)を作成した。

30

さらにまた、pcDNA3-anti-CD19-CD28-HIVPRベクター、pcDNA3-anti-CD19-CD28-HIVPR(4)ベクター、及びpcDNA3-anti-CD19-CD28(ICD)-HIVPR(4)ベクターにおいて、各切断用CAR遺伝子の3'末端に接続するようにYFP遺伝子を挿入したベクターも調製した。

40

【0109】

また、pcDNA3-anti-CD19-CD28-cleave site-mCherryベクターを基に、pHR__PGK__antiHer24D5-3__synNotch__Gal4VP64ベクターよりPCRにて増幅したanti-HER2(4D5-3)scFvをoverlap extension PCRにて接続し、pcDNA3-anti-HER2(4D5-3)-CD28-CS-mCherryベクターを作成した。

【0110】

さらに、pcDNA3-anti-HER2(4D5-3)-CD28-CS-mCh

50

erryベクター及びpcDNA3-anti-CD19-CD28(ICD)-HIVPR(4)ベクターを基にoverlap extension PCRを用いてpcDNA3-anti-HER2(4D5-3)-Scissors-CAR-T2A-mCherryベクターを作成した。

【0111】

さらにまた、NheI及びXhoIを用いた制限酵素処理によってanti-HER2(4D5-3)-Scissors-CAR-T2A-mCherry遺伝子断片を調製し、pcDNA3(-)-Hygroベクター(Thermo Fisher Scientific)に挿入することで、pcDNA3(-)-anti-HER2(4D5-3)-Scissors-CAR-T2A-mCherry-Hygroベクターを作成した。

10

また、pHR_PGK_antiHer24D5-3_synNotch_Gal4VP64ベクターの代わりに、pHR_PGK_antiHer24D5-8_synNotch_Gal4VP64ベクターを用い、前記同様の方法にて、pcDNA3(-)-anti-HER2(4D5-8)-Scissors-CAR-T2A-mCherry-Hygroベクターも作成した。

【0112】

CD19を細胞において強制的に発現させるため、Raji細胞由来cDNAからCD19遺伝子をクローニングし、pcDNA3(-)-hygroベクターに挿入することにより、pcDNA3(-)-CD19-Hygroベクター(CD19発現ベクター)を作成した。また、HER2を細胞において強制的に発現させるため、SK-BR-3細胞由来cDNAからHER2遺伝子をクローニングし、pcDNA3(-)-hygroベクターに挿入することにより、HER2発現ベクターを作成した。

20

【0113】

なお、上記各PCRにはrTaqポリメラーゼ(TAKARA, Shiga, Japan)及びKOD-plusポリメラーゼ(TOYOBO, Osaka, Japan)を用いた。また、作成したベクターについては、東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム解析室に委託し、配列を確認した。

【0114】

上記PCRにて用いたプライマーは、Sigma Aldrich社に設計及び合成を委託した。これらプライマーの配列は表1～3に示す。

30

【0115】

40

50

【表 1】

CAR発現ベクター構築用プライマー		
プライマー名	配列	配列番号:
anti-CD19 outer F	TTCGAATTCTCACGCGTCAAG	10
anti-CD19-CD28 inner R	CTGGCTGGTCTCGGTTGAACTCACTGTCAC	11
anti-CD19-CD28 inner F	GTGACAGTGAGTTCAACCCGAGACCAGCCAG	12
CD28-CV1 inner R	AGTGATCTGAGGGAAGCTAAAGGATGAATATCCCTGCCT	13
CV1-mCherry inner F	TCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTATGGTGAGCAAGGGC	14
mCherry outer R	ACCCTCGAGTTACTTGACAGCTCGTC	15
CD28-HIVPR inner R	AAGAGTGATCTGAGGTGAATATCCCTGCCT	16
CD28-HIVPR inner F	AGGCAGGGATATTCACCTCAGATCACTCTT	17
HIVPR outer R	ACCCTCGAGTTAAAAATTTAAAGTGCA	18
HIV-PR delta 4 inner F	AGGCAGGGATATTCACCTTTGGCAGCGACCC	19
CD28 inner R	TGAATATCCCTGCCTAACTCTATTC	20
CD28 delta ICD inner R	CTGCCCTAACTCTATTACCCAGAAAAATAATAAGGCCAC	21
CD28 delta ICD inner F	ATTATTTTCTGGGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTC	22

【 0 1 1 6 】

【表 2】

CAR発現ベクター構築用プライマー

プライマー名	配列	配列番号:
anti-HER2(4D5-3) outer F	TCTGAAGAGGACCTCGACATACAGATGACC	23
anti-HER2(4D5-3) inner R	GGTCATCTGTATGTCTGAGGTCCTCTTCAGA	24
anti-HER2(4D5-3) inner F	GTTAGTTCTGGATCTACCGAGACCAGCCAG	25
anti-HER2(4D5-3) outer R	CTGGCTGGTCTCGGTAGATCCAGAACTAAC	26
anti-HER2(4D5-8) 5' F	TCTGAAGAGGACCTCGATATTCAAATGACC	53
anti-HER2(4D5-8) 5' R	GGTCATTTGAATATCGAGGTCCTCTTCAGA	54
anti-HER2(4D5-8) 3' F	GTTAGCAGCGGCTCTACCGAGACCAGCCAG	55
anti-HER2(4D5-8) 3' R	CTGGCTGGTCTCGGTAGAGCCGCTGCTAAC	56
CV1-TCRz inner F	TTCCCTCAGATCACTAGAGTGAAGTTCAGC	27
TCRz-T2A inner R	GCCCTCTCCGGATCCGCGAGGGGGCAGGGC	28
TCRz-T2A inner F	GCCCTGCCCCCTCGCGGATCCGGAGAGGGC	29
YFP R XhoI	ACCCTCGAGCTACAGCTCGTCCAT	30
HIVPR-T2A inner R	GCCCTCTCCGGATCCAAAATTTAAAGTGCA	31
HIVPR-T2A inner F	TGCACTTTAAATTTTGGATCCGGAGAGGGC	32
T2A-mCherry inner R	GCCCTTGCTCACCATAGGTCCAGGATTCTC	33
T2A-mCherry inner F	GAGAATCCTGGACCTATGGTGAGCAAGGGC	34

【 0 1 1 7 】

【表 3】

クローニング用プライマー

プライマー名	配列	配列番号:
CD19 F nested	ATGCCACCTCCTCGCCTCC	35
CD19 R nested	GCCCAAGGTTGGAGTCGTTC	36
CD19 F XbaI	TTCTCTAGAATGCCACCTCCTCG	37
CD19 R BamHI	ACCGGATCCTTAGACCAGGGCTCTTTG	38
HER2 F XbaI	TTCTCTAGAATGGAGCTGGCGGCCTTG	39
HER2 R HindIII	ACCAAGCTTAGTACTTCCGGATCTTC	40

【 0 1 1 8 】

作成した各CARをコードするDNA配列を、配列番号：1、3、5、7、45、47、49及び51に示す。また各CARのアミノ酸配列を、配列番号：2、4、6、8、46、48、50及び52に示す。

【 0 1 1 9 】

配列番号：2に示す「anti-CD19-CD28-CS-mCherry CAR」のアミノ酸配列において、1～21位のアミノ酸からなる配列はリーダー配列を示し、22～31位のアミノ酸からなる配列はMycタグを示し、32～273位のアミノ酸

からなる配列は *anti* - CD19 - *scFv* を示し、274～282 位のアミノ酸からなる配列は C9 配列を示し、283～348 位のアミノ酸からなる配列は CD28 膜貫通領域を示し、349～361 位のアミノ酸からなる配列は CD28 細胞内ドメインを示し、362～369 位のアミノ酸からなる配列は gp41 配列を示し、370～377 位のアミノ酸からなる配列は HIVPR 切断部位を示し、378～613 位のアミノ酸からなる配列は *mCherry* を示す。

【0120】

配列番号：4 に示す「*anti* - CD19 - CD28 - HIVPR CAR」のアミノ酸配列において、369 位迄のアミノ酸配列については配列番号：2 におけるそれらと同じである。配列番号：4 に記載のアミノ酸配列において、370～468 位のアミノ酸からなる配列は HIVPR を示す。

10

【0121】

配列番号：6 に示す「*anti* - CD19 - CD28 - HIVPR 4 CAR」のアミノ酸配列において、369 位迄のアミノ酸配列については配列番号：2 におけるそれらと同じである。配列番号：6 に記載のアミノ酸配列において、370～464 位のアミノ酸からなる配列は N 末端の 4 アミノ酸が欠失している HIVPR を示す。

【0122】

配列番号：8 に示す「*anti* - CD19 - CD28 ICD - HIVPR 4 CAR」のアミノ酸配列において、348 位迄のアミノ酸配列については配列番号：2 におけるそれらと同じである。配列番号：8 に記載のアミノ酸配列において、349～356 位のアミノ酸からなる配列は gp41 配列を示し、357～451 位のアミノ酸からなる配列は N 末端の 4 アミノ酸が欠失している HIVPR を示す。

20

【0123】

配列番号：46 に示す「*anti* - HER2 (4D5 - 3) - CD28 - CS - *mCherry* CAR」のアミノ酸配列において、1～21 位のアミノ酸からなる配列はリーダー配列を示し、22～31 位のアミノ酸からなる配列は Myc タグを示し、32～277 位のアミノ酸からなる配列は *anti* - HER2 (4D5 - 3) *scFv* を示し、278～286 位のアミノ酸からなる配列は C9 配列を示し、287～352 位のアミノ酸からなる配列は CD28 膜貫通領域を示し、353～365 位のアミノ酸からなる配列は CD28 細胞内ドメインを示し、366～373 位のアミノ酸からなる配列は gp41 配列を示し、374～381 位のアミノ酸からなる配列は HIVPR 切断部位を示し、382～617 位のアミノ酸からなる配列は *mCherry* を示す。

30

【0124】

配列番号：48 に示す「*anti* - CD19 - CD28 - CS - CD3 zeta (ICD) - T2A - YFP」のアミノ酸配列において、377 位迄のアミノ酸配列については配列番号：2 におけるそれらと同じである。配列番号：48 に記載のアミノ酸配列において、378～489 位のアミノ酸からなる配列は CD3 zeta (ICD) を示し、490～510 位のアミノ酸からなる配列は T2A 配列を示し、511～747 位のアミノ酸からなる配列は YFP を示す。

【0125】

40

配列番号：50 に示す「*anti* - HER2 (4D5 - 3) - CD28 ICD - HIVPR 4 T2A - *mCherry*」のアミノ酸配列において、1～21 位のアミノ酸からなる配列はリーダー配列を示し、22～31 位のアミノ酸からなる配列は Myc タグを示し、32～277 位のアミノ酸からなる配列は *anti* - HER2 (4D5 - 3) *scFv* を示し、278～286 位のアミノ酸からなる配列は C9 配列を示し、287～352 位のアミノ酸からなる配列は CD28 膜貫通領域を示し、353～360 位のアミノ酸からなる配列は gp41 配列を示し、361～455 位のアミノ酸からなる配列は N 末端の 4 アミノ酸が欠失している HIVPR 切断部位を示し、456～476 位のアミノ酸からなる配列は T2A 配列を示し、477～712 位のアミノ酸からなる配列は *mCherry* を示す。

50

配列番号：52に示す「anti-HER2(4D5-8)-CD28 ICD-H I V P R 4 T2A-mCherry」のアミノ酸配列において、32～277位のアミノ酸からなる配列はanti-HER2(4D5-8) scFvを示し、それ以外の配列については、配列番号：50におけるそれらと同じである。

【0126】

(遺伝子導入と安定発現細胞株の樹立)

上述のベクターの、293T細胞及びSK-BR-3細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用い、添付のプロトコルに従って実施した。Jurkat細胞及びRaji細胞への遺伝子導入にはNucleofector kit V (Lonza, Basel, Switzerland) を用い、それぞれ添付のプロトコルに従って実施した。

10

【0127】

CD19発現ベクターを遺伝子導入したSK-BR-3細胞に対し、遺伝子導入24時間後より培地中に終濃度100 µg/mLのHygromycin (WAKO) を添加することでCD19を安定的に発現するSK-BR-3細胞を樹立した。また、HER2発現ベクターを遺伝子導入したRaji細胞に対し、同様に遺伝子導入24時間後より培地中に終濃度300 µg/mLのHygromycinを添加することで、HER2を安定的に発現するSK-BR-3細胞を樹立した。

【0128】

pCDNA3-anti-CD19-Effector-CAR-T2A-YFP遺伝子を遺伝子導入したJurkat細胞に対し、遺伝子導入から24時間後にFACS ariall (BD Bioscience, San Jose, CA) を用いてYFP陽性細胞を選別したうえで、培地中に終濃度1 mg/mLのG418 (Thermo Fisher Scientific) を添加することでanti-CD19-Effector-CAR-T2A-YFP遺伝子を安定的に発現するJurkat細胞を樹立した。このanti-CD19-Effector/Jurkat細胞に対し、同様にpCDNA3(-)-anti-HER2(4D5-3)-Scissors-CAR-T2A-mCherry-Hygroベクター又はpCDNA3(-)-anti-HER2(4D5-8)-Scissors-CAR-T2A-mCherry-Hygroベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入から24時間後にFACS ariallを用いてYFP及びmCherry陽性細胞を選別したうえで、培地中に終濃度1 mg/mLのG418及び200 µg/mLのHygromycinを添加することで、anti-CD19-Effector-CAR-T2A-YFP遺伝子と、anti-HER2(4D5-3)-Scissors-CAR遺伝子又はanti-HER2(4D5-8)-Scissors-CAR遺伝子との両者を安定的に発現するJurkat細胞を樹立した。

20

30

【0129】

(細胞溶解液の調製)

前記遺伝子導入した各細胞に関し、全細胞、細胞膜又は細胞質のタンパク質溶解液を調製した。全細胞溶解液は、回収した細胞に溶解バッファー(1% Triton-X, 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 40 mM -グリセロリン酸, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル, 10 µg/mL アプロチニン, 10 µg/mL ロイペプチン) を添加し、氷上で15分溶解したうえで4、15,000 rpmにて15分間の遠心分離を行い、調製した。

40

【0130】

細胞膜と細胞質の分画は、トライデント膜タンパク質抽出キット (Genetex, Irvine, CA) を用い、添付のプロトコルに従って実施した。細胞膜分画のペレットは前記バッファーにて全細胞溶解同様に溶解した。なお、細胞質分画は、前記キット添付のBuffer Aに溶解された状態でサンプリングした。

【0131】

50

（ウエスタンブロット）

前記各タンパク質溶解液を、等量の2×Laemmliサンプルバッファーと混和し、100 で5分間反応させ、ウエスタンブロットに供するサンプルを調製した。電気泳動のゲルには12.5% PAGE L (ATTO, Tokyo, Japan)を用いた。ブロッティング後のブロッキングは5% スキムミルク (Meiji, Tokyo, Japan)を用いて行なった。検出試薬にはウエスタンライトニングプラスECL (Perkin Elmer, Waltham, MA)を用いた。

【0132】

（蛍光顕微鏡観察）

蛍光顕微鏡観察は、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-8100又はBZ-X800（共に、KEYENCE, Osaka, Japan）を用いて行なった。核染色はHoechst 33258 (Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いて行なった。

【0133】

（qRT-PCR）

細胞からのmRNA抽出には、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific)を用い、cDNA合成にはSuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を用いて各々行なった。なお、逆転写反応は、250ngのtotal RNAを用いて実施した。qRT-PCRは、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Basel, Switzerland)及びLightcycler 480 (Roche)にて行い、解析した。なお、qRT-PCRに用いたプライマーの配列 (Sigma Aldrichより購入)を表4に示す。

【0134】

【表4】

qRT-PCR 用プライマー

プライマー名	配列	配列番号:
GAPDH F	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	41
GAPDH R	CAGAGTTAAAGCAGCCCTGGT	42
hLI-2 RT-F	CCAGGATGCTCACATTAAAGTTTTAC	43
hIL-2 RT-R	GCACTTCCTCCAGAGGTTTGAG	44

【0135】

（表面抗原解析）

表面抗原解析は、FACS Calibur及びFACS Arian (BD Bioscience)を用いたフローサイトメトリーにより行なった。なお、その際のブロッキングには、1% マウスIgG1アイソタイプコントロールを用いた。蛍光標識には、PE標識抗ヒトCD69抗体を30倍希釈して、PerCP/Cy5.5標識抗ヒトHER2抗体を50倍希釈して、APC標識マウス抗ヒトCD19抗体を20倍希釈して、用いた。得られたデータはFlowJo software (BD Bioscience)を用いて解析した。

【0136】

（実施例1）

図1及び2に示したコンセプトの有効性を検証するため、従来用いられているanti-CD19 CARの配列を基に、HIVPR標的配列 (cleavage site; CS)を組み込み、CD3 zetaの代わりに蛍光タンパク質 mCherryを組み込ん

だCAR (anti-CD19-CD28-CS-mCherry CAR、図3 参照) をコードするベクターを作成した。なお、HIVPR標的配列として、HIV1の配列においてトランスフレーム(TF)タンパク質とプロテアーゼ(PR)タンパク質とに挟まれた8アミノ酸(Ser-Phe-Ser-Phe-Pro-Gln-Ile-Thr、配列番号:9)を用いた。

【0137】

そして、このベクターを293T細胞に導入し、anti-CD19-CD28-CS-mCherry CAR(以下「anti-CD19-mCherry CAR」とも称する)を過剰発現させた。その結果、図4に示すとおり、mCherryシグナルが細胞質に局在することを確認した。

10

【0138】

次に、前記293T細胞を、CD19を発現していない骨髓系腫瘍由来細胞株K562細胞と共培養した。その結果、図5に示すとおり、前述の293T細胞の単培養と比して、mCherryシグナルの局在に変化がみられなかった。一方、CD19陽性細胞であるパーキットリンパ腫由来細胞株Raji細胞との共培養においてはmCherryシグナルの集積が認められた(図5 参照)。これらのことから、anti-CD19-mCherry CARは、標的分子であるCD19を認識して細胞膜上に集合し得ることが示唆された。

【0139】

次に、図9に示すanti-CD19-CD28-HIVPR CAR(以下「CD28-HIVPR CAR」とも称する)をコードするベクターも、前記293T細胞に遺伝子導入し、当該細胞においてanti-CD19-mCherry CAR及びCD28-HIVPR CARを共発現させた。その結果、図6に示すとおり、mCherryシグナルの局在が細胞膜から細胞質に変化した。すなわち、図1及び2に示したコンセプトとは異なり、標的細胞(図2においては正常細胞)非存在下でも、CD28-HIVPR CAR中のプロテアーゼが活性化されてしまい、anti-CD19-mCherry CAR中の切断が生じ、mCherryが細胞質中に遊離してしまったことが示唆される。

20

【0140】

また、細胞膜と細胞質を分画したうえでウエスタンブロットを行なった結果、図7に示すとおり、anti-CD19-mCherry CARを単独で発現させたサンプルにおいては、細胞膜画分にて当該CARの全長(約70kDa)が検出された。一方、CD28-HIVPR CARと共発現させた場合には、前記図6に示した結果同様に、予想とは異なり、細胞質画分にてmCherryのみの分子量に相当する約30kDaのバンドを細胞質が検出された。さらに、細胞膜画分においてはanti-CD19-scFvからCD28までの分子量に相当する約40kDaのバンドが検出された(図7 参照)。

30

【0141】

さらに、HIVPR阻害剤であるサキナビル又はネルフィナビルを、anti-CD19-mCherry CAR及びCD28-HIVPR CARを共発現させた293T細胞に添加した結果、図8に示すとおり、HIVPR阻害剤用量依存的に、anti-CD19-mCherry CARの全長を示すバンド(約70kDa)が増加する一方で、mCherryのみを示すバンド(約40kDa)は減少した。

40

【0142】

以上の結果から、上述のとおり、図1及び2に示したコンセプトとは異なるものの、細胞膜に係留されたanti-CD19-mCherry CAR(anti-CD19-CD28-CS-mCherry CAR)の目的ドメイン(ここではmCherry)を、標的抗原非依存的に生じた反応とはいえ、少なくとも、HIVPRによる認識配列切断によって細胞質に切り離すことができることは示された。

【0143】

(実施例2)

前述のとおり、anti-CD19-CD28-HIVPR CAR(CD28-HI

50

VPR CAR)を用いた場合には、標的細胞非存在下でも、標的抗原非依存的に HIVPRによって、anti-CD19-CD28-CS-mCherry CAR(anti-CD19-mCherry CAR)中の認識配列(CS)が切断されてしまうことが明らかになった。そこで、かかる標的抗原非依存的なプロテアーゼによる切断を抑えるため、以下に示すとおり、CD28-HIVPR CARの配列について、更なる検討を行なった。

【0144】

HIVPRは二量体で働くプロテアーゼであり、Whisker配列と呼ばれる、そのN末端の4アミノ酸(Pro-Gln-Ile-Thr)は、当該自己二量体化に寄与することが報告されている(Dayer MR.ら、J Biomed Sci. 2013 Sep 12; 20: 67 参照)。

10

【0145】

一方、図1及び2に示すコンセプトにおいては、抗原認識に依存しない、Whisker配列による自己二量体化は生じないことは望ましい。また、当該配列は、プロテアーゼ活性自体には必須とされていない。そこで、このWhisker配列が上述の標的抗原非依存的切断の要因になり得ると考え、CD28-HIVPR CAR(anti-CD19-CD28-HIVPR CAR)から、Whisker配列である4アミノ酸を除去したCAR(anti-CD19-CD28-HIVPR 4 CAR)を想到し、当該CAR(以下「CD28-HIVPR 4 CAR」とも称する)をコードするベクター(pcdNA3-anti-CD19 scFv-CD28-HIVPR(4)ベクター)を作成した。

20

【0146】

また、図7に示したウエスタンブロットによる解析結果にて、CD28-HIVPR CARを過剰発現させたにも関わらず、そのN末端を認識する抗Myctag抗体によって、当該CARの全長に由来するバンド(約50kDa)は検出されなかった。このことから、CD28-HIVPR CARにおいて、HIVPRによる配列内での自己切断が生じている可能性が示唆された。そして、この切断によって当該CARより遊離したHIVPRが、anti-CD19-mCherry CAR中の認識配列を、標的抗原非依存的に切断してしまっていることが想定される。

【0147】

30

そこで、ペプチドデータベース(MEROPS、<https://www.ebi.ac.uk/merops/>)を検索した結果、CD28の細胞内ドメイン内にHIVPRが属するアスパラギン酸プロテアーゼの切断候補となる配列が存在することが明らかになった。そのため、前記自己切断は、当該配列によって生じていること、及びCD28内の前記配列をHIVPRが切断することによって、細胞膜にHIVPRを係留できていないことも想定される。

【0148】

一方、CD28の細胞内ドメインはCD28-HIVPR CARの活性には不要であると考え、anti-CD19-CD28-HIVPR 4 CAR(CD28-HIVPR 4 CAR)から、CD28の細胞内ドメインを除去したCAR(anti-CD19-CD28 ICD-HIVPR 4 CAR)を想到し、当該CAR(以下「CD28 ICD-HIVPR 4 CAR」又は「anti-CD19-Scissors-CAR」とも称する)をコードするベクター(pcdNA3-anti-CD19 scFv-CD28(ICD)-HIVPR(4)ベクター)を作成した。

40

【0149】

そして、このようにして作成した各ベクターを293T細胞に遺伝子導入し、CD28-HIVPR CAR、CD28-HIVPR 4 CAR及びCD28 ICD-HIVPR 4 CARを各々過剰発現させ、ウエスタンブロットにより解析した。その結果、図10に示すとおり、CD28 ICD-HIVPR 4 CARを過剰発現したサンプルにおいてのみ、完全長のバンドが検出された。

50

さらに、図 9 に示す 3 種の切断用 C A R の細胞内局在を評価するため、C 末端に Y F P を融合させた態様にて各切断用 C A R を、2 9 3 T 細胞において発現させ、蛍光顕微鏡にて観察・解析した。その結果、図 1 1 に示すとおり、C D 2 8 - H I V P R C A R と Y F P との融合タンパク質を発現した細胞では、細胞膜への局在は認められなかった。一方、図 1 2 に示すとおり、C D 2 8 - H I V P R 4 C A R と Y F P との融合タンパク質を発現した細胞においては、一部細胞質内にシグナルを認めたものの、細胞膜に局在する傾向を示された。さらに、図 1 3 に示すとおり、C D 2 8 I C D - H I V P R 4 C A R と Y F P との融合タンパク質を発現した細胞においては、細胞質に Y F P 由来の蛍光シグナルは検出されず、完全な細胞膜への局在が認められた。

以上のことから、上述の想定のとおり、C D 2 8 の細胞内ドメイン及び H I V P R の N 末側の配列に存在する認識配列が、H I V P R による自己切断をうけていることが示唆される。また、これら認識配列を除去することにより、切断用 C A R を細胞膜に係留することに成功した。

【 0 1 5 0 】

(実施例 3)

図 1 及び 2 に示すとおり、プロテアーゼを有する切断用 C A R が標的細胞を認識した際に、活性化用 C A R 中において、プロテアーゼ認識配列における切断が特異的に誘導されるかについて、H I V P R による切断部位を有さない C D 2 8 I C D - H I V P R 4 C A R を用い、検証した。

【 0 1 5 1 】

具体的には、2 9 3 T 細胞に、a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R をコードするベクターと、C D 2 8 I C D - H I V P R 4 C A R をコードするベクターとを遺伝子導入し、蛍光顕微鏡にて m C h e r r y シグナルを検出した。

【 0 1 5 2 】

その結果、図 1 4 に示すとおり、標的細胞非存在下では、a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R 中のプロテアーゼ認識配列は切断されることなく、m C h e r r y が細胞膜に局在していることが認められた。すなわち、標的抗原非依存的な切断は生じていないことが明らかになった。

【 0 1 5 3 】

一方、a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R 及び C D 2 8 I C D - H I V P R 4 C A R を共発現させた 2 9 3 T 細胞と、その標的細胞である R a j i 細胞とを共培養し、ウエスタンブロットにより分析した結果、図 1 5 に示すとおり、a n t i - C D 1 9 - m C h e r r y C A R から遊離した m C h e r r y を検出することができた。

【 0 1 5 4 】

したがって、図 1 及び 2 に示したコンセプトのとおり、切断用 C A R (上述の C D 2 8 I C D - H I V P R 4 C A R に相当) がその標的抗原を認識した場合のみ、当該 C A R 中のプロテアーゼ (上述の H I V P R 4) が活性化され、当該活性化されたプロテアーゼにより活性化用 C A R が切断されることにより、シグナル伝達因子 (上述の m C h e r r y に相当) が細胞質中に遊離されることが明らかになった。

【 0 1 5 5 】

(実施例 4)

実施例 3 に示すとおり、C D 1 9 のみを標的抗原とする 1 抗原認識系 (シングルアーム系) において、切断用 C A R による活性化用 C A R の切断が、標的細胞における前記抗原を認識することによって生じることが認められた。

【 0 1 5 6 】

次に、標的抗原を 2 種類とした場合 (2 抗原認識系、ダブルアーム系) においても、標的細胞依存的な切断用 C A R による切断が生じることを、C D 1 9 を強制発現させた S K - B R - 3 細胞 (標的細胞) と、a n t i - H E R 2 (4 D 5 - 3) - C D 2 8 - C S - m C h e r r y C A R (以下「a n t i - H E R 2 - m C h e r r y C A R」とも称する) 及び C D 2 8 I C D - H I V P R 4 C A R (a n t i - C D 1 9 - S c i s s

10

20

30

40

50

ors - CAR) を共発現させた 293T 細胞とを用い、確認した。

【0157】

より具体的には、生来 HER2 を発現している SK-BR-3 細胞 (図 16 の「SK-BR-3 / empty 参照のほど) に、CD19 発現ベクターを導入することにより、2 種の抗原 (HER2 及び CD19) を発現する改変 SK-BR-3 細胞を、標的細胞として樹立した (図 16 の「SK-BR-3 / CD19」 参照のほど)。

【0158】

また、293T 細胞に、pcDNA3 - anti - HER2 (4D5 - 3) - CD28 - CS - mCherry ベクター及び pcDNA3 - anti - CD19 - CD28 (ICD) - HIVPR (4) ベクターを、重量比にて 5 : 1 になるよう遺伝子導入し、anti - HER2 - mCherry CAR 及び anti - CD19 - Scissors - CAR を共発現する T 細胞を調製した。

10

【0159】

そして、当該 T 細胞を SK-BR-3 細胞と共培養をしたところ、図 17 に示すとおり、細胞質内の mCherry シグナルは認められなかった (図 17 の「SK-BR-3 / empty」 参照のほど)。一方、前記 T 細胞を前記改変 T 細胞と共培養した結果、mCherry シグナルの細胞質内への移行が認められた (図 17 の「SK-BR-3 / CD19」 参照のほど)。

【0160】

以上の結果により、図 1 及び 2 に示すように、標的細胞中の 2 抗原 (ここでは、CD19 及び HER2) を、切断用 CAR (ここでは、anti - CD19 - Scissors - CAR) 及び活性化用 CAR (ここでは、anti - HER2 - mCherry CAR) が各々認識した場合に、切断用 CAR による標的細胞特異的な活性化用 CAR の切断を誘導できることが確認された。

20

【0161】

(実施例 5)

図 2 に示すネガティブシステムが機能することを実証するに際し、先ず、本願発明にかかる活性化用 CAR によって、標的細胞特異的な T 細胞の活性化を誘導できることを確認した。

【0162】

30

具体的には先ず、活性化用 CAR 発現ベクターとして、共刺激分子である CD28 と CD3 - zeta に HIVPR 認識配列を介在した anti - CD19 Effector CAR - T2A - YFP 発現ベクターを作成した (図 18 参照のほど)。なお、ここではチサゲンレクル (キムリア (登録商標)、ノバルティス社製) 等の実臨床でも使用されている CD3 - zeta を用いたネガティブ・システムを評価するため、前記ベクターを作成した。また、図 18 に示すとおり、当該ベクターにおいては、蛍光タンパク質発現により活性化用 CAR の発現を追跡するため、anti - CD19 Effector CAR 下流には T2A 配列を介在し YFP 遺伝子が組み込んである。

【0163】

そして、anti - CD19 Effector CAR - T2A - YFP 発現ベクターを Jurkat 細胞に遺伝子導入し、K562 細胞 (CD19 陰性細胞) 又は Raji 細胞 (CD19 陽性細胞) との共培養を実施した。その結果、図 19 に示すとおり、YFP を発現する CAR 陽性 Jurkat 細胞において、CD19 陽性の Raji 細胞特異的に T 細胞活性化マーカーである CD69 の発現誘導が確認された。また、図 20 に示すとおり、CAR 陽性 Jurkat 細胞を単離して遺伝子発現解析を実施したところ、Raji との共培養にて IL - 2 mRNA の発現誘導が認められた。

40

【0164】

さらにまた、anti - CD19 Effector CAR - T2A - YFP 発現ベクターに組み込まれた G418 薬剤耐性遺伝子を利用し、G418 での薬剤選択によって anti - CD19 Effector CAR - T2A - YFP を安定的に発現する Jur

50

k a t細胞（以下、「a n t i - C D 1 9 E f f e c t o r / J u r k a t細胞」とも称する）を樹立した。そして、この細胞においても、図 2 1 に示すとおり、R a j i 細胞又はC D 1 9 を遺伝子を導入した前記改変S K - B R - 3 細胞との共培養によって、C D 6 9 発現で示される同細胞の活性化が誘導されることが確認された。

【0 1 6 5】

以上のとおり、H I V P R 認識配列が介在してある活性化用C A Rによっても、標的細胞特異的なT細胞活性化が誘導できることが確認された。

【0 1 6 6】

（実施例 6）

図 2 に示すネガティブシステムが機能することを実証するため、実施例 5 において調製したa n t i - C D 1 9 E f f e c t o r / J u r k a t細胞に、a n t i - H E R 2（4 D 5 - 3）- S c i s s o r s - C A R - T 2 A - m C h e r r y 発現ベクターを遺伝子導入した。そして、当該ベクターに組み込まれているH y g r o m y c i n 耐性遺伝子を利用し、G 4 1 8 とH y g r o m y c i n の双方による薬剤選択を行うことでa n t i - C D 1 9 E f f e c t o r C A R 及びa n t i - H E R 2（4 D 5 - 3）- S c i s s o r s - C A R の双方を安定的に発現するJ u r k a t細胞（以下、「a n t i - C D 1 9 E f f e c t o r C A R + a n t i - H E R 2（4 D 5 - 3）S c i s s o r s / J u r k a t細胞」とも称する）を樹立した（図 2 2 参照）。

また、a n t i - H E R 2（4 D 5 - 3）- S c i s s o r s - C A R - T 2 A - m C h e r r y 発現ベクターの代わりに、a n t i - H E R 2（4 D 5 - 8）- S c i s s o r s - C A R - T 2 A - m C h e r r y 発現ベクターを、a n t i - C D 1 9 E f f e c t o r / J u r k a t細胞に遺伝子導入し、a n t i - C D 1 9 E f f e c t o r C A R 及びa n t i - H E R 2（4 D 5 - 8）- S c i s s o r s - C A R の双方を安定的に発現するJ u r k a t細胞（以下、「a n t i - C D 1 9 E f f e c t o r C A R + a n t i - H E R 2（4 D 5 - 8）S c i s s o r s / J u r k a t細胞」とも称する）も樹立した（図 2 2 参照）。

【0 1 6 7】

そして、これらC A R 発現J u r k a t細胞を、R a j i 細胞、S K - B R - 3 細胞又は前記改変S K - B R - 3 細胞と共培養し、早期活性化のマーカーであるC D 6 9 の発現量を指標として、T細胞の活性化について解析した。

その結果、図 2 3 及び 2 4 に示すとおり、R a j i 細胞（C D 1 9 陽性 / H E R 2 陰性）に対しては切断用C A Rの有無にかかわらずC A R 発現J u r k a t細胞はほぼ同等の活性化を示した。一方、改変S K - B R - 3 細胞（C D 1 9 陽性 / H E R 2 陽性）に対してはa n t i - H E R 2（4 D 5 - 3）- S c i s s o r s - C A R を発現する群において活性化の減弱が認められた。さらに、図 2 4 に示すとおり、a n t i - H E R 2（4 D 5 - 3）s c F v よりも親和性の高いs c F v であるa n t i - H E R 2（4 D 5 - 8）s c F v を発現させた細胞においては、より効率的な活性化の減弱が認められた。

【0 1 6 8】

以上のとおり、切断用C A R は、標的細胞の表面抗原の発現パターン依存的に活性化用C A R によるT細胞の活性化を調節できることが、確認された。また、表面抗原に対して親和性の高い切断用C A R は、より効率的に活性化用C A R の活性化を減弱できることも、実証された。

【産業上の利用可能性】

【0 1 6 9】

以上説明したように、本発明によれば、2 種類のC A R（切断用C A R 及び活性化用C A R）が2つの抗原を各々認識することにより、これらC A R を発現する細胞によって、正常細胞への細胞障害等を抑えつつ、標的細胞に細胞障害等をもたらすことが可能となる。さらに、切断用C A R が有するプロテアーゼに対する阻害剤を用いることにより、活性化用C A R の活性化を抑制することによって、前記C A R を発現する細胞の活性の強さ、その持続性を制御することも可能となる。

10

20

30

40

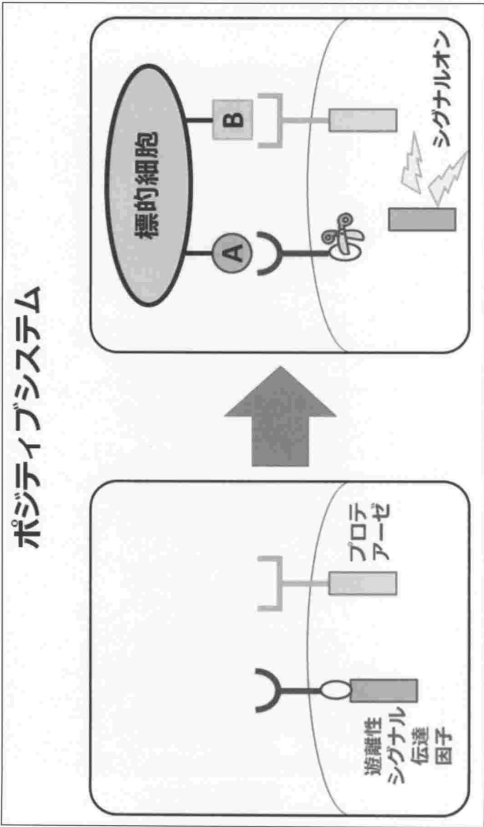
50

【 0 1 7 0 】

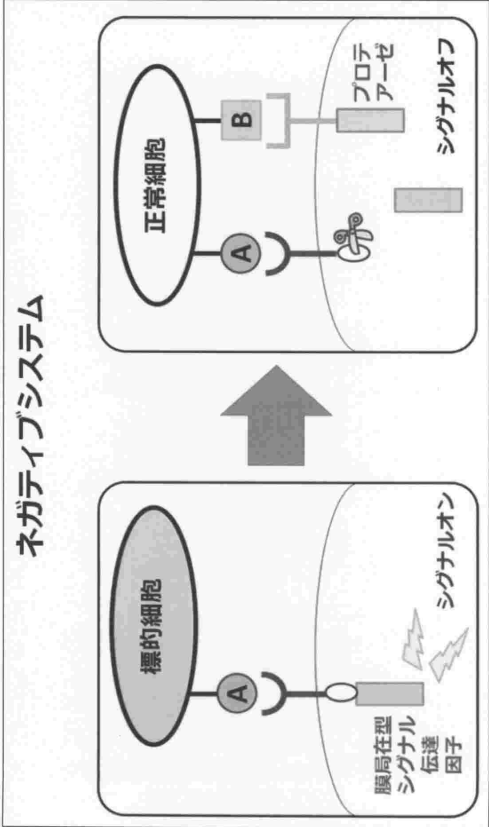
したがって、本発明のCARは、副作用少なく、また過剰に活性化されたT細胞によって生じる有害事象（高サイトカイン血症等）も制御しながら、がん等の疾患を治療又は予防することが可能となるため、がん免疫療法等において有用である。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

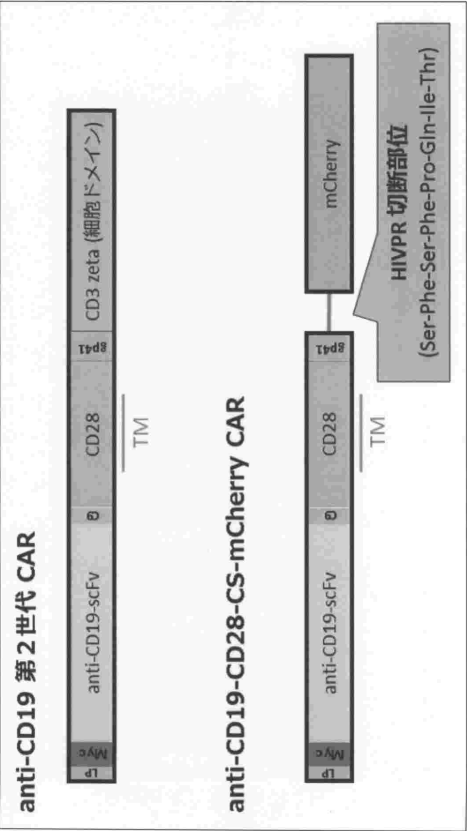
20

30

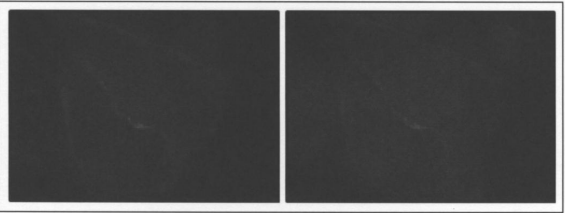
40

50

【 図 3 】



【 図 4 】



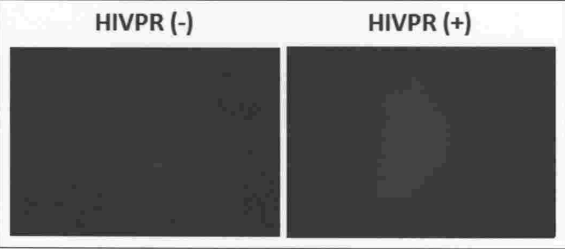
10

20

【 図 5 】



【 図 6 】

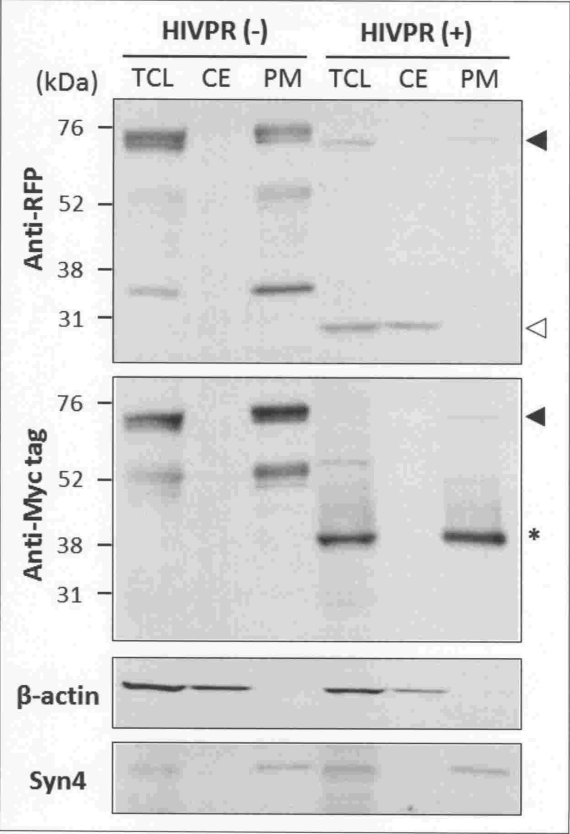


30

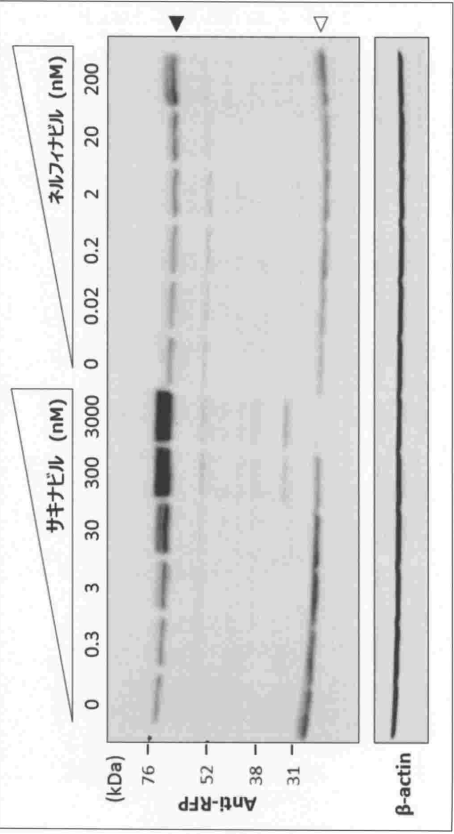
40

50

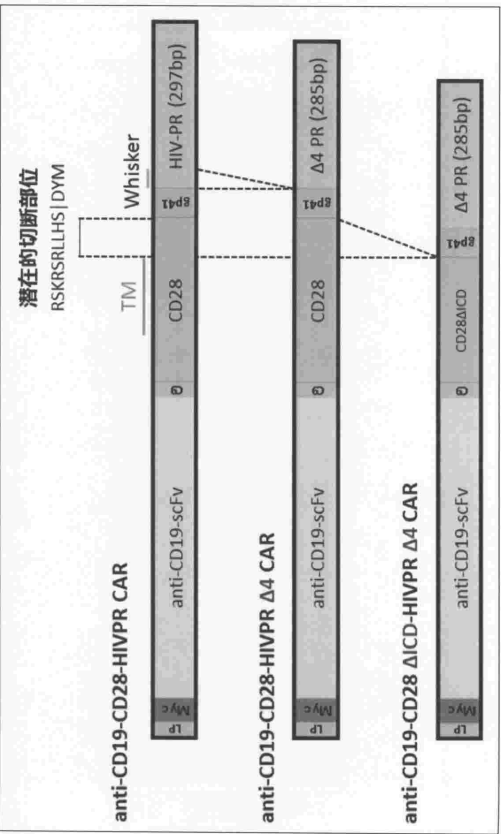
【 図 7 】



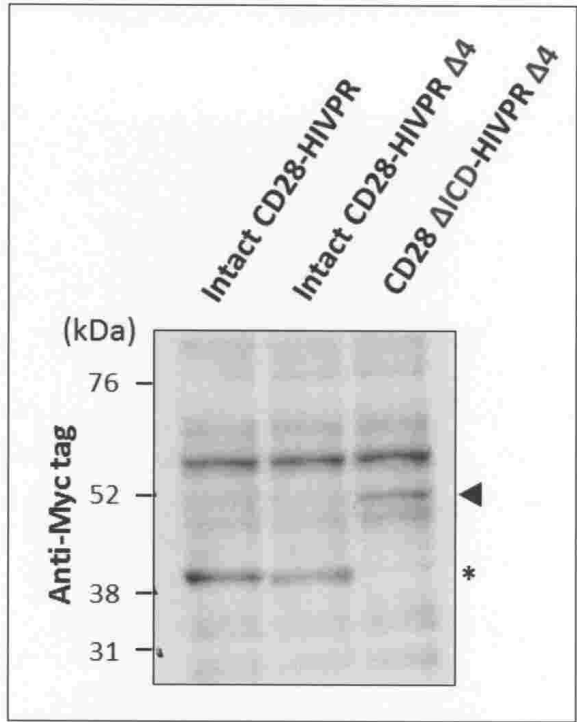
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



10

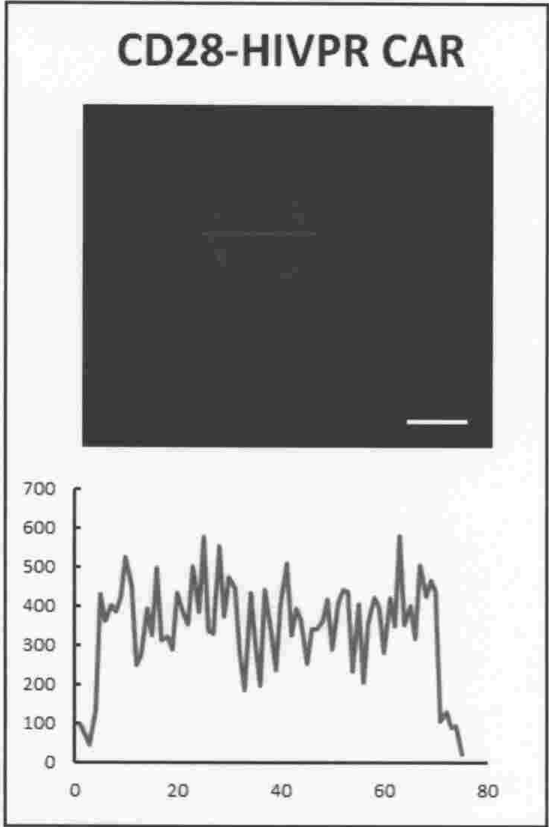
20

30

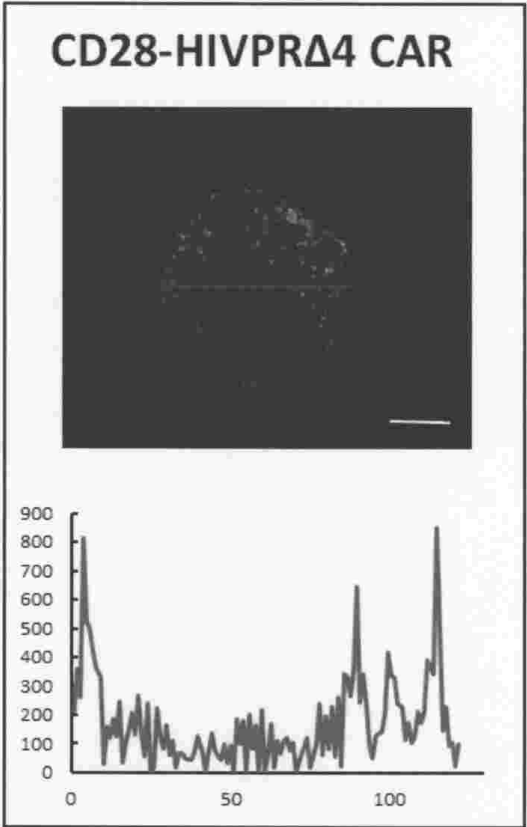
40

50

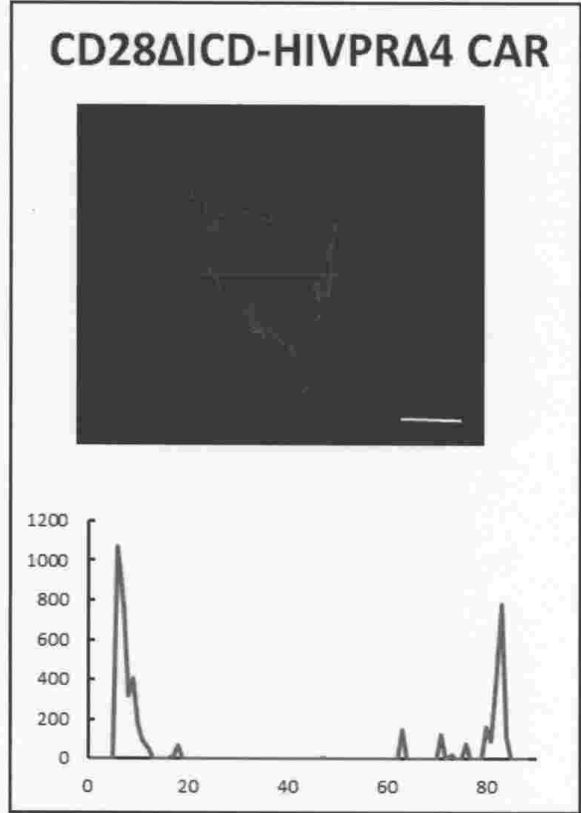
【図 1 1】



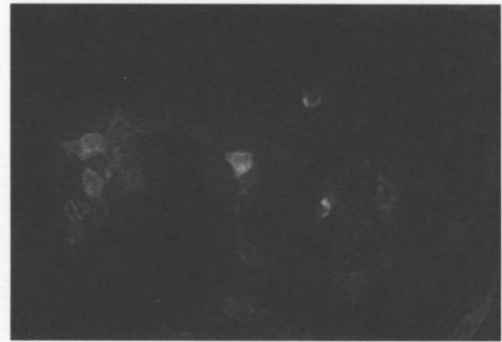
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

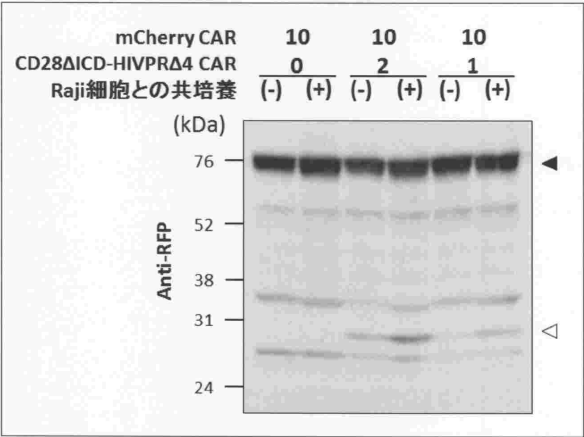
20

30

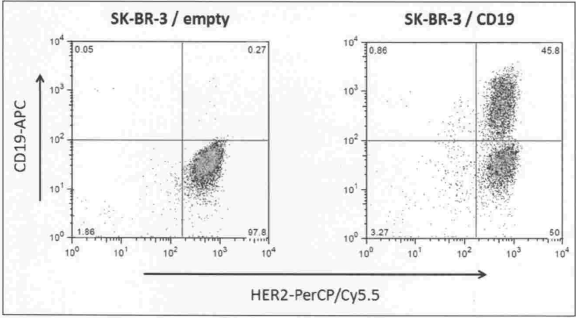
40

50

【 図 1 5 】

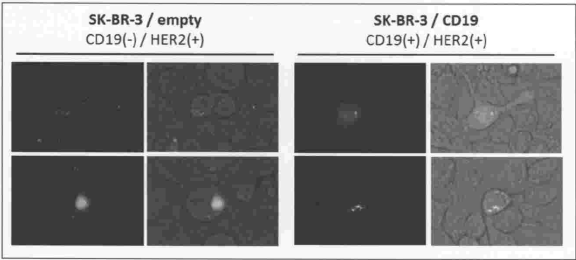


【 図 1 6 】

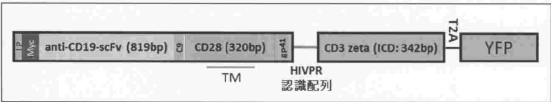


10

【 図 1 7 】

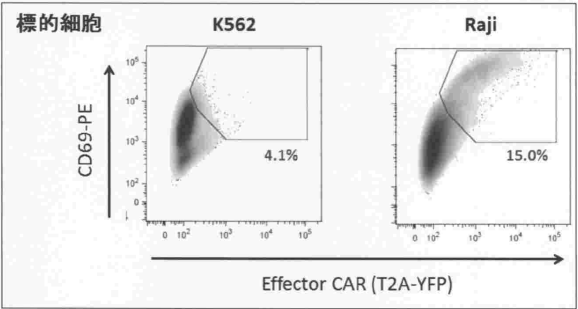


【 図 1 8 】

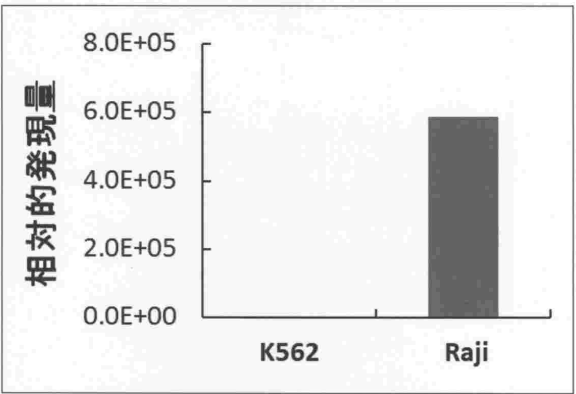


20

【 図 1 9 】



【 図 2 0 】

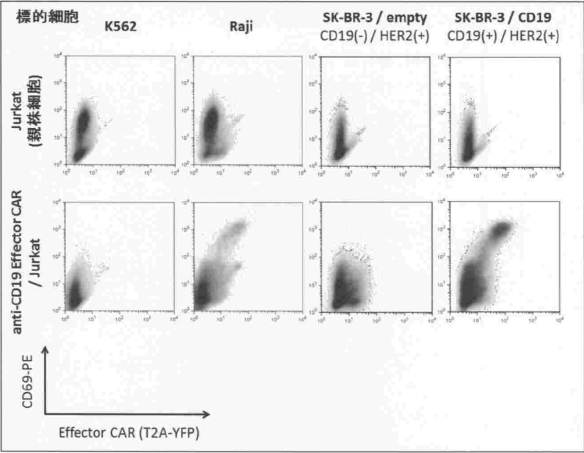


30

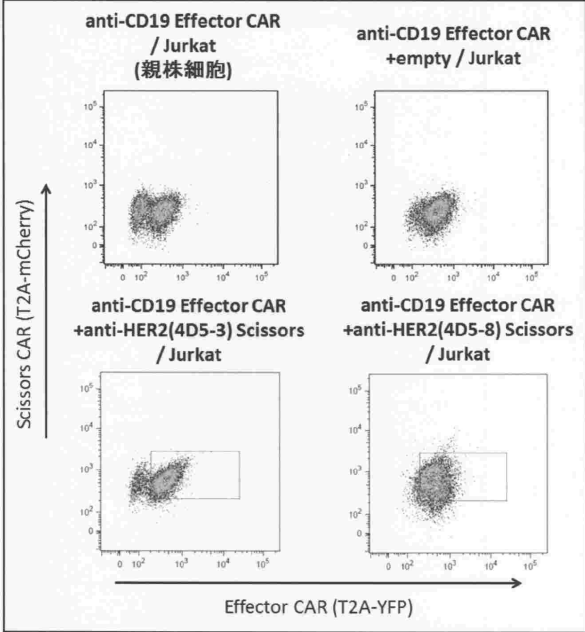
40

50

【図 2 1】



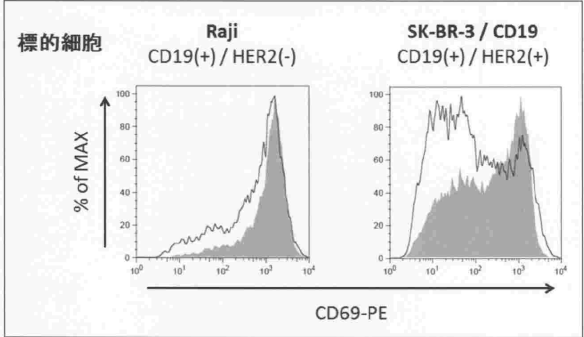
【図 2 2】



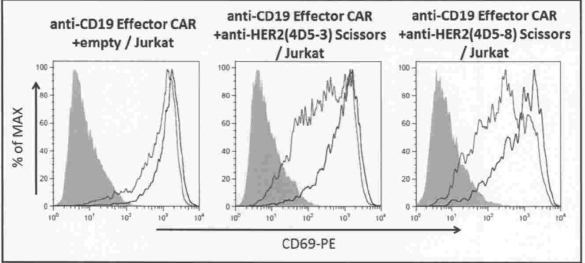
10

20

【図 2 3】



【図 2 4】



30

【配列表】

0007684691000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/62	(2006.01)	F I		
			C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z

(56)参考文献

特表 2 0 1 7 - 5 0 4 6 0 1 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 8 / 1 8 1 2 0 7 (W O , A 1)
DAYER, MR et al. , Whiskers-less HIV-protease: a possible way for HIV-1 deactivation , Journal of Biomedical Science , 2013年 , Vol. 20, No. 67 , pp. 1-8

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K
C 1 2 N
A 6 1 K
A 6 1 P
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)