

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7642236号
(P7642236)

(45)発行日 令和7年3月10日(2025.3.10)

(24)登録日 令和7年2月28日(2025.2.28)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/115 (2010.01)	C 1 2 N	15/115
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00
		1 0 7	
		請求項の数 19 (全31頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2021-504450(P2021-504450)	(73)特許権者	522035443
(86)(22)出願日	令和1年7月26日(2019.7.26)		イグザカ フランス
(65)公表番号	特表2021-532745(P2021-532745 A)		フランス国 9 4 8 0 0 ビルジュイフ, メール・ドゥ・プロフェスール・ジョー ジス・マテ 1
(43)公表日	令和3年12月2日(2021.12.2)	(74)代理人	100118902
(86)国際出願番号	PCT/IB2019/000890		弁理士 山本 修
(87)国際公開番号	WO2020/021338	(74)代理人	100106208
(87)国際公開日	令和2年1月30日(2020.1.30)		弁理士 宮前 徹
審査請求日	令和4年7月26日(2022.7.26)	(74)代理人	100196508
(31)優先権主張番号	62/879,401		弁理士 松尾 淳一
(32)優先日	令和1年7月26日(2019.7.26)	(74)代理人	100157923
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 鶴喰 寿孝
(31)優先権主張番号	62/703,869	(72)発明者	ミョデク, アナ
(32)優先日	平成30年7月26日(2018.7.26)		フランス国 9 1 4 0 0 オルセー, リュ
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 アプタマーベースのCAR T細胞スイッチ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

キメラ抗原受容体（CAR）を標的に結合するためのアプタマーブリッジであって、1つ以上のCAR結合アプタマーおよび1つ以上の標的結合アプタマーを含むブリッジで、前記1つ以上のCAR結合アプタマーが1つ以上のリンカーによって前記標的結合アプタマーに接続され、前記1つ以上のCAR結合アプタマーのうちの少なくとも1つが前記CARの細胞外ドメインに結合しており、免疫細胞上に発現されるCARへのブリッジのCAR結合アプタマーの結合が、免疫細胞を活性化する、そして、前記CAR細胞外ドメインが特異的にペプチドネオエピトープ（PNE）を結合することができる、前記アプタマーブリッジ。

【請求項2】

前記リンカーが、共有結合、一本鎖核酸、二本鎖核酸、ペプチド、ポリペプチド、オリゴ糖、多糖、合成ポリマー、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、トリアゾール、ナノ粒子、ミセル、リポソーム、細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択されるリンカー部分を含むか、またはからなる、請求項1に記載のアプタマーブリッジ。

【請求項3】

ペプチドまたはポリペプチドを含有しない、請求項1または2に記載のアプタマーブリッジ。

【請求項4】

(i) 前記リンカー部分がDNA、RNA、およびXNAから選択される一本鎖または

二本鎖核酸を含む、または

(i i) 前記リンカー部分がグルカン、デキストラン、グリコーゲン、デンプン、およびそれらの誘導体からなる群から選択される多糖である、または

(i i i) 前記リンカー部分がポリ(アミドアミン)(PAMAM)およびポリ(βアミノエステル)(PBAE)から選択される合成ポリマーである、

請求項2に記載のアプタマーブリッジ。

【請求項5】

前記CAR細胞外ドメインが免疫グロブリンポリペプチドまたはそのフラグメントを含み、前記1つ以上のCAR結合アプタマーが、該免疫グロブリンポリペプチドまたはそのフラグメントに結合するアプタマーを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のアプタマーブリッジ。

10

【請求項6】

(i) 前記PNEがヒトプロテオームに見つからないアミノ酸配列を有する、または

(i i) 前記PNEが、配列番号1～7からなる群より選択される、

請求項1に記載のアプタマーブリッジ。

【請求項7】

少なくとも1つの標的結合アプタマーが、CD19、CD20、CD22、CD123、BCMA、NY-ESO-1、メソセリン、PSA、PSMA、MART-1、MART-2、Gp100、チロシナーゼ、p53、ras、MUC1、SAP-1、サバイビン、CEA、Ep-CAM、Her2、EGFRvIII、BRCA1/2、CD70、CD73、および変異SODからなる群から選択された標的に結合する、請求項1～6のいずれか一項に記載のアプタマーブリッジ。

20

【請求項8】

2つ以上の同一または非同一のCAR結合アプタマーを含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のアプタマーブリッジ。

【請求項9】

2つ以上の同一または非同一の標的結合アプタマーを含む、請求項8に記載のアプタマーブリッジ。

【請求項10】

(i) 環状、星形、デンドリマー、線形、分岐、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される分子形態を含む、および／または

30

(i i) CAR結合アプタマーの1つ以上と70～200オングストロームの範囲内の1つ以上の標的結合アプタマーとの間に距離を有する、および／または

(i i i) T細胞、NK細胞、B細胞、またはマクロファージにおいて発現する場合に、前記CARに結合する、および／または

(i v) 1つ以上のCAR結合アプタマーおよび1つ以上の標的結合アプタマーがそれぞれ10nM未満、1nM未満、100pM未満または10pM未満の結合親和性を有する、

請求項1～9のいずれか一項に記載のアプタマーブリッジ。

【請求項11】

40

前記(i i i)において、前記CARに結合した際に、前記T細胞、NK細胞、B細胞、またはマクロファージを活性化する、請求項10に記載のアプタマーブリッジ。

【請求項12】

請求項1～11のいずれか一項に記載のアプタマーブリッジと、前記CARを発現する免疫細胞を含む、免疫療法のためのシステム。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項に記載のアプタマーブリッジと、前記CARをコードするウイルスベクターを含む、対象に免疫療法を提供するためのキット。

【請求項14】

ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項13に記載のキット。

50

【請求項 15】

さらに前記 C A R 結合アプタマーまたはその一部の相補配列を有するアプタマーを含む、請求項 13 または 14 に記載のキット。

【請求項 16】

(i) 生体内または 生体外の免疫細胞における発現のための C A R をコードするウイルスベクターと、(ii) 前記 C A R に高い親和性結合が可能なアプタマーを含む、対象に免疫療法を提供するためのキット。

【請求項 17】

ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

請求項 1 ～請求項 12 のいずれか一項に記載のアプタマーブリッジと、前記ブリッジの C A R 結合アプタマーと同じ C A R に結合するが、前記ブリッジによって結合される前記標的とは結合しない、標識および／または非標識 C A R 結合アプタマーを含むキット。

【請求項 19】

請求項 1 ～12 のいずれか一項に記載のアプタマーブリッジと、前記ブリッジの標的結合アプタマーと同じ標的に結合するが、前記ブリッジによって結合された C A R には結合しない、標識および／または非標識の標的結合アプタマーを含むキット。

【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 (C A R) 関連免疫療法の使用の制御を強化するアプタマーベースのスイッチ技術に関する。

【背景技術】

【0002】

キメラ抗原受容体 (C A R) は、一本鎖可変ドメイン (s c F v) 抗体を利用して、患者の T 細胞にがん細胞を認識して殺す能力を与える。しかし、初期の成功した適用にもかかわらず、C A R T 細胞の使用は、i n v i v o での免疫応答の制御が困難であるため複雑であり、サイトカインの有害な過剰放出や望ましくない毒性をもたらし得る。さらに、オフターゲット反応が発生する可能性があり、腫瘍による抗原の逃避により、抗原特異性が変更された次のラウンドの C A R T 細胞療法が必要になる可能性がある。したがって、相互作用を強化して特異性を高め、C A R を新しい抗原にリダイレクトするか、C A R T 細胞療法を阻害または終了するための「オフ」または「キル」スイッチを開発する戦略を開発する必要がある。

【0003】

C A R T 細胞と標的細胞との間の相互作用を媒介する適応性のある分子スイッチの患者への投与を可能にする、切り替え可能な C A R T 細胞アプローチが開発された。スイッチがない場合、C A R を媒介した免疫反応は起こらない。たとえば、キルスイッチを使用して C A R T 細胞を排除し、毒性を防ぐことができる (Straathof et al., Di Stasi et al.)。別のアプローチは、小分子スイッチの存在下で結合させるスプリットキメラ受容体を利用する (Wu et al.)。C A R と標的間の相互作用を媒介する抗体ベースのスイッチも開発されている (Tamada et al., Urbanska et al. (2012a), Urbanska et al. (2012b))。抗体スイッチ技術の変形では、標的抗原の抗体は、C A R の s c F v 部分に結合するペプチドネオエピトープ (P N E) と統合することができる (Rodgers et al.)。P N E は内因性エピトープとは異なり、単一の P N E と抗 P N E C A R を異なる標的抗原の抗体と組み合わせることにより、新しいスイッチを設計できるモジュラースイッチアプローチを可能にする。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、このアプローチでは依然として抗体分子の複雑なエンジニアリングが必要であ

10

20

30

40

50

り、特に s c F v が完全にヒト化されていない場合は、スイッチに対する免疫反応の可能性が生じる。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本技術は、キメラ抗原受容体 (C A R) 関連の免疫療法を実施する際に高度な制御を生み出すアプタマーベースのスイッチ技術を提供する。本技術のアプタマーベースのスイッチ、すなわちアプタマブリッジは、その最も基本的なレベルで、リンカーを介して C A R 結合アプタマーに結合された標的結合アプタマーを含有する合成ブリッジ分子を利用する。C A R と対応するアプタマブリッジを含有するシステムは、免疫療法プラットフォームを提供する。該プラットフォームは、(i) ブリッジの標的結合アプタマーを選択することで任意の所望する抗原を標的にすることができ、(i i) 標的結合アプタマーを変更することで1つの標的から別の標的へリダイレクトでき、(i i i) ブリッジの投与プロトコルを変更することにより、時間の経過とともに変化する個々の患者のニーズにしたがって投薬することができ、(i v) すばやくまたは徐々にオンまたはオフに切り替えることができ、(v) 特定の C A R 療法のコンパニオン診断として使用でき、(v i) i n v i v o (生体内) または e x v i v o (生体外) の何れかの C A R 発現と統合することができ、(v i i) 非免疫原性であり、(v i i i) 製造コストが低いものである。

【0006】

本技術は、細胞方向転換アプタマー (例えば、二重特異性または多価アプタマー) を提供し、これは、アプタマーベースの C A R 免疫療法システムにおけるアプタマブリッジとして、ならびに細胞のインビボまたはエクスビボ遺伝子修飾のために使用することができる。本技術のアプタマブリッジ、細胞、キット、および方法は、がん (例えば、血液学的または非血液学的、個々の細胞または固形腫瘍)、自己免疫疾患 (例えば、関節炎、重力筋無力症、ペンフィガス)、神経炎症性疾患、眼疾患、神経変性疾患 (例えば、A L S、ハンチントン病、アルツハイマー病)、神経筋疾患 (デュシェンヌ筋ジストロフィー、S M A を含む)、感染症 (例えば、H I V、H S V、H P V、H B V、エボラ、結核、クリプトコッカス)、および代謝性疾患 (例えば、1型糖尿病) の治療のための免疫療法として、を含む、多種多様な用途で 사용할 ことができる。それらはまた、画像化、細胞輸送の分析、および新しい免疫療法の研究開発を含む、そのような免疫療法で使用するための診断薬、キット、および方法を提供するために、ならびに幹細胞療法 (例えば、H S C T) と組み合わせた場合の予防を提供するために使用することができる。

【0007】

本明細書で使用する場合、「キメラ抗原受容体細胞」または「C A R 細胞」は、遺伝的に単鎖可変ドメイン (s c F v) 抗体を発現するように生体外 (e x v i v o) または生体内 (i n v i v o) で操作された細胞 (例えば、T 細胞、N K 細胞、単球、またはその他) であり、茎または膜貫通ドメインを介して受容体の細胞内ドメイン (C D 3-T C R など) に融合し、1つまたは複数の特定の抗原を認識して結合し、細胞性免疫応答を活性化する能力 (例えば、がん細胞を殺すか、ウイルスに感染した細胞を破壊する能力) を細胞に与える。

【0008】

本明細書で 사용되는場合、「抗原喪失」または「抗原エスケープ」は、腫瘍抗原のダウンレギュレーションまたは阻害性リガンド (例えば、P D-L 1、T I M 3、L A G 3) のアップレギュレーションなどの免疫療法への耐性または適応のいくつかのメカニズムのいずれかを指すことができる。これは、C A R-T 細胞の障害、C A R 細胞がその標的 (例えば、腫瘍部位) に到達できないこと、C A R の抗体部分に対する免疫 (例えば、特にそれが完全にヒト化されていない場合の s c F v に対する T 細胞応答)、C A R-T 細胞の適合性 (すなわち、記憶の自己複製の可能性の低下および消耗の増加傾向)、または抗原のスプライシングまたは突然変異に寄与する。

【0009】

候補アプタマーは、異なる配列の核酸のセットであり、そこから所望のアプタマーが選

10

20

30

40

50

択される。候補アプタマーの供給源は、天然に存在する核酸またはその断片、化学的に合成された核酸、酵素的に合成された核酸、または前述の技術の組み合わせによって作製された核酸であり得る。

本技術で使用するための核酸は、例えば、その化学修飾を含むDNA、RNA、またはXNA（外来の核酸）分子であり得、一本鎖、二本鎖、または一本鎖と二本鎖の混合物のいずれかであり得る。

【0010】

標的は、アプタマーに結合する構造単位、通常は生物学的実体の構成要素である。標的は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、多糖、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、基質、代謝産物、薬物、栄養素、成長因子などの分子であり得る。標的は、T細胞、NK細胞、単球、B細胞、腫瘍細胞、または病理学的に変更された細胞（例えば、ウイルスまたは他の微生物によって、または遺伝的再配列のために変更されたもの）などの細胞または細胞の一部であり得る。標的はまた、器官または細胞小器官であり得る。

【0011】

結合親和性とは、リガンドと受容体など、互いに可逆的に結合する2つ以上の構造間の相互作用の強さをいう。結合親和性は、オンレート（ k_{on} ）とオフレート（ k_{off} ）の比率の動的平衡の尺度であり、結合の濃度依存性、または解離のギブスの自由エネルギー（ ΔG_D ）の決定からなどの、解離定数（ K_d ）または会合定数（ K_A ）の決定を含む任意の既知の方法で測定または推定できる。結合親和性の増加は、相互作用する構造（例えば、リガンドと受容体）間のより強い分子間力から生じ、結合部位での滞留時間の増加をもたらす。より高い結合親和性を示すリガンドは、より高い「オン」率および／またはより低い「オフ」率を有し得る。より低い濃度のリガンドで完全な受容体活性が達成されるため、結合親和性の増加は治療用製品において有利であり得る。結合親和性は、多価構造における個々の非共有結合相互作用の複数の親和性の集成的な強さによって決定し得る。多価リガンドの全体的な結合親和性は、その個々の結合親和性、リガンドと受容体の両方の原子価、および相互作用する構造の立体配置に依存する。しかし乍ら、多量体構築物の全体的な結合親和性は、単に個々のアプタマーの個々の結合親和性の平均ではない。多量体構造の親和性に影響を与える要因には、リガンドと受容体の間の立体化学的適合、それらの間の接触領域のサイズ、および荷電基と疎水性基の分布が含まれる。

【0012】

安全性プロファイルとは、薬物、治療、または介入およびそのような副作用の可能性に関連する副作用の収集をいう。より良い安全性プロファイルは、同じレベルの治療効果に関連する頻度および／または重篤性の低い副作用および／または有害事象から生じ得る。より良い安全性プロファイルは、改善された治療指数（TI）、すなわち、最小有効量と最大耐量の間より大きな安全ウィンドウと関連付けることができる。

【0013】

免疫応答は、抗原に対して特異的な体液性および／または細胞性反応の誘導をいう。体液性成分は、抗原に特異的な抗体の産生を含み得、一方、細胞媒介性成分は、抗原に対する遅延型過敏性および細胞毒性効果細胞の生成を含み得る。免疫細胞は、抗原との直接相互作用、免疫系の他の細胞との相互作用、サイトカインの放出および／または反応による、さまざまな方法で免疫応答に関与する。

【0014】

免疫系の活性化または刺激は、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）などの免疫効果細胞の活性化によって媒介される。それは、樹状細胞などの抗原提示細胞の活性化および成熟によって媒介され得る。また、免疫チェックポイント分子を抑制することによるなど、抑制性経路の遮断によって媒介され得る。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1】図 1 は、本技術のアプタマーブリッジのいくつかの実施態様の概略図を示している。

【図 2】図 2 は、CAR プラットフォームの *in vivo* 発現と、アプタマーブリッジを介した標的化と一緒に使用した CAR T 細胞療法のシステムと方法の概略図を示している。

【図 3】図 3 は、本技術による標的方向転換の方法の概略図である。

【図 4】図 4 は、ペプチドネオ抗原と単量体アプタマーの配列表である。

【図 5】図 5 は、単量体アプタマーのいくつかの予測される二次構造を示している。

【図 6】図 6 は、アプタマーをリンクするためのクリック化学反応のスキームを示している。

【図 7 A】図 7 A は、それぞれの抗原を発現する細胞および発現しない細胞への抗 P S M A アプタマーの結合を示す。

【図 7 B】図 7 B は、それぞれの抗原を発現する細胞および発現しない細胞への抗 C D 3 アプタマーの結合を示す。

【図 8 A】図 8 A は、単量体および二量体（二重特異性）アプタマーのアガロースゲルを示している。

【図 8 B】図 8 B も、単量体および二量体（二重特異性）アプタマーのアガロースゲルを示している。

【図 9】図 9 は、血清中の R N A アプタマーの経時変化を示している。

【図 10】図 10 A - B は、P S M A 陽性および陰性細胞に対する二重特異性アプタマーの結合親和性を示している。

【図 11】図 11 A - B は、C D 3 陽性および陰性細胞に対する二重特異性アプタマーの結合親和性を示している。

【図 12】図 12 は、P S M A 陽性細胞に対する二重特異性アプタマーの細胞毒性を示している。

【図 13】図 13 A は、いくつかの抗 P N E R N A アプタマーの配列アラインメントを示している。図 13 B は、13 A からの 2 つの R N A アプタマーの予測される二次構造を示している。

【図 14】図 14 A - C は、受容体、C D 19 C A R、または P N E C A R を発現しない細胞への抗 C A R P N E アプタマーの結合を示している。

【図 15】図 15 は、血清中の抗 C A R P N E R N A アプタマーの安定性を示している。

【図 16】図 16 は、C A R - P N E で形質導入された末梢血単核細胞（P B M C）への抗 C A R P N E アプタマーの結合を示している。

【発明を実施するための形態】

【0016】

詳細な説明

本技術は、CAR T 細胞療法などの免疫療法で使用するためのアプタマーベースのスイッチを提供する。アプタマースイッチは、CAR 発現免疫細胞と、がん細胞や病原体の細胞などの標的細胞との間の物理的な橋渡し（ブリッジ）として機能する。ただし、アプタマースイッチまたはブリッジは、免疫反応の特異性と強度を調節するための機敏で迅速に適応できるツールとしても機能する。それらの CAR 結合および標的結合機能は両方ともアプタマーによって実行されるため、アプタマーブリッジを迅速に選択し、抗体ベースのアプローチでは対応できない迅速なペースおよび低コストで、生体外(*in vitro*)で患者の進化するニーズに適合させることができる。さらに、本技術のアプタマーブリッジは、例えば、ポリマーでコーティングされたウイルスベクター粒子からの、CAR をコードするベクターの直接注射、および選択された免疫細胞および CAR の発現のインビボ形質導入（すなわち、免疫療法の対象の体内での形質導入）と組み合わせることができ、従来の生体外(*ex vivo*)での形質導入および CAR T 細胞の増殖と比較して、さらに時間とコストを節約しながら高度な免疫療法を実現する。

【0017】

細胞方向転換アプタマー技術（例えば、二重特異性または多価結合）および本技術のアプタマブリッジ、ならびにそれらを含むシステムおよびキットは、自家または異種のがん療法および免疫療法を含む様々な用途で 사용할 ことができる。本技術の細胞方向転換アプタマー技術、アプタマブリッジ、アプタマーベースのCAR免疫療法システム、キット、および方法は、がんの処置を含む多種多様な免疫療法（例えば、血液学的または非血液学的）、個々の細胞または固形腫瘍）、自己免疫疾患（例、関節炎、重力筋無力症、ペンフィガス）、神経炎症性疾患、眼疾患、神経変性疾患（例、ALS、ハンチントン病、アルツハイマー病）、神経筋疾患（デュシェンヌ病、SMA）、感染症（例えば、HIV、HSV、HPV、HBV、エボラ、結核、クリプトコッカス）、および代謝性疾患（例えば、1型糖尿病）に採用され得る。それらはまた、画像化、細胞輸送の分析、および新しい免疫療法の研究開発を含む、そのような免疫療法で使用するための診断薬、キット、および方法を提供するために、ならびに幹細胞療法（例えば、HSC T）と組み合わせた場合の予防を提供するために使用することができる。

【0018】

アプタマブリッジは、がんや感染症に対する細胞媒介性免疫応答などの免疫反応の質と強度を改善することにより、免疫療法を強化することができる。さらに、アプタマブリッジを使用して、万能のCARを多くの異なる標的に向けたり、免疫応答を別の標的にリダイレクトしたりすることができる。アプタマブリッジを使用して、免疫応答の強さを調整したり、異なる標的のアプタマブリッジを投与したり、アプタマブリッジの投与量や投与スケジュールを経時的に調整したりするだけで、応答をオンまたはオフにすることもできる。アプタマブリッジのさらなる使用は、PD L-1などの阻害性リガンドを免疫刺激効果に変換すること、すなわち、アプタマブリッジの標的結合アプタマーを阻害性リガンドに結合するアプタマーで置き換えることにより、阻害性リガンドをCAR-結合リガンドに変換することである。

【0019】

本技術によるCAR療法は、通常、免疫療法を必要とする対象へのCAR発現細胞の導入から始まる。CAR細胞は、例えば、対象から除去された細胞をウイルスベクターで形質導入するか、またはそれらをプラスミドまたはトランスポゾンで形質導入することによって生体外（ex vivo）で得ることができ、これにより、CARが細胞上で発現され、続いて細胞が培地で増殖し、静脈内注射などにより増殖した細胞の対象への導入を行う。あるいは、CARをコードするレンチウイルスベクターなどのウイルスベクターを、例えば静脈内注射によって対象に投与することができ、その結果、CARは、所望の免疫細胞（自己または同種T細胞、NK細胞、B細胞、単球、マクロファージ、または樹状細胞など）で発現される。いずれの方法でも、CAR発現細胞のベースラインが対象の体内で確立されると、標的をCARのsc Fv部分に結合することによって活性化されると、CAR細胞は増殖する。

【0020】

十分な数のCAR細胞を含有する対象への適切なアプタマブリッジの投与は、ブリッジのCAR結合アプタマーがCARに結合する際に、ブリッジの標的結合アプタマーによって指定される標的に対する免疫応答を引き起こす。結果として生じる免疫応答の強さは、経時的に変化する可能性があり、対象におけるCAR細胞の数、標的へのCAR細胞のアクセス、および標的でのアプタマブリッジの濃度の関数である。免疫応答の強さは、CAR細胞の数を調整することによって、および／または投与されるブリッジの量を増減することによって、または投与されるブリッジの投薬間の時間間隔を短縮または増加することによってブリッジの濃度を調整することによって、上または下に調整できる。

【0021】

本技術の治療法では、免疫療法を開始するためにアプタマブリッジを投与する前に、対象におけるCAR細胞の総量を推定し、そうして投与プロトコル（例えば、投薬量、投薬回数、および／または投与間隔）が設計され（例えば、アルゴリズムを使用して）、免疫応答の所望の強度および／または持続時間が生み出される。免疫応答の強さは、既知の

10

20

30

40

50

方法（例えば、蛍光活性化セルソーティング（FACS）分析）を使用して、患者からの血液サンプル中の特定の活性化免疫細胞の数と種類を定量化するために、あるいはそのようなサンプル中の特定のサイトカインのレベルを決定することにより監視できる。免疫応答が強すぎて患者に危険をもたらす可能性がある場合は、アプタマブリッジの投与量または投与頻度を減らすか、完全に停止するか、または以下を含む「キル」スイッチを投与することにより、応答を減らすことができる。すなわち、単一のCAR結合アプタマー（それはCARへのアプタマブリッジの結合を邪魔する）、CARに結合してアプタマブリッジの結合を邪魔するペプチドまたは抗体、単一の標的結合アプタマー（それは標的へのアプタマブリッジの結合を邪魔する）、またはCARまたは標的抗原からの可溶性ドメインまたはエピトープなどである。

【0022】

本技術のアプタマブリッジを使用して、CAR細胞を別の標的にリダイレクトすることができる。これは、最初の標的による抗原の逃避、または最初の標的に対する弱い応答の場合に有用であり得、異なるまたは追加の標的の追求を必要とする。この方法の一実施態様において、異なる（例えば、第2以降の）アプタマブリッジが対象に投与され、これは、同じまたは類似のCAR結合アプタマーを有するが、第1のブリッジとは異なる標的結合アプタマーを有する。別の実施態様において、第1の標的に直接標的化される（すなわち、CARスイッチを使用せずに）従来のCARが対象の細胞上に発現され、アプタマブリッジが対象に投与されて、CAR応答を異なる（第2以上の）標的へのCAR応答をリダイレクトする。アプタマブリッジは、標的結合CARに特異的なCAR結合アプタマーおよび標的結合アプタマーを含み、2つのアプタマーがリンカーによって結合されている。このアプローチは、免疫療法を調整するため、または最適な標的または標的の組み合わせを見つけるために、同じ対象内の異なる標的と連続してまたは同時に数回（例えば、2、3、4、5、またはそれ以上）使用することができる。本技術のアプタマブリッジの一実施態様は、対象内のCAR細胞または標的のいずれかを画像化または定量化する際に使用するための検出可能な標識に結合されている。例えば、該ブリッジは、リンカーまたは、CAR結合アプタマーまたはPETスキャンで使用するための標的結合アプタマーのいずれかに取り付けられた¹⁸F部分を含むことができる。同じ方法は、治療のためにアプタマブリッジで使用する個々のアプタマー（CAR結合または標的結合のいずれか）を使用して実施することができる。この方法は、例えば、治療を開始する前または治療中に対象のCAR細胞を定量化するために使用することができる。

【0023】

本技術のアプタマブリッジは、連結部分によって共有結合または非共有結合された2つ以上のアプタマーを含有する。2つ以上のアプタマーは、CAR結合部分および標的結合部分を形成し、これらのそれぞれは、1つ以上のアプタマーを含有する。CAR結合アプタマーは、T細胞などの免疫細胞中において発現されたCARに結合し、いくつかの実施態様では免疫細胞を活性化するが、他の実施態様では（例えば、「キル」スイッチとして作用する場合）、免疫細胞を活性化しない。標的は、免疫療法の意図された標的、すなわち、排除を目的とした細胞である。したがって、CAR発現細胞とアプタマブリッジは、CAR-T細胞療法などの免疫療法におけるシステムとして一緒に使用することを目的としている。アプタマブリッジのCARおよび標的への結合は、好ましくは高親和性結合である。標的は、タンパク質（細胞表面受容体タンパク質など）、細胞、小分子、または核酸であり得る。標的は、がん細胞などの標的細胞の表面に位置することが好ましく、対象の他の細胞（正常細胞）に見られる場合と見られない場合がある。

【0024】

いくつかの実施態様では、標的は、CD19、CD20、CD22、CD30、CD123、BCMA、NY-ESO-1、メソセリン、PSA、PSMA、MART-1、MART-2、Gp100、チロシナーゼ、p53、ras、Ftt3、NKG2DLigang、Lewis-Y、MUC1、SAP-1、スルビピン、CEA、Ep-CAM、Her2、Her3、EGFRvIII、BRCA1/2、CD70、CD73、CD1

10

20

30

40

50

6A、CD40、VEGF- α 、VEGF、TGF- β 、CD32B、CD79B、cMet、PCSK9、IL-4RA、IL-17、IL-23、4-1BB、LAG-3、CTLA-4、PD-L1、PD-1、OX-40、または変異SODなどの腫瘍抗原である。アプタマブリッジの成分アプタマーはまた、そのような標的の組み合わせに特異的に結合することができる。いくつかの実施態様において、標的は、gag、逆転写酵素、tat、HIV-1エンベロープタンパク質、スポロゾイト周囲タンパク質、HCV非構造タンパク質、ヘマグルチニンなどの感染性病原体の抗原である。アプタマブリッジは、そのような標的の組合せに特異的に結合することもできる。

【0025】

好ましい実施態様において、1つまたは複数のCAR結合アプタマーは、ペプチドネオエピトープ(PNE)、すなわち抗PNE CARに対して親和性を有するCARの細胞外ドメインへの特異的結合のために選択される。PNEは対象の体内に存在しないエピトープであるため、抗PNE CARを発現する免疫細胞は内因性生体分子によって活性化されないが、免疫細胞のために、「オン」スイッチとして機能するアプタマブリッジの対象への投与を待ち、CAR発現細胞を所望の抗原または抗原を有する細胞型に標的化する。CAR発現免疫細胞の免疫活性化および生体内(in vivo)増殖は、PNEを含有するペプチド、または単量体型のブリッジのCAR結合アプタマーまたは標的結合アプタマーのいずれかを対象に投与することによってオフにすることができ、そのうちの1つは、標的によるCAR発現免疫細胞の活性化を終了させるであろう。

【0026】

PNEは、宿主のプロテオームに見られない(例えば、ヒトプロテオームには見られない)、抗PNE CARを得ることができる、任意のペプチドエピトープであり得る。好ましいPNEの例は、Saccharomyces cerevisiae由来のGCN4転写因子のペプチドフラグメント(NYHLENEVARLKKL、配列番号1)である。高親和性($K_d = 5.2 \text{ pM}$)で52SR4単鎖抗体を含むCAR結合GCN4は、Rodgersらによって説明されている。CARおよび対応するアプタマブリッジでの使用に適したさらなるPNEには、以下が含まれる:

【0027】

(i) 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンBのN末端15-マーペプチドESQPDPKPDELHKSS(配列番号2)、それに結合する抗体と対になり、Clin. Vaccine Immunol. 17(11):1708~1717に記載されている;

(ii) 大腸菌マイコトキシンであるデオキシニバレノールは、それに結合するscFvと対になっており、Protein Expr. Purif. 35(1): 84-92に記載されている;

(iii) BiomedInt. Res. Int. 2018; 2018: 5809028に記載されている抗体と対になったHPV-16タンパク質E5;

(iv) 狂犬病ウイルスタンパク質およびそれに結合するscFvであり、Protein Expression and Purification 86(2012) 75-81に記載されている;

(v) それに結合するscFvと対になってBioconjugateChem. 2010、21、1134~1141に記載されているインフルエンザAマトリックスタンパク質;

【0028】

(vi) HBVのプレS2タンパク質のアミノ酸134~145(PRVRGLYFPAGG、配列番号3)、それに結合するscFvと対になっており、Virallimmunol. 2018 May 30に記載されている;

(vii) J. of Virological Methods 257(2018) 73-78に記載されているscFvと対になったアヒル肝炎ウイルス1型のVP3ペプチド;

(viii) Appl Microbiol Biotechnol. 2017年12月; 101(23-24): 8331-8344に記載されているscFvと対になったウシヘルペスウイルス1型の糖タンパク質Dからのペプチド(MEESKGYEPP、配列番号4);

(ix) 南アフリカ領土2(SAT2)の口蹄疫ウイルスのVP1タンパク質のアミノ酸159を含み、それに結合するscFvと対になっており、Virus Research 167(201

10

20

30

40

50

2) 370-379に記載されているペプチド；

(x) ネズミチフス菌由来のOmp Dのペプチド(DRTNNQVKA、配列番号5)は、それに結合するscFvと対になっており、Veterinary Microbiology 147 (2011) 162-169に記載されている；

【0029】

(xi) 大腸菌由来のイソフェリチンのペプチドであり、それに結合するscFvと対になっており、Journal of Biotechnology 102 (2003) 177/189に記載されている；

(xii) ブドウの葉巻関連ウイルス3コートタンパク質のN末端に位置するペプチド(AQEPPRQ、配列番号6)で、それに結合するscFvと対になっており、Arch. Virol. (2008) 153:1075-1084に記載されている；

(xiii) SARS-CoVのNタンパク質のペプチド(PTDSTDNNQNGGRNGARPKQRRPQ、配列番号7)で、それに結合するscFvと対になっており、Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2004、36 (8) 541-547に記載されている；

(xiv) HIV Tatタンパク質のアミノ酸1~15を含み、それに結合するscFvと対になっており、J.Virol. 2004年4月; 78(7):3792-3796に記載されているペプチド； および(xv) HCV NS3のヘリカーゼドメインのアミノ酸1363~1454からのペプチドであり、それに結合するscFvと対になっており、J. Hepatology 37 (2002) 660~668, Virol 1994; 68:4829~4836, およびArchVirol 1997; 142:601-610に記載されている。本技術のアプタマーブリッジと組み合わせることができる万能のCARの他の例は、J.Autoimmun. 2013 May; 42:105-16; Blood Cancer J. 2016 Aug, 6(8): e458; Oncotarget. 2017 Dec 12, 8(65):108584-108603; Oncotarget 2017 May 9, 8(19): 31368-31385; Oncotarget 2018 Jan 26, 9(7): 7487-7500; およびWO 2016-030414に記載されている。

【0030】

アプタマーブリッジの連結部分は、個々のアプタマー間の単純な1つまたは複数の共有結合であり得るか、または炭化水素、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、核酸、ペプチド、炭水化物、または脂質などの合成または天然に存在するポリマーであり得る。特定の実施態様では、連結部分はペプチドではない。特定の実施態様では、アプタマーブリッジはペプチドを欠いており、ポリペプチドおよびタンパク質を欠いている。連結部分はまた、ナノスケール構造(ポリマー、タンパク質、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノ結晶、ナノワイヤー、ナノリボン、ナノ結晶、ミセル、またはリポソームなど)、またはマイクロスケール構造(マイクロビーズまたは細胞など)、またはより大きな構造(固体支持体など)の形態をとることができる。好ましくは、連結部分は生分解性ポリマーである。連結部分は、線状、分岐、環状、またはこれらの構造の組み合わせであるポリマーであり得る。連結部分はまた、デンドリマー構造、またはハブまたは星型構造(2つ以上のアプタマーが結合しているコア構造など)のバックボーンとして機能し得る。非共有会合の場合、2つ以上の個々のアプタマーは、アプタマー間で直接、または連結部分との相互作用を介して、非共有相互作用を介して結合することができる。非共有相互作用は、例えば、1つ以上の水素結合、イオン結合、疎水性結合、ファンデルワールス相互作用、またはそれらの組み合わせであり得る。ストレプトアビジン-ビオチンなどの高親和性結合対を使用して、アプタマーブリッジ内のアプタマーを非共有連結させることができる。

【0031】

リンカーまたは連結部分は、単量体アプタマーユニットを共有的にまたは非共有的に結び付ける任意の化学部分であり得る。リンカーは、例えば、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、または炭水化物を含有し得るか、またはそれら構成し得る。リンカーは、細胞受容体、リガンド、または脂質を含有し得るか、またはそれらから構成し得る。リンカーは、置換または非置換のアルキル鎖または環構造などの炭化水素鎖またはポリマー、ポリエチレングリコールポリマー、または修飾または非修飾のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含有し得るか、またはそれらから構成し得る。リンカーは、単一の共有結合である場合もあれば、1つ以上のイオン結合、水素結合、

10

20

30

40

50

疎水性結合、またはファンデルワールス相互作用を含む場合もある。リンカーは、ジスルフィド架橋、ヘパリンまたはヘパラン硫酸塩由来のオリゴ糖（グリコソアミノグリカン）、化学的架橋剤、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、またはトリアゾールを含み得る。リンカーは酵素によって開裂可能であり、個々のアプタマーの放出および／またはアプタマブリッジによるCAR-標的相互作用の停止を可能にする。

【0032】

リンカーは、正味の正、負、または中性の電荷を持つことができる。リンカーは、多量体構築物中の個々の単量体アプタマーユニットの機能的特性の保存を確実にし、CARおよび標的への結合を促進するため、またはそれらの相互作用を促進するために、必要に応じて柔軟または剛性にする事ができる。リンカーは、5～20個のグリシンおよび／またはセリン残基のポリマーなどの柔軟な部分を含み得る。リンカーはまた、グルタメート、アラニン、リジン、および／またはロイシンのポリマーなどの、剛性で定義された構造を含有することができる。リンカーは、ヒンジ部分またはスペーサー部分を含むことができる。リンカーは、置換または非置換のC₂-C₅₀鎖または環構造、ポリエチレングリコールポリマー（例えば、ヘキサエチレングリコール）、または修飾または非修飾オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含むことができる。リンカーは、ヘパリンまたはヘパラン硫酸塩由来のオリゴ糖（グリコソアミノグリカン）、化学架橋剤、ペプチド、ポリペプチド、ヒドラゾン、チオエーテル、またはエステルを含むことができる。

【0033】

C₂-C₅₀リンカーは、2～50個の炭素原子（飽和または不飽和、直鎖、分岐、または環状）、0～10個のアリール基、0～10個のヘテロアリール基、および0～10個の複素環基の骨格を含むことができ、それらは任意選択的にエーテル結合（例えば、1以上のエチレングリコール単位-O-（CH₂CH₂O）-を含むがこれらに限定されない、1以上のアルキレングリコール単位）；1以上の1，3-プロパンジオール単位；アミン、アミド、またはチオエーテルを含有する。各骨格炭素原子（すなわち、-H置換基のみを含む）独立して非置換であり得るか、またはC₁～C₃アルキル、-OH、-NH₂、-SH、-O-（C₁-C₆アルキル）、-S-（C₁-C₆アルキル）、ハロゲン、-OC（O）（C₁-C₆アルキル）、および-NH-（C₁-C₆アルキル）から選択される1以上の基で置換されていてもよい。いくつかの実施態様において、リンカーは、C₂-C₂₀リンカー、C₂-C₁₀リンカー、C₂-C₈リンカー、C₂-C₆リンカー、C₂-C₅リンカー、C₂-C₄リンカー、またはC₃リンカーであり、ここで、各炭素は、上記のように独立して置換され得る。

【0034】

特定の実施態様において、例えばイオン結合、水素結合、疎水性結合、ファンデルワールス相互作用、またはそれらの混合物を介して媒介されるアプタマー間に非共有結合があり、個々のアプタマーを結び付ける介在する連結部分はない。単一の多量体アプタマー構築物はまた、特定のアプタマーを接続する介在リンカー部分を介した共有結合、および介在リンカー部分なしの、アプタマー間の他の結合サイトでの非共有結合の混合物を使用することができる。

【0035】

リンカーは、任意選択で1つ以上の機能を持つことができます。例えば、いくつかの実施態様において、リンカーは、温度および／またはpHに感受性であり、これは、リンカーが、コンフォメーションを変化させるか、または事前に設計された温度および／またはpHの範囲で開裂されることを意味する。

【0036】

アプタマブリッジのCAR結合部分および標的結合部分のそれぞれは、単一のアプタマーを含むことができ、または2つ以上の同一または非同一のアプタマーユニットを含むことができる。2つ以上の同一のアプタマー、または同一ではないが同じ標的に結合するアプタマーの使用は、特に与えられた標的分子の複数のコピーを持っている細胞などの標的について、異なって提示される同じ標的の結合または結合の協同性を通じて、結合親和

性を大幅に高めることができる。。同一の単量体アプタマーは、完全に同一のヌクレオチド配列（１００％同一）を有するか、または約９９％同一、約９８％同一、約９７％同一、約９６％同一、約９５％同一、約９４％同一同一、約９３％同一、約９２％同一、約９１％同一、または約９０％同一、または少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の配列を有することができる。

【００３７】

アプタマーブリッジのＣＡＲ結合部分および標的結合部分のそれぞれは、同一ではなく、同じまたは異なる標的に結合する２つ以上の個々のアプタマーを含むことができる。非同一のアプタマーは、構造、ヌクレオチド配列、および／または結合特異性または結合親和性が異なる可能性がある。このようなブリッジは、タンパク質の異なるエピトープまたは標的細胞の異なる表面タンパク質、または異なるＣＡＲなどの標的上の２つ以上の異なるサイトに特異的に結合し、それによって標的に対する親和性および／または特異性を増加させるか、または異なる標的細胞および／または異なるＣＡＲ発現細胞に結合する。異なる標的細胞および／または異なるＣＡＲ発現細胞が関与する作用の組み合わせを通じて、所望の治療効果を最大化するように、異なる標的または異なるＣＡＲＳを選択することができる。

【００３８】

ＣＡＲ細胞の機能は、それらを標的細胞上の２つ以上の抗原、例えば、ＣＤ１９とＣＤ２２、ＣＤ１９とＣＤ１２３、またはＣＤ１９とＢＣＭＡなどの所与の腫瘍細胞上の２つ以上の抗原に向けさせることによって改善され得る。このようなアプローチは、腫瘍抗原の喪失を克服し、応答の持続性を改善するのを達成するために役立ち得る。アプタマーブリッジは、標的結合部分で２つ以上のアプタマーを一緒に連結することによって、同じ標的細胞上のＣＡＲおよび２つ以上の抗原を認識するように操作することができる。このアプローチは、２つの腫瘍関連抗原受容体を同時に発現するようにＴ細胞を操作することに類似しているが、抗体の二重標的制限を超えて拡張され、抗体ベースのＣＡＲスイッチよりも低コストと高い柔軟性を提供する。

【００３９】

本技術のアプタマーブリッジ構築物は、免疫療法組成物に使用することができる。そのような組成物の実施態様は、アプタマーブリッジおよび賦形剤を含む。アプタマーブリッジは、他の分子、またはリポソーム、マイクロまたはナノ粒子、受容体または細胞を標的とする分子、または取り込み、分布、および／または吸収を支援するための経口、局所または他の製剤などの構造と関連付けることができる。いくつかの実施態様では、アプタマーブリッジは、カプセル化されるか、共役（複合体）化されるか、またはそうでなければ治療薬送達ビヒクルと関連付けられる。いくつかの実施態様において、治療薬送達ビヒクルは、ウイルスベクターなどの遺伝子送達ビヒクルであるか、またはウイルスベクターを含む。ウイルスベクターは、発現ベクターまたはプラスミドなどの任意のタイプの適切なベクターであり得る。好ましい実施態様では、ベクターはレンチウイルスベクターである。好ましい実施態様において、ＣＡＲコード化ベクターは、最初に対象に投与され、ＣＡＲ発現の初期ベースライン、およびいくつかの実施態様において、ＣＡＲ細胞増殖は、標的に対する免疫応答を活性化するために、対象にアプタマーブリッジを投与する前に、対象において確立される。ＣＡＲ発現、および任意選択でＣＡＲ発現細胞の増殖は、例えば、標識化形態でＣＡＲ結合アプタマー（アプタマーブリッジのＣＡＲ結合部分など）を投与することによって、対象において検出および／または定量化することができる。続いて末梢血細胞の結合標識を決定するか、体内の標識の分布を決定する。

【００４０】

アプタマーブリッジの構成要素アプタマーは、アプタマー構造または配列に対する任意の所望の修飾を含み得る。修飾は、候補アプタマーの１つ以上のリボースまたはデオキシリボース部分に導入された置換を含み得る。修飾には、候補配列の１以上のリン酸塩部分における置換を含み得る。修飾には、候補アプタマーの１以上のプリンまたはピリミジン

部分における置換、または候補アプタマーの天然ヌクレオチドの代わりに非天然または希少天然ヌクレオチドを使用することを含み得る。化学修飾は、ヌクレオチド間リン酸塩のホスホロチオエートまたはボラノリン酸による置換、ビオチン、アジドまたはアルキン基の付加など、ヌクレオチド間リン酸塩結合に導入することができる。フッ素、LNA（閉じ込め核酸）ユニット、または2'-O-アルキル修飾の導入など、化学修飾をリボース環のC2'位置に導入することができる。アプタマーの1以上のヌクレオシドは、(2'-アミノ(2'-NH₂))、2'-フルオロ(2'-F)、または2'-O-メチル(2'-OMe)などの2'位の糖修飾、シトシン環外アミンでの修飾、ヌクレオシド間連結修飾、または5-メチルシトシンから選択される修飾を含み得る。アプタマーは、3'キャップ、5'キャップ、および／または3'末端に逆位デオキシチミジンを含み得る。2-チオウリジン(s2U)、偽性ウリジン(ψ)、ジヒドロウリジン(D)、またはペプチド核酸(PNA)、モルホリノ、閉じ込め核酸(LNA)、グリコール核酸(GNA)などの非天然ヌクレオチドなどの希少ヌクレオチド、またはスレオース核酸(TNA)は、一般的に発生するヌクレオチドの代わりに使用できる。非天然核酸(ゼノ核酸(XNA))も含めることができる。

【0041】

標的に対するアプタマーを作製または選択するための任意の適切な方法を使用して、アプタマープリッジの構成要素アプタマーを得ることができる。たとえば、アプタマーは、指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化(SELEX)によって識別できる。SELEXは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,270,163号に記載されている。簡単に言えば、SELEXは、標的と接触する様々なヌクレオチド配列を含有する複数の核酸(すなわち、候補アプタマー配列)から始まる。結合していない核酸は、アプタマーと標的の複合体を形成する核酸から分離される。次に、アプタマーと標的の複合体が解離され、核酸が増幅され、結合、分離、解離、および増幅のステップが、標的に対して次第に高い親和性のアプタマーの集団をもたらすために、所望されるだけ多くのサイクルを通して繰り返される。選択と増幅のサイクルは、サイクルのさらなる繰り返して結合親和性の有意な改善が達成されなくなるまで繰り返すことができる。

【0042】

単一のアプタマーが同定される前に、選択と増幅のサイクルを中断することができる。そのような場合、アプタマーの集団が同定され、これは、アプタマーと標的との結合を可能にする配列、構造、またはモチーフに関する重要な情報を提供することができる。候補アプタマーのそのような集団はまた、アプタマーのどの部分が標的結合にとって重要ではないかを知らせることができる。この情報は、他のアプタマーの生成を同じ標的に導くことができる。このように生成されたアプタマーは、SELEXの新しいラウンドの入力として使用でき、より優れた結合親和性またはその他の関心のある特性を備えたアプタマーを潜在的に生成する。

【0043】

いくつかの実施態様では、候補アプタマープリッジなどの多量体アプタマー構築物を含有する候補アプタマー配列が形成され、その後、多量体構築物としてさらなるラウンドの選択に供される。多量体候補アプタマー構築物は、個々の候補アプタマー部分を連結部分と連結し、任意選択で、そのような構築物を1以上のSELEXのラウンド用の入力として使用することによって作製することができる。いくつかの実施態様において、個々のアプタマーは、1つ以上のラウンドのSELEXを介して独立して選択され、そして最終的に、連結部分と一緒に連結される。したがって、単量体アプタマーおよび多量体アプタマー構築物の多量体化は、SELEX手順の前、最中、または後に実行することができる。

【0044】

アプタマープリッジの構成要素アプタマーを選択するために、標的細胞上の標的に結合するアプタマーと比較して、CARに結合するアプタマーに対して異なる方法で選択を行うことができる。標的細胞に結合するアプタマーの選択は、候補アプタマーを無傷の標的細胞、組換え細胞、病原体細胞、ウイルス様粒子、または精製された標的タンパク質また

10

20

30

40

50

はペプチドエピトープと、または標的細胞からの膜調製物、または抗原性表面タンパク質を含有する組換え細胞と関連付けることによって行うことができる。しかしながら、抗PNE CARに結合するアプタマーの選択は、候補アプタマーを、PNEの存在下および非存在下で細胞上に発現された抗PNE CARと接触させることによって実施することができる。したがって、この方法によれば、抗PNE CARに対して所望の結合親和性を有するアプタマーは、PNEを含有するペプチドを添加することによって、PNEの非存在下でのCARへの結合を置換することができるものである。しかし、アプタマーは、PNE結合部位に隣接するなど、異なるCARの領域からのペプチドを使用して選択することもでき、この方法で選択されたアプタマーは、PNEによって置き換えられない可能性があるが、抗PNE CARに対して高い親和性結合を提供し得る。さらに、免疫療法の成功を促進するために、CARを発現するT細胞などのCAR発現細胞の活性化は、アプタマー選択プロセス中に監視されるべきである。この目的のために、候補のCAR結合アプタマーの選択は、候補の標的結合アプタマーとともに、アプタマースイッチに設置された候補のCAR結合アプタマーを使用して実行することができる。

【0045】

アプタマーブリッジの成分アプタマーは、任意の所望の長さを有することができる。いくつかの実施態様では、成分アプタマーは少なくとも約15個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、成分アプタマーは約100個のヌクレオチドを含む。アプタマーブリッジの長さは、ブリッジを介して相互作用する細胞間の距離を決定することができる。このように、ブリッジの長さは、約70～約200オングストローム、または約70～約150オングストローム、または約100～約170オングストローム、または約120～約150オングストロームの範囲が望ましい。

【0046】

本技術は、任意の所望する結合親和性を有するアプタマーを識別または生成するために使用し得る。好ましい実施態様では、1以上の選択されたアプタマーは、高親和性（特異的）結合のために約1 pMから約10 nMまでの目標に結合するための K_d を有し、低親和性結合の場合は約100 nMから10 μ M程度である。いくつかの実施態様において、アプタマーは、約1 pMから約10 μ Mまで、約1 pMから約1 μ M；約1 pMから約100 nM；約100 pMから約10 μ M；約100 pMから約1 μ M；約100 pMから約100 nM；または約1 nMから約10 μ Mまで；約1 nMから約1 μ M；約1 nMから約200 nM；約1 nMから約100 nM；約500 nMから約10 μ M；または約500 nMから約1 μ Mまでの K_d を有する。いくつかの実施態様では、アプタマーブリッジ内の成分アプタマーの結合親和性は、単量体候補アプタマーの親和性の4～50倍高い。いくつかの実施態様では、アプタマーブリッジの成分アプタマーと1つ以上の標的との親和性は、ブリッジ内の多量化度、ブリッジに含まれる成分アプタマー、またはリンカーを変更することによって微調整し得る。特定の実施態様において、ブリッジのCAR結合部分および／または標的結合部分が多価であり、つまり、CARまたは標的上の同一または異なる部位に結合する2つ以上の個々のアプタマーを含有することを意味する。多価アプタマー構造物は、CARまたは標的に対する高い結合特異性および／または高い結合親和性の利点を提供する。多元性アプタマーの結合親和性は、単一アプタマーのそれよりもはるかに高い可能性があり、それは多量体複合体の結合が、個々の結合サイトの間で正の協同性または正のアロステリズムを示すことができるためである。多量体アプタマーブリッジ部分で結合サイトを慎重に選択して結合させる能力は、有害または毒性作用を制限し、効果的な処置効果を高めることにより、安全性プロファイルを高める。

【0047】

いくつかの実施態様において、アプタマーブリッジのアプタマーは、ビオチンアビジンまたはポリエチレングリコールなどの別の化合物との複合化によって安定化および／または多量化される。いくつかの実施態様において、アプタマーは固体の支持体を用いて合成される。

【0048】

本明細書で公開されているアプタマブリッジは、増殖性疾患または感染症の予防または処置に有用である。本発明の1つの側面は、アプタマブリッジまたは免疫療法製剤またはアプタマブリッジを含む治療剤送達ビヒクルを投与することにより、がんや感染を予防または処置する方法である。

【0049】

本発明はまた、アプタマブリッジまたは免疫療法製剤またはアプタマブリッジを含む治療剤送達ビヒクルを投与することにより、対象のがんまたは感染症に対する免疫応答を誘導または増強する方法を提供する。

【0050】

本発明は、さらに、CARを発現する免疫細胞と、免疫応答または増強された免疫応答が所望される標的細胞を特異的に関連付ける方法を提供する。標的細胞上にCARと分子標的の両方に結合特異性を有するアプタマブリッジを投与すると、CAR発現免疫細胞の活性化、標的細胞に対する免疫応答の開始または増強に繋がる。

【実施例】

【0051】

【実施例1】 PSMAおよびCD3に特異的な二重特異性アプタマーの調製

A10 RNAアプタマー（配列番号8）は、ヒト前立腺特異膜抗原（PSMA）に対して選択され、siRNAの前立腺特異的送達剤（McNamara et al. 2006-Dassieら 2009）として使用される39個のヌクレオチド長の配列である。

CELTIC_1S、CELTIC_19s、CELTIC-coreはDNAアプタマー（配列番号9、10、11）、ARACD3-3700006およびARACD3-0010209はRNAアプタマー（配列番号12および13）であり、これらはすべてヒトCD3に対して以前に選択されている。

これらのDNAまたは2'-デオキシ-2'-フルオロチミジン修飾RNA（2'-F-RNA）アプタマーは、標準的な固相リンアミダイト化学を介して合成されたHPLC-RP精製された単一標準オリゴとして、ベースクリック（ドイツ、ノイリード）から購入された。抗CD3アプタマーは、抗CD3モノクローナル抗体（データは示されていない）とは異なり、共刺激性抗CD28抗体と併用しても、サイトカイン分泌または表面マーカー発現を活性化させなかった。

【0052】

A10アプタマーは、その後のトリアゾール・ヌクレオチド間二量化のために、その3'末端にアジド基で修飾された。ビオチンは、アプタマー配列とビオチン旗の間に16原子混合極性スパーサーを導入するビオチン-TEGとして、A10アプタマーの5'末端に添加された。A10のCy5ラベル付きバージョンも合成された。その後のトリアゾール・ヌクレオチド・ヌクレオチドERTIC_1s、CELTIC_19s、CELTIC_コア、ARACD3-3700006、ARACD3-0010209は、5'末端のアルキン基で修飾された。分子量、純度、完全性はHPLC-MSによって検証された。PSMA陽性およびPSMA陰性細胞について、A10抗PSMA RNAアプタマーの親和性および特異性が評価された（図7A）。

【0053】

抗PSMA A10および抗CD3アプタマーは、メーカーの指示に従って、オリゴ2-クリックキットL（ベースクリック、ドイツ・ノイリード）にて45℃で60分間行った銅触媒クリック反応によってヘテロ二量化された。30分の間に100Vにて1XTBEバッファ（Invitrogen社）で移行した3%アガロースゲル上の反応生成物は、ゲル電気泳動によって分離された。ゲルをバイオ・ラッドイメージングシステムを用いて可視化し、その結果を図8Aと8Bに示す。二量体アプタマーに対応するゲルスライスをゲルから切り出し、核酸を25mMのNaCl-TEバッファ中で受動溶出することにより、8℃で72時間抽出した。二特異性アプタマーダイマーは、標準的な酢酸ナトリウム沈殿法によって回収され、滅菌水に再懸濁され、使用まで-20℃で保存された。

【0054】

【実施例2】PSMAに特異的なアプタマーA10の機能安定性

A10 RNAアプタマーの安定性は、5% FBSを含有するダルベッコのリン酸塩バッファ生理食塩水 (DPBS) またはFBSだけで測定した。ビオチン化アプタマーは85℃で5分変性した後、氷ブロック上で直ちに4℃まで5分間冷却した。その後、アプタマーをFBSの5%または純粋なFBS中で補ったDPBS中、最終濃度 2 μMに希釈した。試料は37℃で10分、30分、1時間、2時間、4時間、または24時間の間培養した。対照試料は37℃で培養なしで新しく調製されたアプタマーを含んでいた。その後、各溶液に100 nMストレプトアビジンPEを加え、アプタマーをPSMA陽性LNCaP細胞で培養した (ヒト前立腺癌-ATCC CRL-1740)。その後、5% FBSを含むDPBSバッファまたは純FBS中のアプタマーA10の半減期は、37℃の培養時間の関数としての蛍光陽性細胞数の変化に基づいて、Y L-1チャンネル上のフローサイトメトリーを用いて測定した。測定結果を図9に示す。5%の血清を含有するDPBSバッファ中で培養されたアプタマー A10は、24時間にわたって安定していた。純粋な血清で試験すると、培養の最初の2時間以内に結合活性の半分が失われた。

【0055】

【実施例3】細胞上に発現される標的に対する抗PSMA×抗CD3二重特異性アプタマーの親和性および特異性の決定。

細胞上に発現した標的タンパク質に対する抗PSMA×抗CD3二重特異性アプタマーの親和性と特異性は、フローサイトメトリーによって評価された。これらの研究は、CD3陽性Jurkat (急性T細胞白血病ヒト細胞株-ATCC TIB-152)、CD3陰性ラモス (パーキットリン腫ヒト細胞株-ATCC CRL-1596)、PSMA陽性LNCaP (ヒト前立腺癌-ATCC CRL-1740) およびPSMA陰性PC-3 (ヒト前立腺癌-ATCC CRL-1435) 細胞上でFBSの5%を補充した、SELEXバッファ中のビオチン化RNA/DNAアプタマー培養、またはDPBSバッファ中のRNA/RNAアプタマーでの培養によって行われた。

【0056】

細胞はRPMI-1640培地 (Gibco Invitrogen社) 中で、使用前に10%のFBS (Gibco Invitrogen社) と1%ペニシリン/ステプマイシン (Gibco Invitrogen社) で補充して培養した。実験の前に、Jurkat、Ramos、LNCaP、およびPC-3細胞 (2.5×10⁵セル/ウェル) を96ウェルプレートで播種し、2500 rpmで2分間遠心分離した。上澄みは廃棄され、ペレット化細胞を37℃で予熱した200 μLのSELEXまたはDPBS-5%のFBSバッファで2回洗浄した。各洗浄ステップの後に、2500 rpmでの遠心分離を2分間行った。アプタマーは5分間85℃で変性し、直ちに4℃の氷ブロックに5分間静置した。その後、試験サンプルを2つの異なる濃度範囲で希釈した。3、10、30、100および300 nM (CD3結合アッセイ) および30、100および300 nM (PSMA結合アッセイ) の後に、100 nMフィコエリスリン標識ストレプトアビジン (ストレプトアビジン-PE、eBioscience社) を各溶液に添加する。Jurkat、Ramos、LNCaP、PC-3細胞をアプタマー希釈液 (100 μL/ウェル) で再懸濁し、5% CO₂ 加湿雰囲気中で37℃で30分間培養した。

【0057】

対照として、細胞は、CD3モノクローナル抗体 (PEラベル、OKT3ヒト抗CD3、Invitrogen社)、PSMAモノクローナル抗体 (アレクサフルオール488ラベル化、GCP-05ヒト抗PSMA、Invitrogen社)、PE-ストレプトアビジンまたは追加の試薬なしでそれぞれのバッファで培養した。培養後、細胞を2分間2500 rpmで遠心分離し、結合されていない配列を有する上澄み液を廃棄した。ペレット化細胞は、SELEXまたはDPBS-5%のFBSバッファ (200 μL/ウェル) で洗浄し、遠心分離し、弱く非特異的に付着した配列をすべて除去するために、2回遠心分離した。その後、5%のCO₂ 加湿雰囲気中で、細胞を1 mg/mL サーモン精子DNA溶液 (100 μL/ウェル) で37℃で洗浄した。30分後、サーモン精液を2分間2500 rpmで遠心分離によって除去し、細胞をSELEXまたはDPBS-5%のバッファ (200 μ

L / ウェル) で2回洗浄した後、遠心分離を行った。その後、DNAまたはRNA配列を添付したJurkat、Ramos、LnCap、PC-3細胞を固定し (BD CellFix 溶液 # 340181)、蛍光陽性細胞をV L-1チャンネル上のフローサイトメトリー (AttuneNX; Invitrogen, Inc.) でカウントした。

【0058】

PSMA陽性細胞への結合研究の結果を図10Aおよび10Bに示す。3個のRNA / DNAアプタマー (A10 x Celtic_1S、A10 x celtic_19S、A10 x Celtic_Core) と2つのRNA / RNAアプタマー (A10 x ARACD3-3700006、A10 x ARACD3-0010209) をA10単量体アプタマーと一緒に分析した。比較のために、試験された試薬のPSMA陰性のPC-3細胞への結合も測定した。A10では、試験された最高濃度で信号の飽和に達することなく、PSMA陽性LnCaP細胞への用量依存的結合が観察された。信号の強度は、抗体対照と同じくらい強かった。A10モノマーのPC-3細胞への残留結合は、試験された最高濃度でのみ観察された。すべての二重特異性PSMA x CD3アプタマーは、A10モノマーと同様の結合特性を示したが、PSMA陰性細胞への残留結合が減少したため、標的陽性細胞の特異性が改善された。試験された濃度ごとに、二重特異性アプタマーの信号強度はA10モノマーで測定されたものよりも優れており、ヘテロ二量体化により親和性が改善されたことを示唆している。

【0059】

別の実験では、同じアプタマーのCD3陽性JurkatおよびCD-3陰性Ramos細胞への結合が検討された。図11Aおよび11Bを参照されたい。予想通り、A10アプタマーはこれらの2つの細胞株に結合しなかった。抗CD3モノマーのRamos細胞への残留結合は、試験された最高濃度でのみ観察された。すべての二重特異性PSMA x CD3アプタマーは、同様の用量依存性結合を示したが、CD3陰性細胞への残留結合が強く低下したため、標的陽性細胞に対する特異性は優れていた。試験された濃度ごとに、二重特異性アプタマーの信号強度は抗CD3モノマーに対して測定されたものよりも劣っており、ヘテロ二量体化により親和性が低下したことを示唆している。

これらの結果は、ヘテロ二量化後、異なる標的に対して選択されたアプタマーの結合特性は、別々に評価したときに立体障害のために破壊されないことを示唆している。選択されたパートナーによっては、二量化時に各標的の特異性と親和性が向上することさえある。

【0060】

【実施例4】表面プラズモン共鳴で測定したPSMAおよびCD3を標的とする二重特異性アプタマーの結合

結合親和性の測定は、BiAcCore T200測定器 (GEヘルスケア社) を使用して実施した。アプタマーとCD3およびPSMAタンパク質の間の相互作用を分析するために、ビオチン化アプタマーの300共振ユニットをシリーズSセンサーチップSA (GEヘルスケア社) の製造者の指示書 (GEヘルスケア社) に従って固定化した。DPBSバッファーが実行バッファーとして使用された。相互作用は、30 μ l / 分の流量で「単一速度論サイクル」モードで、ヒトCD3 ϵ / γ 、CD3 ϵ / δ 、lgG1Fc、PSMA (AcroBiosystems社) の異なる濃度を注入することによって測定した。使用された最も高いアプタマー濃度は300 nMであった。他の濃度は3倍希釈によって得られた。相互作用のすべての運動データは、BIACore T200評価ソフトウェアを使用して評価された。

【0061】

単量体および二重特異性アプタマーのK_D値の比較は、二量化がその特定の標的に対する各サブユニットの結合特性を妨げないことを示している。PSMAとCD3 ϵ / γ の同時結合は、10 μ l / 分の流量で手動注入モードで記録し、飽和濃度で第1標的の溶液を注入し、次に第2標的の溶液を飽和濃度で注入することによって記録することができる。逆配列を有する第2の注入が行われる。どちらの配列においても、同じ強度の反応をもたらす各注射は、第1抗原に対する結合部位が占有されている間、二重特異性アプタマーの両腕が第2の標的を結合できることを示している。モノマーが標的溶液の両方の注射に応

答しないことは、二重特異性アプタマーが両方の標的を同時に結合できることを示している。

【0062】

〔実施例5〕PSMAおよびCD3に特異的な二重特異性アプタマーの生物活性

細胞毒性アッセイは、非刺激末梢血単核細胞（PBMC）に対して実施された。新しく調製したPBMCは、健康的なドナー（Etablissement Francais du Sang, Division Rhones-Alpes）から得られたバフィーコートから単離された。血液をDPBSで希釈した後、PBMCをFICOLL密度勾配（FICOLL-PAQUE PREMIUM 1.077 GE Healthcare社）で分離し、DPBSで2回洗浄し、RPMI-1640培地（Gibco Invitrogen社製）で再懸濁し、 5×10^6 細胞/mLの細胞密度を得た。これらのPBMCは効果細胞として使用された。

10

【0063】

LNCaP標的細胞は、細胞培養培地中の37℃で30分間2μMのカルセインAM（Trevigen Inc社、MD、Gaithersburg、アメリカ）で標識化された。カルセインAMフルオロクロームは、生きたLNCaP細胞内に閉じ込められ、リディレクトされた溶解時にのみ放出される色素である。細胞培養培地で2回洗浄した後、RPMI-1640培地で 5×10^5 細胞/mLの細胞密度に調整され、アッセイ反応ごとに50,000細胞の100μLアリコートを使用した。37℃/5%CO₂での標準反応は4時間持続し、 5×10^4 細胞カルセインAM標識化標的細胞を、 5×10^5 PBMCs（E/T比1:10）、20μLの二重特異性アプタマー溶液を総体積200μL中1μMで使用した。細胞毒性反応の後、培養培地中に放出された色素を蛍光リーダー（Varioskan Lux、ThermoFisher、マサチューセッツ州ウォルサム、米国）で定量し、細胞毒性化合物が存在しない対照反応と蛍光信号が完全に溶解した細胞（アプタマーは、Chemometec, Allerod, Denmarkから購入したA100試薬に置き換えられた）について決定された反応からの蛍光信号と比較された。これらの測定値に基づいて、特定の細胞毒性は、式：[蛍光（サンプル）-蛍光（対照）] / [蛍光（全溶解）-蛍光（対照）] × 100に従って、計算された。

20

【0064】

10:1の単一のE:T比を有するアプタマー100nMの存在下で4時間の培養後に得られた細胞毒性アッセイの結果を図12に示す。PSMAXCD3二重特異性RNA/DNAアプタマーでは、0~弱い特異細胞殺害活性(<10%)が観察された。RNA/RNAアプタマーA10 x ARACD3-3700006およびA10 x ARACD3-0010209で優れた特異的細胞毒性を測定し、LNCaP細胞の40~50%の殺傷を誘発した。CD3結合部分を欠いた対照単量体A10は、細胞毒性を誘発しなかった。

30

これらの結果は、設計されたアプタマースイッチは、エフェクターTリンパ球を標的細胞に誘発し、細胞溶解機械をリダイレクトし、特定の細胞集団を排除できることを示唆している。

【0065】

〔実施例6〕アンチCAR PNEアパタマー

ライブラリとプライマー

40

初期のRNAライブラリテンプレートとプライマーは、IDT（Coralville、米国アイオワ州）によって一本鎖DNA：

：5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-(N20)-TTTCTGCAGCGATTCTTGTTT-(N10)-GGAGAATGAGGAACCCAGTGCAG-3'〔鋳型、配列番号14〕、5'-TAATACGACTCACTATAGGGCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGA

T-3'（順方向プライマー；配列番号15）、

5'-CTGCACTGGGTTTCCTCATTCTCC-3'（逆方向プライマー；配列番号16）として合

成された。2次構造に対するプライマーの影響を最小限にするために、5'および3'不変のプライマー領域を補完する2つの短い「ブロッキング」シーケンス（IDTから購入）

を合成した。5'-ATCACCGACTGCCCATAGAGAGG-3'（順方向ブロッキング配列配列

50

番号17)、5'-CTGCACTGGGTTTCCTCATTCTCC-3' (逆方向ブロッキング配列配列番号18)。ライブラリの不変中心領域を補完する追加のビオチン化の「キャプチャ」配列もIDTによって合成された:5'-ビオチン-GTC-PEG-6 スペース-CAAGAATCGCTGCAG-3' (配列番号19)。すべての材料は250nmolスケールで注文され、脱塩精製を受けた。

【0066】

RNAアプタマー選択用のRNAライブラリを2'フルオロー(2'F)ピリミジンで修飾し、最終アプリケーションでの安定性を高めた。T7プライマーは、チタンTaq DNAポリメラーゼ(Clontech; マウンテンビュー、米国カリフォルニア州)とプライマー拡張のためのライブラリ鋳型配列と組み合わせた。プライマー拡張材料は、Durascribe^(R) T7転写キット(Epicentre; Madison、米国ウィスコンシン州)を使用して転写され、8M尿素(続編NE試薬、パートAおよびパートB)で変性ポリアクリルアミドで精製され、American Bioanalytical(Natick、米国マサチューセッツ州)から購入された。選択中、ライブラリは製造元のプロトコルに従ってSuperscript IV逆転写酵素(Invitrogen社; カリフォルニア州カールスバッド)を用いて逆転写され、Clontech社のチタンTaq DNAポリメラーゼを用いて増幅された。選択中、ライブラリは以下のPCRプロトコル(95℃で10秒、60℃では30秒、95℃で60秒間初期HotStartアクティベーションを実施)を使用して増幅された。その後、Durascribe^(R) T7転写キットを使用してRNAライブラリを転写し、ポリアクリルアミドゲル上で精製した(PAGE)。4℃で一晩精製後ライブラリ回収のためのゲル溶出バッファーは、0.5M NH₄OAc、1mM EDTA(いずれもTeknovaから購入)、0.2% SDS(Amrescoから購入)、pH 7.4に調製した。

【0067】

RNAアプタマー選択

RNAライブラリのスクリーニングは、メルティングオフアプローチを用いた選択の6ラウンドで行われた。選択の1~6ラウンドは、安定なHEK293T細胞株(ヒト胚腎臓-ATCC CRL-1573)上で実施され、細胞表面上のペプチドネオエピトープ(PNE)に対して方向付けされたGCN4(S25R14)CAR(キメラ抗原受容体)を発現し、安定的に形質導入されたHEK293T細胞で、負の選択ステップに対して抗CD19CARを包み込む(cell-SELEX)。HEK293T細胞株はアメリカ型細胞コレクションから得られ、DMEM培地(Gibco Invitrogen社)で培養され、10% FBS(Gibco Invitrogen社)と1%ペニシリン/ステプトマイシン(Gibco Invitrogen社)が補充された。すべての選択は、10%の血清マトリックスを補ったDMEM培地で実施され、SELEXラウンドのそれぞれは以下の手順を含んでいた:ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上のRNAライブラリの固定化、カウンター選択、標的との培養、標的を認識した配列の逆転写、PCR増幅、およびRNAへの転写。各ラウンドの前に、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズのアリコート(MyOne Streptavidin T1 Dynabeads^(TM))、典型的には、バイオチン化材料1ピコモルのバイオチン化材料をダイナビード^(TM) 20μgごとに使用し、必要な逼迫度に応じて量は異なる)は、200μL PBS-T(最終濃度は0.01%のTween 20、pH 7.4 洗浄バッファーで3回予備洗浄した。さらに、標的細胞および対標的細胞をトリプシン処理で採取し、5,000x gで遠心分離によりペレット化し、DPBSバッファーで2回洗浄してから200μLのDPBSバッファー中で懸濁した。1ラウンドあたりの細胞数の概略を表1に示す。RNAライブラリは、血清を含まないDMEM培地(90℃で1分間変性し、60℃で5分間、23℃で5分間アニーリングした)で、プライマーブロッキング配列と捕捉配列の2倍のライブラリモル量で再折り畳まれた。これは、一定のプライマー領域のアプタマーの二次構造への影響を最小限に抑え、ストレプトアビジン-ビオチン結合相互作用を介して磁気ビーズによってライブラリを捕捉し、外核細胞からアプタマーの末端を保護するために行われた。

【0068】

再折り畳みとプライマーブロッキングの後、室温で15分間培養によって磁性ビーズ上にライブラリを捕捉した。その後、磁気ビーズを溶液から分離し、37℃で200μLの選択バッファーで3回洗浄し、PBS-Tおよび非特異的に結合されたライブラリ種を除去した。固定化されたRNAライブラリを備えた磁気ビーズは、37℃で10⁶個の対セル調製中200μLでカウンター選択培養を行い、その結果、磁気ビーズから非特異的な配列の放出をもたらした。その後、非特異的なライブラリメンバーを廃棄し、磁気ビーズを200μLの選択バッファーで7分間6回洗浄し、1時間(DPBSで37℃で7分、3分間磁気的に分離し、上澄み液を廃棄し、そのプロセスを繰り返す)特定されていないライブラリメンバーは、肯定的な選択ステップの間、応答するために生き残ることができる可能性が減少する。肯定的な選択は、ラウンド1-4の間、37℃で60分間、およびラウンド5-6の間30分間、200μLの陽性細胞調製による磁気ビーズRNAライブラリの培養と、並列評価(表1の細胞カウント)から構成されていた。肯定的な選択が完了すると、標的を認識した配列を含有する上澄み液を磁気ビーズから分離し、回収した。その後、上澄み液は、磁気ビーズが完全に除去されたことを確認するために、第2の磁気分離を受けた。標的となったHEK293T CARPNE細胞を5,000×gで遠心分離によりペレット化し、200μLのDPBSバッファーで1回洗浄し、弱く会合したアダマー種を除去した。ライブラリは70℃での熱変性によって細胞から回収された。すべてのラウンドで回収されたライブラリは、MPC試薬(Lucigen Corp、米国ウィスコンシン州ミドルトン)によるタンパク質沈殿、エタノール沈殿、サンプルの濃縮を受け、8Mの尿素でPAGEを10%変性させることによって精製された。ライブラリは、製造元の指示に従って上付きIV逆転写酵素を用いて逆転写し、チタン^(R) Taq DNAポリメラーゼを使用して増幅し、製造元の指示に従ってデュラスクリブ(R) T7転写キットを使用して転写した。転写生成物は、8Mの尿素で10%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって精製された。ゲルスライスを切除し、ゲル溶出バッファー中で一晩4℃で溶出し、RNAライブラリの濃度をナノドロップー1000上の260nmで吸光度を測定して計算した。SELEXプロセスの連続ラウンド中、RNAライブラリの濃度と標的細胞番号は徐々に低下した。追加の並列評価と「クロスオーバーフィットネステスト」が実施され、選択後の生物情報学分析中に良好なアダマー候補の同定が容易になった。

【0069】

10

20

30

40

50

【表 1】

抗CAR PNE RNAアプタマーの各選択ラウンドに使用されるSELEX条件

ラウンド	対抗選択		洗浄	ポジティブな選択		入力ライブラリ
	[CAR CD19]	培養時間	7分／3分	[CAR PNE]	培養時間	ピコモル
1	1×10^6	30 分	6	1×10^6	60 分	1000
2	1×10^6	30 分	6	1×10^6	60 分	100
3	1×10^6	30 分	6	1×10^6	60 分	100
4	1×10^6	30 分	6	1×10^6	60 分	100
5	1×10^6	60 分	6	1×10^5	30 分	50
6	1×10^6	60 分	6	1×10^5	30 分	100
平行 (x)	1×10^6	60 分	6	1×10^6	30 分	100
平行 (+)	1×10^6	60 分	6	1×10^5	30 分	100

【0070】

アプタマー候補は、MiniSeq Mid Output (150サイクル) システム (Illumina社) を用いた次世代シーケンシングによって選ばれた。さらなるテストのためにいくつかのアプタマーが選択された。この目的のために、2'-デオキシ-2'-フルオロチミジン修飾RNAアプタマーをEurogentec-Kaneka (ベルギー、リエージュ) から、標準的な固相リンアミダイト化学によって合成されたHPLC-RP精製された単鎖オリゴとして購入した。ビオチンは、アプタマー配列とビオチン旗の間に16個の原子混合極性スペーサーを導入するビオチン-TEGとして、アプタマーの5'末端に添加された。分子量、純度、完全性はHPLC-MSによって検証された。これらのアプタマーの核酸配列を図13Aに示す。

【0071】

【実施例7】 ヒト細胞に発現する標的に対する抗CAR PNEアプタマーの親和性と特異性の決定

細胞に発現したタンパク質を標的とするために、ARAA-00100001、ARAA-05200001、ARAA-0060095、ARAA-01300011、ARAA-01700001アプタマーの親和性および特異性をフローサイトメトリーで評価した。これらの研究は、HEK293T、HEK293T-CAR CD19 (CD19抗原に対して方向付けされたCARに対するレンチウイルスベクトル符号化で形質導入されたHEK293T細胞株) およびHEK293T-CAR PNE (PNEペプチドに対して方向づけされたCARをコード化するレンチウイルスベクトルで形質導入されたHEK293T細胞株) 細胞に対して、DPBSバッファ中のビオチン化アプタマーで培養することによって行われ、FBSの5%で補充された。

【0072】

細胞はDMEM培地 (Gibco Invitrogen社) 中で培養され、使用前に10%のFBS (G

ibco Invitrogen社) および 1% ペニシリン/ステプトマイシン (Gibco Invitrogen社) を補足された。実験の前に、細胞 (2.5×10^5 細胞/ウェル) を 96 ウェルプレートで播種し、2500 rpm で 2 分間遠心分離した。上澄み液は廃棄され、ペレット化細胞は 37°C で予熱した DPBS-5% FBS バッファ 200 μ L で 2 回洗浄した。各洗浄ステップの後に、2500 rpm で 2 分間遠心分離を行った。アプタマーは 85°C で 5 分間変性し、直ちに 4°C の氷ブロックに 5 分間静置した。配列は、その後、2 つの異なる濃度範囲で希釈し: 30, 100 および 300 nM (5 アプタマー候補の一次試験) および 30, 50, 75 および 100 nM (ARAA-00100001 および ARAA-01700001 による染色の繰り返し)、続いて 100 nM フィコエリスリン標識ストレプトアビジン (Streptavidin-PE, eBioscience社) を各溶液に添加した。細胞はアプタマー希釈液 (100 μ L/ウェル) で再懸濁し、5% CO₂ 加湿雰囲気中 37°C で 30 分間培養した。

10

【0073】

対照として、細胞は、追加の試薬なしで PNE ペプチド (Alexa Fluor 488 ラベル、Provepharm社、マルセイユ、フランス)、ストレプトアビジン-PE (eBioscience社) またはそれぞれのバッファで培養した。培養後、細胞を 2 分間 2500 rpm で遠心分離し、結合されていない配列を有する上澄み液を廃棄した。ペレット化細胞を DPBS-5% FBS バッファ (200 μ L/ウェル) で洗浄し、2 回遠心分離して弱く非特異的に付着した配列をすべて除去した。その後、5% の CO₂ 加湿雰囲気中で、細胞を 1 mg/mL サーモン精子 DNA 溶液 (100 μ L/ウェル) で 37°C で洗浄した。30 分後、サーモン精液を 2500 rpm で 2 分間遠心分離によって除去し、細胞を DPBS-5% のバッファ (200 μ L/ウェル) でさらに 2 回洗浄した後、遠心分離を行った。その後、DNA 配列が結合した細胞を固定し (BD CellFix 溶液 #340181)、蛍光陽性細胞を YL-1 チャンネル上のフローサイトメトリ (attunenXt; Invitrogen, Inc.社) でカウントした。

20

【0074】

図 14A に、HEK293T、HEK293T-CAR CD19、HEK293T-CAR PNE への結合研究の結果を示す。アプタマー ARA-00100001 および ARAA-01700001 では、CAR PNE 陽性 HEK293T 細胞への用量依存的結合が、試験された最高濃度で信号の飽和に達することなく観察された。信号の強度は PNE ペプチド対照よりも強かった。両方のアプタマーの CAR PNE 陰性細胞への残留結合が 50 nM を超える濃度で観察された。ARAA-05200001、ARAA-0060095、ARAA-01300011 は、これらの 3 つのアプタマーが CAR PNE に特異的ではなかったことを示す、3 つの HEK293T 細胞株間の分染を示さなかった。アプタマー ARA-00100001 と ARAA-01700001 との結合研究をより広い濃度で繰り返し、一次実験の結果を確認した (図 14B および 14C 参照)。

30

【0075】

別の実験では、同じアプタマーの CAR PNE を発現するヒト PBMC への結合について研究した。PBMC は、実施例 5 で既に説明されているように献血者から単離され、RPMI-1640 培地 (Gibco Invitrogen社) で培養され、37°C、5% CO₂ で 10% FBS (Gibco Invitrogen社) と 1% ペニシリン/ステプトマイシン (Gibco Invitrogen社) とで補充した。PNE ペプチドに対して方向づけされた CAR のためのレンチウイルススペクトル符号化による 2 時間の形質導入の後、細胞は上記の方法に従って結合研究を行う前に、さらに 72 時間培養中に保持された。図 16 に示すように、300 nM を超える濃度で停滞期に到達した両方のアプタマーで、用量依存性の信号を測定した。信号の強度は PNE ペプチド対照よりも強かった。

40

【0076】

両方の実験は、PNE ペプチドを認識する CAR に対して選択された ARAA-00100001 と ARAA-01700001 アプタマーは、この特定のキメラ抗原受容体を発現するように設計されたヒト細胞上で発現されたそれらの標的を特異的に認識することができることを示している。

【0077】

50

【実施例 8】 CAR-PNE に特異的な アプタマー の血清安定性

抗 CAR PNE RNA アプタマー の安定性 (ARAA-00100001 および ARAA-01700001) は、5 % の胎児ウシ血清 (FBS) を含有する DPBS バッファー、10 % FBS または純粋な FBS を含有する RPMI 培地中で研究された。アプタマー は 85 °C で 5 分間変性した後、氷ブロック上で直ちに 4 °C まで 5 分間で冷却した。その後、5 % の FBS を補充した DPBS バッファー、10 % の FBS を補充した RPMI 培地、または純粋な FBS 血清中の 2 μM の最終濃度まで配列を希釈した。試料は 37 °C で 10 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、または 24 時間で培養した。対照サンプルは、37 °C で培養することなく新たに調製されたアプタマーを含んでいた。それぞれの緩衝液中のアプタマーの半減期は、変性電気泳動法を用いてアガロースゲル上での移動によって以下のように決定された：異なる培養時間のアプタマーサンプルをホルムアミド含有負荷バッファー（熱科学、ThermoScientific, Waltham, MA、米国）と 85 °C で 5 分間変性した後、RNA 染色マーカーとして SYBRsafe (Invitrogen) を含有する新しく調製した 3 % アガロースゲルに、各サンプルの 15 μL を配置した。アガロースゲル上の RNA アプタマーの移行は、20 分の間に 100 V を印加することにより、1XTBE バッファー (Invitrogen 社) で行われた。ゲルをバイオ・ラッド画像化システムを用いて可視化し、その結果を図 15 に示す。RNA 信号の強度が 4 時間後に減少し始めたため、両方のアプタマーは、培養の異なる条件下で少なくとも 2 時間安定であった。

【0078】**【実施例 9】 PSMA および CAR-PNE に特有の二重特異性 アプタマー の調製**

ARAA-00100001 と ARAA-01700001 アプタマーはベスクリック (Neuried、ドイツ) から、HPLC-RP で精製した標準的な固相リンアミダイト化学を介して合成された 2' F RNA オリゴとして購入された。

A10 2' F-RNA アプタマーは、その後のトリアゾール・ヌクレオチド間二量化のために、その 3' 末端でアジド基によって修飾された。ビオチンは、アプタマー配列とビオチン旗の間に 16 原子混合極性スペーサーを導入するビオチン-TEG として、A10 アプタマーの 5' -末端に添加された。ARAA-00100001 と ARAA-01700001 は、その後のトリアゾール・ヌクレオチド間二量化のために、アルキン基によって 5' -末端で修飾した。分子量、純度、完全性は HPLC-MS によって検証された。

実施例 1 で説明した手順は、二重特異性抗-PSMA A10 および抗-CAR PNE アプタマーを調製するために使用された。クリック反応の結果を図 8 A に示す。

【0079】**【実施例 10】 細胞に発現する標的に対する抗 PSMA × 抗 CAR PNE 二重特異性 アプタマー の親和性 および 特異性の 決定**

細胞に発現するタンパク質を標的にする抗 PSMA × 抗 CAR PNE アプタマーの親和性と特異性は、フローサイトメトリーによって評価された。これらの研究は、実施例 3 に記載されているように、5 % FBS 含有 DPBS バッファーの PSMA 陽性 LNCaP (ヒト前立腺癌-ATCC CRL-1740) および PSMA 陰性 PC-3 (ヒト前立腺癌-ATCC CRL-1435) に対して実施された。アプタマーは単一の濃度範囲内で試験された：30、100 および 300 nM。

PSMA 陽性細胞への結合研究の結果を図 10 A に示す。A10 単量体アプタマーとともに、A10 x ARAA-00100001、A10 x ARAA-01700001 の 2 個の RNA/RNA アプタマーを分析した。比較のために、試験された試薬の PSMA 陰性の PC-3 細胞への結合も測定した。

【0080】

A10 では、試験された最高濃度で信号の飽和に達することなく、PSMA 陽性 LNCaP 細胞への用量依存的結合が観察された。信号の強度は、抗体対照と同じくらい強かった。A10 モノマーの PC-3 細胞への残留結合は、試験された最高濃度でのみ観察された。二重特異性 PSMA x CAR PNE アプタマーはいずれも A10 モノマーと同様の結合特性を示したが、PSMA 陰性細胞への残留結合が減少したため、標的陽性細胞に対

する特異性が改善された。試験された濃度ごとに、二重特異性アプタマーの信号強度はA10モノマーで測定されたものよりも優れており、ヘテロ二量体化により親和性が改善されたことを示唆している。

実施例9と10の結果は、異なる標的に対して選択されたアプタマーのヘテロ二量化が、別々に評価されたときに、各部分の結合特性に著しい影響を与えないことを示唆している。

【0081】

【実施例11】CAR-PNEおよびPSMAに特異的な二重特異性アプタマーの生物活性細胞毒性アッセイは、非刺激末梢血単核細胞(PBMC)に対して行われる。新しく調製されたPBMCは、健康的なドナー(フランスの血液施設、ローンズ-アルペス部門)から得られた Buffy Coat から単離される。血液をDPBSで希釈した後、PBMCをFICOLL密度勾配(FICOLL-PAQUE PREMIUM 1.077 GEヘルスケア社)上で分離し、DPBSで2回洗浄し、RPMI-1640培地(Gibco Invitrogen社)で再懸濁し、 5×10^6 個の細胞/mLの細胞密度を得る。これらのPBMCは、CAR-PNE受容体を発現するレンチウイルスベクトルで形質導入される。これらのPBMC-CAR-PNEは効果細胞として使用される。

【0082】

LNCaP標的細胞は、細胞培養培地中の37℃で30分間、2μMカルセインAM(Trevigen Inc社, Gaithersburg, MD, 米国)で標識化される。カルセインAMフルオロクロームは、生きたLNCaP細胞内に閉じ込められ、リディレクトされた溶解時にのみ放出される色素である。細胞培養培地で2回洗浄した後、RPMI-1640培地で 5×10^5 個の細胞/mLの細胞密度を調整し、アッセイ反応ごとに100μLの50,000セルのアリコートを使用する。37℃/5%CO₂での標準反応は4時間持続し、 5×10^4 個の細胞のカルセインAM標識化標的細胞、 5×10^5 個のPBMCs-CAR-PNE(E/T比1:10)、20μLの二重特異性アプタマー溶液を総体積200μLで1μMで使用する。細胞毒性反応の後、培養培地中に放出された色素を蛍光リーダー(VarioSkan Lux, ThermoFisher, マサチューセッツ州ウォルサム、米国)で定量し、細胞毒性化合物が存在しない対照反応と蛍光信号が完全に溶解した細胞(アプタマーは、Chemometec, Allerod, デンマークから購入したA100試薬に置き換えられた)について決定された反応からの蛍光信号と比較される。これらの測定値に基づいて、特定の細胞毒性は、式: [蛍光(サンプル) - 蛍光(対照)] / [蛍光(全溶解) - 蛍光(対照)] $\times 100$ に従って、計算される。

【0083】

10:1の単一のE:T比を有するアプタマー100nMの存在下で4時間の培養後に得られた細胞毒性アッセイの結果が決定される。特異的な細胞毒性は、RNA/RNAアプタマーA10xPNEで測定され、30%を超えるLNCaP細胞の殺傷を誘発する。PNE結合部分を欠く対照単量体A10は、細胞毒性を誘発しない。

この結果から、設計されたアプタマースイッチは、エフェクターTリンパ球を標的細胞に誘発し、細胞溶解機械をリダイレクトし、特定の細胞集団を排除できることを示すことができる。

【0084】

【実施例12】抗CD3x抗PSMAアプタマーを用いた前臨床モデルにおけるがんの処置マウスにおける単量体アプタマーと比較して、異なる多量性アプタマー構造物のinvivoにおける有効性および毒性を評価する。PSMA陽性腫瘍を有する成体マウスは、CD3およびPSMAに特異的に結合するアプタマーを投与され、異なるマウス群においては、アプタマーは単量体型または多量体型のいずれかである。有効性は、腫瘍の大きさ、腫瘍の増殖およびその速度、ならびに処置群と対照群における生存率を測定することによって評価される。毒性は、処置群と対照群における副作用の発生率によって評価される。

【0085】

【実施例 13】CAR-T アプタマースイッチを用いた前臨床モデルにおけるがんの処置マウスにおける単量体アプタマーと比較して、スイッチアプタマー構造物の *in vivo* の有効性および毒性を評価する。多量体アプタマーは、CAR-T 細胞ベースの治療薬の活性をオンにするスイッチとして調製されている。腫瘍を有する成体マウスは、最初に CAR-PNE で形質導入された T 細胞を注射され、そして PSMA、または HER2、または CD19、または CD20 または CD22 腫瘍関連標的と融合した抗 CAR-PNE アプタマーから作製された多量体アプタマーを注入される。有効性は、腫瘍の大きさ、腫瘍の増殖およびその速度、ならびに処置群と対照群における生存率を測定することによって評価される。毒性は、処置群と対照群における副作用の発生率によって評価される。

【0086】

10

本明細書で使用する場合、「から本質的になる」は、請求項の基本的かつ新規の特徴に実質的に影響を及ぼさない物質またはステップの包含を許容する。本明細書では、用語「含む (comprising)」の記述は、特に組成物の構成成分の説明、または装置の構成要素の説明において、「から本質的になる (consisting essentially of)」または「からなる (consisting of)」と置き換えることができる。

本技術を特定の好ましい実施態様と共に説明したが、当業者であれば、前述の明細書を読んだ後に、本明細書に記載の組成物および方法に対して、さまざまな変更、同等物との置換およびその他の改変を行うことができる。

【0087】

参考文献

20

Dassie JP, et al., 「最適化されたアプタマー-siRNA キメラの全身投与は、PSMA 発現腫瘍の退縮を促進する」 *Nat. Biotechnol* 27, 839 (2009).

Di Stasi A, et al., 「養子細胞療法のための安全スイッチとしての誘導アポトーシス」 *N Engl J Med* 365, 1673 (2011).

McNamara JO, et al., 「アプタマー-siRNA キメラによる siRNA の細胞型特異的な輸送」 *Nat. Biotechnol* 24, 1005 (2006).

Rodgers DT, et al., 「B 細胞悪性腫瘍に対する CAR-T 細胞のスイッチを介した活性化および再標的化」 *PNAS* 113, E459 (2016).

Straathof KC, et al., 「T 細胞治療のための誘導性カスパーゼ 9 安全スイッチ」 *Blood* 105, 4247 (2005).

30

Tamada K, et al., 「タグ抗体を用いた様々ながんタイプへの遺伝子改変 T 細胞リダイレクト」

Clin Cancer Res 18, 6436 (2012). Urbanska K, et al., 「新規の T 細胞抗原受容体の使用による、がんの養子免疫療法の普遍的戦略」

Cancer Res 72, 1844 (2012a). Urbanska K, et al., 「抗原標的化のための新規ユニバーサル免疫受容体の開発：無限の彼方へ」 *OncoImmunology* 1, 777 (2012b).

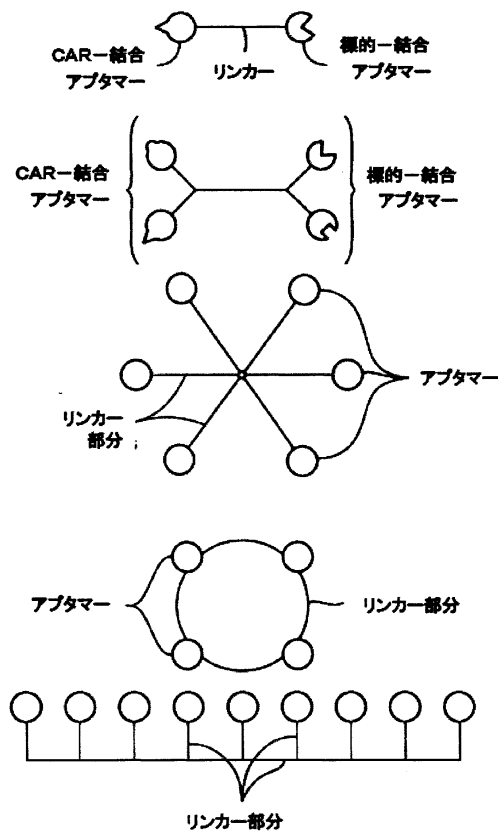
Wu CY, et al., 「低分子ゲートキメラ受容体を介した治療用 T 細胞の遠隔制御」 *Science* 350, aab4077 (2015).

40

50

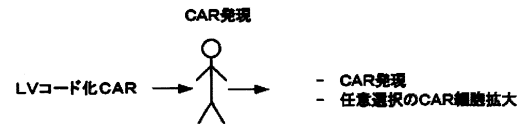
【図面】

【図 1】

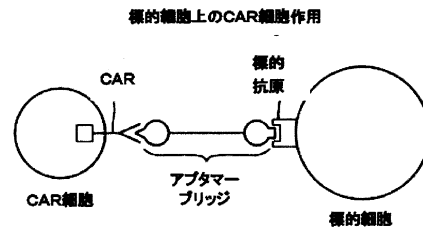


【図 2】

【図2A】



【図2B】



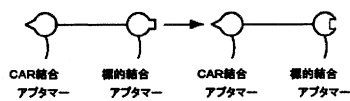
【図2C】

- 免疫反応の調節
- 追加・取り消しブリッジ
 - 投与計画の変更
 - CAR発現のさらなるラウンド
 - ブリッジの投与と調整のためのコンパニオン診断アプタマーの使用

【図 3】

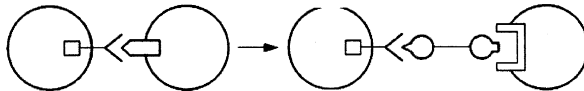
【図3A】

異なる標的特異性でのアプタマーブリッジの置換



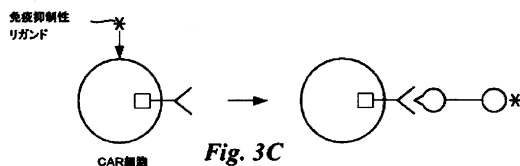
【図3B】

CARの新たな標的への適合



【図3C】

抑制性リガンドを免疫刺激に変換



【図 4】

配列番号1	GCN4	NYHLENEVARLKKL
配列番号2	15-mer SEB	ESQDPKPKDELHKSS
配列番号3	HBV pre-S2	PRVRGLYFPAGG
配列番号4	BHV1 gpD	MEEKGYEPP
配列番号5	GmpD	DRTNNQVKA
配列番号6	GLV3	AQEPPRQ
配列番号7	SARS-CoV	PTDSTDNNQNGGRNGARPKQRBPQ
配列番号8	A10	GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCAUGUUUACGUCACUCCU
配列番号9	CELTIC_1s	TTTCGGGTGGGGTTTGGACCGGGCTGCGCAGGGATTG
配列番号10	CELTIC_19s	TACCGCGGGATTGGCTCGGGCTGCGCTCGTAATCTGA
配列番号11	CELTIC_コア	GGGTTTGGCATCGGGCTGGC
配列番号12	ARACD3-3700006	UUAAGACUUUAAUGUCUAUUUUCGACGCAUUCUUGUUUUAUUAACAUA 50
配列番号13	ARACD3-0010209UCUAAAGCAUAUUUGUUUGCUUUUGCAGCGAUUCUGUUUUGCAUUAUUA	

ペプチドネオ抗原およびモノマーアプタマーの配列

10

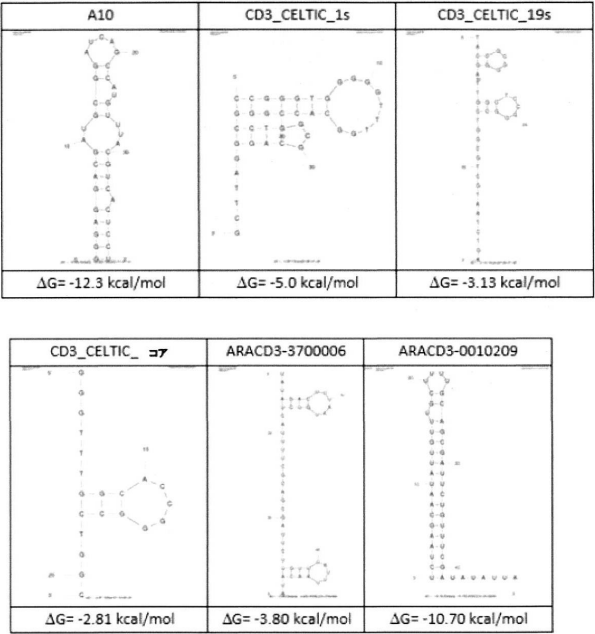
20

30

40

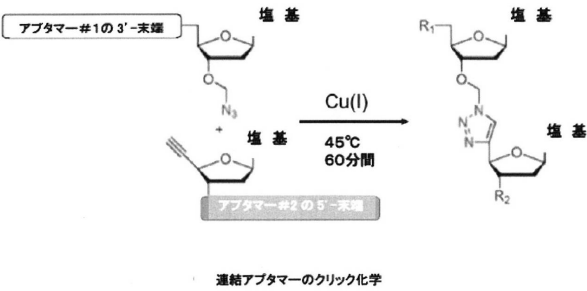
50

【図 5】



モノマーアプタマーの予測二次構造

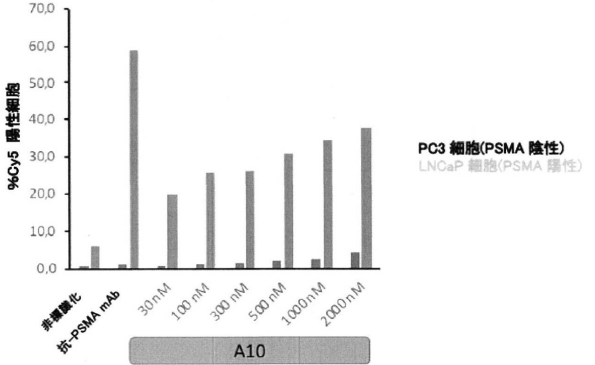
【図 6】



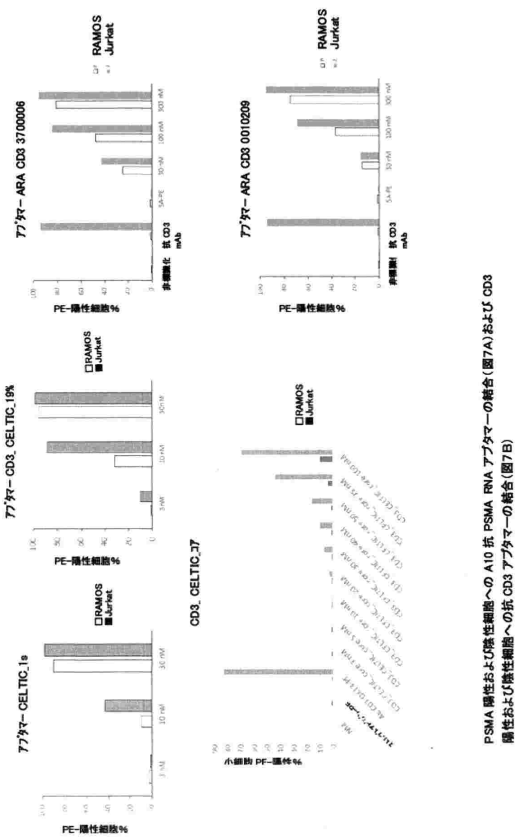
10

20

【図 7 A】



【図 7 B】



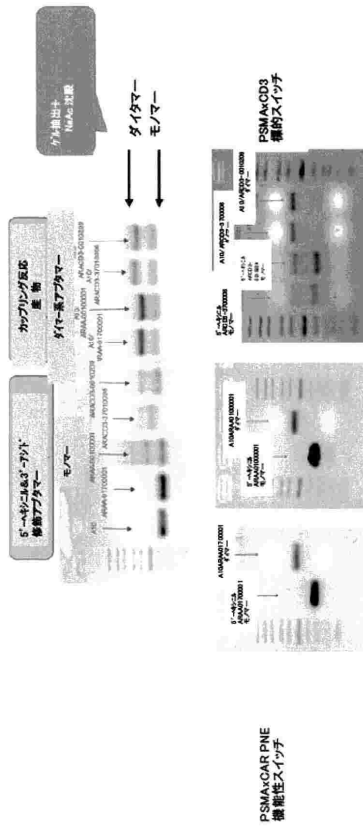
PSMA 陽性および陰性細胞への A10 抗 PSMA RNA アプタマーの結合 (図 7A) および CD3 陽性および陰性細胞への抗 CD3 アプタマーの結合 (図 7B)

30

40

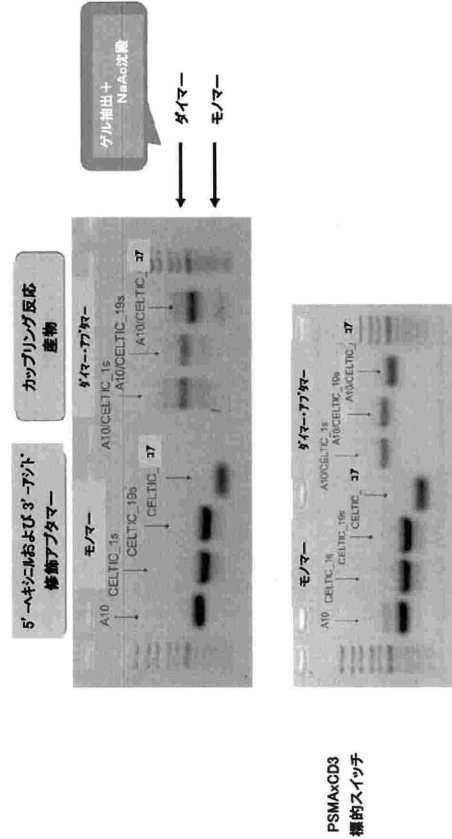
50

【図 8 A】



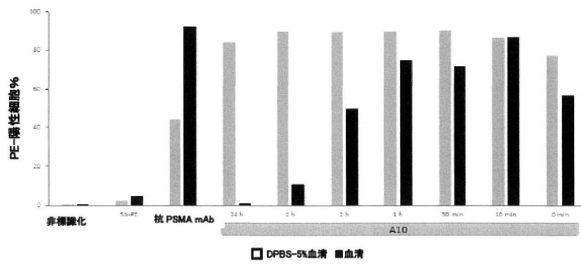
抗 CAR-PNE、抗 PSMA および抗 CD3 モノマー、ならびに抗 PSMAx 抗 CAR-PNE および抗 PSMAx 抗 CD3 アプタマーダイマーのアガロースゲルでの可視化。
RNA / RNA 二重特異性アプタマー。

【図 8 B】



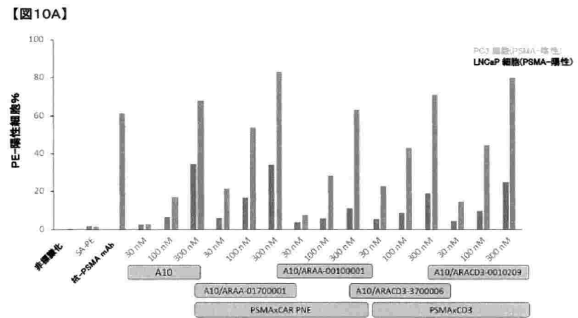
RNA 抗 PSMA および DNA 抗 CD3 モノマーおよび RNA-DNA 抗 PSMAx 抗 CD3 アプタマーダイマーのアガロースゲルでの可視化。
DNA / RNA 二重特異性アプタマー。

【図 9】

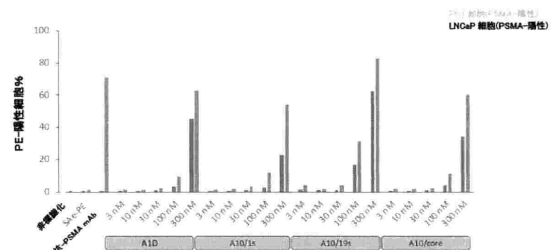


血清中のA10 RNAアプタマーの安定性

【図 10】



【図10B】



A10 PSMA 結合特性は二量体化によって変化しない。PSMA 陽性細胞への結合は、RNA アプタマー(抗 CD3 および抗 CAR PNE、図 10A)または DNA アプタマー(抗 CD3 DNA アプタマー、図 10B)のいずれかによる二量体化後も維持される。

10

20

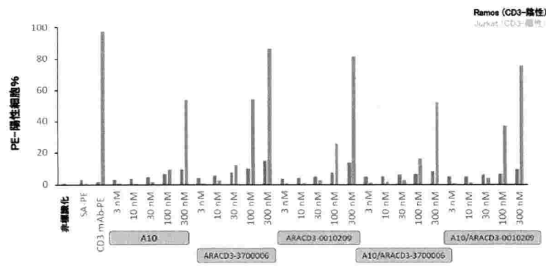
30

40

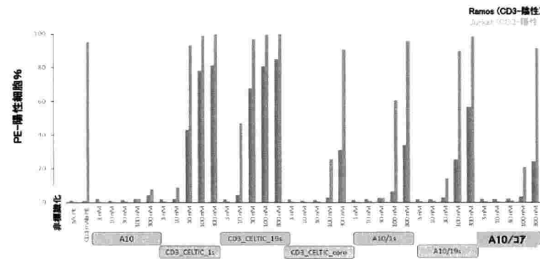
50

【図 1 1】

【図 11A】

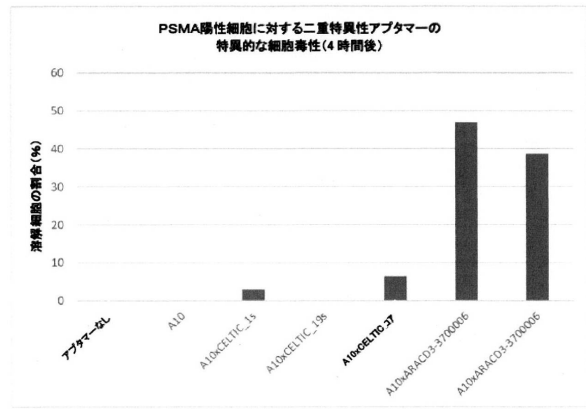


【図 11B】



抗 CD3 RNA (図 11A) および DNA (図 11B) アプタマーの結合特性は二量体化によって変化しない: CD3 陽性細胞への結合は、抗 PSMA RNA ベースのアプタマーによる二量体化後も維持される

【図 1 2】



10

【図 1 3】

1 56

AFAA-00100001 (1) UAGACUGCAUUCUGCAGCGAUUCUGUUGUUGCAAAAUAGCUGUCUAA-----

AFAA-01300011 (1) UAGACUGCAUUCUGCAGCGAUUCU--UUUUGCAAAAUAGCUGUCUAA-----

AFAA-01700001 (1) UAGACCG---AUUUCUGCAGCGAUUCUGUUGUUGCAAAAUAGCUGUCUAA-----

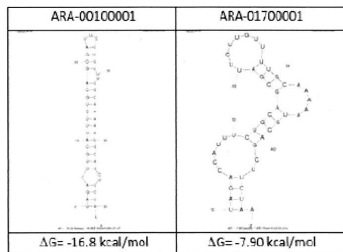
AFAA-00600095 (1) UAGACUGCAUUCUGCAGCGAUUCUGUUGUUGS-AAAA--GCAG-UUCUAA-----

AFAA-05200001 (1) UAGACCG--CUUUCUGCAGCGAUUCUGUUGUUGCAAAA-UAGCUGUCUAA-----

***** ***** *

抗-CAR-PNE RNAアプタマーの配列

【図 13A】

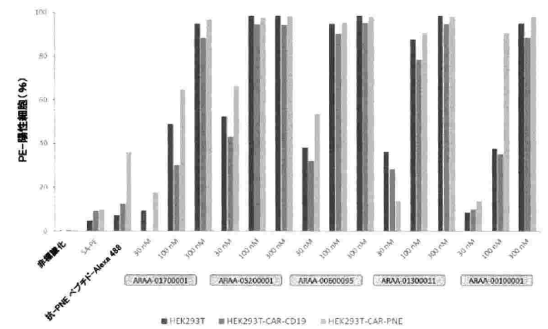


2つの抗-CAR-PNE RNAアプタマーの予測二次構造

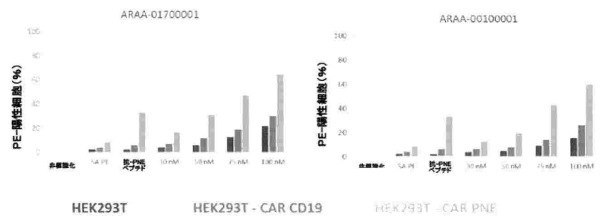
【図 13B】

【図 1 4】

【図 14A】



30



【図 14B】

【図 14C】

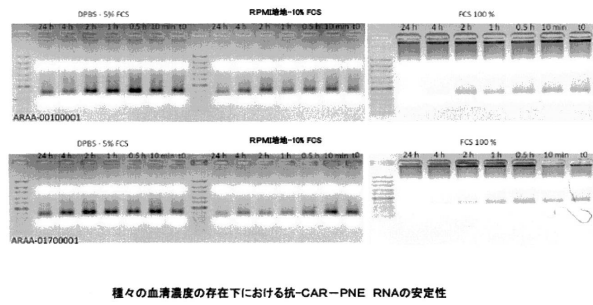
受容体を発現しない細胞への抗 CAR PNE RNA アプタマーの結合

CD19 CAR と PNE CAR。

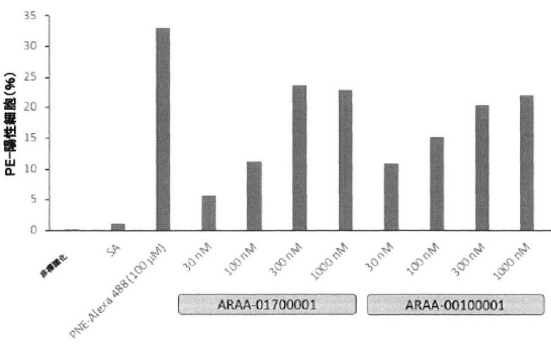
40

50

【図 15】



【図 16】



CAR-PNEで形質導入されたPBMCに対する抗-CAR-PNE RNAアプタマーの結合

【配列表】

0007642236000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 K	35/76	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	
		C 0 7 K	19/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

ー・アルシャンジュ 1 3

(72)発明者 ムルラーヌ, フレデリック

フランス国 0 6 0 0 0 ニース, アベニュー・デ・オランジェ 1 7

(72)発明者 バウシュ, セシル

フランス国 7 5 0 1 3 パリ, リュー・オーギュスト・ペレ 1 4

(72)発明者 バイアン, ルノー

フランス国 9 4 2 5 0 ジャンティイ, リュー・デ・シャン・エリゼ 4 9

(72)発明者 ビショップ, フィリップ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 4 0 4, フォスター・シティ, ブリッジポイント・パークウェイ 1 9 2 7, ナンバー 3 0 7, ケア・オブ・アラティンガ・バイオ・インコーポレーテッド

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 0 0 0 2 4 (J P, A)

国際公開第 2 0 1 7 / 1 4 3 1 5 0 (W O, A 1)

国際公開第 2 0 1 0 / 1 4 4 2 9 5 (W O, A 1)

Silvia Arcangeli, Switchable chimeric antigen receptor T cells: a novel universal chimeric antigen receptor platform for a safe control of T-cell activation, Transl Cancer Res, 2016年, 5, S174-S177, doi:10.21037/tcr.2016.07.23

David T. Rodgers, Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies, Proc.NAS, 2016年, 113, E459-E468., doi:10.1073/pnas.1524155113

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C 0 7 K

C 1 2 N 1 / 0 0 - 5 / 2 8

C 1 2 Q

MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / CAPLUS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)