

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第6538684号
(P6538684)

(45) 発行日 令和1年7月3日(2019.7.3)

(24) 登録日 令和1年6月14日(2019.6.14)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06

請求項の数 24 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-532594 (P2016-532594)	(73) 特許権者	507299817
(86) (22) 出願日	平成26年11月21日 (2014.11.21)		ユーシーエル ビジネス ビーエルシー
(65) 公表番号	特表2016-538855 (P2016-538855A)		イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティ
(43) 公表日	平成28年12月15日 (2016.12.15)		ービー ロンドン, トットナム コート
(86) 国際出願番号	PCT/GB2014/053452		ロード 97, ザ ネットワーク ビ
(87) 国際公開番号	W02015/075469		ルディング
(87) 国際公開日	平成27年5月28日 (2015.5.28)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成29年9月5日 (2017.9.5)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	1320573.7	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成25年11月21日 (2013.11.21)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100181674
(31) 優先権主張番号	1410934.2		弁理士 飯田 貴敏
(32) 優先日	平成26年6月19日 (2014.6.19)	(74) 代理人	100181641
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

T細胞であって、第1のキメラ抗原受容体(CAR)および第2のCARを該細胞表面で共発現し、各CARが、

(i) 抗原結合ドメイン

(ii) スペーサー

(iii) 膜貫通ドメイン、および

(iv) エンドドメイン

を含み、該第1のCARおよび該第2のCARの該抗原結合ドメインが異なる抗原に結合し、該第1のCARの該スペーサーが該第2のCARの該スペーサーとは異なり、該第1のCARまたは該第2のCARの一方が活性化エンドドメインを含む活性化CARであり、他方のCARがライゲーション・オフ阻害性エンドドメインを含む阻害性CARのいずれかであり、該ライゲーション・オフ阻害性エンドドメインは、CD148またはCD45からのエンドドメインの全部または一部を含む、T細胞。

【請求項2】

前記第1のCARおよび前記第2のCARがそれらのそれぞれの標的抗原と結合したとき、該第1のCARおよび該第2のCARが前記T細胞膜上で空間的に分離されるように、該第1のCARの前記スペーサーが、該第2のCARの前記スペーサーとは異なる長さおよび/または電荷および/またはサイズおよび/または立体配置および/またはグリコシル化を有する、請求項1に記載のT細胞。

【請求項 3】

第 1 の前記スパーサーまたは第 2 の前記スパーサーのいずれかが C D 8 ストックを含み、他方のスパーサーが I g G 1 のヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメインを含む、請求項 2 に記載の T 細胞。

【請求項 4】

前記第 1 の C A R または前記第 2 の C A R の一方が、活性化エンドドメインを含む活性化 C A R であり、他方の C A R が、ライゲーシオン・オフ阻害性エンドドメインを含む阻害性 C A R であり、その阻害性 C A R が、阻害性 C A R ライゲーシオンの非存在下では該活性化 C A R による T 細胞活性化を阻害するが、該阻害性 C A R がライゲーシオンされたときには、該活性化 C A R による T 細胞活性化を有意に阻害しない、請求項 2 または 3 に記載の T 細胞。

10

【請求項 5】

前記第 1 の C A R の前記抗原結合ドメインが C D 5 と結合し、前記第 2 の C A R の前記抗原結合ドメインが C D 1 9 と結合する、請求項 4 に記載の T 細胞。

【請求項 6】

2 つより多くの抗原の区別可能なパターンを担持する、T 細胞などの細胞により特異的に刺激されるような、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の C A R を 2 つより多く含む T 細胞であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の第 1 の C A R および第 2 の C A R を該細胞表面で共発現する、T 細胞。

【請求項 7】

20

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の前記第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) および前記第 2 のキメラ抗原受容体 (C A R) の両方をコードする核酸。

【請求項 8】

次の構造：

A g B 1 - スパーサー 1 - T M 1 - エンド 1 - c o e x p r - A b B 2 - スパーサー 2 - T M 2 - エンド 2

(ここで、

A g B 1 は、前記第 1 の C A R の前記抗原結合ドメインをコードする核酸であり；

スパーサー 1 は、該第 1 の C A R の前記スパーサーをコードする核酸であり；

T M 1 は、該第 1 の C A R の前記膜貫通ドメインをコードする核酸であり；

30

エンド 1 は、該第 1 の C A R の前記エンドドメインをコードする核酸であり；

c o e x p r は、両 C A R の共発現を可能にする核酸であり；

A g B 2 は、前記第 2 の C A R の前記抗原結合ドメインをコードする核酸であり；

スパーサー 2 は、該第 2 の C A R の前記スパーサーをコードする核酸であり；

T M 2 は、該第 2 の C A R の前記膜貫通ドメインをコードする核酸であり；

エンド 2 は、該第 2 の C A R の前記エンドドメインをコードする核酸である)

を有し、T 細胞で発現されるときに、該第 1 の C A R および該第 2 の C A R が該 T 細胞表面で共発現されるような、切断部位で切断されるポリペプチドをコードする、請求項 7 に記載の核酸。

【請求項 9】

40

c o e x p r が、自己切断性ペプチドをコードする、請求項 8 に記載の核酸。

【請求項 10】

相同組換えを回避するため、代替的コドンが、同じかまたは類似したアミノ酸をコードする領域で使用される、請求項 8 または 9 に記載の核酸。

【請求項 11】

(i) 請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の前記第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする第 1 の核酸であって、以下の構造：

A g B 1 - スパーサー 1 - T M 1 - エンド 1

(ここで、

A g B 1 は、該第 1 の C A R の前記抗原結合ドメインをコードする核酸であり；

50

スペーサー 1 は、該第 1 の C A R の前記スペーサーをコードする核酸であり；
T M 1 は、該第 1 の C A R の前記膜貫通ドメインをコードする核酸であり；
エンド 1 は、該第 1 の C A R の前記エンドドメインをコードする核酸である）
を有する核酸；および

(i i) 請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の前記第 2 のキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする第 2 の核酸であって、以下の構造：

A g B 2 - スペーサー 2 - T M 2 - エンド 2

(A g B 2 は、該第 2 の C A R の前記抗原結合ドメインをコードする核酸であり；
スペーサー 2 は、該第 2 の C A R の前記スペーサーをコードする核酸であり；
T M 2 は、該第 2 の C A R の前記膜貫通ドメインをコードする核酸であり；
エンド 2 は、該第 2 の C A R の前記エンドドメインをコードする核酸である)
を有する核酸

を含む、キット。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の前記第 1 の核酸を含む第 1 のベクターおよび請求項 1 1 に記載の前記第 2 の核酸を含む第 2 のベクターを含む、キット。

【請求項 1 3】

前記第 1 および第 2 のベクターが組込み型ウイルスベクターまたはトランスポゾンに基づくベクターである、請求項 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 4】

請求項 7 ～ 1 0 のいずれかに記載の核酸を含むベクター。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 によるレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターまたはトランスポゾンに基づくベクター。

【請求項 1 6】

請求項 7 ～ 1 0 のいずれかに記載の核酸；請求項 1 1 に記載の第 1 の核酸および第 2 の核酸；および / または請求項 1 2 に記載の第 1 のベクターおよび第 2 のベクターまたは請求項 1 4 または 1 5 に記載のベクターを、T 細胞に導入する工程を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の T 細胞を製造する方法。

【請求項 1 7】

前記 T 細胞が被験体から単離された試料に由来する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の複数の T 細胞を含む医薬組成物。

【請求項 1 9】

疾患を処置および / または予防するための請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の医薬組成物であって、
前記 T 細胞が、被験体から単離された T 細胞含有試料由来の細胞であり、
該 T 細胞含有試料由来の該 T 細胞は、請求項 7 ～ 1 0 のいずれかに記載の核酸；請求項 1 1 に記載の第 1 の核酸および第 2 の核酸；請求項 1 2 または 1 3 に記載の第 1 のベクターおよび第 2 のベクターまたは請求項 1 4 または 1 5 に記載のベクターで形質導入またはトランスフェクションされていることを特徴とし、
形質導入またはトランスフェクションされた T 細胞が、該被験体に投与されることを特徴とする、
医薬組成物。

【請求項 2 1】

前記疾患ががんである、請求項 1 9 または 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

疾患を処置および / または予防するための医薬の製造における請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の T 細胞の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 2 3】

第 1 のキメラ抗原受容体 (CAR) および第 2 の CAR を細胞表面で共発現するナチュラルキラー (NK) 細胞であって、各 CAR が、

(i) 抗原結合ドメイン；

(ii) スペーサー；

(iii) 膜貫通ドメイン；および

(iv) エンドドメイン

を含み、該第 1 の CAR および該第 2 の CAR の該抗原結合ドメインが異なる抗原に結合し、該第 1 の CAR の該スペーサーが該第 2 の CAR の該スペーサーとは異なり、該第 1 の CAR または該第 2 の CAR の一方が、活性化エンドドメインを含む活性化 CAR であり、他方の CAR が、ライゲーション・オフ阻害性エンドドメインを含む阻害性 CAR であり、該ライゲーション・オフ阻害性エンドドメインは、CD148 または CD45 からのエンドドメインの全部または一部を含む、ナチュラルキラー細胞。

10

【請求項 2 4】

前記第 1 の CAR および前記第 2 の CAR をコードする核酸により血液試料を生体外で形質導入することにより作製される、請求項 1 に記載の CAR 発現 T 細胞および / または請求項 2 3 に記載の CAR 発現 NK 細胞を含む細胞組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

(発明の分野)

本発明は、複数のキメラ抗原受容体 (CAR) を含む細胞に関するものである。該細胞は、標的細胞による 2 またはそれより多くの抗原の発現 (または非発現) パターンに差異がある故に、該標的細胞を特異的に認識することができるものであり得る。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

若干の免疫治療剤が、治療用モノクローナル抗体 (mAb)、免疫コンジュゲート mAb、放射性コンジュゲート mAb および二重特異性 T 細胞エンゲージャーを含め、がん処置での使用について記載されている。

30

【0003】

典型的には、これらの免疫治療剤は、単一の抗原を標的とし、例えば、リツキシマブであれば CD20 を標的とし、ミエロタलगであれば CD33 を標的とし、そしてアレムツズマブであれば CD52 を標的とする。

【0004】

しかしながら、がんに関し有効な形での単一の抗原の存在 (または非存在) について記載されるのは比較的まれであることから、特異性が欠如することになり得る。

【0005】

ほとんどのがんは、単一抗原に基づいた正常組織からは分化され得ない。このため、相当な「標的に対するが、腫瘍外の (on-target off-tumour)」毒性が生じることにより、正常組織は該治療により損傷を受ける。例えば、リツキシマブで CD20 を標的として B 細胞リンパ腫を処置していると、正常な B 細胞区画全体が枯渇し、CD52 を標的として慢性リンパ性白血病を処置していると、リンパ系区画全体が枯渇し、CD33 を標的として急性骨髄性白血病を処置していると、骨髄系区画全体が損傷を受けるなどである。

40

【0006】

予想された「on-target off-tumour」毒性の問題は、臨床試験により確認されている。例えば、ERBB2 を標的とする手法は、肺および肝臓への転移がある結腸がんの患者に死をもたらした。ERBB2 は、一部の患者では結腸がんで過剰発現されているが、心臓および正常な脈管構造を含むいくつかの正常組織でも発現されてい

50

る。

【0007】

一部のがんについては、2つのがん抗原の存在を標的とする方が、1つを標的とするよりも選択性が高く、したがって、より有効であり得る。例えば、B細胞性慢性リンパ性白血病（B-CLL）は、現行ではCD19を標的とすることにより処置されるよくある白血病である。これによりリンパ腫は処置されるが、B細胞区画全体が枯渇するため、該処置は、相当な毒性作用を有することになる。B-CLLは、CD5およびCD19が共発現するという点で異常な表現型を有する。CD5およびCD19を発現する細胞のみを標的とすることにより、on-target off-tumour毒性をかなり低減させることが可能となる。

10

【0008】

したがって、標的指向性を高めて多くのがんと関連するマーカー発現の複雑なパターンを反映させることができる免疫治療剤が要望されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

キメラ抗原受容体（CAR）

キメラ抗原受容体は、モノクローナル抗体（mAb）の特異性をT細胞のエフェクター機能に結び付けるタンパク質である。キメラ抗原受容体の通常形態は、抗原認識性アミノ末端、スペーサー、T細胞生存および活性化シグナルを伝達する複合エンドドメインにす

20

【0010】

これらの分子の最も一般的な形態は、シグナル伝達エンドドメインにスペーサーおよび膜貫通ドメインを介して融合された、標的抗原を認識するモノクローナル抗体から誘導された1本鎖可変フラグメント（scFv）の融合体である。上記分子は、その標的のscFvによる認識に応答してT細胞の活性化をもたらす。T細胞がかかるCARを発現すると、T細胞はその標的抗原を発現する標的細胞を認識し、殺す。いくつかのCARが腫瘍関連抗原に対して開発されており、かかるCAR発現T細胞を用いる養子移入手法は、現在様々ながんの処置についての臨床試験にかけられている。

30

【0011】

しかしながら、CAR発現T細胞の使用はまた、on-target, off-tumour毒性と関連している。例えば、炭酸脱水酵素（carboxy anhydrase）IX（CAIX）を標的として腎細胞癌を処置するCARに基づく手法は、胆管上皮細胞に対する特異チャレンジにより引き起こされると考えられる肝臓毒性をもたらした（Lamersら（2013）Mol. Ther. 21:904-912）。

【0012】

二重標的化CAR手法

「on-target, off-tumour」毒性の問題に取り組むため、二重抗原特異性（specificity）をもつCAR T細胞が開発された。この「二重標的化」手法では、2つの相補的CARが同じT細胞集団で共発現され、それぞれ離れた腫瘍標的に指向され、相補的シグナルを提供すべく操作が加えられている。

40

【0013】

Wlikieら（2012 J Clin Immunol 32:1059-1070）は、ErbB2特異的CARおよびMUC1特異的CARが共発現される二重標的化手法を記載している。ErbB2特異的CARは、CD3シグナルのみを提供し、MUC1特異的CARはCD28共刺激シグナルのみを提供した。相補的シグナル伝達は両抗原の存在下で行われ、IL-2産生を招くことが見出された。しかしながら、シグナル伝達が、融合されたCD28+CD3エンドドメインにより送達される対照CAR操作T細胞と比較すると、IL-2産生は控えめであった。

50

【 0 0 1 4 】

類似した手法が K l o s s ら (2 0 1 3 N a t u r e B i o t e c h n o l . 3 1 : 7 1 - 7 5) により記載されており、その手法では、P S M A に特異的なキメラ共刺激受容体と組み合わせて C D 3 媒介活性化シグナルを提供する C D - 1 9 特異的 C A R を使用した。この「共 C A R (c o - C A R) 」設計によると、C A R T 細胞は、一方の抗原をもつ標的細胞との遭遇のときには活性化シグナルを、および他方の抗原をもつ標的細胞との遭遇のときには共刺激シグナルを受信し、両抗原をもつ標的細胞と遭遇すると活性化 (a c t i v a t o r y) シグナルおよび共刺激シグナルの両方を受信するだけである。

【 0 0 1 5 】

この手法は、2つの抗原をもつ標的細胞のみに C A R 活性を限定する初期の試みを代表する。しかしながら、この手法は制限されている：C A R T 細胞活性は両抗原を発現する標的に対して非常に大きくなるが、C A R T 細胞は、依然として活性化 C A R により認識された抗原のみを発現する標的を殺す；さらに、共刺激の結果、標的細胞の放出後長く続く T 細胞に対する作用が延長される。このため、ダブル陽性 T 細胞に対する活性と同等であるシングル抗原陽性 T 細胞に対する活性は、例えばシングル陽性組織がダブル陽性腫瘍からの遊走路に隣接しているかまたは該遊走路中にある状況では可能であり得る。

【 0 0 1 6 】

したがって、T 細胞活性化が全面的に両抗原を発現する標的細胞に限定されている、o n - t a r g e t o f f - t u m o u r 毒性が低減された、改善された C A R に基づく治療手法が要望されている。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項 目 1)

T 細胞であって、第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) および第 2 の C A R を該細胞表面で共発現し、各 C A R が、

(i) 抗原結合ドメイン

(i i) スペーサー

(i i i) 膜貫通ドメイン、および

(i v) エンドドメイン

を含み、該第 1 の C A R および該第 2 の C A R の該抗原結合ドメインが異なる抗原に結合し、該第 1 の C A R の該スペーサーが該第 2 の C A R の該スペーサーとは異なり、該第 1 の C A R または該第 2 の C A R の一方が活性化エンドドメインを含む活性化 C A R であり、他方の C A R がライゲーシオン・オフ阻害性エンドドメインを含む阻害性 C A R のいずれかである、T 細胞。

(項 目 2)

前記第 1 の C A R および前記第 2 の C A R がそれらのそれぞれの標的抗原と結合したとき、該第 1 の C A R および該第 2 の C A R が前記 T 細胞膜上で空間的に分離されるように、該第 1 の C A R の前記スペーサーが、該第 2 の C A R の前記スペーサーとは異なる長さおよび / または電荷および / またはサイズおよび / または立体配置および / またはグリコシル化を有する、項目 1 に記載の T 細胞。

(項 目 3)

第 1 の前記スペーサーまたは第 2 の前記スペーサーのいずれかが C D 8 ストックを含み、他方のスペーサーが I g G 1 のヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメインを含む、項目 2 に記載の T 細胞。

(項 目 4)

前記第 1 の C A R または前記第 2 の C A R の一方が、活性化エンドドメインを含む活性化 C A R であり、他方の C A R が、ライゲーシオン・オフ阻害性エンドドメインを含む阻害性 C A R であり、その阻害性 C A R が、阻害性 C A R ライゲーシオンの非存在下では該活性化 C A R による T 細胞活性化を阻害するが、該阻害性 C A R がライゲーシオンされたときには、該活性化 C A R による T 細胞活性化を有意に阻害しない、項目 2 または 3 に記

10

20

30

40

50

載の T 細胞。

(項目 5)

前記阻害性エンドドメインが、C D 1 4 8 または C D 4 5 からのエンドドメインの全部または一部を含む、項目 4 に記載の T 細胞。

(項目 6)

前記第 1 の C A R の前記抗原結合ドメインが C D 5 と結合し、前記第 2 の C A R の前記抗原結合ドメインが C D 1 9 と結合する、項目 4 または 5 に記載の T 細胞。

(項目 7)

2 つより多くの抗原の区別可能なパターンを担持する、T 細胞などの細胞により特異的に刺激されるような、先行する項目に記載の C A R を 2 つより多く含む T 細胞。

10

(項目 8)

項目 1 ~ 7 のいずれかに記載の前記第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) および前記第 2 のキメラ抗原受容体 (C A R) の両方をコードする核酸配列。

(項目 9)

次の構造：

A g B 1 - スペーサー 1 - T M 1 - エンド 1 - c o e x p r - A b B 2 - スペーサー 2 - T M 2 - エンド 2

(ここで、

A g B 1 は、前記第 1 の C A R の前記抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 1 は、該第 1 の C A R の前記スペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 1 は、該第 1 の C A R の前記膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド 1 は、該第 1 の C A R の前記エンドドメインをコードする核酸配列であり；

c o e x p r は、両 C A R の共発現を可能にする核酸配列であり；

A g B 2 は、前記第 2 の C A R の前記抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 2 は、該第 2 の C A R の前記スペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 2 は、該第 2 の C A R の前記膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド 2 は、該第 2 の C A R の前記エンドドメインをコードする核酸配列である)

を有し、T 細胞で発現されるときに、該第 1 の C A R および該第 2 の C A R が該 T 細胞表面で共発現されるような、切断部位で切断されるポリペプチドをコードする、項目 8 に記載の核酸配列。

20

30

(項目 10)

c o e x p r が、自己切断性ペプチドを含む配列をコードする、項目 9 に記載の核酸配列。

(項目 11)

相同組換えを回避するため、代替的コドンが、同じかまたは類似したアミノ酸配列をコードする配列の領域で使用される、項目 9 または 10 に記載の核酸配列。

(項目 12)

(i) 項目 1 ~ 7 のいずれかに記載の前記第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする第 1 の核酸配列であって、以下の構造：

A g B 1 - スペーサー 1 - T M 1 - エンド 1

40

(ここで、

A g B 1 は、該第 1 の C A R の前記抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 1 は、該第 1 の C A R の前記スペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 1 は、該第 1 の C A R の前記膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド 1 は、該第 1 の C A R の前記エンドドメインをコードする核酸配列である)

を有する核酸配列；および

(i i) 項目 1 ~ 7 のいずれかに記載の前記第 2 のキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする第 2 の核酸配列であって、以下の構造：

A g B 2 - スペーサー 2 - T M 2 - エンド 2

(A g B 2 は、該第 2 の C A R の前記抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

50

スパーサー 2 は、該第 2 の C A R の前記スパーサーをコードする核酸配列であり；
T M 2 は、該第 2 の C A R の前記膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；
エンド 2 は、該第 2 の C A R の前記エンドドメインをコードする核酸配列である）
を有する核酸配列
を含む、キット。

(項目 1 3)

項目 1 2 に記載の前記第 1 の核酸配列を含む第 1 のベクターおよび項目 1 2 に記載の該
第 1 の核酸配列を含む第 2 のベクターを含む、キット。

(項目 1 4)

前記ベクターが組込み型ウイルスベクターまたはトランスポゾンである、項目 1 3 に記
載のキット。

(項目 1 5)

項目 8 ～ 1 1 のいずれかに記載の核酸配列を含むベクター。

(項目 1 6)

項目 1 5 によるレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターまたはトランス
ポゾン。

(項目 1 7)

項目 8 ～ 1 1 のいずれかに記載の核酸配列；項目 1 2 に記載の第 1 の核酸配列および第
2 の核酸配列；および / または項目 1 3 に記載の第 1 のベクターおよび第 2 のベクターま
たは項目 1 5 または 1 6 に記載のベクターを、T 細胞に導入する工程を含む、項目 1 ～ 7
のいずれかに記載の T 細胞を製造する方法。

(項目 1 8)

前記 T 細胞が被験体から単離された試料に由来する、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

項目 1 ～ 7 のいずれかに記載の複数の T 細胞を含む医薬組成物。

(項目 2 0)

項目 1 9 に記載の医薬組成物を被験体に投与する工程を含む、疾患を処置および / また
は予防する方法。

(項目 2 1)

次の工程：

(i) 被験体からの T 細胞含有試料の単離；

(i i) 項目 8 ～ 1 1 のいずれかに記載の核酸配列；項目 1 2 に記載の第 1 の核酸配列お
よび第 2 の核酸配列；項目 1 3 または 1 4 に記載の第 1 のベクターおよび第 2 のベクター
または項目 1 5 または 1 6 に記載のベクターでの該 T 細胞の形質導入またはトランスフェ
クション；ならびに

(i i i) 該被験体に (i i) からの該 T 細胞を投与すること
を含む、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記疾患ががんである、項目 2 0 または 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

疾患の処置および / または予防で使用するための項目 1 9 に記載の医薬組成物。

(項目 2 4)

疾患を処置および / または予防するための医薬の製造における項目 1 ～ 7 のいずれかに
記載の T 細胞の使用。

(項目 2 5)

第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) および第 2 の C A R を細胞表面で共発現するナチュ
ラルキラー (N K) 細胞であって、各 C A R が、

(i) 抗原結合ドメイン；

(i i) スパーサー；

(i i i) 膜貫通ドメイン；および

10

20

30

40

50

(i v) エンドドメイン

を含み、該第 1 の C A R および該第 2 の C A R の該抗原結合ドメインが異なる抗原に結合し、該第 1 の C A R の該スペーサーが該第 2 の C A R の該スペーサーとは異なり、該第 1 の C A R または該第 2 の C A R の一方が、活性化エンドドメインを含む活性化 C A R であり、他方の C A R が、ライゲーション・オフ阻害性エンドドメインを含む阻害性 C A R である、ナチュラルキラー細胞。

(項目 2 6)

前記第 1 の C A R および前記第 2 の C A R をコードする核酸により血液試料を生体外で形質導入することにより作製される、項目 1 に記載の C A R 発現 T 細胞および / または項目 2 5 に記載の C A R 発現 N K 細胞を含む細胞組成物。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1】図 1 (a) は、C A R の一般化構造である：結合ドメインは抗原を認識し；スペーサーは細胞表面から結合ドメインを持ち上げ；膜貫通ドメインはタンパク質を膜につなぎ留め、エンドドメインはシグナルを伝達する。図 1 (b) ~ (d) は、C A R エンドドメインの異なる世代および並べ替えを示す：(b) 最初の設計は F c R 1 - または C D 3 エンドドメインのみを通じて I T A M シグナルを伝達し、後の設計は、シス配列で (c) さらに 1 つまたは (d) さらに 2 つの共刺激シグナルを伝達した。

【図 2】図 2 は、本発明を説明する概略図である。本発明は、標的細胞抗原発現の論理的規則に応じるように T 細胞を操作することに関する。これについては、仮想的 F A C S 散布図で十分説明されている。標的細胞集団は、抗原「 A 」および「 B 」の両方または片方を発現するかまたはどちらも発現しない。種々の標的集団（赤色で印を付している）は、異なるゲートにより連結された一対の C A R で形質導入された T 細胞により殺される。O R ゲート受容体では、シングル陽性細胞およびダブル陽性細胞の両方が殺される。A N D ゲート受容体では、ダブル陽性標的細胞のみが殺される。A N D N O T ゲーティングでは、ダブル陽性標的は保存され、シングル陽性標的は

20

【図 3】図 3 は、標的細胞集団の作製を示す。S u p T 1 細胞を標的細胞として使用した。これらの細胞に対し C D 1 9、C D 3 3 のどちらかまたは C D 1 9 および C D 3 3 の両方を発現するように形質導入を行った。標的細胞を適切な抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

30

【図 4】図 4 は、O R ゲートについてのカセット設計である。単一のオープンリーディングフレームにより、枠内 F M D - 2 A 配列をもつ両 C A R が提供され、2 つのタンパク質をもたらす。シグナル 1 は、I g G 1 に由来するシグナルペプチドである（ただし、任意の有効なシグナルペプチドであり得る）。s c F v 1 は、C D 1 9 を認識する 1 本鎖可変セグメントである（ただし、s c F v またはペプチドループまたはリガンドまたは事実上、所望のいかなる随意的標的でも認識する任意のドメインであってもよい）。S T K は、C D 8 ストックであるが、任意の適切な細胞外ドメインであり得る。C D 2 8 t m は、C D 2 8 膜貫通ドメインであるが、任意の安定した I 型タンパク質膜貫通ドメインであり得（c a n b y）、C D 3 Z は C D 3 ゼータエンドドメインであるが、I T A M を含む任意のエンドドメインであり得る。シグナル 2 は、C D 8 に由来するシグナルペプチドであるが、シグナル 1 とは D N A 配列が異なる任意の有効なシグナルペプチドであり得る。s c F V は C D 3 3 を認識するが、s c F v 1 については定まっていない。H C 2 C H 3 は、ヒト I g G 1 のヒンジ - C H 2 - C H 3 であるが、第 1 の C A R で使用されるスペーサーと交差対合することのない任意の細胞外ドメインであり得る。C D 2 8 t m ' および C D 3 Z ' は、C D 2 8 t m および C D 3 Z と同じタンパク質配列をコードするが、相同組換えを防止するためコドンのゆらぎを呈する。

40

【図 5】図 5 は、O R ゲートについてのキメラ抗原受容体（C A R）の概略図である。N 末端 A）抗 C D 1 9 s c F v ドメイン、続いてヒト C D 8 の細胞外ヒンジ領域または B）抗 C D 3 3 s c F v ドメイン、続いてヒト I g G 1 の細胞外ヒンジ、C H 2 および C H 3（F c R 結合を低減するため p v a a 変異を含む）領域のどちらかで構成される刺激性 C

50

A Rが構築された。両受容体ともヒトC D 2 8 膜貫通ドメインおよびヒトC D 3 ゼータ (C D 2 4 7) 細胞内ドメインを含む。「S」はジスルフィド結合の存在を示す。

【図6】図6は、1つのT細胞の表面における両C A Rの共発現を示す発現データである。

【図7】図7は、O Rゲートの機能分析である。O Rゲート構築物を発現するエフェクター細胞 (5×10^4 細胞) を、様々な数の標的細胞と共インキュベーションし、I L - 2 を16時間後E L I S Aにより分析した。グラフは、3複製物から得た、エフェクター細胞単独の化学的刺激 (P M Aおよびイオノマイシン) からの平均最大I L - 2 分泌および刺激を一切伴わないエフェクター細胞からの平均バックグラウンドI L - 2 を示す。

【図8】図8は、両A N Dゲートを発現するのに使用されるカセットの両バージョンを示すカートゥーンである。F M D - 2 A 配列を用いて活性化C A Rおよび阻害性C A Rを再度共発現させた。シグナル1は、I g G 1に由来するシグナルペプチドである (ただし、任意の有効なシグナルペプチドであり得る)。s c F v 1は、C D 1 9を認識する1本鎖可変セグメントである (ただし、s c F v またはペプチドループまたはリガンドまたは事実上、所望のいかなる随意的標的でも認識する任意のドメインであり得る)。S T Kは、C D 8 ストークであるが、任意の嵩高くない細胞外ドメインであってもよい。C D 2 8 t mは、C D 2 8 膜貫通ドメインであるが、任意の安定したI型タンパク質膜貫通ドメインであり得、C D 3 ZはC D 3 ゼータエンドドメインであるが、I T A Mを含む任意のエンドドメインであり得る。シグナル2は、C D 8 に由来するシグナルペプチドであるが、シグナル1とはD N A 配列が異なる任意の有効なシグナルペプチドであり得る。s c F VはC D 3 3を認識するが、s c F v 1については定まっていない。H C 2 C H 3は、ヒトI g G 1のヒンジ - C H 2 - C H 3であるが、任意の嵩高い細胞外ドメインであり得る。C D 4 5およびC D 1 4 8は、それぞれC D 4 5およびC D 1 4 8の膜貫通およびエンドドメインであるが、この種のタンパク質のいずれかに由来するものであってもよい。

【図9】図9は、A N Dゲートについてのキメラ抗原受容体 (C A R) のタンパク質構造の概略図である。刺激性C A RはN - 末端抗C D 1 9 s c F v ドメイン、次いでヒトC D 8の細胞外ストーク領域、ヒトC D 2 8 膜貫通ドメインおよびヒトC D 3 ゼータ (C D 2 4 7) 細胞内ドメインから成る。2つの阻害性C A Rを試験した。これらは、N - 末端抗C D 3 3 s c F v ドメイン、次いでヒトI g G 1の細胞外ヒンジ、C H 2 およびC H 3 (F c R 結合を低減するためp v a a 変異を含む) 領域、次いでヒトC D 1 4 8またはC D 4 5のどちらかの膜貫通および細胞内ドメインから成る。「S」は、ジスルフィド結合の存在を示す。

【図10】図10は、活性化C A Rおよび阻害性C A Rの共発現を示す。B W 5 1 4 7細胞をエフェクター細胞として使用し、形質導入することにより、活性化抗C D 1 9 C A Rおよび阻害性抗C D 3 3 C A Rの1つを共に発現させた。エフェクター細胞をC D 1 9 マウスF c およびC D 3 3 ウサギF c および適切な二次抗体で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。

【図11】図11は、A N Dゲートの機能分析である。活性化抗C D 1 9 C A RおよびA) C D 1 4 8またはB) C X D 4 5 細胞内ドメインをもつ阻害性抗C D 3 3 C A Rを発現するエフェクター細胞 (5×10^4 細胞) を、様々な数の標的細胞と共インキュベーションし、I L - 2 を16時間後E L I S Aにより分析した。グラフは、3複製物から得た、エフェクター細胞単独の化学的刺激 (P M Aおよびイオノマイシン) からの最大I L - 2 分泌および刺激を一切伴わないエフェクター細胞からのバックグラウンドI L - 2 を示す。

【図12】図12は、A N D NOTゲートを生成させるのに使用されるカセットの3つのバージョンを示すカートゥーンである。F M D - 2 A 配列を用いて活性化C A Rおよび阻害性C A Rを再度共発現させた。シグナル1は、I g G 1に由来するシグナルペプチドである (ただし、任意の有効なシグナルペプチドであり得る)。s c F v 1は、C D 1 9を認識する1本鎖可変セグメントである (ただし、s c F v またはペプチドループまたはリガンドまたは事実上、所望のいかなる随意的標的でも認識する任意のドメインであり

10

20

30

40

50

得る)。STKは、ヒトCD8ストークであるが、任意の嵩高くない細胞外ドメインであってもよい。CD28tmは、CD28膜貫通ドメインであるが、任意の安定したI型タンパク質膜貫通ドメインであり得、CD3ZはCD3ゼータエンドドメインであるが、ITAMを含む任意のエンドドメインであり得る。シグナル2は、CD8に由来するシグナルペプチドであるが、シグナル1とはDNA配列が異なる任意の有効なシグナルペプチドであり得る。scFVはCD33を認識するが、scFv1については定まっていない。muSTKはマウスCD8ストークであるが、ただし、共局在するが、活性化CARのスペーサーと交差対合することのない任意のスペーサーであり得る。dPTPN6は、PTPN6のホスファターゼドメインである。LAIR1は、LAIR1の膜貫通およびエンドドメインである。2Awは、FMD-2A配列のゆらぎコドンバージョンである。SH2-CD148は、CD148のホスファターゼドメインと融合したPTPN6のSH2ドメインである。

10

【図13】図13は、NOT ANDゲートについてのキメラ抗原受容体(CAR)の概略図である。A)N末端抗CD19 scFvドメイン、次いでヒトCD8のストーク領域、ヒトCD28膜貫通ドメインおよびヒトCD247細胞内ドメインから成る刺激性CAR。B)N末端抗CD33 scFvドメイン、次いでマウスCD8のストーク領域、マウスCD8の膜貫通領域およびPTPN6のホスファターゼドメインから成る阻害性CAR。C)N末端抗CD33 scFvドメイン、次いでマウスCD8のストーク領域およびLAIR1の膜貫通および細胞内セグメントから成る阻害性CAR。D)PTPN6 SH2ドメインおよびCD148ホスファターゼドメインの融合タンパク質と共発現

20

【図14】図14は、NOT ANDゲートの機能分析である。A)完全長SHP-1またはB)SHP-1の先端切除形態を発現するエフェクター細胞(5×10⁴細胞)を、様々な数の標的細胞と共インキュベーションし、IL-2を16時間後ELISAにより分析した。グラフは、3複製物から得た、エフェクター細胞単独の化学的刺激(PMAおよびイオノマイシン)からの平均最大IL-2分泌および刺激を一切伴わないエフェクター細胞からの平均バックグラウンドIL-2を示す。

【図15】図15は、ORゲートのアミノ酸配列である。

【図16】図16は、CD148およびCD145に基づくANDゲートのアミノ酸配列である。

30

【図17】図17は、2つのAND NOTゲートのアミノ酸配列である。

【図18】図18は、ANDゲート機能を詳細に吟味したものである。A.プロトタイプのANDゲートが右側に図示されており、CD19シングル、CD33シングルおよびCD19、CD33ダブルの陽性標的に応じたその機能が左側に示されている。B.scFVを交換すると、活性化エンドドメインはCD33により発動され、阻害性エンドドメインはCD19により活性化される。このANDゲートは、scFv交換にもかかわらず機能的なままである。C.阻害性CARのスペーサーにおけるCD8マウスストーク置換Fc。この修飾により、ゲートは、CD19シングル陽性標的にもCD19、CD33ダブル陽性標的にも応答できなくなる。

【図19】図19は、人工標的細胞上における標的抗原の発現を示す。Aは、SupT1細胞から誘導された人工標的細胞のオリジナルセットのフローサイトメトリー散布図CD19対CD33を示す。左から右へ：ダブル陰性SupT1細胞、CD19に陽性、CD33に陽性、ならびにCD19およびCD33の両方に陽性のSupT1細胞。Bは、CD19 AND GD2ゲートを試験するために生成された人工標的細胞のフローサイトメトリー散布図CD19対GD2を示す。左から右へ：陰性SupT1細胞、CD19を発現するSupT1細胞、GD2陽性となるGD2およびGM3シンターゼベクターで形質導入されたSupT1細胞および、GD2およびCD19の両方に陽性であるCD19ならびにGD2およびGM3シンターゼで形質導入されたSupT1細胞。Cは、CD19 AND EGFRvIIIゲートを試験するために生成された人工標的のCD19対EGFRvIIIのフローサイトメトリー散布図を示す。左から右へ：陰性SupT1

40

50

細胞、CD19を発現するSupT1細胞、EGFRvIIIで形質導入されたSupT1細胞ならびにCD19およびEGFRvIIIの両方で形質導入されたSupT1細胞。Dは、CD19 AND CD5ゲートを試験するために生成された人工標的のCD19対CD5のフローサイトメトリー散布図を示す。左から右へ：陰性293T細胞、CD19で形質導入された293T細胞、CD5で形質導入された293T細胞、CD5およびCD19ベクターの両方で形質導入された293T細胞。

【図20】図20は、ANDゲートの一般化可能性である。A．改変されたANDゲートのカートゥーンであり、第2のCARの特異性はCD33の元の特異性から変更されており、3つの新たなCAR：CD19 AND GD2、CD19 AND EGFRvIII、CD19 AND CD5が生成される。B．CD19 AND GD2 ANDゲート：左：ANDゲートの発現について、CD19 CARについての組換えCD19-Fc染色（x軸）対GD2 CARについての抗ヒトFc染色（y軸）が示されている。右：シングル陽性およびダブル陽性標的への応答における機能。C．CD19 AND EGFRvIII ANDゲート：左：ANDゲートの発現について、CD19 CARについての組換えCD19-Fc染色（x軸）対EGFRvIII CARについての抗ヒトFc染色（y軸）が示されている。右：シングル陽性およびダブル陽性標的への応答における機能。D．CD19 AND CD5 ANDゲート：左：ANDゲートの発現について、CD19 CARについての組換えCD19-Fc染色（x軸）対CD5 CARについての抗ヒトFc染色（y軸）が示されている。右：シングル陽性およびダブル陽性標的への応答における機能。

【図21】図21は、AND NOTゲートの機能である。3回実施のAND NOTゲートの機能を示す。試験したゲートのカートゥーンが右側に示され、シングル陽性およびダブル陽性標的への応答における機能が左側に示されている。A．PTPN6に基づいたAND NOTゲートであり、第1のCARは、CD19を認識し、ヒトCD8ストロクスパーサーおよびITAM含有活性化エンドドメインを有し；CD33を認識し、マウスCD8ストロクスパーサーを有し、PTPN6ホスファターゼドメインを含むエンドドメインを有する第2のCARと共発現される。B．エンドドメインがLAIR1からのエンドドメインにより置換されたこと以外、ITIMに基づくAND NOTゲートはPTPN6ゲートと同一である。C．PTPN6 SH2およびCD148のエンドドメイン間のさらなる融合が発現されること以外、CD148ブーストAND NOTゲートはITIMに基づくゲートと同一である。3つのゲートはすべて、CD19およびCD33両方への応答ではなくCD19への応答での活性化により予想された通りに機能する。

【図22】図22は、PTPN6に基づくAND NOTゲート機能の詳細な吟味である。元のPTPN6に基づくAND NOTゲートを、モデルを示すべく幾つかの対照と比較する。試験したゲートのカートゥーンを右側に示し、シングル陽性およびダブル陽性標的への応答における機能を左側に示す。A．元のAND NOTゲートであり、第1のCARは、CD19を認識し、ヒトCD8ストロクスパーサーおよびITAM含有活性化エンドドメインを有し；CD33を認識し、マウスCD8ストロクスパーサーを有し、PTPN6ホスファターゼドメインを含むエンドドメインを有する第2のCARと共発現される。B．改変されたAND NOTゲートであり、マウスCD8ストロクスパーサーがFcスパーサーにより置き換えられている。C．PTPN6ホスファターゼドメインがCD148からのエンドドメインで置き換えられるように改変されたAND NOTゲート。元のAND NOTゲート（A．）は、CD19およびCD33の両方への応答ではなく、CD19への応答での発動により予想された通りに機能する。B．でのゲートは、CD19単独またはCD19およびCD33の両方に応答して発動する。C．でのゲートが、一方または両方の標的に応答して発動することはない。

【図23】図23は、LAIR1に基づくAND NOTゲートの詳細な吟味である。CD19陽性標的、CD33陽性標的およびCD19、CD33ダブル陽性標的に対する機能的活性を示す。A．元のITIMに基づくAND NOTゲートの構造および活性。このゲートは、2つのCARにより構成される：第1のCARは、CD19を認識し、ヒ

10

20

30

40

50

トCD8ストークスパーサーおよびITAM含有エンドドメインを有し、第2のCARはCD33を認識し、マウスCD8ストークスパーサーおよびITIM含有エンドドメインを有する。B. マウスCD8ストークスパーサーがFcドメインにより置き換えられている対照ITIMに基づくゲートの構造および活性。このゲートは、2つのCARにより構成される：第1のCARは、CD19を認識し、ヒトCD8ストークスパーサーおよびITAM含有エンドドメインを有し、第2のCARはCD33を認識し、FcスパーサーおよびITIM含有エンドドメインを有する。両ゲートとも、CD19シングル陽性標的に応答し、元のゲートのみがCD19およびCD33ダブル陽性標的への応答において不活性である。

【図24A】図24は、CAR論理ゲートの動力的分離モデルである。ANDゲート、NOT ANDゲートおよび対照の動力的分離および行動のモデル。CARはCD19またはCD33のいずれかを認識する。免疫学的シナプスは、標的細胞膜を表す青線とT細胞膜を表す赤線の間にあると想像され得る。「45」は、T細胞上に存在する天然CD45タンパク質である。「H8」は、スパーサーとしてヒトCD8ストークを伴うCARエクドメインである。「Fc」は、スパーサーとしてヒトHCH2CH3を伴うCARエクドメインである。「M8」は、スパーサーとしてネズミCD8ストークを伴うCARエクドメインである。「19」は、標的細胞表面上のCD19を表す。「33」は、標的細胞表面上のCD33を表す。記号

【数1】

「⊕」

は、ITAMを含有する活性化エンドドメインを表す。記号

【数2】

「⊖」

は、緩慢な動態を有するホスファターゼ - PTPN6またはITIMの触媒ドメインを含むものなどの「ライゲーション・オン」エンドドメインを表す。記号

【数3】

「∅」

は、速い動態を有するホスファターゼ - CD45またはCD148のエンドドメインなどの「ライゲーション・オフ」エンドドメインを表す。この記号を図面で拡大することにより、その強力な活性を強調する。

(a) は、一組のCARを含む機能的ANDゲートの仮定される行動を示すもので、第1のCARは、CD19を認識し、ヒトCD8ストークスパーサーおよび活性化エンドドメインを有し、第2のCARは、CD33を認識し、FcスパーサーおよびCD148エンドドメインを有する；

(b) は、対照ANDゲートの仮定される行動を示す。ここで、第1のCARは、CD19を認識し、ヒトCD8ストークスパーサーおよび活性化エンドドメインを有し、第2のCARは、CD33を認識するが、マウスCD8ストークスパーサーおよびCD148エンドドメインを有する；

(c) は、一組のCARを含む機能的AND NOTゲートの行動を示すもので、第1のCARは、CD19を認識し、ヒトCD8ストークスパーサーおよび活性化エンドドメインを有し、第2のCARは、CD33を認識し、マウスCD8ストークスパーサーおよびPTPN6エンドドメインを有する；

(d) は、一組のCARを含む対照AND NOTゲートの仮定される行動を示すもので、第1のCARは、CD19を認識し、ヒトCD8ストークスパーサーおよび活性化エンドドメインを有し、第2のCARは、CD33を認識するが、FcスパーサーおよびPTPN6エンドドメインを有する；

1列目では、標的細胞は、CD19およびCD33の両方に陰性である。2列目では、

10

20

30

40

50

標的は、CD19陰性およびCD33陽性である。3列目では、標的細胞は、CD19陽性およびCD33陰性である。4列目では、標的細胞はCD19およびCD33の両方に陽性である。

【図24B】同上

【図25】図25は、APRILに基づくCARの設計である。scFVが、BCMA、TACIおよびプロテオグリカンと相互作用して(interacts with)、抗原結合ドメインとして作用する、A増殖誘導性リガンド(APRIL)の改変形態で置き換えられるようにCAR設計を改変した。プロテオグリカン結合性アミノ末端が存在しないように、APRILの先端を切除した。次いで、シグナルペプチドを先端切除APRILアミノ末端に結合して、タンパク質を細胞表面に指向させた。このAPRILに基づく結合ドメインをもつ3つのCARを生成した：A．第1のCARでは、ヒトCD8ストークドメインをスペーサードメインとして使用した。B．第2のCARでは、IgG1からのヒンジをスペーサードメインとして使用した。C．第3のCARでは、Fc受容体結合を低減するためにHombachら(2010 Gene Ther. 17:1206-1213)により記載されたpva/a変異で改変されたヒトIgG1のヒンジ、CH2およびCH3ドメインを、スペーサーとして使用した(以後、Fc-pvaaaと称す)。全CARにおいて、これらのスペーサーをCD28膜貫通ドメイン、次いでCD28、OX40およびCD3-ゼータエンドドメインの融合体を含む3連エンドドメイン(tripartite endodomain)に連結した(Puleら、Molecular therapy, 2005:12巻;5号;933-41頁)。

【図26】図26は、上記3つのAPRIL-CARの注釈付きアミノ酸配列である。

Aは、CD8ストークAPRIL CARの注釈付きアミノ酸配列を示し；Bは、APRIL IgG1ヒンジに基づくCARの注釈付きアミノ酸配列を示し；Cは、APRIL Fc-pvaaaに基づくCARの注釈付きアミノ酸配列を示す。

【図27】図27は、異なるAPRILに基づくCARの発現およびリガンド結合を示す。A．受容体を、レトロウイルス遺伝子ベクターにおけるマーカー遺伝子先端切除CD34と共発現させた。形質導入された細胞におけるマーカー遺伝子の発現により、形質導入の確認が可能となる。B．T細胞に対し、CD8ストークスペーサー、IgG1ヒンジまたはFcスペーサーのどちらかを伴うAPRILに基づくCARで形質導入した。これらの受容体を細胞表面で安定して発現させることができるかどうかを試験するため、次にT細胞を抗APRIL-ビオチン/ストレプトアビジンAPCおよび抗CD34で染色した。フローサイトメトリー分析を行った。APRILが3つのCARにおける細胞表面で等しく検出されたことから、それらが等しく安定して発現されていることが示唆された。C．次に、CARがTACIおよびBCMAを認識する能力を決定した。形質導入されたT細胞を、抗マウス二次抗体(anti-mouse secondary)および抗CD34と一緒にマウスIgG2a Fc融合体に融合された組換えBCMAまたはTACIのどちらかで染色した。3つの受容体フォーマットは全て、BCMAおよびTACIの両方への結合性を示した。驚くべき発見は、BCMAへの結合性がTACIへの結合性より大きくみえることであった。さらなる驚くべき発見は、3つのCARは全て等しく発現されるが、CD8ストークおよびIgG1ヒンジCARは、BCMAおよびTACIを認識する点でFcスペーサーを伴うものより優れているようであることであった。

【図28】図28は、異なるCAR構築物の機能を示す。機能アッセイを、3つの異なるAPRILに基づくCARにより実施した。非形質導入(NT)であるか、または異なるCARを発現するように形質導入された正常ドナーの末梢血T細胞。等しい力価の上清を用いて、形質導入を実施した。次いで、これらのT細胞を、CD56を除去して非特異的NK活性を枯渇させ、エフェクターとして使用した。非形質導入(NT)SupT1細胞またはBCMAまたはTACIを発現するように形質導入されたSupT1細胞を、標的として用いた。示されたデータは、5回の独立実験からの平均値および標準偏差である。A．BCMAおよびTACI発現T細胞の特異的致死を、クロム放出を用いて決定した

。B. また、インターフェロン - μ 放出を決定した。標的およびエフェクターを 1 : 1 の割合で共培養した。24 時間後、上清中のインターフェロン μ を、ELISA によりアッセイした。C. また、CAR T 細胞の増殖 / 生存を、さらに 6 日間インキュベーションした同じ共培養における CAR T 細胞の数を数えることにより決定した。3 つの CAR は全て、BCMA および TACI 発現標的に対する応答を指令する。BCMA への応答は、TACI の場合より大きかった。

【図 29】図 29 は、初代細胞における AND ゲートの機能である。PBM C を血液から単離し、PHA および IL - 2 を用いて刺激した。2 日後、細胞を、レトロネクチン被覆プレート上で CD 19 : CD 33 AND ゲート構築物を含むレトロウイルスにより形質導入した。5 日目、AND ゲート構築物により翻訳された 2 つの CAR の発現レベルをフローサイトメトリーにより評価し、細胞から CD 56 + 細胞（主に NK 細胞）を枯渇させた。6 日目、PBM C を 1 : 2 のエフェクター対標的細胞比で標的細胞との共培養中に置いた。8 日目、上清を集め、ELISA により IFN - γ 分泌について分析した。

【図 30】図 30 は、サイズの増加を伴う可能なスパーサードメインの選択 / ヒエラルキーを示す。CD 3 - ζ のエクストドメインは、最も短い可能なスパーサーとして示唆されており、それに (b) Ig G 1 ヒンジが続く。(c) ネズミまたはヒト CD 8 ストックおよび CD 28 エクストドメインは、サイズが中間であると考えられ、共分離する。(d) Ig G 1 のヒンジ、CH 2 および CH 3 ドメインは、より大きく、かさ高であり、(e) Ig M のヒンジ、CH 2、CH 3 および CH 4 ドメインは、さらに大きい。標的分子の特性、および前記標的分子上の結合ドメインのエピトープを考慮すれば、スパーサーのこのヒエラルキーを用いて、シナプス形成の際に共分離または別個に分離する CAR シグナル伝達系を作製することが可能である。

【図 31】図 31 は、論理ゲート CAR T 細胞を構築するための設計規則である。上部に標的細胞、下部に T 細胞、中間にシナプスとしたカートゥーンフォーマットで OR、AND NOT および AND ゲート CAR を示す。標的細胞は、任意の標的抗原 A および B を発現する。T 細胞は、抗 A 認識ドメインおよび抗 B 認識ドメイン、スパーサーおよびエンドドメインを含む 2 つの CAR を発現する。OR ゲートは、(1) 単に抗原認識および CAR 活性化を可能にするスパーサー、ならびに (2) 活性化エンドドメインを有するための両 CAR を必要とする；AND NOT ゲートは、(1) 両抗原の認識の際に両 CAR の共分離をもたらすスパーサーならびに (2) 活性化エンドドメインを伴う一方の CAR、およびエンドドメインが弱いホスファターゼを含むかまたはリクルートする他方の CAR を必要とする；AND ゲートは、(1) 両抗原の認識の際に免疫学的シナプスの異なる部分への両 CAR の分離をもたらすスパーサーならびに (2) 活性化エンドドメインを伴う一方の CAR、およびエンドドメインが強力なホスファターゼを含む他方の CAR を必要とする。

【発明を実施するための形態】

【0018】

(発明の態様の概要)

本発明者らは、T 細胞などの細胞により発現されたとき、少なくとも 2 つの標的抗原の特定の発現パターンを検出することができる「論理ゲート」キメラ抗原受容体対のパネルを開発した。少なくとも 2 つの標的抗原が抗原 A および抗原 B として任意に示されるならば、3 つの可能な選択肢は以下ようになる：

「OR ゲート」 - 抗原 A または抗原 B のどちらかが標的細胞上に存在するとき T 細胞が発動する。

「AND ゲート」 - 抗原 A および抗原 B の両方が標的細胞上に存在するときのみ T 細胞が発動する。

「AND NOT ゲート」 - 抗原 A が標的細胞上に単独で存在するならば、T 細胞は発動するが、抗原 A および抗原 B の両方が標的細胞上に存在するときには発動しない。

【0019】

これらの CAR の組み合わせを発現する操作された T 細胞は、それらの 2 またはそれよ

10

20

30

40

50

り多くのマーカーの特定の発現（または発現の欠如）に基づき、がん細胞に極めて特異的になるように調整され得る。

【0020】

したがって、第1の態様では、本発明は、第1のキメラ抗原受容体（CAR）および第2のCARを細胞表面で共発現する細胞であって、各CARが、

（i）抗原結合ドメイン；

（ii）スペーサー；

（iii）膜貫通ドメイン；および

（iv）細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン（エンドドメイン）

を含み、

第1のCARおよび第2のCARの抗原結合ドメインが異なる抗原に結合し、第1のCARのスペーサーが第2のCARのスペーサーとは異なることにより、第1のCARおよび第2のCARがヘテロダイマーを形成することはないものとし、さらに第1のCARまたは第2のCARの一方が活性化細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含む活性化CARであり、他方のCARが「ライゲーシオン・オフ」（本明細書で定義されるとおりの）阻害性細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含む阻害性CARである、細胞を提供する。

【0021】

該細胞は、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞などの免疫エフェクター細胞であり得る。T細胞に関して本明細書で挙げた特徴は、NK細胞などの他の免疫エフェクター細胞にも等しく当てはまる。

【0022】

第1のCARのスペーサーは、第2のCARのスペーサーとは異なる長さおよび/または電荷および/または形状および/または立体配置および/またはグリコシル化を有し得るため、第1のCARおよび第2のCARがそれらのそれぞれの標的抗原と結合したとき、第1のCARおよび第2のCARはT細胞上で空間的に離れることになる。第1のCARおよび第2のCARのそれらのそれぞれの抗原へのライゲーシオンにより、それらは免疫学的シナプスにおいて一緒に、または別々に区画化されることになり、その結果、活性化が制御される。このことについては、T細胞活性化の動力学的分離モデルについて考慮すると、理解され得る（下記参照）。

【0023】

第1のスペーサーまたは第2のスペーサーは、CD8ストークを含み得、もう一方のスペーサーは、IgG1のヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含み得る。

【0024】

「AND」ゲートに関する本発明では、第1のCARおよび第2のCARの一方は活性化エンドドメインを含む活性化CARであり、他方のCARは阻害性エンドドメインを含む「ライゲーシオン・オフ」阻害性CARである。ライゲーシオン・オフ阻害性CARは、阻害性CARライゲーシオンの非存在下で活性化CARによるT細胞活性化を阻害するが、阻害性CARがライゲーシオンされているときには活性化CARによるT細胞活性化を有意に阻害しない。第1のCARのスペーサーは、第2のCARのスペーサーとは異なる長さおよび/または電荷および/または形状および/または立体配置および/またはグリコシル化を有するため、両方のCARがライゲーシオンされたとき、それらは分離する。この結果、阻害性CARが活性化CARから空間的に離されることになり、T細胞活性化がおこり得る。したがって、T細胞活性化は、もっぱら両方の同種抗原をもつ標的細胞に应答しておこる。

【0025】

阻害性エンドドメインは、CD148またはCD45など、受容体様チロシンホスファターゼからのエンドドメインの全部または一部を含み得る。

【0026】

第1のCARの抗原結合ドメインはCD5と結合し得、第2のCARの抗原結合ドメインはCD19と結合し得る。このことは、慢性リンパ性白血病（CLL）を標的とするの

10

20

30

40

50

に有用である。この疾患については、CD19を単独で標的をすることにより処置することができるが、全B細胞区画を枯渇させるという犠牲を払うことになり得る。CLL細胞は、CD5およびCD19を共発現するという点で異常である。ANDゲートでこの抗原対を標的とすることにより、特異性を高め、毒性を低減させる。

【0027】

第2の態様において、本発明は、本発明の第1の態様で定義したとおりの第1のキメラ抗原受容体(CAR)および第2のCARの両方をコードする核酸配列を提供する。

【0028】

したがって(according)、この核酸配列は、次の構造：

AgB1 - スペーサー1 - TM1 - エンド1 - coexpr - AgB2 - スペーサー2 - TM2 - エンド2 10

を有し得、

ここで、

AgB1は、第1のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー1は、第1のCARのスペーサーをコードする核酸配列であり；

TM1は、第1のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド1は、第1のCARのエンドドメインをコードする核酸配列であり；

coexprは、2つのCARの共発現を可能にする核酸配列(例えば、切断部位)であり；

AgB2は、第2のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり； 20

スペーサー2は、第2のCARのスペーサーをコードする核酸配列であり；

TM2は、第2のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド2は、第2のCARのエンドドメインをコードする核酸配列であり；

該核酸配列は、T細胞で発現されるときに、第1のCARおよび第2のCARがT細胞表面で共発現されるような、切断部位で切断されるポリペプチドをコードする。

【0029】

2つのCARの共発現を可能にする核酸配列は、自己切断性ペプチドまたは2つのCARを共発現する代替的手段を可能にする配列、例えば内部リボソーム進入配列または第2プロモーターまたは当業者が同じベクターから2種のタンパク質を発現させることができるような他の手段を可能にする配列をコードし得る。 30

【0030】

代替コドンは、相同組換えを回避するために、同一または類似アミノ酸配列をコードする配列の領域で使用されてもよい。

【0031】

第3の態様において、本発明は、

(i) 本発明の第1の態様で定義した第1のキメラ抗原受容体(CAR)をコードする第1の核酸配列であって、以下の構造：

AgB1 - スペーサー1 - TM1 - エンド1

(ここで、

AgB1は、第1のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり； 40

スペーサー1は、第1のCARのスペーサーをコードする核酸配列であり；

TM1は、第1のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド1は、第1のCARのエンドドメインをコードする核酸配列である)

を有する核酸配列；および

(ii) 本発明の第1の態様で定義した第2のキメラ抗原受容体(CAR)をコードする第2の核酸配列であって、以下の構造：

AgB2 - スペーサー2 - TM2 - エンド2

(AgB2は、第2のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー2は、第2のCARのスペーサーをコードする核酸配列であり；

TM2は、第2のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり； 50

エンド 2 は、第 2 の C A R のエンドドメインをコードする核酸配列である)
を有する核酸配列
を含むキットを提供する。

【 0 0 3 2 】

第 4 の態様において、本発明は、上記で定義した第 1 の核酸配列を含む第 1 のベクター
および上記で定義した第 1 の核酸配列を含む第 2 のベクターを含むキットを提供する。

【 0 0 3 3 】

これらのベクターは、プラスミドベクター、レトロウイルスベクターまたはトランスポ
ゾンベクターであり得る。これらのベクターはレンチウイルスベクターであり得る。

【 0 0 3 4 】

第 5 の態様において、本発明は、本発明の第 2 の態様による核酸配列を含むベクターを
提供する。このベクターはレンチウイルスベクターであり得る。

【 0 0 3 5 】

該ベクターは、プラスミドベクター、レトロウイルスベクターまたはトランスポゾンベ
クターであり得る。

【 0 0 3 6 】

第 6 の態様において、本発明は、2 つより多い抗原の複合パターン (c o m p l e x
p a t t e r n) が標的細胞上で認識されることができるとやり方で 2 つより多い C A R を
共発現させることを含む。

【 0 0 3 7 】

第 7 の態様において、本発明は、本発明の第 1 の態様による T 細胞を作製する方法であ
って、第 1 の C A R および第 2 の C A R をコードする 1 つもしくはそれより多くの核酸配
列 (複数も可) または上記で定義した 1 つもしくはそれより多くのベクター (複数も可)
を T 細胞に導入する工程を含む方法を提供する。

【 0 0 3 8 】

T 細胞は、患者、関連もしくは非関連造血系移植ドナー、完全に無関係のドナーから単
離された試料に由来するか、臍帯血に由来するか、胚性細胞株から分化されるか、誘導性
前駆細胞株から分化されるか、または形質転換 T 細胞株から誘導され得る。

【 0 0 3 9 】

第 8 の態様において、本発明は、本発明の第 1 の態様による複数の T 細胞を含む医薬組
成物を提供する。

【 0 0 4 0 】

第 9 の態様において、本発明は、疾患を処置および / または予防する方法であって、被
験体に本発明の第 8 の態様による医薬組成物を投与する工程を含む方法を提供する。

【 0 0 4 1 】

該方法は、以下の工程 :

(i) 上記で列挙した T 細胞の単離 ;

(i i) 第 1 の C A R および第 2 の C A R をコードする 1 つもしくはそれより多くの核
酸配列 (複数も可) または上記核酸配列 (複数も可) を含む 1 つもしくはそれより多くの
ベクター (複数も可) での T 細胞の形質導入またはトランスフェクション ; および

(i i i) 被験体に (i i) からの T 細胞を投与すること
を含み得る。

【 0 0 4 2 】

該疾患はがんであり得る。

【 0 0 4 3 】

第 10 の態様において、本発明は、疾患の処置および / または予防で使用するための本
発明の第 8 の態様による医薬組成物を提供する。

【 0 0 4 4 】

該疾患はがんであり得る。

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50

第11の態様において、本発明は、疾患を処置および/または予防するための医薬の製造における本発明の第1の態様によるT細胞の使用を提供する。

【0046】

該疾患はがんであり得る。

本発明はまた、

- a) 第1のキメラ抗原受容体(CAR)をコードする第1のヌクレオチド配列；
 - b) 第2のCARをコードする第2のヌクレオチド配列；
 - c) 2つのCARが別々の実体として発現されるように、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列との間に配置された自己切断性ペプチドをコードする配列；
- を含む核酸配列を提供する。

10

【0047】

代替コドンは、同一または類似アミノ酸配列(複数可)をコードする領域における第1のヌクレオチド配列および第2のヌクレオチド配列の1つまたはそれより多くの部分(複数可)で使用されてもよい。

【0048】

本発明はまた、上記の核酸を含むベクターおよび細胞を提供する。

【0049】

本発明の動力学的分離に基づくANDゲートは、先に記載した「共CAR」、すなわち活性化シグナルまたは共刺激シグナルのいずれかをT細胞に供給する2つのCARにより2つの抗原が認識される二重標的化手法に著しい技術的利益を提供する。

20

【0050】

共CAR手法によると、非常に高い活性が両抗原をもつ標的細胞に対して予想され得るが、活性化CARにより認識される抗原のみをもつ組織に対するかなりの活性が予想され得る。この活性は、少なくとも第一世代CARの活性であると予想され得る。第一世代CARは、かなりの毒性をもたらし、例えば、予想外にも胆管上皮で発現される炭酸脱水酵素IXを認識する第一世代CARの臨床試験では胆管毒性が観察された(Rotterdam参考文献)。特に、最終分化エフェクターは、共刺激シグナルを必要とせず、またはそれに応答することもないため、最終分化CAR T細胞はいずれも、共刺激CARシグナルが存在しないにもかかわらず、最大限に作用することになる。

【0051】

30

さらに、共刺激シグナルは、T細胞集団に対する長期にわたる作用をもたらす。これらの作用は、T細胞/標的シナプス相互作用を長期間にわたり存続させる。したがって、腫瘍内で十分に活性化され、遊走するCAR T細胞は、単一抗原担持正常組織に対して最大限に強い活性を有することができる。この「流出(spill-over)」作用は、腫瘍内、腫瘍付近または腫瘍から排出する組織において非常に著しいものであり得る。事実、CAR活性化ではなく、別個の受容体を通して結びつけられた共刺激シグナルにより高められる第一世代CARの活性の概念に基づく戦略が、提案され、試験された(Rossig, Blood, 2002年3月15日; 99(6): 2009-16)。

【0052】

40

このため、共CAR手法は、単一抗原発現正常組織の向かう毒性を廃するのではなく、せいぜい低減させる程度であることが予想され得る。本発明は、T細胞/標的細胞間に形成された免疫学的シナプスでの動力学的分離を使用することにより、T細胞発動自体を調節する。したがって、第2の抗原の非存在下における発動の堅固な絶対的制御が達成される。このため、T細胞活性化の全体は、両抗原を発現する標的細胞に制限され、ANDゲートは当然エフェクター細胞型または分化状態とは関係なく機能することになり、ANDゲートT細胞活性化の「流出」作用の可能性は無い。

【0053】

(本発明のさらなる態様)

本発明はまた、以下の番号を付した項に列挙した態様に関するものである：

1. 第1のキメラ抗原受容体(CAR)および第2のCARを細胞表面で共発現するT

50

細胞であって、各 C A R が、

(i) 抗原結合ドメイン

(i i) スペーサー

(i i i) 膜貫通ドメイン、および

(i v) エンドドメイン

を含み、第 1 の C A R および第 2 の C A R の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合し、第 1 の C A R のスペーサーが第 2 の C A R のスペーサーとは異なり、第 1 の C A R または第 2 の C A R の一方が活性化エンドドメインを含む活性化 C A R であり、他方の C A R が、活性化エンドドメインを含む活性化 C A R またはライゲーション・オンもしくはライゲーション・オフ阻害性エンドドメインを含む阻害性 C A R のどちらかである、T 細胞。

10

【 0 0 5 4 】

2 . 第 1 の C A R のスペーサーが、第 2 の C A R のスペーサーとは異なる長さおよび / または電荷および / またはサイズおよび / または立体配置および / またはグリコシル化を有するため、第 1 の C A R および第 2 の C A R がそれらのそれぞれの標的抗原を結合したとき、第 1 の C A R および第 2 の C A R が T 細胞膜上で空間的に離されることになる、項 1 に記載の T 細胞。

【 0 0 5 5 】

3 . 第 1 のスペーサーおよび第 2 のスペーサーのどちらか一方が C D 8 ストックを含み、他方のスペーサーが I g G 1 のヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメインを含む、項 2 に記載の T 細胞。

20

【 0 0 5 6 】

4 . 第 1 の C A R および第 2 の C A R の両方が活性化 C A R である、項 1 に記載の T 細胞。

【 0 0 5 7 】

5 . 一方の C A R が C D 1 9 と結合し、他方の C A R が C D 2 0 と結合する、項 4 に記載の T 細胞。

【 0 0 5 8 】

6 . 第 1 の C A R または第 2 の C A R の一方が、活性化エンドドメインを含む活性化 C A R であり、他方の C A R が、ライゲーション・オフ阻害性エンドドメインを含む阻害性 C A R であり、この阻害性 C A R は阻害性 C A R ライゲーションの非存在下での活性化 C A R による T 細胞活性化を阻害するが、阻害性 C A R がライゲーションしたときには活性化 C A R による T 細胞活性化を有意に阻害しない、項 2 または 3 に記載の T 細胞。

30

【 0 0 5 9 】

7 . 阻害性エンドドメインが、C D 1 4 8 または C D 4 5 からのエンドドメインの全部または一部を含む、項 6 に記載の T 細胞。

【 0 0 6 0 】

8 . 第 1 の C A R の抗原結合ドメインが C D 5 と結合し、第 2 の C A R の抗原結合ドメインが C D 1 9 と結合する、項 6 または 7 に記載の T 細胞。

【 0 0 6 1 】

9 . 第 1 のスペーサーと第 2 のスペーサーが、第 1 の C A R および第 2 の C A R の交差対合を防止するほど十分に異なるが、ライゲーション後に第 1 の C A R および第 2 の C A R の共局在化をもたらすほど十分に類似している、項 1 に記載の T 細胞。

40

【 0 0 6 2 】

1 0 . 第 1 の C A R または第 2 の C A R の一方が、活性化エンドドメインを含む活性化 C A R であり (i n a n a c t i v a t i n g C A R) 、他方の C A R が、ライゲーション・オン阻害性エンドドメインを含む阻害性 C A R であり、この阻害性 C A R は、阻害性 C A R ライゲーションの非存在下での活性化 C A R による T 細胞活性化を有意に阻害しないが、阻害性 C A R がライゲーションしたときには活性化 C A R による T 細胞活性化を阻害する、項 9 に記載の T 細胞。

【 0 0 6 3 】

50

11．ライゲーション・オン阻害性エンドドメインが、ホスファターゼの少なくとも一部を含む、項10に記載のT細胞。

【0064】

12．ライゲーション・オン阻害性エンドドメインが、PTPN6の全部または一部を含む、項11に記載のT細胞。

【0065】

13．ライゲーション・オン阻害性エンドドメインが、少なくとも1つのITIMドメインを含む、項10に記載のT細胞。

【0066】

14．ライゲーション・オン阻害性エンドドメインの活性が、PTPN6-CD45融合タンパク質またはPTPN6-CD148融合タンパク質の共発現により増強される、項13に記載のT細胞。

【0067】

15．活性化エンドドメインを含むCARが、CD33と結合する抗原結合ドメインを含み、ライゲーション・オン阻害性エンドドメインを含むCARが、CD34と結合する抗原結合ドメインを含む、項10～14のいずれかに記載のT細胞。

【0068】

16．2つより多くの抗原の区別可能なパターンを担持する、T細胞などの細胞により特異的に刺激されるような、先行する項に記載のCARを2つより多く含むT細胞。

【0069】

17．項1～16のいずれかに記載の第1のキメラ抗原受容体(CAR)および第2のキメラ抗原受容体(CAR)の両方をコードする核酸配列。

【0070】

18．以下の構造：

AgB1-スパーサー1-TM1-エンド1-coexpr-AgB2-スパーサー2-TM2-エンド2

(ここで、

AgB1は、第1のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スパーサー1は、第1のCARのスパーサーをコードする核酸配列であり；

TM1は、第1のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド1は、第1のCARのエンドドメインをコードする核酸配列であり；

coexprは、両CARの共発現を可能にする核酸配列であり；

AgB2は、第2のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スパーサー2は、第2のCARのスパーサーをコードする核酸配列であり；

TM2は、第2のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド2は、第2のCARのエンドドメインをコードする核酸配列である)

を有し、T細胞で発現されるときに、第1のCARおよび第2のCARがT細胞表面で共発現されるような、切断部位で切断されるポリペプチドをコードする、項17に記載の核酸配列。

【0071】

19．coexprが、自己切断性ペプチドを含む配列をコードする、項18に記載の核酸配列。

【0072】

20．代替コドンが、相同組換えを回避するために、同一または類似アミノ酸配列をコードする配列の領域で使用される、項18または19に記載の核酸配列。

【0073】

21．

(i) 項1～16のいずれかで記載した第1のキメラ抗原受容体(CAR)をコードする第1の核酸配列であって、以下の構造：

AgB1-スパーサー1-TM1-エンド1

(ここで、

A g B 1 は、第 1 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 1 は、第 1 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 1 は、第 1 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド 1 は、第 1 の C A R のエンドドメインをコードする核酸配列である）

を有する核酸配列；および

(i i) 項 1 ~ 1 6 のいずれかで記載した第 2 のキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする第 2 の核酸配列であって、以下の構造：

A g B 2 - スペーサー 2 - T M 2 - エンド 2

(A g B 2 は、第 2 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

10

スペーサー 2 は、第 2 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 2 は、第 2 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド 2 は、第 2 の C A R のエンドドメインをコードする核酸配列である）

を有する核酸配列

を含むキット。

【 0 0 7 4 】

2 2 . 項 2 1 に記載の第 1 の核酸配列を含む第 1 のベクター、および項 2 1 に記載の第 1 の核酸配列を含む第 2 のベクターを含むキット。

【 0 0 7 5 】

2 3 . ベクターが、組込み型ウイルスベクターまたはトランスポゾンである、項 2 2 に記載のキット。

20

【 0 0 7 6 】

2 4 . 項 1 7 ~ 2 0 のいずれかに記載の核酸配列を含むベクター。

【 0 0 7 7 】

2 5 . 項 2 4 に記載のレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターまたはトランスポゾン。

【 0 0 7 8 】

2 6 . 項 1 7 ~ 2 0 のいずれかに記載の核酸配列；項 2 1 に記載の第 1 の核酸配列および第 2 の核酸配列；および / または項 2 2 に記載の第 1 のベクターおよび第 2 のベクターまたは項 2 4 もしくは 2 5 に記載のベクターを T 細胞へ導入する工程を含む、項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の T 細胞を作製する方法。

30

【 0 0 7 9 】

2 7 . T 細胞が被験体から単離された試料に由来する、項 2 4 に記載の方法。

【 0 0 8 0 】

2 8 . 項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の複数の T 細胞を含む医薬組成物。

【 0 0 8 1 】

2 9 . 被験体に項 2 8 に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、疾患を処置および / または予防する方法。

【 0 0 8 2 】

3 0 . 以下の工程：

40

(i) 被験体からの T 細胞含有試料の単離；

(i i) 項 1 7 ~ 2 0 のいずれかに記載の核酸配列；項 2 1 に記載の第 1 の核酸配列および第 2 の核酸配列；項 2 2 もしくは 2 3 に記載の第 1 のベクターおよび第 2 のベクターまたは項 2 4 もしくは 2 5 に記載のベクターでの T 細胞の形質導入またはトランスフェクション；ならびに

(i i i) 被験体に (i i) からの T 細胞を投与することを含む、項 2 9 に記載の方法。

【 0 0 8 3 】

3 1 . 疾患ががんである、項 2 9 または 3 0 に記載の方法。

【 0 0 8 4 】

50

32. 疾患の処置および/または予防で使用するための項28に記載の医薬組成物。

【0085】

33. 疾患を処置および/または予防するための医薬の製造における項1~16のいずれかに記載のT細胞の使用。

【0086】

(詳細な説明)

キメラ抗原受容体(CAR)

図1で概略的に示されているCARは、細胞外抗原認識ドメイン(バインダー)を細胞内シグナル伝達ドメイン(エンドドメイン)に結び付けるキメラI型膜貫通タンパク質である。バインダーは、典型的にはモノクローナル抗体(mAb)から誘導された1本鎖可変フラグメント(scFV)であるが、抗体様抗原結合部位を含む他のフォーマットに基づくことも可能である。スペーサドメインは、通常膜からバインダーを単離し、好適な配向をもたせるのに必要である。使用される一般的なスペーサドメインは、IgG1のFcである。より小型のスペーサー、例えば、抗原によっては、CD8からのストーク、さらにはIgG1ヒンジ単独でも十分であり得る。膜貫通ドメインは、細胞膜にタンパク質をつなぎ止め、スペーサーをエンドドメインに結び付ける。

【0087】

初期のCAR設計は、FcR1またはCD3の鎖のどちらかの細胞内部分から誘導されたエンドドメインを有していた。したがって、これらの第一世代受容体は、免疫学的シグナル1を伝達するもので、同種標的細胞のT細胞による致死を誘発するのに十分ではあったが、T細胞を十分に活性化して増殖および生存をもたらしことはなかった。この限界を克服するため、複合エンドドメインが構築された：T細胞共刺激分子の細胞内部分とCD3の細胞内部分の融合により、抗原認識後活性化シグナルおよび共刺激シグナルを同時に伝達することができる第二世代受容体もたらされる。最も一般的に使用される共刺激ドメインは、CD28の共刺激ドメインである。これは、T細胞増殖を誘発する最も強力な共刺激シグナル、すなわち免疫学的シグナル2を供給する。また、生存シグナルを伝達する密接に関連したOX40および41BBなど、TNF受容体ファミリーのエンドドメインを含む一部の受容体も記載されている。活性化シグナル、増殖シグナルおよび生存シグナルを伝達することができるエンドドメインを有するさらにいっそう強力な第三世代CARが現在記載されている。

【0088】

CARエンコード核酸は、例えば、レトロウイルスベクターを用いてT細胞に移入され得る。レンチウイルスベクターも使用され得る。こうして、多数のがん特異的T細胞が、養子細胞移入のために生成され得る。CARが標的抗原と結合したとき、これにより、活性化シグナルの、それが発現されるT細胞への伝達もたらされる。すなわち、CARは、標的抗原を発現する腫瘍細胞に向けたT細胞の特異性および細胞傷害性を誘導する。

【0089】

本発明の第1の態様は、真理値表：表1、2および3で詳述した論理ゲートの方式でT細胞が標的細胞上の所望の発現パターンを認識できるように第1のCARおよび第2のCARを共発現するT細胞に関するものである。

【0090】

第1および第2の両CAR(および所望により後続のCAR)は、

(i) 抗原結合ドメイン；

(ii) スペーサー；

(iii) 膜貫通ドメイン；および

(iii) 細胞内ドメイン

を含む。

【表 1】

表1:CAR ORゲートについての真理値表

抗原A	抗原B	応答
無	無	活性化無し
無	有	活性化
有	無	活性化
有	有	活性化

10

【0091】

【表 2】

表2:CAR ANDゲートについての真理値表

抗原A	抗原B	応答
無	無	活性化無し
無	有	活性化無し
有	無	活性化無し
有	有	活性化

20

【0092】

【表 3】

表3:CAR AND NOTゲートについての真理値表

抗原A	抗原B	応答
無	無	活性化無し
無	有	活性化無し
有	無	活性化
有	有	活性化無し

30

【0093】

本発明のT細胞の第1および第2のCARは、切断部位と一緒に両CARを含むポリペプチドとして産生され得る。

40

【0094】

配列番号1～5は、かかるポリペプチドの例を示しており、その各々は2つのCARを含む。したがって、CARは、単一CARに対応する、以下のアミノ酸配列の1つまたは他の部分を含み得る。

配列番号1は、CD19 OR CD33を認識するCAR ORゲートである。

配列番号2は、CD148ホスファターゼを用いるCD19 AND CD33を認識するCAR ANDゲートである。

配列番号3は、CD45ホスファターゼを用いるCD19 AND CD33を認識するCAR ANDゲートの代替的実現形態である。

50

配列番号 4 は、PTPN6 ホスファターゼに基づいた CD19 AND NOT CD33 を認識する CAR AND NOT ゲートである。

配列番号 5 は、CD19 AND NOT CD33 を認識し、LAIR1 からの ITIM 含有エンドドメインに基づく CAR AND NOT ゲートの代替的実現形態である。

配列番号 6 は、CD19 AND NOT CD33 を認識し、ITIM 含有エンドドメインへ PTPN6 - CD148 融合タンパク質をリクルートする CAR AND NOT ゲートのさらなる代替的実現形態である。

【化 1】

配列番号 1

MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPD
GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGK
LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMAVPTQ
VLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLI
YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGGGKLEIKRS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AAQDAYTGGYFDYWGQGLTVTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

30

【化 2】

配列番号 2

MSLPVTALLPLALLHAARPDQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD
 GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTK
 LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
 VSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
 YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMAVPTQ
 VLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLI
 YDTRNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKEIKRS
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
 WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AAQDAYTGGYFDYWGQGTSLTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
 DTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH
 ALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKAVFGCIGFALVIVTVGGFIFWRKKRDAKNNEVSFSQIKPK
 KSKLIRVENFEAYFKKQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPY
 DISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGGLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLT
 KCVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHF
 TSWPDHGVPTDILLINFRYLVRDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRTGTFAIDRLIYQIENEN
 TVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAP
 VTTFGKTNGYIA

10

20

30

【化 3 - 1】

配列番号 3

MSLPVTALLPLALLHAARPDQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD
 GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTK
 LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
 VSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL

40

【化 3 - 2】

YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLLTCGDVEENPGPMAVPTQ
VLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLI
YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AAQDAYTGGYFDYWGGTLVTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKALIAFLAFLIIVTSIALLVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVER
DDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFIKEARKPFNQKNRYV
DILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKAT
VIVMVTRCEEGRNRNKA EYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKAT
GREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTIYIGIDA
MLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSLHPYL
HNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKH
ELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMI
FQRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDLKDSDKSSTYTLRVFELRHSKR
KDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDG
SQQTGIFCALLNLESAETEEVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNG
QVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSV
NGPASPALNQGS

10

20

【化 4 - 1】

配列番号 4

MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD
GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTK
LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
VSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLLTCGDVEENPGPMAVPTQ
VLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLI
YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYC

30

40

【化 4 - 2】

AAQDAYTGGYFDYWGGTLVTVSSMDPATTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRG
SVKGTGLDFACDIYWAPLAGICVALLLSLIITLICYHRSRKRVCSSGGGSFWEEFESLQKQEV
KNLHQRLEGQRPENKGNRYKNILPFDHSRVILQGRDSNIPGSDYINANYIKNQLLGP DENA
KTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENS RVIVMTTREV EKG R N K C V P Y W P E V G M Q R A Y G P Y
SVTNCGEHDTTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGV PSEPGGVLSFLDQINQ
RQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKTIQM VRAQRSGMVQTE
AQYKFIYVAIAQFIETTKKKL

10

【化 5】

配列番号 5

MSLPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N W Y Q Q K P D
GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGK
LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
VSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAEGRGSLT CGDVEENPGPMAVPTQ
VLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLWYQQKPGKAPKLLI
YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AAQDAYTGGYFDYWGGTLVTVSSMDPATTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRG
SVKGTGLDFACDILIGSVVFLFCLLLLVLFLHRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRPD LAVD
VLERTADKATVNLPEKDRETDTSALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPM
AESITYAAVARH

20

30

【化 6 - 1】

配列番号 6

MSLPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N W Y Q Q K P D
GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGK
LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
VSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAEGRGSLT CGDVEENPGPMAVPTQ
VLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLWYQQKPGKAPKLLI
YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRS

40

【化 6 - 2】

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
 WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AAQDAYTG GYFDYWGQGTLVTVSSMDPATTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRG
 SVKGTGLDFACDILIGSVVFLFCLLLLVLFLCLHRQNIQKQGPPRSKDDEEQKPQQRPD LAVD
 VLERTADKATVNGLP EKDR ETDTSALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPM
 AESITYAAVARHRAEGRGSLTTCGDVEENPGPWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTF LVR
 ESLSQPGDFVLSVLS DQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLET FDSLTDLVEHF KKT
 GIEEASGAFVYLRQPYSGGGGSFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKL VGISQPKYAAELAE
 NRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQG PLPNTLKD FWR
 MVWEKNVYAIIMLT KCVEQGR TKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDF TVKNI
 QTS ESHPLRQFHFTSWPDHGV P DTTDLLINFRYLVRDYM KQSPPE SPILVHCSAGVGRTGT
 FIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQC VLDIVRSQKDSKV DLIY
 QNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIASGS

10

【0095】

CARは、少なくとも80、85、90、95、98または99%の配列同一性を有する配列番号1、2、3、4、5または6として示された配列のCARエンコード部分の変異型を含み得るが、ただし、変異型の配列は要求される特性を有するCARであるものとする。

20

【0096】

配列アラインメントの方法は、当技術分野では周知であり、好適なアラインメントプログラムを用いて遂行される。配列同一性%は、2つの配列を最適な形で並列させたときにその2つの配列において同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチド残基のパーセンテージをいう。ヌクレオチドおよびタンパク質の配列相同性または同一性は、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>で公的に入手可能である、デフォルトパラメータを用いるBLASTプログラム(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biotechnology Information)などの標準アルゴリズムを用いて決定され得る。配列同一性または相同性を決定するための他のアルゴリズムには次のものがある：LALIGN(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/>)および<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/nucleotide.html>)、AMAS(Analysis of Multiply Aligned Sequences、<http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/Amas/amass.html>)、FASTA(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>)、Clustal Omega(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)、SIM(<http://web.expasy.org/sim/>)、およびEMBOSS Needle(http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html)。

30

40

【0097】

CAR論理ORゲート

この実施形態では、本発明の第1のCARおよび第2のCARの抗原結合ドメインは、異なる抗原に結合し、両CARとも、活性化エンドドメインを含む。両CARとも、2種の異なる受容体の交差対合を防止するために異なるスペーサドメインを有する。このため、T細胞に対し、抗原の一方または両方の認識の際に活性化するように操作することができる。このことは、Goldie-Coldmanによる仮説により示されているよう

50

に腫瘍学の分野で有用である：単一抗原を標的化するだけでは、ほとんどのがん固有の高い変異率故に前記抗原のモジュレーションにより腫瘍エスケープが起こり得る。2つの抗原を同時に標的化することにより、かかるエスケープの確率（probably）は指数関数的に低減される。

【0098】

様々な腫瘍関連抗原が下記表4に示されているとおり公知である。所与の疾患について、第1のCARおよび第2のCARは、その疾患に関連する2つの異なるTAAに結合し得る。この方法では、第2の抗原も標的とされるため、単一抗原をモジュレートすることによる腫瘍エスケープは防止される。例えば、B細胞悪性腫瘍を標的とするとき、CD19およびCD20を両方とも同時に標的化することができる。この実施形態では、2つのCARがヘテロダイマーを形成しないことが重要である。

10

【表4】

表4

がんタイプ	TAA
びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫	CD19, CD20
乳がん	ErbB2, MUC1
AML	CD13, CD33
神経芽細胞腫	GD2, NCAM
B-CLL	CD19, CD52
結腸直腸がん	葉酸結合タンパク質、CA-125

20

【0099】

動力学的分離モデル

30

ANDゲートおよびAND NOTゲートを生成するためのCARの後続的対合は、T細胞活性化の動力学的分離モデル（KS）に基づく。これは、いかにしてT細胞受容体による抗原認識が下流の活性化シグナルに変換されるかを説明する、実験データに裏付けられた機能モデルである。簡単に述べると、基底状態では、T細胞膜上のシグナル伝達成分は、動的ホメオスタシスにあり、脱リン酸化ITAMは、リン酸化ITAMより好適である。これは、膜貫通CD45/CD148ホスファターゼの活性が、Lckなどの膜連結キナーゼよりも大きいためである。T細胞が、同種抗原のT細胞受容体（またはCAR）認識を通して標的細胞と結び付いたとき、堅固な免疫学的シナプスが形成される。T細胞および標的膜のこの近接した並置により、CD45/CD148は、シナプスへ適合できないそれらの大きなエクトドメイン故に排除される。ホスファターゼの非存在下での、シナプスにおける高濃度のT細胞受容体関連ITAMおよびキナーゼの分離は、リン酸化ITAMの方が有利にはたらく状態をもたらす。ZAP70は、閾値のリン酸化ITAMを認識し、T細胞活性化シグナルを伝搬する。本発明では、T細胞活性化に対するこの進歩した理解を活用する。特に、本発明は、いかにして異なる長さおよび/またはかさおよび/または電荷および/または立体配置および/またはグリコシル化を有するエクトドメインがシナプス形成の際に特異的な分離（differential segregation）をもたらすかについての理解に基づいている。

40

【0100】

CAR論理ANDゲート

この実施形態では、1つのCARが活性化エンドドメインを含み、1つのCARが阻害

50

性エンドドメインを含むことにより、阻害性CARは構成的に第1の活性化CARを阻害するが、その同種抗原の認識の際にその活性化CAR阻害を解除する。このように、標的細胞が両同種抗原を発現する場合のみ発動するようにT細胞は操作され得る。この行動は、ITAMドメイン含有活性化エンドドメイン、例えばCD3-ゼータのエンドドメインを含む活性化CAR、およびITAMを脱リン酸化できるホスファターゼ（例えば、CD45またはCD148）からのエンドドメインを含む阻害性CARにより達成される。重大なことに、両CARのスペーサードメインは、サイズおよび/または形状および/または電荷などが有意に異なる。活性化CARのみがライゲーションされたとき、阻害性CARはT細胞表面上で溶解状態にあり、活性化CARを阻害するシナプスの内外で拡散することができる。両CARがライゲーションされたとき、スペーサー特性が異なる故に、活性化CARおよび阻害性CARは特異的に分離され、活性化CARに、阻害性CARにより妨害されないT細胞活性化を誘発させ得る。

10

【0101】

これは、がん治療分野でかなりの有用性を示す。目下、免疫療法は、典型的には単一抗原を標的とする。ほとんどのがんは、単一抗原に基づく正常組織からは分化され得ない。このため、かなりの「on-target off-tumour」毒性が生じることにより、正常組織はその治療により損傷を被る。例えば、リツキシマブでB細胞リンパ腫を処置するためCD20を標的としている間に、全正常B細胞区画は枯渇に至る。例えば、慢性リンパ性白血病を処置するためCD52を標的としている間に、全リンパ区画は枯渇に至る。例えば、急性骨髄性白血病を処置するためCD33を標的としている間に、全骨髄区画が損傷を被るなど。活性を一組の抗原に制限することにより、より精巧を極めた標的化、したがってより毒性の低い治療を開発することができる。実践例は、CD5およびCD19の両方を発現するCLLの標的化である。両抗原を発現する正常B細胞の比率はわずかな比率に過ぎないため、論理ANDゲートでの両抗原の標的化のオフターゲット毒性は、各抗原を個々に標的化する場合より実質的に低い。

20

【0102】

本発明の設計は、Wilkieら((2012). J. Clin. Immunol. 32, 1059-1070)により記載され、次いでインピボで試験された(Klossら(2013) Nat. Biotechnol. 31, 71-75)ように、先行実現形態にかなりの改良を加えたものである。この実現形態では、第1のCARは活性化エンドドメインを含み、第2のCARは共刺激性ドメインを含む。かくして、T細胞のみが、両抗原が存在するときに活性化および共刺激シグナルを受信する。しかしながら、T細胞はなお、単なる第1の抗原の存在下で活性化し、オフターゲット毒性についての可能性をもたらす。さらに、本発明の実現形態は多重複合リンク型ゲート(multiple compound linked gate)を可能にするもので、細胞は抗原の複合パターンを解釈することができる。

30

【表 5】

表5

がんタイプ	抗原
慢性リンパ性白血病	CD5, CD19
神経芽細胞腫	ALK, GD2
神経膠腫	EGFR, ビメンチン
多発性骨髄腫	BCMA, CD138
腎細胞がん	炭酸脱水酵素 IX, G250
T-ALL	CD2, N-カドヘリン
前立腺がん	PSMA, ヘプシン (または、その他)

10

【0103】

CAR論理AND NOTゲート

この実現形態では、1つのCARが活性化エンドドメインを含み、1つのCARが阻害性エンドドメインを含み、その結果この阻害性CARがその同種抗原を認識したときのみ活性である。このため、このように操作されたT細胞は、第1の抗原の存在のみに応答して活性化されるが、両抗原が存在するときには活性化されない。本発明は、第1のCARと共局在するスパーサーを伴う阻害性CARにより実現されるが、阻害性CARのホスファターゼ活性は、当然阻害性CARが溶解状態で阻害するほど強力ではないか、または阻害性CARがその同種標的を認識したときのみ阻害性エンドドメインは実際にホスファターゼをリクルートするかのいずれかである。かかるエンドドメインは、本明細書では「ライゲーション・オン」または半阻害性と呼ぶ。

20

【0104】

本発明は、腫瘍を腫瘍関連抗原の存在および正常組織で発現された抗原の喪失により正常組織と識別することができるとき、標的化を精巧なものにするのに有用である。AND NOTゲートは、正常細胞であって、ただし活性化エンドドメインを含むCARにより認識される抗原も発現する正常細胞により発現される抗原の標的化を可能にするため、腫瘍学分野でかなりの有用性がある。かかる抗原の一例は、正常幹細胞および急性骨髄性白血病(AML)細胞により発現されるCD33である。CD34は、幹細胞で発現されるが、典型的にはAML細胞からは発現されない。CD33 AND NOT CD34を認識するT細胞は、白血病細胞の破壊をもたらすが、正常幹細胞を残存させる。

30

【0105】

AND NOTゲートで使用するための潜在的抗原対を表6に示す。

【表 6】

表6

疾患	TAA	TAAを発現する正常細胞	正常細胞により発現されるが、がん細胞により発現されない抗原
AML	CD33	幹細胞	CD34
骨髄腫	BCMA	樹状細胞	CD1c
B-CLL	CD160	ナチュラルキラー細胞	CD56
前立腺がん	PSMA	神経組織	NCAM
腸がん	A33	正常腸上皮	HLAクラスI

10

【0106】

複合ゲート

上記成分を伴う動力的分離モデルにより、複合ゲート、例えば2つより多くの標的抗原のパターンに応答して発動するT細胞が作製され得る。例えば、3つの抗原が存在するときのみ(A AND B AND C)発動するT細胞を作製することが可能である。ここで、細胞は3つのCARを発現し、それぞれ抗原A、BおよびCを認識する。1つのCARは興奮性であり、2つのCARは阻害性であり、各CARは、特異的分離をもたらすスペーサードメインを有する。3つ全てがライゲーションされたときのみ、T細胞は活性化する。さらなる例(A OR B) AND C:ここで、抗原AおよびBを認識するCARは、活性型であり、共局在するスペーサーを有し、抗原Cを認識するCARは阻害性であり、異なる共分離をもたらすスペーサーを有する。さらなる例(A AND NOT B) AND C:ここで、抗原Aに対するCARは、活性化エンドドメインを有し、条件的阻害性エンドドメインを有する抗原Bに対するCARと共局在する。抗原Cに対するCARは、AまたはBとは異なる形で分離するスペーサーを有し、阻害性である。事実、より複合的なブール論理でも、任意の数のCARおよびスペーサーを伴う本発明のこれらの単純な成分でプログラム化することができる。

20

30

【0107】

シグナルペプチド

本発明のT細胞のCARはシグナルペプチドを含み得、その結果、CARがT細胞などの細胞の内側で発現されるとき、新生タンパク質を小胞体、それに続いて細胞表面へと指向させ、そこで発現される。

【0108】

シグナルペプチドのコアは、単一アルファ-ヘリックスを形成する傾向を有する疎水性アミノ酸の長いストレッチを含み得る。シグナルペプチドは、アミノ酸の短い正に荷電したストレッチから始まり得、これが転位中におけるポリペプチドの適切なトポロジーを強化する助けとなる。シグナルペプチドの末端に、典型的にはシグナルペプチダーゼにより認識され、切断されるアミノ酸のストレッチが存在する。シグナルペプチダーゼは、転位中または転位完了後に切断して、遊離シグナルペプチドおよび成熟タンパク質を生成させ得る。次いで、遊離シグナルペプチドは、特異的プロテアーゼにより消化される。

40

【0109】

シグナルペプチドは、分子のアミノ末端に位置し得る。

【0110】

シグナルペプチドは、配列番号7、8もしくは9または5、4、3、2もしくは1のアミノ酸変異(挿入、置換または付加)を有するその変異型を含み得るが、ただし、シグナルペプチドは、依然としてCARの細胞表面発現を誘発するべく機能するものとする。

50

【0111】

配列番号7: M G T S L L C W M A L C L L G A D H A D G

配列番号7のシグナルペプチドは、小型であり高効率である。末端グリシンの後約95%切断を与えることから、シグナルペプチダーゼによる効率的な除去をもたらすと予測される。

【0112】

配列番号8: M S L P V T A L L L P L A L L L H A A R P

配列番号8のシグナルペプチドは、I g G 1から誘導される。

【0113】

配列番号9: M A V P T Q V L G L L L L W L T D A R C

配列番号9のシグナルペプチドは、C D 8から誘導される。

10

【0114】

第1のC A Rについてのシグナルペプチドは、第2のC A Rのシグナルペプチド（ならびに第3のC A Rおよび第4のC A Rなど）とは異なる配列を有し得る。

【0115】

抗原結合ドメイン

抗原結合ドメインは、抗原を認識するC A Rの部分である。抗体、抗体模倣物、およびT細胞受容体の抗原結合部位に基づくものを含め、多数の抗原結合ドメインが当技術分野では知られている。例えば、抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体から誘導された1本鎖可変フラグメント(s c F v)；標的抗原の天然リガンド；標的に対する十分な親和力をもつペプチド；単ドメイン抗体；D a r p i n（設計されたアンキリン反復タンパク質）などの人工単一バインダー；またはT細胞受容体から誘導された単鎖を含み得る。

20

【0116】

抗原結合ドメインは、抗体の抗原結合部位に基づかないドメインを含み得る。例えば、抗原結合ドメインは、腫瘍細胞表面受容体についての可溶性リガンド（例えば、サイトカインまたはケモカインなどの可溶性ペプチド）であるタンパク質/ペプチドに基づくドメイン；または膜結合リガンドもしくは結合対のカウンターパートを腫瘍細胞で発現させるための受容体の細胞外ドメインを含み得る。

【0117】

実施例11~13は、B C M Aと結合するC A Rに関するものであり、抗原結合ドメイン(d o a i m n)は、B C M AについてのリガンドであるA P R I Lを含む。

30

【0118】

抗原結合ドメインは、抗原の天然リガンドに基づき得る。

【0119】

抗原結合ドメインは、コンビナトリアルライブラリーからの親和性ペプチドまたは新たに設計された親和性タンパク質/ペプチドを含み得る。

【0120】

スペーサードメイン

C A Rは、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインと連結し、空間的に抗原結合ドメインをエンドドメインから分離させるためのスペーサー配列を含む。可撓性スペーサーは、抗原結合ドメインを異なる方向で配向させることにより、結合を促進し得る。

40

【0121】

本発明のT細胞では、第1のC A Rおよび第2のC A Rは、異なるスペーサー分子を含む。例えば、スペーサー配列は、例えば、I g G 1 F c領域、I g G 1ヒンジまたはヒトC D 8ストークまたはマウスC D 8ストークを含み得る。あるいは、スペーサーは、I g G 1 F c領域、I g G 1ヒンジまたはC D 8ストークと類似した長さおよび/またはドメインスペーシング特性を有する代替的リンカー配列を含み得る。ヒトI g G 1スペーサーは、F c結合性モチーフを除去するために改変され得る。

これらのスペーサーについてのアミノ酸配列の例を以下に示す：

【化 7】

配列番号 10 (ヒト IgG1 のヒンジ CH2CH3)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

配列番号 11 (ヒト CD8 ストーク):

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

10

配列番号 12 (ヒト IgG1 ヒンジ):

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

配列番号 13 (CD2 エクトドメイン)

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFEKEDTYKLF
 KNGTLKIKHLKTDQDIYKVSIDYTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNG
 TDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAFKCTAGNKVSKESSVEPVSCP
 EKGLD

20

配列番号 14 (CD34 エクトドメイン)

SLDNNGTATPELPTQGTFNSVSTNVSQYETTTSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKF
 TSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATS
 PTKPYTSSSPILSDIAEKCSGIREVKLTQGCLEQNKTSSCAEFKDRGEGELARVLCGEEQ
 ADADAGAQCSSLQAQSEVRPQCLLLVLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKGILDFTEQDVA
 SHQSYSQKT

30

【0122】

CAR は典型的にはホモダイマーであるため (図 1 a 参照)、交差対合がヘテロダイマー性キメラ抗原受容体を生じさせ得る。これは、例えば以下の様々な理由により望ましくない: (1) エピトープは、標的細胞上で同じ「レベル」にはないことがあり得、その結果、交差対合した CAR は 1 つの抗原に結合できるのみであり得る; (2) 2 つの異なる scFv からの VH および VL は、取り換え可能であるが、標的を認識できないか、またはなお悪いことには予想外で予測外の抗原を認識することがあり得る。「OR」ゲートおよび「AND NOT」ゲートの場合、第 1 の CAR のスペーサーは、交差対合を回避するため第 2 の CAR のスペーサーとは十分に異なる。第 1 のスペーサーのアミノ酸配列は、第 2 のスペーサーとはアミノ酸レベルで 50%、40%、30% または 20% より低い同一性を共有し得る。

40

【0123】

本発明の他の実施態様 (例えば AND ゲートについて) では、動力学的分離モデルにより予測されるところによると、第 1 の CAR および第 2 の CAR の両方がそれらの標的抗原と結合したとき、スペーサーの電荷または寸法の差異により、2 タイプの CAR が膜の異なる部分へと空間的に分離されて活性化をもたらすように、第 1 の CAR のスペーサーは、異なる長さおよび / または電荷および / または形状および / または立体配置および / またはグリコシル化を有することが重要である。これらの実施態様では、スペーサーの異なる長さ、形状および / または立体配置は、同種標的を認識する際に特異的分離が可能となるように標的抗原上でのサイズおよび標的抗原上の結合エピトープを考慮に入れて注意

50

深く選択される。例えば、I g G 1 ヒンジ、C D 8 ストック、I g G 1 F c、C D 3 4 のエクドメイン、C D 4 5 のエクドメインが、特異的に分離すると予想される。

【 0 1 2 4 】

特異的に分離することから、A N D ゲートでの使用に好適であるスペーサー対の例を、下表に示す：

【表 7】

刺激性CARスペーサー	阻害性CARスペーサー	
ヒト-CD8STK	ヒト-IgG-ヒンジ-CH2CH3	10
ヒト-CD3z エクドメイン	ヒト-IgG-ヒンジ-CH2CH3	
ヒト-IgG-ヒンジ	ヒト-IgG-ヒンジ-CH2CH3	
ヒト-CD28STK	ヒト-IgG-ヒンジ-CH2CH3	
ヒト-CD8STK	ヒト-IgM-ヒンジ-CH2CH3CD4	20
ヒト-CD3z エクドメイン	ヒト-IgM-ヒンジ-CH2CH3CD4	
ヒト-IgG-ヒンジ	ヒト-IgM-ヒンジ-CH2CH3CD4	
ヒト-CD28STK	ヒト-IgM-ヒンジ-CH2CH3CD4	

【 0 1 2 5 】

本発明の他の実施態様（例えばA N D N O T ゲート）では、スペーサーは、交差対合を防止することに関して十分異なるが、共局在することに関して十分類似していることが重要である。オーソログスペーサー配列の対が使用され得る。例は、ネズミおよびヒトC D 8 ストック、または、あるいはモノマー性であるスペーサードメイン、例えばC D 2 のエクドメインである。

【 0 1 2 6 】

共局在することから、A N D N O T ゲートでの使用に好適であるスペーサー対の例を下表に示す：

【表 8】

刺激性CARスペーサー	阻害性CARスペーサー	
ヒト-CD8aSTK	マウスCD8aSTK	40
ヒト-CD28STK	マウスCD8aSTK	
ヒト-IgG-ヒンジ	ヒト-CD3z エクドメイン	
ヒト-CD8aSTK	マウスCD28STK	
ヒト-CD28STK	マウスCD28STK	50
ヒト-IgG-ヒンジ-CH2CH3	ヒト-IgM-ヒンジ-CH2CH3CD4	

【 0 1 2 7 】

上記で挙げたスペーサードメインはすべてホモダイマーを形成する。しかしながら、この機構は、ホモダイマー受容体を使用する場合に限定されるわけではなく、スペーサーが十分に堅固である限りモノマー受容体でも当然機能する。かかるスペーサーの一例は、C

D 2 または先端切除 C D 2 2 である。

【 0 1 2 8 】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインは、膜にわたる C A R の配列である。

【 0 1 2 9 】

膜貫通ドメインは、膜において熱力学的に安定しているいかなるタンパク質構造であってよい。これは、典型的には幾つかの疎水性残基で構成されるアルファ・ヘリックスである。いかなる膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインでも、本発明の膜貫通部分を供給するのに使用され得る。タンパク質の膜貫通ドメインの存在および範囲は、T M H M M アルゴリズム (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) を用いて当業者により決定され得る。さらに、タンパク質の膜貫通ドメインが比較的単純な構造、すなわち膜にわたるのに十分な長さを有する疎水性アルファヘリックスを形成すると予測されるポリペプチド配列であるとすれば、人工的に設計された T M ドメインもまた使用され得る（米国特許第 7 0 5 2 9 0 6 B 1 号は、合成膜貫通成分について記載している）。

10

【 0 1 3 0 】

膜貫通ドメインは、C D 2 8 から誘導され得、良好な受容体安定性を与える。

【 0 1 3 1 】

活性化エンドドメイン

エンドドメインは、C A R のシグナル伝達部分である。抗原認識後、受容体がクラスター形成し、天然 C D 4 5 および C D 1 4 8 は、シナプスから排除され、シグナルは細胞へ伝達される。最も一般的に使用されるエンドドメイン成分は、3つの I T A M を含む C D 3 - ゼータのエンドドメイン成分である。これは、抗原が結合された後、活性化シグナルを T 細胞に伝達する。C D 3 - ゼータは、十分に適格な活性化シグナルを提供しない可能性があるため、追加の共刺激シグナル伝達が必要とされ得る。例えば、キメラ C D 2 8 および O X 4 0 は、C D 3 - ゼータと併用されて、増殖 / 生存シグナルを伝達し得るか、または 3 つ全部が一緒に使用され得る。

20

【 0 1 3 2 】

本発明の T 細胞が活性化エンドドメインを伴う C A R を含む場合、該細胞は、C D 3 - ゼータエンドドメイン単独、C D 2 8 または O X 4 0 どちらかのエンドドメインと共に C D 3 - ゼータエンドドメインまたは C D 2 8 エンドドメインならびに O X 4 0 および C D 3 - ゼータエンドドメインを含み得る。

30

【 0 1 3 3 】

I T A M モチーフを含むエンドドメインであれば、いずれも本発明における活性化エンドドメインとして作用し得る。幾つかのタンパク質が、1つまたはそれより多くの I T A M モチーフを伴うエンドドメインを含むことが知られている。かかるタンパク質として少し例を挙げれば、C D 3 イブシロン鎖、C D 3 ガンマ鎖および C D 3 デルタ鎖が挙げられる。I T A M モチーフは、サイン Y x x L / I を与える、任意の 2 つの他のアミノ酸によりロイシンまたはイソロイシンから分離されたチロシンとして容易に認識され得る。常というわけではないが、典型的には、これらのモチーフの 2 つが、分子 (Y x x L / I x (6 - 8) Y x x L / I) のテイルにおける 6 ~ 8 個の間のアミノ酸により分離される。このため、当業者であれば、活性化シグナルを伝達するための 1 つまたはそれより多くの I T A M を含む既存のタンパク質を容易に見出すことができる。さらに、モチーフが単純であり、複合 2 次構造が要求されないと仮定すると、当業者であれば、活性化シグナルを伝達するための人工 I T A M を含むポリペプチドを設計できる（合成シグナル伝達分子に関する、国際公開第 2 0 0 0 0 6 3 3 7 2 号参照）。

40

【 0 1 3 4 】

活性化エンドドメインを伴う C A R の膜貫通および細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメイン（エンドドメイン）は、配列番号 1 5、1 6 または 1 7 に示された配列または少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその変異型を含み得る。

50

【 0 1 3 5 】

【 化 8 】

配列番号 15 CD28 膜貫通ドメインおよび CD3 ゼータエンドドメインを含む

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY
 QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 16 CD28 膜貫通ドメインならびに CD28 および CD3 ゼータエンドドメインを含む

10

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
 RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
 KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 PR

配列番号 17 CD28 膜貫通ドメインならびに CD28, OX40 および CD3 ゼータエンドドメインを含む

20

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
 RDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQG
 QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
 MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【 0 1 3 6 】

変異型配列が、有効な膜貫通ドメインおよび有効な細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインを提供するものと仮定すれば、該配列は、配列番号 15、16 または 17 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、98% または 99% の配列同一性を有し得る。

【 0 1 3 7 】

「ライゲーション・オフ」阻害性エンドドメイン

30

AND ゲートとして上記で示した実施形態では、阻害性 CAR が、阻害性 CAR ライゲーションの非存在下では活性化 CAR による T 細胞活性化を阻害するが、阻害性 CAR がライゲーションされたとき活性化 CAR による T 細胞活性化を有意に阻害することのないように、CAR の 1 つは阻害性エンドドメインを含む。これは、「ライゲーション・オフ」阻害性エンドドメインと呼ばれる。

【 0 1 3 8 】

この場合、両受容体がライゲーションされたとき、スペーサー寸法の差異が、免疫学的シナプスの異なる膜区画において活性化 CAR と阻害性 CAR の単離をもたらし、その結果、活性化エンドドメインが阻害性エンドドメインによる阻害から解放されるように、阻害性 CAR のスペーサーは、活性化 CAR のスペーサーとは異なる長さ、電荷、形状および/または立体配置および/またはグリコシル化のスペーサーである。

40

【 0 1 3 9 】

したがって、ライゲーション・オフ阻害性 CAR で使用するための阻害性エンドドメインは、同じ膜区画にあるとき（すなわち、阻害性 CAR についての抗原の非存在下で）活性化 CAR による T 細胞シグナル伝達を阻害するが、膜の別々の部分で阻害性 CAR から単離されたときには T 細胞シグナル伝達を有意に阻害しない任意の配列を含み得る。

【 0 1 4 0 】

ライゲーション・オフ阻害性エンドドメインは、受容体様チロシンホスファターゼなどのチロシンホスファターゼであり得るかまたはこれを含み得る。阻害性エンドドメインは、刺激性受容体のみがライゲーションされたとき TCR シグナル伝達を阻害することがで

50

きる任意のチロシンホスファターゼであり得るかまたはこれを含み得る。阻害性エンドドメインは、刺激性受容体のみがライゲーションされたとき T C R シグナル伝達を阻害することができるリン酸化 I T A M についての十分に速い触媒速度を有する任意のチロシンホスファターゼであり得るかまたはこれを含み得る。

【 0 1 4 1 】

例えば、A N D ゲートの阻害性エンドドメインは、C D 1 4 8 または C D 4 5 のエンドドメインを含み得る。C D 1 4 8 および C D 4 5 は、T C R シグナル伝達の上流でのリン酸化チロシンに対して自然に作用することが示されている。

【 0 1 4 2 】

C D 1 4 8 は、P L C 1 および L A T のリン酸化および機能を妨げることにより T C R シグナル伝達を負に調節する受容体様プロテインチロシンホスファターゼである。

10

【 0 1 4 3 】

全造血細胞に存在する C D 4 5 は、同じく P L C 1 をリン酸化することにより、シグナル伝達および機能的応答を調節することができるプロテインチロシンホスファターゼである。

【 0 1 4 4 】

阻害性エンドドメインは、受容体様チロシンホスファターゼの全部または一部 (a l l o f p a r t) を含み得る。ホスファターゼは、P L C 1 および / または L A T などの T 細胞シグナル伝達に關与するエレメントのリン酸化および / または機能を妨げ得る。

20

【 0 1 4 5 】

C D 4 5 および C D 1 4 8 の膜貫通およびエンドドメインを、それぞれ配列番号 1 8 および 1 9 に示す。

【 化 9 】

配列番号 18 - CD45 膜貫通およびエンドドメイン配列

ALIAFLAFLIIVTSIALLVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVPIHADILLETYK
RKIADEGRFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSN
YINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTTRCEEGRNRNKA EYWP
SMEEGTRAFGDDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVDPDPH
LLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTIYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQ
RCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLP
SYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSE
EPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQ
YWGEKGQTYGDIEVDLKDTSSTYTLRVFELRHRSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEP
KELISMIQVVKQLPQKNSSEGKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDI
FQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQ
DANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS

30

40

配列番号 19 - CD148 膜貫通およびエンドドメイン配列

AVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSN
CGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYM
PGYHKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTCKVEQGRTKCEEYWPSPKQAQD
YGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVDPDITDLLINFRYLVR
DYMKQSPPEPILVHCSAGVGRTGTIFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTED
QYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

50

【 0 1 4 6 】

阻害性 C A R は、配列番号 1 8 または 1 9 の全部または一部を含み得る（例えば、それは、エンドドメインのホスファターゼ機能を含み得る）。変異型が活性化 C A R による T 細胞シグナル伝達を基本的に阻害する能力を保持している限り、阻害性 C A R は少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列またはその一部の変異型を含み得る。

【 0 1 4 7 】

他のスパーサーおよびエンドドメインは、例えば本明細書で具体的に示したモデル系を用いて試験され得る。S u p T 1 細胞系などの好適な細胞系に単独に、または二重に形質導入を行って、両抗原について陰性である細胞（野生型）、いずれか一方に陽性および両方に陽性である細胞（例えば、C D 1 9 - C D 3 3 - 、C D 1 9 + C D 3 3 - 、C D 1 9 - C D 3 3 + および C D 1 9 + C D 3 3 + ）を確立することにより標的細胞集団を作製することができる。活性化の際に I L - 2 を放出するマウス T 細胞系 B W 5 1 4 7 などの T 細胞に、C A R の対で形質導入を行い、それらが論理ゲートで機能する能力を、I L - 2 放出の測定により（例えば E L I S A により）測定してもよい。例えば、C D 1 4 8 および C D 4 5 エンドドメインは両方とも、C D 3 - ゼータエンドドメインを含む活性化 C A R との組み合わせで阻害性 C A R として機能することができることが実施例 4 に示されている。これらの C A R は、A N D ゲーティングを達成するため、一方の C A R 上の短い / 嵩高くない C D 8 ストックスパーサーおよび他方の C A R 上の嵩高い F c スパーサーに依拠する。両受容体がライゲーションされたとき、スパーサー寸法の差異により、異なる膜区画における異なる受容体が単離され、C D 3 - ゼータ受容体は C D 1 4 8 または C D 4 5 エンドドメインによる阻害から解放される。かくして、一旦両受容体が活性化されると、活性化のみが起こる。このモジュール系が、代替的スパーサー対および阻害性エンドドメインを試験するのに使用され得ることは容易に見出すことができる。スパーサーが両受容体のライゲーション後に単離を達成しないならば、阻害は解除されず、したがって活性化も起こらない。試験されている阻害性エンドドメインが非有効性であるならば、活性化は、阻害性 C A R のライゲーション状態とは関係なく活性化 C A R のライゲーションの存在下で予測される。

【 0 1 4 8 】

「ライゲーション・オン」エンドドメイン

A N D N O T ゲートとして上記で示された実施形態では、C A R の一方は、阻害性 C A R が、阻害性 C A R ライゲーションの非存在下で活性化 C A R による T 細胞活性化を有意に阻害することはないが、阻害性 C A R がライゲーションされたときには、活性化 C A R による T 細胞活性化を阻害するように「ライゲーション・オン」阻害性エンドドメインを含む。

【 0 1 4 9 】

「ライゲーション・オン」阻害性エンドドメインは、刺激性受容体のみがライゲーションされたとき、T C R シグナル伝達を阻害することができないチロシンホスファターゼであり得るかまたはこれを含み得る。

【 0 1 5 0 】

「ライゲーション・オン」阻害性エンドドメインは、刺激性受容体のみがライゲーションされたとき T C R シグナル伝達を阻害することはできないが、シナプスで濃縮されたときには T C R シグナル伝達応答を阻害することができるリン酸化 I T A M にとって触媒速度が十分に遅いチロシンホスファターゼであり得るかまたはこれを含み得る。シナプスでの濃縮は、阻害性受容体ライゲーションを通して達成される。

【 0 1 5 1 】

チロシンホスファターゼが、「ライゲーション・オン」阻害性エンドドメインにとって速すぎる触媒速度を有するならば、点変異などの修飾および短いリンカー（立体障害を誘発する）によりホスファターゼの触媒速度を落として調整することにより「ライゲーション・オン」阻害性エンドドメインに対して好適なものとするのが可能である。

【 0 1 5 2 】

この第1の実施形態では、エンドドメインは、活性化エンドドメインおよび阻害性エンドドメインが共局在するときにITAMのみの有意な脱リン酸化が起こるように、CD45またはCD148よりもかなり活性が低いホスファターゼであり得るかまたはこれを含み得る。多くの好適な配列が当技術分野では知られている。例えば、NOT ANDゲートの阻害性エンドドメインは、PTPN6などのプロテインチロシンホスファターゼの全部または一部を含み得る。

【0153】

プロテインチロシンホスファターゼ(PTP)は、細胞の成長、分化、有糸分裂周期および発がん性形質転換を含む様々な細胞プロセスを調節するシグナル伝達分子である。このPTPのN末端部分は、2つのタンデムSrcホモログ(SH2)ドメインを含み、これらはタンパク質ホスホ-チロシン結合ドメインとして作用し、このPTPとその基質との相互作用を媒介する。このPTPは、主として造血細胞で発現され、造血細胞における多重シグナル伝達経路の重要な調節因子として機能する。

【0154】

阻害剤ドメインは、PTPN6(配列番号20)の全部またはホスファターゼドメイン(配列番号21)のみを含み得る。

【化10】

配列番号 20 – PTPN6 の配列

MVRWFHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDF
YDLYGGEKFATLTLEVEYYTQQQGVLDQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQA
ETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGG
LETFDSLTDLVEHFHKKTGIEEASGAFVYLRQPPYATRVAADIENRVLELNKKQESEDATA
GFWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGNRYKNILPFDHSRVILQGRDSNIPGSDYIN
ANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVIVMTTREVVEKGRNKCVP
YWPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTEYKLRRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGV
PSEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKT
IQMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQFIETTKKKLEVLQSQKGQSEYGNITYPPAMKNAH
AKASRTSSKHKEDVYENLHTKNKREEKVKKQRSADKEKSKGSLKRK

配列番号 21 – PTPN6 のホスファターゼドメインの配列

FWEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGNRYKNILPFDHSRVILQGRDSNIPGSDYINA
NYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVIVMTTREVVEKGRNKCVPY
WPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTEYKLRRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGV
SEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKT
QMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQF

【0155】

ライゲーション・オン阻害性エンドドメインの第2の実施形態は、CD22、LAIR-1、キラー阻害性受容体ファミリー(KIR)、LILRB1、CTLA4、PD-1、BTLAなどに由来するものなどのITIM(免疫受容体チロシンに基づく阻害モチーフ)含有エンドドメインである。リン酸化されたとき、ITIMはそのSH2ドメインを通して内因性PTPN6をリクルートする。ITAM含有エンドドメインと共局在するならば、脱リン酸化が起こり、活性化CARは阻害される。

【0156】

ITIMは、免疫系の多くの阻害性受容体の細胞質テイルから見出されるアミノ酸の保存配列(S/I/V/LxYxxI/V/L)である。当業者であれば、ITIMを含有するタンパク質ドメインを容易に見出すことができる。ヒト候補ITIM含有タンパク質

のリストは、プロテオームワイド走査法 (proteome-wide scan) (Stauble (2004) Cell. Signal. 16, 435-456) により作製された。さらに、コンセンサス配列は周知であり、2次構造が要求されることはほとんどないようであるため、当業者であれば、人工的ITIMを生成することができる。

PDCD1、BTLA4、LILRB1、LAIR1、CTLA4、KIR2DL1、KIR2DL4、KIR2DL5、KIR3DL1およびKIR3DL3からのITIMエンドドメインを、それぞれ配列番号22~31に示す。

【化11】

配列番号 22 PDCD1 エンドドメイン

CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATI
VFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

10

配列番号 23 BTLA4

KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTL
RFPEMNIPRTGDAESSEMQRPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELI
QFGVGERPQAQENVVILKH

配列番号 24 LILRB1

LRHRRQGKHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQ
PEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQM
DTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH

20

配列番号 25 LAIR1

HRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRPD LAVDVLERTADKATVNGLPEKDRETDTSALAAGSS
QEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMASITYAAVARH

配列番号 26 CTLA4

FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN

30

配列番号 27 KIR2DL1

GNSRHLHVLIGTSVVIIPFAILLFLLHRWCANKKNAVVMQEPAGNRTVNREDSDEQDP
QEVTYTQLNHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKWVSCP

【化 1 2】

配列番号 28 KIR2DL4

GIARHLHAVIRYSVAIILFTILPFFLLHRWCSSKKKENAAVMNQEPAGHRTVNREDSDEQDPQ
 EVTYAQLDHCIFTQRKITGPSQSRKRPSTDTSVCIELPNAEPRALSPAHEHHSQALMGSSRE
 TTALSQTQLASSNVPAAGI

配列番号 29 KIR2DL5

TGIRRHILHILIGTSVAIILFIILFFLLHCCCSNKKNAAVMDQEPAGDRTVNREDSDDQDPQEV
 TYAQLDHCVFTQTKITSPSQRPKTPPTDTTMYMELPNAKPRSLSPAHKHHSQALRGSSRET
 TALSQNRVASSHVPAAGI

10

配列番号 30 KIR3DL1

KDPRHLHILIGTSVVIILFILLFFLLHLWCSSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPPEEV
 TYAQLDHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP

配列番号 31 KIR3DL3

KDPGNSRHLHVLIGTSVVIIPFAILLFFLLHRWCANKKNAVMDQEPAGNRTVNREDSDEQD
 PQEVTYAQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDTSV

20

【0 1 5 7】

ライゲーション・オン阻害性エンドドメインの第3の実施形態は、融合タンパク質と共発現されるITIM含有エンドドメインである。融合タンパク質は、プロテインチロシンホスファターゼの少なくとも一部および受容体様チロシンホスファターゼの少なくとも一部を含み得る。この融合体は、プロテインチロシンホスファターゼからの1つまたはそれより多くのSH2ドメインを含み得る。例えば、この融合体は、PTPN6 SH2ドメインとCD45エンドドメインとの間またはPTPN6 SH2ドメインとCD148エンドドメインとの間にあり得る。リン酸化されたとき、ITIMドメインは、融合タンパク質をリクルートして、非常に強力なCD45またはCD148ホスファターゼを活性化エンドドメインへの近位に導き、活性化を遮断する。

30

融合タンパク質の配列を32および33に列挙する。

【化 1 3 - 1】

配列番号 32 PTPN6-CD45 融合たんぱく質

WYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVTHIKV
 MCEGGRYTVGGLETFDLTLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYKIYDLHKKRSCNLDEQQ
 ELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQN
 KNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIW
 EQKATVIVMVTRECEGNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNK

40

【化 1 3 - 2】

KEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTY
 IGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSL
 HPYLHNMKKRDPPEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRV
 LKHELEMSKESEHSDSESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFMI
 QRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDLKDTSSTYTLRVFELRHSKRK
 DSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGKHHKSTPLLIHCRDGS
 QQTGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASSTYPAQNGQ
 VKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCNVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVN
 GPASPALNQGS

10

【化 1 4】

配列番号 33 PTPN6-CD148 融合物

ETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGG
 LETFDSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFFVLRQPYRKKRKDAKNNEVSFSQIKPKSKLIRVENF
 EAYFKKQQADSNCGFEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQ
 THSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKCVEQGRTK
 CEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWRTIRDFTVKNQTSSEHPLRQFHFTSWPDHGV
 DTTDLLINFRYLVRDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRTGTFFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYD
 LRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGY
 IA

20

【0 1 5 8】

ライゲーション・オン阻害性 C A R は、配列番号 2 0 または 2 1 の全部または一部を含
 み得る。それは、配列番号 2 2 ~ 3 1 の全部または一部を含み得る。それは、配列番号 3
 2 または 3 3 のどちらかと共発現される配列番号 2 2 ~ 3 1 の全部または一部を含み得る
 。それは、変異型が阻害性 C A R のライゲーションの際に活性化 C A R による T 細胞シグ
 ナル伝達を阻害する能力を保持している限り、少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配
 列またはその一部の変異型を含み得る。

30

【0 1 5 9】

上記のとおり、代替的スパーサーおよびエンドドメインは、例えば本明細書で例証した
 モデル系を用いて試験され得る。実施例 5 には、PTPN6 エンドドメインが、CD3 -
 ゼータエンドドメインを含む活性化 C A R と組み合わせた形で半阻害性 C A R として機能
 することができることが示されている。これらの C A R は、一方の C A R 上のヒト CD 8
 ストックスパーサーおよび他方の C A R 上のマウス CD 8 ストックスパーサーに依拠する
 。オーソロガス配列は、交差対合を防止する。しかしながら、両受容体がライゲーション
 されたとき、スパーサー間の類似性により、同じ膜区画における異なる受容体の共単離が
 もたらされる。これにより、PTPN6 エンドドメインによる CD3 - ゼータ受容体の阻
 害が生じる。活性化 C A R のみがライゲーションされたとき、PTPN6 エンドドメイン
 は、T 細胞活性化を防止するほど十分に活性でない。かくして、活性化 C A R がライゲ
 ーションされ、阻害性 C A R がライゲーションされないならば (AND NOT ゲーティン
 グ)、活性化のみが起こる。このモジュール系を用いて、代替的スパーサー対および阻害
 性ドメインを試験することができることは、容易に確かめることができる。スパーサーが
 両受容体のライゲーション後に共分離を達成しないならば、阻害は有効ではなく、したが
 って活性化が起こる。試験されている半阻害性エンドドメインが非有効性であるならば、
 半阻害性 C A R のライゲーション状態とは関係無く活性化 C A R のライゲーションの存在
 下で活性化が予想される。

40

50

【 0 1 6 0 】

共発現部位

本発明の第 2 の実施態様は、第 1 の C A R および第 2 の C A R をコードする核酸に関する。

【 0 1 6 1 】

核酸は、切断部位により連結された 2 つの C A R 分子を含むポリペプチドを生成し得る。切断部位は、ポリペプチドが産生されるとき、外部の切断活性を一切必要とせずに第 1 の C A R および第 2 の C A R へと直ちに切断されるように、自己切断性であり得る。

配列番号 3 4 として示された配列を有する、口蹄疫ウイルス (F M D V) 2 a 自己切断性ペプチドを含む、様々な自己切断性部位が知られている：

配列番号 3 4

R A E G R G S L L T C G D V E E N P G P 。

【 0 1 6 2 】

共発現配列は、内部リボソーム進入部位 (I R E S) であり得る。共発現配列は、内部プロモーターであり得る。

【 0 1 6 3 】

細胞

本発明の第 1 の実施態様は、細胞表面で第 1 の C A R および第 2 の C A R を共発現する細胞に関する。

【 0 1 6 4 】

該細胞は、免疫学的細胞など、細胞表面で C A R を発現することができる任意の真核生物細胞であってよい。

特に、細胞は、T 細胞またはナチュラルキラー (N K) 細胞などの免疫エフェクター細胞であり得る。

【 0 1 6 5 】

T 細胞または T リンパ球は、細胞媒介性免疫において中心的役割を演じるリンパ球のタイプである。それらは、細胞表面における T 細胞受容体 (T C R) の存在により、B 細胞およびナチュラルキラー細胞 (N K 細胞) など、他のリンパ球とは区別することができる。下記で概説する通り、様々なタイプの T 細胞がある。

【 0 1 6 6 】

ヘルパー T ヘルパー細胞 (T H 細胞) は、形質細胞および記憶 B 細胞への B 細胞の成熟、ならびに細胞傷害性 T 細胞およびマクロファージの活性化を含む、免疫学的プロセスで他の白血球を補助する。T H 細胞は、それらの表面で C D 4 を発現する。T H 細胞は、抗原提示細胞 (A P C) の表面で M H C クラス II 分子によりペプチド抗原と共に提示されたときに活性化される。これらの細胞は、種々のサイトカインを分泌することにより、種々のタイプの免疫応答を促進する、T H 1、T H 2、T H 3、T H 1 7、T h 9、または T F H を含む、幾つかのサブタイプのうちの 1 つに分化し得る。

【 0 1 6 7 】

細胞傷害性 T 細胞 (T C 細胞または C T L) は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、また移植拒絶でも関与する。C T L は、それらの表面で C D 8 を発現する。これらの細胞は、全有核細胞の表面に存在する、M H C クラス I に随伴する抗原に結合することにより標的を認識する。調節性 T 細胞により分泌される I L - 1 0、アデノシンおよび他の分子を通じて、C D 8 + 細胞はアネルギー状態に不活化され得、実験的自己免疫脳脊髄炎などの自己免疫疾患を防止する。

【 0 1 6 8 】

記憶 T 細胞は、感染の消散後長期にわたって持続する抗原特異的 T 細胞のサブセットである。それらは、それらの同種抗原に再曝露されると、迅速に多数のエフェクター T 細胞に拡大し、過去の感染に対する「記憶」をもつ免疫系を提供する。記憶 T 細胞は、3 つのサブタイプ：セントラル記憶 T 細胞 (T C M 細胞) および 2 タイプのエフェクター記憶 T 細胞 (T E M 細胞および T E M R A 細胞) を含む。記憶細胞は、C D 4 + または C D 8 +

10

20

30

40

50

のいずれかであり得る。記憶T細胞は、典型的には細胞表面タンパク質CD45ROを発現する。

【0169】

以前にはサプレッサーT細胞として知られていた、調節性T細胞(Treg細胞)は、免疫寛容の維持に非常に重要である。それらの主たる役割は、免疫反応の終末に向けてT細胞媒介性免疫を抑制し、胸腺での負の選択のプロセスを逃れた自己反応性T細胞を抑制することである。

【0170】

CD4+Treg細胞の2つの主なクラス - 天然に存在するTreg細胞および適応Treg細胞については記載されている。

10

【0171】

天然に存在するTreg細胞(CD4+CD25+FoxP3+Treg細胞としても知られている)は、胸腺で生じ、TSLPで活性化された骨髄性(CD11c+)樹状細胞および形質細胞様(CD123+)樹状細胞の両方と発達中のT細胞との間の相互作用に関連付けられている。天然に存在するTreg細胞は、FoxP3と呼ばれる細胞内分子の存在により他のT細胞からは区別され得る。FOX P3遺伝子の変異は、調節性T細胞の発達を防止し得るため、致命的な自己免疫疾患IPEXが引き起こされ得る。

【0172】

適応Treg細胞(Tr1細胞またはTh3細胞としても知られている)は、正常な免疫応答中に生じ得る。

20

【0173】

本発明のT細胞は、上記で挙げたT細胞タイプのいずれでもよいが、特にCTLであり得る。

ナチュラルキラー(NK)細胞は、先天性免疫系の一部を形成する細胞溶解性細胞の1タイプである。NK細胞は、MHC非依存的にウイルス感染細胞からの内生シグナルに対して、迅速な応答を提供する。

【0174】

NK細胞(自然リンパ球の群に属する)は、大顆粒リンパ球(LGL)として定義され、Bリンパ球およびTリンパ球を生じる共通のリンパ性前駆細胞から分化した第3の種類の細胞を構成する。NK細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃および胸腺で分化および成熟し、次いでそこから循環系に入ることが知られている。

30

【0175】

本発明のCAR細胞は、上記で挙げた細胞タイプのいずれでもよい。

【0176】

CAR発現TまたはNK細胞などのCAR発現細胞は、患者自身の末梢血から(第1団)、またはドナー末梢血からの造血幹細胞移植の状況において(第2団)、または非関連ドナーからの末梢血(第3団)から生体外で作製され得る。

【0177】

本発明はまた、本発明によるCAR発現T細胞および/またはCAR発現NK細胞を含む細胞組成物を提供する。該細胞組成物は、本発明による核酸での血液試料の生体外形質導入またはトランスフェクションにより作製され得る。

40

【0178】

あるいは、CAR発現細胞は、T細胞などの関連する細胞タイプへの誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞の生体外分化から誘導され得る。あるいは、溶解機能を保持し、治療薬として作用することができるT細胞系などの不死化細胞系も使用され得る。

【0179】

これらのすべての実施形態において、CAR細胞は、ウイルスベクターでの形質導入、DNAまたはRNAでのトランスフェクションを含む多くの手段のうちの1つによりCARをコードするDNAまたはRNAを導入することにより生成される。

【0180】

50

本発明のCAR T細胞は、被験体由来の生体外T細胞であり得る。T細胞を、末梢血単核細胞(PBMC)試料から得てもよい。T細胞は、CARエンコード核酸で形質導入される前に、例えば抗CD3モノクローナル抗体での処理により活性化および/または拡大され得る。

【0181】

本発明のCAR T細胞は、

(i) 被験体または上記で挙げた他の供給源からのT細胞含有試料の単離；および
(ii) 第1のCARおよび第2のCARをコードする1つまたはそれより多くの核酸配列(複数可)によるT細胞の形質導入またはトランスフェクション
により作製され得る。

10

【0182】

次いで、T細胞は精製され得、例えば、第1のCARおよび第2のCARの共発現に基づいて選択され得る。

【0183】

核酸配列

本発明の第2の実施態様は、本発明の第1の実施態様で記載した第1のCARおよび第2のCARをコードする1つまたはそれより多くの核酸配列(複数可)に関する。

核酸配列は、以下の配列のうちの1つ、またはその変異型を含み得る：

配列番号35 ORゲート

CD45を用いる配列番号36 ANDゲート

CD148を用いる配列番号37 ANDゲート

エンドドメインとしてPTPN6を用いる配列番号38 AND NOTゲート

LAIR1エンドドメインを用いる配列番号39 AND NOTゲート

CD148ホスファターゼとのLAIR1およびPTPN6 SH2融合体を用いる配列番号40 AND NOTゲート。

20

【化 1 5 - 1】

配列番号 35:

>MP13974.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-
CD28tmZw

ATGAGCCTGCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
CGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTACC
AGCAGAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACA
GCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC
ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
TGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAG
GCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGGT
GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
CTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA
CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
GTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTG
ACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCC
ACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGG
GGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTTGGGTGCTGGT
GGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT
TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGG
GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT
GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGG
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC
CGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAGGTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGAT
GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGCGAGA
TCGCGTCACCATCACCTGTGAGCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCA
GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGAT
GGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAA
GTAGCCTGCAACCCGAAGATTTGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
TCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
CAGTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCC
TGTGCAGCCTCAGGATTCAGTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTC
CAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCT

10

20

30

40

【化 1 5 - 2】

ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
TCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGT
GCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA
CACCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGGCAACCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGG
CTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCT
GAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCCTGGTGGTGGTGGGAGG
CGTGCTGGCCTGTTACTCTCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCT
CCCGGGTGAAGTTTTCTCGCTCTGCCGATGCCCCAGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCA
GCTGTACAATGAACTGAACCTGGGCAGGCGGGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCG
GAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAACCACGGCGCAAAAATCCCCAGGAGG
GACTCTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCAT
GAAGGGAGAGAGAAGACGCGGAAAGGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGATTGTCCAC
CGCTACAAAAGATACATATGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCAGATGA

10

20

【化 1 6 - 1】

配列番号 36

>MP14802.SFG.aCD19fmc63_clean-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-
dCD45

ATGAGCCTGCCCCTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
CGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTACC
AGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACA
GCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC
ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
TGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAG
GCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGGT
GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
CTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA

30

40

【化 16 - 2】

CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
GTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTG
ACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCC
ACCATCGCGTCCGAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGG
GGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTTGGGTGCTGGT
GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATT
TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGG
GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT
GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGG
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC
CGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAGGTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGAT
GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTCCGAGA
TCGCGTCACCATCACCTGTGAGCAAGTGAGGACATTTATTTAATTTAGTGTGGTATCA
GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGAT
GGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAA
GTAGCCTGCAACCCGAAGATTTGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
TCACGTTCCGTGAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
CAGTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCC
TGTGCAGCCTCAGGATTCAGTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTC
CAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCT
ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
TCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT
GCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCACCACCAAGGA
CACCCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACA
AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG

10

20

30

40

【化 16 - 3】

CAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG
CTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATAACCAGAAATCTCT
GAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGGCACTGATAGCATTCTGGCATTCTG
ATTATTGTGACATCAATAGCCCTGCTTGTGTTCTCTACAAAATCTATGATCTACATAAGA
AAAGATCCTGCAATTTAGATGAACAGCAGGAGCTTGTGAAAGGGATGATGAAAAACAA
CTGATGAATGTGGAGCCAATCCATGCAGATATTTTGTGGAACCTTATAAGAGGAAGAT
TGCTGATGAAGGAAGACTTTTTCTGGCTGAATTTGAGAGCATCCCGCGGGTGTTCAGCA
AGTTTTCTATAAAGGAAGCTCGAAAGCCCTTTAACCAGAATAAAAACCGTTATGTTGACA
TTCTTCTTATGATTATAACCGTGTGAACTCTCTGAGATAAACGGAGATGCAGGGTCAA
ACTACATAAATGCCAGCTATATTGATGGTTTTCAAAGAACCCAGGAAATACATTGCTGCAC
AAGGTCCCAGGGATGAACTGTTGATGATTTCTGGAGGATGATTTGGGAACAGAAAGC
CACAGTTATTGTCATGGTCACTCGATGTGAAGAAGGAAACAGGAACAAGTGTGCAGAAT
ACTGGCCGTCAATGGAAGAGGGCACTCGGGCTTTTGGAGATGTTGTTGTAAAGATCAA
CCAGCACAAAAGATGTCCAGATTACATCATTGAGAAATTGAACATTGTAAATAAAAAAGA
AAAAGCAACTGGAAGAGAGGTGACTCACATTCAGTTCACCAGCTGGCCAGACCACGGG
GTGCCTGAGGATCCTCACTTGCTCCTCAAACCTGAGAAGGAGAGTGAATGCCTTCAGCA
ATTTCTTCAGTGGTCCCATTGTGGTGCAGTGCAGTGGTGGTGGGCGCACAGGAAC
CTATATCGGAATTGATGCCATGCTAGAAGGCCTGGAAGCCGAGAACAAGTGGATGTTT
ATGGTTATGTTGTCAAGCTAAGGCGACAGAGATGCCTGATGGTTCAAGTAGAGGCCCA
GTACATCTTGATCCATCAGGCTTTGGTGGAATACAATCAGTTTGGAGAAACAGAAGTGA
ATTTGTCTGAATTACATCCATATCTACATAACATGAAGAAAAGGGATCCACCCAGTGAGC
CGTCTCCACTAGAGGCTGAATTCAGAGACTTCCTTCATATAGGAGCTGGAGGACACA
GCACATTGGAAATCAAGAAGAAAATAAAAGTAAAAACAGGAATTCTAATGTCATCCATA
TGACTATAACAGAGTGCCACTTAAACATGAGCTGGAAATGAGTAAAGAGAGTGAGCATG
ATTCAGATGAATCCTCTGATGATGACAGTGATTCAGAGGAACCAAGCAAATACATCAAT
GCATCTTTTATAATGAGCTACTGGAAACCTGAAGTGATGATTGCTGCTCAGGGACCACT
GAAGGAGACCATTGGTGACTTTTGGCAGATGATCTTCCAAAGAAAAGTCAAAGTTATTG
TTATGCTGACAGAACTGAAACATGGAGACCAGGAAATCTGTGCTCAGTACTGGGGAGA
AGGAAAGCAAACATATGGAGATATTGAAGTTGACCTGAAAGACACAGACAAATCTTCAA
CTTATACCCTTCGTGTCTTTGAACTGAGACATTCCAAGAGGAAAGACTCTCGAACTGTG
TACCAGTACCAATATACAACTGGAGTGTGGAGCAGCTTCCTGCAGAACCCAAGGAATT
AATCTCTATGATTGAGTTCGTCAAACAAAACTTCCCCAGAAGAATTCCTCTGAAGGGA
ACAAGCATCACAAGAGTACACCTCTACTCATTCACTGCAGGGATGGATCTCAGCAAACG
GGAATATTTTGTGCTTTGTTAAATCTCTTAGAAAAGTGCGGAAACAGAAGAGGTAGTGGA
TATTTTTCAAGTGGTAAAAGCTCTACGCAAAGCTAGGCCAGGCATGGTTTCCACATTG
AGCAATATCAATTCCTATATGACGTCATTGCCAGCACCTACCCTGCTCAGAATGGACAA

10

20

30

40

【化 1 6 - 4】

GTAAAGAAAAACAACCATCAAGAAGATAAAATTGAATTTGATAATGAAGTGGACAAAGTA
AAGCAGGATGCTAATTGTGTTAATCCACTTGGTGCCCCAGAAAAGCTCCCTGAAGCAAA
GGAACAGGCTGAAGGTTCTGAACCCACGAGTGGCACTGAGGGGCCAGAACATTCTGTC
AATGGTCCTGCAAGTCCAGCTTTAAATCAAGGTTTCATAG

【化 1 7 - 1】

配列番号 37:

>MP14801.SFG.aCD19fmc63_clean-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-
dCD148

ATGAGCCTGCCCCTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
CGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTACC
AGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACA
GCGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC
ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
TGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAG
GCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGGT
GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
CTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA
CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
GTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTG
ACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCC
ACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGG
GGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTTGGGTGCTGGT
GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT
TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG
GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT
GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGG
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC
CGGGCCCATGGCCGTGCCACTCAGGTCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGAT
GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTCGGAGA
TCGCGTCACCATCACCTGTGCGAGCAAGTGAGGACATTTATTTAATTTAGTGTGGTATCA
GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGAT

10

20

30

40

【化 17 - 2】

GGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAA
GTAGCCTGCAACCCGAAGATTTTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
TCACGTTCCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
CAGTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCC
TGTGCAGCCTCAGGATTCACCTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTC
CAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCT
ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
TCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT
GCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTTCCCAAGGA
CACCCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGGCAACCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG
CTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCT
GAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGGCGGTTTTTGGCTGTATCTTTGGTGGC
CTGGTTATTGTGACTGTGGGAGGCTTCATCTTCTGGAGAAAGAAGAGGAAAGATGCAAA
GAATAATGAAGTGTCTTTTTCTCAAATTAACCTAAAAATCTAAGTTAATCAGAGTGGA
GAATTTTGAGGCCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAAGTGTGGGTTTCGAGAG
GAATACGAAGATCTGAAGCTTGTTGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAGAACTGGC
TGAGAATAGAGGAAAGAATCGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATATTTCCCGTGTCAA
ACTTTCCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCAACTACATGCCTGGCT
ACCACTCCAAGAAAGATTTTATTGCCACACAAGGACCTTTACCGAACACTTTGAAAGATT
TTTGGCGTATGGTTTGGGAGAAAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTG
AACAGGGAAGAACCAAATGTGAGGAGTATTGGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGG
AGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAAATTGTTCTTCCGGAATGGACCATCAGAGATT
TCACAGTGAAAAATATCCAGACAAGTGAGAGTCACCCTCTGAGACAGTTCCATTTACC
TCCTGGCCAGACCACGGTGTTCCTCGACACCACTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTACC
TCGTTCTGACTACATGAAGCAGAGTCCTCCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGT
GCTGGGGTCCGAAGGACGGGCACTTTTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAG

10

20

30

40

【化 1 7 - 3】

AGAATGAGAACACCGTGGATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCT
TTAATGGTGCAGACAGAGGACCAGTATGTTTTCTCAATCAGTGTGTTTTGGATATTGTC
AGATCCCAGAAAGACTCAAAAGTAGATCTTATCTACCAGAACACAACCTGCAATGACAAT
CTATGAAAACCTTGCGCCCGTGACCACATTTGGAAAGACCAATGGTTACATCGCCTAA

【化 1 8 - 1】

配列番号 38

>16076.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-tm-dPTPN6

10

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
CGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTACC
AGCAGAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACA
GCGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC
ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
TGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAG
GCTCTGGCGGAGGCGGGCTCTGGCGGAGGCGGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGGT
GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
CTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA
CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
GTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCGCGTG
ACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCC
ACCATCGCGTCGACGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGG
GGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTTGGGTGCTGGT
GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT
TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG
GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT
GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGG
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC
CGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAGGTCTTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGAT
GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGCGGAGA
TCGCGTCACCATCACCTGTGAGCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCA
GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGAT
GGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAA

20

30

40

【化 1 8 - 2】

GTAGCCTGCAACCCGAAGATTTGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
TCACGTTCCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
CAGTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCC
TGTGCAGCCTCAGGATTCAGTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTC
CAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCT
ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
TCGTCTATGGATCCCGCCACCACAACCAAGCCCGTGCTGCGGACCCCAAGCCCTGTGC
ACCCTACCGGCACCAGCCAGCCTCAGAGACCCGAGGACTGCCGGCCTCGGGGCAGC
GTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATCTACTGGGCACCTCTGGCCGGA
ATATGCGTGGCACTGCTGCTGAGCCTCATCATCACCCCTGATCTGTTATCACCGAAGCCG
CAAGCGGGTGTGTAAAAGTGGAGGCGGAAGCTTCTGGGAGGAGTTTGAGAGTTTGCA
GAAGCAGGAGGTGAAGAACTTGCACCAGCGTCTGGAAGGGCAGCGGCCAGAGAACAA
GGGCAAGAACCCTACAAGAACATTCTCCCTTTGACCACAGCCGAGTGATCCTGCAG
GGACGGGACAGTAACATCCCCGGGTCCGACTACATCAATGCCAACTACATCAAGAACC
AGCTGCTAGGCCCTGATGAGAACGCTAAGACCTACATCGCCAGCCAGGGCTGTCTGGA
GGCCACGGTCAATGACTTCTGGCAGATGGCGTGGCAGGAGAACAGCCGTGTCATCGT
CATGACCACCCGAGAGGTGGAGAAAGGCCGGAACAAATGCGTCCCATACTGGCCCGA
GGTGGGCATGCAGCGTGCTTATGGGCCCTACTCTGTGACCAACTGCCGGGAGCATGA
CACAACCGAATACAACTCCGTACCTTACAGGTCTCCCCGCTGGACAATGGAGACCTG
ATTCGGGAGATCTGGCATTACAGTACCTGAGCTGGCCCCGACCACGGGGTCCCCAGT
GAGCCTGGGGGTGTCCTCAGCTTCTGGACCAGATCAACCAGCGGCAGGAAAGTCTG
CCTCACGCAGGGCCCATCATCGTGCAGTGCAGCGCCGGCATCGGCCGCACAGGCACC
ATCATTGTCATCGACATGCTCATGGAGAACATCTCCACCAAGGGCCTGGACTGTGACAT
TGACATCCAGAAGACCATCCAGATGGTGCGGGCGCAGCGCTCGGGCATGGTGCAGAC
GGAGGCGCAGTACAAGTTCATCTACGTGGCCATCGCCCAGTTCATTGAAACCACTAAG
AAGAAGCTGTGA

10

20

30

【化 1 9 - 1】

配列番号 39

>MP16091.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-LAIR1tm-endo
ATGAGCCTGCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
CGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAGTGGTACC
AGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACA
GCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC

40

【化 19 - 2】

ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
TGCCCTACACCTTCGGAGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAG
GCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGGT
GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
CTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA
CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
GTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTG
ACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCC
ACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGG
GGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTTGGGTGCTGGT
GGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT
TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGG
GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT
GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGG
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGGCCTGCCTCC
TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC
CGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAGGTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGAT
GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTCCGAGA
TCGCGTCACCATCACCTGTGAGCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCA
GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGAT
GGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAA
GTAGCCTGCAACCCGAAGATTTGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
TCACGTTCCGTGAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
CAGTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCC
TGTGCAGCCTCAGGATTCAGTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTC
CAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCT
ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
TCGTCTATGGATCCCGCCACCACAACCAAGCCCGTGCTGCGGACCCCAAGCCCTGTGC
ACCCTACCGGCACCAGCCAGCCTCAGAGACCCGAGGACTGCCGGCCTCGGGGCAGC
GTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATTCTCATCGGGGTCTCAGTGGTCT

10

20

30

40

【化 1 9 - 3】

TCCTCTTCTGTCTCCTCCTCCTGGTCCTCTTCTGCCTCCATCGCCAGAATCAGATAAAG
CAGGGGCCCCCAGAAGCAAGGACGAGGAGCAGAAGCCACAGCAGAGGCCTGACCT
GGCTGTTGATGTTCTAGAGAGGACAGCAGACAAGGCCACAGTCAATGGACTTCCTGAG
AAGGACCGGGAGACCGACACCAGCGCCCTGGCTGCAGGGAGTTCCAGGAGGTGAC
GTATGCTCAGCTGGACCACTGGGCCCTCACACAGAGGACAGCCCGGGCTGTGTCCCC
ACAGTCCACAAAGCCCATGGCCGAGTCCATCACGTATGCAGCCGTTGCCAGACACTGA

【化 2 0 - 1】

配列番号 40

>MP16092.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-LAIR1tm-
endo-2A-PTPN6_SH2-dCD148

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
CGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTACC
AGCAGAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACA
GCGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC
ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
TGCCCTACACCTTCGGAGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAG
GCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGGT
GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
CTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA
CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
GTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTG
ACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCC
ACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGG
GGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTTGGGTGCTGGT
GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATT
TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG
GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT
GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
GATTGGGATGAAAGGCCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGG
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC
CGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAGGTCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGAT
GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTCGGAGA

10

20

30

40

【化 2 0 - 2】

TCGCGTCACCATCACCTGTCCGAGCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCA
GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGAT
GGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAA
GTAGCCTGCAACCCGAAGATTTGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
TCACGTTCCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
CAGTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCC
TGTGCAGCCTCAGGATTCACCTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTC
CAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCT
ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTTCACAGTC
TCGTCTATGGATCCCGCCACCACAACCAAGCCCGTGCTGCGGACCCCAAGCCCTGTGC
ACCCTACCGGCACCAGCCAGCCTCAGAGACCCGAGGACTGCCGGCCTCGGGGCAGC
GTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATTCTCATCGGGGTCTCAGTGGTCT
TCCTCTTCTGTCTCCTCCTCCTGGTCTCTTCTGCCTCCATCGCCAGAATCAGATAAAG
CAGGGGCCCCCAGAAGCAAGGACGAGGAGCAGAAGCCACAGCAGAGGCCTGACCT
GGCTGTTGATGTTCTAGAGAGGACAGCAGACAAGGCCACAGTCAATGGACTTCCTGAG
AAGGACCGGGAGACCGACACCAGCGCCCTGGCTGCAGGGAGTTCCCAGGAGGTGAC
GTATGCTCAGCTGGACCACTGGGCCCTCACACAGAGGACAGCCCGGGCTGTGTCCCC
ACAGTCCACAAAGCCCATGGCCGAGTCCATCACGTATGCAGCCGTTGCCAGACACAGG
GCAGAAGGAAGAGGTAGCCTGCTGACTTGCGGGGACGTGGAAGAGAACCCAGGGCCA
TGGTATCATGGCCACATGTCTGGCGGGCAGGCAGAGACGCTGCTGCAGGCCAAGGGC
GAGCCCTGGACGTTTCTTGTGCGTGAGAGCCTCAGCCAGCCTGGAGACTTCGTGCTTT
CTGTGCTCAGTGACCAGCCCAAGGCTGGCCAGGCTCCCCGCTCAGGGTCACCCACA
TCAAGGTCATGTGCGAGGGTGGACGCTACACAGTGGGTGGTTTGGAGACCTTCGACAG
CCTCACGGACCTGGTGGAGCATTTCAAGAAGACGGGGATTGAGGAGGCCTCAGGCGC
CTTTGTCTACCTGCGGCAGCCGTACAGCGGTGGCGGTGGCAGCTTTGAGGCCTACTTC
AAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAACCTGTGGGTTGCGAGAGGAATACGAAGATCTGAAGC
TTGTTGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAGAAGTGGCTGAGAATAGAGGAAAGAAT
CGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATATTTCCCGTGTCAAACCTTTCCGTCCAGACCCAT
TCAACGGATGACTACATCAATGCCAACTACATGCCTGGCTACCACTCCAAGAAAGATTT
TATTGCCACACAAGGACCTTTACCGAACACTTTGAAAGATTTTGGCGTATGGTTTGGG
AGAAAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTGAACAGGGAAGAACCAAAT
GTGAGGAGTATTGGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAAT
GACATCAGAAATTGTTCTTCCGGAATGGACCATCAGAGATTTACAGTGAAAAATATCC
AGACAAGTGAGAGTCACCCCTCTGAGACAGTTCCATTTACCTCCTGGCCAGACCACGG

10

20

30

40

【化 2 0 - 3】

TGTTCCCGACACCACTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTACCTCGTTCGTGACTACATGA
 AGCAGAGTCCTCCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGCTGGGGTCGGAAGGA
 CGGGCACTTTTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGAGAATGAGAACACCGTG
 GATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCTTTAATGGTGCAGACAGA
 GGACCAGTATGTTTTCTCAATCAGTGTGTTTTGGATATTGTCAGATCCCAGAAAAGACTC
 AAAAGTAGATCTTATCTACCAGAACACAACCTGCAATGACAATCTATGAAAACCTTGCGCC
 CGTGACCACATTTGGAAAGACCAATGGTTACATCGCCAGCGGTAGCTAA

10

【0 1 8 4】

該核酸配列は、配列番号 35、36、37、38、39 または 40 によりコードされるものと同じアミノ酸配列をコードし得るが、遺伝コードの縮重故に、異なる核酸配列を有し得る。該核酸配列は、それが本発明の第 1 の実施態様に定義した第 1 の C A R および第 2 の C A R をコードするかぎり、配列番号 35、36、37、38、39 または 40 に示された配列と少なくとも 80、85、90、95、98 または 99 % の同一性を有し得る。

【0 1 8 5】

ベクター

本発明はまた、1 つまたはそれより多くの C A R エンコード核酸配列（複数も可）を含むベクターまたはベクターのキットを提供する。かかるベクターは、宿主細胞へ核酸配列（複数も可）を導入するのに使用され得、それにより、その宿主細胞が第 1 の C A R および第 2 の C A R を発現する。

20

【0 1 8 6】

ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター、またはトランスポゾンに基づくベクターまたは合成 m R N A であり得る。

【0 1 8 7】

本ベクターは、T 細胞に対しトランスフェクションまたは形質導入を行うことができるものであればよい。

30

【0 1 8 8】

医薬組成物

本発明はまた、本発明の第 1 の実施態様による T 細胞または N K 細胞などの複数の C A R 発現細胞を含む医薬組成物に関する。医薬組成物は、さらに薬学的に許容し得る担体、希釈剤または賦形剤を含んでいてもよい。医薬組成物は、所望により 1 種またはそれより多くのさらなる医薬活性ポリペプチドおよび / または化合物を含んでいてもよい。かかる製剤は、例えば、静脈内注入に好適な形態であり得る。

【0 1 8 9】

処置方法

本発明の T 細胞は、がん細胞などの標的細胞を殺すことができるものであればよい。標的細胞は、抗原発現の特定パターン、例えば抗原 A A N D 抗原 B の発現；抗原 A O R 抗原 B の発現；または抗原 A A N D N O T 抗原 B の発現またはこれらのゲートの複合的反復により認識可能であり得る。

40

【0 1 9 0】

本発明の T 細胞は、ウイルス感染症などの感染症の処置に使用され得る。

【0 1 9 1】

本発明の T 細胞はまた、例えば自己免疫疾患、アレルギーおよび移植片対宿主拒絶における、病的免疫応答の制御に使用され得る。

【0 1 9 2】

本発明の T 細胞は、膀胱がん、乳がん、結腸がん、子宮体がん、腎臓がん（腎細胞）、

50

白血病、肺がん、メラノーマ、非ホジキンリンパ腫、膵臓がん、前立腺がんおよび甲状腺がんなどのがん性疾患の処置に使用され得る。

【0193】

それは、良好な選択的単一標的の利用可能性が限定される固形腫瘍の処置に特に適している。

【0194】

本発明のT細胞は、舌、口および咽頭のがんを含む口腔および咽頭のがん；食道がん、胃がんおよび結腸直腸がんを含む消化器系のがん；肝細胞癌および胆管癌を含む肝臓および胆道系のがん；気管支原性がんおよび喉頭のがんを含む呼吸器系のがん；骨肉腫を含む骨および関節のがん；メラノーマを含む皮膚のがん；乳がん；女性における子宮がん、卵巣がんおよび子宮頸がん、男性における前立腺がんおよび精巣がんを含む生殖器のがん；腎細胞癌および尿管（uterer）もしくは膀胱の移行上皮癌を含む腎臓系（renal tract）のがん；神経膠腫、多形神経膠芽腫および髄芽腫（medulloblastoma）を含む脳がん；甲状腺がん、副腎癌および多発性内分泌腫瘍症候群に随伴するがんを含む内分泌系のがん；ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫；多発性骨髄腫および形質細胞腫；急性および慢性の両方の、骨髄性またはリンパ性の白血病；ならびに神経芽細胞腫を含む他の部位および非特定部位のがんを処置するのに使用され得る。

10

【0195】

本発明のT細胞による処置は、標準的手法で起こることが多い腫瘍細胞のエスケープまたは放出を防止するのを助け得る。

20

【0196】

以下、実施例により本発明をさらに記載するが、これは、本発明を実施する上で当業者を助ける役割を果たすことを意味するもので、本発明の範囲をいかなる意味にせよ限定する意図はない。

【実施例】

【0197】

実施例1 - 標的細胞集団の作製

本発明の原理を証明する目的で、抗CD19および抗CD33に基づく受容体を任意選択した。レトロウイルスベクターを用いて、CD19およびCD33をクローン化した。これらのタンパク質の先端を切除した結果、それらはシグナルを発さず、長期間にわたって安定して発現させることができた。次に、これらのベクターを用いて、SupT1細胞系に対し単独に、または二重に形質導入を行い、両抗原に陰性の細胞（野生型）、どちらか一方に陽性の細胞および両方に陽性の細胞を確立した。発現データを図3に示す。

30

【0198】

実施例2 - ORゲートの設計および機能

ORゲートを構築するため、CD19およびCD33を認識する1対の受容体を共発現させた。異なるスペーサーを用いることにより、交差対合を防止した。両受容体とも、表面安定性を改善するためのCD28由来の膜貫通ドメインおよび単純な活性化シグナルを提供するためのCD3-ゼータのものから誘導されたエンドドメインを有していた。かくして、1対の独立した第一世代CARを共発現させた。配列を共発現させるのに使用されたレトロウイルスベクターカセットは、口蹄疫2A（foot-and-mouth 2A）自己切断性ペプチドを利用することにより、両受容体の1:1共発現を可能にした。カセット設計を図4に、タンパク質構造を図5に示す。相同性領域のヌクレオチド配列をコドンゆらぎ状態としてレトロウイルスベクター逆転写の間の組換えを防止した。

40

【0199】

実施例3 - ORゲートの試験

両CARの発現を、Fcに融合させた同種抗原で染色することによりT細胞表面上で試験した。異なる種（CD19にはマウスおよびCD33にはウサギ）のFcドメインを用いることにより、両CARの共発現を、異なるフルオロフォアでコンジュゲートした異な

50

る2次抗体で染色することにより細胞表面上で決定した。これを図6に示す。

【0200】

次いで、マウスT細胞系BW5147を用いて機能試験を実施した。この細胞系は、活性化の際にIL-2を放出するため、単純な定量的読出しが可能となる。これらのT細胞を、漸増量の上記人工標的細胞と共培養した。T細胞は、ELISAにより測定されたIL-2放出により示されるとおり、いずれかの抗原を発現する標的細胞に応答した。両CARとも、細胞表面上で発現されることが示され、T細胞は一方または両方の抗原に応答することが示された。これらのデータを図7に示す。

【0201】

実施例4 - ANDゲートの設計および機能

ANDゲートでは、単純な活性化受容体を、基本的には活性を阻害するが、一旦受容体がライゲーションされると、その阻害が止められてしまう受容体と組み合わせる。これは、短い/嵩高くないCD8ストークスパーおよびCD3-ゼータエンドドメインをもつ標準的第一世代CARを、そのエンドドメインがCD148エンドドメインまたはCD45エンドドメインのいずれかを含む嵩高いFcスパーをもつ第2の受容体と組み合わせることにより達成された。両受容体がライゲーションされたとき、スパー寸法の差異により、異なる膜区画において異なる受容体が単離され、CD3-ゼータ受容体をCD148またはCD45エンドドメインによる阻害から解放させる。かくして、一旦両受容体が活性化されると、活性化のみが起こる。CD148およびCD45は、本来この様式で機能するため、それらをこのために選択した：例えば、非常に嵩高いCD45エク

【0202】

異なる特異性についての表面染色は、両受容体対が、図10に示されたように細胞表面で有効に発現され得ることを示した。BW5147における機能は、両抗原の存在下ではT細胞が活性化されるだけであることを示す(図11)。

【0203】

実施例5：ANDゲートの一般化可能性の実証

観察結果がCD19/CD33および使用されていたそれらのバインダーのいくつかの特異的な特徴の発現ではなかったことを確認するため、ここでは、活性化(ITAM)シグナルがCD19ではなくCD33の認識の際に伝達され、また阻害性(CD148)シグナルがCD33ではなくCD19の認識の際に伝達されるように、2つの標的化scFvを交換した。CD45エンドドメインおよびCD148エンドドメインは、機能的に類似していると考えられるため、CD148エンドドメインを伴うANDゲートに実験を制限した。これにより、当然機能的ANDゲートが依然としてもたらされる。新しい論理ゲートを発現するT細胞を、CD19またはCD33のいずれか一方または両方を担持する標的でチャレンジした。T細胞は、CD19およびCD33の両方を発現する標的に応答したが、これらの抗原の一方のみを発現するかまたはどちらも発現しない標的には応答しなかった。これは、ANDゲートが依然としてこのフォーマットで機能性であることを示す(図18B)。

【0204】

同じ系において、本発明者らのANDゲートがいかに一般化可能であることを確立しようと努めた：ANDゲートは、種々の標的全体にわたって一般化可能であるべきである。相対的抗原密度、同種scFv結合速度論およびscFv結合エピトープの正確な距離が与えられたゲートの忠実度は多かれ少なかれあり得るが、広範なセットの標的およびバインダーをもついくつかのANDゲート発現を見出すことが予想される。これを試験するため、3つの追加的ANDゲートを生成した。今回もまた、ANDゲートのCD148バージョンに実験を制限した。元のCD148 ANDゲートからの第2のscFvを、抗GD2 scFv huK666(配列番号41および配列番号42)、または抗CD5 scFv(配列番号43および配列番号44)、または抗EGFRvIII scFv M

10

20

30

40

50

R 1 . 1 (配列番号 4 5 および配列番号 4 6) で置き換えて、以下の C A R A N D ゲート: C D 1 9 A N D G D 2 ; C D 1 9 A N D C D 5 ; C D 1 9 A N D E G F R v I I I を生成した。また、以下の人工抗原発現細胞系が生成された: S u p T 1、および本発明者らの S u p T 1 . C D 1 9 を G M 3 および G D 2 シンターゼで形質導入することにより、S u p T 1 . G D 2 および S u p T 1 . C D 1 9 . G D 2 が生成された。S u p T 1 および S u p T 1 . C D 1 9 を、E G F R v I I I をコードするレトロウイルスベクターで形質導入することにより、S u p T 1 . E G F R v I I I および S u p T 1 . C D 1 9 . E G F R v I I I が生成された。C D 5 は S u p T 1 細胞で発現されるため、異なる細胞系を用いて標的細胞を生成させた: C D 1 9 単独、C D 5 単独および C D 5 および C D 1 9 の両方を合わせて発現する 2 9 3 T 細胞を生成させた。発現をフローサイトメトリーにより確認した (図 1 9) 。 3 つの新たな C A R A N D ゲートを発現する T 細胞を、S u p T 1 . C D 1 9 およびそれぞれ同種のダブル陽性およびシングル陽性標的細胞でチャレンジした。3 つの A N D ゲートは全て、シングル陽性標的との比較におけるダブル陽性細胞系による活性化の低減を証明した (図 2 0) 。これは、任意標的および同種バインダーに対する A N D ゲート設計の一般化可能性を実証する。

【 0 2 0 5 】

実施例 6 : C A R A N D ゲートの動力的分離モデルの実験的証明

この目的は、異なるスペーサーにより誘発される特異的分離が、これらの論理 C A R ゲートを生成する能力の背後の中心機構であることを証明することであった。このモデルは、活性化 C A R のみがライゲーションされれば、強力な阻害性「ライゲーション・オフ」型 C A R が膜において溶解状態であり、活性化 C A R を阻害することができるということである。一旦両 C A R がライゲーションされると、両 C A R スペーサーが十分に異なれば、それらはシナプス内で分離し、共局在することはない。このため、重要な必要条件は、スペーサーが十分に異なることである。このモデルが正しければ、両スペーサーが、両受容体がライゲーションされたとき、共局在するほど十分に類似していれば、ゲートは、機能し得ない。これを試験するため、元の C A R における「嵩高い」F c スペーサーを、本発明者らはネズミ C D 8 スペーサーで置き換えた。これがヒト C D 8 と類似した長さ、かさおよび電荷を有するが、当然それと交差対合するものではないことが予測された。このため、新しいゲートは、C D 1 9 を認識し、ヒト C D 8 ストックスペーサーおよび活性化エンドドメインを有する第 1 の C A R ; 同時に、C D 3 3 を認識し、マウス C D 8 ストックスペーサーおよび C D 1 4 8 エンドドメインを有する第 2 の C A R を有した (図 1 8 C) 。 T 細胞に対し、この新しい C A R ゲートを発現するように形質導入した。次いで、これらの T 細胞を、C D 1 9 単独、C D 3 3 単独または C D 1 9 および C D 3 3 の両方を発現する S u p T 1 細胞でチャレンジした。T 細胞は、元の A N D ゲートのとおりになぜかの抗原のみを発現する S u p T 1 細胞には応答しなかった。しかしながら、C A R T 細胞は、両抗原を発現する S u p T 1 細胞には応答し得なかったことから、このモデルが確認された (図 1 8 C) 。機能的 A N D ゲートは、両 C A R が免疫学的シナプス内で共局在することがないようにそれらが十分に異なるスペーサーを有することを要求する (図 2 3 A および B) 。

【 0 2 0 6 】

実施例 7 - A N D N O T ゲートの設計および機能

C D 4 5 および C D 1 4 8 などのホスファターゼは、非常に強力であるため、免疫学的シナプスに少量入っただけでも、I T A M 活性化を阻害することができる。これは、論理 A N D ゲートの阻害の基礎である。他のクラスのホスファターゼ、例えば P T P N 6 および関連ホスファターゼは、それほど強力ではない。少量の P T P N 6 が拡散によりシナプスに入っても活性化を阻害することはないと予測された。加えて、阻害性 C A R が活性化 C A R と十分に類似したスペーサーを有するならば、両 C A R がライゲーションされると、シナプス内で共局在できると予測された。この場合、大量の阻害性エンドドメインであれば、両抗原が存在するとき I T A M が活性化するのを止めるのに十分である。かくして、A N D N O T ゲートを作製することができた。

【0207】

NOT ANDゲートの場合、第2のシグナルは、活性化を「拒否する(veto)」必要がある。これは、阻害性シグナルを免疫学的シナプスにもたらしることにより、例えばPTPN6などの酵素ホスファターゼをもたらしることにより行われる。このため、本発明者らは、最初のAND NOTゲートを以下の通り生成した：2つのCARを共発現させ、それにより、第1のCARはヒトCD8ストークスパーサーおよび活性化エンドドメインを有してCD19を認識し；マウスCD8ストークスパーサーおよびPTPN6の触媒ドメインを含むエンドドメインを伴う抗CD33 CARと共発現させる（配列番号38、図13AとB）。好適な力セットを図12に示し、予備的機能データを図14に示す。

【0208】

加えて、AND NOTゲートを生成するための代替的戦略を開発した。免疫チロシンーゼ阻害性モチーフ(ITIM)は、ホスファターゼが集合および排除されるとITIMがIckによりリン酸化されるという点で、ITAMと類似した様式で活性化される。ZAP70と結合することにより活性化を誘発する代わりに、リン酸化ITIMは、それらの同種SH2ドメインを通してPTPN6などのホスファターゼをリクルートする。ITIMは、活性化CARおよび阻害性CAR上のスペーサーが共局在し得る限り、阻害性エンドドメインとして機能することができる。この構築物を生成するため、AND NOTゲートを以下の通り生成した：2つのCARを共発現させた - 第1のCARは、ヒトCD8ストークスパーサーおよび活性化エンドドメインを有してCD19を認識し；マウスCD8ストークスパーサーおよびLAIR1のものに由来するITIM含有エンドドメインを有する抗CD33 CARと共発現させる（配列番号39、図13AおよびC）。

【0209】

また、さらなるより複合的なAND NOTゲートを開発し、それによると、ITIMは、追加的キメラタンパク質：PTPN6のSH2ドメインおよびCD148のエンドドメインの細胞内融合体の存在により高められる。この設計では、3つのタンパク質が発現される - 第1のタンパク質は、ヒトCD8ストークスパーサーおよび活性化エンドドメインを有してCD19を認識し；マウスCD8ストークスパーサーおよびLAIR1のものに由来するITIM含有エンドドメインを有する抗CD33 CARと共発現させる。さらなる2Aペプチドは、PTPN6 - CD148融合体の共発現を可能にする（配列番号40、図13AおよびD）。これらのAND NOTゲートは、異なる範囲の阻害：PTPN6 - CD148 > PTPN6 > ITIMを有すると予測された。

【0210】

これらのゲートでT細胞の形質導入を行い、CD19またはCD33のいずれか一方、またはCD19およびCD33の両方を一緒に発現する標的にチャレンジした。3つのゲートは全て、CD19のみを発現する標的に応答したが、CD19およびCD33の両方を一緒に発現する標的には応答しなかった（図21）ことから、3つのAND NOTゲートは全て機能的であることが確認された。

【0211】

実施例8：PTPN6に基づくAND NOTゲートの動力学的分離モデルの実験的証明

AND NOTゲートのモデルは、両CARで使用されるスペーサーの性質が、ゲートの正確な機能にとって重要であるという事実を軸として展開する。PTPN6を伴う機能的AND NOTゲートでは、両CARスペーサーは十分に類似しており、両CARがライゲーションされたとき、両方がシナプス内で共局在し、高濃度であるため弱いPTPN6でさえ活性化を阻害するのに十分である。スペーサーが異なれば、シナプスにおける分離は、活性化を可能にするITAMからPTPN6を離すことになり、AND NOTゲートを破壊する。これを試験するため、ネズミCD8ストークスパーサーをFcのそれで置き換えて対照を生成した。この場合、試験ゲートは2つのCARで構成された。第1のCARは、ヒトCD8ストークスパーサーおよびITAMエンドドメインを有してCD19を認識し；一方、第2のCARは、FcスペーサーおよびPTPN6からのホス

10

20

30

40

50

ファクターゼを含むエンドドメインを有してCD33を認識する。このゲートは、CD19に
応答して活性化するが、同じくCD19およびCD33の両方に応答して活性化する（
図22B、この図では、このゲートの機能を、元のAND NOTゲートおよび実施例6
に記載の対照ANDゲート変異型の機能と比較する）。この実験データは、PTPN6を
伴う機能的AND NOTゲートの場合、共同在するスパーサーが必要とされるモデルを
証明している。

【0212】

実施例9：ITIMに基づくAND NOTゲートの動力的分離モデルの実験的証明
PTPN6に基づくAND NOTゲートと同様に、ITIMに基づくゲートもまた、
AND NOTゲートとして機能するために免疫学的シナプスにおける共同在を要求する
。この仮説を証明するため、対照ITIMに基づくゲートを以下の通り生成した：2つの
CARを共発現させた - 第1のCARは、ヒトCD8ストークスパーサーおよび活性化エ
ンドドメインを有してCD19を認識し；FcスパーサーおよびLAIR1のものに由来
するITIM含有エンドドメインを有する抗CD33 CARと共発現させる。このゲ
ートの活性を、元のITIMに基づくAND NOTゲートの活性と比較した。この場合、
改変されたゲートは、CD19を発現する標的に応答して活性化したが、同じくCD19
およびCD33の両方を発現する細胞に反応して活性化した。これらのデータは、ITIM
に基づくAND NOTゲートが動力的分離に基づくモデルに従うこと、および機能
ゲートを作製するためには正確なスパーサーが選択されなければならないことを示す（図
23B）。

【0213】

実施例10：動力的分離により生成されたCAR論理ゲートのモデルの概要

現時点での動力的分離モデルについての理解および本明細書記載の実験データに基づ
き、2-CARゲートについてのモデルの概要を図24に提示する。この図は、それぞれ
異なる抗原を認識する、2つのCARを発現する細胞を示す。一方または両方のCARが
細胞上の標的抗原を認識すると、シナプスが形成され、もともとあったCD45およびC
D148は、それらのエクドメインがかさ高い故にシナプスから排除される。これがT
細胞活性化のためのステージを設定する。標的細胞が唯一の同種抗原をもつ場合、同種C
ARがライゲーションされ、同種CARはシナプスへと分離する。ライゲーションされて
いないCARはT細胞膜上で溶解状態のままであるため、シナプスの内外へと拡散するこ
とができ、その結果、低濃度のライゲーションされていないCARを伴う高局所濃度のラ
イゲーションされたCARの領域が形成する。この場合、ライゲーションされたCARが
ITAMを有し、ライゲーションされていないCARが、「ライゲーション・オフ」型阻
害性エンドドメイン、例えばCD148のそれを有するならば、ライゲーションされてい
ないCARの量は、活性化を阻害するのに十分であり、ゲートはオフである。対照的に、
この場合、ライゲーションされたCARがITAMを有し、ライゲーションされていない
CARが、PTPN6などの「ライゲーション・オン」型阻害性エンドドメインを有する
ならば、ライゲーションされていないCARの量は、阻害するには不十分であり、ゲ
ートはオンである。両同種抗原をもつ標的細胞によりチャレンジされると、両同種CARがラ
イゲーションされ、免疫学的シナプスの一部を形成する。重要なことに、CARスパー
サーが十分に類似しているならば、両CARはシナプスに共同在するが、CARスパー
サーが十分に異なるならば、両CARはシナプス内で分離する。この後者の場合、一方のCAR
は高濃度で存在するが、他方のCARは存在しない膜の領域が形成される。この場合、
分離は完全であるため、阻害性エンドドメインが「ライゲーション・オフ」型であるとし
ても、ゲートはオンである。前者の場合、両CARが高濃度で共に混ざった膜の領域が形
成される。この場合、両エンドドメインが濃縮されるため、阻害性エンドドメインが「ラ
イゲーション・オン」型であるとしても、ゲートはオフである。スパーサーおよびエ
ンドドメインの正しい組み合わせを選択することにより、論理をCAR T細胞にプログラ
ム化することができる。

【0214】

上記の本発明者らの作業に基づき、本発明者らは、論理ゲート C A R の生成を可能にする一連の設計規則を確立した(図 3 1 で概説)。「抗原 A O R 抗原 B」ゲート C A R T 細胞を生成するため、(1)各 C A R が、C A R が機能するように単に抗原接近およびシナプス形成を可能にするスペーサーを有し、そして(2)各 C A R が活性化エンドドメインを有するように、抗 A および抗 B の C A R を生成しなければならない。「抗原 A A N D N O T B」ゲート C A R T 細胞を生成するため、(1)両 C A R が、交差対合することはないが、標的細胞上で両同種抗原を認識したとき、C A R を共分離させるようにするスペーサーを有し、そして(2)一方の C A R が活性化エンドドメインを有し、同時に、他方の C A R が弱いホスファターゼ(例えば、P T P N 6)を含むかまたはリクルートするエンドドメインを有するように、抗 A および抗 B の C A R を生成しなければならない。(3)「抗原 A A N D 抗原 B」ゲート C A R T 細胞を生成するため、(1)両 C A R が標的細胞上で両同種抗原を認識したとき、両 C A R が共分離することのないように、一方の C A R が他方の C A R とは十分に異なるスペーサーを有し、(2)一方の C A R が活性化エンドドメインを有し、他方の C A R が、強力なホスファターゼ(例えば、C D 4 5 または C D 1 4 8 のもの)を含むエンドドメインを有するように、抗 A および抗 B の C A R を生成しなければならない。所望の効果を達成するための正確なスペーサーは、既知サイズ/形状などをもつスペーサーのセットから、ならびに標的抗原のサイズ/形状など(例えば図 3 0 参照)および標的抗原上の同種エピトープの場所を考慮に入れて選択され得る。

【化 2 1 - 1】

配列番号 41: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aGD2-HCH2CH3pvaa-dCD148

MSLPVTALLLPLIALLLHAARPDITQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL
IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGGSG
GGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGS
ETTYNSALKSRLTIKDNSKSKQVFLKMNLSLQTDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDP
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI FWVLVVGVLACYSLLVTVAF
IIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLLTGCDVEENP
GPMETDTLLWLWVLLWVPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLASYNHWRQPPGKGLE
WLGVWAGGSTNYSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGT
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSENQMTQSPSSLSASVGDRTMTTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGKAPK
VWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTKEIKRSDPAEPKS
PDKTHTCPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDITLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD

【化 2 1 - 2】

ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKAVFGCIFGALVIVTVGGFI FWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPK
KSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKL
SVQTHSTDDYINANYMPGYHSHKKDFIATQGPLPNTLKD FWRMVWEKNVYAIIMLT KCVEQGR TKCEEY
WPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVDPDTTDLINFRY
LVRDYMKSPPESPILVHCSAGVGRTGT FIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQY
VFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

【化 2 2 - 1】

配列番号 42: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aGD2-HCH2CH3pvaa-dCD148

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGACCAGACAT
CCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGTGACCATCAGCTGCAGAG
CCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG
ATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCTGCCAGCCGGTTGAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGA
CTACAGCCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACA
CCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAGGCGGAGGCGGAGGCTCTGGC
GGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGCTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCC
AGGCTTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCTGAGCCTGCCCGACT
ACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGCGTGATCTGGGGCAGC
GAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCA
GGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCCGCCAAGCACTACT
ACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGCGCAGGCCACAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCC
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCGTGTCCCTGCG
CCCAGAGGCGTGCCCGCCAGCGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATA
TCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT
ATTATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTGAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG
GCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTG
CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG
GCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG
CCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCC
GGGCCCATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCACCGGCCA
GGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCAGGCCTGGTGAAGCCCCAGCCAGACCCCTGAGCATCACCTGCACCG
TGAGCGGCTTCAGCCTGGCCAGCTACAACATCCACTGGGTGCCGCAGCCCCCAGGCAAGGGCCTGGAG
TGGCTGGGCGTGATCTGGGCTGGCGGCAGCACCAACTACAACAGCGCCCTGATGAGCCGGCTGACCAT
CAGCAAGGACAACAGCAAGAACCAGGTGTTCTGAAGATGAGCAGCCTGACAGCCGCCGACACCGCCG
TGTAATACTGCCCAAGCGGAGCGACGACTACAGCTGGTTGCGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG
ACCGTGAGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGAACCAGAT
GACCCAGAGCCCCAGCAGCTTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGGCTGACCATGACCTGCAGAGCCAGCA
GCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACCTGGTACCAGCAGAAGAGCGGCAAGGCCCCAAGGTGTGGATC
TACAGCACAGCAACCTGGCCAGCGGCTGCCAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTA
CACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCGGCT
ACCCCATCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTCCGATCCCGCCAGCCCCAAATCT
CCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACG
TGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAT

10

20

30

【化 2 2 - 2】

GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
TGCTCCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGGCAA
GAAGGACCCCCAAGGCGGTTTTTGGCTGTATCTTTGGTGGCCTGGTTATTGTGACTGTGGGAGGCTTCA
TCTTCTGGAGAAAGAAGAGGAAAGATGCAAAGAATAATGAAGTGTCTTTTCTCAAATTAAACCTAAA
AAATCTAAGTTAATCAGAGTGGAGAATTTTGGGCCCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAACTG
TGGGTTCGCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTGTGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAGAAC
TGGCTGAGAATAGAGGAAAGAATCGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATATTTCCCGTGTCAAACCTT
TCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCAACTACATGCCTGGCTACCCTCCAAGAA
AGATTTTATTGCCACACAAGGACCTTTACCGAACACTTTGAAAGATTTTGGCGTATGGTTTGGGAGA
AAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTGAACAGGGAAGAACCAAATGTGAGGAGTAT
TGGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAAATTGTTCTTCC
GGAATGGACCATCAGAGATTTACAGTGAATAATATCCAGACAAGTGAGAGTCACCCCTCTGAGACAGT
TCCATTTACCTCCTGGCCAGACCACGGTGTTCGCCGACACCCTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTAC
CTCGTTCGTGACTACATGAAGCAGAGTCTCCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGTGGGGT
CGGAAGGACGGGCACCTTTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGAGAATGAGAACACCGTGG
ATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCCTTTAATGGTGCAGACAGAGGACCAGTAT
GTTTTCTCAATCAGTGTGTTTTGGATATTGTGAGATCCCAGAAAGACTCAAAAGTAGATCTTATCTA
CCAGAACACAACCTGCAATGACAATCTATGAAAACCTTGCGCCCGTGACCACATTTGGAAAGACCAATG
GTTACATCGCCTAA

10

20

【化 2 3】

配列番号 43: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD5-HCH2CH3pvaa-dCD148

MSLPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL
IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGS
ETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTSVTVSSDP
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAF
II FWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLTTCGDVEENP
GPMETDTLLLWVLLLWVPGSTGQVTLKESGPGILKPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKG
LEWLAHIWDDDDVYNNPSLKNQLTISKDASRDQVFLKITNLDTADTATYCVRRRATGTGFDYWGQGT
TLTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSNIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIACKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLL
IYWTSTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCHQYNSYNTFGSGTRLELKRSDPAEPKS
PDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAITPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDKPAVFGCIFGALVIVTVGGFI FWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPK
KSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFEEYEDLKLVGISQPKYAAELAEENRGKNRYNNVLPYDISRVKL
SVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRTKCEEY
WPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQPHFTSWPDHGVDPDTTDLINFRY
LVRDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGVYDLRMHRPI MVQTEDQY
VFLNQCVLDIVRSQKSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

30

40

【化 2 4 - 1】

配列番号 44: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD5-HCH2CH3pvaa-dCD148

ATGAGCCTGCCCCTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGACCAGACAT
CCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGTGACCATCAGCTGCAGAG

【化 2 4 - 2】

CCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG
ATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGA
CTACAGCCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACA
CCCTGCCC'TACACCT'TCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCGGAGCGGGAGGCTCTGGC
GGAGGCGGCTCT'GGCGGAGGCGGCTCT'GGCGGAGGCGGSCAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCC
AGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCT'GAGCGTGACCT'GCACCCCT'GAGCGCGCT'GAGCCT'GCCCCACT
ACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCCACGGAAGGGCTTGGAGTGGCT'GGCGTGATCTGGGGCAGC
GAGACCACCTACTACAACAGCGCCCT'GAAGAGCCGGCT'GACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCA
GGTGTTCCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACT
ACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCC
ACCACGACGCCAGCGCGCGGACCACCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCG
CCCAGAGGCGTGCCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATA
TCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGCAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT
ATTATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTT'GAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG
GCGGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCGTGTACAATGAAGTGA
CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGG
GCACGATGGCCTTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCCCTTCACATGCAGG
CCCT'GCGCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCC
GGGCCCATGGAGACCGACACCT'GCTGCTGT'GGGT'GCT'GCTGCTGT'GGGTGCCCCGCGACCGGCCA
GGTGACCTGAAGGAGAGCGGTCCCGGCATCCTGAAGCCAGCCAGACCTGAGCCTGACCTGCAGCT
TCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACCAGCGGCATGGGCGTGGGCTGGATTGCGCAGCCAGCGGCAAGGGC
CTGGAGTGGCTGGCCACATCTGGTGGGACGACGACGTGTACTACAACCCAGCCTGAAGAACCAGCT
GACCATCAGCAAGGACGCCAGCGGGGACCAGGTGTTCTGAAGATCACCAACCTGGACACCGCCGACA
CCGCCACCTACTACTGCGTGCGGCGCGGGGCCACCGGCACCGGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACC
ACCTTGACCGTGAGCAGCGGTGGCGGTGGCAGCGGCGCGCGCGGAAGCGCAGGTGGTGGCAGCAACAT
CGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTCATGAGCACCAGCGTGGGCGACCGGCTGAGCATCGCCTGCAAGG
CCAGCCAGGACGTGGGCACCGCGGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTG
ATCTACTGGACAGCACC CGGCACACCGGCTGCCCCGACCGGTTCACCGGCAGCGGCAGCGGCACCGA
CTTCACCTGACCATCACCAACGTGCAGAGCGAGGACCTGGCCGACTACTTCTGCCACCAGTACAACA
GCTACAACACCTTCGGCAGCGGCACCCGGCTGGAGCTGAACCGGTGCGATCCCGCCGAGCCCCAAATCT
CCTGACAAAACCTCACACATGCCCCACCGT'GCCCCAGCACCTCCCGTGCGCGGCGCCGTCAGTCTTCTCTCTT
CCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACG
TGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT'AAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCACTCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGACAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGT
GGAGTGGGACAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAACTACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCAGGCAA
GAAGGACCCCAAGGCGGT'TTTTGGCTGTATCT'TTGGTGCCCTGGT'ATTTG'GACTGTGGGAGGCTTCA
TCTTCTGGAGAAAGAAGAGGAAGATGCAAGAATAATGAAGT'G'CC'TTTTCTCAAAT'AAAACCTAAA
AAATCTAAGTTAATCAGAGTGGAGAATTTTGAGGGCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAACCTG
TGGGTTGCGCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTGTGGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAGAAC
TGGCTGAGAATAGAGGAAAGAATCGCTATAATAATGTCTGCCCTATGATATTTCCCGTGTCAAACCTT
TCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCAACTACATGCCTGGCTACCACTCCAAGAA
AGATTTTATTTGCCACACAAGGACCTTTACCGAACACTTTGAAAGATTTTTCGGCTATGGTTTGGGAGA

10

20

30

40

【化 2 4 - 3】

AAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTGAACAGGGAAGAACCAAATGTGAGGAGTAT
TGGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAAATGTTCTTCC
GGAATGGACCATCAGAGATTTACAGTGAAAAATATCCAGACAAGTGAGAGTCACCCCTCTGAGACAGT
TCCATTTACCTCCTGGCCAGACCACGGTGTTCGGACACCACTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTAC
CTCGTTTCGTGACTACATGAAGCAGAGTCCTCCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGCTGGGGT
CGGAAGGACGGGCACTTTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGAGAATGAGAACACCGTGG
ATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCTTTAATGGTGCAGACAGAGGACCAGTAT
GTTTTCTCAATCAGTGTGTTTTGGATATTGTCAGATCCCAGAAAGACTCAAAAGTAGATCTTATCTA
CCAGAACACAACCTGCAATGACAATCTATGAAAACCTTGCGCCCGTGACCACATTTGAAAAGACCAATG
GTTACATCGCCTAA

10

【化 2 5】

配列番号 45: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aEGFRvIII-HCH2CH3pvaa-dCD148

MSLPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL
IYHTSRLHSGVPSRFGSGSGTGYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGSG
GGGSGGGSGGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGS
ETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYGGSYAMDYWGQTSVTVSSDP
TTTPAPRPETPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVVGVLACYSLLVTAF
IIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQLSTATKDYDALHMQALPPRAEGRGSLTTCGDVEENP
GPMETDTLLWVLLWVPGSTGQVKLQSGGGLVKPGASLKLSCVTSGFTFRKFGMSWVRQTS DKRLE
WVASISTGGYNTYSDNVKGRFTISRENAKNTLYLQMSLSEDTALYYCTRGYSSTSYAMDYWGQGT
TVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIELTQSPASLSVATGEKVTIRCMTSTDIDDDMNWYQQKPEPPKFL
ISEGNTLRPGVPSRFSSTGTGTFVFTIENTLSEVDGYCLQSFNVPLTFGDGKLEIKRSDPAEPK
SPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKPDITLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGKKDPKAVFGCFI GALVIVTVGGFI FWRKKRKDAKNNEVSFSQIKP
KSKSLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVLGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVK
LSVQTHSTDDYINANYMPGYHSKKDFIATQGPLPNTLTKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRKCEE
YWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVDPDITDILLINFR
YLVRDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGVYDLRMHRPLMVQTEDQ
YVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

20

30

【化 2 6 - 1】

配列番号 46: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aEGFRvIII-HCH2CH3pvaa-dCD148

ATGAGCCTGCCCCTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGACCAGACAT
CCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCAGAG
CCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG
ATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGCGCTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGA
CTACAGCCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACA
CCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAGGCTCTGGC
GGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCC
AGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCCACT
ACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCACGGAAGGGCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGC
GAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCA
GGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACT
ACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCC

40

【化 2 6 - 2】

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCG
 CCCAGAGCGCTGCCGCGCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATA
 TCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGECTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT
 ATTATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCA
 GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG
 GCCGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTG
 CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG
 GCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG
 CCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCC
 GGGCCCATGGAGACCAGACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGCAGCACCGGCCA
 GGTGAAGCTGCAGCAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGTGA
 CCAGCGGCTTCACCTTCGGGAAGTTCCGSCATGAGCTGGGTGCGGCAGACCAGCGACAAGCGGCTGGAG
 TGGGTGGCCAGCATCAGCACCGGCGGCTACAACACCTACTACAGCGACAACGTGAAGGGCCGGTTTAC
 CATCAGCCGGGAGAACGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAGCAGCCTGAAGAGCGAGGACACCG
 CCCTGTACTACTGCACCCGGGGCTACAGCAGCACCCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACC
 ACCGTGACAGTGAAGCAGCGGCGGAGGAGGCAGTGGTGGGGGTGGATCTGGCGGAGGTGGCAGCGACAT
 CGAGCTGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGAGCGTGGCCACCGGCGAGAAGGTGACCATCCGGTGCATGA
 CCAGCACCGACATCGACGACGACATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCGAGCCCCCAAAGTTCTCTG
 ATCAGCGAGGGCAACACCCCTGCGGCCCCGGCGTGGCCAGCCGGTTTACGACGAGCGGACCCGGCACCGA
 CTTCGTGTTTACCATCGAGAACACCCCTGAGCGAGGACGTGGGCGACTACTACTGCCTGCAGAGCTTCA
 ACGTGCCCTTGACCTTCGGCGACGGCAACCAAGCTGGAGATCAAGCGGTGCGATCCCGCCGAGCCCAA
 TCTCCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGGCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCCT
 CTCCCCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG
 ACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCA
 CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCG
 AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
 GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGACTCCG
 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGG
 CAAGAAGGACCCCAAGGCGGTTTTTGGCTGTATCTTTGGTGCCCTGGTTATTGTGACTGTGGGAGGCT
 TCATCTTCTGGAGAAAGAAGAGGAAAGATGCAAGAATAATGAAGTGTCTTTTCTCAAATTAAACCT
 AAAAAATCTAAGTTAATCAGAGTGGAGAATTTTGGAGCCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAA
 CTGTGGGTTCGCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTGTGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAG
 AACTGGCTGAGAATAGAGGAAAGAATCGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATATTTCCCGTGTCAA
 CTTTCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCAACTACATGCCTGGCTACCACTCCAA
 GAAAGATTTTATTGCCACACAAGGACCTTTACCGAACACTTTGAAAGATTTTGGCGTATGGTTTGGG
 AGAAAAATGTATATGCCATCATTTATGTTGACTAAATGTGTTGAACAGGGAACAACCAATGTGAGGAG
 TATTGGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAAATTGTTCT
 TCCGGAATGGACCATCAGAGATTTACAGTGAAAAATATCCAGACAAGTGAGAGTCACCCCTCTGAGAC
 AGTTCCATTTCACTCCTGGCCAGACCACGGTGTTCGGACACCACTGACCTGCTCATCAACTTCCGG
 TACCTCGTTCTGACTACATGAAGCAGAGTCCTCCCGAATCGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGTGG
 GGTGGAAGGACGGGCACCTTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGAGAATGAGAACACCG
 TGGATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCTTTAATGGTGCAGACAGAGGACCAG
 TATGTTTTCTCAATCAGTGTGTTTTGGATATTGTGAGATCCAGAAAGACTCAAAAGTAGATCTTAT
 CTACCAGAACCAACTGCAATGACAATCTATGAAAACCTTGCGCCCGTGACCACATTTGGAAAGACCA
 ATGGTTACATCGCCTAA

10

20

30

40

【0 2 1 5】

実施例 11 : A P R I L に基づく C A R の設計および構築

A P R I L の天然形態は、分泌 I I 型タンパク質である。C A R のための B C M A 結合ドメインとしての A P R I L の使用は、この I I 型分泌タンパク質の I 型膜結合タンパク質への変換を必要とし、このタンパク質が安定しており、この形態で B C M A への結合性

50

を保持するためにも必要である。候補分子を生成するため、A P R I L のアミノ末端先端部を欠失させて、プロテオグリカンへの結合性を除去した。次に、シグナルペプチドを付加することにより、新生タンパク質を小胞体、およびそれゆえ細胞表面へと向かわせた。また、使用されるスペーサーの性質は、C A R の機能を変更することができるため、3つの異なるスペーサードメインを試験した：(i) F c 結合モチーフを除去するように改変されたヒト I g G 1 スペーサー；(i i) C D 8 ストック；および(i i i) I g G 1 ヒンジ単独を含む、A P R I L に基づく C A R が生成された(図 2 5 におけるカートゥーンおよび図 2 6 におけるアミノ酸配列)。これらの C A R は、マーカータンパク質 - 先端切除 C D 3 4 が好都合なマーカー遺伝子として共発現され得るようにバイシストロニックレトロウイルスベクターで発現された(図 2 7 A)。

10

【 0 2 1 6 】

実施例 1 2：A P R I L に基づく C A R の発現および機能

この研究の目的は、構築された A P R I L に基づく C A R が細胞表面で発現されるかどうか、および A P R I L が折り畳まれて天然タンパク質を形成するかどうかを試験することであった。T 細胞を、これらの異なる C A R 構築物で形質導入し、マーカー遺伝子についての染色と一緒に、市販されている抗 A P R I L m A b を用いて染色し、フローサイトメトリーにより分析した。この実験の結果を、A P R I L 結合性がマーカー遺伝子の蛍光に対してプロットしている図 2 7 B に示す。これらのデータは、このフォーマットで、A P R I L に基づく C A R が細胞表面で発現され、A P R I L が抗 A P R I L m A b により認識されるほど十分に折り畳まれていることを示す。

20

【 0 2 1 7 】

次に、このフォーマットの A P R I L が B C M A および T A C I を認識できるかどうかを決定した。組換え B C M A および T A C I を、マウス I g G 2 a - F c との融合体として生成した。これらの組換えタンパク質を、形質導入した T 細胞とインキュベーションした。その後、細胞を洗浄し、抗マウスフルオロフォアコンジュゲート抗体および異なるフルオロフォアにコンジュゲートしたマーカー遺伝子を検出するための抗体で染色した。細胞をフローサイトメトリーにより分析し、結果を図 2 7 C に提示する。種々の C A R は、B C M A および T A C I の両方と結合することができた。驚くべきことに、C A R は、T A C I よりも B C M A と良好に結合することができた。また、驚くべきことに、C D 8 ストックまたは I g G 1 ヒンジスペーサーをもつ C A R は、F c スペーサーをもつ C A R より B C M A および T A C I と良好に結合することができた。

30

【 0 2 1 8 】

実施例 1 3：A P R I L に基づくキメラ抗原受容体は、B C M A 発現細胞に対して活性である

正常ドナーからの T 細胞を、種々の A P R I L C A R で形質導入し、野生型、または B C M A および T A C I を発現するように操作された S u p T 1 細胞のどちらかに対して試験した。幾つかの異なるアッセイを使用して、機能を決定した。古典的クロム放出アッセイを実施した。ここでは、標的細胞(S u p T 1 細胞)を、5 1 C r で標識し、異なる比率でエフェクター(形質導入 T 細胞)と混合した。共培養上清中の 5 1 C r を数えることにより、標的細胞の溶解を決定した(図 2 8 A は、累積データを示す)。

40

【 0 2 1 9 】

加えて、S u p T 1 細胞と 1 : 1 で培養した T 細胞からの上清を、インターフェロン - ガンマについて E L I S A によりアッセイした(図 2 8 B は累積データを示す)。また、1 週間の S u p T 1 細胞との共培養後の T 細胞拡大の測定を実施した(図 2 8 C)。T 細胞を、カウントビーズで校正したフローサイトメトリーにより計数した。これらの実験データは、A P R I L に基づく C A R が、B C M A 発現標的を殺すことができることを示す。さらに、これらのデータは、C D 8 ストックまたは I g G 1 ヒンジに基づく C A R が、F c - p v a a に基づく C A R よりも良好に動作したことを示す。

【 0 2 2 0 】

実施例 1 4：初代細胞における A N D ゲートの機能分析

50

P B M Cを血液から単離し、P H AおよびI L - 2を用いて刺激した。2日後、細胞を、レトロネクチン被覆プレート上でC D 1 9 : C D 3 3 A N Dゲート構築物を含むレトロウイルスにより形質導入した。5日目、A N Dゲート構築物により翻訳された2つのC A Rの発現レベルを、フローサイトメトリーにより評価し、細胞からC D 5 6 + 細胞（主としてN K 細胞）を枯渇させた。6日目、P B M Cを、1 : 2のエフェクター対標的細胞比で標的細胞との共培養物に入れた。8日目、上清を集め、I F N - ガンマ分泌についてE L I S Aにより分析した（図29）。

【0221】

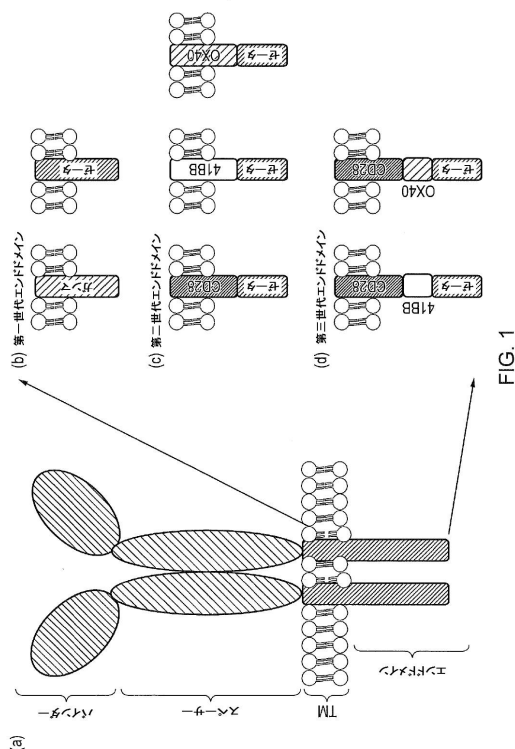
これらのデータは、A N Dゲートが初代細胞において機能することを実証する。

【0222】

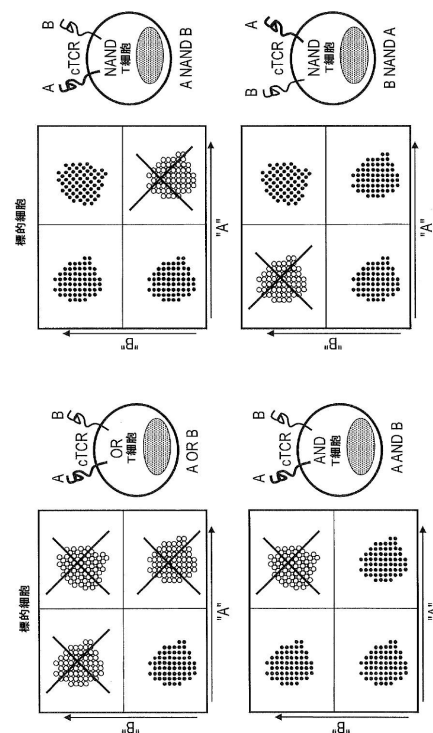
上記の明細書で挙げた出版物は全て、参照により本明細書に援用する。本発明の記載された方法および系の様々な修飾および変形は、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく当業者には明らかである。本発明を特定の好ましい実施形態と共に記載したが、請求されている本発明は、かかる特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解すべきである。事実、分子生物学、細胞生物学または関連分野における専門家にとって明白な、本発明を実施するために記載された方法の様々な修飾も以下の特許請求の範囲の範囲内に含まれるものとする。

10

【図1】



【図2】



【図 3】

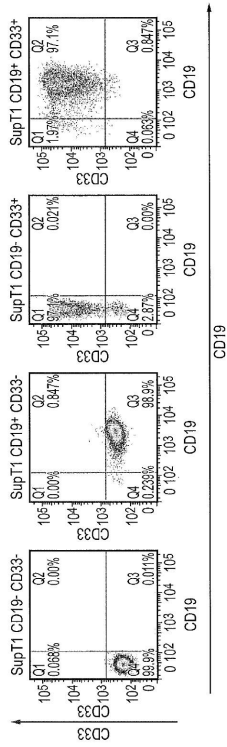


FIG. 3

【図 4】

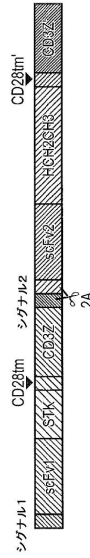


FIG. 4

【図 5】

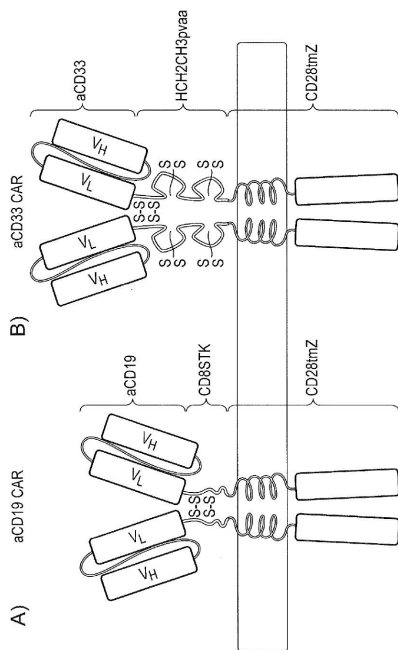


FIG. 5

【図 6】

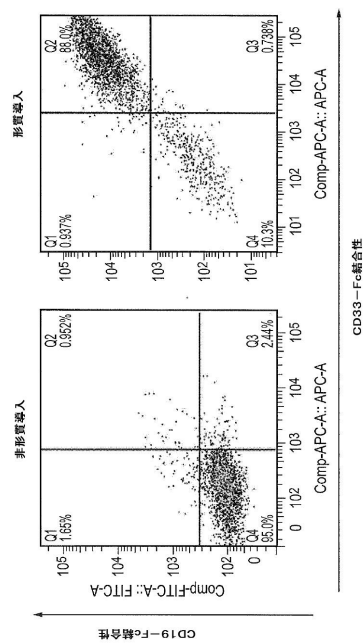


FIG. 6

【図 7】

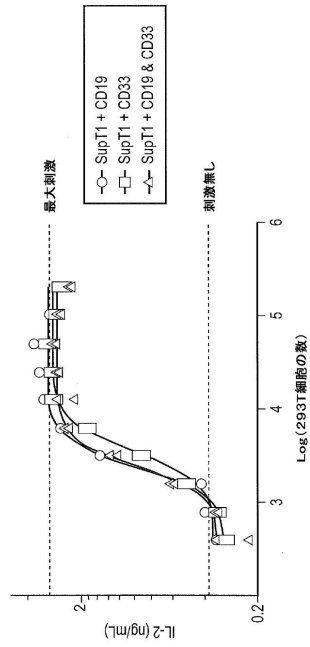


FIG. 7

【図 8】

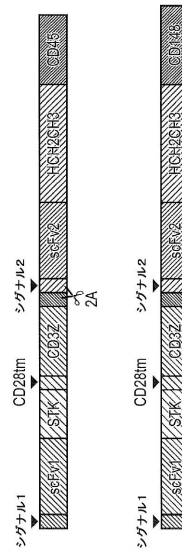


FIG. 8

【図 9】

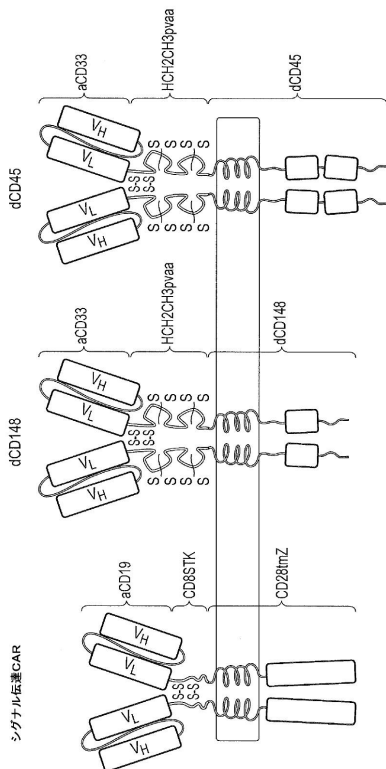


FIG. 9

【図 10】

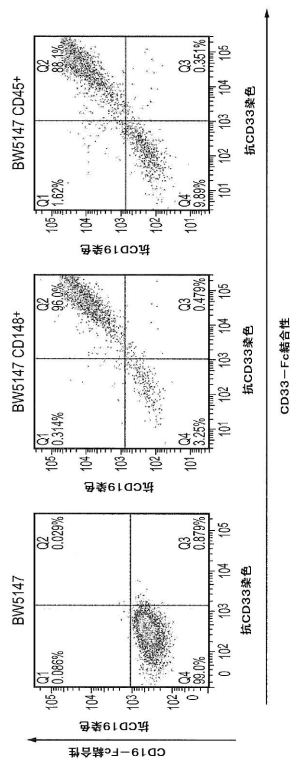


FIG. 10

【図 1 1】

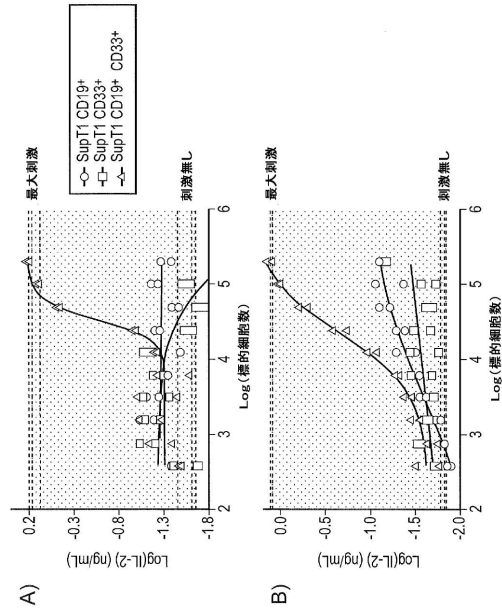


FIG. 11

【図 1 2】

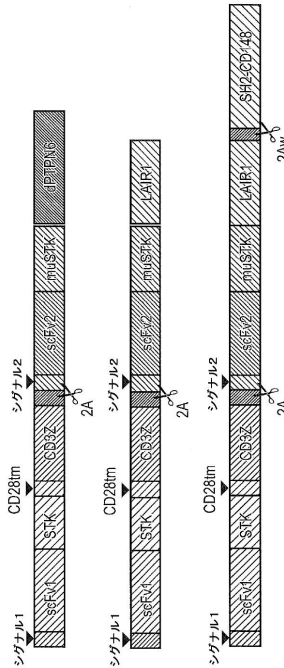


FIG. 12

【図 1 3】

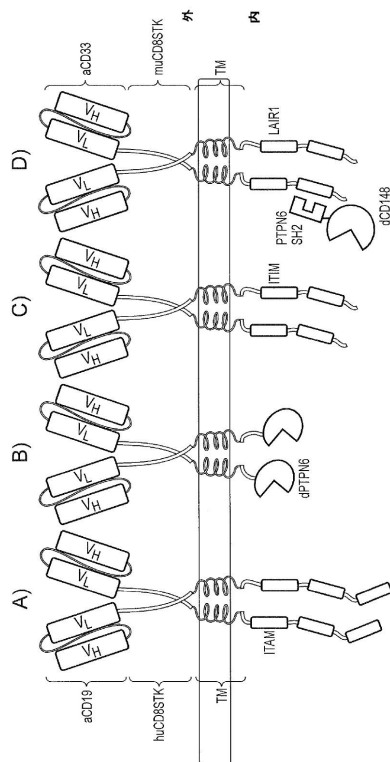


FIG. 13

【図 1 4】

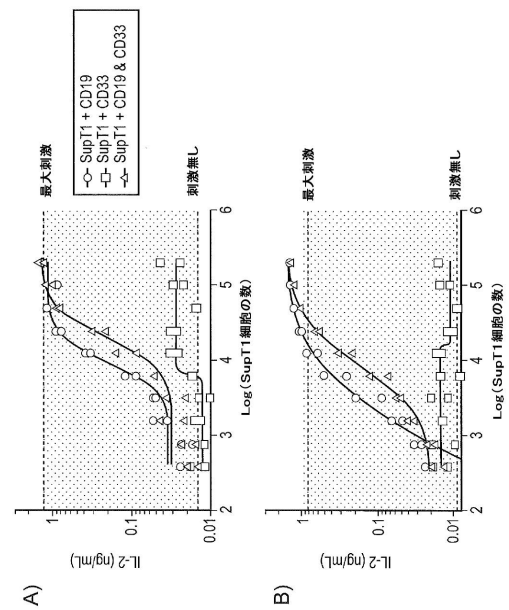


FIG. 14

【 図 1 6 】

[illegible]

領域	説明
シグナル1	シグナルペプチド1
scFv1	scFv1ー抗CD19
SDP	リンカーおよび鎖切断
STR	CD8アルファストーク
CD28tm1	CD28膜貫通ドメインおよびCD3セータエンドドメイン
FMD-2A	D 疎離2Aペプチド
シグナル2	シグナルペプチド2
scFv2	scFv2ー抗CD33
MDP	リンカーおよび鎖切断
HC1HC2HC3	ヒトIgG1 のHC1, HC2およびHC3
CD28tm2	CD28膜貫通ドメインおよびCD3セータエンドドメイン

[illegible][illegible]

FIG. 16

【 図 1 8 】

[illegible][illegible][illegible]

前掲	説明
シグナル	シグナルペプチド1
scFv ¹⁸	scFv ¹ -抗原CD19
SDF	リノカ-および吸引素
SHG	EトCD87ルファストーク
CD28m	CD28親和性メインおよびCD3ゼータドメイン
M2-2T	ヒトM2-2Tペプチド
シグナル2	シグナルペプチド2
scFv ²	scFv ² -抗原CD33
MDP ¹⁹	リノカ-および吸引素
STK	エトCD87ルファストーク
LACZ	ラウスg10LacZ、CH2およびCH3
CDPTN6	PTPN6のホスファターゼドメイン
MVD-2A	口腹症2Aペプチド1およびゼフィン
PTPN6-SH2	PTPN6のSH2ドメイン
GSGGGGS	セリングリシンポリカーボキシ酸鎖
GSGGS	

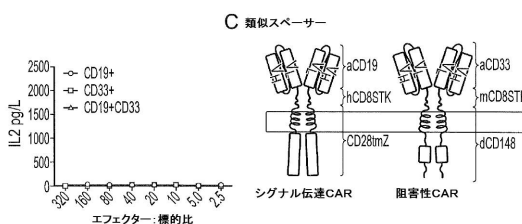
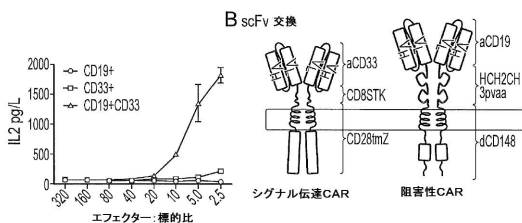
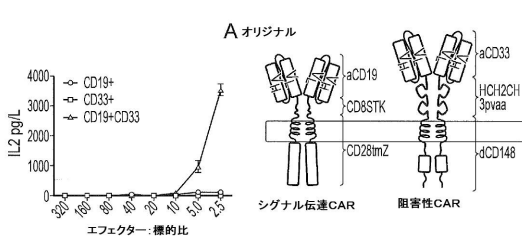


FIG. 18

FIG. 17

【図 19】

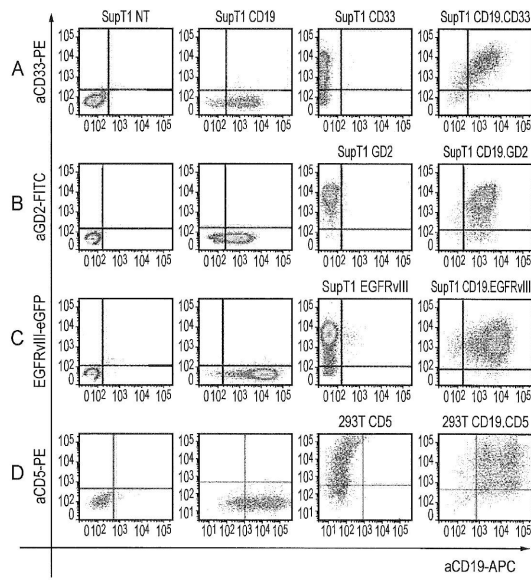


FIG. 19

【図 20】

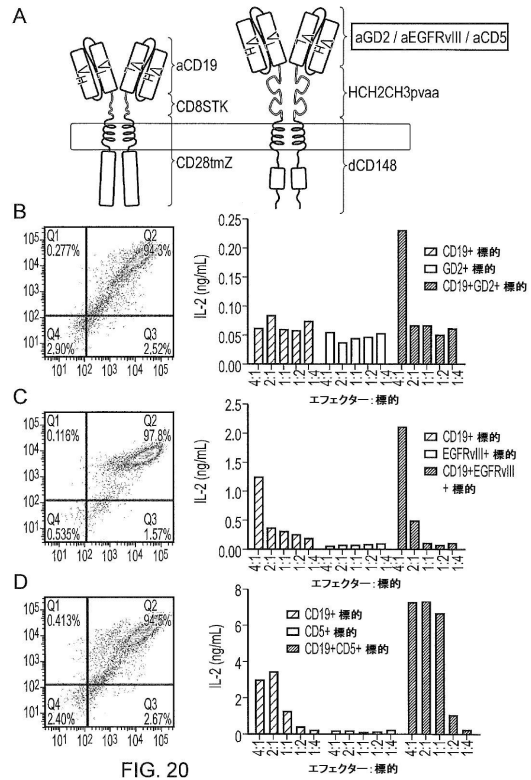


FIG. 20

【図 21】

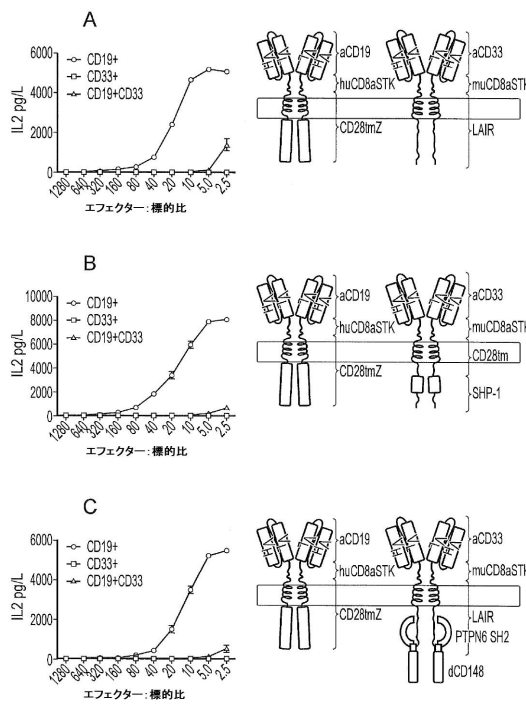


FIG. 21

【図 22】

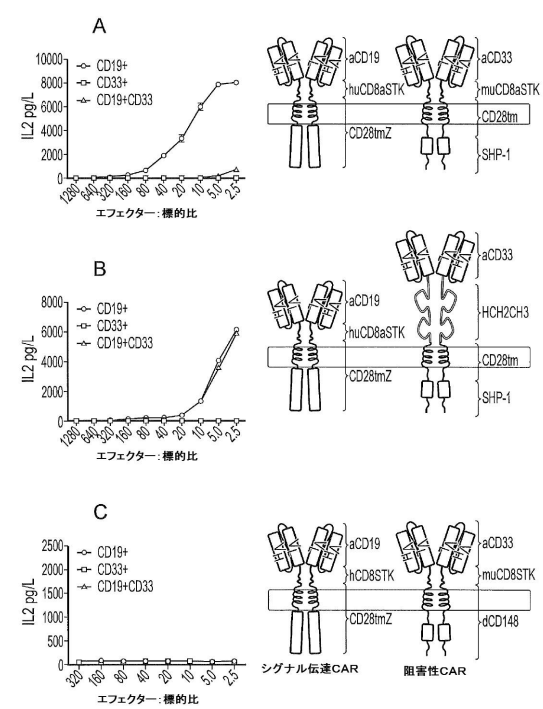


FIG. 22

【図 23】

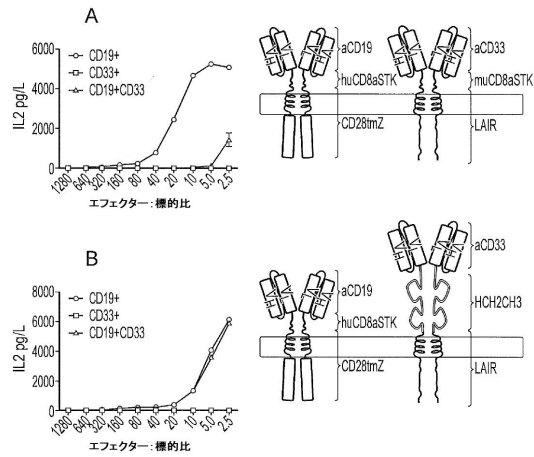


FIG. 23

【図 24 A】

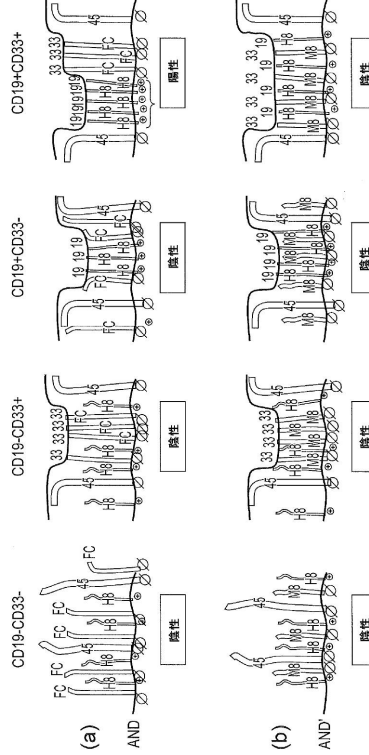


FIG. 24

【図 24 B】

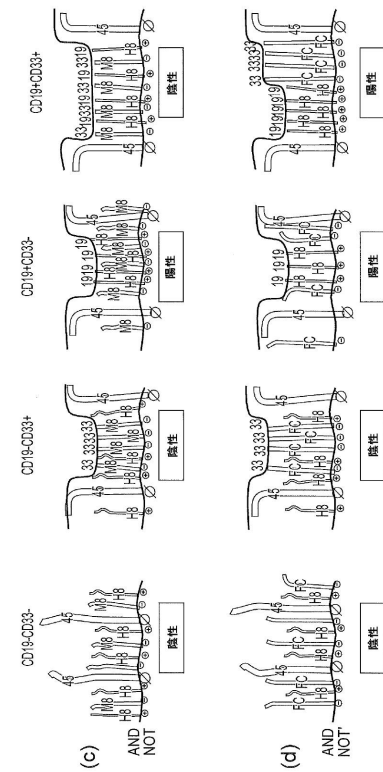


FIG. 24 (続き)

【図 25】

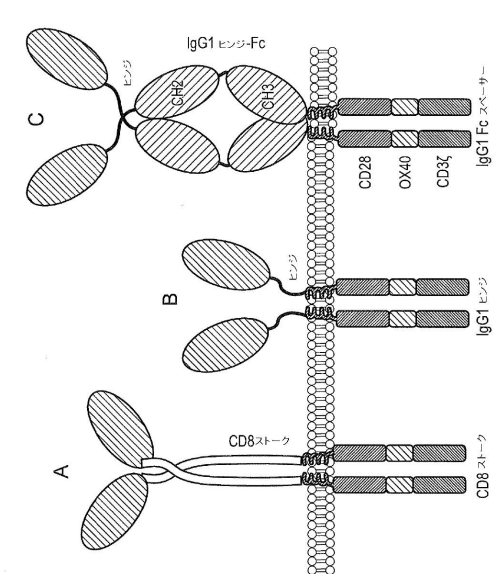


FIG. 25

【 図 2 6 】

A

[illegible]

B

[illegible]

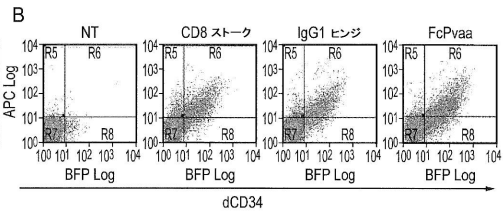
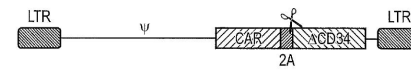
C

[illegible]

シグナルペプチド
APRIL
ヒトIgG1のヘンジ-CH2CH3、ヒトCD8 α ストークおよびヒトIgG1ヘンジ
のいずれか
CD28TMDメイン、CD28エンドメインならびにOX40およびCD3-ゼータ
エンドメインを含む複合エンドメイン

【圖 27】

A



C

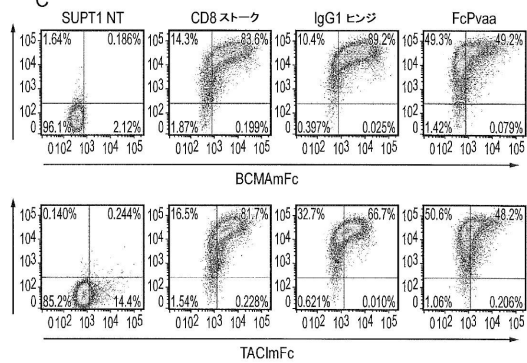


FIG. 27

【 図 2 8 】

A クロム放出によるAPRIL CAR媒介標的細胞致死

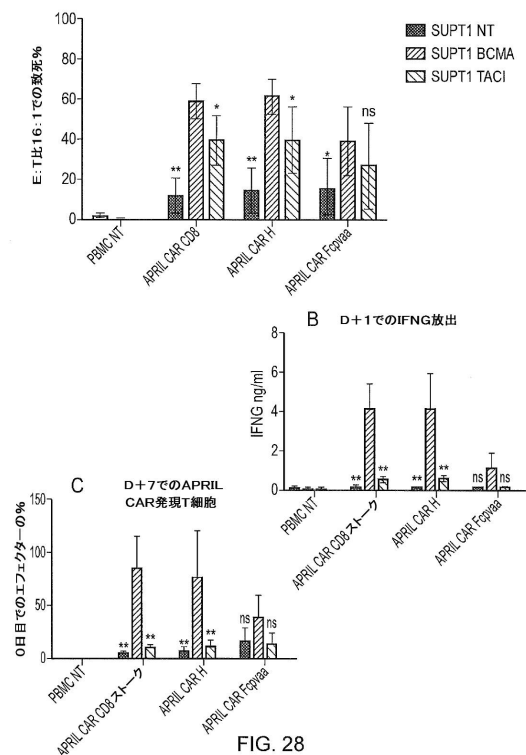


FIG. 28

【 図 2 9 】

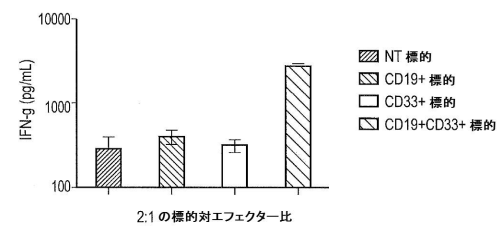
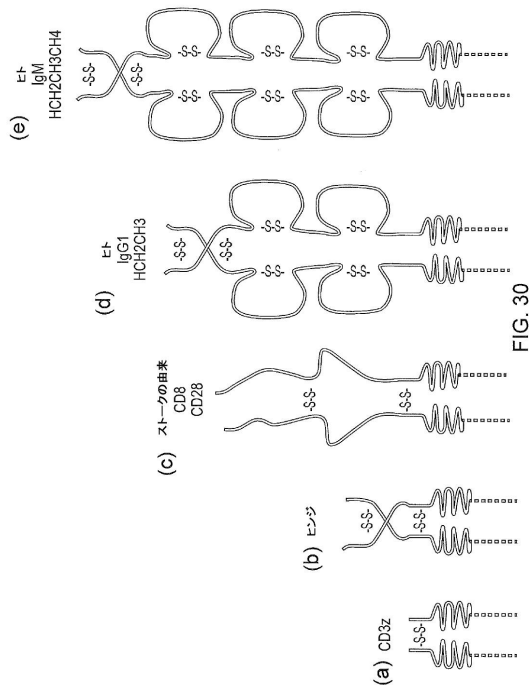


FIG. 29

【図 30】



【図 31】

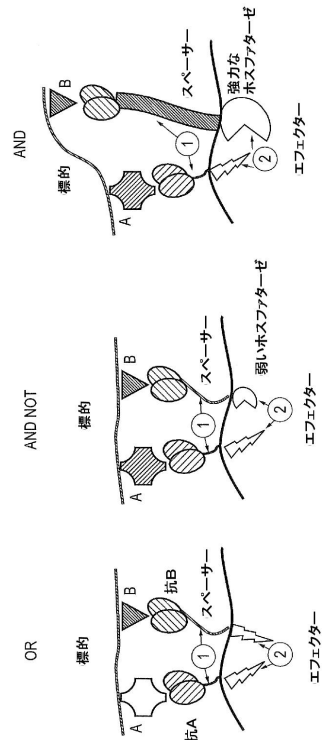


FIG. 31

【配列表】

0006538684000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/725 (2006.01) C 0 7 K 14/725

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 プーレ, マーティン

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 コン, カイ

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 コルドバ, ショーン

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

審査官 金田 康平

(56)参考文献 LANITIS E; POUSSIN M; KLATTENHOFF A W ET AL, CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, 2 0 1 3年
4月 7日, VOL:1 NR:1, PAGE(S):43 - 53, U R L, <http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0008>

SCOTT WILKIE; MAY C I VAN SCHALKWYK; STEVE HOBBS ET AL, JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOG
Y, NE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, 2 0 1 2年 4月 1 7日, VOL:32 NR
:5, PAGE(S):1059 - 1070, U R L, <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-012-9689-9>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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

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 / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I (S
T N)