

(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 1	
C 12 N 15/12	(2006.01)	C 12 N 15/12
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/10
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00
A 61 K 35/17	(2015.01)	A 61 K 35/17
A 61 P 37/06	(2006.01)	A 61 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)
(86) (22) 出願日	平成26年11月21日(2014.11.21)
(65) 公表番号	特表2016-538855 (P2016-538855A)
(43) 公表日	平成28年12月15日(2016.12.15)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2014/053452
(87) 國際公開番号	W02015/075469
(87) 國際公開日	平成27年5月28日(2015.5.28)
審査請求日	平成29年9月5日(2017.9.5)
(31) 優先権主張番号	1320573.7
(32) 優先日	平成25年11月21日(2013.11.21)
(33) 優先権主張国	英國(GB)
(31) 優先権主張番号	1410934.2
(32) 優先日	平成26年6月19日(2014.6.19)
(33) 優先権主張国	英國(GB)

(73) 特許権者	507299817 ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 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 97, ザ ネットワーク ビ ルディング
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】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の前記スペーサーまたは第2の前記スペーサーのいずれかがCD8ストークを含み、他方のスペーサーがIgG1のヒンジ、CH2およびCH3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CARまたは前記第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、その阻害性CARが、阻害性CARライゲーションの非存在下では該活性化CARによるT細胞活性化を阻害するが、該阻害性CARがライゲーションされたときには、該活性化CAR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CARの前記抗原結合ドメインがCD5と結合し、前記第2のCARの前記抗原結合ドメインがCD19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CAR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CARおよび第2のCARを該細胞表面で共発現する、T細胞。 20

【請求項 7】

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(CAR)および前記第2のキメラ抗原受容体(CAR)の両方をコードする核酸。

【請求項 8】

次の構造：

AgB1 - スペーサー1 - TM1 - エンド1 - coexp - AbB2 - スペーサー2 - TM2 - エンド2

(ここで、

AgB1は、前記第1のCAR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1は、該第1のCARの前記スペーサーをコードする核酸であり；

TM1は、該第1のCAR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CARの前記エンドドメインをコードする核酸であり；

coexpは、両CARの共発現を可能にする核酸であり；

AgB2は、前記第2のCAR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CARの前記スペーサーをコードする核酸であり；

TM2は、該第2のCAR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CAR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CARおよび該第2のCAR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】

coexp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。 40

【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(CAR)をコードする第1の核酸であって、以下の構造：

AgB1 - スペーサー1 - TM1 - エンド1

(ここで、

AgB1は、該第1のCAR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سف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سف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。

【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23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】****（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。

【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、ミエロタルグであればCD33を標的とし、そしてアレムツマブであれば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うける。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髓性白血病を処置していると、骨髓系区画全体が損傷をうけるなどである。

【0006】

予想された「on-target off-tumour」毒性の問題は、臨床試験により確証されている。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

10

20

30

40

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べて連結された膜貫通ドメインを有するI型膜貫通ドメインタンパク質の形態である（図1A参照）。

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、現在様々ながら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

【0014】

類似した手法がKlossら(2013 Nature Biotechnol. 31 : 71 - 75)により記載されており、その手法では、PSMAに特異的なキメラ共刺激受容体と組み合わせてCD3媒介活性化シグナルを提供するCD-19特異的CARを使用した。この「共CAR(co-CAR)」設計によると、CAR-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(activatory)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。

【0015】

この手法は、2つの抗原をもつ標的細胞のみにCAR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: CAR-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、CAR-T細胞は、依然として活性化CAR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。

【0016】

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、on-target off-tumour毒性が低減された、改善されたCAR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(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のいずれかである、T細胞。

(項目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、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/またはグリコシリ化を有する、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CD8ストークを含み、他方のスペーサーがIgG1のヒンジ、CH2およびCH3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CARまたは前記第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、その阻害性CARが、阻害性CARライゲーションの非存在下では該活性化CARによるT細胞活性化を阻害するが、該阻害性CARがライゲーションされたときには、該活性化CAR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

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；

20

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。

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）
を有する核酸配列
を含む、キット。

(項目 13)

項目 12 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 12 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 14)

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 13 に記載のキット。

10

(項目 15)

項目 8 ~ 11 のいずれかに記載の核酸配列を含むベクター。

(項目 16)

項目 15 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 17)

項目 8 ~ 11 のいずれかに記載の核酸配列；項目 12 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 13 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 15 または 16 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。

20

(項目 18)

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 17 に記載の方法。

(項目 19)

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 20)

項目 19 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 21)

次の工程：

30

(i) 被験体からの T 細胞含有試料の単離；

(ii) 項目 8 ~ 11 のいずれかに記載の核酸配列；項目 12 に記載の第 1 の核酸配列および第 2 の核酸配列；項目 13 または 14 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 15 または 16 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سفェクション；ならびに

(iii) 該被験体に (ii) からの該 T 細胞を投与することを含む、項目 20 に記載の方法。

(項目 22)

前記疾患ががんである、項目 20 または 21 に記載の方法。

(項目 23)

40

疾患の処置および / または予防で使用するための項目 19 に記載の医薬組成物。

(項目 24)

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 25)

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；

(ii) スペーサー；

(iii) 膜貫通ドメイン；および

50

(i v) 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である、ナチュラルキラー細胞。

(項目 26)

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、項目1に記載のCAR発現T細胞および/または項目25に記載のCAR発現NK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、CAR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、CAR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Fc-R1-またはCD3エンドドメインのみを通じてITAM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FACS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CARで形質導入されたT細胞により殺される。OR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。ANDゲート受容体では、ダブル陽性標的細胞のみが殺される。AND NOTゲーティングでは、ダブル陽性標的是保存され、シングル陽性標的是

20

【図3】図3は、標的細胞集団の作製を示す。SupT1細胞を標的細胞として使用した。これらの細胞に対しCD19、CD33のどちらかまたはCD19およびCD33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、OR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FMD-2A配列をもつ両CARが提供され、2つのタンパク質をもたらす。シグナル1は、IgG1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）。scFv1は、CD19を認識する1本鎖可変セグメントである（ただし、scFv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の標的でも認識する任意のドメインであってもよい）。STKは、CD8ストークであるが、任意の適切な細胞外ドメインであり得る。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（can by）、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。HC2CH3は、ヒトIgG1のヒンジ-CH2-CH3であるが、第1のCAR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。CD28tm'およびCD3Z'は、CD28tmおよびCD3Z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、ORゲートについてのキメラ抗原受容体(CAR)の概略図である。N末端A)抗CD19scFvドメイン、続いてヒトCD8の細胞外ヒンジ領域またはB)抗CD33scFvドメイン、続いてヒトIgG1の細胞外ヒンジ、CH2およびCH3(FcR結合を低減するためpvaaa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に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の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に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の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)。S T K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つてもよい。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。

【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に発現されること以外は先行のCARと同一である阻害性CAR。

【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(5×10^4 細胞)を、様々な数の標的細胞と共に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。

【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シル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シル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

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 10 D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。20

【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ストークスペーサーおよび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ストークスペーサーを有し、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と共に発現される。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。30

【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ストークスペーサーおよび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ストークスペーサーを有し、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と共に発現される。B. 改変されたAND NOTゲートであり、マウスCD8ストークスペーサーがFcスペ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。40

【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

ト C D 8 ストークスペーサーおよび I T A M 含有エンドドメインを有し、第 2 の C A R は C D 3 3 を認識し、マウス C D 8 ストークスペーサーおよび I T I M 含有エンドドメインを有する。B . マウス C D 8 ストークスペーサーが F c ドメインにより置き換えられている対照 I T I M に基づくゲートの構造および活性。このゲートは、2 つの C A R により構成される：第 1 の C A R は、C D 1 9 を認識し、ヒト C D 8 ストークスペーサーおよび I T A M 含有エンドドメインを有し、第 2 の C A R は C D 3 3 を認識し、F c スペーサーおよび I T I M 含有エンドドメインを有する。両ゲートとも、C D 1 9 シングル陽性標的的に応答し、元のゲートのみが C D 1 9 および C D 3 3 ダブル陽性標的への応答において不活性である。

【図 24 A】図 24 は、C A R 論理ゲートの動力学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学的分離および行動のモデル。C A R は C D 1 9 または C D 3 3 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いると想像され得る。「45」は、T 細胞上に存在する天然 C D 4 5 タンパク質である。「H8」は、スペーサーとしてヒト C D 8 ストークを伴う C A R エクトドメインである。「Fc」は、スペーサーとしてヒト H C H 2 C H 3 を伴う C A R エクトドメインである。「M8」は、スペーサーとしてネズミ C D 8 ストークを伴う C A R エクトドメインである。「19」は、標的細胞表面上の C D 1 9 を表す。「33」は、標的細胞表面上の C D 3 3 を表す。記号

【数 1】

「⊕」

は、I T A M 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 - P T P N 6 または I T I M 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 - C D 4 5 または C D 1 4 8 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 C A R 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 C A R は、C D 1 9 を認識し、ヒト C D 8 ストークスペーサーおよび活性化エンドドメインを有し、第 2 の C A R は、C D 3 3 を認識し、F c スペーサーおよび C D 1 4 8 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 C A R は、C D 1 9 を認識し、ヒト C D 8 ストークスペーサーおよび活性化エンドドメインを有し、第 2 の C A R は、C D 3 3 を認識するが、マウス C D 8 ストー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；

(c) は、一組の C A R を含む機能的 AND NOT ゲートの行動を示すもので、第 1 の C A R は、C D 1 9 を認識し、ヒト C D 8 ストークスペーサーおよび活性化エンドドメインを有し、第 2 の C A R は、C D 3 3 を認識し、マウス C D 8 ストークスペーサーおよび P T P N 6 エンドドメインを有する；

(d) は、一組の C A R 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 C A R は、C D 1 9 を認識し、ヒト C D 8 ストークスペーサーおよび活性化エンドドメインを有し、第 2 の C A R は、C D 3 3 を認識するが、F c スペーサーおよび P T P N 6 エンドドメインを有する；

1 列目では、標的細胞は、C D 1 9 および C D 3 3 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* *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-pvaa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-pvaa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と共に発現させた。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。PBMC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CD19:CD33 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CD56+細胞(主にNK細胞)を枯渇させた。6日目、PBMC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-ガンマ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ペーサードメインの選択/ヒエラルキーを示す。CD3-ゼータのエクトドメインは、最も短い可能なスペーサーとして示唆されており、それに(b) IgG1ヒンジが続く。(c) ネズミまたはヒトCD8ストークおよびCD28エクトドメインは、サイズが中間であると考えられ、共分離する。(d) IgG1のヒンジ、CH2およびCH3ドメインは、より大きく、かさ高であり、(e) IgMのヒンジ、CH2、CH3およびCH4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、スペ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、スペ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ペーサー、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ペーサーならびに(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ペーサーならびに(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のようになる:

「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

り多くのマークの特定の発現（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、

10

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「ライゲーション・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－細胞にも等しく当てはまる。

20

【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／またはグリコシリ化を有し得るため、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ョンにより、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】

30

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「ライゲーション・オフ」阻害性CARである。ライゲーション・オフ阻害性CARは、阻害性CARライゲーショ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がライゲーショ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／またはグリコシリ化を有するため、両方のCARがライゲーションされたとき、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るため、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応答しておこる。

40

【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

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 - 10
TM2 - エンド2

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、自己切斷性ペプチドまたは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。

【 0 0 4 6 】

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 (C A R) をコードする第 1 のヌクレオチド配列；
- b) 第 2 の C A R をコードする第 2 のヌクレオチド配列；
- c) 2 つの C A R 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

【 0 0 4 7 】

代替コドンは、同一または類似アミノ酸配列（複数も可）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（複数も可）で使用されてもよい。

【 0 0 4 8 】

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。

【 0 0 4 9 】

本発明の動力学的分離に基づく A N D ゲートは、先に記載した「共 C A R 」、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 C A R 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

【 0 0 5 0 】

共 C A R 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 C A R 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 C A R の活性であると予想され得る。第一世代 C A R 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 I X を認識する第一世代 C A R の臨床試験では胆管毒性が観察された (R o t t e r d a m 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 C A R T 細胞はいずれも、共刺激 C A R 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。

【 0 0 5 1 】

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 / 標的シナッ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 C A R T 細胞は、单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 (s p i l l - o v e r)」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、C A R 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 C A R の活性の概念に基づく戦略が、提案され、試験された (R o s s i g , B l o o d . 2 0 0 2 年 3 月 1 5 日 ; 9 9 (6) : 2 0 0 9 - 1 6)。

【 0 0 5 2 】

このため、共 C A R 手法は、单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ッ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、A N D 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、A N D ゲート T 細胞活性化の「流出」作用の可能性は無い。

40

【 0 0 5 3 】

(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举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 (C A R) および第 2 の C A R 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 ストークを含み、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 紹介。

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 紹介。

【 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 紹介。

【 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 紹介。

40

【 0 0 6 2 】

10 . 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 activating 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 紹介。

【 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。 10

【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。 20

【0070】

18. 以下の構造：
AgB1 - スペーサー1 - TM1 - エンド1 - coexp - AbB2 - スペーサー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； 30

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；

coexp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. coexp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 - スペーサー1 - TM1 - エンド1

10

20

30

40

50

(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سف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。スペーサードメインは、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ードメインは、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。

10

【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すことはなかった。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がもたらされる。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。

20

【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細胞への伝達がもたらされる。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。

30

【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。

40

【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
 - (iv) 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

10

MSLPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVТИSCRASQDISKYLNWYQQKPD
 GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGTK
 LEITKAGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
 VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSDPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIFWVLVVVGVLACYSLLTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
 YNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPRAEGRGSLLTCGDVEENPGPMAVPTQ
 VLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVТИCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLI
 YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISLQPEDFATYYCQHYKNYPLFGQGTKLEIKRS
 GGGGSGGGGGGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
 WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AAQDAYTGGYFDYWGQGTЛTVSSMDPAEPKSPDKTHCPPCPAPPVAGPSVFLFPKPK
 DTLMIARTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFVVLVVVGVLACYSLLTVAFIIFWVRSRVKFSRSADAPA
 YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA
 YSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLP
 20
 30

【化2】

配列番号 2

MSLPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVТИCRASQDISKYLNWYQQKPD
 GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGTK
 LEITKAGGGGSGGGSGGGSGGGSEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
 VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSDPTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIFWVLVVGGVLACYSLLVTVAIFI FWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
 YNELNLGRREEYDVLKDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE 10
 RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLLTCGDVEENPGPMAVPTQ
 VLGLLLLWLDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVТИCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLI
 YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGKLEIKRS
 GGGGSGGGSGGGSGGGSRSEVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
 WIRQAPGKGLEWSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AAQDAYTGGYFDYWGQGTЛTVSSMDPAEPKSPDKTHCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
 DTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK 20
 GFYPSDIAVEWESNGQPNENYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKAVFGCIFGALVITVGGFIFWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPK
 KSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPY
 DISRVKLSVQTHSTDYINANYMPGYHSKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLT
 KCVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHF
 TSWPDHGVPDTTDLLINFRLVRYDYMKSPPESPILVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENEN
 TVDVYGIYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVL DIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAP
 VTTFGKTNGYIA 30

【化3 - 1】

配列番号 3

MSLPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVТИCRASQDISKYLNWYQQKPD
 GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGTK
 LEITKAGGGGSGGGSGGGSGGGSEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
 VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSDPTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIFWVLVVGGVLACYSLLVTVAIFI FWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL 40

【化3-2】

YNENLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPRAEGRGSLLTCDVENEENPGPMAVPTQ
 VLGLLLLWLT DARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLI
 YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKEIKRS
 GGGGSGGGSGGGSGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
 WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AAQDAYTGGYFDYWQQGTLVTVSSMDPAEPKSPDKHTCPPCPAPPVAGPSVFLPPKPK
 DTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWWVAGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKALIAFLAFLIIVTSIALLVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVER
 DDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPPIKEARKPFNQNKNRYV
 DILPYDYNRVELSEINGAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDFFWRMIWEQKAT
 VIVMVTRCEEGNRNKCAEWPSMEEGTRAFFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKAT
 GREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVHCSAGVGRTGYIGIDA
 MLEGLEAENKDVYGYVKLRRQRCLMVQEAQYILIHQALVEYNNQFGETEVNLSELHPYL
 HNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPKH
 ELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPVEVMIAAQGPLKETIGDFWQMI
 FQRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDLKD TDKSSTYTLRVFELRHSKR
 KDSRTVYQYQYTNTWSVEQLPAEPKELISMIVVVKQKLPQKNSSEGKHHKSTPLLIHCRDG
 SQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAGNG
 QVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSV
 NGPASPALNQGS

10

20

【化4-1】

30

配列番号 4

MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVITCRASQDISKYLNWYQQKPD
 GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQQNTLPYTFGGGTK
 LEITKAGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
 VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDATIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTSSDPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIFWVLVVVGGVLACYSLVTVAIFIWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
 YNENLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPRAEGRGSLLTCDVENEENPGPMAVPTQ
 VLGLLLLWLT DARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLI
 YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKEIKRS
 GGGGSGGGGGSGGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
 WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC

40

【化4-2】

AAQDAYTGGYFDYWGQGTLTVSSMDPATTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRG
 SVKGTGLDFACDIYWAPLAGICVALLSLIITLICYHRSRKRVCKSGGGSFWEEFESLQKQE
 KNLHQRLEGQRPENKGKNRYKNILPFDHSRVLQGRDSNIPGSDYINANYIKNQLGPDEN
 KTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVIVMTTREVEKGRNKCVPYWPEVGMQRAYGPY
 SVTNCGEHDTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGVPEPGVLSFLDQINQ
 RQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGIIIDMLMENISTKGLCDCIDIQKTIQMVRQRSGMVQTE
 AQYKFIYVAIAQFIETTKKKL

10

【化5】

配列番号 5

MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLASLGDRVТИSCRASQDISKYLNWYQQKPD
 GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTK
 LEITKAGGGGSGGGGGGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
 VSWIRQPPRKGLEWLGVIGSETYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSDPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIFWVLVVVGVLACYSLLTVAIFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
 YNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPRRAEGRGSLLCGDVEENPGPMAVPTQ
 VLGLLLLWLT DARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVТИCRASEDIYFNLWYQQKPGKAPKLLI
 YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGKLEIKRS
 GGGGGGGGGGGGGGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
 WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AAQDAYTGGYFDYWGQGTLTVSSMDPATTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRG
 SVKGTGLDFACDILIGVSVVFCLLLLVLFCILHRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRPDLAVID
 VLERTADKATVNGLPEKDRETDTSALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPM
 AESITYAAVARH

20

【化6-1】

配列番号 6

MSLPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLASLGDRVТИSCRASQDISKYLNWYQQKPD
 GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTK
 LEITKAGGGGSGGGGGGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
 VSWIRQPPRKGLEWLGVIGSETYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSDPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIFWVLVVVGVLACYSLLTVAIFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
 YNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPRRAEGRGSLLCGDVEENPGPMAVPTQ
 VLGLLLLWLT DARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVТИCRASEDIYFNLWYQQKPGKAPKLLI
 YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGKLEIKRS

40

【化6-2】

GGGGSGGGGSGGGSGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
 WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AAQDAYTGGYFDYWGQGTLTVSSMDPATTTPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRG
 SVKGTGLDFACDILIGVSVFVFLCLLLLVLFCLHRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRPDLAVD
 VLERTADKATVNGLPEKDRETDTSALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPM
 AESITYAAVARHRAEGRGSLLTCGDVEENPGPWYHGMSGQAETLLQAKGEPEWTFLVR
 ESLSQPGDFVLSVLDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETFDSDLVEHFKKT
 GIEEASGAFVYLQRQPSGGGGSFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLV рис. 10
 NRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHSKKDFIATQGPLPNTLKDFWR
 MWWENKNVYAIIMLTCKVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNI
 QTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPDTDLLINFРYLVРDYMКQSPPESPILVHCСAGVGRTGT
 FIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVL DIVRSQKDSKVDLIY
 QNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIASGS

【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。

【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/amas.html)、FASTA(http://www.ebi.ac.uk/Tools/ssss.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)。

【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ードメインを有する。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

10

20

30

40

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、ほとんどのがんに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（probabilty）は指數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、单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

【0099】

動力学的分離モデル

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、leck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/またはグリコシリ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

10

20

30

40

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。

【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、急性骨髓性白血病を処置するためCD33を標的としている間に、全骨髓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。

【0102】

本発明の設計は、Wilkieら((2012).J.Clin.Immunol.32、1059-1070)により記載され、次いでインビボで試験された(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。

10

20

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
多発性骨髓腫	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)

【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と共に局在するスペ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。

【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髓性白血病(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。

【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。

10

20

30

【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
骨髓腫	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

【0106】

複合ゲート

上記成分を伴う動力学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。

【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、單一アルファ-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。

【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。

10

20

30

40

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、IgG1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

10

配列番号9のシグナルペプチドは、CD8から誘導される。

【0114】

第1のCARについてのシグナルペプチドは、第2のCARのシグナルペプチド（ならびに第3のCARおよび第4のCAR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CAR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(scfv)；標的抗原の天然リガンド；標的にに対する十分な親和力をもつペプチド；単一ドメイン抗体；Darpin（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、BCMAと結合するCARに関するものであり、抗原結合ドメイン（domain）は、BCMAについてのリガンドであるAPRIL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

CAR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CARおよび第2のCAR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、IgG1Fc領域、IgG1ヒンジまたはヒトCD8ストークまたはマウスCD8ストークを含み得る。あるいは、スペーサーは、IgG1Fc領域、IgG1ヒンジまたはCD8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クア配列を含み得る。ヒトIgG1スペーサーは、Fc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)

AEPKSPDKTHTCPCPAPPVAGPSVFLPPPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

配列番号 11 (ヒト CD8 ストーク):

TTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDI

10

配列番号 12 (ヒト IgG1ヒンジ):

AEPKSPDKTHTCPCPKDPK

配列番号 13 (CD2 エクトドメイン)

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDKKIAQFRKEKETFKEKDTYKLF
KNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVS PKKISWTCINTTLCEVMNG
TDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAFKCTAGNKVSKESSVEPVSCP
EKGLD

20

配列番号 14 (CD34 エクトドメイン)

SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTPSTLGSTSHPVSQHGNEATTNITETTVKF
TSTS VITSVYGNNTNSVQS QTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTS LATS
PTKPYTSSS PILSDIKA EIKCGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQ
ADADAGAQVCSLLL A QSEVRPQC LLLVLANRTEISSKLQLM KKQSDLKKLGILDFTEQDVA
SHQSYSQKT

30

【0122】

C A R 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 C A R 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 s c F v からの V H および V L 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。「O R」ゲートおよび「A N D N O T」ゲートの場合、第 1 の C A R のスペーサーは、交差対合を回避するため第 2 の C A R 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 A N D 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 C A R および第 2 の C A R 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 C A R 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 C A R 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、IgG1ヒンジ、CD8ストーク、IgG1Fc、CD34のエクトドメイン、CD45のエクトドメインが、特異的に分離すると予想される。

【0124】

特異的に分離することから、AND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 エクトドメイン	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	
ヒト-CD3z エクトドメイン	ヒト-IgM-ヒンジ-CH2CH3CD4	
ヒト-IgG-ヒンジ	ヒト-IgM-ヒンジ-CH2CH3CD4	20
ヒト-CD28STK	ヒト-IgM-ヒンジ-CH2CH3CD4	

【0125】

本発明の他の実施態様（例えばAND NOT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。オーソロガス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CD8ストーク、または、あるいはモノマーリ性であるスペーサードメイン、例えばCD2のエクトドメインである。

【0126】

共局在することから、AND NOT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	
ヒト-CD28STK	マウスCD8aSTK	
ヒト-IgG-ヒンジ	ヒト-CD3z エクトドメイン	40
ヒト-CD8aSTK	マウスCD28STK	
ヒト-CD28STK	マウスCD28STK	
ヒト-IgG-ヒンジ-CH2CH3	ヒト-IgM-ヒンジ-CH2CH3CD4	

【0127】

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つてよい。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 (h t t p : / / w w w . c b s . d t u . d k / s e r v i c e s / T M H M M - 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）。

【 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、シナップスから排除され、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ので、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。

【 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。

【 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 イプシロン鎖、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 × × 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 × × L / I × (6 - 8) Y × × 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）。

【 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。

10

20

30

40

50

【0135】

【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

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAIFI FWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREY
 DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLY
 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

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAIFI FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP
 RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
 KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 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

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAIFI FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP
 RDFAAYRSRDQRLLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHLAKIRVKFSRSADAPAYQQG
 QNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
 MKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【0136】

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。

【0137】

「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。

【0138】

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/またはグリコシリ化のスペーサーである。

40

【0139】

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。

【0140】

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 】

例えは、AND ゲートの阻害性エンドドメインは、CD148 または CD45 のエンドドメインを含み得る。CD148 および CD45 は、TCR 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 】

CD148 は、PLC 1 および LAT のリン酸化および機能を妨げることにより TCR 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。

【 0 1 4 3 】

全造血細胞に存在する CD45 は、同じく PLC 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 1 1 of part) を含み得る。ホスファターゼは、PLC 1 および / または LAT などの T 細胞シグナル伝達に関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。

【 0 1 4 5 】

CD45 および CD148 の膜貫通およびエンドドメインを、それぞれ配列番号 18 および 19 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

ALIAFLAFLIIVTSIALLVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYK
RKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQNKNRYVDILPYDYNRVELSEINGAGSN
YINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDFFWRMIWEQKATVIVMVTRCEEGNRNKCAEYWP
SMEEGTRAFGDVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKKEATGREVTHIQFTSWPDHGVPEPDPH
LLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVWHCSAGVGRTGYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQ
RCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLHNMMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLP
SYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSE
EPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVVKIVMLTELKHGDQEICAQ
YWGEKGKTYGDIEDLKDTDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSDRTVYQYQYTWNWSVEQLPAEP
KELISMIQVVKQKLPQKNSSEGKHHKSTPLIHC RDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDI
FQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPQAQNGQVKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQ
DANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS

20

30

40

配列番号 19 - CD148 膜貫通およびエンドドメイン配列

AVFGCIFGALIVTVGGFIFWRKKRKDAKNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSN
CGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYM
PGYHSKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTCKVEQGRTKCEEYWPSKQAQD
YGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPDTTDLLINFRLV
DYMKQSPPEPILVHCSAGVGRTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGYIVYDLRMHRPLMVQTED
QYVFLNQCVL DIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

50

【0146】

阻害性CARは、配列番号18または19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CAR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CARは少なくとも80%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。

【0147】

他のスペ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。SupT1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、CD19-CD33-、CD19+CD33-、CD19-CD33+およびCD19+CD33+）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IL-2を放出するマウスT細胞系BW5147などのT細胞に、CAR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、IL-2放出の測定により（例えばELISAにより）測定してもよい。例えば、CD148およびCD45エンドドメインは両方とも、CD3-ゼータエンドドメインを含む活性化CARとの組み合わせで阻害性CARとして機能することができる実施例4に示されている。これらのCARは、ANDゲーティングを達成するため、一方のCAR上の短い/嵩高くないCD8ストークスペーサーおよび他方のCAR上の嵩高いFcスペーサーに依拠する。両受容体がライゲーションされたとき、スペ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、CD3-ゼータ受容体はCD148またはCD45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、代替的スペ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。スペ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CARのライゲーション状態とは関係なく活性化CARのライゲーションの存在下で予測される。

【0148】

「ライゲーション・オン」エンドドメイン

AND NOTゲートとして上記で示された実施形態では、CARの一方は、阻害性CARが、阻害性CARライゲーションの非存在下で活性化CAR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CARがライゲーションされたときには、活性化CAR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。

【0149】

「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、TCR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。

【0150】

「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TCR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TCRシグナル伝達応答を阻害することができるリン酸化ITAM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。

【0151】

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ク（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ことが可能である。

【0152】

10

20

30

40

50

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 I T A M のみの有意な脱リン酸化が起こるよう、 C D 4 5 または C D 1 4 8 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、 N O T A N D ゲートの阻害性エンドドメインは、 P T P N 6 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。

【 0 1 5 3 】

プロテインチロシンホスファターゼ(P T P)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 P T P の N 末端部分は、2つのタンデム S r c ホモログ(S H 2)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 P T P とその基質との相互作用を媒介する。この P T P 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。
10

【 0 1 5 4 】

阻害剤ドメインは、 P T P N 6 (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 1 0 】

配列番号 20 – PTPN6 の配列

MVRWFHRDLSGLDAETLLKGKRGVHGSFLARPSRKNQGDFSLSRVGDQVTHIRIQNSGDF
20
YDLYGGEKFATLTELVEYYTQQQGVQLQDRDGIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQA
ETLLQAKGEPEWTFLVRESLSQPGDFVLSVLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRTVGG
LETFDSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYYATRVNAADIENRVLELNKKQESEDTAKA
GFWEEFESLQKQEVKNLHQQRLEGQRPENKGKNRYKNILPFDHSRVLQGRDSNIPGSDYIN
ANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVIVMTTREVEKGRNKCV
YWPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGV
PSEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLCDCIDIQKT
IQMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQFIETTKKKLEVLSQKGQESEYGNITYPPAMKNAH
AKASRTSSKHEDVYENLHTKNKREEVKKKQRSADKEKSKGSLKRK
30

配列番号 21 – PTPN6 のホスファターゼドメインの配列

FWEEFESLQKQEVKNLHQQRLEGQRPENKGKNRYKNILPFDHSRVLQGRDSNIPGSDYINA
NYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVIVMTTREVEKGRNKCVPY
WPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGV
SEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLCDCIDIQKT
QMVRRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQF

【 0 1 5 5 】

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、 C D 2 2 、 L A I R - 1 、キラー阻害性受容体ファミリー(K I R)、 L I L R B 1 、 C T L A 4 、 P D - 1 、 B T L A などに由来するものなどの I T I M (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、 I T I M はその S H 2 ドメインを通して内因性 P T P N 6 をリクルートする。 I T A M 含有エンドドメインと共に局在するならば、脱リン酸化が起こり、活性化 C A R は阻害される。

【 0 1 5 6 】

I T I M 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 / L × Y × X I / V / L)である。当業者であれば、 I T I M 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 I T I M 含有タンパク質
40
50

のリストは、プロテオームワイド走査法(p r o t e o m e - w i d e s c a n) (S t a u b l a (2 0 0 4) C e l l . S i g n a l . 1 6 , 4 3 5 - 4 5 6)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 I T I M を生成することができる。

P D C D 1 、 B T L A 4 、 L I L R B 1 、 L A I R 1 、 C T L A 4 、 K I R 2 D L 1 、 K I R 2 D L 4 、 K I R 2 D L 5 、 K I R 3 D L 1 および K I R 3 D L 3 からの I T I M エンドドメインを、それぞれ配列番号 2 2 ~ 3 1 に示す。

【化 1 1 】

配列番号 22 PDCD1 エンドドメイン

CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATI
VFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

10

配列番号 23 BTLA4

KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPHSLGCYNPMMEDGISYTL
RFPEMNIPRTGDAESSEMQRPPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELI
QFGVGERPQAQENVDYVILKH

配列番号 24 LILRB1

LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQ
PEDGVEMDTRSPHDDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQM
DTEAAASEAPQDVTVYQLHSLTRCREATEPPSQEGPSPA VPSIYATLAIH

20

配列番号 25 LAIR1

HRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRPDLAQVLERTADKATVNGLPEKDRETDTSALAAGSS
QEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMAESITYAAVARH

配列番号 26 CTLA4

FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTEPECEKQFQPYFIPIN

30

配列番号 27 KIR2DL1

GNSRHLHVLIGTSVVIIPFAILLFFLLHRWCANKNAVVMDQEPAGNRTVNREDSDEQDP
QEVTYTQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELNAESRSKVVSCL

【化12】

配列番号 28 KIR2DL4

GIARHLHAVIRYSVAILFTILPFFLLHRWCSKKKENAAVMNQEPAHGRTVNREDSDEQDPQ
 EVTYAQLDHCIFTQRKITGPSQRSKRPSTDTSVCIELPNAEPRALSPAHEHHSQALMGSSRE
 TTALSQTQLASSNVPAAGI

配列番号 29 KIR2DL5

TGIRRHLHILIGTSVAILFIILFFFLLHCCSNKKNAAVMDQEPAHGRTVNREDSDDQDPQEV
 TYAQLDHCVFTQTKitSPSQRPKTPPTDTTMYMELPNAKPRSLSPAHKHHSQALRGSSRET
 TALSQNRVASSHVPAAGI

10

配列番号 30 KIR3DL1

KDPRHLHILIGTSVIIIFILLFFLLHLWCSNKNAAVMDQEPAHNRTANSEDSDEQDPEEV
 TYAQLDHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDTLYTELPNAKPRSKVVSCP

配列番号 31 KIR3DL3

KDPGNSRHLHVILIGTSVIIIPFAILLFFLLHRWCANKNAVVMDQEPAHNRTVNREDSDEQD
 PQEVTYAQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDTSV

20

【0157】

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に発現される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13-1】

配列番号 32 PTPN6-CD45 融合たんぱく質

WYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFLVRESLSQPGDFVLSVLSDQPKAGPGSPLRVTHIKV
 MCEGGGRYTVGGLETFDSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLQPYKIYDLHKKRSCNLDEQQ
 ELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQN
 KNRYVDILPYDYNRVELSEINGAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIW
 EQKATVIVMVTRCEEGNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNK

40

【化13-2】

KEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTY
 IGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVKLRRQRCLMVQVEAQYIHLHQALVEYNQFGETEVNLSEL
 HPYLHNMKRDPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRV
 LKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFMI
 QRKVVKIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGKTYGDIEDLKDTSSTYTLRVFELRHSKRK
 DSRTVYQYQYTNTWSVEQLPAEPKELISMIVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLIHC RDGS
 QQTGIFCALLNLLESAAETEEVVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPQAQNGQ
 VKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSV
 GPASPALNQGS

10

【化14】

配列番号 33 PTPN6-CD148 融合物

ETLLQAKGEPWTFLVRESLSQPGDFVLSVLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRTVGG
 LETFDSDLVHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYRKKRDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENF
 EAYFKKQQADSNCGFAEYEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQ
 THSTDDYINANYMPGYHSKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTCKVEQGRTK
 CEEYWPSKQQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVP
 DTTDLLINFRLVRDYMKQSPPESPLVHCSAGVGRTGTFIADRLIYQIENENTVDVYGIYD
 LRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGY
 IA

20

【0158】

ライゲーション・オン阻害性CARは、配列番号20または21の全部または一部を含み得る。それは、配列番号22～31の全部または一部を含み得る。それは、配列番号32または33のどちらかと共に発現される配列番号22～31の全部または一部を含み得る。それは、変異型が阻害性CARのライゲーションの際に活性化CAR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80%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

【0159】

上記のとおり、代替的スペ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CARと組み合わせた形で半阻害性CARとして機能することができる事が示されている。これらのCARは、一方のCAR上のヒトCD8ストークスペーサーおよび他方のCAR上のマウスCD8ストークスペーサーに依拠する。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、スペ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CAR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CARがライゲーションされ、阻害性CAR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、代替的スペ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。スペ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CARのライゲーション状態とは関係無く活性化CARのライゲーションの存在下で活性化が予想される。

40

50

【0160】

共発現部位

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

【0161】

核酸は、切断部位により連結された2つのCAR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CARおよび第2のCAR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34として示された配列を有する、口蹄疫ウイルス(FMDV)2a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： 10

配列番号34

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

【0162】

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

【0163】

細胞

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

【0164】

該細胞は、免疫学的細胞など、細胞表面でCAR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(NK)細胞などの免疫エフェクター細胞であり得る。

【0165】

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(TCR)の存在により、B細胞およびナチュラルキラー細胞(NK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。

【0166】

ヘルパーTヘルパー細胞(TH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。TH細胞は、それらの表面でCD4を発現する。TH細胞は、抗原提示細胞(APC)の表面でMHC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、TH1、TH2、TH3、TH17、Th9、またはTFHを含む、幾つかのサブタイプのうちの1つに分化し得る。 30

【0167】

細胞傷害性T細胞(CTL細胞またはCTL)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。CTLは、それらの表面でCD8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、MHC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IL-10、アデノシンおよび他の分子を通じて、CD8+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。 40

【0168】

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(CTCM細胞)および2タイプのエフェクター記憶T細胞(TEM細胞およびTEMRA細胞)を含む。記憶細胞は、CD4+またはCD8+ 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】

以前にはサブレッサーT細胞として知られていた、調節性T細胞（T_{reg}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細胞媒介性免疫を制止し、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+T_{reg}細胞の2つの主なクラス - 天然に存在するT_{reg}細胞および適応T_{reg}細胞については記載されている。

10

【0171】

天然に存在するT_{reg}細胞（CD4+CD25+FOXP3+T_{reg}細胞としても知られている）は、胸腺で生じ、TSLPで活性化された骨髓性（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T_{reg}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。FOXP3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T_{reg}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 C A R 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 (P B M C) 試料から得てもよい。T 細胞は、C A R エンコード核酸で形質導入される前に、例えば抗 C D 3 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。

【 0 1 8 1 】

本発明の C A R 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
(i i) 第 1 の C A R および第 2 の C A R をコードする 1 つまたはそれより多くの核酸配列 (複数も可) 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

【 0 1 8 2 】

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

【 0 1 8 3 】

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 C A R および第 2 の C A R をコードする 1 つまたはそれより多くの核酸配列 (複数も可) 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 3 5 O R ゲート

C D 4 5 を用いる配列番号 3 6 A N D ゲート

20

C D 1 4 8 を用いる配列番号 3 7 A N D ゲート

エンドドメインとして P T P N 6 を用いる配列番号 3 8 A N D N O T ゲート

L A I R 1 エンドドメインを用いる配列番号 3 9 A N D N O T ゲート

C D 1 4 8 ホスファターゼとの L A I R 1 および P T P N 6 S H 2 融合体を用いる配列番号 4 0 A N D N O T ゲート。

【化15-1】

配列番号 35:

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

ATGAGCCTGCCGTGACGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
 AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGCGAC
 CGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACGGTACC 10
 AGCAGAAAGCCCACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACA
 GCGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGACACTACAGCCTGACC
 ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGAACACCC
 TGCCCTACACCTTCGGAGGCAGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGCGAGG
 GCTCTGGCGGAGGCCGGCTCTGGCGGAGGCCGGCTCTGGCGGAGGCCGGAGCGAGGT
 GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCAGGCCGGCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
 CTGCACCGTGAGCGCGTGAGCCTGCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
 CCCACGGAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCGTGATCTGGGCAGCGAGACCACCTACTA 20
 CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
 GTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGCCATCTACTACTTGCGCCAAG
 CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGCCAGGGCACCGCGTG
 ACCGTGAGCTCAGATCCCACACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGGCC 30
 ACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCTGCAGGCCAGAGCGTGCCGGCCAGCGGCCGG
 GGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTGGGTGCTGGT
 GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTAGTAACAGTGGCCTTATTATTT
 TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGAGCAGG
 GCCAGAACCGAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGGAGTACGATGTTT
 GGACAAGAGACGTGGCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
 GATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCGAGG 40
 GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
 TCGCAGAGCCAGGGCAGGGAAAGTCTTAACATGCCGGACGTGGAGGAAAATCC
 CGGGCCATGGCGTCCCCACTCAGGTCTGGGTTGTGCTACTGTGGCTTACAGAT
 GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTCCGTGCTGCATGTGGAGA
 TCGCGTCACCATCACCTGTCGAGCAAGTGAGGACATTATTTAATTAGTGTGGTATCA
 GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCTGATCTATGATAACAAATGCTGGCAGAT
 GGGTCCATACGGTCAGTGGCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCAA 40
 GTAGCCTGCAACCGAAGATTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
 TCACGTTGGTCAGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
 GAGGCAGGAGGCAGCGGAGGCAGGCTCGGGAGGCCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
 CAGTTGGTGGAGTCTGGGGCGCTGGTGCAGCCTGGAGGGCCCTGAGGCTCTCC
 TGTGCAGCCTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCAGGGACTCAGGCAGGCTC
 CAGGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
 CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAGCACCCTCT

【化15-2】

ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGCCGTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTACGGGAGGTTACTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
 TCGTCTATGGATCCCAGCCGAGCCAAATCTCCTGACAAAACACATGCCACCCT
 GCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCGTAGTCTCCTTCCCCAAAACCCAAGGA
 CACCTCATGATGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCA
 CGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTC
 ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACA
 AAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCTGAGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCA
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAG
 CAATGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGG
 CTCCCTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAAC
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCT
 GAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCAAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGAGG
 CGTGCCTGGCTGTTACTCTCCTGGTGACCGTGGCCTCATCATCTTGGTGCCT
 CCCGGGTGAAGTTCTCGCTCTGCCATGCCCTATCAGCAGGGCAGAATCA
 GCTGTACAATGAACCTGGCAGGCGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCG
 GAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGCGGCAAACCACGGCGAAAAATCCCCAGGAGG
 GACTCTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAATGCCGAGGCCTATTCCGAGATGGCAT
 GAAGGGAGAGAGAACGCGGAAAGGGCACGACGCCGTATCAGGGATTGTCCAC
 CGCTACAAAAGATAATGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCAGATGA

10

【化16-1】

配列番号 36

30

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

ATGAGCCTGCCGTGACGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
 AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACAGCAGCCTGAGGCCAGCCTGGCGAC
 CGGGTACCATCAGCTGCAGAGCCAGGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACGGTACC
 AGCAGAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGCTGCACA
 GCAGCGTGCCAGCCGGTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC
 ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
 TGCCCTACACCTTGGAGGCGGCCAACAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAG
 GCTCTGGCGGAGGCCTCTGGCGAGGCGCTCTGGCGGAGGCCAGCGAGGT
 GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCCTGGTGGCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
 CTGCACCGTGAGCGCGTGAGCCTGCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
 CCCACGGAAGGGCTGGAGTGGCTGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA

40

【化16-2】

CAACAGGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
 GTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
 CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGCCAGGGCACCGCGTG
 ACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGACCACCAACACCGCGCCC
 ACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCTGCGCCCAGAGCGTGCAGGGCACCGCGGG
 GGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTTTGGGTGCTGGT
 GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTT
 TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAAGCAGG
 GCCAGAACCAAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGGAGTACGATGTTT
 GGACAAGAGACGTGGCCGGACCCCTGAGATGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACACTGCAGAAAGATAAGATGGCGAGGCCTACAGTGA
 GATTGGGATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGCAGATGGCCTTACCAAGG
 GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
 TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAATCC
 CGGGCCCATGGCGTCCCCACTCAGGTCTGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGAT
 GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGCGGAGA
 TCGCGTACCATCACCTGTCGAGCAAGTGAGGACATTATTAAATTAGTGTGGTATCA
 GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAACGCTCTGATCTATGATAACAAATCGCTGGCAGAT
 GGGTCCCATCACGGTTCAAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCAA
 GTAGCCTGCAACCGAAGATTGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
 TCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
 GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCAGTGGCTCGGGAGGCAGGCTCGAGATCTGAGGTG
 CAGTTGGTGGAGTCTGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCC
 TGTGCAGCCTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCAGTGGATCAGGCAGGCTC
 CAGGGAAAGGTCTGGAGTGGCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
 CGAGACTCCGTGAAGGGCCATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAGCACCCCT
 ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCAGGACACGGCGTCTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTACGGGAGGTTACTTGATTACTGGGCCAGGAACGGCTGGTACAGTC
 TCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCAAATCTCTGACAAAACACTCACACATGCCACCGT
 GCCCAGCACCTCCCGTGGCGGGCCCGTCAGTCTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGA
 CACCCCTCATGATGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCA
 CGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACA
 AAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCA
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAG

10

20

30

40

【化16-3】

CAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGG
 CTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCT
 GAGTCTGAGCCCAGGAAGAACCCCAAGGCACTGATAGCATTCTGGCATTCTG
 ATTATTGTGACATCAATAGCCCTGCTTGTCTCTACAAAATCTATGATCTACATAAGA
 AAAGATCCTGCAATTAGATGAACAGCAGGAGCTTGTGAAAGGGATGATGAAAAACAA
 CTGATGAATGTGGAGCCAATCCATGCAGATATTGTGAACTTATAAGAGGAAGAT
 TGCTGATGAAGGAAGACTTTCTGGCTGAATTTCAGAGCATCCCGCGGGTGTTCAGCA
 AGTTTCCTATAAAGGAAGCTCGAAAGCCCTTAACCAGAATAAAACCGTTATGTTGACA
 TTCTTCCTTATGATTATAACCGTGTGAACCTCTGAGATAACGGAGATGCAGGGTCAA
 ACTACATAAAATGCCAGCTATTGATGGTTCAAAGAACCCAGGAAATACATTGCTGCAC
 AAGGTCCAGGGATGAAACTGTTGATGATTCTGGAGGATGATTGGAAACAGAAAGC
 CACAGTTATTGTCATGGTCACTCGATGTGAAGAAGGAACAGGAACAAGTGTGCAGAAT
 ACTGGCCGTCAATGGAAGAGGGCACTCGGCTTGGAGATGTTGTAAAGATCAA
 CCAGCACAAAAGATGTCCAGATTACATCATTAGAAATTGAAACATTGAAATAAAAAAGA
 AAAAGCAACTGGAAGAGAGGTGACTCACATTAGTTCACAGCTGGCCAGACCACGGG
 GTGCCTGAGGATCCTCACTGCTCCTCAAACCTGAGAAGGAGAGTGAATGCCTTCAGCA
 ATTTCTTCAGTGGTCCCATTGTGGTGCAGTCAGTGTGCTGGTGTGGCGCACAGGAAC
 CTATATCGGAATTGATGCCATGCTAGAAGGCCTGGAAGGCCGAGAACAAAGTGGATGTT
 ATGGTTATGTTGTCAAGCTAAGGCACAGAGATGCCTGATGGTCAAGTAGAGGCCA
 GTACATCTTGATCCATCAGGCTTGGGAATACAATCAGTTGGAGAACAGAAGTGA
 ATTTGTCTGAATTACATCCATATCTACATAACATGAAGAAAAGGGATCCACCCAGTGAGC
 CGTCTCCACTAGAGGCTGAATTCCAGAGACTTCCTCATATAGGAGCTGGAGGACACA
 GCACATTGGAAATCAAGAAGAAAATAAGTAAAACAGGAATTCTAATGTCATCCATA
 TGACTATAACAGAGTGCCACTTAAACATGAGCTGGAAATGAGTAAAGAGAGTGAGCATG
 ATTCAAGATGAATCCTCTGATGATGACAGTGATTGAGGAACCAAGCAAATACATCAAT
 GCATCTTTATAATGAGCTACTGGAAACCTGAAGTGATGATTGCTGCTCAGGGACCACT
 GAAGGAGACCATTGGTACTTTGGCAGATGATCTTCAAAGAAAAGTCAAAGTTATTG
 TTATGCTGACAGAACTGAAACATGGAGACCAGGAAATCTGTGCTCAGTACTGGGAGA
 AGGAAAGCAAACATGGAGATATTGAAGTTGACCTGAAAGACACAGACAAATCTCAA
 CTTATACCCCTCGTGTCTTGAACCTGAGACATTCAAGAGGAAAGACTCTCGAACTGTG
 TACCAAGTACCAATACAAACTGGAGTGTGGAGCAGCTCCTGCAGAACCCAAGGAATT
 AATCTCTATGATTCAAGTCGTCAAACAAAAACTTCCCCAGAAGAATTCTCTGAAGGGA
 ACAAGCATCACAAGAGTACACCTCTACTCATTCACTGCAGGGATGGATCTCAGCAAACG
 GGAATATTTGTGCTTGTAAATCTCTTAGAAAGTGCAGGAAACAGAAGAGGTAGTGG
 TATTTTCAAGTGGTAAAGCTTACGCAAAGCTAGGCCAGGCATGGTTCCACATTG
 AGCAATATCAATTCTATATGACGTCAATTGCCAGCACCTACCCCTGCTCAGAACGGACAA

10

20

30

40

【化16-4】

GTAAAGAAAAACAACCATCAAGAAGATAAAATTGAATTGATAATGAAGTGGACAAAGTA
 AAGCAGGATGCTAATTGTGTTAATCCACTGGTCCCCAGAAAAGCTCCCTGAAGCAAA
 GGAACAGGCTGAAGGTTCTGAACCCACGAGTGGCACTGAGGGGCCAGAACATTCTGTC
 AATGGTCCTGCAAGTCCAGCTTAAATCAAGGTTCATAG

【化17-1】

配列番号 37:

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

ATGAGCCTGCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
 AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGGCCAGCCTGGCGAC
 CGGGTGACCATCAGCTGCAGGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACGGTAC
 AGCAGAAGCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAACACCAGCCGGCTGCACA
 GCGCGTGCCCAGCCGGTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC
 ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
 TGCCCTACACCTCGGAGGCCGACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCCGGAG
 GCTCTGGCGGAGGCCGGCTCTGGCGGAGGCCGGCTCTGGCGGAGGCCGGAGCGAGGT
 GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
 CTGCACCGTGAGCGCGTGAGCCTGCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
 CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCAACCTACTA
 CAACAGGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
 GTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
 CACTACTACTATGGCGGAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAAGCGTG
 ACCGTGAGCTCAGATCCCACCGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGCGCC
 ACCATCGCGTCGAGCCCTGTCCTGCGCCAGAGCGTGCCGGCCAGCGGGGG
 GGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTGGGTGCTGGT
 GGTGGTTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTT
 TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGAGCAGG
 GCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
 GGACAAGAGACGTGGCGGGACCTGAGATGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCACAGTGA
 GATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCGAGG
 GTCTCAGTACGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
 TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCAGGGACGTGGAGGAAATCC
 CGGGCCCATGGCCGTGCCACTCAGGTCTGGGTTTTGCTACTGTGGCTTACAGAT
 GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGCGAGA
 TCGCGTCACCATCACCTGTCGAGCAAGTGAGGACATTATTAAATTAGTGTGGTATCA
 GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAACGCTCTGATCTATGATAACAAATCGCTGGCAGAT

10

20

30

40

【化17-2】

GGGGTCCCACCGGTTAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACATAA
 GTAGCCTGCAACCCGAAGATTGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
 TCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
 GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
 CAGTTGGTGGAGTCTGGGGCGGCTTGGTCAGCCTGGAGGGCCCTGAGGCTCTCC
 TGTGCAGCCTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCAGTGATCAGGCAGGCTC
 CAGGGAAAGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
 CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCCTCT
 ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGCCGTCTTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTACGGGAGGTTACTTGATTACTGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
 TCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCAAATCTCCTGACAAAACACATGCCACCGT
 GCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA
 CACCCTCATGATGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCA
 CGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACA
 AAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCTACCCGGATGAGCTGACCATGCCGTGGAGTGGAGAG
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGACTCCGACCG
 CAATGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACCG
 CTCCTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAAC
 GTCTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCT
 GAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGGCGGTTTGGCTGTATCTTGGTGCC
 CTGGTTATTGTGACTGTGGAGGCTTCATCTCTGGAGAAAGAAGAGGAAAGATGCAA
 GAATAATGAAGTGTCTTTCTCAAATTAAACCTAAAAAATCTAAGTTAATCAGAGTGG
 GAATTTGAGGCCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAATGTGGTTCGCAGAG
 GAATACGAAGATCTGAAGCTTGGATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAGAACTGGC
 TGAGAATAGAGGAAAGAACGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATATTCCGTGCAA
 ACTTTCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCAATACATGCCCTGGCT
 ACCACTCCAAGAAAGATTTATTGCCACACAAGGACCTTACCGAACACTTGAAGATT
 TTTGGCGTATGGTTGGAGAAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTG
 AACAGGGAAGAACCAAATGTGAGGAGTATTGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGG
 AGACATAACTGTGCAATGACATCAGAAATTGTTCTCCGAATGGACCATCAGAGATT
 TCACAGTAAAAATATCCAGACAAGTGAGAGTCACCCCTCTGAGACAGTCCATTCA
 TCCTGGCCAGACCACGGTGTCCGACACCACTGACCTGCTCATCAACTCCGGTACC
 TCGTTCGTGAACATGAAGCAGAGTCCTCCGAATGCCGATTCTGGTGCATTGCA
 GCTGGGGCGAAGGACGGCACTTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAAGATA

10

20

30

40

【化17-3】

AGAATGAGAACACCGTGGATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCT
 TTAATGGTGCAGACAGAGGACCAGTATGTTCTCAATCAGTGTGTTGGATATTGTC
 AGATCCCAGAAAGACTCAAAGTAGATCTTACCAAGAACACAACGTCAATGACAAT
 CTATGAAAACCTTGCGCCCGTGACCACATTGGAAAGACCAATGGTTACATCGCCTAA

【化18-1】

配列番号 38

>16076.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-tm-dPTPN6 10
 ATGAGCCTGCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
 AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGCGAC
 CGGGTGACCATCAGCTGCAGGCCAGGCAGGACATCAGCAAGTACCTGAECTGGTACC
 AGCAGAACGCCCAGGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACACACCAGCCGGCTGCACA
 GCGCGTGCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC
 ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGAACACCC
 TGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAG
 GCTCTGGCGAGGCCGGCTGGCGAGGCCGGCTCTGGCGGAGGCCGGCAGCGAGGT 20
 GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCAGGCCCTGGTGGCCCCAAGCCAGGCCTGAGCGTGAC
 CTGCACCGTGAGCGCGTGAGCCTGCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
 CCCACGGAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA
 CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGGCCAGGT
 GTTCCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGCCATCTACTACTGCGCCAAG
 CACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCAGGGCACCAGCGTG
 ACCGTGAGCTCAGATCCCACACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGGCC
 ACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCTGCAGGCCAGAGCGTGCCGGCAGCGCGGG 30
 GGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTGGGTGCTGGT
 GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCTTATTATTT
 TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACAGCAGG
 GCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGGAGTACGATGTTT
 GGACAAGAGACGTGGCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
 CTCAGGAAGGCCGTACAATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGGGAGGCCTACAGTGA
 GATTGGGATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGCAGATGGCCTTACCAAGG 40
 GTCTCAGTACGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
 TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGAAAGTCTTCAACATGCGGGACGTGGAGGAAATCC
 CGGGCCCATGGCGTGCCCACTCAGGTCTGGGTTGGCTACTGTGGCTTACAGAT
 GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTCCCTGTGCTGCATCTGCGGAGA
 TCGCGTACCATCACCTGTCGAGCAAGTGGAGGACATTATTTAATTTAGTGTGGTATCA
 GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCTGATCTATGATAACAAATCGCTGGCAGAT
 GGGGTCCCATCACGGTCAGTGGCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCTAA

【化18-2】

GTAGCCTGCAACCGAAGATTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
 TCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
 GAGGCAGGAGGCAGCGGAGGCAGGTGGCTGGAGGCGGAGGCTGAGATCTGAGGTG
 CAGTTGGTGGAGTCTGGGGCGGCTGGTGAGCCTGGAGGGCTCTGAGGCTCTCC
 TGTGCAGCCTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCAGTGGATCAGGCAGGCTC
 CAGGGAAAGGGTCTGGAGTGGGCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
 CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAGCACCCCTCT
 ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTACGGGAGGTTACTTGATTACTGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
 TCGTCTATGGATCCCACCACAAACCAAGCCGTGCTGCCAGCCCAAGCCCTGTGC
 ACCCTACCGGCACCAGCCAGCCTCAGAGACCCGAGGACTGCCGCCCTGGGGCAGC
 GTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCCCTGCGACATCTACTGGGCACCTCTGGCCGGA
 ATATGCGTGGCACTGCTGAGCCTCATCATCACCCGTATCTGTTATCACCGAAGCCG
 CAAGCGGGTGTGTAAAAGTGGAGGCGGAAGCTCTGGGAGGAGTTGAGAGTTGCA
 GAAGCAGGAGGTGAAGAACCTGACCCAGCGTCTGGAAAGGGCAGCGGCCAGAGAACAA
 GGGCAAGAACCGCTACAAGAACATTCTCCCTTGACCACAGCCGAGTGATCCTGCAG
 GGACGGGACAGTAACATCCCCGGTCCGACTACATCAATGCCAATCACATCAAGAAC
 AGCTGCTAGGCCCTGATGAGAACGCTAACGACTACATGCCAGCCAGGGCTGTCTGGA
 GCCACGGTCAATGACTCTGGCAGATGGCGTGGCAGGAGAACAGCCGTGTCATCGT
 CATGACCACCCGAGAGGTGGAGAAAGGCCGAACAAATGCGTCCCATACTGGCCCGA
 GGTGGGCATGCGTGCCTATGGCCCTACTCTGTGACCAACTGCCGGGAGGCATGA
 CACAACCGAATACAAACTCCGTACCTTACAGGTCTCCCGCTGGACAATGGAGACCTG
 ATTGCGGAGATCTGGCATTACCACTGAGCTGGCCCGACCACGGGTCCCCAGT
 GAGCCTGGGGTGTCTCAGCTTCCGGACAGATCAACCAGCCAGGAAAGTCTG
 CCTCACGCAGGCCATCATCGTGCAGCGCCGGCATGCCGCACAGGCACC
 ATCATTGTCATCGACATGCTCATGGAGAACATCTCCACCAAGGGCTGGACTGTGACAT
 TGACATCCAGAACGACCATCCAGATGGTGCAGCGCAGCGCTGGCATGGTGCAGAC
 GGAGGCGCAGTACAAGTTCATCTACGTGGCCATGCCAGTTCATGAAACCACTAAG
 AAGAAGCTGTGA

【化19-1】

配列番号 39

>MP16091.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-muCD8STK-LAIR1tm-endo
 ATGAGCCTGCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCACGCCGCC
 AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGCGAC
 CGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACGGTACC
 AGCAGAACGCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAACACCAGCCGGCTGCACA
 GCAGCGTGCCTGCCAGGCCGGTTCAAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC

10

20

30

40

【化19-2】

ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
 TGCCCTACACCTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCAGGAG
 GCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGAGGCGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGGT
 GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
 CTGCACCGTGAGCGCGTGAGCCTGCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
 CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGCGTGATCTGGGCAGCGAGACCACCTACTA
 CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
 GTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCCCATCTACTACTGCGCCAAG
 CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGCCAGGGCACCAGCGTG
 ACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGACCACCAACACCGGCC
 ACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCTGCAGGCCAGAGCGTGCAGGCCAGCGCGGG
 GGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTGGGTGCTGGT
 GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATT
 TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAAGCAGG
 GCCAGAACCAAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGGAGTACGATGTTT
 GGACAAAGAGACGTGGCCGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
 GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAAGG
 GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
 TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTAACATGCGGGACGTGGAGGAAAATCC
 CGGGCCCATGGCGTCCCACTCAGGTCTGGGTTGTGCTACTGTGGCTTACAGAT
 GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCGTCTGCATCTCGGAGA
 TCGCGTACCATCACCTGTCAGCAAGTGAGGACATTATTAAATTAGTGTGGTATCA
 GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAACGCTCTGATCTATGATACAAATCGCTGGCAGAT
 GGGGTCCCATCACGGTTCACTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACATAA
 GTAGCCTGCAACCCGAAGATTGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
 TCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
 GAGGCAGGGCAGCGGAGGCCGGTGGCTGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
 CAGTTGGTGGAGTCTGGGGCGGCTGGTGCAAGCCTGGAGGGCTCTGAGGCTCTCC
 TGTGCAGCCTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCAGTGGATCAGGCAGGCTC
 CAGGGAAAGGTCTGGAGTGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTAGCAGTACTTACTAT
 CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCAGGGACAATGCAAAAGCACCCCTCT
 ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTACGGGAGGTTACTTGTGATTACTGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
 TCGTCTATGGATCCGCCACCAACCAAGCCGTGCTGCCGGACCCCAAGCCCTGTGC
 ACCCTACCGGACCCAGCCAGCCTCAGAGACCCGAGGACTGCCGGCTCGGGCAGC
 GTGAAGGGCACCAGGCCTGGACTTCGCCTGCACATTCTCATGGGTCTCAGTGGTCT

10

20

30

40

【化19-3】

TCCTCTTGTCTCCTCCTGGTCTCTGCCTCCATGCCAGAACATCAGATAAAG
 CAGGGGCCCCCCCAGAACAGCAAGGACGGAGGAGCAGAACGCCACAGCAGAGGCCTGACCT
 GGCTGTTGATGTTCTAGAGAGGGACAGCAGACAAGGCCACAGTCAATGGACTCCTGAG
 AAGGACCGGGAGACCGACACCAGGCCCTGGCTGCAGGGAGTCCCAGGAGGTGAC
 GTATGCTCAGCTGGACCCTGGGCCCTCACACAGAGGACAGCCGGCTGTGTC
 ACAGTCCACAAAGCCCATGGCCGAGTCCATCACGTATGCAGCCGTTGCCAGACACTGA

【化20-1】

10

配列番号 40

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

endo-2A-PTPN6_SH2-dCD148

ATGAGCCTGCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
 AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACAGCAGCCTGAGGCCAGCCTGGCGAC
 CGGGTACCATCAGCTGAGGCCAGGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACGGTACC
 AGCAGAAGCCGACGGCACCGTGAAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACA
 GCGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCAGGACTACAGCCTGACC
 ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
 TGCCCTACACCTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATACCAAGGCCGGAGGCGGAG
 GCTCTGGCGGAGGCAGGCTCTGGCGGAGGCGCTCTGGCGGAGGCGGAGCGAGGT
 GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
 CTGCACCGTGAGCGCGTGAGCCTGCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
 CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGCGTGATCTGGGCAGCGAGACCCACTACTA
 CAACAGGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
 GTTCCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
 CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGCCAGGGCACCGCGTG
 ACCGTGAGCTCAGATCCCACCAACGACGCCAGCGCCGCCGACCAACACCGCGCCC
 ACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCTGCGCCAGAGCGTGCCGGCAGCGGGCGGG
 GGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTGGGTGCTGGT
 GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATT
 TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
 GCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
 GGACAAGAGACGTGGCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
 GATTGGGATGAAAGCGAGGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAAG
 GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
 TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCCGGACGTGGAGGAAAATCC
 CGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAGGTCTGGGTTGGCTACTGTGGCTTACAGAT
 GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGCGGAGA

20

30

40

【化 2 0 - 2】

TCGCGTACCATCACCTGTCGAGCAAGTGAGGACATTATTTAATTAGTGTGGTATCA
 GCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAACGCTCCTGATCTATGATAACAAATCGCTGGCAGAT
 GGGGTCCCATCACGGTTAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAA
 GTAGCCTGCAACCGAAGATTGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
 TCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
 GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCCGGCTCGGGAGGCCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
 CAGTTGGTGGAGTCTGGGGCGGCTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCC
 TGTGCAGCCTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCAGTGGATCAGGCAGGCTC
 CAGGGAAAGGTCTGGAGTGGGCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCAGTACTAT
 CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAGCACCCCTCT
 ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
 GGACGCTTACCGGAGGTTACTTGATTACTGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
 TCGTCTATGGATCCCACCACACCAAGCCGTGCTGCCGGACCCCCAAGCCCTGTGC
 ACCCTACCGGCACCAGCCAGCCTCAGAGACCCGAGGACTGCCGGCCTGGGCAGC
 GTGAAGGGCACCGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATTCTCATCGGGTCTCAGTGGTCT
 CCCTCTCTGTCTCCTCCTGGTCTCTTCTGCCCTCATGCCAGAATCAGATAAAG
 CAGGGGCCCCCAGAAGCAAGGACGAGGAGCAGAACGCCACAGCAGAGGCCGACT
 GGCTGTTGATGTTCTAGAGAGGACAGCAGACAAGGCCACAGTCAATGGACTCCTGAG
 AAGGACCGGGAGACCGACACCAGGCCCTGGCTGCAGGGAGTCCCAGGAGGTGAC
 GTATGCTCAGCTGGACCACTGGCCCTCACACAGAGACAGCCGGCTGTGCCCC
 ACAGTCCACAAAGCCATGCCGAGCTCACGTATGCAGCCGGCTGCCAGACACAGG
 GCAGAAGGAAGAGGTAGCCTGCTGACTTGCAGGGACGTGGAAGAGAACCCAGGGCA
 TGGTATCATGCCACATGTCGGCGGGCAGGCAGAGACGCTGCTGCAGGCCAGGGC
 GAGCCCTGGACGTTCTTGTGCGTGAGAGCCTCAGCCAGCCTGGAGACTTCGTGCTT
 CTGTGCTCAGTGACCAGCCAAGGCTGGCCAGGCTCCCCGCTCAGGGTCACCCACA
 TCAAGGTATGTGCGAGGGTGGACGCTACACAGTGGTGGTTGGAGACCTTCGACAG
 CCTCACGGACCTGGTGGAGCATTCAAGAACGACGGGATTGAGGAGGCCAGGGC
 CTTGTCTACCTGGCGAGCCGTACAGCGTGGCGGTGGCAGCTTGAGGCCCTACTTC
 AAGAACGAGCAAGCTGACTCCAACGTGGGTTGCGCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGC
 TTGTTGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAGAACTGGCTGAGAATAGAGGAAAGAAT
 CGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATATTCCGTGTCACACTTCGGTCCAGACCCAT
 TCAACGGATGACTACATCAATGCCAACTACATGCCCTGGTACCCACTCCAAGAAAGATT
 TATTGCCACACAAGGACCTTACCGAACACTTGAAAGATTTGGCGTATGGTTGG
 AGAAAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTGAAACAGGGAAAGAACCAAT
 GTGAGGAGTATTGGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAAT
 GACATCAGAAATTGTTCTCCGAATGGACCATCAGAGATTTCACAGTGAAGAAATATCC
 AGACAAGTGAGAGTCACCCCTGAGACAGTCCATTACCTCCGGCCAGACCACGG

10

20

30

40

【化 2 0 - 3】

TGTTCCCGACACCACTGACCTGCTCATCAACTTCCGGTACCTCGTCGTGACTACATGA
 AGCAGAGTCCTCCCGAATGCCGATTCTGGTGCATTGCAGTGCTGGGGTCGGAAGGA
 CGGGCACTTCAATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAGATAGAGAATGAGAACACCGTG
 GATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCTTAATGGTGCAGACAGA
 GGACCACTATGTTTCCTCAATCAGTGTGTTGGATATTGTCAGATCCCAGAAAGACTC
 AAAAGTAGATCTTATCTACCAGAACACAACACTGCAATGACAATCTATGAAAACCTTGCGCC
 CGTGACCACATTGGAAAGACCAATGGTTACATGCCAGCGGTAGCTAA

10

【0 1 8 4】

該核酸配列は、配列番号 3 5、3 6、3 7、3 8、3 9 または 4 0 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 3 5、3 6、3 7、3 8、3 9 または 4 0 に示された配列と少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 8 または 9 9 % 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 AND 抗原 B の発現；抗原 A OR 抗原 B の発現；または抗原 A AND NOT 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 紹介は、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(utteerer)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髓芽腫(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的白血病；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をクローニングした。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に培養した。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ストークスペーサーおよび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スペーサーをもつ第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、スペーサ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エクトドメインは、免疫学的シナプスから受容体全体を排除する。発現力セットを図8に、後続のタンパク質を図9に示す。

10

【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こ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(ITAAM)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)。

20

【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か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らかの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CD148AND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

30

40

50

R 1 . 1 (配列番号45および配列番号46)で置き換えて、以下のCAR ANDゲート: CD19 AND GD2; CD19 AND CD5; CD19 AND EGFRVIII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: SupT1、および本発明者らのSupT1.CD19をGM3およびGD2シンターゼで形質導入することにより、SupT1.GD2およびSupT1.CD19.GD2が生成された。SupT1およびSupT1.CD19を、EGFRVIII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、SupT1.EGFRVIIIおよびSupT1.CD19.EGFRVIIIが生成された。CD5はSupT1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: CD19単独、CD5単独およびCD5およびCD19の両方を合わせて発現する293T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19)。3つの新たなCAR ANDゲートを発現するT細胞を、SupT1.CD19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AND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20)。これは、任意標的および同種バインダーに対するANDゲート設計の一般化可能性を実証する。

【0205】

実施例6: CAR ANDゲートの動力学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CAR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CAR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CARが膜において溶解状態であり、活性化CARを阻害することができるということである。一旦両CARがライゲーションされると、両CARスペーサーが十分に異なれば、それらはシナップス内で分離し、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CARにおける「嵩高い」Fcスペーサーを、本発明者らはネズミCD8スペーサーで置き換えた。これがヒトCD8と類似した長さ、かさおよび電荷を有するが、当然それと交差対応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、CD19を認識し、ヒトCD8ストー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CAR;同時に、CD33を認識し、マウスCD8ストークスペーサーおよびCD148エンドドメインを有する第2のCARを有した(図18C)。T細胞に対し、この新しいCAR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、CD19単独、CD33単独またはCD19およびCD33の両方を発現するSupT1細胞でチャレンジした。T細胞は、元のANDゲートのとおりにいずれかの抗原のみを発現するSupT1細胞には応答しなかった。しかしながら、CAR-T細胞は、両抗原を発現するSupT1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18C)。機能的ANDゲートは、両CARが免疫学的シナップス内で共局在する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23AおよびB)。

【0206】

実施例7 - AND NOTゲートの設計および機能

CD45およびCD148などのホスファターゼは、非常に強力であるため、免疫学的シナップスに少量入っただけでも、ITAM活性化を阻害することができる。これは、論理AND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PTPN6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PTPN6が拡散によりシナップスに入ってしま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CARが活性化CARと十分に類似したスペーサーを有するならば、両CARがライゲーションされると、シナップス内で共局在することが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ITAMが活性化するのを止めるのに十分である。かくして、AND NOT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すことにより、例えばPTPN6などの酵素ホスファターゼをもたらす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ストークスペ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ストークスペーサーおよびPTPN6の触媒ドメインを含むエンドドメインを伴う抗CD33 CARと共に発現させる（配列番号38、図13AとB）。好適なカセットを図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。免疫チロシナ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Lck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ストークスペ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ストークスペーサーおよび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と共に発現させる（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ストークスペ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ストークスペーサーおよび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と共に発現させる。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の両方と一緒に発現する標的でチャレンジした。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の両方と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。スペーサーが異なったならば、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ストークスペーサーを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ストークスペーサーおよび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、共局在するスペ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ゲートの動力学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局在を要求する。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ストークスペーサーおよび活性化工ンドドメインを有してCD19を認識し；Fcスペーサーおよび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と共に発現させる。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応答して活性化した。これらのデータは、ITIMに基づくAND NOTゲートが動力学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ペーサーが選択されなければならないことを示す(図23B)。

10

【0213】

実施例10：動力学的分離により生成されたCAR論理ゲートのモデルの概要

現時点での動力学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CD148は、それらのエクト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CAR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スペーサーが十分に類似しているならば、両CARはシナプスに共局在するが、CARスペ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。スペ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ます。

20

【0214】

30

40

50

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 OR 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 AND NOT 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 AND 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】

10

配列番号 41: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aGD2-HCH2CH3pvaa-dCD148
 MSLPVTLALLPLALLHAAARPDIQMTQTTSSLASALGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL
 TYHTSRLHSGVPSRFSGSGGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFFGGTKEITKAGGGGSG
 GGGSGGGGGGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGS
 ETTYYNSALKSRLTIICKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSDP
 TTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIFWVLVVVGGVLACYSLVTVAF
 IIWFVRRVKFSRSADAFAYQQQNQLYNELNLGRREEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QDKDMAEAYSEIGMKERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPRRAEGRGSLTCGDVEENP
 GPMETDTLLLWVLLWVPGSTGQVQLQESCPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWVRQPPGKLE
 WLGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDN SKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLV
 TVSSGGGGGGGGGGSENQMTQSPSSLASAVGDRVTMTCRASSVSSSYLHWYQQKSGKAPKVWI
 YSTSNIASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSILOPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTKVEIKRSDPAEPKS
 PDKTHTCPPCPAPPVAGPSVLFPPPKD TLMIARTPEVTCVVVDVSCHEDPEVFKFNWYVDGVEVHN
 ATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD

20

【化 2 1 - 2】

30

ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHHHYTQKSLSLSPGKDKPKAVFGCIFGALIVTVGGFI FWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPK
 KSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKL
 SVQTHSTDDYINANMPGYHSKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKCQEGRKTCEEY
 WPSKQAOQDYGDITVAMTSEIVLPEWТИRDFTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPD TDLLINFRY
 LVRDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRGTGTIAIDRLIYQIENENTDVYGIYDLMHRPLMVQTEDQY
 VFLNQCVL DIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

40

【化22-1】

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

ATGAGCCTGCCGTGACCGCCCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCACGCCGCCAGACCAGACAT
 CCAGATGACCCAGACCAACCAGCAGCCTGAGGCCAGCCTGGCGACCGGGTGAACCATCAGCTGCAGAG
 CCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACGGTACCAAGCAGAACGCCGACGGCACCGTGAAAGCTGCTG
 ATCTACCAACACCAGCCGGCTGCACAGCGCGTGCCAGCGGTTCAGCGCAGCGGAGCAGCGGACCGA
 CTACAGCCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGACATGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACA
 CCCTGCCCTACACCTCGGAGGGGGCACCAAGCTGGAGATACCAAGGCCGGAGGCGGAGGCTTGGC
 GGAGCGGGCTTGGCGAGGCGCTTGGCGAGGCGGAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGCCC
 AGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGCGTGAGCCTGCCGACT
 ACGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCCACCGAAGGGCTGGAGTGGCTGCCGTGATCTGGGGCAGC
 GAGACCACCTACTACAAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCACTCAAGGACAACAGCAAGAGCCA
 GGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACT
 ACTATGGCCGAGCTACGCTATGGACTACTGGGCCAGGGCACCGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCC
 ACCACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGGCCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCGTGCCG
 CCCAGAGCGTGCAGGCCAGCGGGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTGCCTGTGATA
 TCTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGCTGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTAGTAAACAGTGGCTT
 ATTATTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAAGCAGGGCA
 GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATTTGGACAAGAGACGTG
 GCCGGGACCTGAGATGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC
 CAGAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGG
 GCACGATGCCCTTACCAAGGTCTAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGG
 CCCTGCCCTCTCGCAGAGCCAGGGCAGGGAAAGTCTCTAACATGCCGGACGTGGAGGAAAATCCC
 GGGCCCATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGGGTGCTGCTGCTGGTGCAGGCCAGCAGGCC
 GGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCAGGCCTGGTAAGCCCAGCCAGACCCCTGAGCATCACCTGCACCG
 TGAGCGGCTTCAGCCTGGCCAGCTACAACATCCACTGGGTGCGGCAGCCCCCAGGCAAGGGCTGGAG
 TGGCTGGCGTGATCTGGCTGGCGCAGCACCAACTACAACAGCGCCCTGATGAGCGGCTGACC
 CAGCAAGGACAACAGCAAGAACAGGTGTTCTGAAGATGAGCAGCCTGACAGCGCCGACACCCCG
 TGTACTACTGCAGCCAAGCGGAGCGACACTACAGCTGGTGCCTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTG
 ACCGTGAGCTCTGGCGAGGCGCTCTGGCGAGGCGGCTCTGGCGAGGCGGAGCGAGAACCGAG
 GACCCAGAGCCCCAGCAGCTTGAGCGCCAGCGTGGCGACCGGTACCATGACCTGCAGAGCCAGCA
 GCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCGAGCAGAACAGCGGCAAGGCCCAAAGGTGTGGATC
 TACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGCGTCCCCAGCCGTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCCACCGACTA
 CACCCCTGACCCTCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGCT
 ACCCCATCACCTCGCCAGGCCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTGGATCCCGCCAGGCCAAATCT
 CCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTACGTCTCCTCTT
 CCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCGCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGC
 TGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGATAATGCCAAG
 ACAAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCCTGCACCA
 GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCTGCCCCCATCCGGAT

10

20

30

【化22-2】

GAGCTGACCAAGAACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
 GGAGTGGGAGAGCAATGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
 GCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCA
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATAACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGGCCAGGCAA
 GAAGGACCCAAGCGTTTGCTGTATCTTGGTGCCTGGTTATTGTGACTGTGGAGGCTTC
 TCTTCTGGAGAAAGAAGAGGAAAGATGCAAAGAATAATGAAGTGTCTTCTCAAATTAAACCTAAA
 AAATCTAAGTTAATCAGAGTGGAGAATTGAGGCCACTTCAAGAACGAGCTGACTCCAAC
 TGGGTTCGCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTGTGAAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAGAAC
 TGGCTGAGAATAGAGGAAAGAACGCTATAATAATGTCTGCCCTATGATATTCCCGTGTCAAACCTT
 TCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCAACTACATGCCCTGGCTACCAC
 TCAAAGAAAGATTTTATGCCACACAAGGACCTTACCGAACACTTGAAAGATTITGGCGTATGGTTGGAGA
 AAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTGAAACAGGAAAGAACCAAATGTGAGGAGTAT
 TGGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAAATTGTTCTCC
 GGAATGGACCATCAGAGATTACAGTAAAAATATCAGACAACTGAGAGTCACCCCTGAGACAGT
 TCCATTTCACCTCCTGCCAGACCACGGTGTCCCGACACCACGTGACCTGCTCATCAACTCCGGTAC
 CTCGTTCGTGTACTACATGAAGCAGAGTCCCTCCGAATGCCGATTCTGGTGCAATTGAGTCAGTGTGGGGT
 CGGAAGGACGGGCACTTCATTGCCATTGATCGTCTCATCTACCAAGATAGAGAATGAGAACACCGTGG
 ATGTGTATGGGATTGTGTATGACCTTCGAATGCATAGGCCCTTAATGGTGAGACAGAGGACAGTAT
 GTTTCCCTCAATCAGTGTGTTGGATATTGTCAGATCCCAGAAAGACTCAAAAGTAGATCTTATCTA
 CCAGAACACAACGTCAATGACAATCTATGAAAACCTGCGCCCGTACACATTGGAAAGACCAATG
 GTTACATGCCCTAA

10

20

【化23】

配列番号 43: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD5-HCH2CH3pvaa-dCD148
 MSLPVTLALLPLALI.LHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL
 IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQQNTLPYTFGGGTKEITKAGGGGSG
 GGGSGGGGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPrKGLEWLGVWGS
 ETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDATAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT
 SVTVSSDP
 TTTPAPRPTPTAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLTVAF
 IIWFVRRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLRREEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKDKMAEAYSEIGMKERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLLTCGDVEENP
 GPMETDTLLLWVLLWPGSTGQVTLKESGPGLKPSQTLTCSFSGFSI
 STSGMGVGWIRQPSKG
 LEWLAHIWDDDVYYPNSLKNQILTISKDASRDQVFLKITNLDTADTATYYCVRRA
 TGTGFEDYWGQGT
 TLT
 VSSGGGGGGGGGGGGGSNIVMTQSHKFMS
 TSVGDRVSIACKASQDVGTAVA
 WYQQKPGQSPKLL
 IYWTSTRHTGVPDFRTGSGSGTDFLTITNVQSED
 LADYFCHQYNSYNTFGSGTRLELKRS
 SDPAEPKS
 PDKTHTCP
 PCPAPPVAGPSVLFPPPKPKDTLMIA
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHN
 A
 TKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 LPPSRD
 ELTKNQVS
 LTCLVKGF
 YPSDIA
 VEWE
 NSGQ
 PENNY
 KTP
 PPV
 L
 SDGS
 FFLY
 SKL
 TVD
 KSR
 WQ
 QGN
 VFS
 CSV
 MHE
 ALHN
 YTQ
 KSLS
 LSP
 GKK
 DPK
 AVFG
 CI
 FG
 ALV
 I
 VT
 VGG
 FI
 FWR
 K
 R
 K
 DAK
 N
 NE
 V
 FS
 Q
 I
 K
 P
 K
 KSKL
 IR
 VEN
 FE
 AY
 FKK
 QQ
 Q
 AD
 SNC
 GFA
 EYE
 DL
 KLV
 G
 IS
 QPK
 Y
 A
 ELA
 EN
 R
 G
 KN
 R
 NN
 V
 LP
 DIS
 RV
 KL
 SV
 QTH
 ST
 DDY
 IN
 AN
 YM
 PGY
 H
 SK
 K
 DF
 I
 AT
 Q
 G
 PL
 P
 NT
 L
 K
 DF
 WR
 M
 W
 E
 K
 N
 V
 Y
 A
 I
 M
 L
 T
 K
 C
 V
 E
 Q
 G
 R
 T
 K
 C
 E
 Y
 W
 P
 SK
 Q
 A
 Q
 D
 Y
 G
 D
 I
 T
 V
 A
 M
 T
 S
 E
 I
 V
 L
 P
 E
 W
 T
 I
 R
 D
 F
 T
 V
 K
 N
 I
 Q
 T
 S
 E
 S
 H
 P
 L
 R
 Q
 F
 H
 F
 T
 S
 W
 P
 D
 H
 G
 V
 P
 D
 T
 T
 D
 L
 L
 I
 N
 F
 R
 Y
 L
 V
 R
 D
 Y
 M
 K
 Q
 S
 P
 P
 E
 S
 P
 I
 L
 V
 H
 C
 S
 A
 G
 V
 G
 R
 T
 G
 F
 I
 A
 I
 D
 R
 L
 I
 Y
 Q
 I
 E
 N
 E
 N
 T
 V
 D
 V
 Y
 G
 I
 V
 Y
 D
 L
 R
 M
 H
 R
 P
 I
 M
 V
 Q
 T
 E
 D
 Q
 Y
 V
 F
 I
 L
 N
 Q
 C
 V
 L
 D
 I
 V
 R
 S
 Q
 K
 D
 S
 K
 V
 D
 L
 I
 Y
 Q
 N
 T
 T
 A
 M
 T
 I
 Y
 E
 N
 L
 A
 P
 V
 T
 T
 F
 G
 K
 T
 N
 G
 Y
 I
 A

30

40

【化24-1】

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

【化24-2】

CCAGGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACCTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG
 ATCTTACCAACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTCCCCAGCCGGTCAGCGGCAGCGGCAGCGGACCGA
 CTACAGCCTGACCACAGAACCTGGAGCAGGAGGACATGCCACCTACTCTGCCAGCAGGGCAACA
 CCCTGCCCTACACCTTCGGAGGCCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGACCCGGAGGCTCTGGC
 GGAGGCCGCTCTGGGGAGGCCAGCGGAGGCCAGCGAGGTGAACCTGCAGGCCGTGAGCCTGCCGACT
 AGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGACCGTGACCTGCACCCGTGAGCCTGCCGACTCTGGCC
 ACGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCACCGAAGGCCCTGGACTGGCTGCCGTGATCTGGGCAGC
 GAGACCACCTACTACAAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCA
 GGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGAGACGACACCGCCATCTACTACTCGCAGCAAGCAGACTACT
 ACTATGGCGGAGCTACGCTATGGACTACTGGGCCAGGGCACAGCGTGACCGTGAGCTCAGATCCC
 ACCACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGGCCACCATCGCGTGCAGGCCCTGTCCCTGCG
 CCCAGAGCGTGCCGGCCAGCGGGGGCGCAGTGCACAGGAGGGCTGGACTTCGCGTGTGATA
 TCTTTGGGTGCTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTGCTAGTAACAGTGGCTTT
 ATTATTTCTGGTGAGGAGAGTGAAGATCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCCAGCAGGGCA
 GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTG
 CCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCTGTACAATGAACCTG
 CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGG
 GCACGATGCCCTTACCAAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGG
 CCCTGCCCTCGCAGACCGAGGGCAGGGGAAGTCTTAACATGCCGGACCTGGAGGAAAATCCC
 GGGCCCATGGAGACCCACCCCTGCTGTGGTGTGCTGTGGTGCCCGCAGCACCGGCA
 GGTGACCCCTGAAGGAGAGCGGTCCCGCATCCTGAAGCCAGGCCAGACCCCTGAGCCTGACCTGCAGCT
 TCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACCGAGCGCATGGCGTGGGCTGGATTGGCAGGCCAGCGGCAAGGGC
 CTGGAGTGCTGGCCACATCTGGTGGGACGACGACGGTACTACAACCCCAGCCTGAAGAACAGCT
 GACCATCAGCAAGGACGCCAGCGGGACCAGGTGTTCTGAAGATCACCAACCTGGACACCGCCGACA
 CCGCACCTACTACTGCCTGCCGCCGCCACCGGCACCGGCTCGACTACTGGGCCAGGGCACC
 ACCCTGACCGTGAGCAGCGTGGCGGTGGCAGCGGCCGGCGGAAGCGGAGGTGGCAGCAACAT
 CGTATGACCCAGAGCCACAAGTTATGAGCACCAGCGTGGCGACCGGCTGAGCATGCCCTGCAAGG
 CCAGCCAGGACGTGGCACCGCCGTGGCTGGTACCAACAGGCTGGCCAGAGCCCAAGCTGCTG
 ATCTACTGGACCAGCACCCGGCACCCGGTGGCCGACCGGTTCACCGGAGCGGCCAGCGGCCACCGA
 CCTCACCCCTGACCATCACCAACGTGAGACGGACCTGGCCACTACTCTGCCACCAAGTACAACA
 GCTACAACACCTTCGGCAGCGGACCCGGTGGAGCTGAAGCGTGGATCCCGCGAGCCCAAATCT
 CCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTCCGTGGCGCCGTGAGCTTCCCTCTT
 CCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTATGATGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGC
 TGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
 ACAAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCC
 GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCAAAGCCAAAGGCAGCCCCACAACCACAGGTGACCCCTGCCCGATCCGGGAT
 GAGCTGACCAAGAACCCAGGTGAGCTGACCTGACCTGCCGTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCAGATGCC
 GGAGTGGCACAGCAATGGCAACCGGAGAACAAACTACAAGACCAAGCCCTCCGTGCTGGACTCC
 GCTCCCTGCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCA
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATAACCAAGAAATCTTGAGCTGAGCCAGGCAA
 GAAGGACCCCAAGGCGGTTTTGGCTGTATCTTGCTGCCCTGGTTATTTGAGCTGTGGAGGCTTCA
 TCTTCTGGAGAAAGAGGAAAGATGCAAAGAATAATGAAGTGTCCCTTTCTCAAATTAAACCTAAA
 AAATCTAAGTTAATCAGAGTGGAGAATTGGAGGCTACTTCAAGAAGCAGCAAGCTGACTCCAACTG
 TGGGTTCGCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTGTTGAAATTAGTCACCTAAATATGCAGCAGAAC
 TGGCTGAGAATAGAGGAAAGAACGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATATTCCCGTGTCAAACCT
 TCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATGCCAACTACATGCCCTGGCTACCAACTCCAAGAA
 AGATTATGCCACACAAGGACCTTACCGAACACTTGAAGGATTTGCCGTATGGTTGGGAGA

10

20

30

40

【化24-3】

AAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTAACAGGGAAAGAACCAAATGTGAGGAGTAT
 TGGCCCTCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGAATGACATCAGAAATTGTTCTTCC
 GGAATGGACCATCAGAGATTCACAGTAAAAATATCCAGACAAGTGAGAGTCACCCTCTGAGACAGT
 TCCATTCACCTCTGGCCAGACCACGGTGTCCCAGACACCACGTGACCTGTCATCAACTCCGGTAC
 CTCGTTCTGACTACATGAAGCAGAGTCCTCCGAATGCCGATTCTGGTCATTGCAGTGCTGGGGT
 CGGAAGGACGGGCACATTCAATTGCCATTGATCGTCTCATCTACAGATAGAGAATGAGAACACCGTGG
 ATGTGTTGAGTGTGTTGACCTTCGAATGCATAGGCCTTAATGGTCAGACAGAGGACAGTAT
 GTTTCTCAATCAGTGTGTTGGATTGTCAGATCCCAGAAAGACTCAAAAGTAGATCTTATCTA
 CCAGAACACAACGCAATGACAATCTATGAAAACCTTGCGCCGTGACCACATTGGAAAGACCAATG
 GTTACATCGCCTAA

10

【化25】

配列番号 45: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aEGFRvIII-HCH2CH3pvaa-dCD148
 MSLPVTLALLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL
 IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFFGGTKLEITKAGGGSG
 GGGSGGGGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIWGS
 ETTYYNALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDATIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSDP
 TTPAPRPPPTAPTIAQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIFWVLVVVGVLACYSLLVTVAF
 IIIFWVRRVFKRSRSDADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEDVLDKRGRDPMEGGKPRRNPKQEGLYNEL
 QDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHQALPPRRAEGRGSLLTCGDVEENP
 GPMETDTLLWVLLWVPGSTGQVKLQQSGGLVKGASLKLSCVTSGFTFRKFGMSWRQTSRKLE
 WVASISTGGYNTYSDNVKGRFTISRENAKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCTRGYSTSYAMDYWGQGT
 TVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIELTQSPASLSVATGEKVTIRCMSTDIDDDMNWYQQKPCCEPPKFL
 ISEGNTLRPGVPSRFSSGTGDFVFTIENTLSEDVCDYYCLQSFNVPLTFDGDKLEIKRSDPAPK
 SPDKTHTCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREGVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SC SVMHEALHNRYTQKSLSLSPGKDPKAVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKKRKDAKNNEVSFSQIKP
 KKS KLIRVENFEAYFKQQADSNCGFAEYEIDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRNNVLPYDISRVK
 LSVQTHSTDYINANYMPGYHSKKFIATQGPLNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKCVEQGRTKCEE
 YWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRFHFTSWPDHGVPDTTDLLINFR
 YLVRDYMKQSPPESPILVHCSAGVGRGTFTAIDRLIYQIENENTVDVYGVYDLRMHRPLMVQTEDQ
 YVFLNQCVLIDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

20

30

【化26-1】

配列番号 46: SFG.aCD19-CD8STK-CD28tmZ-2A-aEGFRvIII-HCH2CH3pvaa-dCD148
 ATGAGCCTGCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGCCCTGCTGCACGCCGCCAGACAGACAT
 CCAGATGACCCAGACCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 CCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACCTGGTACCAAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG
 ATCTACACACCAGCCGGCTGCACAGCCGGTGTCCAGCCGGTTCAGCCGGAGCCGGCACCGAACCGA
 CTACAGCCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 CCCTGCCCTACACCTTCGGAGCCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCAGGCTCTGGC
 GGAGGCCGGCTCTGGCGGAGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 AGGCCCTGGGCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAACCTGCACCGTGAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 ACGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCACGGAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCGTGAATCTGGGGCAGC
 GAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGTGAACCATCTACTACTGCGCCAAGCAAG
 GGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCAAGCAAG
 ACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGCCAGGGCACCGTGAACCGTGAACGCTCAGATCCC

40

【化26-2】

ACCAACGACGCCAGCGCCGCACCACCAACACCGGGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCGTCCCTGCG
 CCCAGACCGCTGCCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATA
 TCTTTGGGTGCTGGTGGTGGACTCTGGCTATAGCTGCTAGTAACAGTGGCCTT
 ATTATTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTACAGCAGGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGAGCGGCCA
 GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTG
 GCCGGGACCCCTGAGATGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC
 CAGAAAGATAAGATGGCGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGG
 GCACGATGCCCTTACAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGG
 CCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGAAAGTCTCTAACATGCGGGACGTGGAGGAAATCCC
 GGGCCCATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGTGGGTGCCCOGGCAGCACGCCA
 GGTGAAGCTGCAGCAGAGCGCGGAGGCCTGGTGAAGCCCGGCCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGTGA
 CCAGCGGCTTCACCTTCCCGAAGTTCGGCATGAGCTGGGTGCGGCAGACAGCAGCACAAGCGGCTGGAG
 TGGGTGGCCAGCATCAGCACCGGGCTACAAACACCTACTACAGCAGAACAGTGAAGGGCCGGTTAC
 CATCAGCCGGAGAACGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAGCAGCCTGAAGAGCGAGGACACCG
 CCCTGTACTACTGCACCCGGGGCTACAGCAGCACCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCAGGGCACC
 ACCGTGACAGTGAGCAGCGCGGAGGAGGAGTGGTGGGGTGGATCTGGCGAGGTGGCAGCAGCAGCAG
 CGAGCTGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGAGCGTGGCACCCGGAGAACAGTGAACATCCGGTGCATGA
 CCAGCACCGACATCGACGACATGAACGGTACCGAGCAGAACAGCCGGCAGCCCCAAAGTCTCG
 ATCAGCGAGGGCAACACCCCTGCGGCCCGCGTGCCTCAGCCGGTACAGCAGCAGCGCACCGGACCGA
 CTTCGTGTTCACCATCGAGAACACCCCTGAGCGAGGACGTGGCGACTACTACTGCCTGCAGAGCTTC
 ACGTGCCCTGACCTTCGGCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAGCGTCGGATCCCGCCAGCCCCAA
 TCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTCCGTGGCCGGCCGTAGTCTTCT
 CTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCCGTGGTGG
 ACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAACTCAACTGGTACGTGACGGCTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACACCACGTACCGTGGCTCAGCGTCTCACCGTCTGCA
 CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCTCCCAGCCCCATCG
 AGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACCACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGG
 GATGAGCTGACCAAGAACCGAGGTCAAGCTGACCTGCTGCTCAAGGCTTCTATCCCAGCAGCATCG
 CGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAACCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGGACTCCG
 ACGGCTCCTCTTCCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTC
 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATAACCCAGAAAATCTTGAGTCTGAGCCCAGG
 CAAGAAGGACCCCAAGCGGTTTGGCTGATCTTGGTGCCTGGTTATTGTGACTGTGGAGGCT
 TCATCTCTGGAGAAAGAGGAAAGATGCAAAGAATAATGAAGTGTCTTCTCAAATTAAACCT
 AAAAATCTAAGTTAATCAGAGTGGAGAATTGAGGCCTACTTCAGAACAGCTGACTCCAA
 CTGTGGGTTCGCAGAGGAATACGAAGATCTGAAGCTTCTGGAATTAGTCAACCTAAATATGCAGCAG
 AACTGGCTGAGAATAGAGGAAGAACGCTATAATAATGTTCTGCCCTATGATATTCCGTGTCAA
 CTTTCGGTCCAGACCCATTCAACGGATGACTACATCAATGCCACTACATGCCCTGGCTACCACTCAA
 GAAAGATTTATTGCCACACAAGGACCTTACCGAACACTTGGAAAGATTGGCGTATGGTTGG
 AGAAAAATGTATATGCCATCATTATGTTGACTAAATGTGTTGAAACAGGGAACACCAAATGTGAGGAG
 TATTGGCCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTATGGAGACATAACTGTGGCAATGACATCAGAAATTGTCT
 TCCGGAATGGACCACAGAGATTTCACAGTGAAGAAAAATATCCAGACAAGTGAGAGTCACCCCTGAGAC
 AGTTCCATTTCACCTCTGGCCAGACCACGGTGTCCCGACACCACGTACCTGCTCATCAACTTCGG
 TACCTCGTGTGACTACATGAAGCAGAGTCCTCCGAATGCCGATTCTGGTGCATTGCAAGTGCTGG
 GGTCGGAAGGACGGGACTTCATTGCCATTGCTCATCTACCGAGATAGAGAACACCG
 TGGATGTGTATGGATTGTGATGACCTCGAATGCATAGGCCTTAATGGTGCAGACAGAGGACAG
 TATGTTTCTCAATCAGTGTGTTGGATATTGTCAGATCCCAGAAAGACTCAAAAGTAGATCTTAT
 CTACCAGAACACAACGCAATGACAATCTATGAAAACCTTGCGCCCGTGACCACATTGGAAACACCA
 ATGGTTACATCGCCTAA

【0215】

実施例11：APRILに基づくCARの設計および構築

APRILの天然形態は、分泌II型タンパク質である。CARのためのBCMA結合ドメインとしてのAPRILの使用は、このII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BCMAへの結合性

10

20

30

40

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IgG1スペーサー；(i i) C D 8 ストーク；および(i i i) IgG1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25におけるカートゥーンおよび図26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リストロニックレトロウイルスペクターで発現された(図27A)。

10

【0216】

実施例12：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27B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

【0217】

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IgG2a - 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。この後、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27C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 ストークまたはIgG1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

【0218】

実施例13：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、51Cr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51Crを数えることにより、標的細胞の溶解を決定した(図28Aは、累積データを示す)。

40

【0219】

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28B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28C)。T細胞を、カウントビーズで較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ることを示す。さらに、これらのデータは、C D 8 ストークまたはIgG1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。

【0220】

実施例14：初代細胞におけるA N D ゲートの機能分析

50

PBMC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CD19:CD33 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CD56+細胞（主としてNK細胞）を枯渇させた。6日目、PBMC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、IFN-ガンマ分泌についてELISAにより分析した（図29）。

【0221】

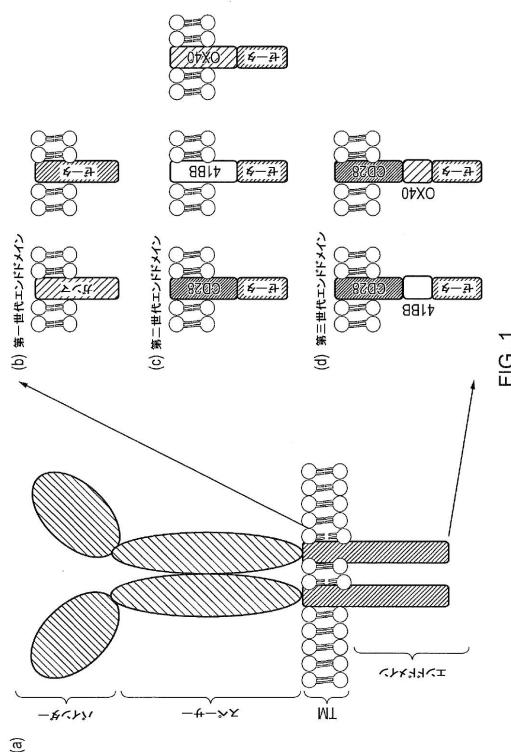
これらのデータは、ANDゲートが初代細胞において機能することを実証する。

【0222】

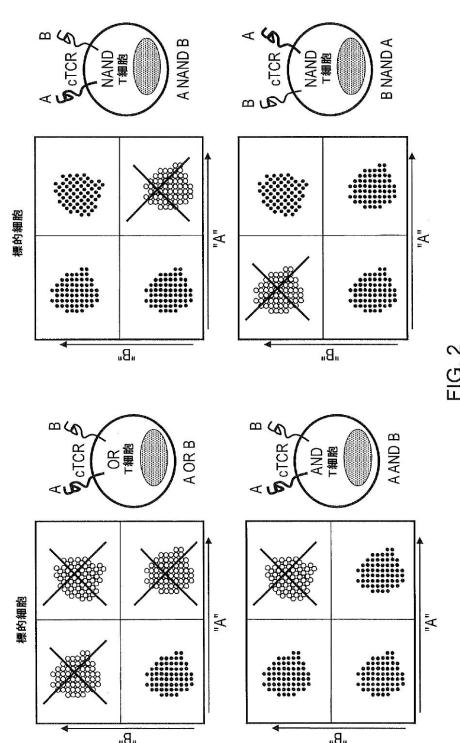
上記の明細書で挙げた出版物は全て、参照により本明細書に援用する。本発明の記載された方法および系の様々な修飾および変形は、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく当業者には明らかである。本発明を特定の好ましい実施形態と共に記載したが、請求されている本発明は、かかる特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解するべきである。事実、分子生物学、細胞生物学または関連分野における専門家にとって明白な、本発明を実施するために記載された方法の様々な修飾も以下の特許請求の範囲の範囲内に含まれるものとする。

10

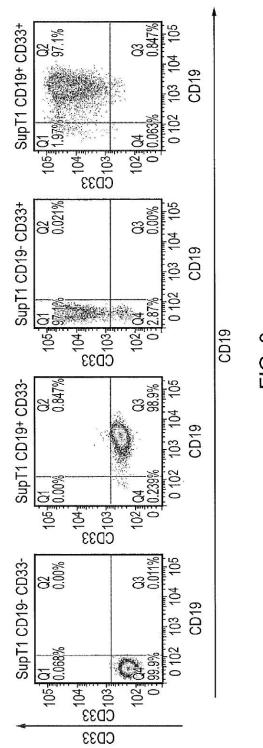
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

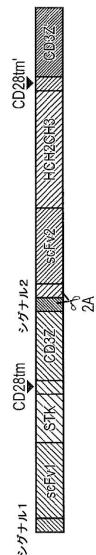


FIG. 4

【図5】

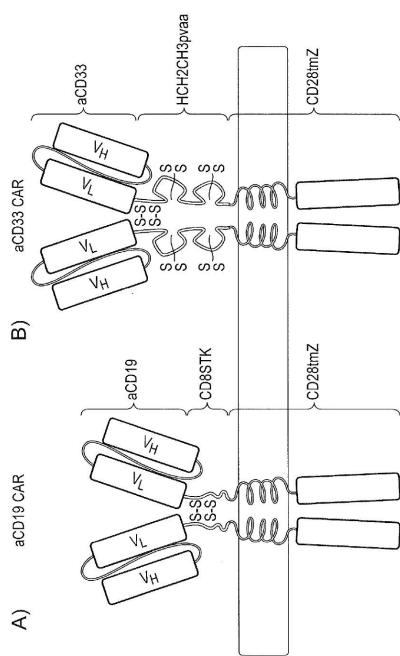


FIG. 5

【図6】

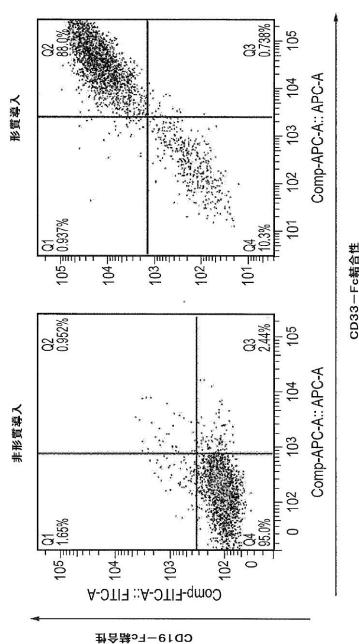


FIG. 6

【図7】

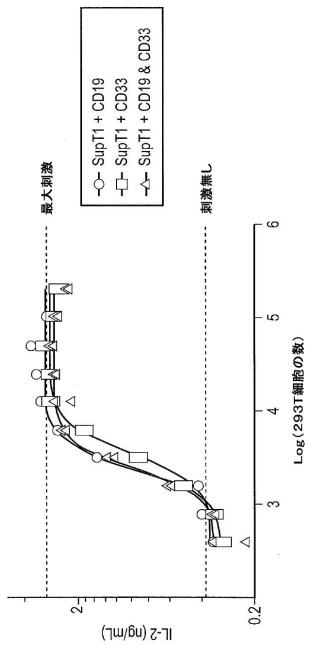


FIG. 7

【図8】

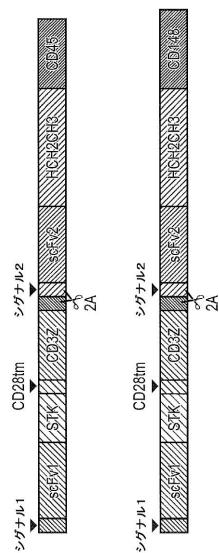


FIG. 8

【図9】

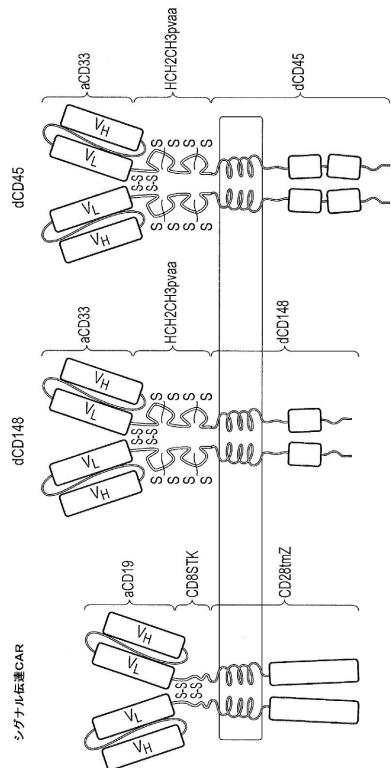


FIG. 9

【図10】

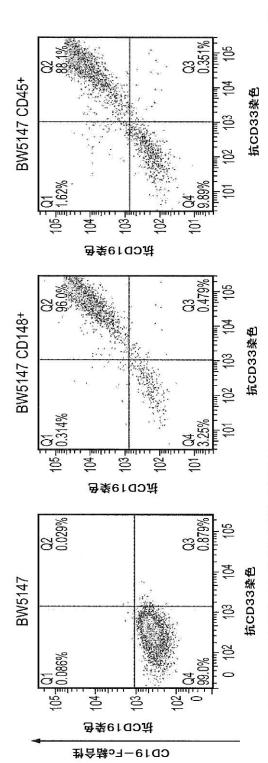
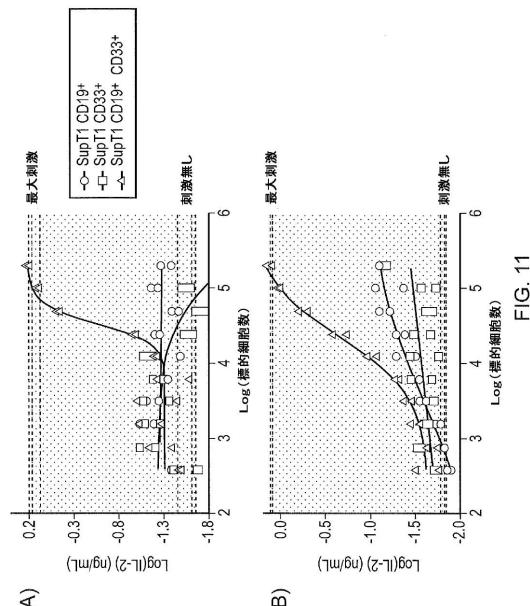


FIG. 10

【図 1 1】



【図 1 2】

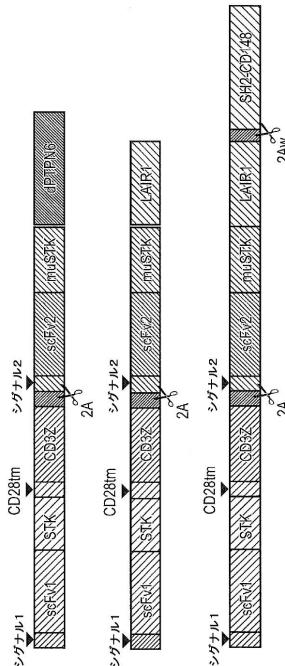


FIG. 11

FIG. 12

【図 1 3】

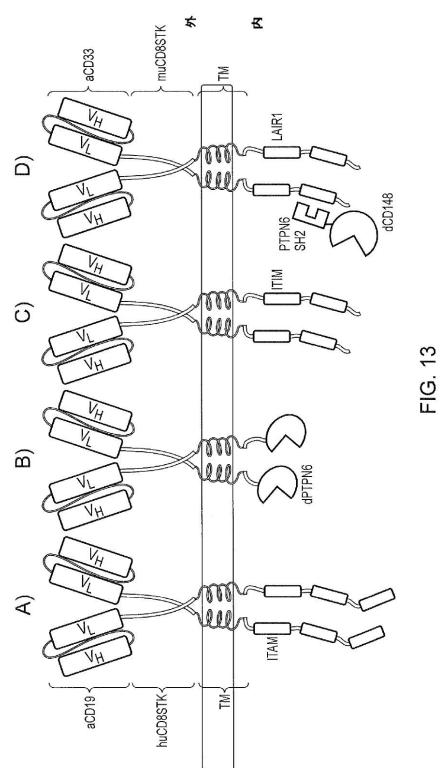


FIG. 13

【図 1 4】

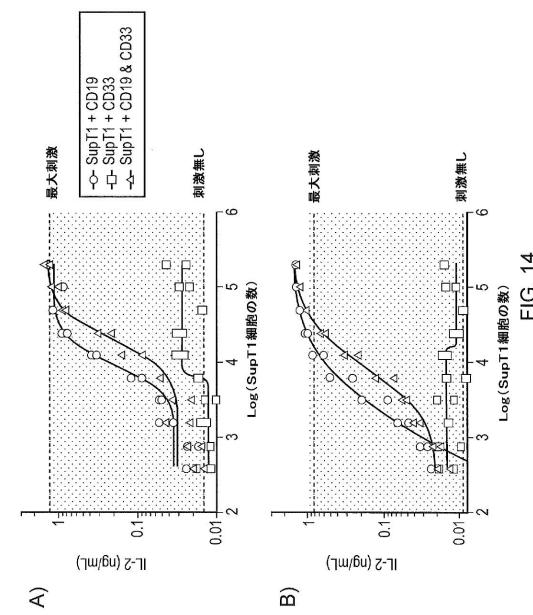


FIG. 14

【 図 15 】

領域	説明
シグナルブチF1	シグナルブチF1
scFv1	scFv1 - 抗CD19
SDP	リンクーおよび鎖切断
STS	CD8アルファストーストック
CD28m1	CD28最真適合メインおよびCD3ゼータエンドメントイン
FMD-2A	口路疫CA-ブチF
シグナル4	シグナルブチF2
scFv2	scFv2 - 抗CD33
MDP	リンクーおよび鎖切断
CH1G1	ヒトIg G1のシグ、CH2およびCH3
CD28m2	CD28最真適合メインおよびCD3ゼータエンドメントイン

【 四 17 】

FIG. 17

【図 1 6】

領域	説明
リンクナル	シグナルペプチド1
scFvE	scFv1-抗CD19
SDP	リンカーおよび網切断
STK	CD8アルファストーク
CD28Bmz	CD28B嵌合ペプチド1およびCD3ゼータエンドメイン
EMD-24	D型免疫スイッチ
シグナル2	シグナルペプチド2
scFv2	scFv2-抗CD33
GW1	
MDP	リンカーおよび網切断
HIC2CH3	ヒトH1G1のビンゴ、CH2およびCH3
3CD148 / CDCA45	CD148およびCD45の嵌合ペプチド1およびエンドメイン

FIG. 16

【図18】

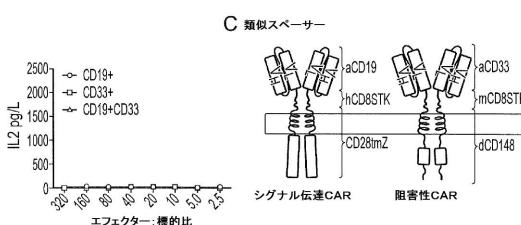
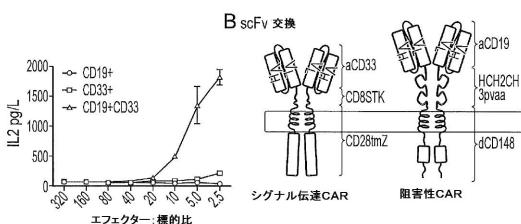
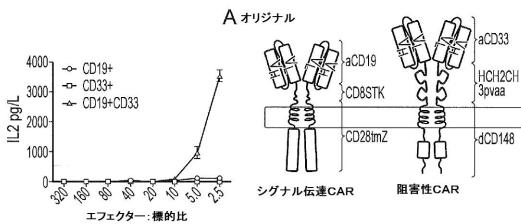


FIG. 18

【図19】

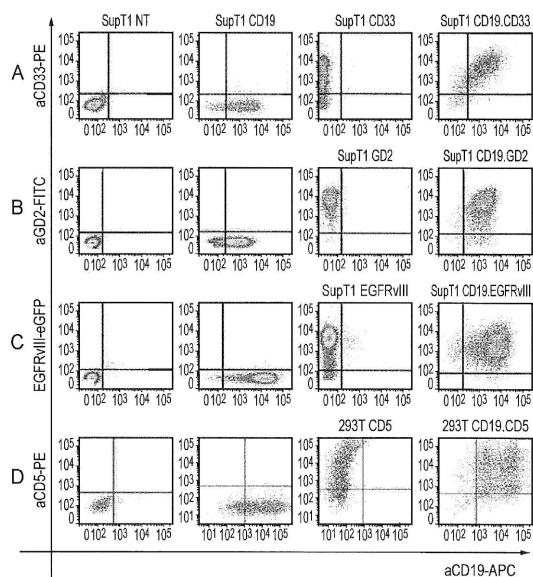


FIG. 19

【図20】

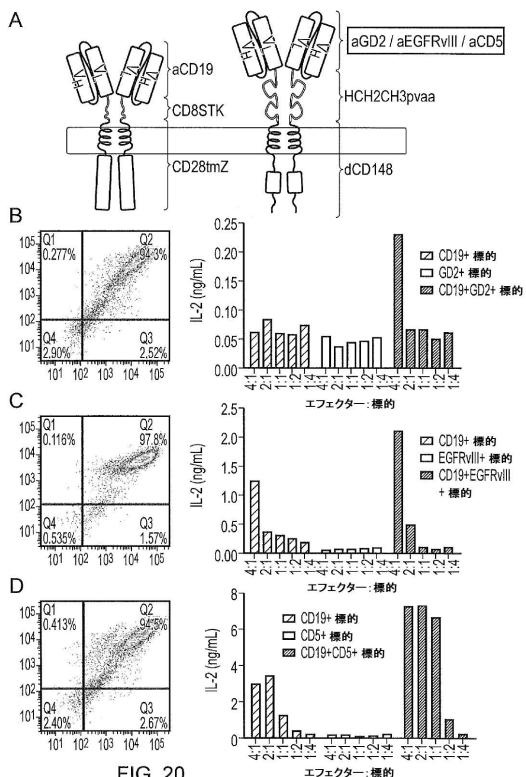


FIG. 20

【図21】

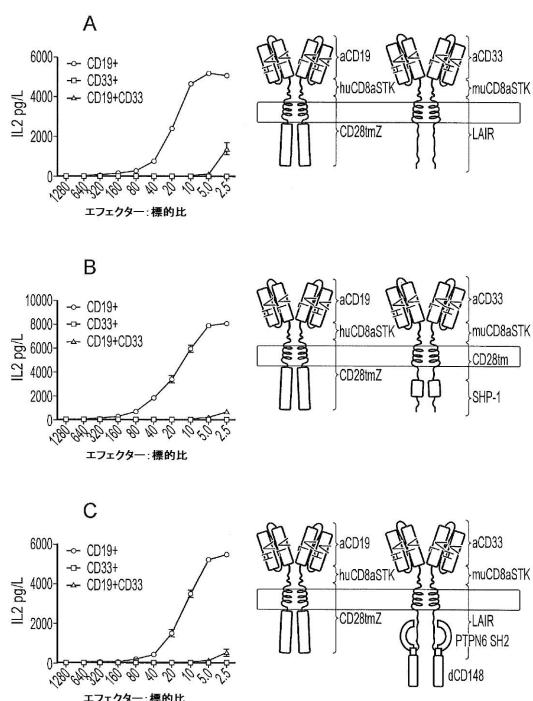


FIG. 21

【図22】

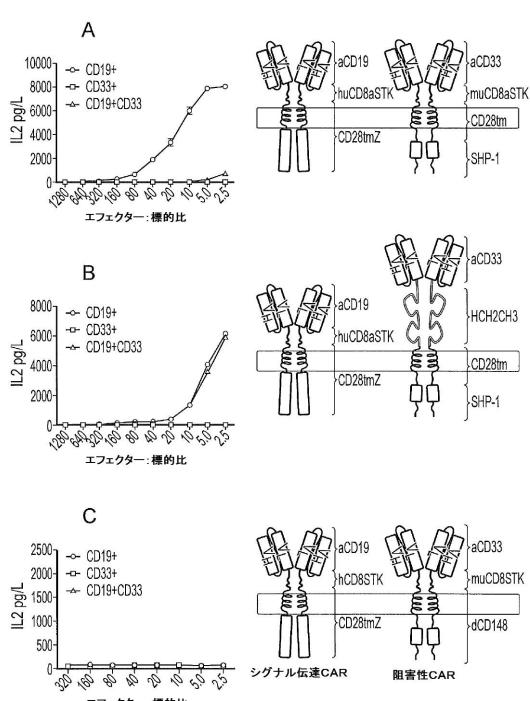


FIG. 22

【図23】

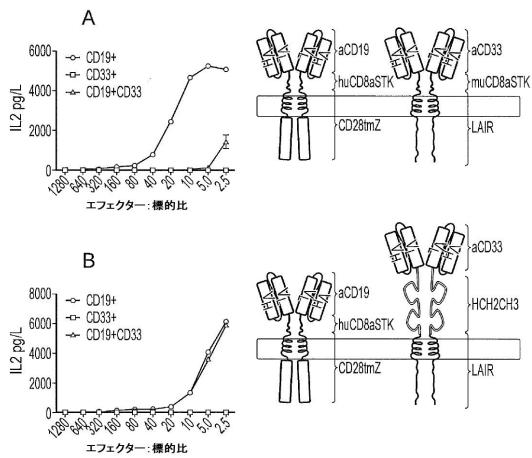


FIG. 23

【図24A】

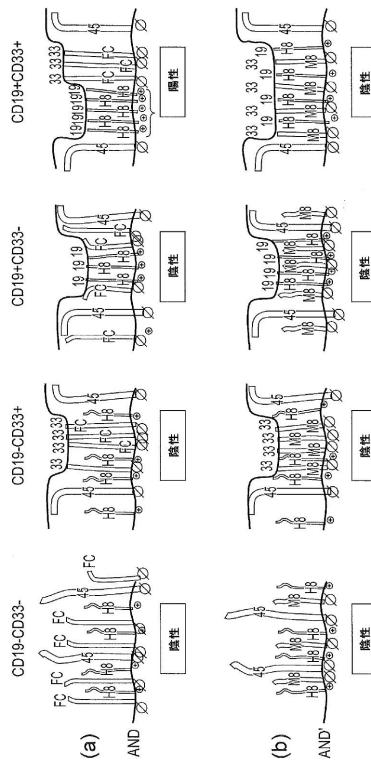


FIG. 24

【図24B】

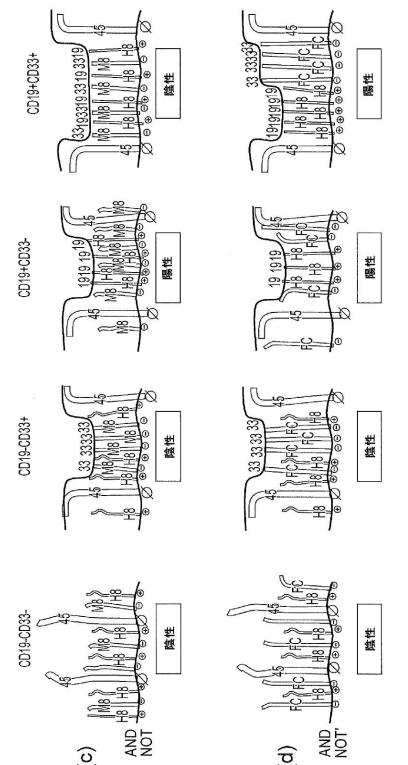


FIG. 24(続き)

【図25】

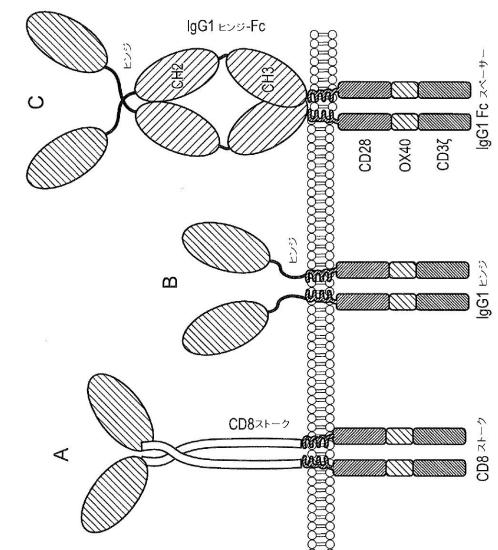


FIG. 25

【図26】

A

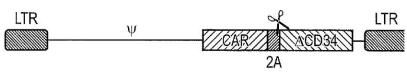
B

C

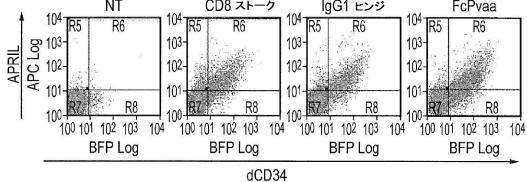
 SIGNAL PEPTIDE  BAPRIN  TMR TM and Endomembrane	<p>効率のよいシグナルペプチド</p> <p>先端切除APRIL</p> <p>ヒトIgG1のヒンジ-CH2CH3、ヒトCD8αスヌークおよびヒトIgG1ヒンジのいずれか</p> <p>CD28TMペプチド、CD28エンドメイニアならびにOX40およびCD3-ゼータエンドメイニアを含む接合エンドメイニア</p>
--	---

【図27】

A



B



C

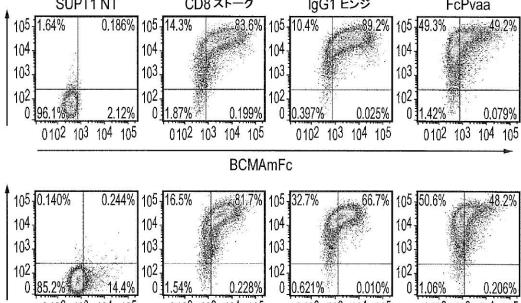
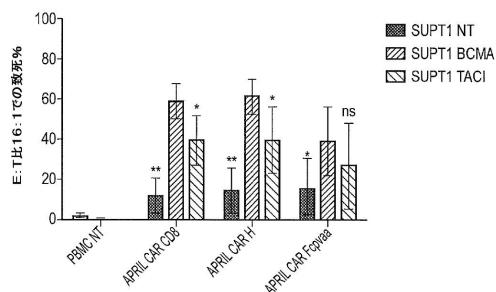


FIG. 27

【図28】

A クロム放出によるAPRIL CAR媒介標的細胞致死



D+1でのIFNG放出

条件	IFN- γ (ng/ml)
PBMC NT	~0.5
APRIL CAR H	~4.2 (** vs NT)
APRIL CAR Fop2a	~4.0 (** vs NT)

D+7でのIL10放出

条件	IL-10 (ng/ml)
PBMC NT	~0.5
APRIL CAR H	~4.2 (** vs NT)
APRIL CAR Fop2a	~4.0 (** vs NT)

C D+7でのAPRIL CAR発現T細胞

条件	エフェクターの%
PBMC NT	~10
APRIL CAR H	~85 (** vs NT)
APRIL CAR Fop2a	~85 (** vs NT)
APRIL CAR H	~10 ns
APRIL CAR Fop2a	~10 ns

〔 四 29 〕

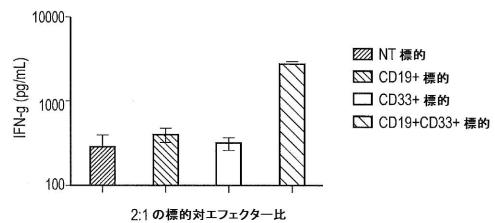
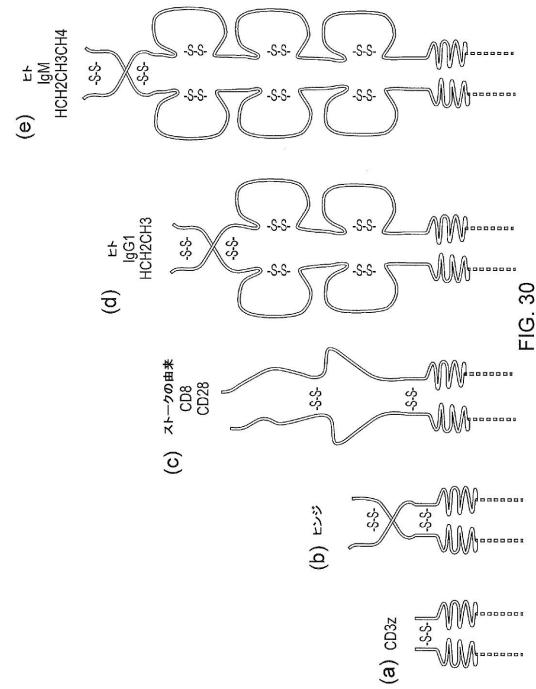


FIG. 29

【図30】



【図31】

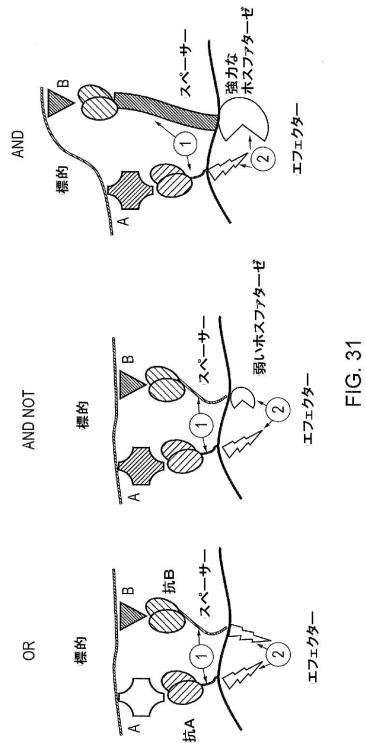


FIG. 31

【配列表】

[0006538684000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 07K 14/725 (2006.01) C 07K 14/725

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ブーレ, 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, ベトナム 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, ベトナム 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, ベトナム 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, 2013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 IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, 2012年 4月 17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 12N 15 / 00 - 15 / 90
JST Plus / JMED Plus / JST 7580 (JDream III)
Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI (STN)