



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112019019941-1 B1

(22) Data do Depósito: 26/03/2018

(45) Data de Concessão: 05/12/2023

(54) Título: POLINUCLEOTÍDEO COMPREENDENDO UMA SEQUÊNCIA DE BASE QUE CODIFICA O RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO, VETOR E MÉTODO

(51) Int.Cl.: C07K 19/00; A61K 35/17; A61P 35/00; C07K 16/18; C12N 5/10; (...).

(30) Prioridade Unionista: 27/03/2017 JP 2017-061461.

(73) Titular(es): NOILE-IMMUNE BIOTECH, INC..

(72) Inventor(es): KOJI TAMADA; YUKIMI SAKODA; HIDENOBU ISHIZAKI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2018012194 de 26/03/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/181207 de 04/10/2018

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/09/2019

(57) Resumo: Um receptor de antígeno quimérico é fornecido, que inclui uma região de ligação do antígeno alvo; uma região transmembrana; e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T, em que o antígeno alvo é o gangliosídeo GM2.

**POLINUCLEOTÍDEO COMPREENDENDO UMA SEQUÊNCIA DE BASE QUE
CODIFICA O RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO, VETOR E MÉTODO**

CAMPO TÉCNICO

[1] A presente invenção se refere a um receptor de antígeno quimérico, uma célula que expressa um receptor de antígeno quimérico, um vetor que inclui uma sequência de base que codifica um receptor de antígeno quimérico e similares.

[2] A prioridade é reivindicada do pedido de patente japonês nº 2017-061461, depositado em 27 de março 2017, o conteúdo do qual é aqui incorporado por referência.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

[3] Um receptor de antígeno quimérico (aqui, a seguir, também referido como "CAR") é uma proteína quimérica artificial na qual um anticorpo de fita única que reconhece um antígeno de superfície celular de uma célula cancerígena está fundido com uma região de transdução de sinal que induz a ativação da célula T. Por exemplo, pela introdução de um gene que codifica um CAR dentro de células T sanguíneas periféricas normais que não apresentam reatividade tumoral (linfócitos T sanguíneos periféricos), é possível produzir uma grande quantidade de células T que expressam CAR (aqui, a seguir, também referidas como "células T-CAR") capazes de expressar um CAR. Tais células T-CAR apresentam reatividade tumoral e, logo, podem permitir que as células cancerígenas sejam prejudicadas sem depender da interação com o complexo de histocompatibilidade principal (MHC).

[4] No que diz respeito a imunoterapia do câncer pela administração de células T-CAR, mais especificamente, uma terapia na qual as células T são coletadas a partir de um

paciente, um gene que codifica um CAR é introduzido dentro da referida células T e o gene é amplificado para ser retransferido dentro do paciente, os ensaios clínicos estão atualmente em progresso ao redor do mundo e resultados que mostram a eficácia em neoplasias hematopoiéticas, como leucemia e linfoma, e similares foram obtidas.

[5] No entanto, na imunoterapia do câncer usando células T-CAR, a situação atual é que resultados eficazes são obtidos apenas para neoplasias hematopoiéticas, e resultados eficazes não são obtidos para tumores sólidos. A fim de desenvolver um CAR eficaz para tumores sólidos, a seleção de antígenos alvo é importante e buscas por antígenos alvo aplicáveis aos tumores sólidos são requeridas.

[6] Enquanto isso, como os fatores em um caso em que a terapia com Célula T-CAR não é eficaz contra tumores sólidos, uma baixa taxa de sobrevivência de células T-CAR *in vivo*, um baixo nível de acúmulo do mesmo em tumores locais, a inibição da atividade do mesmo por fatores imunossupressores secretados por células tumorais e similares, e similares são concebíveis. Como um método de resolução de tal problema, um método foi reportado no qual um ácido nucleico que codifica um fator de promoção da função imune de células T é introduzido nas células T junto com um ácido nucleico que codifica um CAR (Literatura patentária 1).

LISTA DE CITAÇÕES

LITERATURA PATENTÁRIA

[7] [Literatura patentária 1] - Publicação Internacional do PCT n° WO 2016/056228

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

PROBLEMA TÉCNICO

[8] Uma vez que os efeitos das células T-CAR que direcionam um antígeno expresso em um tumor humano sólido não foi confirmado na Literatura patentária 1, as células T-CAR que mostram eficácia contra tal antígeno são requeridas.

[9] Um objetivo da presente invenção é fornecer um novo CAR que direciona um antígeno de tumor sólido como um antígeno alvo e uma célula T-CAR que é eficaz contra os tumores sólidos.

SOLUÇÃO PARA O PROBLEMA

[10] A presente invenção inclui os seguintes aspectos.

(1) Um receptor de antígeno quimérico que inclui uma região de ligação do antígeno alvo; uma região transmembrana; e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T, na qual o antígeno alvo é o gangliosídeo GM2.

(2) O receptor de antígeno quimérico de acordo com (1), no qual a região de ligação do antígeno alvo inclui uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve de um anticorpo anti-gangliosídeo GM2.

(3) O receptor de antígeno quimérico de acordo com (2), no qual o anticorpo anti-gangliosídeo GM2 é um anticorpo selecionado do grupo que consiste nos seguintes (a) a (c):

(a) um anticorpo que inclui uma região variável de cadeia pesada apresentando CDR1, CDR2 e CDR3 de uma região variável de cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2, e uma região variável de cadeia leve apresentando CDR1, CDR2 e CDR3 de uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4, e que apresenta uma capacidade de ligação ao gangliosídeo

GM2;

(b) um anticorpo que inclui uma região variável de cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4, e que apresenta uma capacidade de ligação ao gangliosídeo GM2; e

(c) um anticorpo que inclui uma região variável de cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4, e que apresenta uma capacidade de ligação ao gangliosídeo GM2.

(4) O receptor de antígeno quimérico de acordo com (3), no qual a região variável de cadeia pesada inclui a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2, e a região variável de cadeia leve inclui a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4.

(5) O receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer um de (2) a (4), no qual o anticorpo anti-gangliosídeo GM2 é um anticorpo de fita única (scFv).

(6) O receptor de antígeno quimérico de acordo com (5), no qual o scFv é um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste nos seguintes (a) a (c):

(a) um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 12, 14 e 16;

(b) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 12, 14, e 16, e que apresenta uma capacidade de ligação ao gangliosídeo GM2; e

(c) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 12, 14, e 16, e que apresenta uma capacidade de ligação ao gangliosídeo GM2.

(7) O receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer um de (1) a (6), no qual a região transmembrana é uma região transmembrana de CD8.

(8) O receptor de antígeno quimérico de acordo com (7), no qual a região transmembrana de CD8 inclui um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste nos seguintes (a) a (c):

(a) um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 20;

(b) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 20, e que apresenta uma capacidade transmembrana; e

(c) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 20,

e que apresenta uma capacidade transmembrana.

(9) O receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer um de (1) a (8), no qual a região de transdução de sinal de ativação de célula T é uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD3ζ.

(10) O receptor de antígeno quimérico de acordo com (9), no qual a região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD3ζ inclui um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste nos seguintes (a) a (c):

(a) um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 28;

(b) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 28, e que apresenta uma capacidade de transdução de sinal de ativação de célula T; e

(c) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 28, e que apresenta uma capacidade de transdução de sinal de ativação de célula T.

(11) O receptor de antígeno quimérico de acordo com (9) ou (10), no qual a região de transdução de sinal de ativação de célula T ainda inclui pelo menos um de uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD28 e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de 4-1BB.

(12) O receptor de antígeno quimérico de acordo com (11), no qual a região de transdução de sinal de ativação de

célula T de CD28 inclui um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste nos seguintes (a) a (c):

(a) um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 24;

(b) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 24, e que apresenta uma capacidade de transdução de sinal de ativação de célula T; e

(c) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 24, e que apresenta uma capacidade de transdução de sinal de ativação de célula T.

(13) O receptor de antígeno quimérico de acordo com (11), no qual a região de transdução de sinal de ativação de célula T de 4-1BB inclui um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste nos seguintes (a) a (c):

(a) um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 26;

(b) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 26, e que apresenta uma capacidade de transdução de sinal de ativação de célula T; e

(c) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 26,

e que apresenta uma capacidade de transdução de sinal de ativação de célula T.

(14) O receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer um de (11) a (13), no qual a região de transdução de sinal de ativação de célula T inclui a região de transdução de sinal de ativação de células T de CD28, 4-1BB, e CD3ζ, e está localizada na ordem CD28, 4-1BB e CD3ζ a partir de um lado N terminal.

(15) Uma célula a qual expressa o receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer um de (1) a (14).

(16) A célula de acordo com (15), a qual ainda expressa pelo menos um de IL-7 ou CCL19.

(17) A célula de acordo com (16), a qual expressa ambos IL-7 e CCL19.

(18) A célula de acordo com (16) ou (17), na qual o IL-7 inclui um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste nos seguintes (a) a (c):

(a) um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 59;

(b) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 59 e que apresenta uma função de promoção da função imune da célula T; e

(c) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 59, e que apresenta uma função de promoção da função imune da célula T.

(19) A célula de acordo com qualquer uma de (16) a

(18), na qual o CCL19 inclui um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste nos seguintes (a) a (c):

(a) um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 61;

(b) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 61, e que apresenta uma função de promoção da função imune da célula T; e

(c) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 61, e que apresenta uma função de promoção da função imune da célula T.

(20) A célula de acordo com qualquer um de (15) a (19), na qual a célula é uma célula imune.

(21) A célula de acordo com (20), na qual a célula imune é uma célula T.

(22) Um polinucleotídeo que inclui uma sequência de base que codifica o receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer um de (1) a (14).

(23) O polinucleotídeo de acordo com (22), ainda incluindo pelo menos um de uma sequência de base que codifica IL-7 ou uma sequência de base que codifica CCL19.

(24) O polinucleotídeo de acordo com (23), que inclui ambas a sequência de base que codifica IL-7 e uma sequência de base que codifica CCL19.

(25) Um vetor que inclui uma sequência de base que codifica o receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer um de (1) a (14).

(26) O vetor de acordo com (25), ainda incluindo pelo menos um de uma sequência de base que codifica IL-7 ou uma sequência de base que codifica CCL19.

(27) O vetor de acordo com (26), que inclui ambas a sequência de base que codifica IL-7 e uma sequência de base que codifica CCL19.

(28) Um método para a produção uma célula que expressa um receptor de antígeno quimérico, que inclui a introdução de um polinucleotídeo ou um vetor que inclui uma sequência de base que codifica o receptor de antígeno quimérico de acordo com qualquer um de (1) a (14) na célula.

(29) O método para a produção de uma célula que expressa um receptor de antígeno quimérico de acordo com (28), ainda incluindo a introdução de um polinucleotídeo ou um vetor que inclui pelo menos um de uma sequência de base que codifica IL-7 ou uma sequência de base que codifica CCL19 na célula.

(30) O método para a produção de uma célula que expressa um receptor de antígeno quimérico de acordo com (29), ainda incluindo a introdução de um polinucleotídeo ou um vetor que inclui ambas uma sequência de base que codifica IL-7 e uma sequência de base que codifica CCL19 na célula.

(31) Uma composição farmacêutica compreendendo a célula de acordo com qualquer um de (15) a (20).

(32) A composição farmacêutica de acordo com (31), a qual é uma composição farmacêutica para o tratamento ou prevenção de um tumor.

EFEITOS VANTAJOSOS DA INVENÇÃO

[11] De acordo com a presente invenção, um novo CAR que direciona um antígeno de tumor sólido como um antígeno

alvo e uma célula T-CAR que é eficaz contra tumores sólidos são fornecidos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[12] A Fig. 1A é uma vista esquemática que mostra um constructo CAR anti-GM2.

[13] A Fig. 1B é uma vista esquemática que mostra um Vetor CAR anti-GM2 que expressa IL-7 / CCL19 e uma célula T anti-GM2 que expressa CAR-IL-7 / CCL19 dentro da qual o vetor foi introduzido.

[14] A Fig. 2 mostra os resultados da checagem de um nível de expressão of CAR nas células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 por citometria de fluxo. O gráfico à esquerda mostra os resultados de uma célula T não transgênica e o gráfico à direita mostra os resultados da célula T anti-GM2 que expressa CAR-IL-7 / CCL19.

[15] A Fig. 3 mostra os resultados da medição de concentrações de IL-7 e CCL19 em um sobrenadante de cultura de uma célula T anti-GM2 que expressa CAR por ELISA. Nos gráficos, o termo "GM2 CAR" representa uma célula T anti-GM2 que expressa CAR-IL-7 / CCL19 e o termo "não infecção" representa uma célula T não transgênica (o mesmo se aplica nas figuras subsequentes).

[16] A Fig. 4 mostra agendas de ensaio de um ensaio de citotoxicidade tumoral e um ensaio de co-cultura usando células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19.

[17] A Fig. 5A mostra resultados de um ensaio de liberação de cromo usando quatro tipos de células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19. A Fig. 5A mostra os resultados do ensaio no qual linhagens celulares de mesotelioma maligno (Y-meso8A e MSTO211H) são usadas coma

célula s alvo. Nos gráficos, cada um de "VL15VH", "VL25VH", "VH15VL" e "VH25VL" representam resultados com as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 que inclui as sequências correspondentes de sequências scFv de CAR anti-GM2 (o mesmo se aplica nos gráficos subsequentes).

[18] A Fig. 5B mostra os resultados de um ensaio de liberação de cromo usando quatro tipos de células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19. A Fig. 5B mostra os resultados do ensaio no qual linhagens celulares de mieloma (KMS-11 e KMS-28PE) são usadas como célula s alvo.

[19] A Fig. 6A mostra os resultados de comparação dos ensaios de liberação de cromo de uma célula T anti-GM2 que expressa CAR-IL-7 / CCL19 e uma célula T-CAR controle. A Fig. 6A mostra os resultados do ensaio no qual uma linhagem celular de mesotelioma maligno (Y-meso8A) é usada como uma célula alvo. Nos gráficos, "T-CAR FITC" representa células T-CAR anti-FITC usadas como um controle negativo (o mesmo se aplica nos gráficos subsequentes).

[20] A Fig. 6B mostra resultados de comparação dos ensaios de liberação de cromo de uma célula T anti-GM2 que expressa CAR-IL-7 / CCL19 e uma célula T-CAR controle. A Fig. 6B mostra os resultados do ensaio no qual uma linhagem celular de mieloma (KMS11) é usada como uma célula alvo.

[21] A Fig. 6C mostra os resultados de comparação dos ensaios de liberação de cromo de uma célula T anti-GM2 que expressa CAR-IL-7 / CCL19 e uma célula T-CAR controle. A Fig. 6C mostra os resultados do ensaio no qual uma linhagem celular de câncer de cólon (SW480) é usada como uma célula alvo.

[22] A Fig. 7 mostra os resultados de um ensaio de

co-cultura de uma linhagem celular de mesotelioma maligno (Y-meso8A) GM2-positiva com células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 ou células controle. Na figura, o termo "apenas tumor" indica que apenas células tumorais são cultivadas (o mesmo se aplica nas figuras subsequentes).

[23] A Fig. 8 mostra os resultados de um ensaio de co-cultura de uma linhagem celular de mesotelioma maligno (MSTO221H) GM2-positiva com células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 ou células controle.

[24] A Fig. 9 mostra resultados de um ensaio de co-cultura de uma linhagem celular de câncer de cólon (SW480) GM2-negativa com células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 ou células controle.

[25] A Fig. 10 mostra os resultados da medição de IFN- γ em um sobrenadante de cultura de um ensaio de co-cultura de cada linhagem de célula tumoral com células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 ou células controle por ELISA.

[26] A Fig. 11A mostra a progressão do crescimento tumoral quando as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 ou células T não transgênicas são administradas a um camundongo imunodeficiente ao qual a Luciferase que expressa MSTO211H foi intratoracicamente administrada.

[27] A Fig. 11B mostra a progressão do crescimento tumoral quando as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 ou células T não transgênicas são administradas ao camundongo imunodeficiente ao qual a Luciferase que expressa MSTO211H foi intraperitonealmente administrada.

[28] A Fig. 12 mostra os resultados da análise de progressão do crescimento tumoral quando as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 ou células T não

transgênicas são administradas ao camundongo imunodeficiente ao qual a Luciferase que expressa MSTO211H foi intratoracicamente administrada.

[29] A Fig. 13 mostra os resultados da análise da progressão do crescimento tumoral quando as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19, células T anti-GM2 que expressam CAR, ou células T não transgênicas são administradas ao camundongo imunodeficiente ao qual a Luciferase que expressa MSTO211H foi intratoracicamente administrada. Na figura, "x" indica que um camundongo morreu.

[30] A Fig. 14 mostra os resultados da análise dos efeitos na progressão do crescimento tumoral quando as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19, células T anti-GM2 que expressam CAR, ou células T não transgênicas são administradas ao camundongo imunodeficiente ao qual a Luciferase que expressa MSTO211H foi intratoracicamente administrada.

[31] A Fig. 15 mostra os resultados da análise dos efeitos nas taxas de sobrevivência de camundongos quando as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19, células T anti-GM2 que expressam CAR, ou células T não transgênicas são administradas a um camundongo imunodeficiente ao qual a Luciferase que expressa MSTO211H foi intratoracicamente administrada.

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES

[32] Polipeptídeos, polinucleotídeos, vetores e células fornecidas pela presente invenção podem estar em um estado isolado. Em outras palavras, polipeptídeos, polinucleotídeos, vetores e células descritos no presente relatório descritivo podem ser polipeptídeos isolados,

polinucleotídeos isolados, vetores isolados e células isoladas.

[Receptor de antígeno quimérico (CAR anti-GM2)]

[33] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um receptor de antígeno quimérico que inclui uma região de ligação do antígeno alvo; uma região transmembrana; e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T, no qual o antígeno alvo é o gangliosídeo GM2.

[34] No presente relatório descritivo, o termo "receptor de antígeno quimérico (CAR)" significa uma proteína quimérica que inclui uma região de ligação do antígeno alvo, uma região transmembrana, e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T. A proteína quimérica significa uma proteína que inclui uma sequência derivada de dois ou mais tipos de proteínas heterólogas. Um CAR não está limitado a um CAR que inclui apenas as três regiões acima e inclui um CAR que inclui outras regiões.

<Região de ligação do antígeno alvo>

[35] O CAR da presente modalidade inclui uma região de ligação do antígeno alvo no qual o antígeno alvo é o gangliosídeo GM2 (aqui, a seguir, também referido como "GM2").

[36] O termo "região de ligação do antígeno alvo" significa uma região extracelular que se liga a um antígeno alvo de forma extracelular quando um CAR é expresso em uma célula T. Um CAR expresso em uma célula T-CAR transfere para uma membrana celular para estar em um estado no qual uma região de ligação do antígeno alvo localizada extracelularmente e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T localizada intracelularmente estão conectadas através de uma região transmembrana que penetra

a membrana celular. Quando a célula T-CAR fica em contato com uma célula apresentando o antígeno alvo como um antígeno de membrana, a região de ligação do antígeno alvo se liga ao antígeno alvo, assim o sinal de ativação da célula T é transmitido a partir de uma região de transdução de sinal de ativação de célula T para o interior da célula T para ativar a célula T.

[37] No CAR da presente modalidade, o antígeno alvo ao qual a região de ligação do antígeno alvo se liga é GM2.

[38] GM2 é um tipo de gangliosídeo que é um glicolipídeo apresentando um ácido siálico. Um gangliosídeo é uma molécula que constitui uma membrana celular de um animal e é composto de uma cadeia de açúcar que é uma cadeia lateral hidrofílica, e esfingosina e um ácido graxo os quais são cadeias laterais hidrofóbicas. Os gangliosídeos são classificados de acordo com o tipo de ligação e o número de ligações com o ácido siálico e a presença ou ausência de ligação da N-acetilgalactosamina (GalNAc) e galactose (Gal) as quais se ligam a uma extremidade não redutora. O GM2 é um dos gangliosídeos que apresenta uma estrutura de cadeia de açúcar de GalNAc β 1-4 (SA α 2-3) Gal β 1-4Glc β 1-1 ceramida.

[39] O tipo e o nível de expressão dos gangliosídeos varia dependendo do tipo da célula, tipo do órgão, tipo de animal e similares. É sabido que a expressão de gangliosídeos muda quantitativamente e qualitativamente no processo de mudança cancerígena de células (Cancer Res 45: 2405 - 14 (1985)). Foi reportado que dificilmente qualquer GM2 pode ser reconhecido como sendo expresso em células normais, porém pode ser expresso em tumores tais como em câncer de pulmão, neuroblastoma, glioma, melanoma, mesotelioma maligno e

mieloma (Cancer Res 45: 2405 - 14 (1985); Cancer Res 50: 7444 - 9 (1990); Cancer Sci vol. 102 no. 12: 2157 - 2163; Cancer Sci vol. 106 no. 1: 102 - 107 (2015)).

[40] A região de ligação do antígeno alvo não está particularmente limitada desde que ela possa se ligar especificamente ao GM2, porém preferencialmente inclui uma região de ligação de antígeno de um anticorpo monoclonal (aqui, a seguir, também referido como um "anticorpo anti-GM2") capaz de se ligar especificamente ao GM2. A "região de ligação de antígeno" de um anticorpo se refere a uma região envolvida na ligação a um antígeno em um anticorpo e se refere especificamente a uma região que inclui uma região determinante de complementaridade (CDR). A região de ligação de antígeno de um anticorpo inclui pelo menos um CDR do anticorpo. Em uma modalidade preferida, a região de ligação de antígeno de um anticorpo inclui todas as seis CDRs do anticorpo. As CDRs podem ser determinadas por qualquer definição conhecida para a definição de CDRs e é possível usar, por exemplo, a definição por Kabat, Chothia, AbM, Cotact e similares. Exemplos preferidos de CDRs incluem CDRs definidas por Kabat.

[41] Um anticorpo anti-GM2 que pode ser usado para a região de ligação do antígeno alvo não está particularmente limitado e pode ser um anticorpo conhecido ou um anticorpo produzido recentemente. Quando o anticorpo anti-GM2 é recentemente produzido, a produção do anticorpo anti-GM2 pode ser realizada por um método conhecido. Por exemplo, é possível usar um método de imunização de um animal com GM2 para obter um hibridoma, um método de *phage display* ou similares.

[42] Um organismo a partir do qual o anticorpo anti-GM2 é derivado não está particularmente limitado, porém um anticorpo humano é preferível. Exemplos de anticorpos anti-GM2 humanos incluem um anticorpo apresentando uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2 como uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4 como uma região variável de cadeia leve (VL), e similares. As sequências de aminoácido das CDRs 1 a 3 de acordo com a definição de Kabat da região VH que consiste na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2 são respectivamente mostradas como as SEQ ID NOs: 63 a 65. Em adição, a sequências de aminoácido das CDRs 1 a 3 de acordo com a definição de Kabat da região VL que consiste na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4 são respectivamente mostradas como as SEQ ID NOs: 66 a 68.

[43] Em uma modalidade preferida, a região de ligação do antígeno alvo pode incluir a região VH e a região VL do anticorpo anti-GM2. Por exemplo, um polipeptídeo que inclui um anticorpo de fita única (scFv) apresentando a região VH e a região VL do anticorpo anti-GM2 é um exemplo adequado da região de ligação do antígeno alvo. O scFv é um polipeptídeo no qual a região VH e a região VL de um anticorpo estão ligadas por meio de um ligante de peptídeo e é, em geral, usada como uma região de ligação do antígeno alvo de um CAR.

[44] No caso do uso do scFv, um ligante de peptídeo para ligação da região VH e a região VL não está particularmente limitado e o ligante de peptídeos geralmente usado para o scFv pode ser usado. Exemplos de ligante de peptídeos incluem um ligante 15 (SEQ ID NO: 6), um ligante

25 (SEQ ID NO: 8) e similares, porém exemplos não estão limitados a estes.

[45] A região VH e a região VL do anticorpo anti-GM2 podem ser usadas como uma região VH e uma região VL usadas para scFv. Exemplos preferidos de anticorpos anti-GM2 são tal como descritos acima. Em adição, uma parte da sequência pode ser modificada na região VH e na região VL usada para scFv, desde que a capacidade de ligação ao GM2 seja retida. Por exemplo, como o scFv, os seguintes exemplos podem ser preferencialmente usados.

(1a) scFv que inclui uma região VH que inclui as CDRs 1 a 3 da região VH que consiste na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2 e a região VL que inclui as CDRs 1 a 3 da região VL que consiste na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4, e que apresenta uma capacidade de ligação ao GM2.

(1b) scFv que inclui uma região VH que consiste na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2 e a região VL que consiste na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4, e que apresenta uma capacidade de ligação ao GM2.

(1c) scFv que inclui uma região VH que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2, e a região VL que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4, e que apresenta uma capacidade de ligação ao GM2.

(1d) scFv que inclui uma região VH que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de

identidade de sequência (homologia) para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2, e a região VL que consiste em uma sequências de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4, e que apresenta uma capacidade de ligação ao GM2.

[46] No (1a) acima, para as sequências (sequências de estrutura) que não sejam as CDRs, é preferível usar sequências de estrutura de anticorpos humanos conhecidos. Por exemplo, é possível selecionar sequências a partir de sequências de estrutura das sequências de aminoácido de anticorpos humanos registradas em bancos de dados de sequências conhecidas, tais como GenBank, sequências de aminoácido selecionadas dentre sequências consenso derivadas de cada subgrupo de anticorpos humanos (sequência consenso mais homóloga à humana; sequências de Proteínas de interesse imunológico por Kabat, E. A. et al., Departamento Norte Americano de Saúde e Serviços Humanos, 1991) e similares.

[47] No (1c) acima, o termo "diversos" pode se referir a, por exemplo, 2 a 30, preferencialmente se refere a 2 a 20, mais preferencialmente se refere a 2 a 10 e ainda mais preferencialmente se refere a 2 a 5. Em adição, o termo "mutado" pode se referir a qualquer um de deleção, substituição, adição e inserção ou uma combinação das mesmas. Além disso, uma localização da mutação é preferencialmente uma região outra que não seja as CDRs 1 a 3 (isto é, uma região de estrutura).

[48] No (1d) acima, a identidade da sequência não está particularmente limitada, desde que seja 70 % ou mais, porém é preferencialmente 80 % ou mais, é mais preferencialmente

85 % ou mais, ainda mais preferencialmente 90 % ou mais, é ainda mais preferencialmente 95 % ou mais, e é particularmente preferencialmente 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais, ou 99 % ou mais. Uma identidade da sequência (ou homologia) entre as sequências de aminoácido é obtida como uma proporção de coincidir aminoácidos à sequência de aminoácido completa, excluindo espaços vazios no alinhamento obtido pela justaposição de duas sequências de aminoácido enquanto introduz espaços vazios em porções que correspondem às inserções e deleções de modo que os aminoácidos correspondentes coincidam o mais próximo. A identidade da sequência entre as sequências de aminoácido pode ser obtida usando diversos tipos de software de busca de homologia conhecido no campo técnico. Por exemplo, um valor de identidade da sequência das sequências de aminoácido pode ser obtido pelo cálculo com base em um alinhamento obtido pelo software de busca de homologia conhecido BLASTP.

[49] Exemplos específicos de scFv's incluem, por exemplo, um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 12, 14 e 16; um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 12, 14 e 16; um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 12, 14, e 16, e que apresenta uma capacidade de ligação ao GM2; um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para uma sequência de aminoácido selecionada do

grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 12, 14 e 16, e que apresenta uma capacidade de ligação ao GM2; e similares. No que diz respeito ao termo "diversos" e o termo "mutado", o mesmo se aplica tal como descrito acima. Em adição, no que diz respeito ao termo "identidade da sequência", o mesmo se aplica tal como descrito acima.

<Região transmembrana>

[50] O termo "região transmembrana" significa uma região que está presente pela penetração da membrana celular e está ligada a uma região extracelular e uma região intracelular quando um CAR está expresso em uma célula T. A região transmembrana não está particularmente limitada desde que ela seja um polipeptídeo apresentando uma função de penetração de uma membrana celular. A região transmembrana pode ser derivada a partir de uma proteína natural ou pode ser artificialmente projetada. Uma região transmembrana derivada a partir de uma proteína natural pode ser obtida a partir de qualquer proteína de ligação de membrana ou proteína transmembrana. Em uma modalidade preferida, a região transmembrana pode transmitir um sinal de ativação à região de transdução de sinal de ativação de célula T em resposta à ligação do antígeno alvo à região de ligação do antígeno alvo.

[51] Exemplos de região transmembranas incluem as regiões transmembranas de uma cadeia α e uma cadeia β de um receptor de célula T, CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR e similares. Exemplos preferidos incluem uma região transmembrana de CD8. Um organismo a partir do qual estas proteínas são derivadas não está particularmente

limitado, porém é preferencialmente um humano. As sequências de aminoácido destas proteínas estão disponíveis a partir de bancos de dados de sequência conhecidos, tais como GenBank. Exemplos de sequências de aminoácido de CD8 humano incluem uma sequência de aminoácido registrada como GenBank nº NM_001768.6 e similares, e exemplos de sequências de aminoácido da região transmembrana incluem uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 20.

[52] Em adição, a região transmembrana pode ser um mutante da região transmembrana acima mencionada derivada a partir de uma proteína natural. Exemplos de mutantes de uma região transmembrana derivados de uma proteína natural incluem os seguintes.

(2a) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para uma sequência de aminoácido (por exemplo, SEQ ID NO: 20) de uma região transmembrana derivada a partir de uma proteína natural, e que apresenta uma capacidade transmembrana.

(2b) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido (por exemplo, SEQ ID NO: 20) de uma região transmembrana derivada a partir de uma proteína natural e apresenta uma capacidade transmembrana.

[53] No (2a) acima, a identidade da sequência não está particularmente limitada desde que seja 70 % ou mais, porém é preferencialmente 80 % ou mais, é mais preferencialmente 85 % ou mais, é ainda mais preferencialmente 90 % ou mais, e é particularmente preferencialmente 95 % ou mais.

[54] No (2b) acima, o termo "diversos" pode se referir

a, por exemplo, 2 a 10, preferencialmente se refere a 2 a 5, mais preferencialmente se refere a 2 a 4, e ainda mais preferencialmente se refere a 2 ou 3. Em adição, o termo "mutado" pode se referir a qualquer um de deleção, substituição, adição e inserção, ou uma combinação das mesmas.

<Região de transdução de sinal de ativação da célula T>

[55] O termo "região de transdução de sinal de ativação da célula T" significa uma região que está localizada intracelularmente e transmite um sinal de ativação da célula T para o interior da célula T quando um CAR é expresso na célula T. Em uma célula T, quando um complexo MHC - peptídeo se liga a um receptor de célula T (TCR), um sinal de ativação da célula T é transmitido para o interior da célula por meio de um complexo TCR - CD3 e diversos sinais de fosforilação são acionados (transdução de sinal primário). Em adição, é conhecido que moléculas co-estimulatórias expressas em uma superfície celular de uma célula T transmite sinais co-estimulatórios para o interior da célula e auxiliam a ativação da célula T pela ligação de cada molécula co-estimulatória expressa em uma superfície celular de uma célula apresentadora de antígeno para um ligante específico (transdução de sinal secundário).

[56] No presente relatório descritivo, o termo "transdução do sinal de ativação da célula T" inclui ambas a transdução de sinal primário e a transdução de sinal secundário acima mencionado. O termo "região de transdução de sinal de ativação da célula T" significa uma região intracelular envolvida na transdução do sinal de uma proteína envolvida na transdução de sinal primário e a transdução de sinal secundário.

[57] A região de transdução de sinal de ativação de célula T não está particularmente limitada desde que seja uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de uma proteína envolvida na transdução do sinal de ativação da célula T. Por exemplo, um motivo de ativação do imunorreceptor à base de tirosina (ITAM) é conhecido por estar envolvido na transdução de sinal primário. De acordo, exemplos de região de transdução de sinal de ativação de células T incluem uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de uma proteína apresentando um ITAM. Exemplos de proteínas apresentando um ITAM incluem CD3 ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d e similares. Uma região de transdução de sinal de ativação de célula T que inclui um ITAM destas proteínas é um exemplo preferido da região de transdução de sinal de ativação de célula T usada para um CAR. Mais exemplos preferidos da mesma inclui uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD3 ζ ou similares.

[58] Em adição, moléculas co-estimulatórias estão envolvidas na transdução de sinal secundário tal como descrito acima. De acordo, exemplos de região de transdução de sinal de ativação de células T ainda incluem uma região de transdução de sinal de moléculas co-estimulatórias. Exemplos de moléculas co-estimulatórias incluem CD2, CD4, CD5, CD8, CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), ICOS, CD154, HVEM, GITR, cadeia γ associada ao receptor Fc e similares. Uma região de transdução de sinal de ativação de célula T destas proteínas é também um exemplo preferido da região de transdução de sinal de ativação de célula T usada para um CAR. Mais exemplos preferidos dos mesmos incluem uma

região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD28, 4-1BB ou similares.

[59] Um organismo a partir do qual as proteínas acima mencionadas são derivadas não está particularmente limitado, porém é preferencialmente um humano. As sequências de aminoácido destas proteínas estão disponíveis a partir de bancos de dados de sequência conhecidos, tais como GenBank. Exemplos de sequências de aminoácido de CD3ζ humano incluem uma sequência de aminoácido registrada como GenBank nº NM_000734.3 e similares e exemplos de sequências de aminoácido da região de transdução de sinal de ativação de célula T inclui uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 28. Em adição, exemplos de sequências de aminoácido de CD28 humano incluem uma sequência de aminoácido registrada como GenBank nº NM_006139.2 e similares e exemplos de sequências de aminoácido da região de transdução de sinal de ativação de célula T incluem uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 24. Além disso, exemplos de sequências de aminoácido de 4-1BB humano incluem uma sequência de aminoácido registrada como GenBank nº NM_001561.5 e similares e exemplos de sequências de aminoácido da região de transdução de sinal de ativação de célula T incluem uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 26.

[60] Além disso, uma região de transdução de sinal de ativação de célula T pode ser um mutante da região de transdução de sinal de ativação de célula T derivada a partir de uma proteína natural tal como descrita acima. Exemplos de mutantes de uma região de transdução de sinal de ativação derivada a partir de uma proteína natural incluem os

seguintes.

(3a) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para uma sequência de aminoácido (por exemplo, SEQ ID NOs: 24, 26 ou 28) de uma região de transdução de sinal de ativação de célula T derivada a partir de uma proteína natural e que apresenta uma capacidade de transdução de sinal de ativação de célula T.

(3b) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido (por exemplo, SEQ ID NOs: 24, 26 ou 28) de uma região de transdução de sinal de ativação de célula T derivada a partir de uma proteína natural e que apresenta uma capacidade de transdução de sinal de ativação de célula T.

[61] No (3a) acima, a identidade da sequência não está particularmente limitada desde que seja 70 % ou mais, porém é preferencialmente 80 % ou mais, é mais preferencialmente 85 % ou mais, é ainda mais preferencialmente 90 % ou mais, e é particularmente preferencialmente 95 % ou mais.

[62] No (3b) acima, no caso de uso de uma região de uma proteína envolvida na transdução de sinal primário, o termo "diversos" pode se referir a, por exemplo, 2 a 30, preferencialmente se refere a 2 a 20, mais preferencialmente se refere a 2 a 10, e ainda mais preferencialmente se refere a 2 a 5. Em adição, no caso de uso de uma região de uma molécula co-estimulatória, o termo "diversos" pode se referir a, por exemplo, 2 a 15, preferencialmente se refere a 2 a 10, mais preferencialmente se refere a 2 a 5, e ainda mais preferencialmente se refere a 2 ou 3. Em adição, o termo

“mutado” pode ser referir a qualquer um de deleção, substituição, adição e inserção ou uma combinação das mesmas.

[63] O número da região de transdução de sinal de ativação de células T incluído no CAR da presente modalidade não está limitado a um e regiões plurais de transdução de sinal de ativação de células T pode estar incluídas. Neste caso, regiões plurais de transdução de sinal de ativação de células T podem ser as mesmas ou diferentes umas das outras. Em uma modalidade preferida, o CAR inclui duas ou mais regiões de transdução de sinal de ativação de células T. neste caso, a região de transdução de sinal de ativação de células T incluída no CAR é preferencialmente uma combinação de uma região de transdução de sinal de ativação de célula T envolvida na transdução de sinal primário e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T envolvida na transdução de sinal secundário. Exemplos específicos das mesmas incluem uma combinação da região de transdução de sinal de ativação de células T de CD3 ζ e CD28, uma combinação de região de transdução de sinal de ativação de células T de CD3 ζ e 4-1BB, uma combinação de região de transdução de sinal de ativação de células T de CD3 ζ , CD28 e 4-1BB e similares.

[64] No caso da combinação da região de transdução de sinal de ativação de célula T envolvida na transdução de sinal primário com a região de transdução de sinal de ativação de célula T envolvida na transdução de sinal secundário, a região de transdução de sinal de ativação de célula T envolvida na transdução de sinal primário está preferencialmente localizada em um lado C terminal. Nos exemplos específicos acima mencionados, é preferível que a região de transdução de sinal de ativação de célula T de

CD3ζ esteja localizada no lado C terminal da região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD28 ou 4-1BB. No caso em que ambos CD28 e 4-1BB são usados, as regiões podem estar localizadas em qualquer ordem, porém, os exemplos de localização incluem a localização na ordem de CD28 e 4-1BB a partir de um lado N terminal.

[65] No caso em que apenas uma região de transdução de sinal de ativação de célula T é usada, é preferível usar uma região de transdução de sinal de ativação de célula T envolvida na transdução de sinal primário e é mais preferível usar uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD3ζ.

<Outras regiões>

[66] O CAR da presente modalidade pode incluir outras regiões em adição às regiões acima. Exemplos de outras regiões incluem uma região de dobra extracelular, uma região citoplasmática, uma região espaçadora, um peptídeo sinal e similares.

(Região de dobra extracelular)

[67] O termo "região de dobra extracelular" significa uma região que liga uma região extracelular de ligação do antígeno alvo e uma região transmembrana. Em uma modalidade preferida, o CAR da presente modalidade inclui uma região de dobra extracelular.

[68] A região de dobra extracelular não está particularmente limitada desde que ela possa ligar uma região de ligação do antígeno alvo e uma região transmembrana. A região de dobra extracelular pode ser derivada a partir de uma proteína natural ou pode ser artificialmente projetada. A região de dobra extracelular pode ser composta de, por

exemplo, cerca de 1 a 100 aminoácidos, e preferencialmente cerca de 10 a 70 aminoácidos. A região de dobra extracelular é preferencialmente uma região que não interfere na capacidade de ligação ao GM2 da região de ligação do antígeno alvo e não interfere com a transdução do sinal pela região de transdução de sinal de ativação de célula T.

[69] Exemplos de regiões de dobra extracelular incluem regiões de dobra extracelular de CD8, CD28, CD4 e similares. Em adição, uma região de dobra de uma imunoglobulina (por exemplo, IgG4 e similares) pode ser usada. Exemplos preferidos incluem uma região de dobra extracelular de CD8.

[70] Um organismo a partir do qual as proteínas acima mencionadas são derivadas não está particularmente limitado, porém é preferencialmente um humano. As sequências de aminoácido destas proteínas estão disponíveis a partir de bancos de dados de sequência conhecidos, tais como GenBank. Exemplos de sequências de aminoácido de CD8 humano incluem sequências de aminoácido descritas acima, e exemplos de sequências de aminoácido da região de dobra extracelular incluem uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 18.

[71] Em adição, a região de dobra extracelular pode ser um mutante da região de dobra extracelular acima mencionada derivada a partir de uma proteína natural. Exemplos de mutantes de uma região de dobra extracelular derivada a partir de uma proteína natural incluem os seguintes.

(4a) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de

sequência (homologia) para uma sequência de aminoácido (por exemplo, SEQ ID NO: 18) de uma região de dobra extracelular derivada a partir de uma proteína natural.

(4b) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido (por exemplo, SEQ ID NO: 18) de uma região de dobra extracelular derivada a partir de uma proteína natural.

[72] No (4a) acima, a identidade da sequência não está particularmente limitada desde que seja 70 % ou mais, porém é preferencialmente 80 % ou mais, é mais preferencialmente 85 % ou mais, é ainda mais preferencialmente 90 % ou mais, e é particularmente preferencialmente 95 % ou mais.

[73] No (4b) acima, o termo "diversos" pode se referir a, por exemplo, 2 a 20, preferencialmente se refere a 2 a 15, mais preferencialmente se refere a 2 a 10, e ainda mais preferencialmente se refere a 2 a 5. Em adição, o termo "mutado" pode se referir a qualquer um de deleção, substituição, adição, e inserção ou uma combinação dos mesmos.

(Região citoplasmática)

[74] Uma "região citoplasmática" é uma região adjacente a uma extremidade citoplasmática de uma região transmembrana em uma proteína transmembrana, e é uma região que consiste em cerca de 3 a 50 aminoácidos. Em uma modalidade preferida, o CAR da presente modalidade inclui uma região citoplasmática. A região citoplasmática não está particularmente limitada desde que seja uma região adjacente a um lado citoplasmático da região transmembrana da proteína transmembrana. Pela ligação da região transmembrana à região de transdução de sinal de ativação de célula T por meio da

região citoplasmática, uma estrutura da região transmembrana pode ser estabilizada. A região citoplasmática pode ser derivada a partir de uma proteína natural ou pode ser artificialmente projetada. A região citoplasmática pode ser composta de, por exemplo, cerca de 3 a 50 aminoácidos, preferencialmente cerca de 4 a 20 aminoácidos, e mais preferencialmente cerca de 5 a 10 aminoácidos. A região citoplasmática é preferencialmente uma região derivada da mesma proteína tal como o caso da região transmembrana. Pelo uso da região citoplasmática derivada a partir da mesma proteína tal como o caso da região transmembrana, a estrutura da região transmembrana pode ser mantida mais estável.

[75] Exemplos de regiões citoplasmáticas incluem uma região citoplasmática das proteínas mencionadas na região transmembrana descrita acima. Exemplos preferidos incluem uma região citoplasmática de CD8. Um organismo a partir do qual estas proteínas são derivadas não está particularmente limitada, porém é preferencialmente um humano. Exemplos de sequências de aminoácido da região citoplasmática incluem uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 22.

[76] Em adição, a região citoplasmática pode ser um mutante da região citoplasmática acima mencionada derivada a partir de uma proteína natural. Exemplos de mutantes de uma região citoplasmática derivada a partir de uma proteína natural incluem os seguintes.

(5a) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para uma sequência de aminoácido (por exemplo, SEQ ID NO: 22) de uma região citoplasmática derivada

a partir de uma proteína natural e que apresenta uma capacidade de estabilização da região transmembrana.

(5b) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido (por exemplo, SEQ ID NO: 22) de uma região citoplasmática derivada a partir de uma proteína natural e apresenta uma capacidade de estabilização da região transmembrana.

[77] No (5a) acima, a identidade da sequência não está particularmente limitada desde que seja 70 % ou mais, porém é preferencialmente 80 % ou mais, é mais preferencialmente 85 % ou mais, é ainda mais preferencialmente 90 % ou mais, e é particularmente preferencialmente 95 % ou mais.

[78] No (5b) acima, o termo "diversos" pode se referir a, por exemplo, 2 a 5, preferencialmente se refere a 2 a 4, e mais preferencialmente se refere a 2 ou 3. Em adição, o termo "mutado" pode se referir a qualquer um de deleção, substituição, adição e inserção ou uma combinação das mesmas.

(Região espaçadora)

[79] Uma "região espaçadora" é um peptídeo curto que liga duas regiões funcionais (domínios) de uma proteína. Em um aspecto, no CAR da presente modalidade, cada uma da região de ligação do antígeno alvo, a região transmembrana, a região de transdução de sinal de ativação de célula T e similares descritas acima pode estar ligada por meio de uma região espaçadora. A região espaçadora não está particularmente limitada e uma região espaçadora geralmente usada para a produção de uma proteína quimérica pode ser usada. Um comprimento da região espaçadora pode ser de 1 a 100 aminoácidos, e é preferencialmente de 10 a 50 aminoácidos.

Exemplos de regiões espaçadoras incluem sequências contínuas de glicina - serina e similares.

(Peptídeo sinal)

[80] Um "peptídeo sinal" é um peptídeo que direciona a localização de uma proteína de membrana ou de uma proteína secretada. Em um aspecto, o CAR da presente modalidade pode incluir um peptídeo sinal. O peptídeo sinal é geralmente um peptídeo que consiste em cerca de 5 a 60 aminoácidos presentes em um N terminal de uma proteína de membrana e é removido em uma proteína madura a qual tenha sido completamente localizada.

[81] O peptídeo sinal usado para o CAR da presente modalidade é preferencialmente um peptídeo sinal que direciona a localização de uma proteína para uma membrana celular e é preferencialmente um peptídeo sinal de uma proteína de membrana. Exemplos de peptídeos sinais incluem peptídeos sinais de cadeia α e uma cadeia β de um receptor de célula T, CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR, uma cadeia pesada de imunoglobulina, uma cadeia leve de imunoglobulina e similares. Exemplos específicos de sequências de aminoácido do peptídeo sinal incluem uma sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 57.

[82] No CAR da presente modalidade, cada uma das regiões acima mencionadas pode estar localizada na ordem da região de ligação do antígeno alvo, a região transmembrana, e a região de transdução de sinal de ativação de célula T a partir do N terminal. Cada uma destas regiões pode estar diretamente ligada uma a outra ou pode estar ligada por meio de outra região, uma sequência espaçadora ou similares.

[83] No caso em que o CAR da presente modalidade inclui uma região de dobra extracelular, a região de dobra extracelular está localizada entre a região de ligação do antígeno alvo e a região transmembrana. Em adição, no caso em que o CAR da presente modalidade inclui uma região citoplasmática, a região citoplasmática está localizada entre a região transmembrana e a região de transdução de sinal de ativação de célula T.

[84] Além disso, no caso em que o CAR da presente modalidade inclui um peptídeo sinal, o peptídeo sinal está localizado no N terminal do CAR.

[85] Exemplos específicos do CAR da presente modalidade incluem um CAR que inclui uma região de ligação do antígeno alvo que inclui scFv de um anticorpo anti-GM2, uma região transmembrana de CD8 (ou um mutante da mesma), uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD28 (ou um mutante da mesma), uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de 4-1BB (ou um mutante da mesma), e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD3 ζ (ou um mutante da mesma). Mais exemplos preferidos dos mesmos incluem um CAR que inclui uma região de ligação do antígeno alvo que inclui scFv de um anticorpo anti-GM2, uma região de dobra extracelular de CD8 (ou um mutante da mesma), uma região transmembrana de CD8 (ou um mutante da mesma), uma região citoplasmática de CD8 (ou um mutante da mesma), uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD28 (ou um mutante da mesma), uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de 4-1BB (ou um mutante da mesma), e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD3 ζ (ou um mutante da

mesma).

[86] Exemplos de tais CAR incluem um CAR que inclui uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 40, 42, 44 e 46. Nas sequências de aminoácido tal como definidas na SEQ ID NOs: 40, 42, 44 e 46, as sequências nas posições 1 a 19 correspondem aos peptídeos sinais. De acordo, cada um dos CARs maduros nos exemplos acima mencionados incluem a sequência de aminoácido nas posições 20 a 874 da sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 40, a sequência de aminoácido nas posições 20 a 884 da sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 42, a sequência de aminoácido nas posições 20 a 874 da sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 44, ou a sequência de aminoácido nas posições 20 a 884 da sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 46.

[87] Em uma modalidade preferida, o CAR da presente modalidade consiste em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 40, 42, 44 e 46. Em adição, um CAR maduro consiste em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste na sequência de aminoácido nas posições 20 a 874 da sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 40, a sequência de aminoácido nas posições 20 a 884 da sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 42, a sequência de aminoácido nas posições 20 a 874 da sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 44, e a sequência de aminoácido nas posições 20 a 884 da sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 46.

[Célula anti-GM2 que expressa CAR (célula anti-GM2 que

expressa CAR)]

[88] Em uma modalidade, a presente invenção fornece uma célula que expressa o CAR das modalidades acima.

[89] A célula da presente modalidade expressa o CAR da modalidade acima (aqui, a seguir também referido como "CAR anti-GM2") e apresenta o CAR em uma superfície celular. Nas células que expressam GM2, o GM2 está abundantemente presente em uma superfície celular. Quando a célula da presente modalidade entra em contato com uma célula que expressa GM2, a célula se liga ao GM2 na superfície da célula que expressa GM2 por meio de uma região de ligação do antígeno alvo do CAR anti-GM2. De acordo, a célula da presente modalidade é ativada e, assim, libera os grânulos citolíticos e causando a produção de citocinas. Estes grânulos citolíticos e citocinas destroem a célula que expressa GM2.

[90] A célula da presente modalidade é preferencialmente uma célula de mamífero e pode ser, por exemplo, uma célula humana ou uma célula de mamíferos não humanos tais como camundongos, ratos, gado, ovelhas, cavalos, cães, porcos e macacos, e é mais preferencialmente uma célula humana. Os tipos de célula não estão particularmente limitados e exemplos incluem células coletadas a partir do sangue, fluido da medula óssea, baço, timo, linfonodos e similares; as células imunes que infiltram tecidos cancerígenos tais como tumores primários, tumores metastáticos e ascites cancerosas e similares. Exemplos preferíveis dos mesmos incluem células imunes e células mononucleares sanguíneas periféricas separadas do sangue periférico e similares podem ser preferencialmente usadas.

Dentre as células contidas nas células mononucleares sanguíneas periféricas, células efectoras são preferíveis e células T e suas células precursoras são particularmente células preferidas. O tipo de células T não está particularmente limitado as células T podem ser quaisquer células T dentre células T $\alpha\beta$, células T $\gamma\delta$, células T CD8 positivas, células T citotóxicas, células T CD4 positivas, células T auxiliaadoras, células T de memória, células T *naïve*, células T que infiltram tumores, células T matadoras naturais e similares. Dentre estas, células T CD8 positivas ou células T citotóxicas são mais preferíveis.

[91] É preferível que, em adição ao CAR anti-GM2, a célula da presente modalidade ainda expresse pelo menos um de interleucina (IL)-7 ou uma ligante 19 de quimiocina (motivo C-C) (CCL 19). Em uma modalidade preferida, a célula da presente modalidade é uma célula que expressa (i) o CAR anti-GM2 e (ii) pelo menos um de IL-7 ou CCL19. Mais preferencialmente, a célula da presente modalidade é uma célula que expressa o CAR anti-GM2, IL-7 e CCL19.

[92] O IL-7 é uma citocina essencial para a sobrevivência de células T e é produzido por células não hematopoiéticas tais como células estromais da medula óssea, timo e órgãos e tecidos linfoides, porém a produção das mesmas pelas células T é dificilmente reconhecida.

[93] Enquanto isso, o CCL19 é principalmente produzido a partir de células dendríticas e macrófagos nos linfonodos e apresenta uma função de causa de migração de células T e células B e células dendríticas maduras por meio do seu receptor, o qual é um receptor 7 de quimiocina CC (receptor 7 de quimiocina (motivo C-C): CCR7).

[94] Um organismo a partir do qual IL-7 e CCL19 são derivados não está particularmente limitado, porém é preferencialmente um humano. As sequências de aminoácido destas proteínas estão disponíveis a partir de bancos de dados de sequência conhecidos, tais como GenBank. Por exemplo, exemplos de sequências de aminoácido de IL-7 humana incluem uma sequência de aminoácido registrada como GenBank nº NM_000880.3 (SEQ ID NO: 59) e similares. Em adição, exemplos de sequências de aminoácido de CCL19 humano incluem uma sequência de aminoácido registrada como GenBank nº NM_006274.2 (SEQ ID NO: 61) e similares. Os IL-7 e CCL19 apresentam um peptídeo sinal e o peptídeo sinal é removido das proteínas maduras. Por exemplo, na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 59 de IL-7 humana, a sequência nas posições 1 a 25 correspondem a um peptídeo sinal. Além disso, por exemplo, na sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 61 do CCL19 humano, a sequência nas posições 1 a 21 correspondem a um peptídeo sinal.

[95] Além disso, IL-7 e CCL19 podem ser mutantes das proteínas naturais descritas acima. Exemplos de mutantes de IL-7 incluem os seguintes.

(6a) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para uma sequência de aminoácido de IL-7 natural (por exemplo, SEQ ID NO: 59) e que apresenta uma função de promoção da função imune da célula T.

(6b) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido de IL-7 natural (por exemplo, SEQ ID

NO: 59) e que apresenta a função de promoção da função imune da célula T.

[96] Em adição, exemplos de mutantes de CCL19 incluem os seguintes.

(7a) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando 70 % ou mais de identidade de sequência (homologia) para uma sequência de aminoácido of CCL19 natural (por exemplo, SEQ ID NO: 61) e que apresenta a função de promoção da função imune da célula T.

(7b) Um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido na qual um ou diversos aminoácidos são mutados na sequência de aminoácido de CCL19 natural (por exemplo, SEQ ID NO: 61) e que apresenta a função de promoção da função imune da célula T.

[97] O termo "função de promoção da função imune da célula T" significa uma função para manter ou promover a sobrevivência, crescimento, atividade citotóxica, atividade de migração, atividade de infiltração no tecido tumoral e similares das células T.

[98] Nos (6a) e (7a) acima, a identidade da sequência não está particularmente limitada desde que seja 70 % ou mais, porém é preferencialmente 80 % ou mais, é mais preferencialmente 85 % ou mais, é ainda mais preferencialmente 90 % ou mais, e é particularmente preferencialmente 95 % ou mais.

[99] Em adição, nos (6b) e (7b) acima, o termo "diversos" pode se referir a, por exemplo, 2 a 30, preferencialmente se refere a 2 a 20, mais preferencialmente se refere a 2 a 10, e ainda mais preferencialmente se refere a 2 a 5. Em adição, o termo "mutado" pode se referir a

qualquer uma de deleção, substituição, adição e inserção ou uma combinação dos mesmos.

[100] Em adição, mutantes de IL-7 e CCL19 podem ser um mutante no qual um peptídeo sinal destas proteínas é modificado por outro peptídeo sinal, ou pode ser um mutante no qual um peptídeo sinal é removido. Preferencialmente, mutantes de IL-7 e CCL19 apresentam um peptídeo sinal de proteínas secretadas e são secretados de forma extracelular.

[101] No caso em que a célula da presente modalidade é uma célula T isolada, a expressão de pelo menos um de IL-7 ou CCL19 junto com o CAR anti-GM2 promove a função imune da célula T e, assim, a célula T se torna excelente em atividade citotóxica contra células que expressam GM2, invasão ao tecido tumoral e capacidade de sobrevivência em um microambiente tumoral.

[102] Em adição, a célula da presente modalidade pode expressar um gene suicida em adição ao CAR anti-GM2. A expressão do gene suicida na célula da presente modalidade permite a indução da apoptose na célula da presente modalidade, tal como necessário. O gene suicida não está particularmente limitado e um gene suicida conhecido pode ser usado. Exemplos de genes suicidas incluem um gene da timidina quinase do vírus do herpes simplex (HSV-TK), um gene caspase 9 induzível e similares. Células que expressam HSV-TK podem induzir a morte celular pela coexistência com ganciclovir. Em adição, células que expressam caspase 9 induzível pode induzir morte celular por coexistência com uma indução química de dimerização (CID) tal como AP1903. As sequências de aminoácido dos genes suicidas estão disponíveis a partir de bancos de dados de sequência

conhecidos, tais como GenBank. Em adição, as sequências dos vetores comercialmente disponíveis que incluem um gene suicida e similares podem também ser usadas.

[103] A célula da presente modalidade também se pode dizer que é uma célula (preferencialmente uma célula T) que inclui o CAR anti-GM2. Exemplos preferidos de célula da presente modalidade pode se dizer que é uma célula (preferencialmente uma célula T) que inclui o CAR anti-GM2, e pelo menos um de IL-7 ou CCL19. Mais exemplos preferidos da célula da presente modalidade pode se dizer que é uma célula (preferencialmente uma célula T) que inclui o CAR anti-GM2, IL-7 e CCL19. Ainda mais exemplos preferidos da célula da presente modalidade pode se dizer que é uma célula (preferencialmente uma célula T) que o CAR anti-GM2, IL-7, CCL19 e um gene suicida.

[104] A célula da presente modalidade pode ser obtida pela introdução de um polinucleotídeo ou um vetor que inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 o qual irá ser descrito depois em uma célula.

[Polinucleotídeo que inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2]

[105] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um polinucleotídeo que inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2.

[106] O polinucleotídeo da presente modalidade não está particularmente limitado desde que ele inclua uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2. O CAR anti-GM2 é tal como descrito acima na seção do [Receptor de antígeno quimérico (CAR anti-GM2)]. O polinucleotídeo da presente modalidade preferencialmente inclui uma sequência

de base que codifica a sequência de aminoácido do CAR anti-GM2 exemplificado na seção do [Receptor de antígeno quimérico (CAR anti-GM2)] descrita acima.

[107] Exemplo de sequências de base que codificam uma região de ligação do antígeno alvo incluem uma sequência de base que codifica scFv de um anticorpo anti-GM2. Mais especificamente, um polinucleotídeo que inclui uma sequência de base que codifica a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2 e uma sequência de base que codifica a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4 pode ser exemplificada. Como a sequência de base que codifica a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 2, uma sequência de base tal como definida na SEQ ID NOs: 1, 49, 51 ou 53 pode ser exemplificada. Em adição, como a sequência de base que codifica a sequência de aminoácido tal como definida na SEQ ID NO: 4, uma sequência de base tal como definida na SEQ ID NO: 3, 50, 52 ou 54 pode ser exemplificada.

[108] Estas sequências de base estão preferencialmente ligadas por uma sequência de base que codifica um ligante. O ligante é tal como descrito na seção do "Receptor de antígeno quimérico" descrita acima. Por exemplo, como uma sequência de base que codifica o ligante 15 descritas acima, uma sequência de base tal como definida na SEQ ID NO: 5 ou 55 pode ser exemplificada. Em adição, como uma sequência de base que codifica o ligante 25, uma sequência de base tal como definida na SEQ ID NO: 7 ou 56 pode ser exemplificada.

[109] Exemplos específicos de sequências de base que codificam scFv de um anticorpo anti-GM2 incluem uma sequência de base tal como definida na SEQ ID NO: 9, 11, 13 ou 15, e

similares.

[110] Uma sequência de base que codifica a região de ligação do antígeno alvo é preferencialmente uma sequência de base otimizada por códon de acordo com as espécies de células a serem introduzidas e, em um caso de introdução em células humanas, uma sequência de base otimizada por códon humana é preferida.

[111] Em adição, as sequências de base que codificam uma região transmembrana e uma região de transdução de sinal de ativação de célula T estão disponíveis a partir de bancos de dados de sequência conhecidos, tais como GenBank. Além disso, no caso em que CAR GM2 inclui outras regiões tais como uma região de dobra extracelular, as sequências de base que codificam as outras regiões estão também disponíveis a partir de bancos de dados de sequência conhecidos, tais como GenBank.

[112] Por exemplo, no caso em que uma região transmembrana de CD8 humano é usada como a região transmembrana, exemplos de sequências de base que codificam o CD8 humano incluem uma sequência de base registrada como GenBank n° NM_001768.6 e similares. Como sequências de base que codificam a região transmembrana, uma sequência de base tal como definida na SEQ ID NO: 19 pode ser exemplificada.

[113] Além disso, por exemplo, no caso em que uma região de transdução de sinal de ativação de célula T de CD3ζ humano, CD28 humano ou 4-1BB humano é usada como a região de transdução de sinal de ativação de célula T, exemplos de sequências de base que codificam CD3ζ humano, CD28 humano e 4-1BB humano respectivamente incluem sequências de base registradas como GenBank n° NM_000734.3,

NM_006139.2 e NM_001561.5 e similares. Como as respectivas sequências de base que codificam a região de transdução de sinal de ativação de células T de CD3ζ humano, CD28 humano e 4-1BB humano, as sequências de base tal como definidas nas SEQ ID NOs: 27, 23 e 25 podem ser exemplificadas.

[114] Além disso, por exemplo, no caso em que uma região de dobra extracelular de CD8 humano é usada como a região de dobra extracelular, uma sequência de base tal como definida na SEQ ID NO: 17 pode ser exemplificada como uma sequência de base que codifica a região de dobra extracelular.

[115] Além disso, por exemplo, no caso em que uma região citoplasmática de CD8 humano é usada como a região citoplasmática, uma sequência de base tal como definida na SEQ ID NO: 21 pode ser exemplificada como uma sequência de base que codifica a região citoplasmática.

[116] A sequência de base que codifica cada uma das regiões acima não está limitada às sequências de base conhecidas e qualquer sequência pode ser usada desde que ela seja uma sequência de base que codifica cada uma das regiões acima. Devido a degeneração do código genético, uma pluralidade de códons que correspondem a um aminoácido está presente. De acordo, muitas sequências de base que codificam a mesma sequência de aminoácido estão presentes. A sequência de base que codifica cada uma das regiões acima pode ser qualquer uma das sequências de base plurais geradas pela degeneração do código genético, desde que seja uma sequência de base que codifica estas regiões.

[117] Uma sequência de base que codifica cada uma das regiões acima mencionadas é preferencialmente uma sequência de base otimizada por códon de acordo com as espécies de

células a serem introduzidas e, em um caso de introdução em células humanas, uma sequência de base otimizada por códon humana é preferida.

[118] Em adição, a sequência de base que codifica cada uma das regiões acima mencionadas pode ser uma sequência de base que codifica um mutante de cada região derivada a partir de uma proteína natural. Mutantes de cada região são tal como descritas acima na seção do [Receptor de antígeno quimérico (CAR anti-GM2)].

[119] A respectiva sequência de base que codifica cada região do CAR anti-GM2 está preferencialmente localizada na ordem da região de ligação do antígeno alvo, a região transmembrana e a região de transdução de sinal de ativação de célula T a partir do lado 5'. Em um caso de uso de um peptídeo sinal, uma região de dobra extracelular ou similares, é preferível que o peptídeo sinal seja localizado no lado 5' da região de ligação do antígeno alvo e a região de dobra extracelular seja localizada entre a região de ligação do antígeno alvo e a região transmembrana. As sequências de base que codificam estas regiões podem estar diretamente ligadas ou podem estar ligadas por meio de uma sequência de base que codifica uma região espaçadora. A região espaçadora é como descrita acima na seção [Receptor de antígeno quimérico (CAR anti-GM2)].

[120] Exemplos específicos de sequências de base que codificam o CAR anti-GM2 incluem uma sequência de base selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 39, 41, 43 e 45 e similares.

[121] O polinucleotídeo da presente modalidade pode ser obtido a partir da ligação dos polinucleotídeos que

consistem em uma sequência de base que codifica cada região do CAR anti-GM2 diretamente ou por meio de uma sequência espaçadora. O polinucleotídeos que codifica cada região do CAR anti-GM2 pode ser obtida pela síntese química com um método conhecido de acordo com a sequência de base de cada região. Em adição, por PCR, amplificação isotérmica e similares usando o DNA extraído de células T ou similares, e cDNA obtido por transcrição reversa do RNA extraído de células T ou similares como modelo, polinucleotídeos que codificam cada região podem ser amplificados e obtidos. Os polinucleotídeos que codificam cada região assim obtida podem estar sujeitos a modificações como substituição, deleção, adição e inserção dentro de uma faixa sem perda de funções de cada região após a tradução.

[122] O polinucleotídeo da presente modalidade pode incluir, em adição à sequência de base que codifica o CAR anti-GM2, sequências regulatórias tais como um promotor, um melhorador, um sinal de adição poli A e um terminador, as sequências de base que codificam outras proteínas e similares.

[123] Exemplos de outras proteínas incluem IL-7 e CCL19. As sequências de base que codificam estas proteínas estão disponíveis a partir de bancos de dados de sequência conhecidos, tais como GenBank. Por exemplo, no caso em que IL-7 humana é usado, exemplos de sequências de base que codificam IL-7 humana incluem uma sequência de base registrada como GenBank nº NM_002190.2 (SEQ ID NO: 58) e similares. Em adição, no caso em que CCL19 humano é usado, exemplos de sequências de base que codificam CCL19 humano incluem uma sequência de base registrada como GenBank nº NM_006274.2 (SEQ ID NO: 60) e similares.

[124] Além disso, as sequências de base que codificam estas proteínas não estão limitadas a sequências de base conhecidas e quaisquer sequências podem ser usadas desde que elas sejam sequências de base que codificam estas proteínas, e quaisquer das sequências de base plurais geradas pela degeneração do código genético podem ser usadas. A sequências de base que codificam estas proteínas são preferencialmente uma sequência de base otimizada por códon de acordo com as espécies de células a serem introduzidas e em um caso de introdução em células humanas, uma sequência de base otimizada por códon humana é preferida.

[125] Além disso, as sequências de base que codificam estas proteínas podem codificar mutantes de IL-7 natural e CCL19 natural. Estes mutantes são tal como descritos acima na seção [Célula CAR que expressa anti-GM2 (célula CAR que expressa anti-GM2)].

[126] Exemplos de outras proteínas incluem um gene suicida. O gene suicida é tal como descrito acima na seção [Célula CAR que expressa anti-GM2 (célula CAR que expressa anti-GM2)]. Uma sequência de base que codifica o gene suicida está disponível a partir de bancos de dados de sequência conhecidos, tais como GenBank. Em adição, as sequências de vetores comercialmente disponíveis que inclui um gene suicida podem também ser usadas.

[127] No caso em que o polinucleotídeo da presente modalidade inclui uma sequência de base que codifica outra proteína, uma sequência de base que codifica um peptídeo tipo de auto clivagem tal como o peptídeo 2A, uma sequência do sítio de entrada de ribozima interna (IRES) e similares pode ser interposta entre a sequência de base que codifica

o CAR anti-GM2 e a sequência de base que codifica outra proteína. Em adição, no caso em que duas ou mais outras proteínas estão presentes, um peptídeo tipo de auto clivagem, um IRES e similares podem ser interpostos entre as outras proteínas. Pela interposição destas sequências, proteínas plurais podem ser expressas independentemente a partir de um promotor.

[128] Exemplos de peptídeos 2A incluem peptídeos 2A de picornavírus, rotavírus, vírus de insetos, aftovírus, vírus de tripanosoma e similares. Como um exemplo específico, uma sequência de aminoácido de peptídeo 2A (F2A) de picornavírus é mostrada na SEQ ID NO: 62. Uma sequência de base que codifica peptídeo 2A é preferencialmente uma sequência de base otimizada por códon de acordo com as espécies de células a serem introduzidas e, em um caso de introdução em células humanas, uma sequência de base otimizada por códon humana é preferida.

[129] Em adição, o polinucleotídeo da presente modalidade pode ser um polinucleotídeo apresentando sequências regulatórias tais como um promotor, um melhorador, um sinal de adição poli A e um terminador para cada sequência que codifica proteína da sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 e a sequência de base que codifica outras proteínas. Além disso, o polinucleotídeo pode ser um polinucleotídeo no qual algumas sequências que codificam proteínas independentemente apresentam sequências regulatórias e as outras sequências que codificam proteínas ligadas por meio do peptídeo 2A, IRES ou similares apresentam sequências regulatórias comuns.

[Vetor que inclui sequência de base que codifica CAR

anti-GM2]

[130] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um vetor que inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2.

[131] O polinucleotídeo da modalidade pode estar em uma forma de um vetor. O tipo de vetor não está particularmente limitado e vetores de expressão comumente usados e similares podem ser usados. O vetor pode ser linear ou circular e pode estar em um vetor não viral tal como um plasmídeo, pode ser um vetor viral ou pode ser um vetor de transposon. Exemplos de vetores incluem vetores virais, vetores de plasmídeo, vetores episomais, vetores de cromossomo artificial e similares.

[132] Exemplos de vetores virais incluem vetores de vírus Sendai, vetores de retrovírus (que inclui lentivírus), vetores de adenovírus, vetores de vírus adeno associados, vetores de vírus do herpes, vetores de vírus vaccinia, vetores de vírus pox, vetores de polio vírus, vetores de sindbis vírus, vetores de rabdovírus, vetores de paramixovírus, vetores de ortomixovírus e similares.

[133] Exemplos de vetores de plasmídeo incluem vetores de plasmídeo para expressão de célula animal, tal como pA1-11, pXT1, pRc / CMV, pRc / RSV e pcDNA1 / Neo.

[134] Um vetor episomal é um vetor capaz de replicação autônoma extracromossomal. Exemplos de vetores episomais incluem vetores contendo sequências as quais são necessárias para a replicação autônoma e são derivados de EBV, SV40 e similares como elementos de vetor. Exemplos específicos de elementos de vetor necessários para a replicação autônoma incluem um ponto de partida da replicação e um gene que

codifica uma proteína que se liga a um vetor no ponto de partida da replicação para controlar a replicação. Exemplos dos mesmos incluem oriP, o qual é um ponto de partida da replicação e o gene EBNA-1 em um caso de EBV e ori, o qual é um ponto de partida da replicação e um gene SV40LT em um caso de SV40.

[135] Exemplos de vetores de cromossomo artificial incluem vetores de cromossomo artificial de levedura (YAC), vetores de cromossomo artificial de bactéria (BAC), vetores de cromossomo artificial derivados de P1 (PAC) e similares.

[136] Exemplos preferidos de vetores da presente modalidade incluem vetores virais e mais exemplos preferidos dos mesmos incluem vetores de retrovírus. Exemplos de vetores de retrovírus incluem um vetor pMSGV1 (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18: 6436 - 6445 (2012)) e um vetor pMSCV (produzido por Takara Bio Inc.). Pelo uso de um vetor retrovírus, um gene no vetor está incorporado no genoma de uma célula hospedeira e, assim, o gene pode ser estavelmente expresso na célula hospedeira por um longo período.

[137] Em adição às sequências de base descritas acima na seção [Polinucleotídeo que inclui sequência de base que codifica CAR anti-GM2], o vetor da presente modalidade pode incluir um ponto de partida da replicação; uma sequência de base que codifica uma proteína que se liga ao vetor no ponto de partida da replicação para controle da replicação; uma sequência de base que codifica um gene marcador tal como um gene de resistência a medicamento e um gene repórter; e similares.

[138] A sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 está preferencialmente localizada dentro do vetor de modo a

ser expressa sob o controle de um promotor apropriado. Em adição, no caso em que as sequências de base que codificam outras proteínas estejam incluídas, estas sequências de base estão preferencialmente localizadas dentro do vetor de modo a serem expressas sob o controle de um promotor apropriado. Exemplos de promotores incluem um promotor SR α , um promotor em estágio inicial SV40, um LTR de retrovírus, um promotor de citomegalovírus (CMV), um promotor de Rous sarcoma vírus (RSV), um promotor da timidina quinase do vírus do herpes simplex (HSV-TK), um promotor EF1 α , um promotor metalotioneína, um promotor de choque térmico e similares. Em adição, um melhorador de um gene IE de CMV humano pode ser usado junto com o promotor. Como um exemplo, um promotor CAG (que inclui um melhorador de citomegalovírus, um promotor de β -actina de galinha e um sítio do sinal poli A de um gene β -globina) e similares podem ser mencionados. Além disso, como descrito acima em [Polinucleotídeo que inclui sequência de base que codifica CAR anti-GM2], transcrições das mesmas podem ser realizadas sob o controle de um promotor comum pela localização de uma sequência de base que codifica um peptídeo tipo de auto clivagem ou um IRES entre cada uma das sequências que codificam proteína.

[139] Em uma modalidade preferida, em adição à sequência de base que codifica o CAR anti-GM2, o vetor da presente modalidade ainda inclui pelo menos um de uma sequência de base que codifica IL-7 e uma sequência de base que codifica CCL19. Em uma modalidade mais preferida, em adição à sequência de base que codifica CAR anti-GM2, o vetor da presente modalidade ainda inclui uma sequência de base que codifica IL-7 e uma sequência de base que codifica CCL19.

[140] O vetor da presente modalidade preferencialmente inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 funcionalmente ligado a um promotor apropriado. Mais preferencialmente, o vetor da presente modalidade inclui uma sequência de base na qual a sequência de base que codifica o CAR anti-GM2, a sequência de base que codifica IL-7 e a sequência de base que codifica CCL19 estão ligadas por meio de uma sequência de base que codifica um peptídeo tipo de auto clivagem ou um IRES. A sequência de base está funcionalmente ligada a um promotor apropriado. A frase "funcionalmente ligada a um promotor" significa que uma sequência de base está ligada a jusante de um promotor de modo a ser expresso sob o controle do promotor. No exemplo acima, a ordem de localização da sequência de base que codifica o CAR anti-GM2, a sequência de base que codifica IL-7 e a sequência de base que codifica CCL19 não está particularmente limitada e pode ser qualquer ordem de localização.

[Método para a produção de célula CAR que expressa anti-GM2]

[141] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para a produção uma célula que expressa o CAR anti-GM2, o método incluindo a introdução de um polinucleotídeo ou vetor que inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 dentro de uma célula.

[142] A célula CAR que expressa o anti-GM2 da modalidade acima (aqui, a seguir, também referido como "célula CAR que expressa anti-GM2") pode ser obtida pela introdução de um polinucleotídeo ou um vetor que inclui a sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 da modalidade

acima dentro de uma célula. O polinucleotídeo ou o vetor introduzido dentro de uma célula é retido na célula em um estado capaz de expressar o CAR anti-GM2. A frase "estado capaz de expressão" significa um estado no qual a sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 pode ser transcrita e traduzida.

[143] Um método para a introdução de um polinucleotídeo ou um vetor dentro de uma célula não está particularmente limitada e métodos conhecidos podem ser usados. Exemplos dos mesmos incluem um método de infecção viral, um método de lipofecção, um método de microinjeção, um método de fosfato de cálcio, um método DEAE - dextrano, um método de eletroporação, um método usando transposon, um método de pistola de partículas e similares.

[144] Em adição, no caso em que o vetor é um vetor de retrovírus, células de empacotamento apropriadas podem ser selecionadas com base nas sequências LTR e sequências sinal de empacotamento incluídas no vetor e partículas de retrovírus podem ser preparadas pelo uso da mesma. Exemplos de células de empacotamento incluem PG13, PA317, GP+E-86, GP+envAm-12, Psi-Crip e similares. Em adição, células 293 ou células 293T com alta eficiência de transfecção podem ser usadas como células de empacotamento. Uma vez que diversos vetores de retrovírus e células de empacotamento que podem ser usadas para o empacotamento do vetor são amplamente comercialmente disponíveis, estes produtos comercialmente disponíveis podem ser usados. Por exemplo, é possível usar células GP2-293 (produzidas por Takara Bio Inc.), células Plat-GP (produzidas por Cosmo Bio Co., Ltd.), células PG13 (CRL-10686 produzidas por ATCC), células PA317 (CRL-9078

produzidas por ATCC) e similares, e um kit comercialmente disponível tal como Kit Eco de empacotamento de retrovírus (produzido por Takara Bio Inc.) pode ser usado.

[145] No caso em que outras proteínas externas tais como IL-7, CCL19 e um gene suicida são expressas nas células CAR que expressam anti-GM2, as sequências de base que codificam estas outras proteínas podem ser incorporadas em um vetor que inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 ou podem ser incorporadas em outro vetor. No caso em que as sequências de base que codificam outras proteínas estão incluídas no outro vetor, o vetor pode ser introduzido em uma célula simultaneamente ou separadamente com o vetor que inclui a sequência de base que codifica o CAR anti-GM2.

[146] Em adição, a célula CAR que expressa anti-GM2 pode ser produzida pela incorporação de um polinucleotídeo que inclui a sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 no genoma de uma célula de modo que o polinucleotídeo pode ser expresso sob o controle de um promotor apropriado, pelo uso de técnicas de edição de gene e similares. Exemplos de técnicas de edição de gene incluem técnicas que usam endonucleases tais como nuclease de dedo de zinco, nuclease efetora do tipo ativação da transcrição (TALEN), sistema de repetição palindrômica curta regularmente intercalada e agrupadas (CRISPR)-Cas e repetição pentatricopeptídeo (PPR). No caso em que outras proteínas externas são expressas na célula CAR que expressa anti-GM2, de forma similar, um polinucleotídeo que inclui a sequência de base que codifica a outra proteína externa pode ser incorporada no genoma da célula de modo que o polinucleotídeo pode ser expresso sob o controle de um promotor apropriado, pelo uso de técnicas

de edição de gene e similares. Por exemplo, um método de incorporação de um polinucleotídeo que inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 (ou outras proteínas) funcionalmente ligadas a um promotor apropriado dentro de uma região não codante e similares em um genoma celular; um método de incorporação de um polinucleotídeo que inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 (ou outras proteínas) à jusante de um promotor endógeno em um genoma celular e similares são exemplificados. Exemplos de promotores endógenos incluem promotores de TCR α e TCR β e similares.

[147] Após a introdução de um polinucleotídeo ou um vetor que inclui uma sequência de base que codifica o CAR anti-GM2 em uma célula, a expressão do CAR anti-GM2 na célula pode ser confirmada por um método conhecido tal como citometria de fluxo, RT-PCR, *Northern blotting*, *Western blotting*, ELISA e imunocoloração fluorescente. Em adição, a expressão de outras proteínas externas tais como IL-7 e CCL19 podem também ser, de forma similar, confirmada por métodos conhecidos.

[Composição farmacêutica que inclui a célula CAR que expressa anti-GM2]

[148] Em uma modalidade, a presente invenção fornece uma composição farmacêutica que inclui a célula CAR que expressa anti-GM2.

[149] A célula CAR que expressa anti-GM2 mostra atividade citotóxica específica contra as células que expressam GM2. De acordo, a célula CAR que expressa anti-GM2 pode ser usada para tratar ou prevenir uma doença envolvendo uma célula que expressa GM2. Uma vez que o GM2 é expresso em

uma ampla faixa de células tumorais que inclui câncer de pulmão, neuroblastoma, glioma, melanoma, mesotelioma maligno, mieloma e similares, a composição farmacêutica que inclui a célula CAR que expressa anti-GM2 pode ser usada como uma composição farmacêutica para o tratamento ou prevenção de tumores. O tumor pode ser um gerado a partir de qualquer tecido ósseo, tecido cartilaginoso, tecido gorduroso, tecido muscular, tecido vascular e tecido hematopoiético. Exemplos de tumores incluem câncer tal como glioma, melanoma, mesotelioma maligno, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de cabeça e pescoço, câncer de fígado, câncer uterino, câncer de bexiga, câncer biliar, câncer de esôfago, tumor testicular, câncer de tireóide, câncer de cérebro, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer de rim, câncer de ovário, câncer de mama, adenocarcinoma, carcinoma espinocelular de células, carcinoma adenoescamoso de células, câncer anaplásico, câncer de células grandes, câncer de células pequenas, câncer de pele, câncer vaginal, câncer de pescoço, câncer de baço, câncer de traqueia, câncer brônquico, câncer de intestino grosso, câncer de estômago, câncer de vesícula biliar e câncer de testículo; sarcoma como osteossarcoma, condrossarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno e sarcoma de tecidos moles; blastoma tal como neuroblastoma, hepatoblastoma, meduloblastoma, nefroblastoma, pancreatoblastoma, blastoma pleuropulmonar e retinoblastoma; tumor de células germinativas; câncer de sangue como linfoma, leucemia e mieloma e similares, porém os exemplos não se limitam a estes. Em particular, a composição farmacêutica da presente modalidade é adequada como uma composição farmacêutica para

o tratamento ou prevenção de tumores que expressam GM2. Exemplos de tumores que expressam GM2 incluem câncer de pulmão, neuroblastoma, glioma, melanoma, mesotelioma maligno, mieloma e similares, porém os exemplos não se limitam a estes. Se um tumor expressão ou não GM2 pode ser confirmado por, por exemplo, um método conhecido usando um anticorpo anti-GM2 ou similares. Exemplos de métodos conhecidos incluem citometria de fluxo, ELISA, imunocoloração, imunocoloração fluorescente e similares. As células (preferencialmente células T) que expressam qualquer um ou ambos de IL-7 e CCL19 em adição ao CAR anti-GM2 exercem forte atividade citotóxica contra até mesmo tumores sólidos desde que eles sejam tumores que expressam GM2. Por esta razão, a composição farmacêutica da presente modalidade que inclui células (preferencialmente células T) que expressam o CAR anti-GM2 e qualquer um ou ambos de IL-7 e CCL19 podem ser particularmente preferencialmente usados para tumores sólidos que expressam GM2. De acordo, a composição farmacêutica para o tratamento ou prevenção de tumores sólidos, os quais incluem uma célula (preferencialmente célula T) que expressa o CAR anti-GM2, e qualquer um ou ambos de IL-7 e CCL19, é um exemplo preferido da composição farmacêutica da presente modalidade. O termo "tumor sólido" significa um tumor outro que não seja câncer de sangue decorrentes de tecidos hematopoiéticos e inclui câncer de células epiteliais e câncer de células não epiteliais.

[150] A composição farmacêutica da presente modalidade pode incluir outros componentes tais como um carreador farmacêuticamente aceitável, em adição à célula CAR que expressa anti-GM2. Exemplos de outros componentes incluem,

em adição a um carreador farmacêuticamente aceitável, um fator de ativação de célula T tal como citocinas, um imunostimulante, um inibidor do ponto de checagem imune, células que expressam outros CAR, um agente anti-inflamatório e similares, porém, exemplos não se limitam a estes. Exemplos de carreadores farmacêuticamente aceitáveis incluem um meio de cultura celular, uma solução salina fisiológica, uma solução tampão de fosfato, uma solução tampão de citrato e similares.

[151] A composição farmacêutica da presente modalidade pode ser administrada por um método conhecido, porém preferencialmente pode ser administrada a um paciente por injeção ou infusão. Uma via de administração é preferencialmente administração intravenosa, porém não se limita a esta, e a administração pode ser realizada por injeção em um tumor ou similares.

[152] A composição farmacêutica da presente modalidade pode incluir uma quantidade terapeuticamente eficaz das células CAR que expressa anti-GM2. O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade de um agente eficaz para o tratamento ou prevenção de uma doença. A quantidade terapeuticamente eficaz pode variar dependendo de um estágio da doença, idade, sexo, peso corporal e similares de um indivíduo para a administração. Na composição farmacêutica da presente modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz acima mencionada das células CAR que expressam anti-GM2 pode ser, por exemplo, uma quantidade que permite as células CAR que expressam anti-GM2 de suprimir o crescimento dos tumores.

[153] Uma dose e um intervalo de administração da

composição farmacêutica da presente modalidade podem ser apropriadamente selecionados dependendo da idade, sexo, peso corporal e similares de um indivíduo para a administração; o tipo, grau de progressão, sintomas e similares de uma doença; um método de administração e similares. Como uma dose, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser administrada e exemplos das mesmas incluem 1×10^4 a 1×10^{10} células, preferencialmente 1×10^5 a 1×10^9 células, e mais preferencialmente 5×10^6 a 5×10^8 células como o número de células a serem administradas por administração.

[154] Um intervalo de administração da composição farmacêutica da presente modalidade pode ser, por exemplo, a cada semanas, a cada 10 a 30 dias, a cada mês, a cada 3 a 6 meses, a cada ano ou similares. Em adição, uma vez que as células CAR que expressam anti-GM2 podem ser autonomamente proliferadas no corpo de um indivíduo para administração, elas podem ser administradas apenas uma vez. Alternativamente, o número das células CAR que expressam anti-GM2 em um corpo pode ser monitorado após a administração e um período de administração pode ser determinado de acordo com o resultado.

[155] Em adição, a composição farmacêutica da presente modalidade pode ser usada em combinação com outros agentes anticâncer. Exemplos de outros agentes anticâncer incluem medicamentos alquilantes tal como ciclofosfamida, antimetabólitos tal como pentostatina, medicamentos direcionados molecularmente tal como rituximab, inibidores de quinase tal como imatinibe, inibidores de proteassoma tal como bortezomibe, inibidores de calcineurina tal como ciclosporina, antibióticos anticâncer tal como idarubicina,

alcaloides vegetais tal como irinotán, preparações de platina tal como cisplatina, medicamentos para terapia hormonal tal como tamoxifeno, medicamentos imunorreguladores tais como nivolumabe e pembrolizumabe, e similares, porém os exemplos não se limitam a estes.

[156] Em adição, em outros aspectos, a presente invenção fornece 1) o uso da célula CAR que expressa anti-GM2 na produção de uma composição farmacêutica para o tratamento ou prevenção de um tumor; 2) um método para o tratamento ou prevenção de um tumor que expressa GM2, o método que inclui a administração da célula T anti-GM2 que expressa CAR a um indivíduo (por exemplo, um paciente que sofre de um tumor que expressa GM2, um paciente o qual passou pela remoção cirúrgica de um tumor e similares); 3) a célula CAR que expressa anti-GM2 para uso no tratamento ou prevenção de um tumor; e 4) uso da célula CAR que expressa anti-GM2 para o tratamento ou prevenção de um tumor.

[157] Além disso, em outro aspecto, a presente invenção fornece um kit para a produção da célula CAR que expressa anti-GM2, o kit que inclui o vetor da modalidade acima descrita. O kit não está particularmente limitado desde que este inclua o vetor da modalidade acima descrita e o kit pode incluir instruções para a produção da célula CAR que expressa anti-GM2, um reagente usado para introduzir o vetor dentro da célula e similares.

[Exemplos]

[158] Aqui, a seguir, a presente invenção será descrita por exemplos, porém a presente invenção não está limitada pelos exemplos a seguir.

[Exemplo 1] Preparo de células T anti-GM2 que expressam

CAR que expressam IL-7 e CCL 19 (seleção do fator de promoção da função imune da célula T)

[159] Pelo menos centenas de moléculas capazes de controlar a função da célula T estão presentes um corpo vivo. Os inventores da presente invenção selecionaram IL-7 e CCL19 dentre um vasto número de combinações como um fator de promoção da função imune para a melhora de um efeito antitumoral nas células T-CAR.

[160] A IL-7 acima mencionada é uma citocina essencial para a sobrevivência de células T e é produzida por células não hematopoiéticas tais como células estromais presentes na medula óssea, timo, órgãos e tecidos linfáticos e similares. Enquanto isso, uma capacidade de produzir IL-7 é dificilmente reconhecida em células T.

[161] Em adição, o CCL19 acima mencionado é principalmente produzido a partir de células dendríticas e macrófagos em linfonodos e apresenta uma função de causar a migração de células T e células B e células dendríticas maduras por meio dos seu receptor, CCR7.

(Sequências scFv de CAR anti-GM2)

[162] As sequências de scFvs anti-GM2 foram projetadas com base em sequências de anticorpos GM2 conhecidos. A fim de comparar a ordem de VL e VH e tipos de ligantes, cada fragmento de DNA de ligante VL 15-VH (SEQ ID NO: 9: VL15VH), ligante VL 25-VH (SEQ ID NO: 11: VL25VH), ligante VH 15-VL (SEQ ID NO: 13: VH15VL) e ligante VH 25-VL (SEQ ID NO: 15: VH 25VL) foram sintetizados. Nos exemplos a seguir, VH VL15 foi usado como a sequência scFv anti-GM2, a menos que especificado o contrário.

(Preparo de vetor anti-GM2 que expressa CAR que expressa

IL-7 e CCL19)

[163] Primeiro, a síntese química foi realizada em um fragmento de DNA de IL-7-F2A-CCL19 (SEQ ID NO: 33: IL-7-F2A-CCL19) que codifica IL-7 humana (sem códon de parada) e F2A subsequente e CCL19 humano. Em seguida, usando a vetor CAR-IL-7 / CCL19 anti-CD20 de camundongo existente obtido pela inserção de um constructo que consiste de um scFv anti-CD20 de camundongo, uma região transmembrana CD8 de camundongo, um motivo do sinal intracelular CD28-4-1BB-CD3ζ de camundongo e um IL-7-F2A de camundongo - CCL19 de camundongo em um vetor de expressão de retrovírus pMSGV1 (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18: 6436 - 6445 (2012)), uma região do IL-7-F2A-CCL19 de camundongo no vetor foi substituída com o fragmento de DNA IL-7 humana-F2A-CCL19 (SEQ ID NO: 33) sintetizado pelo tratamento com enzima de restrição (NsiI e SalI) e ligação. Além disso, a síntese química foi realizada em um fragmento de DNA CAR anti-CD20 humano (SEQ ID NO: 37: CAR anti-CD20) que consiste de um scFv anti-CD20 humano, uma região transmembrana CD8 humana e um motivo do sinal intracelular CD28-4-1BB-CD3ζ humano e uma região CAR anti-CD20 de camundongo no vetor foi substituída com este fragmento de DNA por tratamento com enzima de restrição (NcoI e EcoI) e ligação. Por fim, os fragmentos de DNA (SEQ ID NOs: 9, 11, 13 e 15) que codificam scFv anti-GM2 humano foram quimicamente sintetizados e o scFv anti-CD20 no vetor foi substituído com este fragmento de DNA por tratamento com enzima de restrição (NcoI e EcoI) e ligação. O constructo do fragmento de DNA CAR anti-GM2 é mostrado na Fig. 1A e uma figura da localização do vetor obtido é mostrada na Fig. 1B.

(Preparo do vetor anti-GM2 que expressa CAR que expressa

IL-7 / CCL19 e HSV-tk)

[164] Na terapia com célula T-CAR, uma forte resposta imune a um antígeno alvo pode causar efeitos colaterais sistêmicos, tal como a síndrome de liberação de citocinas. A fim de lidar com tal problema, um constructo CAR foi produzido, no qual um gene da timidina quinase derivada do vírus do herpes, HSV-tk, foi introduzido como um gene suicida. Quando esse constructo foi transfectado e o HSV-tk foi expresso nas células T-CAR, a adição de ganciclovir, o qual é um medicamento terapêutico para citomegalovírus, induz a apoptose das células T-CAR para matá-los e a administração de ganciclovir permite o controle de células T- CAR no corpo.

[165] Primeiro, o fragmento de DNA IL-7-F2A-CCL19-HSV-tk (SEQ ID NO: 35: IL-7-F2A-CCL19-HSV-tk) foi quimicamente sintetizado. Em seguida, a região de IL-7-F2A-CCL19 no vetor anti-GM2 que expressa CAR (SEQ ID NO: 39) que expressa IL-7 e CCL19 foi substituído com o fragmento de DNA IL-7-F2A-CCL19-HSV-tk sintetizado (SEQ ID NO: 35) por tratamento com enzima de restrição (NsiI e SalI) e ligação, e assim um vetor de expressão CAR anti-GM2 (SEQ ID NO: 47) que expressa IL-7 / CCL19 e HSV-tk foi produzido.

(Produção de retrovírus dentro do qual o vetor CAR anti-GM2 que expressa IL-7 / CCL19 foi introduzido)

[166] Um retrovírus foi produzido para a transfecção do gene entro de uma célula T. Usando Lipofectamina 3000 (produzida por Life Technology Inc.), o vetor CAR anti-GM2 que expressa IL-7 / CCL19 acima mencionado e plasmídeo p-Ampho (produzido por Takara Bio Inc.) foi transfectado dentro de uma linhagem celular de empacotamento GP2-293 (produzida por Takara Bio Inc.) e, assim, um retrovírus dentro do qual

o vetor CAR anti-GM2 que expressa IL-7 / CCL19 foi introduzido foi produzido. O sobrenadante contendo o retrovírus foi recuperado 48 horas após a transfecção.

[167] Como uma solução de cultura de células GP2-293, DMEM ao qual 10 % de FCS, 100 U / ml de penicilina e 100 mg / ml de estreptomicina foram adicionados foi usado. Em adição, como uma solução de cultura de células T usadas nos Exemplos a serem descritos a seguir, o GT-T 551 contendo 2.0 % de soro tipo AB humano (produzido por Sigma), 1 % de penicilina - estreptomicina (produzida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e 2.5 µg / ml de anfotericina B (produzida por Bristol - Myers Squibb) foi usado.

(Transdução genética de células T)

[168] Células mononucleares sanguíneas periféricas foram coletadas a partir de sangue de doadores saudáveis e foram cultivadas com 2×10^6 de IL-2 (200 IU / ml: produzida por Peprotech) em uma incubadora com 5 % de CO₂ a 37 °C por 3 dias em uma placa na qual um anticorpo monoclonal anti-CD3 (5 µg / ml) e RetroNectin (marca registrada: produzida por Takara Bio Inc., 25 µg / ml) foram dispostos em camadas para ativar células T. No segundo dia após o início da cultura, 500 µl / poço do sobrenadante contendo o retrovírus dentro do qual o vetor CAR anti-GM2 que expressa IL-7 / CCL19 produzido acima foi introduzido foi adicionado a uma placa de 24 poços de superfície não tratada que foi previamente revestida com 25 µg / ml de RetroNectin (produzida por Takara Bio Inc.) e, assim, uma placa pré carregada com retrovírus foi produzida por centrifugação a 2000 g por 2 horas. Um total de duas placas foi produzido e, após o final da centrifugação, as placas foram lavadas com 1.5 % de BSA /

PBS e armazenadas a 4 °C até serem usadas. No terceiro dia da cultura, células ativadas foram recuperadas a partir da placa e preparadas como uma suspensão celular (1×10^5 células / ml). Uma primeira infecção com retrovírus foi realizada pela adição de 1 ml por poço desta suspensão celular para a placa pré carregada com retrovírus e cultivo em uma incubadora com 5 % de CO₂ a 37 °C por 24 horas na presença de IL-2 (uma concentração final de 200 IU / ml). No dia seguida (dia 4 da cultura), uma segunda infecção com retrovírus foi realizada pela transferência da solução celular de cada poço para uma segunda placa pré carregada com vírus armazenada, centrifugação a 500 g por 1 minuto e cultivo a 37 °C por 4 horas. Após 4 horas de cultivo a 37 °C, 1 ml da suspensão celular de cada poço foi transferida a uma nova placa de 12 poços com cultura celular, diluída 4 vezes com uma solução de cultura fresca (GT-T551) contendo IL-2 (200 IU / ml) e cultivada a 37 °C em uma incubadora com 5 % de CO₂. O cultivo foi realizado até o dia 7 a partir do dia de início da cultura das células mononucleares sanguíneas periféricas e, assim, as células T (células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19) dentro das quais o vetor CAR anti-GM2 que expressa IL-7 / CCL19 foi introduzido foram obtidas (Fig. 1B). Em adição, ao mesmo tempo, como um controle negativo de célula CAR, células não transgênicas, as quais ativaram células mononucleares sanguíneas periféricas obtidas a partir dos mesmos doadores saudáveis da mesma maneira, porém as quais não foram infectadas com retrovírus, foram produzidas.

[Exemplo 2] Medida da expressão de CAR por citometria de fluxo (análise de citometria de fluxo)

[169] A análise de um nível de expressão de CAR que reconhece GM2 como um antígeno foi realizada por análise de citometria de fluxo bicolor. As células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 produzidas foram reagidas com proteína L biotinilada (produzida por GenScript), estreptavidina marcada com (APC) aloficocianina (produzida por Affymetrix) e anticorpo monoclonal anti-CD8 marcado com (APC) (produzido por Affymetrix) e coloração foi realizado. EC800 (produzido por Sony) foi usado para a citometria de fluxo e o software FlowJo (produzido por Tree Star) foi usado para análise dos dados.

[170] Os resultados são mostrados na Fig. 2. O gráfico da esquerda mostra os resultados de células dentro das quais nenhum gene CAR foi transfectado e o gráfico da direita mostra os resultados das células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19. Os valores numéricos nos gráficos representam porcentagens das respectivas populações. Tal como mostrado na Fig. 2, cerca de 68 % da expressão CAR foi confirmada nas células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19.

[Exemplo 3] Produção de IL-7 e CCL19

(Medida das concentrações de IL-7 e CCL19 no sobrenadante de cultura de células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19)

[171] Um sobrenadante de cultura das células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 ou células não transgênicas no dia 7 da cultura descrita acima foi recuperado e a produção de IL-7 e CCL19 pelas células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foi examinada usando um kit ELISA comercialmente disponível (produzido por Peprotech

e R & D systems, respectivamente).

[Resultados]

[172] Os resultados são mostrados na Fig. 3. Tal como mostrado na Fig. 3, no sobrenadante de cultura das células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 (GM2 CAR), 300 pg / ml ou mais de IL-7 e 2000 pg / ml ou mais de CCL 19 foram detectados. Com base nestes resultados, foi confirmado que as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 expressam IL-7 e CCL19 e os IL-7 e CCL19 expressos são secretados de forma extracelular. Por outro lado, no sobrenadante de cultura (não infecção) das células T não transgênicas controle, quantidades de ambos IL-7 e CCL19 estavam abaixo de um limite de detecção (Não detectado).

[Exemplo 4] Expressão de GM2 em cada célula tumoral
(Análise de citometria de fluxo)

[173] Linhagens celulares de mesotelioma maligno Y-meso8A e MSTO211H, linhagem celular de mieloma KMS-11, KMS-28PE e linhagem celular de câncer de cólon SW480 foram coradas com um anticorpo anti-GM2 e um anticorpo anti-DNP controle o qual foi marcado com Alexa 488 e a expressão do GM2 em cada célula tumoral foi medida por análise de citometria de fluxo. Para ambos o anticorpo anti-GM2 marcado com Alexa 488 e anticorpo anti-DNP marcado com Alexa 488, a coloração foi realizada a 10 µg / amostra.

[174] A expressão de GM2 não foi observada na linhagem celular de câncer de cólon SW480, porém a expressão de GM2 foi confirmada nas linhagens celulares de mesotelioma maligno Y-meso8A e MSTO211H e nas linhagens celulares de mieloma KMS-11 e KMS-28PE.

[Exemplo 5] Ensaios de citotoxicidade

(ensaio de liberação de ^{51}Cr 1 por células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19)

[175] A Fig. 4 mostra programações de testes de produção de células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19, um ensaio de citotoxicidade tumoral e um ensaio de co-cultura. Tal como mostrado na Fig. 4, as células T que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foram recuperadas no dia 8 e atividade citotóxica das células T que expressam CAR-IL-7 / CCL19 contra células tumorais foi avaliada pelo uso de um ensaio de liberação padrão ^{51}Cr de 24 horas.

[176] Diversas células tumorais que expressam GM2 humano foram usadas como células alvo. A linhagem de célula tumoral foi cultivada a 37°C por 1 hora na presença de 100 μCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ e, então, lavada 3 vezes, e 5×10^3 células por poço foram adicionadas a uma placa de fundo em V de 96 poços (produzida por Nunc). Em seguida, como células T efetoras, quatro tipos de células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 com diferentes combinações de VH e VL e um ligante no scFv de CAR anti-GM2, ou células T não transgênicas foram adicionadas e a co-cultura foi realizada com as células alvo a 37°C por 4 horas. Uma proporção de efetoras / alvo (proporção E / T) foi ajustada dentro de uma faixa de 2.5, 5, 10, 20 e 40. A liberação máxima e liberação espontânea das células alvo foram medidas pela cultura das células alvo em uma solução de cultura contendo 10 % de Triton X (produzida por Sigma - Aldrich) ou em apenas uma solução de cultura. A liberação do ^{51}Cr do sobrenadante foi medida com um contador de cintilação TopCount (produzido por PerkinElmer). Uma porcentagem de atividade citotóxica foi calculada pela equação: atividade citotóxica (%) = [(ensaio

de liberação - liberação espontânea) / (liberação máxima - liberação espontânea)] × 100.

[Resultados]

[177] Os resultados são mostrados na Figs. 5A e 5B. A Fig. 5A mostra os resultados nos quais as linhagens celulares de mesotelioma maligno (Y-meso8A e MSTO211H) foram usadas como células alvo e a Fig. 5B mostra os resultados nos quais as linhagens celulares de mieloma (KMS-11 e KMS-28PE) foram usadas como células alvo. Nos gráficos, cada um de "VL15VH", "VL25VH", "VH15VL" e "VH25VL" representam as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 que inclui as sequências correspondentes às sequências scFv de CAR anti-GM2. Tal como mostrado nas Figs. 5A e B, as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 exibiram citotoxicidade contra a linhagem de células tumorais por qualquer combinação de VH, VL e um ligante. Por outro lado, as células T não transgênicas controle (não infecção) mostraram quase nenhuma atividade citotóxica contra a linhagem de células tumorais. Nas Figs. 5A e 5B, um eixo lateral dos gráficos representa uma proporção de efectoras (células T) para direcionar (células tumorais) em uma proporção E / T e um eixo vertical representa a atividade citotóxica (%).

(Ensaio de liberação de ^{51}Cr 2 por células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19)

[178] Para examinar a especificidade do GM2 da atividade citotóxica pelas células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19, usando as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19, células T-CAR anti-FITC que reconhecem FITC como controle para as células T-CAR e células T não transgênicas, atividade citotóxica de cada célula contra uma

linhagem de célula tumoral positiva para GM2 e uma linhagem de célula tumoral negativa para GM2 foi comparada e examinada. Para as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19, células contendo VL15VH como sequência scFv foram usadas.

[Resultados]

[179] Os resultados são mostrados na Figs. 6A a 6C. A Fig. 6A mostra os resultados nos quais a linhagem celular de mesotelioma maligno (Y-MESO8A) foi usada como uma célula alvo, a Fig. 6B mostra os resultados nos quais a linhagem celular de mieloma (KMS11) foi usada como uma célula alvo, e a Fig. 6C mostra os resultados nos quais a linhagem celular de câncer de cólon (SW480) foi usada como uma célula alvo. Tal como mostrado nas Figs. 6A a 6C, nenhuma atividade citotóxica significativa de células T-CAR anti-FITC (T-CAR FITC) foi reconhecida contra quaisquer células alvo, as quais foram quase do mesmo nível daquelas das células T não transgênicas (não infecção). Por outro lado, as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 (T-CAR GM2) exibiram citotoxicidade contra as células que expressam GM2 (Y-MESO8A e KMS11), porém não exibiram citotoxicidade contra as células que não expressam GM2 (SW480). Com base na descrição acima, foi confirmado que as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 induzem a atividade citotóxica especificamente contra GM2. Nas Figs. 6A a 6C, um eixo lateral dos gráficos representa uma proporção de efectoras (células T) para direcionar (célula tumoral) em uma proporção E / T, e um eixo vertical representa a atividade citotóxica (%).

(Ensaio de co-cultura)

[180] Tal como mostrado na Fig. 4, as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foram recuperadas no dia

7, e, em uma placa de cultura de células de 24 poços, foram co-cultivadas com uma linhagem de célula tumoral positiva para GM2 ou uma linhagem de célula tumoral negativa para GM2 em uma incubadora a 37 °C após o ajuste de uma proporção células efetoras:células tumorais de 1:1 a 1:3. A atividade citotóxica foi observada microscopicamente 2 ou 3 dias após o início da co-cultura e IFN- γ produzida no sobrenadante da cultura foi medido usando um kit ELISA para IFN- γ comercialmente disponível (produzido por BioLegend). Como os controles para as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19, células T anti-FITC que expressam CAR e células T não transgênicas foram usadas.

[Resultados]

[181] Os resultados são mostrados nas Figs. 7 a 9. As Figs. 7 e 8 mostram os resultados nos quais a linhagem celular de mesotelioma maligno (Y-meso8A, MSTO221H) foi usada como uma célula alvo e a Fig. 9 mostra os resultados nos quais a linhagem celular de câncer de cólon (SW480) foi usada como uma célula alvo. Tal como mostrado nas Figs. 7 a 9, na co-cultura das células T anti-FITC que expressam CAR (T-CAR FITC) controle ou células T não transgênicas (não infecção) com células tumorais alvo, observou-se que todas as células tumorais alvo cresceram pelo mesmo nível como nos poços com apenas tumor.

[182] Por outro lado, nas células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 (T-CAR GM2), diferenças no crescimento do tumor foram observadas dependendo do tipo de célula tumoral alvo. Na co-cultura com células alvo negativas para GM2 (SW 480: Fig. 9), células tumorais alvo cresceram pelo mesmo nível como nos poços com apenas tumor. Por outro

lado, quando co-cultivadas com células tumorais positivas para GM2 (Y-meso8A: Fig. 7 e MSTO221H: Fig. 8), o número de células tumorais claramente diminuiu quando comparado aos poços com apenas tumor e os poços de co-cultura com células controle.

[183] Com base nestes resultados, foi confirmado que células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 danifica células tumorais de uma maneira antígeno específica, como no ensaio de liberação de 51Cr. Em adição, tal como mostrado na Fig. 10, no ELISA de IFN- γ usando um sobrenadante após a co-cultura, a produção de IFN- γ foi confirmada apenas no co-sobrenadante de cultura das células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 e as células alvo positivas para GM2 (MSTO221H e Y-meso8A).

[Exemplo 6] Efeito terapêutico em modelo tumoral

(Administração de células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 a camundongos irradiados com raios X)

[184] Camundongos NOD / SCID / IL2rgKO (NSG), os quais são camundongos imunodeficientes, foram irradiados com 2 Gy de raios X e, então, inoculados com 1×10^4 de MSTO211H que expressa luciferase intraperitonealmente ou intratoracicamente. Após um dia, 2.5×10^7 de células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 (1×10^7 de células para células nas quais a expressão de CAR foi confirmada) ou o mesmo número de células T não transgênicas como um controle foram administradas intravenosamente para este grupo de modelo de tumor intraperitoneal (n = 2) ou grupo de modelo de tumor intratorácico (n = 3). O dia da administração celular foi considerado dia 0 e um volume do tumor (= intensidade de luminescência devido a atividade da

luciferase) foi avaliado ao longo do tempo usando sistema de imageamento IVIS (produzido por Perkin Elmer).

[Resultados]

[185] Os resultados das mudanças no volume do tumor dos camundongos são mostrados nas Figs. 11A e 11B. A Fig. 11A mostra um resultado em um modelo de tumor intratorácico e a Fig. 11B mostra um resultado em um modelo de tumor intraperitoneal. Tal como mostrado na Fig. 11A, no modelo de tumor intratorácico, o crescimento do tumor foi confirmado no grupo (não infecção) ao qual as células T não transgênicas foram administradas, porém nenhum crescimento aparente do tumor foi confirmado no grupo (T-CAR GM2) ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foram administradas. Em adição, tal como mostrado na Fig. 11B, no modelo de inoculação de tumor intraperitoneal, o crescimento do tumor foi observado até o dia 3 no grupo (T-CAR GM2) ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foram administradas, porém o tumor gradualmente encolheu a partir do dia subsequente. Com base nestes resultados, tornou-se claro que as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 exibiram excelente atividade antitumoral em ambos o modelo de tumor intratorácico e o modelo de tumor intraperitoneal.

(Administração de células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 a camundongos não irradiados com raios X)

[186] Em seguida, um efeito antitumoral em um modelo no qual um camundongo NSG foi intratoracicamente inoculado com um tumor sem pré tratamento com irradiação de raios X foi examinado. A cavidade torácica foi inoculada com 1×10^4 de MSTO211H que expressa luciferase e, no dia seguinte, 1.6

$\times 10^7$ células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 (1×10^7 células para o caso de células que expressam CAR) ou o mesmo número de células T não transgênicas como um controle foram administradas intravenosamente (o grupo ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foram administradas: $n = 6$, e o grupo ao qual as células T não transgênicas foram administradas: $n = 5$). O dia da administração celular foi considerado dia 0 e o crescimento do tumor foi avaliado ao longo do tempo usando um sistema de imageamento IVIS tal como descrito acima.

[Resultados]

[187] Os resultados das mudanças no volume do tumor dos camundongos são mostrados na Fig. 12. Tal como mostrado na Fig. 12, no grupo (não infecção) ao qual as células T não transgênicas foram administradas, os tumores cresceram gradualmente. Por outro lado, no grupo (T-CAR GM2) ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foram administradas, os tumores mostraram uma tendência a crescer até o dia 9, porém, a partir do dia subsequente, os tumores não cresceram exceto para um camundongo e desapareceu. Foi confirmado que as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 induzem um excelente efeito antitumoral, como no modelo acima mencionado submetido ao pré-tratamento com irradiação por raios X.

[Exemplo 7] Efeito terapêutico em modelo tumoral

(Produção de células T anti-GM2 que expressam CAR)

[188] Um vetor anti-GM2 que expressa CAR foi produzido com a mesma configuração do vetor CAR anti-GM2 que expressa IL-7 / CCL19 exceto pelo fato de que nenhum fragmento de DNA IL-7-F2A-CCL19 estava contido. Este vetor anti-GM2 que

expressa CAR foi transduzido em células T da mesma maneira do Exemplo 1 e, assim, células T anti-GM2 que expressam CAR foram obtidas.

(Administração de células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 ou células T anti-GM2 que expressam CAR a camundongos)

[189] Camundongos NOD / SCID / IL2rgKO (NSG), os quais são camundongos imunodeficientes, foram inoculados com 1×10^4 MSTO211H que expressa intratoracicamente. Após um dia, 2.2×10^6 células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 (1×10^6 células por células nas quais a expressão de CAR foi confirmada), o mesmo número de células T anti-GM2 que expressam CAR (1×10^6 células por células nas quais a expressão de CAR foi confirmada), ou o mesmo número de células T não transgênicas como um controle foram administradas intravenosamente para este grupo de modelo de tumor intratorácico. O dia da administração celular foi considerado dia 1 e um volume de tumor (= intensidade de luminescência devido à atividade da luciferase) foi avaliada ao longo do tempo usando um sistema de imageamento IVIS (produzido por Perkin Elmer).

[Resultados]

[190] Resultados das mudanças no volume do tumor de camundongos são mostrados na Fig. 13. Na Fig. 13, "x" indica que um camundongo morreu. Tal como mostrado na Fig. 13, no modelo de tumor intratorácico, o crescimento do tumor foi confirmado ao longo do tempo no grupo (não infecção) ao qual as células T não transgênicas foram administradas, e nenhum camundongo sobreviveu no dia 57. Mesmo no grupo (T-CAR GM2 (-) IL-7 / CCL19) ao qual as células T anti-GM2 que expressam

CAR foram administradas, os tumores cresceram ao longo do tempo, porém a supressão no crescimento do tumor foi observada quando comparada ao grupo ao qual as células T não transgênicas foram administradas. Por outro lado, no grupo (T-CAR GM2 (+) IL-7 / CCL19) ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foram administradas, o crescimento do tumor foi suprimido quando comparado aos outros grupos e os camundongos sobreviveram mesmo após o dia 70.

[191] A Fig. 14 é um gráfico que mostra as mudanças na intensidade de luminescência na Fig. 13. No gráfico da Fig. 14, um eixo lateral indica o número de dias passados desde a inoculação intratorácica de células tumorais no camundongo, e um eixo vertical indica a intensidade de luminescência ($\times 10^6$ fótons / sec) de células tumorais. No grupo (não infecção) ao qual as células T não transgênicas foram administradas e o grupo (T-CAR GM2 (-) IL-7 / CCL19) ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR foram administradas, nenhum camundongo sobreviveu no dia 57 e não houve marcações subsequentes. Na Fig. 14, pode ser confirmado que o crescimento do tumor é levemente suprimido no grupo (T-CAR GM2 (-) IL-7 / CCL19) ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR foram administradas quando comparado ao grupo (não infecção) ao qual as células T não transgênicas foram administradas. Por outro lado, no grupo (T-CAR GM2 (+) IL-7 / CCL19) ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foram administradas, o crescimento do tumor foi suprimido dentro de uma faixa substancialmente constante.

[192] Em adição, a Fig. 15 é um gráfico o qual mostra a transição em uma taxa de sobrevivência de camundongos. No

gráfico da Fig. 15, um eixo lateral indica o número de dias passados desde a inoculação intratorácica das células tumorais no camundongo e um eixo vertical indica uma taxa de sobrevivência (%) de camundongos. Tal como mostrado na Fig. 15, foi confirmado que, no grupo (T-CAR GM2 (-) IL-7 / CCL19) ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR foram administradas, um período de sobrevivência tendeu a se estender um pouco quando comparado ao grupo (não infecção) ao qual as células T não transgênicas foram administradas. Por outro lado, foi confirmado que, no grupo (T-CAR GM2 (+) IL-7 / CCL19) ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 foram administradas, a taxa de sobrevivência foi melhorada (um efeito de extensão do período de sobrevivência) quando comparada ao grupo ao qual as células T não transgênicas foram administradas e o grupo ao qual as células T anti-GM2 que expressam CAR foram administradas.

[193] Com base nestes resultados, se tornou claro que as células T anti-GM2 que expressam CAR-IL-7 / CCL19 apresentaram excelente atividade antitumoral.

[Aplicação Industrial]

[194] De acordo com a presente invenção, um novo CAR que direciona um antígeno de tumor sólido como um antígeno alvo e uma célula T-CAR que é eficaz contra tumores sólidos são fornecidos. As células T-CAR da presente invenção podem ser aplicadas ao tratamento ou prevenção de tumores sólidos que expressam GM2, tais como câncer de pulmão, neuroblastoma, glioma, melanoma, mesotelioma maligno e mieloma.

[195] O presente pedido se baseia no pedido de patente japonês nº 2017-61461 depositado em 27 de março de 2017, o conteúdo do qual é incorporado no presente relatório

descritivo por referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo compreendendo uma sequência de base que codifica o receptor de antígeno quimérico, uma sequência de base que codifica IL7, e uma sequência de base que codifica CCL19, **CARACTERIZADO** pelo fato do receptor de antígeno quimérico compreender:

uma região de ligação ao antígeno alvo;

uma região transmembrana; e

uma região de transdução de sinal de ativação de linfócitos T;

em que uma sequência de base que codifica a região de ligação ao antígeno alvo compreende uma sequência de base que codifica uma região variável de cadeia pesada de um anticorpo anti-gangliosídeo GM2 e uma sequência de base que codifica uma região variável de cadeia leve do anticorpo anti-gangliosídeo GM2

em que a sequência de base que codifica a região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-gangliosídeo GM2 compreende a sequência de base estabelecida nas SEQ ID NO: 1, 49, 51 ou 53,

em que a sequência de base que codifica a região variável de cadeia leve do anticorpo anti-gangliosídeo GM2 compreende a sequência de base estabelecida nas SEQ ID NO: 3, 50, 52 ou 54,

em que a região transmembrana é selecionada de uma cadeia α e uma cadeia β de um receptor de linfócitos T, CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154 ou GITR; e

em que a região de transdução do sinal de ativação de linfócitos T é selecionada de CD2, CD4, CD5, CD8, CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), ICOS, CD154, HVEM, GITR, cadeia γ associada ao receptor Fc, ou de proteínas possuindo um motivo de ativação do imunorreceptor à base de tirosina (ITAM) de CD3 ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ ,

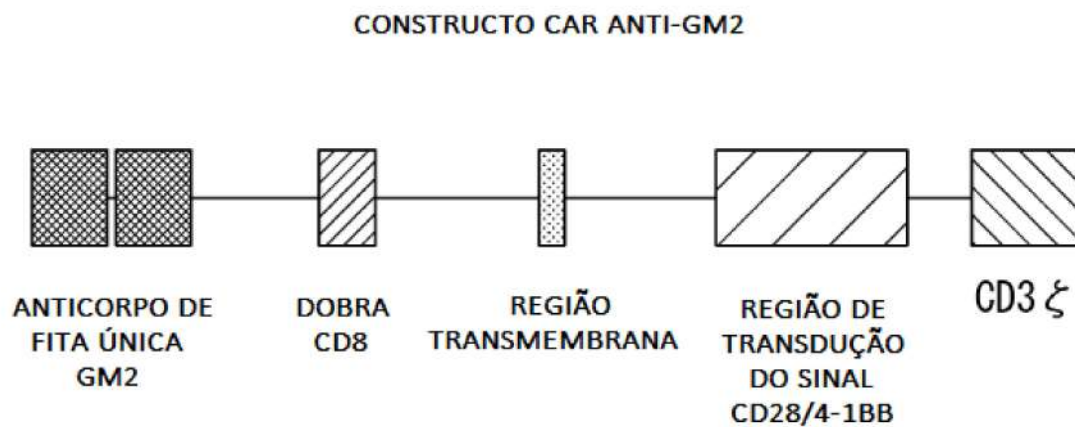
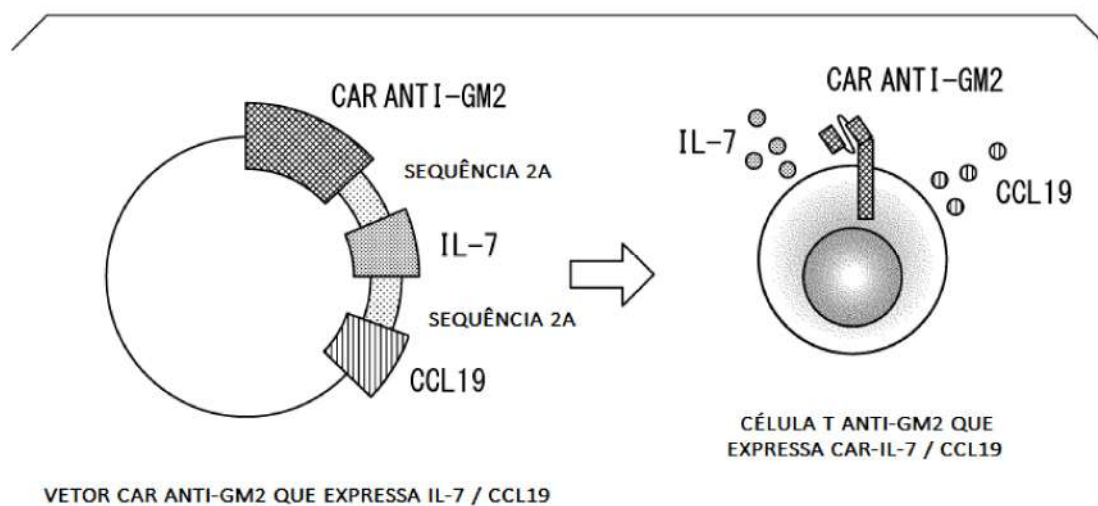
CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b ou CD66d.

2. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da região de ligação ao antígeno alvo ser um anticorpo de fita única (scFv) do anticorpo anti-gangliosídeo GM2.

3. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma sequência de base que codifica scFv do anticorpo anti-gangliosídeo GM2 compreende a sequência de base que é selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 9, 11, 13 e 15.

4. Vetor **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender o polinucleotídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3.

5. Método para a produção de uma célula que expressa um receptor de antígeno quimérico **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a introdução do polinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, ou o vetor, conforme definido na reivindicação 4, dentro de uma célula.

**FIGURA 1A****FIGURA 2A**

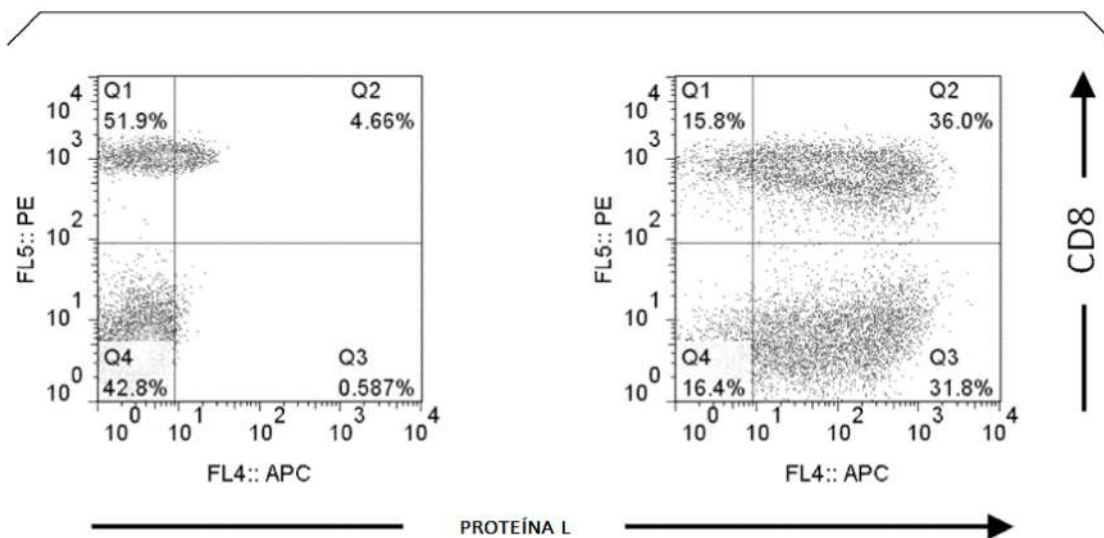


FIGURA 2

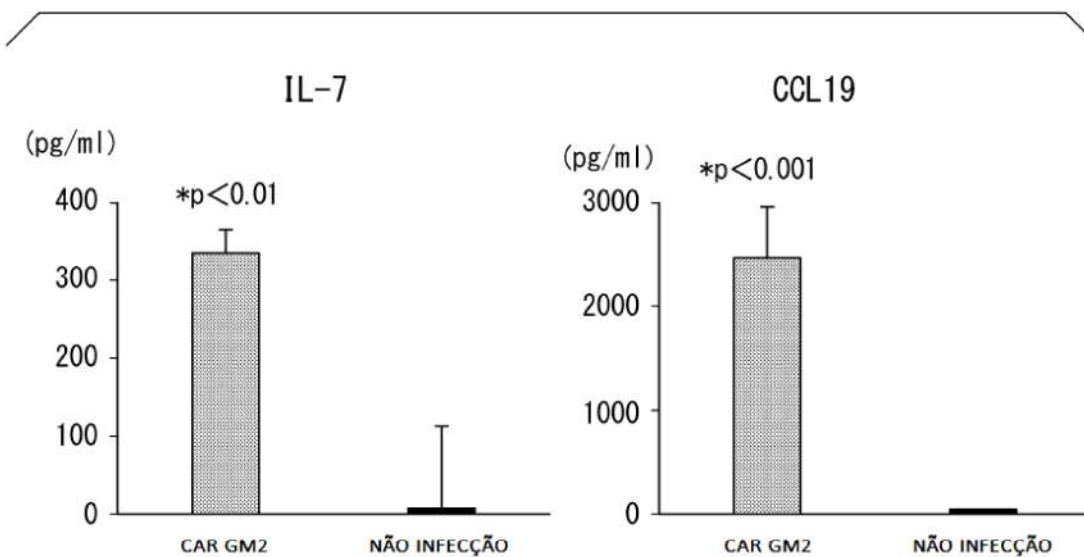
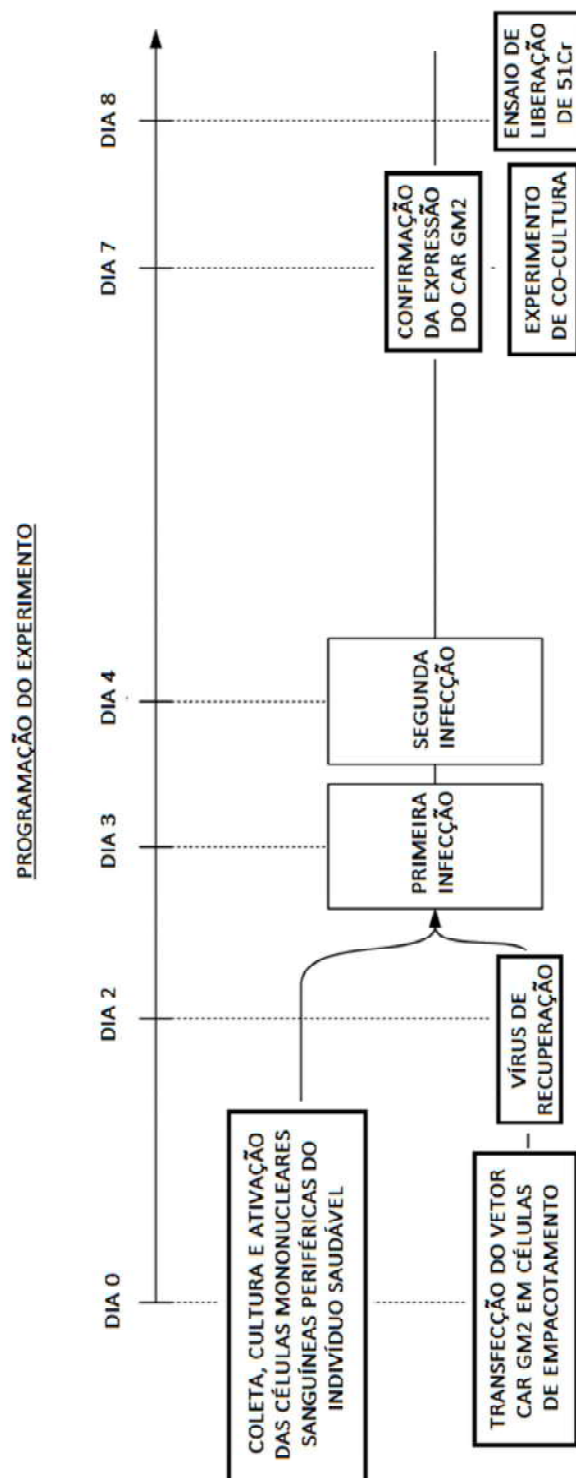


FIGURA 3

**FIGURA 4**

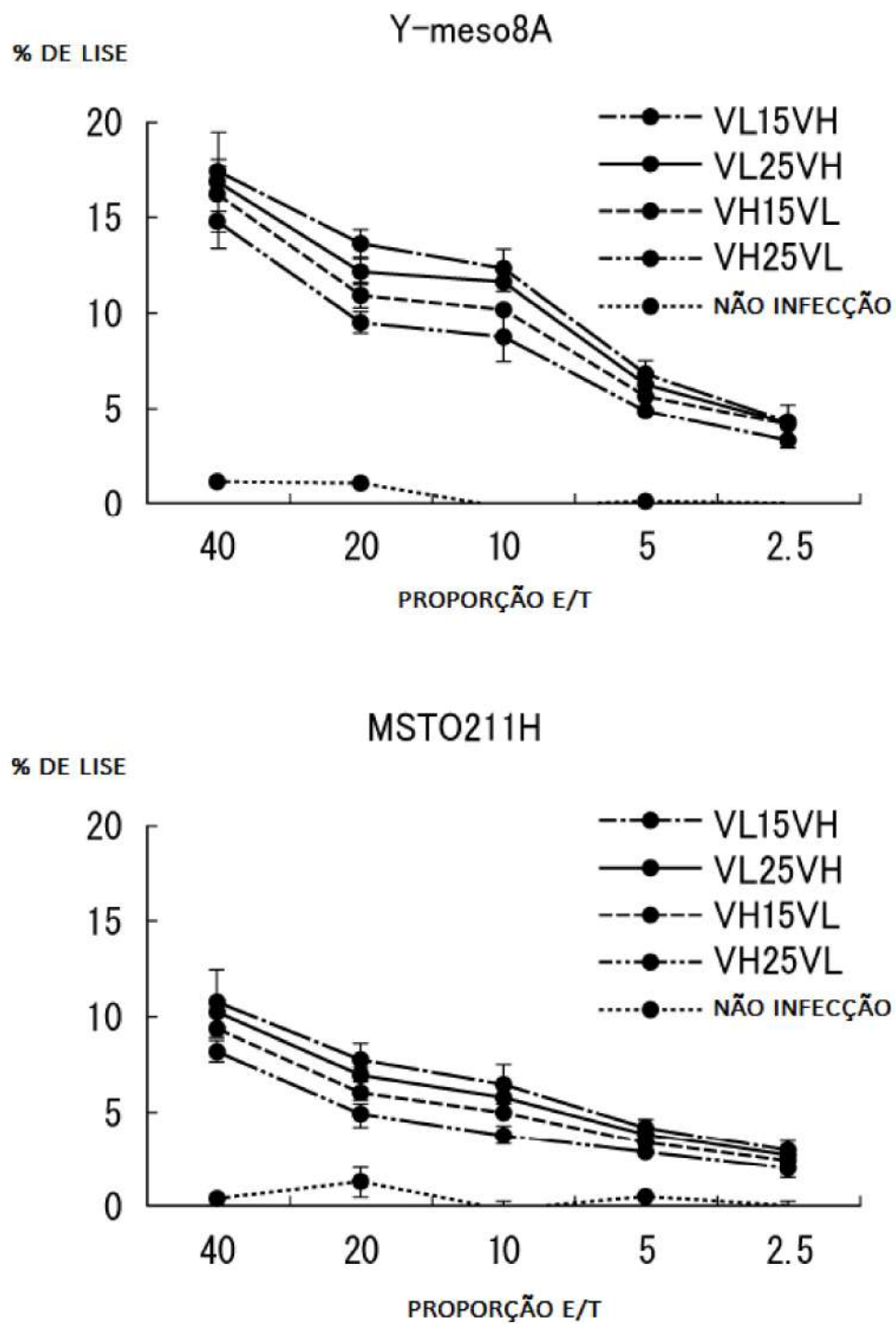


FIGURA 51

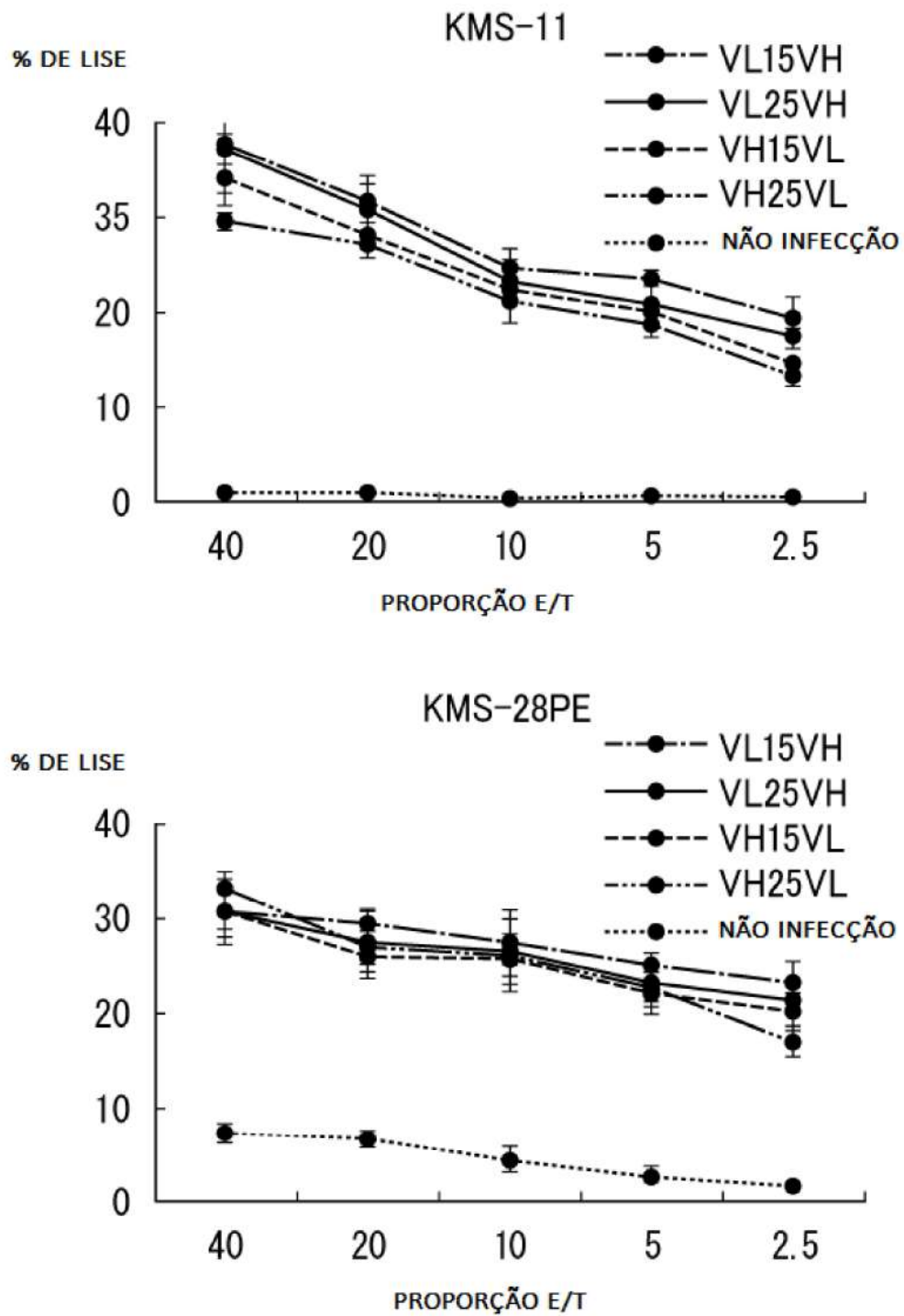


FIGURA 5B

FIGURA 6A

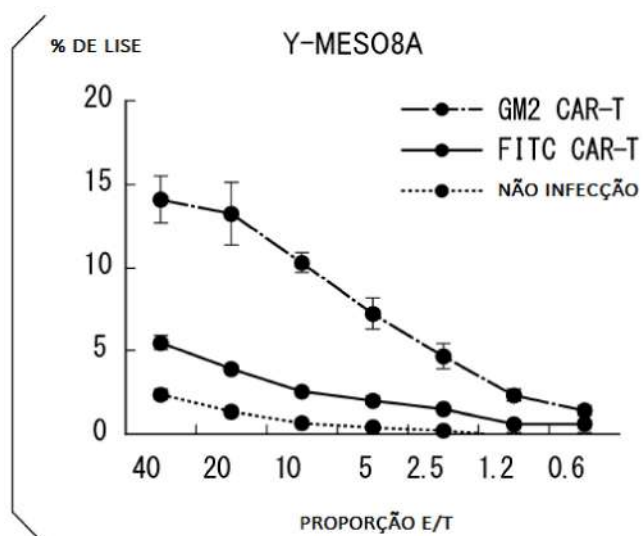


FIGURA 6B

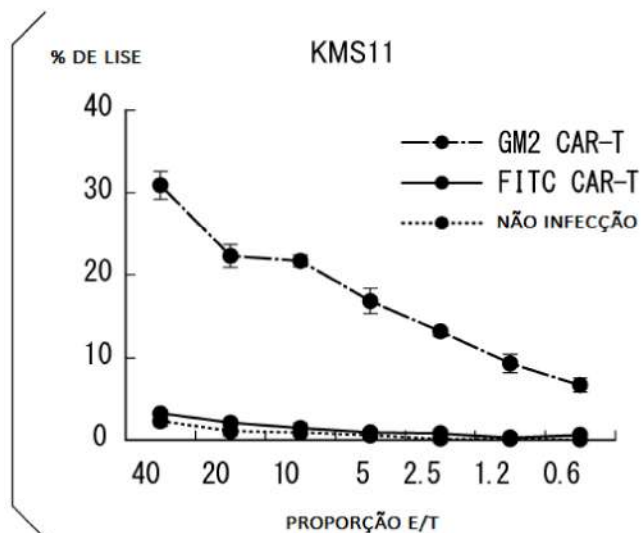
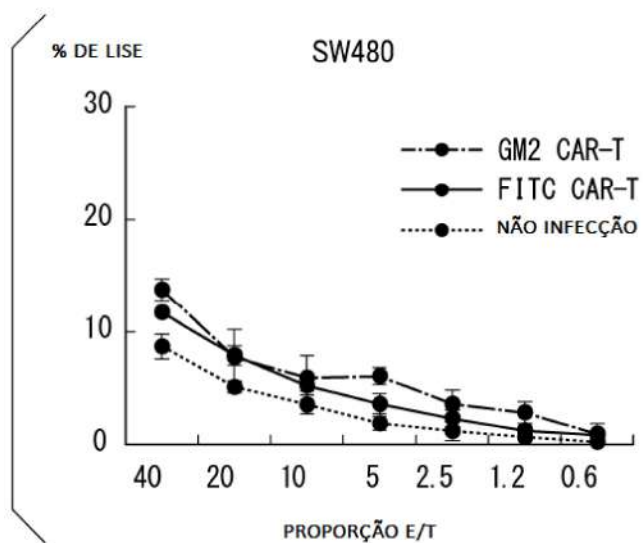


FIGURA 6C



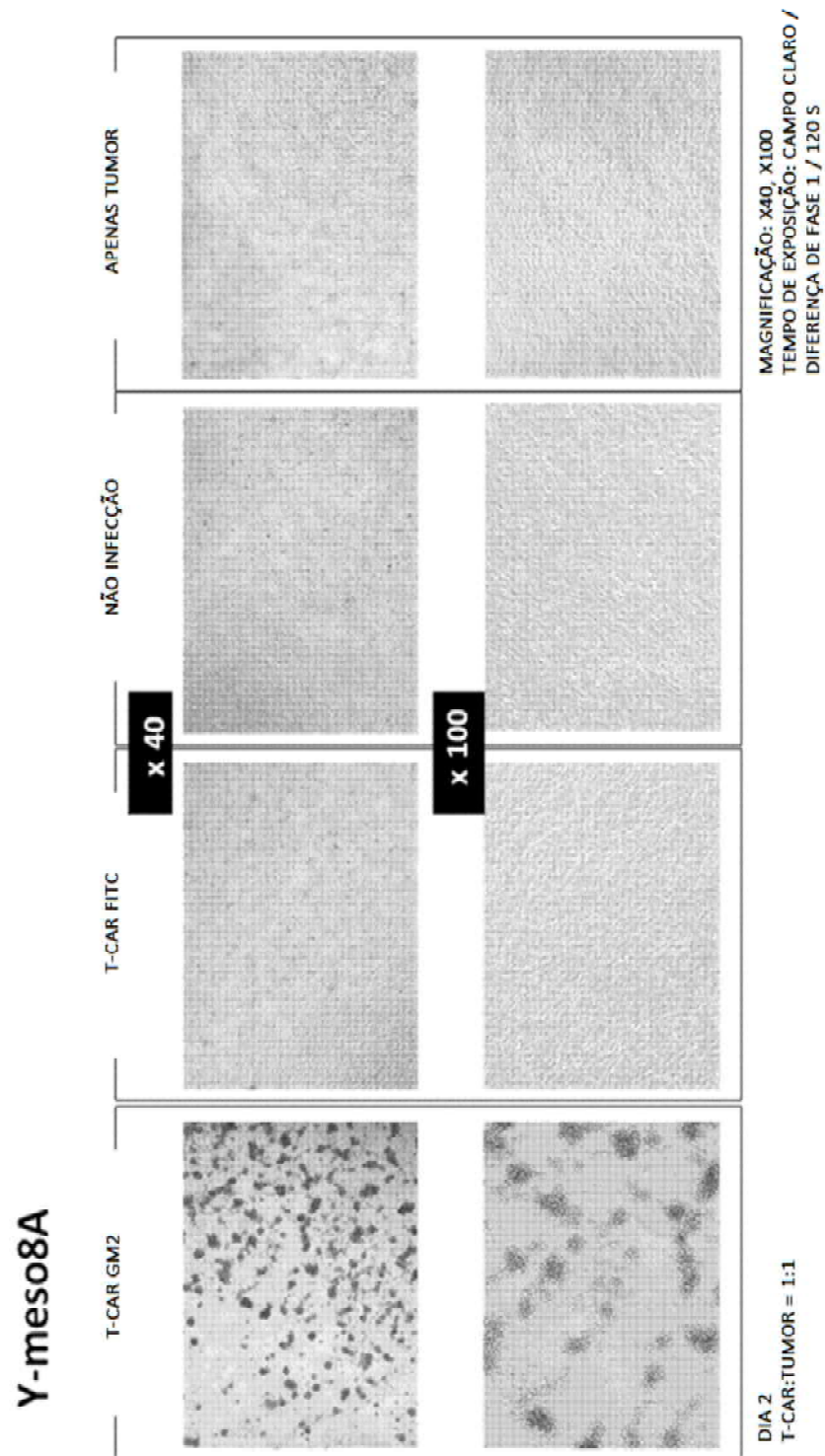


FIGURA 7

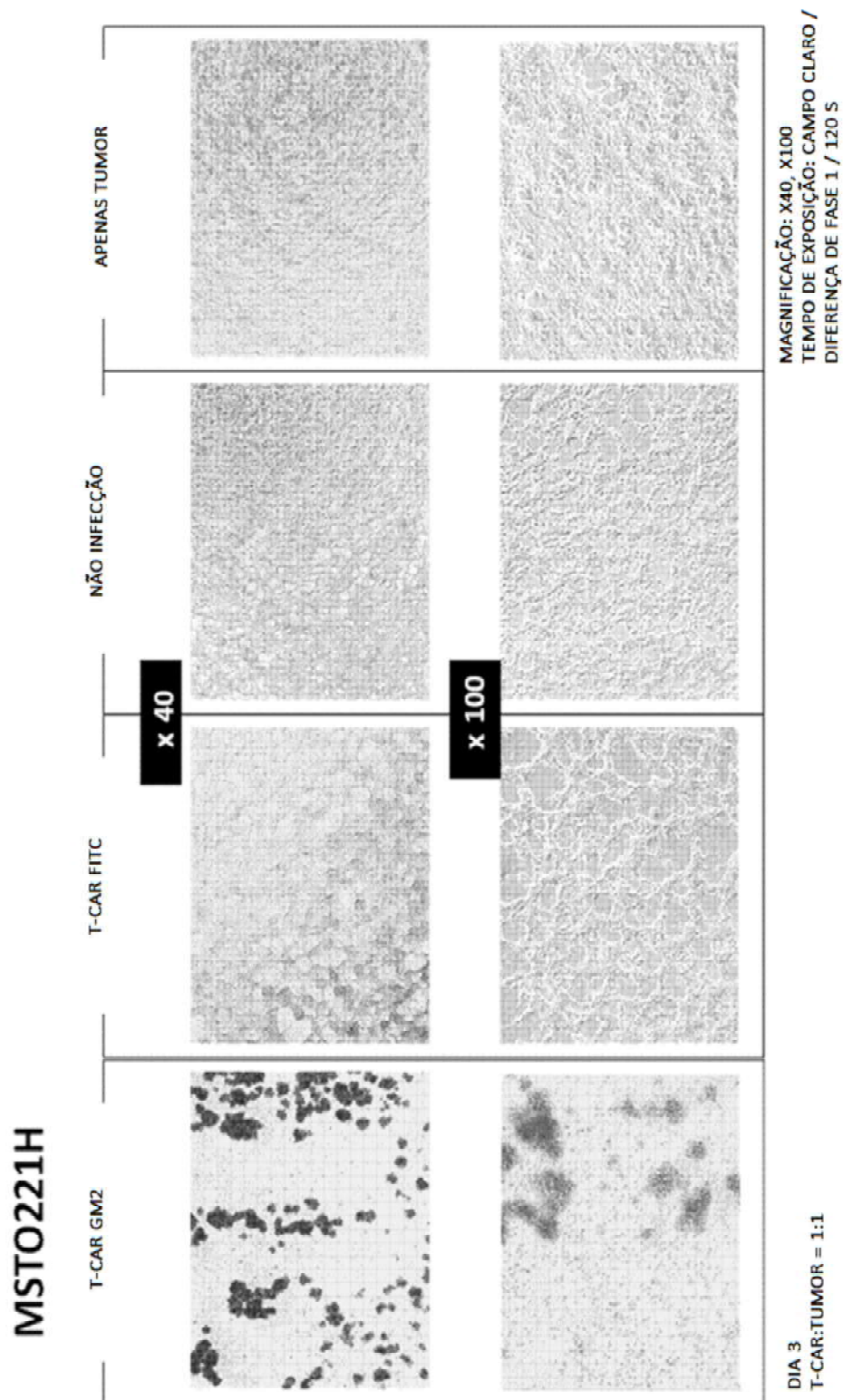


FIGURA 8

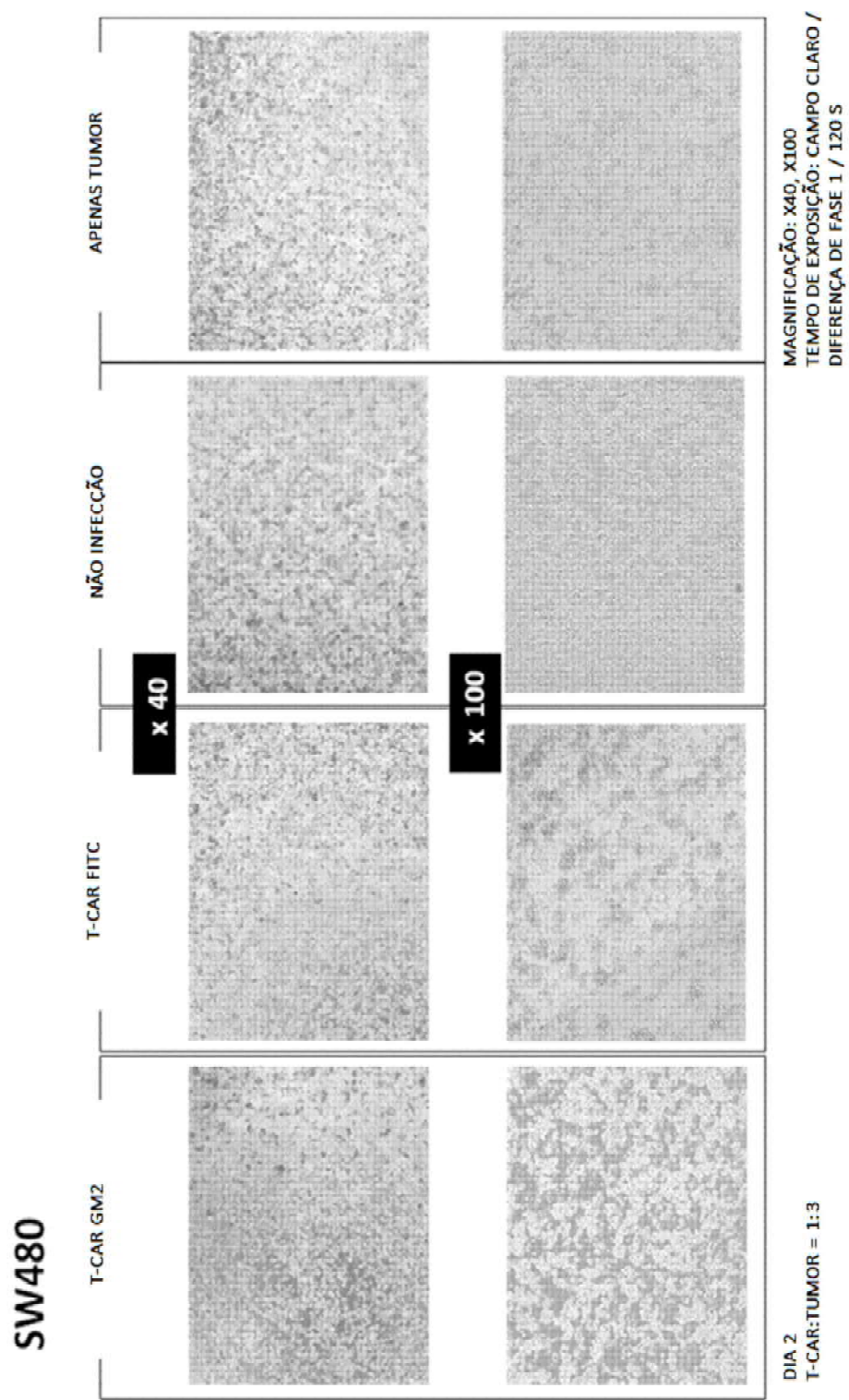


FIGURA 9

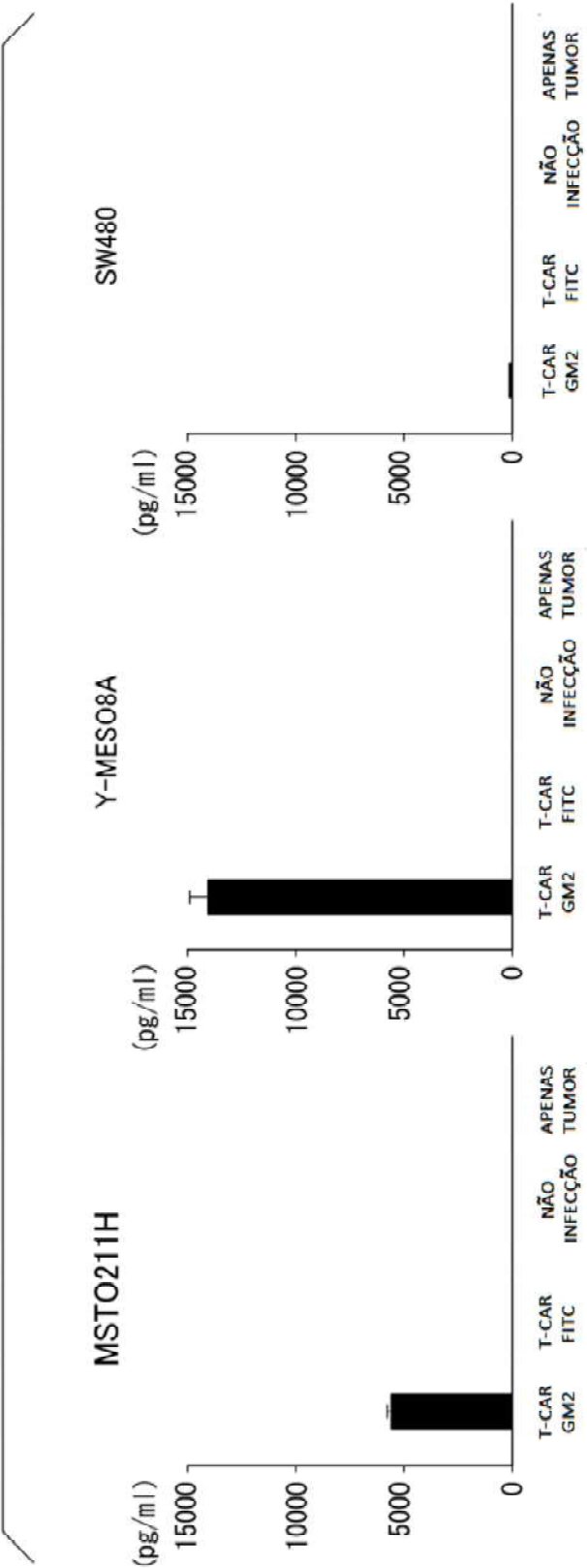
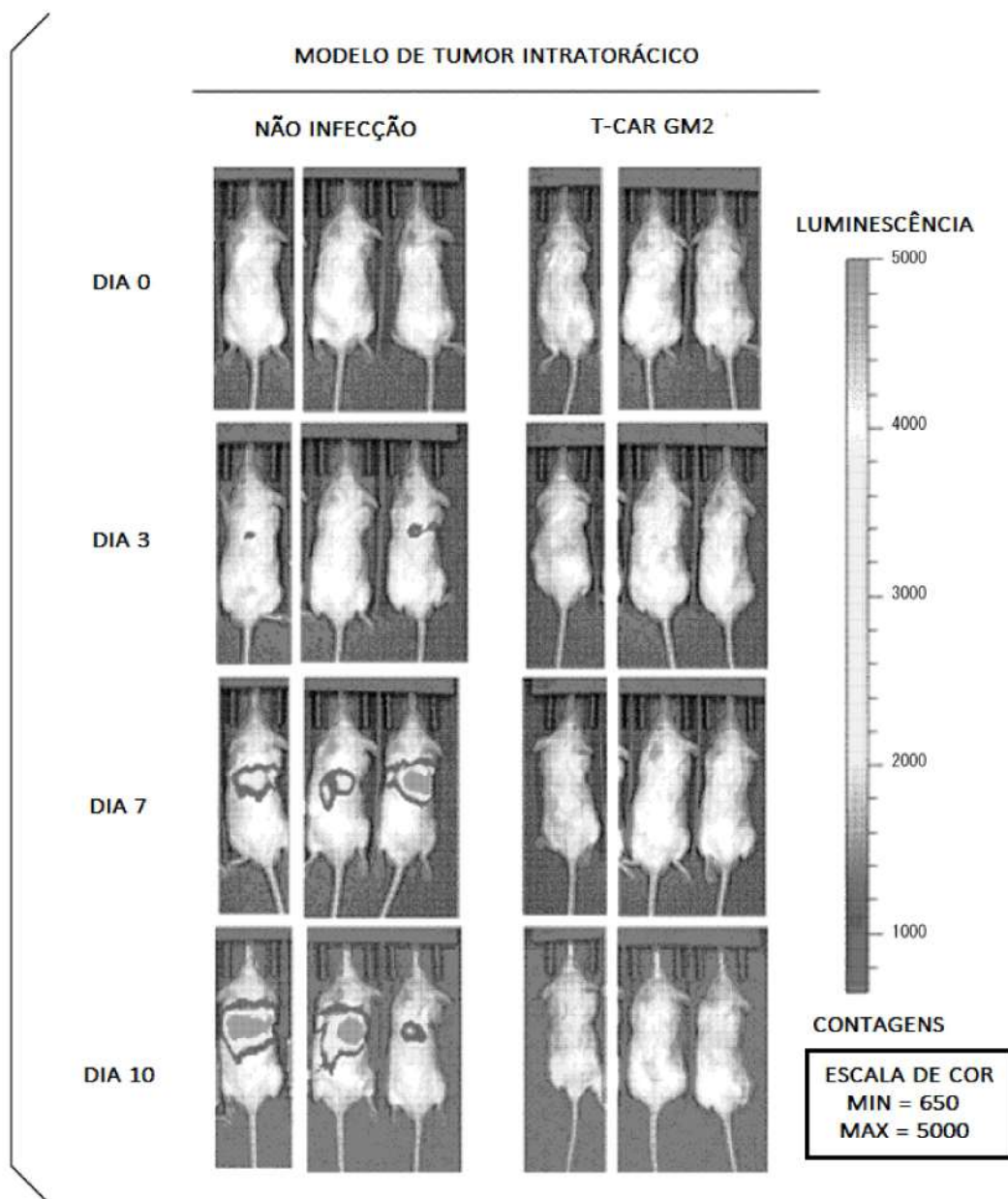
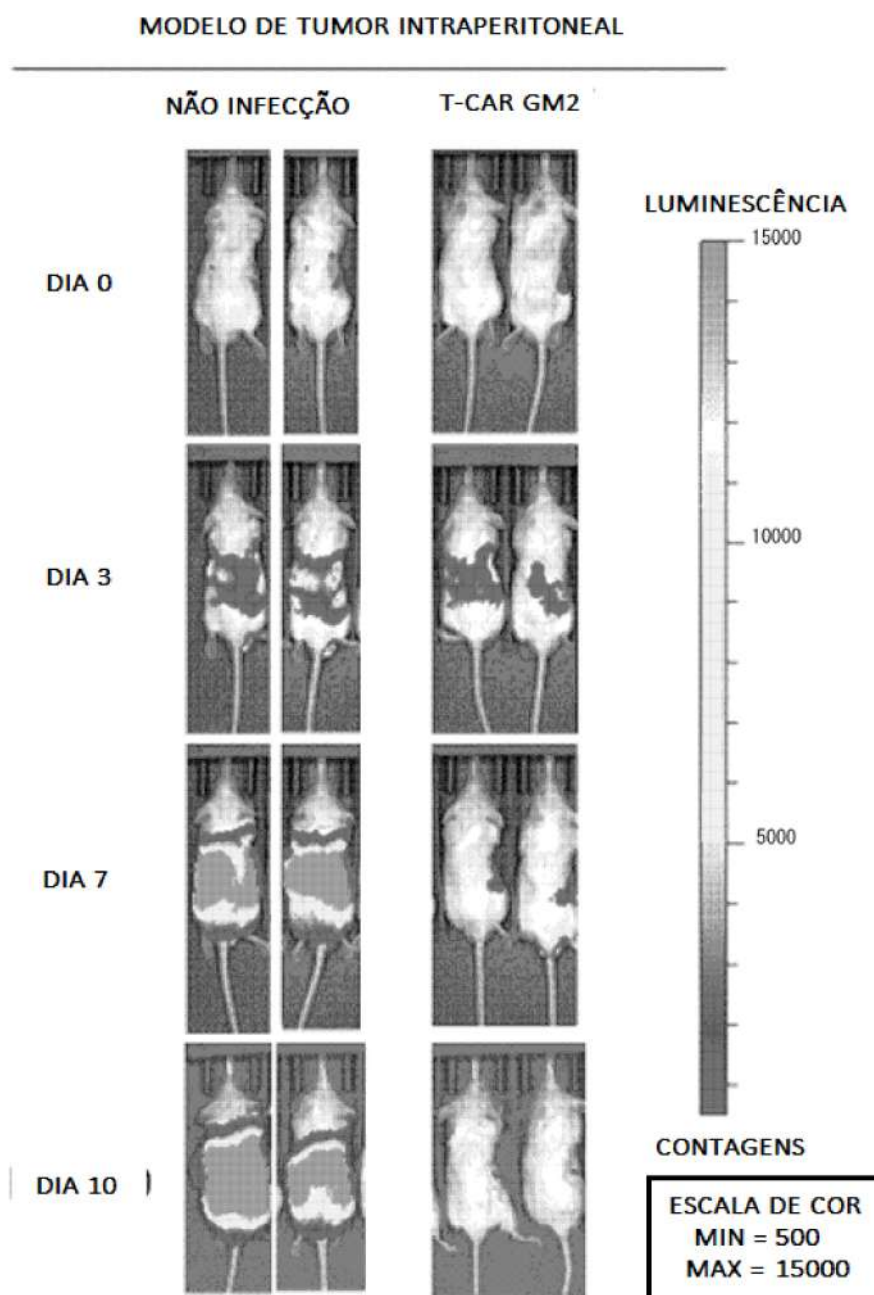


FIGURA 10

**FIGURA 11A**

**FIGURA 11B**

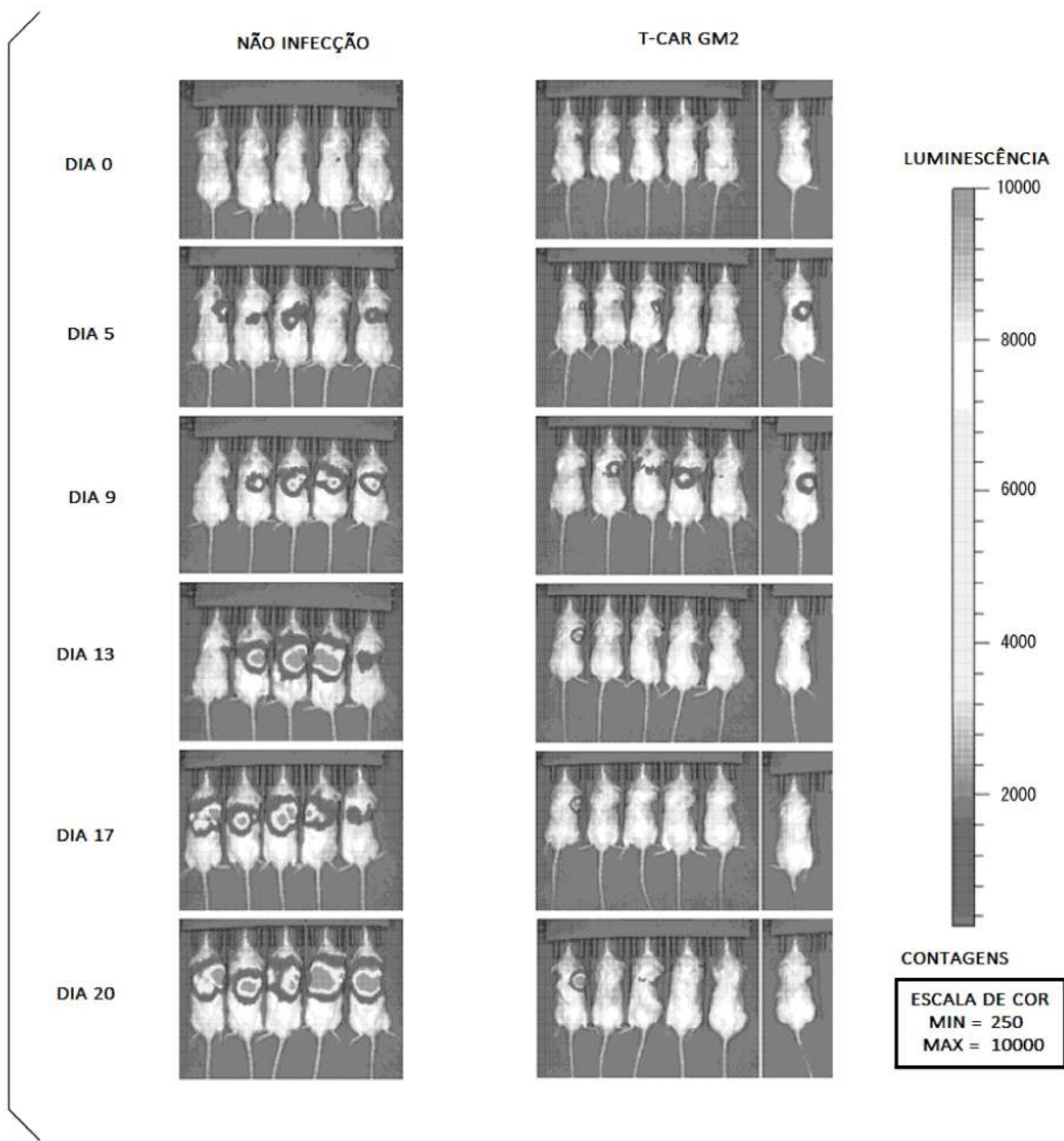


FIGURA 12

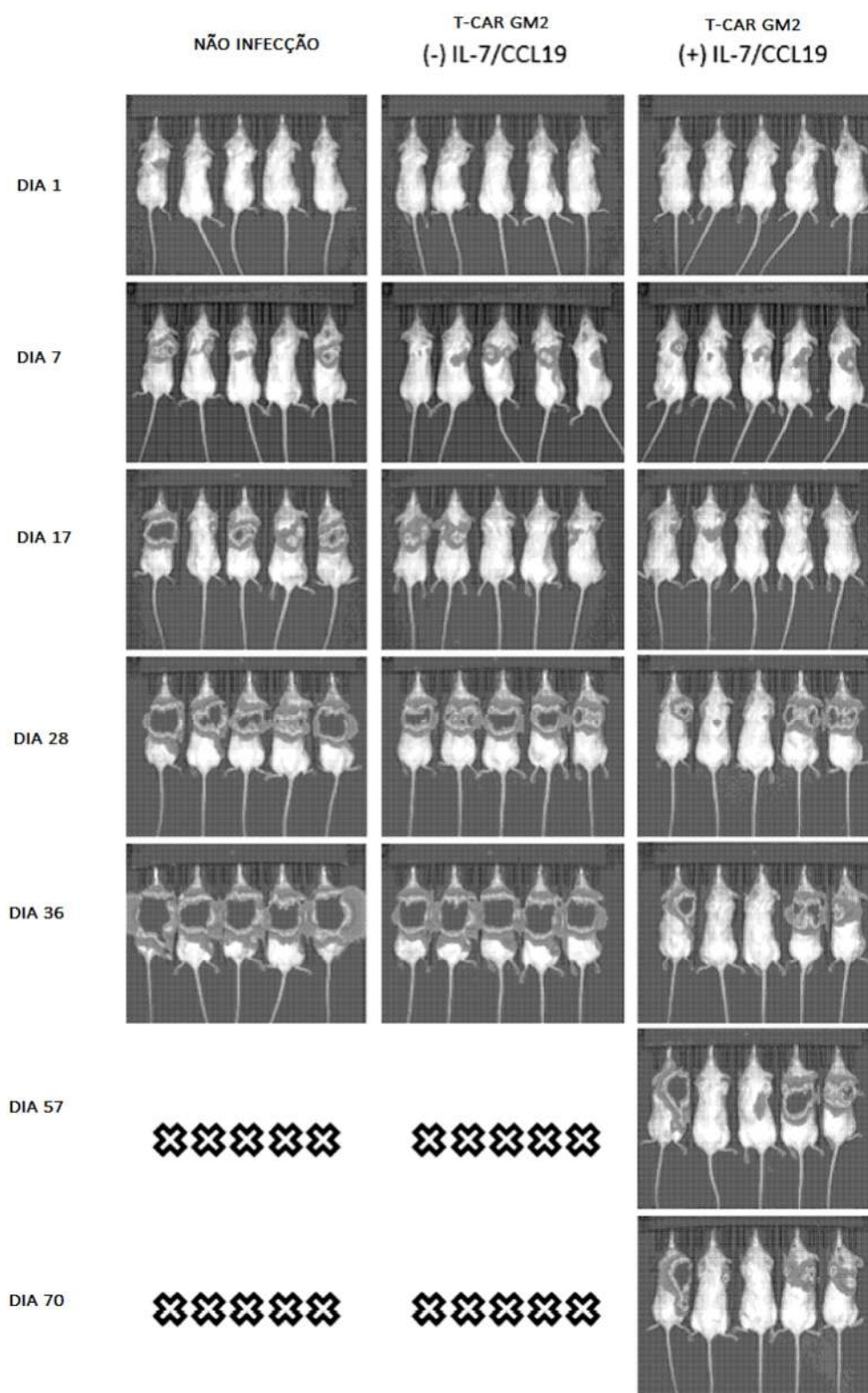


FIGURA 13

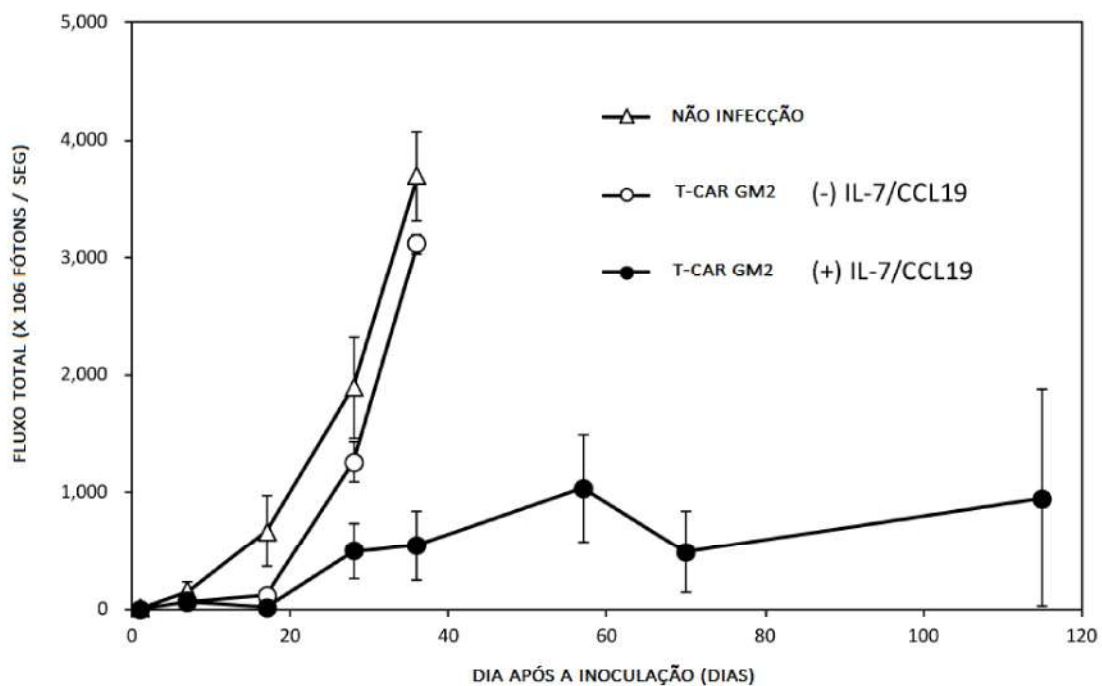


FIGURA 14

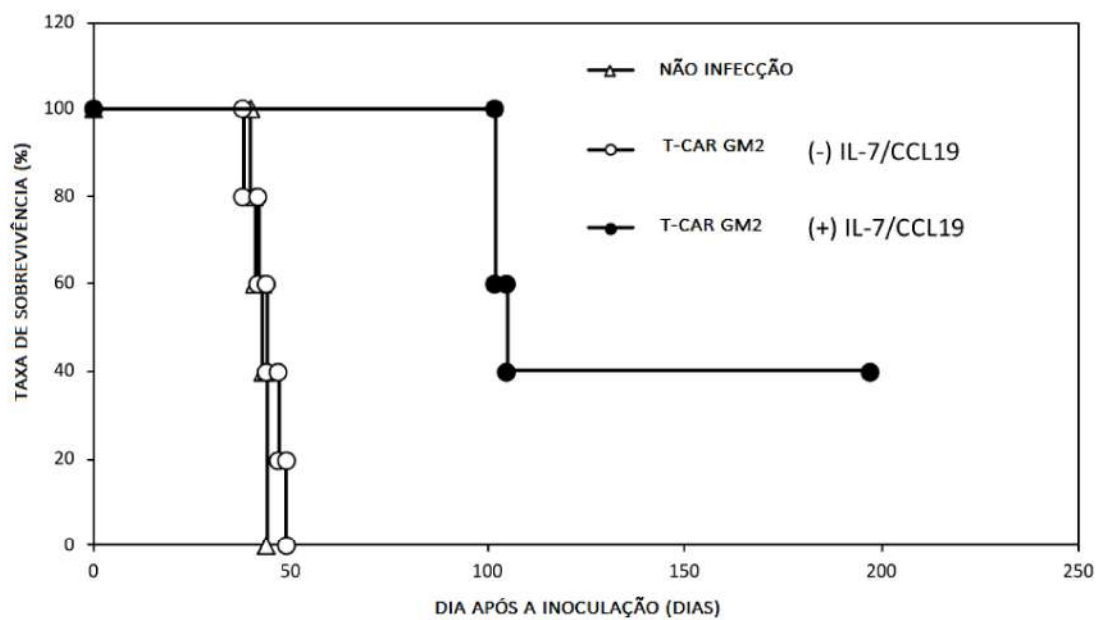


FIGURA 15