

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7395249号
(P7395249)

(45)発行日 令和5年12月11日(2023.12.11)

(24)登録日 令和5年12月1日(2023.12.1)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
請求項の数 29 (全51頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2018-509542(P2018-509542)	(73)特許権者	517215973
(86)(22)出願日	平成28年8月19日(2016.8.19)		オートラス リミテッド
(65)公表番号	特表2018-523484(P2018-523484 A)		イギリス国 イングランド ダブリュー 1
(43)公表日	平成30年8月23日(2018.8.23)		2 7エフピー, ロンドン, ウッド レ
(86)国際出願番号	PCT/GB2016/052563	(74)代理人	100078282
(87)国際公開番号	WO2017/029511		弁理士 山本 秀策
(87)国際公開日	平成29年2月23日(2017.2.23)	(74)代理人	100113413
審査請求日	令和1年6月19日(2019.6.19)		弁理士 森下 夏樹
審判番号	不服2021-11784(P2021-11784/J 1)	(74)代理人	100181674
審判請求日	令和3年9月6日(2021.9.6)		弁理士 飯田 貴敏
(31)優先権主張番号	1514874.5	(74)代理人	100181641
(32)優先日	平成27年8月20日(2015.8.20)		弁理士 石川 大輔
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	230113332
	最終頁に続く		弁護士 山本 健策
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R)、および第 2 の C A R を含む T 細胞であって、ここで、前記第 1 および第 2 の C A R は、同じリガンド上の異なるエピトープに結合し、前記リガンドが、可溶性リガンドである、T 細胞。

【請求項 2】

前記リガンドが、サイトカイン、ケモカインまたは代謝産物である、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 3】

各 C A R が、

- (i) 抗原結合ドメイン；
- (i i) スペーサー；および
- (i i i) 膜貫通ドメイン

を含み、ここで、前記第 1 および第 2 の C A R のスペーサーは異なる、請求項 1 または 2 に記載の T 細胞。

【請求項 4】

各 C A R が、

- (i) 抗原結合ドメイン；
- (i i) スペーサー；および
- (i i i) 膜貫通ドメイン

を含み、ここで、前記第 1 および / または第 2 の C A R のスパーサーは、三量体または多価である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 5】

細胞表面抗原に結合する第 3 の C A R を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の T 細胞。

【請求項 6】

前記第 1 および / または第 2 ならびに第 3 の C A R が、それぞれ、

(i) 抗原結合ドメイン；

(i i) 膜貫通ドメイン；および

(i i i) エンドドメイン

を含み、ここで、前記リガンドが前記第 1 および第 2 の C A R に結合され、かつ細胞表面抗原が前記第 3 の C A R に結合されたとき、細胞の活性化が生じるように、前記第 3 の C A R のエンドドメインと前記第 1 および / または第 2 の C A R のエンドドメインは、相補的である、請求項 5 に記載の T 細胞。

【請求項 7】

前記第 3 の C A R が、C D 3 ゼータエンドドメインを含み、前記第 1 および / または第 2 の C A R が、C D 2 8 エンドドメインおよび O X 4 0 または 4 1 B B エンドドメインを含む、請求項 6 に記載の T 細胞。

【請求項 8】

前記第 3 の C A R が、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) に結合し、前記第 1 および第 2 の C A R が、前立腺特異的抗原 (P S A) に結合する、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の T 細胞。

【請求項 9】

前記第 1 および第 2 の C A R が前記リガンドに結合したとき、前記細胞表面抗原に結合する前記第 3 の C A R によって引き起こされる細胞の活性化が阻害されるように、前記第 1 および / または第 2 の C A R が、阻害性エンドドメインを含み、ここで、該阻害性エンドドメインが、P T P N 6 または免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ (I T I M) の触媒ドメインであるかまたはそれを含む、請求項 5 に記載の T 細胞。

【請求項 10】

前記第 1 および第 2 の C A R が、前記可溶性リガンドに結合したとき、前記細胞表面抗原に結合する前記第 1 の C A R によって引き起こされる細胞の活性化が阻害されるように、前記第 2 の C A R が、阻害性エンドドメインを含み、ここで、該阻害性エンドドメインが、P T P N 6 または免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ (I T I M) の触媒ドメインであるかまたはそれを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の T 細胞。

【請求項 11】

前記第 1 および第 2 の C A R が、I L - 6 に結合する、請求項 9 または 10 に記載の T 細胞。

【請求項 12】

前記第 1 および / または第 2 の C A R が、阻害性エンドドメインを含み、

前記リガンドの非存在下では、前記細胞表面抗原に結合する前記第 3 の C A R によって引き起こされる細胞の活性化が阻害され；

リガンドの存在下では、前記第 1 および第 2 の C A R は凝集して前記第 3 の C A R から分離し、前記第 3 の C A R が前記細胞表面抗原に結合したとき、シグナル伝達が生じ得、ここで、該阻害性エンドドメインが、C D 4 5 または C D 1 4 8 のエンドドメインであるかまたはそれを含む、請求項 5 に記載の T 細胞。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれかにおいて規定されたような第 1 の C A R をコードする第 1 の核酸配列；および請求項 1 ~ 12 のいずれかにおいて規定されたような第 2 の C A R をコードする第 2 の核酸配列を含む、核酸構築物。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

以下の構造：

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

(ここで、

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

スペース 1 は、前記第 1 の C A R のスペースをコードする核酸配列であり；

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

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

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

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

スペース 2 は、前記第 2 の C A R のスペースをコードする核酸配列であり；

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

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

を有する請求項 1 3 に記載の核酸構築物であって、その核酸構築物は、T 細胞において発現されたとき、前記第 1 の C A R および前記第 2 の C A R が該 T 細胞表面に共発現されるように、切断部位で切断されるポリペプチドをコードする、

請求項 1 3 に記載の核酸構築物。

【請求項 1 5】

c o e x p r が、自己切断性ペプチドを含む配列をコードする、請求項 1 4 に記載の核酸構築物。

【請求項 1 6】

相同組換えを回避するために、代替的コドンが、同一または類似のアミノ酸配列をコードする配列の領域で使用される、請求項 1 4 または 1 5 に記載の核酸構築物。

【請求項 1 7】

請求項 5 ~ 9、および 1 2 のいずれかにおいて規定されたような第 3 の C A R をコードする核酸配列も含む、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれかに記載の核酸構築物。

【請求項 1 8】

請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれかに記載の核酸構築物を含む、ベクター。

【請求項 1 9】

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはトランスポゾンである、請求項 1 8 に記載のベクター。

【請求項 2 0】

i) 請求項 1 ~ 4 のいずれかにおいて規定されたような第 1 の C A R をコードする核酸配列を含むベクター；および

i i) 請求項 1 ~ 4 のいずれかにおいて規定されたような第 2 の C A R をコードする核酸配列を含むベクター

を含む、キット。

【請求項 2 1】

請求項 5 において規定されたような第 3 の C A R をコードする核酸配列を含むベクターも含む、請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の T 細胞を作製するための方法であって、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれかに記載の核酸構築物；請求項 1 8 もしくは 1 9 に記載のベクター；または請求項 2 0 もしくは 2 1 に記載のベクターのキットを T 細胞に導入する工程を含み、該細胞が、被験体から単離された試料に由来する、方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 から 1 2 のいずれかに記載の複数の T 細胞を含む、医薬組成物。

【請求項 2 4】

疾患を処置および / または予防するための請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

10

20

30

40

50

(i) 前記 T 細胞が請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれかに記載の核酸構築物；請求項 1 8 もしくは 1 9 に記載のベクター；または請求項 2 0 もしくは 2 1 に記載のベクターのキットで形質導入またはトランスフェクションされ；および

(i i) 被験体に (i) からの該細胞が投与されることを特徴とする、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

前記疾患が、がんである、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

疾患の処置および／または予防において使用するための請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

疾患を処置および／または予防するための医薬の製造における請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の T 細胞の使用。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の T 細胞を含む、疾患を処置および／または予防するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、リガンド、例えば、可溶性リガンドを認識することができるキメラ抗原受容体 (C A R) 発現細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

キメラ抗原受容体 (C A R)

若干の免疫治療剤が、治療用モノクローナル抗体 (m A b)、二重特異性 T 細胞エンゲージャーおよびキメラ抗原受容体 (C A R) を含め、がん処置での使用について記載されている。

【0003】

キメラ抗原受容体は、モノクローナル抗体 (m A b) の特異性を T 細胞のエフェクター機能に結び付けるタンパク質である。キメラ抗原受容体の通常形態は、抗原認識性アミノ末端、スパーサー、T 細胞生存および活性化シグナルを伝達する複合エンドドメインにすべて連結された膜貫通ドメインを有する I 型膜貫通ドメインタンパク質の形態である。

【0004】

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

【0005】

下記の表 1 に要約されているように、様々な C A R がインビトロおよびインビボの試験において試験されている。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

標的抗原	関連する悪性疾患
α -葉酸受容体	卵巣がん
CAIX	腎細胞癌
CD19	B細胞悪性疾患
CD20	リンパ腫およびB細胞悪性疾患
CD22	B細胞悪性疾患
CD30	リンパ腫
CD33	AML
CD44v7/8	子宮頸癌
CEA	乳がんおよび直腸結腸がん
EGP-2	複数の悪性疾患
EGP-40	直腸結腸がん
erb-B2	直腸結腸がん、乳がんおよび前立腺がん
erb-B 2,3,4	乳がんなど

10

【表 1 - 2】

FBP	卵巣がん
胎児アセチルコリン受容体	横紋筋肉腫
GD2	神経芽細胞腫
GD3	メラノーマ
Her2/neu	髄芽腫、骨肉腫、 神経膠芽腫、肺の悪性疾患
IL-13R-a2	神経膠腫、神経膠芽腫、髄芽腫(medulloblastoma)
KDR	腫瘍の血管新生
k-軽鎖	B細胞悪性疾患
LeY	癌、上皮由来腫瘍
L1 細胞接着分子	神経芽細胞腫
MAGE-A1	メラノーマ
メソテリン(Mesothelin)	様々な腫瘍
マウスCMV感染細胞	マウスCMV
MUC1	乳房、卵巣
NKG2Dリガンド	様々な腫瘍
がん胎児抗原 (h5T4)	様々な腫瘍
PSCA	前立腺癌
PSMA	前立腺/腫瘍の脈管構造
mAb IgEによって標的化されるTAA	様々な腫瘍
TAG-72	腺癌
VEGF-R2	腫瘍の血管新生

20

30

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

分離を介したT細胞の活性化

【0007】

50

T細胞の活性化は、動力的分離 (k i n e t i c s e g r e g a t i o n) として知られるプロセスによって、阻害性分子がサイズに基づいてシナプス部位から排除されるせいで生じる。T細胞受容体 (T C R) および C A R は、チロシンのリン酸化を刺激することによってT細胞シグナル伝達を引き起こす。静止T細胞では、このプロセスに関わる分子は、拡散によって繰り返し衝突している。T C R / C D 3 複合体は、L c k (膜結合性チロシンキナーゼ) によって絶えずリン酸化されており、そして続けて C D 4 5 (チロシンホスファターゼ) によって脱リン酸化されている。この連続的なリン酸化 / 脱リン酸化は、ランダムに起き、結果として、T C R の全体的なリン酸化は低く、T細胞の活性化は進まない。

【 0 0 0 8 】

10

T C R / ペプチド - M H C 複合体または C A R - 標的細胞リガンド複合体が及ぶ距離は短い。これにより、密接に接触した小領域が形成され、この小領域から、大きすぎではまらない外部ドメインを有する阻害性 C D 4 5 および C D 1 4 8 ホスファターゼ分子が排除される。

【 0 0 0 9 】

C D 4 5 の立体排除は、上記の密接に接触した領域内に捕捉される T C R / ペプチド - M H C 複合体または C A R - 標的細胞リガンド複合体のリン酸化半減期を延長する。L c k キナーゼによる I T A M のそのようなリン酸化の延長は、Z A P - 7 0 のリクルート、リン酸化によるその活性化、およびその後のアダプタータンパク質 L A T および S L P - 7 6 のリン酸化の時間を与え、T細胞の活性化に至る。

20

【 0 0 1 0 】

C A R - T細胞の活性化の分離機構の中心にあるものは、C A R が標的細胞の表面上の抗原に結合して、阻害性ホスファターゼが排除される密接に接触した領域を形成するという事実である。

【 0 0 1 1 】

ゆえに、現在まで、標的 (例えば、腫瘍細胞) 上の膜結合型抗原を認識する C A R T細胞が開発されただけであった。

【 0 0 1 2 】

可溶性腫瘍抗原

がんの発生は、まず体細胞が起因事象 (すなわち、環境損傷) を起こし、次いで、第2の事象または促進事象を起こす、多段階のプロセスとして規定されている。腫瘍微小環境は、この新生物プロセスの第2の部分に関与する欠くことのできないものである。

30

【 0 0 1 3 】

腫瘍微小環境は、種々の細胞型の間で生じているクロストークの産物である。例えば、上皮の腫瘍では、これらの細胞は、侵襲性の癌およびそのストローマエレメントを含む。極めて重要なストローマエレメントとしては、成長因子およびケモカインの分泌を介して不可欠なコミュニケーションネットワークを提供するがん関連線維芽細胞が挙げられ、このがん関連線維芽細胞は、E C M の変化を誘導するがゆえにさらなる発がんシグナルを提供してがん細胞の増殖および浸潤を強める。腫瘍関連ストローマ細胞が、がんの進行に積極的に寄与すると認識されている。ストローマエレメントは、細胞外マトリックス (E C M) 、ならびに様々な表現型の線維芽細胞、ならびに免疫細胞および炎症細胞、血管およびリンパ管および神経から構成される骨格からなる。

40

【 0 0 1 4 】

腫瘍が進行して生命を危うくする実体になるためには、腫瘍は、4つの極めて重要な能力を発揮しなければならない。第1に、移動する能力、第2に、組織マトリックス (E C M) を分解する能力、第3に、血液中で生き残る適性、および最後に、新しい組織環境において自身を確立することができる物理的品質。微小環境は、このプロセスの成功にとって極めて重要である。

【 0 0 1 5 】

がん細胞の微小環境は、転写因子をオンにする必須のシグナルを提供する。したがって

50

、必要とされる間葉系の表現型が遠位の組織に浸潤し、新しい環境を確立することを可能にする必要不可欠な転写プログラムをストローマ細胞または非悪性細胞が誘導する。すると、がん細胞は、それらの転写因子プログラムを停止して間葉系から上皮細胞に再変換することになり、ゆえに、原発腫瘍細胞のコアからそれら自体が再形成される。

【 0 0 1 6 】

腫瘍細胞は、成長因子、および E C M を分解するプロテイナーゼをはじめとした種々のタンパク質を直接分泌するか、またはマトリックスおよびその構成要素の接着分子を分解できる生体分子を宿主が産生するのを誘導する。マトリックスの分解は、腫瘍細胞表面に近い領域で生じ、ここで、活性な分解酵素の量は、マトリックスに存在するかまたは正常細胞によって分泌される天然のプロテイナーゼ阻害剤を超える。ゆえに、腫瘍細胞によ

10

【 0 0 1 7 】

ゆえに、がんは、腫瘍細胞または周囲の非がん性細胞（例えば、ストローマ細胞）によって分泌されるタンパク質、およびマトリックス分解などのがんの活性の結果として産生される分子をはじめとした数多くの可溶性リガンドが腫瘍微小環境に存在することを特徴とし得る。

【 0 0 1 8 】

そのような可溶性リガンドを標的にするモノクローナル抗体などの作用物質は、現在、臨床開発中であるが、これまでに、細胞免疫療法のアプローチが、この価値ある抗原源に

20

【 0 0 1 9 】

オンターゲットオフ腫瘍 (O n - t a r g e t o f f - t u m o u r) 毒性

がんは特異性を喪失させ得るため、がんを単一抗原の存在によって効果的に説明することは比較的稀である。

【 0 0 2 0 】

大抵のがんは、単一の抗原に基づいて正常な組織と区別することはできない。ゆえに、かなりの「オンターゲットオフ腫瘍」毒性が生じ、それによって、正常な組織が、治療によって損傷される。例えば、リツキシマブで B 細胞リンパ腫を処置するために C D 2 0 を標的にするが、正常な B 細胞コンパートメント全体が枯渇し、慢性リンパ性白血病を処置するために C D 5 2 を標的にするが、リンパ系コンパートメント全体が枯渇し、急性骨髄性白血病を処置するために C D 3 3 を標的にするが、骨髄コンパートメント全体が損傷される、など。

30

【 0 0 2 1 】

「オンターゲットオフ腫瘍」毒性の予測される問題は、臨床試験によって裏付けられている。例えば、E R B B 2 を標的にするアプローチは、結腸がんが肺および肝臓に転移した患者を死亡させた。E R B B 2 は、一部の患者の結腸がんにおいて過剰発現されるが、心臓および正常な脈管構造をはじめとしたいくつかの正常組織上にも発現される。

【 0 0 2 2 】

いくつかのがんにおいて、2 つのがん抗原の存在を標的にすることは、より選択的であり得るので、1 つを標的にするよりも効果的であり得る。例えば、慢性 B リンパ性白血病 (B - C L L) は、一般的な白血病であり、現在、C D 1 9 を標的にすることによって処置される。これは、そのリンパ腫を処置するが、B 細胞コンパートメント全体を枯渇させることから、この処置は、かなり有毒な作用を有する。B - C L L は、C D 5 と C D 1 9 とが共発現されるという点において稀な表現型を有する。C D 5 および C D 1 9 を発現する細胞だけを標的にすることによって、オンターゲットオフ腫瘍毒性をかなり減少させることが可能であり得る。

40

【 0 0 2 3 】

免疫療法のアプローチを用いて可溶性リガンドを標的にすることが可能であれば、腫瘍組織または非腫瘍組織に特徴的な可溶性リガンド（例えば、ケモカイン、サイトカインま

50

たは代謝産物)の存在と膜抗原の存在との組み合わせに基づいて細胞を標的にすることが可能であり得る。これもまた、オンターゲットオフ腫瘍毒性をかなり減少させると予想され得る。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

第 1 のキメラ抗原受容体 (CAR) および第 2 の CAR を含む細胞であって、ここで、前記第 1 および第 2 の CAR は、同じリガンド上の異なるエピトープに結合する、細胞。

(項目 2)

前記リガンドが、可溶性リガンドである、項目 1 に記載の細胞。

(項目 3)

前記リガンドが、サイトカイン、ケモカインまたは代謝産物である、項目 2 に記載の細胞。

(項目 4)

各 CAR が、

(i) 抗原結合ドメイン；

(ii) スペーサー；および

(iii) 膜貫通ドメイン

を含み、ここで、前記第 1 および第 2 の CAR のスペーサーは異なる、前述のいずれかの項目に記載の細胞。

(項目 5)

各 CAR が、

(i) 抗原結合ドメイン；

(ii) スペーサー；および

(iii) 膜貫通ドメイン

を含み、ここで、前記第 1 および / または第 2 の CAR のスペーサーは、三量体または多価である、前述のいずれかの項目に記載の細胞。

(項目 6)

細胞表面抗原に結合する第 3 の CAR を含む、前述のいずれかの項目に記載の細胞。

(項目 7)

前記第 1 および / または第 2 ならびに第 3 の CAR が、それぞれ、

(i) 抗原結合ドメイン；

(ii) 膜貫通ドメイン；および

(iii) エンドドメイン

を含み、ここで、前記リガンドが前記第 1 および第 2 の CAR に結合し、かつ細胞表面抗原が前記第 3 の CAR に結合したとき、細胞の活性化が生じるように、前記第 3 の CAR のエンドドメインと前記第 1 および / または第 2 の CAR のエンドドメインは、相補的である、項目 6 に記載の細胞。

(項目 8)

前記第 3 の CAR が、CD3 ゼータエンドドメインを含み、前記第 1 および / または第 2 の CAR が、CD28 エンドドメインおよび OX40 または 41BB エンドドメインを含む、項目 7 に記載の細胞。

(項目 9)

前記第 3 の CAR が、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) に結合し、前記第 1 および第 2 の CAR が、前立腺特異的抗原 (PSA) に結合する、項目 6 ~ 8 のいずれかに記載の細胞。

(項目 10)

前記第 1 および第 2 の CAR が前記リガンドに結合したとき、前記細胞表面抗原に結合する前記第 3 の CAR によって引き起こされる細胞の活性化が阻害されるように、前記第 1 および / または第 2 の CAR が、阻害性エンドドメインを含む、項目 6 に記載の細胞。

(項目 11)

前記第 1 の CAR が、2 つの抗原結合ドメインを含み、1 つが前記可溶性リガンドに結合し、1 つが細胞表面抗原に結合する、項目 2 に記載の細胞。

10

20

30

40

50

(項目 1 2)

前記第 1 および第 2 の C A R が、前記可溶性リガンドに結合したとき、前記細胞表面抗原に結合する前記第 1 の C A R によって引き起こされる細胞の活性化が阻害されるように、前記第 2 の C A R が、阻害性エンドドメインを含む、項目 1 ～ 5 のいずれかに記載の細胞。

(項目 1 3)

前記阻害性エンドドメインが、P T P N 6 または免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ (I T I M) の触媒ドメインであるかまたはそれを含む、項目 1 0 または 1 2 に記載の細胞。

(項目 1 4)

前記第 1 および第 2 の C A R が、I L - 6 に結合する、項目 1 0 ～ 1 3 のいずれかに記載の細胞。

10

(項目 1 5)

前記第 1 および / または第 2 の C A R が、阻害性エンドドメインを含み、前記リガンドの非存在下では、前記細胞表面抗原に結合する前記第 3 の C A R によって引き起こされる細胞の活性化が阻害され；リガンドの存在下では、前記第 1 および第 2 の C A R は凝集して前記第 3 の C A R から分離し、前記第 3 の C A R が前記細胞表面抗原に結合したとき、シグナル伝達が生じ得る、項目 6 に記載の細胞。

(項目 1 6)

前記阻害性エンドドメインが、C D 4 5 または C D 1 4 8 のエンドドメインであるかまたはそれを含む、項目 1 5 に記載の細胞。

20

(項目 1 7)

前記第 1 の C A R が、機能性エンドドメインを欠き、前記第 2 の C A R が、単量体であって機能性エンドドメインを含み、その結果、前記可溶性リガンドの結合が、前記第 1 の C A R と第 2 の C A R との共同在を引き起こし、前記第 1 の C A R が前記細胞表面抗原に結合したとき、T 細胞シグナル伝達を生じさせる、項目 1 1 に記載の細胞。

(項目 1 8)

前記第 2 の C A R が、単量体のスペーサーを含む、項目 1 7 に記載の細胞。

(項目 1 9)

前記単量体のスペーサーが、C D 2 2 由来の 1 つまたはそれを超える I g ドメインを含む、項目 1 8 に記載の細胞。

30

(項目 2 0)

前記第 2 の C A R 上の機能性エンドドメインが、前記 C D 3 - ゼータエンドドメインを含む、項目 1 7 ～ 1 9 のいずれかに記載の細胞。

(項目 2 1)

項目 1 から 2 0 のいずれかにおいて規定されたような第 1 の C A R をコードする第 1 の核酸配列；および項目 1 から 2 0 のいずれかにおいて規定されたような第 2 の C A R をコードする第 2 の核酸配列を含む、核酸構築物。

(項目 2 2)

以下の構造：

40

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

(ここで、

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

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

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

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

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

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

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

50

T M 2 は、前記第 2 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；
エンド 2 は、前記第 2 の C A R のエンドドメインをコードする核酸配列である）
を有する項目 2 1 に記載の核酸構築物であって、その核酸構築物は、T 細胞において発現
されたとき、前記第 1 の C A R および前記第 2 の C A R が該 T 細胞表面に共発現されるよ
うに、切断部位で切断されるポリペプチドをコードする、
項目 2 1 に記載の核酸構築物。

(項目 2 3)

c o e x p r が、自己切断性ペプチドを含む配列をコードする、項目 2 2 に記載の核酸構
築物。

(項目 2 4)

相同組換えを回避するために、代替的コドンが、同一または類似のアミノ酸配列をコード
する配列の領域で使用される、項目 2 2 または 2 3 に記載の核酸構築物。

(項目 2 5)

項目 6 ～ 1 0、1 5 および 1 6 のいずれかにおいて規定されたような第 3 の C A R をコー
ドする核酸配列も含む、項目 2 1 ～ 2 4 のいずれかに記載の核酸構築物。

(項目 2 6)

項目 2 1 ～ 2 5 のいずれかに記載の核酸構築物を含む、ベクター。

(項目 2 7)

項目 2 6 に記載の、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターまたはトラン
スポゾン。

(項目 2 8)

i) 項目 1 ～ 5 のいずれかにおいて規定されたような第 1 の C A R をコードする核酸配列
を含むベクター；および

i i) 項目 1 ～ 5 のいずれかにおいて規定されたような第 2 の C A R をコードする核酸配
列を含むベクター
を含む、キット。

(項目 2 9)

項目 6 において規定されたような第 3 の C A R をコードする核酸配列を含むベクターも含
む、項目 2 8 に記載のキット。

(項目 3 0)

項目 1 から 2 0 のいずれかに記載の細胞を作製するための方法であって、項目 2 1 ～ 2 5
のいずれかに記載の核酸構築物；項目 2 6 もしくは 2 7 に記載のベクター；または項目 2
8 もしくは 2 9 に記載のベクターのキットを細胞に導入する工程を含む、方法。

(項目 3 1)

前記細胞が、被験体から単離された試料に由来する、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

項目 1 から 2 0 のいずれかに記載の複数の細胞を含む、医薬組成物。

(項目 3 3)

項目 3 2 に記載の医薬組成物を被験体に投与する工程を含む、疾患を処置および / または
予防するための方法。

(項目 3 4)

以下の工程：

(i) 被験体からの細胞含有試料の単離；

(i i) 項目 2 1 ～ 2 5 のいずれかに記載の核酸構築物；項目 2 6 もしくは 2 7 に記載の
ベクター；または項目 2 8 もしくは 2 9 に記載のベクターのキットでの該細胞の形質導入
またはトランスフェクション；および

(i i i) 該被験体に (i i) からの該細胞を投与すること
を含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記試料が、T 細胞含有試料である、項目 3 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 3 6)

前記疾患が、がんである、項目 3 4 または 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

疾患の処置および / または予防において使用するための項目 3 2 に記載の医薬組成物。

(項目 3 8)

疾患を処置および / または予防するための医薬の製造における項目 1 から 2 0 のいずれかに記載の細胞の使用。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 4 】

【図 1】可溶性リガンドが単一 C A R T 細胞との凝集を引き起こさないことを図示している模式図。

10

【 0 0 2 5 】

【図 2】可溶性リガンドと二重 C A R プラットフォーム（両 C A R が同じリガンドを認識する）との予測される凝集を図示している模式図。

【 0 0 2 6 】

【図 3】可溶性リガンドと二重 C A R プラットフォーム（両 C A R が同じリガンドを認識し、一方の C A R は多価である）との予測される凝集を図示している模式図。

【 0 0 2 7 】

【図 4】概念証明を示すために用いられたモデルを図示している模式図。使用されたりガンドは、R O R - 1 であり、第 1 および第 2 の受容体は、それぞれ R 1 2 および R 1 1 であった。

20

【 0 0 2 8 】

【図 5】実施例において試験されたモデルシステムを用いたときの R O R - 1 との予測される凝集を図示している模式図。

【 0 0 2 9 】

【図 6】実施例において試験されたモデルシステム（一方の C A R は多価である）を用いたときの R O R - 1 との予測される凝集を図示している模式図。

【 0 0 3 0 】

【図 7】可溶性リガンド（R O R - 1）の存在下における I L - 2 の分泌を示しているグラフ。B W 5 T 細胞に、単一の C A R（F c または C D 8 S T K または C O M P スペーサーのいずれかを有する R 1 1 または R 1 2）または 2 つの C A R を形質導入した。これらの T 細胞を可溶性 R O R - 1 リガンドと共培養し、2 4 時間後に I L - 2 を検出した。

30

【 0 0 3 1 】

【図 8】固定化されたりガンドの存在下における I L - 2 の分泌を示しているグラフ。B W 5 T 細胞に、単一の C A R（F c または C D 8 S T K または C O M P スペーサーのいずれかを有する R 1 1 または R 1 2）または 2 つの C A R を形質導入した。これらの T 細胞を、H i s でタグ化された可溶性 R O R - 1 リガンドで予めコーティングされた抗 H i s ビーズと共培養し、2 4 時間後に I L - 2 を検出した。

【 0 0 3 2 】

【図 9 - 1】「分割」C A R システムの例を示している模式図。第 3 の C A R が P S M A などの細胞表面抗原に結合すると、T C R ゼータエンドドメインを介して T 細胞活性化シグナル 1 が提供される。第 1 および第 2 の C A R が P S A などの可溶性リガンドに結合すると、C D 2 8 および O X 4 0 エンドドメインを介して T 細胞活性化シグナル 2 および 3 が提供される。細胞表面抗原（例えば、P S M A）と可溶性リガンド（例えば、P S A）の両方が存在すると、3 つすべてのシグナルが提供され、T 細胞の活性化がもたらされる。

40

【図 9 - 2】「分割」C A R システムの例を示している模式図。第 3 の C A R が P S M A などの細胞表面抗原に結合すると、T C R ゼータエンドドメインを介して T 細胞活性化シグナル 1 が提供される。第 1 および第 2 の C A R が P S A などの可溶性リガンドに結合すると、C D 2 8 および O X 4 0 エンドドメインを介して T 細胞活性化シグナル 2 および 3 が提供される。細胞表面抗原（例えば、P S M A）と可溶性リガンド（例えば、P S A）

50

の両方が存在すると、3つすべてのシグナルが提供され、T細胞の活性化がもたらされる。

【0033】

【図10-1】第1および/または第2のCARが第3のCARからのシグナル伝達を阻害するCARシステムを示している模式図。第3のCARが細胞表面抗原（「リガンドA」、例えば、PSMA）に結合すると、T細胞シグナル伝達もたらされる。しかしながら、第1および第2のCARが可溶性リガンド（例えば、IL6）に結合すると、凝集によって誘導されるリン酸化、およびシグナル伝達の阻害もたらされる。

【図10-2】第1および/または第2のCARが第3のCARからのシグナル伝達を阻害するCARシステムを示している模式図。第3のCARが細胞表面抗原（「リガンドA」、例えば、PSMA）に結合すると、T細胞シグナル伝達もたらされる。しかしながら、第1および第2のCARが可溶性リガンド（例えば、IL6）に結合すると、凝集によって誘導されるリン酸化、およびシグナル伝達の阻害もたらされる。

【0034】

【図11-1】第1のCARが2つの抗原結合ドメインを含み、そのうちの1つ（「バインダーA」）は細胞表面抗原（「リガンドA」、例えば、PSMA）に結合し、もう1つ（「バインダーB1」）は可溶性リガンド（「リガンドB」、例えば、IL-6）に結合する、「TanCAR」システムを示している模式図。第2のCARは、その抗原結合ドメイン（「バインダーB2」）を介して可溶性リガンド（「リガンドB」、例えば、IL-6）に結合する。第2のCARは、T細胞シグナル伝達を阻害するエンドドメインを有する。第1のCARが細胞表面抗原（「リガンドA」、例えば、PSMA）に結合すると、T細胞シグナル伝達もたらされる。しかしながら、第1および第2のCARが可溶性リガンド（例えば、IL6）に結合すると、第2のCAR上の阻害性エンドドメインが、第1のCAR上の活性化エンドドメインと共局在して、シグナル伝達が阻害される。

【図11-2】第1のCARが2つの抗原結合ドメインを含み、そのうちの1つ（「バインダーA」）は細胞表面抗原（「リガンドA」、例えば、PSMA）に結合し、もう1つ（「バインダーB1」）は可溶性リガンド（「リガンドB」、例えば、IL-6）に結合する、「TanCAR」システムを示している模式図。第2のCARは、その抗原結合ドメイン（「バインダーB2」）を介して可溶性リガンド（「リガンドB」、例えば、IL-6）に結合する。第2のCARは、T細胞シグナル伝達を阻害するエンドドメインを有する。第1のCARが細胞表面抗原（「リガンドA」、例えば、PSMA）に結合すると、T細胞シグナル伝達もたらされる。しかしながら、第1および第2のCARが可溶性リガンド（例えば、IL6）に結合すると、第2のCAR上の阻害性エンドドメインが、第1のCAR上の活性化エンドドメインと共局在して、シグナル伝達が阻害される。

【0035】

【図12-1】第1および/または第2のCARが、反応速度が速い阻害性エンドドメイン（例えば、CD148エンドドメイン）を含む、「ANDゲート」システムを示している模式図。可溶性リガンドの非存在下では、その阻害性エンドドメインは、第3のCAR上の活性化エンドドメインを構成的に阻害する。可溶性リガンドの存在下では、第1および第2のCARは凝集し、第3のCARから分離して、T細胞シグナル伝達を生じさせる。

【図12-2】第1および/または第2のCARが、反応速度が速い阻害性エンドドメイン（例えば、CD148エンドドメイン）を含む、「ANDゲート」システムを示している模式図。可溶性リガンドの非存在下では、その阻害性エンドドメインは、第3のCAR上の活性化エンドドメインを構成的に阻害する。可溶性リガンドの存在下では、第1および第2のCARは凝集し、第3のCARから分離して、T細胞シグナル伝達を生じさせる。

【0036】

【図13-1】第1のCARが2つの抗原結合ドメインを含み、そのうちの1つ（「バインダーA」）が細胞表面抗原（「リガンドA」、例えば、PSMA）に結合し、もう1つ（「バインダーB1」）が可溶性リガンド（「リガンドB」、例えば、PSA）に結合する、代替的「ANDゲート」システムを示している模式図。第2のCARは、その抗原結合ドメイン（「バインダーB2」）を介して可溶性リガンド（「リガンドB」、例えば、

10

20

30

40

50

P S A) に結合する。第 1 の C A R は、機能的な T 細胞活性化エンドドメインを含まないのに対して、第 2 の C A R は、機能的な T 細胞活性化エンドドメインを含む。可溶性リガンドの非存在下では、T C R ゼータ鎖が存在しないことに起因して、細胞表面抗原の結合は、細胞シグナル伝達をもたらさない。可溶性リガンドの存在下では、第 1 および第 2 の C A R が共同在し、第 1 の C A R が細胞表面抗原に結合すると、細胞シグナル伝達が始まる。細胞表面リガンドの非存在下でのシグナル伝達を妨げるために、第 2 の C A R は、単量体であり得、これは、単量体のスペーサー（例えば、C D 2 2 に基づくもの）を用いて達成され得る。

【図 1 3 - 2】第 1 の C A R が 2 つの抗原結合ドメインを含み、そのうちの 1 つ（「バインダー A」）が細胞表面抗原（「リガンド A」、例えば、P S M A）に結合し、もう 1 つ（「バインダー B 1」）が可溶性リガンド（「リガンド B」、例えば、P S A）に結合する、代替的「AND ゲート」システムを示している模式図。第 2 の C A R は、その抗原結合ドメイン（「バインダー B 2」）を介して可溶性リガンド（「リガンド B」、例えば、P S A）に結合する。第 1 の C A R は、機能的な T 細胞活性化エンドドメインを含まないのに対して、第 2 の C A R は、機能的な T 細胞活性化エンドドメインを含む。可溶性リガンドの非存在下では、T C R ゼータ鎖が存在しないことに起因して、細胞表面抗原の結合は、細胞シグナル伝達をもたらさない。可溶性リガンドの存在下では、第 1 および第 2 の C A R が共同在し、第 1 の C A R が細胞表面抗原に結合すると、細胞シグナル伝達が始まる。細胞表面リガンドの非存在下でのシグナル伝達を妨げるために、第 2 の C A R は、単量体であり得、これは、単量体のスペーサー（例えば、C D 2 2 に基づくもの）を用いて達成され得る。

【0 0 3 7】

【図 1 4】凝集に基づく AND ゲートは、膜結合型抗原（C D 1 9）および可溶性リガンド（R O R 1）の存在下でのみ、シグナル伝達する。

【0 0 3 8】

【図 1 5】可溶性リガンド P S A の存在下における I L - 2 の分泌を示しているグラフ。B W 5 T 細胞に、P S A の異なるエピトープに結合する 2 つの C A R を発現するベクターを形質導入した。一方の C A R は、5 A 5 A 5 に基づく抗原結合ドメインを有し、もう一方の C A R は、5 D 3 D 1 1 に基づく抗原結合ドメインを有する（a P S A - A 5 - C D 8 S T K - C D 2 8 T M - z _ _ a P S A - D 1 1 - H L - ヒンジ - C D 2 8 t m Z または a P S A - D 1 1 - C D 8 S T K - C D 2 8 T M - z _ _ a P S A - A 5 - H L - ヒンジ - C D 2 8 t m Z）。これらの T 細胞を可溶性 P S A リガンドと共培養し、2 4 時間後に I L - 2 を検出した。

【0 0 3 9】

本発明の態様の要旨

本発明者らは、2 つの C A R（各々が同じ可溶性リガンド上のエピトープを認識する）を含む細胞を使用することによる C A R アプローチを用いて可溶性リガンドを標的にすることが可能であることを見出した。

【0 0 4 0】

それらの C A R は、同じリガンド上の異なるエピトープを認識するので、リガンドが存在すると、細胞の表面上で、リガンドと会合した C A R の凝集が引き起こされる。ゆえに、本発明は、本質的には、T 細胞シグナル伝達を分離ベースのプロセスから凝集ベースのプロセスにする。

【0 0 4 1】

したがって、第 1 の態様において、本発明は、第 1 のキメラ抗原受容体（C A R）および第 2 の C A R を含む細胞を提供し、ここで、その第 1 および第 2 の C A R は、同じリガンド上の異なるエピトープに結合する。

【0 0 4 2】

リガンドは、可溶性リガンド（例えば、サイトカイン、ケモカインまたは代謝産物）であり得る。可溶性リガンドは、例えば、以下の群：トランスフォーミング成長因子ベータ

(T G F -)、前立腺特異的抗原 (P S A)、がん胎児抗原 (C E A) および血管内皮成長因子 (V E G F) から選択され得る。

【 0 0 4 3 】

各 C A R は、

(i) 抗原結合ドメイン；

(i i) スペーサー；および

(i i i) 膜貫通ドメイン

を含み得る。

【 0 0 4 4 】

第 1 および第 2 の C A R のスペーサーは、異なってもよい。

10

【 0 0 4 5 】

第 1 および / または第 2 の C A R のスペーサーは、三量体または多価であり得る。

【 0 0 4 6 】

上記細胞は、細胞表面抗原に結合する第 3 の C A R を含み得る。

【 0 0 4 7 】

本発明の第 1 の態様は、5 つの別個の実施形態も提供し、その各々が、細胞 (c a l l) 表面抗原およびリガンド (例えば、可溶性リガンド) の存在下 (または非存在下) でのシグナル伝達の特定の配置に関する。

【 0 0 4 8 】

第 1 の実施形態において、第 1 および / または第 2 の C A R ならびに第 3 の C A R は、それぞれ、

20

(i) 抗原結合ドメイン；

(i i) 膜貫通ドメイン；および

(i i i) エンドドメイン

を含み、リガンドが第 1 および第 2 の C A R に結合し、かつ細胞表面抗原が第 3 の C A R に結合したとき、細胞の活性化が生じるように、第 3 の C A R のエンドドメインと第 1 および / または第 2 の C A R のエンドドメインは、相補的である。

【 0 0 4 9 】

この実施形態において、第 3 の C A R は、C D 3 ゼータエンドドメインを含み得、第 1 および / または第 2 の C A R は、C D 2 8 エンドドメインおよび O X 4 0 または 4 1 B B エンドドメインを含み得る。

30

【 0 0 5 0 】

この実施形態において、第 3 の C A R は、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) に結合し得、第 1 および第 2 の C A R は、前立腺特異的抗原 (P S A) に結合し得る。

【 0 0 5 1 】

第 2 の実施形態では、第 1 および第 2 の C A R がリガンドに結合したとき、細胞表面抗原に結合する第 3 の C A R によって引き起こされる細胞の活性化が阻害されるように、第 1 および / または第 2 の C A R は、阻害性エンドドメインを含む。

【 0 0 5 2 】

第 3 の実施形態において、第 1 の C A R は、2 つの抗原結合ドメインを含み、そのうちの 1 つは可溶性リガンドに結合し；もう 1 つは細胞表面抗原に結合する。

40

【 0 0 5 3 】

この実施形態では、第 1 および第 2 の C A R が可溶性リガンドに結合したとき、細胞表面抗原に結合する第 1 の C A R によって引き起こされる細胞の活性化が阻害されるように、第 2 の C A R は、阻害性エンドドメインを含む。

【 0 0 5 4 】

第 2 または第 3 の実施形態の阻害性エンドドメインは、P T P N 6 または免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ (I T I M) の触媒ドメインであり得るか、またはそれを含み得る。

【 0 0 5 5 】

50

第 2 または第 3 の実施形態において、第 1 および第 2 の C A R は、I L - 6 に結合し得る。

【 0 0 5 6 】

第 4 の実施形態において、第 1 および / または第 2 の C A R は、阻害性エンドドメインを含み、その結果、リガンドの非存在下では、細胞表面抗原に結合する第 3 の C A R によって引き起こされる細胞の活性化が阻害され；リガンドの存在下では、第 1 および第 2 の C A R が凝集して第 3 の C A R から分離し、その結果、第 3 の C A R が細胞表面抗原に結合したとき、シグナル伝達が生じ得る。

【 0 0 5 7 】

第 4 の実施形態において、阻害性エンドドメインは、C D 4 5 または C D 1 4 8 のエンドドメインであり得るか、またはそれを含み得る。

【 0 0 5 8 】

第 5 の実施形態において、第 1 の C A R は、機能性エンドドメインを欠き、第 2 の C A R は、単量体であって機能性エンドドメインを含み、その結果、可溶性リガンドの結合が、第 1 の C A R と第 2 の C A R との共局在を引き起こし、第 1 の C A R が細胞表面抗原に結合したとき、T 細胞シグナル伝達を生じさせる。

【 0 0 5 9 】

第 2 の C A R は、単量体のスペーサーを含み得、この単量体のスペーサーは、例えば、C D 2 2 由来の 1 つまたはそれを超える I g ドメインを含み得る。

【 0 0 6 0 】

第 5 の実施形態において、第 2 の C A R 上の機能性エンドドメインは、C D 3 - ゼータエンドドメインを含み得る。

【 0 0 6 1 】

第 2 の態様において、本発明は、上で規定されたような第 1 の C A R をコードする第 1 の核酸配列；および上で規定されたような第 2 の C A R をコードする第 2 の核酸配列を含む核酸構築物を提供する。

【 0 0 6 2 】

上記核酸構築物は、以下の構造：

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

(ここで、

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

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

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

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

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

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

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

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

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

その核酸構築物は、T 細胞において発現されるとき、第 1 の C A R および第 2 の C A R が T 細胞表面に共発現されるように切断部位で切断されるポリペプチドをコードする) を有し得る。

【 0 0 6 3 】

「c o e x p r」は、自己切断性ペプチドを含む配列をコードし得る。

【 0 0 6 4 】

相同組換えを回避するために、代替的コドンが、同一または類似のアミノ酸配列をコードする配列の領域で使用され得る。

【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

50

上記核酸構築物は、上で規定されたような第3のCARをコードする核酸配列も含み得る。

【0066】

第3の態様において、本発明は、本発明の第2の態様に記載の核酸構築物を含むベクターを提供する。

【0067】

そのベクターは、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターまたはトランスポゾンであり得る。

【0068】

第4の態様において、本発明は、

i) 上で規定されたような第1のCARをコードする核酸配列を含むベクター；および

ii) 上で規定されたような第2のCARをコードする核酸配列を含むベクター

を含むキットを提供する。

【0069】

そのキットは、上で規定されたような第3のCARをコードする核酸配列を含むベクターも含み得る。

【0070】

第5の態様において、本発明は、本発明の第1の態様に記載の細胞を作製するための方法を提供し、その方法は、本発明の第2の態様に記載の核酸構築物；本発明の第3の態様に記載のベクター；または本発明の第4の態様に記載のベクターのキットを細胞に導入する工程を含む。

【0071】

本発明の第5の態様の方法において、細胞は、被験体から単離された試料由来であり得る。

【0072】

第6の態様において、本発明は、本発明の第1の態様に記載の複数の細胞を含む医薬組成物を提供する。

【0073】

第7の態様において、本発明は、疾患を処置および／または予防するための方法を提供し、その方法は、本発明の第6の態様に記載の医薬組成物を被験体に投与する工程を含む。

【0074】

上記方法は、以下の工程：

(i) 被験体からの細胞含有試料の単離；

(ii) 本発明の第2の態様に記載の核酸構築物；本発明の第3の態様に記載のベクター；または本発明の第4の態様に記載のベクターのキットでの細胞の形質導入またはトランスフェクション；および

(iii) その被験体に(ii)からの細胞を投与すること

を含む得る。

【0075】

上記試料は、T細胞含有試料であり得る。

【0076】

上記疾患は、がんであり得る。

【0077】

第8の態様において、本発明は、疾患の処置および／または予防において使用するための本発明の第6の態様に記載の医薬組成物を提供する。

【0078】

第9の態様において、本発明は、疾患を処置および／または予防するための医薬の製造における本発明の第1の態様に記載の細胞の使用を提供する。

【0079】

上記疾患は、がんであり得る。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0080】

詳細な説明

キメラ抗原受容体 (CAR)

古典的CARは、細胞外抗原認識ドメイン (バインダー) を細胞内シグナル伝達ドメイン (エンドドメイン) に結び付けるキメラI型膜貫通タンパク質である。バインダーは、典型的にはモノクローナル抗体 (mAb) から誘導された1本鎖可変フラグメント (scFv) であるが、抗体様抗原結合部位またはリガンドベースの抗原結合部位を含む他のフォーマットに基づくことも可能である。膜貫通ドメインは、細胞膜にタンパク質をつなぎ止め、スパーサーをエンドドメインに結び付ける。

10

【0081】

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

20

【0082】

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

30

【0083】

本発明の細胞は、第1のキメラ抗原受容体 (CAR) および第2のCARを含む。この細胞は、第3のCARおよび必要に応じてさらなるCARも含み得る。

【0084】

上記CARは、抗原結合ドメイン、スパーサードメイン、膜貫通ドメインおよびエンドドメインを含み得る。エンドドメインは、T細胞の活性化シグナルを伝達するドメインを含み得るか、またはそれと会合し得る。

【0085】

抗原結合ドメイン

抗原結合ドメインは、抗原を認識するCARの一部である。

40

【0086】

数多くの抗原結合ドメインが、当該分野で公知であり、それらとしては、抗体、抗体模倣物およびT細胞受容体の抗原結合部位に基づくものが挙げられる。例えば、抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体に由来する一本鎖可変フラグメント (scFv) ; 標的抗原の天然リガンド ; 標的に対して十分な親和性を有するペプチド ; 単ドメインバインダー (例えば、ラクダ科動物のもの) ; 人工単一バインダー (artificial binder single) (例えば、Darpin) ; またはT細胞受容体に由来する一本鎖を含み得る。

【0087】

抗原結合ドメインは、下記に規定されるような、可溶性リガンド上または膜結合型リガ

50

ンド上のエピトープに結合し得る。

【0088】

用語「リガンド」は、CARの抗原結合ドメインによって特異的に認識および結合される実体を意味する「抗原」の同意語として使用される。

【0089】

可溶性リガンド

用語「可溶性リガンド」は、細胞の一部ではないかまたは細胞に付着しておらず、細胞外空間で、例えば、目的の組織の体液中で自由に動く、リガンドまたは抗原を表すために使用される。可溶性リガンドは、個体の血清、血漿または他の体液中において無細胞の状態で存在し得る。

10

【0090】

可溶性リガンドは、例えば、サイトカイン、ケモカインまたは代謝産物であり得る。

【0091】

サイトカインは、細胞シグナル伝達において重要な低分子タンパク質（約5～20kDa）である。サイトカインは、細胞によって放出され、他の細胞の挙動に影響する。サイトカインには、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンフォカインおよび腫瘍壊死因子が含まれる。サイトカインは、マクロファージ、Bリンパ球、Tリンパ球およびマスト細胞のような免疫細胞、ならびに内皮細胞、線維芽細胞および様々なストローマ細胞をはじめとした広範囲の細胞によって産生される。

【0092】

サイトカインは、受容体を通じて作用し、健康および疾患、詳細には、感染に対する宿主の応答、免疫応答、炎症、外傷、敗血症、がんおよび生殖において重要である。ケモカインは、細胞間の化学誘引（走化性）を媒介する。

20

【0093】

サイトカインは、がんに対する免疫応答とがんの病理の両方において鍵となる役割を果たすと考えられている。サイトカインは、腫瘍部位の免疫エフェクター細胞およびストローマ細胞を直接刺激し、細胞傷害性エフェクター細胞による腫瘍細胞の認識を高める。数多くの動物腫瘍モデル研究から、サイトカインが広範な抗腫瘍活性を有することが実証され、これは、がん治療のためのいくつかのサイトカインベースのアプローチに変換された。近年、GM-CSF、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18およびIL-21をはじめとしたいくつかのサイトカインが、進行がんを有する患者に対する臨床試験に入った。

30

【0094】

抗腫瘍免疫を促進する際のIL-10およびTGF- β などの抑制性サイトカインの中和を支持する進行中の前臨床研究が存在する。本発明のCAR細胞を用いて免疫抑制性サイトカインを標的にする利点は、CARが2つの方法で：第1に、疾患に特徴的なサイトカインによって活性化されることによって、および第2に、少なくとも循環サイトカインのタンパク質（protein）を隔離することによりその免疫抑制効果を弱めることによって、有効であるという点にある。

【0095】

可溶性リガンドは、がんなどの特定の疾患の存在または病理に関連し得る。

40

【0096】

可溶性リガンドは、がんセクレトーム（cancer secretome）、すなわち腫瘍によって分泌される因子のコレクションの一部であり得、がん幹細胞、非幹細胞または周囲のストローマ由来であり得る。可溶性リガンドは、腫瘍細胞によって分泌され得る。可溶性リガンドは、例えば、以下の群：TGF- β 、PSA、CEAおよびVEGFから選択され得る。

【0097】

可溶性リガンドは、疾患または罹患組織に特徴的であり得る。可溶性リガンドは、疾患を有する被験体にもっぱら見られ得るか、または健康な被験体と比べて疾患を有する被験

50

体において；もしくは健康な組織と比べて罹患組織においてより高いレベルで見られ得る。可溶性リガンドは、健康な被験体と比べて疾患を有する被験体において；または健康な組織と比べて罹患組織において、少なくとも2倍、5倍、10倍、100倍、1000倍、10000倍または100000倍高いレベルで発現され得る。

【0098】

TGFベータ

可溶性リガンドは、TGFであり得る。

【0099】

トランスフォーミング成長因子ベータ(TGF-)は、増殖、細胞分化、および細胞における他の機能を制御する分泌タンパク質である。トランスフォーミング成長因子ベータは、免疫、ならびにがん、気管支喘息、肺線維症、心疾患、糖尿病、多発性硬化症およびAIDSをはじめとした様々な疾患において役割を果たすサイトカインである。

10

【0100】

TGF-は、他の2つのポリペプチド、潜在型TGF-ベータ結合タンパク質(LTBP)および潜在関連ペプチド(LAP)と複合体化した潜在形で、マクロファージを含む多くの細胞型によって分泌される。プラスミンなどの血清プロテイナーゼは、その複合体からの活性なTGF-の放出を触媒する。これは、潜在型TGF-複合体が、CD36のリガンドであるトロンボスポンジン-1(TSP-1)を介してCD36に結合するマクロファージ表面上で生じることが多い。マクロファージを活性化する炎症性刺激は、プラスミンの活性化を促進することによって、活性なTGF-の放出を高める。マクロファージはまた、形質細胞によって分泌された、IgGに結合した潜在型TGF-複合体をエンドサイトーシスによって取り込み、次いで、活性なTGF-を細胞外液に放出し得る。

20

【0101】

TGF-は、少なくとも3つのアイソフォーム：TGF-1、TGF-2およびTGF-3で存在する。TGF-1、TGF-2およびTGF-3の配列および特徴に関する情報は、omim.orgのそれぞれエントリー190180、190220および190230から入手可能である。

【0102】

TGF-は、正常な上皮細胞および腫瘍形成の初期において、抗増殖因子として作用する。がん性細胞は、TGF-の産生を増加させ、そのTGF-は、周囲の細胞にも作用する。

30

【0103】

正常細胞では、シグナル伝達経路を介して作用するTGF-は、細胞周期をG1期で停止して、増殖を停止するか、分化を誘導するか、またはアポトーシスを促進する。細胞が、がん細胞に変わると、TGF-シグナル伝達経路の一部は変異して、もはやTGF-はその細胞を制御しなくなる。これらのがん細胞は増殖する。周囲のストローマ細胞(線維芽細胞)も増殖する。両方の細胞が、TGF-の産生を増加させる。このTGF-は、周囲のストローマ細胞、免疫細胞、内皮細胞および平滑筋細胞に作用する。これにより、免疫抑制および血管新生が生じ、がんをより侵襲性にする。TGF-はまた、正常では炎症(免疫)反応によってがんを攻撃するエフェクターT細胞を、その炎症反応をオフにする制御性(サプレッサー)T細胞に変換する。

40

【0104】

ゆえに、a)TGF-のアップレギュレートされた発現は、いくつかのがんに特徴的であるので；およびb)CAR発現細胞による遊離したTGF-の隔離は、循環中のTGF-の量ならびに関連する免疫抑制作用、血管新生作用および抗炎症作用を減少させ得るので、TGF-は、可溶性リガンドを認識する本発明のCARの魅力的な標的である。

【0105】

本発明の細胞の第1または第2のCARは、フレソリムマブ(fresolimума

50

b) に基づく結合ドメインを含み得る。

【0106】

フレソリムマブ (G C 1 0 0 8) は、T G F - の全アイソフォームに結合し、それらを阻害するヒトモノクローナル抗体である。フレソリムマブは、特発性肺線維症 (I P F)、巣状分節状系球体硬化症、およびがん、例えば、腎臓がんおよびメラノーマの処置において使用されている。

【0107】

第1または第2のC A Rの抗原結合ドメインは、例えば、フレソリムマブ由来の6つのC D RまたはV Hおよび/もしくはV Lドメインを含み得る。

【0108】

前立腺特異的抗原 (P S A)

可溶性リガンドは、前立腺特異的抗原 (P S A) であり得る。

【0109】

前立腺特異的抗原 (P S A) は、ガンマ - セミノプロテインまたはカリクレイン - 3 (K L K 3) としても知られ、ヒトにおいてK L K 3 遺伝子によってコードされる糖タンパク質酵素である。P S Aは、カリクレイン関連ペプチダーゼファミリーのメンバーであり、前立腺の上皮細胞によって分泌される。

【0110】

P S Aは、健康な前立腺を有する男性の血清中に少量で存在するが、前立腺がんおよび他の前立腺障害を有する個体では増加する。

【0111】

P S Aは、237残基の糖タンパク質であり、K L K 2によって活性化される。その生理学的役割は、精液の凝塊成分の液化であり、精子の遊離をもたらす。がんでは、P S Aは、新生物の成長および転移のプロセスに関与し得る。

【0112】

P S Aは、典型的なH i s - A s p - S e r三連構造、および他のカリクレイン関連ペプチダーゼの触媒ドメインに類似の触媒ドメインを有するキモトリプシン様セリンプロテアーゼである。P S Aの結晶構造は、i) モノクローナル抗体 (m A b) 8 G 8 F 5 との複合体として、およびii) 2つのm A bである5 D 5 A 5 および5 D 3 D 1 1 とのサンドイッチ複合体 (S t u r a ら (J . M o l . B i o l . (2 0 1 1) 4 1 4 : 5 3 0 - 5 4 4) として、得られた。

【0113】

様々なモノクローナル抗体が知られており、それらとしては、B a v a t ら、A v i c e n n a J . M e d . B i o t e c h n o l . 2 0 1 5 , 7 : 2 - 7 ; および . . . L e i n o n e n (2 0 0 4) 2 8 9 : 1 5 7 - 6 7 に記載されているクローン2 G 2 - B 2、2 D 8 - E 8、I g G 1 / K が挙げられる。

【0114】

第1または第2のC A Rの抗原結合ドメインは、例えば、P S Aに結合するm A b (例えば、8 G 8 F 5、5 D 5 A 5 または5 D 3 D 1 1) 由来の6つのC D RまたはV Hおよび/もしくはV Lドメインを含み得る。

【0115】

5 D 3 D 1 1 および5 D 5 A 5 のV HおよびV Lのアミノ酸配列を下記に示す。相補性決定領域 (C D R) は、太字で強調している。

10

20

30

40

50

【化 1】

5D3D11 VH (配列番号 1)

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKVSGYAISSWMMNWWKQRPQGQGLEWIGRIYPGD
 GDTKYNGKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSVDSAVYFCARDGYRYYFDYWGQ
 GTSVTVSS

5D3D11 VL (配列番号 2)

DIVMTQTAPSVFVTPGESVSISCRSSKSLLSHNGNTYLYWFLQRPQGQSPQLLIYRMS
 NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPVTFGAGTKVEIK

10

5D5A5 VH (配列番号 3)

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKTSGYSFSSYWMHWWKQRPQGQGLEWIGYINPS
 TGYTENNQKFKDKVTLTADKSSNTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARSGRLYFDVWGA
 GTTVTVSS

5D5A5 VL (配列番号 4)

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESIDLYGFTFMHWYQQKPGQPPKILYRASNL
 ESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQTHEDPYTFGGGTKLEIK

20

【0116】

第1のCARの抗原結合ドメインは、5D5A5由来の6つのCDRを含み得、第2のCARの抗原結合ドメインは、5D3D11由来の6つのCDRを含み得る。

【0117】

第1のCARの抗原結合ドメインは、5D5A5またはその変異型由来のVHおよび/またはVLドメインを含み得；第2のCARの抗原結合ドメインは、5D3D11またはその変異型由来のVHおよび/またはVLドメインを含み得る。変異型のVHおよびVLドメインは、上に示した配列と少なくとも80、90、95または99%の同一性を有し得るが、但し、PSA結合活性を保持する。

30

【0118】

がん胎児抗原 (CEA)

可溶性リガンドは、CEAであり得る。

【0119】

がん胎児抗原 (CEA) は、細胞接着に関わる高度に近縁の一連の糖タンパク質を表現している。CEAは、正常には、胎児発生中の胃腸組織において産生されるが、その産生は、誕生前に停止する。ゆえに、CEAは、通常、健康な成人の血液中には非常に低いレベルでしか存在しない。しかしながら、いくつかのタイプのがんにおいてその血清レベルが上昇し、これは、それを臨床検査において腫瘍マーカーとして使用できることを意味する。

40

【0120】

CEAは、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型の細胞表面糖タンパク質であり、その特殊なシアロフコシル化された (specialized sialofucosylated) グリコフォームは、結腸癌細胞の転移性播種にとって極めて重要であり得る機能的な結腸癌L-セレクチンおよびE-セレクチンリガンドとして働く。免疫学的には、それらは、CD66クラスターの分化のメンバーとして特徴付けられる。

【0121】

50

C E Aおよび関連遺伝子は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するC E Aファミリーを構成する。ヒトにおいて、がん胎児抗原ファミリーは、29個の遺伝子からなり、そのうち18個は、通常、発現されている。以下は、がん胎児抗原関連細胞接着タンパク質をコードするヒト遺伝子のリストである：C E A C A M 1、C E A C A M 3、C E A C A M 4、C E A C A M 5、C E A C A M 6、C E A C A M 7、C E A C A M 8、C E A C A M 16、C E A C A M 18、C E A C A M 19、C E A C A M 20、C E A C A M 21。

【0122】

C E Aを標的にする様々な抗体が、W O 2 0 1 1 / 0 3 4 6 6 0に記載されている。

【0123】

可溶性リガンドは、V E G Fであり得る。

10

【0124】

血管内皮成長因子(V E G F)

血管内皮成長因子(V E G F)は、細胞によって産生される、血管発生および血管新生を刺激するシグナルタンパク質である。血管内皮成長因子は、血液循環が不十分であるとき、組織への酸素供給を回復させる系の一部である。V E G Fの血清濃度は、気管支喘息および真性糖尿病において高い。V E G Fの通常の機能は、胚発生中に新しい血管を作ること、損傷後に新しい血管を作ること、運動後に筋肉を作ること、および遮断された脈管を迂回する新しい脈管(側副血行路)を作ることである。

【0125】

V E G Fは、過剰発現されると、疾患に寄与し得る。固形がんは、十分な血液の供給がないと、限られたサイズを超えて成長できない；V E G Fを発現し得るがんは、成長でき、転移できる。

20

【0126】

V E G Fは、シスチン-ノット成長因子の血小板由来成長因子ファミリーのサブファミリーである。それらは、血管発生(胎児の循環器系のデノボ形成)と血管新生(既存の脈管構造からの血管の成長)の両方に関わる重要なシグナル伝達タンパク質である。

【0127】

V E G Fファミリーは、哺乳動物において5つのメンバーを含む：V E G F - A、胎盤成長因子(P G F)、V E G F - B、V E G F - CおよびV E G F - D。

【0128】

V E G Fに対する様々な抗体(例えば、ベバシズマブ(A v a s t i n)およびラニズマブ(L u c e n t i s))が知られている。

30

【0129】

膜結合型リガンド

用語「膜結合型リガンド」は、細胞の一部であるかまたは細胞に付着しているリガンドまたは抗原を表すために使用される。このリガンドは、標的細胞の表面に発現されていることがある。このリガンドは、例えば、膜貫通タンパク質であり得る。

【0130】

抗原結合ドメインは、細胞、例えば、がん細胞上に低密度で発現されたT A Aに結合し得る。低密度で発現されたT A Aとは、例えば、細胞1つあたり10s~1000s分子のレベルで発現されたT A Aのことを指し得る。

40

【0131】

ある特定のがんにおいて低密度で発現されると知られているT A Aの例としては、C L LにおけるR O R 1、メラノーマにおけるT y p r - 1およびミエローマにおけるB C M Aが挙げられるが、これらに限定されない。

【0132】

これらのT A Aに結合する抗原結合ドメイン(例えば、s c F vまたはm A b)は、例えば、以下の表1に示されているように以前に報告された。

【表 1 - 3】

腫瘍関連抗原	抗原結合ドメイン	参考文献
ROR-1	2A2、2D11	S.Baskar et al., Landes Bioscience, vol.4,(3)349-361, R12, R11, Y31 (J. Yang et al., PLOSONe, vol.6,(6), e21018, 2011
Tytp-1	TA99	P.Boross et al., Immunology Letters, vol.160,(2), 151-157, 2014
BCMA	C12A3.2およびC11D5.3	R.Carpenter et al., Clin Cancer Res., vol.19,(8)2048-2060, 2013), J6M0 (Y. Tai et al., Blood, vol 123,(20), 3128-3138, 2014

10

【0133】

スペーサー

本発明のCARは、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインと連結し、抗原結合ドメインをエンドドメインと空間的に分離する、スペーサー配列を含み得る。フレキシブルスペーサーは、抗原結合ドメインが、抗原結合を可能にする種々の方向に向くことを可能にする。

【0134】

第1のCARのスペーサーは、第2のCARのスペーサーと異なってもよい。

【0135】

スペーサー配列は、例えば、IgG1 Fc領域、IgG1 ヒンジまたはCD8 ストックを含み得る。リンカーは、IgG1 Fc領域、IgG1 ヒンジまたはCD8 ストックと類似の長さおよび/またはドメインスペーシング特性を有する代替的リンカー配列を二者択一的に含み得る。

20

【0136】

ヒトIgG1 スペーサーは、Fc 結合モチーフを除去するように変更され得る。

【0137】

これらのスペーサーのアミノ酸配列の例を下記に示す：

【化2】

配列番号 5 (ヒトIgG1のヒンジ-CH2CH3)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKD

30

配列番号 6 (ヒト CD8 ストック):

TTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

40

配列番号 7 (ヒト IgG1 ヒンジ):

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

【0138】

コイルドコイルドメイン

本発明の細胞の第1および/または第2のCARは、コイルドコイルスペーサードメインを含み得る。

50

【0139】

コイルドコイルは、2～7個のアルファ-ヘリックスがロープの子縄のように一緒に巻かれた構造モチーフである（図6）。多くの内在性タンパク質が、コイルドコイルドメインを組み込んでいる。コイルドコイルドメインは、タンパク質の折り畳みに関わり得る（例えば、同じタンパク質鎖内のいくつかのアルファヘリックスモチーフと相互作用する）か、またはタンパク質間相互作用に関与し得る。後者の場合、コイルドコイルは、ホモまたはヘテロオリゴマー構造を惹起し得る。

【0140】

本明細書中で使用されるとき、用語「多量体」および「多量体化」は、「オリゴマー」および「オリゴマー化」と同義であり、相互交換可能である。

10

【0141】

コイルドコイルドメインの構造は、当該分野で周知である。例えば、Lupas & Gruberが記載したとおり（Advances in Protein Chemistry; 2007; 70; 37-38）。

【0142】

コイルドコイルは通常、ヘプタッドリピートと称される、疎水性アミノ酸残基（h）および荷電アミノ酸残基（c）の反復パターンhxxhcxを含む。このヘプタッドリピート内の位置は、通常、a b c d e f gと標識され、ここで、aおよびdは、疎水性の位置であり、イソロイシン、ロイシンまたはバリンが占めることが多い。この反復パターンを有する配列がアルファ-ヘリックス二次構造に折り畳まれることにより、疎水性残基が、そのヘリックスに左回りでゆるく巻きつく「縞」として提示され、両親媒性の構造が形成される。そのような2つのヘリックスがそれら自体を細胞質に配置する最も好ましい方法は、親水性アミノ酸の間に挟まれた疎水性鎖を互いに逆らって巻くことである。したがって、疎水性表面の埋没こそが、オリゴマー化のための熱力学的駆動力を提供する。コイルドコイル界面における充填は、例外的に緊密であり、a残基の側鎖とd残基の側鎖との間にほぼ完全なファンデルワールス接触がある。

20

【0143】

-ヘリックスは、平行であっても逆平行であってもよいが、通常、左巻きのスーパーコイルをとる。好まれないが、いくつかの右巻きのコイルドコイルも、天然においておよび設計されたタンパク質において観察されている。

30

【0144】

コイルドコイルドメインは、コイルドコイルドメインを含むCARの複合体が形成されるようにコイルドコイル多量体を形成できる任意のコイルドコイルドメインであってよい。

【0145】

コイルドコイルドメインの配列と折り畳まれた最終的な構造との関係性は、当該分野で十分理解されている（Mahrenholzら; Molecular & Cellular Proteomics; 2011; 10(5):M110.004994）。したがって、コイルドコイルドメインは、合成的に生成されたコイルドコイルドメインであってよい。

【0146】

コイルドコイルドメインを含むタンパク質の例としては、キネシンモータータンパク質、D型肝炎デルタ抗原、古細菌のボックスC/D sRNPコアタンパク質、軟骨オリゴマートリックスタンパク質（COMP）、マンノース結合タンパク質A、コイルドコイルセリンリッチタンパク質1、ポリペプチド終結因子2、SNAP-25、SNARE、Lacリプレッサーまたはアポリポタンパク質Eが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0147】

様々なコイルドコイルドメインの配列を下記に示す：
キネシンモータータンパク質：平行ホモ二量体（配列番号8）

50

【化 3】

MHAALSTEVVHLRQRTEELLRCNEQQAAELETCKEQLFQSNMERKELHNTVMDLR
GN

D 型肝炎デルタ抗原：平行ホモ二量体（配列番号 9）

【化 4】

GREDILEQWWSGRKKLEELERDLRKLKKKIKKLEEDNPWLGNIGIIGKY

10

古細菌ボックス C / D s R N P コアタンパク質：逆平行ヘテロ二量体（配列番号 10）

【化 5】

RYVVALVKALEEIDESINMLNEKLEDIRAVKESEITEKFEKKIRELRELRRDVEREIEEV
M

マンノース結合タンパク質 A：平行ホモ三量体（配列番号 11）

【化 6】

AIEVLANMEAEINTLKSLELTNKLHAFSM

20

コイルドコイルセリンリッチタンパク質 1：平行ホモ三量体（配列番号 12）

【化 7】

EWEALEKKLAALLESKLQALEKKLEALEHG

ポリペプチド終結因子 2：逆平行ヘテロ三量体

【化 8】

鎖 A: INPVNNRIQDLTERS DVLRGYLDY (配列番号 13)

鎖 B:

VVDTL DQMKQGLE DVSG LLELAVEADDEETFNEAVAELDALEEKLAQLEFR (配列番号
14)

30

S N A P - 2 5 および S N A R E：平行ヘテロ四量体

【化 9】

鎖 A: IETRHSEIIKLENSIRELHDMFMDMAMLVESQGEMIDRIEYNVEHAVDYVE
(配列番号 15)

鎖 B:

ALSEIETRHSEIIKLENSIRELHDMFMDMAMLVESQGEMIDRIEYNVEHAVDYVERA
VSDTKKAVKY (配列番号 16)

40

鎖 C:

ELEEMQRRADQLADESLESTRMLQLVEESKDAGIRTLVMLDEQGEQLERIEE
GMDQINKDMKEAEKNL (配列番号 17)

鎖 D: IETRHSEIIKLENSIRELHDMFMDMAMLVESQGEMIDRIEYNVEHAVDYVE
(配列番号 18)

L a c リプレッサー：平行ホモ四量体

50

【化 1 0】

SPRALADSLMQLARQVSRLE (配列番号 19)

アポリポタンパク質 E : 逆平行ヘテロ四量体

【化 1 1】

SGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKS
 ELEEQLTARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLA
 SHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQA (配列番号 20)

10

【0 1 4 8】

コイルドコイルドメインは、オリゴマー化が可能である。コイルドコイルドメインは、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体または七量体を形成することができ得る。

【0 1 4 9】

2つを超えるコイルドコイルドメインを含む多量体を形成することができるコイルドコイルドメインの例としては、軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質 (COMP)、マンノース結合タンパク質 A、コイルドコイルセリンリッチタンパク質 1、ポリペプチド終結因子 2、SNAP-25、SNARE、Lacリプレッサーまたはアポリポタンパク質 E に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない (上記の配列番号 11 ~ 20 を参照のこと)。

20

【0 1 5 0】

コイルドコイルドメインは、COMPコイルドコイルドメインであり得る。

【0 1 5 1】

COMPは、本質的に最も安定なタンパク質複合体の1つであり (0 ~ 100 および広範囲の pH で安定)、4 ~ 6 M 塩酸グアニジンでしか変性できない。COMPコイルドコイルドメインは、五量体を形成することができる。COMPは、通常、細胞外空間に発現される、内因性に発現されるタンパク質でもある。これは、合成スパーサーと比べて免疫原性のリスクを低下させる。さらに、COMPコイルドコイルモチーフの結晶構造が解析されており、それによって、スパーサーの長さに関する正確な推定がもたらされる。COMP構造は、(約 8 . 1 nm であるヒト IgG 由来のヒンジおよび CH2CH3 ドメインに対して) 約 5 . 6 nm 長である。

30

【0 1 5 2】

コイルドコイルドメインは、配列番号 21 として示されている配列またはそのフラグメントからなり得るか、またはそれを含み得る。

配列番号 21

【化 1 2】

DLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVREITFLKNTVMECDACG

40

【0 1 5 3】

COMPコイルドコイルドメインをN末端で切断し、表面発現を保持することが可能である。ゆえに、このコイルドコイルドメインは、N末端で切断された配列番号 21 の切断バージョンを含み得るか、またはそれからなり得る。切断型COMPは、配列番号 21 のC末端の5つのアミノ酸、すなわち、配列CDACGを含み得る。切断型COMPは、5 ~ 44 個のアミノ酸、例えば、少なくとも5、10、15、20、25、30、35または40個のアミノ酸を含み得る。切断型COMPは、配列番号 21 のC末端に対応し得る。例えば、20個のアミノ酸を含む切断型COMPは、配列QQVREITFLKNTVMECDACGを含み得る。切断型COMPは、多量体化に関わるシステイン残基を保持し得る。切断型COMPは、多量体を形成する能力を保持し得る。

50

【 0 1 5 4 】

様々なコイルドコイルドメインが知られており、それらは、六量体（例えば、H I V に由来する g p 4 1 ）、および N . Z a c c a i ら（ 2 0 1 1 ） N a t u r e C h e m . B i o . , （ 7 ） 9 3 5 - 9 4 1 ）が報告した六量体コイルドコイルをデザインした人工タンパク質を形成する。G C N 4 - p 1 ロイシンジッパーの変異体型は、七量体のコイルドコイル構造を形成する（ J . L i u . ら（ 2 0 0 6 ） P N A S （ 1 0 3 ） 1 5 4 5 7 - 1 5 4 6 2 ）。

【 0 1 5 5 】

本コイルドコイルドメインは、上に記載されたコイルドコイルドメインの 1 つの変異型を含み得るが、但し、その変異型の配列は、コイルドコイルオリゴマーを形成する能力を保持する。例えば、本コイルドコイルドメインは、少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 8 または 9 9 % の配列同一性を有する配列番号 8 ~ 2 1 として示されている配列の変異型を含み得るが、但し、その変異型の配列は、コイルドコイルオリゴマーを形成する能力を保持する。

10

【 0 1 5 6 】

2 つのポリペプチド配列間のパーセンテージ同一性は、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> で自由に利用可能な B L A S T などのプログラムによって容易に測定され得る。

【 0 1 5 7 】

膜貫通ドメイン

20

膜貫通ドメインは、膜にまたがる C A R の配列である。膜貫通ドメインは、疎水性アルファヘリックスを含み得る。膜貫通ドメインは、良好な受容体安定性をもたらす C D 2 8 に由来し得る。

【 0 1 5 8 】

シグナルペプチド

本発明の C A R はシグナルペプチドを含み得、その結果、それらが T 細胞などの細胞において発現されるとき、新生タンパク質を小胞体、それに続いて細胞表面へと指向させ、そこで発現される。

【 0 1 5 9 】

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

30

【 0 1 6 0 】

シグナルペプチドは、分子のアミノ末端に位置し得る。

【 0 1 6 1 】

シグナルペプチドは、配列番号 2 2、2 3 もしくは 2 4 に示される配列、または 5、4、3、2 もしくは 1 個のアミノ酸変異（挿入、置換または付加）を有するそれらの変異型を含み得るが、ただし、そのシグナルペプチドは、C A R の細胞表面発現を引き起こすようになおも機能する。

40

【 化 1 3 】

配列番号 22: MGTSLLCWMLCCLLGADHADG

【 0 1 6 2 】

配列番号 2 2 のシグナルペプチドは、小型であり高効率であり、T C R 鎖に由来する。末端グリシンの後で約 9 5 % の切断をもたらすことから、シグナルペプチダーゼによる効率的な除去をもたらすと予測される。

50

【化 1 4】

配列番号 23: MSLPVTALLPLALLHAARP

【0 1 6 3】

配列番号 23 のシグナルペプチドは、I g G 1 に由来する。

【化 1 5】

配列番号 24: MAVPTQVLGLLLLWLT DARC

10

【0 1 6 4】

配列番号 24 のシグナルペプチドは、C D 8 a に由来する。

【0 1 6 5】

エンドドメイン

エンドドメインは、膜の細胞内の側に位置する古典的 C A R の一部である。

【0 1 6 6】

エンドドメインは、古典的 C A R のシグナル伝達部分である。抗原結合ドメインによる抗原認識の後、個々の C A R 分子クラスター、天然の C D 4 5 および C D 1 4 8 がシナプスから排除され、シグナルが細胞に伝達される。

【0 1 6 7】

本明細書中で規定されるような第 1、第 2 または第 3 の C A R のエンドドメインは、細胞内のシグナル伝達ドメインであり得るか、またはそれを含み得る。代替の実施形態では、本 C A R のエンドドメインは、細胞質に存在する細胞内のシグナル伝達分子と相互作用することができ、シグナル伝達をもたらし得る。

20

【0 1 6 8】

上記細胞内のシグナル伝達ドメインまたは別個の細胞内のシグナル伝達分子は、T 細胞シグナル伝達ドメインであり得るか、またはそれを含み得る。

【0 1 6 9】

最も一般的に使用されるシグナル伝達成分は、3 つの I T A M を含む C D 3 - ゼータエンドドメインのエンドドメイン成分である。これは、抗原が結合された後、活性化シグナルを T 細胞に伝達する。C D 3 - ゼータは、十分に適切な活性化シグナルを提供しない可能性があるため、追加の共刺激シグナル伝達が必要とされ得る。例えば、キメラ C D 2 8 および O X 4 0 は、C D 3 - ゼータと併用されて、増殖 / 生存シグナルを伝達し得るか、または 3 つ全部が一緒に使用され得る。

30

【0 1 7 0】

本 C A R は、C D 3 - ゼータエンドドメインのみを含み得るか、C D 2 8 もしくは O X 4 0 のエンドドメインとともに C D 3 - ゼータエンドドメインを含み得るか、または C D 2 8 エンドドメインならびに O X 4 0 および C D 3 - ゼータエンドドメインを含み得る。

【0 1 7 1】

エンドドメインは、以下のうちの 1 つまたはそれを超えるものを含み得る：I C O S エンドドメイン、C D 2 7 エンドドメイン、B T L A エンドドメイン、C D 3 0 エンドドメイン、G I T R エンドドメインおよび H V E M エンドドメイン。

40

【0 1 7 2】

エンドドメインは、配列番号 2 5 ~ 3 3 に示された配列または少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその変異型を含み得る。

50

【化 1 6】

配列番号 25 - CD3 Z エンドメイン

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

配列番号 26 - CD28およびCD3 ゼータ エンドメイン

SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 27 - CD28, OX40およびCD3 ゼータ エンドメイン

SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPG
GGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 28 - ICOS エンドメイン

CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL

配列番号 29 - CD27 エンドメイン

QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

配列番号 30 - BTLA エンドメイン

RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCF
RMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSGVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

30

【化 1 7】

配列番号 31 - CD30 エンドメイン

HRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGL
MSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIM
KADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVML
SVEEEGKEDPLPTAASGK

40

配列番号 32 - GITR エンドメイン

QLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGD
LWV

配列番号 33 - HVEM エンドメイン

CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRS
PNH

50

【 0 1 7 3 】

変異型の配列は、配列番号 25 ～ 33 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 % または 99 % の配列同一性を有し得るが、但し、その配列は、有効な細胞内のシグナル伝達ドメインを提供する。

【 0 1 7 4 】

さらなる C A R

上記で規定された第 1 および第 2 の C A R に加えて、本発明の細胞は、第 3 の C A R および必要に応じてさらなる C A R (第 4、第 5、第 6 など) を含み得る。

【 0 1 7 5 】

第 3 の C A R は、例えば、腫瘍関連抗原などの細胞表面抗原に結合し得る。

10

【 0 1 7 6 】

以下の表 2 に示されているように、様々な腫瘍関連抗原 (T A A) が知られている。第 3 の C A R またはさらなる C A R の抗原結合ドメインは、これらの T A A のうちの 1 つに結合することができるドメインであり得る。

【表 2】

がんのタイプ	TAA
びまん性大細胞型B細胞リンパ腫	CD19、CD20、CD22
乳がん	ErbB2、MUC1
AML	CD13、CD33
神経芽細胞腫	GD2、NCAM、ALK、GD2
B-CLL	CD19、CD52、CD160
直腸結腸がん	葉酸結合タンパク質、CA-125
慢性リンパ球性白血病	CD5、CD19
神経膠腫	EGFR、ビメンチン
多発性骨髄腫	BCMA、CD138
腎細胞がん	炭酸脱水酵素IX、G250
前立腺がん	PSMA
腸がん	A33

20

【 0 1 7 7 】

核酸

30

【 0 1 7 8 】

本発明はさらに、本発明の第 1 の態様に関連して規定されたような第 1 の C A R をコードする第 1 の核酸配列；および本発明の第 1 の態様に関連して規定されたような第 2 の C A R をコードする第 2 の核酸配列を含む核酸構築物を提供する。

【 0 1 7 9 】

核酸構築物は、以下の構造：

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

(ここで、

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

40

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

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

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

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

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

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

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

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

を有し得る。

【 0 1 8 0 】

50

核酸構築物が、T細胞などの細胞において発現されるとき、それは、第1および第2のCARが細胞表面で共発現されるように切断部位で切断されるポリペプチドをコードする。

【0181】

核酸構築物が、3つのCARをコードする場合、それは、構造：

AgB1 - スペース1 - TM1 - エンド1 - coexpr1 - AbB2 - スペース2 - TM2 - エンド2 - coexpr2 - AbB3 - スペース3 - TM3 - エンド3

を有し得る。

【0182】

エンドドメインは、細胞内の細胞シグナル伝達ドメインであり得るか、または別個の細胞シグナル伝達ドメインと細胞内で会合し得る。

【0183】

本明細書中で使用されるとき、用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」および「核酸」は、互いと同義であると意図されている。

【0184】

遺伝暗号の縮重の結果として、数多くの異なるポリヌクレオチドおよび核酸が同じポリペプチドをコードできることは、当業者によって理解される。さらに、本明細書に記載されるポリヌクレオチドが発現されるべき任意の特定の宿主生物のコドン使用頻度を反映するために、当業者は、日常的な手法を用いて、本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列に影響しないヌクレオチドの置換を行うことがあることが理解されるべきである。

【0185】

本発明による核酸は、DNAまたはRNAを含み得る。それらは、一本鎖または二本鎖であり得る。それらは、それらの中に合成または修飾ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドでもあり得る。オリゴヌクレオチドに対するいくつかの異なるタイプの修飾が当該分野で公知である。これらには、メチルホスホネート骨格およびホスホロチオエート骨格、分子の3'および/または5'末端におけるアクリジン鎖またはポリリジン鎖の付加が含まれる。本明細書中に記載されるような使用の目的において、それらのポリヌクレオチドは、当該分野において利用可能な任意の方法によって修飾され得ることが理解されるべきである。そのような修飾は、目的のポリヌクレオチドのインビボ活性を高めるためまたは寿命を延長するために行われ得る。

【0186】

ヌクレオチド配列に関する用語「変異型」、「ホモログ」または「誘導体」は、その配列からのまたはその配列への1つ（またはそれを超える）核酸の任意の置換、変更、修飾、置換、欠失または付加を含む。

【0187】

上記の構造において、「coexpr」は、第1のCARと第2のCARの両方の共発現を可能にする核酸配列である。それは、切断部位をコードする配列であり得、その結果、核酸構築物は、切断部位によって連結された2つまたはそれを超えるCARを生成し含む。切断部位は、自己切断性であり得、その結果、ポリペプチドが生成されると、いかなる外部の切断活性も必要とせずに、直ちに個々のペプチドに切断される。

【0188】

切断部位は、第1および第2のCARが分断されるようになるのを可能にする任意の配列であってよい。

【0189】

用語「切断」は、便宜上、本明細書中で使用されるが、切断部位は、上記ペプチドを古典的な切断以外の機構によって個々の実体に分離させ得る。例えば、口蹄疫ウイルス（FMDV）2A自己切断性ペプチド（下記を参照のこと）の場合、「切断」活性を説明する様々なモデルが提案されている：宿主細胞のプロテイナーゼによるタンパク質分解、自己タンパク分解または翻訳効果（Donnellyら（2001）J. Gen. Virol. 82：1027-1041）。切断部位が、タンパク質をコードする核酸配列の間に位

10

20

30

40

50

置するとき、それらのタンパク質を別個の実体として発現させる限り、そのような「切断」の正確な機構は、本発明の目的にとって重要でない。

【0190】

切断部位は、フューリン切断部位であり得る。

【0191】

フューリンは、サブチリシン様プロタンパク質コンバーターゼファミリーに属する酵素である。このファミリーのメンバーは、潜在型前駆体タンパク質をそれらの生物学的に活性な生成物にプロセッシングするプロタンパク質コンバーターゼである。フューリンは、前駆体タンパク質をそれらの対になった塩基性アミノ酸プロセッシング部位で効率的に切断し得るカルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼである。フューリンの基質の例としては、プロ副甲状腺ホルモン、トランスフォーミング成長因子ベータ1前駆体、プロアルブミン、プロ-ベータ-セクレターゼ、膜1型マトリックスメタロプロテアーゼ、プロ神経成長因子のベータサブユニットおよびフォン・ビルブランド因子が挙げられる。フューリンは、塩基性アミノ酸標的配列（標準的には、 $\text{Arg-X-(Arg/Lys)-Arg'}$ ）のすぐ下流でタンパク質を切断し、ゴルジ装置において濃縮される。

10

【0192】

切断部位は、タバコエッチウイルス（TEV）の切断部位であり得る。

【0193】

TEVプロテアーゼは、高度に配列特異的なシステインプロテアーゼであり、キモトリプシン様プロテアーゼである。TEVプロテアーゼは、その標的切断部位に非常に特異的であるので、インビトロとインビボの両方において、融合タンパク質の制御された切断のために使用されることが多い。コンセンサスTEV切断部位は、 $\text{ENLYFQ}\backslash\text{S}$ である（ここで、「 \backslash 」は、切断されるペプチド結合を表す）。ヒト細胞などの哺乳動物細胞は、TEVプロテアーゼを発現しない。したがって、本核酸構築物がTEV切断部位を含み、哺乳動物細胞において発現される実施形態では、外来性TEVプロテアーゼは、哺乳動物細胞においても発現されなければならない。

20

【0194】

切断部位は、自己切断性ペプチドをコードし得る。

【0195】

「自己切断性ペプチド」とは、そのポリペプチドが当該タンパク質を構成し、かつ自己切断性ペプチドが生成されると、そのポリペプチドは、いかなる外部の切断活性も必要とせずに、直ちに「切断」されるか、または異なる不連続の第1および第2のポリペプチドに分離されるように機能するペプチドのことを指す。

30

【0196】

自己切断性ペプチドは、アフトウイルスまたはカルジオウイルス由来の2A自己切断性ペプチドであり得る。アフトウイルスおよびカルジオウイルスの最初の2A/2B切断は、それ自体のC末端で「切断」する2Aによって媒介される。アフトウイルス（*apthoviruses*）（例えば、口蹄疫ウイルス（FMDV）およびウマ鼻炎Aウイルス）では、2A領域は、約18アミノ酸という短いセクションであり、それは、タンパク質2BのN末端残基（保存されたプロリン残基）とともに、それ自体のC末端での「切断」を媒介することができる自律エレメントになる（上記のようなDonnellyら（2001））。

40

【0197】

「2A様」配列は、アフトウイルスまたはカルジオウイルス以外のピコルナウイルス、「ピコルナウイルス様」昆虫ウイルス、C型口タウイルスおよびTrypanosoma spp.の中の反復配列および細菌の配列（上記のようなDonnellyら（2001））において見られる。切断部位は、これらの2A様配列のうちの1つ、例えば：

【化 1 8】

YHADYYKQRLIHDVEMNPGP (配列番号 34)
 HYAGYFADLLIHDIENTNPGP (配列番号 35)
 QCTNYALLKLAGDVESNPGP (配列番号 36)
 ATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 37)
 AARQMLLLLSGDVETNPGP (配列番号 38)
 RAEGRGSLTCGDVEENPGP (配列番号 39)
 TRAEIEDELIRAGIESNPGP (配列番号 40)

10

【化 1 9】

TRAEIEDELIRADIESNPGP (配列番号 41)
 AKFQIDKILISGDVELNPGP (配列番号 42)
 SSIIRTKMLVSGDVEENPGP (配列番号 43)
 CDAQRQKLLLSGDIEQNPGP (配列番号 44)
 YPIDFGGFLVKADSEFNPGP (配列番号 45)

20

を含み得る。

【0 1 9 8】

切断部位は、配列番号 3 9 (R A E G R G S L L T C G D V E E N P G P) として示される 2 A 様配列を含み得る。

【0 1 9 9】

本発明は、本発明の第 1 の態様に記載の第 1 および第 2 の C A R をコードする 1 つまたはそれを超える核酸配列を含むキットも提供する。

【0 2 0 0】

分割 C A R システム

本発明の 1 つの実施形態において、T 細胞を刺激するエンドドメインは、可溶性リガンドを認識する第 1 および第 2 の C A R と、細胞表面抗原を認識する第 3 の C A R との間で「分割」されている (図 9 を参照のこと) 。

30

【0 2 0 1】

このような分割 C A R システムの利点は、それが、T 細胞の「シャドーボクシング」、すなわち、存在しない何かを殺そうとする可能性を回避するという点である。これは、例えば、可溶性リガンドが T 細胞の近傍に存在するが、可溶性リガンドを分泌した腫瘍細胞が遠すぎて活性化 T 細胞によって殺されない場合に生じ得る。

【0 2 0 2】

このシステムでは、エンドドメインは、例えば、以下の表に示されているような、可溶性リガンドに結合する第 1 および / または第 2 の C A R と ; 細胞表面抗原に結合する第 3 の C A R との間で分割され得る :

40

【表 3】

第1および/または第2のCAR上のエンドドメイン	第3のCAR上のエンドドメイン
CD28-OX40またはCD28-41BB	CD3ゼータ
OX40または41BB	CD28-CD3ゼータ

【0 2 0 3】

本発明のこの実施形態において、第 3 の C A R ならびに第 1 および / または第 2 の C A R のエンドドメインは、それらが一緒になって、シグナル 1 および 2 または 1 、 2 および

50

3を提供して、細胞の活性化をもたらすという意味において「相補的」である。ゆえに、可溶性リガンドが第1および第2のCARに結合し、かつ細胞表面抗原が第3のCARに結合したとき、最適なT細胞の活性化が生じる。

【0204】

この実施形態において、第3のCARは、前立腺特異的膜抗原(P SMA)に結合し得、第1および第2のCARは、前立腺特異的抗原(P SA)に結合し得る。

【0205】

凝集に基づく阻害性CARシステム

本発明の第2の実施形態では、第1および第2のCARによるリガンドのライゲーショ

ンが、第3のCARの阻害を引き起こす。リガンド(例えば、可溶性リガンド)の非存在

下において細胞表面抗原に第3のCARが結合すると、細胞の活性化がもたらされる。対

照的に、リガンド(例えば、可溶性リガンド)の存在下において細胞表面抗原に第3のC

ARが結合すると、細胞の活性化はもたらされないか、または細胞の活性化が低下する(

図10を参照のこと)。

10

【0206】

この実施形態において、可溶性リガンドは、正常な組織によって放出されるががん性組

織によって放出されない、サイトカインなどの実体であり得る。リガンドは、例えば、I

L-6であり得る。このように、可溶性CARによってもたらされる阻害性シグナルは、

サイトカイン放出症候群またはマス活性化症候群(m a s s - a c t i v a t i o n s

y n d r o m e)などのCARに関連する問題に対して負のフィードバックループを提供

するために使用され得る。

20

【0207】

第1および/または第2のCARは、「ライゲーショ

ン - オン」阻害性エンドドメイン

を含み、その結果、第1および第2のCARがリガンドに結合すると、細胞表面抗原に結

合する第3のCARによって引き起こされる細胞の活性化が阻害される。

【0208】

「ライゲーショ

ン - オン」阻害性エンドドメインは、可溶性リガンドの非存在下では第

3のCARによるT細胞の活性化を有意に阻害しないが、第1および第2のCARが可溶

性リガンドに結合すると、第3のCARによるT細胞の活性化を阻害する。

【0209】

「ライゲーショ

ン - オン」阻害性エンドドメインは、第3のCARだけがその(細胞表

面)抗原に結合したときには、TCRシグナル伝達を阻害しない、リン酸化されたITAM

に対して十分に遅い触媒速度を有するチロシンホスファターゼであり得るかまたはそれ

を含み得るが、第1および第2のCARの凝集によって阻害性エンドドメインがシナプス

で濃縮されると、TCRシグナル伝達応答を阻害することができる。

30

【0210】

阻害性エンドドメインは、PTPN6などのタンパク質チロシンホスファターゼの全部

または一部を含み得る。

【0211】

タンパク質チロシンホスファターゼ(PTP)は、細胞の成長、分化、有糸分裂周期お

よび癌化をはじめとした種々の細胞プロセスを制御するシグナル伝達分子である。このP

TPのN末端部分は、2つのタンデムなSrcホモログ(SH2)ドメインを含み、その

ドメインは、タンパク質ホスホ - チロシン結合ドメインとして作用し、このPTPとその

基質との相互作用を媒介する。このPTPは、主に造血細胞において発現され、造血細胞

における複数のシグナル伝達経路の重要な制御因子として機能する。

40

【0212】

阻害性(i n h i b i t o r)ドメインは、PTPN6のすべて(配列番号46)または

ホスファターゼドメインのみ(配列番号47)を含み得る。

配列番号46 - PTPN6の配列

50

【化 2 0】

MVRWFHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDFSLSVRVGDQVTHIRIQN
 SGDFYDLYGGEKFATLTELVEYYTQQQGVLLQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYH
 GHMSGGQAETLLQAKGEPWTFLLVRESLSQPGDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVTHIK
 VMCEGGRYTVGGLETDFSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYYATRVNAADIEN
 RVLELNKKQESED TAKAGFWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGNRYKNILP
 FDHSRVILQGRDSNIPGSDYINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQM
 AWQENSRVIVMTTREVVEKGRNKCVPYWPVEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTEYKL
 RTLQVSPDLNGDLIREIWHYQYLSWPDHGVPSPPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPI
 IVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKTIQMVRARSGMVQTEAQYKFIY
 VAIAQFIETTKKKLEVLQSQKGQSEYGNITYPPAMKNAHAKASRTSSKHKEDVYEN
 LHTKNKREEKVKKQRSADKEKSKGSLKRK

10

配列番号 47 - P T P N 6 のホスファターゼドメインの配列

【化 2 1】

FWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGNRYKNILPFDHSRVILQGRDSNIPGS
 DYINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVIVMTTREV
 KGRNKCVPYWPVEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTEYKLRTLQVSPDLNGDLIREI
 WYQYLSWPDHGVPSPPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVID
 MLMENISTKGLDCDIDIQKTIQMVRARSGMVQTEAQYKFIYVAIAQF

20

【0 2 1 3】

あるいは、阻害性エンドドメインは、ITIM（免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ）含有エンドドメイン、例えば、CD22、LAIR-1、キラー細胞阻害性受容体ファミリー（KIR）、LILRB1、CTLA4、PD-1、BTLAなどに由来するものであり得る。ITIMは、リン酸化されると、そのSH2ドメインを通じて内在性PTPN6をリクルートする。ITAM含有エンドドメインと共局在する場合、脱リン酸化が生じ、CARの活性化が阻害される。

30

【0 2 1 4】

ITIMは、免疫系の多くの阻害性受容体の細胞質テイルに見られる保存されたアミノ酸配列（S/I/V/LxYxxI/V/L）である。当業者は、ITIMを含むタンパク質ドメインを容易に見つけることができる。ヒトのITIM含有タンパク質候補のリストが、全プロテオームスキャンによって生成された（Staubら（2004）Cell Signal. 16, 435-456）。さらに、コンセンサス配列が周知であり、二次構造はほとんど必要とされないとみられるので、当業者は、人工的なITIMを生成し得る。

【0 2 1 5】

PDCD1、BTLA4、LILRB1、LAIR1、CTLA4、KIR2DL1、KIR2DL4、KIR2DL5、KIR3DL1およびKIR3DL3由来のITIMエンドドメインを、それぞれ配列番号48～57に示す。

40

【化 2 2】

配列番号 48 - PDCD1 エンドメイン

CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQT
EYATI
VFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

配列番号 49 - BTLA4

KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGI
SYTTLRFPENIPRTGDAESSEMQRPPPCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPE
DEGIHYSELI
QFGVGERPQAQENVVILKH

10

配列番号 50 - LILRB1

LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAV
KHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDR
QAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATL
AIH

20

配列番号 51 - LAIR1

HRQNQIKQGPPRSKDDEEQKPQQRPD LAVDVLERTADKATVNGLPK DRET DTSALA
AGSS
QEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMASITYAAVARH

30

40

50

【化 2 3】

配列番号 52 CTLA4

FWLLWLAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQPYF
IPIN

配列番号 53 KIR2DL1

GNSRHLHLIGTSVVIIPFAILLFLLHRWCANKKNAVVMQEPAGNRTVNREDSDE
QDP
QEVITYQLNHCFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP

10

配列番号 54 KIR2DL4

GIARHLHAVIRYSVAIILFTILPFFLLHRWCSSKKKNAAVMNQEPAGHRTVNREDSDE
QDPQEVITYAQLDHCFTQRKITGPSQRSKRPTDTSVCIELPNAEPRLSPAHEHHS
QALMGSSRETTALSQTQLASSNVPAAGI

配列番号 55 KIR2DL5

TGIRRLHLIGTSVAIILFIILFFLLHCCCSNKKNAAVMDQEPAGDRTVNREDSDDQ
DPQEVITYAQLDHCFTQTKITSPSQRPKTPPTDTTMYMELPNAKPRSLSPAHHHS
QALRGSSRETTALSQNRVASSHVPAAGI

20

配列番号 56 KIR3DL1

KDPRHLHLIGTSVVIILFILLFFLLHLWCSSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQD
PEEVITYAQLDHCFTQRKITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP

配列番号 57 KIR3DL3

KDPGNSRHLHLIGTSVVIIPFAILLFLLHRWCANKKNAVVMQEPAGNRTVNREDS
DEQDPQEVITYAQLNHCFTQRKITRPSQRPKTPPTDTSV

30

【0 2 1 6】

あるいは、阻害性エンドドメインは、融合タンパク質と共発現されるITIM含有エンドドメインであり得る。その融合タンパク質は、タンパク質チロシンホスファターゼの少なくとも一部および受容体様チロシンホスファターゼの少なくとも一部を含み得る。その融合は、タンパク質チロシンホスファターゼ由来の1つまたはそれを超えるSH2ドメインを含み得る。例えば、その融合は、PTPN6 SH2ドメインとCD45エンドドメインとの間またはPTPN6 SH2ドメインとCD148エンドドメインとの間に存在し得る。ITIMドメインは、リン酸化されると、その融合タンパク質をリクルートし、非常に強力なCD45またはCD148ホスファターゼを、活性化を阻止する活性化エンドドメインに近づける。例証的な融合タンパク質の配列を配列番号58および59として示す。

40

【化 2 4】

配列番号 58 - PTPN6-CD45 融合タンパク質

WYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSDQPKAGPGSPLRV
 THIKVMCEGGRYTVGGLETFDLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYKIYDLHKK
 RSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRFLAEFQSIPRVFS
 KFIPIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIA
 AQQPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCEEGRNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGD
 VVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVDPEDPHLLLKLRR
 RVNAFSNFFSGPIVHCSAGVGRTGTIYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRQR
 CLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQ
 RLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPIYDYNRVLKHELEMSKESEHDSDESSD
 DDSDSSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFMIQRKVQVIMLTCLKHG
 DQEICAQYWGEKQTYGDIKDLKDTKSSYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYT
 NWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFC
 ALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASSTYPAQNGQVK
 KNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEH
 SVNGPASPALNQGS

10

20

配列番号 59 - PTPN6-CD148 融合

ETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRY
 TVGGLETFDLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYRKKRDAKNNEVSFSQIKPK
 KSKLIRVENFEAYFKKQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNN
 VLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGGLPNTLKDFWRMVWE
 KNVYAIIMLTKEVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNI
 QTSESHPLRQFHFTSWPDHGVDPDTDLLINFRYLVRDYMKQSPPEPILVHCSAGV
 GRTGTIFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIVRS
 QKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

30

【0 2 1 7】

阻害性エンドドメインは、配列番号 4 6 または 4 7 の全部または一部を含み得る。阻害性エンドドメインは、配列番号 4 8 ~ 5 7 の全部または一部を含み得る。阻害性エンドドメインは、配列番号 5 8 または 5 9 と共発現される配列番号 4 8 ~ 5 7 の全部または一部を含み得る。少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列の変異型が、第 1 および第 2 の C A R のライゲーションの際に第 3 の C A R による T 細胞シグナル伝達を阻害する能力を保持する限り、阻害性エンドドメインは、その変異型またはその一部を含み得る。

40

【0 2 1 8】

共局在に基づく阻害性 C A R システム

本発明の第 3 の実施形態では、第 1 の C A R は、2 つの抗原結合ドメインを含み、そのうちの 1 つは可溶性リガンドに結合し；もう 1 つは細胞表面抗原に結合する。この結合ドメインのタンデム配置 (T a n C A R システム) は、図 1 1 に模式的に図示されている。

【0 2 1 9】

第 1 の C A R が、T 細胞などの細胞の表面に発現されると、細胞表面抗原に結合する抗原結合ドメインは、細胞膜に対して遠位になり得、可溶性リガンドに結合する抗原結合ドメインは、細胞膜に対して近位になり得る。

【0 2 2 0】

50

このシステムでは、第2のCARは、阻害性エンドドメインを含み得、その結果、第1および第2のCARが、可溶性リガンドに結合すると、細胞表面抗原に結合する第1のCARによって引き起こされる細胞の活性化が阻害される。

【0221】

阻害性エンドドメインは、「ライゲーション - オン」阻害性エンドドメインであり、その結果、第2のCARは、可溶性リガンドの非存在下では第1のCARによるT細胞の活性化を有意に阻害しないが、第1および第2のCARが可溶性リガンドに結合すると、第1のCARによるT細胞の活性化を阻害する。

【0222】

阻害性エンドドメインは、反応速度が遅いホスファターゼ（例えば、先のセクションで規定されたようなPTPN6の触媒ドメインまたはITIMを含むもの）であり得るか、またはそれを含み得る。

【0223】

本発明のこの実施形態において、第1および第2のCARは、IL-6に結合し得る。

【0224】

凝集に基づくANDゲート

本発明の第4の実施形態では、細胞表面抗原に結合する第3のCARは、活性化エンドドメインを含み、第1および/または第2のCARは、「ライゲーション - オフ」阻害性エンドドメインを含む（図12を参照のこと）。

【0225】

この実施形態は、T細胞活性化の動力的分離モデル(KS)に基づく。これは、実験データによって裏付けられた機能的なモデルであり、T細胞受容体による抗原認識が、どのようにして下流の活性化シグナルに変換されるのかを説明する。簡潔には、基底状態では、T細胞膜上のシグナル伝達の構成要素は、動的ホメオスタシスの状態であり、それにより、脱リン酸化されたITAMが、リン酸化されたITAMよりも好まれる。これは、Lckなどの膜結合型キナーゼよりも膜貫通CD45/CD148ホスファターゼの高い活性に起因する。T細胞が、同族抗原のT細胞受容体（またはCAR）の認識を介して標的細胞と会合すると、密接な免疫学的シナプスが形成する。このT細胞と標的膜との近接によって、そのシナプスに収まらない大きな外部ドメインに起因してCD45/CD148が排除される。ホスファターゼの非存在下において、そのシナプスに高濃度のT細胞受容体関連ITAMおよびキナーゼが分離することにより、リン酸化されたITAMが好まれる状態がもたらされる。ZAP70は、リン酸化されたITAMの閾値を認識し、T細胞の活性化シグナルを広める。このT細胞の活性化に関する高度な理解を本発明は利用する。特に、本発明は、異なる長さおよび/またはかさ高さおよび/または電荷および/または配置および/またはグリコシル化の外部ドメインが、どのようにしてシナプス形成の際に異なって分離するのかというこの理解に基づく。

【0226】

本発明の実施形態の凝集に基づくANDゲートにおいて、細胞表面抗原に結合する第3のCARは、活性化エンドドメインを含み、可溶性リガンドに結合する第1および/または第2のCARは、阻害性エンドドメインを含む。阻害性CARは、第3のCARを構成的に阻害するが、可溶性リガンドに結合したとき、活性化CARのその阻害を解除する。このように、T細胞は、細胞表面抗原（図12におけるリガンドA）および可溶性抗原（図12におけるリガンドB）の存在下でのみ誘発するように操作され得る。この挙動は、ITAMドメインを含む活性化エンドドメイン、例えば、CD3ゼータのエンドドメインを含む第3のCAR、およびITAMを脱リン酸化できるホスファターゼ（例えば、CD45またはCD148）由来のエンドドメインを含む阻害性CARによって達成される。第3のCARだけがライゲートされるときは、阻害性エンドドメインを有する第1および/または第2のCARは、T細胞表面上で溶解状態にあり、シナプスの内外において拡散し得、CARの活性化を阻害し得る。第1および第2のCARが可溶性リガンドに結合すると、それらは凝集して、第3のCARから分離し、第3のCARがT細胞活性化を誘発

10

20

30

40

50

することを可能にする。

【0227】

共局在に基づくANDゲート

本発明の第5の実施形態では、第1のCARは、2つの抗原結合ドメインを含み、そのうちの1つは可溶性リガンドに結合し；もう1つは細胞表面抗原に結合する。この結合ドメインのタンデム配置（TanCARシステム）は、上に記載された本発明の第3の（thirs）実施形態と類似している。

【0228】

この共局在に基づくANDゲートでは、第1のCARは、機能性エンドドメインを欠く。それは、不活性なエンドドメインまたは切断型エンドドメインを含み得る。このエンドドメインは、抗原が結合した後にT細胞に活性化シグナルを伝達する任意のITAMまたは十分な数のITAMを欠くことがある。

10

【0229】

第2のCARは、T細胞シグナル伝達を誘発することができる1つまたはそれを超えるITAMを含む機能性エンドドメインを含む。可溶性リガンドの結合は、第1および第2のCARの共局在を引き起こし、第1のCARが細胞表面抗原に結合したとき、T細胞シグナル伝達を生じさせる。第2のCARは、例えば、CD3ゼータエンドドメインを含み得る。

【0230】

第2のCARは、単量体であり得、それにより、リガンドAの非存在下でのシグナル伝達が回避され得る。これは、単量体のスペーサーを含む第2のCARによって達成され得る。

20

【0231】

1つまたはそれを超えるIgドメインを含むCD22の切断バージョンが、単量体のスペーサーとして使用され得る。

【0232】

ベクター

本発明は、本発明の第1の態様に記載の第1および第2のCARをコードする1つまたはそれを超える核酸配列を含むベクターまたはベクターのキットも提供する。そのようなベクターは、本発明の第1の態様に記載の第1および第2のCARを発現するようにそれら（の）核酸配列を宿主細胞に導入するために使用され得る。

30

【0233】

ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター）またはトランスポゾンベースのベクターまたは合成mRNAであり得る。

【0234】

ベクターは、T細胞またはNK細胞をトランスフェクトすることまたは形質転換することができ得る。

【0235】

細胞

本発明は、第1のキメラ抗原受容体（CAR）および第2のCARを含む細胞を提供し、その第1および第2のCARは、同じリガンド上の異なるエピトープに結合する。

40

【0236】

上記細胞は、本発明の核酸またはベクターを含み得る。

【0237】

上記細胞は、T細胞またはNK細胞などの細胞溶解性の免疫細胞であり得る。

【0238】

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

50

。下記で概説する通り、様々なタイプのT細胞がある。

【0239】

ヘルパーTヘルパー細胞（TH細胞）は、形質細胞および記憶B細胞へのB細胞の成熟、ならびに細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化を含む、免疫学的プロセスで他の白血球を補助する。TH細胞は、それらの表面でCD4を発現する。TH細胞は、抗原提示細胞（APC）の表面でMHCクラスII分子によりペプチド抗原と共に提示されたときに活性化される。これらの細胞は、種々のサイトカインを分泌することにより、種々のタイプの免疫応答を促進する、TH1、TH2、TH3、TH17、Th9、またはTFHを含む、幾つかのサブタイプのうちの1つに分化し得る。

【0240】

細胞溶解性T細胞（TC細胞またはCTL）は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、また移植拒絶でも関与する。CTLは、それらの表面でCD8を発現する。これらの細胞は、全有核細胞の表面に存在する、MHCクラスIに随伴する抗原に結合することにより標的を認識する。調節性T細胞により分泌されるIL-10、アデノシンおよび他の分子を通じて、CD8+細胞はアネルギー状態に不活化され得、実験的自己免疫脳脊髄炎などの自己免疫疾患を防止する。

【0241】

記憶T細胞は、感染の消散後長期にわたって持続する抗原特異的T細胞のサブセットである。それらは、それらの同種抗原に再曝露されると、迅速に多数のエフェクターT細胞に拡大し、過去の感染に対する「記憶」をもつ免疫系を提供する。記憶T細胞は、3つのサブタイプ：セントラル記憶T細胞（TCM細胞）および2タイプのエフェクター記憶T細胞（TEM細胞およびTEMRA細胞）を含む。記憶細胞は、CD4+またはCD8+のいずれかであり得る。記憶T細胞は、典型的には細胞表面タンパク質CD45ROを発現する。

【0242】

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

【0243】

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

【0244】

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

【0245】

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

【0246】

細胞は、ナチュラルキラー細胞（またはNK細胞）であり得る。NK細胞は、先天性免疫系の一部を形成する。NK細胞は、MHC非依存的にウイルス感染細胞からの内生シグナルに対して、迅速な応答を提供する。

【0247】

NK細胞（自然リンパ球の群に属する）は、大顆粒リンパ球（LGL）として定義され、Bリンパ球およびTリンパ球を生じる共通のリンパ性前駆細胞から分化した第3の種類の細胞を構成する。NK細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃および胸腺で分化および成

10

20

30

40

50

熟し、次いでそこから循環系に入ることが知られている。

【0248】

本発明のCAR細胞は、上記で挙げた細胞タイプのいずれでもよい。

【0249】

本保圧名の第1の態様にキシアのTまたはNK細胞は、患者自身の末梢血から（第1団）、またはドナー末梢血からの造血幹細胞移植の状況において（第2団）、または非関連ドナーからの末梢血（第3団）から生体外で作製され得る。

【0250】

あるいは、本発明の第1の態様によるTまたはNK細胞は、TまたはNK細胞への誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞のエキソビボでの分化から得られ得る。あるいは、溶解機能を保持し、治療薬として作用し得る不死化されたT細胞株が使用され得る。

10

【0251】

これらのすべての実施形態において、CAR細胞は、ウイルスベクターでの形質導入、DNAまたはRNAでのトランスフェクションを含む多くの手段のうちの1つにより第1および第2のCARをコードするDNAまたはRNAを導入することにより生成される。

【0252】

本発明のCAR細胞は、被験体由来のエキソビボのTまたはNK細胞であり得る。そのTまたはNK細胞は、末梢血単核球（PBMC）試料に由来し得る。TまたはNK細胞は、本発明の第1の態様によるCARを提供する分子または本発明の第2の態様によるCARシグナル伝達系の構成要素をコードする核酸を形質導入される前に、例えば、抗CD3モノクローナル抗体での処置によって、活性化および/または拡大され得る。

20

【0253】

本発明のTまたはNK細胞は、

（i）被験体または上に列挙された他の起源からのTまたはNK細胞含有試料の単離；および

（ii）第1および第2のCARをコードする1つまたはそれを超える核酸配列によるTまたはNK細胞の形質導入またはトランスフェクションによって作製され得る。

【0254】

次いで、それらのTまたはNK細胞は、抗原結合ポリペプチドの抗原結合ドメインの発現に基づいて精製され得、例えば、選択され得る。

30

【0255】

医薬組成物

本発明はまた、本発明の第1の実施態様による複数の細胞を含む医薬組成物に関する。

【0256】

医薬組成物は、さらに薬学的に許容し得る担体、希釈剤または賦形剤を含んでもよい。医薬組成物は、所望により1種またはそれより多くのさらなる医薬活性ポリペプチドおよび/または化合物を含んでもよい。かかる製剤は、例えば、静脈内注入に好適な形態であり得る。

【0257】

処置方法

本発明は、疾患を処置および/または予防するための方法を提供し、その方法は、本発明の細胞（例えば、上に記載されたような医薬組成物中の本発明の細胞）を被験体に投与する工程を含む。

40

【0258】

疾患を処置するための方法は、本発明の細胞の治療的使用に関する。本明細書中において、それらの細胞は、既存の疾患に関連する少なくとも1つの症候を和らげるか、減少させるか、もしくは改善するため、および/またはその疾患の進行を減速させるか、減少させるか、もしくは阻止するために、その疾患または症状を有する被験体に投与され得る。

【0259】

50

疾患を予防するための方法は、本発明の細胞の予防的使用に関する。本明細書中において、そのような細胞は、まだ疾患にかかっていないおよび／またはいかなる疾患の症候も示していない被験体に、その疾患を予防するためもしくはその疾患の原因を弱めるため、またはその疾患に関連する少なくとも1つの症候を減少させるためもしくはその発生を予防するために、投与され得る。被験体は、その疾患の素因を有し得るか、またはその疾患を発症するリスクがあると考えられ得る。

【0260】

上記方法は、

(i) TまたはNK細胞含有試料を単離する工程；

(ii) そのような細胞に、本発明によって提供される核酸配列もしくはベクターを形質導入するか、またはそのような細胞を、本発明によって提供される核酸配列もしくはベクターでトランスフェクトする工程；

(iii) 被験体に(ii)からの細胞を投与する工程を含み得る。

【0261】

TまたはNK細胞含有試料は、被験体または他の起源、例えば、上に記載されたような起源から単離され得る。TまたはNK細胞は、被験体自身の末梢血（第一者）、またはドナー末梢血由来の造血幹細胞移植の状況（第二者）、または無関係のドナー由来の末梢血（第三者）から単離され得る。

【0262】

本発明は、疾患の処置および／または予防において使用するための本発明のCAR細胞を提供する。

【0263】

本発明は、疾患を処置および／または予防するための医薬の製造における本発明のCAR細胞の使用にも関する。

【0264】

本発明の方法によって処置および／または予防される疾患は、がん性疾患（例えば、膀胱がん、乳がん、結腸がん、子宮体がん、腎臓がん（腎細胞）、白血病、肺がん、メラノーマ、非ホジキンリンパ腫、膵がん、前立腺がんおよび甲状腺がん）であり得る。

【0265】

可溶性リガンドがPSAである場合、がんは、前立腺がんであり得る。

【0266】

本発明のCAR細胞は、がん細胞などの標的細胞を殺すことができ得る。標的細胞は、標的細胞の近傍に可溶性リガンドが存在することを特徴とし得る。標的細胞は、標的細胞表面における腫瘍関連抗原（TAA）の発現とともに、可溶性リガンドが存在することを特徴とし得る。

【0267】

本発明のCAR細胞は、低密度のTAAを発現するがん細胞などの標的細胞を殺すことができ得る。ある特定のがんにおいて低密度で発現されると知られているTAAの例としては、CLLにおけるROR1、メラノーマにおけるTypr-1およびミエローマにおけるBCMAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0268】

本発明のCAR細胞および医薬組成物は、上に記載された疾患の処置および／または予防において使用するためであり得る。

【0269】

本発明のCAR細胞および医薬組成物は、上に記載された任意の方法において使用するためであり得る。

【0270】

本発明は、実施例によってさらに説明され、この実施例は、本発明を実施する際に当業者を助けるように機能すると意味されており、本発明の範囲を決して限定しないと意図さ

10

20

30

40

50

れている。

【実施例】

【0271】

実施例1 - 可溶性リガンドによるT細胞の活性化の誘発

通常、CARは、単量体の可溶性リガンドで活性化されない。なぜなら、そのリガンドは、会合した受容体の分離を引き起こさず、受容体に結合するだけであるからである（図1）。可溶性リガンドに受容体を凝集させるために、2つの非競合的エピトープに結合する少なくとも2つのCARを有することが必要である（図2）。CARは、典型的にはホモ二量体であるが、三量体または多価の受容体が、改善された成績を示し得る（図3）。

【0272】

概念証明として、可溶性の単量体のROR-1をリガンドとして使用した（図4）。R12およびR11と名付けられた、ROR-1リガンド上の相互排他的なエピトープに結合する2つのCARを使用した。凝集モデルに従って、R11またはR12を発現しているT細胞は、可溶性リガンドによって活性化しないが、R12とR11の両方を発現しているT細胞は、可溶性リガンドの存在下において活性化すると予測された。R12およびR11 CARが互いに相互結合する（ヘテロ二量体を引き起こす）のを妨げるために、R12をCD8STKスパーサー上に置き、R11をFcスパーサー上に置いた（図5）。コントロールとして、二重CARを発現するT細胞を使用し、ここで、両CARが、R12 scFvを含む（一方はCD8STK上であり、他方はFcスパーサー上である）。それらのCARのうちの1つを多価CARとして有する効果を調べるために、1つのシステムにおいて、R12 CARをCD8STKスパーサー上に置き、R11をCOMPスパーサー上に置いた（図6）。

【0273】

マウスT細胞株（BW5細胞）に、R12 scFvをCD8STKスパーサー上もしくはFcスパーサー上に含む単一CAR、またはR11 scFvをFcスパーサー上もしくはCOMPスパーサー上に含む単一CARを形質導入した。さらに、R12-CD8STKが陽性のBW5細胞に、R11-Fc、R11-COMP、またはコントロールとしてのR12-Fcである第2のCARを形質導入して発現させた。この実験において使用されたすべてのCARが、細胞内TCR α ドメイン（第1世代）を有した。これらの細胞を、可溶性ROR-1（Hisでタグ化されたもの）を含む上清で刺激し、IL-2を24時間後に計測した（図7）。

【0274】

R11 CARとR12 CARの両方を発現するT細胞だけが、可溶性リガンドの存在下において刺激できたことが見出された。重要なことには、2コピーのR12を発現しているT細胞は、可溶性リガンドで刺激できなかった。

【0275】

これらのT細胞を、固定化されたりガンドで刺激できることを試験するためのさらなるコントロールとして、これらのT細胞を、種々の濃度の可溶性ROR-1 hisタグで予めコーティングされた抗Hisビーズで刺激した（図8）。この図は、固定化されたりガンドですべてのT細胞を刺激できたことを示しており、この実験において使用されたすべてのT細胞がシグナルを伝達することができたが、しかしながら、2つの相互排他的なエピトープに対する二重CARだけでは、可溶性リガンドで刺激できなかったことが示唆された。

【0276】

実施例2 - 膜結合型リガンドと可溶性リガンドの両方の存在下でT細胞の活性化を誘発するための凝集に基づくANDゲートの使用

【0277】

「分割」CARシステムの実行可能性を実証するために、BW5細胞に、

i) aCD19-CD8STK-TCR α -2A-R12-IgGfc-CD148または

ii) aCD19-CD8STK-TCR α -2A-R12-IgGfc-CD148お

よび R 1 1 - I g M F c - C D 1 4 8

を発現するベクターを形質導入し、トランスフェクトされていない S u p T 1 標的細胞または C D 1 9 を発現している S u p T 1 標的細胞に曝露した。種々の濃度の可溶性 R O R - 1 上清とともに、4 : 1 の標的対エフェクター比で共培養を行った。

【 0 2 7 8 】

結果を図 1 4 に示す。T 細胞の活性化は、膜結合型抗原 (C D 1 9) と可溶性リガンド (R O R 1) の両方の存在下において最大である。膜結合型抗原を発現しない標的 (N T) は、T 細胞を刺激しなかった。

【 0 2 7 9 】

実施例 3 - P S A に結合する m A b (5 D 5 A 5 および 5 D 5 D 1 1) に基づく 2 C A R システムを用いたとき、可溶性リガンド P S A によって、凝集の誘導およびその後の T 細胞の活性化が生じる

【 0 2 8 0 】

B W 5 T 細胞に、

i) A 5 - D 1 1 (a P S A - A 5 - C D 8 S T K - C D 2 8 T M - z _ _ a P S A - D 1 1 - H L - ヒンジ - C D 2 8 t m Z) または

i i) D 1 1 - A 5 (a P S A - D 1 1 - C D 8 S T K - C D 2 8 T M - z _ _ a P S A - A 5 - H L - ヒンジ - C D 2 8 t m Z)

を発現するベクターを形質導入し、次いで、300 p g / m L の P S A の存在下においてインキュベートして、その 2 C A R システムの構築物内の P S A 抗原結合ドメインが、凝集およびその後の C A R の活性化を誘導するかを判定した。グラフ (図 1 5) は、A 5 - D 1 1 構築物と D 1 1 - A 5 構築物の両方が、B W 5 T 細胞に有意なレベルの I L - 2 を分泌させたことを示しており、T 細胞の活性化が示唆される。

【 0 2 8 1 】

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

10

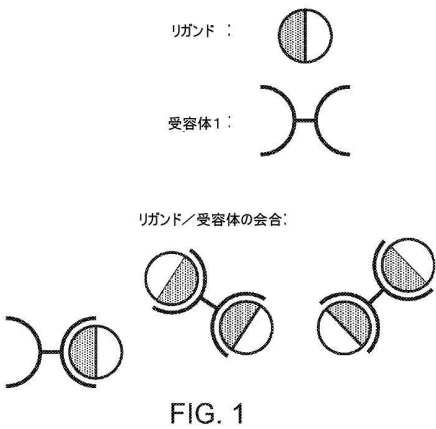
20

30

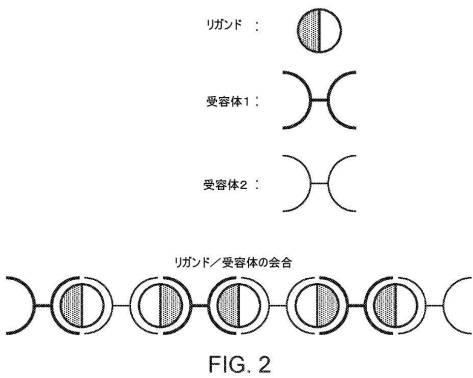
40

50

【図面】
【図 1】

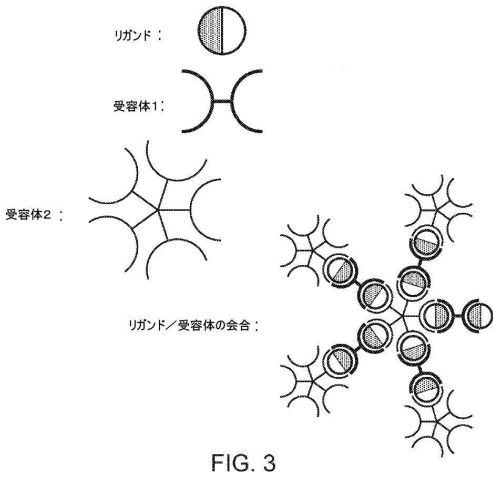


【図 2】

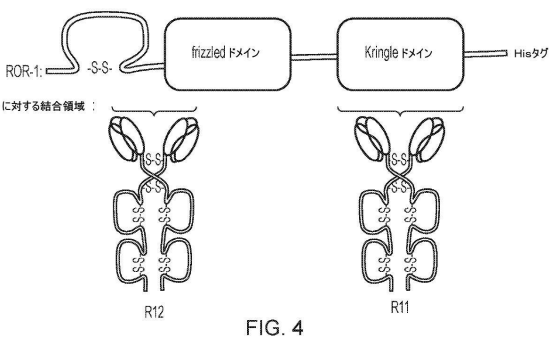


10

【図 3】



【図 4】



20

30

40

50

【図 9 - 1】

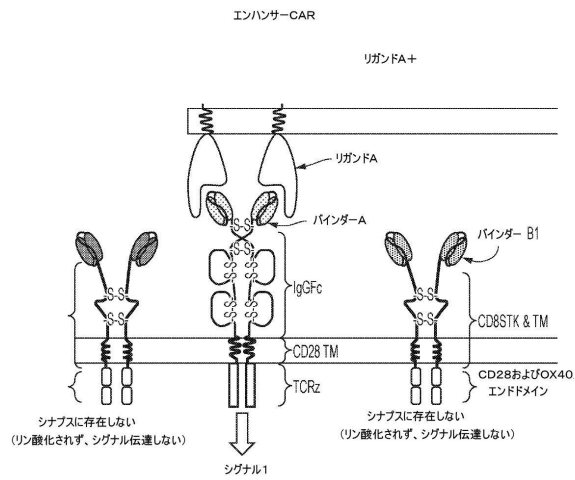


FIG. 9

【図 9 - 2】

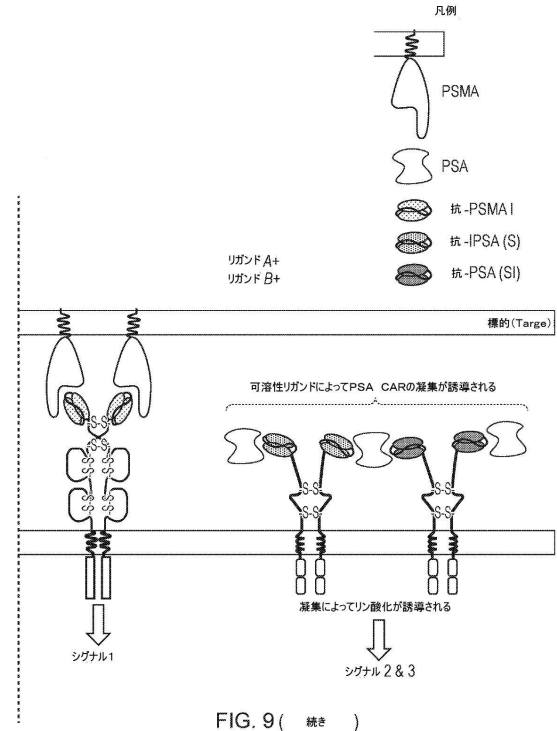


FIG. 9 (続き)

【図 10 - 1】

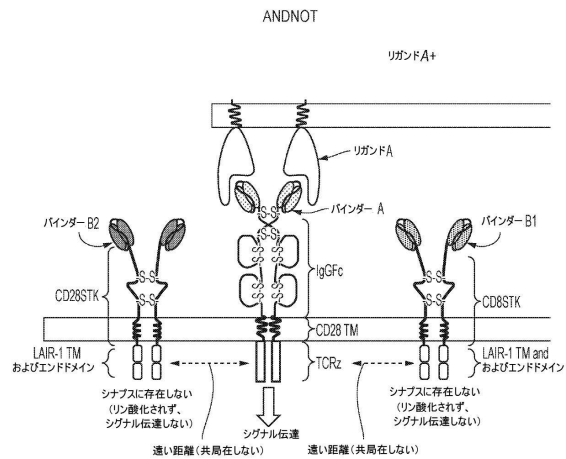


FIG. 10

【図 10 - 2】

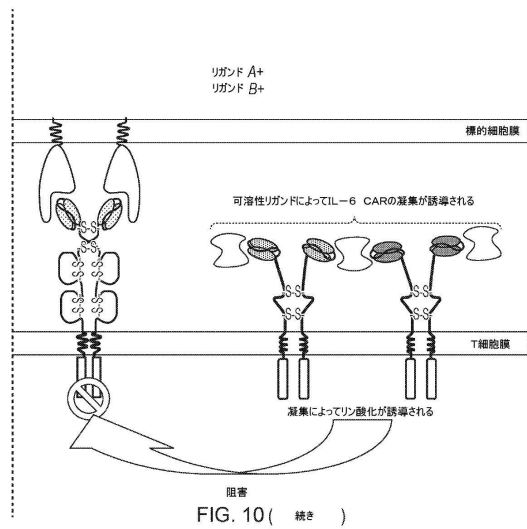


FIG. 10 (続き)

10

20

30

40

50

【図 1 1 - 1】

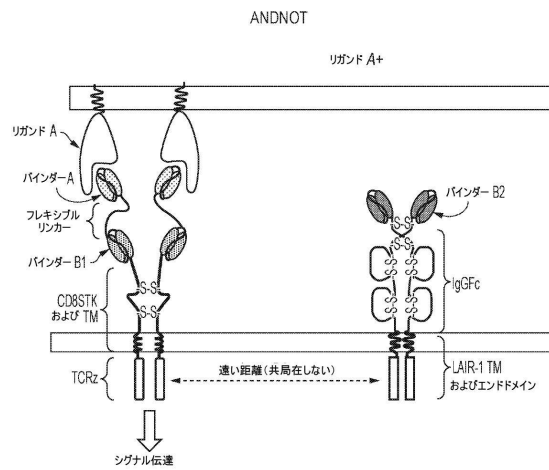


FIG. 11

【図 1 1 - 2】

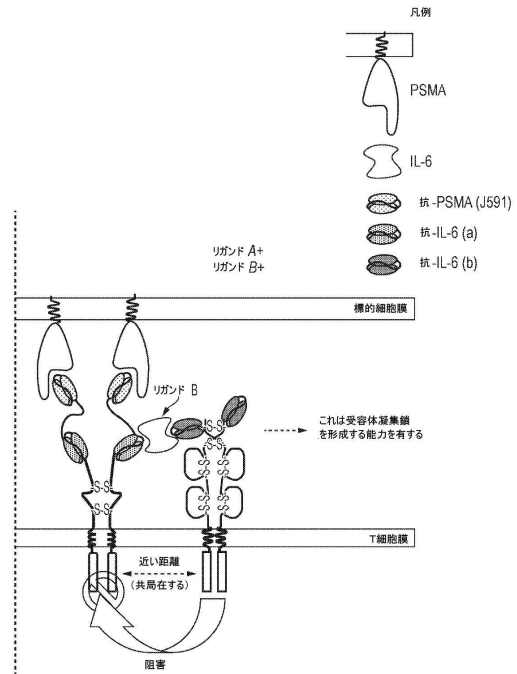


FIG. 11 (続き)

【図 1 2 - 1】

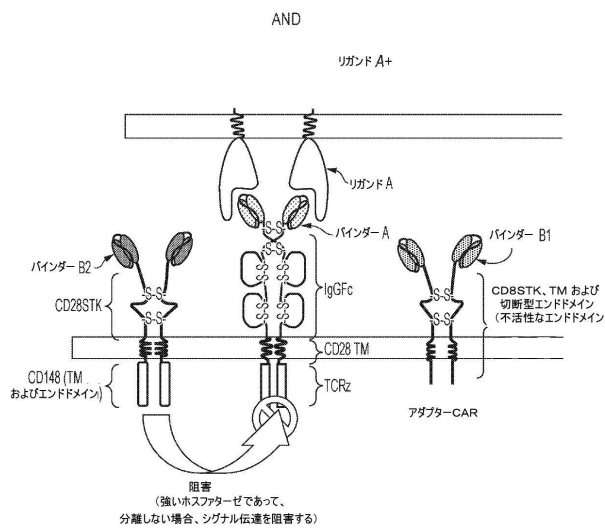


FIG. 12

【図 1 2 - 2】

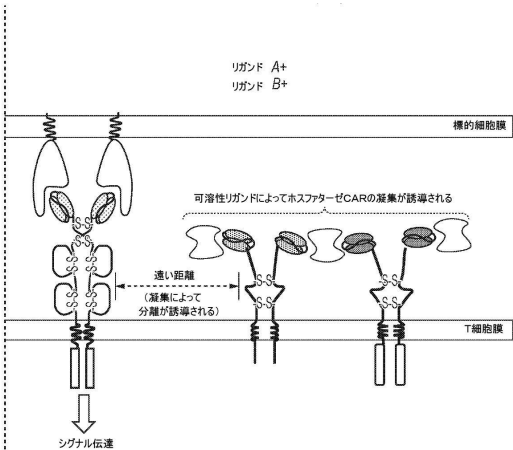


FIG. 12 (続き)

10

20

30

40

50

【図 13 - 1】

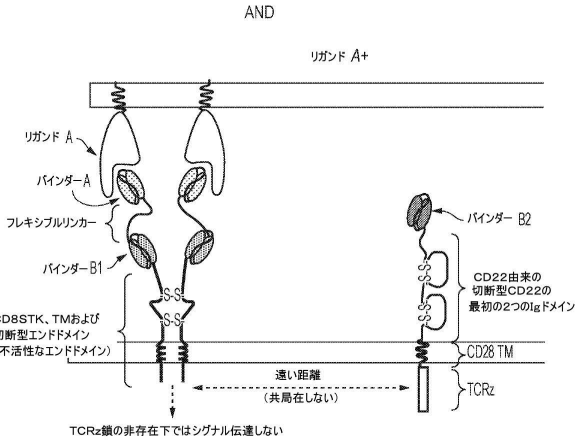


FIG. 13

【図 13 - 2】

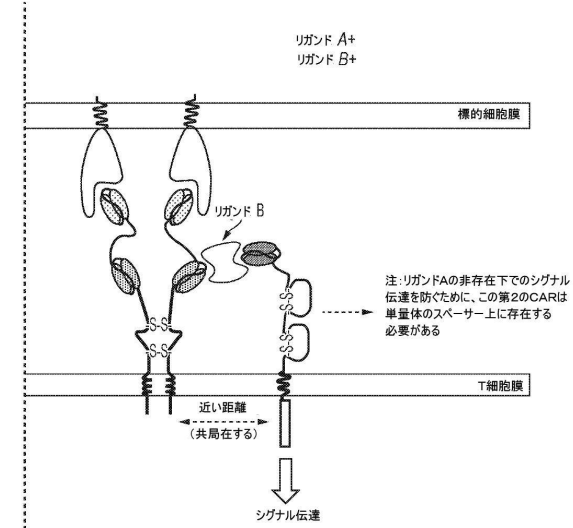


FIG. 13 (続き)

【図 14】

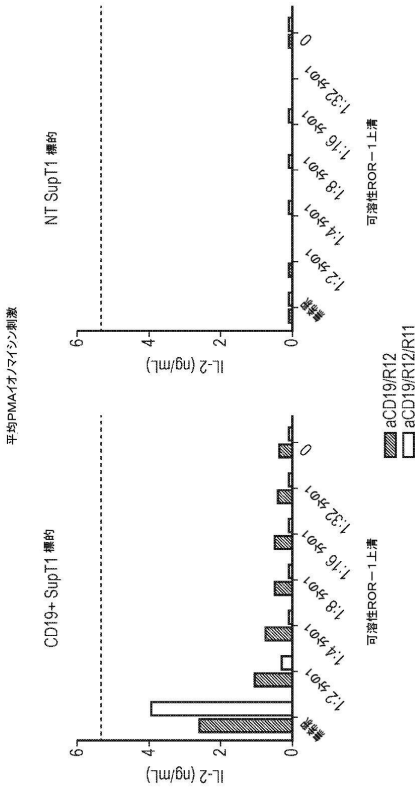


FIG. 14

【図 15】

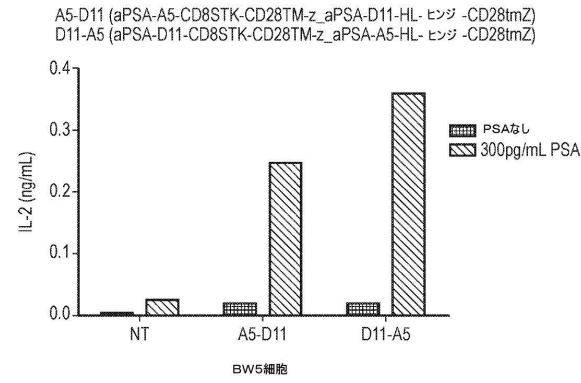


FIG. 15

【配列表】

0007395249000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

英国(GB)

(72)発明者 プーレ, マーティン

イギリス国 ダブリュー 1 2 7 アールゼット ロンドン, ウッド レーン 5 8, フォレスト ハ
ウス, オートラス リミテッド 気付

(72)発明者 コルドバ, ショーン

イギリス国 ダブリュー 1 2 7 アールゼット ロンドン, ウッド レーン 5 8, フォレスト ハ
ウス, オートラス リミテッド 気付

(72)発明者 リーギ, マッテオ

イギリス国 ダブリュー 1 2 7 アールゼット ロンドン, ウッド レーン 5 8, フォレスト ハ
ウス, オートラス リミテッド 気付

(72)発明者 シリボーン, ジェイムズ

イギリス国 ダブリュー 1 2 7 アールゼット ロンドン, ウッド レーン 5 8, フォレスト ハ
ウス, オートラス リミテッド 気付

合議体

審判長 福井 悟

審判官 高堀 栄二

審判官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 0 2 3 0 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 5 / 0 7 5 4 6 9 (W O , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 3 4 9 7 0 (U S , A 1)

Onkologie, 2012年, Vol. 35, Supp. 6, Abstract

Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia, 20

11年, Vol. 11, Supp. 2, Abstract

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C12N15/00-15/62

C12N5/00-5/10

C A / B I O S I S / W P I D S (S T N)

P u b M e d