

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-514308
(P2024-514308A)

(43)公表日 令和6年4月1日(2024.4.1)

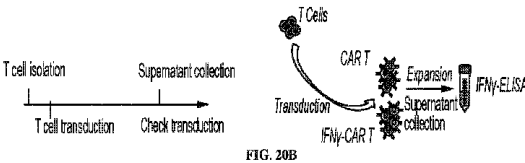
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/23 (2006.01)	C 1 2 N	15/23		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 7
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全120頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-560349(P2023-560349)	(71)出願人	598004424	シティ・オブ・ホープ City of Hope アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 1 0 - 3 0 0 0 デュアーテ イースト デュアーテ ロード 1 5 0 0	
(86)(22)出願日	令和4年3月30日(2022.3.30)				
(85)翻訳文提出日	令和5年11月28日(2023.11.28)				
(86)国際出願番号	PCT/US2022/022575				
(87)国際公開番号	WO2022/212525	(74)代理人	100107766	弁理士 伊東 忠重	
(87)国際公開日	令和4年10月6日(2022.10.6)	(74)代理人	100070150		
(31)優先権主張番号	63/168,210	(72)発明者	アリザデ, ダリヤ	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 1 0 , デュアーテ, イースト デュア ーテ ロード 1 5 0 0	
(32)優先日	令和3年3月30日(2021.3.30)	(72)発明者	ブラウン, クリスティーン イー .		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			最終頁に続く	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 C A R T細胞療法及びI F N γ

(57)【要約】

本明細書では、とりわけ、キメラ抗原受容体 (C A R) 改変免疫細胞を含む組成物、製剤化方法、並びにがん及び白血病の治療に有用な方法が提供される。

【選択図】なし



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び C D 3 ζ シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) をコードするヌクレオチド配列 ; 並びにヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 2】

C A R 及びヒトインターフェロン γ の発現とともに制御するプロモーターを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

第一のプロモーターが C A R の発現を制御し、第二のプロモーターがヒトインターフェロン γ 又はその変異体の発現を制御する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

第一のプロモーターが構成的プロモーターであり、第二のプロモーターが構成的プロモーター又は誘導性プロモーターである、請求項 3 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

2 A スキップ配列をコードするヌクレオチド配列が、C A R をコードするヌクレオチド配列と、ヒトインターフェロン γ 又はその変異体をコードするヌクレオチド配列との間に位置する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

2 A スキップ配列が、T 2 A、P 2 A、E 2 A 及び F 2 A からなる群から選択される、請求項 5 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

ヒトインターフェロン γ 又はその変異体が、配列番号 1 又は配列番号 B で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

C A R が、配列番号 C で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

膜貫通ドメインが、C D 4 膜貫通ドメイン、C D 8 膜貫通ドメイン、C D 2 8 膜貫通ドメイン、及び N K G 2 D 膜貫通ドメインから選択される、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 10】

膜貫通ドメインが、C D 2 8 膜貫通ドメイン又は C D 8 膜貫通ドメインである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 11】

共刺激ドメインが、C D 2 8 共刺激ドメイン、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、又は 2 B 4 共刺激ドメインである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 12】

共刺激ドメインが、配列番号 2 2 ~ 2 5 及び 6 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

C D 3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 2 1 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 5 0 ~ 5 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むその変異体を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 14】

アミノ酸残基が 3 ~ 1 5 個あるリンカーが、共刺激ドメインと C D 3 ζ シグナル伝達ドメイン又はその変異体との間に位置する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 15】

スパーサーが、配列番号 2 ~ 1 2 及び 4 4 で表されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

標的化ドメインが、いかなるがん細胞抗原にも標的化される s c F v を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 17】

s c F v が、CD 19、MUC 16、MUC 1 (又は t MUC 1)、CAIX、CEA、CD 20、CD 22、CD 30、HER - 2、ERBB 2、MAGEA 3、p 53、PSCA、BCMA、CD 123、CD 44V6、インテグリン B7、ICAM - 1、CD 70、CEA、GD 2、PSMA、B7H3、CD 33、Flt 3、CLL 1、葉酸受容体、EGFR、CD 7、EGFRvIII、グリピカン 3、CD 5、ROR 1、CS 1、AFP、CD 133、及び TAG - 72 のいずれか 1 つ以上を標的とする、請求項 16 に記載の核酸分子。

10

【請求項 18】

標的化ドメインがリガンドを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 19】

リガンドが、IL - 13 若しくはその変異体、又は、クロロトキシン若しくはその変異体である、請求項 18 に記載の核酸分子。

【請求項 20】

CAR が、配列番号 70 ~ 76 のいずれかで表されるアミノ酸配列、又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 21】

ヒトインターフェロン γ を含むポリペプチドが、ヒトインターフェロン γ の分泌のためのシグナル配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

20

【請求項 22】

ヒトインターフェロン γ を含むポリペプチドが、天然ヒトインターフェロン γ シグナル配列とは異なるヒトインターフェロン γ の分泌のためのシグナル配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 23】

(a) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列及びヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体又はポリペプチドが、標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び CD 3 ζ シグナル伝達ドメインを含み、又は、

30

(b) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子及びヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体又はポリペプチドが、標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び CD 3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、を備える、ヒト T 細胞の集団。

【請求項 24】

(a) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列及びヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体又はポリペプチドが、標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び CD 3 ζ シグナル伝達ドメインを含み、又は、

40

(b) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子及びヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体又はポリペプチドが、標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び CD 3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、を備える、ヒト T 細胞の集団。

【請求項 25】

50

核酸分子が、C A R 及びヒトインターフェロン γ の発現をともに制御するプロモーターを含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 2 6】

核酸分子が、C A R 及びヒトインターフェロン γ の発現をともに制御するプロモーターを含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 2 7】

第一のプロモーターが C A R の発現を制御し、第二のプロモーターがヒトインターフェロン γ 又はその変異体の発現を制御する、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 2 8】

第一のプロモーターが構成的プロモーターであり、第二のプロモーターが構成的プロモーター又は誘導性プロモーターである、請求項 2 7 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 2 9】

2 A スキップ配列をコードするヌクレオチド配列が、C A R をコードするヌクレオチド配列と、ヒトインターフェロン γ 又はその変異体をコードするヌクレオチド配列との間に位置する、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 0】

2 A スキップ配列が、T 2 A、P 2 A、E 2 A 及び F 2 A からなる群から選択される、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 1】

ヒトインターフェロン γ が、配列番号 1 又は配列番号 B で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 2】

C A R が、配列番号 C で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 3】

膜貫通ドメインが、C D 4 膜貫通ドメイン、C D 8 膜貫通ドメイン、C D 2 8 膜貫通ドメイン、及び N K G 2 D 膜貫通ドメインから選択される、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 4】

膜貫通ドメインが、C D 2 8 膜貫通ドメイン又は C D 8 膜貫通ドメインである、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 5】

共刺激ドメインが、C D 2 8 共刺激ドメイン、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、又は 2 B 4 共刺激ドメインである、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 6】

共刺激ドメインが、配列番号 2 2 ~ 2 5 及び 6 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 7】

C D 3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 2 1 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 5 0 ~ 5 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むその変異体を含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 8】

アミノ酸残基が 3 ~ 1 5 個あるリンカーが、前記共刺激ドメインと前記 C D 3 ζ シグナル伝達ドメイン又はその変異体との間に位置する、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 3 9】

スペーサーが、配列番号 2 ~ 1 2 及び 4 4 で表されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 4 0】

10

20

30

40

50

標的化ドメインが、いかなるがん細胞抗原にも標的化される s c F v を含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 4 1】

s c F v が、C D 1 9、M U C 1 6、M U C 1 (又は t M U C 1)、C A I X、C E A、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、H E R - 2、E R B B 2、M A G E A 3、p 5 3、P S C A B C M A、C D 1 2 3、C D 4 4 V 6、インテグリン B 7、I C A M - 1、C D 7 0、C E A、G D 2、P S M A、B 7 H 3、C D 3 3、F l t 3、C L L 1、葉酸受容体、E G F R、C D 7、E G F R v I I I、グリピカン 3、C D 5、R O R 1、C S 1、A F P、C D 1 3 3、及び T A G - 7 2 のいずれか 1 つ以上を標的とする、請求項 4 0 に記載のヒト T 細胞の集団。

10

【請求項 4 2】

標的化ドメインがリガンドを含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 4 3】

リガンドが、I L - 1 3 若しくはその変異体、又は、クロロトキシン若しくはその変異体である、請求項 4 2 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 4 4】

C A R が、配列番号 7 0 ~ 7 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列、又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体を含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 4 5】

ヒトインターフェロン γ を含むポリペプチドが、ヒトインターフェロン γ の分泌のためのシグナル配列を含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

20

【請求項 4 6】

ヒトインターフェロン γ を含むポリペプチドが、天然ヒトインターフェロン γ シグナル配列とは異なるヒトインターフェロン γ の分泌のためのシグナル配列を含む、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 4 7】

患者のがんを治療するための方法であって、前記方法は、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクターによって形質導入された自己由来又は同種異系ヒト T 細胞の集団を投与することを含み、ここで、前記がんが、C A R の標的化ドメインによって標的化される、方法。

30

【請求項 4 8】

患者のがんを治療するための方法であって、前記方法は、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のヒト T 細胞の集団を投与することを含み、ここで、前記ヒト T 細胞の集団は自己由来又は同種異系であり、かつ、前記がんが、C A R の標的化ドメインによって標的化される、方法。

【請求項 4 9】

第一のプロモーターが強力な構成的プロモーターであり、第二のプロモーターがより脆弱な構成的プロモーターである、請求項 2 8 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 5 0】

第一のプロモーターが強力な構成的プロモーターであり、第二のプロモーターがより脆弱な構成的プロモーターである、請求項 4 に記載の核酸分子。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 2 1 年 3 月 3 0 日に提出された米国仮出願第 6 3 / 1 6 8 , 2 1 0 号の利益を主張する。その内容は全体として、参照により本明細書に援用される。

本開示は、キメラ抗原受容体 (C A R) 組換え免疫細胞、その製剤化方法、及びその使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

50

膠芽腫（GBM）は、治療選択肢が極めて限定された最も致命的ながんの1つである（非特許文献1～3）。積極的な標準治療にもかかわらず、腫瘍再発はほぼ避けられず、ほぼ致死的であり、ほとんどの患者は診断後2年以上生存することはない。免疫療法の進歩により、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞の養子移入を含む、GBMにおける抗腫瘍免疫応答を誘発するための治療戦略を開発するための試みが続けられている。GBMにおけるCAR T細胞を評価する臨床研究により、選択された患者における安全性及び生物活性の初期の証拠が実証されたが、それにもかかわらず、応答は制限されている。GBM等の固形腫瘍に対する効率の良いCAR T細胞療法のための課題は、多因子性である。腫瘍の不均一性及び細胞の可塑性により、抗原喪失腫瘍変異体が増殖し、治療が失敗する。GBM腫瘍における腫瘍微小環境は、骨髄が豊富であり、T細胞集団が少ないため、CAR T細胞に特異的な課題がある。 10

【0003】

IL13R α 2-CAR T療法は、腫瘍細胞によるIL13R α 2の不均一な発現にもかかわらず、GBMの治療においていくらか有望であることが示されている（非特許文献4）。応答は、CNS炎症性サイトカインの増加及び内因性免疫細胞の浸潤に関連していた（非特許文献4）。この観察と一致して、HER2-CAR T細胞治療後の免疫モニタリングの最近の縦断的分析により、患者の好ましい応答に寄与している可能性がある内因性免疫反応性を示す証拠が示された（非特許文献5）。IFN γ 等のCAR T細胞によって分泌される炎症促進性サイトカインは、GBM TMEにおける免疫浸潤物の活性化及びプログラミングにおいて重要な役割を果たし得る。 20

IFN γ は、マクロファージ（非特許文献6）及びミクログリア（非特許文献7）を活性化し、細胞傷害性T細胞を動員及び活性化し、CD4+T細胞をTh1エフェクター細胞に極性化し、腫瘍促進性Tregの発生及びその機能を損なわせることができる（非特許文献8～10）。IFNはさらに、腫瘍反応性T細胞の活性化及びプライミングを促進するための主要なシグナル（非特許文献12）として作用することができる（非特許文献11）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】McGranahan T, Therkelsen KE, Ahmad S, Nagpal S. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. Current treatment options in oncology 2019, 20(3): 24. 30

【非特許文献2】Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA: a cancer journal for clinicians 2018, 68(1): 7-30.

【非特許文献3】Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2017, 35(21): 2402-2409. 40

【非特許文献4】Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. The New England journal of medicine 2016, 375(26): 2561-2569.

【非特許文献5】Hegde M, Joseph SK, Pashankar F, DeRenzo C, Sanber K, Navai S, et al. Tumor response and endogenous immune reactivity a 50

fter administration of HER2 CAR T cells in a child with metastatic rhabdomyosarcoma. Nature communications 2020, 11(1): 3549.

【非特許文献6】Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, et al. Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. International journal of cancer 2009, 125(2): 367-373.

10

【非特許文献7】Rock RB, Hu S, Deshpande A, Munir S, May BJ, Baker CA, et al. Transcriptional response of human microglial cells to interferon-gamma. Genes and immunity 2005, 6(8): 712-719.

【非特許文献8】Castro F, Cardoso AP, Goncalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. Frontiers in immunology 2018, 9: 847.

20

【非特許文献9】Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon-gamma derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. Cell death & disease 2017, 8(6): e2836.

【非特許文献10】Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting. Nature reviews Immunology 2006, 6(11): 836-848.

【非特許文献11】Curtissinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. Current opinion in immunology 2010, 22(3): 333-340.

30

【非特許文献12】O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. Sci Transl Med 2017, 9(399).

40

【発明の概要】

【0005】

本明細書で開示されるのは、腫瘍抗原を標的とするCAR及び核酸分子によりコードされるヒトIFN γ （「組換えヒトIFN γ 」）をともに発現する免疫系細胞、例えば、T細胞又はNK細胞、例えば、CAR及びヒトIFN γ をコードする核酸分子がある免疫細胞である。いかなる理論にも束縛されるものではないが、共発現は、免疫細胞の活性化、免疫細胞の増殖、及び腫瘍細胞を認識する内因性細胞による腫瘍細胞死滅のうちの1つ以上を高めるようである。CARは、腫瘍抗原を標的とするscFv（例えば、CD19を標的とするscFv）又は腫瘍細胞上の受容体に結合するリガンド（例えば、IL-13又はその変異体）である標的化ドメインを含んでよい。したがって、細胞は、CAR及び

50

ヒトIFN γ をコードする核酸分子を保有することができる。CAR及びヒトIFN γ の発現は、同じ発現制御配列の制御下にあっても、異なる発現制御配列の制御下にあってもよい。細胞は、CAR及びヒトインターフェロン γ を含む単一アミノ酸配列をコードする核酸分子を保有することができる。例えば、CARのアミノ酸配列の後に、リボソームスキップ配列、次いでヒトIFN γ を含むアミノ酸配列が続いてよい。アミノ酸配列は、タンパク質の分泌のための少なくとも1つのシグナル配列（例えば、CARの分泌のためのシグナル配列及びヒトIFN γ の発現のためのシグナル配列）を含んでよい。ある実施形態では、本開示の核酸は、非内因性核酸であってよい。

【0006】

CAR及びインターフェロンを発現する免疫細胞は、CARの標的を発現するがん細胞を標的とし、死滅させることができる。さらに、それらは、例えば、腫瘍微小環境における自然免疫サブセット及び適応免疫サブセットを活性化することによって、CARの標的を発現しないがん細胞の死滅を活性化することができる。このように、それらは、CARの標的を発現するがん細胞及びCARの標的を発現しないか又はCARの標的の発現が非常に低いがん細胞とともに含む腫瘍の治療に有用である。

10

ヒトIFN γ は、以下のアミノ酸配列を含んでよい。

【0007】

【化1】

QDPYVKEAENLKQYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNV

20

KFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFRGRRASQ (配列番号1)

ヒトIFN γ アミノ酸配列前に、真核生物細胞（例えば、ヒト細胞）からのヒトインターフェロン γ の分泌を指向するシグナル配列が付加されてよい。したがって、ヒトインターフェロン γ 前駆体を用いることができる（シグナル配列に下線を付す）。

【0008】

【化2】

MKYTSYILAFQLCIVLGLGCGCYCQDPYVKEAENLKQYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFK

30

NFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFR

GRRASQ (配列番号B)

CARは、腫瘍抗原を標的とすることができ、その非限定的な例としては、適するIL-13 CARは、以下のアミノ酸配列を含むヒトIL-13の変異体を含む：

【0009】

【化3】

GPGPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAG

40

QFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGFRN (配列番号C)

野生型ヒトIL-13の配列（シグナル配列に下線を付す）：

【0010】

【化4】

MHPLLNPILLALGLMALLTTVIALTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAA

LESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGFRN (配列番号D)

50

I L - 1 3 C A R は、例えば、配列番号 C ; スペーサー (例えば、配列番号 2 ~ 1 2 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む) ; 膜貫通ドメイン (例えば、配列番号 1 3 ~ 2 0 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む) ; 共刺激ドメイン (配列番号 2 2 ~ 2 5 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む) ; 場合によっては、アミノ酸残基が 3 ~ 1 5 個あるリンカー (例えば、G G G) ; 及び C D 3 ゼータ細胞質ドメイン (配列番号 2 1 又は配列番号 5 0 ~ 5 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むその変異体) を含む変異体 I L 1 3 を含んでよい。有用な C A R は、配列番号 7 0 ~ 7 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むことができる。

【 0 0 1 1 】

【 化 5 】

10

GPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSG
CSAIEKTQRM LSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLFREGR
FNESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLGKMALIVLGGVAGLLLLFIGLGIFFKRGGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVLDKRRGRDPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 7 6

本明細書には、キメラ抗原受容体 (C A R) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、キメラ抗原受容体が、配列番号 C で表されるアミノ酸配列を含む標的化ドメイン ; スペーサー、膜貫通ドメイン ; 共刺激ドメイン ; 及び C D 3 ゼータ細胞質ドメインを含む、核酸分子が記載される。ある実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 4 膜貫通ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体、C D 8 膜貫通ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体、C D 2 8 膜貫通ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体から選択され ; I L 1 3 受容体標的化ドメインは、最大 3 個の単一のアミノ酸が置換された配列番号 C のアミノ酸配列を含むか、又はからなる (ある場合、第 1 3 位の Y は置換されない) ; 共刺激ドメインは、4 1 B B 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体 ; C D 2 8 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体 ; C D 2 8 g g 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体から選択され、ここで共刺激ドメインは、4 1 B B 共刺激ドメインであり ; 4 1 B B 共刺激ドメインは、配列番号 2 4 で表されるアミノ酸配列又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体を含み ; C D 3 ゼータ細胞質ドメインは、配列番号 2 1 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 5 0 ~ 5 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むその変異体を含み ; アミノ酸残基が 3 ~ 1 5 個あるリンカーは、共刺激ドメインと C D 3 ゼータ細胞質ドメイン又はその変異体との間に位置し ; C A R は、配列番号 7 0 ~ 7 6 で表されるアミノ酸配列又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体を含み ; C A R は、配列番号 7 0 ~ 7 6 のいずれかと少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含み ; C A R は、配列番号 7 0 ~ 7 6 のいずれかと比較して 5 、 4 、 3 、 2 、又は 1 個以下の単一アミノ酸が置換され及び / 又は欠失しているアミノ酸配列を含む。また、上記の核酸分子のいずれかを含む発現ベクターも開示される。また、上記の核酸分子のいずれかを含むウイルスベクターも開示さ

30

40

50

れる。

【 0 0 1 2 】

CARは、いかなるがん細胞抗原、例えば、CD19、MUC16、MUC1、tMUC1、CAIX、CEA、CD20、CD22、CD30、HER-2、MAGEA3、p53、PSCA、BCMA、CD123、CD44V6、インテグリンB7、ICAM-1、CD70、CEA、GD2、PSMA、B7H3、CD33、Flt3、CLL1、葉酸受容体、EGFR、CD7、EGFRvIII、グリピカン3、CD5、ROR1、CS1、AFP、CD133、及びTAG-72を標的とするscFvを含んでよい。CARは、リガンド、例えば、IL-13又はその変異体、クロトキシシン又はその変異体等を含むことができる。

10

したがって、共発現に有用なCARとしては、国際公開公報WO2016/044811号、国際公開公報WO2017/079694号、国際公開公報WO2017/066481号、及び国際公開公報WO2017/062628号に記載されているものがあげられる。

【 0 0 1 3 】

上記核酸分子のいずれかを含有するヒトT細胞、NK細胞、骨髄細胞、γデルタT細胞、又はiPSC由来エフェクター細胞の集団も開示される。上記発現ベクター又はウイルスベクターのいずれかを含有するヒトT細胞の集団も開示される。ある実施形態では、ヒトT細胞の集団は、セントラルメモリーT細胞、ナイーブメモリーT細胞、panT細胞、又はCD25+細胞及びCD14+細胞が実質的に枯渇したPBMCを含む。

20

【 0 0 1 4 】

本明細書では、がん（例えば、脳がん（神経膠芽腫）、膵臓がん、黒色腫、神経芽細胞腫、肝臓がん、肉腫、結腸直腸がん、胃がん、卵巣がん、卵管がん、甲状腺がん、膀胱がん、子宮頸がん、消化器系がん、頭頸部がん、骨肉腫、腎細胞がん、前立腺がん、乳がん又は肺がん）に罹患している患者を治療する方法であって、本明細書で開示される核酸を保有する自己又は同種異系ヒトT細胞の集団を投与することを含む、方法も開示される。ある実施形態では、細胞は、局所的又は全身的に投与され、単回又は反復投薬によって投与される。

本明細書ではまた、CAR T細胞を調製する方法であって、自己又は同種異系ヒトT細胞の集団を提供すること、及び本明細書で開示される核酸分子を含むベクターによってT細胞を形質導入すること、を含む方法が開示される。

30

【 0 0 1 5 】

また、CAR及びIFNγを発現するベクター又は核酸を保有するT細胞も開示される。ある実施形態では、形質導入されたヒトT細胞の少なくとも20%、30%、又は40%がセントラルメモリーT細胞であり、形質導入されたヒトT細胞の少なくとも30%がCD4+及びCD62L+又はCD8+及びCD62L+である。ある実施形態では、ヒトT細胞の集団は、配列番号C若しくは70~76から選択されるアミノ酸配列又はアミノ酸が1~5個（例えば、1又は2個）改変（例えば、置換）されたその変異体を含むキメラ抗原受容体を発現するベクターを含む；T細胞の集団は、エフェクターT細胞、エフェクターメモリー細胞、セントラルメモリーT細胞、幹セントラルメモリー細胞及びナイーブT細胞のうちの1つ以上を含んでよく；ヒトT細胞の集団は、セントラルメモリーT細胞（TCM細胞）を含み、例えば、当該細胞の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%がTCM細胞であるか、又はT細胞の集団は、セントラルメモリーT細胞、ナイーブT細胞及び幹セントラルメモリー細胞（TCM/SCM/N細胞）の組み合わせを含み、例えば、細胞の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%がTCM/SCM/N細胞である。ある実施形態では、T細胞の集団は、エフェクターT細胞及びエフェクターメモリー細胞を含む。ある実施形態では、T細胞の集団は、CD4+細胞及びCD8+細胞をともに含む（例えば、CD3+T細胞の少なくとも20%がCD4+であり、CD3+T細胞の少なくとも3%がCD8+であり、少なくとも70、80又は90%がCD4+又はCD8+のいずれかであり；細胞C

40

50

D 3 + 細胞の少なくとも 15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、50 %、60 % が C D 4 + であり、C D 3 + 細胞の少なくとも 4 %、5 %、8 %、10 %、20 % が C D 8 + 細胞である)。ある実施形態では、ヒト T 細胞の集団は、患者に対して自己由来である。ある実施形態では、ヒト T 細胞の集団は、患者に対して同種異系である。ある実施形態では、C A R 及び I F N γ を発現する T 細胞は、とりわけ、I L 1 3 R α 2 - I F N γ C A R T 細胞、I L 1 3 R α 2 - C A R / I F N γ T 細胞、及び I L 1 3 C A R T - I F N γ 細胞なる記載と互換可能である。

【0016】

ある実施形態では、スパーサードメインは、I g G 4 (E Q) スパーサードメイン、I g G 4 (H L - C H 3) スパーサードメイン及び I g G 4 (C H 3) スパーサードメインからなる群より選択され；スパーサードメインは配列番号 10 を含み；スパーサードメインは配列番号 9 を含み；スパーサードメインは配列番号 12 を含み；膜貫通ドメインは、C D 4 膜貫通ドメイン、C D 8 膜貫通ドメイン、及び C D 2 8 膜貫通ドメインからなる群より選択され；共刺激ドメインは、C D 2 8 共刺激ドメイン、及び C D 2 8 g g 共刺激ドメイン、及び 4 1 - B B 共刺激ドメインから選択される。

10

【0017】

本明細書では、さらに、キメラ抗原受容体 (C A R) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、当該キメラ抗原受容体が、配列番号 C の 109、110、111、112、113 個の連続アミノ酸又は配列番号 C の全体に 1、2、3、4 若しくは 5 個の単一アミノ酸が変化していることを含む変異体 I L 1 3 ドメインを含むアミノ酸配列を含む標的化ドメイン；スパーサードメイン；膜貫通ドメイン；共刺激ドメイン及び C D 3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、核酸分子も開示される。

20

ある実施形態では、スパーサードメインは、配列番号 2 ~ 12 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、共刺激ドメインは、配列番号 22 ~ 25 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、C D 3 ゼータドメイン又はその変異体である。ある実施形態では、C A R は、C D 2 8 共刺激ドメイン及び変異体 C D 3 ゼータドメインを含む。

本明細書ではまた、当該核酸分子を含むベクター又は発現ベクター；本明細書で開示される核酸分子を保有するヒト T 細胞又は N K の集団も開示される。ある実施形態では、ヒト T 細胞の集団は、セントラルメモリー T 細胞、ナイーブメモリー T 細胞、p a n T 細胞、又は C D 2 5 + 細胞及び C D 1 4 + 細胞が実質的に枯渇した P B M C を含む。

30

【0018】

本明細書ではまた、神経膠芽腫、膵管腺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞がん、乳がん又は肺がん罹患している患者を治療する方法であって、本明細書で開示される核酸分子を保有する自己又は同種異系細胞の集団を投与することを含む方法も開示される。ある実施形態では、ある実施形態では、細胞は、局所的、全身的又は脳室内に投与され、単回又は反復投薬によって投与される。

本明細書ではまた、C A R T 細胞を調製する方法であって、自己又は同種異系ヒト T 細胞又は N K の集団を提供すること、及び本明細書で開示される核酸分子を含むベクターによって細胞を形質導入すること、を含む方法も開示される。

本明細書ではまた、本明細書で開示される核酸によってコードされるポリペプチドも開示される。

40

ある実施形態では、N K 細胞は、臍帯血、末梢血又は幹細胞に由来する。

【0019】

当該 C A R 又はポリペプチドは、発現をモニタリングするのに有用なさらなる配列、例えば、T 2 A 又は P 2 A スキップ配列及び切断型 E G F R 又は切断型 C D 1 9 又は L N G F R (配列番号 31 で表されるアミノ酸配列からなるか、又はそれを含んでよい) と共に発現されうる。

非内因性又は外因性核酸分子 (又はポリペプチド) は、細胞中に内因的に存在しない核酸分子 (又はポリペプチド) である。当該用語としては、細胞内で発現される組換え核酸分子 (又はポリペプチド) があげられる。外因性核酸は、天然野生型細胞に存在しない核酸

50

である；例えば、外因性核酸は、配列によって、位置／場所によって、内因性のその対応物と異なってよい。外因性核酸分子は、遺伝子組換えにより細胞又は当該細胞の前駆体のいずれかに導入することができる。ポリペプチドをコードする外因性核酸分子は、発現制御配列に連結することができ、シグナル配列をコードする配列を含むことができ、その一方又は両方をコードする配列に対して異種であってよい。

【 0 0 2 0 】

スパーサー領域

本明細書で開示される C A R 又はポリペプチドは、標的化ドメイン（すなわち、I L 1 3 又はその変異体）と膜貫通ドメインとの間に位置するスパーサーを含んでよい。様々な異なるスパーサーを用いることができる。それらのいくつかは、ヒト F c 領域の少なくとも部分、例えば、ヒト F c 領域のヒンジ部分又は C H 3 ドメイン又はその変異体を含む。以下の表 1 に、本明細書で開示される C A R において用いることができる様々なスパーサーを提供する。

表 1：スパーサーの例

【 0 0 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1:スペーサーの例

名称	長さ	配列
a3	3 aa	AAA
リンカー	10 aa	GGGSSGGGSG (配列番号2)
IgG4 hinge (S→P) (S228P)	12 aa	ESKYGPPCPPCP (配列番号3)
IgG4 hinge	12 aa	ESKYGPPCPSCP (配列番号4)
IgG4 hinge (S228P)+ linker	22 aa	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSG (配列番号5)
CD28 hinge	39 aa	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (配列番号6)
CD8 hinge-48aa	48 aa	AKPTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD I (配列番号7)
CD8 hinge-45aa	45aa	TTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (配列番号8)
IgG4(HL-CH3) IgG4(HL-ΔCH2)ともいう (ヒンジにS228Pが含まれる)	129 aa	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号9)
IgG4(L235E,N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPSCPAPFEFGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号10)
IgG4(S228P,L235E,N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPPCPAPFEFGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号11)
IgG4(CH3) IgG4(ΔCH2)ともいう	107 aa	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPVLDSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLGLGK (配列番号12)
IgG1 Hinge	16 aa	LEPKSCDKTHTCPPCP (配列番号44)

いくつかのスペーサー領域は、免疫グロブリン（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）ヒンジ領域、すなわち、免疫グロブリンのCH1ドメインとCH2ドメインとの間に入る配列、例えば、IgG4Fcヒンジ又はCD8ヒンジの全て又は部分を含む。いくつかのスペーサー領域は、免疫グロブリンCH3ドメイン（CH3又はΔCH2ともいう）又はCH3ドメイン及びCH2ドメインをともに含む。免疫グロブリン由来配列は、1つ以上のアミノ酸の改変、例えば、1、2、3、4又は5つアミノ酸の置換、例えば、オフターゲット結合を低減する置換を含むことができる。

スペーサー領域はまた、配列ESKYGPPCPSCP（配列番号4）又はESKYGPPCPPCP（配列番号3）があるIgG4ヒンジ領域を含んでよい。スペーサー領域は

また、ヒンジ配列 E S K Y G P P C P P C P (配列番号 3)、続いてリンカー配列 G G S S G G G S G (配列番号 2)、続いて I g G 4 C H 3 配列
【 0 0 2 2 】
【 化 6 】

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(配列番号 1 2) を含むことができる。したがって、スパーサー領域全体は、配列 :
【 0 0 2 3 】
【 化 7 】

ESKYGPPCPPCPGGGSSGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLGLGK

(配列番号 1 1) を含むことができる。
【 0 0 2 4 】

膜貫通ドメイン

様々な膜貫通ドメインを C A R に用いることができる。ある場合、膜貫通ドメインは、C D 2 8 膜貫通ドメインであり、これは F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V (配列番号 1 4) で表される。ある場合、C D 2 8 膜貫通ドメインは、配列番号 1 4 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸 (好ましくは保存的) が変化している。表 2 は、適当な膜貫通ドメインの例を含む。スパーサー領域が存在する場合、膜貫通ドメイン (T M) は、スパーサー領域のカルボキシ末端に位置する。

表 2 : 膜貫通ドメインの例
【 0 0 2 5 】

30

40

50

【表 2】

表2:膜貫通ドメインの例

名称	受託番号	長さ	配列
CD3z	J04132.1	21 aa	LCYLLDGILFIYGVILTALFL (配列番号13)
CD28	NM_006139	27aa	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (配列番号14)
CD28(M)	NM_006139	28aa	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (配列番号15)
CD4	M35160	22aa	MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF (配列番号16)
CD8tm	NM_001768	21aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (配列番号17)
CD8tm2	NM_001768	23aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (配列番号18)
CD8tm3	NM_001768	24aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (配列番号19)
41BB	NM_001561	27aa	IISFFLALTSTALLFLLFF LTLRFSV (配列番号20)
NKG2D	NM_007360	21aa	PFFFCFCFIAMGIRFIIMVA (配列番号65)

共刺激ドメイン

共刺激ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインとの併用に適するいかなるドメインであってよい。ある場合、共刺激ドメインは、RSKRSRL LHS DY MNMT PRRP GPTRKH YQPY APPR DFAAYRS (配列番号22) と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%同一または完全同一の配列を含むCD28共シグナル伝達ドメインである。ある場合、4-1BB共シグナル伝達ドメインは、配列番号22と比較して、1、2、3、4又は5つのアミノ酸(好ましくは保守的)が変化している。共刺激ドメイン(複数可)は、膜貫通ドメインとCD3ζシグナル伝達ドメインとの間に位置する。表3に、CD3ζシグナル伝達ドメインの配列と共に適当な共刺激ドメインの例をあげる。ある場合、共シグナル伝達ドメインは、RSKRSRL LHS DY MNMT PRRP GPTRKH YQPY APPR DFAAYRS (配列番号22) で表される。

表3：CD3ζドメイン及び共刺激ドメインの例

【0026】

【表 3】

名称	受託番号	長さ	配列
CD3ζ	J04132.1	113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号21) ITAMS 1～3に下線を付す
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号50)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号51)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号52)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号53)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号54)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号55)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号56)
CD28	NM_006139	42aa	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (配列番号22)
CD28gg*	NM_006139	42aa	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR S (配列番号23)
41BB	NM_001561	42 aa	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL (配列番号24)
OX40	NM_003327	42 aa	ALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (配列番号25)
2B4	NM_016382	120 aa	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFPGG GSTIYSMIQSQSAPTSEQPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPS FNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYS (配列番号66)

10

20

30

40

ある実施形態では、共刺激ドメインは、表 3 に示される共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体、CD28 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体、4 - 1 BB 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体、及び OX40 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体からなる群より選択される。ある実施形態では、4 - 1 BB 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体がある。ある実施形態では、2 つの共刺激ドメイン、例えば、CD28 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変（例えば、置換）されたその変異体及び 4 - 1 BB 共刺激ドメイン又

50

はアミノ酸が 1 ~ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変（例えば、置換）されたその変異体がある。ある実施形態では、アミノ酸の 1 ~ 5 個（例えば、1 又は 2 個）の改変は置換である。共刺激ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインに対してアミノ末端であり、共刺激ドメインとCD3ζシグナル伝達ドメインとの間に、2 ~ 10 個、例えば 3 個のアミノ酸からなる短いリンカー（例えば、GGG）を配置することができる。

【0027】

CD3ζシグナル伝達ドメイン

CD3ζシグナル伝達ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインとの併用に適するいかなるドメインであってよい。ある場合、CD3ζシグナル伝達ドメインは

【0028】

【化8】

10

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

(配列番号21)

と少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 同一または完全同一の配列を含む。

20

ある場合、CD3ζシグナル伝達ドメインは、配列番号 21 と比較して 1、2、3、4 又は 5 つのアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。ある場合、CD3ζシグナル伝達ドメインは、配列番号 50 ~ 56 のいずれかを含む。これらの変異体 CD3ζシグナル伝達ドメインには、1 つ以上の ITAM ドメインに Y から F への変異がある。ある場合、好ましくは、ITAM 2 及び 3 を不活性化する変異がある変異体を用いる。

【0029】

ヒト IFNγ

IFNγ ドメインは、成熟ヒト IFNγ の少なくとも機能的部分（例えば、ヒト IFNγ のアミノ酸 24 ~ 161 ; GenBank NP_000610）又は成熟ヒト IFNγ の機能的部分を含むドメインである。

30

成熟ヒト IFNγ には、以下の配列：

【0030】

【化9】

QDPYVKE AENLKKYFNA GHSDVADNGT
LFLGILKNWKEESDRKIMQS QIVSFYFKLF KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM
NVKFFNSNKK KRDDFEKLTNYSVTDLNVQR KAIHELIQVM AELSPAAGTG
KRKRSQMLFR GRRASQ (成熟IFNγ;配列番号1)

40

がある。未熟ヒト IFNγ（シグナル配列を含む）には、以下の配列：

【0031】

50

【化 1 0】

MKYTSYILAF QLCIVLGSLG CYCQDPYVKE
AENLKKEYFNA GHSDVADNGT LFLGILKNWK EESDRKIMQS QIVSFYFKLF
KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM NVKFFNSNKK KRDDFEKLTN YSVTDLNVQR
KAIHELIQVM AELSPAAGTG KRKRSQLFR GRRASQ (配列番号B)

がある。ある実施形態では、ヒト IFN γ には、以下の配列：

【0 0 3 2】

10

【化 1 1】

QDPYVKEAENLKKEYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFLK
NFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVM
AELSPAAGTGKRKRSQL (SEQ ID NO:Z)

が含まれる。

ある場合、IFN γ ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 B 又は配列番号 Z と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。例えば、配列番号 1 又は配列番号 Z において、K 7 4 A、E 7 5 Y 及び N 8 3 R のうちの 1 つ、2 つ又は 3 つ全てのアミノ酸が変化してよい。ある実施形態では、本明細書で提供される IFN γ ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 B 又は配列番号 Z と少なくとも 95 % の同一性があるアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、IFN γ では、配列番号 1 又は配列番号 Z の Q 1、D 2、P 3、K 6、Q 6 4、Q 6 7、K 6 8、E 7 1、T 7 2、K 7 4、E 7 5、D 7 6、N 7 8、V 7 9、K 8 0、N 8 3、S 8 4、K 8 6、R 8 9、D 9 0 に対応する位置及びそれらのいかなる組み合わせから選択されるアミノ酸残基で少なくとも 1 つのアミノ酸が置換される。

20

ある実施形態では、本明細書で提供される IFN γ ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 Z と少なくとも 95 % の同一性があり、かつ、さらに、配列番号 1 又は配列番号 Z の Q 1、D 2、P 3、K 6、Q 6 4、Q 6 7、K 6 8、E 7 1、T 7 2、K 7 4、E 7 5、D 7 6、N 7 8、V 7 9、K 8 0、N 8 3、S 8 4、K 8 6、R 8 9、D 9 0 に対応する位置及びそれらのいかなる組み合わせから選択されるアミノ酸残基で少なくとも 1 つのアミノ酸が置換される、アミノ酸配列を含む。

30

ある実施形態では、また、IFN γ の変異体を用いることができる。いくつかの IFN γ 変異体が当技術分野において公知であり、有用であってよい (Mendoza JL, et al., (2019) Nature 567: 56; 国際公報 WO 2020/028275 号)。

【0 0 3 3】

40

切断型 E G F R 又は切断型 C D 1 9 又は L N G F R

ある実施形態では、本明細書で開示される C A R 又はペプチドは、リボソームスキップ配列（例えば、L E G G G E G R G S L L T C G D V E E N P G P R；配列番号 2 7）及び以下の配列：

【0 0 3 4】

【化 1 2】

LVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFR
GDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSL
AVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSC
KATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIOC
HPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGH
VCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVVGALLLLLVVALGIGLFM
(配列番号28)

10

で表される切断型 E G F R と少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 同一または完全同一の配列を含む。

ある場合、切断型 E G F R は、配列番号 28 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。

【0035】

ある実施形態では、本明細書で開示される C A R 又はペプチドは、リボソームスキップ配列（例えば、L E G G G E G R G S L L T C G D V E E N P G P R ; 配列番号 27）及び以下の配列：

20

【0036】

【化 1 3】

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKP
FLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSG
ELFRWNVSDLGGLGCGLNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCVPPRD
SLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRRPAR
DMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVS
AVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKR (配列番号26)

30

で表される切断型 C D 1 9 R と少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 同一または完全同一の配列を含む。ある場合、切断型 C D 1 9 t は、配列番号 26 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。

【0037】

ある実施形態では、本明細書で開示される C A R 又はペプチドは、リボソームスキップ配列（例えば、L E G G G E G R G S L L T C G D V E E N P G P R ; 配列番号 27）及び以下の配列：

40

【0038】

【化 1 4】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV
AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGO
FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVHISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN
SCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI
QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPCAGVMGENNTLVWKYADA
GHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLLVALGIGLFM

10

(配列番号45)

で表される t E G F R と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 同一または完全同一の配列を含む。

【 0 0 3 9】

ある実施形態では、本明細書で開示される C A R 又はペプチドは、リボソームスキップ配列及び以下の配列：

【 0 0 4 0】

【化 1 5】

20

MGAGATGRAMDGPRLLLLLLLGVSLGGAKEACPTGLYTHSGECCACNLGEGVAQPC
GANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQ
DETIGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDT
ERQLRECTRWADAECIEIPGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTT
VMGSSQPVVTRGTTDNLPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRWNSCKQNK (配列番号CC)

で表される切断型 L N G F R と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 同一または完全同一の配列を含む。ある場合、切断型 L N G F R は、配列番号 C C と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。

30

【 0 0 4 1】

本明細書で開示される C A R 又はペプチドにおいて有用な他のリボソームスキップ配列としては、E G R G S L L T C G D V E E N P G P（配列番号 4 6）で表される配列と少なくとも 9 5 % 同一である配列がある T 2 A 又は G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P（配列番号 4 7）で表される配列と少なくとも 9 5 % 同一である配列がある P 2 A があげられる。ある場合、リボソームスキップ配列は、配列番号 4 6 又は 4 7 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化する。

【 0 0 4 2】

40

アミノ酸改変とは、タンパク質又はペプチド配列におけるアミノ酸の置換、挿入、及び／又は欠失をいう。「アミノ酸置換」又は「置換」は、親ペプチド又はタンパク質配列中の特定の位置のアミノ酸を他のアミノ酸で置き換えることをいう。置換は、得られるタンパク質中のアミノ酸を変化させるために、非保存的様式で（すなわち、特定のサイズ又は特徴があるアミノ酸のグループに属するアミノ酸から他の群に属するアミノ酸にコドンを変化させることによる）、又は保存的様式で（すなわち、特定のサイズ又は特徴があるアミノ酸の群に属するアミノ酸から同じ群に属するアミノ酸にコドンを変化させることによる）、行うことができる。当該保存的变化によれば、一般に、得られるタンパク質の構造及び機能の変化がより少ない。以下は、アミノ酸の種々の分類の例である：1）非極性 R 基があるアミノ酸：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルア

50

ラニン、トリプトファン、メチオニン；2) 非荷電極性R基があるアミノ酸：グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン；3) 荷電した極性R基(pH6.0で負に荷電している)があるアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸；4) 塩基性アミノ酸(pH6.0で正に荷電)：リジン、アルギニン、ヒスチジン(pH6.0)。他の群分けは、フェニル基があるアミノ酸：フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンであってよい。

【0043】

ある場合、CARは、CARオープンリーディングフレームの後にリボソームスキップ配列及び細胞質シグナル伝達テールが欠損した切断型EGFR(EGFRt)、又は切断型CD19R若しくはLNGFRが続くベクターを用いて産生することができる。この配置により、EGFRtの共発現において、遺伝子改変細胞を正確に測定でき、遺伝子改変細胞の陽性選択、並びに養子移入後のインビボでの治療用NK細胞を効率よく細胞追跡しうる不活性な非免疫原性表面マーカーを提供する。サイトカINSTORM及びオフターゲット毒性を回避するために増殖を効率的に制御することは、NK細胞免疫療法の成功に重要である。CARレンチウイルス又はレトロウイルスベクターに組み込まれたEGFRt、CD19t、又はLNGFRは、治療関連毒性の場合にCAR+細胞を除去するための自殺遺伝子として作用することができる。

10

【0044】

ある場合、本明細書で開示される核酸分子は、CAR及びヒトインターフェロンγの発現とともに制御するプロモーターを含む。他の場合、本明細書で開示される核酸分子は、CARの発現を制御する第一のプロモーター及びヒトインターフェロンγの発現を制御する第二のプロモーターを含む。ある場合、第一及び第二のプロモーターは同一であり、ある場合、それらは異なる。ある実施形態では、第一のプロモーターは、強力な構成的プロモーター又は誘導性プロモーターである。ある実施形態では、第二のプロモーターは、第一のプロモーターよりも弱いプロモーターであるか、又は誘導性プロモーターである。有用なプロモーターは、当該分野で周知である。例えば、合成NFATプロモーターは、CAR構築物をコードする核酸で用いることができる。有用なプロモーターは、CMV、EF1、SV40、PKG1、PKG100、Ubc、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、NFAT、及びいかなる他の構成的プロモーター又は誘導性プロモーターのうちの1つ以上を含んでよい。ある実施形態では、NFAT認識要素を用いることができる(TGGAGGA A A A A C T G T T T C A T A C A G A A G G C G；配列番号X)。ある実施形態では、有用なプロモーターは、NFAT認識要素の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11個の反復を含む。ある実施形態では、有用なプロモーターは、以下に表される配列番号X、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8、X9、X10及びX11のいずれか1つ以上を含む。

20

30

【0045】

40

50

【化 1 6】

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCG; 配列番号X2

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG; 配列番号X3

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCG; 配列番号X4

10

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCG TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG; 配列番号X5

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCG; 配列番号X6

20

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCG TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG; 配列番号X7
TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA

【 0 0 4 6】

30

40

50

【化 17】

GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACT
GTTTCATACAGAAGGCG; **配列番号X8**

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACT
GTTTCATACAGAAGGCG TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG; **配列番号**

X9

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACT
GTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAA
AACTGTTTCATACAGAAGGCG; **配列番号X10**

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACT
GTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAA
AACTGTTTCATACAGAAGGCG TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG

配列番号X11

本明細書で開示されるCAR又はポリペプチドは、当技術分野で公知のいかなる手段によつて産生されてよいが、好ましくは、組換えDNA技術を用いて産生される。キメラ受容体のいくつかの領域をコードする核酸は、当該分野で公知の分子クローニングの標準的な技術（ゲノムライブラリースクリーニング、オーバーラッピングPCR、プライマー補助連結、部位特異的変異誘発等）によつて、有利に調製されてよく、そして完全なコード配列にアセンブルされてよい。得られたコード領域は、好ましくは発現ベクターに挿入され、適当な発現宿主細胞株、好ましくは免疫細胞（例えば、T細胞）、最も好ましくは自己T細胞を形質転換するために用いられる。

CAR又はポリペプチドは、CAR又はポリペプチドをコードするmRNAによつて細胞集団において一過的に発現されてよい。mRNAは、エレクトロポレーションによつて免疫細胞に導入することができる（Wiesinger et al., 2019 Cancer (Basel) 11: 1198）。

ある実施形態では、本明細書で開示されるCAR免疫細胞を含む組成物を投与することを含む、がんがある対象の生存を増加させる方法が本明細書で開示される。

ある実施形態では、本明細書で開示されるCAR免疫細胞を含む組成物を投与することを含む、患者におけるがんを治療する方法が本明細書で開示される。

ある実施形態では、本明細書で開示されるCAR免疫細胞を含む組成物を投与することを含む、患者におけるがんに関連する症状を低減又は改善する方法が本明細書で開示される

。

ある実施形態では、本明細書で開示されるC A R N K細胞又はC A R T細胞を含む組成物は、局所的又は全身的に投与される。ある実施形態では、本明細書で開示されるC A R免疫細胞を含む組成物を、単回又は反復投与により投与する。ある実施形態では、本明細書で開示されるC A R免疫細胞を含む組成物を、がん、病原体感染、自己免疫障害があるか又は同種異系移植された患者に投与する。

ある実施形態では、がんは固形腫瘍である。ある実施形態では、がんは黒色腫である。

他に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味がある。方法及び材料は、本発明で用いるために本明細書中に記載される；当該分野で公知の他の適当な方法及び材料もまた用いられてよい。材料、方法、及び実施例は、例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。本明細書中で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリー、及び他の参考文献は、いかなる及び全ての目的のために、その全体が参考として本明細書に援用される。

記載された組成物及び方法の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び図面から、並びに特許請求の範囲から明らかであろう。

以下、図面を参照して本発明を説明する

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】図1A～1D：m I L 1 3 B B ζ生成及びm I L 1 3 B B ζ C A R T細胞の表現型特徴付け。1A、マウスI L 1 3 R α 2 - C A R T (m I L 1 3 B B ζ C A R T) 構築物を示す概略図。1B及び1C、0日目から4日目までのマウスC A R T細胞の表現型の変化を示すフローサイトメトリー及びグラフ。1D、I L 1 3 R α 2 + 及びI L 1 3 R α 2 - K - L u c細胞に対するm I L 1 3 B B ζ C A R T細胞のインビトロ殺傷。

【図2】図2A～2I：マウスI L 1 3 B B ζ C A R T細胞は、強力な抗腫瘍活性がある。2A、フローサイトメトリー（左パネル）及び形質導入効率を実証するC A R + T細胞比率を要約する棒グラフ（右）。2B及び2C、免疫蛍光及びフローサイトメトリー染色により、K R 1 5 8 (K - L u c) 神経膠腫細胞におけるm I L 1 3 R α 2の形質導入が確認された。2D、K - L u c細胞に対するm I L 1 3 B B ζ C A R T細胞のインビトロ死滅（E：T、1：3）。2E、L u m i n e x はI F N γ及びT N F αレベルを検出した。2F、インビボ実験設計を示す概略図。2G、ヘマトキシリン及びエオシン（H & E）の画像は、未治療及びC A R T治療脳において浸潤性K - L u cを示した。2H、未治療群及びC A R T治療群におけるK - L u c - m I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの生存曲線。2I、生物発光画像（B L I；上）及びフラックス値（下）は、未治療群及びC A R T治療群における腫瘍成長を示す。少なくとも3回の独立した実験のデータを平均± s . e . m .（2D及び2E）として示し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。生存曲線間の差をログラंक（M a n t e l - C o x）検定（2H）によって分析した。示された比較について、* p < 0 . 0 5、* * p < 0 . 0 1、及び* * * p < 0 . 0 0 1。

【図3】図3A～3F：m I L 1 3 B B ζ C A R T細胞は、強力な抗腫瘍活性を有し、G L 2 6 1 - L u c腫瘍に対する内因性メモリー免疫応答を誘導した。3A、ヘマトキシリン及びエオシン（H & E）の画像は、G L 2 6 1 - L u c腫瘍の形態を示した。3B、免疫蛍光及びフローサイトメトリー染色により、G L 2 6 1 - L u c神経膠腫細胞におけるI L 1 3 R α 2の形質導入が確認された。3C、I L 1 3 R α 2 + G L 2 6 1 - L u c神経膠腫細胞に対するm I L 1 3 B B ζ C A R T細胞のインビトロ死滅（E：T、1：3）。3D、L u m i n e x E L I S Aは、I F N γ及びT N F αレベルを検出した。3E、未治療群及びC A R T治療群におけるI L 1 3 R α 2 + G L 2 6 1 - L u c神経膠腫腫瘍があるマウスの生存曲線。3F、C A R T療法によって治癒し、I L 1 3 R α 2陰性G L 2 6 1 - L u cで再チャレンジしたマウスの生存。少なくとも2つの独立した実験のデータを平均± s . e . m .（3C）として提示し、対応のない両側スチューデント

10

20

30

40

50

ト t 検定によって分析した。比較のために、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ 及び $**** p < 0.0001$ 。生存曲線間の差 (3 E) を、ログランク (Mantel - Cox) 検定によって検定されたログランク (Mantel - Cox) によって分析した。

【図 4】図 4 A ~ 4 E : m I L 1 3 B B ζ C A R T 細胞は、免疫応答性宿主において優れた抗腫瘍活性がある。4 A、4 日目又は 7 日目に C A R を投与したインビボ実験計画を示す模式図。4 B、4 日齢の腫瘍モデルにおける未治療群及び C A R T 治療群における腫瘍増殖を示す生物発光画像 (B L I ; 上) 及びフラックス値 (下)。4 C、未治療群及び C A R T 治療群における 4 日齢 K - L u c I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの生存曲線。7 日齢の腫瘍モデルにおける未治療群及び C A R T 治療群における腫瘍増殖を示す生物発光画像 (B L I ; 上) 及びフラックス値 (下)。7 日齢の K - L u c I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの未治療群及び C A R T 治療群における生存曲線。生存曲線間の差 (4 C、4 E) を、ログランク (Mantel - Cox) 検定によって分析した。

10

【図 5】図 5 a ~ 5 f : C A R T 細胞は、内因性メモリー免疫応答及び抗原特異的 T 細胞の生成を誘導する。a、C A R T 療法によって治癒し、I L 1 3 R α 2 陰性 K - L u c 腫瘍で再チャレンジしたマウスの生存。b、生物発光 (B L I) 画像 (上) 及びフラックス値 (下) は、ナীব对照及び C A R T 療法群の生存者における腫瘍成長を示す。c、実験計画の概要。d、インビボ殺傷、及び e、K - L u c - m I L 1 3 R α 2 + 細胞に対する未治療又は C A R T 治療マウスから単離された内因性 T 細胞の増殖 (E : T、10 : 1)。f、腫瘍 (K - L u c) があるマウスにおける未治療細胞又は C A R T 治療細胞から単離された C A R T 細胞及び内因性 T 細胞のインビボ殺傷能の評価。データは、少なくとも 2 つの独立した実験を含む。各記号は 1 つの個体を表す。データを平均 $\pm$ s . e . m . (d 及び e) として表し、対応のない両側スチューデント t 検定によって分析した。生存曲線間の差を、ログランク (Mantel - Cox) 検定によって分析した (a)。示された比較について、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、及び $*** p < 0.001$ 。

20

【図 6】図 6 a ~ 6 b : m I L 1 3 B B ζ C A R T 細胞は、強力な抗腫瘍活性があるが、小腫瘍モデルにおいて内因性記憶免疫応答を誘導することができない。a、未治療群及び C A R T 治療群における 4 日齢 K - L u c I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの生存曲線。b、C A R T 療法によって治癒し、I L 1 3 R α 2 陰性 K - L u c 腫瘍で再チャレンジしたマウスの生存。生存曲線間の差 (a) を、ログランク (Mantel - Cox) 検定によって分析した。

30

【図 7】図 7 a ~ 7 e : 混合抗原腫瘍があるマウスにおける生存の比較。a、4 日目及び 7 日目のインビボ実験計画の概略図。b、異なるレベルの I L 1 3 R α 2 を示すフローサイトメトリー。c、未治療群及び C A R T 治療群における 4 日目の K - L u c I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの生存曲線。d、未治療群及び C A R T 治療群における 7 日目の K - L u c I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの生存曲線。e : 未治療の K - L u c 腫瘍があるマウスのフローサイトメトリー選別後の C D 1 1 b 及び C D 3 細胞の定量。各記号は 1 つの個体を表す。データを平均 $\pm$ s . e . m . として示す。(e) 両側スチューデント t 検定によって分析した。比較のために、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ 及び $**** p < 0.0001$ 。生存曲線間の差 (c、d) を、ログランク (Mantel - Cox) 検定によって分析した。

40

【図 8】図 8 : 内因性及び C A R T 細胞のフローサイトメトリー選別。内因性 (C D 3 + C D 1 9 -) 及び C A R T (C D 3 + C D 1 9 +) 集団のフローサイトメトリー選別の表示。

【図 9】図 9 a ~ 9 g : C A R T 細胞は、神経膠腫腫瘍微小環境において内因性 T 細胞を活性化する。a、N a n o s t r i n g 分析は、治療の 3 日後に未治療マウス又は C A R T 治療マウスから単離された腫瘍内 T 細胞 (C D 3 +) の遺伝子発現の全体的な変化を示す。b、U M A P プロットは、C A R T 療法後の神経膠腫 T M E におけるリンパ系

50

コンパートメントの変化を示す。c、特徴プロットは、治療後のCD8及びCD4 T細胞サブCD8及びCD4 T細胞サブクラスター内の富化された経路を実証する。d、濃縮スコアのヒートマップ(GSEA分析)は、T細胞サブクラスターにおける濃縮された経路を示す。e、CD45.1+モック又はCAR T細胞の養子移入を実証する実験設計(上)及びフローサイトメトリー分析は、神経膠腫TMEにおける内因性(CD3+CD45.2+)又は養子移入されたT細胞(CD3+CD45.1+)の頻度を示す(下)。f、棒グラフは、養子移入されたモック(CD3+CD45.1+)又はCAR T細胞(CD3+CD45.1+CD19+)の数及び表現型の特徴付け(CD69、Ki67及びGZMB)を比較する。g、棒グラフは、未治療、モック、又はCAR T治療マウスにおける内因性T細胞(CD3+CD45.2+)数及び表現型特徴付け(CD69、Ki67、GZMB、及びIFN γ)を比較する(n=5/群)。データは、少なくとも2つの独立した実験を含む。データを平均 $\pm$ s.e.m.(F及びG)として示し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。示された比較について、*p<0.05、**p<0.01、及び***p<0.001。

【図10】図10a~10d：腫瘍内免疫細胞の単一細胞RNA配列決定。a、腫瘍内免疫細胞のみの未処理データ及びCAR T処理データをマージしたUMAPプロット。b、免疫サブセット特異的マーカー遺伝子発現の特徴プロット。c、リンパ系サブクラスター(上)及びパイオリンプロット(下)の頻度の変化は、リンパ系特異的マーカーを示す。d、棒グラフは、骨髄サブクラスターの頻度の変化を示し(上)、パイオリンプロット(下)は、骨髄特異的マーカーを示す。

【図11】図11a~11b：単一細胞RNA配列決定は、腫瘍内T細胞の表現型を同定する。UMAPプロットは、CAR T療法後の記憶幹様T細胞に関連する遺伝子の増強を実証する。b、UMAPプロットは、CAR T療法後の制御性T細胞に関連する遺伝子の発現の低下を示す。

【図12】図12：腫瘍内T細胞におけるT細胞活性化に関連する遺伝子の発現。qPCR分析は、T細胞活性化に関連する遺伝子を示す。データを平均 $\pm$ s.e.m.として示し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。比較のために、*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001及び****p<0.0001。

【図13】図13a~13f：CAR T細胞は、神経膠腫腫瘍微小環境における常在骨髄系集団を活性化する。a、UMAPは、CAR T治療又は未治療マウスからの腫瘍内骨髄系細胞の変化を示す。b、GSEA計算法によって同定された、未治療と比較したCAR T治療における腫瘍内マクロファージ及びミクログリア細胞におけるIFN γ シグナル伝達経路の濃縮プロット。c、GSEA分析は、骨髄サブクラスター(MP：マクロファージ；MG：ミクログリア；DC：樹状細胞；Neu：好中球)における集団特異的活性化経路のアプレギュレーションを明らかにする。d、ナノストリング分析は、CAR T治療マウス対未治療マウスから単離された骨髄細胞(CD11b+)の遺伝子発現の全体的な変化を示す。e、UMAPは、骨髄系コンパートメント内の単一細胞レベルでの抗原提示遺伝子シグネチャーの相対的発現レベルを示す。f、ヒストグラム(左)及び棒グラフ(右)は、MHCII、MHC I、CD86、及びIFN γ を発現する腫瘍内CD11b+CD45.2+細胞を示す。データを平均 $\pm$ s.e.m.として示す。対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。示された比較について、*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001。

【図14】図14a~14j：CAR T細胞におけるIFN γ の欠損は、抗腫瘍活性及び宿主免疫細胞の活性化を損なう。a、実験計画の概略図。b、CAR Twt及びCAR TIFN γ -/-における比率CAR陽性、生存率、増殖、及びCAR 4：CAR 8比の比較。c、K-Luc-IL13R α 2+細胞に対するCAR Twt及びCAR TIFN γ -/-のインビトロ死滅(E：T、1：1)。d、フローサイトメトリーは、wt及びIFN γ -/- CAR T細胞における細胞内サイトカインレベル(TNF α 、GZMB及びIFN γ)を示す。e、生物発光(BLI)画像(上)及びフラックス値(下)は、未処理、CAR Twt又はCAR TIFN γ -/-における腫瘍成長を示す

。f、非治療、CAR T^{w t}及びCAR T^{I F N γ - / -}群におけるK - L u c - I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの生存曲線。g、ヒートマップは、腫瘍における免疫活性化及び抑制に関連する遺伝子の正規化された発現を示す。h、CAR T細胞(CD3 + CD19 +)数及び活性化表現型(CD69)を比較する棒グラフ(左)及びフローサイトメトリープロット(左)。i、内因性T細胞(CD3 + CD19)数及び活性化表現型(CD69)を比較する棒グラフ(左)及びフローサイトメトリープロット(右)。j、骨髓(CD11b +)区画における表現型を示すヒストグラム(左)及び棒グラフ(右)。データは、少なくとも2つの独立した実験を含む。各記号は1つの個体を表す。データを平均 ± s . e . m . (h、i、及びj)として表し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。生存曲線間の差(f)を、ログランク(Mantel - Cox)検定によって分析した。示された比較について、* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、及び*** p < 0 . 0 0 1。

【図15】CAR T細胞によるI F N γ 産生の欠損は、抗腫瘍活性と宿主免疫細胞の活性化を損なう。A、実験デザインの概略図。B、CAR T^{w t}とCAR T^{I F N γ - / -}におけるCAR陽性率、生存率、拡大率、CD4 : CD8比の比較。C、K - L u c - m I L 1 3 R α 2 + 細胞に対するCAR T^{w t}及びCAR T^{I F N γ - / -}のインビトロ死滅(E : T、1 : 1)D、代表的なフローサイトメトリープロットは、K - L u c - m I L 1 3 R α 2 + 腫瘍への曝露後のw t 及びI F N γ - / - CAR T細胞における細胞内サイトカインレベル(TNFα、G Z M B 及びI F N γ)を示す。E、代表的な生物発光(B L I)画像(上)及びフラックス値(下)は、未処理、CAR T^{w t}又はCAR T^{I F N γ - / -}における腫瘍成長を示す。個々のマウスを点線で表し、フラックスの中央値を太線で示す。F、未処理群、CAR T^{w t}処理群及びCAR T^{I F N γ - / -}処理群におけるK - L u c - m I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの生存曲線。G、ヒートマップは、T M E における免疫活性化及び抑制に関連する遺伝子の正規化された発現を示す。H、CAR T細胞(CD3 + CD19 +)数と活性化表現型(CD69)を比較した棒グラフ(左)と代表的なフローサイトメトリープロット(右)。I、内因性T細胞(CD3 + CD19 -)数と活性化表現型(CD69)を比較した棒グラフ(左)と代表的なフローサイトメトリープロット(右)。J、骨髓(CD11b +)区画における表現型を示す代表的なヒストグラム(左)及び棒グラフ(右)。データは、少なくとも2つの独立した実験の代表である。各記号は、1つの個体(H、I、及びJ)を表す。データを平均 ± s . e . m として表し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。生存曲線(F)間の差はlog - rank (Mantel - Cox)検定で解析した。* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、ランク(Mantel - Cox)検定によって分析した。

【図16】図16a ~ 16d : CAR T細胞は、単球分化及びM1型マクロファージの生成を促進する。a、実験計画のスキーム。b、フローサイトメトリー(左)及び棒グラフ(右)は、異なる馴化培地とのインキュベーション後の単球における表現型の変化を示す。c、顕微鏡画像は、異なる馴化培地とのインキュベーション後の単球における形態学的変化を示す。d、M1マクロファージ表現型に関連する遺伝子のq P C R 分析。データを平均 ± s . e . m . として示す。対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。比較のために、* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、*** p < 0 . 0 0 1 及び**** p < 0 . 0 0 0 1。

【図17】図17a ~ 17k : CAR T細胞は、GBM患者の免疫細胞を活性化することができる。a、実験計画のスキーム。b、フローサイトメトリー、c、顕微鏡画像及びd、馴化培地中でのインキュベーション後の患者マクロファージの表現型変化の棒グラフ要約。e、フローサイトメトリー及びf、馴化培地中でのインキュベーション後の患者T細胞における表現型の変化の概要。g、CAR T療法を受けている患者についての試験設計の概略図。h、フローサイトメトリーは、CAR T療法の前(P r e - C A R)、及び照射自己腫瘍との共培養後に4時間刺激した後のCAR T療法への応答中(P o s t - C A R)に得られた患者T細胞における細胞内I F N γ レベルを示す。i、自己照射

(Irr.) 患者腫瘍とのインキュベーション後のT細胞数。j、10:1のE:T比での自己(UPN109)又は非特異的腫瘍株(K562)に対するT細胞によるインビトロ殺傷。k、フローサイトメトリーは、患者自己(UPN109)腫瘍のIL13R α 2発現を実証する。各記号は1回の反復を表す。データを平均 $\pm$ s.e.m.として示す。(d、f、i及びj)、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。比較のために、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。

【図18】図18：本明細書で開示される研究で用いたプライマーのリスト。

【図19】図19：本明細書で開示される試験で用いた抗体のリスト。

【図20】図20A~20D：異なるIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞構築物の分子設計及び生成、並びにインターフェロ γ を共発現するCAR T細胞の調製の態様を示す。20A、標準IL13 CAR Tと比較した、IFN γ を共発現するIL13 CAR Tの構築物設計。20B、形質導入及びIL13 CAR T細胞産生の模式図。T細胞を単離し、CD3/CD28抗体(1:1)の存在下で活性化し、続いてIL13 CAR形質導入を行う。20C、フローサイトメトリーは、CAR発現のマーカーとしてIL13を用いてCAR陽性細胞の比率を示した。20D、産生中の様々なIL13 CAR T細胞におけるIFN γ レベル(左パネル)及びELISAにより、CAR T細胞におけるIFN γ 発現及び分泌が確認され、構築物内のIFN γ の形質導入及び発現が確認された。

【図21】図21A~21E：マウスIL13 CAR T細胞及びIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞の機能的評価及び表現型評価の結果を示す。マウスIL13 CAR T細胞又はIFN γ を共発現するIL13 CAR T細胞を、1エフェクター:3標的比でマウス神経腫瘍腫瘍と共培養した。21A、顕微鏡画像は、異なるIL13 CAR T構築物(形質導入されていないモックT細胞、IL13 CAR Tのみ、及びIL13 CAR IFN γ T細胞)の殺傷能を実証した。21B、24時間の共培養後のT細胞数。21C、24時間の共培養後の腫瘍細胞数。21D、棒グラフは、24時間の共培養後のCD69発現によって測定されるT細胞活性化比率を示す。21E、フローサイトメトリー分析は、マウスIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞及びIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞において、同等の疲弊(PD-1+Tim3+)及び分化(CD62L+CD45RA+)表現型を示した。

【図22】図22A~22C：ヒトIL13 CAR細胞及びIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞の機能的及び表現型評価。ヒトIL13 CAR T細胞又はIL13 CAR T-IFN γ 細胞を、患者由来神経腫瘍腫瘍(1エフェクター:25標的)と共培養した。22A、24時間の共培養後のT細胞数。22B、24時間の共培養後に測定された腫瘍細胞数。22C、フローサイトメトリー分析は、ヒトIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞及びIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞において、同等の疲弊(PD-1+Tim3+)及び分化(CD62L+CD45RA+)表現型を示した。

【図23】IL13R α 2-IFN γ CAR T細胞は、多病変転移性黒色腫モデルにおいてアブスコパル効果を誘導した。腫瘍を両方の側腹部に注射した。腫瘍が所定のサイズに達したら、IL13R α 2 CAR T細胞又はIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞を1つの腫瘍に局所投与した。両方の腫瘍を抗腫瘍活性について測定した。線グラフは、治療の反対側の腫瘍における腫瘍体積の変化を示した。

【図24】示された様々なドメインがある様々なヒトIL13 CARで表されるアミノ酸配列(配列番号70~72)。

【図25】様々なドメインが示されている様々なヒトIL13 CARで表されるアミノ酸配列(配列番号73~75)。

【図26】図26A~26B：IL13R α 2-IFN γ CAR T細胞は、マクロファージを再プログラムすることができる。26A、形質導入及びCAR T細胞産生の概略図。26B、棒グラフは、IL13R α 2-IFN γ CAR T細胞によるマクロファージのリプログラミングを実証した。棒グラフは、CAR産物の製造中に収集された上清と

共にインキュベートした場合、又は外因性 $IFN\gamma$ に曝露した場合の、炎症促進性及び代謝的に活性なマクロファージに関連する遺伝子の qPCR 分析を示した。各データ点は、1つの複製を示す。

【図27】図27A～27C：合成NFATプロモーターによる誘導性 $IL13R\alpha2-IFN\gamma CAR$ T細胞の発生。27A．CAR T活性化時の誘導性 $IFN\gamma$ 発現の分子設計を示す概略図。27B．実験設計を示す説明図である。簡潔には、細胞にNFAT-eGFP-CAR T細胞構築物を形質導入し、 $IL13R\alpha2$ + 腫瘍及び $IL13R\alpha2$ - 腫瘍と共培養した。抗原陽性腫瘍による刺激及び活性化の際に、GFPが発現され、検出可能である。27C．フローサイトメトリーは、抗原陽性腫瘍によって形質導入及び活性化された細胞におけるGFPの発現を実証した。

10

【図28】図28A～28C： $IL13R\alpha2-IFN\gamma CAR$ T細胞は、インビボで中/低 $IL13R\alpha2$ 抗原発現腫瘍を標的化することにおいて、標準 $IL13R\alpha2$ CAR T細胞と比較してより有効であった。28A．実験計画を示す概略図。28B．棒グラフは、 $IL13R\alpha2$ CAR T細胞又は $IL13R\alpha2-IFN\gamma CAR$ T細胞による治療後の、高 $IL13R\alpha2$ 抗原発現腫瘍があるマウスにおける腫瘍進行を示した。28C．棒グラフは、 $IL13R\alpha2$ CAR T細胞又は $IL13R\alpha2-IFN\gamma CAR$ T細胞による治療後の、培地 - $IL13R\alpha2$ 抗原発現腫瘍があるマウスにおける腫瘍進行を示した。

【図29】図29A～29D： $IL13R\alpha2-IFN\gamma CAR$ T細胞及び $IL13R\alpha2-IFN\gamma^{low} CAR$ 変異体は、異なるレベルの $IFN\gamma$ を発現した。29A異なる強度のプロモーターの制御下に $IFN\gamma$ がある構築物設計を示す概略図。29B．形質導入及び上清の収集を示す実験設計を示す概略図。29C．棒グラフは、エクスビボ増殖中の $IFN\gamma$ レベルを示した。29D．棒グラフは、CAR T細胞と腫瘍 (1:50のエフェクター:標的比) との5日間の共培養後の生存腫瘍数を示した。

20

【図30】図30A～30C： $IL13R\alpha2-CAR$ T細胞及び $IL13R\alpha2-CAR-NFAT/IFN\gamma$ T細胞は、同等の死滅能力を示す。30A．構築物設計のスキームは、NFATプロモーターの制御下での $IFN\gamma$ を示す。30B．実験設計の概略図は、抗原陽性腫瘍の存在下での異なるCARの共培養を実証した。30C．グラフは、 $IL13R\alpha2-CAR-NFAT/IFN\gamma$ T細胞と比較した $IL13R\alpha2-CAR$ Tの細胞傷害機能を示す。

30

【図31】図31A～31B： $IL13R\alpha2-IFN\gamma CAR$ T細胞は、抗腫瘍機能の増強のために骨髓細胞と相乗作用する。32A．実験には、 $IL13R\alpha2-IFN\gamma CAR$ T細胞又は $IL13R\alpha2$ CAR T細胞で形質導入されたT細胞をマクロファージ及び抗原陽性腫瘍細胞と共培養した。32B．棒グラフは、マクロファージ又は腫瘍細胞を伴う又は伴わない $IL13R\alpha2-IFN\gamma CAR$ T細胞又は $IL13R\alpha2$ CAR T細胞との三元共培養における腫瘍数を示した。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明を以下の実施例においてさらに説明するが、これらは特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

40

【0049】

実施例

材料及び方法

マウス及び細胞株

C57BL/6/J、CD45.1 (B6.SJL-PtprCaPepcb/BoyJ)、Thy1.1 (B6.PL-Thy1a/CyJ)、 $IFN\gamma R^{-/-}$ (B6.129S7- $Ifngr1tm1Agt/J$)、及び $IFN\gamma^{-/-}$ (B6.129S7- $Ifngtm1Ts/J$) マウスは、The Jackson Laboratory から購入した。NOD/Scid $IL2R\gamma Cnull$ (NSG) マウスを City of Hope で飼育した。全てのマウス実験は、City of Hope Insti

50

tutional Animal Care and Use Committee (IACUC) によって承認された。

ルシフェラーゼ発現マウス GL261 (GL261-Luc) 及び KR158B (K-Luc) 神経腫細胞にレンチウイルスを形質導入して、マウス IL13R α 2 (mIL13R α 2) 発現サブライン (GL261-Luc-mIL13R α 2 及び K-Luc-mIL13R α 2) を作製した。これらの腫瘍株を、10% 胎児ウシ血清 (Hyclone Laboratories)、25 mM HEPES (Irvine Scientific、カリフォルニア州サンタナ) 及び 2 mM L-グルタミン (Lonza) を補充した DMEM (Gibco) 中で維持した。mIL13R α 2 の細胞表面発現を、フローサイトメトリー及び免疫蛍光イメージングによって確認した。

患者由来の神経腫細胞 (PBT030-2-ffLuc) を、COH IRB によって承認されたプロトコルにより GBM 患者切除から単離し、上記のように維持した。全ての腫瘍株を、フローサイトメトリーによって所望の抗原 / マーカー発現について認証し、そして細胞をマイコプラズマについて試験し、そして 1 ~ 3 ヶ月未満、培養物中で維持した。

【0050】

CAR T 細胞産生

ヒト CAR T 細胞：ナイーブ及びメモリー T 細胞を、COH IRB (12、32) によって承認されたプロトコルにより City of Hope の健常ドナーから単離した。IL13R α 2 標的化 CAR の構築物及び CAR 形質導入は、参考文献 12、33、34 に記載されている。簡潔には、初代 T 細胞を Dynabeads Human T Expander CD3 / CD28 (Invitrogen) (T 細胞：ビーズ = 1 : 2) で 24 時間刺激し、CAR レンチウイルス (感染多重度 [MOI] = 0.5) で形質導入した。CAR 形質導入の Seven 日後に、CD3 / CD28 ビーズを除去し、細胞を再懸濁し、10% FCS、50 U / ml 組換えヒト IL-2、及び 0.5 ng / ml 組換えヒト IL-15 を含有する X-VIVO 15 培地 (Lonza) 中でさらに 10 ~ 15 日間増殖させた後、エクスピボ増殖に及んだ。

【0051】

マウス CAR T 細胞

マウス IL13BB ζ キメラ抗原受容体を、細胞外マウス IL13 及びマウス CD8 ヒンジ、マウス CD4 膜貫通ドメイン、並びに細胞内マウス 4-1BB 共刺激及びマウス CD3 ζ シグナルを含有する MSCV レトロウイルス骨格 (Addgene) において構築した。T2A リボソームスキップの後、切断型マウス CD19 を形質導入マーカーとして挿入した。得られたプラスミドを、Fugene (Promega) を用いて Plate 細胞 (Dr. Zuoming サン研究所から寄贈) にトランスフェクトした。48 時間後、上清を回収し、0.2 μ m フィルターを用いて濾過した。レトロウイルス上清を等分し、形質導入時まで凍結した。

マウス T 細胞を、ナイーブ C57BL / 6J マウス又は適当な系統 (CD45.1、Thy1.1、又は IFN γ - / -) の脾臓から EasySep Mouse T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies) を用いて単離し、Dynabead Mouse T-Activator CD3 / CD28 ビーズ (Gibco) を 1 : 1 の比で用いて刺激した。T 細胞を、レトロウイルス含有上清 (上記) を用いて、RetroNectin コーティングプレート (Takara Bio USA) 上で形質導入した。次いで、細胞を、10% FBS (Hyclone Laboratories)、55 mM 2-メルカプトエタノール (Gibco)、50 U / mL 組換えヒト-IL-2 (Novartis)、及び 10 ng / mL 組換えマウス IL-7 (PeproTech) を補充した RPMI-1640 (Lonza) 中で 4 日間増殖させた。インビトロ及びインビボ実験の前に、T 細胞を脱ビーズ化し、CAR 発現をフローサイトメトリーによって決定した。

【0052】

q R T - P C R 分析

R N e a s y M i n i K i t (Q i a g e n) を用いて、ミエリンを除去した脳組織 (バルク組織又はフロー選別細胞のいずれか) から R N A を単離した。 S u p e r S c r i p t V I L O M a s t e r m i x (L i f e T e c h n o l o g i e s) を製造業者の指示に従って用いて、 c D N A を逆転写した。上記のように (3 5)、 q P C R 反応を行った。用いたプライマーを図 1 8 に列挙する。

【 0 0 5 3 】

インビボ研究

全てのマウス実験は、 C i t y o f H o p e I A C U C によって承認されたプロトコルを用いて実施した。同所性 G B M モデルを、上記のように生成した (3 6)。 8 ~ 1 0 週齢の C 5 7 B L / 6 J、 I F N γ R - / -、又は N S G マウスの右前脳に 1×10^5 個の腫瘍細胞を頭蓋内 (i . c .) に定位置に移植することによって、同所性腫瘍モデルを確立した。 C A R T 細胞注射の 1 日前に生物発光イメージングによって生着を検証した。生物発光シグナルに基づいてマウスを群に無作為化した。腫瘍注射の 4 又は 7 日後、マウスを、 1×10^6 m I L 1 3 B B ζ - C A R T 細胞で頭蓋内治療した。腫瘍量を S P E C T R A L L a g o X (S p e c t r a l I n s t r u m e n t s I m a g i n g) でモニターし、 A u r a ソフトウェア (v 2 . 3 . 1、 S p e c t r a l I n s t r u m e n t s I m a g i n g) を用いて分析した。生存曲線を G r a p h P a d P r i s m S o f t w a r e (v 8) によって作成した。

再チャレンジ実験のために、腫瘍のクリアランスを、腫瘍再チャレンジ K - L u c 又は 5×10^4 G L 2 6 1 - L u c 細胞を注射した腫瘍再チャレンジの前に生物発光イメージングによって検証した。 1 0 4

皮下研究のために、 P B S 中の 1×10^6 K - L u c - m I L 1 3 R α 2 を、 8 ~ 1 0 週齢の C 5 7 B L / 6 J ドナーマウスの右及び左側腹部に注射した。腫瘍を 8 日間確立させた後、 1×10^6 個の C A R T 細胞を腫瘍に直接注射した。 3 日後、腫瘍塊を採取し、手動で解離させ、 B D A r i a S O R P (B D B i o s c i e n c e s) を用いてフローサイトメトリーによって C D 3 + C D 1 9 - (内因性 T 細胞) 又は C D 3 + C D 1 9 + (C A R T 細胞) に選別した。精製された T 細胞集団を、以下に記載されるようにインビトロ共培養 1 0 : 1 (エフェクター : 標的) 比でエフェクター細胞として用いるか、又は 8 日齢の皮下 K - L u c - m I L 1 3 R α 2 腫瘍に再注入して戻し、この腫瘍体積をノギスを用いて経時的に測定した。

マウスはまた、 A m e r i c a n V e t e r i n a r y M e d i c a l A s s o c i a t i o n G u i d e l i n e s に従って適用される安楽死とともに、生存及び腫瘍進行に関連するいかなる症状について、 C i t y o f H o p e の C e n t e r f o r C o m p a r a t i v e M e d i c i n e によってモニターされた。

【 0 0 5 4 】

インビトロ細胞毒性

C A R T 細胞増殖及び細胞傷害活性の評価のために、 K - L u c - m I L 1 3 R α 2 又は G L 2 6 1 - L u c - m I L 1 3 R α 2 腫瘍細胞をマウス C A R T 細胞と C A R + 腫瘍比 1 : 3 で 4 8 時間共培養した。インビボでプライムされたエフェクター T 細胞を用いる共培養のために、 T 細胞を 1 0 : 1 のエフェクター : 腫瘍比で 7 2 時間プレーティングした。細胞を抗 C D 3、 C D 8、及び C D 1 9 で染色した。生存腫瘍及び C A R T 細胞の絶対数をフローサイトメトリーによって評価した。

脱顆粒アッセイのために、 C A R T 細胞及び腫瘍細胞を、 G o l g i S t o p タンパク質輸送阻害剤 (B D B i o s c i e n c e s) の存在下で 5 時間、 1 : 1 のエフェクター : 腫瘍比で共培養した。細胞混合物を抗 C D 3、 C D 8、及び C D 1 9 で染色し、続いて抗 I F N γ (B D B i o s c i e n c e s)、 G Z M B、及び T N F α (e B i o s c i e n c e s) 抗体で細胞内染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

全ての試料を M A C S Q u a n t A n a l y z e r (M i l t e n y i B i o t e c) で取得し、 F l o w J o ソフトウェア (v 1 0 . 7) 及び G r a p h P a d P r i s 50

m (v 8) で分析した。

【 0 0 5 5 】

患者試料分析

馴化培地は、患者由来の神経膠腫細胞とヒト C A R T 細胞又は組み合わせを 1 : 1 の比で 2 4 時間播種することによって作製した。上清を回収し、遠心分離して細胞破片を除去した。G B M 患者からの末梢血 (C i t y o f H o p e によって承認された臨床プロトコルで計画された採血から得た) を、P h a r m L y s e 緩衝液 (B D B i o s c i e n c e s) で溶解した。選択キット (S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s) を用いて、C D 3 及び C D 1 4 細胞を単離した。C D 1 4 及び C D 3 陽性細胞を、I F N γ R 中和抗体 (R & D S y s t e m s) の存在下又は非存在下で、馴化培地と共にインキュベートした。マクロファージ分化のために、C D 1 4 細胞を M - C S F (B i o L e g e n d) の存在下で 7 日間インキュベートした後、I F N γ R 中和抗体 (R & D S y s t e m s) の存在下又は非存在下で馴化培地に曝露した。4 8 時間後、細胞を、K e y e n c e 顕微鏡を用いて可視化し、フローサイトメトリーによって表現型決定した。C A R T 療法 (r e f) に対するユニークレスポnderにおける内因性応答の評価を、以前に報告されているように行った (3 7) 。簡単に説明すると、治療前及び治療中に全血から T 細胞を単離した。2 日毎に、T 細胞を、I L 2 (5 0 U / m l) の存在下で照射 (4 0 G y) 自己腫瘍細胞と共にインキュベートした。1 4 日後、T 細胞を精製し、計数した。T 細胞を 1 0 : 1 (エフェクター : 標的) 比で新鮮な自己腫瘍又は無関係な腫瘍株と共に培養し、3 日後に腫瘍数を測定した。T 細胞を細胞刺激カクテルでさらに 4 時間刺激し、続いて細胞内 I F N γ についてフローサイトメトリーを行うことによって、I F N γ 産生を測定した。

【 0 0 5 6 】

フローサイトメトリーアッセイ

インビトロで増殖させた生きた腫瘍細胞を、非コンジュゲートヤギ抗マウス I L 1 3 R α 2 (R & D S y s t e m s) 、続いて二次口バ抗ヤギ N L 6 3 7 (R & D S y s t e m s) で染色した。生存マウス C A R T 細胞を、C D 8 (B i o L e g e n d) 、C D 3 、C D 4 、C D 6 2 L (e B i o s c i e n c e s) 又は C D 4 5 R A (B D B i o s c i e n c e s) で染色した。C D 1 9 (B D B i o s c i e n c e s) を、C A R を検出するための代替物として用いた。安楽死させたマウスからの脳を、所定の時点で取り出し、げっ歯類脳マトリクスを用いて、冠状面及び矢状面に沿って切断して、注射部位を中心とする 4 × 4 m m の切片を得た。これらの切片を手で切り刻み、次に 4 0 μ m フィルターに通した。ミエリン除去ビーズ I I 及び L S 磁気カラム (M i l t e n y i B i o t e c) を製造業者の指示に従って用いてミエリンを除去し、次いで細胞を計数した。細胞を染色し、フローサイトメトリーを用いて分析した。フロー選別のために、細胞を示された抗体で染色し (図 1 9) 、B D A r i a S O R P (B D B i o s c i e n c e s) を用いて選別した。T M E の遺伝子発現分析のために、残りの細胞の R N A を溶解した。

【 0 0 5 7 】

免疫蛍光及び免疫組織化学

免疫蛍光用に、K - L u c 及び G L 2 6 1 - L u c 親細胞又は m I L 1 3 R α 2 形質導入細胞をカバースリップ上で培養し、非コンジュゲートヤギ抗マウス I L 1 3 R α 2 (R & D S y s t e m s) 、続いて二次口バ抗ヤギ N L 6 3 7 (R & D S y s t e m s) 及びアクチンで染色した。上記のように (3 8) 、共焦点顕微鏡 (Z e i s s 共焦点顕微鏡) を用いてスライドを画像化した。免疫組織化学用に、マウスを C A R T 注射の 3 日後に安楽死させ、P B S 、続いて 4 % P F A で灌流した。全脳を解剖し、4 % P F A 中で 3 日間、続いて 7 0 % エタノール中で 3 日間インキュベートした後、パラフィン中に包埋した。1 0 μ M の横断面を切断し、H & E 、C D 3 (a b 1 6 6 6 9 、A b c a m) 又は F 4 / 8 0 (a b 6 6 4 0 、A b c a m) で染色した。スライドを、N a n o Z o o m e r 2 . 0 - H T デジタルスライドス

キャナー (Hamamatsu) を用いて 40 倍の倍率でデジタル化した。

【0058】

Bioplex サイトカイン分析

CAR T 細胞 サイトカイン プロファイル を評価するために、mIL13BBζCAR + T 細胞 及び 腫瘍細胞 (GL261-Luc-mIL13Rα2 又は K-Luc-mIL13Rα2) を、外因性 サイトカイン なし で 1:1 の比 で 1 日間 インキュベートした。無細胞上清を回収し、ProcartaPlex Mouse Th1/Th2 Cytokine Panel 11 plex (ThermoFisher Scientific) を製造業者の指示に従って用いてアッセイし、Bio-Plex 3D Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories) で取得した。 10

【0059】

ナノストリング遺伝子発現分析

RNA を、製造業者 (Qiagen, Germantown, MD, USA) の指示に従って、SohERSPlus マイクロキットを用いて、フロー選別された CD3+ 又は CD11b+ 選別された細胞から精製した。続いて、Nanodrop 1000 分光光度計 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) 及び Bioanalyser Tape ステーション (Agilent, Santa Clara, CA, USA) アッセイを用いて、RNA 試料を定量及び定性した。その後の Nanosttring 分析を、CD3+ 細胞 及び CD11b+ 細胞 について 各々 35 ng / ウェル 及び 25 ng / ウェルの濃度で行った。 20

nCounter (登録商標) マウス PanCancer Immune プロファイリング遺伝子発現パネル (Nanosttring Technologies, Seattle, WA, USA) に基づいて試料を分析した: ハイブリダイゼーション反応を 65 °C で 18 時間行った。自動 nCounter (登録商標) Prep ステーション 及び nCounter (登録商標) Digital Analyzer 光学スキャナ (Nanosttring Technologies, Seattle, WA, USA) から構成される完全自動 nCounter FLEX 分析システムを用いた。正規化は、CodeSet Content 中に存在する陽性対照カウント 及び 正規化遺伝子の幾何平均を用いることによって実施した: 0.3 - 3.0 範囲外の正規化因子がある試料を除外し、0.10 - 10.0 範囲外の参照因子がある試料も同様に除外した。遺伝子発現分析は、nSolver v3.0 及び Advanced analysis module ソフトウェアを用いて行った。 (Nanosttring Technologies, Seattle, WA, USA)。 30

【0060】

単一細胞 RNA 配列決定

K-Luc-mIL13Rα2 生着の 7 日後、CAR T 細胞を上記のように腫瘍に注射したか、又は注射しなかった。CAR T 治療 又は 非治療 マウス (1 群当たり n = 3) からの脳を採取し、CAR T 細胞注射の 3 日後にブルし、手動で細かく刻み、ミエリンを除去した後、生 (DAPI-) CD45-PE+ (BD Biosciences) 細胞について BD AriaSORP (BD Biosciences) 上でフローソーティングした。単一細胞懸濁液を、Chromium Single Cell 3' v3 Reagent Kit (10x Genomics) を用いて処理し、製造業者の指示に従って Chromium Single Cell Chip (10x Genomics) 上にロードした。2 つの実験各々から得られた生配列データを、各々マウスゲノム (mm10) にアラインメントし、cellranger count コマンドを用いて、10x Genomics に従ってシングルセル解像度で発現データを作成した。Genomics (<https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/using/count>). R パッケージ Seurat 3.9 を用 50

いて、遺伝子と細胞のろ過、正規化、主成分分析、可変遺伝子の発見、クラスタリング分析、Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) 次元削減を行った。簡潔には、遺伝子毎の発現データを含むマトリクスをインポートして、CAR T 未処理試料及びCAR T 処理試料について個別にSeuratオブジェクトを作製した。＜200の検出可能な遺伝子及び＞10%のミトコンドリア遺伝子の比率がある細胞をさらに除去した。次いで、データをマージし、その後の分析のために対数正規化した。主成分分析(PCA)を次元削減のために実施し、最初の20個の主成分を0.6の分解能でクラスタリング分析に用いた。クラスターをUMAP包埋で可視化した。Immunologic Genome Project (ImmGen) 40、41を用いて、さらに、細胞種同定を容易にするために、以下のマーカーの発現レベルを、VlnPlotを用いてプロットした。それらはItgam、Cd3e、Cd19、Cd79a、Nkh7、Cd68及びCd8aであった。リンパ系及び骨髄系親クラスターの同定に際して、それらの各々について、本発明者らは、娘クラスターを生成するためのサブクラスター化についての上記の戦略に従った。ImmGenと協力して、骨髄性娘クラスターを識別するための重要なマーカーは、Itgam、Cd68、S100a9、Itgax、Tmem119、及びP2ry12であり、一方、リンパ系Cd3e、Cd4、Cd8a、Cd79a、及びNcr1であった。骨髄性娘クラスターにおける集団にわたる、遺伝子のモジュール、D74、H2-Aa、H2-Ab1、H2-Eb1、及びMARCKSの平均発現をさらに視覚化するために、AddModuleScore関数を用いて、FeaturePlotを用いてレンダリングすることができる特徴を生成した。

【0061】

遺伝子セット濃縮分析

各骨髄系及びリンパ系の親及び娘クラスターにおいて、未処理とCAR T 処理との間で差次的に発現した(DE) 遺伝子を、関数FindAllMarkersで検出した。Gene ontology (GO)、Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway、及びImmunologic signatures collection (ImmuneSigDB) (42) に関する分析を、clusterProfilerパッケージ(43) に実装されたGSEA関数を用いて各クラスターのDE遺伝子の完全なリストを用いて行い、次いでggplot2 (H. Wickham. ggplot2: データ分析のためのエレガントなグラフィックス。Springer-Verlag New York, 2016)。

【0062】

統計分析

統計的有意性は、スチューデントt検定(2群)又はボンフェローニによる一元配置ANOVA分析(3群以上)を用いて決定した。Kaplan-Meier生存曲線を用いて生存をプロットし、ログランク(Mantel-Cox) 検定により統計的有意性を決定した。全ての分析は、GraphPad Prismソフトウェア(v5)を用いて行った。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.01$; ***、 $P < 0.001$ 。

【実施例1】

【0063】

マウスIL13R α 2 - CAR T細胞は、GBMの免疫適格モデルにおいて強力な抗腫瘍活性を媒介する

本発明者らは、上記の臨床IL13R α 2 - CAR T細胞プラットフォームの免疫応答性マウスモデルを確立した。IL-13 (E12Y) 腫瘍標的化ドメイン、マウスCD8ヒンジ(mCD8h)、マウスCD8膜貫通ドメイン(mCD8tm)、マウス4-1BB共刺激ドメイン(m4-1BB) 及びマウスCD3ゼータ(mCD3 ζ) から構成される、ヒトIL13R α 2 標的化CARに対するマウス対応物を構築した(12)。T2Aスキップ配列は、細胞追跡のために用いられる切断型マウスCD19 (mCD19t) からCARを分離する(図1A)。操作プロセスは、CD19t+細胞の頻度によって評価

されるように、70～85%の形質導入効率をもたらした(図2A)。表現型分析は、ヒトCAR T細胞(12)と同様に、マウスIL13R α 2標的化CAR T細胞(mIL13BB ζ CAR T細胞)が、エクスピボ増殖の4日目に、混合された初期メモリー(CD62L+)及びエフェクター(CD62L-)T細胞集団がある同程度の数のCD4+及びCD8+T細胞サブセットを含有することを示した(図1B及び図1C)。本発明者らは、2つの同系の免疫応答性マウス神経腫瘍モデルであるK-Luc及びGL261-Lucに基づいて治療設定を設計した。KR15813のホタルルシフェラーゼ改変亜系統であるK-Lucは、GBMの高度に浸潤性の特徴を再現するので用いた(図2B)。この腫瘍株は、Nf1、Trp53変異マウスから生じる自然発生神経腫瘍に由来し、抗PD-1チェックポイント療法に対するその非応答性によって示されるように、免疫原性が低い(14)。第二のモデルとして、本発明者らはまた、ffLuc(GL261-luc)を発現するように組換えられたGL261を用いたが、これは、化学的誘導によって生成され、多数の突然変異を含有し、K-Lucとは対照的に、抗PD-1免疫療法に応答性である(15、16)、非侵襲性の「嵩高い」神経腫瘍(図3A)である。両方の腫瘍株を、マウスIL13R α 2(mIL13R α 2)を発現するように組換えた(図2C及び図3B)。mIL13BB ζ CAR T細胞は、炎症性サイトカインIFN γ 及びTNF α の産生に関連した(図2E及び図3D)mIL13R α 2組換えK-Luc及びGL261-Luc細胞を特異的に死滅させ(図2D及び図3C)、インビトロでIL13R α 2陰性親腫瘍株に応答しなかった(図1D)。

次に、本発明者らは、C57BL/6免疫応答性マウスにおける同所移植された神経腫瘍に対するCAR T細胞抗腫瘍活性を評価した。IL13R α 2+K-Luc及びGL261-Luc腫瘍モデルにおいて、腫瘍注射の7日後のmIL13BB ζ CAR T細胞の単回腫瘍内投与は、強力なインビボ抗腫瘍活性を媒介し、有意な生存利益を与えた(図2F～2I及び図3E)。本発明者らは、C57BL/6マウスにおける抗K-Luc活性を、適応免疫サブセットを欠く免疫不全NOD-scid IL2Rgnull(NSG)モデルに移植された腫瘍と比較した。より小さい4日齢の腫瘍モデルにおいて、C57BL/6及びNSGにおける抗腫瘍活性は同等であり、CAR T細胞の機能性は両方のマウス系統で同等であった(図4A～4C)。しかしながら、驚くべきことに、免疫微小環境がより確立されたより大きな腫瘍モデル(7日目)では、T細胞療法に対するインビボ応答は、免疫不全NSGマウスと比較して、免疫応答性C57BL/6において優れていた($p < 0.001$)(図4D～4E)。この観察により、腫瘍浸潤免疫細胞がGBMにおけるCAR T細胞療法の抗腫瘍効果を増強する可能性が示された。

【実施例2】

【0064】

CAR T療法は、免疫学的記憶及び腫瘍特異的T細胞の生成を促進することができる
CAR T細胞が内因性抗腫瘍免疫を誘導する機能があるかを評価するために、CAR T細胞治療後に治癒したマウスを、IL13R α 2陰性親腫瘍でチャレンジした。実際に、生着腫瘍(CAR T療法前の7日間の生着)がより大きい場合、免疫応答性C57BL/6モデルにおける治癒マウスは、IL13R α 2陰性K-Luc(図5A及び図5B)及びGL261-Luc(図3F)親腫瘍細胞による腫瘍再チャレンジを拒絶することに成功し、CAR T細胞が、抗PD-1免疫療法に対する応答性が異なる2つの独立した腫瘍モデルにおいて免疫記憶を促進し得ることが実証された(14、16)。IL13R α 2陰性腫瘍細胞に対する内因性免疫を誘導するCAR T細胞の機能は、小腫瘍モデル(4日目)において治癒したマウスが親腫瘍による再チャレンジ後に抗腫瘍応答を開始することができなかったため、より確立されたTMEがなお必要であった(図6)。この観察により、腫瘍曝露が内因性抗腫瘍免疫を誘導するのに十分ではなく、むしろ免疫記憶の確立はCAR T細胞療法及び宿主免疫浸潤物が必要であることが示唆される。同様の一連の実験では、本発明者らは、IL13R α 2+K-Luc(100%IL13R α 2+細胞)対IL13R α 2+K-Luc及びIL13R α 2-親K-Luc腫瘍細胞の混合物(1:1比)に対するmIL13BB ζ CAR T細胞の抗腫瘍活性を比較した。C

A R T細胞が抗原陰性腫瘍細胞に対する内因性免疫応答を促進することができるという考察を支持して、m I L 1 3 B B ζ C A R T細胞は、同種及び異種 I L 1 3 R α 2 抗原発現がある腫瘍に対して同等の生存利益を媒介した ($p < 0.001$; 図 7 A 及び 図 7 B)。ここでも、C A R T細胞療法は、小腫瘍モデル (4 日目) において混合抗原腫瘍 (1 : 1 比) に対して効能が低く ($p < 0.001$; 図 7 C 及び 図 7 D)、I L 1 3 R α 2 陰性腫瘍に対する応答には、腫瘍微小環境が確立されなければならなかった。つまり、上記観察から、G B M の T M E を C A R T細胞療法によって変化させると、抗腫瘍応答が高まり、内因性抗腫瘍記憶応答が促進されることが示唆される。

C A R T療法が腫瘍特異的 T細胞の生成を増強することができるかをより直接的に評価するため、本発明者らは、I L 1 3 R α 2 + K - L u c 神経膠腫モデルにおける未治療及び C A R T細胞治療マウスから腫瘍内内因性 (C D 3 + C D 1 9 -) 及び C A R T細胞 (C D 3 + C D 1 9 +) を単離し (治療後 3 日目) (図 8)、腫瘍細胞とエクスピボで共培養するか、又は腫瘍があるマウスに養子移入した (図 5 C)。インビトロで、C A R T細胞治療腫瘍から単離された内因性 T細胞は、共培養アッセイ (1 0 : 1、エフェクター : 標的比 ; 7 2 時間) において、I L 1 3 R α 2 + K - L u c 細胞の死滅及び T細胞増殖の増強を示したが、対照未治療群では示さなかった (図 5 D 及び 図 5 E)。インビボ機能を評価するために、未治療マウス及び C A R T細胞治療マウス由来の内因性 T細胞を単離し、I L 1 3 R α 2 + K - L u c 腫瘍保有マウスに養子移入した。腫瘍進行の測定により、C A R T治療マウスから単離された内因性 T細胞を注射したマウスでは、対照群と比較して腫瘍増殖が有意に低下したことが実証された (図 5 F)。つまり、上記結果から、C A R T細胞には、抗原拡散及び腫瘍特異的 T細胞応答の生成を促進する機能があることが立証された。

【実施例 3】

【0065】

C A R T細胞は、腫瘍微小環境において自然免疫サブセット及び適応免疫サブセットを活性化する

C A R T細胞療法後の内因性抗腫瘍免疫の確立と同時に起こる T M E における免疫関連変化を解明するために、本発明者らは、遺伝子及びタンパク質発現プロファイリングによってリンパ系及び骨髄系コンパートメントをとともに調べた。最初にリンパ系コンパートメントについて、本発明者らは、精製腫瘍内 C D 3 + 細胞のナノストリング分析を行い、未治療と比較して C A R T治療マウスにおいてトランスクリプトームレベルでの全体的な変化を実証した (図 9 A)。分解能を高め、亜集団をより正確に定義するために、本発明者らは、非治療マウス又は C A R T治療マウスから単離された C D 4 5 細胞に s c R N A s e q を行った (図 1 0 A 及び 図 1 0 B)。次いで、リンパ系集団及び骨髄系集団をコンピュータで分離し、より高い粒度で s c R N A s e q データを再分析した。このアプローチにより、C D 8 + T細胞の 3 つの異なるサブセット (C D 8 _ L 2、C D 8 _ L 3、及び C D 8 _ L 4)、C D 4 + T細胞の 2 つのサブセット (C D 4 _ L 1、C D 4 _ L 6)、N K細胞の 1 つのサブセット、B細胞の 2 つのサブセット、及び $\gamma \delta$ T細胞に類似する 1 つのサブセット (図 9 B 及び 図 1 0 C) を含む、古典的マーカー遺伝子の分布によって広く定義される 9 つの異なるリンパ系亜集団がもたらされた (図 1 0 C)。C D 8 _ L 2 の頻度は変化しなかったが、興味深いことに、C A R T治療後、C D 8 _ L 3 及び C D 8 _ L 4 サブクラスターの頻度が増加した (図 1 0 C)。T細胞サブクラスターに注目すると、C D 8 _ L 3 は主に治療後に観察され、T細胞輸送に関連する C x c r 3 の発現 (図 1 1 a)、並びに活性化されたレジデントメモリー C D 8 T細胞表現型に対応する I t g a e (C D 1 0 3)、C d 7 4 (H l a d r) 及び I f i t m 1 (I F N 誘導性膜貫通タンパク質 1) の発現 (図 9 C) を特徴とする。C D 8 _ L 4 は治療後に増殖し、K i 6 7、C d 7 4、及び G z m a 遺伝子の発現がより高まると、高度に活性化されたエフェクター T細胞として同定された (図 9 C)。C D 4 サブセット内で、C D 4 _ L 1 クラスターの頻度は、治療後には変化せず、C A R T治療群におけるエフェクターメモリー C D 4 T細胞に関連する I l 7 r、T c f 7、及び I t g a 4 遺伝子の発現は適

度に高まった（図10C及び11A）。CD4、Foxp3、GITR（Tnfrsf18）及びCtla4の発現に基づいてサブクラスターCD4⁺IL6⁺によって定義される腫瘍内制御性T細胞（Treg）は、CAR-T療法後に低下した（図11B）。全体として、遺伝子セット濃縮分析（GSEA）により、ほとんどのT細胞サブクラスターにおいて活性化され及びTh1応答に関連する遺伝子シグネチャーが濃縮されたことが明らかになった（図9D）。つまり、上記研究から、CAR-T細胞が腫瘍内のリンパ系コンパートメントを劇的に変化させ、活性化された、メモリー又はエフェクターT細胞集団のクラスターをもたらし得ることが立証された。

【0066】

CAR-T細胞療法後のT細胞集団を細胞レベルでさらに特徴付け、内因性T細胞対養子移入T細胞の変化を区別するため、CD45.1 CAR-T細胞を同質遺伝子的にミスマッチさせたものを用いて、CD45.2マウスに移植されたIL13Rα2+K-Luc腫瘍を治療した（図9e）。頭蓋内送達後、CAR-T細胞（CD3+CD45.1+CD19+）は、モック形質導入T細胞（CD3+CD45.1+CD19-）とは異なり、T細胞数並びに活性化（CD69+）、細胞傷害機能（GZMB+）及び増殖（Ki67+）のマーカー発現が有意に増加し（図9f）、観察されたエフェクター活性がCAR依存性であることが示された。興味深いことに、CAR-T療法後にのみ、活性化（CD69+）、増殖性（Ki67+）、及び細胞傷害性表現型（GZMB+）がある内因性T細胞（CD3+CD45.2+）数が有意に増加したが、これは未治療又は偽治療対照では検出されなかった（図9g）。これは、CAR-T療法後の腫瘍内CD3+T細胞におけるGZMA、GZMB、及びPRF1遺伝子の上方制御を実証するqPCR分析と一致した（図12）。上記結果から、CAR-T細胞が内因性T細胞活性化及び増殖を高めることが立証され、CAR-T細胞療法後に単離された内因性腫瘍内T細胞が抗腫瘍活性があるという本発明者らの以前の知見と一致した（図5D～5F）。それらが神経膠腫腫瘍において優勢な免疫集団であり、神経膠腫の病因において決定的な機能があるため、本発明者らは次に、ミクログリア/マクロファージ等の先天性骨髄細胞における変化を評価した（17）。単一細胞レベルでの腫瘍内骨髄系集団の分析により、CAR-T療法後に著しくリモデリングされた17個の別個の骨髄系亜集団が同定された（図13A）。本発明者らは、神経膠腫TMEにおける腫瘍内単球/マクロファージ/ミクログリア/DC区画の興味深い複雑性及び動態を観察した。いくつかのマクロファージ/単球亜集団は頻度が減少したが、他の集団は高まり、TMEを再形成した。7つの主要な単球/マクロファージ（Itgam、Cd68）、4つのミクログリア（Tmem119及びP2ry12）、4つのDC及び好中球の2つのクラスター（S100A9）亜集団を同定した。遺伝子セット濃縮分析（GSEA）により、CAR治療群におけるIFNγ刺激マクロファージ及びミクログリアに関連する遺伝子が明らかに濃縮された（図13B）。主要な骨髄系集団（マクロファージ、ミクログリア、及び好中球）のさらなる評価により、成熟及びIFNγ活性化マクロファージ並びに刺激好中球に関連する遺伝子の発現がより高く同定され（図13C）、常在自然免疫細胞がIFNγ媒介性活性化に曝露されていることがさらに確認された。

【0067】

CAR-T療法の3日後のTMEからの腫瘍内ミクログリア/マクロファージ細胞（CD11b+）のナノストリング分析では、抗原プロセッシング及び提示を媒介する遺伝子（例えば、Cd74、H2-Ab1、H2-Aa、H2-Eb1）の濃縮が示された（図13D）。scRNAseqを用いたさらなる分析により、マクロファージ/ミクログリアサブクラスターの大部分が抗原プロセッシング及び抗原提示に関与し得ることが明らかになった（図13E）。フローサイトメトリーによって常在ミクログリア/マクロファージ集団におけるCAR-T細胞性変化を評価して、本発明者らは、CAR-T治療マウスで、活性化された脳常在マクロファージ/ミクログリア細胞（CD86+、MHCIIhigh、MHCIhigh）の頻度及び数の増加が見出した（図13F）。骨髄系コンパートメントの評価により、また、炎症性サイトカインIFNγ+の頻度が有意に高まったこと

が明らかになった（図 1 3 F）。つまり、上記データにより、CAR T 療法が、GBM 免疫ランドスケープを変化させ、宿主先天性及び適応免疫細胞を活性化することが示された。上記結果により、また、局所免疫細胞の活性化の誘導における IFN γ の主要な機能がさらに明らかになった。

【実施例 4】

【0068】

CAR T 細胞における IFN γ の欠損は、インビボ抗腫瘍活性及び宿主免疫細胞の活性化を損なう

骨髓細胞が、グリオーマ TME において最も大きな集団を構成し、本発明者らの scRNA-seq 分析が、マクロファージ及びミクログリアサブクラスター内の IFN γ 刺激に関連する遺伝子シグネチャーを同定したことを考慮すると（図 1 3 B）、本発明者らは、刺激された CAR T 細胞によって産生された IFN γ が、常在マクロファージ/ミクログリア細胞の活性化並びにその後の適応免疫反応のプライミング及び誘導の調節に関与し得ると推論した。

IFN γ は、活性化の際に CAR T 細胞によって豊富に産生される重要なエフェクターサイトカインの 1 つであり、原型マクロファージ活性化因子である（18）。CAR T 細胞によって分泌される IFN γ が、常在マクロファージ/ミクログリア細胞の表現型及び機能において観察される変化の原因であるかを調べるために、CAR T 細胞を、WT（CAR T^{WT}）又は IFN γ -/-（CAR T^{IFN γ -/-}）マウスから開発し（図 1 4 A）、それに応じて特徴付けた。両方の CAR T 細胞集団（CAR T^{WT} 及び CAR T^{IFN γ -/-}）における CAR 形質導入率、生存率、増殖及び CAR 4 : CAR 8 の比は、同等の治療産物を示した（図 1 4 B）。次に、本発明者らは、WT マウス由来の CAR T 細胞と比較してインビトロ殺傷アッセイを行い、IFN γ -/- マウス由来の CAR T 細胞の機能性を検証したが、そこで 1 : 1 のエフェクター対標的比で同等の殺傷効力が実証された（図 1 4 C）。CAR T 多機能性の評価で、CAR T^{WT} 及び CAR T^{IFN γ -/-} 細胞で TNF α 及び GZMB は同等に産生されることが実証され、CAR T^{IFN γ -/-} における IFN γ 産生の欠損が予測された（図 1 4 D）。インビボで、CAR T^{IFN γ -/-} を受けたマウスは、CAR T^{WT} で治療されたマウスと比較して全生存が低く、これは、CAR T 細胞における IFN γ 欠損のために抗がん活性が低下し、生存が低下することを示す（図 1 4 E 及び図 1 4 F）。TME 全体の分析により、CAR T 細胞を受けたマウスでは活性化及び炎症性サイトカインに関する遺伝子の発現が高まり、逆に、抑制表現型及び腫瘍内免疫浸潤物の機能に関する遺伝子の発現が低下したことから（図 1 4 G）、CAR T 細胞による IFN γ 分泌の欠損により神経膠腫 TME が変化することが示された。IFN γ は、CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導し（9）、Th1/CD4 細胞の極性化を促進し（19）、マクロファージ/ミクログリア細胞を再プログラム又は活性化する（6、7）多面的サイトカインである。したがって、次に、本発明者らは、CAR T 細胞によって分泌される IFN γ の欠損が宿主免疫細胞に影響を及ぼすかを評価した。CAR T 細胞療法の 3 日後の TME のフローサイトメトリー分析で、内因性 T 細胞及び CAR T 細胞の T 細胞数が有意に低下したが、それは活性化（CD69⁺）T 細胞の減少と相関する（図 1 4 H 及び図 1 4 I）。さらに、CAR T^{IFN γ -/-} 細胞と比較して、CAR T^{WT} を受けた腫瘍担持マウスの MHC I⁺/MHC II⁺ 及び CD8⁺ マクロファージ/ミクログリア細胞活性化の頻度は有意に増加した（図 1 4 J）。したがって、CAR T 抗腫瘍活性の結果としての IFN γ 産生により、T 細胞が活性化及び再活性化され、マクロファージ/ミクログリア細胞の活性化及び抗原提示能が高まる。

【実施例 5】

【0069】

宿主における IFN γ シグナル伝達の欠損により、インビボでの CAR T 抗腫瘍活性が低下する

以前の研究は、抗 PD-1 治療等の免疫療法に対する応答のシグネチャーとしての IFN

10

20

30

40

50

γ シグナル伝達を報告する (20)。宿主 $\text{IFN}\gamma$ シグナル伝達が $\text{CAR}^+ \text{T}$ 媒介性免疫応答において機能するかを調べる、 $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{WT}}$ 細胞を K-Luc 保有 WT 又は $\text{IFN}\gamma \text{R}^-/-$ マウスに養子移入した (図 15 A)。 $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{WT}}$ を受けた $\text{IFN}\gamma \text{R}^-/-$ マウスの生存は不利で、宿主免疫細胞の $\text{IFN}\gamma$ シグナル伝達の欠損で、 $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞の抗腫瘍活性及び全生存の低下が示唆された (図 15 B 及び図 15 C)。

TME の遺伝子発現分析により、 CAR 療法中の宿主における $\text{IFN}\gamma$ シグナル伝達の欠損により、活性化及び炎症促進性応答に關与する遺伝子 ($\text{CD}40$ 、 $\text{NOS}2$ 、 $\text{TNF}\alpha$ 、 GZMA 、 GZMB 、 $\text{PRF}1$ 、及び $\text{IFN}\gamma$) の発現が低下することが明らかになった (図 15 D)。免疫ランドスケープにおける $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞媒介性変化をさらに調べるため、本発明者らは、同質遺伝子的にミスマッチした ($\text{Thy}1.1^+$) $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{WT}}$ 細胞を K-Luc 保有 WT 又は $\text{IFN}\gamma \text{R}^-/-$ マウスに養子移入した。 TME のフローサイトメトリー分析により、 $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞療法の日後という早期に、 $\text{IFN}\gamma \text{R}^-/-$ マウスと比較して、 WT マウスにおけるマクロファージ/ミクログリア細胞 ($\text{CD}11\text{b}^+ \text{CD}86^+ \text{MHCII}^+ \text{MHCII}^+$) の活性化が有意に高まったことが示された (図 15 E)。 WT マウスと比較して、増殖能及びエフェクターサイトカイン産生能で活性化された内因性 T 細胞 ($\text{Thy}1.2^+ \text{CD}3^+$) の数は、 $\text{IFN}\gamma \text{R}^-/-$ マウスにおいて有意に低かった (図 15 F)。興味深いことに、 WT マウスと比較して、養子移入された $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞 ($\text{Thy}1.1^+ \text{CD}3^+$) は、 $\text{IFN}\gamma \text{R}^-/-$ マウスと比較して有意に高い数、増殖性 ($\text{Ki}67^+$) 及び細胞傷害性表現型 ($\text{IFN}\gamma^+$ 及び GZMB^+) を示し (図 15 G)、これは、 TME における $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞活性を促進する宿主免疫細胞からの潜在的な $\text{IFN}\gamma$ ポジティブフィードバックを示唆する。つまり、上記結果から、宿主と養子移入された免疫細胞との間に相互作用が存在し、神経膠腫 TME における宿主 $\text{IFN}\gamma$ シグナル伝達が、 $\text{CAR}^+ \text{T}$ 療法中に強力な免疫応答を開始するために必要であることが確立された。

$\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞によって分泌される $\text{IFN}\gamma$ が、常在マクロファージ/ミクログリア細胞の表現型及び機能において觀察される変化の原因であるかどうかを調べるために、野生型 ($\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{WT}}$) 又は $\text{IFN}\gamma^-/-$ ($\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{IFN}\gamma^-/-}$) マウスから $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞を作製し (図 15 A)、それに応じて特徴付けた。両方の $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞集団 ($\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{WT}}$ 及び $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{IFN}\gamma^-/-}$) における CAR 形質導入率、生存率、増殖は、 $\text{CAR}^+ 4 : \text{CAR}^+ 8$ T 細胞の比にいくらかの差がある同等の治療生成物を示した ($P < 0.05$; 図 15 B)。次に、本発明者らは、 WT マウス由来の $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞と比較してインビトロ殺傷アッセイを行うことによって、 $\text{IFN}\gamma^-/-$ マウス由来の $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞の機能性を検証し、これは、1 : 1 の $\text{E} : \text{T}$ 比で同等の殺傷効力を実証した (図 15 C)。 $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞多機能性の評価は、 $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{WT}}$ 及び $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{IFN}\gamma^-/-}$ 細胞の両方における $\text{TNF}\alpha$ 及び GZMB の同等の産生を実証し、 $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{IFN}\gamma^-/-}$ における $\text{IFN}\gamma$ 産生の欠損が予測された (図 15 D) インビボで、 $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{IFN}\gamma^-/-}$ を受けたマウスは、 $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{WT}}$ で治療されたマウスと比較して低い全生存を示し、 $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞における $\text{IFN}\gamma$ 欠損がインビボでそれらの抗がん活性を弱めることを示した (図 15 E 及び 15 F)。 $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞療法の日後の腫瘍及び関連する TME の遺伝子発現分析により、 $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{WT}}$ 細胞を受けたマウスにおける活性化及び炎症促進性サイトカインに關与する遺伝子における発現が増強され、孫一方では、腫瘍内免疫浸潤物の抑制表現型及び機能に關与する遺伝子の発現が低減されたことが明らかになり (図 15 G)、 $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞による $\text{IFN}\gamma$ 分泌の欠損により、神経膠腫 TME が変化することが示された。 $\text{IFN}\gamma$ は、 $\text{CD}8^+ \text{T}$ 細胞の活性化を誘導し、 $\text{Th}1$ $\text{CD}4$ 細胞の極性を促進し、マクロファージ/ミクログリア細胞を再プログラム又は活性化する多面的サイトカインである。したがって、本発明者らは次に、 $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞によって分泌される $\text{IFN}\gamma$ の欠損が宿主免疫細胞に影響を及ぼすかどうかを評価した。 $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞療法の日後の TME のフローサイトメトリー分析により、内因性及び $\text{CAR}^+ \text{T}$ 細胞の両方において、 T 細胞数が有意な減少し、これは活性化 ($\text{CD}69^+$) T 細胞の減少と相関した (図 15 H 及び 15 I)。さらに、 $\text{CAR}^+ \text{T}^{\text{IFN}\gamma^-/-}$ 細胞と比較して

10

20

30

40

50

、CAR T^{wt}を受けた担γウスにおけるMHC I + / MHC II + 及びCD86 + マクロファージ / ミクログリア細胞活性化の頻度の有意な増加が観察された (図15J)。重要なことに、CAR T細胞によるIFNγ分泌が欠損すると、CAR T^{wt}細胞と比較して、CAR T^{IFNγ-/-}細胞を受けたマウスにおいてより高いM2型腫瘍マクロファージがもたらされた。したがって、CAR T細胞抗腫瘍活性の結果としてのIFNγ産生により、T細胞の活性化及び再活性化並びにマクロファージ / ミクログリア細胞の再プログラミングがもたらされ、それらの活性化及び抗原提示能が高まった。

【実施例6】

【0070】

ヒトCAR T細胞療法は、患者宿主免疫細胞を調節する

10

本発明者らは次に、GBM患者におけるヒト内因性免疫細胞に対するCAR T細胞抗腫瘍活性の影響を調査した。CAR T細胞がGBM患者単球又はマクロファージの活性化を促進することができるかどうかを臨床的に評価するために、本発明者らは、CAR T細胞抗腫瘍活性の存在下で患者骨髓系集団を表現型的に特徴付けるインビトロアッセイを開発した。患者由来神経膠腫腫瘍に対するヒトCAR T細胞の共培養からの上清を収集し、その後、神経膠腫患者由来単球 (図16A)、エクスピボ分化患者マクロファージ又は全CD3 + 患者T細胞 (図17A) と共にインキュベートした。表現型及び形態学的評価により、活性化マーカー (CD14 + CD86 + / CD80 + 及びCD14 + HLA Dr +) の発現の増加によって実証されるように、CAR T腫瘍共培養からの馴化培地 (CM) が患者由来単球又はマクロファージの分化及び活性化を促進することが明らかになり、これは古典的M1マクロファージに関連する遺伝子の発現の増強と相関する (図16B ~ 16D 及び図17B ~ 17D)。したがって、CAR T腫瘍共培養からのCMへの曝露により、CD69の発現の亢進によって証明されるように、GBM患者血液から単離されたT細胞の活性化が誘導された (図17E 及び図17F)。重要なことに、マクロファージ及びT細胞におけるIFNγシグナル伝達の遮断により、活性化が低減され (図17B ~ 17F)、GBM患者における宿主免疫細胞のCAR T媒介性活性化におけるIFNγの影響が強調される。これらの知見を総合すると、CAR T細胞抗腫瘍機能によって分泌されたIFNγにより、単球の活性化マクロファージへの極性化が促進され、さらに分化マクロファージの活性化が誘導され、T細胞活性化が促進されることが示唆される。

20

30

【0071】

本発明者らはGBMの本発明者らの免疫適格マウスモデルを実証したため、最後に、CAR T細胞に臨床現場で腫瘍特異的T細胞の生成を誘導する機能があるかどうかを評価することを目的とした。この現象を正確に調査するために、本発明者らは、完全応答を示し、CAR T療法に対してユニークに反応したケースレポート由来の試料を評価した (4)。CAR T細胞治療前 (Pre-CAR T) 及びCAR T療法に対する応答中 (Post-CAR T) に血液からT細胞を単離した (図17G)。単離されたT細胞を刺激し、照射された自己腫瘍細胞の存在下で増殖させた。T細胞集団のフローサイトメトリ評価は、CAR T細胞療法の開始前に対する応答中に単離されたT細胞の細胞内IFNγ及び増殖の亢進によって示されるように、腫瘍反応性が明らかに高まった (図17H 及び図17I)。重要なことに、エクスピボで増殖させたT細胞と自己患者神経膠腫腫瘍又は無関係な腫瘍細胞株との患者由来の共培養において、CAR T療法に対する応答中に単離されたT細胞は、自己腫瘍細胞対無関係な腫瘍細胞に対して腫瘍特異的死滅を示した (図17J)。これらの結果では、腫瘍細胞がIL13Rα2陰性であることが考慮された (図17K)。これらの知見は、有効なCAR T療法には、宿主免疫細胞を刺激し、腫瘍特異的T細胞応答の生成を促進する可能性があり、さらに、宿主免疫細胞がCAR T治療の成功に重要に機能するという本発明者らの前臨床研究が確認された。

40

【実施例7】

【0072】

IL-13 CAR T及びインターフェロンガンマの共発現

50

本発明者らは、実施例 1 の IL - 13 CAR (図 1 A) が T2A スキップ配列を介して未成熟マウスインターフェロンガンマに連結されている発現カセットを作製することによって、インターフェロンガンマの同時発現の影響を調べた (図 20 A)。本発明者らは、IL13R α 2 - CAR / IFNg を設計及び構築した。マウス及びヒトプラットフォームに関して、IFNg を組み込むことが実証される。CAR カセットにおいて、CAR T 細胞の同等の形質導入及び増殖が実現可能である (図 20 A)。ベクターを配列決定し、検証した。マウス T 細胞を単離し、IL - 13 CAR 及び切断型 CD19 (シグナル伝達ドメインを欠く) 又は IL - 13 CAR 及びマウスインターフェロンガンマを発現するベクターのいずれかで形質導入した (図 20 B)。培養上清を回収し、フローサイトメトリーを用いて、CAR 発現のマーカーとしての IL - 13 の存在を評価した。両方の構築物が IL - 13 CAR を発現し、形質導入効率は FACS により 50 % 超である (図 20 C)。さらに、IL13R α 2 - CAR / IFNg ベクターが T 細胞に IFNg を発現及び分泌する機能を付与していることを確認するため、エキスピボで展開した増殖させた IL13R α 2 - CAR / IFNg 及び IL13R α 2 - CAR T 細胞から上清を採取し、ELISA で IFNg レベルを測定した (図 1 D)。ELISA によるインターフェロンガンマ産生の測定から、IL - 13 CAR T - インターフェロンガンマ構築物のみがインターフェロンガンマを発現したことが示された (図 20 D)。

10

【0073】

次に、本発明者らは、CAR T 細胞の表現型を評価した。本発明者らの研究から、マウス (図 21 E) 及びヒト (図 22 C) T 細胞における、IL13R α 2 - CAR / IFNg と IL13R α 2 - CAR 間に表現型の差異がないことが実証された。簡潔には、マウス IL - 13 CAR T 細胞及びマウス IL - 13 CAR - インターフェロンガンマ T 細胞を、マウス神経腫瘍腫瘍細胞と 1 : 3 のエフェクター : 標的比で 24 時間共培養した。図 21 A ~ 21 C に示されるように、IL - 13 CAR - インターフェロンガンマ T 細胞はともに、優れた増殖及び腫瘍細胞死滅を示した。T 細胞活性化は、CD69 発現を測定することによって評価した。図 21 D に見られるように、IL - 13 CAR T 細胞及び IL - 13 CAR T - インターフェロンとともに T 細胞の活性化は類似していた。

20

【0074】

ヒト IL - 13 CAR (E13Y 突然変異があるヒト IL - 13、ヒト CD8 ヒンジ、ヒト CD8 TM、ヒト 4 - 1 BB 共刺激ドメイン及びヒト CD3 ゼータ) を発現する CAR T 細胞を、ヒトインターフェロンガンマを共発現するか又は共発現しないで産生した。ヒト IL - 13 CAR T 細胞及びヒト IL - 13 CAR - インターフェロンガンマ T 細胞を、患者由来神経腫瘍腫瘍細胞と、1 : 25 のエフェクター : 標的比で 24 時間共培養した。T 細胞及び腫瘍細胞を評価した。図 22 A に見られるように、IL - 13 CAR - インターフェロンガンマ T 細胞は、優れた増殖及びほぼ同様の T 細胞死滅を示した。重要なことに、抗原陽性腫瘍と共培養した場合、マウス (図 21 C) 及びヒト (図 22 B) において、IL13R α 2 - CAR T 細胞と比較して、IL13R α 2 - CAR / IFNg T 細胞の増殖が高まる。マウス及びヒトともに、IL13R α 2 - IFNg CAR 細胞と比較して、IL13R α 2 - CAR / IFNg T 細胞では殺傷能がわずかに亢進したことが観察された。

30

40

【0075】

重要なことに、IL13R α 2 - CAR / IFNg T 細胞由来の分泌された IFNg は機能的であり、免疫刺激成分があることを確認するために、IFNg を構成的に発現するように組換えられた、エキスピボで増殖させた T 細胞由来の上清をマクロファージ培養物に添加した (図 26 A)。IL13R α 2 - CAR / IFNg 培養条件に曝露されたマクロファージは、IL13R α 2 - CAR T 細胞から収集された上清と比較して、より高い炎症促進性及び代謝的に活性な表現型を示した (図 26 B)。つまり、これらの結果から、IL13R α 2 - CAR / IFNg は、IFNg を発現及び分泌し、マクロファージ等の内因性自然免疫集団を活性化する機能があることがわかる。

50

【 0 0 7 6 】

本発明者らは、本発明者らの合成モデルにおいて、腫瘍が高レベル（図 2 8 B ; 左）又は中 / 低（図 2 8 C ; 右）であるマウスにおいて、 $IL13R\alpha2-CAR/IFNg$ と $IL13R\alpha2-CAR$ の抗腫瘍活性を評価するパイロット試験を行った。 $IL13R\alpha2$ 抗原がある腫瘍があるおける $IL13R\alpha2-CAR$ と比較した。2つのCARの機能は、高抗原発現腫瘍において同等であるが、 $IL13R\alpha2-CAR/IFNg$ で治療した中程度の抗原発現腫瘍があるマウスにおける抗腫瘍活性は、 $IL13R\alpha2-CAR$ と比較して有意に変化した。

【 0 0 7 7 】

$IFNg$ のグローバルインパクトの部分として、本発明者らはまた、 $IL13R\alpha2-IFNgCAR$ が、転移疾患又は遠隔部位の腫瘍に対して優れた抗腫瘍活性を示すか否かを試験した。したがって、マウス $IL-13CAR$ T細胞及びマウス $IL-13CAR-インターフェロンガンマ$ T細胞を、転移性黒色腫のマウスモデルにおいて評価した（図 2 3）。簡潔には、腫瘍細胞をマウスの両方の側腹部に注射した。腫瘍が所定のサイズに達したら、マウス $IL-13CAR$ T細胞及びマウス $IL-13CAR-インターフェロンガンマ$ T細胞を1つの腫瘍に局所的に注射した。腫瘍サイズを両側で測定した。図 2 3 のグラフは、非治療側の腫瘍体積を示す。図から分かるように、 $IL-13CART-インターフェロンガンマ$ T細胞は、 $IL-13CAR$ T細胞よりも大きなアブスコパル効果を示した。興味深いことに、黒色腫があるマウスに対する本発明者らの研究は、 $IL13R\alpha2-CAR/IFNgT$ 細胞は、遠位腫瘍を標的化する優れた機能があることを見出した。これらの知見は、GBM等の多病巣性病変があるがんに対する重要な治療アプローチとして、 $IL13R\alpha2-CAR/IFNg$ を強く強調する。

【 0 0 7 8 】

実験は、 $IL13R\alpha2$ + 原発性脳腫瘍株（PBT）を移植した同系免疫応答性グリオーマモデル及びNSGマウスにおける $IL13R\alpha2-IFNgCAR$ のインビボ機能活性を試験するように設計した。本発明者らは、 $IL13R\alpha2-CAR/IFNgT$ 細胞は、中 / 低抗原腫瘍があるマウスにおいて優れた抗腫瘍活性があり、転移性黒色腫モデルで遠隔部位で腫瘍が根絶されることを証明した。免疫刺激剤として $IFNg$ の重要性及び $IL13R\alpha2-CAR/IFNgT$ 細胞の治療的重要性を評価するために、本発明者らは、CAR T細胞、マクロファージ、及び腫瘍細胞を用いて三元共培養系を開発した（図 3 1 A ~ 3 1 B）。その結果は、マクロファージのような他の免疫細胞の存在下で、 $IL13R\alpha2-CAR/IFNyT$ 細胞は、有意に優れた抗腫瘍機能を示し、内因性免疫を刺激することを示唆する。

【 実施例 8 】

【 0 0 7 9 】

IL-13 CAR T及びインターフェロンガンマの同時発現の最適化

本発明者らはまた、 $IFNy$ 発現を最適化及び調節することによって、効能及び安全性とともに優先するための、異なる $IL13R\alpha2-CAR/IFNg$ 変異体を設計し、かつ、構築した。本発明者らは、図 2 9 A に示される構築物の設計及び配列チェックに成功した。T細胞にCAR/IFNg変異体を形質導入し、かつ上清を回収して $IFNg$ 産生を確認し、かつ、機能性を確認するために、 $IL13R\alpha2$ + 腫瘍と共培養した（図 2 9 B）。CAR/IFNg変異体を、異なるレベルの $IFNy$ 発現及び分泌について評価した。強力なプロモーターであるEF1プロモーターと比較して、 $pkg100$ プロモーターはより弱いプロモーターである。 $pkg100$ プロモーター下に $IFNy$ があるCAR T細胞は、 $IFNy$ レベルの低下を示した（図 2 9 C）。 $IL13R\alpha2-CAR/IFNy^{low}T$ 細胞は、 $IFNy$ の過剰産生に関連する安全上の懸念に対処する。次に、細胞毒性機能を確認するために、 $IL13R\alpha2-CAR/IFNy^{low}T$ 細胞を $IL13R\alpha2$ + 腫瘍と1 : 50のエフェクター対標的比で5日間共培養した。生存腫瘍数の評価により、 $IL13R\alpha2-CAR/IFNy^{low}T$ 細胞には標準 $IL13R\alpha2-CAR$ T細胞に匹敵する細胞傷害機能があることが示された（図 2 9 D）。

10

次に、本発明者らは、GFP遺伝子をIFN γ で置き換えた(図30A)。構築物で形質導入されたT細胞を、1:50のエフェクター対標的比で5日間、IL13R α 2+腫瘍と共培養した(図30B)。本発明者らの結果は、NFAT CARが機能的であり、標準的なIL13R α 2-CAR T細胞に匹敵する死滅能力を示すことを確認する(図30C)。これらの結果から、CAR構築物へ合成NFATプロモーターを組み込むと、CAR T細胞の機能が損なわれないことが示された。

20

30

40

50

1. McGranahan T, Therkelsen KE, Ahmad S, Nagpal S. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. *Current treatment options in oncology* 2019, **20**(3): 24.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018, **68**(1): 7-30.
3. Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2017, **35**(21): 2402-2409.

【 0 0 8 2 】

【表 5】

4. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, *et al.* Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *The New England journal of medicine* 2016, **375**(26): 2561-2569.
5. Hegde M, Joseph SK, Pashankar F, DeRenzo C, Sanber K, Navai S, *et al.* Tumor response and endogenous immune reactivity after administration of HER2 CAR T cells in a child with metastatic rhabdomyosarcoma. *Nature communications* 2020, **11**(1): 3549.
6. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, *et al.* Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *International journal of cancer* 2009, **125**(2): 367-373. 10
7. Rock RB, Hu S, Deshpande A, Munir S, May BJ, Baker CA, *et al.* Transcriptional response of human microglial cells to interferon-gamma. *Genes and immunity* 2005, **6**(8): 712-719.
8. Castro F, Cardoso AP, Goncalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in immunology* 2018, **9**: 847.
9. Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon-gamma derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell death & disease* 2017, **8**(6): e2836. 20
10. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(11): 836-848.
11. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current opinion in immunology* 2010, **22**(3): 333-340.
12. Brown CE, Aguilar B, Starr R, Yang X, Chang WC, Weng L, *et al.* Optimization of IL13Ralpha2-Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells for Improved Anti-tumor Efficacy against Glioblastoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2018, **26**(1): 31-44. 30
13. Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT, McLaughlin ME, Jacks T. Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. *Nature genetics* 2000, **26**(1): 109-113.
14. Flores CT, Wildes TJ, Drake JA, Moore GL, Dean BD, Abraham RS, *et al.* Lin(-)CCR2(+) hematopoietic stem and progenitor cells overcome resistance to PD-1 blockade. *Nature communications* 2018, **9**(1): 4313.
15. Ausman JJ, Shapiro WR, Rall DP. Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. *Cancer research* 1970, **30**(9): 2394-2400. 40

【 0 0 8 3 】

【表 6】

16. Reardon DA, Gokhale PC, Klein SR, Ligon KL, Rodig SJ, Ramkissoon SH, *et al.* Glioblastoma Eradication Following Immune Checkpoint Blockade in an Orthotopic, Immunocompetent Model. *Cancer immunology research* 2016, **4**(2): 124-135.
17. Gutmann DH, Kettenmann H. Microglia/Brain Macrophages as Central Drivers of Brain Tumor Pathobiology. *Neuron* 2019, **104**(3): 442-449.
18. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, *et al.* Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* 2007, **447**(7142): 326-329. 10
19. Schulz EG, Mariani L, Radbruch A, Hofer T. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* 2009, **30**(5): 673-683.
20. Cloughesy TF, Mochizuki AY, Orpilla JR, Hugo W, Lee AH, Davidson TB, *et al.* Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nature medicine* 2019, **25**(3): 477-486.
21. Maus MV, Fraietta JA, Levine BL, Kalos M, Zhao Y, June CH. Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annual review of immunology* 2014, **32**: 189-225. 20
22. Quail DF, Joyce JA. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer cell* 2017, **31**(3): 326-341.
23. Giering A, Pszczolkowska D, Walentynowicz KA, Rajan WD, Kaminska B. Immune microenvironment of gliomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2017, **97**(5): 498-518.
24. Jansen CS, Prokhnevskaya N, Master VA, Sanda MG, Carlisle JW, Bilen MA, *et al.* An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* 2019, **576**(7787): 465-470. 30
25. Corrales L, Glickman LH, McWhirter SM, Kanne DB, Sivick KE, Katibah GE, *et al.* Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell reports* 2015, **11**(7): 1018-1030.
26. Corrales L, McWhirter SM, Dubensky TW, Jr., Gajewski TF. The host STING pathway at the interface of cancer and immunity. *The Journal of clinical investigation* 2016, **126**(7): 2404-2411.
27. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, Khan N, Mendonca LE, Pacis A, *et al.* BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* 2018, **172**(1-2): 176-190 e119. 40

【 0 0 8 4 】

【表 7】

28. Yao Y, Jeyanathan M, Haddadi S, Barra NG, Vaseghi-Shanjani M, Damjanovic D, *et al.* Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell* 2018, **175**(6): 1634-1650 e1617.
29. Grasso CS, Tsoi J, Onyshchenko M, Abril-Rodriguez G, Ross-Macdonald P, Wind-Rotolo M, *et al.* Conserved Interferon-gamma Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer cell* 2020.
30. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, *et al.* A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 2017, **9**(399).
31. You F, Jiang L, Zhang B, Lu Q, Zhou Q, Liao X, *et al.* Phase 1 clinical trial demonstrated that MUC1 positive metastatic seminal vesicle cancer can be effectively eradicated by modified Anti-MUC1 chimeric antigen receptor transduced T cells. *Science China Life sciences* 2016, **59**(4): 386-397.
32. Wang D, Aguilar B, Starr R, Alizadeh D, Brito A, Sarkissian A, *et al.* Glioblastoma-targeted CD4+ CAR T cells mediate superior antitumor activity. *JCI insight* 2018, **3**(10): e99048.
33. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, *et al.* Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *The New England journal of medicine* 2016, **375**(26): 2561-2569.
34. Wang D, Starr R, Chang WC, Aguilar B, Alizadeh D, Wright SL, *et al.* Chlorotoxin-directed CAR T cells for specific and effective targeting of glioblastoma. *Sci Transl Med* 2020, **12**(533).
35. Wang D, Aguilar B, Starr R, Alizadeh D, Brito A, Sarkissian A, *et al.* Glioblastoma-targeted CD4+ CAR T cells mediate superior antitumor activity. *JCI insight* 2018, **3**(10).
36. Brown CE, Starr R, Martinez C, Aguilar B, D'Apuzzo M, Todorov I, *et al.* Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer research* 2009, **69**(23): 8886-8893.
37. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature reviews Cancer* 2003, **3**(9): 666-675.
38. Alizadeh D, White EE, Sanchez TC, Liu S, Zhang L, Badie B, *et al.* Immunostimulatory CpG on Carbon Nanotubes Selectively Inhibits Migration of Brain Tumor Cells. *Bioconjugate chemistry* 2018, **29**(5): 1659-1668.
39. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM, 3rd, *et al.* Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 2019, **177**(7): 1888-1902 e1821.

【 0 0 8 5 】

10

20

30

40

50

【 表 8 】

40. Heng TS, Painter MW, Immunological Genome Project C. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nature immunology* 2008, **9**(10): 1091-1094.

41. Aran D, Looney AP, Liu L, Wu E, Fong V, Hsu A, *et al.* Reference-based analysis of lung single-cell **sequencing** reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nature immunology* 2019, **20**(2): 163-172.

42. Godec J, Tan Y, Liberzon A, Tamayo P, Bhattacharya S, Butte AJ, *et al.* Compendium of Immune Signatures Identifies Conserved and Species-Specific Biology in Response to Inflammation. *Immunity* 2016, **44**(1): 194-206.

43. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics : a journal of integrative biology* 2012, **16**(5): 284-287.

10

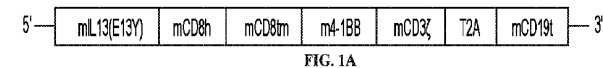
他の実施形態

本発明をその詳細な説明と併せて説明してきたが、上記説明は、本発明の範囲を例示することを意図しており、限定することを意図していないことを理解されたい。

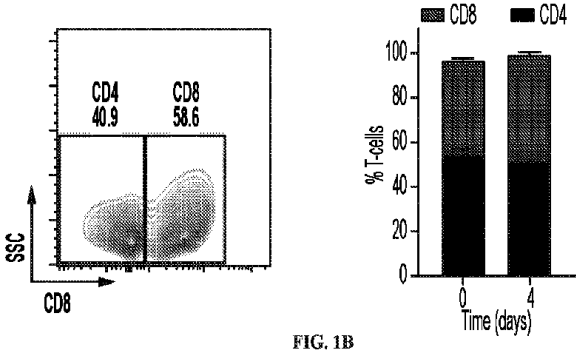
20

【 図 面 】

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



30

40

50

【 図 1 C 】

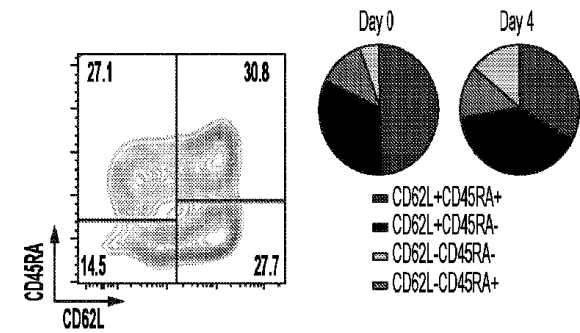


FIG. 1C

【 図 1 D 】

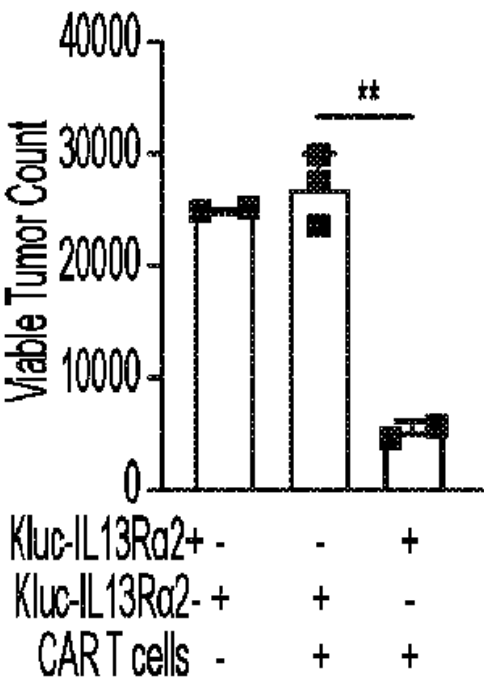


FIG. 1D

【 図 2 A 】

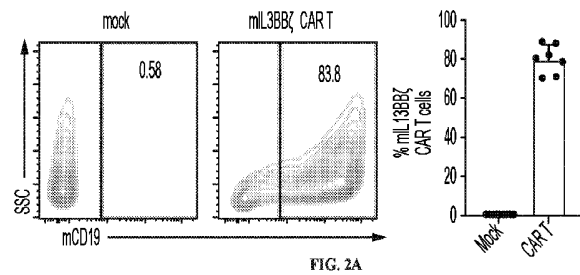


FIG. 2A

【 図 2 B 】

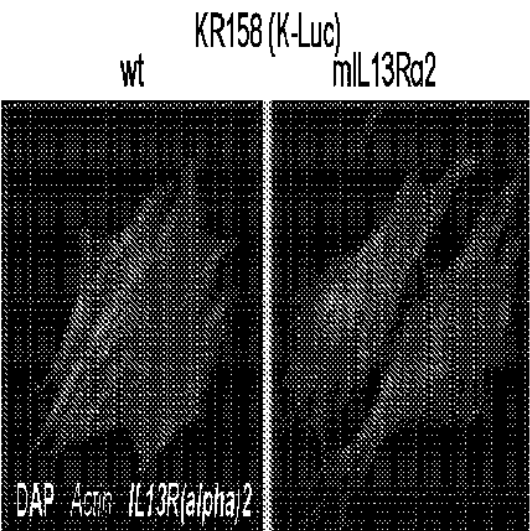


FIG. 2B

10

20

30

40

50

【 図 2 C 】

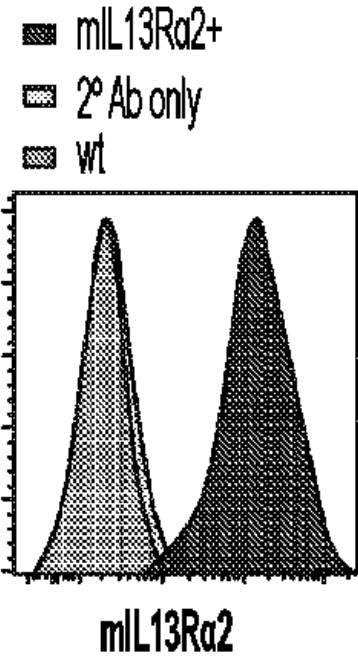


FIG. 2C

【 図 2 D 】

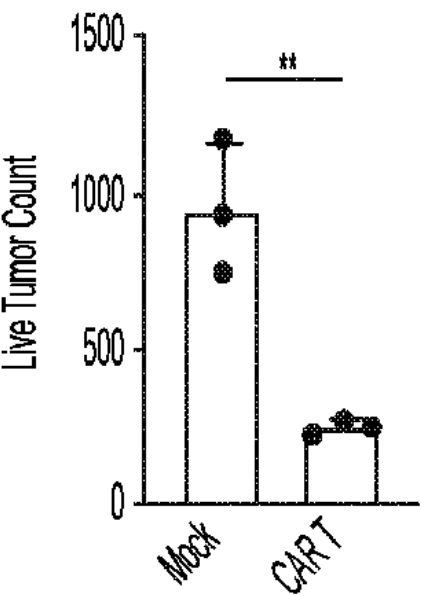


FIG. 2D

【 図 2 E 】

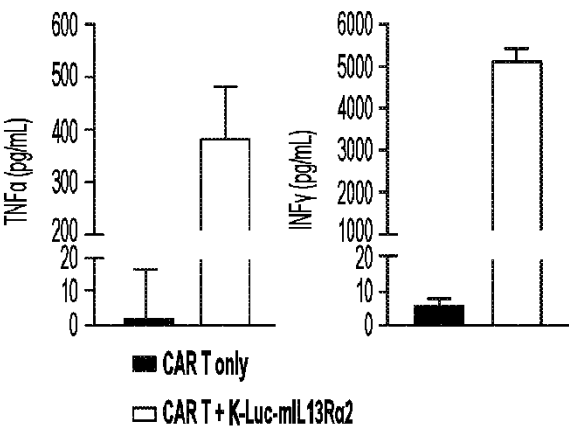


FIG. 2E

【 図 2 F 】

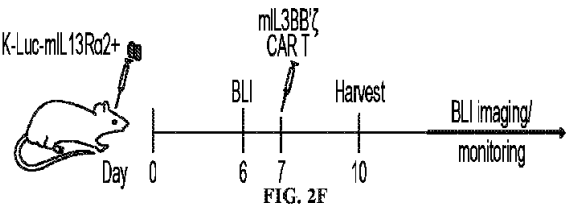


FIG. 2F

10

20

30

40

50

【 図 2 G 】

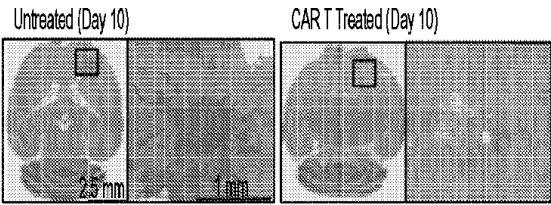


FIG. 2G

【 図 2 H 】

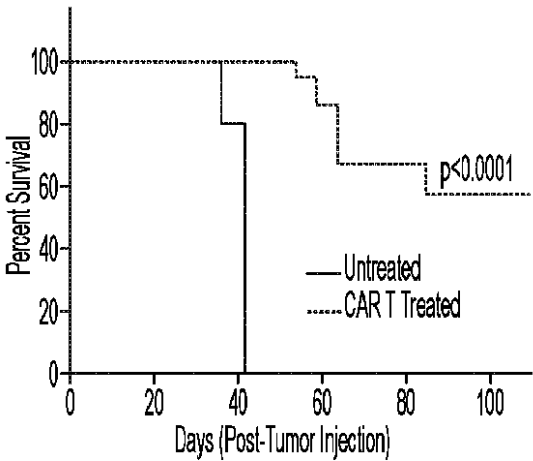


FIG. 2H

【 図 2 I 】

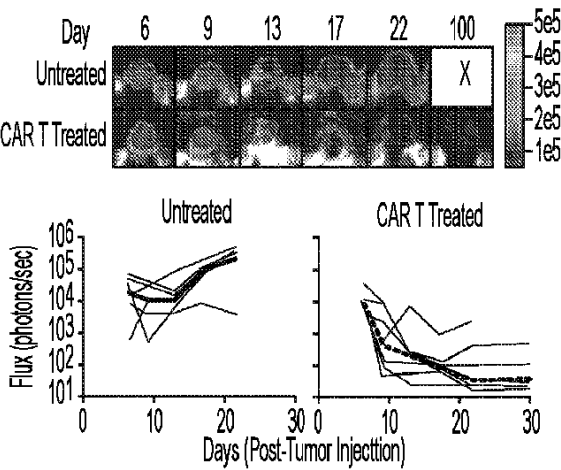


FIG. 2I

【 図 3 A 】

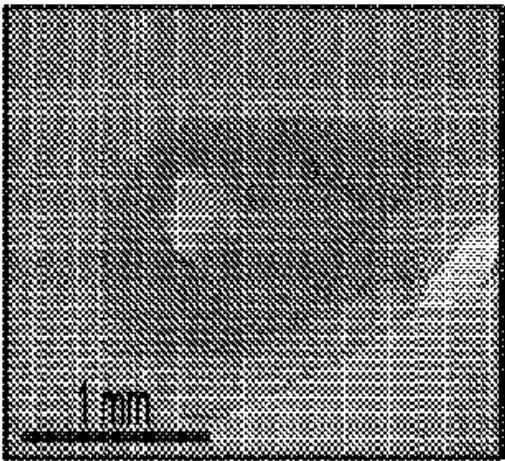


FIG. 3A

10

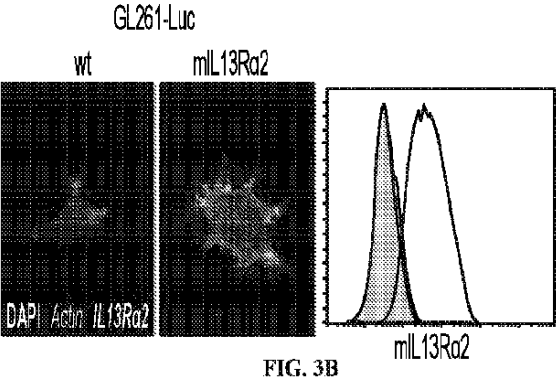
20

30

40

50

【 3 B 】



【 3 C 】

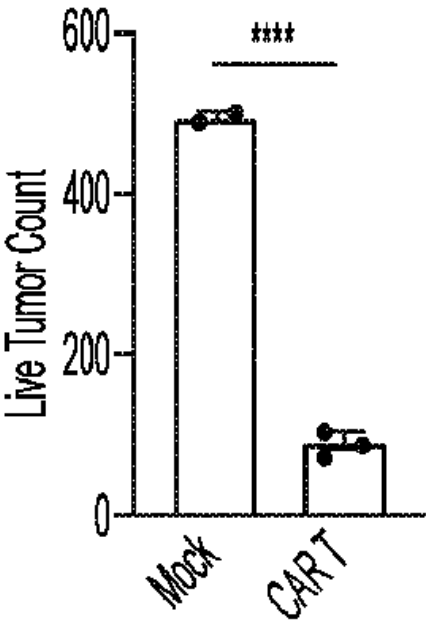
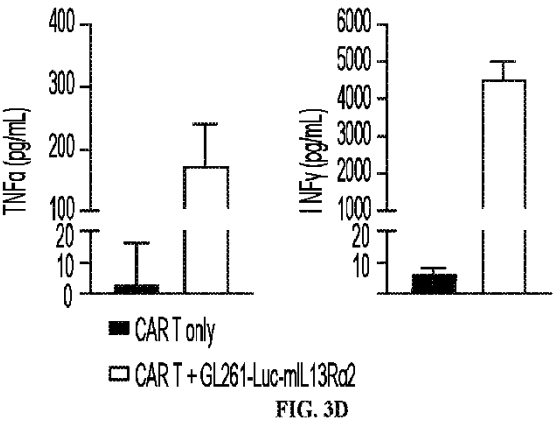
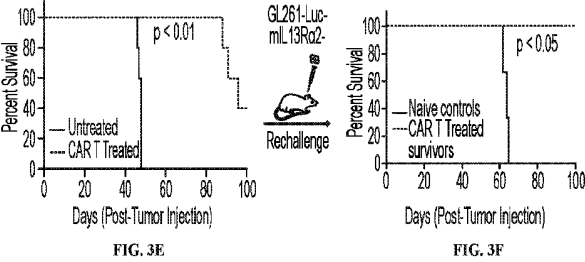


FIG. 3C

【 3 D 】



【 3 E - 3 F 】



10

20

30

40

50

【 4 A 】

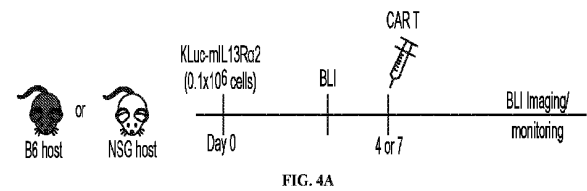


FIG. 4A

【 4 B 】

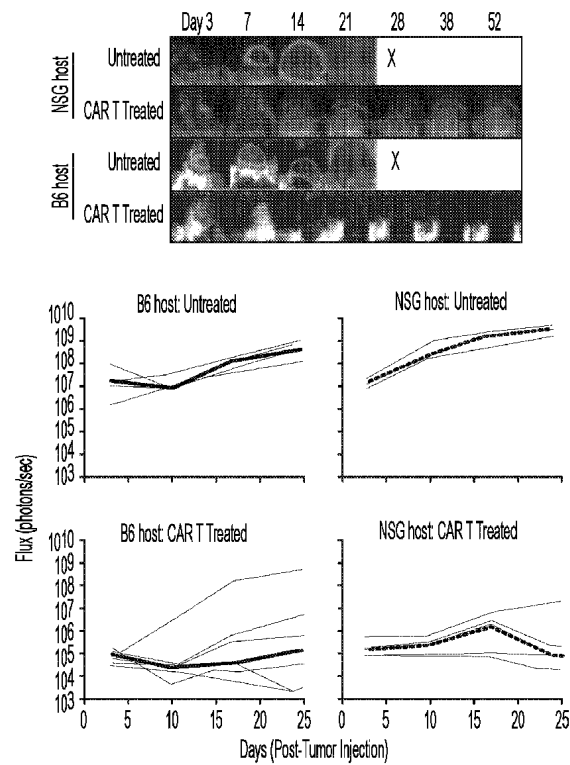


FIG. 4B

【 4 C 】

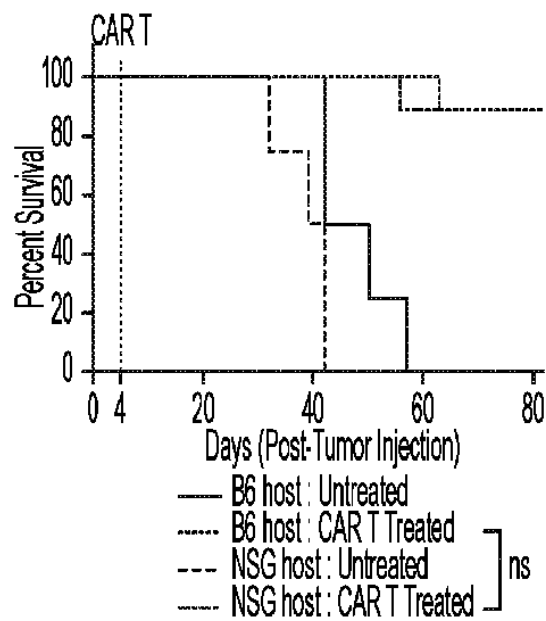


FIG. 4C

【 4 D 】

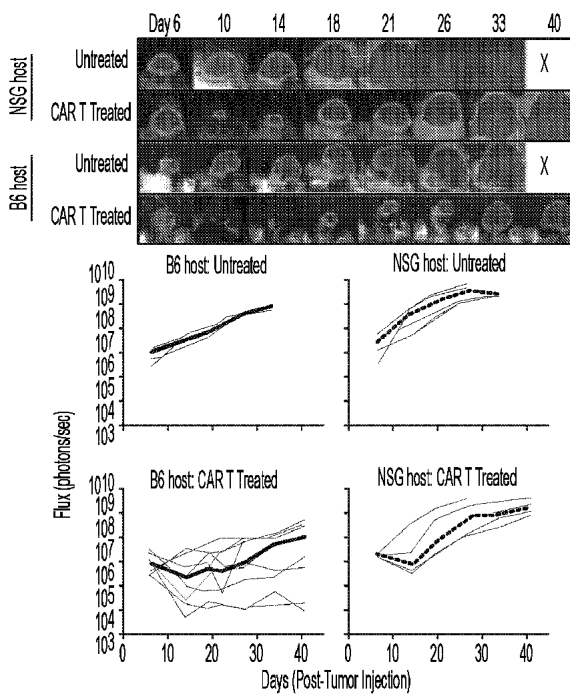


FIG. 4D

10

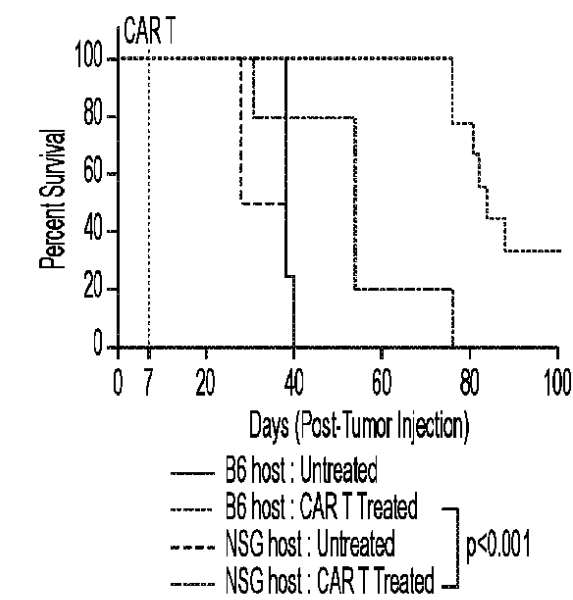
20

30

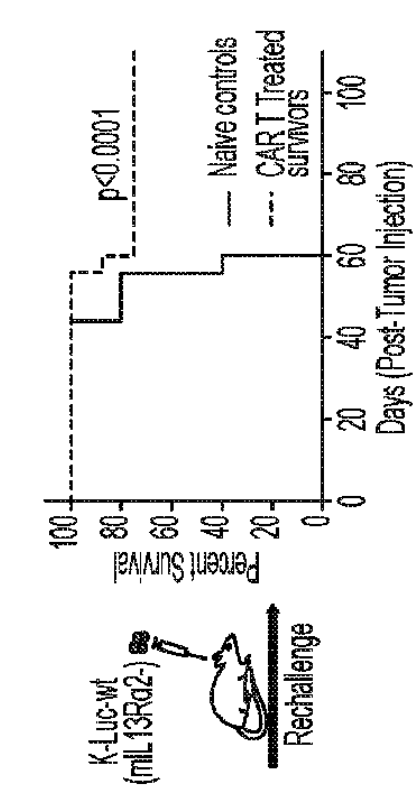
40

50

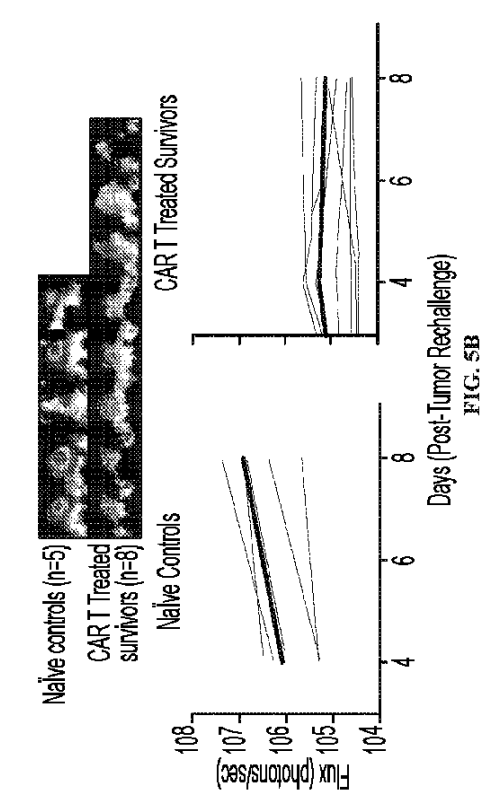
【 4 E 】



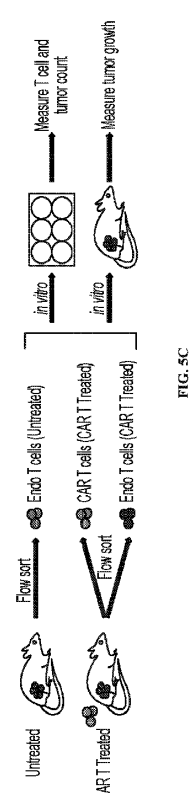
【 5 A 】



【 5 B 】



【 5 C 】



10

20

30

40

50

【 図 5 D - 5 E 】

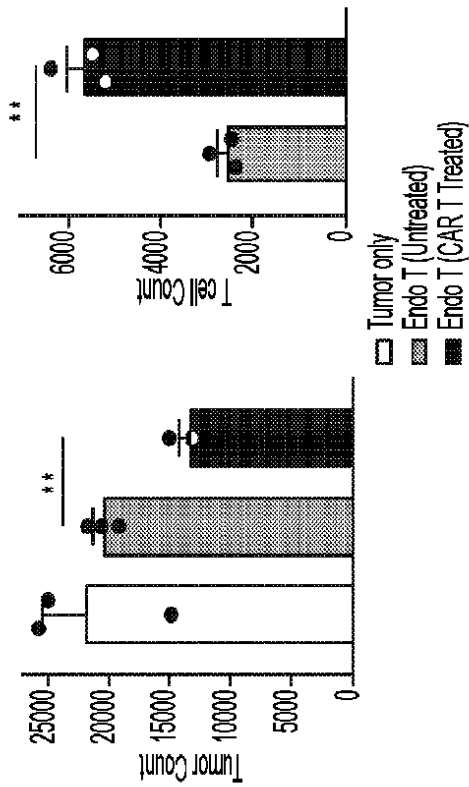


FIG. 5E

FIG. 5D

【 図 5 F 】

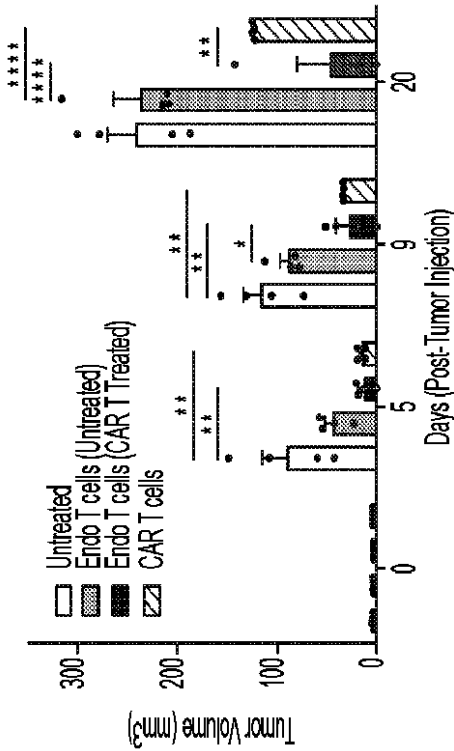


FIG. 5F

【 図 6 A - 6 B 】

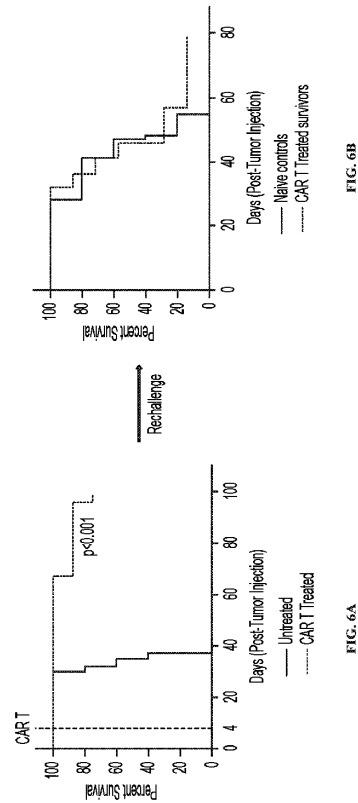


FIG. 6B

FIG. 6A

【 図 7 A 】

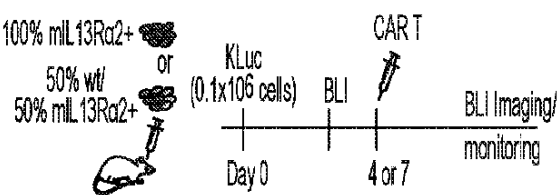


FIG. 7A

10

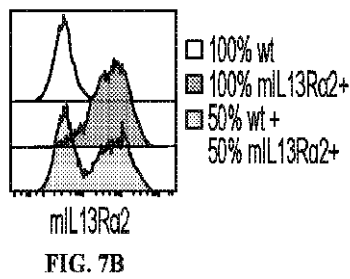
20

30

40

50

【 図 7 B 】



【 図 7 C 】

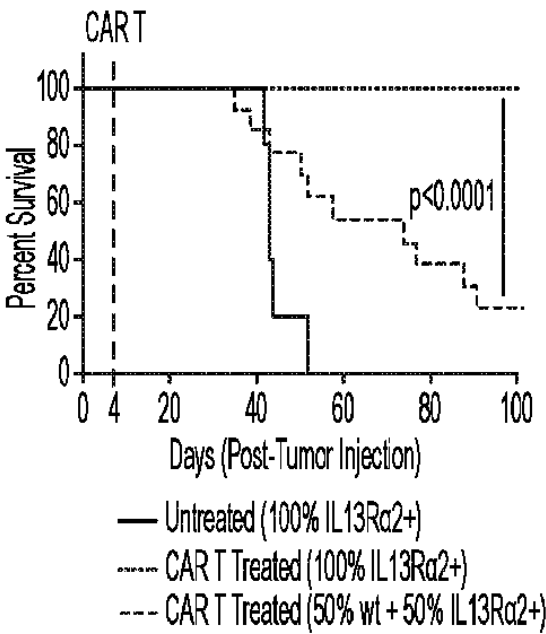


FIG. 7C

【 図 7 D 】

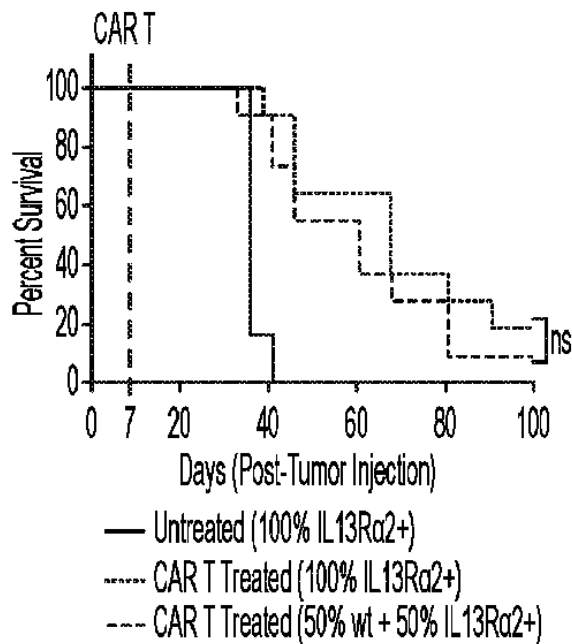


FIG. 7D

【 図 7 E 】

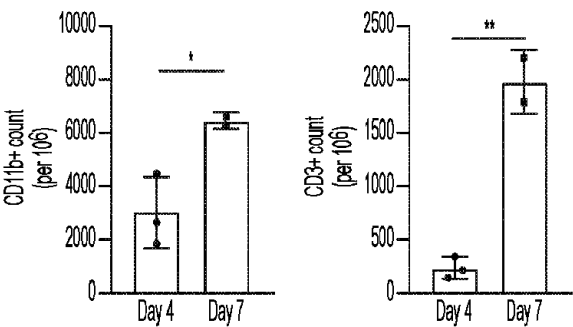


FIG. 7E

10

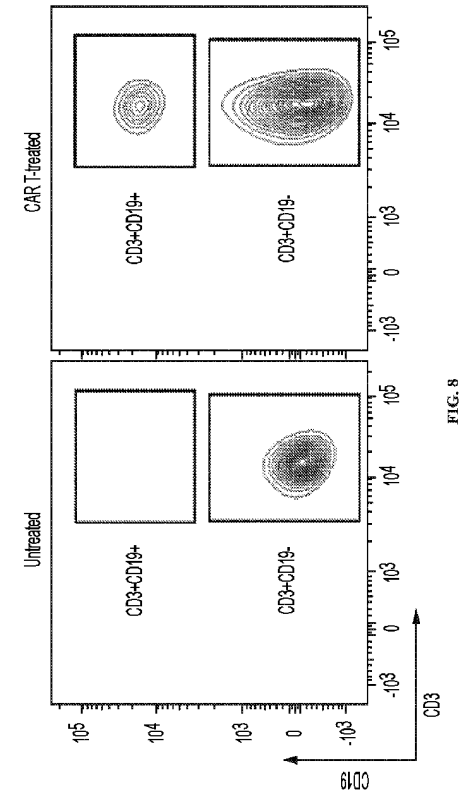
20

30

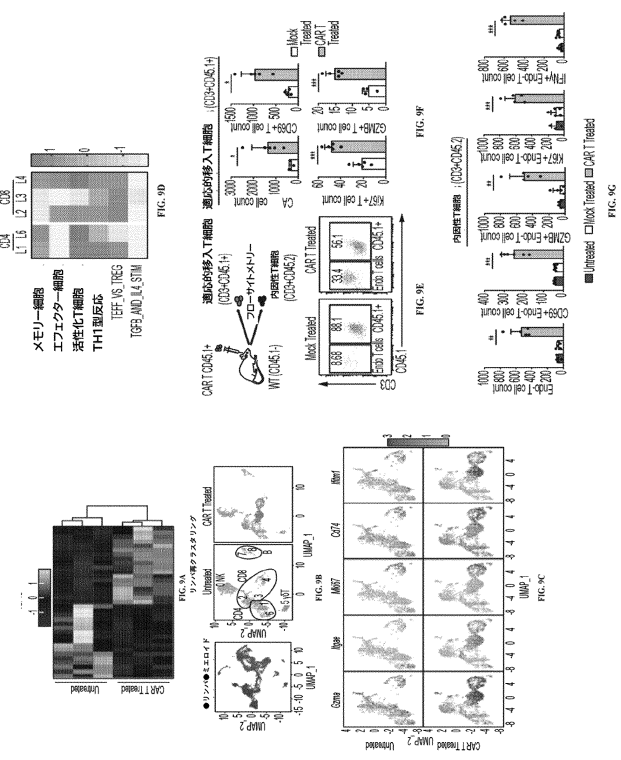
40

50

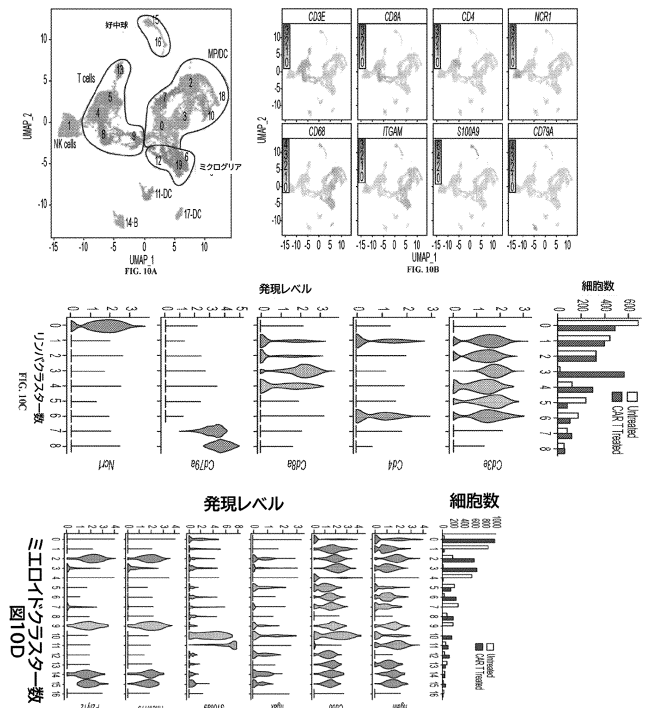
【図 8】



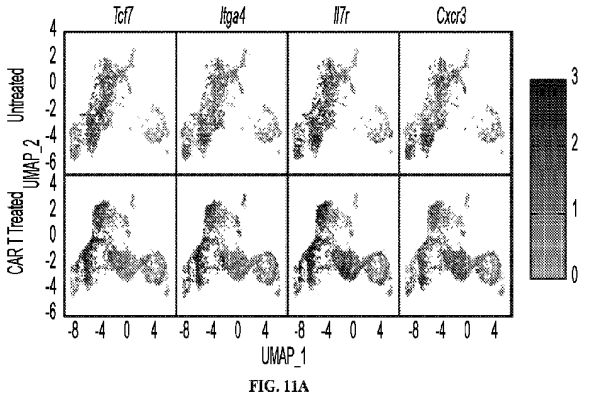
【図 9】



【図 10】



【図 11 A】



10

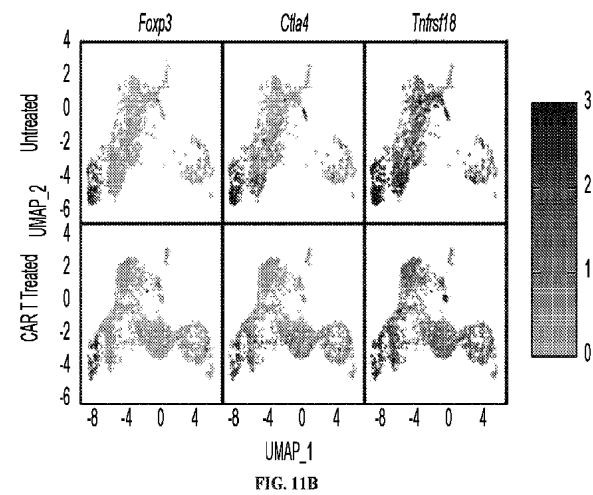
20

30

40

50

【 1 1 B 】



【 1 2 】

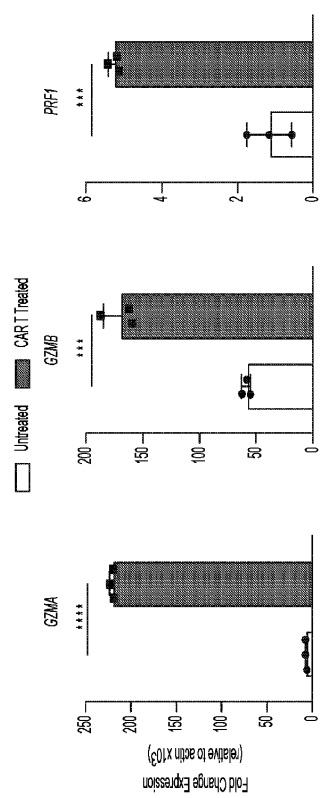
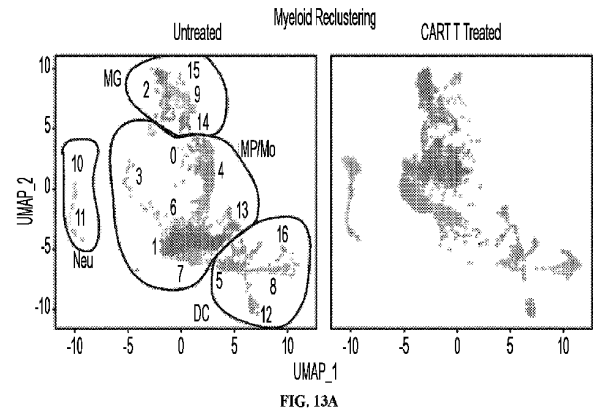


FIG. 12

【 1 3 A 】



【 1 3 B 】

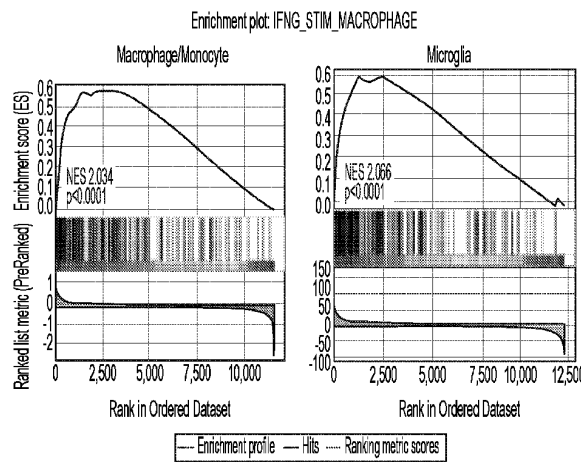


FIG. 13B

10

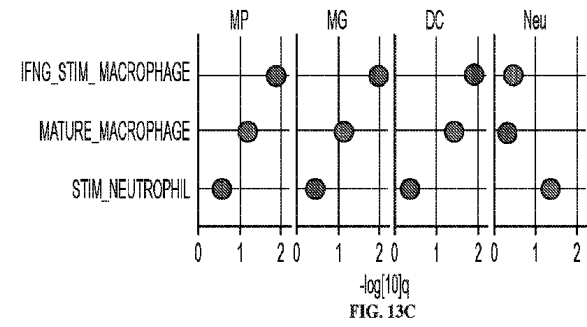
20

30

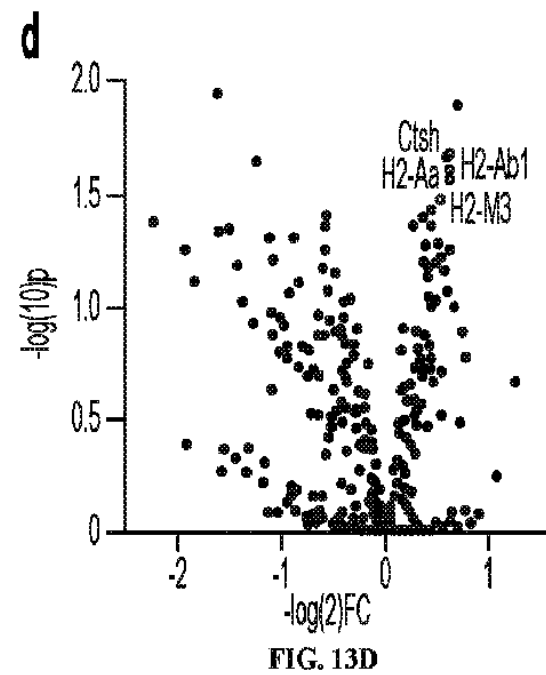
40

50

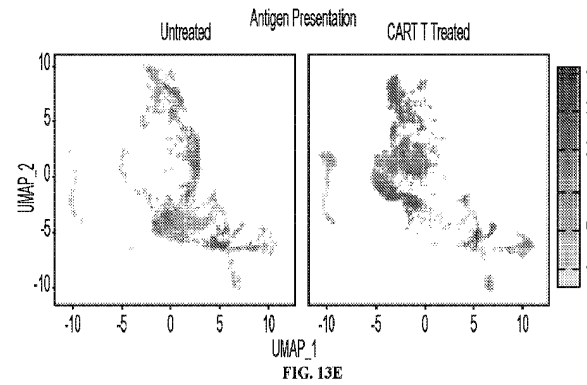
【 図 1 3 C 】



【 図 1 3 D 】



【 図 1 3 E 】



【 図 1 3 F 】

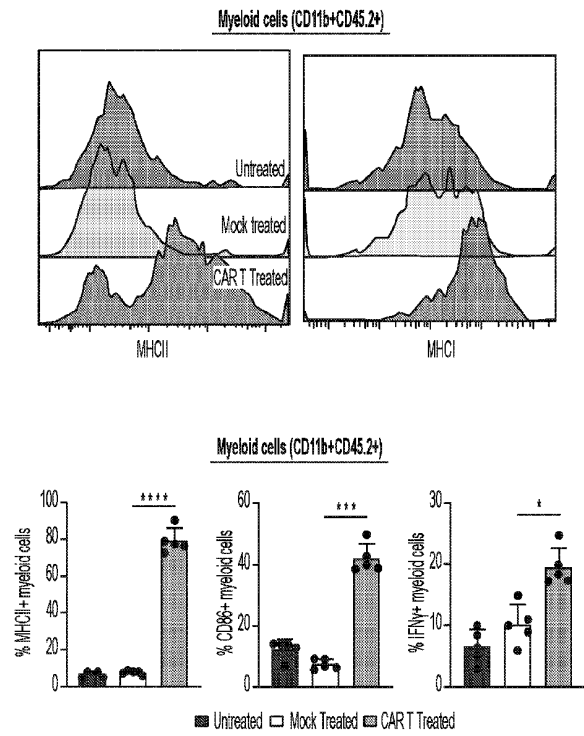
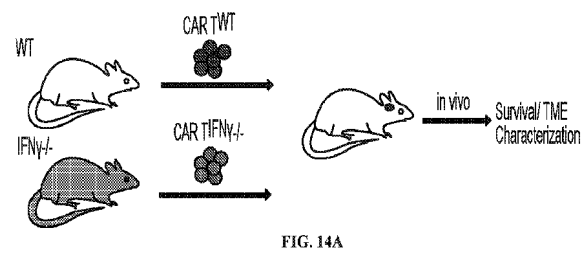
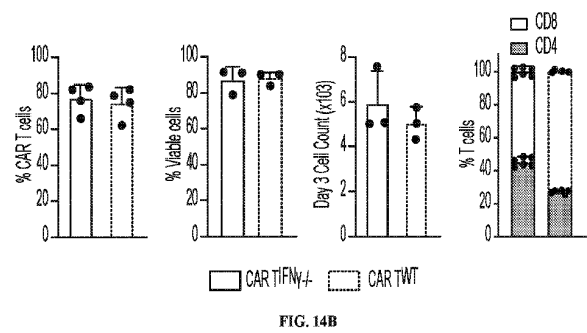


FIG. 13F

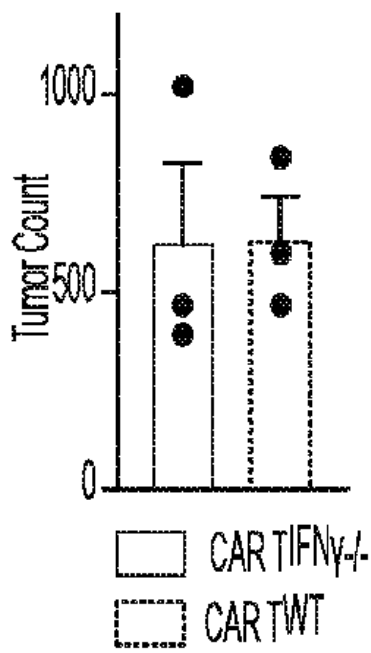
【 図 1 4 A 】



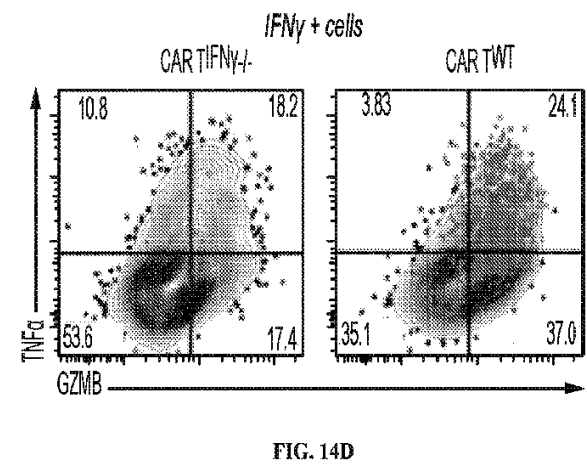
【 図 1 4 B 】



【 図 1 4 C 】



【 図 1 4 D 】



10

20

30

40

50

【 14 E 】

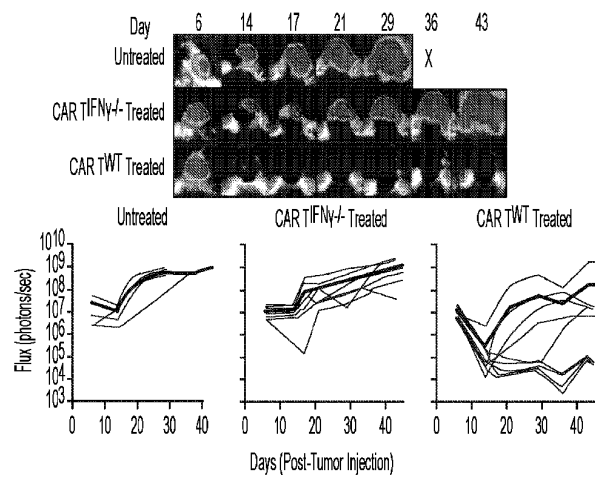


FIG. 14E

【 14 F 】

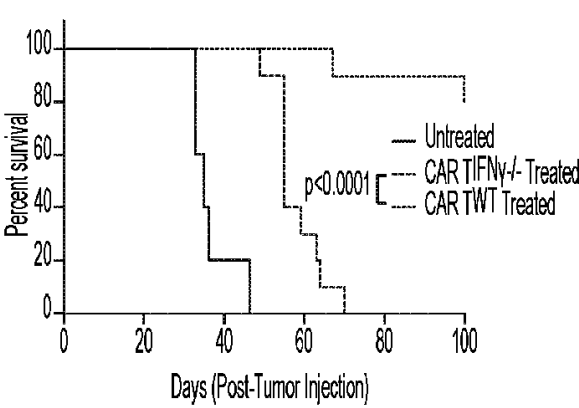


FIG. 14F

【 14 G 】

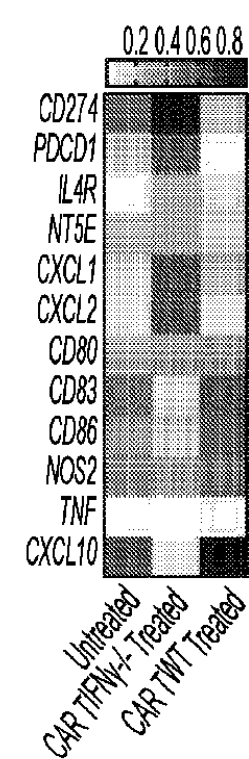


FIG. 14G

【 14 H - 14 I 】

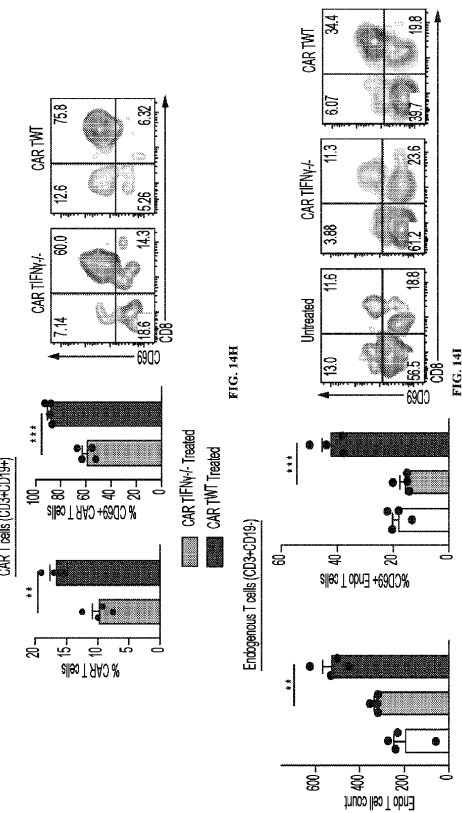


FIG. 14H

FIG. 14I

10

20

30

40

50

【 図 1 4 J 】

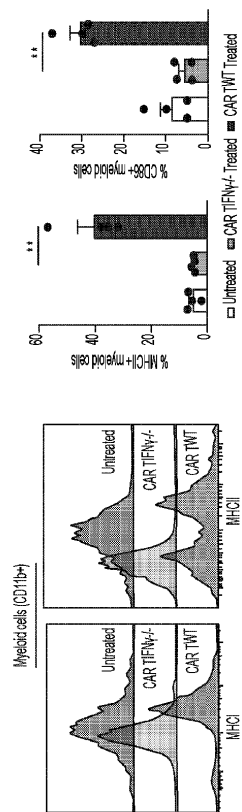


FIG. 14J

【 図 1 5 A 】

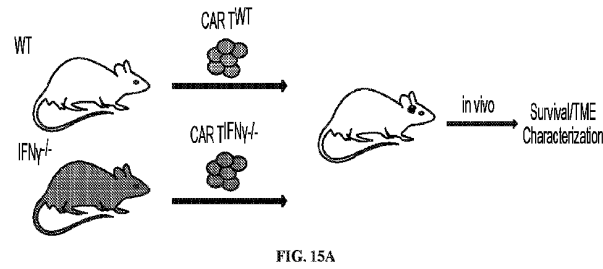


FIG. 15A

【 図 1 5 B 】

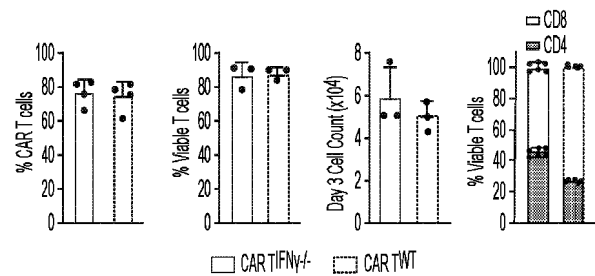


FIG. 15B

【 図 1 5 C 】

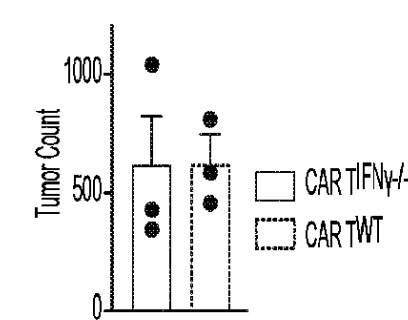


FIG. 15C

10

20

30

40

50

【 図 1 5 D 】

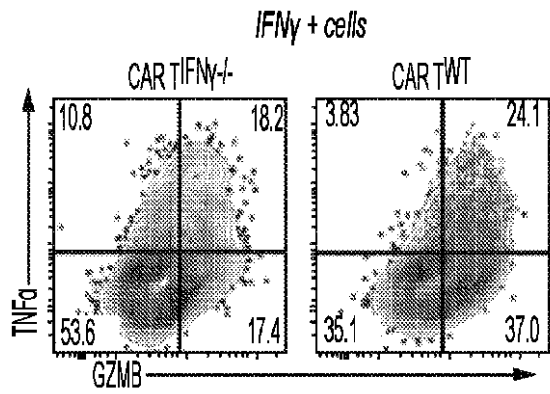


FIG. 15D

【 図 1 5 E 】

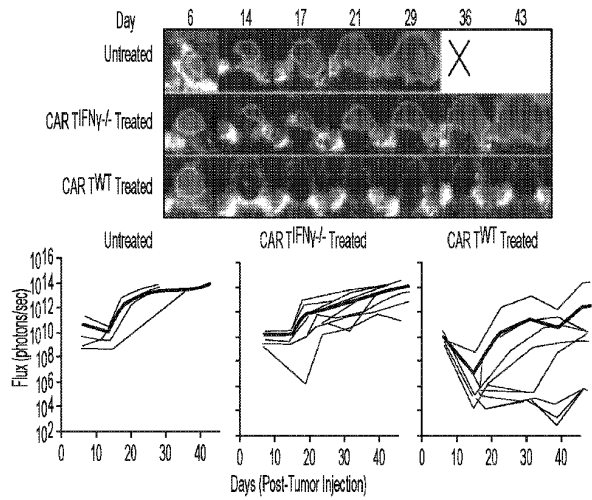


FIG. 15E

【 図 1 5 F 】

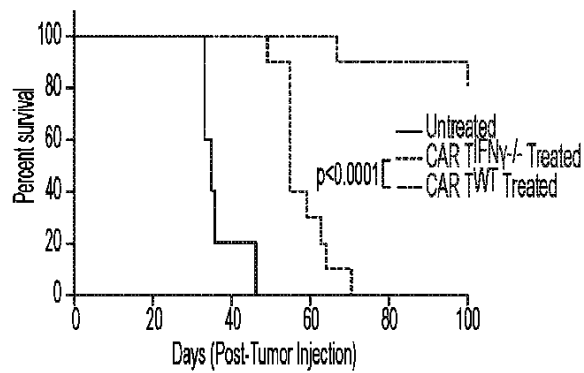


FIG. 15F

【 図 1 5 G 】

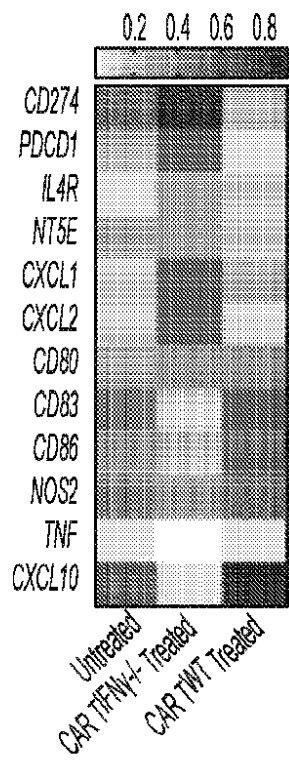


FIG. 15G

10

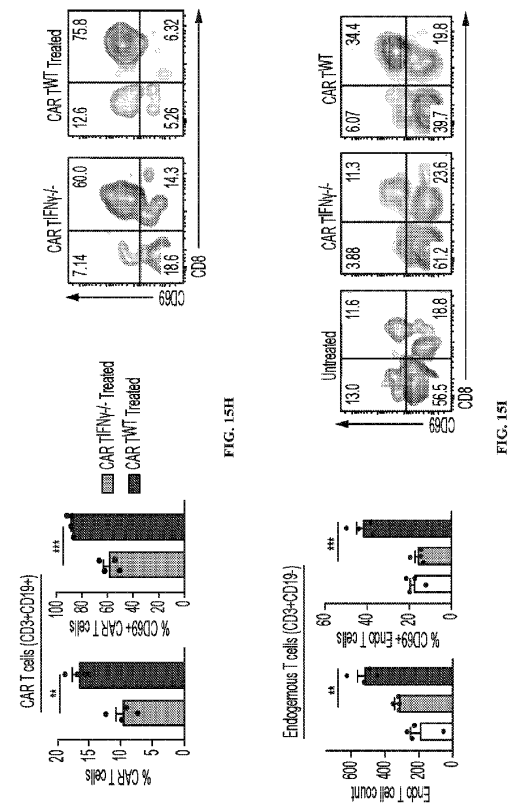
20

30

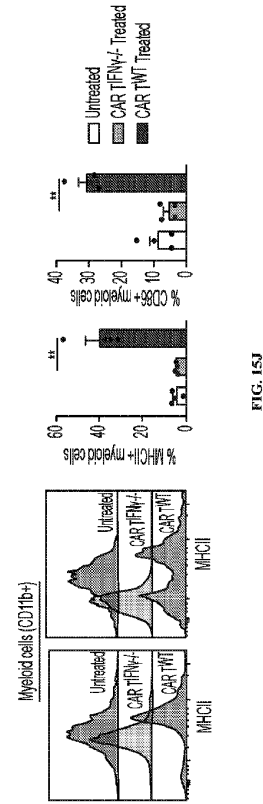
40

50

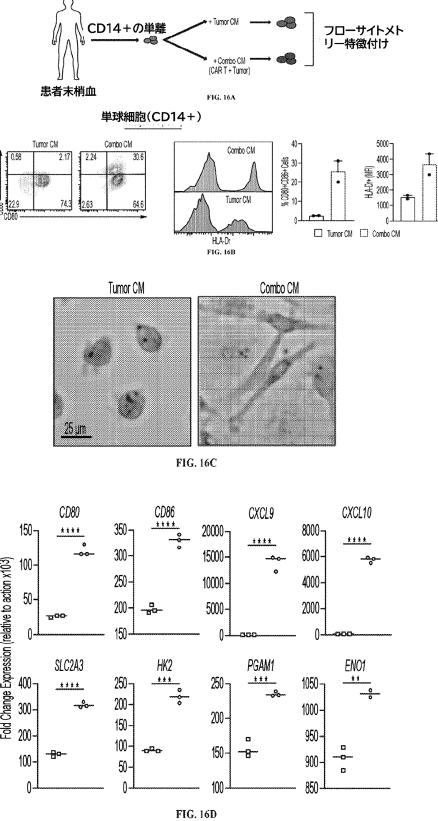
【 図 1 5 H - 1 5 I 】



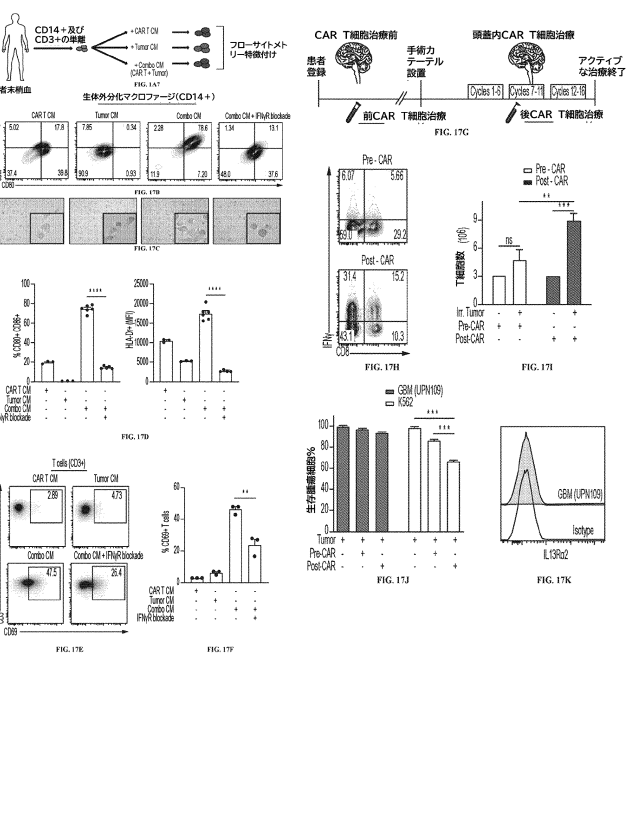
【 図 1 5 J 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



10

20

30

40

50

【 図 1 8 】

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
h-Adn	CCTGCTCTTTGGGATCC	GGATCTTCATGAGGAGTCACTC
h-CD80	AAATCGGATCTACCGGCAAA	GGTCTCTGTGAGTGGGCAATA
h-CD86	CTGCTCATCTATACAGGGTTAC	GGAAAGCTGCTACAGTTCTGTG
h-CXC10	GTGGCAATTCAAGAGGACTTC	TGATGGCTTCGATCTCGATT
h-CXC19	CCAGTAGTGAAGAGGCTGC	AGGGCTTGGGCAAAATTGTT
h-ENO1	GGTTGTGGTAAACCTCTGTC	AAAGCTGTGGGCTTGAAGA
h-GAPDH	CTCATGACACAGTCCATGCC	AGGCATGCGCAGTGAATTC
h-HK2	GAGCCACCTCACTCACTCT	CCAGCAATTCGGCATGTG
h-PGAM1	GTGAGAGAGAGGAGATCCG	CGGTAGACCTCCATAGTGC
h-SLC2A3	GCTGGGATCTGTTCTTGA	GCCTTTGTAGATAGCAGGAG
m-Actn	AGCTCATTTGTGAAGGTGTGG	GTGGGATGGGTTGAGAGG
m-CD15	GGGTACATGAGATCTCTGC	TCTAGGAGAGGTAGGCAAG
m-CD11	AACCGAGTCTATAGCCACAC	CAGAGGCTGCCATCAGAG
m-CD110	TGAGCACATGACCCAA	CTATGGCTCATCTCTACTG
m-CD12	GAGCTCATGACCTCTCAAGG	CTTCCGTGTAGGAGGACG
m-GAPDH	CTCATGACACAGTCCATGCC	AGGCATGCGCAGTGAATTC
m-VOS2	GTCTCAGCCCAACAACAAGA	GTGGAGGGTGTGATCTAC

Gene	Taqman Assay ID
m-Actn	Mm02819880 g1
m-ADORA2	Mm00820175 m1
m-CD206	Mm01329362 m1
m-CD274	Mm03048248 m1
m-CD40	Mm00441881 m1
m-CD74	Mm00668176 m1
m-CD80	Mm00711880 m1
m-CD83	Mm00489888 m1
m-CD86	Mm0044540 m1
m-G2M1	Mm01344482 m1
m-G2M8	Mm00428837 m1
m-FNG	Mm01168134 m1
m-LAR	Mm01275189 m1
m-VOS2	Mm00405812 m1
m-VIS1	Mm00507910 m1
m-POCD1	Mm01286616 m1
m-PF1	Mm00812512 m1
m-TGFB1	Mm01178820 m1
m-TGFB1	Mm00433664 m1
m-TNF	Mm00443288 m1

FIG. 18

【 図 1 9 】

Idiotyp	Clone	Company
h-CD14	MpP9	BD Biosciences
h-CD3	UCHT1	BD Biosciences
h-CD89	L78	BD Biosciences
h-CD8	SK1	BD Biosciences
h-CD80	L307.4	BD Biosciences
h-CD86	2331 (FUN-1)	BD Biosciences
h-IL4dr	LN3	eBioscience
h-IFN	B27	BD Biosciences
h-IL13Ra2	SHM38	BioLegend
m-CD11b	M170	eBioscience
m-CD11c	N418	eBioscience
m-CD19	1D3	BD Biosciences
m-CD3	17A2	BioLegend
m-CD4	RM4-5	eBioscience
m-CD45	30-F11	BD Biosciences
m-CD45.1	A20	BioLegend
m-CD45Ra	14.8	BD Biosciences
m-CD62L	MEL-14	eBioscience
m-CD69	H1.2F3	eBioscience
m-CD8	53-6.7	BioLegend
m-CD86	PC3	BioLegend
Donkey anti-Goat IgG	polyclonal	R&D Systems
m-G2M8	NG2B	eBioscience
m-IFN	XMG1.2	BD Biosciences
m-IL13Ra2	polyclonal	R&D Systems
m-Ki67	16A8	BioLegend
m-MHC1	AF6-88.5	BioLegend
m-MHCII	NIMR-4	eBioscience
m-Thy1.1	OX-7	BioLegend
m-TNFa	MP6-KT22	eBioscience

FIG. 19

【 図 2 0 】

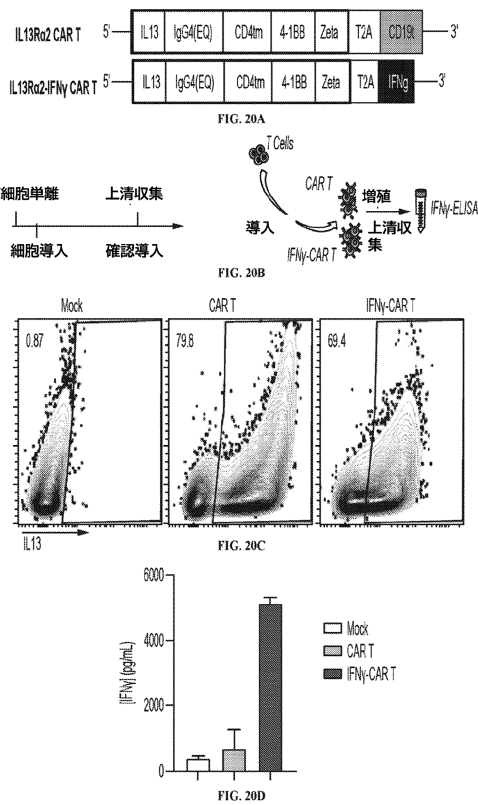


FIG. 20D

【 図 2 1 A 】

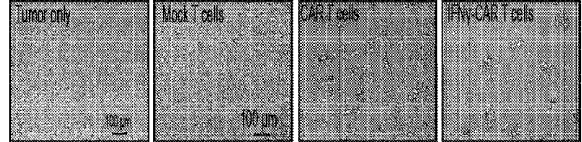
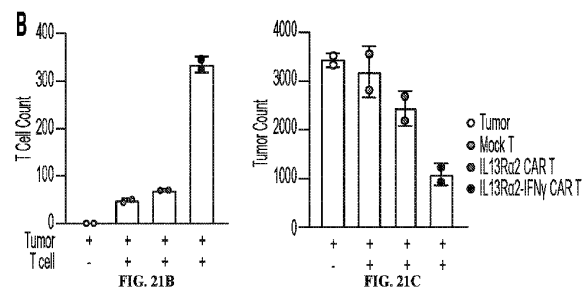
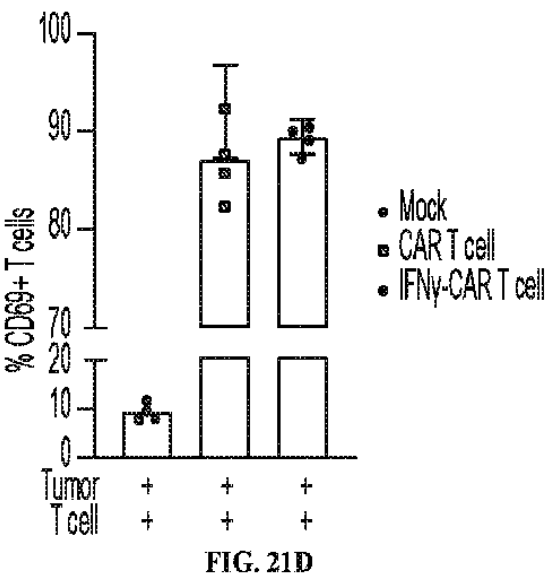


FIG. 21A

【 図 2 1 B - 2 1 C 】

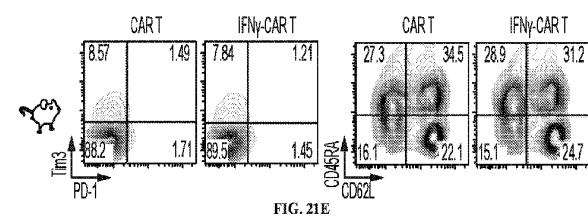


【 図 2 1 D 】



10

【 図 2 1 E 】



【 図 2 2 A 】

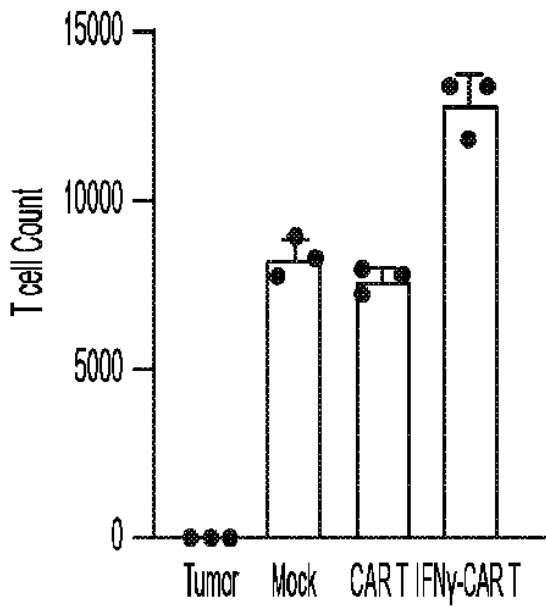


FIG. 22A

20

30

40

50

【 図 2 2 B 】

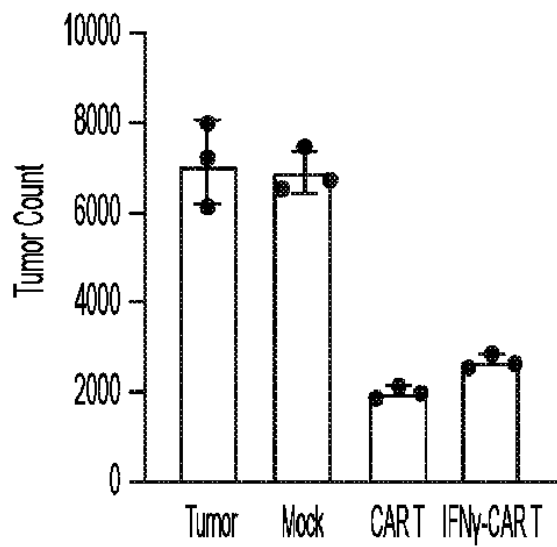


FIG. 22B

【 図 2 2 C 】

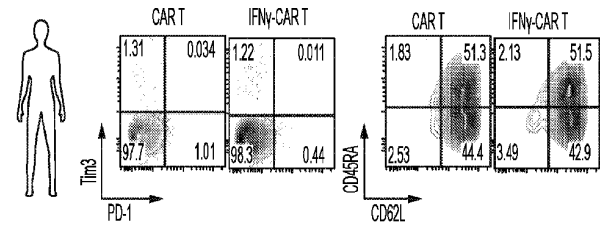


FIG. 22C

10

20

【 図 2 3 】

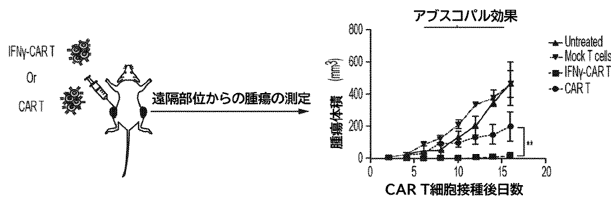


FIG. 23

【 図 2 4 】

IL13 variant/IgG4 (EQ) spacer/CD28TM/41BB/GGG/CD3zeta

GPVPPSTALRYLIEELVNITQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSAGSAIEKTQRMISGFCPHKVSAGOF
SSLHVVDTKIEVAQFVKOLLHLKLFREGFRNESKYGPCCPCPAPEFEGGSPVLEFPKPKDILMISRTPEVTCVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHOAKTKPREEQFQSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSSEKISKAKGQPRE
POVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVE
SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLKRFVWLVVVGGLACYSLLVFAHFVWVRRGRKKLLYIFKQPEMRPVQITQEDDGC
SCRPEFEFGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQGQGNQLYNELNLGRREYDVLQKRRGRDPEMGGKPRKKNPQEGLYN
ELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHGDLGYGLSTATKDTYDALHMQALPPR

IL13 variant/IgG4 (EQ) spacer/CD4TM/41BB/GGG/CD3zeta

GPVPPSTALRYLIEELVNITQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSAGSAIEKTQRMISGFCPHKVSAGOF
SSLHVVDTKIEVAQFVKOLLHLKLFREGFRNESKYGPCCPCPAPEFEGGSPVLEFPKPKDILMISRTPEVTCVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHOAKTKPREEQFQSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSSEKISKAKGQPRE
POVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVE
SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLKRFVWLVVVGGLACYSLLVFAHFVWVRRGRKKLLYIFKQPEMRPVQITQEDDGC
SCRPEFEFGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQGQGNQLYNELNLGRREYDVLQKRRGRDPEMGGKPRKKNPQEGLYN
ELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHGDLGYGLSTATKDTYDALHMQALPPR

IL13 variant/IgG4 (EQ) spacer/CD8TM/41BB/GGG/CD3zeta

GPVPPSTALRYLIEELVNITQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSAGSAIEKTQRMISGFCPHKVSAGOF
SSLHVVDTKIEVAQFVKOLLHLKLFREGFRNESKYGPCCPCPAPEFEGGSPVLEFPKPKDILMISRTPEVTCVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHOAKTKPREEQFQSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSSEKISKAKGQPRE
POVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVE
SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLKRFVWLVVVGGLACYSLLVFAHFVWVRRGRKKLLYIFKQPEMRPVQITQEDDGC
SCRPEFEFGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQGQGNQLYNELNLGRREYDVLQKRRGRDPEMGGKPRKKNPQEGLYN
ELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHGDLGYGLSTATKDTYDALHMQALPPR

FIG. 24

40

50

【 図 2 5 】



FIG. 25

【 図 2 7 A 】

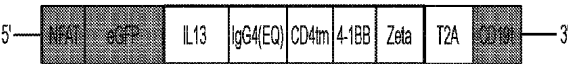
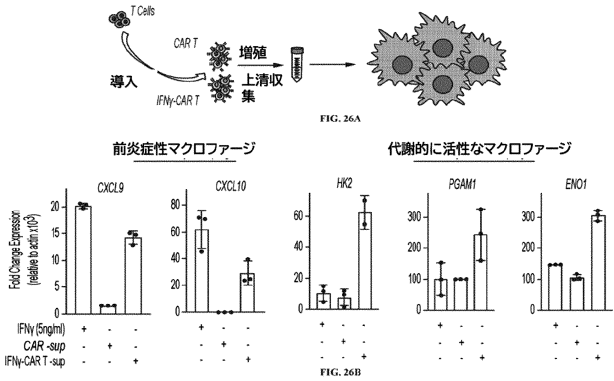


FIG. 27A

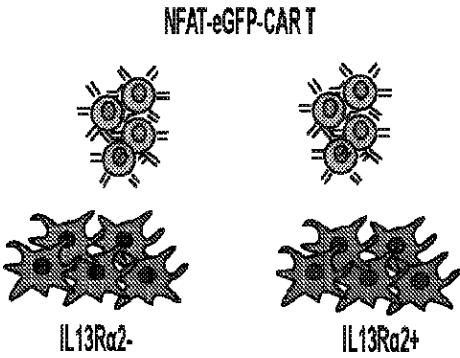
【 図 2 6 】



10

20

【 図 2 7 B 】



30

40

50

【 2 7 C 】

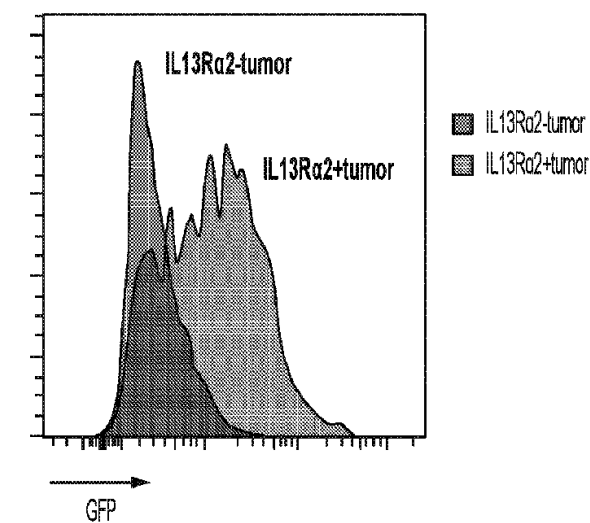


FIG. 27C

【 2 8 A 】

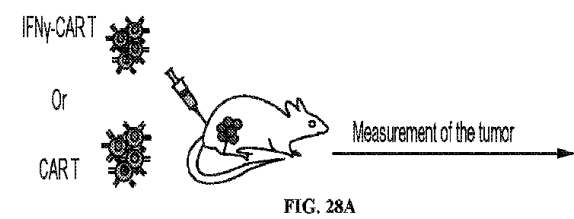


FIG. 28A

10

【 2 8 B 】

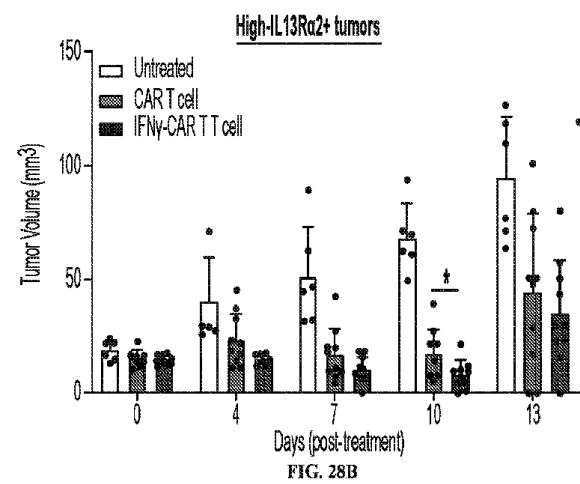


FIG. 28B

【 2 8 C 】

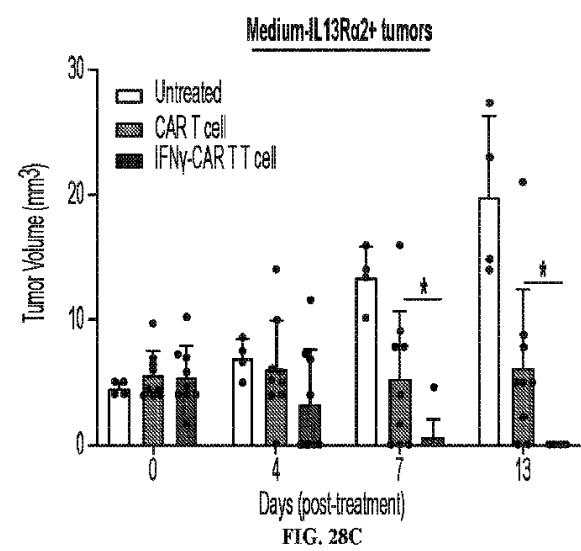


FIG. 28C

20

30

40

50

【 図 2 9 】

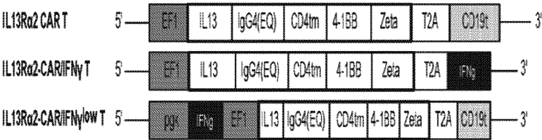


FIG. 29A



FIG. 29B

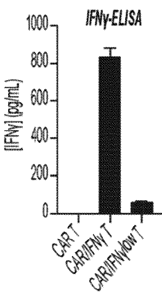


FIG. 29C

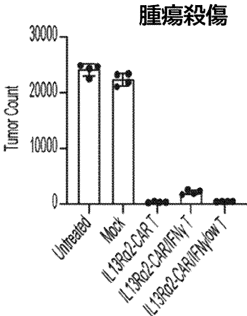


FIG. 29D

【 図 3 0 B 】

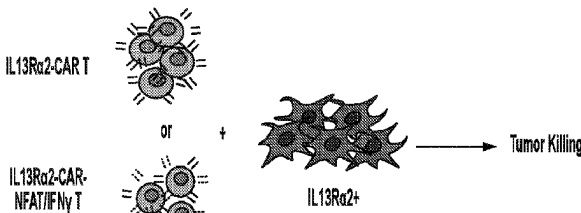


FIG. 30B

【 図 3 0 A 】



FIG. 30A

【 図 3 0 C 】

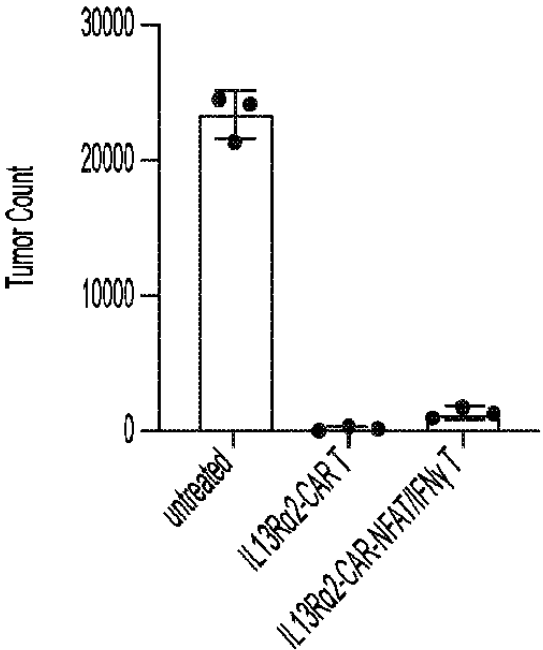


FIG. 30C

【 図 3 1 】

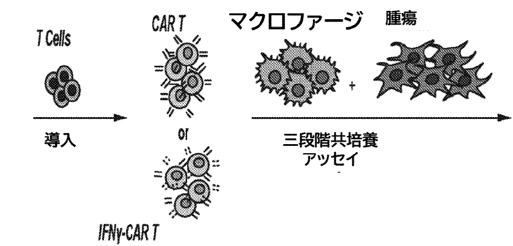


FIG. 31A

10

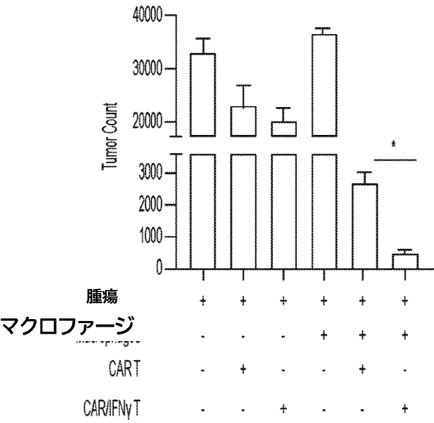


FIG. 31B

20

【 配 列 表 】

2024514308000001.app

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年12月6日(2023.12.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本出願は、2021年3月30日に出願された米国仮出願第63/168,210号の利益を主張する。その内容は全体として、参照により本明細書に援用される。

本開示は、キメラ抗原受容体(CAR)組換え免疫細胞、その製剤化方法、及びその使用方法に関する。

【0002】

配列表：本出願には、ASCII形式で電子的に提出された配列表が含まれており、その全体が参照により本出願に組み込まれる。2022年6月10日に作成された当該ASCIIコピーは、40056-0070WO1-SL.txtと命名され、サイズは84,079バイトである。

【背景技術】

20

【0003】

膠芽腫(GBM)は、治療選択肢が極めて限定された最も致命的ながんの1つである(非特許文献1~3)。積極的な標準治療にもかかわらず、腫瘍再発はほぼ避けられず、ほぼ致死的であり、ほとんどの患者は診断後2年以上生存することはない。免疫療法の進歩により、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞の養子移入を含む、GBMにおける抗腫瘍免疫応答を誘発するための治療戦略を開発するための試みが続けられている。GBMにおけるCAR T細胞を評価する臨床研究により、選択された患者における安全性及び生物活性の初期の証拠が実証されたが、それにもかかわらず、応答は制限されている。GBM等の固形腫瘍に対する効率の良いCAR T細胞療法のための課題は、多因子性である。腫瘍の不均一性及び細胞の可塑性により、抗原喪失腫瘍変異体が増殖し、治療が失敗する。GBM腫瘍における腫瘍微小環境は、骨髄が豊富であり、T細胞集団が少ないため、CAR T細胞に特異的な課題がある。

30

【0004】

IL13R α 2-CAR T療法は、腫瘍細胞によるIL13R α 2の不均一な発現にもかかわらず、GBMの治療においていくらか有望であることが示されている(非特許文献4)。応答は、CNS炎症性サイトカインの増加及び内因性免疫細胞の浸潤と関連していた(非特許文献4)。この観察と一致して、HER2-CAR T細胞治療後の免疫モニタリングの最近の縦断的分析により、患者の好ましい応答に寄与している可能性がある内因性免疫反応性を示す証拠が示された(非特許文献5)。

IFN γ 等のCAR T細胞によって分泌される炎症促進性サイトカインは、GBM TMEにおける免疫浸潤物の活性化及びプログラミングにおいて重要な役割を果たし得る。IFN γ は、マクロファージ(非特許文献6)及びミクログリア(非特許文献7)を活性化し、細胞傷害性T細胞を動員及び活性化し、CD4+T細胞をTh1エフェクター細胞に極性化し、腫瘍促進性Tregの発生及びその機能を損なわせることができる(非特許文献8~10)。IFNはさらに、腫瘍反応性T細胞の活性化及びプライミングを促進するための主要なシグナル(非特許文献12)として作用することができる(非特許文献11)。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

50

【非特許文献1】McGranahan T, Therkelsen KE, Ahmad S, Nagpal S. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. Current treatment options in oncology 2019, 20(3): 24.

【非特許文献2】Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA: a cancer journal for clinicians 2018, 68(1): 7-30.

【非特許文献3】Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2017, 35(21): 2402-2409.

【非特許文献4】Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. The New England journal of medicine 2016, 375(26): 2561-2569.

【非特許文献5】Hegde M, Joseph SK, Pashankar F, De Renzo C, Sanber K, Navai S, et al. Tumor response and endogenous immune reactivity after administration of HER2 CAR T cells in a child with metastatic rhabdomyosarcoma. Nature communications 2020, 11(1): 3549.

【非特許文献6】Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, et al. Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. International journal of cancer 2009, 125(2): 367-373.

【非特許文献7】Rock RB, Hu S, Deshpande A, Munir S, May BJ, Baker CA, et al. Transcriptional response of human microglial cells to interferon-gamma. Genes and immunity 2005, 6(8): 712-719.

【非特許文献8】Castro F, Cardoso AP, Goncalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. Frontiers in immunology 2018, 9: 847.

【非特許文献9】Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon-gamma derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. Cell death & disease 2017, 8(6): e2836.

【非特許文献10】Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting. Nature reviews Immunology 2006, 6(11): 836-848.

10

20

30

40

50

【非特許文献11】Curtis J M, Mescher M F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. Current opinion in immunology 2010, 22(3): 333-340.

【非特許文献12】O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. Sci Transl Med 2017, 9(399).

【発明の概要】

【0006】

本明細書で開示されるのは、腫瘍抗原を標的とするCAR及び核酸分子によりコードされるヒトIFN γ （「組換えヒトIFN γ 」）をともに発現する免疫系細胞、例えば、T細胞又はNK細胞、例えば、CAR及びヒトIFN γ をコードする核酸分子がある免疫細胞である。いかなる理論にも束縛されるものではないが、共発現は、免疫細胞の活性化、免疫細胞の増殖、及び腫瘍細胞を認識する内因性細胞による腫瘍細胞死滅のうちの1つ以上を高めるようである。CARは、腫瘍抗原を標的とするscFv（例えば、CD19を標的とするscFv）又は腫瘍細胞上の受容体に結合するリガンド（例えば、IL-13又はその変異体）である標的化ドメインを含んでよい。したがって、細胞は、CAR及びヒトIFN γ をコードする核酸分子を保有することができる。CAR及びヒトIFN γ の発現は、同じ発現制御配列の制御下にあっても、異なる発現制御配列の制御下にあってもよい。細胞は、CAR及びヒトインターフェロン γ を含む単一アミノ酸配列をコードする核酸分子を保有することができる。例えば、CARのアミノ酸配列の後に、リボソームスキップ配列、次いでヒトIFN γ を含むアミノ酸配列が続いてよい。アミノ酸配列は、タンパク質の分泌のための少なくとも1つのシグナル配列（例えば、CARの分泌のためのシグナル配列及びヒトIFN γ の発現のためのシグナル配列）を含んでよい。ある実施形態では、本開示の核酸は、非内因性核酸であってよい。

【0007】

CAR及びインターフェロンを発現する免疫細胞は、CARの標的を発現するがん細胞を標的とし、死滅させることができる。さらに、それらは、例えば、腫瘍微小環境における自然免疫サブセット及び適応免疫サブセットを活性化することによって、CARの標的を発現しないがん細胞の死滅を活性化することができる。このように、それらは、CARの標的を発現するがん細胞及びCARの標的を発現しないか又はCARの標的の発現が非常に低いがん細胞をともに含む腫瘍の治療に有用である。

ヒトIFN γ は、以下のアミノ酸配列を含んでよい。

【0008】

【化1】

QDPYVKEAENLKKEYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNV
KFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFRGRRASQ（配列番号1）

ヒトIFN γ アミノ酸配列前に、真核生物細胞（例えば、ヒト細胞）からのヒトインターフェロン γ の分泌を指向するシグナル配列が付加されてよい。したがって、ヒトインターフェロン γ 前駆体を用いることができる（シグナル配列に下線を付す）。

【0009】

【化 2】

MKYTSYILAFQLCIVLGS LGCYCQDPYVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFK
NFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFR
GRRASQ (配列番号29)

CAR は、腫瘍抗原を標的とすることができ、その非限定的な例としては、
適する IL - 13 CAR は、以下のアミノ酸配列を含むヒト IL - 13 の変異体を含む：
【 0 0 1 0 】

10

【化 3】

GPGPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAG
QFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLKKLFREGREFN (配列番号30)

野生型ヒト IL 13 の配列（シグナル配列に下線を付す）：

【 0 0 1 1 】

【化 4】

MHPLLNP LLLALGLMALLTTVIALTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAA
LES LINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLKKLFREGREFN (配列番号31)

20

IL - 13 CAR は、例えば、配列番号 30；スパーサー（例えば、配列番号 2 ～ 1
2 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む）；膜貫通ドメイン（例えば、配列番号 13
～ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む）；共刺激ドメイン（配列番号 22 ～ 2
5 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む）；場合によっては、アミノ酸残基が 3 ～ 1
5 個あるリンカー（例えば、GGG）；及び CD3 ゼータ細胞質ドメイン（配列番号 21
又は配列番号 50 ～ 56 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むその変異体）を含む変
異体 IL 13 を含んでよい。有用な CAR は、配列番号 70 ～ 76 のいずれかで表される
アミノ酸配列を含むことができる。

30

【 0 0 1 2 】

【化 5】

GPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSG
CSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLKKLFREGREFN
FNE SKYGP PCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPDILMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLGKMA LIVLGGVAGLLLFIGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

50

配列番号 7 6

本明細書には、キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、キメラ抗原受容体が、配列番号 3 0 で表されるアミノ酸配列を含む標的化ドメイン；スパーサー、膜貫通ドメイン；共刺激ドメイン；及び CD 3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、核酸分子が記載される。ある実施形態では、膜貫通ドメインは、CD 4 膜貫通ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体、CD 8 膜貫通ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体、CD 2 8 膜貫通ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体から選択され；IL 1 3 受容体標的化ドメインは、最大 3 個の単一のアミノ酸が置換された配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含むか、又はからなる（ある場合、第 1 3 位の Y は置換されない）；共刺激ドメインは、4 1 BB 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体；CD 2 8 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体；CD 2 8 g g 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体から選択され、ここで共刺激ドメインは、4 1 BB 共刺激ドメインであり；4 1 BB 共刺激ドメインは、配列番号 2 4 で表されるアミノ酸配列又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体を含み；CD 3 ζ シグナル伝達ドメインは、配列番号 2 1 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 5 0 ~ 5 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むその変異体を含み；アミノ酸残基が 3 ~ 1 5 個あるリンカーは、共刺激ドメインと CD 3 ζ シグナル伝達ドメイン又はその変異体との間に位置し；CAR は、配列番号 7 0 ~ 7 6 で表されるアミノ酸配列又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体を含み；CAR は、配列番号 7 0 ~ 7 6 のいずれかと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含み；CAR は、配列番号 7 0 ~ 7 6 のいずれかと比較して 5、4、3、2、又は 1 個以下の単一アミノ酸が置換され及び/又は欠失しているアミノ酸配列を含む。また、上記の核酸分子のいずれかを含む発現ベクターも開示される。また、上記の核酸分子のいずれかを含むウイルスベクターも開示される。

10

20

30

40

50

【0013】

CAR は、いかなるがん細胞抗原、例えば、CD 1 9、MUC 1 6、MUC 1、tMUC 1、CAIX、CEA、CD 2 0、CD 2 2、CD 3 0、HER - 2、MAGEA 3、p 5 3、PSCA、BCMA、CD 1 2 3、CD 4 4 V 6、インテグリン B 7、ICAM - 1、CD 7 0、CEA、GD 2、PSMA、B 7 H 3、CD 3 3、Flt 3、CLL 1、葉酸受容体、EGFR、CD 7、EGFRvIII、グリピカン 3、CD 5、ROR 1、CS 1、AFP、CD 1 3 3、及び TAG - 7 2 を標的とする scFv を含んでよい。CAR は、リガンド、例えば、IL - 1 3 又はその変異体、クロロトキシニン又はその変異体等を含むことができる。

したがって、共発現に有用な CAR としては、国際公開公報 WO 2 0 1 6 / 0 4 4 8 1 1 号、国際公開公報 WO 2 0 1 7 / 0 7 9 6 9 4 号、国際公開公報 WO 2 0 1 7 / 0 6 6 4 8 1 号、及び国際公開公報 WO 2 0 1 7 / 0 6 2 6 2 8 号に記載されているものがあげられる。

【0014】

上記核酸分子のいずれかを含有するヒト T 細胞、NK 細胞、骨髄細胞、γ デルタ T 細胞、又は i P S C 由来エフェクター細胞の集団も開示される。上記発現ベクター又はウイルスベクターのいずれかを含有するヒト T 細胞の集団も開示される。ある実施形態では、ヒト T 細胞の集団は、セントラルメモリー T 細胞、ナイーブメモリー T 細胞、p a n T 細胞、又は CD 2 5 + 細胞及び CD 1 4 + 細胞が実質的に枯渇した P B M C を含む。

【0015】

本明細書では、がん（例えば、脳がん（神経膠芽腫）、膵臓がん、黒色腫、神経芽細胞腫、肝臓がん、肉腫、結腸直腸がん、胃がん、卵巣がん、卵管がん、甲状腺がん、膀胱がん、子宮頸がん、消化器系がん、頭頸部がん、骨肉腫、腎細胞がん、前立腺がん、乳がん又は肺がん）に罹患している患者を治療する方法であって、本明細書で開示される核酸を保有する自己又は同種異系ヒト T 細胞の集団を投与することを含む、方法も開示される。

ある実施形態では、細胞は、局所的又は全身的に投与され、単回又は反復投薬によって投与される。

本明細書ではまた、CAR T細胞を調製する方法であって、自己又は同種異系ヒトT細胞の集団を提供すること、及び本明細書で開示される核酸分子を含むベクターによってT細胞を形質導入すること、を含む方法が開示される。

【0016】

また、CAR及びIFN γ を発現するベクター又は核酸を保有するT細胞も開示される。ある実施形態では、形質導入されたヒトT細胞の少なくとも20%、30%、又は40%がセントラルメモリーT細胞であり、形質導入されたヒトT細胞の少なくとも30%がCD4+及びCD62L+又はCD8+及びCD62L+である。ある実施形態では、ヒトT細胞の集団は、配列番号30若しくは70~76から選択されるアミノ酸配列又はアミノ酸が1~5個(例えば、1又は2個)改変(例えば、置換)されたその変異体を含むキメラ抗原受容体を発現するベクターを含む；T細胞の集団は、エフェクターT細胞、エフェクターメモリー細胞、セントラルメモリーT細胞、幹セントラルメモリー細胞及びナイーブT細胞のうちの1つ以上を含んでよく；ヒトT細胞の集団は、セントラルメモリーT細胞(TCM細胞)を含み、例えば、当該細胞の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%がTCM細胞であるか、又はT細胞の集団は、セントラルメモリーT細胞、ナイーブT細胞及び幹セントラルメモリー細胞(TCM/SCM/N細胞)の組み合わせを含み、例えば、細胞の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%がTCM/SCM/N細胞である。ある実施形態では、T細胞の集団は、エフェクターT細胞及びエフェクターメモリー細胞を含む。ある実施形態では、T細胞の集団は、CD4+細胞及びCD8+細胞をととも含む(例えば、CD3+T細胞の少なくとも20%がCD4+であり、CD3+T細胞の少なくとも3%がCD8+であり、少なくとも70、80又は90%がCD4+又はCD8+のいずれかであり；細胞CD3+細胞の少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%がCD4+であり、CD3+細胞の少なくとも4%、5%、8%、10%、20%がCD8+細胞である)。ある実施形態では、ヒトT細胞の集団は、患者に対して自己由来である。ある実施形態では、ヒトT細胞の集団は、患者に対して同種異系である。ある実施形態では、CAR及びIFN γ を発現するT細胞は、とりわけ、IL13R α 2-IFN γ CAR T細胞、IL13R α 2-CAR/IFN γ T細胞、及びIL13CAR T-IFN γ 細胞なる記載と互換可能である。

【0017】

ある実施形態では、スペーサードメインは、IgG4(EQ)スペーサードメイン、IgG4(HL-CH3)スペーサードメイン及びIgG4(CH3)スペーサードメインからなる群より選択され；スペーサードメインは配列番号10を含み；スペーサードメインは配列番号9を含み；スペーサードメインは配列番号12を含み；膜貫通ドメインは、CD4膜貫通ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、及びCD28膜貫通ドメインからなる群より選択され；共刺激ドメインは、CD28共刺激ドメイン、及びCD28gg共刺激ドメイン、及び41-BB共刺激ドメインから選択される。

【0018】

本明細書では、さらに、キメラ抗原受容体(CAR)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、当該キメラ抗原受容体が、配列番号30の109、110、111、112、113個の連続アミノ酸又は配列番号30の全体に1、2、3、4若しくは5個の単一アミノ酸が変化していることを含む変異体IL13ドメインを含むアミノ酸配列を含む標的化ドメイン；スペーサードメイン；膜貫通ドメイン；共刺激ドメイン及びCD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、核酸分子も開示される。

ある実施形態では、スペーサードメインは、配列番号2~12のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、共刺激ドメインは、配列番号22~25のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、CD3ゼータドメイン又はその変異体である。ある実施形態では、CARは、CD28共刺激ドメイン及び変異体CD3ゼータドメインを含む。

本明細書ではまた、当該核酸分子を含むベクター又は発現ベクター；本明細書で開示される核酸分子を保有するヒトT細胞又はNKの集団も開示される。ある実施形態では、ヒトT細胞の集団は、セントラルメモリーT細胞、ナイーブメモリーT細胞、p a n T細胞、又はCD25+細胞及びCD14+細胞が実質的に枯渇したPBMCを含む。

【0019】

本明細書ではまた、神経膠芽腫、膵管腺がん、黒色腫、卵巣がん、腎細胞がん、乳がん又は肺がんに罹患している患者を治療する方法であって、本明細書で開示される核酸分子を保有する自己又は同種異系細胞の集団を投与することを含む方法も開示される。ある実施形態では、ある実施形態では、細胞は、局所的、全身的又は脳室内に投与され、単回又は反復投薬によって投与される。

10

本明細書ではまた、CAR T細胞を調製する方法であって、自己又は同種異系ヒトT細胞又はNKの集団を提供すること、及び本明細書で開示される核酸分子を含むベクターによって細胞を形質導入すること、を含む方法も開示される。

本明細書ではまた、本明細書で開示される核酸によってコードされるポリペプチドも開示される。

ある実施形態では、NK細胞は、臍帯血、末梢血又は幹細胞に由来する。

【0020】

当該CAR又はポリペプチドは、発現をモニタリングするのに有用なさらなる配列、例えば、T2A又はP2Aスキップ配列及び切断型EGFR又は切断型CD19又はLNGFR（配列番号31で表されるアミノ酸配列からなるか、又はそれを含んでよい）と共に発現されうる。

20

非内因性又は外因性核酸分子（又はポリペプチド）は、細胞中に内因的に存在しない核酸分子（又はポリペプチド）である。当該用語としては、細胞内で発現される組換え核酸分子（又はポリペプチド）があげられる。外因性核酸は、天然野生型細胞に存在しない核酸である；例えば、外因性核酸は、配列によって、位置／場所によって、内因性のその対応物と異なってよい。外因性核酸分子は、遺伝子組換えにより細胞又は当該細胞の前駆体のいずれかに導入することができる。ポリペプチドをコードする外因性核酸分子は、発現制御配列に連結することができ、シグナル配列をコードする配列を含むことができ、その一方又は両方をコードする配列に対して異種であってよい。

【0021】

30

スパーサー領域

本明細書で開示されるCAR又はポリペプチドは、標的化ドメイン（すなわち、IL13又はその変異体）と膜貫通ドメインとの間に位置するスパーサーを含んでよい。様々な異なるスパーサーを用いることができる。それらのいくつかは、ヒトFc領域の少なくとも部分、例えば、ヒトFc領域のヒンジ部分又はCH3ドメイン又はその変異体を含む。以下の表1に、本明細書で開示されるCARにおいて用いることができる様々なスパーサーを提供する。

表1：スパーサーの例

【0022】

40

【表 1】

表1:スパーサーの例

名称	長さ	配列
a3	3 aa	AAA
リンカー	10 aa	GGGSSGGGSG (配列番号2)
IgG4 hinge (S→P) (S228P)	12 aa	ESKYGPPCPPCP (配列番号3)
IgG4 hinge	12 aa	ESKYGPPCPSCP (配列番号4)
IgG4 hinge (S228P)+ linker	22 aa	ESKYGPPCPPCPGGSSGGGSG (配列番号5)
CD28 hinge	39 aa	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (配列番号6)
CD8 hinge-48aa	48 aa	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (配列番号7)
CD8 hinge-45aa	45aa	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (配列番号8)
IgG4(HL-CH3) IgG4(HL-ΔCH2)ともいう (ヒンジにS228Pが含まれる)	129 aa	ESKYGPPCPPCPGGSSGGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG GNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (配列番号9)
IgG4(L235E,N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPSCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (配列番号10)
IgG4(S228P,L235E,N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (配列番号11)
IgG4(CH3) IgG4(ΔCH2)ともいう	107 aa	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSL SLSLGLK (配列番号12)
IgG1 Hinge	16 aa	LEPKSCDKTHTCPPCP (配列番号44)

いくつかのスパーサー領域は、免疫グロブリン（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）ヒンジ領域、すなわち、免疫グロブリンのCH1ドメインとCH2ドメインとの間に入る配列、例えば、IgG4Fcヒンジ又はCD8ヒンジの全て又は部分を含む。いくつかのスパーサー領域は、免疫グロブリンCH3ドメイン（CH3又はΔCH2ともいう）又はCH3ドメイン及びCH2ドメインをともに含む。免疫グロブリン由来配列は、1つ以上のアミノ酸の改変、例えば、1、2、3、4又は5つアミノ酸の置換、例えば、オフターゲット結合を低減する置換を含むことができる。

スパーサー領域はまた、配列ESKYGPPCPSCP（配列番号4）又はESKYGPPCPPCP（配列番号3）があるIgG4ヒンジ領域を含んでよい。スパーサー領域は

また、ヒンジ配列 E S K Y G P P C P P C P (配列番号 3)、続いてリンカー配列 G G S S G G G S G (配列番号 2)、続いて I g G 4 C H 3 配列
【 0 0 2 3 】
【 化 6 】

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(配列番号 1 2) を含むことができる。したがって、スパーサー領域全体は、配列 :
【 0 0 2 4 】
【 化 7 】

ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLGLGK

(配列番号 9) を含むことができる。
【 0 0 2 5 】

膜貫通ドメイン

様々な膜貫通ドメインを C A R に用いることができる。ある場合、膜貫通ドメインは、C D 2 8 膜貫通ドメインであり、これは F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V (配列番号 1 4) で表される。ある場合、C D 2 8 膜貫通ドメインは、配列番号 1 4 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸 (好ましくは保存的) が変化している。表 2 は、適当な膜貫通ドメインの例を含む。スパーサー領域が存在する場合、膜貫通ドメイン (T M) は、スパーサー領域のカルボキシ末端に位置する。

表 2 : 膜貫通ドメインの例
【 0 0 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表2:膜貫通ドメインの例

名称	受託番号	長さ	配列
CD3z	J04132.1	21 aa	LCYLLDGILFIYGVILTALFL (配列番号13)
CD28	NM_006139	27aa	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV (配列番号14)
CD28(M)	NM_006139	28aa	MFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV (配列番号15)
CD4	M35160	22aa	MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF (配列番号16)
CD8tm	NM_001768	21aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (配列番号17)
CD8tm2	NM_001768	23aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (配列番号18)
CD8tm3	NM_001768	24aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (配列番号19)
41BB	NM_001561	27aa	IISFFLALTSTALLFLLFF LTLRFSV (配列番号20)
NKG2D	NM_007360	21aa	PFFFCFCIAVAMGIRFIIMVA (配列番号65)

共刺激ドメイン

共刺激ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインとの併用に適するいかなるドメインであってよい。ある場合、共刺激ドメインは、RSKRSRLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (配列番号22) と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%同一または完全同一の配列を含むCD28共シグナル伝達ドメインである。ある場合、4-1BB共シグナル伝達ドメインは、配列番号22と比較して、1、2、3、4又は5つのアミノ酸 (好ましくは保守的) が変化している。共刺激ドメイン (複数可) は、膜貫通ドメインとCD3ζシグナル伝達ドメインとの間に位置する。表3に、CD3ζシグナル伝達ドメインの配列と共に適当な共刺激ドメインの例をあげる。ある場合、共シグナル伝達ドメインは、RSKRSRLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (配列番号22) で表される。

表3：CD3ζドメイン及び共刺激ドメインの例

【0027】

10

20

30

40

50

【表 3】

名称	受託番号	長さ	配列
CD3ζ	J04132.1	113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号21) ITAMS 1～3に下線を付す
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号50)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号51)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号52)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号53)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号54)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (配列番号55)
CD3ζ variant		113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号56)
CD28	NM_006139	42aa	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (配列番号22)
CD28gg*	NM_006139	42aa	RSKRSRGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (配列番号23)
41BB	NM_001561	42 aa	KRGKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL (配列番号24)
OX40	NM_003327	42 aa	ALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (配列番号25)
2B4	NM_016382	120 aa	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRNHEQEQTFFGG GSTIYSMIQSQSAPTSQEPATLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPS FNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYS (配列番号66)

10

20

30

40

ある実施形態では、共刺激ドメインは、表 3 に示される共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体、CD28 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体、4 - 1 BB 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体、及び OX40 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体からなる群より選択される。ある実施形態では、4 - 1 BB 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変されたその変異体がある。ある実施形態では、2 つの共刺激ドメイン、例えば、CD28 共刺激ドメイン又はアミノ酸が 1 ～ 5 個（例えば、1 又は 2 個）改変（例えば、置換）されたその変異体及び 4 - 1 BB 共刺激ドメイン又

50

はアミノ酸が1～5個（例えば、1又は2個）改変（例えば、置換）されたその変異体がある。ある実施形態では、アミノ酸の1～5個（例えば、1又は2個）の改変は置換である。共刺激ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインに対してアミノ末端であり、共刺激ドメインとCD3ζシグナル伝達ドメインとの間に、2～10個、例えば3個のアミノ酸からなる短いリンカー（例えば、GGG）を配置することができる。

【0028】

CD3ζシグナル伝達ドメイン

CD3ζシグナル伝達ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインとの併用に適するいかなるドメインであってよい。ある場合、CD3ζシグナル伝達ドメインは

【0029】

【化8】

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

(配列番号21)

と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%同一または完全同一の配列を含む。

ある場合、CD3ζシグナル伝達ドメインは、配列番号21と比較して1、2、3、4又は5つのアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。ある場合、CD3ζシグナル伝達ドメインは、配列番号50～56のいずれかを含む。これらの変異体CD3ζシグナル伝達ドメインには、1つ以上のITAMドメインにYからFへの変異がある。ある場合、好ましくは、ITAM 2及び3を不活性化する変異がある変異体を用いる。

【0030】

ヒトIFNγ

IFNγドメインは、成熟ヒトIFNγの少なくとも機能的部分（例えば、ヒトIFNγのアミノ酸24～161；GenBank NP_000610）又は成熟ヒトIFNγの機能的部分を含むドメインである。

成熟ヒトIFNγには、以下の配列：

【0031】

【化9】

QDPYVKE AENLKKYFNA GHSDVADNGT
LFLGILKNWKEESDRKIMQS QIVSFYFKLF KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM
NVKFFNSNKK KRDDFEKLTNYSVTDLNVQR KAIHELIQVM AELSPAAGTG
KRKRSQMLFR GRRASQ (成熟IFNγ;配列番号1)

がある。未熟ヒトIFNγ（シグナル配列を含む）には、以下の配列：

【0032】

【化10】

MKYTSYILAF QLCIVLGSLG CYCQDPYVKE
AENLKKYFNA GHSDVADNGT LFLGILKNWK EESDRKIMQS QIVSFYFKLF
KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM NVKFFNSNKK KRDDFEKLTN YSVTDLNVQR
KAIHELIQVM AELSPAAGTG KRKRSQMLFR GRRASQ (配列番号29)

10

20

30

40

50

がある。ある実施形態では、ヒト IFN γ には、以下の配列：

【 0 0 3 3 】

【 化 1 1 】

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFK
NFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVM
AELSPAAKTGKRKRSQ (配列番号32)

が含まれる。

ある場合、IFN γ ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 29 又は配列番号 32 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。例えば、配列番号 1 又は配列番号 32 において、K 74 A、E 75 Y 及び N 83 R のうちの 1 つ、2 つ又は 3 つ全てのアミノ酸が変化してよい。ある実施形態では、本明細書で提供される IFN γ ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 29 又は配列番号 32 と少なくとも 95 % の同一性があるアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、IFN γ では、配列番号 1 又は配列番号 32 の Q 1、D 2、P 3、K 6、Q 64、Q 67、K 68、E 71、T 72、K 74、E 75、D 76、N 78、V 79、K 80、N 83、S 84、K 86、R 89、D 90 に対応する位置及びそれらのいかなる組み合わせから選択されるアミノ酸残基で少なくとも 1 つのアミノ酸が置換される。

ある実施形態では、本明細書で提供される IFN γ ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 32 と少なくとも 95 % の同一性があり、かつ、さらに、配列番号 1 又は配列番号 32 の Q 1、D 2、P 3、K 6、Q 64、Q 67、K 68、E 71、T 72、K 74、E 75、D 76、N 78、V 79、K 80、N 83、S 84、K 86、R 89、D 90 に対応する位置及びそれらのいかなる組み合わせから選択されるアミノ酸残基で少なくとも 1 つのアミノ酸が置換される、アミノ酸配列を含む。

ある実施形態では、また、IFN γ の変異体を用いることができる。いくつかの IFN γ 変異体が当技術分野において公知であり、有用であってよい（Mendoza J L, et al., (2019) Nature 567: 56; 国際公報 WO 2020/028275 号）。

【 0 0 3 4 】

切断型 E G F R 又は切断型 C D 19 又は L N G F R

ある実施形態では、本明細書で開示される C A R 又はペプチドは、リボソームスキップ配列（例えば、L E G G G E G R G S L L T C G D V E E N P G P R ; 配列番号 27）及び以下の配列：

【 0 0 3 5 】

【 化 1 2 】

LVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFR
GDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQH GQFSL
AVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSC
KATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQC
HPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAGVMGENNTLVWKYADAGH
VCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
(配列番号28)

で表される切断型 E G F R と少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 同

一または完全同一の配列を含む。

ある場合、切断型 E G F R は、配列番号 28 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。

【0036】

ある実施形態では、本明細書で開示される C A R 又はペプチドは、リボソームスキップ配列（例えば、L E G G G E G R G S L L T C G D V E E N P G P R ; 配列番号 27）及び以下の配列：

【0037】

【化 13】

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKP
FLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSG
ELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCVPPRD
SLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPAR
DMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVS
AVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKR（配列番号26）

10

で表される切断型 C D 19 R と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% 同一または完全同一の配列を含む。ある場合、切断型 C D 19 t は、配列番号 26 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。

20

【0038】

ある実施形態では、本明細書で開示される C A R 又はペプチドは、リボソームスキップ配列（例えば、L E G G G E G R G S L L T C G D V E E N P G P R ; 配列番号 27）及び以下の配列：

【0039】

【化 14】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV
AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQ
FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVHISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN
SCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI
QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADA
GHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLLVALGIGLFM
（配列番号45）

30

で表される t E G F R と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% 同一または完全同一の配列を含む。

40

【0040】

ある実施形態では、本明細書で開示される C A R 又はペプチドは、リボソームスキップ配列及び以下の配列：

【0041】

50

【化 1 5】

MGAGATGRAMDGPRLLLLLLLGVSLGGAKEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPC
GANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYQQ
DETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDT
ERQLRECTRWADAECCEEIPGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTT
VMGSSQPVVTRGTTDNLPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRWNSCKQNK (配列番号33)

10

で表される切断型 L N G F R と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% 同一または完全同一の配列を含む。ある場合、切断型 L N G F R は、配列番号 33 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化している。

【0042】

本明細書で開示される C A R 又はペプチドにおいて有用な他のリボソームスキップ配列としては、E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号 46) で表される配列と少なくとも 95% 同一である配列がある T 2 A 又は G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 47) で表される配列と少なくとも 95% 同一である配列がある P 2 A があげられる。ある場合、リボソームスキップ配列は、配列番号 46 又は 47 と比較して、1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸（好ましくは保存的）が変化する。

20

【0043】

アミノ酸改変とは、タンパク質又はペプチド配列におけるアミノ酸の置換、挿入、及び/又は欠失をいう。「アミノ酸置換」又は「置換」は、親ペプチド又はタンパク質配列中の特定の位置のアミノ酸を他のアミノ酸で置き換えることをいう。置換は、得られるタンパク質中のアミノ酸を変化させるために、非保存的様式で（すなわち、特定のサイズ又は特徴があるアミノ酸のグループに属するアミノ酸から他の群に属するアミノ酸にコドンを変化させることによる）、又は保存的様式で（すなわち、特定のサイズ又は特徴があるアミノ酸の群に属するアミノ酸から同じ群に属するアミノ酸にコドンを変化させることによる）、行うことができる。当該保存的变化によれば、一般に、得られるタンパク質の構造及び機能の変化がより少ない。以下は、アミノ酸の種々の分類の例である：1) 非極性 R 基があるアミノ酸：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン；2) 非荷電極性 R 基があるアミノ酸：グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン；3) 荷電した極性 R 基（pH 6.0 で負に荷電している）があるアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸；4) 塩基性アミノ酸（pH 6.0 で正に荷電）：リジン、アルギニン、ヒスチジン（pH 6.0）。他の群分けは、フェニル基があるアミノ酸：フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンであってよい。

30

【0044】

ある場合、C A R は、C A R オープンリーディングフレームの後にリボソームスキップ配列及び細胞質シグナル伝達テールが欠損した切断型 E G F R (E G F R t)、又は切断型 C D 19 R 若しくは L N G F R が続くベクターを用いて産生することができる。この配置により、E G F R t の共発現において、遺伝子改変細胞を正確に測定でき、遺伝子改変細胞の陽性選択、並びに養子移入後のインビボでの治療用 N K 細胞を効率よく細胞追跡しうる不活性な非免疫原性表面マーカーを提供する。サイトカINSTORM 及びオフターゲット毒性を回避するために増殖を効率的に制御することは、N K 細胞免疫療法の成功に重要である。C A R レンチウイルス又はレトロウイルスベクターに組み込まれた E G F R t、C D 19 t、又は L N G F R は、治療関連毒性の場合に C A R + 細胞を除去するための自殺遺伝子として作用することができる。

40

【0045】

ある場合、本明細書で開示される核酸分子は、C A R 及びヒトインターフェロン γ の発

50

現をともに制御するプロモーターを含む。他の場合、本明細書で開示される核酸分子は、C A Rの発現を制御する第一のプロモーター及びヒトインターフェロン γ の発現を制御する第二のプロモーターを含む。ある場合、第一及び第二のプロモーターは同一であり、ある場合、それらは異なる。ある実施形態では、第一のプロモーターは、強力な構成的プロモーター又は誘導性プロモーターである。ある実施形態では、第二のプロモーターは、第一のプロモーターよりも弱いプロモーターであるか、又は誘導性プロモーターである。有用なプロモーターは、当該分野で周知である。例えば、合成N F A Tプロモーターは、C A R構築物をコードする核酸で用いることができる。有用なプロモーターは、C M V、E F 1、S V 4 0、P K G 1、P K G 1 0 0、U b c、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、N F A T、及びいかなる他の構成的プロモーター又は誘導性プロモーターのうちの1つ以上を含んでよい。ある実施形態では、N F A T認識要素を用いることができる(T G G A G G A A A A A C T G T T T C A T A C A G A A G G C G; 配列番号34)。ある実施形態では、有用なプロモーターは、N F A T認識要素の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11個の反復を含む。ある実施形態では、有用なプロモーターは、以下に表される配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43及び48のいずれか1つ以上を含む。

10

【0046】

【化16】

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCG; 配列番号35

20

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG; 配列番号36

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCG; 配列番号37

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCG TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG; 配列番号38

30

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCG; 配列番号39

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCG TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG; 配列番号40
TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA

40

【0047】

50

【化 1 7】

GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACT
GTTTCATACAGAAGGCG; **配列番号41**

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACT
GTTTCATACAGAAGGCG TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG; **配列番号42**

10

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACT
GTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAA
AACTGTTTCATACAGAAGGCG; **配列番号X 43**

20

TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAA
GGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATAC
AGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTC
ATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACT
GTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAA
AACTGTTTCATACAGAAGGCG TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG

30

配列番号48

本明細書で開示されるCAR又はポリペプチドは、当技術分野で公知のいかなる手段によつて産生されてよいが、好ましくは、組換えDNA技術を用いて産生される。キメラ受容体のいくつかの領域をコードする核酸は、当該分野で公知の分子クローニングの標準的な技術（ゲノムライブラリースクリーニング、オーバーラッピングPCR、プライマー補助連結、部位特異的変異誘発等）によつて、有利に調製されてよく、そして完全なコード配列にアセンブルされてよい。得られたコード領域は、好ましくは発現ベクターに挿入され、適当な発現宿主細胞株、好ましくは免疫細胞（例えば、T細胞）、最も好ましくは自己T細胞を形質転換するために用いられる。

40

CAR又はポリペプチドは、CAR又はポリペプチドをコードするmRNAによつて細胞集団において一過的に発現されてよい。mRNAは、エレクトロポレーションによつて免疫細胞に導入することができる（Wiesinger et al., 2019, *Cancers (Basel)* 11: 1198）。

ある実施形態では、本明細書で開示されるCAR免疫細胞を含む組成物を投与することを含む、がんがある対象の生存を増加させる方法が本明細書で開示される。

ある実施形態では、本明細書で開示されるCAR免疫細胞を含む組成物を投与すること

50

含む、患者におけるがんを治療する方法が本明細書で開示される。

ある実施形態では、本明細書で開示されるCAR免疫細胞を含む組成物を投与することを含む、患者におけるがんに関連する症状を低減又は改善する方法が本明細書で開示される。

ある実施形態では、本明細書で開示されるCAR NK細胞又はCAR T細胞を含む組成物は、局所的又は全身的に投与される。ある実施形態では、本明細書で開示されるCAR免疫細胞を含む組成物を、単回又は反復投与により投与する。ある実施形態では、本明細書で開示されるCAR免疫細胞を含む組成物を、がん、病原体感染、自己免疫障害があるか又は同種異系移植された患者に投与する。

ある実施形態では、がんは固形腫瘍である。ある実施形態では、がんは黒色腫である。他に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味がある。方法及び材料は、本発明で用いるために本明細書中に記載される；当該分野で公知の他の適当な方法及び材料もまた用いられてよい。材料、方法、及び実施例は、例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。本明細書中で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリー、及び他の参考文献は、いかなる及び全ての目的のために、その全体が参考として本明細書に援用される。

記載された組成物及び方法の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び図面から、並びに特許請求の範囲から明らかであろう。

以下、図面を参照して本発明を説明する

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1A～1D：mIL13BBζ生成及びmIL13BBζCAR T細胞の表現型特徴付け。1A、マウスIL13Rα2-CAR T (mIL13BBζCAR T) 構築物を示す概略図。1B及び1C、0日目から4日目までのマウスCAR T細胞の表現型の変化を示すフローサイトメトリー及びグラフ。1D、IL13Rα2+及びIL13Rα2-K-Luc細胞に対するmIL13BBζCAR T細胞のインビトロ殺傷。

【図2】図2A～2I：マウスIL13BBζCAR T細胞は、強力な抗腫瘍活性がある。2A、フローサイトメトリー（左パネル）及び形質導入効率を実証するCAR+T細胞比率を要約する棒グラフ（右）。2B及び2C、免疫蛍光及びフローサイトメトリー染色により、KR158 (K-Luc) 神経膠腫細胞におけるmIL13Rα2の形質導入が確認された。2D、K-Luc細胞に対するmIL13BBζCAR T細胞のインビトロ死滅（E:T、1:3）。2E、LuminesはIFNγ及びTNFαレベルを検出した。2F、インビボ実験設計を示す概略図。2G、ヘマトキシリン及びエオシン（H&E）の画像は、未治療及びCAR T治療脳において浸潤性K-Lucを示した。2H、未治療群及びCAR T治療群におけるK-Luc-mIL13Rα2+腫瘍があるマウスの生存曲線。2I、生物発光画像（BLI；上）及びフラックス値（下）は、未治療群及びCAR T治療群における腫瘍成長を示す。少なくとも3回の独立した実験のデータを平均±s.e.m.（2D及び2E）として示し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。生存曲線間の差をロジランク（Mantel-Cox）検定（2H）によって分析した。示された比較について、*p<0.05、**p<0.01、及び***p<0.001。

【図3】図3A～3F：mIL13BBζCAR T細胞は、強力な抗腫瘍活性を有し、GL261-Luc腫瘍に対する内因性メモリー免疫応答を誘導した。3A、ヘマトキシリン及びエオシン（H&E）の画像は、GL261-Luc腫瘍の形態を示した。3B、免疫蛍光及びフローサイトメトリー染色により、GL261-Luc神経膠腫細胞におけるIL13Rα2の形質導入が確認された。3C、IL13Rα2+GL261-Luc神経膠腫細胞に対するmIL13BBζCAR T細胞のインビトロ死滅（E:T、1:3）。3D、Lumines ELISAは、IFNγ及びTNFαレベルを検出した。3E、未治療群及びCAR T治療群におけるIL13Rα2+GL261-Luc神経

膠腫腫瘍があるマウスの生存曲線。3 F、CAR T療法によって治癒し、IL13R α 2 陰性GL261-Lucで再チャレンジしたマウスの生存。少なくとも2つの独立した実験のデータを平均 $\pm$ s.e.m.(3C)として提示し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。比較のために、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。生存曲線間の差(3E)を、ログランク(Mantel-Cox)検定によって検定されたログランク(Mantel-Cox)によって分析した。

【図4】図4A~4E:mIL13BBζCAR T細胞は、免疫応答性宿主において優れた抗腫瘍活性がある。4A、4日目又は7日目にCARを投与したインビボ実験計画を示す模式図。4B、4日齢の腫瘍モデルにおける未治療群及びCAR T治療群における腫瘍増殖を示す生物発光画像(BLI;上)及びフラックス値(下)。4C、未治療群及びCAR T治療群における4日齢K-Luc IL13R α 2+腫瘍があるマウスの生存曲線。7日齢の腫瘍モデルにおける未治療群及びCAR T治療群における腫瘍増殖を示す生物発光画像(BLI;上)及びフラックス値(下)。7日齢のK-Luc IL13R α 2+腫瘍があるマウスの未治療群及びCAR T治療群における生存曲線。生存曲線間の差(4C、4E)を、ログランク(Mantel-Cox)検定によって分析した。

10

【図5】図5a~5f:CAR T細胞は、内因性メモリー免疫応答及び抗原特異的T細胞の生成を誘導する。a、CAR T療法によって治癒し、IL13R α 2 陰性K-Luc腫瘍で再チャレンジしたマウスの生存。b、生物発光(BLI)画像(上)及びフラックス値(下)は、ナイーブ対照及びCAR T療法群の生存者における腫瘍成長を示す。c、実験計画の概要。d、インビトロ殺傷、及びe、K-Luc-mIL13R α 2+細胞に対する未治療又はCAR T治療マウスから単離された内因性T細胞の増殖(E:T、10:1)。f、腫瘍(K-Luc)があるマウスにおける未治療細胞又はCAR T治療細胞から単離されたCAR T細胞及び内因性T細胞のインビボ殺傷能の評価。データは、少なくとも2つの独立した実験を含む。各記号は1つの個体を表す。データを平均 $\pm$ s.e.m.(d及びe)として表し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。生存曲線間の差を、ログランク(Mantel-Cox)検定によって分析した(a)。示された比較について、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ 。

20

30

【図6】図6a~6b:mIL13BBζCAR T細胞は、強力な抗腫瘍活性があるが、小腫瘍モデルにおいて内因性記憶免疫応答を誘導することができない。a、未治療群及びCAR T治療群における4日齢K-Luc IL13R α 2+腫瘍があるマウスの生存曲線。b、CAR T療法によって治癒し、IL13R α 2 陰性K-Luc腫瘍で再チャレンジしたマウスの生存。生存曲線間の差(a)を、ログランク(Mantel-Cox)検定によって分析した。

【図7】図7a~7e:混合抗原腫瘍があるマウスにおける生存の比較。a、4日目及び7日目のインビボ実験計画の概略図。b、異なるレベルのIL13R α 2を示すフローサイトメトリー。c、未治療群及びCAR T治療群における4日目のK-Luc IL13R α 2+腫瘍があるマウスの生存曲線。d、未治療群及びCAR T治療群における7日目のK-Luc IL13R α 2+腫瘍があるマウスの生存曲線。e:未治療のK-Luc腫瘍があるマウスのフローサイトメトリー選別後のCD11b及びCD3細胞の定量。各記号は1つの個体を表す。データを平均 $\pm$ s.e.m.として示す。(e)両側スチューデントt検定によって分析した。比較のために、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 及び**** $p < 0.0001$ 。生存曲線間の差(c、d)を、ログランク(Mantel-Cox)検定によって分析した。

40

【図8】図8:内因性及びCAR T細胞のフローサイトメトリー選別。内因性(CD3+CD19-)及びCAR T(CD3+CD19+)集団のフローサイトメトリー選別の表示。

【図9】図9a~9g:CAR T細胞は、神経膠腫腫瘍微小環境において内因性T細胞

50

を活性化する。a、Nanosttring分析は、治療の3日後に未治療マウス又はCAR T治療マウスから単離された腫瘍内T細胞(CD3+)の遺伝子発現の全体的な変化を示す。b、UMAPプロットは、CAR T療法後の神経膠腫TMEにおけるリンパ系コンパートメントの変化を示す。c、特徴プロットは、治療後のCD8及びCD4 T細胞サブCD8及びCD4 T細胞サブクラスター内の富化された経路を実証する。d、濃縮スコアのヒートマップ(GSEA分析)は、T細胞サブクラスターにおける濃縮された経路を示す。e、CD45.1+モック又はCAR T細胞の養子移入を実証する実験設計(上)及びフローサイトメトリー分析は、神経膠腫TMEにおける内因性(CD3+CD45.2+)又は養子移入されたT細胞(CD3+CD45.1+)の頻度を示す(下)。f、棒グラフは、養子移入されたモック(CD3+CD45.1+)又はCAR T細胞(CD3+CD45.1+CD19+)の数及び表現型の特徴付け(CD69、Ki67及びGZMB)を比較する。g、棒グラフは、未治療、モック、又はCAR T治療マウスにおける内因性T細胞(CD3+CD45.2+)数及び表現型特徴付け(CD69、Ki67、GZMB、及びIFN γ)を比較する(n=5/群)。データは、少なくとも2つの独立した実験を含む。データを平均 $\pm$ s.e.m.(F及びG)として示し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。示された比較について、*p<0.05、**p<0.01、及び***p<0.001。

【図10】図10a~10d：腫瘍内免疫細胞の単一細胞RNA配列決定。a、腫瘍内免疫細胞のみの未処理データ及びCAR T処理データをマージしたUMAPプロット。b、免疫サブセット特異的マーカー遺伝子発現の特徴プロット。c、リンパ系サブクラスター(上)及びバイオリンプロット(下)の頻度の変化は、リンパ系特異的マーカーを示す。d、棒グラフは、骨髓サブクラスターの頻度の変化を示し(上)、バイオリンプロット(下)は、骨髓特異的マーカーを示す。

【図11】図11a~11b：単一細胞RNA配列決定は、腫瘍内T細胞の表現型を同定する。UMAPプロットは、CAR T療法後の記憶幹様T細胞に関連する遺伝子の増強を実証する。b、UMAPプロットは、CAR T療法後の制御性T細胞に関連する遺伝子の発現の低下を示す。

【図12】図12：腫瘍内T細胞におけるT細胞活性化に関連する遺伝子の発現。qPCR分析は、T細胞活性化に関連する遺伝子を示す。データを平均 $\pm$ s.e.m.として示し、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。比較のために、*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001及び****p<0.0001。

【図13】図13a~13f：CAR T細胞は、神経膠腫腫瘍微小環境における常在骨髓系集団を活性化する。a、UMAPは、CAR T治療又は未治療マウスからの腫瘍内骨髓系細胞の変化を示す。b、GSEA計算法によって同定された、未治療と比較したCAR T治療における腫瘍内マクロファージ及びミクログリア細胞におけるIFN γ シグナル伝達経路の濃縮プロット。c、GSEA分析は、骨髓サブクラスター(MP：マクロファージ；MG：ミクログリア；DC：樹状細胞；Neu：好中球)における集団特異的活性化経路のアプレギュレーションを明らかにする。d、ナノストリング分析は、CAR T治療マウス対未治療マウスから単離された骨髓細胞(CD11b+)の遺伝子発現の全体的な変化を示す。e、UMAPは、骨髓系コンパートメント内の単一細胞レベルでの抗原提示遺伝子シグネチャーの相対的発現レベルを示す。f、ヒストグラム(左)及び棒グラフ(右)は、MHCI、MHCI、CD86、及びIFN γ を発現する腫瘍内CD11b+CD45.2+細胞を示す。データを平均 $\pm$ s.e.m.として示す。対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。示された比較について、*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001。

【図14】図14a~14j：CAR T細胞におけるIFN γ の欠損は、抗腫瘍活性及び宿主免疫細胞の活性化を損なう。a、実験計画の概略図。b、CAR Twt及びCAR TIFN γ -/-における比率CAR陽性、生存率、増殖、及びCAR 4：CAR 8比の比較。c、K-Luc-IL13R α 2+細胞に対するCAR Twt及びCAR TIFN γ -/-のインビトロ死滅(E：T、1：1)。d、フローサイトメトリーは、

w t 及び I F N γ - / - C A R T 細胞における細胞内サイトカインレベル (T N F α 、G Z M B 及び I F N γ) を示す。e、生物発光 (B L I) 画像 (上) 及びフラックス値 (下) は、未処理、C A R T w t 又は C A R T I F N γ - / - における腫瘍成長を示す。f、非治療、C A R T w t 及び C A R T I F N γ - / - 群における K - L u c - I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの生存曲線。g、ヒートマップは、腫瘍における免疫活性化及び抑制に関連する遺伝子の正規化された発現を示す。h、C A R T 細胞 (C D 3 + C D 1 9 +) 数及び活性化表現型 (C D 6 9) を比較する棒グラフ (左) 及びフローサイトメトリープロット (左)。i、内因性 T 細胞 (C D 3 + C D 1 9) 数及び活性化表現型 (C D 6 9) を比較する棒グラフ (左) 及びフローサイトメトリープロット (右)。j、骨髓 (C D 1 1 b +) 区画における表現型を示すヒストグラム (左) 及び棒グラフ (右)。データは、少なくとも 2 つの独立した実験を含む。各記号は 1 つの個体を表す。データを平均 $\pm$ s . e . m . (h、i、及び j) として表し、対応のない両側スチューデント t 検定によって分析した。生存曲線間の差 (f) を、ログランク (M a n t e l - C o x) 検定によって分析した。示された比較について、* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、及び *** p < 0 . 0 0 1。

10

【図 1 5】C A R T 細胞による I F N γ 産生の欠損は、抗腫瘍活性と宿主免疫細胞の活性化を損なう。A、実験デザインの概略図。B、C A R T w t と C A R T I F N γ - / - における C A R 陽性率、生存率、拡大率、C D 4 : C D 8 比の比較。C、K - L u c - m I L 1 3 R α 2 + 細胞に対する C A R T w t 及び C A R T I F N γ - / - のインピット口死滅 (E : T、1 : 1) D、代表的なフローサイトメトリープロットは、K - L u c - m I L 1 3 R α 2 + 腫瘍への曝露後の w t 及び I F N γ - / - C A R T 細胞における細胞内サイトカインレベル (T N F α 、G Z M B 及び I F N γ) を示す。E、代表的な生物発光 (B L I) 画像 (上) 及びフラックス値 (下) は、未処理、C A R T w t 又は C A R T I F N γ - / - における腫瘍成長を示す。個々のマウスを点線で表し、フラックスの中央値を太線で示す。F、未処理群、C A R T w t 処理群及び C A R T I F N γ - / - 処理群における K - L u c - m I L 1 3 R α 2 + 腫瘍があるマウスの生存曲線。G、ヒートマップは、T M E における免疫活性化及び抑制に関連する遺伝子の正規化された発現を示す。H、C A R T 細胞 (C D 3 + C D 1 9 +) 数と活性化表現型 (C D 6 9) を比較した棒グラフ (左) と代表的なフローサイトメトリープロット (右)。I、内因性 T 細胞 (C D 3 + C D 1 9 -) 数と活性化表現型 (C D 6 9) を比較した棒グラフ (左) と代表的なフローサイトメトリープロット (右)。J、骨髓 (C D 1 1 b +) 区画における表現型を示す代表的なヒストグラム (左) 及び棒グラフ (右)。データは、少なくとも 2 つの独立した実験の代表である。各記号は、1 つの個体 (H、I、及び J) を表す。データを平均 $\pm$ s . e . m として表し、対応のない両側スチューデント t 検定によって分析した。生存曲線 (F) 間の差は l o g - r a n k (M a n t e l - C o x) 検定で解析した。* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、ランク (M a n t e l - C o x) 検定によって分析した。

20

30

【図 1 6】図 1 6 a ~ 1 6 d : C A R T 細胞は、単球分化及び M 1 型マクロファージの生成を促進する。a、実験計画のスキーム。b、フローサイトメトリー (左) 及び棒グラフ (右) は、異なる馴化培地とのインキュベーション後の単球における表現型の変化を示す。c、顕微鏡画像は、異なる馴化培地とのインキュベーション後の単球における形態学的変化を示す。d、M 1 マクロファージ表現型に関連する遺伝子の q P C R 分析。データを平均 $\pm$ s . e . m . として示す。対応のない両側スチューデント t 検定によって分析した。比較のために、* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、*** p < 0 . 0 0 1 及び *** p < 0 . 0 0 0 1。

40

【図 1 7】図 1 7 a ~ 1 7 k : C A R T 細胞は、G B M 患者の免疫細胞を活性化することができる。a、実験計画のスキーム。b、フローサイトメトリー、c、顕微鏡画像及び d、馴化培地中でのインキュベーション後の患者マクロファージの表現型変化の棒グラフ要約。e、フローサイトメトリー及び f、馴化培地中でのインキュベーション後の患者 T 細胞における表現型の変化の概要。g、C A R T 療法を受けている患者についての試験

50

設計の概略図。h、フローサイトメトリーは、CAR T療法の前 (Pre-CAR)、及び照射自己腫瘍との共培養後に4時間刺激した後のCAR T療法への応答中 (Post-CAR) に得られた患者T細胞における細胞内IFN γ レベルを示す。i、自己照射 (Irr.) 患者腫瘍とのインキュベーション後のT細胞数。j、10:1のE:T比での自己 (UPN109) 又は非特異的腫瘍株 (K562) に対するT細胞によるインビトロ殺傷。k、フローサイトメトリーは、患者自己 (UPN109) 腫瘍のIL13R α 2発現を実証する。各記号は1回の反復を表す。データを平均 $\pm$ s.e.m.として示す。(d、f、i及びj)、対応のない両側スチューデントt検定によって分析した。比較のために、*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001及び****p<0.0001。

10

【図18】図18：本明細書で開示される研究で用いたプライマーのリストである。配列番号77-106、89-90、107-108が、それぞれ出現順に開示されている。

【図19】図19：本明細書で開示される試験で用いた抗体のリスト。

【図20】図20A~20D：異なるIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞構築物の分子設計及び生成、並びにインターフェロ γ を共発現するCAR T細胞の調製の態様を示す。20A、標準IL13 CAR Tと比較した、IFN γ を共発現するIL13 CAR Tの構築物設計。20B、形質導入及びIL13 CAR T細胞産生の模式図。T細胞を単離し、CD3/CD28抗体 (1:1) の存在下で活性化し、続いてIL13 CAR形質導入を行う。20C、フローサイトメトリーは、CAR発現のマーカーとしてIL13を用いてCAR陽性細胞の比率を示した。20D、産生中の様々なIL13 CAR T細胞におけるIFN γ レベル (左パネル) 及びELISAにより、CAR T細胞におけるIFN γ 発現及び分泌が確認され、構築物内のIFN γ の形質導入及び発現が確認された。

20

【図21】図21A~21E：マウスIL13 CAR T細胞及びIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞の機能的評価及び表現型評価の結果を示す。マウスIL13 CAR T細胞又はIFN γ を共発現するIL13 CAR T細胞を、1エフェクター:3標的比でマウス神経腫瘍腫瘍と共培養した。21A、顕微鏡画像は、異なるIL13 CAR T構築物 (形質導入されていないモックT細胞、IL13 CAR Tのみ、及びIL13 CAR IFN γ T細胞) の殺傷能を実証した。21B、24時間の共培養後のT細胞数。21C、24時間の共培養後の腫瘍細胞数。21D、棒グラフは、24時間の共培養後のCD69発現によって測定されるT細胞活性化比率を示す。21E、フローサイトメトリー分析は、マウスIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞及びIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞において、同等の疲弊 (PD-1+Tim3+) 及び分化 (CD62L+CD45RA+) 表現型を示した。

30

【図22】図22A~22C：ヒトIL13 CAR細胞及びIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞の機能的及び表現型評価。ヒトIL13 CAR T細胞又はIL13 CAR T-IFN γ 細胞を、患者由来神経腫瘍腫瘍 (1エフェクター:25標的) と共培養した。22A、24時間の共培養後のT細胞数。22B、24時間の共培養後に測定された腫瘍細胞数。22C、フローサイトメトリー分析は、ヒトIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞及びIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞において、同等の疲弊 (PD-1+Tim3+) 及び分化 (CD62L+CD45RA+) 表現型を示した。

40

【図23】IL13R α 2-IFN γ CAR T細胞T細胞は、多病変転移性黒色腫モデルにおいてアブスコパル効果を誘導した。腫瘍を両方の側腹部に注射した。腫瘍が所定のサイズに達したら、IL13R α 2 CAR T細胞又はIL13R α 2-IFN γ CAR T細胞を1つの腫瘍に局所投与した。両方の腫瘍を抗腫瘍活性について測定した。線グラフは、治療の反対側の腫瘍における腫瘍体積の変化を示した。

【図24】示された様々なドメインがある様々なヒトIL13 CARで表されるアミノ酸配列 (配列番号70~72)。

【図25】様々なドメインが示されている様々なヒトIL13 CARで表されるアミノ酸配列 (配列番号73~75)。

50

【図 26】図 26A ~ 26B : IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞は、マクロファージを再プログラムすることができる。26A . 形質導入及び CAR T 細胞産生の概略図。26B . 棒グラフは、IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞によるマクロファージのリプログラミングを実証した。棒グラフは、CAR 産物の製造中に収集された上清と共にインキュベートした場合、又は外因性 IFN γ に曝露した場合の、炎症促進性及び代謝的に活性なマクロファージに関連する遺伝子の qPCR 分析を示した。各データ点は、1 つの複製を示す。

【図 27】図 27A ~ 27C : 合成 NFAT プロモーターによる誘導性 IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞の発生。27A . CAR T 活性化時の誘導性 IFN γ 発現の分子設計を示す概略図。27B . 実験設計を示す説明図である。簡潔には、細胞に NFAT - eGFP - CAR T 細胞構築物を形質導入し、IL13R α 2 + 腫瘍及び IL13R α 2 - 腫瘍と共培養した。抗原陽性腫瘍による刺激及び活性化の際に、GFP が発現され、検出可能である。27C . フローサイトメトリーは、抗原陽性腫瘍によって形質導入及び活性化された細胞における GFP の発現を実証した。

【図 28】図 28A ~ 28C : IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞は、インビボで中 / 低 IL13R α 2 抗原発現腫瘍を標的化することにおいて、標準 IL13R α 2 CAR T 細胞と比較してより有効であった。28A . 実験計画を示す概略図。28B . 棒グラフは、IL13R α 2 CAR T 細胞又は IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞による治療後の、高 IL13R α 2 抗原発現腫瘍があるマウスにおける腫瘍進行を示した。28C . 棒グラフは、IL13R α 2 CAR T 細胞又は IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞による治療後の、培地 - IL13R α 2 抗原発現腫瘍があるマウスにおける腫瘍進行を示した。

【図 29】図 29A ~ 29D : IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞及び IL13R α 2 - IFN γ ^{low} CAR 変異体は、異なるレベルの IFN γ を発現した。29A 異なる強度のプロモーターの制御下に IFN γ がある構築物設計を示す概略図。29B . 形質導入及び上清の収集を示す実験設計を示す概略図。29C . 棒グラフは、エクスピボ増殖中の IFN γ レベルを示した。29D . 棒グラフは、CAR T 細胞と腫瘍 (1 : 50 のエフェクター : 標的比) との 5 日間の共培養後の生存腫瘍数を示した。

【図 30】図 30A ~ 30C : IL13R α 2 - CAR T 細胞及び IL13R α 2 - CAR - NFAT / IFN γ T 細胞は、同等の死滅能力を示す。30A . 構築物設計のスキームは、NFAT プロモーターの制御下での IFN γ を示す。30B . 実験設計の概略図は、抗原陽性腫瘍の存在下での異なる CAR の共培養を実証した。30C . グラフは、IL13R α 2 - CAR - NFAT / IFN γ T 細胞と比較した IL13R α 2 - CAR T の細胞傷害機能を示す。

【図 31】図 31A ~ 31B : IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞は、抗腫瘍機能の増強のために骨髓細胞と相乗作用する。32A . 実験には、IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞又は IL13R α 2 CAR T 細胞で形質導入された T 細胞をマクロファージ及び抗原陽性腫瘍細胞と共培養した。32B . 棒グラフは、マクロファージ又は腫瘍細胞を伴う又は伴わない IL13R α 2 - IFN γ CAR T 細胞又は IL13R α 2 CAR T 細胞との三元共培養における腫瘍数を示した。

【発明を実施するための形態】

【0049】

本発明を以下の実施例においてさらに説明するが、これらは特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【0050】

実施例

材料及び方法

マウス及び細胞株

C57BL / 6 / J、CD45 . 1 (B6 . SJL - P t p r C a P e p p c b / B o y J)、Thy1 . 1 (B6 . PL - Thy1 a / Cy J)、IFN γ R - / - (B6 . 1

10

20

30

40

50

29S7 - Ifngr1tm1Agt/J)、及びIFN γ - / - (B6.129S7 - Ifngtm1Ts/J)マウスは、The Jackson Laboratoryから購入した。NOD/Scid IL2RyCnull (NSG)マウスをCity of Hopeで飼育した。全てのマウス実験は、City of Hope Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)によって承認された。

ルシフェラーゼ発現マウスGL261 (GL261 - Luc)及びKR158B (K - Luc)神経膠腫細胞にレンチウイルスを形質導入して、マウスIL13R α 2 (mIL13R α 2)発現サブライン (GL261 - Luc - mIL13R α 2及びK - Luc - mIL13R α 2)を作製した。これらの腫瘍株を、10%胎児ウシ血清 (Hyclone Laboratories)、25 mM HEPES (Irvine Scientific、カリフォルニア州サンタナ)及び2 mM L - グルタミン (Lonza)を補充したDMEM (Gibco)中で維持した。mIL13R α 2の細胞表面発現を、フローサイトメトリー及び免疫蛍光イメージングによって確認した。

患者由来の神経膠腫細胞 (PBT030 - 2 - ffluc)を、COH IRBによって承認されたプロトコルによりGBM患者切除から単離し、上記のように維持した。全ての腫瘍株を、フローサイトメトリーによって所望の抗原/マーカー発現について認証し、そして細胞をマイコプラズマについて試験し、そして1~3ヶ月未満、培養物中で維持した。

【0051】

CAR T細胞産生

ヒトCAR T細胞：ナイーブ及びメモリーT細胞を、COH IRB (12、32)によって承認されたプロトコルによりCity of Hopeの健常ドナーから単離した。IL13R α 2標的化CARの構築物及びCAR形質導入は、参考文献12、33、34に記載されている。簡潔には、初代T細胞をDynabeads Human T expander CD3/CD28 (Invitrogen) (T細胞：ビーズ=1:2)で24時間刺激し、CARレンチウイルス (感染多重度 [MOI] = 0.5) で形質導入した。CAR形質導入のSeven日後に、CD3/CD28ビーズを除去し、細胞を再懸濁し、10% FCS、50 U/ml 組換えヒトIL - 2、及び0.5 ng/ml 組換えヒトIL - 15を含有するX - VIVO 15培地 (Lonza) 中でさらに10~15日間増殖させた後、エクスピボ増殖に及んだ。

【0052】

マウスCAR T細胞

マウスIL13BB ζ キメラ抗原受容体を、細胞外マウスIL13及びマウスCD8ヒンジ、マウスCD4膜貫通ドメイン、並びに細胞内マウス4 - 1BB共刺激及びマウスCD3 ζ シグナルを含有するMSCVレトロウイルス骨格 (Addgene) において構築した。T2Aリボソームスキップの後、切断型マウスCD19を形質導入マーカーとして挿入した。得られたプラスミドを、Fugene (Promega) を用いてPlate細胞 (Dr. Zuoming サン研究所から寄贈) にトランスフェクトした。48時間後、上清を回収し、0.2 μ m フィルターを用いて濾過した。レトロウイルス上清を等分し、形質導入時まで凍結した。

マウスT細胞を、ナイーブC57BL/6Jマウス又は適当な系統 (CD45.1、Thy1.1、又はIFN γ - / -) の脾臓からEasySep Mouse T cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies) を用いて単離し、Dynabead Mouse T - Activator CD3/CD28ビーズ (Gibco) を1:1の比で用いて刺激した。T細胞を、レトロウイルス含有上清 (上記) を用いて、RetroNectinコーティングプレート (Takara Bio USA) 上で形質導入した。次いで、細胞を、10% FBS (Hyclone Laboratories)、55 mM 2 - メルカプトエタノール (Gibco)、50 U/ml 組換えヒト - IL - 2 (Novartis)、及び10 ng/ml 組換えマウスI

L - 7 (P e p r o t e c h) を補充した R P M I - 1 6 4 0 (L o n z a) 中で4日間増殖させた。インビトロ及びインビボ実験の前に、T細胞を脱ビーズ化し、CAR発現をフローサイトメトリーによって決定した。

【0053】

qRT - PCR分析

R N e a s y M i n i K i t (Q i a g e n) を用いて、ミエリンを除去した脳組織（バルク組織又はフロー選別細胞のいずれか）からRNAを単離した。S u p e r S c r i p t V I L O M a s t e r m i x (L i f e T e c h n o l o g i e s) を製造業者の指示に従って用いて、cDNAを逆転写した。上記のように(35)、qPCR反応を行った。用いたプライマーを図18に列挙する。

10

【0054】

インビボ研究

全てのマウス実験は、C i t y o f H o p e I A C U C によって承認されたプロトコルを用いて実施した。同所性GBMモデルを、上記のように生成した(36)。8~10週齢のC57BL/6J、IFN γ R - / -、又はNSGマウスの右前脳に 1×10^5 個の腫瘍細胞を頭蓋内(i.c.)に定位置に移植することによって、同所性腫瘍モデルを確立した。CAR T細胞注射の1日前に生物発光イメージングによって生着を検証した。生物発光シグナルに基づいてマウスを群に無作為化した。腫瘍注射の4又は7日後、マウスを、 1×10^6 m I L 1 3 B B ζ - C A R T細胞で頭蓋内治療した。腫瘍量をS P E C T R A L L a g o X (S p e c t r a l I n s t r u m e n t s I m a g i n g) でモニターし、A u r a ソフトウェア(v2.3.1、S p e c t r a l I n s t r u m e n t s I m a g i n g) を用いて分析した。生存曲線をG r a p h P a d P r i s m S o f t w a r e (v 8) によって作成した。

20

再チャレンジ実験のために、腫瘍のクリアランスを、腫瘍再チャレンジK - L u c 又は 5×10^4 G L 2 6 1 - L u c 細胞を注射した腫瘍再チャレンジの前に生物発光イメージングによって検証した。104

皮下研究のために、PBS中の 1×10^6 K - L u c - m I L 1 3 R α 2 を、8~10週齢のC57BL/6Jドナーマウスの右及び左側腹部に注射した。腫瘍を8日間確立させた後、 1×10^6 個のCAR T細胞を腫瘍に直接注射した。3日後、腫瘍塊を採取し、手動で解離させ、B D A r i a S O R P (B D B i o s c i e n c e s) を用いてフローサイトメトリーによってC D 3 + C D 1 9 - (内因性T細胞) 又はC D 3 + C D 1 9 + (C A R T細胞) に選別した。精製されたT細胞集団を、以下に記載されるようにインビトロ共培養10:1(エフェクター:標的)比でエフェクター細胞として用いるか、又は8日齢の皮下K - L u c - m I L 1 3 R α 2 腫瘍に再注入して戻し、この腫瘍体積をノギスを用いて経時的に測定した。

30

マウスはまた、A m e r i c a n V e t e r i n a r y M e d i c a l A s s o c i a t i o n G u i d e l i n e s に従って適用される安楽死とともに、生存及び腫瘍進行に関連するいかなる症状について、C i t y o f H o p e の C e n t e r f o r C o m p a r a t i v e M e d i c i n e によってモニターされた。

【0055】

40

インビトロ細胞毒性

C A R T細胞増殖及び細胞傷害活性の評価のために、K - L u c - m I L 1 3 R α 2 又はG L 2 6 1 - L u c - m I L 1 3 R α 2 腫瘍細胞をマウスCAR T細胞とCAR + 腫瘍比1:3で48時間共培養した。インビボでプライムされたエフェクターT細胞を用いる共培養のために、T細胞を10:1のエフェクター:腫瘍比で72時間プレATINGした。細胞を抗C D 3、C D 8、及びC D 1 9 で染色した。生存腫瘍及びCAR T細胞の絶対数をフローサイトメトリーによって評価した。

脱顆粒アッセイのために、CAR T細胞及び腫瘍細胞を、G o l g i S t o p タンパク質輸送阻害剤(B D B i o s c i e n c e s) の存在下で5時間、1:1のエフェクター:腫瘍比で共培養した。細胞混合物を抗C D 3、C D 8、及びC D 1 9 で染色し、続

50

いて抗IFN γ (BD Biosciences)、GZMB、及びTNF α (eBiosciences) 抗体で細胞内染色し、フローサイトメトリーによって分析した。全ての試料をMACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec) で取得し、FlowJoソフトウェア (v10.7) 及びGraphPad Prism (v8) で分析した。

【0056】

患者試料分析

馴化培地は、患者由来の神経膠腫細胞とヒトCAR T細胞又は組み合わせを1:1の比で24時間播種することによって作製した。上清を回収し、遠心分離して細胞破片を除去した。GBM患者からの末梢血 (City of Hopeによって承認された臨床プロトコルで計画された採血から得た) を、PharmLyse緩衝液 (BD Biosciences) で溶解した。選択キット (STEMCELL Technologies) を用いて、CD3及びCD14細胞を単離した。CD14及びCD3陽性細胞を、IFN γ R中和抗体 (R&D Systems) の存在下又は非存在下で、馴化培地と共にインキュベートした。マクロファージ分化のために、CD14細胞をM-CSF (BioLegend) の存在下で7日間インキュベートした後、IFN γ R中和抗体 (R&D Systems) の存在下又は非存在下で馴化培地に曝露した。48時間後、細胞を、Keyence顕微鏡を用いて可視化し、フローサイトメトリーによって表現型決定した。

CAR T療法 (ref) に対するユニークレスポnderにおける内因性応答の評価を、以前に報告されているように行った (37)。簡単に説明すると、治療前及び治療中に全血からT細胞を単離した。2日毎に、T細胞を、IL2 (50 U/ml) の存在下で照射 (40 Gy) 自己腫瘍細胞と共にインキュベートした。14日後、T細胞を精製し、計数した。T細胞を10:1 (エフェクター: 標的) 比で新鮮な自己腫瘍又は無関係な腫瘍株と共に培養し、3日後に腫瘍数を測定した。T細胞を細胞刺激カクテルでさらに4時間刺激し、続いて細胞内IFN γ についてフローサイトメトリーを行うことによって、IFN γ 産生を測定した。

【0057】

フローサイトメトリーアッセイ

インビトロで増殖させた生きた腫瘍細胞を、非コンジュゲートヤギ抗マウスIL13R α 2 (R&D Systems)、続いて二次口バ抗ヤギNL637 (R&D Systems) で染色した。生存マウスCAR T細胞を、CD8 (BioLegend)、CD3、CD4、CD62L (eBiosciences) 又はCD45RA (BD Biosciences) で染色した。CD19 (BD Biosciences) を、CARを検出するための代替物として用いた。

安楽死させたマウスからの脳を、所定の時点に取り出し、げっ歯類脳マトリクスを用いて、冠状面及び矢状面に沿って切断して、注射部位を中心とする4×4 mmの切片を得た。これらの切片を手で切り刻み、次に40 μ mフィルターに通した。ミエリン除去ビーズI I及びLS磁気カラム (Miltenyi Biotec) を製造業者の指示に従って用いてミエリンを除去し、次いで細胞を計数した。細胞を染色し、フローサイトメトリーを用いて分析した。フロー選別のために、細胞を示された抗体で染色し (図19)、BD AriaSORP (BD Biosciences) を用いて選別した。TMEの遺伝子発現分析のために、残りの細胞のRNAを溶解した。

【0058】

免疫蛍光及び免疫組織化学

免疫蛍光用に、K-Luc及びGL261-Luc親細胞又はmIL13R α 2形質導入細胞をカバースリップ上で培養し、非コンジュゲートヤギ抗マウスIL13R α 2 (R&D Systems)、続いて二次口バ抗ヤギNL637 (R&D Systems) 及びアクチンで染色した。上記のように (38)、共焦点顕微鏡 (Zeiss共焦点顕微鏡) を用いてスライドを画像化した。

免疫組織化学用に、マウスをCAR T注射の3日後に安楽死させ、PBS、続いて4 %

10

20

30

40

50

PFAで灌流した。全脳を解剖し、4% PFA中で3日間、続いて70%エタノール中で3日間インキュベートした後、パラフィン中に包埋した。10 μ Mの横断面を切断し、H&E、CD3 (ab16669、Abcam) 又はF4/80 (ab6640、Abcam) で染色した。スライドを、NanoZoomer 2.0-HTデジタルスライドスキャナー (Hamamatsu) を用いて40倍の倍率でデジタル化した。

【0059】

Bioplexサイトカイン分析

CAR T細胞サイトカインプロファイルを評価するために、mIL13BBζCAR+ T細胞及び腫瘍細胞 (GL261-Luc-mIL13Rα2又はK-Luc-mIL13Rα2) を、外因性サイトカインなしで1:1の比で1日間インキュベートした。無細胞上清を回収し、ProcartaPlex Mouse Th1/Th2 Cytokine Panel 11 plex (ThermoFisher Scientific) を製造業者の指示に従って用いてアッセイし、Bio-Plex 3D Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories) で取得した。

【0060】

ナノストリング遺伝子発現分析

RNAを、製造業者 (Qiagen, Germantown, MD, USA) の指示に従って、SohERSPlusマイクロキットを用いて、フロー選別されたCD3+又はCD11b+選別された細胞から精製した。続いて、Nanodrop 1000分光光度計 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) 及びBioanalyser Tapeステーション (Agilent, Santa Clara, CA, USA) アッセイを用いて、RNA試料を定量及び定性した。その後のNanosttring分析を、CD3+細胞及びCD11b+細胞について各々35 ng/ウェル及び25 ng/ウェルの濃度で行った。

nCounter (登録商標) マウスPanCancer Immuneプロファイリング遺伝子発現パネル (Nanosttring Technologies, Seattle, WA, USA) に基づいて試料を分析した: ハイブリダイゼーション反応を65で18時間行った。自動nCounter (登録商標) Prepステーション及びnCounter (登録商標) Digital Analyzer光学スキャナ (Nanosttring Technologies, Seattle, WA, USA) から構成される完全自動nCounter FLEX分析システムを用いた。正規化は、CodeSet Content中に存在する陽性対照カウント及び正規化遺伝子の幾何平均を用いることによって実施した: 0.3 - 3.0範囲外の正規化因子がある試料を除外し、0.10 - 10.0範囲外の参照因子がある試料も同様に除外した。遺伝子発現分析は、nSolver v3.0及びAdvanced analysis moduleソフトウェアを用いて行った。 (Nanosttring Technologies, Seattle, WA, USA)。

【0061】

単一細胞RNA配列決定

K-Luc-mIL13Rα2生着の7日後、CAR T細胞を上記のように腫瘍に注射したか、又は注射しなかった。CAR T治療又は非治療マウス (1群当たりn=3) からの脳を採取し、CAR T細胞注射の3日後にプールし、手動で細かく刻み、ミエリンを除去した後、生 (DAPI-) CD45-PE+ (BD Biosciences) 細胞についてBD AriaSORP (BD Biosciences) 上でフローソーティングした。単一細胞懸濁液を、Chromium Single Cell 3' v3 Reagent Kit (10x Genomics) を用いて処理し、製造業者の指示に従ってChromium Single Cell Chip (10x Genomics) 上にロードした。2つの実験各々から得られた生配列データを、各々マウスゲノム (mm10) にアラインメントし、cellranger countコマンドを用いて、1

10

20

30

40

50

10x Genomicsに従ってシングルセル解像度で発現データを作成した。Genomics (<https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/using/count>)、RパッケージSeurat 3.9を用いて、遺伝子と細胞のろ過、正規化、主成分分析、可変遺伝子の発見、クラスタリング分析、Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)次元削減を行った。簡潔には、遺伝子毎の発現データを含むマトリクスをインポートして、CAR T未処理試料及びCAR T処理試料について個別にSeuratオブジェクトを作製した。＜200の検出可能な遺伝子及び＞10%のミトコンドリア遺伝子の比率がある細胞をさらに除去した。次いで、データをマージし、その後の分析のために対数正規化した。主成分分析 (PCA) を次元削減のために実施し、最初の20個の主成分を0.6の分解能でクラスタリング分析に用いた。クラスターをUMAP包埋で可視化した。Immunologic Genome Project (ImmGen) 40、41を用いて、さらに、細胞種同定を容易にするために、以下のマーカーの発現レベルを、VlnPlotを用いてプロットした。それらはItgam、Cd3e、Cd19、Cd79a、Nkh7、Cd68及びCd8aであった。リンパ系及び骨髄系親クラスターの同定に際して、それらの各々について、本発明者らは、娘クラスターを生成するためのサブクラスター化についての上記の戦略に従った。ImmGenと協力して、骨髄性娘クラスターを識別するための重要なマーカーは、Itgam、Cd68、S100a9、Itgax、Tmem119、及びP2ry12であり、一方、リンパ系Cd3e、Cd4、Cd8a、Cd79a、及びNcr1であった。骨髄性娘クラスターにおける集団にわたる、遺伝子のモジュール、D74、H2-Aa、H2-Ab1、H2-Eb1、及びMARKSの平均発現をさらに視覚化するために、AddModuleScore関数を用いて、FeaturePlotを用いてレンダリングすることができる特徴を生成した。

【0062】

遺伝子セット濃縮分析

各骨髄系及びリンパ系の親及び娘クラスターにおいて、未処理とCAR T処理との間で差次的に発現した (DE) 遺伝子を、関数FindAllMarkersで検出した。Gene ontology (GO)、Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway、及びImmunologic signatures collection (ImmuneSigDB) (42) に関する分析を、clusterProfilerパッケージ (43) に実装されたGSEA関数を用いて各クラスターのDE遺伝子の完全なリストを用いて行い、次いでggplot2 (H. Wickham. ggplot2: データ分析のためのエレガントなグラフィックス。Springer-Verlag New York, 2016)。

【0063】

統計分析

統計的有意性は、スチューデントt検定 (2群) 又はボンフェローニによる一元配置ANOVA分析 (3群以上) を用いて決定した。Kaplan-Meier生存曲線を用いて生存をプロットし、ログランク (Mantel-Cox) 検定により統計的有意性を決定した。全ての分析は、GraphPad Prismソフトウェア (v5) を用いて行った。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.01$; ***、 $P < 0.001$ 。

【実施例1】

【0064】

マウスIL13R α 2-CAR T細胞は、GBMの免疫適格モデルにおいて強力な抗腫瘍活性を媒介する

本発明者らは、上記の臨床IL13R α 2-CAR T細胞プラットフォームの免疫応答性マウスモデルを確立した。IL-13 (E12Y) 腫瘍標的化ドメイン、マウスCD8ヒンジ (mCD8h)、マウスCD8膜貫通ドメイン (mCD8tm)、マウス4-1B

B共刺激ドメイン(m4-1BB)及びマウスCD3ゼータ(mCD3ζ)から構成される、ヒトIL13Rα2標的化CARに対するマウス対応物を構築した(12)。T2Aスキップ配列は、細胞追跡のために用いられる切断型マウスCD19(mCD19t)からCARを分離する(図1A)。操作プロセスは、CD19t+細胞の頻度によって評価されるように、70~85%の形質導入効率をもたらした(図2A)。表現型分析は、ヒトCAR T細胞(12)と同様に、マウスIL13Rα2標的化CAR T細胞(mIL13BBζCAR T細胞)が、エクスピボ増殖の4日目に、混合された初期メモリー(CD62L+)及びエフェクター(CD62L-)T細胞集団がある同程度の数のCD4+及びCD8+T細胞サブセットを含有することを示した(図1B及び図1C)。本発明者らは、2つの同系の免疫応答性マウス神経腫瘍モデルであるK-Luc及びGL261-Lucに基づいて治療設定を設計した。KR15813のホタルルシフェラーゼ改変亜系統であるK-Lucは、GBMの高度に浸潤性の特徴を再現するので用いた(図2B)。この腫瘍株は、Nf1、Trp53変異マウスから生じる自然発生神経腫瘍に由来し、抗PD-1チェックポイント療法に対するその非応答性によって示されるように、免疫原性が低い(14)。第二のモデルとして、本発明者らはまた、ffLuc(GL261-luc)を発現するように組換えられたGL261を用いたが、これは、化学的誘導によって生成され、多数の突然変異を含有し、K-Lucとは対照的に、抗PD-1免疫療法に応答性である(15、16)、非侵襲性の「嵩高い」神経腫瘍(図3A)である。両方の腫瘍株を、マウスIL13Rα2(mIL13Rα2)を発現するように組換えた(図2C及び図3B)。mIL13BBζCAR T細胞は、炎症性サイトカインIFNγ及びTNFαの産生に関連した(図2E及び図3D)mIL13Rα2組換えK-Luc及びGL261-Luc細胞を特異的に死滅させ(図2D及び図3C)、インビトロでIL13Rα2陰性親腫瘍株に応答しなかった(図1D)。

次に、本発明者らは、C57BL/6免疫応答性マウスにおける同所移植された神経腫瘍腫瘍に対するCAR T細胞抗腫瘍活性を評価した。IL13Rα2+K-Luc及びGL261-Luc腫瘍モデルにおいて、腫瘍注射の7日後のmIL13BBζCAR T細胞の単回腫瘍内投与は、強力なインビボ抗腫瘍活性を媒介し、有意な生存利益を与えた(図2F~2I及び図3E)。本発明者らは、C57BL/6マウスにおける抗K-Luc活性を、適応免疫サブセットを欠く免疫不全NOD-scid IL2Rgnull(NSG)モデルに移植された腫瘍と比較した。より小さい4日齢の腫瘍モデルにおいて、C57BL/6及びNSGにおける抗腫瘍活性は同等であり、CAR T細胞の機能性は両方のマウス系統で同等であった(図4A~4C)。しかしながら、驚くべきことに、免疫微小環境がより確立されたより大きな腫瘍モデル(7日目)では、T細胞療法に対するインビボ応答は、免疫不全NSGマウスと比較して、免疫応答性C57BL/6において優れていた(p<0.001)(図4D~4E)。この観察により、腫瘍浸潤免疫細胞がGBMにおけるCAR T細胞療法の抗腫瘍効果を増強する可能性が示された。

【実施例2】

【0065】

CAR T療法は、免疫学的記憶及び腫瘍特異的T細胞の生成を促進することができる

CAR T細胞が内因性抗腫瘍免疫を誘導する機能があるかを評価するために、CAR T細胞治療後に治癒したマウスを、IL13Rα2陰性親腫瘍でチャレンジした。実際に、生着腫瘍(CAR T療法前の7日間の生着)がより大きい場合、免疫応答性C57BL/6モデルにおける治癒マウスは、IL13Rα2陰性K-Luc(図5A及び図5B)及びGL261-Luc(図3F)親腫瘍細胞による腫瘍再チャレンジを拒絶することに成功し、CAR T細胞が、抗PD-1免疫療法に対する応答性が異なる2つの独立した腫瘍モデルにおいて免疫記憶を促進し得ることが実証された(14、16)。IL13Rα2陰性腫瘍細胞に対する内因性免疫を誘導するCAR T細胞の機能は、小腫瘍モデル(4日目)において治癒したマウスが親腫瘍による再チャレンジ後に抗腫瘍応答を開始することができなかったため、より確立されたTMEがなお必要であった(図6)。この観察により、腫瘍曝露が内因性抗腫瘍免疫を誘導するのに十分ではなく、むしろ免疫記憶

の確立はC A R T細胞療法及び宿主免疫浸潤物が必要であることが示唆される。同様の一連の実験では、本発明者らは、I L 1 3 R α 2 + K - L u c (1 0 0 % I L 1 3 R α 2 + 細胞) 対 I L 1 3 R α 2 + K - L u c 及び I L 1 3 R α 2 - 親 K - L u c 腫瘍細胞の混合物 (1 : 1 比) に対する m I L 1 3 B B ζ C A R T細胞の抗腫瘍活性を比較した。C A R T細胞が抗原陰性腫瘍細胞に対する内因性免疫応答を促進することができるという考察を支持して、m I L 1 3 B B ζ C A R T細胞は、同種及び異種 I L 1 3 R α 2 抗原発現がある腫瘍に対して同等の生存利益を媒介した ($p < 0.001$; 図 7 A 及び 図 7 B)。ここでも、C A R T細胞療法は、小腫瘍モデル (4 日目) において混合抗原腫瘍 (1 : 1 比) に対して効能が低く ($p < 0.001$; 図 7 C 及び 図 7 D)、I L 1 3 R α 2 陰性腫瘍に対する応答には、腫瘍微小環境が確立されなければならなかった。つまり、上記観察から、G B M の T M E を C A R T細胞療法によって変化させると、抗腫瘍応答が高まり、内因性抗腫瘍記憶応答が促進されることが示唆される。

C A R T療法が腫瘍特異的T細胞の生成を増強することができるかをより直接的に評価するため、本発明者らは、I L 1 3 R α 2 + K - L u c 神経膠腫モデルにおける未治療及びC A R T細胞治療マウスから腫瘍内内因性 (C D 3 + C D 1 9 -) 及びC A R T細胞 (C D 3 + C D 1 9 +) を単離し (治療後 3 日目) (図 8)、腫瘍細胞とエキスピボで共培養するか、又は腫瘍があるマウスに養子移入した (図 5 C)。インビトロで、C A R T細胞治療腫瘍から単離された内因性T細胞は、共培養アッセイ (1 0 : 1、エフェクター : 標的比 ; 7 2 時間) において、I L 1 3 R α 2 + K - L u c 細胞の死滅及びT細胞増殖の増強を示したが、対照未治療群では示さなかった (図 5 D 及び 図 5 E)。インビボ機能を評価するために、未治療マウス及びC A R T細胞治療マウス由来の内因性T細胞を単離し、I L 1 3 R α 2 + K - L u c 腫瘍保有マウスに養子移入した。腫瘍進行の測定により、C A R T治療マウスから単離された内因性T細胞を注射したマウスでは、対照群と比較して腫瘍増殖が有意に低下したことが実証された (図 5 F)。つまり、上記結果から、C A R T細胞には、抗原拡散及び腫瘍特異的T細胞応答の生成を促進する機能があることが立証された。

【実施例 3】

【 0 0 6 6 】

C A R T細胞は、腫瘍微小環境において自然免疫サブセット及び適応免疫サブセットを活性化する

C A R T細胞療法後の内因性抗腫瘍免疫の確立と同時に起こる T M E における免疫関連変化を解明するために、本発明者らは、遺伝子及びタンパク質発現プロファイリングによってリンパ系及び骨髄系コンパートメントをとともに調べた。最初にリンパ系コンパートメントについて、本発明者らは、精製腫瘍内 C D 3 + 細胞のナノストリング分析を行い、未治療と比較してC A R T治療マウスにおいてトランスクリプトームレベルでの全体的な変化を実証した (図 9 A)。分解能を高め、亜集団をより正確に定義するために、本発明者らは、非治療マウス又はC A R T治療マウスから単離されたC D 4 5 細胞に s c R N A s e q を行った (図 1 0 A 及び 図 1 0 B)。次いで、リンパ系集団及び骨髄系集団をコンピュータで分離し、より高い粒度で s c R N A s e q データを再分析した。このアプローチにより、C D 8 + T細胞の3つの異なるサブセット (C D 8 __ L 2、C D 8 __ L 3、及び C D 8 __ L 4)、C D 4 + T細胞の2つのサブセット (C D 4 __ L 1、C D 4 __ L 6)、N K細胞の1つのサブセット、B細胞の2つのサブセット、及び $\gamma \delta$ T細胞に類似する1つのサブセット (図 9 B 及び 図 1 0 C) を含む、古典的マーカー遺伝子の分布によって広く定義される9つの異なるリンパ系亜集団がもたらされた (図 1 0 C)。C D 8 __ L 2 の頻度は変化しなかったが、興味深いことに、C A R T治療後、C D 8 __ L 3 及び C D 8 __ L 4 サブクラスターの頻度が増加した (図 1 0 C)。T細胞サブクラスターに注目すると、C D 8 __ L 3 は主に治療後に観察され、T細胞輸送に関連する C x c r 3 の発現 (図 1 1 a)、並びに活性化されたレジデントメモリー C D 8 T細胞表現型に対応する I t g a e (C D 1 0 3)、C d 7 4 (H l a d r) 及び I f i t m 1 (I F N 誘導性膜貫通タンパク質 1) の発現 (図 9 C) を特徴とする。C D 8 __ L 4 は治療後に増殖し、K

i 6 7、C d 7 4、及びG z m a 遺伝子の発現がより高まると、高度に活性化されたエフェクターT細胞として同定された(図9C)。CD4サブセット内で、CD4__L1クラスターの頻度は、治療後には変化せず、CAR T治療群におけるエフェクターメモリーCD4 T細胞に関連するI l 7 r、T c f 7、及びI t g a 4 遺伝子の発現は適度に高まった(図10C及び11A)。CD4、F o x p 3、G I T R (T n f r s f 1 8) 及びC t l a 4 の発現に基づいてサブクラスターCD4__L6によって定義される腫瘍内制御性T細胞(T r e g)は、CAR T療法後に低下した(図11B)。全体として、遺伝子セット濃縮分析(G S E A)により、ほとんどのT細胞サブクラスターにおいて活性化され及びT h 1 応答に関連する遺伝子シグネチャーが濃縮されたことが明らかになった(図9D)。つまり、上記研究から、CAR T細胞が腫瘍内のリンパ系コンパートメントを劇的に変化させ、活性化された、メモリー又はエフェクターT細胞集団のクラスターをもたらし得ることが立証された。

10

【0067】

CAR T細胞療法後のT細胞集団を細胞レベルでさらに特徴付け、内因性T細胞対養子移入T細胞の変化を区別するため、CD45 . 1 CAR T細胞を同質遺伝子的にミスマッチさせたものを用いて、CD45 . 2マウスに移植されたI L 1 3 R α 2 + K - L u c 腫瘍を治療した(図9e)。頭蓋内送達後、CAR T細胞(CD3 + CD45 . 1 + CD19 +)は、モック形質導入T細胞(CD3 + CD45 . 1 + CD19 -)とは異なり、T細胞数並びに活性化(CD69 +)、細胞傷害機能(G Z M B +)及び増殖(K i 6 7 +)のマーカー発現が有意に増加し(図9f)、観察されたエフェクター活性がCAR依存性であることが示された。興味深いことに、CAR T療法後にのみ、活性化(CD69 +)、増殖性(K i 6 7 +)、及び細胞傷害性表現型(G Z M B +)がある内因性T細胞(CD3 + CD45 . 2 +)数が有意に増加したが、これは未治療又は偽治療対照では検出されなかった(図9G)。これは、CAR T療法後の腫瘍内CD3 + T細胞におけるG Z M A、G Z M B、及びP R F 1 遺伝子の上方制御を実証するq P C R 分析と一致した(図12)。上記結果から、CAR T細胞が内因性T細胞活性化及び増殖を高めることが立証され、CAR T細胞療法後に単離された内因性腫瘍内T細胞が抗腫瘍活性があるという本発明者らの以前の知見と一致した(図5D ~ 5F)。それらが神経膠腫腫瘍において優勢な免疫集団であり、神経膠腫の病因において決定的な機能があるため、本発明者らは次に、ミクログリア/マクロファージ等の先天性骨髄細胞における変化を評価した(17)。単一細胞レベルでの腫瘍内骨髄系集団の分析により、CAR T療法後に著しくリモデリングされた17個の別個の骨髄系亜集団が同定された(図13A)。本発明者らは、神経膠腫TMEにおける腫瘍内単球/マクロファージ/ミクログリア/DC区画の興味深い複雑性及び動態を観察した。いくつかのマクロファージ/単球亜集団は頻度が減少したが、他の集団は高まり、TMEを再形成した。7つの主要な単球/マクロファージ(I t g a m、C d 6 8)、4つのミクログリア(T m e m 1 1 9 及びP 2 r y 1 2)、4つのDC及び好中球の2つのクラスター(S 1 0 0 A 9)亜集団を同定した。遺伝子セット濃縮分析(G S E A)により、CAR治療群におけるI F N γ 刺激マクロファージ及びミクログリアに関連する遺伝子が明らかに濃縮された(図13B)。主要な骨髄系集団(マクロファージ、ミクログリア、及び好中球)のさらなる評価により、成熟及びI F N γ 活性化マクロファージ並びに刺激好中球に関連する遺伝子の発現がより高く同定され(図13C)、常在自然免疫細胞がI F N γ 媒介性活性化に曝露されていることがさらに確認された。

20

30

40

【0068】

CAR T療法の3日後のTMEからの腫瘍内ミクログリア/マクロファージ細胞(CD11b +)のナノストリング分析では、抗原プロセッシング及び提示を媒介する遺伝子(例えば、C d 7 4、H 2 - A b 1、H 2 - A a、H 2 - E b 1)の濃縮が示された(図13D)。s c R N A s e q を用いたさらなる分析により、マクロファージ/ミクログリアサブクラスターの大部分が抗原プロセッシング及び抗原提示に関与し得ることが明らかになった(図13E)。フローサイトメトリーによって常在ミクログリア/マクロファージ集

50

団におけるCAR T細胞性変化を評価して、本発明者らは、CAR T治療マウスで、活性化された脳常在マクロファージ/ミクログリア細胞(CD86⁺、MHCII^{high}、MHCII^{high})の頻度及び数の増加が見出した(図13F)。骨髓系コンパートメントの評価により、また、炎症性サイトカインIFN γ の頻度が有意に高まったことが明らかになった(図13F)。つまり、上記データにより、CAR T療法が、GBM免疫ランドスケープを変化させ、宿主先天性及び適応免疫細胞を活性化することが示された。上記結果により、また、局所免疫細胞の活性化の誘導におけるIFN γ の主要な機能がさらに明らかになった。

【実施例4】

【0069】

CAR T細胞におけるIFN γ の欠損は、インビボ抗腫瘍活性及び宿主免疫細胞の活性化を損なう

骨髓細胞が、グリオーマTMEにおいて最も大きな集団を構成し、本発明者らのscRNAseq分析が、マクロファージ及びミクログリアサブクラスター内のIFN γ 刺激に関連する遺伝子シグネチャーを同定したことを考慮すると(図13B)、本発明者らは、刺激されたCAR T細胞によって産生されたIFN γ が、常在マクロファージ/ミクログリア細胞の活性化並びにその後の適応免疫反応のプライミング及び誘導の調節に関与し得ると推論した。

IFN γ は、活性化の際にCAR T細胞によって豊富に産生される重要なエフェクターサイトカインの1つであり、原型マクロファージ活性化因子である(18)。CAR T細胞によって分泌されるIFN γ が、常在マクロファージ/ミクログリア細胞の表現型及び機能において観察される変化の原因であるかを調べるために、CAR T細胞を、WT(CAR T^{WT})又はIFN γ -/- (CAR T^{IFN γ -/-})マウスから開発し(図14A)、それに応じて特徴付けた。両方のCAR T細胞集団(CAR T^{WT}及びCAR T^{IFN γ -/-})におけるCAR形質導入率、生存率、増殖及びCAR 4:CAR 8の比は、同等の治療産物を示した(図14B)。次に、本発明者らは、WTマウス由来のCAR T細胞と比較してインビトロ殺傷アッセイを行い、IFN γ -/-マウス由来のCAR T細胞の機能性を検証したが、そこで1:1のエフェクター対標的比で同等の殺傷効力が実証された(図14C)。CAR T多機能性の評価で、CAR T^{WT}及びCAR T^{IFN γ -/-}細胞でTNF α 及びGZMBは同等に産生されることが実証され、CAR T^{IFN γ -/-}におけるIFN γ 産生の欠損が予測された(図14D)。インビボで、CAR T^{IFN γ -/-}を受けたマウスは、CAR T^{WT}で治療されたマウスと比較して全生存が低く、これは、CAR T細胞におけるIFN γ 欠損のために抗がん活性が低下し、生存が低下することを示す(図14E及び図14F)。TME全体の分析により、CAR T細胞を受けたマウスでは活性化及び炎症性サイトカインに関連する遺伝子の発現が高まり、逆に、抑制表現型及び腫瘍内免疫浸潤物の機能に関連する遺伝子の発現が低下したことから(図14G)、CAR T細胞によるIFN γ 分泌の欠損により神経膠腫TMEが変化することが示された。IFN γ は、CD8 T細胞の活性化を誘導し(9)、Th1 CD4細胞の極性を促進し(19)、マクロファージ/ミクログリア細胞を再プログラム又は活性化する(6、7)多面的サイトカインである。したがって、次に、本発明者らは、CAR T細胞によって分泌されるIFN γ の欠損が宿主免疫細胞に影響を及ぼすかを評価した。CAR T細胞療法の3日後のTMEのフローサイトメトリ分析で、内因性T細胞及びCAR T細胞のT細胞数が有意に低下したが、それは活性化(CD69⁺)T細胞の減少と相関する(図14H及び図14I)。さらに、CAR T^{IFN γ -/-}細胞と比較して、CAR T^{WT}を受けた腫瘍担持マウスのMHCII⁺/MHCII⁺及びCD86⁺マクロファージ/ミクログリア細胞活性化の頻度は有意に増加した(図14J)。したがって、CAR T抗腫瘍活性の結果としてのIFN γ 産生により、T細胞が活性化及び再活性化され、マクロファージ/ミクログリア細胞の活性化及び抗原提示能が高まる。

【実施例5】

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

宿主における I F N γ シグナル伝達の欠損により、インビボでの C A R T 抗腫瘍活性が低下する

以前の研究は、抗 P D 1 治療等の免疫療法に対する応答のシグネチャーとしての I F N γ シグナル伝達を報告する (2 0)。宿主 I F N γ シグナル伝達が C A R T 媒介性免疫応答において機能するかを調べる、C A R T W^t 細胞を K - L u c 保有 W T 又は I F N γ R - / - マウスに養子移入した (図 1 5 A)。C A R T W^t を受けた I F N γ R - / - マウスの生存は不利で、宿主免疫細胞の I F N γ シグナル伝達の欠損で、C A R T 細胞の抗腫瘍活性及び全生存の低下が示唆された (図 1 5 B 及び 図 1 5 C)。

T M E の遺伝子発現分析により、C A R 療法中の宿主における I F N γ シグナル伝達の欠損により、活性化及び炎症促進性応答に關与する遺伝子 (C D 4 0、N O S 2、T N F α 、G Z M A、G Z M B、P R F 1、及び I F N γ) の発現が低下することが明らかになった (図 1 5 D)。免疫ランドスケープにおける C A R T 細胞媒介性変化をさらに調べるため、本発明者らは、同質遺伝子的にミスマッチした (T h y 1 . 1 +) C A R T W^t 細胞を K - L u c 保有 W T 又は I F N γ R - / - マウスに養子移入した。T M E のフローサイトメトリー分析により、C A R T 細胞療法後の 3 日後という早期に、I F N γ R - / - マウスと比較して、W T マウスにおけるマクロファージ / ミクログリア細胞 (C D 1 1 b + C D 8 6 + M H C I + M H C I I +) の活性化が有意に高まったことが示された (図 1 5 E)。W T マウスと比較して、増殖能及びエフェクターサイトカイン産生能で活性化された内因性 T 細胞 (T h y 1 . 2 + C D 3 +) の数は、I F N γ R - / - マウスにおいて有意に低かった (図 1 5 F)。興味深いことに、W T マウスと比較して、養子移入された C A R T 細胞 (T h y 1 . 1 + C D 3 +) は、I F N γ R - / - マウスと比較して有意に高い数、増殖性 (K i 6 7 +) 及び細胞傷害性表現型 (I F N γ + 及び G Z M B +) を示し (図 1 5 G)、これは、T M E における C A R T 細胞活性を促進する宿主免疫細胞からの潜在的な I F N γ ポジティブフィードバックを示唆する。つまり、上記結果から、宿主と養子移入された免疫細胞との間に相互作用が存在し、神経膠腫 T M E における宿主 I F N γ シグナル伝達が、C A R T 療法中に強力な免疫応答を開始するために必要であることが確立された。

C A R T 細胞によって分泌される I F N γ が、常在マクロファージ / ミクログリア細胞の表現型及び機能において觀察される変化の原因であるかどうかを調べるために、野生型 (C A R T W^t) 又は I F N γ - / - (C A R T $I F N \gamma$ - / -) マウスから C A R T 細胞を作製し (図 1 5 A)、それに応じて特徴付けた。両方の C A R T 細胞集団 (C A R T W^t 及び C A R T $I F N \gamma$ - / -) における C A R 形質導入率、生存率、増殖は、C A R 4 : C A R 8 T 細胞の比にいくらかの差がある同等の治療生成物を示した (P < 0 . 0 5 ; 図 1 5 B)。次に、本発明者らは、W T マウス由来の C A R T 細胞と比較してインビトロ殺傷アッセイを行うことによって、I F N γ - / - マウス由来の C A R T 細胞の機能性を検証し、これは、1 : 1 の E : T 比で同等の殺傷効力を実証した (図 1 5 C)。C A R T 細胞多機能性の評価は、C A R T W^t 及び C A R T $I F N \gamma$ - / - 細胞の両方における T N F α 及び G Z M B の同等の産生を実証し、C A R T $I F N \gamma$ - / - における I F N γ 産生の欠損が予測された (図 1 5 D)。インビボで、C A R T $I F N \gamma$ - / - を受けたマウスは、C A R T W^t で治療されたマウスと比較して低い全生存を示し、C A R T 細胞における I F N γ 欠損がインビボでそれらの抗がん活性を弱めることを示した (図 1 5 E 及び 1 5 F)。C A R T 細胞療法後の 3 日後の腫瘍及び関連する T M E の遺伝子発現分析により、C A R T W^t 細胞を受けたマウスにおける活性化及び炎症促進性サイトカインに關与する遺伝子における発現が増強され、孫一方では、腫瘍内免疫浸潤物の抑制表現型及び機能に關与する遺伝子の発現が低減されたことが明らかになり (図 1 5 G)、C A R T 細胞による I F N γ 分泌の欠損により、神経膠腫 T M E が変化することが示された。I F N γ は、C D 8 T 細胞の活性化を誘導し、T h 1 C D 4 細胞の極性を促進し、マクロファージ / ミクログリア細胞を再プログラム又は活性化する多面的サイトカインである。したがって、本発明者らは次に、C A R T 細胞によっ

10

20

30

40

50

て分泌される $IFN\gamma$ の欠損が宿主免疫細胞に影響を及ぼすかどうかを評価した。CAR T細胞療法の3日後のTMEのフローサイトメトリー分析により、内因性及びCAR T細胞の両方において、T細胞数が有意な減少し、これは活性化 ($CD69+$) T細胞の減少と相関した (図15H及び15I)。さらに、CAR T $IFN\gamma^{-/-}$ 細胞と比較して、CAR T W^t を受けた担γウスにおけるMHC I + / MHC II + 及びCD86 + マクロファージ/ミクログリア細胞活性化の頻度の有意な増加が観察された (図15J)。重要なことに、CAR T細胞による $IFN\gamma$ 分泌が欠損すると、CAR T W^t 細胞と比較して、CAR T $IFN\gamma^{-/-}$ 細胞を受けたマウスにおいてより高いM2型腫瘍マクロファージがもたらされた。したがって、CAR T細胞抗腫瘍活性の結果としての $IFN\gamma$ 産生により、T細胞の活性化及び再活性化並びにマクロファージ/ミクログリア細胞の再プログラミングがもたらされ、それらの活性化及び抗原提示能が高まった。

10

【実施例6】

【0071】

ヒトCAR T細胞療法は、患者宿主免疫細胞を調節する

本発明者らは次に、GBM患者におけるヒト内因性免疫細胞に対するCAR T細胞抗腫瘍活性の影響を調査した。CAR T細胞がGBM患者単球又はマクロファージの活性化を促進することができるかどうかを臨床的に評価するために、本発明者らは、CAR T細胞抗腫瘍活性の存在下で患者骨髓系集団を表現型的に特徴付けるインビトロアッセイを開発した。患者由来神経膠腫腫瘍に対するヒトCAR T細胞の共培養からの上清を収集し、その後、神経膠腫患者由来単球 (図16A)、エクスピボ分化患者マクロファージ又は全CD3 + 患者T細胞 (図17A) と共にインキュベートした。表現型及び形態学的評価により、活性化マーカー ($CD14 + CD86 + / CD80 +$ 及び $CD14 + HLA Dr +$) の発現の増加によって実証されるように、CAR T腫瘍共培養からの馴化培地 (CM) が患者由来単球又はマクロファージの分化及び活性化を促進することが明らかになり、これは古典的M1マクロファージに関連する遺伝子の発現の増強と相関する (図16B ~ 16D 及び図17B ~ 17D)。したがって、CAR T腫瘍共培養からのCMへの曝露により、CD69の発現の亢進によって証明されるように、GBM患者血液から単離されたT細胞の活性化が誘導された (図17E 及び図17F)。重要なことに、マクロファージ及びT細胞における $IFN\gamma$ シグナル伝達の遮断により、活性化が低減され (図17B ~ 17F)、GBM患者における宿主免疫細胞のCAR T媒介性活性化における $IFN\gamma$ の影響が強調される。これらの知見を総合すると、CAR T細胞抗腫瘍機能によって分泌された $IFN\gamma$ により、単球の活性化マクロファージへの極性化が促進され、さらに分化マクロファージの活性化が誘導され、T細胞活性化が促進されることが示唆される。

20

30

【0072】

本発明者らはGBMの本発明者らの免疫適格マウスモデルを実証したため、最後に、CAR T細胞に臨床現場で腫瘍特異的T細胞の生成を誘導する機能があるかどうかを評価することを目的とした。この現象を正確に調査するために、本発明者らは、完全応答を示し、CAR T療法に対してユニークに反応したケースレポート由来の試料を評価した (4)。CAR T細胞治療前 (Pre-CAR T) 及びCAR T療法に対する応答中 (Post-CAR T) に血液からT細胞を単離した (図17G)。単離されたT細胞を刺激し、照射された自己腫瘍細胞の存在下で増殖させた。T細胞集団のフローサイトメトリー評価は、CAR T細胞療法の開始前に対する応答中に単離されたT細胞の細胞内 $IFN\gamma$ 及び増殖の亢進によって示されるように、腫瘍反応性が明らかに高まった (図17H 及び図17I)。重要なことに、エクスピボで増殖させたT細胞と自己患者神経膠腫腫瘍又は無関係な腫瘍細胞株との患者由来の共培養において、CAR T療法に対する応答中に単離されたT細胞は、自己腫瘍細胞対無関係な腫瘍細胞に対して腫瘍特異的死滅を示した (図17J)。これらの結果では、腫瘍細胞がIL13R α 2陰性であることが考慮された (図17K)。これらの知見は、有効なCAR T療法には、宿主免疫細胞を刺激し、腫瘍特異的T細胞応答の生成を促進する可能性があり、さらに、宿主免疫細胞がC

40

50

A R T 治療の成功に重要に機能するという本発明者らの前臨床研究が確認された。

【実施例 7】

【0073】

IL - 13 CAR T 及びインターフェロンガンマの共発現

本発明者らは、実施例 1 の IL - 13 CAR (図 1 A) が T2A スキップ配列を介して未成熟マウスインターフェロンガンマに連結されている発現カセットを作製することによって、インターフェロンガンマの同時発現の影響を調べた (図 20 A)。本発明者らは、IL13R α 2 - CAR / IFNg を設計及び構築した。マウス及びヒトプラットフォームに関して、IFNg を組み込むことが実証される。CAR カセットにおいて、CAR T 細胞の同等の形質導入及び増殖が実現可能である (図 20 A)。ベクターを配列決定し、検証した。マウス T 細胞を単離し、IL - 13 CAR 及び切断型 CD19 (シグナル伝達ドメインを欠く) 又は IL - 13 CAR 及びマウスインターフェロンガンマを発現するベクターのいずれかで形質導入した (図 20 B)。培養上清を回収し、フローサイトメトリーを用いて、CAR 発現のマーカーとしての IL - 13 の存在を評価した。両方の構築物が IL - 13 CAR を発現し、形質導入効率は FACS により 50 % 超である (図 20 C)。さらに、IL13R α 2 - CAR / IFNg ベクターが T 細胞に IFNg を発現及び分泌する機能を付与していることを確認するため、エクスピボで展開した増殖させた IL13R α 2 - CAR / IFNg 及び IL13R α 2 - CAR T 細胞から上清を採取し、ELISA で IFNg レベルを測定した (図 1 D)。ELISA によるインターフェロンガンマ産生の測定から、IL - 13 CAR T - インターフェロンガンマ構築物のみがインターフェロンガンマを発現したことが示された (図 20 D)。

10

20

【0074】

次に、本発明者らは、CAR T 細胞の表現型を評価した。本発明者らの研究から、マウス (図 21 E) 及びヒト (図 22 C) T 細胞における、IL13R α 2 - CAR / IFNg と IL13R α 2 - CAR 間に表現型の差異がないことが実証された。簡潔には、マウス IL - 13 CAR T 細胞及びマウス IL - 13 CAR - インターフェロンガンマ T 細胞を、マウス神経膠腫腫瘍細胞と 1 : 3 のエフェクター : 標的比で 24 時間共培養した。図 21 A ~ 21 C に示されるように、IL - 13 CAR - インターフェロンガンマ T 細胞はともに、優れた増殖及び腫瘍細胞死滅を示した。T 細胞活性化は、CD69 発現を測定することによって評価した。図 21 D に見られるように、IL - 13 CAR T 細胞及び IL - 13 CAR T - インターフェロンとともに T 細胞の活性化は類似していた。

30

【0075】

ヒト IL - 13 CAR (E13Y 突然変異があるヒト IL - 13、ヒト CD8 ヒンジ、ヒト CD8 TM、ヒト 4 - 1BB 共刺激ドメイン及びヒト CD3 ゼータ) を発現する CAR T 細胞を、ヒトインターフェロンガンマを共発現するか又は共発現しないで産生した。ヒト IL - 13 CAR T 細胞及びヒト IL - 13 CAR - インターフェロンガンマ T 細胞を、患者由来神経膠腫腫瘍細胞と、1 : 25 のエフェクター : 標的比で 24 時間共培養した。T 細胞及び腫瘍細胞を評価した。図 22 A に見られるように、IL - 13 CAR - インターフェロンガンマ T 細胞は、優れた増殖及びほぼ同様の T 細胞死滅を示した。重要なことに、抗原陽性腫瘍と共培養した場合、マウス (図 21 C) 及びヒト (図 22 B) において、IL13R α 2 - CAR T 細胞と比較して、IL13R α 2 - CAR / IFNg T 細胞の増殖が高まる。マウス及びヒトともに、IL13R α 2 - IFNg CAR 細胞と比較して、IL13R α 2 - CAR / IFNg T 細胞では殺傷能がわずかに亢進したことが観察された。

40

【0076】

重要なことに、IL13R α 2 - CAR / IFNg T 細胞由来の分泌された IFNg は機能的であり、免疫刺激成分があることを確認するために、IFNg を構成的に発現するように組換えられた、エクスピボで増殖させた T 細胞由来の上清をマクロファージ培養物に添加した (図 26 A)。IL13R α 2 - CAR / IFNg 培養条件に曝露されたマク

50

ロファージは、IL13R α 2 - CAR T細胞から収集された上清と比較して、より高い炎症促進性及び代謝的に活性な表現型を示した(図26B)。つまり、これらの結果から、IL13R α 2 - CAR / IFN γ は、IFN γ を発現及び分泌し、マクロファージ等の内因性自然免疫集団を活性化する機能があることがわかる。

【0077】

本発明者らは、本発明者らの合成モデルにおいて、腫瘍が高レベル(図28B;左)又は中/低(図28C;右)であるマウスにおいて、IL13R α 2 - CAR / IFN γ とIL13R α 2 - CARの抗腫瘍活性を評価するパイロット試験を行った。IL13R α 2抗原がある腫瘍があるおけるIL13R α 2 - CARと比較した。2つのCARの機能は、高抗原発現腫瘍において同等であるが、IL13R α 2 - CAR / IFN γ で治療した中程度の抗原発現腫瘍があるマウスにおける抗腫瘍活性は、IL13R α 2 - CARと比較して有意に変化した。

10

【0078】

IFN γ のグローバルインパクトの部分として、本発明者らはまた、IL13R α 2 - IFN γ CARが、転移疾患又は遠隔部位の腫瘍に対して優れた抗腫瘍活性を示すか否かを試験した。したがって、マウスIL-13 CAR T細胞及びマウスIL-13 CAR - インターフェロンガンマT細胞を、転移性黒色腫のマウスモデルにおいて評価した(図23)。簡潔には、腫瘍細胞をマウスの両方の側腹部に注射した。腫瘍が所定のサイズに達したら、マウスIL-13 CAR T細胞及びマウスIL-13 CAR - インターフェロンガンマT細胞を1つの腫瘍に局所的に注射した。腫瘍サイズを両側で測定した。図23のグラフは、非治療側の腫瘍体積を示す。図から分かるように、IL-13 CAR T - インターフェロンガンマT細胞は、IL-13 CAR T細胞よりも大きなアブスコパル効果を示した。興味深いことに、黒色腫があるマウスに対する本発明者らの研究は、IL13R α 2 - CAR / IFN γ T細胞は、遠位腫瘍を標的化する優れた機能があることを見出した。これらの知見は、GBM等の多病巣性病変があるがんに対する重要な治療アプローチとして、IL13R α 2 - CAR / IFN γ を強く強調する。

20

【0079】

実験は、IL13R α 2 + 原発性脳腫瘍株(PBT)を移植した同系免疫応答性グリオーマモデル及びNSGマウスにおけるIL13R α 2 - IFN γ CARのインビボ機能活性を試験するように設計した。本発明者らは、IL13R α 2 - CAR / IFN γ T細胞は、中/低抗原腫瘍があるマウスにおいて優れた抗腫瘍活性があり、転移性黒色腫モデルで遠隔部位で腫瘍が根絶されることを証明した。免疫刺激剤としてIFN γ の重要性及びIL13R α 2 - CAR / IFN γ T細胞の治療的重要性を評価するために、本発明者らは、CAR T細胞、マクロファージ、及び腫瘍細胞を用いて三元共培養系を開発した(図31A~31B)。その結果は、マクロファージのような他の免疫細胞の存在下で、IL13R α 2 - CAR / IFN γ T細胞は、有意に優れた抗腫瘍機能を示し、内因性免疫を刺激することを示唆する。

30

【実施例8】

【0080】

IL-13 CAR T及びインターフェロンガンマの同時発現の最適化

40

本発明者らはまた、IFN γ 発現を最適化及び調節することによって、効能及び安全性とともに優先するための、異なるIL13R α 2 - CAR / IFN γ 変異体を設計し、かつ、構築した。本発明者らは、図29Aに示される構築物の設計及び配列チェックに成功した。T細胞にCAR / IFN γ 変異体を形質導入し、かつ上清を回収してIFN γ 産生を確認し、かつ、機能性を確認するために、IL13R α 2 + 腫瘍と共培養した(図29B)。CAR / IFN γ 変異体を、異なるレベルのIFN γ 発現及び分泌について評価した。強力なプロモーターであるEF1プロモーターと比較して、p κ g100プロモーターはより弱いプロモーターである。p κ g100プロモーター下にIFN γ があるCAR T細胞は、IFN γ レベルの低下を示した(図29C)。IL13R α 2 - CAR / IFN γ ^{low} T細胞は、IFN γ の過剰産生に関連する安全上の懸念に対処する。次に、細

50

胞毒性機能を確認するために、 $IL13R\alpha2-CAR/IFN\gamma^{low}$ T細胞を $IL13R\alpha2+$ 腫瘍と1:50のエフェクター対標的比で5日間共培養した。生存腫瘍数の評価により、 $IL13R\alpha2-CAR/IFN\gamma^{low}$ T細胞には標準 $IL13R\alpha2-CAR$ T細胞に匹敵する細胞傷害機能があることが示された(図29D)。

【0081】

本発明者らは、 $IFN\gamma$ 発現を制御するために合成NFATプロモーターを用いる誘導性構築物系を設計した。この構築物を、 CAR T細胞が活性化された場合にのみ $IFN\gamma$ が確実に発現するように、目的の遺伝子の発現を制御するように設計した。概念の証明として、本発明者らは、GFPをNFATプロモーターの制御下に置いた。本発明者らの研究により、 $IL13R\alpha2$ 抗原陽性腫瘍の存在下で CAR が活性化すると、NFATプロモーターが機能的であり、GFP発現を誘導することができることが実証された(図27A~27C)。

10

次に、本発明者らは、GFP遺伝子を $IFN\gamma$ で置き換えた(図30A)。構築物で形質導入されたT細胞を、1:50のエフェクター対標的比で5日間、 $IL13R\alpha2+$ 腫瘍と共培養した(図30B)。本発明者らの結果は、NFAT CAR が機能的であり、標準的な $IL13R\alpha2-CAR$ T細胞に匹敵する死滅能力を示すことを確認する(図30C)。これらの結果から、 CAR 構築物へ合成NFATプロモーターを組み込むと、 CAR T細胞の機能が損なわれないことが示された。

参考文献

【0082】

20

【表4】

References

1. McGranahan T, Therkelsen KE, Ahmad S, Nagpal S. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. *Current treatment options in oncology* 2019, **20**(3): 24.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018, **68**(1): 7-30.
3. Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2017, **35**(21): 2402-2409.

30

【0083】

40

50

【表 5】

4. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, *et al.* Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *The New England journal of medicine* 2016, **375**(26): 2561-2569.
5. Hegde M, Joseph SK, Pashankar F, DeRenzo C, Sanber K, Navai S, *et al.* Tumor response and endogenous immune reactivity after administration of HER2 CAR T cells in a child with metastatic rhabdomyosarcoma. *Nature communications* 2020, **11**(1): 3549.
6. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, *et al.* Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *International journal of cancer* 2009, **125**(2): 367-373. 10
7. Rock RB, Hu S, Deshpande A, Munir S, May BJ, Baker CA, *et al.* Transcriptional response of human microglial cells to interferon-gamma. *Genes and immunity* 2005, **6**(8): 712-719.
8. Castro F, Cardoso AP, Goncalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in immunology* 2018, **9**: 847.
9. Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon-gamma derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell death & disease* 2017, **8**(6): e2836. 20
10. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(11): 836-848.
11. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current opinion in immunology* 2010, **22**(3): 333-340.
12. Brown CE, Aguilar B, Starr R, Yang X, Chang WC, Weng L, *et al.* Optimization of IL13Ralpha2-Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells for Improved Anti-tumor Efficacy against Glioblastoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2018, **26**(1): 31-44. 30
13. Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT, McLaughlin ME, Jacks T. Nf1, Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. *Nature genetics* 2000, **26**(1): 109-113.
14. Flores CT, Wildes TJ, Drake JA, Moore GL, Dean BD, Abraham RS, *et al.* Lin(-)CCR2(+) hematopoietic stem and progenitor cells overcome resistance to PD-1 blockade. *Nature communications* 2018, **9**(1): 4313.
15. Ausman JI, Shapiro WR, Rall DP. Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. *Cancer research* 1970, **30**(9): 2394-2400. 40

【 0 0 8 4 】

【表 6】

16. Reardon DA, Gokhale PC, Klein SR, Ligon KL, Rodig SJ, Ramkissoon SH, *et al.* Glioblastoma Eradication Following Immune Checkpoint Blockade in an Orthotopic, Immunocompetent Model. *Cancer immunology research* 2016, **4**(2): 124-135.
17. Gutmann DH, Kettenmann H. Microglia/Brain Macrophages as Central Drivers of Brain Tumor Pathobiology. *Neuron* 2019, **104**(3): 442-449.
18. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, *et al.* Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* 2007, **447**(7142): 326-329. 10
19. Schulz EG, Mariani L, Radbruch A, Hofer T. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* 2009, **30**(5): 673-683.
20. Cloughesy TF, Mochizuki AY, Orpilla JR, Hugo W, Lee AH, Davidson TB, *et al.* Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nature medicine* 2019, **25**(3): 477-486.
21. Maus MV, Fraietta JA, Levine BL, Kalos M, Zhao Y, June CH. Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annual review of immunology* 2014, **32**: 189-225. 20
22. Quail DF, Joyce JA. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer cell* 2017, **31**(3): 326-341.
23. Giering A, Pszczolkowska D, Walentynowicz KA, Rajan WD, Kaminska B. Immune microenvironment of gliomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2017, **97**(5): 498-518.
24. Jansen CS, Prokhnevskaya N, Master VA, Sanda MG, Carlisle JW, Bilen MA, *et al.* An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* 2019, **576**(7787): 465-470. 30
25. Corrales L, Glickman LH, McWhirter SM, Kanne DB, Sivick KE, Katibah GE, *et al.* Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell reports* 2015, **11**(7): 1018-1030.
26. Corrales L, McWhirter SM, Dubensky TW, Jr., Gajewski TF. The host STING pathway at the interface of cancer and immunity. *The Journal of clinical investigation* 2016, **126**(7): 2404-2411.
27. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, Khan N, Mendonca LE, Pacis A, *et al.* BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* 2018, **172**(1-2): 176-190 e119. 40

【 0 0 8 5 】

【表 7】

28. Yao Y, Jeyanathan M, Haddadi S, Barra NG, Vaseghi-Shanjani M, Damjanovic D, *et al.* Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell* 2018, **175**(6): 1634-1650 e1617.
29. Grasso CS, Tsoi J, Onyshchenko M, Abril-Rodriguez G, Ross-Macdonald P, Wind-Rotolo M, *et al.* Conserved Interferon-gamma Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer cell* 2020.
30. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, *et al.* A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 2017, **9**(399). 10
31. You F, Jiang L, Zhang B, Lu Q, Zhou Q, Liao X, *et al.* Phase 1 clinical trial demonstrated that MUC1 positive metastatic seminal vesicle cancer can be effectively eradicated by modified Anti-MUC1 chimeric antigen receptor transduced T cells. *Science China Life sciences* 2016, **59**(4): 386-397.
32. Wang D, Aguilar B, Starr R, Alizadeh D, Brito A, Sarkissian A, *et al.* Glioblastoma-targeted CD4+ CAR T cells mediate superior antitumor activity. *JCI insight* 2018, **3**(10): e99048. 20
33. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, *et al.* Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *The New England journal of medicine* 2016, **375**(26): 2561-2569.
34. Wang D, Starr R, Chang WC, Aguilar B, Alizadeh D, Wright SL, *et al.* Chlorotoxin-directed CAR T cells for specific and effective targeting of glioblastoma. *Sci Transl Med* 2020, **12**(533).
35. Wang D, Aguilar B, Starr R, Alizadeh D, Brito A, Sarkissian A, *et al.* Glioblastoma-targeted CD4+ CAR T cells mediate superior antitumor activity. *JCI insight* 2018, **3**(10).
36. Brown CE, Starr R, Martinez C, Aguilar B, D'Apuzzo M, Todorov I, *et al.* Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer research* 2009, **69**(23): 8886-8893. 30
37. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature reviews Cancer* 2003, **3**(9): 666-675.
38. Alizadeh D, White EE, Sanchez TC, Liu S, Zhang L, Badie B, *et al.* Immunostimulatory CpG on Carbon Nanotubes Selectively Inhibits Migration of Brain Tumor Cells. *Bioconjugate chemistry* 2018, **29**(5): 1659-1668.
39. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM, 3rd, *et al.* Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 2019, **177**(7): 1888-1902 e1821. 40

【 0 0 8 6 】

【表 8】

40. Heng TS, Painter MW, Immunological Genome Project C. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nature immunology* 2008, **9**(10): 1091-1094.
41. Aran D, Looney AP, Liu L, Wu E, Fong V, Hsu A, *et al.* Reference-based analysis of lung single-cell **sequencing** reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nature immunology* 2019, **20**(2): 163-172.
42. Godec J, Tan Y, Liberzon A, Tamayo P, Bhattacharya S, Butte AJ, *et al.* Compendium of Immune Signatures Identifies Conserved and Species-Specific Biology in Response to Inflammation. *Immunity* 2016, **44**(1): 194-206.
43. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics : a journal of integrative biology* 2012, **16**(5): 284-287.

10

他の実施形態

本発明をその詳細な説明と併せて説明してきたが、上記説明は、本発明の範囲を例示することを意図しており、限定することを意図していないことを理解されたい。

20

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び CD3ζ シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列；並びにヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

30

【請求項 2】

CAR 及びヒトインターフェロン γ の発現をともに制御するプロモーターを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

第一のプロモーターが CAR の発現を制御し、第二のプロモーターがヒトインターフェロン γ 又はその変異体の発現を制御する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

第一のプロモーターが構成的プロモーターであり、第二のプロモーターが構成的プロモーター又は誘導性プロモーターである、請求項 3 に記載の核酸分子。

40

【請求項 5】

2 A スキップ配列をコードするヌクレオチド配列が、CAR をコードするヌクレオチド配列と、ヒトインターフェロン γ 又はその変異体をコードするヌクレオチド配列との間に位置する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

2 A スキップ配列が、T 2 A、P 2 A、E 2 A 及び F 2 A からなる群から選択される、請求項 5 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

ヒトインターフェロン γ 又はその変異体が、配列番号 1 又は配列番号 2_9 で表されるア

50

ミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

C A R が、配列番号 3 0 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

膜貫通ドメインが、C D 4 膜貫通ドメイン、C D 8 膜貫通ドメイン、C D 2 8 膜貫通ドメイン、及び N K G 2 D 膜貫通ドメインから選択される、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 0】

膜貫通ドメインが、C D 2 8 膜貫通ドメイン又は C D 8 膜貫通ドメインである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 1】

共刺激ドメインが、C D 2 8 共刺激ドメイン、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、又は 2 B 4 共刺激ドメインである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 2】

共刺激ドメインが、配列番号 2 2 ~ 2 5 及び 6 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 3】

C D 3 ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 2 1 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 5 0 ~ 5 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むその変異体を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 4】

アミノ酸残基が 3 ~ 1 5 個あるリンカーが、共刺激ドメインと C D 3 ζ シグナル伝達ドメイン又はその変異体との間に位置する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5】

スペーサーが、配列番号 2 ~ 1 2 及び 4 4 で表されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 6】

標的化ドメインが、いかなるがん細胞抗原にも標的化される s c F v を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 7】

s c F v が、C D 1 9、M U C 1 6、M U C 1 (又は t M U C 1)、C A I X、C E A、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、H E R - 2、E R B B 2、M A G E A 3、p 5 3、P S C A、B C M A、C D 1 2 3、C D 4 4 V 6、インテグリン B 7、I C A M - 1、C D 7 0、C E A、G D 2、P S M A、B 7 H 3、C D 3 3、F l t 3、C L L 1、葉酸受容体、E G F R、C D 7、E G F R v I I I、グリピカン 3、C D 5、R O R 1、C S 1、A F P、C D 1 3 3、及び T A G - 7 2 のいずれか 1 つ以上を標的とする、請求項 1 6 に記載の核酸分子。

【請求項 1 8】

標的化ドメインがリガンドを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 9】

リガンドが、I L - 1 3 若しくはその変異体、又は、クロロトキシシン若しくはその変異体である、請求項 1 8 に記載の核酸分子。

【請求項 2 0】

C A R が、配列番号 7 0 ~ 7 6 のいずれかで表されるアミノ酸配列、又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 2 1】

ヒトインターフェロン γ を含むポリペプチドが、ヒトインターフェロン γ の分泌のためのシグナル配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 2 2】

ヒトインターフェロン γ を含むポリペプチドが、天然ヒトインターフェロン γ シグナル配列とは異なるヒトインターフェロン γ の分泌のためのシグナル配列を含む、請求項 1 に

10

20

30

40

50

記載の核酸分子。

【請求項 23】

(a) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列及びヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体又はポリペプチドが、標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含み、又は、

(b) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子及びヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体又はポリペプチドが、標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、を備える、ヒト T 細胞の集団。

10

【請求項 24】

(a) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列及びヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体又はポリペプチドが、標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含み、又は、

(b) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子及びヒトインターフェロン γ 又はその変異体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体又はポリペプチドが、標的化ドメイン、スパーサー、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、を備える、ヒト T 細胞の集団。

20

【請求項 25】

核酸分子が、CAR 及びヒトインターフェロン γ の発現とともに制御するプロモーターを含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 26】

核酸分子が、CAR 及びヒトインターフェロン γ の発現とともに制御するプロモーターを含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

30

【請求項 27】

第一のプロモーターが CAR の発現を制御し、第二のプロモーターがヒトインターフェロン γ 又はその変異体の発現を制御する、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 28】

第一のプロモーターが構成的プロモーターであり、第二のプロモーターが構成的プロモーター又は誘導性プロモーターである、請求項 27 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 29】

2A スキップ配列をコードするヌクレオチド配列が、CAR をコードするヌクレオチド配列と、ヒトインターフェロン γ 又はその変異体をコードするヌクレオチド配列との間に位置する、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

40

【請求項 30】

2A スキップ配列が、T2A、P2A、E2A 及び F2A からなる群から選択される、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 31】

ヒトインターフェロン γ が、配列番号 1 又は配列番号 29 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 32】

CAR が、配列番号 30 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒ

50

ト T 細胞の集団。

【請求項 33】

膜貫通ドメインが、CD4 膜貫通ドメイン、CD8 膜貫通ドメイン、CD28 膜貫通ドメイン、及び NKG2D 膜貫通ドメインから選択される、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 34】

膜貫通ドメインが、CD28 膜貫通ドメイン又は CD8 膜貫通ドメインである、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 35】

共刺激ドメインが、CD28 共刺激ドメイン、4-1BB 共刺激ドメイン、又は 2B4 共刺激ドメインである、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。 10

【請求項 36】

共刺激ドメインが、配列番号 22 ~ 25 及び 66 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 37】

CD3ζ シグナル伝達ドメインが、配列番号 21 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 50 ~ 56 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むその変異体を含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 38】

アミノ酸残基が 3 ~ 15 個あるリンカーが、前記共刺激ドメインと前記 CD3ζ シグナル伝達ドメイン又はその変異体との間に位置する、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。 20

【請求項 39】

スペーサーが、配列番号 2 ~ 12 及び 44 で表されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 40】

標的化ドメインが、いかなるがん細胞抗原にも標的化される scFv を含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 41】

scFv が、CD19、MUC16、MUC1 (又は tMUC1)、CAIX、CEA、CD20、CD22、CD30、HER-2、ERBB2、MAGEA3、p53、PSCA、BCMA、CD123、CD44V6、インテグリン B7、ICAM-1、CD70、CEA、GD2、PSMA、B7H3、CD33、Flt3、CLL1、葉酸受容体、EGFR、CD7、EGFRvIII、グリピカン3、CD5、ROR1、CS1、AFP、CD133、及び TAG-72 のいずれか 1 つ以上を標的とする、請求項 40 に記載のヒト T 細胞の集団。 30

【請求項 42】

標的化ドメインがリガンドを含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 43】

リガンドが、IL-13 若しくはその変異体、又は、クロロトキシン若しくはその変異体である、請求項 42 に記載のヒト T 細胞の集団。 40

【請求項 44】

CAR が、配列番号 70 ~ 76 のいずれかで表されるアミノ酸配列、又はアミノ酸が 1 ~ 5 個改変されたその変異体を含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 45】

ヒトインターフェロン γ を含むポリペプチドが、ヒトインターフェロン γ の分泌のためのシグナル配列を含む、請求項 23 又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 46】

ヒトインターフェロン γ を含むポリペプチドが、天然ヒトインターフェロン γ シグナル配列とは異なるヒトインターフェロン γ の分泌のためのシグナル配列を含む、請求項 23 50

又は 24 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 47】

患者のがんを治療するための方法であって、前記方法は、請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクターによって形質導入された自己由来又は同種異系ヒト T 細胞の集団を投与することを含み、ここで、前記がんが、CAR の標的化ドメインによって標的化される、方法。

【請求項 48】

患者のがんを治療するための方法であって、前記方法は、請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載のヒト T 細胞の集団を投与することを含み、ここで、前記ヒト T 細胞の集団は自己由来又は同種異系であり、かつ、前記がんが、CAR の標的化ドメインによって標的化

10

【請求項 49】

第一のプロモーターが強力な構成的プロモーターであり、第二のプロモーターがより脆弱な構成的プロモーターである、請求項 28 に記載のヒト T 細胞の集団。

【請求項 50】

第一のプロモーターが強力な構成的プロモーターであり、第二のプロモーターがより脆弱な構成的プロモーターである、請求項 4 に記載の核酸分子。

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/022575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/725 C12N5/0783 A61P35/00 A61K35/17 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61P A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/155598 A1 (XIAO LEI [CN] ET AL) 21 May 2020 (2020-05-21)	1-7, 9-11, 16, 17, 21, 23-31, 33-35, 40, 41, 45, 47-50
Y	abstract; Examples; par. 0095-0100, 0105, 0110-0119 SEQ ID 328 Fig. 8	12-15, 18-20, 22, 36-39, 42-44, 46
Y	US 2017/224733 A1 (BADIE BEHNAM [US] ET AL) 10 August 2017 (2017-08-10) SEQ. ID. NO. 42	12-15, 18-20, 36-39, 42-44
----- -/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 September 2022		Date of mailing of the international search report 27/09/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schulich, Juliane

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/022575

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/028275 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 6 February 2020 (2020-02-06) cited in the application the whole document -----	22, 46
X, P	WO 2021/179967 A1 (WEST CHINA HOSPITAL OF SICHUAN UNIV [CN]) 16 September 2021 (2021-09-16) the whole document -----	1, 2, 5, 6, 9-11, 16, 17, 23-30, 33-35, 40, 41, 47, 48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/022575

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/022575

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020155598 A1	21-05-2020	US 2020155598 A1	21-05-2020
		US 2021161961 A1	03-06-2021
US 2017224733 A1	10-08-2017	AU 2017213661 A1	16-08-2018
		BR 112018015836 A2	26-12-2018
		CA 3013773 A1	10-08-2017
		CN 108779160 A	09-11-2018
		DK 3411393 T3	28-06-2021
		EP 3411393 A1	12-12-2018
		EP 3912993 A1	24-11-2021
		ES 2879700 T3	22-11-2021
		HK 1257741 A1	25-10-2019
		IL 287889 A	01-01-2022
		JP 2019504105 A	14-02-2019
		KR 20180105709 A	28-09-2018
		RU 2018130752 A	06-03-2020
		US 2017224733 A1	10-08-2017
		US 2021244761 A1	12-08-2021
		WO 2017136829 A1	10-08-2017
WO 2020028275 A1	06-02-2020	AU 2019313339 A1	11-03-2021
		CA 3108066 A1	06-02-2020
		EP 3830115 A1	09-06-2021
		JP 2021531814 A	25-11-2021
		US 2021309707 A1	07-10-2021
		WO 2020028275 A1	06-02-2020
WO 2021179967 A1	16-09-2021	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	38/21	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K	14/57 (2006.01)	C 0 7 K	14/57	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,J
P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N
A,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,
TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 1 0 , デュアーテ , イースト デュアーテ ロード 1 5 0 0

F ターム (参考)

4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084 AA02 BA44 CA53 DA24 NA14 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262
4C085 AA14 BB01 CC03 DD62
4C087 AA01 AA03 BB37 BB65 NA14 ZB09 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA18 DA50 DA76
EA20 FA74