

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-514187
(P2021-514187A)

(43) 公表日 令和3年6月10日(2021.6.10)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|-----------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N 15/63 1 0 0 Z | 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 N 15/62 (2006.01) | C 1 2 N 15/62 Z N A Z | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 15/861 (2006.01) | C 1 2 N 15/861 Z | 4 C 0 8 7 |
| C 1 2 N 15/867 (2006.01) | C 1 2 N 15/867 Z | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-543545 (P2020-543545)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月14日 (2019. 2. 14)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月13日 (2020. 10. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2019/050182
 (87) 国際公開番号 W02019/159173
 (87) 国際公開日 令和1年8月22日 (2019. 8. 22)
 (31) 優先権主張番号 62/631, 095
 (32) 優先日 平成30年2月15日 (2018. 2. 15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/784, 501
 (32) 優先日 平成30年12月23日 (2018. 12. 23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 512000156
 ザ ナショナル インスティテュート フ
 ォー バイオテクノロジー イン ザ ネ
 ゲヴ リミテッド
 THE NATIONAL INSTIT
 UTE FOR BIOTECHNOLO
 GY IN THE NEGEV LTD
 .
 イスラエル国 ベエルシェバ 8 4 1 0 5
 , ピーオービー 6 5 3
 (74) 代理人 100120662
 弁理士 川上 桂子
 (74) 代理人 100216770
 弁理士 三品 明生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラ抗原受容体の腫瘍環境特異的発現

(57) 【要約】

腫瘍微小環境 (TME) 応答性発現ベクターは、1つ以上のプロモーター応答エレメントを含む合成プロモーターをコードする核酸配列、およびキメラ抗原レセプターのような免疫エフェクター遺伝子をコードする核酸配列を含む。TME 応答性ベクトルはTME内で免疫エフェクター遺伝子の発現を誘発し、正常な健康組織では発現を誘発しないように設計されている。これにより、免疫活性に焦点を当て、安全性を高め、正常組織を標的とすること (ON-target OFF-tumor) の危険性を減少させる。

【選択図】 図2

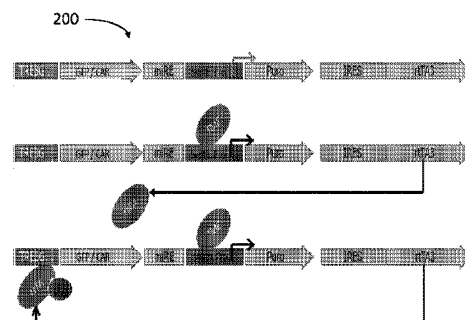


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍微小環境 (T M E) 応答性発現ベクターであって、

合成プロモーターをコードする核酸配列であって、前記プロモーターは、1つ以上の T M E 依存性プロモーター応答エレメント (P R E) およびエフェクター遺伝子をコードする核酸配列を含み、

前記 T M E 応答性発現ベクターが T M E 中に存在する 1つ以上の T M E 因子のプロモーター応答エレメントへの結合がエフェクター遺伝子の発現を誘導するように設計され、1つ以上の T M E 因子のプロモーター応答エレメントへの結合の非存在下で、エフェクター遺伝子の発現率が低いか、または、エフェクター遺伝子が発現されない、

T M E 応答性発現ベクター。

10

【請求項 2】

前記 T M E 依存性 P R E が、インターフェロン - (I F N -) P R E、T N F - P R E、核因子 B (N F - B) P R E、低酸素 P R E、熱ショックタンパク質 70 (H S P - 70) P R E、I L - 6 T G F - P R E、I L - 1 P R E、I L - 8 P R E、I L - 11 P R E、I L - 12 P R E、I L - 15 P R E、I L - 18 P R E、I L - 17 P R E、I L - 21 P R E、I L - 35 P R E、G M - C S F P R E、肝増殖因子 (H G F) P R E、アリアル水素受容体 (A h R) P R E、またはこれらの任意の組み合わせからなるリストから選択される 1つ以上の配列エレメントを含む、請求項 1 に記載の T M E 応答性発現ベクター。

20

【請求項 3】

前記エフェクター遺伝子がキメラ抗原受容体 (C A R) である、請求項 1 または 2 に記載の T M E 応答性発現ベクター。

【請求項 4】

プロモーター応答エレメントが、配列番号 1 ~ 40 に記載の核酸配列またはそれらの任意の組み合わせから選択される核酸に対して少なくとも 80% の配列相同性を有する核酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の T M E 応答性発現ベクター。

【請求項 5】

プロモーター応答エレメントが、配列番号 1 ~ 4 に記載の核酸配列から選択される核酸配列に対して少なくとも 80% の配列相同性を有する核酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の T M E 応答性発現ベクター。

30

【請求項 6】

プロモーター応答エレメントが、配列番号 22 ~ 40 に記載の核酸配列またはそれらの任意の組み合わせから選択される核酸配列に対して少なくとも 80% の配列相同性を有する核酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の T M E 応答性発現ベクター。

【請求項 7】

プロモーター応答エレメントが、配列番号 41 に記載の核酸に対して少なくとも 80% の配列相同性を有する核酸配列を含む、請求項 1 に記載の T M E 応答性発現ベクター。

【請求項 8】

プロモーター応答エレメントが、2つ以上のプロモーター応答エレメントを含み、2つ以上の T M E 依存性プロモーター応答エレメントへの 1つ以上の T M E 因子の結合が、単一の T M E 依存性プロモーター応答エレメントに結合する場合よりも高い C A R の発現レベルを誘導する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の T M E 応答性発現ベクター。

40

【請求項 9】

外部誘導性プロモーターおよびトランスアクチベーターをさらに含み、

合成プロモーターがトランスアクチベーターの発現を駆動し、外部誘導性プロモーターが C A R の発現を駆動し、インデューサーおよび T M E 因子の組み合わせが C A R の発現を誘導する、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の T M E 応答性発現ベクター。

【請求項 10】

50

外部インデューサーの存在下およびTME因子の非存在下で、本質的にCAR発現が検出されない、請求項9に記載のTME応答性発現ベクター。

【請求項11】

TME因子が外部インデューサーの非存在下でプロモーター応答エレメントに結合する場合、本質的にCAR発現が検出されない、請求項9または10に記載のTME応答性発現ベクター。

【請求項12】

外部誘導性プロモーターがTet応答要素プロモーターであり、外部インデューサーがドキシサイクリンおよび/またはテトラサイクリンであり、Tet応答要素がトランス活性化因子およびドキシサイクリンおよび/またはテトラサイクリンの組み合わせによって活性化される、請求項9～11のいずれか一項に記載のTME応答性発現ベクター。

10

【請求項13】

トランスアクチベーターがrtTA3である、請求項12に記載のTME応答性発現ベクター。

【請求項14】

CAR配列によってコードされるCAR分子が抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内ドメインを含み、前記抗原結合ドメインが疾患関連腫瘍抗原に結合する、請求項1～13のいずれか一項に記載のTME応答性発現ベクター。

20

【請求項15】

前記ベクターが、DNAベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターから選択される、請求項1～14のいずれか一項に記載のTME応答性発現ベクター。

【請求項16】

請求項1～15のいずれか一項に記載のTME応答性発現ベクターを含む免疫エフェクター細胞。

【請求項17】

薬剤として使用される、請求項16に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項18】

それを必要とする患者の腫瘍を治療するための、請求項16記載の免疫エフェクター細胞。

30

【請求項19】

腫瘍が固形腫瘍である、請求項18に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項20】

固形腫瘍が肉腫、癌腫またはリンパ腫である、請求項19に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項21】

前記固形腫瘍が、肺腫瘍、メラノーマ、結腸癌、乳癌または脳腫瘍である、請求項20に記載の免疫エフェクター細胞。

【請求項22】

最適な合成プロモーターの決定のために腫瘍生検をスクリーニングするための方法であって、

40

生検における1つ以上のTME因子の発現レベルを決定することと、

患者のTMEに一致するTME依存性プロモーター応答エレメントを有するTME応答性発現ベクターを選択することと、を含む方法。

【請求項23】

前記選択されたTME応答性発現ベクターを免疫エフェクター細胞または細胞集団に導入することをさらに含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

免疫エフェクター細胞または細胞集団が、NK細胞またはT細胞である、請求項23に

50

記載の方法。

【請求項 25】

免疫エフェクター細胞または細胞集団が患者に対して自己由来である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

免疫エフェクター細胞または細胞集団が、治療前に患者から単離された免疫エフェクター細胞または細胞集団である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

1 つ以上の TME 因子が、腫瘍および / または非腫瘍 TME 細胞によって発現される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

患者の TME に一致する TME 依存性プロモーター応答エレメントを有する TME 応答性発現ベクターの選択が、TME 依存性プロモーター応答エレメントを合成することを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

患者の TME に適合する TME 依存性プロモーター応答エレメントを有する TME 応答性発現ベクターの選択が、患者の TME に最も適合する TME 依存性プロモーター応答エレメントのライブラリーから TME 依存性プロモーター応答エレメントを選択することを含む、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は一般に、キメラ抗原受容体 (CAR) 発現の分野、特に腫瘍組織特異的 CAR 発現に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫システムを活用して癌を根絶することは、近年非常に効率的であることが証明されている。

【0003】

その一例として、キメラ抗原レセプター T 細胞 (CAR-T) のような遺伝子操作された免疫細胞がある。この細胞は、他に効率的な治療法がなかった悪性腫瘍を根絶する能力に関して、優れた結果が示された後、様々な癌の治療のために FDA によって承認されている。

【0004】

しかしながら、CAR 発現免疫細胞は、患者の体全体にわたって、腫瘍および転移に到達し得るが、操作された受容体の特異性は、少数の例外を除いて、腫瘍細胞と正常細胞とを完全に区別することを可能にしない。なぜなら、腫瘍は、体内のいくつかの正常細胞によって発現されない、絶対的にユニークな抗原を有しないことが多いからである。その結果、いくつかの CAR 治療は、GVHD に類似した毒性免疫反応を引き起こし、臨床試験中に CAR 治療が原因となって死亡する事例もあった。

【0005】

改変された免疫細胞内で CAR の非構成的 (恒常的) 発現を達成する試みがなされている。一例は、外因的に提供される分子 (テトラサイクリン / ドキシサイクリンなど) の存在下でのみ活性化されるプロモーターを利用することによって、CAR 発現ベクター内に「ON-OFF スイッチ」を適用することを含む。副作用症状が顕著な場合に CAR 発現をオフにすることを可能にするが、このアプローチは、腫瘍細胞に対する CAR-T 細胞の陽性活性をオフにするので、有効な CAR 治療を中断する。

【0006】

したがって、生命を脅かす「副作用」のリスクを低下させ、一方で腫瘍の効果的な除去

10

20

30

40

50

を可能にする制御されたCAR発現に対する、未だ満たされていないニーズが残っている。

【発明の概要】

【0007】

以下の実施形態およびその態様は例示的かつ例示的であり、範囲を限定するものではないことが意図される組成物および方法と併せて記載され、例示される。様々な実施形態では上述の問題のうちの1つまたは複数が低減または排除されており、他の実施形態は他の利点または改善に向けられている。

【0008】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍微小環境応答性プロモーターのコントロールの下で、必要に応じてtet応答回路と組み合わせ、エフェクター遺伝子発現を調節するための新規なプラットフォームが提供される。

【0009】

前記プラットフォームは、1つ以上のTME依存性プロモーター応答エレメントを含む合成プロモーターをコードする核酸配列を含む腫瘍環境(TME)応答性発現ベクターを含む。前記核酸配列は、エフェクター遺伝子(例えば、エフェクター遺伝子(例えば、CAR)をコードする核酸配列が挙げられるが、これに限定されない)に結合される。

【0010】

有利には、TME応答性ベクターが、TME中に存在する1つ以上の因子のプロモーター応答エレメントへの結合が、直接的または間接的に、プロモーターによる発現を誘導するように設計される。TME因子結合が存在しない場合、プロモーター発現は、改変された細胞の各々内で自律的に下方制御される。これは有利には、CARのようなエフェクターメカニズムの発現が、腫瘍のそれとは異なる組織環境において、最小限とされるか、または全く見られないことを保証する。一方、腫瘍環境においては、CARのようなエフェクターメカニズムの発現は、正常組織を温存しながら上方制御され、腫瘍に対する活性をもたらす。

【0011】

いくつかの実施形態によれば、発現ベクターは、2つ以上のTME依存性プロモーター応答エレメントを含み得る。これは、最も高い発現レベルがTME因子の特定の組み合わせが見出される場合にのみ得られることを確実にするのに役立つ。

【0012】

有利には、プロモーターを活性化するように構成された1つ以上のTME依存性プロモーター応答エレメントが、特定の患者または患者群の実際のTMEシグネチャーに適合するように、カスタムメイドのプロモーターのための合成プロモーターを任意にさらに置換/変化させ、これにより、最も重要な特異的かつ効率的な応答を確実にすることができる。

【0013】

いくつかの実施形態によれば、合成プロモーターをコードする核酸配列を含む腫瘍微小環境(TME)応答性発現ベクターが提供され、前記プロモーターは、1つ以上のTME依存性プロモーター応答エレメント(PRE)と、エフェクター遺伝子をコードする核酸配列とを含む。前記TME応答性発現ベクターは、TME中に存在する1つ以上のTME因子のプロモーター応答エレメントへの結合がエフェクター遺伝子の発現を誘導するように設計され、1つ以上のTME因子のプロモーター応答エレメントへの結合の不在下で、低エフェクター遺伝子が発現されるか、または、エフェクター遺伝子が実質的に全く発現されない。

【0014】

いくつかの実施形態によれば、CARは、キメラ抗原T細胞受容体(CAR-T)、キメラ抗原ナチュラルキラー(NK)細胞受容体(CAR-NK)、キメラ先天性受容体、サイトカイン、ケモカイン、ケモカイン受容体、プロテアーゼ、マイクロRNA、またはそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない他の免疫エフェクターである。

10

20

30

40

50

【0015】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、インターフェロン（IFN-）エレメント応答、核因子 B（NF- B）応答エレメント、低酸素応答エレメント、IL-6 応答エレメント、熱ショックタンパク質70（HSP-70）応答エレメント、IL-4 応答エレメント、IL-6 応答エレメント、IL-8 応答エレメント、IL-10 応答エレメント、IL-11 応答エレメント、IL-15 応答エレメント、IL-18 応答エレメント、IL-21 応答エレメント、IL-35 応答エレメント、TGF- 応答エレメント、肝成長因子（HGF）応答エレメント、アリアル水素受容体（AhR）応答エレメント、PGE2 応答要素、または任意の他の適切なTME 因子応答エレメント、あるいはそれらの組み合わせからなるリストから選択される、1つ以上の応答エレメントを含む。

10

【0016】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、インターフェロン（IFN-）エレメント応答、核因子 - B（NF- B）応答エレメント、低酸素応答エレメント、IL-1 応答エレメント、IL-6 応答エレメント、IL-8 応答エレメント、IL-11 応答エレメント、IL-12 応答エレメント、IL-15 応答エレメント、IL-18 応答エレメント、IL-17 応答エレメント、IL-21 応答エレメント、TGF- 応答エレメント、GM-CSF 応答エレメント、肝成長因子（HGF）応答エレメント、アリアル水素受容体（AhR）応答エレメント、または任意の他の適切なTME 因子応答エレメント、あるいはそれらの組み合わせからなるリストから選択される1つ以上の応答エレメントを含むが、これらに限定されない。

20

【0017】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントはインターフェロン（IFN-）エレメント応答、核因子 - B（NF- B）応答エレメント、低酸素応答エレメント、IL-6 応答エレメント、熱ショックタンパク質70（HSP-70）応答エレメント、または任意の他の適切なTME 因子応答エレメント、またはそれらの組み合わせからなるリストから選択される1つ以上の応答エレメントを含むが、これらに限定されない。

【0018】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、センス（5' から 3'）またはアンチセンス（3' から 5'）方向で合成プロモーターに挿入され得る。

30

【0019】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、配列番号1で示されるTTCCGGGA A、配列番号2で示されるGGGAATTTCC、配列番号3で示されるGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG、配列番号4で示されるGCGCTTCTCTGACAGTGACGCGAGCCG、GCGCTTCTCTGACAGTGACGCGAGCCG、またはこれらの任意の組み合わせからなるグループから選択される核酸を含む。

【0020】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、配列番号22で示されるTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTCGCACTAGTTCTAGAACTTCCCGGAATAAGGGTGGGCAAGTATTTCCGGGAATACTCTAGAGGGAGGTTCCCGGGGACTTTCCGGGGATTTTCTCTAGATAATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCAGAGCGACCCTGCAGCGACC CGCTTAAAAGCGGCGCCATGGGCGCCATGGCCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAAGGAGTTCTATGC、配列番号23で示されるTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTCGCACTAGTTCTAGAACTTCCCGGAAGTAAAGTGGGCAAGTAACTTCCCGGAAGTCTTAGAGGAATAATTTCTCGGGGACTTTCCGGGGTTCCTCTCTAGATA

40

50

TTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTG
CAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCGCCATGGGCCGCCATGG
CCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTTCATGC、配列番号24
で示されるTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCC
GGTCGCACTAGTTCTAGAACTTCCCGGAAGTAGGGTGGGC
AAGTACTTCCGGGAATACTCTAGAGGGAGTTCTCGGGGACT
TTCGGGAATTTCTCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGG
CCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCGAGCGACCCGCTTAAAAG
CGGCGGCCATGGGCGGCCATGGCCTCCTCCGAGGACGTC
TCAAGGAGTTTCATGC、配列番号25で示されるTACAGGGACAGCA
GAGATCCAGTTTGGACTAGCCCAGTTCGCACTAGTTCTAGA
ACTTCCCGGAAGTAGGGTGGGCAGGTAATTTCCCGGAAGTT
CTAGAGGAAGTTCTCGGGGACTTTCCGGAGATTCTCTCTA
GATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGGAC
CCTGCGAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCGCCATGGGCGGCC
ATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTTCATGC、配列
番号26で示されるTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTA
GCCCGGTTCGCACTAGTTCTAGAACTTCCGGGAATAAGGGT
GGGCAAGTACTTCCGGGAATACTCTAGAGGGGATTTCGGG
GACTTTCCGGAGGGTTCTCTCTAGATATTAAGGTGACGCGT
GTGGCCTCGAACACCGAGCGGACCCCTGCGAGCGACCCGCTTA
AAAAGCGGCGGCCATGGGCGGCCATGGCCTCCTCCGAGGAC
GTCATCAAGGAGTTTCATGC、配列番号27で示されるTACAGGGAC
AGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCAGTTCGCACTAGTTC
TAGAACTTCCGGGAATAAGGGTGGGCAGGTACTTCCGGGA
AGTTCTAGAGGAGGGTTTTCGGGGACTTTCCGGAGGGTTTCC
TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAG
CGACCCCTGCGAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCGGCCATGGGC
CGCCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTTCATG
C、配列番号28で示されるTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGG
ACTAGCCCGGTTCGCACTAGTTCTAGAACTTCCGGGAAGTA
GGGTGGGCAAGTATTTCCCGGAAGTTCTAGAGGGGGTTTT
CGGGGACTTTCCGGAGGGTTTCTCTCTAGATATTAAGGTGAC
GCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGGACCCCTGCGAGCGACCCG
CTTAAAAGCGGCGGCCATGGGCGGCCATGGCCTCCTCCGA
GGACGTCATCAAGGAGTTTCATGC、配列番号29で示されるTACAG
GGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCAGTTCGCACTA
GTTCTAGAACTTCCGGGAAGTAGGGTGGGCAGGTAATTTCC
GGGAATACTCTAGAGGGAGTTCTCGGGGACTTTCCGGGGAT
TTTTCTCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACAC
CGAGCGACCCCTGCGAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCGGCCAT
GGGCGGCCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTT
CATGC、配列番号30で示されるTACAGGGACAGCAGAGATCCAGT
TTGGACTAGCCCAGTTCGCACTAGTTCTAGAAATTTCCCGGA
AATAGGGTGGGCAGGTACTTCCGGGAATACTCTAGAGGGGG
TTTCCGGGGACTTTCCGGGGTTTCTCTAGATATTAAGG
TGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGGACCCCTGCGAGCGA
CCCGCTTAAAAGCGGCGGCCATGGGCGGCCATGGCCTCCT
CCGAGGACGTCATCAAGGAGTTTCATGC、配列番号31で示されるT
ACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCAGTTCGC

10

20

30

40

50

C G C C A T G G C C T C C T C C G A G G A C G T C A T C A A G G A G T T C A T G
C、配列番号39で示されるT A C A G G G A C A G C A G A G A T C C A G T T T G G
A C T A G C

C C G G T C G C A C T A G T T C T A G T T C C G G G A A G T G G G T G G G C A A
T A T T T C C G G A A G T T T A G A G G A A G T T T C G G G G A C T T C C G
G A A A T T C C C T C T A G A T A T T A A G G T G A C G C G T G T G G C C T C G
A A C A C C G A G C G A C C C T G C A G C G A C C C G C T T A A A A G C G G C C
G C C A T G G G C C G C C A T G G C C T C C T C C G A G G A C G T C A T C A A G
G A G T T C A T G C、配列番号40で示されるT A C A G G G A C A G C A G A G A T
C C A G T T T G G A C T A G C C C G G T C G C A C T A G T T C T A G A A C T T C
T C G G A A A T A G G G T G G G C A A G T A C T G T G G C C T C G A A C A C C G
A G C G A C C C T G C A G C G A C C C G C T T A A A A G C G G C C G C C A T G G
G C C G C C A T G G C C T C C T C C G A G G A C G T C A T C A A G G A G T T C A
T G C A G A C C A A G T C T C T G C T A C C、またはこれらの任意の組み合わせから
なるグループから選択される核酸を含む。各可能性は、別個の実施形態である。

10

【0021】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、配列番号1~4に記載の核酸配列またはそれらの任意の組み合わせから選択される核酸を含む。各可能性は、別個の実施形態である。

【0022】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、配列番号22~40に記載の核酸配列またはそれらの任意の組み合わせから選択される核酸を含む。各可能性は、別個の実施形態である。

20

【0023】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、配列番号41で定義される次の核酸配列を含む。T A C A G G G A C A G C A G A G A T C C A G T T T G G A
C T A G C C C G G T C G C A C T A G T T C T A G A A Y T T C C S G G A A R T A G
G G T G G G C A A G T A Y T T C C S G G A A R T T C T A G A G G R R R T T Y Y C
G G G G A C T T T C C G G R R R T T Y Y C T C T A G A T A T T A A G G T G A C G
C G T G T G G C C T C G A A C A C C G A G C G A C C C T G C A G C G A C C C G C
T T A A A A G C G G C C G C C A T G G G C C G C C A T G G C C T C C T C C G A G
G A C G T C A T C A A G G A G T T C A T G C。ここで、Y = CまたはT、S = CまたはG、R = AまたはGである。

30

【0024】

いくつかの実施形態によれば、1つ以上のTME因子は、腫瘍壊死因子 (TNF -)、IFN - 、IL - 6、HSP - 70、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0025】

いくつかの実施形態によれば、合成プロモーターは、プロモーター応答エレメントに隣接する追加のヌクレオチド、および/またはプロモーター応答エレメント間の間隔 (spacing) を含む。

40

【0026】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントはIFN - 、NF - B、低酸素タンパク質、HSP - 70、IL - 1、IL - 4、IL - 6、IL - 8、IL - 10 応答エレメント、IL - 11 応答エレメント、IL - 12 応答エレメント、IL - 15 応答エレメント、IL - 18 応答エレメント、IL - 17 応答エレメント、IL - 21 応答エレメント、TGF - 応答エレメント、GM - CSF 応答エレメント、肝増殖因子 (HGF) 応答エレメント、アリアル水素受容体 (AhR) 応答エレメント、PGE2 応答エレメント (センスまたはアンチセンス) のいずれかの応答エレメントの1つ以上を含み、これらは1つ以上の位置で改変されている。

【0027】

50

いくつかの実施形態によれば、改変は、天然配列に対して増加した T M E 因子結合を有する配列を生成する。

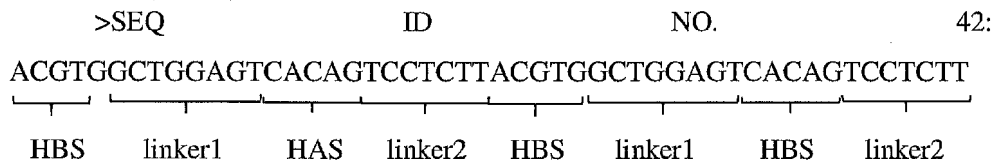
【 0 0 2 8 】

非限定的な例として、合成プロモーターは、種々の低酸素依存性標的遺伝子 (L D H A / E P O / V E G F) (例えば、 L D H A / E P O / V E G F の H B S 配列の共有部分および / または E P O 遺伝子の H A S 配列) に由来する低酸素タンパク質の応答エレメント (または他の T M E 因子応答エレメント) 、ならびに標的遺伝子において見出されない約 6 ~ 9 ヌクレオチドのリンカーを含み得る。この配列は以下に概説される配列番号 4 2 に記載されるように、「塩基性低酸素プロモーター応答エレメント (P R E) 」と呼ばれる。

10

【 0 0 2 9 】

【 化 1 】



【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態によれば、塩基性 T M E 因子プロモーター (ここでは塩基性低酸素 P R E) は、合成プロモーター配列の 5 '、3 ' または中央に付加され得る。いくつかの実施形態によれば、基本的な T M E 因子 P R E は、5 ' - 3 ' 方向で、または反転した 3 ' - 5 ' 方向で挿入されてもよい。いくつかの実施形態によれば、合成プロモーターは、塩基性 T M E 因子 P R E の改変バージョンを含み得る。改変された塩基性低酸素症 P R E の非限定的な例は、配列番号 4 3 に、R C G T G S C T G G A G T M A C A G T C C T C T T R C G T G S C T G G A G T M A C A G T C C T C T T (R = A または G、S = C または G、M = A または C)、と記載されている。

20

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態によれば、改変された T M E 因子 P R E は、より少ない漏出性および低酸素刺激に対する最も高い応答を誘導する合成 P R E である。

30

【 0 0 3 2 】

改変された I F N - P R E の非限定的な例は、配列番号 4 4 に、A C T T C C S G G A A R T A G G G T G G G C A A G T A C T T C C S G G A A R T (R = A または G、S = C または G) と記載されている。

【 0 0 3 3 】

改変された N F - B P R E の非限定的な例は、配列番号 4 5 に、G G G G G T T T Y C G G G G A C T T T C C G G R R R T T T T (R = A または G、Y = C または T) と記載されている。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、2 つ以上のプロモーター応答エレメントを含み得る。ここで、2 つ以上の T M E 依存性プロモーター応答エレメントへの T M E 因子の結合は、単一の T M E 依存性プロモーター応答エレメントへの結合よりも高いエフェクター遺伝子の発現レベルを誘導する。

40

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態によれば、T M E 応答性発現ベクターは、外部誘導性プロモーターおよびトランスアクチベーターをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、合成プロモーターは、トランスアクチベーターの発現を駆動し、外部誘導性プロモーターはエフェクター遺伝子の発現を駆動する。いくつかの実施形態によれば、インデューサーおよび T M E 因子の組み合わせた存在は、エフェクター遺伝子の発現を誘導する。いくつかの実施形態によれば、外部インデューサーの存在下および T M E 因子の非存在下では、エフェクタ

50

ー遺伝子発現は本質的に検出されない。いくつかの実施形態によれば、TME因子が、外部インデューサーの非存在下でプロモーター応答エレメントに結合する場合、エフェクター遺伝子発現は本質的に検出されない。

【0036】

いくつかの実施形態によれば、誘導性プロモーターはTet応答要素プロモーターであり、外部インデューサーは、ドキシサイクリンおよび/またはテトラサイクリンである。

【0037】

いくつかの実施形態によれば、エフェクター遺伝子は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および同時刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内ドメインを含むCARであってもよいが、これらに限定されず、前記抗原結合ドメインは腫瘍抗原に結合する。

10

【0038】

いくつかの実施形態によれば、CARは、CAR、ケモカインレセプター、サイトカインレセプター、腫瘍内での免疫エフェクター細胞の付着を促進するMMP8/9のプロテアーゼのようなタンパク質（または機能性RNA）、限定されるものではないが例えばPD1および/またはCTLA4のような免疫阻害剤を抑制するmiRNA、限定されるものではないが例えばCXCL9/10および/またはCCR3リガンドのような腫瘍内に免疫細胞保持をもたらすサイトカイン、または、特異的発現プロファイルが所望されるTMEの他の適当なエフェクター遺伝子からなる群から選択され得る。

【0039】

いくつかの実施形態によれば、ベクターは、DNAベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、または合成構築物を免疫細胞に導入するための他のベクターから選択される。

20

【0040】

いくつかの実施形態によれば、TME応答性発現ベクターは、MMP8/9のプロテアーゼなどであるが、これらに限定されない、腫瘍への免疫エフェクター細胞の浸透を増強するタンパク質（または機能性RNA）をコードするエフェクター遺伝子をさらに含む。

【0041】

いくつかの実施形態によれば、TME応答性発現ベクターは、これらに限定されないがPD1および/またはCTLA4などの腫瘍内で免疫阻害剤を抑制するmiRNAをコードする1つまたは複数のエフェクター遺伝子をさらに含む。

30

【0042】

いくつかの実施形態によれば、TME応答性発現ベクターは、腫瘍内に免疫細胞保持をもたらすサイトカインをコードする1つ以上のエフェクター遺伝子（例えば、CXCL9/10および/またはCCR3リガンド（これらに限定されない））をさらに含み、それによってオートクリンループを生成する。

【0043】

いくつかの実施形態によれば、本質的に本明細書に記載されるように、1つ以上のTME依存性プロモーター応答エレメントを含む合成プロモーターをコードする核酸配列と、キメラ抗原レセプターをコードする核酸配列を含むベクターを含む免疫エフェクター細胞とが提供される。いくつかの実施形態によれば、TME応答性ベクターは、TME中に存在する1つ以上の因子のプロモーター応答エレメントへの結合が直接的または間接的にエフェクター遺伝子の発現を誘導するように設計される。プロモーター応答エレメントへのTME因子結合の非存在下で、本質的に、残留キメラ抗原レセプターが全く発現されないか、または、残留キメラ抗原レセプターの発現率は低くなる。

40

【0044】

いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は、薬剤としての使用に適している。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は、それを必要とする患者の腫瘍を治療するのに適している。いくつかの実施形態によれば、腫瘍は固形腫瘍である。いくつかの実施形態によれば、固形腫瘍は、肉腫、癌腫、またはリンパ腫である。いくつか

50

の実施形態によれば、固形腫瘍は、肺腫瘍、黒色腫、結腸癌、乳房腫瘍または脳腫瘍である。

【0045】

いくつかの実施形態によれば、それを必要とする患者において癌を治療するための方法であって、本質的に本明細書に記載される発現ベクターを含む免疫細胞を投与することを含む方法が提供される。

【0046】

いくつかの実施形態によれば、最適な合成プロモーターの決定のために患者をスクリーニングするための方法であって、患者の腫瘍の生検を取得する工程と、生検における1つ以上のTME因子の発現レベルを決定する工程と、生検における1つ以上のTME因子の決定された発現レベルに一致するTME依存性プロモーター応答エレメントを有するTME応答性発現ベクターを選択する工程とを含む方法が提供される。

10

【0047】

いくつかの実施形態によれば、最適な合成プロモーターを決定するために生検をスクリーニングするための方法であって、生検における1つ以上のTME因子の発現レベルを決定することと、生検における1つ以上のTME因子の決定された発現レベルに一致するTME依存性プロモーター応答エレメントを有するTME応答性発現ベクターを選択することを含む方法が提供される。

【0048】

いくつかの実施形態によれば、TMEは、腫瘍細胞および/または非腫瘍TME細胞によって発現され得る。

20

【0049】

いくつかの実施形態によれば、この方法は、選択されたTME応答性発現ベクターを免疫細胞に導入する工程をさらに包含する。

【0050】

いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞または細胞集団はT細胞および/またはナチュラルキラー(NK)細胞を含み得るが、これらに限定されない。

【0051】

いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞または細胞集団は、患者に対して自己由来である。

30

【0052】

いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞/細胞集団は、治療前に患者から単離される。

【0053】

いくつかの実施形態によれば、この方法は、免疫エフェクター細胞または細胞集団を患者に投与する工程をさらに包含する。

【0054】

本開示の特定の実施形態は、上記の利点のいくつか、全て、またはいずれも含み得る。

【0055】

1つまたは複数の技術的利点は、本明細書に含まれる図面、説明、および特許請求の範囲から当業者には容易に明らかになるのであろう。さらに、特定の利点が上に列挙されたが、様々な実施形態は列挙された利点のすべて、いくつか、または全く含まなくてもよい。

40

【0056】

上記の例示的な態様および実施形態に加えて、さらなる態様および実施形態は図面を参照し、以下の詳細な説明を検討することによって明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0057】

本発明は、以下の例示的な図面を参照して、特定の実施例および実施形態に関連して説明される。

50

【図 1】図 1 は、レポーターおよび / または C A R 遺伝子発現を直接制御する合成プロモーターを含む発現構築物を概略的に示す。

【図 2】図 2 は、レポーターおよび / または C A R 遺伝子発現を間接的に制御する合成プロモーターを含む発現構築物を概略的に示す。

【図 3】図 3 は、最適なレポーターおよび / または C A R 遺伝子発現を提供する腫瘍微小環境 (T M E) のためのプロモーターライブラリーをスクリーニングするための方法の例示的なフローチャートである。

【図 4 A】図 4 A は、 T M E 因子および / またはドキシサイクリンの存在下および非存在下で、示された T M E 応答エレメント (G および K) を含む、図 2 の発現レンチウイルス構築物 (G F P レポーターあり) で形質導入された 2 9 3 T H E K 細胞における G F P 強度 (上のパネル) および G F P 陽性細胞のパーセンテージ (下のパネル) を示す代表的なヒストグラムを示す。

10

【図 4 B】図 4 B は、図 3 A に使用した代表的な反復の代表的な F A C S プロットを示す。

【図 5】図 5 は、 T M E 因子および / またはドキシサイクリンの存在下および非存在下で、示された T M E 応答エレメント (G および K) を含む、図 2 の発現構築物 (G F P レポーターあり) でトランスフェクトされた G F P 陽性 2 9 3 T H E K 細胞をゲーティングする代表的な F A C S プロットを示す。

【図 6】図 6 は、 T M E 因子および / またはドキシサイクリンの存在下および非存在下で、示された T M E 応答エレメント (G および K) を含む、図 2 の発現構築物 (G F P レポーターあり) でトランスフェクトされた G F P 陽性 2 9 3 T H E K 細胞内のレポーター強度を定量する代表的なヒストグラムを示す。

20

【図 7】図 7 は、 T M E 因子および / またはドキシサイクリンの存在下および非存在下で、示された T M E 応答エレメント (G 、 K 、 J および H) を含む、図 2 の発現構築物 (G F P レポーターあり) でトランスフェクトされた G F P 陽性 2 9 3 T H E K 細胞内のレポーター強度を定量する代表的なヒストグラムを示す。

【図 8】図 8 は、所望の最適なレポーター遺伝子発現プロフィールを有する細胞を同定および選別するために使用される例示的な F A C S 選別結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 8 】

30

以下の説明では、本開示の様々な態様が説明される。説明の目的のために、本開示の異なる態様の完全な理解を提供するために、特定の構成および詳細が記載される。しかし、本明細書に特定の詳細を提示することなく、本開示を実施することができることも当業者には明らかであろう。さらに、本開示を曖昧にしないために、周知の特徴は省略または簡略化されてもよい。

(定義)

特に定義しない限り、本明細書で使用する全科学技術用語は本発明が属する分野の当業者に通常理解されている通りの意味をもつ。

【 0 0 5 9 】

用語「 a 」および「 a n 」は記事の文法的対象の 1 つまたは 2 つ以上 (すなわち、少なくとも 1 つ) を指し、例えば、「要素」は、 1 つの要素または 2 つ以上の要素を手段する。

40

【 0 0 6 0 】

量、時間的持続時間などの測定可能な値に言及する場合、「約」という用語は、開示された方法を実行するのに適切であるため、特定の値から $\pm 20\%$ 、場合によっては $\pm 10\%$ 、場合によっては $\pm 5\%$ 、場合によっては $\pm 1\%$ 、または場合によっては $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。

【 0 0 6 1 】

用語「キメラ抗原受容体」または代わりに「 C A R 」は、少なくとも細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および以下に定義されるような刺激分子に由来する機能的シグ

50

ナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン（本明細書では「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも呼ばれる）を含む組換えポリペプチド構築物を指す。いくつかの実施形態において、CARポリペプチド構築物中のドメインは同じポリペプチド鎖中にあり、例えば、キメラ融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、CARポリペプチド構築物中のドメインが互いに連続しておらず、例えば、異なるポリペプチド鎖中にある。いくつかの実施形態によれば、CARは、免疫細胞によって発現され、標的癌細胞に対して細胞毒性効果を有する任意の部分、すなわち標的上の死受容体を活性化するリガンドを広く指すことができる。

【0062】

用語「腫瘍環境」、「腫瘍微小環境」および「TME」は、互換的に使用され、周囲の血管、免疫細胞、線維芽細胞、骨髄由来炎症細胞、リンパ球、シグナル伝達分子および細胞外マトリックス（ECM）を含む、腫瘍が存在する細胞環境を指すことができる。

10

【0063】

「抗原」という用語は、免疫応答を引き起こす分子を指す。この免疫応答は、抗体産生、または特異的な免疫学的に適格な細胞の活性化、またはその両方を含み得る。当業者は、実質的に全てのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原として働き得ることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の全長ヌクレオチド配列によってのみコードされる必要がないことを理解するであろう。本発明は2つ以上の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含むが、これに限定されず、そしてこれらのヌクレオチド配列は所望の免疫応答を誘発するポリペプチドをコードするために、種々の組み合わせで配置されることが容易に明らかである。抗原は、合成され得るか、または生物学的サンプルから誘導され得るか、またはポリペプチド以外の巨大分子であり得ることが容易に明らかである。このような生物学的サンプルとしては組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞、または他の生物学的成分を含む流体が挙げられ得るが、これらに限定されない。

20

【0064】

用語「抗腫瘍効果」とは様々な手段によって発現され得る生物学的効果を指し、これには例えば、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、平均余命の増加、腫瘍細胞増殖の減少、腫瘍細胞生存の減少、または癌状態に関連する様々な生理学的症状の改善が含まれるが、これらに限定されない。

【0065】

「自己由来」という用語は後に個体に再導入される同一の個体に由来する任意の物質を指し、「同種」という用語は、その物質が導入される個体とは異なる個体に由来する任意の物質を指す。

30

【0066】

用語「保存的配列改変」はそれに対する因子の結合特性に有意に影響を及ぼさない、またはそれを変化させないアミノ酸改変を指す。このような保存的改変には、アミノ酸置換、付加および欠失が含まれる。

【0067】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫エフェクター細胞」は、免疫応答に関与する細胞をいう。例としては、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、自然リンパ球細胞（ILC）、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、マスト細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、好塩基球、好中球および好酸球の様々なタイプ、およびサブタイプが挙げられる。

40

【0068】

用語「発現」は、プロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳をいう。

【0069】

用語「発現ベクター」は、発現されるべきヌクレオチド配列に作動可能に連結された発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターをいう。発現ベクターには、組換えヌクレオチド配列を組み込んだコスミド、プラスミド、エピソーム、トランスポゾン

50

およびウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルス）を含む、当技術分野で公知のすべてのものが含まれる。

【0070】

本明細書中で使用される場合、用語「TME 応答性発現ベクター」は、腫瘍環境を構成するか、規定するか、または、そうでなければ、関連する因子の存在下で遺伝子産物を発現するように構成される発現ベクターをいう。

【0071】

本明細書中で使用される場合、用語「プロモーター」は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始するために必要とされる、細胞の合成機構によって認識されるDNA配列、または導入された合成機構をいう。

10

【0072】

本明細書中で使用される場合、用語「プロモーター/調節配列」および「プロモーター応答エレメント(PRE)」は互換的に使用され得、そしてプロモーター/調節配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現に必要な核酸配列をいう。本明細書中で使用される場合、用語「TME 因子」はサイトカイン、転写因子などのような（これらに限定されない）TME中に存在し、そして活性な因子をいう。本明細書中で使用される場合、用語「TME 関連因子に連結されたPRE」はTME 関連因子の排出(excreted)効果の後に活性化されるPREをいう。例えば、「低酸素PRE」は、TME中の低酸素後に活性化されるPREを指す。「IFN-PRE」がTME中のIFN-の存在後に活性化されるPREを指す。いくつかの例ではこの配列はコアプロモーター配列であってよく、他の例ではこの配列はまた、遺伝子産物の発現に必要なエンハンサー配列および他の調節エレメントを含んでいてもよい。プロモーター/調節配列は例えば、組織特異的な様式で遺伝子産物を発現するものであり得る。

20

【0073】

本明細書中で使用される場合、用語「構成的(constitutive)」プロモーターは、遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結される場合、細胞のほとんどまたは全ての生理学的条件下で、細胞中で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列をいう。

【0074】

本明細書中で使用される場合、用語「誘導性(inducible)」プロモーターは遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結される場合、インデューサーが存在する場合にのみ、遺伝子産物を実質的に増強させるヌクレオチド配列をいう。「誘導(Induction)」は、OFF状態からON状態への発現の開始、ならびに相対的LOWから相対的HIGHへの発現の増強の両方を含み得る。

30

【0075】

本明細書中で使用される場合、用語「TME 特異的プロモーター」、「TME 誘導性プロモーター」および「TME 応答性プロモーター」は、互換的に使用され得、そして遺伝子産物をTME内で誘導させるヌクレオチド配列をいう。

【0076】

本明細書中で使用される場合、用語「合成プロモーター」は天然に存在するプロモーターのクローニングとは対照的に、人工的に合成されたDNA配列をいう。

40

【0077】

用語「癌関連抗原」および「腫瘍抗原」は互換的に使用され得、そして完全にまたはフラグメントとしてのいずれかで癌細胞の表面上に発現され、そして癌細胞への薬理学的因子の優先的標的化に有用である分子（代表的にはタンパク質、炭水化物または脂質）をいう。いくつかの実施形態において、腫瘍抗原は、正常細胞および癌細胞の両方によって発現されるマーカーである。いくつかの実施形態において、腫瘍抗原は正常細胞と比較して癌細胞において過剰発現される細胞表面分子であり、例えば、正常細胞と比較して1倍の過剰発現、2倍の過剰発現、3倍以上の過剰発現である。いくつかの実施形態において、腫瘍抗原は癌細胞において不適切に合成される細胞表面分子、例えば、正常細胞上で発現

50

される分子と比較して欠失、付加または突然変異を含む分子である。

【0078】

本明細書中で使用される場合、用語「治療する (treating)」は、増殖性障害の進行、重症度および/または持続時間の減少または改善、または治療の結果から生じる増殖性障害の1つ以上の症状(好ましくは1つ以上の識別可能な症状)の改善をいう。他の実施形態において、この用語は、増殖性障害の進行の阻害をいう。他の実施形態において、この用語は腫瘍サイズまたは癌性細胞数の減少または安定化をいう。用語「トランスフェクトされた (transfected)」は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスをいう。

【0079】

細胞は、一次被験体細胞およびその子孫を含む。

【0080】

用語「特異的に結合する」および「結合する」は同族核酸配列を認識し、結合する転写因子などの因子を意味する。

【0081】

本明細書中で使用される場合、非腫瘍環境(すなわち、健康な組織)における遺伝子発現の不在に関して「実質的に」および「本質的に」という用語は、全く存在しないか、または、残余発現レベルのみを意味する。いくつかの実施形態によれば、(健康な組織におけるように)実質的に発現がないことは、TME内で有効なレベルを誘導しながら、正常な健康な組織に対して生物学的/機能的に無効であるレベルでの発現レベルを指し得る。

【0082】

範囲：本開示全体を通して、本発明の様々な態様は、範囲フォーマットで提示することができる。範囲形式での説明は単に便宜および簡潔さのためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の説明は、その範囲内のすべての可能な部分範囲ならびに個々の数値を具体的に開示したものとみなされるべきである。例えば、1~6などの範囲の記載は1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などのサブ範囲、ならびにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6などの具体的に開示されたサブ範囲を有すると考えられるべきである。別の例として、95~99%同一などの範囲は、95%、96%、97%、98%または99%同一を有であるものを含み、96~99%、96~98%、96~97%、97~99%、97~98%および98~99%同一であるなどの下位範囲を含む。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

(説明)

いくつかの実施形態によれば、1つ以上のTME依存性プロモーター応答エレメントを含む合成プロモーターをコードする核酸配列；およびキメラ抗原受容体をコードする核酸配列を含む腫瘍環境(TME)応答性発現ベクターが提供される。TME応答ベクターは、TMEに存在する1つ以上の因子のプロモーター応答エレメントへの結合が直接的または間接的に、CARなどのエフェクター遺伝子の発現を誘導するように設計される。

【0083】

より少ない応答エレメントを含む間でトレードオフがなされ得ることが理解され、その結果、同じTME応答発現構築物を利用し、正常組織とは対照的に腫瘍組織に対する発現構築物の特異性を増加させる応答エレメントのより包括的な組み合わせを含む、広範なスペクトルの癌を標的化することができる。

【0084】

いくつかの実施形態によれば、CARは、キメラ抗原T細胞受容体(CAR-T)またはキメラ抗原ナチュラルキラー(NK)細胞受容体(CAR-NK)である。

【0085】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、1つ以上のインターフェロン-(IFN-、G)-応答エレメント/結合部位、1つ以上の核因子B(NF-B、K)-応答エレメント/結合部位、1つ以上の熱ショックタンパク質70(H

10

20

30

40

50

S P - 70) 応答エレメント / 結合部位、1つ以上の低酸素応答 (H) エレメント / 結合部位、1つ以上のインターロイキン 6 (I L - 6、J) 応答エレメント / 結合部位、またはそれらの任意の組み合わせを含む / 包含する。各可能性は、別個の実施形態である。

【0086】

いくつかの実施形態によれば、1つ以上の T M E 因子は、腫瘍壊死因子 (T N F -)、I F N - 、I L - 6、H S P - 70、および / または類似の活性化経路を誘導することができる等価物、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。

【0087】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、2つ以上のプロモーター応答エレメント / 結合部位を含む。いくつかの実施形態によれば、2つ以上のプロモーター応答エレメント / 結合部位は、同じであっても異なってもよい。非限定的な例として、2つ以上のプロモーター応答エレメント / 結合部位は、2つ以上の N F - B 応答エレメント / 結合部位を含み得る。別の非限定的な例として、2つ以上のプロモーター応答エレメント / 結合部位は、N F - B 応答エレメント / 結合部位および I F N - 応答エレメント / 結合部位を含み得る。いくつかの実施形態によれば、2つ以上の T M E 依存性プロモーター応答エレメントへの T M E 因子の結合は、単一の T M E 依存性プロモーター応答エレメントへの結合よりも高い C A R 発現レベルを誘導する。非限定的な例として、N F - B 応答エレメント / 結合部位への N F - B の結合、およびプロモーターの I F N - 応答エレメント / 結合部位への T N F - の結合はいくつかの実施形態によれば、N F - B または T N F - 単独の結合よりも高い C A R の発現を誘導し得る。

10

20

【0088】

いくつかの実施形態によれば、プロモーター応答エレメントは、配列番号 1 に示される T T C C G G G A A (本明細書中では G と略される)、配列番号 2 に示される G G G A A T T T C C (本明細書中では K と略される)、配列番号 3 に示される G A C C T T G A G T A C G T G C G T C T C T G C A C G T A T G (本明細書中では H と略される)、配列番号 4 に示される G C G C T T C C T G A C A G T G A C G C G A G C C G (本明細書中では J と略される)、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される核酸を含む。各可能性は、別個の実施形態である。非限定的な例として、プロモーター応答エレメントは、配列番号 1 (略称 G 2) に記載の核酸配列 T T C C G G G A A の 2 倍を含む。別の非限定的な例として、プロモーター応答エレメントは、配列番号 1 に示される核酸配列 T T C C G G G A A および配列番号 2 に示される核酸配列 G G G A A T T T C C (略称 G 1 K 1) の両方を含む。いくつかの実施形態によれば、核酸は、同延 (c o e x t e n s i v e) であってもよい。非限定的な例として、配列番号 3 に示される核酸配列 G A C C T T G A G T A C G T G C G T C T C T G C A C G T A T G の直後に、配列番号 4 に示される核酸配列 G C G C T T C C T G A C A G T G A C G C G A G C C G (略称 H 1 J 1) が続いてもよい。いくつかの実施形態によれば、核酸は、スペーサー配列によって分離され得る。非限定的な例として、配列番号 1 に記載の核酸配列 T T C C G G G A A および配列番号 2 に記載の核酸配列 G G G A A T T T C C は、同じ合成プロモーター内のスペーサー要素によって離間されてもよい。

30

40

【0089】

いくつかの実施形態によれば、T M E 応答性発現ベクターは、外部誘導性プロモーターをコードする核酸配列、およびトランスアクチベーター、例えば r t T A 3 をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、合成プロモーターはトランスアクチベーターの発現を駆動し、誘導性プロモーターは C A R の発現を駆動する。いくつかの実施形態によれば、外部インデューサーと T M E 因子との組み合わせた存在のみが、C A R 発現を生じる。いくつかの実施形態によれば、T M E 因子の非存在下での外部インデューサーの存在は、C A R 発現の誘導を実質的に引き起こさない。いくつかの実施形態によれば、T M E 因子の非存在下での外部インデューサーの存在は、C A R 発現の最小の誘導を引き起こす。いくつかの実施形態によれば、T M E 因子が、外部インデューサーの非存在下でプロモーター応答エレメントに結合する場合、本質的に C A R 発現は誘導されない

50

。いくつかの実施形態によれば、マイナーレベルのCAR発現もまた、誘導されない状態で見出される。そのような最小の発現は、CAR-T記憶が確実に維持されるように役立つ可能性がある。

【0090】

いくつかの実施形態によれば、誘導性プロモーターはTet応答要素プロモーターであってもよく、外部インデューサーはドキシサイクリンおよび/またはテトラサイクリンであってもよい。いくつかの実施形態によれば、Tet応答要素は、トランス活性化因子およびドキシサイクリンおよび/またはテトラサイクリンの組み合わせた存在によって活性化され得る。テトラサイクリン(Tet)-On系は哺乳類細胞の誘導性遺伝子発現系であり、ドキシサイクリン結合Tet-リプレッサー変異蛋白質と単純ヘルペスウイルスVP16蛋白質由来のC末端活性化因子ドメインから構成される逆Tetトランス活性化因子(rtTA)融合蛋白質がドキシサイクリン(Dox)を提供することにより、遺伝子発現を制御するように改変される。Doxの存在下で、rtTAはアレイ(例えば、7つ)反復Tetオペレーター配列の下流で融合される最小プロモーターを活性化する。最近まで、すべてのTet-On系は2つの別々のベクターを必要とし、1つはrtTAを導入し、もう1つは目的の遺伝子を制御するために誘導性プロモーターを用いた。しかしながら、最近、ワンベクター系が開発され、これにより、目的の遺伝子の初代免疫細胞への形質導入が可能になった。このワンベクター系を利用することにより、Tet-On誘導系を用いて標的発現および機能を制御することが可能である。

10

【0091】

いくつかの実施形態によれば、CAR配列によってコードされるCAR分子は抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含み、任意選択で、共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態によれば、抗原結合ドメインは腫瘍抗原に結合する。腫瘍抗原の非限定的な例としては、以下が挙げられる：甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR)；CD171；CS1(CD2サブセット1、CRACC、SLAMF7、CD319、Neu5Ac(28)bDGalp(CLL1)；ガングリオシド様分子1(2)bDGlcp(1-1)Cer)；Tn抗原(TnAg)；Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3)；CD38；B7H3(CD276)；KIT(CD117)；インターロイキン13受容体サブユニット-2(IL13Ra2)；インターロイキン11受容体(ILRa1)；前立腺幹細胞抗原(PSCA)；プロテアーゼセリン21(PRSS21)；血管内皮増殖因子受容体2(VEGFR2)；CD24；血小板由来増殖因子受容体(PDGFR-)；ステージ特異的胚性抗原-4(SSEA-4)；ムチン1、細胞表面関連(MUC1)；上皮増殖因子受容体(EGFR)；神経細胞接着分子(NCAM)；炭酸アンヒドラーゼIX(CAIX)；プロテアソーム、型(LMP2)；エフリンA受容体2(EphA2)；シアリルLewis接着分子(sLe)；ガングリオシドGM3(2-3)bDGalp(1-1)Cer；TGS5；高分子量エラノーマ関連抗原(HMWMAA)；o-アセチルGD2ガングリオシド(OAcGD2)；葉酸受容体；腫瘍内皮マーカー1(TEM1/CD248)；腫瘍内皮マーカー7関連(TEM7R)；クラウジン6(CLDN6)；G蛋白質共役受容体クラスCグループ5メンバーD(GPRC5D)；染色体Xオープンリーディングフレーム61(CXORF61)；CD97A；未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)；ポリシアル酸；胎盤特異的1(PLAC1)；グロボHグリコセラミドの六糖部分(GlobOH)；乳腺分化抗原(NY-BR1)；ウロプラキン2(UPK2)；肝炎A細胞性ウイルス受容体1(HAVCR1)；アドレナリン受容体3(PANX3)；G蛋白質共役受容体20(GPR20)；リンパ球抗原6座K(LY6K)；嗅覚受容体51E2(OR51E2)；TCR Gamma Alternate Reading Frame Protein(TARP)；Wilms腫瘍蛋白質(WT1)；染色体12pに位置するETS転座変異遺伝子6(ETV6-AML)；精子蛋白質17(SPA17)；Xantigen familyメンバー1A(XAGE1)；アンジオポエチン結合細胞表面受容体2(Tie2)；メラノーマ癌精巢抗原-2(MADCT-2)

20

30

40

50

; Fos 関連抗原 1 ; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T) ; アポトーシスのメラノーマ阻害剤 (M L - I A P) ; E R G (膜貫通プロテアーゼ、セリン 2 (T M P R S S) 融合遺伝子) ; N A c e t y l g l u c o s a m i n y l - t r a n s f e r a s e V (N A 1 7) ; ペアボックス蛋白質 Pax - 3 (P A X 3) ; アンドロゲン受容体 ; サイクリン B 1 ; v - ミエロサイトーシスウイルス性神経芽細胞腫由来ホモログ (M Y C N) ; R a s ホモログファミリー C (C Y P 1 B 1) ; C C C T C 結合因子 (Z i n c F i n g e r P r o t e i n) 様 (B O R I S) ; T 細胞により認識される扁平上皮癌抗原 (S A R T 3) ; ペアボックス蛋白質 Pax - 5 (P A X 5) ; プロアクロシン結合蛋白質 s p 3 2 (O Y - T E S 1) ; リンパ球特異的蛋白質チロシンキナーゼ (L C K) ; A キナーゼアンカー蛋白質 4 (A K A P - 4) ; 滑膜肉腫 X 切断点 2 (S S X 2) ; C D 7 9 A ; C D 7 9 A ; 白血球分離免疫グロブリン様受容体 1 (L A I R 1) ; 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリー A メンバー 2 (L I L R A 2) ; C D 3 0 0 分子様ファミリーメンバー f (C D 3 0 0 L F) ; C 型レクチンドメインファミリー 1 2 メンバー A (C L E C 1 2 A) ; 骨髄間質細胞抗原 2 (B S T 2) ; E G F 様モジュール含有ムチンホルモン様受容体様 2 (E M R 2) ; リンパ球抗原 7 5 (L Y 7 5) ; グリピカン - 3 (G P C 3) ; F c 受容体様 5 (F C R L 5) ; および免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド 1 (I G L 1) およびその任意の組合せ。各可能性は、別個の実施形態である。

10

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態によれば、TME 応答性発現ベクターは MMP 8 / 9 のプロテアーゼなどであるが、これらに限定されない、腫瘍への免疫エフェクター細胞の浸透を増強するタンパク質 (または機能性 RNA) をコードするエフェクター遺伝子をさらに含む。

20

【 0 0 9 3 】

いくつかの実施形態によれば、TME 応答性発現ベクターは、腫瘍内の PD 1 および / または CTLA 4 などの免疫阻害剤を抑制する miRNA をコードする 1 つまたは複数のエフェクター遺伝子をさらに含むが、これらに限定されない。

【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態によれば、TME 応答性発現ベクターは腫瘍内に免疫細胞保持をもたらすサイトカインをコードする 1 つ以上のエフェクター遺伝子 (例えば、CXCL 9 / 1 0 および / または CR CR 3 リガンド (これらに限定されない)) をさらに含み、それによってオートクリンループを生成する。

30

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態によれば、ベクターは哺乳動物細胞 (例えば、ヒト細胞) における発現を可能にする任意の適切なベクターであり得る。いくつかの実施形態によれば、ベクターは、DNA ベクター、RNA ベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターから選択され得る。各可能性は、別個の実施形態である。

【 0 0 9 6 】

いくつかの実施形態によれば、TME ベクターライブラリーが作製され得、このライブラリーは TME ベクターを含み、各々は、固有の TME 応答性発現エレメントプロフィールを有する。

40

【 0 0 9 7 】

いくつかの実施形態によれば、干渉性腫瘍環境 (TME) 応答性発現ベクターを含む免疫エフェクター細胞または細胞集団が提供される。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞または細胞集団は、NK 細胞または T 細胞である。

【 0 0 9 8 】

いくつかの実施形態によれば、それを必要とする患者において癌を治療するための方法であって、有効量の免疫エフェクター細胞を投与することを含む方法であって、前記免疫エフェクター細胞は、前記非硬化腫瘍環境 (TME) 応答性発現ベクターを含む、方法が提供される。

50

【0099】

いくつかの実施形態によれば、この方法はテトラサイクリンおよび/またはドキシサイクリンなどの外部誘導物質を患者に投与することをさらに含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態によれば、外部誘導物質は固有の固有がん環境(TME)反応ベクトルを有する免疫効果細胞を注射する前に、同時または後に提供される可能性がある。

【0100】

いくつかの実施形態によれば、この方法は、CAR発現レベルを評価する工程、および/または有害作用について患者をチェックする工程を含み得る。いくつかの実施形態によれば、CAR発現レベルは、外部誘導物質を投与する前に評価されてもよい。いくつかの実施形態によれば、CAR発現レベルは、外部誘導物質の投与中および/または投与後に評価することができる。非限定的な例として、最初に外部誘導物質のポラスを投与し、続いてCAR発現を評価することができる。次に、検出されたCAR発現レベルおよび治療に対する患者の反応に基づいて、2回目のポラス投与を行うことができる。いくつかの実施形態によれば、外部誘導物質は、繰り返し、例えば、10時間毎、毎日、2日毎、または任意の他の適切な時間隔で提供され得る。いくつかの実施形態によれば、外部誘導物質の投与は、副作用が検出された場合に終了されてもよい。いくつかの実施形態によれば、投与される外部誘導物質の量は、評価されたCAR発現レベルに基づいて、および/または治療に対する患者の応答に基づいて、増加/減少されてもよい。

10

【0101】

いくつかの実施形態によれば、CAR発現のための最適な合成プロモーターの決定のために患者をスクリーニングするための方法が提供される。この方法は、患者の腫瘍の生検を得ること、生検における1つ以上のTME因子の発現プロファイルを決めること、および/または生検における1つ以上のTME因子の発現プロファイルに一致するTME依存性プロモーター応答エレメントを有するTME応答性発現ベクターを選択および/または操作することを含む。いくつかの実施形態によれば、TMEは、腫瘍細胞および/または非腫瘍TME細胞によって発現され得る。いくつかの実施形態によれば、非腫瘍TME細胞は、免疫エフェクター細胞であってもよい。

20

【0102】

いくつかの実施形態によれば、患者の腫瘍から、および任意選択で健康な組織から得られた組織サンプルはインビトロおよびTME応答性ベクターのライブラリーで増殖させることができ、治療に最も有効かつ選択的であることを証明するベクター、すなわち、腫瘍のものと一致するTME応答プロファイルを有するベクターをスクリーニングするために使用することができる。これは、腫瘍組織において最大の発現を得る一方で、腫瘍に独特であり、その結果、健康な組織において発現が全く得られないか、または最小の発現が得られる。

30

【0103】

いくつかの実施形態によれば、この方法は、選択されたTME応答性発現ベクターを免疫エフェクター細胞または細胞集団に導入する工程をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞または細胞集団は、NK細胞またはT細胞である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞または細胞集団は、患者に対して自己由来である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞または細胞集団は、治療前に患者から単離される。

40

【0104】

いくつかの実施形態によれば、この方法は、免疫エフェクター細胞または細胞集団を患者に投与する工程をさらに包含する。

【0105】

ここで、いくつかの実施形態による、CAR(またはレポーター遺伝子)の発現を直接制御する合成プロモーターを含む発現構築物100を概略的に示す図1を参照する。発現構築物100は、宿主免疫エフェクター細胞に導入されると、発現構築物100のTME応答要素に一致するTME因子が普及している組織環境においてCAR(またはGFPマ

50

ーカー)の転写を直接誘導するように構成される。発現構築物100は、以下の要素を含む。

【0106】

Synth.Pro.(合成プロモーター)：(i)適切な近位エレメントで発現を開始することができるTATAAボックスを有する最小転写プロモーターと、(ii)プロモーター応答エレメントのユニークな組み合わせと、から構成される合成プロモーターである。ここでは、プロモーター応答エレメントは、IFN- 応答エレメント(「G」と略す)、NF-kB応答エレメント(「K」と略す)、低酸素応答エレメント(「H」と略す)、および/または、IL-6応答エレメント(「J」と略す)である。

【0107】

TME：TMEは、プロモーター応答エレメント配列が位置し、TMEに存在する誘導因子が結合できるプロモーターの領域をマーキングし、それによって合成プロモーター(例えば、IFN-、TNF-、低酸素およびIL-6)を活性化する。

【0108】

Puro：Puroは、合成プロモーターによっても転写される耐性遺伝子である。耐性遺伝子はここに示されるように、ピューロマイシン耐性遺伝子であるかもしれない。しかし、他の耐性遺伝子もまた適用可能であり、本開示の範囲内である。耐性遺伝子は、インビトロでポジティブと選択された細胞を、ベクターと共に導入することを可能とするために導入される。

【0109】

IRES：Internal Ribosome Entry Siteは同じmRNAから耐性遺伝子と標的遺伝子(例えば、CARまたはGFPマーカ)の両方の翻訳を可能にする。

【0110】

ここで、いくつかの実施形態による、CAR(またはレポーター遺伝子)の発現を間接的に制御する合成プロモーターを含む発現構築物200を概略的に示す図2を参照する。発現構築物200は、宿主免疫エフェクター細胞に導入されると、発現構築物200のTME応答要素に一致するTME因子が普及している組織環境において、トランスアクチベーターの転写を誘導するように構成される。次いで、トランスアクチベーターは、外因的に投与されたインデューサー(ここではドキシサイクリン)が提供される場合、CARの発現を誘導する。このようなCAR発現の間接的誘導はON-OFF安全メカニズムを提供し、非特異的発現が検出された場合、または有害作用が観察された場合にCAR発現の停止を可能にする。

【0111】

発現構築物200は、以下の要素を含む。

【0112】

Synth.Pro.(合成プロモーター)：(i)適切な近位エレメントで発現を開始することができるTATAAボックスを有する最小転写プロモーターと、(ii)プロモーター応答エレメントのユニークな組み合わせとから構成される合成プロモーターである。ここでは、プロモーター応答エレメントは、IFN- 応答エレメント(「G」と略す)、NF-kB応答エレメント(「K」と略す)、低酸素応答エレメント(「H」と略す)、および/またはIL-6応答エレメント(「J」と略す)である。

【0113】

TME：TMEは、プロモーター応答エレメント配列が位置し、TMEに存在する誘導因子が結合できるプロモーターの領域をマーキングする。それによって合成プロモーター(例えば、IFN-、TNF-、低酸素およびIL-6)を活性化する。

【0114】

Puro：合成プロモーターによっても転写される耐性遺伝子である。耐性遺伝子はここに示されるように、ピューロマイシン耐性遺伝子であっても良い。しかし、他の耐性遺伝子もまた適用可能であり、本開示の範囲内である。耐性遺伝子は、インビトロでポジテ

10

20

30

40

50

ィブと選択された細胞を、ベクターと共に導入することを可能とするために導入される。

【0115】

r t T A 3 : 転写が合成プロモーターによって媒介されるトランス活性化遺伝子である。

【0116】

I R E S : I R E S エlementは、同じ合成プロモーターから耐性遺伝子とトランスアクチベーター遺伝子(ここでは r t T A 3)の両方の転写を可能にする。

【0117】

D o x : テトラサイクリンの強力な類似体であるドキシサイクリンテトラサイクリンであり、トランス活性化因子に対する共活性化因子として働く。

【0118】

T R E 3 G : T e t 応答Elementプロモーターで、r t T A 3 と外因性ドキシサイクリンの併用により活性化され、C A R (またはレポーター遺伝子または他の標的遺伝子)の転写を媒介する。これは、一方ではT e t 応答Elementプロモーター下のr t T A 3 トランスアクチベーターおよびレポーター遺伝子/C A Rの前に上記の合成プロモーターを構築することによって、さらなる安全層と共に増幅されたT M E 特異的C A R 発現を可能にする、増強安全性ベクターの基礎である。r t T A - t e t 応答を含むことにより、V P 1 6 転写アクチベーターをリクルートする際の転写の増幅が得られる。さらに、テトラサイクリン/ドキシサイクリン誘導性Elementはテトラサイクリン(またはD o x)の存在下でのみ活性であるため、別の安全層を付加し、したがって、系を容易にオフにすることを可能にする。

【0119】

m i R E : マイクロRNA Element (m i R E) はT R E 3 g プロモーター転写O R Fの転写終結と、目的とする他の遺伝子のサイレンシングのためのm i Rの同時発現(例えば、内因性T細胞レセプターまたはP D - 1のような免疫チェックポイントレセプターのサイレンシング)の両方を提供している。

【0120】

いくつかの実施形態によれば、最適な腫瘍微小環境(T M E)発現パターンを有するためのプロモーター-ライブラリー、すなわち、T M E において強い発現を誘導するが、非T M E においては発現があったとしても無いに等しいプロモーターを、スクリーニングするための方法が提供される。

【0121】

いくつかの実施形態によれば、プロモーターライブラリーは、構築され、場合によりインピットで機能的に試験される候補合成プロモーターを有する発現構築物を含む。

【0122】

いくつかの実施形態によれば、ライブラリー中のプロモーターは、T M E 内で活性化される転写因子の予想される結合部位を有する核酸配列を有する。

【0123】

いくつかの実施形態によれば、プロモーターは2つ以上の候補核酸配列を含み、候補核酸配列は、ヌクレオチド配列(本明細書では「スペーサー」とも呼ばれる)によって離間されている。

【0124】

いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子が後に続く最小プロモーター配列をさらに含む。

【0125】

いくつかの実施形態によれば、構築物は、2つの蛍光レポーター:潜在的なオフフレームA T G 開始コドン(ここではA T G)を有する第1のレポーター、および、その独立した翻訳を可能にする内部リボソームエンターサイト(I R E S)の後に位置する第2のレポーター、を含む。いくつかの実施形態によれば、第1の蛍光レポーターは翻訳が不十分であり、高度に転写された場合にのみシグナルを生じ、一方、第2の蛍光レポーターは、低レベルで転写さ

10

20

30

40

50

れた場合にも、独立して翻訳される。

【0126】

いくつかの実施形態によれば、候補プロモーターのライブラリーは、定常「コア」部分を有するプロモーター、および目的の転写因子の結合部位に基づく可変ヌクレオチドを含む。スパーサー配列、結合部位のタンDEM反復、および複数の因子の種々の結合部位の組成もまた、ライブラリーの生成を可能にする。いくつかの実施形態によれば、複雑さは、目的の転写因子の複数の結合部位の分析に基づいて、戦略的位置に可変ヌクレオチドを集中させることによって制限され得る。いくつかの実施形態によれば、複雑性は、可変ヌクレオチドおよび/または結合部位の反復および/またはそれらの間のスパーサーの付加によって増加され得る。

10

【0127】

非限定的な例として、特定の可変ヌクレオチドを有するコア部位はS T A T 1結合のためのA Y T T C C S G G A A R T、およびN F - k BのためのG G R R R T T Y Y C (ここで、A = アデニン、T = チミジン、C = シチジン、G = グアニン、Y = C / T、S = C / G、R = A / Gである)を含むことができるが、これらに限定されない。適切なスパーサーの非限定的な例としては、A G G G T G G G C A A G T、t c t a g a、G G G G A C T T T C Cが挙げられる。

【0128】

いくつかの実施形態によれば、プロモーターは発現ベクター(例えば、上記の第1および第2の蛍光レポーター、ならびにプラスミド増殖およびレンチウイルス粒子の生成に必要なとされるさらなる配列を有するp H a g e 2 レンチウイルスベクター(これらに限定されない))にクローニングされる。

20

【0129】

いくつかの実施形態によれば、合成プロモーター配列は、任意のクローニング技術を使用して発現ベクターにクローニングされ得る。適切なクローニング技術の非限定的な例としては、制限酵素を使用する「古典的」クローニング、および融合クローニングが挙げられる。

【0130】

必要に応じて、非ブルーフリーダーポリメラーゼを使用するプロモーターライブラリーのP C R増幅を利用して、ランダム突然変異を導入することができ、これは、ライブラリーの可変性および複雑性をさらに増大し得る。

30

【0131】

いくつかの実施形態によれば、レンチウイルスは293T-HEKセルにおける、パッケージングプラスミドと共に、表現ベクトルの一時的な共変性などの一般的な技法によって生成される可能性がある。次いで、目的の細胞株(例えば、293細胞)を、ウイルス(好ましくは、M O I < 0.3)で形質導入して、細胞当たり単一コピーを得てもよく、その後、必要に応じて増殖させてもよい。

【0132】

いくつかの実施形態によれば、この方法は最適なプロモーター、すなわち、T M Eにおいて強い発現を誘導するが、非T M Eにおいて発現があったとしてもほとんどないプロモーターを有する細胞を同定することをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、細胞は、T N F - 、I F N - 、低酸素、I L - 6、およびT G F - などの関連するT M E因子(これらに限定されない)の存在下/非存在下で、刺激の有無にかかわらず、形質導入された細胞を増殖させることによって同定され得る。次いで、細胞を、レポーター遺伝子の発現に従って(例えば、F A C Sを使用して)選別する。いくつかの実施形態によれば、第1および第2の蛍光レポーターの両方の二重色を獲得する非常に高い発現を有する細胞は、第2のレポーターのみの中程度の高い発現を有する細胞から分離され得る。

40

【0133】

他の技術が使用されてもよいことが理解される。例えば、第1および第2のレポーターは抗生物質耐性遺伝子であっても良く、この場合、選別は抗生物質耐性細胞を同定するよ

50

うになされ得る。

【0134】

いくつかの実施形態によれば、選別された細胞はサイトカインを刺激することなくさらに増殖され、次いで、構成的活性プロモーターを回避するために、第1のレポーターの陰性/低発現について選別される。次いで、刺激の非存在下でネガティブ/ローの第1のレポーター発現を示す細胞をさらに増殖させる。

【0135】

いくつかの実施形態によれば、本方法は、上述の陽性および陰性選択を本質的に繰り返すことによって、追加の刺激分類工程をさらに含んでもよい。

【0136】

いくつかの実施形態によれば、一旦所望の表現型が得られると、本方法は従来の分子生物学を使用して、細胞からゲノムDNAを抽出すること（任意に、細胞のさらなる増殖の後）をさらに含み得る。ベクターのプロモーターはPCRを使用して、例えば、組み込まれたライブラリーの上流および下流の配列に特異的なプライマーを使用して、抽出される。いくつかの実施形態によれば、プライマーは、商業的サービスを使用する直接配列決定を可能にする追加の伸長部分を含む。

【0137】

いくつかの実施形態によれば、この方法は濃縮されたプロモーターの配列をライブラリーの配列と比較すること、および場合により、新規の最適なプロモーター配列を同定するための既知のプロモーターとも比較することをさらに含む。

【0138】

いくつかの実施形態によれば、この方法は、スクリーニングされた細胞株および/または他の細胞株および/または目的の一次免疫細胞における同定された最適なプロモーターの活性を確認することをさらに含む。

【0139】

図3は、最適な腫瘍微小環境（TME）CAR発現パターンを提供するためのプロモーターライブラリーをスクリーニングするための方法の例示的なフローチャート300である。

【0140】

本方法の工程310において、候補プロモーターを含むライブラリー（例えば、レンチウイルス（LV）ライブラリー）が、本質的に本明細書に記載されるように構築される。

【0141】

工程320において、細胞株（例えば、293細胞）を、ライブラリーのレンチウイルスに感染させる。一旦、プロモーター構築物を発現する細胞株が生成されると、工程330において、細胞は刺激（rtTA3およびドキシサイクリン）の存在または非存在下、および刺激サイトカインの存在または非存在下で培養され、次いで、TME依存性レポーターのみの中程度の高発現を有する細胞から、第1および第2の蛍光レポーターの両方の二重色を獲得する非常に高い発現を有する細胞を分離することによって、それらのレポーター遺伝子発現プロファイルに従って（例えば、FACSによって）選別される。本明細書中に説明されるように、この工程は、プロモーターの感度および/または特異性をさらに増強するために繰り返され得る。

【0142】

工程340において、所望の発現プロファイル（刺激およびサイトカインの存在下での両方のプロモーターの高発現、第2のプロファイルの発現はほとんどまたは全くない）を有する細胞が同定され、サイトカインの非存在下でのTME依存性レポーターが同定され、そしてそれらのプロモーターが配列決定される（工程350）。

【0143】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態をより完全に例示するために提示される。しかしながら、それらは、本発明の広い範囲を限定するものとして決して解釈されるべきではない。当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示された原理

10

20

30

40

50

の多くの変形および修正を容易に考案することができる。

【0144】

(実施例)

(実施例1 - 応答エレメントの定義)

以下の応答エレメント配列を含むプロモーターを、以下の表1に列挙する。応答エレメントは、適切な近位エレメントで発現を開始できるTATAAボックスを有する最小転写プロモーターの直前に構築された。

【0145】

表1：プロモーター応答エレメント配列

【0146】

【表1】

| Abbreviation | Response elements | Sequence | SEQ ID NO. |
|--------------|-------------------|--|-----------------|
| K1 | 1xNF-κB | GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATT TCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCAGAG CATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGA ACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGC TTAAAAGCGGCCGCC | SEQ ID NO. 5 |
| G2 | 2xIFN-γ | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGG AAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGC AGTAGGTTTTTCGCATATTAAGGTGACG CGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCT GCAGCGACCCGCTTAAAAGGCGCGCC | SEQ ID NO. 6 |
| G4 | 4xIFN-γ | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGG AAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGC AGTAGGTACAGCCTTCCGGGAAAGGGT GGGCAAGTTTCCGGGAAAGCAGTAGGT ACAGCCTTCCGGGAAAGGGTGGGCAAG TTTCCGGGAAAGCAGTAGGTTTTTCGCA TATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAAC ACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTT AAAAGGCGGCC | SEQ ID NO. 7 |

10

20

30

40

| | | | |
|--------|---|--|------------------|
| G6 | 6xIFN- γ | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGG AAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGC AGTAGGTACAGCCTTCCGGGAAAGGGT GGGCAAGTTTCCGGGAAAGCAGTAGGT ACAGCCTTCCGGGAAAGGGTGGGCAAG TTTCCGGGAAAGCAGTAGGTACAGCCTT CCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGG AAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGGAA AGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGCAG TAGGTTTTTCGCATATTAAGGTGACGCG TGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGC AGCGACCCGCTTAAAAGGCGCGCC | SEQ ID NO. 8 |
| G1K1 | 1xIFN- γ + 1xNF- κ B | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTCCG GGAACCCGGGAATTTCCGGGGACTTTCC GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATT TCCAGAGCATATTAAGGTGACGCGTGTG GCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGC GACCCGCTTAAAAGCGGCC | SEQ ID NO. 9 |
| G1K0.6 | 1xIFN- γ + 60% NF- κ B | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTCCG GGAACCCGGGAATTTCCGGGGACTTTCC GGGAATTTCCAGAGCATATTAAGGTGA CGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGAC CCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCC GCC | SEQ ID NO. 10 |
| G2K2 | 2xIFN- γ + 2xNF- κ B | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGG AAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGA GCAGGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGG AATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCC AGAGCAGGGAATTTCCGGGGACTTTCC GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATT TCCAGAGCATATTAAGGTGACGCGTGTG | SEQ ID NO. 11 |

10

20

30

40

| | | | |
|------------|---|---|------------------|
| | | GCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGC GACCCGCTTAAAAGGCGCGCC | |
| G3K3 | 3xIFN- γ + 3xNF- κ B | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGG AAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGC AGTAGGTACAGCCTTCCGGGAAAGGGT GGGCAAGTTTCCGGGAAAGAGCAGGGA ATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCG GGGACTTTCCGGGAATTTCCAGAGCAG GGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTT CCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCAGAGC AGGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAAT TTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCAGA GCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCG AACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCG CTTAAAAGGCGCGCC | SEQ ID NO. 12 |
| G3H2K 3 | 3xIFN- γ + 2xhypoxia+ 2xNF- κ B | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGG AAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGC AGTAGGTACAGCCTTCCGGGAAAGGGT GGGCAAGTTTCCGGGAAAGCAGTAGGT ACAGCCGACCTTGAGTACGTGCGTCTCT GCACGTATGAGAGCAGACCTTGAGTAC GTGCGTCTCTGCACGTATGAGAGCAGG GAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCC CGGGGACTTTCCGGGAATTTCCAGAGCA GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATT TCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCAGAG CAGGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGA ATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCA GAGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCT CGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACC CGCTTAAAAGGCGCGCC | SEQ ID NO. 13 |

10

20

30

40

| | | | | |
|------------|--|--|------------------|----|
| G3K3H 2 | 3xIFN- γ + 3xNF- κ B + 2xhypoxia | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGG AAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGC AGTAGGTACAGCCTTCCGGGAAAGGGT GGGCAAGTTTCCGGGAAAGAGCAGGGA ATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCG GGACTTTCCGGGAATTTCCAGAGCAG GGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTT CCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCAGAGC AGGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAAT TTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCAGA GCAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCA CGTATGAGAGCAGACCTTGAGTACGTG CGTCTCTGCACGTATGAGAGCATATTA GGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGA GCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAG GCGCGCC | SEQ ID NO. 14 | 10 |
| G2H2K 2 | 2xIFN- γ + 2xhypoxia+ 2xNF- κ B | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGG AAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGC AGTAGGTACAGCCGACCTTGAGTACGT GCGTCTCTGCACGTATGAGAGCAGACCT TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGAG AGCAGGGAATTTCCGGGGACTTTCCGG GAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTT CAGAGCAGGGAATTTCCGGGGACTTTCC GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATT TCCAGAGCATATTAAGGTGACGCGTGTG GCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGC GACCCGCTTAAAAGGCGCGCC | SEQ ID NO. 15 | 30 |
| G2K2H 2 | 2xIFN- γ + 2xNF- κ B + 2xhypoxia | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCTTCCGGG AAAGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGA | SEQ ID NO. 16 | 40 |

| | | | | |
|------------|--|---|------------------|----------|
| | | GCAGGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGG AATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCC AGAGCAGGGAATTTCCGGGGACTTTCC GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATT TCCAGAGCAGACCTTGAGTACGTGCGTC TCTGCACGTATGAGAGCAGACCTTGAGT ACGTGCGTCTCTGCACGTATGAGAGCAT ATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAAC ACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTT AAAAGGCGCGCC | | 10 |
| H2G2K 2 | 2xhypoxia + 2xIFN- γ + 2xNF- κ B | GACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGT ATGAGAGCAGACCTTGAGTACGTGCGT CTCTGCACGTATGAGAGCATTCCGGGAA AGGGTGGGCAAGTTTCCGGGAAAGCAG TAGGTACAGCCTTCCGGGAAAGGGTGG GCAAGTTTCCGGGAAAGAGCAGGGAAT TTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCGGG GACTTTCCGGGAATTTCCAGAGCAGGG AATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCC GGGGACTTTCCGGGAATTTCCAGAGCAT ATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAAC ACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTT AAAAGGCGCGCC | SEQ ID NO. 17 | 20 |
| G1H2K 1 | 1xIFN- γ + 2xhypoxia + 1xNF- κ B | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAAAGCAGTAGGTACAGCCGACCTTG AGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGAGAG CAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCAC GTATGAGAGCAGGGAATTTCCGGGGAC TTTCCGGGAATTTCCGGGGACTTTCCGG GAATTTCCAGAGCATATTAAGGTGACGC GTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCT GCAGCGACCCGCTTAAAAGGCGCGCC | SEQ ID NO. 18 | 30 40 |

| | | | |
|--------------|--|---|------------------|
| G1J1H 1 | 1xIFN- γ + 1xIL-6 + 1xhypoxia | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAACCCGACCTTGAGTACGTGCGTCTC TGCACGTATGTACAGCGCTTCTGACAG TGACGCGAGCCGAGAGCATATTAAGGT GACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCG ACCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGG CCGCC | SEQ ID NO. 19 |
| G1K0.6 J1 | 1xIFN- γ + 60% NF- κ B + 1xIL-6 | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAACCCGGAATTTCCGGGGACTTTCC GGGAATTTCTACAGCGCTTCTGACAG TGACGCGAGCCGAGAGCATATTAAGGT GACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCG ACCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGG CCGCC | SEQ ID NO. 20 |
| G1K0.6 H1 | 1xIFN- γ + 60% NF- κ B + 1xhypoxia | TTCCGGGAAAGGGTGGGCAAGTTTCCG GGAACCCGGAATTTCCGGGGACTTTCC GGGAATTTCTACAGACCTTGAGTACGT GCGTCTCTGCACGTATGAGAGCATATTA AGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCG AGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAAA GCGGCCGCC | SEQ ID NO. 21 |

10

20

【 0 1 4 7 】

表 1 に列挙される応答エレメントに結合する因子または因子の組み合わせ（例えば、TNF- α 、NF- κ B および IL-6）は多くの TME に特徴的であり、これらの因子の特定の組み合わせは、特に、TME シグネチャー / プロファイルを表し得る。

30

【 0 1 4 8 】

しかしながら、前述の要因が全ての TME に存在するわけではないことに留意されたい。同様に、特定の TME においても、追加の要因を見出すことができる。したがって、他の応答要素が含まれてもよく、または前述の応答要素を置換してもよく、そのような追加および / または置換は、本開示の範囲内である。

【 0 1 4 9 】

さらに、本明細書で説明するように、より少ないまたはより多い応答要素を含むことの間でトレードオフを行うことができることを理解されたい。例えば、より少ないタイプの応答エレメントを含むことは、同じ TME 応答性発現構築物を利用して、広範囲の癌に対する発現の標的化を可能にし得る。別の例として、応答エレメントのより包括的 / 網羅的な組み合わせを含むことは、正常 / 健康な組織とは対照的に、腫瘍組織に対する発現構築物の特異性を増加させ得る。

40

（実施例 2 - プロモーターの漏れを制御）

本発明の主な局面は、TME 内の免疫エフェクター遺伝子の内因性誘導を得ることである。本明細書に開示される合成プロモーターは健康な組織における発現を実質的に制限しながら、TME 内での発現を誘導するように構成される。そこで、合成プロモーターの漏洩性を評価した。

【 0 1 5 0 】

50

2つのタイプの漏れが想定された。

【0151】

第1のタイプの漏出は、図1の発現構築物100の場合のようにCAR/GFPレポーターであろうと、図2の発現構築物200の場合のようにトランスアクチベーターであろうと、TME因子の不在下で、TME刺激プロモーターからの転写として現れる。このタイプの漏出性は、外因的に提供されたTME関連刺激なしで、内因的に試験された細胞が因子を発現するため、またはプロモーター漏出性自体による、最小プロモーターの誘導に起因する可能性がある。

【0152】

図2の発現構築物200のようなTet応答要素プロモーターを含む発現構築物に関連する第2のタイプの漏出レベルは、ドキシサイクリン/テトラサイクリンの不在下でのCAR/GFPレポーターの発現を指す。このタイプの漏出は、(i)使用される培地または血清中の残留tet/doxの存在、したがって、インビトロ設定の人為結果であること、または(ii)プロモーター漏出それ自体に起因し得る。

10

【0153】

HEK293T細胞を、図2に開示される発現ベクターおよび以下の応答エレメントで形質導入した。

【0154】

1. G2(2xIFN-)、

2. G1K0.6(1xIFN- とNF- B配列要素の60%の組合せ)、または

20

3. G3K3(3xIFN- と3xNF- B(の組合せ))。

【0155】

細胞はベクター形質導入細胞のみの生存を保証するために、ピューロマイシンによる選択を受けた。

【0156】

GFP集約度およびGFPポジティブセルの割合をテストした。

【0157】

図4Aのヒストグラムならびに図4Bの代表的なFACSプロットから分かるように、3つの場合すべてにおいて、細胞培地へのドキシサイクリンの添加はそれ自体ではGFP発現を誘導しなかった(すなわち、GFP強度またはGFP陽性細胞のパーセンテージの増加は観察されなかった)。しかしながら、ドキシサイクリンとTNF- および/またはIFN- の組み合わせの存在において、GFP強度およびGFP-正細胞の割合は著しく増加した。

30

【0158】

これらの結果は、本明細書中に開示される発現構築物がTME特異的発現を可能にすることを明らかに実証する。

(実施例3-応答エレメントのシナジー)

TME応答性エレメントの組み合わせを含むことは、相乗的発現を提供すると仮定された。

40

【0159】

単一のIFN- エレメントと比較して多数のIFN- エレメント(2、4、および6)を含む効果は、GFP陽性細胞の頻度およびGFP強度の両方において、2つのIFN- エレメントの後にすでに安定状態に達した(データは示さず)。

【0160】

しかしながら、図5から分かるように、3つのIFN- エレメント応答エレメントおよび3つのNF- B応答エレメントを含むプロモーターが、IFN- 応答エレメントのみを含むプロモーターよりも有意に高い割合のGFP陽性細胞を提供するという点で、NF- B応答エレメントをIFN- エレメントに添加した場合、相乗作用が有利に観察された。

50

(実施例4 - TMEプロファイリング)

炎症性サイトカインと単一サイトカインによる刺激の組み合わせによる刺激時のGFP発現の強度と頻度も試験した。要するに、HEK293T細胞を、以下の合成プロモーターの1つを含むベクターで形質導入した。

【0161】

1. G1K0.6 : 1 x IFN- と NF- B の60%、
2. G3K3 : 3 x IFN- と 3 x NF- B との併用。

【0162】

今度は、細胞を事前のピューロマイシン選択なしで採取したので、その結果は、形質導入細胞および非形質導入細胞の全細胞集団を表す。

10

【0163】

図6は、代表的なFACSプロット(上のパネル)、ゲーティングGFP陽性細胞(GFP+)、ならびに各試験条件についてのGFP強度(中央値)の定量を示すヒストグラム(下のパネル)を示す。

【0164】

特に、G3K3応答エレメントを有する発現構築物を有する形質導入細胞は、サイトカイン添加当たりの累積発現を示した。G1K0.6応答エレメントを有する発現構築物を形質導入した細胞において、IFN- およびTNF- の各々を別々に加えると、低レベルの発現のみが引き起こされたが、IFN- およびTNF- の両方を用いた併用処理は実質的に高い発現レベルを誘導した。

20

【0165】

これらの結果は、制御されたレベルの表現が固有の表現構成物を用いて達成できることを明確に示している。好ましくは、利用される構築物が必要性に基づいて発現レベルを最適化するように、処理/標的化された細胞のTMEプロフィールに慣れているべきである。

(実施例5 - 3因子応答エレメント)

2つの応答要素IFN- およびNF- B (GおよびK)の組合せを用いた研究に続いて、IL-6および低酸素(JおよびH)という追加因子の結合部位を含む応答要素も、前述のように本質的に評価した。

【0166】

HEK293T細胞を、以下の合成プロモーターの1つを含むベクターで形質導入した。

30

【0167】

1. G1K0.6 J1 : 1 x IFN- 、NF- B の60%、1 x IL-6 応答エレメント配列、
2. G1K0.6 H1 : 1 x IFN- 、NF- B の60%、1 x Hypoxia 応答エレメント配列。

【0168】

GFP強度および発現頻度を、示された因子による刺激の前後にFACSによって評価した。細胞を選択せずに回収した。

40

【0169】

図7は、各プロモーターおよび各条件におけるGFP陽性細胞(GFP+)のFACSプロット(上部パネル)および各条件におけるGFP陽性細胞の発現強度(中央値として)の定量化を示すヒストグラム(下部パネル)を示す。

【0170】

図7から分かるように、G1K0.6要素の下流に第3の応答要素を挿入しても、その相乗効果にはそれ以上寄与しなかった。これは、必ずしも一般的な観察ではなく、むしろ試験された特定の細胞株の代表であり得ることに留意されたい。

(実施例6 - 最適なプロモーター配列のスクリーニング)

最適なCAR発現プロフィールを提供するプロモーターを同定するために、候補プロモ

50

ーターのレンチウイルスライブラリーを構築した。ライブラリーは、定常「コア」部分を有するプロモーター、および目的の転写因子の結合部位に基づく可変ヌクレオチドを有する構築物を含む。スペーサー配列、結合部位のタンデム反復、および複数の因子の種々の結合部位の組成も含まれる。プロモーターの可変性はプロモーターの戦略的および/またはランダムな位置でヌクレオチドを変化させ、付加し、および/または欠失させることによって生じた。複合性は、結合部位反復および/またはそれらの間のスペーサーの数を変化させることによってさらに増加した。合計 65,536 のプロモーター配列をスクリーニングに含めた。

【0171】

ライブラリーの構築物は、高レベルの転写物、すなわち高レベルの転写因子、ここでは TME 転写因子の存在下でのみレポーター遺伝子が翻訳されることを確実にする潜在的オフフレーム ATG 開始コドンを含む。この構築物はまた、内部リボソームエンターサイト (IRES) の後に位置する第 2 のレポーター (DsRed) を含み、これもまた低レベルの転写物で、その独立した翻訳を可能にする。

10

【0172】

その後、構築物をレンチウイルスベクターにクローニングし、ウイルスは包装プラスミドと共にレンチウイルスベクターの一時的なコトランスフェクションにより、293T-HEKセルに生成した。

【0173】

次に 293 個の細胞をレンチウイルスに感染 (形質導入) させ、ライブラリーのプロモーター構築物をゲノムに組み込んだ細胞株を得た。

20

【0174】

次いで、形質導入細胞を 250 U/mL TNF、IFN または TNF および IFN の存在下または非存在下で 48 時間増殖させ、続いて FACS 選別に供した。最初に、TNF、IFN または TNF および IFN の存在下で高い GFP 発現または高い GFP および DsRed 発現を示す細胞をゲートした (「陽性」選別)。図 8 の上部パネルから分かるように、サイトカインの非存在下では細胞の 0.09% のみが高い GFP 発現を示したが、TNF、IFN または TNF および IFN の存在下では細胞の 0.2% が高い GFP 発現を示した。

30

【0175】

次いで、ゲートされた細胞を、サイトカインの非存在下で増殖させた後、「ネガティブ」ソーティングのラウンドに供した (図 8 の第 2 のパネル)。この選別工程の間、サイトカインの非存在下で GFP 発現を全くまたはほとんど有さない細胞が獲得されたが、構造的発現を引き起こすプロモーターを有する細胞は廃棄された (または別々に選別された)。

【0176】

最初の集団の 1.94% である最終集団が獲得されるまで、ソーティングの陽性および陰性ラウンドを 2 回繰り返す (図 8 の第 3 および第 4 パネル)、この集団は高 GFP 発現を有すること、すなわち、TNF および/または IFN の存在/非存在に対して高度に感受性の発現様式を有することによって特徴付けられた。

40

【0177】

獲得した細胞を増殖させ、それらのプロモーターを、プロモーター特異的プライマーを用いて配列決定した。スクリーニングは、スクリーニングに含まれる 65,536 個の配列のうち 19 個の配列を同定した。18 個の配列は本質的に類似していたが、16 個のヌクレオチド (太字および下線) に加えて、いくつかの場合において、いくつかのさらなるランダムな変化が異なっていた。他の 18 個と多少異なるさらなる配列 (配列番号 41) も得られた。

【0178】

以下の表 2 は、スクリーニングから検索された最適な CAR 発現プロフィールを提供するプロモーターの配列を提供する。

50

【 0 1 7 9 】

表 2 : プロモーター配列

【 0 1 8 0 】

【 表 2 】

| SEQ ID NO. | Sequence | |
|---------------|--|----|
| 22 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>CTTCCCGGAA</u> ATAGGGTGGGCAAGTAT <u>TTCCG</u> GGAA <u>ATTCTAGAGG</u> <u>GAGTTCCCGGG</u> ACTTTCCGG <u>GGA</u> TT <u>TTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC | 10 |
| 23 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>CTTCCCGGAA</u> GTAGGGTGGGCAAGT <u>ACTTCCG</u> GGA <u>ATTCTAGAGG</u> <u>AAA</u> TT <u>TT</u> CGGGGACTTTCCGG <u>GGG</u> TT <u>CTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC | 20 |
| 24 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>CTTCCCGGAA</u> GTAGGGTGGGCAAGT <u>ACTTCCG</u> GGAA <u>ATTCTAGAGG</u> <u>GAGTTCT</u> CGGGGACTTTCCGG <u>GAA</u> TT <u>TTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC | 30 |
| 25 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>CTTCCCGGAA</u> GTAGGGTGGGCAAGTAT <u>TTCCG</u> GGA <u>ATTCTAGAGG</u> <u>AAGTTCT</u> CGGGGACTTTCCGG <u>GAG</u> ATT <u>CTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC | |
| 26 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>CTTCCCGGAA</u> ATAGGGTGGGCAAGT <u>ACTTCCG</u> GGAA <u>ATTCTAGAGG</u> <u>GGA</u> TT <u>TCC</u> CGGGGACTTTCCGG <u>AGG</u> TT <u>CTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA | 40 |

| | |
|----|---|
| | CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC |
| 27 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>C</u> TTCC <u>G</u> GGAA <u>A</u> TAGGGTGGGCAAGTA <u>C</u> TTCC <u>G</u> GGAAG <u>T</u> TCTAGAGG <u>A</u> GGT <u>T</u> TCGGGGACTTTCCGG <u>A</u> GGT <u>T</u> TC TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC |
| 28 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>C</u> TTCC <u>G</u> GGAA <u>G</u> TAGGGTGGGCAAGTA <u>T</u> TTCC <u>C</u> GGAAG <u>T</u> TCTAGAGG <u>G</u> GGT <u>T</u> TCGGGGACTTTCCGG <u>A</u> GGT <u>T</u> TC TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC |
| 29 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>C</u> TTCC <u>G</u> GGAA <u>G</u> TAGGGTGGGCAAGTA <u>T</u> TTCC <u>G</u> GGAA <u>A</u> TTCTAGAGG <u>G</u> AGT <u>T</u> TCGGGGACTTTCCGG <u>G</u> ATT <u>T</u> TC TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC |
| 30 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>T</u> TTCC <u>C</u> GGAA <u>A</u> TAGGGTGGGCAAGTA <u>C</u> TTCC <u>G</u> GGAA <u>A</u> TTCTAGAGG <u>G</u> GGT <u>T</u> TCGGGGACTTTCCGG <u>G</u> GGT <u>T</u> TC TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC |
| 31 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>T</u> TTCC <u>C</u> GGAA <u>A</u> TAGGGTGGGCAAGTA <u>T</u> TTCC <u>C</u> GGAA <u>A</u> TTCTAGAGG <u>G</u> GGT <u>T</u> TCGGGGACTTTCCGG <u>G</u> AA <u>T</u> TT <u>C</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC |

10

20

30

40

| | |
|----|---|
| 32 | <p>TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA<u>TTTCC</u><u>CGGAA</u>A<u>TAGGGTGGGCAAGTA</u><u>TTTCCG</u> GAA<u>A</u>TTCTAGAGG<u>AGG</u><u>TTCT</u>CGGGGACTTTCCGG<u>GAG</u><u>TTTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC</p> |
| 33 | <p>TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA<u>TTTCC</u><u>CGGAA</u>A<u>TAGGGTGGGCAAGTA</u><u>TTTCCG</u> GAA<u>A</u>TTCTAGAGG<u>AGG</u><u>TTTC</u>CGGGGACTTTCCGG<u>GAG</u><u>TTTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC</p> |
| 34 | <p>TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA<u>TTTCC</u><u>CGGAA</u>A<u>TAGGGTGGGCAAGTA</u><u>TTTCCG</u> GAA<u>G</u>TTCTAGAGG<u>AAG</u><u>TTTC</u>CGGGGACTTTCCGG<u>GAA</u><u>TTTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC</p> |
| 35 | <p>TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA<u>TTTCC</u><u>G</u>GGAA<u>A</u>TAGGGTGGGCAAGTA<u>TTTCC</u> GAA<u>G</u>TTCTAGAGG<u>AGA</u><u>TTCT</u>CGGGGACTTTCCGG<u>GG</u><u>TTCTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC</p> |
| 36 | <p>TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA<u>TTTCC</u><u>G</u>GGAA<u>G</u>TAGGGTGGGCAAGTA<u>TTCCG</u> GAA<u>A</u>TTCTAGAGG<u>GGG</u><u>TTTC</u>CGGGGACTTTCCGG<u>AG</u><u>ATTCTC</u> TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC</p> |
| 37 | <p>TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA<u>TTTCC</u><u>G</u>GGAA<u>A</u>TAGGGTGGGCAAGTA<u>TTTCC</u> GAA<u>G</u>TTCTAGAGG<u>GGG</u><u>TTTC</u>CGGGGACTTTCCGG<u>GAA</u><u>ATTTC</u></p> |

10

20

30

40

| | |
|----|---|
| | TCTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGA CCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCCCATG GCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC |
| 38 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>C</u> TTCC <u>G</u> GAA <u>A</u> TAGGGTGGGCAAGTAT <u>T</u> TTCC <u>C</u> GGAAG <u>T</u> TCTAGAGGAGG <u>T</u> TT <u>T</u> CGGGACTTTCCGGGAT <u>T</u> CCCT CTAGATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGAC CCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCATG GCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC |
| 39 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGTTCC <u>G</u> GGAAG <u>T</u> GGGTGGGCAATA <u>T</u> TTCC <u>C</u> GGAAG TTTAGAGGA <u>A</u> GT <u>T</u> TT <u>T</u> CGGGACTTCCGGA <u>A</u> ATT <u>C</u> CTCTAGAT ATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCA GCGACCCGCTTAAAAGCGGCCGCCATGGGCCGCCATGGCCTCC TCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGC |
| 40 | TACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGACTAGCCCGGTTCGCAC TAGTTCTAGAA <u>C</u> TTCT <u>C</u> GGA <u>A</u> TAGGGTGGGCAAGTACTGTGG CCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCGG CCGCCATGGGCCGCCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGG AGTTCATGCAGACCAAGTCTCTGCTACC |

10

20

30

40

50

【0181】

(実施例7 - 新しいPREベースのライブラリーを設計し、基本配列またはライブラリー最適化配列を他のPREと組み合わせて同じ合成プロモーターにする)

特定のPREのライブラリーを生成するために、単独で、または他のPREと組み合わせて、低酸素PREエレメントを例として使用しながら、本明細書中で詳細に記載される以下の一般的なアプローチを採用した。

【0182】

異なる遺伝子の低酸素依存性プロモーターに利用されるPRE配列を収集した。

【0183】

塩基性、非自然発生低酸素PREエレメントを、異なる遺伝子における低酸素PREとして機能することが示唆される自然発生配列からの部分を取ることで、配列に基づいて生成した。当該部分は以下を含む。

【0184】

例えば低酸素依存性LDHA/EPO/VEGF遺伝子に見られるHBS配列(ACGTG)；

リンカー1(GCTGGAGT)。これは8ヌクレオチドリンカーであり、天然の標的遺伝子(LDHA/EPO/VEGF遺伝子の一部ではない)のプロモーターにはみられない；

例えば低酸素依存性EPO遺伝子に見られるHAS(CACAG)；および

リンカー2(TCCTCTT)。これは7ヌクレオチドリンカーであり、天然の標的遺伝子(LDHA/EPO/VEGF遺伝子の一部ではない)のプロモーターにはみられない。

【0185】

これらの配列は1つの配列に直線的に組み合わせられ、次いで、配列番号42に示される配列ACGTGGCTGGAGTCAACAGTCCCTCTTACGTGGCTGGAGTCAACAGTCCCTCTTを得るために、タンデムで二重化された。

【0186】

これは「基本的低酸素症PRE」を表す。基本的な低酸素PREは単に例示的なものであり、他の組み合わせ、リンカー、PREの数、ならびにそれらの配向もまた想定され得ることが理解される。

【0187】

次いで、「塩基性低酸素配列」を（同じまたは異なるTMEの）追加のPRE配列に加えて、改変/代替合成プロモーターを生成することができる。塩基性TME因子（ここでは低酸素）PREに基づく任意の改変/代替合成プロモーターの非限定的な例には、以下が含まれる。

10

【0188】

(i) 単一または複合PRE。非限定的な例として、塩基性低酸素PREをG1K1配列（配列番号9に記載）と組み合わせ、それによって配列番号46に記載の配列（H1G1K1とも呼ばれる）ACGTGGCTGGAGTCAACAGTCCCTCTTACGTGGCTGGAGTCAACAGTCCCTCTTACTAGTTCTAGAACTTCCCGGAAGTCTAGAGGAATAATTTTCGGGGACTTTCCGGGGGTTCTCTCTAGATAATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTA AAAAGCGGC CGCCATGGGCGCCATGGCCTCTCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCを生成することができる。

20

【0189】

(ii) 代替的な配置：基本的なTME因子PREは、合成プロモーターの5プライムおよび/または3プライムおよび/または中間に添加され得る。

【0190】

(ii) 代替配向：基本TME係数PREは、上記(i)および(ii)のように反転させ、加えることができる。非限定的な例として、基本的な低酸素PREは、反転配置でG1K1配列（配列番号9に示される）と組み合わせることができ、それによって、配列番号47に示される配列（H1fliPG1K1とも呼ばれる）AAGAGGACTGTGACTCCAGCCACGTAAGAGGACTGTGACTCCAGCCACGTACTAGTTCTAGAACTTCCCGGAAGTAGGGTGGGCAAGTACTTCCCGGAAGTTCTAGAGGAATAATTTTCGGGGACTTTCCGGGGGTTCTCTCTAGATAATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTA AAAAGCGGC CGCCATGGGCGCCATGGCCTCTCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCを生成する。

30

【0191】

(iv) 代替的な配列

塩基性TME因子PRE配列のヌクレオチドを置換することができる。例えば、配列番号43に記載されるRCGTGSCTGGAGTMACAGTCCCTCTTRCGTGSCTGGAGTMACAGTCCCTCTT。

40

【0192】

ライブラリーの生成に続いて、ライブラリーは本質的に実施例6に記載されるように、最良の配列（すなわち、より少ない漏出性および低酸素刺激に対する最も高い応答を誘導する配列）についてスクリーニングする。

【0193】

「基本応答要素」を設計し、次いで「基本応答要素」に基づいて修正/代替PREのライブラリーを生成するための説明されたアプローチは、本明細書で説明されるTME因子PREのすべてに適合され得ることが理解される。

50

【 0 1 9 4 】

本発明の特定の実施形態を図示し、説明したが、本発明が本明細書に記載の実施形態に限定されないことは明らかであろう。以下の特許請求の範囲によって記載される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多くの修正、変更、変形、置換および等価物が当業者には明らかであろう。

【 図 1 】



FIG. 1

【 図 2 】

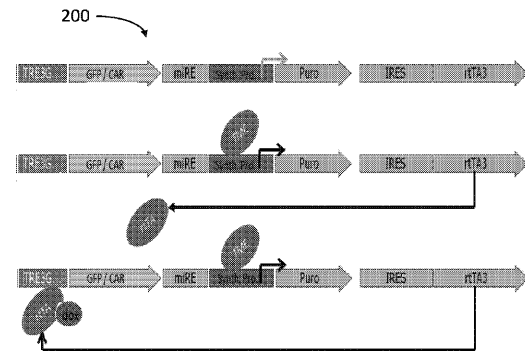
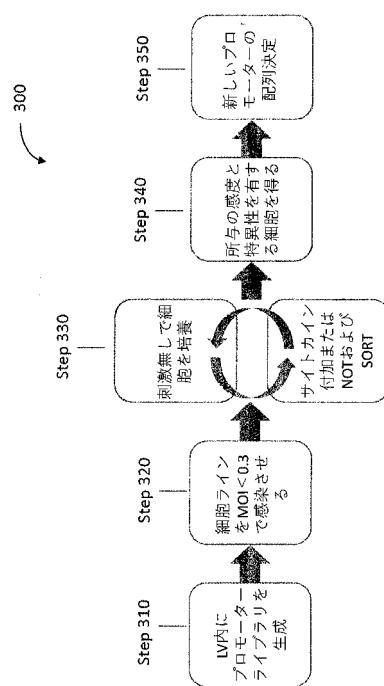
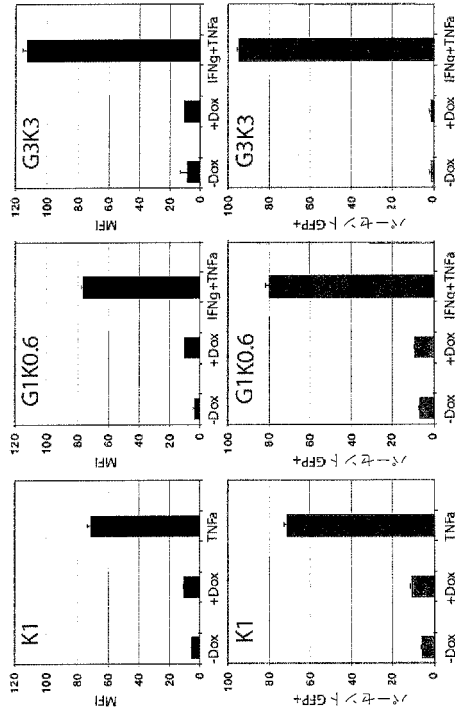


FIG. 2

【 図 3 】



【 4 A 】



【 4 B 】

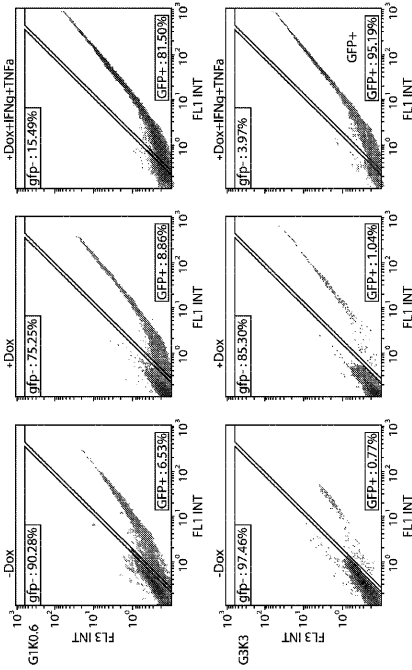


FIG. 4B

【 5 】

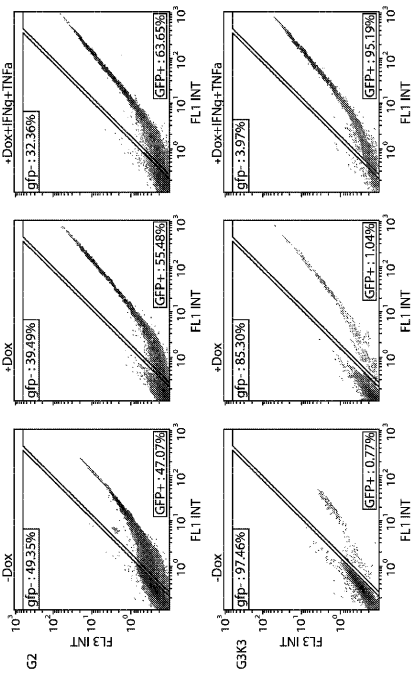


FIG. 5

【 6 】

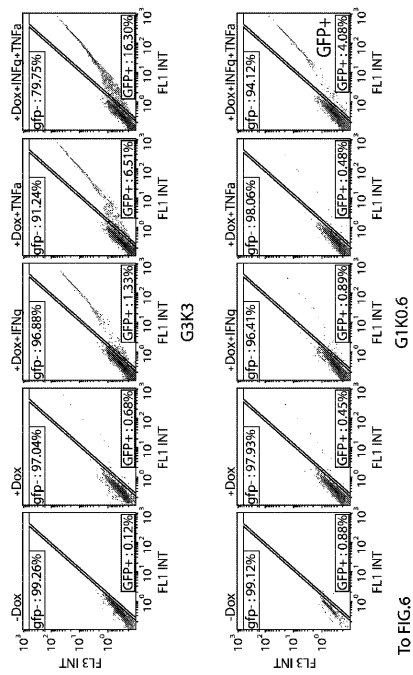


FIG. 6

To FIG. 6

【 6 - 1 】

↑ From FIG.6

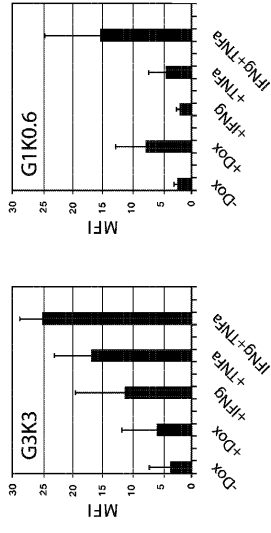


FIG. 6

【 7 】

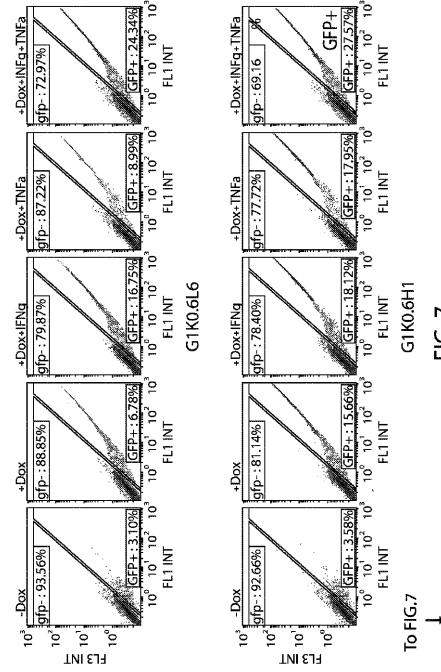


FIG. 7

【 7 - 1 】

↑ From FIG.7

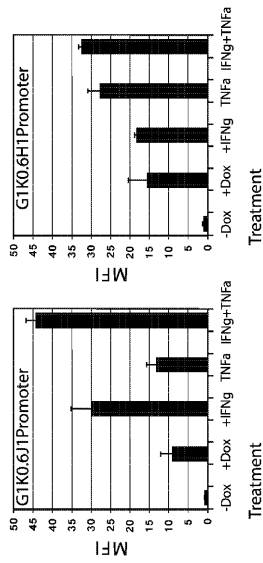


FIG. 7

【 8 】

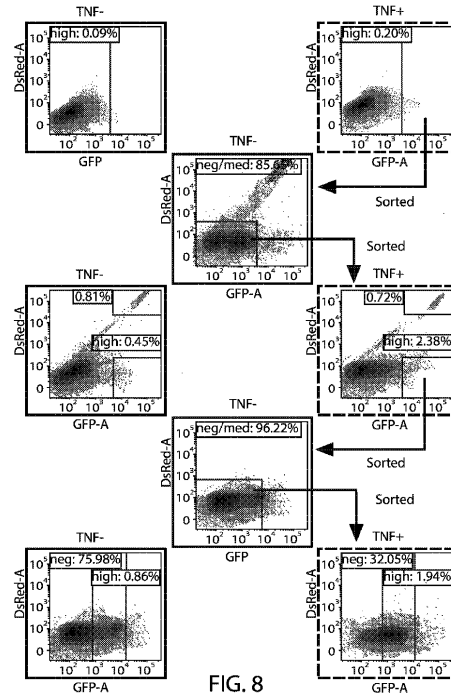


FIG. 8

【配列表】

2021514187000001.app

【 国際調査報告 】

| | |
|--|--|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | International application No. PCT/IL2019/050182 |
| Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet) | |
| <p>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:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed:</p> <p style="margin-left: 20px;"><input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> 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.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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.</p> <p>3. Additional comments:</p> | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/IL2019/050182**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 3, 8, 14-21(all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2019/050182

| | | |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| INV. C12N15/85 | C12N15/86 | C12N15/867 A61K35/17 A61K48/00 |
| 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) | | |
| A61K C12N | | |
| 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, 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 | JAVAN B. & SHAHBAZI M.: "Hypoxia-inducible tumour-specific promoters as a dual-targeting transcriptional regulation system for cancer gene therapy.", ECANCER, vol. 11, 751, 6 July 2017 (2017-07-06), XP002791514, the whole document ----- -/-- | 1,8 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 | | Date of mailing of the international search report |
| 21 May 2019 | | 02/08/2019 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Galli, Ivo |

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2019/050182

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>DOTTI G. ET AL.: "Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells", IMMUNOL. REV., vol. 257, no. 1, 13 December 2013 (2013-12-13), pages 107-126, XP002791515, the whole document page 121, right-hand column page 121, right-hand column -----</p> | <p>1,3, 14-21</p> |

1

International Application No. PCT/IL2019/050182

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 3, 8, 14-21(all partially)

A vector for the expression of a gene of interest, preferably a CAR, wherein the gene of interest is under the control of a promoter that comprises a TME (tumour microenvironment responsive element).

- The same, therein the CAR is directed against a TAA.
- The same, wherein the vector is a plasmid, a lentivirus, an adenoviral vector or a retrovirus vector.
- The same, wherein the promoter comprises two or more TMEs.
- Corresponding recombinat immune effector cells, and medical uses thereof, in particular to cure a cancer.

2. claims: 9-13(completely); 14-21(partially)

A vector for the expression of a gene of interest, preferably a CAR, wherein the gene of interest is under the control of a promoter inducible by a transactivator (such as rtTA3), and the transactivator is under the control of a promoter that comprises a TME.

- The same, therein the CAR is directed against a TAA.
- The same, wherein the vector is a plasmid, a lentivirus, an adenoviral vector or a retrovirus vector.
- The same, wherein the promoter for the transactivator comprises two or more TMEs.
- Corresponding recombinat immune effector cells, and medical uses thereof, in particular to cure a cancer.

3-21. claims: 2, 4-7(completely); 1, 3, 8, 14-21(partially)

Same as (1) or (2) but wherein the TME is chosen from:

- 3) IFN gamma
- 4) TNF alpha
- 5) NFkB
- 6) another hypoxia element
- 7) HSP70
- 8) IL6
- 9) TGF-beta
- 10) IL1
- 11) IL8
- 12) IL11
- 13) IL12
- 14) IL15
- 15) IL18
- 16) IL17
- 17) IL21
- 18) IL35
- 19) GM-CSF
- 20) HGF

International Application No. PCT/IL2019/050182

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

21) AhR
and their corresponding sequences 1-41 (which have not all
been defined in the application).

22. claims: 22-29

A method of selecting TMEs specific to a given tumour in a
given patient, for use in constructing a personalised vector
for treating that tumor in that patient.

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I | | テーマコード(参考) |
|---------------------------------|---------|--------|------------|
| C 1 2 N 15/113 (2010.01) | C 1 2 N | 15/113 | Z |
| C 1 2 Q 1/06 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/06 | |
| A 6 1 K 35/12 (2015.01) | A 6 1 K | 35/12 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 K 35/17 (2015.01) | A 6 1 K | 35/17 | Z |

(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, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, NE, 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, JO, JP, 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, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74) 代理人 100217364

弁理士 田端 豊

(72) 発明者 ポルガドール、 エンジェル

イスラエル国 レハヴィム、 8 5 3 3 8 0 0 タブラン ストリート 1 1

(72) 発明者 ガジット、 ロイ

イスラエル国 キドロム、 7 0 7 9 5 0 0、 ハーバード ストリート 3 6 7

F ターム(参考) 4B063 QA01 QQ08 QR77 QS36 QX02

4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA44

4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 CA04 NA14 ZB26