

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6846352号
(P6846352)

(45) 発行日 令和3年3月24日(2021.3.24)

(24) 登録日 令和3年3月3日(2021.3.3)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 14/725 (2006.01)	C O 7 K 14/725
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 18 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-541919 (P2017-541919)	(73) 特許権者	507148294
(86) (22) 出願日	平成28年2月11日 (2016.2.11)		ユニバーシティー ヘルス ネットワーク
(65) 公表番号	特表2018-509893 (P2018-509893A)		カナダ、エム・5・ジィ 2・シィ・4
(43) 公表日	平成30年4月12日 (2018.4.12)		オンタリオ、トロント、エリザベス・スト
(86) 国際出願番号	PCT/CA2016/050126		リート、190、アール・フレーザー・エ
(87) 国際公開番号	W02016/127257		リオット・ビルディング、ルーム・1・エ
(87) 国際公開日	平成28年8月18日 (2016.8.18)		スー417
審査請求日	平成30年11月21日 (2018.11.21)	(73) 特許権者	302019245
(31) 優先権主張番号	62/115,527		タカラバイオ株式会社
(32) 優先日	平成27年2月12日 (2015.2.12)		滋賀県草津市野路東七丁目4番38号
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
前置審査		(74) 代理人	100155631
			弁理士 榎 保孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラ抗原受容体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

i) 所定の抗原に結合し得る細胞外ドメインと、
 i i) 膜貫通ドメインと、
 i i i) N末端から順に、
 a) 細胞質共刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインと、
 b) 内因性または外因性 J A K 結合モチーフおよびシグナル伝達転写活性化因子 (S T A T) 5 関連モチーフを有するインターロイキン 2 受容体鎖の細胞質ドメインを含んでなる細胞内シグナル伝達ドメインと、
 c) 外因性 S T A T 3 関連モチーフを含んでなる C D 3 細胞内シグナル伝達ドメインと

10

ここで、前記 S T A T 5 関連モチーフが、Y F F F (配列番号 28)、Y C T F (配列番号 29) および Y L S L (配列番号 43) からなる群より選択されるモチーフであり、

前記 S T A T 3 関連モチーフが、Y L R Q (配列番号 30)、Y R H Q (配列番号 22)、Y F K Q (配列番号 31)、Y L P Q (配列番号 32)、Y M P Q (配列番号 33)、Y V L Q (配列番号 34)、Y Q P Q (配列番号 35)、Y K P Q (配列番号 36)、Y R P Q (配列番号 37)、Y T H Q (配列番号 38)、Y L K Q (配列番号 39)、Y H N Q (配列番号 40) からなる群より選択されるモチーフである、

キメラ抗原受容体 (C A R)。

【請求項2】

20

前記外因性 S T A T 3 関連モチーフが、C A R の C 末端から 1 0 0 アミノ酸残基内に導入される、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 3】

前記インターロイキン 2 受容体鎖の細胞質ドメインが、インターロイキン 2 受容体鎖の細胞質ドメインの切断フラグメントである、請求項 1 または 2 に記載の C A R。

【請求項 4】

前記細胞質共刺激ドメインが、C D 2 8、C D 2、C D 4、C D 5、C D 8、C D 8、C D 1 3 4 または C D 1 3 7 の細胞質ドメインである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 5】

細胞質共刺激ドメインが、C D 2 8 の細胞質ドメインである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 6】

前記インターロイキン 2 受容体鎖が、インターロイキン 2 受容体 (I L - 2 R) 鎖である、請求項 3 に記載の C A R。

【請求項 7】

前記細胞外ドメインが、所定の抗原に結合し得る抗体の抗原結合領域である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 8】

前記抗体の抗原結合領域が、前記抗体の一本鎖可変フラグメントである、請求項 7 に記載の C A R。

【請求項 9】

前記膜貫通ドメインが、C D 2 8 膜貫通ドメインおよび C D 8 膜貫通ドメインからなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 1 0】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の C A R をコードするポリヌクレオチドを含んでなる核酸。

【請求項 1 1】

前記核酸が C A R をコードし、さらに N 末端にシグナルペプチドをコードする、請求項 1 0 に記載の核酸。

【請求項 1 2】

請求項 1 0 または 1 1 に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の C A R を発現し、および / または請求項 1 0 もしくは 1 1 の核酸または請求項 1 2 のベクターでトランスフェクトまたは形質導入された細胞。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の C A R、核酸、ベクターまたは細胞と場合により薬学上許容可能な賦形剤とを含んでなる組成物。

【請求項 1 5】

請求項 1 0 もしくは 1 1 に記載の核酸または請求項 1 2 に記載のベクターで細胞を形質導入する、請求項 1 3 に記載の細胞の作製方法。

【請求項 1 6】

a) 哺乳動物から免疫細胞を単離すること (場合により、前記免疫細胞は T 細胞である) ;

b) 単離された免疫細胞 (場合により、T 細胞) を、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の C A R をコードする核酸でトランスフェクトまたは形質導入すること ; および

c) 場合により、トランスフェクションまたは形質導入後に C A R 発現細胞 (場合により、C A R 発現 T 細胞) を単離し、および / または拡大培養することを含んでなる、請求項 1 5 に記載の細胞の作製方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

疾患を治療もしくは予防するための、および／または対象において所定の抗原を発現する細胞の数を減らすための医薬品の製造における、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の C A R、核酸、ペクター、細胞または組成物の使用。

【請求項 18】

哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供するための、請求項 17 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本出願は、2015年2月12日に出願された、引用することにより本明細書の一部とされる米国仮出願第 62 / 115, 527 号の優先権に基づき米国特許法 119 条の利益を主張する特許協力条約出願である。

【技術分野】

【0002】

本開示は、改良されたキメラ抗原受容体 (C A R)、特に、インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメイン、および／または細胞質共刺激ドメインを含んでなる細胞内セグメント (前記細胞内セグメントは、J A K 結合モチーフおよびシグナル伝達転写活性化因子 (S T A T) 5 関連モチーフを含んでなる)、および／または外因性 S T A T 3 関連モチーフを含んでなる C D 3 細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる C A R に関する。また、前記 C A R をコードする核酸、前記 C A R を発現する細胞、ならびにそれらの作製および使用の方法も提供される。

【背景技術】

【0003】

腫瘍を治療するための 1 つの治療戦略は、対象とする抗原を標的とする T 細胞を作製するために特定の抗原と結合し得る T 細胞受容体 (T C R) を T 細胞に導入することを含み得る。この戦略に基づき、例えば、W T 1、M A R T 1、g p 100、C E A、C D 19 および m H A G H A - 2 抗原などの多くの腫瘍抗原を標的とする T C R 遺伝子を用いた養子免疫遺伝子療法が試みられてきた。

【0004】

もう 1 つの遺伝子改変 T 細胞療法は、キメラ抗原受容体 (C A R) の使用を含む。C A R は、単一の融合分子に抗原特異性と T 細胞活性化特性を併せ持つ。C A R は、腫瘍細胞の表面抗原に対する特異性と生体外 (e x v i v o) で T 細胞の増殖を活性化させる能力を持つ。この療法は、腫瘍表面抗原を標的とする治療抗体よりも強く、より長く持続する抗腫瘍効果を持ち得、従って、その臨床効果もまた大きいものであり得る。

【0005】

C A R の代表的な構造は、腫瘍細胞の表面抗原を認識する一本鎖可変フラグメント (s c F v) と、膜貫通ドメインと、T 細胞を活性化する T C R 複合体の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば C D 3 とを含んでなる。このような構成を有する C A R は、第一世代 C A R と呼ばれる。一本鎖可変フラグメント部分をコードする核酸配列は、例えば、標的腫瘍抗原などの標的抗原を認識するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマから単離することができる。C A R は T 細胞などの細胞中で生産および発現される。C A R を発現する T 細胞は、腫瘍細胞上の主要組織適合性抗原クラス I の発現とは独立に腫瘍細胞の表面抗原を直接認識すると同時に T 細胞を活性化し、それにより、C A R 発現 T 細胞は腫瘍細胞を効率的に死滅させることができる。

【0006】

第一世代 C A R の T 細胞活性化能の増強を試みるために、第一世代 C A R に、T 細胞の共刺激分子である C D 28 の細胞内シグナル伝達ドメインが連結された第二世代 C A R が開発された。さらなる改良型として、第二世代 C A R に、C D 137 由来細胞内シグナル伝達ドメイン (4 - 1 B B) または C D 134 由来細胞内シグナル伝達ドメイン (O X 40) (両方とも腫瘍壊死因子 (T N F) 受容体スーパーファミリーメンバーである) が直

10

20

30

40

50

列に連結された第三世代C A Rも開発された。従って、様々な腫瘍抗原を標的とする多くのC A R分子が報告されている（例えば、Sadelain et al 2009参照）。しかしながら、現在報告されている第二世代および第三世代C A Rに共刺激細胞内シグナル伝達ドメインとして使用されているシグナル伝達タンパク質は限定されている。どのT細胞シグナル伝達タンパク質に由来する細胞内シグナル伝達ドメインも、C A Rに連結された場合、総てが標的腫瘍細胞を傷害し、および/または死滅させるよう十分にT細胞を刺激できるわけではないことが知られている。従って、C A Rに連結した際に有効となるシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを見出すことが望ましい。

【発明の概要】

【0007】

10

本開示の1つの側面は、標的抗原と特異的に結合し、かつ、標的抗原を発現する標的細胞に対する細胞傷害活性を付与するC A Rである。

【0008】

さらなる側面は、対象とする標的抗原を発現する細胞を標的化するために使用可能な、C A Rを発現する細胞である。

【0009】

1つの側面は、i) 所定の抗原に結合し得る細胞外ドメインと、i i) 膜貫通ドメインと、i i i) a) インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインおよび/または細胞質共刺激ドメインから選択される1以上の細胞内シグナル伝達ドメインと、b) 外因性S T A T 3関連モチーフを含んでなるC D 3 細胞内シグナル伝達ドメインとを含んでなる細胞内セグメントとを含んでなり、前記細胞内セグメントが内因性または外因性J A K結合モチーフおよびS T A T 5関連モチーフを含んでなるC A Rを提供する。

20

【0010】

1つの実施形態では、外因性S T A T 3関連モチーフは、Y X X Q（配列番号13）である。

【0011】

ある実施形態では、外因性S T A T 3関連モチーフは、Y R H Q（配列番号22）である。

【0012】

ある実施形態では、外因性S T A T 3関連モチーフは、C A RのC末端から100アミノ酸残基内にある。

30

【0013】

1つの実施形態では、外因性S T A T 3関連モチーフは、C D 3 のアミノ酸156～158に取って代わっている。

【0014】

ある実施形態では、1以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインであるか、またはそれを含んでなる。

【0015】

別の実施形態では、インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインは、J A K結合モチーフおよびS T A T 5関連モチーフを少なくとも含んでなる末端切断（truncated）フラグメントである。

40

【0016】

ある実施形態では、1以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞質共刺激ドメインであるか、またはそれを含んでなる。

【0017】

別の実施形態では、細胞質共刺激ドメインは、C D 2 8、C D 2、C D 4、C D 5、C D 8、C D 8、C D 1 3 4またはC D 1 3 7の細胞質ドメインである。

【0018】

別の側面は、i) 所定の抗原に結合し得る細胞外ドメインと、i i) 膜貫通ドメインと、i i i) インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインを含む1以上の細胞内シグナル伝

50

達ドメインと場合により少なくとも1つの補足的細胞質ドメインとを含んでなる細胞内セグメントとを含んでなるCARである。

【0019】

ある実施形態では、インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインは、チロシンキナーゼ関連モチーフおよびSTAT関連モチーフを含んでなる末端切断フラグメントである。

【0020】

ある実施形態では、少なくとも1つの補足的細胞質ドメインは、i) CD3 の細胞内シグナル伝達ドメイン(場合により、前記CD3 細胞内シグナル伝達ドメインは、外因性STAT3 関連モチーフを含んでなる)、および/またはii) CD28の細胞質共刺激ドメインである。

10

【0021】

ある実施形態では、インターロイキン受容体鎖は、インターロイキン2受容体(IL-2R) 鎖およびインターロイキン21受容体(IL-21R) 鎖からなる群から選択される。

【0022】

さらに別の実施形態では、細胞外ドメインは、所定の抗原に結合し得る抗体の抗原結合領域であり、および/またはそれを含んでなる。

【0023】

別の実施形態では、抗体の抗原結合領域は、前記抗体の一本鎖可変フラグメントであるか、またはそれを含んでなる。

20

【0024】

別の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインおよびCD8膜貫通ドメインからなる群から選択される。

【0025】

別の実施形態では、CARは、さらに場合によりN末端にシグナルペプチドを含んでなる。

【0026】

別の側面は、本明細書に記載のCARをコードする核酸を含む。

【0027】

ある実施形態では、核酸は、シグナルペプチド(場合により、前記シグナルペプチドはCARのN末端にある)にコンジュゲートされたCARをコードする。

30

【0028】

さらなる側面は、本明細書に記載の核酸を含んでなるベクターを含む。

【0029】

よりさらなる側面は、本明細書に記載のCARを発現し、および/または本明細書に記載の核酸もしくはベクターでトランスフェクトまたは形質導入された細胞を含む。

【0030】

よりさらなる側面は、本明細書に記載のCAR核酸またはベクター、場合により、本明細書に記載のCARを含んでなるミクロソーム製剤を含んでなる組成物を含む。

【0031】

ある実施形態では、組成物は、希釈剤または薬学上許容可能な賦形剤を含んでなる。

40

【0032】

本開示によれば、キメラ抗原受容体、前記キメラ抗原受容体をコードする核酸、前記キメラ抗原受容体を発現する細胞、および以上のいずれかを含んでなる組成物が提供される。ある実施形態では、上記の1以上が腫瘍抗原などの抗原を標的とする養子免疫遺伝子療法の分野で、および/またはスクリーニングもしくはその他のインビトロ(in vitro)アッセイで使用され得る。本開示のキメラ抗原受容体を細胞に導入し、例えば、その細胞においてキメラ抗原受容体の発現量の増強または上昇を得ることができる。このような細胞は、標的抗原を発現する細胞に対して細胞傷害活性を発揮し得る。

【0033】

50

一側面において、

a) 哺乳動物から免疫細胞を単離すること(場合により、前記免疫細胞はT細胞である) ;

b) 単離された免疫細胞(場合により、T細胞)を、本明細書に記載のCARをコードする核酸でトランスフェクトまたは形質導入すること ; および

c) 場合により、トランスフェクションまたは形質導入後にCAR発現細胞(場合により、CAR発現T細胞)を単離し、および/または拡大培養すること

を含んでなる、本明細書に開示されるCARを発現する細胞の作製方法が提供される。

【0034】

別の側面は、例えば、所定の抗原を発現する細胞の数を減らす、疾患を治療する、疾患を予防する、および/または抗腫瘍免疫を提供するための、本明細書に記載のCAR、核酸、ベクター、細胞または組成物の使用である。

【0035】

別の側面は、対象において所定の抗原を発現する細胞の数を減らす方法であって、それを必要とする対象に有効量の本明細書に記載のCAR発現細胞を投与することを含んでなり、前記CARは所定の抗原と特異的に結合する、方法を含む。

【0036】

別の側面は、哺乳動物において疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする哺乳動物に有効量の、本明細書に記載のCARを発現する細胞または本明細書に記載の組成物を投与することを含んでなる方法である。

【0037】

さらなる側面は、哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、それを必要とする哺乳動物に有効量の、本明細書に記載のCAR発現細胞または本明細書に記載の組成物を投与することを含んでなる方法である。

【0038】

本開示の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなる。しかしながら、この詳細な説明から当業者には本開示の趣旨および範囲内で種々の変更および改変が自明となるので、本開示の好ましい実施形態を示す詳細な説明および具体例は説明のためだけに与えられているものと理解されるべきである。

以下、本開示の実施形態を図面に関して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】図1は、抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)構築物の概略図である。

【図2】図2は、抗CD19 CAR構築物による初代T細胞の形質導入効率を示すフローサイトメトリー分析の一連のプロットである。

【図3】図3は、種々の構築物の抗CD19-CAR表面発現を示す一連のグラフである。

【図4】図4は、28-IL2RB-z(YXXQ)抗CD19 CAR形質導入T細胞におけるSTAT3およびSTAT5のリン酸化を示す一連のグラフである。

【図5】図5は、CAR形質導入T細胞におけるJAK-STAT経路活性のグラフ比較である。

【図6】図6は、抗CD19 CAR構築物T細胞形質導入および拡大培養のプロトコルを示す模式図である。

【図7】図7は、形質導入後のCAR形質導入T細胞の拡大増殖を示す一連のグラフである。

【図8】図8は、K562-CD19細胞によるCD19特異的刺激の後のCAR形質導入T細胞の拡大増殖を示す一連のグラフである。

【図9】図9は、K562細胞(対照)との共培養後のCAR形質導入T細胞の拡大増殖を示す一連のグラフである。

【図10】図10は、K562-CD19細胞による抗原特異的再刺激後のCAR形質導

10

20

30

40

50

入T細胞の拡大増殖を示す一連のグラフである。

【図11】図11は、CAR形質導入T細胞の細胞分裂速度を示す一連のグラフである。

【図12】図12は、CAR形質導入T細胞の生存率を示すグラフである。

【図13】図13は、CAR形質導入T細胞の表面表現型ならびにCD4⁺およびCD8⁺発現レベルを示すフローサイトメトリー分析の一連のプロットである。

【図14】図14は、幹細胞様メモリーT細胞のマーカー表現型(CD45RA⁺ CD62L⁺ CD95⁺)を有するCAR形質導入T細胞の頻度を示す一連のグラフである。

【図15】図15は、CAR形質導入T細胞におけるCD62L発現を比較する一連のグラフである。

10

【図16】図16は、CAR形質導入T細胞によるIL-2およびIFN- γ 分泌を示す一連のグラフである。

【図17】図17は、CAR形質導入T細胞によるインビトロ標的細胞溶解を示すグラフである。

【図18】図18は、免疫不全マウスへの、EGFP-ルシフェラーゼを発現するCD19陽性急性リンパ芽球性白血病細胞株NALM-6の注射とその後のCAR形質導入T細胞注射のプロトコールを示す模式図である。

【図19】図19は、抗CD19 CAR形質導入T細胞の注入後の示された時点のルシフェラーゼ活性の一連の生物発光イメージングである。

【図20】図20は、抗CD19 CAR形質導入T細胞で処置したマウスの全生存率のカプランマイヤー曲線を示すグラフである(各n=5)。

20

【図21】図21は、実施例に使用したCARとしてのNFMC63-28Z、NFMC63-28-d2RbZ、NFMC63-28-21RaZまたはNFMC63-28Z-21Raの構造を示す。

【図22】図22は、図21のCARで形質導入されたSTATリン酸化細胞を示す。

【発明の具体的説明】

【0040】

本明細書で使用する場合、「キメラ抗原受容体(CAR)」は、所定の抗原に結合し得る細胞外ドメインと、前記細胞外ドメインが由来するポリペプチドとは異なるシグナル伝達タンパク質に由来する1以上の細胞質ドメインを含んでなる細胞内セグメントと、膜貫通ドメインとを含んでなる融合タンパク質を意味する。「キメラ抗原受容体(CAR)」は、「キメラ受容体」、「T-ボディー」、または「キメラ免疫受容体(CIR)」と呼ばれることもある。「所定の抗原に結合し得る細胞外ドメイン」という句は、前記所定の抗原と特異的に結合し得る任意のタンパク質性分子またはその一部を意味する。「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、細胞内での生物学的プロセスの活性化または阻害、例えば、T細胞もしくはNK細胞などの免疫細胞の活性化を引き起こすシグナルを伝達する働きをすることが知られる任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドドメインを意味する。例としては、ILR鎖、CD28および/またはCD3が挙げられる。

30

【0041】

本明細書で使用する場合、「STAT3」または「シグナル伝達転写活性化因子3」は、STATタンパク質ファミリーに属す転写因子を意味する。STAT3はまた、「急性期応答因子」、「APRF」、「APRF転写因子」、「DNA結合タンパク質APRF」、「FLJ20882」、「仮想タンパク質MGC16063」、「IL-6応答因子」、「LIF(白血病阻害因子)応答因子」または「STAT3_HUMAN」とも呼ばれる。STAT3タンパク質は、細胞増殖および分裂、細胞移動ならびに細胞アポトーシスに關与する遺伝子の調節に關与している。免疫系では、STAT3は、T細胞およびB細胞などの免疫系細胞の成熟に關するシグナル伝達因子である。Siegelらは、STAT3がヒトT細胞記憶の生成と維持に役割を果たすことを示している(Siegel et al. 2011)。

40

【0042】

50

本明細書で使用する場合、「シグナル伝達転写活性化因子3関連モチーフ」または「STAT3関連モチーフ」は、STAT3と結合（例えば、より長いポリペプチド/タンパク質の文脈で）するアミノ酸配列YXXQ（配列番号13）（またはその文脈に従って前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド）を意味する。STAT3関連モチーフは、シグナル伝達タンパク質、例えば、IL-6およびIL-10内に存在する。STAT3関連モチーフはまた、STAT3関連モチーフを内因的に含まないシグナル伝達ドメインに導入することもできる（すなわち、外因性STAT3関連モチーフ）。用語「外因性STAT3関連モチーフ」は、ドメイン、例えば、CD3細胞内シグナル伝達ドメイン、に組換えにより導入されるが、前記ドメインに天然には存在しない、または前記ドメイン内の導入場所には存在しないSTAT3関連モチーフを意味する。例えば、YXXQ（配列番号13）外因性STAT3関連モチーフは、CD3に導入することができる。外因性STAT3関連モチーフは、例えば、YRHQ（配列番号22）であり得る。当業者は、外因性STAT3関連モチーフが当技術分野で理解されている種々の技術を用いてCD3に導入できることを認識するであろう。

【0043】

本明細書で使用する場合、「シグナル伝達転写活性化因子5関連モチーフ」または「STAT5関連モチーフ」は、STAT5と結合するチロシン残基を含んでなるアミノ酸配列（またはその文脈に従って前記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド）を意味する。例えば、IL-2R鎖のSTAT5関連モチーフは、チロシン残基-510（NCBI RefSeq: NP_000869.1のアミノ酸番号536、例えば、配列番号11の271であるチロシン残基510）を含んでなる。例えば、STAT5関連モチーフは、アミノ酸残基YXXL（配列番号41）を含んでなる。例えば、STAT5関連モチーフは、アミノ酸残基YLSL（配列番号43）を含んでなる。

【0044】

用語「外因性関連モチーフ」は、ドメイン、例えば、インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメイン、細胞質共刺激ドメインまたはD3細胞内シグナル伝達ドメインなどの細胞内シグナル伝達ドメイン、に組換えにより導入されるが、前記ドメインに天然には存在しない、または前記ドメイン内の導入場所には存在しない任意の関連モチーフを意味する。例えば、外因性JAK結合モチーフは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメイン、に挿入することができる。

【0045】

本明細書で使用する「JAK結合モチーフ」は、チロシンキナーゼJAK会合を可能とするBOX-1モチーフ、例えばJAK1、を意味する。JAK結合モチーフは、例えば、NCBI RefSeq: NP_000869.1のアミノ酸番号278~286（配列番号11のアミノ酸13~21）であり得る。

【0046】

本明細書で使用する場合、「ドメイン」は、例えば、他の領域とは独立に特定の構造に折り畳まれ、および/または特定の機能を有する、ポリペプチドの一領域を意味する。ドメインは、例えば、分子の細胞質部分またはその一部であり得る。本明細書で使用する場合、分子の「細胞質ドメイン」は、全長細胞質ドメイン、または活性化された際に細胞内シグナルを伝達するその一部を意味する。

【0047】

用語「変異体」は、1または数個から複数のアミノ酸の置換、欠失または付加を含んでなる分子を意味し、その変異体が元の配列と同じ機能を実質的に保持する限り、特に保存的置換分子を含む。例えば、IL受容体変異体は、JAK結合モチーフおよびSTAT関連モチーフの外側に置換、欠失または付加を含んでいてもよい。例えば、IL受容体鎖変異体は、JAK結合モチーフおよびSTAT関連モチーフの外側の領域に50個まで、40個まで、30個まで、20個までまたは10個までのアミノ酸欠失および/または保存的置換を含んでいてもよい。同様に、他の分子の変異体も、本明細書で特定された領域の外側の領域に50個まで、40個まで、30個まで、20個までまたは10個までのアミ

10

20

30

40

50

ノ酸欠失および/または保存的置換を含んでもよい。

【0048】

本明細書で使用する場合、「細胞内セグメントが内因性または外因性JAK結合モチーフおよびSTAT5関連モチーフを含んでなる」という句は、その細胞内セグメントが1以上の細胞質ドメインを含んでなる場合を意味し、JAK結合モチーフとSTAT5関連モチーフは同じ細胞質ドメインにあってもよいし、または別の細胞質ドメインにあってもよい。

【0049】

用語「補足的細胞質ドメイン」は、インターロイキン受容体(ILR)鎖の細胞質ドメインを含んでなるCARの文脈で本明細書で使用される場合、ILR鎖には含まれないシグナル伝達タンパク質の細胞質ドメインである。

10

【0050】

本明細書で使用する場合、「腫瘍抗原」は、その発現が細胞の悪性変化に関連して認識されるようになる、抗原性を有する生体分子を意味する。本開示の腫瘍抗原には、腫瘍特異的抗原(腫瘍細胞のみに存在し、他の正常細胞には見られない抗原)、および腫瘍関連抗原(他の器官および組織もしくは異種および同種異系の正常細胞にも存在する抗原、または発生および/もしくは分化の際に発現される抗原)が含まれる。

【0051】

本明細書で使用する場合、「インターロイキン(IL)受容体」は、インターロイキンに対するサイトカイン受容体を意味する。IL受容体には、1型および2型サイトカイン受容体の2つの主要なファミリーが存在する。1型インターロイキン受容体には、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-4受容体、IL-5受容体、IL-6受容体、IL-7受容体、IL-9受容体、IL-11受容体、IL-12受容体、IL-13受容体、IL-15受容体、IL-21受容体、IL-23受容体およびIL-27受容体が含まれる。2型IL受容体には、IL-10受容体、IL-20受容体、IL-22受容体およびIL-28受容体が含まれる。IL受容体は、複数のポリペプチド鎖から構成される。本明細書では、例えば、IL-2受容体鎖は、IL2RbまたはIL-2Rbと略記される場合がある。

20

【0052】

用語「抗体」は、本明細書で使用する場合、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびマウス-ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体ならびにネズミ、ウシ、ウサギ、ラット、ヤギ、ヒト抗体および他の生物由来抗体を含むものとする。抗体は組換え源に由来してもよく、および/またはトランスジェニック動物で生産されてもよい。抗体はまた合成であってもよい。用語「抗体フラグメント」は、本明細書で使用する場合、限定されるものではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ヘテロ二量体、ミニボディ、ダイアボディ、およびその多量体、多重特異性抗体フラグメントおよびドメイン抗体を含むものとする。抗体は従来の技術を用いて断片化することができる。例えば、F(ab')₂フラグメントは抗体をペプシンで処理することにより作製できる。得られたF(ab')₂フラグメントにジスルフィド結合を還元する処理をしてFab'フラグメントを生成することができる。パパイン消化は、Fabフラグメントの形成をもたらす。Fab、Fab'およびF(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体フラグメントおよびその他のフラグメントも組換え技術により合成することができる。

30

40

【0053】

抗体の作製方法は当技術分野で公知である。ヒトモノクローナル抗体および/またはその結合フラグメントを生産するためには、抗体生産細胞(リンパ球)を、癌を有するヒトから採取し、標準的な体細胞融合手順によって骨髓腫細胞と融合させ、このようにしてこれらの細胞を不死化し、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。このような技術は当技術分野で周知である(例えば、Kohler and Milstein (Nature256:495-497 (1975))により最初に開発されたハイブリドーマ技術)ならびにヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor

50

et al., Immunol. Today 4:72 (1983))、ヒトモノクローナル抗体を生産するためのE B V - ハイブリドーマ技術(Cole et al., Methods Enzymol, 121:140-67 (1986))、およびコンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニング(Huse et al., Science 246:1275 (1989))などの他の技術。ハイブリドーマ細胞を癌細胞と特異的に反応性のある抗体の生産に関して免疫化学的にスクリーニングすることができ、モノクローナル抗体を単離することができる。

【0054】

本明細書で使用する場合、「一本鎖可変フラグメント(s c F v)」は、抗原への結合能を保持する抗体由来の一本鎖ポリペプチドを意味する。s c F vの例には、組換えDNA技術により形成され、免疫グロブリン重鎖(H鎖)および軽鎖(L鎖)フラグメントのF v領域がスペーサー配列を介して連結されている抗体ポリペプチドが含まれる。s c F vを調製するための様々な方法が知られており、米国特許第4694778号、Science, vol. 242, pp. 423-442 (1988)、Nature, vol. 334, p. 54454 (1989)、およびScience, vol. 242, pp. 1038-1041 (1988)に記載されている方法が含まれる。

【0055】

用語「CD3」は、本明細書で使用する場合、総ての哺乳動物種、好ましくは、ヒトの分化抗原群3(CD3)T細胞共受容体を意味する。哺乳動物では、CD3は、CD3鎖、CD3鎖および2本のCD3鎖を含んでなる。CD3鎖(例えば、NCBI RefSeq: NP_932170.1)は、本開示のCARを操作するために使用可能な細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、配列番号7)を含んでなる。

【0056】

用語「28-z」は、本明細書で使用する場合、FMC63由来一本鎖可変フラグメント(s c F v)とCD28膜貫通ドメインおよびCD3細胞内ドメインを連結することにより作製されたCAR構築物を意味する。

【0057】

用語「28-BB-z」は、本明細書で使用する場合、FMC63由来一本鎖可変フラグメント(s c F v)とCD28膜貫通ドメインを、さらには4-1BB細胞内シグナル伝達ドメインおよびCD3細胞内シグナル伝達ドメインを連結することにより作製されたCAR構築物を意味する。

【0058】

用語「28-IL2RB-z(YXXQ)」は、本明細書で使用する場合、FMC63由来一本鎖可変フラグメント(s c F v)とCD28膜貫通ドメイン、JAKシグナル伝達に關与するBOX1モチーフ(例えば、JAK結合モチーフを含んでなる)と510番にSTAT5会合のためのチロシン残基とを含んでなるIL-2R細胞質ドメイン、およびさらにSTAT3会合に關与する外因性YXXQ(配列番号13)モチーフを含んでなるCD3細胞内シグナル伝達ドメインを連結することにより作製されたCAR構築物を意味する。

【0059】

用語「核酸配列」は、本明細書で使用する場合、天然の塩基、糖および糖間(主鎖)結合からなるヌクレオシドまたはヌクレオチドモノマーの配列を意味する。この用語にはまた、非天然モノマーまたはその一部を含んでなる修飾または置換配列も含まれる。本出願の核酸配列はデオキシリボ核酸配列(DNA)またはリボ核酸配列(RNA)であり得、アデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシルを含む天然塩基が含まれる。これらの配列はまた、修飾塩基も含有し得る。このような修飾塩基の例には、アザおよびデアザアデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシル；ならびにキサンチンおよびヒポキサンチンが含まれる。

【0060】

用語「単離された核酸」は、本明細書で使用する場合、組換えDNA技術により生産される場合には細胞材料もしくは培養培地を、または化学合成される場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸を意味する。単離された核酸はまた、その核

10

20

30

40

50

酸が由来する、核酸に天然に隣接している配列（すなわち、その核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）も実質的に含まない。用語「核酸」は、DNAおよびRNAを含むものとし、二本鎖または一本鎖のいずれでもよく、センスまたはアンチセンス鎖に相当する。さらに、用語「核酸」は、相補的核酸配列、例えば、cDNAを含む。

【0061】

用語「単離されたポリペプチド」は、「単離されたタンパク質」とも呼ばれ、組換えDNA技術により生産される場合には細胞材料もしくは培養培地を、または化学合成される場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないポリペプチドを意味する。

【0062】

用語「アミノ酸」は、天然アミノ酸ならびに修飾アミノ酸の総てを含む。

10

【0063】

「保存的アミノ酸バリエーション」は、本明細書で使用する場合、そのタンパク質の所望の特性を損なうことなくあるアミノ酸残基が別のアミノ酸残基で置換されているものである。

【0064】

用語「対象」は、本明細書で使用する場合、ヒトを含む動物界の総てのメンバーを意味する。

【0065】

本明細書で使用する場合、当技術分野で十分に理解されているように、「治療」は、臨床結果を含む、有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。有益なまたは所望の臨床結果は、限定されるものではないが、検出可能であるか不能であるかは問わず、1以上の症状または病態の緩和または改善、疾患の程度の軽減、疾患の状態の安定化（すなわち、無増悪）、疾患の拡散の防止、疾患の進行の遅延または緩徐化、疾患状態の改善または軽減、および寛解（部分的または完全）を含み得る。「治療」はまた、治療を受けなかった場合の予想生存期間に比べて生存期間を延長することも意味し得る。疾患または障害を「軽減する」とは、障害を治療しない場合に比べて、障害もしくは疾患状態の程度および/もしくは望ましくない臨床発現が軽くなること、ならびに/または進行の経過が緩徐化または長くなることを意味する。

20

【0066】

本明細書で使用する場合、「癌を治療または予防する」という句は、癌細胞の複製を阻害すること、抗腫瘍免疫を提供すること、癌の拡散（転移）を阻害すること、腫瘍増殖を阻害すること、癌細胞の数もしくは腫瘍増殖を減らすこと、または癌関連症状を改善することを意味する。

30

【0067】

用語「投与する」は、本明細書で使用する場合、所定の抗原を発現する細胞の拡散を減らし、および/または阻害するために治療上有効な量の、例えば、CAR発現細胞または本出願の組成物を患者に投与することを意味する。

【0068】

本開示の範囲を理解する上で、「を含んでなる」という用語およびその派生語は、本明細書で使用する場合、記載されている特徴、要素、成分、群、整数、および/または工程の存在を明示するが、記載されていない特徴、要素、成分、群、整数、および/または工程の存在を排除しないオープンエンドの用語であるものとする。以上のことは、「含む」、「有する」という用語およびそれらの派生語などの類似の意味を有する語にも当てはまる。最後に、「実質的に」、「約」および「およそ」などの程度の用語は、本明細書で使用する場合、最終的な結果を有意に変化させないような、被修飾語の合理的偏差量を意味する。これらの程度の用語は、この偏差が、それが修飾する語の意味を否定しない限り、被修飾語の少なくとも±5%の偏差を含むと解釈されるべきである。

40

【0069】

本明細書でおよび添付の特許請求の範囲使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、内容がそうではないことが明示されない限り、複数

50

の指示語を含む。また、用語「または」は、内容がそうではないことが明示されない限り、一般に、「および/または」を含むその意味の範囲内で使用されることにも留意されたい。

【0070】

特定の節に記載される定義および実施形態は、当業者に理解されるように、それらが好適であると記載される本明細書の他の実施形態にも当てはまることが意図される。

【0071】

本明細書において終点による数値範囲の列挙は、その範囲内に包含される総ての数字および分数を含む（例えば、1～5は、1、1.5、2、2.75、3、3.90、4、および5を含む）。また、総ての数およびその分数も用語「約」で修飾されるであろうことも理解されるべきである。

【0072】

さらに、特定の節に記載される定義および実施形態は、当業者に理解されるように、それらが好適であると記載される本明細書の他の実施形態にも当てはまることが意図される。例えば、以下の下りでは、本発明の種々の側面がより詳しく定義される。このように定義される各側面は、そうではないことが明示されない限り、他のいずれの1または複数の側面と組み合わせてもよい。特に、好ましいまたは有利であるとして示されるいずれの特徴も、好ましいまたは有利であるとして示される他のいずれの1または複数の特徴と組み合わせてもよい。

【0073】

(1) 本開示 C A R

本明細書では、i) 所定の抗原に結合し得る細胞外ドメイン、ii) 膜貫通ドメイン、およびiii) 細胞質共刺激ドメインおよび/またはインターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインから選択される1以上の細胞内シグナル伝達ドメインと外因性S T A T 3関連モチーフを含んでなるC D 3 細胞内シグナル伝達ドメインとを含んでなる細胞内セグメント（ここで、前記細胞内セグメントは、内因性のまたは外因性J A K結合モチーフおよびS T A T 5関連モチーフを含んでなる）を含んでなるC A Rが開示される。ある実施形態では、これらのドメインは、場合により、N末端から始まって以上の順序で、直接的または間接的に融合される。ある実施形態では、細胞内セグメント内のこれらのドメインは、逆の順序で融合される。

【0074】

また、本明細書では、i) 所定の抗原に結合し得る細胞外ドメイン、ii) 膜貫通ドメイン、およびiii) I L受容体鎖の細胞質ドメインおよび場合により少なくとも1つの補足的細胞質ドメインを含む1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメント、を含んでなるC A Rも開示される。ある実施形態では、これらのドメインは、場合により、N末端から始まって以上の順序で、直接的または間接的に融合される。1つの実施形態では、細胞内セグメント内のこれらのドメインは、逆の順序で融合される。

【0075】

いくつかの実施形態では、I L受容体鎖は、膜貫通ドメインの近位にあり、および/またはC A R細胞内セグメントのN末端に近い、またはN末端を形成する。他の実施形態では、I L受容体鎖は、C A R内の細胞内セグメントのC末端に近い、またはC末端を形成する。いくつかの実施形態では、I L受容体鎖は、C A R内の、外因性S T A T 3関連モチーフY X X Q（配列番号13）を含んでなるC D 3 細胞内シグナル伝達ドメインの上流またはN末端側にある。

【0076】

C A R細胞内セグメントがI L受容体鎖のシグナル伝達ドメインのみを含んでなる実施形態では、C A R発現細胞は、内因性T C Rを介してM H C複合体内に存在する所定の抗原によって、および/または内因性C D 2 8を介してC D 8 0 / 8 6分子によって、例えば、B細胞によって活性化され得る。

【0077】

また、本開示のCARを発現する細胞も提供される。このような細胞は、例えば、高い増殖速度および/または高い生存率を持ち得、高い量のサイトカインを生産し、および/またはCARを発現しない親細胞に比べて、CARが結合する所定の/予め選択された抗原をその表面に有する細胞に対して高い細胞傷害活性を持ち得る。例えば、実施例に示されるように、28-IL2RBz(YXXQ)CAR形質導入T細胞は、高い細胞分裂、増殖および生存率を有し、治療として前記細胞を受容しているマウスにおいて、抗腫瘍効果を提供し、かつ、全生存率を改善する。

【0078】

(a) 細胞外ドメイン

本開示のCARに関して使用される「所定の抗原に結合し得る細胞外ドメイン」は、標的抗原と結合し得るタンパク質性分子またはその一部を含んでなるドメインであり、例えば、抗体の抗原結合ドメインおよび受容体のリガンド結合ドメインが含まれる。このドメインは、細胞表面に存在する抗原に結合して相互作用し、それにより、CARを発現する細胞に対する特異性を付与する。例えば、本開示のCARに関して使用される細胞外ドメインは、抗体(例えば、H鎖およびL鎖)の可変領域、一本鎖およびその結合フラグメントもしくはTCR(TCR、TCR、TCR、TCR)を含んでなり、および/またはそれに由来し、あるいはCD4エクトドメイン、CD8、CD8、CD11A、CD11B、CD11C、CD18、CD29、CD49A、CD49B、CD49D、CD49E、CD49F、CD61、CD41、および/またはCD51に由来する。これらのタンパク質の全領域を使用してもよい。他方、抗原またはリガンドに結合し得るドメイン、例えば、抗体Fabフラグメント、抗体可変領域[H鎖のV領域(VH)およびL鎖(VL)のV領域]または受容体の細胞外リガンド結合ドメインを使用することができる。特に、ある実施形態では、一本鎖可変フラグメント(scFv)を使用することができる。例えば、CD4エクトドメインは、HIV感染細胞を認識することができる。

【0079】

本開示のCARの細胞外ドメインは、1つのみの抗原もしくはリガンドに結合してもよく、または2以上の抗原もしくはリガンドに結合してもよい。加えて、本開示は、1つの細胞外ドメインを含んでなるCARと2以上の細胞外ドメインを含んでなるCARの両方を含む。

【0080】

本開示のCARの細胞外ドメインは、標的抗原を認識する抗体、場合により、細胞表面抗原もしくは可溶性抗原、または抗原と相互作用する分子から選択され得る。抗原の例としては、ウイルス抗原、細菌(特に、感染性細菌)抗原、寄生虫抗原、特定の病態に関連する標的細胞上の細胞表面マーカー(例えば、腫瘍抗原)、および免疫細胞の表面分子が含まれる。

【0081】

本開示は、一側面において、レトロウイルス科(例えば、ヒト免疫不全ウイルス、例えば、HIV-1およびHIV-LP)、ピコルナウイルス科(例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、およびエコーウイルス)、風疹ウイルス、コロナウイルス、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、パルボウイルス、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科[例えば、1型および2型単純ヘルペスウイルス(HSV)、水痘-帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、およびヘルペスウイルス]、ポックスウイルス科(例えば、痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、およびポックスウイルス)、またはC型肝炎ウイルスに由来する抗原と結合し得るCARを提供する。

【0082】

本開示は、別の側面において、ブドウ球菌属(*Staphylococci*)、連鎖球菌属(*Streptococcus*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)、またはサルモネラ菌

10

20

30

40

50

属(*Salmonella*)の菌株に由来する抗原と結合し得るC A Rを提供する。特に、本開示は、感染性細菌、例えば、ピロリ菌(*Helicobacter pylori*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、マイコバクテリア種の菌株(例えば、結核菌(*M. tuberculosis*)、鳥結核菌(*M. avium*)、M. イントラセルラーレ(*M. intracellulare*)、M. カンサイー(*M. kansasii*)、またはM. ゴルドネ(*M. goodii*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、A群連鎖球菌属、B群連鎖球菌属(ストレプトコッカス・アガラクティエ(*Streptococcus agalactiae*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、または破傷風菌(*Clostridium tetani*)に由来する抗原と結合し得るC A Rを提供する。

10

【0083】

本開示は、別の側面において、5 T 4、5 1 - インテグリン、7 0 7 - A P、A F P、A R T - 4、B 7 H 4、B A G E、- カテニン / m、B c r - a b 1、M N / C I X 抗体、C A 1 2 5、C A M E L、C A P - 1、C A S P - 8、C D 4、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 2 5、C D C 2 7 / m、C D 3 0、C D 3 3、C D 5 2、C D 5 6、C D 8 0、C D K 4 / m、C E A、C T、C y p - B、D A M、E G F R、E r b B 3、E L F 2 M、E M M P R I N、E p C a m、E T V 6 - A M L 1、G 2 5 0、G A G E、G n T - V、G p 1 0 0、H A G E、H E R - 2 / n e w、H L A - A * 0 2 0 1 - R 1 7 0 I、H P V - E 7、H S P 7 0 - 2 M、H S T - 2、h T E R T (またはh T R T)、i C E、I G F - 1 R、I L - 2 R、I L - 5、K I A A 0 2 0 5、L A G E、L D L R / F U T、M A G E、M A R T - 1 / m e l a n - A、M A R T - 2 / S k i、M C 1 R、ミオシン / m、M U C 1、M U M - 1、M U M - 2、M U M - 3、N A 8 8 - A、P A P、プロテインアーゼ - 3、p 1 9 0 m i n o r b c r - a b 1、P m 1 / R A R、P R A M E、P S A、P S M、P S M A、R A G E、R U 1 または R U 2、S A G E、S A R T - 1 または S A R T - 3、サバイピン、T E L / A M L 1、T G F、T P I / m、T R P - 1、T R P - 2、T R P - 2 / I N T 2、V E G F、W T 1、N Y - E s o - 1 または N Y - E s o - B などの腫瘍抗原と結合し得るC A Rを提供する。本開示はまた、細胞表面接着分子、自己免疫疾患に見られる炎症性細胞の表面分子、または自己免疫を生じるT C Rと結合し得るC A Rも提供する。

20

【0084】

(b) 細胞内セグメント

本開示によるC A Rの細胞内セグメントは、1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなり得、同じ分子内に存在する細胞外ドメインがそのコグネイト抗原 / リガンドと結合(相互作用)する際に細胞にシグナルを伝達し得る、タンパク質性分子である。

30

【0085】

ある側面において、C A R細胞内セグメントは、外因性S T A T 3 関連モチーフを含んでなるC D 3 細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる。加えて、C A R細胞内セグメントは、I L 受容体鎖の細胞質ドメインおよび / または細胞質共刺激ドメインから選択される1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなり、前記細胞内セグメントは、内因性または外因性J A K 結合モチーフおよびS T A T 5 関連モチーフを含んでなる。

40

【0086】

一次細胞質シグナル伝達配列は、T C R 複合体の一次活性化を調節する。例えば、C D 3 細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞質シグナルを提供する。一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(I T A M) [Nature, vol. 338, pp. 383-384 (1989)]として知られるシグナル伝達モチーフを含んでいてもよい。他方、阻害的に働く一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシン阻害モチーフ(I T I M) [J Immunol., vol. 162, No. 2, pp. 897-902 (1999)]として知られるシグナル伝達モチーフを含んでいてもよい。本開示では、I T A Mおよび / またはI T I Mを有する細胞内シグナル伝達ドメインを使用することができる。

【0087】

50

使用可能なITAMを有する細胞内シグナル伝達ドメインの例は、例えば、CD3の代わりに、またはCD3と置き換えて、CD3、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するITAMを有する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。具体的には、1以上のITAMを含んでなる細胞内ドメインの例には、CD3 (NCBI RefSeq: NP_932170.1)のアミノ酸番号52~164(配列番号7)、FcRI (NCBI RefSeq: NP_004097.1)のアミノ酸番号45~86、FcRI (NCBI RefSeq: NP_000130.1)のアミノ酸番号201~244、CD3 (NCBI RefSeq: NP_000064.1)のアミノ酸番号139~182、CD3 (NCBI RefSeq: NP_000723.1)のアミノ酸番号128~171、CD3 (NCBI RefSeq: NP_000724.1)のアミノ酸番号153~207、CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2)のアミノ酸番号402~495、CD22 (NCBI RefSeq: NP_001762.2)のアミノ酸番号707~847、CD79a (NCBI RefSeq: NP_001774.1)のアミノ酸番号166~226、CD79b (NCBI RefSeq: NP_000617.1)のアミノ酸番号182~229、およびCD66d (NCBI RefSeq: NP_001806.2)のアミノ酸番号177~252の配列を有するペプチド、ならびにこれらのペプチドと同じ機能を有するそれらの変異体が含まれる。本明細書に記載のNCBI RefSeq IDまたはGenBankのアミノ酸配列情報に基づくアミノ酸番号は、各タンパク質の前駆体(シグナルペプチド配列などを含んでなる)の全長に基づいて符番されている。

【0088】

CD3が以上のものに置き換わっている実施形態では、外因性STAT3関連モチーフは、CD3置換部に導入される。

【0089】

STAT3転写因子シグナル伝達は、ヒトT細胞記憶の生成と維持に重要な役割を果たす(Siegel et al. 2011)。STAT3シグナル伝達はまた、T細胞において、インビボ(in vivo)抗腫瘍効果を増強する可能性もある(Blood. 2010 and J Exp Med. 2005)。

【0090】

ある実施形態では、外因性STAT3関連モチーフは、YXXQ(配列番号13)である。示されたように、CD3シグナル伝達ペプチドの細胞内シグナル伝達ドメイン内に含まれる外因性STAT3関連モチーフYXXQ(配列番号13)は、STAT3結合能がある。ある実施形態では、CD3の細胞内ドメインは、配列番号7の配列である。

【0091】

ある実施形態では、STAT3関連モチーフYXXQ(配列番号13)において「X」で表されるアミノ酸残基は、STAT3結合を保持するいずれの修飾天然アミノ酸も含む、任意の天然アミノ酸であり得る。1つの実施形態では、アミノ酸Xは、ロイシン、アルギニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、リシン、プロリン、メチオニン、バリン、グルタミン、トレオニン、アスパラギン酸から独立に選択される。例えば、アミノ酸Xはアルギニンである。例えば、アミノ酸Xはヒスチジンである。

【0092】

ある実施形態では、チロシン残基に隣接する2つのアミノ酸残基は、アルギニン-ヒスチジンである。さらに別の実施形態では、外因性STAT3関連モチーフは、YRHQ(配列番号22)である。

【0093】

外因性STAT3関連モチーフYXXQ(配列番号13)はCD3の細胞内ドメインのどの部分に導入されてもよいが、ある実施形態では、YXXQ関連モチーフはC末端領域付近に挿入される。特定の理論に縛られることを望むものではないが、多くの内因性YXXQモチーフは、C末端から100aa付近またはそれ以内に配置されると考えられる

。また、C末端領域付近にあるYXXQモチーフは、GP130およびLIFR研究でより近位にある方が機能性が高いことが示されている(Schmitz J et al. J Immunol. 2000; 164:848-54; Tomida M et al. Blood. 1999;93:1934-41)。

【0094】

ある実施形態では、外因性STAT3関連モチーフYXXQ(配列番号13)は、CARのC末端から200アミノ酸残基内にあるCD3の細胞内ドメインの任意の部分に導入される。例えば、STAT3関連モチーフは、CARのC末端から200アミノ酸残基内、150アミノ酸残基内、100アミノ酸残基内、90アミノ酸残基内、80アミノ酸残基内、70アミノ酸残基内、60アミノ酸残基内、50アミノ酸残基内、40アミノ酸残基内、30アミノ酸残基内、20アミノ酸残基内または10アミノ酸残基内に導入される。

10

【0095】

本明細書で述べられるように、CD3の細胞内ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含んでなる。1つの実施形態では、外因性STAT3関連モチーフは、ITAM以外の場所に導入される。

【0096】

ITAMは、機能的に冗長であるが、それらはシグナル伝達応答の強度に関して相加作用を有する。例えば、CD3の細胞内ドメインは、細胞内シグナル伝達のための3つのITAMを含んでなる。よって、1つの実施形態では、本明細書に開示されるCARのCD3細胞内ドメイン内のITAMモチーフは維持される。

20

【0097】

ある実施形態では、外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3細胞内ドメインは、少なくとも1つのITAMモチーフを含んでなる。1つの実施形態では、外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3細胞内ドメインは、2つのITAMモチーフを含んでなる。さらなる実施形態では、外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3細胞内ドメインは、3つのITAMモチーフを含んでなる。

【0098】

当業者は、D3の細胞内シグナル伝達ドメインにSTAT3関連モチーフを導入するためにいくつかの方法が使用可能であることを認識するであろう。例えば、図1に示されるように、外因性STAT3関連モチーフは、104～106位のアミノ酸残基Leu-His-Metを残基104番のチロシンとそのチロシン残基に105番および106番で隣接する任意の他の2個のアミノ酸残基で置換し、それにより、YXXQ(配列番号13)関連モチーフを形成することにより導入することができる。CD3の細胞内シグナル伝達ドメインのアミノ酸残基104-105-106は、全長CD3(例えば、NCBI RefSeq: NP_932170.1)のアミノ酸残基156-157-158に相当する。CD3細胞内ドメインの残基104～107にYXXQモチーフを含んでなる28-IL2RB-z(YXXQ)の配列が配列番号24に示される。CD3細胞内ドメイン(CD3細胞内ドメインは、配列番号25の残基475～586で示される)の残基104～107にYRHQ(配列番号22)モチーフを含んでなる28-IL2RB-z(YRHQ)の配列。

30

40

【0099】

例えば、STAT3モチーフは、例えば、ギブソンアセンブリ法を用い、部位特異的変異誘発によって導入することができる。以下のプライマーがギブソンアセンブリに使用できる：フォワード、ACGCCCTATCGCCATCAGGCCCTGC(配列番号26)；およびリバース、CTGATGGCGATAGGCGTCGTAGGTGT(配列番号27)。使用可能な他の方法には、例えば、PCRに基づく技術、例えば、ポリメラーゼ不完全プライマー伸長(polymerase incomplete primer extension)(PIPE)クローニング、配列および連結非依存的クローニング(SLIC)およびオーバーラップエクステンションクローニング(OEC)(Klock et al., 2008; Li et al., 2007; Bryskin et al., 2010; Unger et al., 2010)が含まれる。

50

【0100】

記載のように、ある実施形態におけるCARは、ILR鎖および細胞質共刺激ドメインの細胞質ドメインから選択される1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメントを含んでなる。

【0101】

本開示に使用されるIL受容体鎖の細胞質ドメインは、IL受容体の任意の鎖から選択することができ、例えば、IL-2受容体鎖(NCBI RefSeq: NP_000869.1)(配列番号11、IL-21受容体鎖(NCBI RefSeq: NP_006857.1; 配列番号6)のアミノ酸番号256~538)のアミノ酸番号266~551、共通IL-2受容体鎖(NCBI RefSeq: NP_000197.1)のアミノ酸番号284~369、IL-7R(NCBI RefSeq: NP_002176.2)のアミノ酸番号265~459、IL-9R(NCBI RefSeq: NP_002177.2)のアミノ酸番号292~521またはIL-4R(NCBI RefSeq: NP_000409.1)のアミノ酸番号257~825を含んでなる細胞質ドメインが使用可能である。IL受容体鎖の細胞質ドメインの全領域が使用可能である(例えば、本明細書に示される配列)。

10

【0102】

あるいは、IL受容体鎖の前記細胞質ドメインの末端切断フラグメントも使用可能である。例えば、末端切断フラグメントは、ILR細胞質ドメインの250までのアミノ酸を含んでなるか、または50~200アミノ酸もしくは80~150アミノ酸である。

20

【0103】

ある実施形態では、IL受容体鎖の細胞質ドメイン、場合により、IL受容体鎖の前記細胞質ドメインの末端切断フラグメントは、少なくともSTAT関連モチーフ、場合により、STAT5関連モチーフ、とJAK結合モチーフ(box-1モチーフとしても知られる)とを含んでなる。ある実施形態では、IL受容体鎖の細胞質ドメインまたはその末端切断フラグメントは、STAT5関連モチーフとJAK結合モチーフとを含んでなる。

【0104】

ある実施形態では、IL受容体鎖の細胞質ドメインおよび/または末端切断フラグメントには、同じ機能を有する変異体、例えば、STATシグナル伝達、場合により、STAT5シグナル伝達および/またはJAKシグナル伝達を誘導する変異体が含まれる。

30

【0105】

本開示の1つの側面では、IL-2受容体(IL-2R)鎖の細胞質ドメインが使用可能である。本開示で使用可能なIL-2R鎖の細胞質ドメインの例には、IL-2R鎖(NCBI RefSeq: NP_000869.1、配列番号11)のアミノ酸番号266~551が含まれる。本開示の1つの側面では、IL-2R鎖の細胞質ドメインの末端切断フラグメントが使用可能である。この末端切断フラグメントは、i) チロシンキナーゼJAK1との会合を可能とする、BOX-1モチーフとも呼ばれる、JAK結合モチーフ(例えば、NCBI RefSeq: NP_000869.1のアミノ酸番号278~286)、およびii) STAT関連モチーフ、場合により、STAT5またはSTAT3関連モチーフを含んでいてもよい。IL受容体鎖の他の部分は、例えば、保存的アミノ酸バリエーションによって変更可能である。

40

【0106】

ある実施形態では、細胞内セグメントは、外因性JAK結合モチーフ、またはJAK結合モチーフを含んでなるシグナル伝達分子を含んでいてもよい。例えば、JAK結合モチーフは、IL2R(IL2RG)、エリスロポエチン受容体(EpoR)、トロンプオエチン受容体(TpoR)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体(GM-CSFR)、および成長ホルモン受容体(GHR)に由来する。

【0107】

IL-2R鎖は、STAT5会合に使用される3つの機能的STAT5結合モチーフ、YFFF(配列番号28)、YCTF(配列番号29)およびYLSL(配列番号4

50

3)を含んでなる。これらのチロシン残基の変異は、I L - 2 R 鎖のI L - 2 反応性を無効にし得る(Friedmann et al., 1996)。エリスロポエチン受容体(E p o R)は、S T A T 5の活性化を媒介する2つのチロシン残基、すなわち、Y 3 4 3とY 4 0 1を含んでなり、両方ともY X X Lモチーフ(配列番号4 1)を有することが記載されている(Klingmuller et al., 1996)。従って、Y X X L(配列番号4 1)は、S T A T 5の動員に好ましいモチーフであり得る。例えば、I L - 2 R 鎖 S T A T 5 結合モチーフで示されているように、他のアミノ酸残基も機能的である。1つの実施形態では、S T A T 5 関連モチーフは、I L - 2 R 鎖 S T A T 5 関連モチーフであり、チロシン残基 - 5 1 0(チロシン残基5 1 0は、N C B I R e f S e q : N P _ 0 0 0 8 6 9 . 1 のアミノ酸番号5 3 6である)を含んでなる。

10

【0 1 0 8】

ある実施形態では、S T A T 5 関連モチーフは、I L 2 R 、E p o R、T p o R、G M - C S F RおよびG H Rに由来し得る。

【0 1 0 9】

ある実施形態では、I L - 2 R 鎖のS T A T 5 関連モチーフは、アミノ酸残基Y X X L(配列番号4 1)を含んでなる。ある実施形態では、S T A T 5 関連モチーフにおいて「X」で表されるアミノ酸残基は、S T A T 5 結合を保持する任意の修飾天然アミノ酸を含む、任意の天然アミノ酸であり得る。

【0 1 1 0】

ある実施形態では、S T A T 5 関連モチーフは、チロシン残基5 1 0と、チロシン残基5 1 0のC末端側に隣接する4残基、すなわち、Y L S L Q(配列番号1 2)を含んでなる。

20

【0 1 1 1】

S T A T 5 関連モチーフは、細胞質ドメイン内に内在し得る。例えば、I L - 2 R 鎖の細胞質ドメインは、S T A T 5 関連モチーフを含んでなる。S T A T 5 関連モチーフはまた、このモチーフを天然には発現しない細胞質ドメインに導入することもできる。例えば、S T A T 5 会合は、例えば、本明細書に記載のものを含む既知の方法を用い、アミノ酸残基の置換または挿入により導入することができる。

【0 1 1 2】

他のS T A T 3 関連モチーフも知られており、例えば、I L 2 1 RのY L R Q(配列番号3 0)；I L 6 S TのY R H Q(配列番号2 2)、Y F K Q(配列番号3 1)、Y L P Q(配列番号3 2)およびY M P Q(配列番号3 3)；G C S F RのY V L Q(配列番号3 4)；L I F RのY Q P Q(配列番号3 5)、Y K P Q(配列番号3 6)およびY R P Q(配列番号3 7)；F G F R 1のY T H Q(配列番号3 8)；I L 1 0 R AのY L R Q(配列番号3 0)およびY L K Q(配列番号3 9)；ならびにE G F RのY H N Q(配列番号4 0)が含まれる(Shao et al., 2004)。

30

【0 1 1 3】

ある実施形態では、細胞内セグメントは、複数のS T A T 3 関連モチーフおよび/または複数のS T A T 5 関連モチーフを含む、S T A T 3およびS T A T 5 関連モチーフを含んでなる。

40

【0 1 1 4】

S T A T 3およびS T A T 5 関連モチーフは、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインのいずれに配置または導入することもできる。

【0 1 1 5】

同様に、細胞内セグメントは、細胞内シグナル伝達ドメインのいずれに配置または導入することもできる1以上のJ A K結合モチーフを含んでなる。

【0 1 1 6】

B O X - 1モチーフはまた、配列番号5のアミノ酸1 3 ~ 2 1としても示され、チロシン残基 - 5 1 0はまた、配列番号5のアミノ酸番号7 9としても示される(およびこのチロシン残基に隣接するモチーフはアミノ酸8 0 ~ 8 3である)。ある実施形態では、イン

50

ターロイキン受容体細胞質ドメインフラグメントは、配列番号5のアミノ酸22～78を含んでなる。IL-2R 鎖の細胞質ドメインの末端切断フラグメント(配列番号5)の例には、NCBI RefSeq: NP_000869.1のアミノ酸番号266～337および530～551の配列を有するペプチドが含まれる。

【0117】

本開示の1つの側面では、IL-21受容体(IL-21R) 鎖の細胞質ドメインが使用可能である。本開示で使用されるIL-21R 鎖の細胞質ドメインの例には、IL-21R 鎖のアミノ酸番号256～538(NCBI RefSeq: NP_068570.1、配列番号6)を含んでなる細胞内シグナル伝達ドメインが含まれる。本開示の1つの側面で、IL-21R 鎖の細胞質ドメインの末端切断フラグメントが使用可能である。末端切断フラグメントには、チロシンキナーゼJAK1との会合に必要なbox-1モチーフ(NCBI RefSeq: NP_068570.1のアミノ酸番号266～274)が含まれ、また、STAT関連モチーフが含まれる。ある実施形態では、STAT関連モチーフは、チロシン残基-500(NCBI RefSeq: NP_000869.1のアミノ酸番号519)およびSTAT1/3会合に必要とされるチロシン残基500、すなわち、YLRQ(配列番号30)のC末端側に隣接する3残基を含んでなる。

【0118】

細胞内シグナル伝達ドメインの他の例には、TCR複合体および/または共刺激分子に由来する細胞質領域、およびそれらの配列と同じ機能を有する任意の変異体が含まれる。他の例には、引用することにより本明細書の一部とされるSadelain et al 2009の表2に挙げられている細胞質シグナル伝達ドメインが含まれる。

【0119】

天然T細胞の活性化は、2つの異なる種類の細胞内シグナル伝達ドメイン、すなわち、TCR複合体を介して抗原依存的一次活性化(例えばCD3により提供される、例えば、一次細胞質シグナル)を誘導するためのドメインおよび二次または共刺激シグナル(二次細胞質シグナル)を提供するために抗原非依存的に作用するドメインにより伝達される。

【0120】

1つの側面において、本開示のCAR細胞内セグメントは、外因性STAT3関連モチーフおよび場合により、二次細胞質シグナル伝達配列を含んでなるCD3 細胞内細胞質シグナル伝達ドメインを含んでなる。

【0121】

本明細書で使用する場合、用語「二次細胞質シグナル伝達」および「共刺激」は互換的に使用される。

【0122】

本開示で使用可能な二次または共刺激細胞質シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内ドメインの例には、CD2、CD4、CD5、CD8、CD8、CD28、CD134、CD137(4-1BB)、ICOS、およびCD154、例えば、シグナル伝達モチーフを含んでなるその末端切断フラグメント、に由来する配列が含まれる。その具体例には、CD2(NCBI RefSeq: NP_001758.2)のアミノ酸番号236～351、CD4(NCBI RefSeq: NP_000607.1)のアミノ酸番号421～458、CD5(NCBI RefSeq: NP_055022.2)のアミノ酸番号402～495、CD8(NCBI RefSeq: NP_001759.3)のアミノ酸番号207～235、CD8(GenBank: AAA35664.1)のアミノ酸番号196～210、CD28(NCBI RefSeq: NP_006130.1)のアミノ酸番号180～220(配列番号8)、CD137(4-1BB、NCBI RefSeq: NP_001552.2)のアミノ酸番号214～255、CD134(OX40、NCBI RefSeq: NP_003318.1)のアミノ酸番号241～277、およびICOS(NCBI RefSeq: NP_036224.1)の

10

20

30

40

50

アミノ酸番号166～199の配列を有するペプチド、およびこれらのペプチドが有するものと同じ機能を有するそれらの変異体が含まれる。

【0123】

1つの実施形態では、本明細書に開示されるCAR細胞内セグメントは、CD28、CD2、CD4、CD5、CD8、CD8、CD134およびCD137から選択される細胞質共刺激ドメインをさらに含んでなる。

【0124】

好ましい開示は、1つの側面において、外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3の細胞内シグナル伝達ドメインに加えて、1以上の、例えば、2または3の細胞内シグナル伝達ドメインを有する細胞内セグメントを含んでなるCARを含む。

10

【0125】

本開示はまた、直列された2以上の同じ細胞内シグナル伝達ドメインを有する細胞内セグメントを含んでなるCARを含む。1つの側面において、本開示は、IL受容体の細胞質ドメインがCD3の細胞内シグナル伝達ドメインのN末端側にあるCAR、すなわち、IL受容体の細胞質ドメインとCD3の細胞内シグナル伝達ドメインが、N末端側からこの順序で連結されたものを含んでなるCARを提供する。本開示はまた、上述のCARにCD28（例えば、CD28の細胞質共刺激ドメイン）の細胞内ドメインをさらに付加することにより得られるCAR、すなわち、CD28の細胞内シグナル伝達ドメインと、IL受容体の細胞質ドメインと、外因性STAT3モチーフを含んでなるCD3の細胞内シグナル伝達ドメインとが、N末端側からこの順序で連結されたものを含んでなるCARも含む。

20

【0126】

ある実施形態では、CARは、外因性STAT3関連モチーフと、インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインおよび細胞質共刺激ドメインから選択される細胞内シグナル伝達ドメインとを含んでなる、CD3細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメントを含んでなり、ここで、細胞内シグナル伝達ドメインの少なくとも1つは、内因性のまたは外因性JAK結合モチーフおよびSTAT5関連モチーフを含んでなる。

【0127】

1つの実施形態では、CARは、外因性STAT3関連モチーフを有するCD3細胞内シグナル伝達ドメインと、内因性または外因性JAK結合モチーフおよびSTAT5関連モチーフを含んでなるIL受容体鎖フラグメントの細胞質ドメインと、CD28の細胞質共刺激ドメインとを含んでなる。

30

【0128】

本開示のCARでは、オリゴペプチドリinkerまたはポリペプチドリinkerが、細胞内セグメントのドメイン間に、そこでドメインを連結するように、および/またはそれらを他のドメインと連結するように挿入できる。例えば、2～10アミノ酸長を有するリンカーが使用できる。特に、グリシン-セリン連続配列を有するリンカーが使用できる。例えば、リンカーIDGGGSGGGGSGGGGS（配列番号42）を、CD28細胞質ドメインと部分的細胞質IL-2受容体ドメインの間に挿入することができる。例えば、リンカーKLGGS GP（配列番号19）を、部分的細胞質IL-2受容ドメインとおよびCD3鎖の細胞内ドメインの間に挿入することができる。

40

【0129】

特定の実施形態では、CARは、例えば配列番号24に示されるように、シグナルペプチドと、FMC63一本鎖可変フラグメント細胞外ドメインと、CD28膜貫通と、CD28細胞質ドメインと、JAK結合モチーフおよび内因性STAT5関連モチーフを含んでなる部分的細胞質IL-2受容体ドメインと、外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3の細胞内シグナル伝達ドメインとが、N末端側からこの順序で連結されたものを含んでなる。

【0130】

別の側面では、i)所定の抗原に結合し得る細胞外ドメイン、ii)膜貫通ドメイン、

50

および i i i) インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインおよび場合により補足的細胞質ドメインを含む 1 以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメント、を含んでなる C A R が提供される。

【 0 1 3 1 】

I L 受容体鎖の細胞質ドメインは、本明細書に記載の I L 受容体のいずれの鎖から選択されてもよい。I L 受容体鎖の細胞質ドメインの全領域が使用可能である。あるいは、I L 受容体鎖の前記細胞質ドメインの末端切断フラグメントもまた使用可能である。全長およびその末端切断フラグメントの例は本明細書に示される。

【 0 1 3 2 】

ある実施形態では、末端切断フラグメントは、本明細書に記載の、少なくとも 1 つのチロシンキナーゼ関連モチーフ (b o x - 1 モチーフとしても知られる) および S T A T (シグナル伝達転写活性化因子) 関連モチーフを含んでいてもよい。例えば、末端切断フラグメントは、I L R 細胞質ドメインの 2 5 0 までのアミノ酸を含んでなるか、または 5 0 ~ 2 0 0 アミノ酸もしくは 8 0 ~ 1 5 0 アミノ酸である。

【 0 1 3 3 】

本明細書に記載されるように、I L - 2 R 鎖の S T A T 関連モチーフは、チロシン残基 - 5 1 0 (チロシン残基 5 1 0 は、N C B I R e f S e q : N P _ 0 0 0 8 6 9 . 1 のアミノ酸番号 5 3 6 である) を含んでなる。ある実施形態では、S T A T 関連モチーフは、チロシン残基 5 1 0 と、チロシン残基 5 1 0 の C 末端側に隣接する 4 残基、すなわち、Y L S L Q (配列番号 1 2) を含んでなる。

【 0 1 3 4 】

他の S T A T 関連モチーフも知られており、例えば、Kisseleva et al 2002 の表 2 に示されているように、I L - 6 の Y X X Q (配列番号 1 3) 、場合により、Y X P Q 、I L - 1 0 の Y X X Q (配列番号 1 3) 、I L - 1 2 の Y L P S N I D (配列番号 1 4) 、I L - 2 の Y L S L Q (配列番号 1 2) 、Y C T F P (配列番号 1 5) 、Y F F F H (配列番号 1 6) 、I L - 7 の Y V T M S (配列番号 1 7) 、I L - 9 の Y L P Q E (配列番号 1 8) 、ならびに I L - 4 の Y K A F S (配列番号 2 0) および Y K P F Q (配列番号 2 1) が含まれる。いずれの S T A T シグナル伝達ドメインも使用可能であり、および / または I L R 鎖に導入できる。

【 0 1 3 5 】

ある実施形態では、I L 受容体の細胞質ドメインに加えて、C A R 細胞内セグメントは、I L 受容体内に存在するもの以外の少なくとも 1 つの補足的シグナル伝達ドメインを含んでなる。細胞内シグナル伝達ドメインの例には、T C R 複合体由来の細胞質領域および / または共刺激分子、およびそのような配列と同じ機能を有する任意の変異体が含まれる。他の例としては、引用することにより本明細書の一部とされる Sadelain et al 2009 の表 2 に挙げられている細胞質シグナル伝達ドメインが含まれる。

【 0 1 3 6 】

ある実施形態では、C A R 細胞内セグメントは、細胞内シグナル伝達ドメインとして本明細書に記載されている一次細胞質シグナル伝達配列および / または二次 (例えば、共刺激) 細胞質シグナル伝達配列を含んでなる。

【 0 1 3 7 】

ある実施形態では、細胞内セグメントは、本明細書に記載の I T A M および / または I T I M を有する細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる。

【 0 1 3 8 】

本開示は、I L 受容体の細胞質ドメインに加えて、1 以上、例えば、2 または 3 の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメントを含んでなる C A R を含む。例えば、C A R は、I L 受容体の細胞質ドメインおよび C D 3 の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる。例えば、C A R は、I L 受容体の細胞質ドメイン、C D 3 の細胞内シグナル伝達ドメインおよび C D 2 8 の細胞質共刺激ドメインを含んでなる。

【 0 1 3 9 】

本開示はまた、直列された2以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメントを含んでなるCARを含む。例えば、CARは、CD3の細胞内シグナル伝達ドメインのN末端側にIL受容体の細胞質ドメインを含んでなり、すなわち、それは、IL受容体の細胞質ドメインとCD3の細胞内シグナル伝達ドメインが、N末端側からこの順序で連結されたものを含んでなる。

【0140】

本開示はまた、上述のCARに導入されたCD28の細胞内ドメインをさらに含んでなるCAR、すなわち、CD28の細胞質共刺激ドメインと、IL受容体の細胞質ドメインと、CD3の細胞内シグナル伝達ドメインが、場合によりN末端側からこの順序で連結されたものを含んでなるCARも含む。例えば、CAR細胞内セグメントは、CD3の細胞内シグナル伝達ドメインのC末端側にIL受容体の細胞質ドメインを含んでなり、すなわち、それは、CD3の細胞内シグナル伝達ドメインとIL受容体の細胞質ドメインは、N末端側からこの順序で連結されたものを含んでなる。

10

【0141】

よって、ある実施形態では、CARは、CD3細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメント、1以上の細胞質共刺激ドメインを含んでなり、ここで、前記細胞内セグメントは、JAK結合モチーフ、STAT5および/またはSTAT3関連モチーフを含んでなる。

【0142】

(c) 膜貫通ドメインおよびスペーサードメイン

20

本開示のCARは、膜貫通ドメインを含んでなる。膜貫通ドメインは、天然ポリペプチドに由来してもよく、または人工的に設計されてもよい。天然ポリペプチド由来の膜貫通ドメインは、膜結合または膜貫通タンパク質から得ることができる。例えば、T細胞受容体または鎖、CD3鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、またはGITRの膜貫通ドメインが使用可能である。人工的に設計された膜貫通ドメインは、主として、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含んでなるポリペプチドである。例えば、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットが合成膜貫通ドメインの各末端に見られ得る。場合により、短鎖オリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、例えば、2~10アミノ酸長のリンカーを、本明細書に記載の膜貫通ドメインと細胞内セグメントの間に配置することができる。特に、グリシン-セリン連続配列を有するリンカー配列が使用可能である。

30

【0143】

例えば、CD28(NCBI RefSeq: NP_006130.1)のアミノ酸番号153~179(配列番号9)の配列を有する膜貫通ドメインが膜貫通ドメインとして使用できる。

【0144】

本開示のCARでは、スペーサードメインを、細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間、または細胞内セグメントと膜貫通ドメインの間に配置することができる。スペーサードメインは、膜貫通ドメインを細胞外ドメインと、および/または膜貫通ドメインを細胞内セグメントと連結する働きをするいずれのオリゴペプチドまたはポリペプチドも意味する。スペーサードメインは、300個までのアミノ酸、例えば、約10~100個のアミノ酸、または約25~50個のアミノ酸を含んでなる。

40

【0145】

スペーサードメインは、好ましくは、CARと抗原の結合を促進し、かつ、細胞へのシグナル伝達を増強する配列を有する。結合を促進することが期待されるアミノ酸の例には、システイン、荷電アミノ酸、ならびに潜在的グリコシル化部位内のセリンおよびトレオニンが含まれ、これらのアミノ酸は、スペーサードメインを構成するアミノ酸として使用することができる。

50

【0146】

ある実施形態では、スパーサードメインは、CD8 (NCBI RefSeq: NP_001759.3) のアミノ酸番号118~178、すなわち、CD8 のヒンジ領域、CD8 (GenBank: AAA35664.1) のアミノ酸番号135~195、CD4 (NCBI RefSeq: NP_000607.1) のアミノ酸番号315~396、CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1) のアミノ酸番号114~152 (配列番号10)、またはそれらの一部を含んでなるか、またはからなるポリペプチドである。さらに、スパーサードメインは人工的合成された配列であってもよい。

【0147】

本開示のCARは、ポリマー、特に、二量体を形成するように設計することができる。例えば、例えばジスルフィド結合を介してCARを重合(二量体化)するために、システインがスパーサードメインおよび/または膜貫通ドメインに挿入される。

【0148】

さらに、本開示のCARでは、シグナルペプチド配列をN末端に連結することができる。シグナルペプチド配列は、多くの分泌タンパク質および膜タンパク質のN末端に存在し、15~30アミノ酸長を有する。本明細書に記載の細胞内ドメインを有するタンパク質分子の多くは膜タンパク質であり、シグナルペプチド配列を有する。このような分泌タンパク質および膜タンパク質に由来するシグナルペプチドは、本開示のCARのシグナルペプチドとして使用可能である。いずれのシグナルペプチドも使用可能である。例えば、シグナルペプチドは、オンコスタチンMシグナルペプチドであり得る。シグナルペプチドは、ヒト由来であってよく、また、非ヒト、例えば、昆虫細胞またはウイルス由来であってもよい。ある実施形態では、シグナルペプチドは、ヒトシグナルペプチドである。

【0149】

(2) CARをコードする核酸

本開示は、本明細書に記載のCARをコードする核酸を提供する。CARをコードする核酸は、示されたCARのアミノ酸配列から常法により容易に作製することができる。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、各ドメインのアミノ酸配列に関する上述のNCBI RefSeq IDまたはGenBank受託番号から取得することができ、標準的な分子生物学的および/または化学的手順を用いて本開示の核酸を作製することができる。例えば、ヌクレオチド配列に基づいて核酸を合成することができ、cDNAライブラリーからポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて得られたDNAフラグメントを組み合わせることによって本開示の核酸を作製することができる。

【0150】

本開示の核酸は、好適なプロモーターの制御下で発現されるように別の核酸に連結することができる。プロモーターの例には、遺伝子または作動可能に連結された構築物の発現を構成的に促進するプロモーター、薬物などの(例えば、テトラサイクリンまたはドキシソルピシン)の作用により遺伝子または作動可能に連結された構築物の発現を誘導するプロモーターが含まれる。本開示の核酸はまた、核酸の効率的な転写を得るために、プロモーターまたは転写開始部位と協働する他の調節エレメント、例えば、エンハンサー配列またはターミネーター配列を含んでなる核酸と連結することもできる。本開示の核酸に加え、核酸の発現を確認するためのマーカーとなり得る遺伝子(例えば、薬剤耐性遺伝子、リポーター酵素をコードする遺伝子、または蛍光タンパク質をコードする遺伝子)を組み込んでよい。

【0151】

ある実施形態では、核酸は、特定の宿主での発現のためにコドンが最適化された核酸である。

【0152】

本開示は、有効成分としての本開示の核酸を、薬学上許容可能な賦形剤とともに含んでなる組成物を提供する。好適な薬学上許容可能な賦形剤は当業者に周知である。薬学上許

10

20

30

40

50

容可能な賦形剤の例には、リン酸緩衝生理食塩水（例えば、0.01 M リン酸塩、0.138 M NaCl、0.0027 M KCl、pH 7.4）、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、または硫酸塩などの無機酸塩を含有する水溶液、生理食塩水、グリコールまたはエタノールの溶液、および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩または安息香酸塩などの有機酸の塩が含まれる。湿潤剤または乳化剤、および pH 緩衝剤などのアジュバントも使用可能である。薬学上許容可能な賦形剤としては、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991)（引用することにより本明細書の一部とされる）に記載されている賦形剤が適切に使用することができる。本開示の組成物は、非経口投与、例えば、注射または注入に好適な既知の形態に処方することができる。さらに、本開示の組成物は、沈殿防止剤、保存剤、安定剤および/または分散剤などの製剤添加剤、ならびに保存中の有効性を延長するための保存剤を含んでなってもよい。本組成物は、使用前に適当な無菌液体で再構成するための乾燥形態であってもよい。微粒子を介する投与のためには、顕微鏡のサイズの金粒子などの粒子を DNA でコーティングすることができる。

10

【0153】

本開示の核酸が *ex vivo* で細胞に導入される場合、本開示の核酸は、細胞への核酸の移動を促進する物質、例えば、上述の賦形剤に加えて、リポソームまたは陽イオン脂質など、核酸を導入するための試薬と組み合わせてもよい。あるいは、後述のように、本開示の核酸を運ぶベクターも有用である。特に、好適なベクターにより運ばれる本開示の核酸を含有する、生体への投与に好適な形態の組成物がインビボ遺伝子療法に好適である。

20

【0154】

本開示の核酸を有効成分として含んでなる組成物は、その核酸によりコードされている CAR が結合する抗原によって、例えば、癌 [血液癌（白血病）、固形腫瘍など]、炎症性疾患 / 自己免疫疾患（喘息、湿疹）、肝炎、および原因がインフルエンザおよび HIV などのウイルス、細菌、または真菌である感染性疾患、例えば、結核、MRSA、VRE、または深在性真菌症などの疾患の治療のために投与することができる。本開示の核酸を有効成分として含んでなる組成物は、皮内、筋肉内、皮下、腹膜内、鼻腔内、動脈内、静脈内、腫瘍内、または輸入リンパ管に、非経口投与により、例えば、注射または注入により投与することができ、またはそれらの投与のために適宜処方することができるが、投与経路は特に限定されない。

30

【0155】

(3) CAR を発現する細胞を生産するための方法

本開示の CAR を発現する細胞を生産するための方法は、本明細書に記載の CAR をコードする核酸を細胞に導入する工程を含む。この工程は、*ex vivo* で行われる。例えば、細胞を、本開示の CAR を発現する細胞を生産するように *ex vivo* にて本開示の核酸を運ぶウイルスベクターまたは非ウイルスベクターで形質転換することができる。

【0156】

本開示の方法では、哺乳動物由来の細胞、例えば、ヒト細胞、またはサル、マウス、ラット、ブタ、ウマ、またはイヌなどの非ヒト哺乳動物由来の細胞を使用することができる。

40

【0157】

1つの実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【0158】

本開示の方法で使用される細胞は特に限定されず、いずれの細胞も使用可能である。例えば、体液、組織もしくは器官、例えば、血液（末梢血、臍帯血など）もしくは骨髄から採取、単離、もしくは精製された細胞、または上述の細胞を分化させる、もしくは多能性幹細胞（iPSC）を作製するために初期化することにより得られた細胞が使用可能である（例えば、Themeli et al 2013 参照）。末梢血単核細胞（PBMC）、免疫細胞 [例えば、T 細胞、樹状細胞、B 細胞、造血幹細胞、マクロファージ、単球、NK 細胞または造

50

血細胞（好中球、好塩基球）を含む）、臍帯血単核細胞、線維芽細胞、脂肪細胞前駆体、肝細胞、皮膚ケラチノサイト、間葉幹細胞、脂肪幹細胞、種々の癌細胞株、または神経幹細胞が使用可能である。例えば、NK細胞またはT細胞、T細胞の前駆細胞（造血幹細胞、リンパ球前駆細胞など）またはそれらを含む細胞集団が使用可能である。T細胞の例には、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、制御性T細胞、細胞傷害性T細胞、および腫瘍浸潤リンパ球が含まれる。T細胞およびT細胞の前駆細胞を含む細胞集団には、PBM Cが含まれる。上述の細胞は、生体から採取してもよく、生体から採取した細胞の拡大培養により得てもよく、または細胞株として樹立してもよい。生産されたCAR発現細胞または生産されたCAR発現細胞から分化させた細胞の生体への移植が望まれる場合は、その生体自体またはその同種の生体から採取した細胞に核酸を導入することができる。

10

【0159】

本開示のCARをコードする核酸はベクターに導入することができ、そのベクターを細胞に導入することができる。例えば、レトロウイルスベクター（オンコレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、および偽型ベクターを含む）、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクター、エプスタイン-バーウイルス（EBV）ベクター、およびHSVベクターなどのウイルスベクターが使用可能である。例えば、感染細胞内で自己複製しないように複製能を欠くウイルスベクターが使用可能である。

【0160】

20

加えて、非ウイルスベクターもまた、本開示において、WO96/10038、WO97/18185、WO97/25329、WO97/30170およびWO97/31934（引用することにより本明細書の一部とされる）に記載されているように、リポソームまたは陽イオン脂質などの縮合剤と組み合わせて使用することができる。本開示の核酸はまた、リン酸カルシウム形質導入、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、または粒子衝撃により細胞に導入することもできる。

【0161】

例えば、レトロウイルスベクターが使用される場合、本開示の方法は、LTR配列に基づき好適なパッケージング細胞とベクターによりプロセッシングされるパッケージングシグナル配列を選択すること、およびパッケージング細胞を用いてレトロウイルス粒子を作製することによって行うことができる。パッケージング細胞の例には、PG13（ATCC CRL-10686）、PA317（ATCC CRL-9078）、GP+E-86およびGP+envAm-12（米国特許第5,278,056号）、およびPsi-Crip [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 85, pp. 6460-6464 (1988)]が含まれる。レトロウイルス粒子はまた、293細胞または高トランスフェクション効率を有する293T細胞を用いて作製することもできる。レトロウイルスおよびレトロウイルスベクターのパッケージングに使用可能なパッケージング細胞に基づいて生産された多くの種類のウイルスベクターが、多くの会社から広く市販されている。

30

【0162】

40

1つの側面は、本明細書に記載の核酸またはベクターで細胞をトランスフェクトまたは形質導入することを含んでなる、本明細書に開示される細胞の作製方法である。

【0163】

別の側面は、

- a) 哺乳動物から免疫細胞を単離すること；
 - b) 単離された免疫細胞、場合により、単離されたT細胞を、本明細書に開示されるCARをコードする核酸でトランスフェクトまたは形質導入すること；および
 - c) 場合により、CAR発現細胞、場合により、CAR発現T細胞を単離し、および/または拡大培養すること
- を含んでなる、本明細書に開示される細胞の作製方法である。

50

【 0 1 6 4 】

1つの実施形態では、単離される免疫細胞は、単離されるT細胞である。

【 0 1 6 5 】

ある実施形態では、単離される細胞はCD3+であり、場合により、形質導入またはトランスフェクション前に、場合により、可溶型または膜結合型の抗CD3抗体、例えば、OKT3またはmOKT3、および/またはAPCで刺激される。1つの実施形態では、APCは人工APC(aAPC)である。別の実施形態では、APCは、膜型の抗CD3モノクローナル抗体を発現する。

【 0 1 6 6 】

1つの実施形態では、トランスフェクションまたは形質導入工程が繰り返される。例えば、トランスフェクションまたは形質導入工程は、2回、または3回、または4回、または例えば、十分な発現レベルが達成されるまで行うことができる。例えば、トランスフェクションまたは形質導入工程は、5回行うことができる。

10

【 0 1 6 7 】

1つの実施形態では、細胞は、連続2日以上トランスフェクトまたは形質導入する。例えば、細胞は、連続2日、連続3日、または連続4日トランスフェクトまたは形質導入する。

【 0 1 6 8 】

1つの実施形態では、CAR形質導入細胞を、所定の抗原を発現する照射細胞で刺激する。例えば、CAR形質導入T細胞を照射細胞で、エフェクター：標的比100：1、75：1、50：1、25：1、20：1、15：1、10：1、9：1、8：1、7：1、6：1、5：1、4：1、3：1、2：1、1：1、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：7、1：8、1：9、1：10、1：15、1：20、1：25、1：50または1：100で刺激する。

20

【 0 1 6 9 】

(4) CARを発現する細胞およびその使用

本開示のCARを発現する細胞は、本明細書に記載のCARをコードする核酸が本明細書に記載の生産方法によって導入および発現された細胞である。

【 0 1 7 0 】

本開示の細胞は、CARを介して特定の抗原と結合し、それにより、シグナルが細胞に伝達され、結果として細胞が活性化される。CARを発現する細胞の活性化は、宿主細胞の種類およびCARの細胞内ドメインによって異なり、指標として、例えば、サイトカインの放出、細胞増殖速度の向上、または細胞表面分子の変化などに基づいて確認することができる。例えば、活性化細胞からの細胞傷害性サイトカイン(腫瘍壊死因子、リンホトキシンなどの)放出は、抗原を発現する標的細胞の破壊を引き起こす。加えて、サイトカインの放出または細胞表面分子の変化は、他の免疫細胞、例えば、B細胞、樹状細胞、NK細胞、およびマクロファージを刺激する。

30

【 0 1 7 1 】

28-IL2RB-z(YXXQ) CARにより操作されたT細胞は、第一世代(28-z)および第二世代(28-BB-z)CARsを含んでなるT細胞に比べて、より速い細胞分裂速度およびアポトーシスの低減を通してより優れた増殖を示すことが実証される(図12参照)。加えて、28-IL2RB-z(YXXQ) CARにより操作されたT細胞はまた、反復抗原刺激の後に幹細胞様記憶表現型を維持する(図14)。

40

【 0 1 7 2 】

よって、CARを発現する細胞は、疾患のための治療薬として使用できる。実施例4ならびに図18~20に示されるように、白血病細胞を注射し、かつ、28-IL2RB-z(YXXQ)抗CD19 CARで処置したマウスは、非処置マウスおよび前世代CARで処置したマウスに比べて腫瘍活性の低下ならびに全生存率の増大を示した。

【 0 1 7 3 】

1つの側面では、疾患を治療するための本明細書に記載のCAR、核酸、ベクター、細

50

胞または組成物の使用が提供される。

【0174】

別の側面は、哺乳動物において疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする哺乳動物に有効量の本明細書開示に開示される細胞または組成物を投与することを含んでなる方法である。

【0175】

さらなる側面は、哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、それを必要とする哺乳動物に有効量の本明細書開示に開示される細胞または組成物を投与することを含んでなる方法である。

【0176】

治療薬は、有効成分として、CARを発現する細胞を含んでなり、好適な賦形剤をさらに含んでいてもよい。賦形剤の例には、有効成分として本開示の核酸を含んでなる組成物のための上述の薬学上許容可能な賦形剤、種々の細胞培養培地、および等張性塩化ナトリウムを含む。

【0177】

CARを発現する細胞が投与される疾患は、その疾患がその細胞に感受性を示す限り特に限定されない。1つの実施形態では、疾患は癌である。

【0178】

例えば、癌は、血液癌または固形腫瘍である。例えば、血液癌は、白血病、リンパ腫または骨髄腫である。例えば、固形腫瘍は、乳癌、卵巣癌、膠芽腫、骨肉腫、または髄芽細胞腫である。

【0179】

ある実施形態では、疾患は、炎症性疾患/自己免疫疾患(喘息、湿疹)、肝炎、およびその原因がインフルエンザおよびHIVなどのウイルス、細菌、または真菌である感染性疾患、例えば、結核、MRSA、VRE、および深在性真菌症である。

【0180】

上述の疾患の治療のために低減または除去されることが望まれる細胞によってプロセッシングされる抗原、すなわち、腫瘍抗原、ウイルス抗原、または細菌抗原などと結合する本開示のCARを発現する細胞が、これらの疾患の治療のために投与される。

【0181】

よって、1つの側面は、対象において所定の抗原を発現する細胞の数を減らす方法であって、それを必要とする対象に有効量の本明細書に記載のCAR発現細胞を投与することを含んでなる方法を含み、ここで、CARは所定の抗原と特異的に結合する。

【0182】

本開示の細胞はまた、再発性白血病の寛解などを目的とした、骨髄移植または放射線暴露、ドナーリンパ球輸血後の感染性疾患の予防のために使用できる。

【0183】

CAR発現細胞を有効成分として含んでなる治療薬は、皮内、筋肉内、皮下、腹膜内、鼻腔内、動脈内、静脈内、腫瘍内、または輸入リンパ管に、非経口投与により、例えば、注射または注入により投与することができるが、投与経路は限定されない。

【0184】

1つの実施形態では、対象は、癌を有することが疑われるか、または癌を有する。1つの実施形態では、対象は、炎症性疾患を有することが疑われるか、または炎症性疾患を有する。

【0185】

さらに、特定の節に記載される定義および実施形態は、当業者に理解されるように、それらが好適であると記載される本明細書の他の実施形態にも当てはまることが意図される。例えば、以下の下りでは、本発明の種々の側面がより詳しく定義される。このように定義される各側面は、そうではないことが明示されない限り、他のいずれの1または複数の側面と組み合わせてもよい。特に、好ましいまたは有利であるとして示されるいずれの特

10

20

30

40

50

徴も、好ましいまたは有利であるとして示される他のいずれの 1 または複数の特徴と組み合わせてもよい。

【0186】

上記の開示は本出願を全般的に説明する。より完全な理解は、以下の具体例を参照することにより得ることができる。これらの例は単に例示のために記載され、本出願の範囲を限定するものではない。状況が好都合であることを示唆または呈示すれば、形態の変化および等価物の置換も企図される。本明細書では特定の用語が使用されているが、このような用語は記述の意味を意図し、限定を目的とするものではない。

【実施例】

【0187】

以下の限定されない例で本開示を説明する。

【0188】

実施例 1

抗 CD19 キメラ抗原受容体 (CAR) 構築物

図 1 に示されるように、FMC63 由来一本鎖可変フラグメント (scFv) (Nicholson et al., 1997) が、CD28 および CD3 鎖 (28-z、第二世代)、CD28、4-1BB および CD3 鎖 (28-BB-z、第 3 世代)、または CD28、内部欠失を伴う IL-2 受容体 鎖の細胞質ドメイン、および STAT3 結合のために外因性 YXXQ モチーフ (配列番号 13) が導入された CD3 鎖 (28-IL2RB-z (YXXQ)) に連結された。YXXQ (配列番号 13) モチーフは、156 ~ 158 番において CD3 鎖によりコードされている Leu-His-Met 残基を Tyr-Arg-His に置換することによって作製した。FMC63 は、CD19 クラスターに属す IgG2a マウスモノクローナル抗体である。オンコスタチン M をシグナルペプチドとして使用した。部位特異的変異誘発にはギブソンアセンブリ法を用いた。以下のプライマーを使用した: ACGCCCTATCGCCATCAGGCCCTGCT (配列番号 26)、および CTGATGGCGATAGGCGTCTAGGTGT (配列番号 27)。

【0189】

抗 CD19 CAR 構築物による一次 T 細胞の形質導入効率

抗 CD19 CAR 構築物による初代 T 細胞の形質導入効率を決定するために、末梢血 CD3⁺ T 細胞を、膜性型の抗 CD3 mAb (クローン OKT3)、CD80、および CD83 (mOKT3/aAPC) (Butler et al., 2012) を発現する人工抗原提示細胞で刺激し、その後、レトロウイルスを用いて個々の CAR 構築物で形質導入した。形質導入は連続 3 日繰り返した。mOKT3/aAPC での初回刺激から 7 日後に、CAR 形質導入 T 細胞をビオチン標識プロテイン L、次いで、ストレプトアビジン-APC で染色した。染色された T 細胞を図 2 に示されるようにフローサイトメトリーにより分析した。種々の CAR 構築物で形質導入した T 細胞で形質導入効率は同等であった。独立した 4 回の実験の代表的データを示す。

【0190】

抗 CD19-CAR 表面発現

抗 CD19-CAR 表面発現を、初代 T 細胞で発現された CAR 構築物の平均蛍光強度 (MFI) を測定することにより比較した (n = 4) (図 3)。CAR 表面発現は、28-BB-z および 28-IL2RB-z (YXXQ) CAR T 細胞では、28-z CAR T 細胞に比べてやや低かった。統計的有意性は対応のある t 検定を用いて表した。エラーバーは標準偏差を示す。

【0191】

28-IL2RB-z (YXXQ) CAR 形質導入 T 細胞における STAT3 および STAT5 のリン酸化

28-IL2RB-z (YXXQ) CAR 形質導入 T 細胞をサイトカイン不含培地で 1 日間休止させ、K562-CD19 細胞で、エフェクター: 標的 (E:T) 比 2:1 にて刺激した。リン酸化された STAT3 および STAT5 CD8⁺ T 細胞を固定/透

10

20

30

40

50

過処理し、特異的mAbで染色し、図4に示されるように細胞内フローサイトメトリー分析により分析した。28-IL2RB-z(YXXQ)CARで操作されたT細胞は、STAT3およびSTAT5両方のリン酸化に段階的な増加を示した。3回の実験の代表的データを示す。

【0192】

CAR形質導入T細胞におけるJAK-STAT経路活性の比較

CAR形質導入T細胞を図4と同じ条件下、K562細胞またはCD19を安定発現するK562細胞(K562-CD19)で刺激し、リン酸化されたSTAT3およびSTAT5の発現を刺激後18時間に測定した。相対的平均蛍光強度(MFI)を、K562細胞と共培養した28-z CAR形質導入T細胞の平均MFI値($n=4$)で除することにより計算した。図5に示されるように、28-IL2RB-z(YXXQ)CAR⁺T細胞は、K562-CD19細胞と共培養した場合に、STAT3($P<0.01$)およびSTAT5($P<0.05$; 対応のあるt検定)の有意に高いリン酸化を示し、CARがCD19特異的JAK-STAT経路の活性化を誘導したことを示す。

【0193】

実施例2

抗CD19 CAR構築物T細胞の形質導入および拡大培養のプロトコール

末梢CD3⁺T細胞をmOKT3/aAPCで刺激し、レトロウイルスにより個々のCD19 CARで連続3日形質導入した。CAR形質導入T細胞を、IL-2 100 IU/mLおよびIL-15 10 ng/mLの存在下、照射済みのK562-CD19細胞またはK562細胞でE:T比2:1にて、示されている場合に週に1回刺激した(図6参照)。E:T比および形質導入期間の変動が想定され得る。例えば、mOKT3/aAPCで刺激したCD3⁺T細胞は、E:T比10:1で連続3日形質導入することができる。

【0194】

形質導入後のCAR形質導入T細胞の拡大培養

CAR形質導入T細胞の増殖倍率を図7に示す($n=4$)。総てのCAR形質導入T細胞において2週間で100倍を超えるCD8⁺T細胞の拡大増殖が得られた。28-BB-z CAR形質導入T細胞は、形質導入後に、28-z CAR形質導入T細胞に比べて有意に優れた増殖を示し(対応のあるt検定により $P<0.05$)、一方、28-z CAR形質導入T細胞と28-IL2RB-z(YXXQ)CAR形質導入T細胞の間に差は無かった。

【0195】

K562-CD19細胞によるCD19特異的刺激後のCAR形質導入T細胞の拡大培養

CAR形質導入T細胞を、照射済みのK562-CD19細胞を用いて、CD19特異的方法で刺激した。28-IL2RB-z(YXXQ)CARで形質導入したT細胞は、サイトカインの補充にかかわらずCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の両方でより優れた増殖を示した。CAR⁺T細胞の増殖倍率を図8に示す($n=4$; 統計的有意性は対応のあるt検定で評価した)。

【0196】

K562細胞との共培養後のCAR⁺T細胞の拡大培養

CAR形質導入T細胞を照射済みK562細胞(対照)で刺激した。CAR形質導入T細胞の増殖倍率を図9に示す($n=4$)。従前に示されるように、28-BB-zで形質導入されたT細胞は、28-z CAR形質導入T細胞に比べて抗原非依存的増殖を促進した(Milone et al., 2009)(CD8⁺T細胞に対して対応のあるt検定により $P<0.05$)。対照的に、28-IL2RB-z(YXXQ)CAR⁺T細胞は、抗原特異的CD19刺激の不在下で28-z CAR T細胞を超える増殖利益を付与しなかった。

【0197】

K562-CD19細胞による抗原特異的再刺激後のCAR⁺T細胞の拡大培養

CAR形質導入T細胞を、図10に示されるように、毎週、照射済みK562-CD19細胞で2回刺激した。CAR⁺T細胞の増殖倍率を示す(n=4)。28-IL2RB-z(YXXQ)CARで操作されたT細胞は、他のCAR形質導入T細胞に比べて増殖の向上を示した(CD8⁺T細胞に対してP<0.05;対応のあるt検定)。

【0198】

CAR形質導入T細胞における細胞分裂速度

CARで操作されたT細胞を、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)で標識し、K562-CD19細胞で2:1比にて刺激した。刺激3日後の、28-zCAR形質導入T細胞に対するCAR形質導入CD4⁺またはCD8⁺T細胞におけるCFSEの平均MFIを図11に示す(n=4)。各ドナーにおいて28-z

CAR形質導入T細胞におけるCFSEの強度を1とした。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意性は対応のあるt検定で評価した。28-IL2RB-z(YXXQ)CARで形質導入したT細胞は、有意に増強された細胞分裂を示した。

【0199】

実施例3

CAR形質導入T細胞の生存率

CAR形質導入T細胞をK562-CD19細胞で2:1比にて刺激した。死細胞の頻度を刺激3日後にフローサイトメトリーにより評価した(n=4)(図12)。エラーバーは標準偏差を表す。28-IL2RB-z(YXXQ)CAR構築物で形質導入したT細胞は、抗原刺激時にアポトーシスの減少を示した。差の有意性は対応のあるt検定により評価した。図11および12に示されるデータは、CD19刺激時の28-IL2RB-z(YXXQ)CAR⁺T細胞の増殖の優位性が細胞分裂の増加とアポトーシスの減少の両方から生じたことを示す。

【0200】

CAR形質導入T細胞の表面表現型

CAR形質導入T細胞をK562-CD19で2:1比にて刺激した。CD4⁺およびCD8⁺T細胞上の表面CD45RAおよびCD62Lを特異的mAbで染色し、刺激7日後にフローサイトメトリー分析を行った(図13)。4回の独立した実験の代表的データを示す。28-IL2RB-z(YXXQ)CARで形質導入したT細胞は、28-zまたは28-BB-zCAR⁺T細胞に比べてCD45RA⁺CD62L⁺T細胞サブセットを維持していた。

【0201】

幹細胞様メモリーT細胞のマーカー表現型(CD45RA⁺CD62L⁺CD95⁺)を有するCAR⁺T細胞の頻度

CAR形質導入T細胞をK562-CD19で2:1比にて刺激した。CD45RA、CD62L、およびCD95表面発現を刺激7日後に分析した(n=4)(図14)。28-IL2RB-z(YXXQ)CAR形質導入T細胞は、CD45RA⁺CD62L⁺CD95⁺幹細胞様メモリーT細胞サブセットの有意に高い頻度を有した。統計的有意性は対応のあるt検定で評価した。

【0202】

CAR形質導入T細胞におけるCD62L発現の比較

CAR形質導入T細胞におけるCD62L発現を図13および14に関して記載したように分析した。CAR形質導入CD4⁺およびCD8⁺T細胞におけるCD62L発現の相対的MFIは、各MFIを28-zCAR形質導入T細胞の平均MFI値(n=4)で除することにより計算した。28-IL2RB-z(YXXQ)CAR形質導入T細胞は、他のCAR⁺T細胞に比べて有意に高いCD62L発現レベルを示した(対応のあるt検定によりP<0.05)。

【0203】

CAR形質導入T細胞によるIL-2分泌

CAR形質導入T細胞をK562-CD19で1:1比にて刺激した。刺激1週間後、

10

20

30

40

50

T細胞をmO K T 3 / a A P Cで再刺激し、サイトカイン分泌は、特異的m A bによる染色の後に細胞内フローサイトメトリーで測定した。2 8 - I L 2 R B - z (Y X X Q) C A R ⁺ T細胞は、2 8 - zおよび2 8 - B B - z C A R形質導入T細胞に比べてより多いI L - 2を分泌した。有意性是对応のあるt検定により評価した。これらの結果は図1 5に示されるデータと一致し；2 8 - I L 2 R B - z (Y X X Q) C A R ⁺ T細胞は、他のC A R T細胞に比べて、C D 4 5 R A ⁺ C D 6 2 L ⁺ C D 9 5 ⁺ 幹細胞様メモリーT細胞サブセットを優先的に維持した。

【 0 2 0 4 】

C A R形質導入T細胞によるインビトロ標的細胞溶解

C A R形質導入T細胞を、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (C F S E) で標識した照射済み標的細胞 (K 5 6 2 - C D 1 9 およびC D 1 9 ⁺ N a l m - 6細胞) とともにE : T比3 : 1にて6時間共培養した。培養中に残存したC F S E 陽性生細胞のパーセンテージをフローサイトメトリー分析により決定した (n = 3)。親K 5 6 2細胞を対照として使用した。エラーバーは標準偏差を表す。統計的有意性は反復測定A N O V Aで評価した。2 8 - I L 2 R B - z (Y X X Q) C A R形質導入T細胞は、C D 1 9 ⁺細胞に対して、他のC A R形質導入T細胞と同等の溶解活性を示した。

【 0 2 0 5 】

実施例 4

ベクター構築

N F M C 6 3 - 2 8 Z C A Rは、2 8 - z C A Rとも呼ばれ、Kochenderfer et al . (J Immunother. 2009 Sep;32(7):689-702)により最初に構築されたF M C 6 3 - 2 8 Z

C A Rのシグナル配列をオンコスタチンMシグナル配列 (N C B I R e f S e q : N P _ 0 6 5 3 9 1 . 1、配列番号1のアミノ酸番号1 ~ 2 5) で置換することにより作出された抗C D 1 9キメラ抗原受容体である。コドンが最適化されたN F M C 6 3 - 2 8 Z

C A R構築物はG e n e a r t (登録商標)により合成し、p M Xレトロウイルスベクター (Int J Hematol. 1998, 67:351-9)にクローニングした。N F M C 6 3 - 2 8 Z C

A Rのアミノ酸配列は配列番号1に示される。N F M C 6 3 - 2 8 - d 2 R b Z C A Rは、N F M C 6 3 - 2 8 Z C A RのC D 2 8ドメインとC D 3 ドメインの間に、b o x - 1モチーフおよび隣接チロシン残基 - 5 1 0を含むヒトI L - 2受容体 鎖の細胞質

ドメインの末端切断フラグメント (例えば、N C B I R e f S e q : N P _ 0 0 0 8 6 9 . 1のアミノ酸番号2 6 6 ~ 3 3 7および5 3 0 ~ 5 5 1、配列番号5)を有するキメラ抗原受容体である。N F M C 6 3 - 2 8 - d 2 R b Z C A Rのアミノ酸配列を配列番号2に示す。N F M C 6 3 - 2 8 - 2 1 R a Z C A Rは、N F M C 6 3 - 2 8 Z C A RのC D 2 8ドメインとC D 3 ドメインの間に、ヒトI L - 2 1受容体 鎖の全長細胞

質ドメイン (N C B I R e f S e q : N P _ 0 6 8 5 7 0 . 1のアミノ酸番号2 5 6 ~ 5 3 8、配列番号6)を有するキメラ抗原受容体である。N F M C 6 3 - 2 8 - 2 1 R a Z C A Rのアミノ酸配列を配列番号3に示す。N F M C 6 3 - 2 8 Z - 2 1 R a C A Rは、N F M C 6 3 - 2 8 Z C A RのN末端とともにヒトI L - 2 1受容体 鎖の全長細胞

質ドメインを有するキメラ抗原受容体である。N F M C 6 3 - 2 8 Z - 2 1 R a C A Rのアミノ酸配列を配列番号4に示す。C A Rの構造を図2 1に示す。F M C 6 3 - 2

8 - d 2 R b Z C A R、N F M C 6 3 - 2 8 - 2 1 R a Z C A RおよびN F M C 6 3 - 2 8 Z - 2 1 R a C A Rをコードする核酸を、各細胞質ドメインをコードするDNA

をp M Xレトロウイルスベクター中のN F M C 6 3 - 2 8 Z C A R構築物に挿入することにより構築した。

【 0 2 0 6 】

エコトロピックレトロウイルスベクターは、p h o e n i x - e c o細胞株にT r a n s I T 2 9 3 (M i r u s B i o)を有するC A R構築物レトロウイルスプラスミドを一時的にトランスフェクトすることにより得、その後、P G 1 3細胞株を、形質導入p h o e n i x - e c o細胞株から得られたエコトロピックレトロウイルスベクターで形質導入した。G a L V偽型レトロウイルスベクターは、形質導入P G 1 3細胞株のバルクから

【 0 2 0 6 】

エコトロピックレトロウイルスベクターは、p h o e n i x - e c o細胞株にT r a n s I T 2 9 3 (M i r u s B i o)を有するC A R構築物レトロウイルスプラスミドを一時的にトランスフェクトすることにより得、その後、P G 1 3細胞株を、形質導入p h o e n i x - e c o細胞株から得られたエコトロピックレトロウイルスベクターで形質導入した。G a L V偽型レトロウイルスベクターは、形質導入P G 1 3細胞株のバルクから

10

20

30

40

50

得、Jurkat細胞への遺伝子導入のために使用した。

【0207】

細胞

PG13細胞株およびphoenix-eco細胞株を10%ウシ胎児血清(FCS)および50 µg/mLゲンタマイシン(Gibco)を添加したDMEM培地で培養した。

【0208】

K562細胞またはヒトCD80およびCD83発現構築物で形質導入したK562細胞をさらにヒトCD19発現構築物で形質導入し、人工抗原提示細胞(aAPC細胞、Clin Cancer Res., 2007, 13:1857-67, Immunol Rev., 2014, 257:191-209)として使用した。K562とK562由来細胞およびJurkatとJurkat由来細胞を、10%FCSおよび50 µg/mLゲンタマイシンを添加したRPMI 1640培地で培養した。

【0209】

CAR構築物移入および細胞選別

細胞を、RetroNectin結合ウイルス感染法(J Biochem. 2001 Sep;130(3):331-4)を用いて形質導入した。この方法では、レトロウイルス溶液をRetroNectin(登録商標、タカラバイオ)コーティングプレートに予め付与し、32、2,000gで2時間遠心分離した後、ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水ですすいだ。Jurkat細胞を、ウイルスを予め付与したプレートに適用した。この遺伝子導入を2回行った。

【0210】

CAR構築物の遺伝子導入後、細胞をビオチン-プロテインL(GenScript)および抗ビオチンマイクロビーズ(Miltenyi Biotec)で選別した。選別後、導入CAR構築物の95%を超える陽性および同等レベルの平均蛍光強度が確認された。

【0211】

STATのリン酸化

CAR形質導入Jurkat細胞およびaAPCを計数し、氷上で混合した。4で回転沈降させた後、細胞を37の湯浴でインキュベートした。インキュベーション後、細胞を1.5%パラホルムアルデヒド中で固定し、100%メタノールで透過処理を施した。その後、細胞を以下の抗体で染色した; Phospho-p44/42 MAPキナーゼ(Cell signaling technology、クローンE10)、Phospho-STAT3(pY705)(BD Phosflow、クローン4/P-STAT3)、およびPhospho-STAT5(pY694)(BD Phosflow、クローン47/P-STAT5)。フローサイトメトリーの取得はBD FACS Canto II(BD Biosciences)を用いて行い、分析はFlowJo(TreeStar)を用いて行った。

【0212】

結果を図22に示す。図2の上の図に示されるように、NFM C63-28ZのみがCD3シグナル伝達のマーカーであるMAPキナーゼのリン酸化を示し、一方、NFM C63-28-d2R5は、phospho-MAPキナーゼ陽性画分においてSTAT5のリン酸化を示す。また、図2の下図に示されるように、NFM C63-28-21RaZおよびNFM C63-28Z-21Raの両方が、phospho-MAPキナーゼ陽性画分においてSTAT3のリン酸化を示す。これらの結果は、これらのCARが、抗原刺激時のMAPキナーゼシグナル伝達に加えてそれぞれIL-2およびIL-21シグナル伝達の主要標的であるSTAT5またはSTAT3シグナル伝達を活性化し得ることを示す。

【0213】

実施例5

10

20

30

40

50

マウスにおけるインビボ抗白血病効果

ヒトCD19⁺NALME B白血病細胞を保持する免疫不全NSGマウスを28-IL2RB-z(YXXQ)抗CD19 CARまたは前世代CAR T細胞で処置した。

【0214】

図18に示されるように、CD3⁺ T細胞をレトロウイルスにより28-z、28-BB-z、または28-IL2RB-z(YXXQ)抗CD19 CARのいずれかで形質導入し、CD19形質導入K562細胞で刺激した。免疫不全NSGマウスに、EGFP-ルシフェラーゼ(NALM6-GL)を発現するCD19陽性急性リンパ芽球性白血病細胞株NALM-6を静脈内注射し、次いで、その後、腫瘍注射から14日後にそれらにCAR形質導入T細胞を注射した。

10

【0215】

抗CD19 CAR形質導入T細胞の注入後、非処置群および28-z抗CD19 CAR群では0、7、28日目の、ならびに28-BB-zおよび28-IL2RB-z(YXXQ)抗CD19 CAR群では0、7、28、42および63日目のルシフェラーゼ活性のインビボ生物発光イメージングを図19に示す。28-IL2RB-z(YXXQ)抗CD19 CARで処置したマウスは、他の群に比べてより大きな腫瘍活性低下を示す。

【0216】

抗CD19 CAR形質導入T細胞で処置したマウス(各n=5)の全生存率のカプラン-マイヤー曲線は、28-IL2RB-z(YXXQ)抗CD19 CAR処置マウスが、非処置群ならびに前世代28-zおよび28-BB-z抗CD19 CARに比べて良好な全生存率を有したことを示す。

20

【0217】

本出願はその時点で好ましい例であると考えられるものに関して記載されているが、本出願は開示されている例に限定されないと理解されるべきである。これに対して、本出願は添付の特許請求の範囲の趣旨および範囲内に含まれる種々の改変および等価の配置を包含することが意図される。

【0218】

総ての刊行物、特許および特許出願は、各個の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個々に引用することによりその全内容が本明細書の一部とされることが示される場合と同程度に、引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる。具体的には、例えば、表または他所に示される受託番号および/またはバイオマーカー配列(例えば、タンパク質および/または核酸)を含む、本明細書に示される各受託番号を伴う配列は、引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる。

30

【0219】配列の表

配列番号1: NFM C 6 3 - 2 8 Z

【化 1】

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
KHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFP
 GPSKPFWWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQP
 YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

10

1 - 2 5 : シグナルペプチド
2 6 - 2 7 0 : F M C 6 3 S C F V
 2 7 4 - 3 1 2 : C D 2 8 部分的細胞外ドメイン
 3 1 3 - 3 3 9 : C D 2 8 膜貫通ドメイン
 3 4 0 - 3 8 0 : C D 2 8 細胞質ドメイン
3 8 1 - 4 9 2 : C D 3 の細胞内ドメイン

20

【 0 2 2 0 】

配列番号 2 : N F M C 6 3 - 2 8 - d 2 R b Z

【化 2】

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
 GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
 SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
 KHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFP
 GPSKPFWWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQP
 YAPPRDFAAYRSIDGGGGSGGGGSGGGGSGNCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFS QLSSE
HGGDVQKW LSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQGQDPT
HLVKLGSGSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
 RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
 LPPR

30

40

1 - 2 5 : シグナルペプチド
 2 6 - 2 7 0 : F M C 6 3 S C F V
 2 7 4 - 3 1 2 : C D 2 8 部分的細胞外ドメイン
 3 1 3 - 3 3 9 : C D 2 8 膜貫通ドメイン
 3 4 0 - 3 8 0 : C D 2 8 細胞質ドメイン

50

3 9 8 - 4 9 1 : I L - 2 受容体 部分的細胞質ドメイン

4 9 9 - 6 1 0 : C D 3 の細胞内ドメイン

【 0 2 2 1 】

配列番号 3 : N F M C 6 3 - 2 8 - 2 1 R a Z

【 化 3 】

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
 GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
 SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
 KHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSAAAEVMPYPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLP
 GPSKPFWWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP
 YAPPRDFAAYRSKTHPLWRLWKKIWAVPSPERFFMPPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGSSLEL
 GPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPALVESDGVKPSFWPTAQNSGGSAY
 SEERDRPYGLVSIDTVTLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTT
 VLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLA
 GLDMDTFDSGFVSGDCSSPVECDFTSPGDEGPFRSYLRQWVIPPPLSSPGPQASKLGGS
 GPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
 GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

1 - 2 5 : シグナルペプチド

2 6 - 2 7 0 : F M C 6 3 S C F V

2 7 4 - 3 1 2 : C D 2 8 部分的細胞外ドメイン

3 1 3 - 3 3 9 : C D 2 8 膜貫通ドメイン

3 4 0 - 3 8 0 : C D 2 8 細胞質ドメイン

3 8 1 - 6 6 3 : I L - 2 1 受容体 全長細胞質ドメイン

6 7 1 - 7 8 2 : C D 3 の細胞内ドメイン

【 0 2 2 2 】

配列番号 4 : N F M C 6 3 - 2 8 Z - 2 1 R a

30

【化4】

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQ
 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
 GGTKEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
 SWIRQPPRKLEWLGVWGSSETTYYNLSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
 KHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLP
 GPSKPFWWLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP
 YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPRGGGGSGGGSGGGSGKTHPLWRLWKKIWAVSPERFFMPLYKGCSDGDFKKWW
 GAPFTGSSLELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPALVESDGVPKPSFW
 PTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSP
 GLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPG
 GVSESEAGSPLAGLMDTFDSDGFVSDCSPVECDFTSPGDEGPPRSYLQWVWVIPPPLS
 SPGPQAS

10

20

1 - 25 : シグナルペプチド

26 - 270 : F M C 6 3 S C F V

274 - 312 : C D 28 部分的細胞外ドメイン

313 - 339 : C D 28 膜貫通ドメイン

340 - 380 : C D 28 細胞質ドメイン

381 - 492 : C D 3 の細胞内ドメイン

508 - 790 : I L - 21 受容体 全長細胞質ドメイン

【0223】

配列番号5 : I L - 2 R 鎖の細胞質ドメインの末端切断フラグメント

【化5】

NCRNTGPWLKKVLKNTDPDSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
 EVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV

【0224】

配列番号6 : ヒト I L - 21 受容体 鎖の細胞質ドメイン

【化6】

KTHPLWRLWKKIWAVSPERFFMPLYKGCSDGDFKKWWGAPFTGSSLELGPWSPEVPSTLE
 VYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPALVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVS
 IDTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSP
 GLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLMDTFDSDGFV
 GSDCSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVWVIPPPLSSPGPQAS

30

40

50

1 1 - 1 9 : B O X 1 モチーフ
 2 6 4 : リン酸化可能チロシン残基
 2 6 5 2 6 7 - チロシン隣接残基
 【 0 2 2 5 】

配列番号 7 : C D 3 の細胞内ドメイン
 【 化 7 】

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL
 YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

【 0 2 2 6 】

配列番号 8 : C D 2 8 の細胞内ドメイン
 【 化 8 】

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

【 0 2 2 7 】

配列番号 9 : C D 2 8 の膜貫通ドメイン
 【 化 9 】

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWW

20

【 0 2 2 8 】

配列番号 1 0 : C D 2 8 の部分的細胞外ドメイン
 【 化 1 0 】

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP

【 0 2 2 9 】

配列番号 1 1

30

N P _ 0 0 0 8 6 9 . 1 , 2 6 6 - 5 5 1 :

【 化 1 1 】

NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
 EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPY
 SEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFSPRDDLFLFSPSLLGGPSPPSTAPGG
 SGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPR
 EGVSFPSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

40

【 0 2 3 0 】

配列番号 1 2 - Y L S L Q

配列番号 1 3 - Y X X Q

配列番号 1 4 - Y L P S N I D

配列番号 1 5 - Y C T F P

配列番号 1 6 - Y F F F H

配列番号 1 7 - Y V T M S

配列番号 1 8 - Y L P Q E

配列番号 1 9 - K L G G S G P

50

配列番号 20 - Y K A F S

配列番号 21 - Y K P F Q

配列番号 22 - Y R H Q

配列番号 23 - Y X P Q

【 0 2 3 1 】

配列番号 24 : C D 3 の細胞内ドメインの 104 - 107 番に S T A T 3 関連モチーフを有する 28 - I L 2 R B - z (Y X X Q)

【 化 1 2 】

MGVLLTQRLLSLVLALLFPSMASMDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ

QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG

GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV

SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLLTIKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA

KHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFP

GPSKPFWWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQP

YAPPRDFAAYRSNCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHG GDVQKWLSSPFPSSSF

SPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQGQDP THLVRVKFSRSADAPAYQQ

GQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI

GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAYXXQALPPR

1 - 25 : シグナルペプチド

26 - 270 : F M C 6 3 S C F V

274 - 312 : C D 28 部分的細胞外ドメイン

313 - 339 : C D 28 膜貫通ドメイン

340 - 380 : C D 28 細胞質ドメイン

381 - 474 : I L - 2 受容体 部分的細胞質ドメイン

475 - 586 : 外因性 S T A T 3 関連モチーフ Y X X Q を含んでなる C D 3 の細胞内ドメイン

【 0 2 3 2 】

配列番号 25 : C D 3 の細胞内ドメインの 104 - 107 番に S T A T 3 関連モチーフ Y R H Q (配列番号 22) を有する 28 - I L 2 R B - z (Y R H Q)

10

20

30

【化 1 3】

MGVLLTQRTLLSLVLALLFSPMASMDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
 GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
 SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
 KHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLF
 GPSKPFWWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP
 YAPPRDFAAYRSNCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSF
SPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLVRVKFSRSADAPAYQQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
 GMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAYRHQALPPR

10

1 - 2 5 : シグナルペプチド

2 6 - 2 7 0 : F M C 6 3 S C F V

20

2 7 4 - 3 1 2 : C D 2 8 部分的細胞外ドメイン

3 1 3 - 3 3 9 : C D 2 8 膜貫通ドメイン

3 4 0 - 3 8 0 : C D 2 8 細胞質ドメイン

3 8 1 - 4 7 4 : I L - 2 受容体 部分的細胞質ドメイン4 7 5 - 5 8 6 : 外因性 S T A T 3 関連モチーフ Y R H Q を含んでなる C D 3 の細胞内
ドメイン

【 0 2 3 3 】

配列番号 2 6 - A C G C C T A T C G C C A T C A G G C C C T G C

配列番号 2 7 - C T G A T G G C G A T A G G C G T C G T A G G T G T

配列番号 2 8 - Y F F F

30

配列番号 2 9 - Y C T F

配列番号 3 0 - Y L R Q

配列番号 3 1 - Y F K Q

配列番号 3 2 - Y L P Q

配列番号 3 3 - Y M P Q

配列番号 3 4 - Y V L Q

配列番号 3 5 - Y Q P Q

配列番号 3 6 - Y K P Q

配列番号 3 7 - Y R P Q

配列番号 3 8 - Y T H Q

40

配列番号 3 9 - Y L K Q

配列番号 4 0 - Y H N Q

配列番号 4 1 - Y X X L

配列番号 4 2 - I D G G G G S G G G G S G G G G S

配列番号 4 3 - Y L S L

【 0 2 3 4 】

参考文献

Markley JC et al. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood*, vol. 29, pp. 3508-3519.

Zeng R et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med*, vol. 201, pp. 139-148.

Sadelain M et al *Current Opinion in Immunology*, vol. 21, pp. 215-223 (2009)

10

Finney, H.M. et al *J. Immunology*, vol. 172, pp. 104-113 (2004)

Thimeli M et al. *Nature Biotechnology* Vol 31, pp. 928-935 (2013)

Kisseleva T et al. *Gene* Vol 285, pp. 1-24 (2002)

Cui et al. *Immunity* 35, 795-805, 2011

Siegel et al. *Immunity* 34, 806-818, 2011

Kochenderfer et al. (*J Immunother.* 2009 Sep;32(7):689-702

20

Themeli et al. *Nat Biotechnol.* Vol 31, pp.928-933. (2013)

Nicholson et al. *Mol Immunol.* Vol 34, pp.1157-1165 (1997)

Butler et al. *PLoS One.* Vol 7, e30229. (2012)

Milone et al. *Mol Ther.* Vol 17, pp.1453-1464. (2009)

Love PE, Hayes SM. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(6):a002485.

Irving BA, Chan AC, Weiss A. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med.* 1993;177(4):1093-103.

30

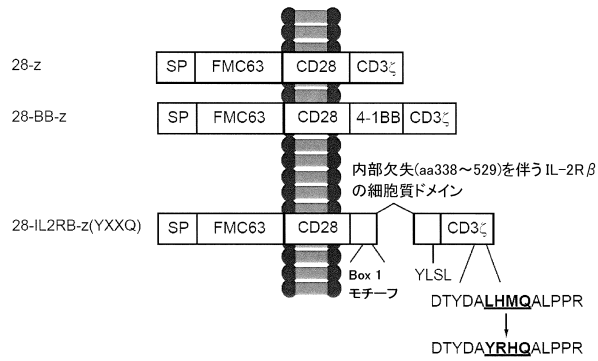
Shores EW, Tran T, Grinberg A, Sommers CL, Shen H, Love PE. Role of the multiple T cell receptor (TCR)-zeta chain signaling motifs in selection of the T cell repertoire. *J Exp Med.* 1997;185(5):893-900.

Shao H, Xu X, Mastrangelo MA, Jing N, Cook RG, Legge GB, Tweardy DJ. Structural requirements for signal transducer and activator of transcription 3 binding to

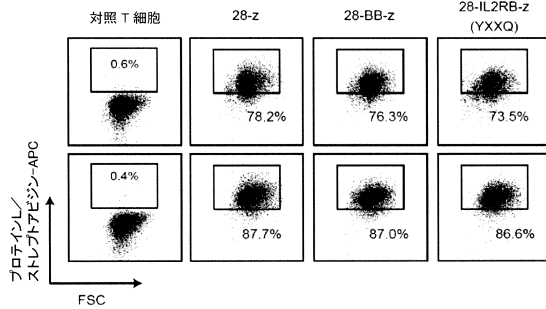
40

- phosphotyrosine ligands containing the YXXQ motif. *J Biol Chem.* 2004;279(18):18967-73.
- Friedmann MC, Migone TS, Russell SM, Leonard WJ. Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(5):2077-82.
- Klingmüller U, Bergelson S, Hsiao JG, Lodish HF. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(16):8324-8. 10
- Klock HE, Koesema EJ, Knuth MW, Lesley SA (2008) Combining the polymerase incomplete primer extension method for cloning and mutagenesis with microscreening to accelerate structural genomics efforts. *Proteins* 71: 982–994.
- Li MZ, Elledge SJ (2007) Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 4: 251–256. 20
- Bryksin AV, Matsumura I (2010) Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* 48: 463–465.
- Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Struct Biol* 172: 34–44.
- Schmitz J. et al. The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction. *J Immunol.* 2000;164:848-54. 30
- Tomida M et al. 1999. Cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor required for STAT3 activation, differentiation, and growth arrest of myeloid leukemic cells. *Blood.* 1999;93:1934-41.

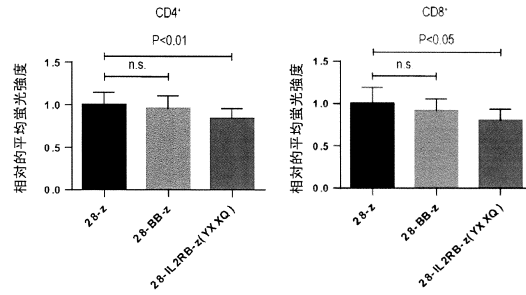
【図 1】



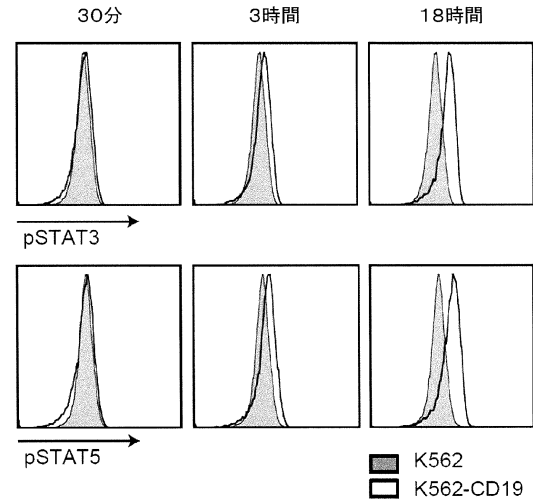
【図 2】



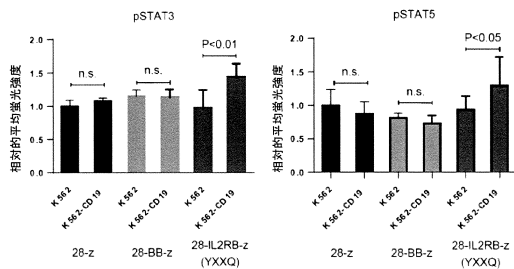
【図 3】



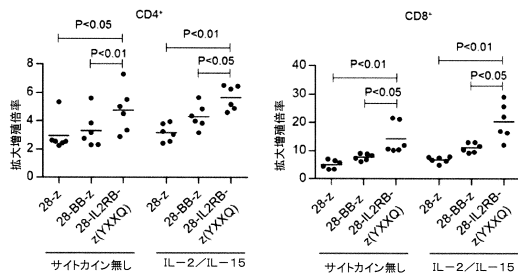
【図 4】



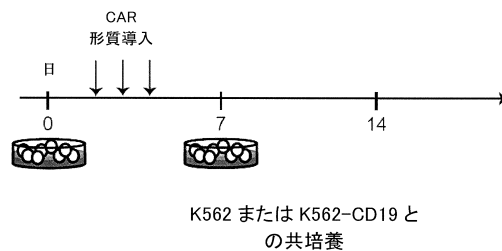
【図 5】



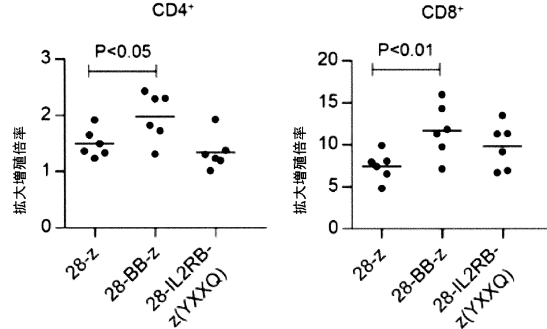
【図 8】



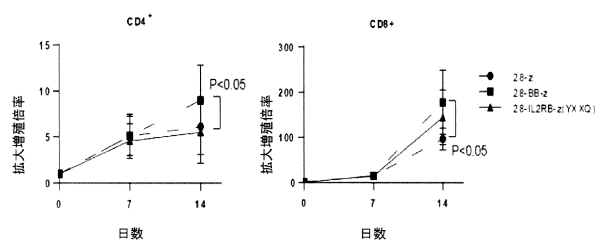
【図 6】



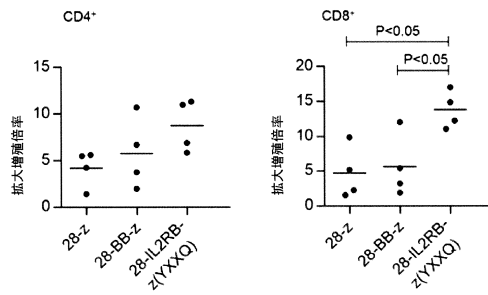
【図 9】



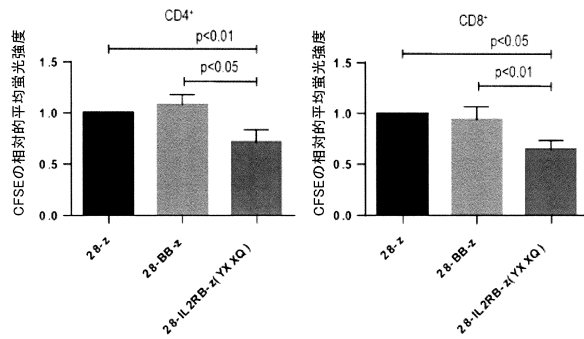
【図 7】



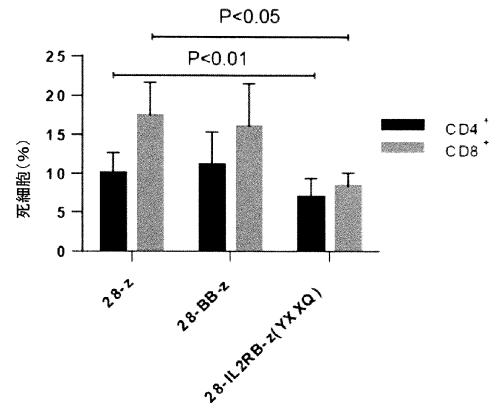
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【図 13】

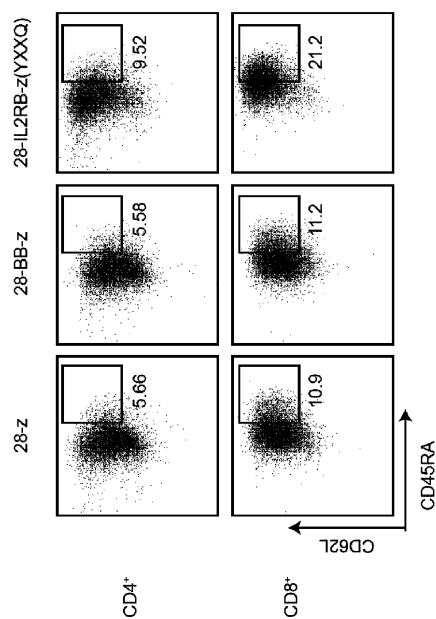
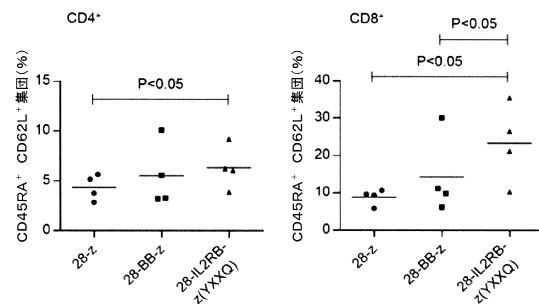
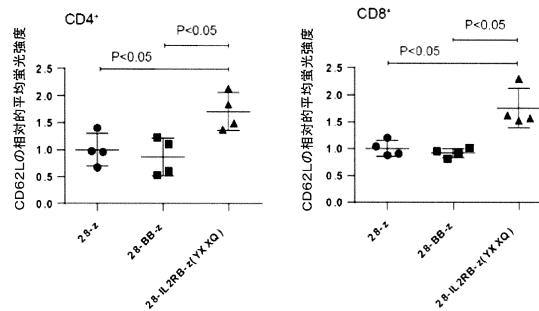


Fig. 13

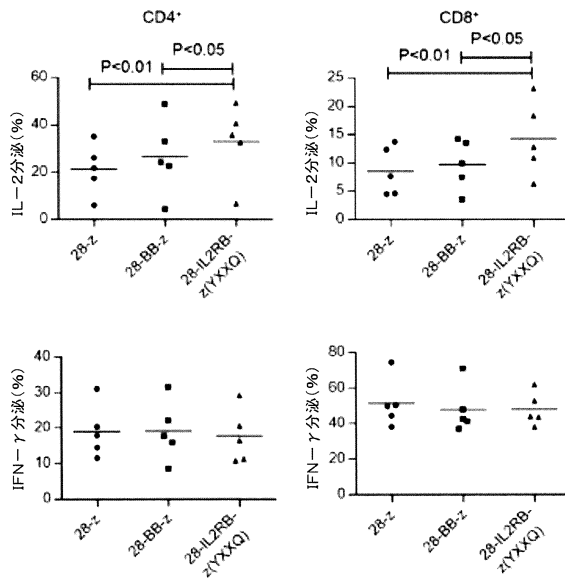
【図 14】



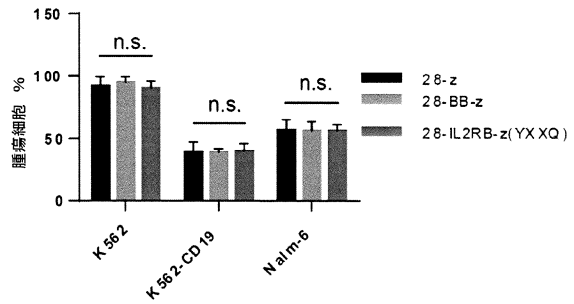
【図 15】



【図 16】

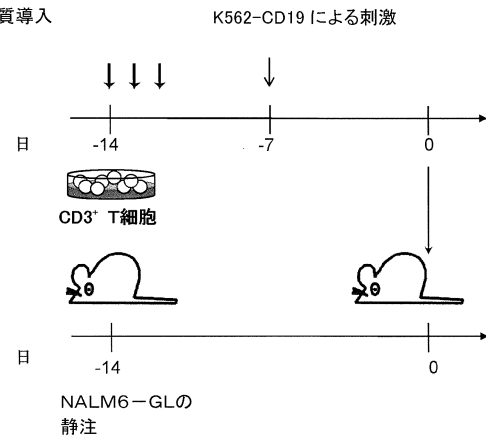


【図 17】

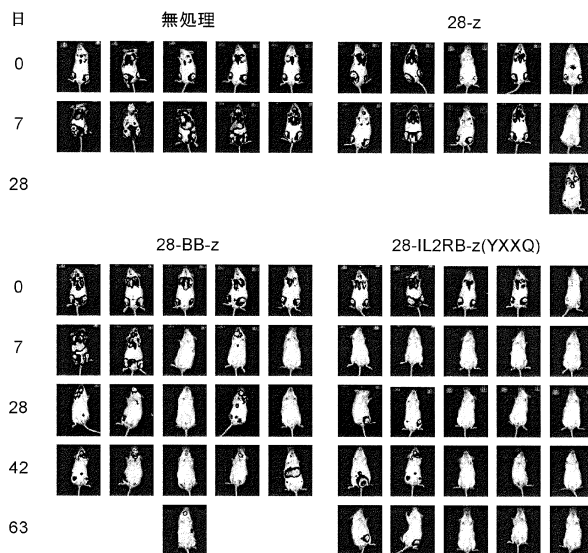


【図 18】

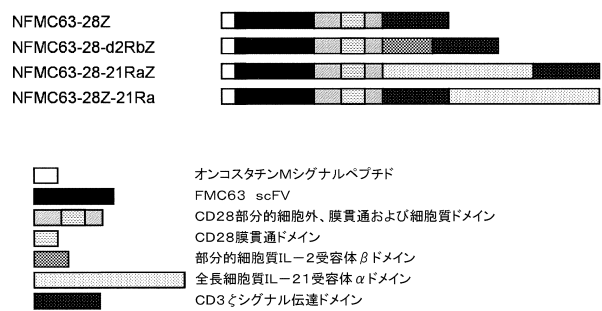
28-z
28-BB-z
28-IL2RB-z(YXXQ)
の形質導入



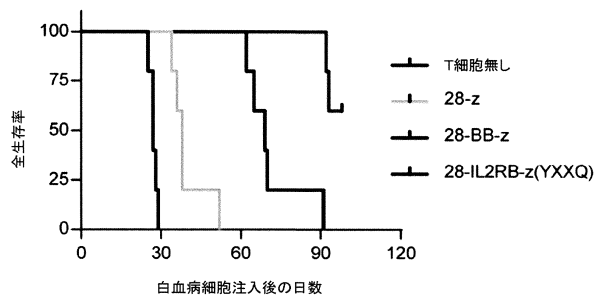
【図 19】



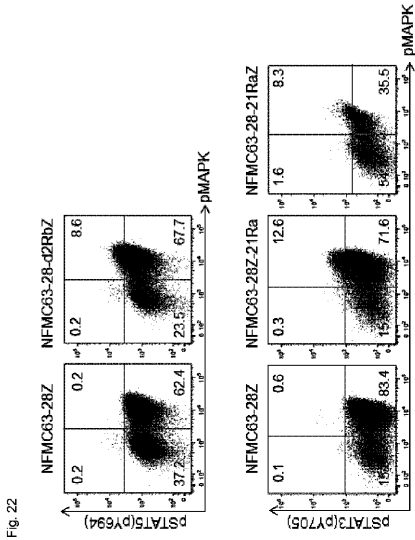
【図 21】



【図 20】



【 図 2 2 】



【 配列表 】

0006846352000001 . app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17 A
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00

(74)代理人 100137497
弁理士 大森 未知子

(74)代理人 100207907
弁理士 赤羽 桃子

(74)代理人 100217294
弁理士 内山 尚和

(72)発明者 田中 真哉
滋賀県大津市瀬田 3 - 4 - 1

(72)発明者 平野 直人
カナダ国オンタリオ州、トロント、プリンス、アーサー、アベニュー、401 - 95

(72)発明者 籠谷 勇紀
カナダ国オンタリオ州、トロント、ウェルスレイ、ストリート、ダブリュ、505 - 24

審査官 林 康子

(56)参考文献 国際公開第2014/186469 (WO, A1)
国際公開第2014/190273 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 / 0 0 ~ 1 9 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
P u b M e d