

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7519906号
(P7519906)

(45)発行日 令和6年7月22日(2024.7.22)

(24)登録日 令和6年7月11日(2024.7.11)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	14/725(2006.01)	C 0 7 K	14/725
		請求項の数 28 (全78頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2020-561076(P2020-561076)	(73)特許権者	500429103
(86)(22)出願日	令和1年5月2日(2019.5.2)		ザ トラストィーズ オブ ザ ユニバーシ
(65)公表番号	特表2021-522790(P2021-522790 A)		ティ オブ ペンシルバニア
(43)公表日	令和3年9月2日(2021.9.2)		アメリカ合衆国ペンシルバニア州1 9 1
(86)国際出願番号	PCT/US2019/030459		0 4 , フィラデルフィア, チェスナッ
(87)国際公開番号	WO2019/213434		ト ストリート 3 8 1 9 , スイート 2
(87)国際公開日	令和1年11月7日(2019.11.7)	(74)代理人	100102978
審査請求日	令和4年5月2日(2022.5.2)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/665,863	(74)代理人	100205707
(32)優先日	平成30年5月2日(2018.5.2)		弁理士 小寺 秀紀
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100160923
前置審査			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ホスホリパーゼ A 2 受容体キメラ自己受容体T細胞の組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ自己抗体受容体 (CAAR) をコードするポリヌクレオチドであって、該CAARが、ホスホリパーゼA2受容体 (PLA2R) 自己抗原またはその自己抗体結合断片を含む細胞外ドメイン、ならびに

(i) 膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメイン、または

(ii) キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR) 膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含み、かつ、

該PLA2R自己抗原またはその自己抗体結合断片が、システインリッチドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記PLA2R自己抗原またはその自己抗体結合断片が、SEQ ID NO: 59のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記膜貫通ドメインが、CD8α鎖膜貫通ドメインを含む、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記CD8 α 鎖膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む、請求項3に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

前記共刺激分子の細胞内ドメインが、4-1BB細胞内ドメインを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

前記4-1BB細胞内ドメインが、SEQ ID NO: 21のアミノ酸配列を含む、請求項5に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

前記シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】

前記CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 23またはSEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を含む、請求項7に記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】

前記CAARが、SEQ ID NO: 36のアミノ酸配列を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】

前記CAARが、前記KIR膜貫通ドメインおよび前記KIR細胞質ドメインを含み、前記KIRがKIRS2またはKIR2DS2である、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項11】

請求項1～10のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項12】

ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその自己抗体結合断片を含む細胞外ドメイン、ならびに

(i) 膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメイン、または

(ii) キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメイン

を含む、キメラ自己抗体受容体（CAAR）であって、

該PLA2R自己抗原またはその自己抗体結合断片が、システインリッチドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、
キメラ自己抗体受容体（CAAR）。

【請求項13】

前記PLA2R自己抗原またはその自己抗体結合断片が、SEQ ID NO: 59のアミノ酸配列を含む、請求項12に記載のCAAR。

【請求項14】

前記膜貫通ドメインが、CD8 α 鎖膜貫通ドメインを含む、請求項12または13に記載のCAAR。

【請求項15】

前記CD8 α 鎖膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む、請求項14に記載のCAAR。

【請求項16】

前記共刺激分子の細胞内ドメインが、4-1BB細胞内ドメインを含む、請求項12～15のいずれか一項に記載のCAAR。

【請求項17】

前記4-1BB細胞内ドメインが、SEQ ID NO: 21のアミノ酸配列を含む、請求項16に記載のCAAR。

【請求項18】

前記シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、請求項12～17の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載のCAAR。

【請求項 19】

前記CD3シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 23またはSEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を含む、請求項18に記載のCAAR。

【請求項 20】

SEQ ID NO:36のアミノ酸配列を含む、請求項12～19のいずれか一項に記載のCAAR。

【請求項 21】

前記KIR膜貫通ドメインおよび前記KIR細胞質ドメインを含み、前記KIRがKIRS2またはKIR2DS2である、請求項12または13に記載のCAAR。

【請求項 22】

請求項12～21のいずれか一項に記載のCAARを含む、遺伝子改変細胞。

【請求項 23】

前記遺伝子改変細胞がT細胞である、請求項22に記載の遺伝子改変細胞。

【請求項 24】

請求項1～10のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、または請求項22もしくは23に記載の遺伝子改変細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、薬学的組成物。

【請求項 25】

治療における使用のための、請求項22または23に記載の遺伝子改変細胞を含む組成物。

【請求項 26】

治療が、それを必要とする対象における自己抗体媒介性腎臓疾患の処置である、請求項25に記載の使用のための組成物。

【請求項 27】

前記自己抗体媒介性腎臓疾患が、糸球体疾患および一次性膜性腎症からなる群より選択される、請求項26に記載の使用のための組成物。

【請求項 28】

前記処置が、対象における糸球体損傷を阻止するかまたは低下させる、請求項26または27に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法（35 U.S.C.）第119条（e）の下で、2018年5月2日に出願された米国特許仮出願第62/665,863号の優先権が与えられ、該出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

膜性腎症（MN）は、成人におけるネフローゼ症候群の最も一般的な主要原因に含まれる（最大で症例の三分の一）。膜性腎症症例の約15～25%は、薬物、感染症、腫瘍、または免疫疾患によって引き起こされた二次性膜性腎症である。膜性腎症症例の残りの75～85%は、突発性であり、一次性膜性腎症とも呼ばれる。MNは、糸球体における免疫複合体形成によって引き起こされる。免疫複合体は、ボドサイト上の抗原に対する抗体の結合によって形成される。免疫複合体は、糸球体上皮細胞の補体媒介性溶解、ならびに毛細血管壁を損傷するプロテアーゼおよび酸化体の放出の誘因となるアクチベーターとして働く。免疫抑制処置を受けていない一次性膜性腎症を有する患者の最大で40%は、透析または腎臓移植を必要とする末期腎疾患を発症する。

【0003】

M型ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）は、一次性膜性腎症における主要自己抗原として記述されている。PLA2Rに対する自己抗体は、一次性膜性腎症の症例の70～80%に存在し、本来の腎臓においておよび腎臓移植後の両方で、一次性膜性腎症の診断および処置

10

20

30

40

50

のモニタリングのために用いることができる。

【0004】

現在のガイドラインは、重篤な一次性膜性腎症の処置のための第一選択治療として、アルキル化剤またはカルシニューリン阻害剤での処置を示唆している。抗CD20抗体であるリツキシマブもまた、有望さを示しており、MNの処置について評定されている。しかし、これらの処置は、血清抗PLA2R抗体を産生する自己反応性B細胞に対する特異性が欠けているため、命を脅かす感染症のリスクに関連しうる。さらに、タンパク尿の寛解を達成した患者において再燃が起こる場合があり、疾患は、腎臓移植後に再発する場合がある。重要なことに、再燃は通常、検出可能な抗PLA2R自己抗体の再発に関連しており、したがって、疾患の病因におけるこの抗体の役割をさらに支持する。

10

【0005】

一次性膜性腎症のためのより特異的かつ有効な処置の達成について、当技術分野において緊急の必要がある。本発明は、この必要に対処する。

【発明の概要】

【0006】

1つの局面において、本発明は、キメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドであって、該CAARが、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインを含む、ポリヌクレオチドを含む。

【0007】

別の局面において、本発明は、本明細書に開示されたポリヌクレオチドのいずれか1つを含むベクターを含む。

20

【0008】

さらに別の局面において、本発明は、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメインを含む、キメラ自己抗体受容体（CAAR）を含む。

【0009】

また別の局面において、本発明は、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインを含む、キメラ自己抗体受容体（CAAR）を含む。

30

【0010】

本発明の別の局面は、本明細書に開示されたCAARのいずれか1つを含む、遺伝子改変細胞を含む。

【0011】

本発明のさらに別の局面は、（a）ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含む、キメラ自己抗体受容体（CAAR）と；（b）DAP12とを含む、遺伝子改変細胞を含む。

【0012】

本発明のまた別の局面は、本明細書に開示されたポリヌクレオチドのいずれか1つ、本明細書に開示されたCAARのいずれか1つ、または本明細書に開示された細胞のいずれか1つと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、薬学的組成物を含む。

40

【0013】

別の局面において、本発明は、対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置するための方法を含む。方法は、キメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子改変T細胞の有効量を対象に投与する段階を含み、該ポリヌクレオチドは、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインをコードし、それにより、該対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置する。

【0014】

50

さらに別の局面において、本発明は、自己抗体媒介性腎臓疾患のリスクがあるかまたはそれに罹患している対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させるための方法であって、該方法が、キメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子改変T細胞の有効量を該対象に投与する段階を含み、該ポリヌクレオチドが、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインをコードし、それにより、該対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させる、方法を含む。

【0015】

また別の局面において、本発明は、対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置するための方法を含む。方法は、（a）ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含むキメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドと；（b）DAP12をコードするポリヌクレオチドとを含む遺伝子改変T細胞の有効量を対象に投与する段階を含み、それにより、該対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置する。

【0016】

別の局面において、本発明は、自己抗体媒介性腎臓疾患のリスクがあるかまたはそれに罹患している対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させるための方法を含む。方法は、（a）ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含むキメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドと；（b）DAP12をコードするポリヌクレオチドとを含む遺伝子改変T細胞の有効量を対象に投与する段階を含み、それにより、該対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させる。

【0017】

本明細書に叙述された本発明の上記の局面または任意の他の局面のさまざまな態様において、PLA2R自己抗原またはその断片は、（a）CysRまたはリシンB型レクチンドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン2を含む、細胞外ドメイン；ならびに（b）CysRまたはリシンB型レクチンドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、およびC型レクチンドメイン3を含む、細胞外ドメインからなる群より選択される。

【0018】

ある態様において、PLA2R自己抗原またはその断片は、（a）システインリッチドメインを含む、細胞外ドメイン、（b）システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、およびC型レクチンドメイン1を含む、細胞外ドメイン、（c）システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、およびC型レクチンドメイン3を含む、細胞外ドメイン、（d）システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、C型レクチンドメイン3、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメイン、（e）システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメイン、または（f）システインリッチドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメインからなる群より選択される。

【0019】

ある態様において、PLA2R細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 8またはSEQ ID NO: 15またはSEQ ID NO: 47またはSEQ ID NO: 60またはSEQ ID NO: 50またはSEQ ID NO: 62またはSEQ ID NO: 52またはSEQ ID NO: 54またはSEQ ID NO: 56またはSEQ ID NO: 58を含む核酸配列によってコードされる。

【0020】

ある態様において、膜貫通ドメインは、CD8 α 鎖膜貫通ドメインを含む。ある態様において、CD8 α 鎖膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 20を含む核酸配列によってコードされる

。ある態様において、CD8 α 鎖膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む。

【0021】

ある態様において、CAARは、ヒンジドメインをさらに含む。ある態様において、ヒンジドメインは、SEQ ID NO: 10またはSEQ ID NO: 42またはSEQ ID NO: 64を含む核酸配列によってコードされる。ある態様において、ヒンジドメインは、配列番号SEQ ID NO: 43またはSEQ ID NO: 44のアミノ酸配列を含む。

【0022】

ある態様において、CAARは、GSリンカーをさらに含む。ある態様において、GSリンカーは、SEQ ID NO: 68を含む核酸配列によってコードされる。ある態様において、GSリンカーは、SEQ ID NO: 69を含む。

【0023】

ある態様において、共刺激分子の細胞内ドメインは、4-1BBを含む。ある態様において、4-1BB細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 22またはSEQ ID NO: 66を含む核酸配列によってコードされる。ある態様において、4-1BB細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 21のアミノ酸配列を含む。

【0024】

ある態様において、シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、CD3 ζ シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 24またはSEQ ID NO: 72を含む核酸配列によってコードされる。ある態様において、CD3 ζ シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 23またはSEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を含む。

【0025】

ある態様において、CAARは、SEQ ID NO: 11、17、25、27、29、31、33、35、37、および39からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。ある態様において、CAARは、SEQ ID NO: 12、18、26、28、30、32、34、36、38、および40からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0026】

ある態様において、CAARは、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含む。

【0027】

ある態様において、ベクターはレンチウイルスベクターである。ある態様において、ベクターはRNAベクターである。

【0028】

ある態様において、細胞は、CAARを発現し、かつ、B細胞上の自己抗体ベースのBCRに対して高い親和性を有する。ある態様において、細胞は、CAARを発現し、かつ、自己抗体を発現するB細胞の死滅を誘導する。ある態様において、細胞は、CAARを発現し、かつ、健常細胞に対する限定された毒性を有する。

【0029】

ある態様において、細胞は、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、調節性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ナチュラルキラー細胞、サイトカイン誘導性キラー細胞、それらの細胞株、Tメモリー幹細胞、多能性幹細胞に由来するT細胞、および他のエフェクター細胞からなる群より選択される。

【0030】

ある態様において、自己抗体媒介性腎臓疾患は、糸球体疾患および一次性膜性腎症からなる群より選択される。

【0031】

ある態様において、対象はヒトである。

【0032】

ある態様において、改変T細胞は、B細胞を標的とする。

【0033】

10

20

30

40

50

ある態様において、KIRは、KIRS2またはKIR2DS2である。

【0034】

ある態様において、ベクターは、CAARをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結した誘導性プロモーターを含む。

【0035】

ある態様において、細胞は、誘導性プロモーターに機能的に連結した、CAARをコードするポリヌクレオチドを含む。

[本発明1001]

キメラ自己抗体受容体 (CAAR) をコードするポリヌクレオチドであって、該CAARが、ホスホリパーゼA2受容体 (PLA2R) 自己抗原またはその断片、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインを含む、前記ポリヌクレオチド。

10

[本発明1002]

前記PLA2R自己抗原またはその断片が、

(a) CysRまたはリシンB型レクチンドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン2を含む、細胞外ドメイン；ならびに

(b) CysRまたはリシンB型レクチンドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、およびC型レクチンドメイン3を含む、細胞外ドメイン

からなる群より選択される、本発明1001のポリヌクレオチド。

20

[本発明1003]

PLA2R細胞外ドメイン (a) が、SEQ ID NO: 8を含む核酸配列によってコードされる、または

PLA2R細胞外ドメイン (b) が、SEQ ID NO: 15を含む核酸配列によってコードされる、本発明1002のポリヌクレオチド。

[本発明1004]

前記PLA2R自己抗原またはその断片が、

(a) シス테인リッチドメインを含む、細胞外ドメイン、

(b) シス테인リッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、およびC型レクチンドメイン1を含む、細胞外ドメイン、

30

(c) シス테인リッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、およびC型レクチンドメイン3を含む、細胞外ドメイン、

(d) シス테인リッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、C型レクチンドメイン3、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメイン、

(e) シス테인リッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメイン、ならびに

(f) シス테인リッチドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメイン

からなる群より選択される、本発明1001のポリヌクレオチド。

40

[本発明1005]

PLA2R細胞外ドメイン (a) が、SEQ ID NO: 47もしくはSEQ ID NO: 60を含む核酸配列によってコードされる、

PLA2R細胞外ドメイン (b) が、SEQ ID NO: 50もしくはSEQ ID NO: 62を含む核酸配列によってコードされる、

PLA2R細胞外ドメイン (c) が、SEQ ID NO: 52を含む核酸配列によってコードされる、

PLA2R細胞外ドメイン (d) が、SEQ ID NO: 54を含む核酸配列によってコードされる、

PLA2R細胞外ドメイン (e) が、SEQ ID NO: 56を含む核酸配列によってコードされる、または

PLA2R細胞外ドメイン (f) が、SEQ ID NO: 58を含む核酸配列によってコードされる、

50

本発明1004のポリヌクレオチド。

[本発明1006]

前記膜貫通ドメインが、CD8 α 鎖膜貫通ドメインを含む、本発明1001～1005のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1007]

前記CD8 α 鎖膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 20を含む核酸配列によってコードされる、本発明1006のポリヌクレオチド。

[本発明1008]

前記CD8 α 鎖膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む、本発明1006のポリヌクレオチド。

[本発明1009]

前記CAARが、ヒンジドメインをさらに含む、本発明1001～1008のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1010]

前記ヒンジドメインが、SEQ ID NO: 10またはSEQ ID NO: 42またはSEQ ID NO: 64を含む核酸配列によってコードされる、本発明1009のポリヌクレオチド。

[本発明1011]

前記ヒンジドメインが、配列番号SEQ ID NO: 43またはSEQ ID NO: 44のアミノ酸配列を含む、本発明1009のポリヌクレオチド。

[本発明1012]

前記CAARが、GSリンカーをさらに含む、本発明1001～1008のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1013]

前記GSリンカーが、SEQ ID NO: 68を含む核酸配列によってコードされる、本発明1011のポリヌクレオチド。

[本発明1014]

前記GSリンカーが、SEQ ID NO: 69を含む、本発明1011のポリヌクレオチド。

[本発明1015]

前記共刺激分子の細胞内ドメインが、4-1BBを含む、本発明1001～1014のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1016]

前記4-1BB細胞内ドメインが、SEQ ID NO: 22またはSEQ ID NO: 66を含む核酸配列によってコードされる、本発明1015のポリヌクレオチド。

[本発明1017]

前記4-1BB細胞内ドメインが、SEQ ID NO: 21のアミノ酸配列を含む、本発明1015のポリヌクレオチド。

[本発明1018]

前記シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、本発明1001～1017のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1019]

前記CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 24またはSEQ ID NO: 72を含む核酸配列によってコードされる、本発明1018のポリヌクレオチド。

[本発明1020]

前記CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 23またはSEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を含む、本発明1018のポリヌクレオチド。

[本発明1021]

前記CAARが、SEQ ID NO: 11、17、25、27、29、31、33、35、37、および39からなる群より選択される核酸配列によってコードされる、本発明1001～1020のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1022]

10

20

30

40

50

前記CAARが、SEQ ID NO: 12、18、26、28、30、32、34、36、38、および40からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1001～1020のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1023]

前記CAARが、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含む、本発明1001～1005のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1024]

本発明1001～1023のいずれかのポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[本発明1025]

レンチウイルスベクターである、本発明1024のベクター。

[本発明1026]

RNAベクターである、本発明1024のベクター。

[本発明1027]

ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメインを含む、キメラ自己抗体受容体（CAAR）。

[本発明1028]

ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインを含む、キメラ自己抗体受容体（CAAR）。

[本発明1029]

前記PLA2R自己抗原またはその断片が、

（a）リシンB型レクチンドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン2を含む、細胞外ドメイン；ならびに

（b）リシンB型レクチンドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、およびC型レクチンドメイン3を含む、細胞外ドメインからなる群より選択される、本発明1027または1028のCAAR。

[本発明1030]

PLA2R細胞外ドメイン（a）が、SEQ ID NO: 8を含む核酸配列によってコードされる、または

PLA2R細胞外ドメイン（b）が、SEQ ID NO: 15を含む核酸配列によってコードされる、本発明1029のCAAR。

[本発明1031]

前記PLA2R自己抗原またはその断片が、

（a）システインリッチドメインを含む、細胞外ドメイン、

（b）システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、およびC型レクチンドメイン1を含む、細胞外ドメイン、

（c）システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、C型レクチンドメイン3、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメイン、

（d）システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、C型レクチンドメイン3、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメイン、

（e）システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメイン、ならびに

（f）システインリッチドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、細胞外ドメイン

からなる群より選択される、本発明1027または1028のCAAR。

[本発明1032]

PLA2R細胞外ドメイン（a）が、SEQ ID NO: 49もしくはSEQ ID NO: 61を含む、

10

20

30

40

50

PLA2R細胞外ドメイン (b) が、SEQ ID NO: 51もしくはSEQ ID NO: 63のアミノ酸配列を含む、

PLA2R細胞外ドメイン (c) が、SEQ ID NO: 53のアミノ酸配列を含む、

PLA2R細胞外ドメイン (d) が、SEQ ID NO: 55のアミノ酸配列を含む、または

PLA2R細胞外ドメイン (e) が、SEQ ID NO: 57のアミノ酸配列を含む、または

PLA2R細胞外ドメイン (f) が、SEQ ID NO: 59のアミノ酸配列を含む、

本発明1031のCAAR。

[本発明1033]

前記膜貫通ドメインが、CD8 α 鎖膜貫通ドメインを含む、本発明1028～1032のいずれかのCAAR。

[本発明1034]

前記CD8 α 鎖膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 20を含む核酸配列によってコードされる、本発明1033のCAAR。

[本発明1035]

前記CD8 α 鎖膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む、本発明1033のCAAR。

[本発明1036]

ヒンジドメインをさらに含む、本発明1027～1035のいずれかのCAAR。

[本発明1037]

前記ヒンジドメインが、SEQ ID NO: 10またはSEQ ID NO: 42またはSEQ ID NO: 64を含む核酸配列によってコードされる、本発明1036のCAAR。

[本発明1038]

前記ヒンジドメインが、配列番号SEQ ID NO: 43またはSEQ ID NO: 44のアミノ酸配列を含む、本発明1036のCAAR。

[本発明1039]

GSリンカーをさらに含む、本発明1027～1035のいずれかのCAAR。

[本発明1040]

前記GSリンカーが、SEQ ID NO: 68を含む核酸配列によってコードされる、本発明1039のCAAR。

[本発明1041]

前記GSリンカーが、SEQ ID NO: 69を含む、本発明1039のCAAR。

[本発明1042]

前記共刺激分子の細胞内ドメインが、4-1BBを含む、本発明1028～1041のいずれかのCAAR。

[本発明1043]

前記4-1BB細胞内ドメインが、SEQ ID NO: 22またはSEQ ID NO: 66を含む核酸配列によってコードされる、本発明1042のCAAR。

[本発明1044]

前記4-1BB細胞内ドメインが、SEQ ID NO: 21のアミノ酸配列を含む、本発明1042のCAAR。

[本発明1045]

前記シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、本発明1028～1044のいずれかのCAAR。

[本発明1046]

前記CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 24またはSEQ ID NO: 72を含む核酸配列によってコードされる、本発明1045のCAAR。

[本発明1047]

前記CD3 ζ シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 23またはSEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を含む、本発明1045のCAAR。

[本発明1048]

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 11、17、25、27、29、31、33、35、37、および39からなる群より選択される核酸配列によってコードされる、本発明1028～1047のいずれかのCAAR。

[本発明1049]

SEQ ID NO: 12、18、26、28、30、32、34、36、38、および40からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1028～1047のいずれかのCAAR。

[本発明1050]

ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含む、本発明1027～1032のいずれかのCAAR。

[本発明1051]

本発明1027～1050のいずれかのCAARを含む、遺伝子改変細胞。

[本発明1052]

CAARを発現し、かつ、B細胞上の自己抗体ベースのBCRに対して高い親和性を有する、本発明1051の細胞。

[本発明1053]

CAARを発現し、かつ、自己抗体を発現するB細胞の死滅を誘導する、本発明1051または1052の細胞。

[本発明1054]

CAARを発現し、かつ、健常細胞に対する限定された毒性を有する、本発明1051～1053のいずれかの細胞。

[本発明1055]

ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、調節性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ナチュラルキラー細胞、サイトカイン誘導性キラー細胞、それらの細胞株、Tメモリー幹細胞、多能性幹細胞に由来するT細胞、および他のエフェクター細胞からなる群より選択される、本発明1051～1054のいずれかの細胞。

[本発明1056]

(a) ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含む、キメラ自己抗体受容体（CAAR）と；(b) DAP12とを含む、遺伝子改変細胞。

[本発明1057]

本発明1001～1023のいずれかのポリヌクレオチド、本発明1027～1050のいずれかのCAAR、または本発明1051～1057のいずれかの細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、薬学的組成物。

[本発明1058]

対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置するための方法であって、

該方法が、キメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子改変T細胞の有効量を該対象に投与する段階を含み、

該ポリヌクレオチドが、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインをコードし、

それにより、該対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置する、前記方法。

[本発明1059]

自己抗体媒介性腎臓疾患のリスクがあるかまたはそれに罹患している対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させるための方法であって、

該方法が、キメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子改変T細胞の有効量を該対象に投与する段階を含み、

該ポリヌクレオチドが、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインをコードし、

それにより、該対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させる、前記方法。

10

20

30

40

50

[本発明1060]

前記自己抗体媒介性腎臓疾患が、糸球体疾患および一次性膜性腎症からなる群より選択される、本発明1058～1059のいずれかの方法。

[本発明1061]

前記対象がヒトである、本発明1058～1060のいずれかの方法。

[本発明1062]

前記改変T細胞が、B細胞を標的とする、本発明1058～1061のいずれかの方法。

[本発明1063]

対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置するための方法であって、該方法が、
(a) ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含む、キメラ自己抗体受容体（CAAR）

をコードするポリヌクレオチドと；

(b) DAP12をコードするポリヌクレオチドと

を含む遺伝子改変T細胞の有効量を該対象に投与する段階を含み、それにより、該対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置する、前記方法。

[本発明1064]

自己抗体媒介性腎臓疾患のリスクがあるかまたはそれに罹患している対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させるための方法であって、該方法が、

(a) ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）膜貫通ドメイン、およびKIR細胞質ドメインを含む、キメラ自己抗体受容体（CAAR）

をコードするポリヌクレオチドと；

(b) DAP12をコードするポリヌクレオチドと

を含む遺伝子改変T細胞の有効量を該対象に投与する段階を含み、それにより、該対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させる、前記方法。

[本発明1065]

前記ポリヌクレオチドが、本発明1001～1023のいずれかのポリヌクレオチドである、本発明1058～1064のいずれかの方法。

[本発明1066]

前記遺伝子改変細胞が、本発明1052～1056のいずれかの細胞である、本発明1058～1065のいずれかの方法。

[本発明1067]

前記KIRが、KIRS2またはKIR2DS2である、本発明1023のポリヌクレオチド、本発明1050のCAAR、本発明1056の遺伝子改変細胞、または本発明1063もしくは1064の方法。

[本発明1068]

CAARをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結した誘導性プロモーターを含む、本発明1024～1026のいずれかのベクター。

[本発明1069]

誘導性プロモーターに機能的に連結した、CAARをコードするポリヌクレオチドを含む、本発明1051～1056のいずれかの細胞。

【図面の簡単な説明】

【0036】

本発明の好ましい態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読んだ場合に、より良く理解されるであろう。本発明を実例で説明するために、現時点で好ましい態様を図面において示している。しかし、本発明は、図面中に示されている態様の厳密な配置および手段には限定されないことが理解されるべきである。

【0037】

【図1】天然のPLA2R分子の模式図を示す図解である。N末端システインリッチ（CysR）ドメイン（リシンB型レクチンドメイン）は、患者血清抗体によって認識される免疫優性

10

20

30

40

50

エピトープである。非還元条件において、血清抗体の認識は、最初の3つのC型レクチンドメイン（CTLD）に依存していることが報告されている。システインリッチドメインに加えて、C型レクチンドメイン1および7に対する血清抗体の免疫反応性もまた、報告されている。市販のNovusモノクローナル抗体（mAb）およびポリクローナルSigma抗体は、CTLD2ドメインに結合する。

【図2A】図2A～2Gは、本発明において記載されたさまざまなPLA2R CAAR構築物を示す、一連の模式図である。ここでのおよび全体を通した略語は以下である：ECD：細胞外ドメイン；TMD：膜貫通ドメイン；BBZ：細胞質タンデム41BB（CD137）およびCD3-ζシグナル伝達ドメイン；CysR＝システインリッチドメイン；FNII＝フィブロネクチンII型ドメイン；CTLD＝C型レクチンドメイン。すべての構築物は、CD8膜貫通ドメインおよびBBZ細胞質ドメインを用い、その細胞外組成が以下のように異なっている：図2Aは、構築物4025.C（または構築物C）を図示し、その細胞外ドメインは、PLA2R CysRドメイン、それに続くCD8ヒンジドメインからなる。図2Bは、構築物4026.CF1（または構築物CF1）を図示し、それは、CysR、FNII、およびCTLD1ドメイン、それに続くCD8ヒンジドメインからなる。図2Cは、構築物4027.CF12を図示し、それは、CysR、FNII、CTLD1、およびCTLD2ドメイン、それに続くCD8ヒンジドメインからなる。図2Dは、構築物4028.CF123（または構築物CF123）を図示し、それは、CysR、FNII、CTLD1、CTLD2、およびCTLD3ドメイン、それに続くCD8ヒンジ（4028.CF123）またはGSリンカー（CF123）のいずれかからなる。図2Eは、構築物CF1237を図示し、それは、CysR、FNII、CTLD1、CTLD2、CTLD3、およびCTLD7ドメイン、それに続くGSリンカーからなる。図2Fは、構築物CF17を図示し、それは、CysR、FNII、CTLD1、およびCTLD7ドメイン、それに続くGSリンカーからなる。図2Gは、構築物C17を図示し、それは、CysR、CTLD1、およびCTLD7ドメイン、それに続くGSリンカーからなる。

【図2B】図2Aの説明を参照のこと。

【図2C】図2Aの説明を参照のこと。

【図2D】図2Aの説明を参照のこと。

【図2E】図2Aの説明を参照のこと。

【図2F】図2Aの説明を参照のこと。

【図2G】図2Aの説明を参照のこと。

【図3】図3Aは、4028.CF123 CAARを含むプラスミドマップの一部分を示す図解である。図3Bは、本発明において記載されたCAAR構築物の組成を区別する表である。

【図4】Jurkat NFAT-GFP細胞上のPLA2R CAARのサブセット（4027.CF12および4028.CF123）の表面発現を実証する、一連のフローサイトメトリープロットである。さまざまなPLA2Rレンチウイルス構築物が形質導入されたJurkat NFAT-GFP細胞によるPLA2R CAARの発現（MOI 5:1、48時間）を、PLA2R CTLD2ドメインに特異的な市販のNovusモノクローナル抗体（mAb）を用いて測定した。構築物4027.CF12または4028.CF123を発現するJurkat T細胞は、CAARの検出可能な表面発現を示したが、CTLD2ドメインを含まず、したがって用いたmAbによって検出可能ではない4025.Cを有するJurkat T細胞、または非形質導入Jurkat NFAT-GFP細胞は、CAARの検出可能な表面発現を示さなかった。

【図5】アイソタイプ対照（上、陰性対照）またはPMA＋イオノマイシン（下、陽性対照）を用いて、PLA2R CAAR T細胞活性化についての陰性対照および陽性対照を示す、一連のフローサイトメトリープロットである。

【図6】Jurkat NFAT-GFP細胞（6時間活性化）によるGFP発現として測定した、PLA2R CTLD2ドメインに特異的なプレートに結合したモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体による4027.CF12および4028.CF123 PLA2R CAAR T細胞の活性化を示す、一連のフローサイトメトリープロットである。抗PLA2Rモノクローナル抗体（mAb）またはポリクローナル抗PLA2R抗体（Ab）に対する曝露時に、構築物4025.Cにおいて、この構築物はCTLD2ドメインを含有しないため期待されるように、および非形質導入細胞において、いかなるT細胞活性化の証拠も見られない。モノクローナル抗PLA2R mAbによるPLA2

R CAARの架橋に応答した特異的T細胞活性化が観察されるが、ポリクローナル抗PLA2R Abによるものは観察されない。

【図7】図7A～7Bは、PLA2R MN患者IgGが、形質導入されたJurkat NFAT-GFPおよび初代ヒトT細胞上のPLA2R CAAR発現を検出することを示す、一連のプロットである。フローサイトメトリープロットにより、評価したすべての構築物（4025.C、4026.CF1、4027.CF12、4028.CF123、C、CF1、CF123、CF1237、CF17、C17）について、Jurkat NFAT-GFP細胞（図7A）および初代ヒトT細胞（図7B）上の堅牢なPLA2R CAAR表面発現が実証される。さまざまなPLA2Rレンチウイルス構築物が形質導入されたJurkat NFAT-GFPおよび初代ヒトT細胞によるPLA2R CAARの発現（72時間）が、MN患者IgGおよびその後のAPCコンジュゲート抗ヒトIgGとのインキュベーションによって検出された。

10

【図8】プレートに結合したMN患者IgGが、PLA2R CAARが形質導入されたJurkat-NFAT-GFP細胞を活性化することを示す、一連のプロットである。フローサイトメトリープロットにより、Jurkat NFAT-GFP細胞（6時間活性化）によるGFP発現として測定した、MN患者IgGによるPLA2R CAAR T細胞の活性化が示される。すべての評価したPLA2R CAAR T細胞（4025.C、4026.CF1、4027.CF12、4028.CF123、C、CF1、CF123、CF1237、CF17、C17）は、プレートに結合した抗PLA2R IgGによる架橋後にシグナルを伝達した。

【図9】プレートに結合したMN患者IgGが、PLA2R CAARが形質導入された初代ヒトT細胞からのIFN- γ 分泌を刺激することを示すグラフのセットである。 5×10^4 個の初代ヒトT細胞を、 $10 \mu\text{g/ml}$ のMN患者IgGまたは対照ヒトIgGのいずれかでコーティングされた96ウェルプレートにおいて24時間培養した。次いで、ELISAによるIFN- γ の検出のために、培養上清を採取した。IFN γ 産生は、すべての培養上清において検出可能であって、非形質導入T細胞、または対照（Ctrl）ヒトIgGで刺激されたPLA2R CAAR T細胞と比べて上昇していた。

20

【発明を実施するための形態】

【0038】

詳細な説明

本発明は、抗ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）B細胞受容体（BCR）に特異的なキメラ自己抗体受容体（CAAR）、該CAARを含む組成物、該CAARをコードするポリヌクレオチド、該CAARをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、および該CAARを含む組換えT細胞を含む。本発明はまた、PLA2R-CAARを発現する遺伝子改変細胞、例えば、遺伝子改変T細胞を作製する方法も含み、ここで、発現したCAARは、PLA2R細胞外ドメインを含む。

30

【0039】

本発明はまた、一般に、自己抗原（例えば、PLA2R）のターゲティングに関連する自己抗体媒介性腎臓疾患を処置するための、CAARを発現するように操作された細胞、例えば、T細胞の使用にも関する。1つの態様において、本発明のCAARを発現する細胞、例えば、T細胞は、抗PLA2R BCR発現細胞に特異的に結合して死滅させるが、正常BCR発現細胞には結合せず、死滅させない。

40

【0040】

定義

別に定める場合を除き、本明細書で用いる技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書中に記載されたものと同様または同等な任意の方法および材料を本発明の試験の実地におよび／または本発明の試験のための実地に用いることができるが、本明細書では好ましい材料および方法について説明する。本発明の説明および特許請求を行う上では、以下の専門用語を、その定義方法、定義が提供されている箇所に従って用いる。

【0041】

また、本明細書中で用いる専門用語は、特定の態様を説明することのみを目的とし、限

50

定的であることは意図しないことも理解される必要がある。

【0042】

「1つの(a)」および「1つの(an)」という冠詞は、本明細書において、その冠詞の文法的目的語の1つまたは複数(すなわち、少なくとも1つ)を指して用いられる。一例として、「1つの要素」は、1つの要素または複数の要素を意味する。

【0043】

量、時間的長さなどの測定可能な値に言及する場合に本明細書で用いる「約」は、特定された値からの±20%または±10%、場合によっては±5%、場合によっては±1%、場合によっては±0.1%のばらつきを包含するものとするが、これはそのようなばらつきが、開示された方法を実施する上で妥当なためである。

【0044】

「抗体」という用語は、抗原と結合する免疫グロブリン分子のことを指す。抗体は、天然供給源または組換え供給源に由来する無傷の免疫グロブリンであってもよく、無傷の免疫グロブリンの免疫応答部分であってもよい。抗体は典型的には、免疫グロブリン分子のテトラマーである。本発明における抗体は、例えば、単ドメイン抗体断片(sdAb)、一本鎖抗体(scFv)およびヒト化抗体を含む、連続ポリペプチド鎖の一部として抗体が発現される種々の形態で存在しうる(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。

【0045】

本明細書で用いる「高親和性」という用語は、標的分子に対する結合分子の結合または相互作用または引力における高い特異性のことを指す。例えば、いくつかの態様において、例えば、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、結合分子は、100 nM、50 nM、20 nM、15 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、または1 nMよりも強い標的分子に対する親和性を有しうる。

【0046】

本明細書で用いる「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を誘発する分子と定義される。この免疫応答には、抗体産生、または特異的免疫適格細胞の活性化のいずれかまたは両方が含まれる。当業者は、事実上すべ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の役を果たしうることを理解するであろう。その上、抗原が組換えDNAまたはゲノムDNAに由来してもよい。当業者は、免疫応答を惹起するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、それ故に、本明細書中でその用語が用いられる通りの「抗原」をコードすることを理解するであろう。その上、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列のみによってコードされる必要はないことも理解するであろう。本発明が複数の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を非限定的に含むこと、およびこれらのヌクレオチド配列が所望の免疫応答を惹起するポリペプチドをコードするさまざまな組み合わせで並べられていることは直ちに明らかである。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要が全くないことも理解するであろう。抗原を合成して作製することもでき、または生物試料から得ることもできることは直ちに明らかである。そのような生物試料には、組織試料、腫瘍試料、細胞または生体液が非限定的に含まれる。

【0047】

「自己抗原(autoantigen)」とは、自己抗体の産生などの、自己免疫応答の産生を刺激する内因性抗原を意味する。自己抗原はまた、自己免疫疾患の発症を結果としてもたらしうる細胞媒介性または抗体媒介性の免疫応答の標的である、自己抗原(self-antigen)または正常組織由来の抗原も含む。自己抗原の例には、PLA2Rおよびその断片が非限定的に含まれる。

【0048】

10

20

30

40

50

本明細書で用いる「限定された毒性」という用語は、インビトロまたはインビボのいずれかで、健常細胞、非腫瘍細胞、非罹患細胞、非標的細胞、またはそのような細胞の集団に対する実質的に負の生物学的作用、抗腫瘍作用、または実質的に負の生理的症状の欠如を表す、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞、および／または抗体のことを指す。

【0049】

「自己抗体」とは、自己抗原に特異的である抗体のことを指す。

【0050】

本明細書で用いる「自己免疫疾患」という用語は、自己抗原に対する抗体媒介性自己免疫応答から結果として生じる障害または状態として定義される。自己免疫疾患は、自己抗原 (self-antigen) または自己抗原 (autoantigen) に対して不適切に産生される、かつ／または過剰に産生される自己抗体の産生を結果としてもたらす。

10

【0051】

本明細書で用いる場合、「自己」という用語は、後にその個体中に再導入される、同じ個体に由来する任意の材料のことを指すものとする。

【0052】

「同種」とは、同じ種の異なる動物に由来する任意の材料のことを指す。

【0053】

「異種」とは、異なる種の動物に由来する任意の材料のことを指す。

【0054】

「キメラ自己抗体受容体」または「CAAR」とは、細胞、例えば、T細胞または任意の他のエフェクター細胞型、例えば、細胞媒介性細胞傷害が可能であるエフェクター細胞型上で発現される、操作された受容体のことを指す。CAARは、自己抗体および／またはBCR、例えば、病原性自己抗体および／またはBCRに特異的である抗原またはその断片を含む。CAARは、任意でまた、膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインも含む。

20

【0055】

本明細書で用いる場合、「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に有意に影響することをもそれを有意に変化させることもないアミノ酸改変を指すことを意図している。そのような保存的改変には、アミノ酸の置換、付加、および欠失が含まれる。改変は、当技術分野において公知の標準的な手法、例えば、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介性突然変異誘発によって、本発明の抗体中に導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えられるもののことである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において明確に定められている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、β分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。したがって、例えば、本発明のCAARの細胞外領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基を、類似の側鎖または電荷を有する他のアミノ酸残基によって置き換えることができ、変化したCAARを、本明細書に記載された機能アッセイを用いて、自己抗体に結合する能力について試験することができる。

30

40

【0056】

「共刺激リガンド」には、この用語が本明細書で用いられる場合、T細胞上のコグネイト共刺激分子と特異的に結合し、それにより、例えば、ペプチドが負荷されたMHC分子のTCR／CD3複合体への結合によって与えられる一次シグナルに加えて、増殖、活性化、分化などを非限定的に含むT細胞応答を媒介するシグナルも与えることのできる、抗原提示

50

細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上の分子が含まれる。

【0057】

「共刺激分子」とは、共刺激リガンドに特異的に結合し、それにより、これに限定されるわけではないが増殖などの、T細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上のコグネイト結合パートナーのことを指す。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受容体が非限定的に含まれる。

【0058】

「コードする」とは、所定のヌクレオチド配列（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）または所定のアミノ酸配列のいずれか、およびそれに起因する生物学的特性を有する、生物過程において他のポリマーおよび高分子の合成のためのテンプレートとして働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAなどのポリヌクレオチド中の特定のヌクレオチド配列の固有の特性のことを指す。すなわち、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によって細胞または他の生体系においてタンパク質が産生される場合、そのタンパク質をコードする。mRNA配列と同一であって通常は配列表として提示されるヌクレオチド配列を有するコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のためのテンプレートとして用いられる非コード鎖の両方を、タンパク質、またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードすると称することができる。

【0059】

「有効量」または「治療的有效量」は、本明細書において互換的に用いられ、特定の生物学的結果を達成するのに有効な本明細書に記載の化合物、製剤、材料、または組成物の量のことを指す。そのような結果には、当技術分野で適切な任意の手段によって決定されるウイルス感染の阻止が含まれ得るが、これに限定されない。

【0060】

「エフェクター機能」という用語は、細胞の特化した機能のことを指す。

【0061】

本明細書で用いる場合、「内因性」とは、生物体、細胞、組織もしくは系に由来するか、またはその内部で産生される任意の材料のことを指す。

【0062】

本明細書で用いる場合、「外因性」という用語は、生物体、細胞、組織もしくは系に導入されるか、またはそれらの外部で産生される任意の材料のことを指す。

【0063】

本明細書で用いる「発現」という用語は、プロモーターによって作動する特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳と定義される。

【0064】

「発現ベクター」とは、発現させようとするヌクレオチド配列と機能的に連結し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のことを指す。発現ベクターは、発現のために十分なシス作用エレメントを含む；発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、またはインビトロ発現系において供給されうる。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを組み入れたコスミド、プラスミド（例えば、裸のもの、またはリポソーム中に含まれるもの）、レトロトランスポゾン（例えば、ピギーバック（piggyback）、スリーピングビューティー（sleeping beauty））、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随伴ウイルス）といった、当技術分野において公知であるすべてのものが含まれる。

【0065】

本明細書で用いる「相同な」とは、2つのポリマー分子の間、例えば、2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子などの2つの核酸分子の間、または2つのポリペプチド分子の間の、サブユニット配列同一性のことを指す。2つの分子の両方においてあるサブユニット位置が、同じ単量体サブユニットによって占められている場合；例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおいてある位置がアデニンによって占められているならば、それらはその位置で相同である。2つの配列間の相同性は、一致するかまたは相同な位置の数の直接的な関数

10

20

30

40

50

である；例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、長さが10サブユニットであるポリマーにおける5つの位置）が相同であるならば、2つの配列は50%相同である；位置の90%（例えば、10のうち9）が一致するかまたは相同であるならば、2つの配列は90%相同である。

【0066】

本明細書で用いる「同一性」とは、2つのポリマー分子の間、特に、2つのポリペプチド分子の間などの2つのアミノ酸分子の間の、サブユニット配列同一性のことを指す。2つのアミノ酸配列が、同じ位置で同じ残基を有する場合；例えば、2つのポリペプチド分子のそれぞれにおいてある位置がアルギニンによって占められているならば、それらはその位置で同一である。2つのアミノ酸配列がアラインメントにおいて同じ位置で同じ残基を有する同一性または程度は、しばしばパーセンテージとして表現される。2つのアミノ酸配列間の同一性は、一致するかまたは同一の位置の数の直接的な関数である；例えば、2つの配列における位置の半分（例えば、長さが10アミノ酸であるポリマーにおける5つの位置）が同一であるならば、2つの配列は50%同一である；位置の90%（例えば、10のうち9）が一致するかまたは同一であるならば、2つのアミノ酸配列は90%同一である。

【0067】

本明細書で用いる場合、「説明資料（instructional material）」には、本発明の組成物および方法の有用性を伝えるために用いる、刊行物、記録、略図または他の任意の表現媒体が含まれる。本発明のキットの説明資料は、例えば、本発明の核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物を含む容器に添付してもよく、または核酸、ペプチドおよび／もしくは組成物を含む容器と一緒に出荷してもよい。または、説明資料および化合物がレシピエントによって一体として用いられることを意図して、説明資料を容器と別に出荷してもよい。

【0068】

「細胞内ドメイン」とは、細胞の内部に存在する分子の一部分または領域のことを指す。

【0069】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内ドメインの任意の完全長または短縮部分を含むことを意味する。

【0070】

「単離された」とは、天然の状態から変更されるかまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きた動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離されて」いないが、その天然の状態で共存する物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは、「単離されて」いる。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することもでき、または例えば宿主細胞などの非天然の環境で存在することもできる。

【0071】

本発明に関連して、一般的に存在する核酸塩基に関しては以下の略語を用いる。「A」はアデノシンのことを指し、「C」はシトシンのことを指し、「G」はグアノシンのことを指し、「T」はチミジンのことを指し、「U」はウリジンのことを指す。

【0072】

別に指定する場合を除き、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、相互に縮重型であって、同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチドが含まれる。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という語句には、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が一部の型においてイントロンを含みうる限り、イントロンも含まれうる。

【0073】

本明細書で用いる「レンチウイルス」とは、レトロウイルス科（Retroviridae）ファミリーの属のことを指す。レンチウイルスは、非分裂細胞を感染させうるという点で、レトロウイルスの中でも独特である；それらはかなりの量の遺伝情報を宿主細胞のDNA中に送達することができるため、それらは遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIVおよびFIVはすべて、レンチウイルスの例である。レンチウイルスに由来する

10

20

30

40

50

ベクターは、インビボでかなり高いレベルの遺伝子移入を達成するための手段を与える。

【0074】

「機能的に連結した」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間の、後者の発現を結果的にもたす機能的連結のことを指す。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列との機能的関係の下で配置されている場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と機能的に連結している。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼすならば、プロモーターはコード配列と機能的に連結している。一般に、機能的に連結したDNA配列は連続しており、2つのタンパク質コード領域を接続することが必要な場合には、同一のリーディングフレーム内にある。

【0075】

免疫原性組成物の「非経口的」投与には、例えば、皮下 (s.c.)、静脈内 (i.v.)、筋肉内 (i.m.) または胸骨内の注射法または輸注法が含まれる。

【0076】

本明細書で用いる場合、「形質細胞 (plasma cell)」とは、抗体を産生して分泌することができる白血球の種類のことを指す。形質細胞はまた、プラズマ細胞 (plasmocyte)、プラズマ細胞 (plasmacyte)、またはエフェクターB細胞とも呼ばれる。いくつかの態様において、これらの細胞には、抗原受容体として細胞表面上にμ鎖を発現する、B細胞分化が可能なB細胞前駆体、またはB細胞分化の初期段階のB細胞；転写過程が変化しており、IgM産生が、膜型IgMから分泌型IgMに変化しているB細胞；クラススイッチを完了しており、IgG、IgA、およびIgMを分泌する成熟B細胞；ならびに分化の最終段階のB細胞が含まれる。

【0077】

本明細書で用いる場合、「ホスホリパーゼA2受容体」または「M型ホスホリパーゼA2受容体」(PLA2R)という用語は、互換的に用いられ、一次性膜性腎症(MN)において腎臓糸球体に発現した主要標的抗原のことを指す(Beck et al. 2009 N Engl J Med; 361: 11-21)。抗PLA2R自己抗体は、主としてIgG4サブクラスのものであるが、サブクラスIgG1、IgG2、およびIgG3もまた表される。PLA2Rの遺伝子バリエーションもまた、MNに関連していることが示された(Stanescu et al. 2011 N Engl J Med; 364(7):616-26)。

【0078】

本明細書で用いる場合、PLA2R断片とは、短くなったかまたは短縮されたPLA2Rタンパク質のことを指す。ポリペプチドは、N末端もしくはC末端の短縮、および／または内部の欠失もまた有することができる。断片の例は、PLA2RのC型レクチンドメイン(「CTLD」)を含む断片である。1つの態様において、PLA2R断片は、ヒトPLA2R(UniProtKB, Q13018)のアミノ酸残基21~1397、またはアミノ酸残基21~1397の任意のより短い部分である、PLA2Rの外部ドメインを含む。

【0079】

本明細書で用いる「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの連鎖と定義される。その上、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書で用いる核酸およびポリヌクレオチドは互換的である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、それらはモノマー性「ヌクレオチド」に加水分解されうるという一般知識を有する。モノマー性ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解されうる。本明細書で用いるポリヌクレオチドには、組換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCR(商標)などを用いて組換えライブラリーまたは細胞ゲノムから核酸配列をクローニングすること、および合成手段を非限定的に含む、当技術分野で利用可能な任意の手段によって得られる、すべての核酸配列が非限定的に含まれる。いくつかの態様において、核酸配列は、本明細書に開示されたいずれかの核酸配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性または相同性を有すると見なされる。

【0080】

本明細書で用いる場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という

10

20

30

40

50

用語は互換的に用いられ、ペプチド結合によって共有結合したアミノ酸残基で構成される化合物のことを指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成しうるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって相互に結合した2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書で用いる場合、この用語は、例えば、当技術分野において一般的にはペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短鎖、ならびに当技術分野において一般にタンパク質と称される長鎖の両方のことを指し、それらには多くの種類がある。「ポリペプチド」には、いくつか例を挙げると、例えば、生物学的活性断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドの変異体、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはこれらの組み合わせが含まれる。いくつかの態様において、アミノ酸配列は、本明細書に記載されたいずれかのアミノ酸配列に対して、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性または相同性を有すると見なされる。

【0081】

「炎症誘発性サイトカイン」という用語は、炎症または炎症性応答を促進するサイトカインまたは因子のことを指す。炎症誘発性サイトカインの例には、ケモカイン（CCL、CXCL、CX3CL、XCL）、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、およびIL-15）、インターフェロン（IFN γ ）、ならびに腫瘍壊死因子（TNF α およびTNF β ）が非限定的に含まれる。

【0082】

本明細書で用いる「プロモーター」という用語は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるために必要な、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列と定義される。

【0083】

本明細書で用いる場合、「プロモーター／調節配列」という用語は、プロモーター／調節配列と機能的に連結した遺伝子産物の発現のために必要とされる核酸配列を意味する。ある場合には、この配列はコアプロモーター配列であってよく、また別の場合には、この配列が、遺伝子産物の発現に必要とされるエンハンサー配列および他の制御エレメントをも含んでもよい。プロモーター／制御配列は、例えば、組織特異的な様式で遺伝子産物を発現させるものであってもよい。

【0084】

「構成性」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、細胞のほとんどまたはすべての生理学的条件下で、その遺伝子産物が細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

【0085】

「誘導性」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、実質的にはそのプロモーターに対応する誘導物質が細胞内に存在する場合にのみ、その遺伝子産物が細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

【0086】

「組織特異的」プロモーターとは、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドと機能的に連結された場合に、実質的には細胞がそのプロモーターに対応する組織型の細胞である場合にのみ、その遺伝子産物が細胞内で産生されるようにするヌクレオチド配列のことである。

【0087】

「シグナル伝達経路」とは、細胞の1つの部分から細胞の別の部分へのシグナルの伝送において役割を果たす、種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係のことを指す。「細胞表面受容体」という語句には、シグナルを受け取り、細胞の膜をまたいでシグナルを伝送することができる分子および分子の複合体が含まれる。

【0088】

「シグナル伝達ドメイン」とは、活性化シグナルに応答して、特異的タンパク質を動員し、それと相互作用する、分子の一部分または領域のことを指す。

【0089】

「対象」という用語は、免疫応答を惹起させることができる、生きている生物（例えば、哺乳動物）を含むことを意図している。

【0090】

本明細書で用いる場合、「実質的に精製された」細胞とは、他の細胞型を本質的に含まない細胞のことである。また、実質的に精製された細胞とは、その天然の状態に本来付随する他の細胞型から分離された細胞のことも指す。場合によっては、実質的に精製された細胞の集団とは、均一な細胞集団のことを指す。また別の場合には、この用語は、単に、天然の状態において本来付随する細胞から分離された細胞のことを指す。いくつかの態様において、細胞はインビトロで培養される。他の態様において、細胞はインビトロでは培養されない。

【0091】

本明細書で用いる「治療的」という用語は、治療および／または予防のことを意味する。治療効果は、疾病状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。

【0092】

本明細書で用いる「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞内に移入または導入される過程のことを指す。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞とは、外因性核酸によってトランスフェクトされた、形質転換された、または形質導入されたもののことである。この細胞には初代対象細胞およびその子孫が含まれる。

【0093】

「膜貫通ドメイン」とは、脂質二重膜にまたがる分子の一部分または領域のことを指す。

【0094】

本明細書で用いる「転写制御下」または「機能的に連結した」という語句は、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するために正しい位置および向きにあることを意味する。

【0095】

「ベクター」とは、単離された核酸を含み、かつその単離された核酸を細胞の内部に送達するために用いる組成物のことである。直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と会合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを非限定的に含む数多くのベクターが、当技術分野において公知である。したがって、「ベクター」という用語は、自律複製性プラスミドまたはウイルスを含む。この用語は、例えばポリリジン化合物、リポソームなどのような、細胞内への核酸の移入を容易にする非プラスミド性および非ウイルス性の化合物も含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが非限定的に含まれる。

【0096】

本明細書で用いる「特異的に結合する」という用語は、試料中に存在するコグネイト結合パートナー（例えば、T細胞上に存在する刺激分子および／または共刺激分子）タンパク質を認識してそれと結合するが、試料中の他の分子を実質的に認識しないかまたは結合しない、抗体またはリガンドを意味する。

【0097】

「刺激」という用語は、刺激分子（例えば、TCR／CD3複合体）がそのコグネイトリガンドと結合して、それにより、これに限定されるわけではないがTCR／CD3複合体を介するシグナル伝達などのシグナル伝達イベントを媒介することによって誘導される、一次応答のことを意味する。刺激は、TGF- β のダウンレギュレーション、および／または細胞骨格構造の再構築などのような、ある種の分子の発現の改変を媒介してもよい。

【0098】

「刺激分子」とは、この用語が本明細書で用いられる場合、抗原提示細胞上に存在するコグネイト刺激リガンドに特異的に結合する、T細胞上の分子のことを意味する。

【0099】

「刺激リガンド」とは、本明細書で用いる場合、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上に存在する場合に、T細胞上のコグネイト結合パートナー（本明細書では「刺激分子」と称する）と特異的に結合して、それにより、活性化、免疫応答の開始、増殖などを非限定的に含む、T細胞による一次応答を媒介することのできるリガンドのことを意味する。刺激リガンドは当技術分野において周知であり、とりわけ、ペプチドが負荷されたMHCクラスI分子、抗CD3抗体、スーパーアゴニスト抗CD28抗体およびスーパーアゴニスト抗CD2抗体を包含する。

10

【0100】

範囲：本開示の全体を通じて、本発明のさまざまな局面を、範囲形式で提示することができる。範囲形式による記載は、単に便宜上かつ簡潔さのためであって、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定とみなされるべきではないことが理解される必要がある。したがって、ある範囲の記載は、その範囲内におけるすべての可能な部分的範囲とともに、個々の数値も具体的に開示されていると考慮されるべきである。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などの部分的範囲とともに、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も、具体的に開示されていると考慮されるべきである。これは範囲の幅広さとは関係なく適用される。

20

【0101】

説明キメラ自己抗体受容体（CAAR）

本発明は、活性化および自己抗体分泌後に自己抗体媒介性腎臓疾患を引き起こしうる、自己抗体ベースのB細胞受容体を発現するB細胞を標的とするために、キメラ自己抗体受容体を使用することができるという発見に、一部基づく。本発明は、抗ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）B細胞受容体（BCR）に特異的なキメラ自己抗体受容体（CAAR）、該CAARを含む組成物、該CAARをコードするポリヌクレオチド、該CAARをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、および該CAARを含む組換えT細胞を含む。本発明はまた、PLA2R-CAARを発現する遺伝子改変細胞、例えば、遺伝子改変T細胞を作製する方法も含み、ここで、発現したCAARは、ホスホリパーゼPLA2R細胞外ドメインを含む。

30

【0102】

本発明は、自己抗体媒介性腎臓疾患を処置するための技術を含む。特に、最終的に自己抗体を産生し、その細胞表面上に自己抗体を提示するB細胞を標的とする技術は、これらのB細胞を、治療的介入のための疾患特異的標的として区分する。したがって、本発明は、抗原特異的な（例えば、PLA2R）キメラ自己抗体受容体（すなわちCAAR）を用いて、疾患を引き起こすB細胞を標的とすることによって、自己抗体媒介性腎臓疾患において病源性B細胞を効率的に標的とし、死滅させるための方法を含む。本発明の1つの態様において、特異的な抗PLA2R BCR発現B細胞のみが死滅し、感染症から防護する有益なB細胞および抗体は無傷の状態になる。

40

【0103】

1つの局面において、本発明は、キメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドであって、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインをコードする、ポリヌクレオチドを含む。

【0104】

自己抗原部分

1つの態様において、本発明のCAARは、別の言い方では自己抗原またはその断片と呼ばれる、自己抗体結合ドメインを含む。本発明における使用のための自己抗原の選択は、標的とされる自己抗体またはBCRの種類（例えば、抗PLA2R）に依存する。例えば、自己抗

50

原は、特定の自己抗体媒介性腎臓疾患状態、例えば、糸球体疾患および一次性膜性腎症に関連する、BCR発現B細胞などの標的細胞上のBCRまたは自己抗体を認識するため、選択されてもよい。

【0105】

場合によっては、自己抗体結合ドメインは、CAARが最終的に用いられることになる同じ種に由来することが、有益である。例えば、ヒトにおける使用のためには、CAARの自己抗体結合ドメインが、ヒトBCRまたは自己抗体に結合するヒト自己抗原（またはその断片）を含むことが、有益でありうる。

【0106】

1つの例示的な態様において、遺伝子操作されたキメラ自己抗体受容体は、抗PLA2R BCR、例えば、対象におけるB細胞上の抗PLA2R BCRに結合する、PLA2Rまたはその断片を含む。

【0107】

1つの態様において、CAARは、PLA2Rの細胞外ドメインを含む。

【0108】

いくつかの態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、N末端システインリッチドメイン（リシンB型レクチンドメイン）、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、C型レクチンドメイン3、C型レクチンドメイン7、または前述のいずれかの組み合わせを含む。

【0109】

いくつかの態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 1によってコードされる免疫優性エピトープであるN末端システインリッチ（CysR）ドメイン（リシンB型レクチンドメイン）、SEQ ID NO: 3によってコードされるフィブロネクチンII型ドメイン、SEQ ID NO: 5によってコードされるC型レクチンドメイン1、およびSEQ ID NO: 7によってコードされるC型レクチンドメイン2を含む。このPLA2Rの細胞外ドメインは、本明細書で構築物4027.CF12と命名された構築物の細胞外ドメインであり、SEQ ID NO: 8によってコードされ、ここで、免疫優性エピトープであるN末端システインリッチドメインとフィブロネクチンII型ドメインとの間のリンカーは、SEQ ID NO: 2によってコードされ、フィブロネクチンII型ドメインとC型レクチンドメイン1との間のリンカーは、SEQ ID NO: 4によってコードされ、C型レクチンドメイン1とC型レクチンドメイン2との間のリンカーは、SEQ ID NO: 6によってコードされる。

【0110】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、構築物4027.CF12の細胞外ドメイン、および追加的に、SEQ ID NO: 14によってコードされるC型レクチンドメイン3を含む。この後者のPLA2Rの細胞外ドメインは、本明細書で構築物4028.CF123と命名された構築物の細胞外ドメインであり、SEQ ID NO: 15によってコードされ、ここで、免疫優性エピトープであるN末端システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン2の間のリンカーは、構築物4027.CF12について本明細書で上記に列挙したもの（SEQ ID NO: 2、4、および6）と同じであり、さらに、C型レクチンドメイン2とC型レクチンドメイン3との間のリンカーは、SEQ ID NO: 13によってコードされる。

【0111】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメインを含む、構築物Cと本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、システインリッチドメインは、SEQ ID NO: 49を含み、SEQ ID NO: 47によってコードされてもよい。ある態様において、システインリッチドメインは、SEQ ID NO: 1を含む。

【0112】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、およびC型レクチンドメイン1を含む、構築物CF1と本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、細胞外ドメインは、SEQ ID

10

20

30

40

50

NO: 51を含み、SEQ ID NO: 50によってコードされてもよい。

【0113】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、およびC型レクチンドメイン3を含む、構築物CF123と本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 53を含み、SEQ ID NO: 52によってコードされてもよい。

【0114】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、C型レクチンドメイン3、およびC型レクチンドメイン7を含む、構築物CF1237と本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 55を含み、SEQ ID NO: 54によってコードされてもよい。

【0115】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、構築物CF17と本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 57を含み、SEQ ID NO: 56によってコードされてもよい。

【0116】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン7を含む、構築物C17と本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 59を含み、SEQ ID NO: 58によってコードされてもよい。

【0117】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメインを含む、構築物4025.Cと本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 61を含み、SEQ ID NO: 60によってコードされてもよい。

【0118】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1を含む、構築物4026.CF1と本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 40を含み、SEQ ID NO: 39によってコードされてもよい。

【0119】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、およびC型レクチンドメイン2を含む、構築物4027.CF12と本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 70を含み、SEQ ID NO: 8によってコードされてもよい。

【0120】

別の態様において、PLA2Rの細胞外ドメインは、システインリッチドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、C型レクチンドメイン1、C型レクチンドメイン2、およびC型レクチンドメイン3を含む、構築物4028.CF123と本明細書で呼ばれる構築物の細胞外ドメインを含む。ある態様において、細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 71を含み、SEQ ID NO: 15によってコードされてもよい。

【0121】

自己抗原またはその断片の許容できる変形物は、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様において、自己抗原またはその断片は、SEQ ID NO: 49、51、53、55、57、59、61、63、70、または71に示されるアミノ酸配列のいずれかに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少な

10

20

30

40

50

くとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、自己抗原またはその断片は、SEQ ID NO: 8、15、47、50、52、54、56、58、60、または62に示される核酸配列に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくともまたは99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

10

【0122】

膜貫通ドメイン

いくつかの態様において、PLA2R CAARは、PLA2R CAARの細胞外ドメインに融合している膜貫通ドメインを含む。1つの態様において、PLA2R CAARは、PLA2R CAAR中のドメインのうちの1つと天然で会合している膜貫通ドメインを含む。場合によっては、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに対する結合を避けるように選択されるか、またはアミノ酸置換によって改変される。

【0123】

膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来しうる。供給源が天然である場合には、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来しうる。1つの態様において、膜貫通ドメインは、合成であってもよく、その場合、それは主として、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含むであろう。1つの局面において、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出されるであろう。任意で、長さが2~10アミノ酸の短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカーが、PLA2R CAARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成しうる。グリシン-セリンダブルレットは、特に適したリンカーを提供する。

20

【0124】

場合によっては、膜貫通ドメイン前の種々のスペーサドメインを、ヒンジ（例えば、CD8もしくはヒトIg（免疫グロブリン）ヒンジ）、またはグリシン-セリン（GS）リンカーを含んで、同様に使用することができる。

30

【0125】

ヒンジおよび／または膜貫通ドメインの例には、T細胞受容体の α 、 β 、もしくは ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）、OX40、CD2、CD27、LFA-1（CD11a、CD18）、ICOS（CD278）、4-1BB（CD137）、GITR、CD40、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKp80（KLRP1）、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、および／またはNKG2Cのヒンジおよび／または膜貫通ドメインが非限定的に含まれる。

40

【0126】

いくつかの態様において、PLA2R CAARは、これに限定されるわけではないがCD8 α 膜

50

貫通ドメインなどの、膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、CD8 α 膜貫通ドメインは、アミノ酸配列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 19) を含む。いくつかの態様において、CD8 α 膜貫通ドメインは、ヌクレオチド配列ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGC (SEQ ID NO: 20)

によってコードされる。

【0127】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 19に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、または、SEQ ID NO: 20に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0128】

いくつかの態様において、PLA2R CAARは、これに限定されるわけではないがCD8 α ヒンジドメインなどの、ヒンジドメインを含む。いくつかの態様において、ヒンジドメインは、アミノ酸配列

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:

43)

を含む。いくつかの態様において、ヒンジドメインは、アミノ酸配列FVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 44)

を含む。いくつかの態様において、ヒンジドメインは、SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの態様において、ヒンジドメインは、ヌクレオチド配列ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCCGAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 42)

によってコードされる。いくつかの態様において、ヒンジドメインは、ヌクレオチド配列TTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCAACCACGACGCCAGCACCGCGACACCAACACCTGCGCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGGGTGCAGACCAGCAGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 64)

によってコードされる。いくつかの態様において、PLA2R CAARは、膜貫通ドメインおよ

びヒンジドメインを含む。

【0129】

いくつかの態様において、ヒンジドメインは、SEQ ID NO: 43もしくはSEQ ID NO: 44に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、または、SEQ ID NO: 42もしくはSEQ ID NO: 64に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

10

【0130】

いくつかの態様において、PLA2R CAARは、グリシンセリン（GS）リンカーを含む。いくつかの態様において、PLA2R CAARは、GSリンカーおよび膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、GSリンカーは、ヌクレオチド配列：
GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 68)

20

によってコードされる。いくつかの態様において、GSリンカーは、アミノ酸配列：
GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 69)

を含む。CAAR構築物における使用に適切である場合、当業者は、適切なリンカー配列を選択することができるであろう。

【0131】

共刺激分子の細胞内ドメイン

いくつかの態様において、PLA2R CAARは、共刺激分子の細胞内ドメインを含む。本発明のPLA2R CAARの共刺激分子の細胞内ドメインは、PLA2R CAARがその中に配置されている免疫細胞の正常なエフェクター機能のうちの少なくとも1つの活性化の原因となる細胞質ドメインである。

30

【0132】

T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性でありうる。したがって、「共刺激分子の細胞内ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達して、細胞が特化した機能を果たすように方向づける、タンパク質の一部分のことを指す。共刺激分子の細胞内ドメイン全体を使用することができるが、多くの場合には、ドメイン全体を用いることは必要でない。共刺激分子の細胞内ドメインの短縮部分が用いられる範囲内において、そのような短縮部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、無傷のドメインの代わりに用いられてもよい。

40

【0133】

共刺激分子の細胞内ドメインとは、共刺激分子の細胞内ドメインを含むCAARの一部分のことを指す。共刺激分子とは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。そのような分子の例には、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83特異的結合リガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKP80（KLRF1）、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITG

50

AD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、本明細書に記載された他の共刺激分子、その任意の誘導体、バリエーション、または断片、同じ機能的能力を有する共刺激分子の任意の合成配列、ならびにそれらの任意の組み合わせが含まれる。したがって、本発明は、共刺激シグナル伝達ドメインとして主に4-1BB (CD137) で例示されるが、他の共刺激ドメインが、本発明の範囲内である。

10

【0134】

1つの態様において、共刺激分子の細胞内ドメインの核酸配列は、共刺激分子4-1BB (CD137) としても公知であり、かつ呼ばれる) 細胞内ドメインを含むアミノ酸配列：KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 21)

をコードする。また別の態様において、4-1BB細胞内ドメインをコードする核酸配列は、AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGAC CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA AGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO: 22)

20

を含む。また別の態様において、4-1BB細胞内ドメインをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 66を含む。ヒト細胞内4-1BBドメインは、PLA2Rまたはその断片などの細胞外自己抗原に対する結合時に、その元のリガンドを必要とせずに、共刺激細胞内シグナル伝達を提供する。

【0135】

いくつかの態様において、共刺激分子の細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 21に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、または、SEQ ID NO: 22もしくはSEQ ID NO: 66に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

30

40

【0136】

TCRのみを通して生成されるシグナルは、T細胞の完全な活性化のためには不十分であること、および、二次シグナルまたは共刺激シグナルも必要とされることが、十分に認識されている。したがって、T細胞活性化は、2つの別個のクラスの細胞質シグナル伝達配列：TCRを通して抗原依存性の一次活性化を開始するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）、および抗原非依存性様式で作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供するもの（二次細胞質シグナル伝達配列）によって媒介されることができる。

【0137】

シグナル伝達ドメイン

いくつかの態様において、PLA2R CAARは、シグナル伝達ドメインを含む。一次細胞質

50

シグナル伝達配列は、刺激性様式または阻害性様式のいずれかで、TCR複合体の一次活性化を調節する。刺激性様式で作用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またはITAMとして公知である、シグナル伝達モチーフを含有しうる。

【0138】

本発明において特に有用であるITAMを含有する一次シグナル伝達配列の例には、TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するものが含まれる。本発明のCAARにおけるシグナル伝達分子は、CD3- ζ に由来するシグナル伝達ドメインを含むことが、特に好ましい。

【0139】

1つの態様において、CAARのシグナル伝達ドメインは、CD3- ζ シグナル伝達ドメインを単独で、または本発明のCAARの文脈において有用な任意の他の望ましい細胞質ドメインと組み合わせて含むように、設計することができる。例えば、CAARのシグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 鎖部分と共刺激シグナル伝達ドメインとを含むことができる。

10

【0140】

いくつかの態様において、PLA2R CAARは、CD3- ζ シグナル伝達ドメインを単独で、または本発明のPLA2R CAARの文脈において有用な任意の他の望ましい細胞質ドメインと組み合わせて含む。例えば、PLA2R CAARは、CD3 ζ 鎖部分と共刺激分子の細胞内ドメインとを含むことができる。いくつかの態様において、CD3 ζ 鎖部分は、ヒトT細胞表面糖タンパク質CD3 ζ 鎖アイソフォーム3細胞内ドメイン（ヒトCD247）である。ヒト細胞内CD3 ζ ドメインは、PLA2Rまたはその断片などの細胞外自己抗原に対する結合時に、HLA拘束なしで、刺激性細胞内シグナル伝達を提供する。

20

【0141】

1つの態様において、シグナル伝達ドメインの核酸配列は、CD3 ζ シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む。別の態様において、CD3 ζ シグナル伝達ドメインの核酸配列は、

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR (SEQ ID NO: 23)

30

を含むアミノ酸配列をコードする。別の態様において、CD3 ζ シグナル伝達ドメインの核酸配列は、

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR (SEQ ID NO: 45)

を含むアミノ酸配列をコードする。別の態様において、CD3 ζ シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列は、

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 24)

40

50

を含む。別の態様において、CD3 ζ シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列は、SEQ ID NO: 74を含む。

【0142】

いくつかの態様において、シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 23もしくはSEQ ID NO: 45に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、または、SEQ ID NO: 24もしくはSEQ ID NO: 74に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0143】

他のドメイン

いくつかの態様において、PLA2R CAARおよびPLA2R CAARをコードするポリヌクレオチドは、ヒトT細胞表面糖タンパク質CD8 α 鎖シグナルペプチドを含む。ヒトCD8 α シグナルペプチドは、T細胞表面への受容体の移行の原因となる。

【0144】

1つの態様において、PLA2R CAARをコードするポリヌクレオチドは、ペプチドリリンカーの核酸配列を含む。別の態様において、PLA2R CAARは、ペプチドリリンカーを含む。さらに別の態様において、PLA2R CAARの細胞内シグナル伝達ドメイン内の細胞質シグナル伝達配列は、ランダムな順序または指定された順序で互いに連結させることができる。任意で、例えば、長さが2~10アミノ酸の短いオリゴペプチドリリンカーまたはポリペプチドリリンカーが、連結を形成しうる。グリシン-セリンダブルレットが、特に適したリンカーである。

【0145】

いくつかの態様において、CAARは、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）ファミリータンパク質由来の膜貫通ドメインおよび／または細胞質（細胞内）ドメインを含む。KIR遺伝子ファミリーは、19番染色体（19q13.4）上に位置する白血球受容体複合体（Leukocyte Receptor Complex）（LRC）の100~200 Kb領域内にコードされる、少なくとも15個の遺伝子座（KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3）ならびに2個の偽遺伝子（KIR2DP1およびKIR3DP1）を有する。LRCは、特徴的なIg様細胞外ドメインを有する他の細胞表面分子をコードする遺伝子を含有する、迅速に進化する免疫遺伝子の大きな1 Mbの高密度のクラスターを構成している。加えて、拡張されたLRCは、膜貫通アダプター分子であるDAP10およびDAP12をコードする遺伝子を含有する。したがって、KIR膜貫通ドメインおよび／または細胞質ドメインを含む本発明のCAARを含む細胞はまた、DAP10またはDAP12をコードするポリヌクレオチドを含んでもよい。ある態様において、KIRは、KIRS2またはKIR2DS2である。

【0146】

ある態様において、CAARは、SEQ ID NO: 11、17、25、27、29、31、33、35、37、および39からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。ある態様において、CAARは、SEQ ID NO: 12、18、26、28、30、32、34、36、38、40、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0147】

CAAR配列の許容できる変形物は、当業者に公知であろう。例えば、いくつかの態様において、CAARは、SEQ ID NO: 12、および18、26、28、30、32、34、36、38、または40に示されるアミノ酸配列のいずれかに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、CAARは、SEQ ID NO: 11、17、25、27、29、31、33、35、37、または39に示される核酸配列に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。

【0148】

PLA2R CAARを含むベクター

いくつかの態様において、CARの発現がヒト伸長因子1 α プロモーターによって調節される第3世代の自己不活性化レンチウイルスベクタープラスミドを、用いることができる。これは、宿主T細胞におけるCARの安定な（永久の）発現を結果としてもたらす。代替アプローチとして、コードmRNAを、宿主細胞中にエレクトロポレーションすることができ、これは、ウイルスで形質導入されたT細胞と同じ治療効果を達成するであろうが、mRNAは細胞分裂に伴って薄まるため、永久ではないと考えられる。

【0149】

1つの局面において、本発明は、キメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドを含むベクターであって、該ポリヌクレオチドが、ヒトPLA2R自己抗原またはその断片を含む細胞外ドメイン、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、および／または細胞内シグナル伝達ドメインを含む、ベクターを含む。1つの態様において、ベクターは、本明細書に記載されたようなCAARをコードする核酸配列のいずれかを含む。別の態様において、ベクターには、プラスミドベクター、ウイルスベクター、レトロトランスポゾン（例えば、piggyback、sleeping beauty）、部位特異的挿入ベクター（例えば、CRISPR、Znフィンガーヌクレアーゼ、TALEN）、または自殺発現ベクター、または当技術分野において公知の他のベクターが含まれる。

【0150】

本明細書に開示されたすべての構築物は、第3世代のレンチウイルスベクタープラスミド、他のウイルスベクター、またはヒト細胞における使用について認可されているRNAと共に用いることができる。1つの態様において、ベクターは、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターである。別の態様において、ベクターはRNAベクターである。

【0151】

PLA2R CAARの発現は、シーケンシングによって検証することができる。完全長CAARタンパク質の発現は、免疫ブロット、免疫組織化学、フローサイトメトリー、または、当技術分野において周知の、かつ利用可能な他の技術を用いて検証されてもよい。

【0152】

本発明はまた、本発明のCAARをコードするDNAが挿入されたベクターも提供する。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターを含むベクターは、長期的遺伝子移入を達成するための適したツールであるが、これはそれらが、導入遺伝子の長期的で安定的な組み込み、および娘細胞におけるその伝播を可能にするためである。レンチウイルスベクターは、マウス白血病ウイルスなどのオンコレトロウイルスに由来するベクターを上回る利点を有するが、これはそれらが、肝細胞などの非増殖性細胞の形質導入も行うこ

とができるためである。また、それらには、それらが導入される対象において結果として生じる免疫原性が低いという利点も加わっている。

【0153】

簡単にまとめると、CAARをコードする天然性または合成性のポリヌクレオチドの発現は、典型的には、CAARポリペプチドまたはその部分をコードする核酸をプロモーター（例えば、EF1 α プロモーター）と機能的に連結させて、その構築物を発現ベクター中に組み入れることによって達成される。ベクターは、哺乳動物細胞において一般に複製可能で、かつ／または哺乳動物の細胞ゲノムへの組み込みも可能なものである。典型的なベクターは、転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター、開始配列、ならびに所望の核酸配列の発現の調節のために有用なプロモーターを含有する。

10

【0154】

核酸は、いくつもの異なる種類のベクター中にクローニングすることができる。例えば、核酸を、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルスおよびコスミドを非限定的に含むベクター中にクローニングすることができる。特に関心が持たれるベクターには、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクターおよびシークエンシングベクターが含まれる。

【0155】

発現ベクターを、ウイルスベクターの形態で細胞に与えることもできる。ウイルスベクター技術は当技術分野において周知であり、例えば、Sambrookら、2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, N Y、ならびにウイルス学および分子生物学の他のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスおよびレンチウイルスが非限定的に含まれる。一般に、適したベクターは、少なくとも1つの生物において機能する複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つまたは複数の選択可能なマーカーを含有する（例えば、WO 01/96584号；WO 01/29058号；および米国特許第6,326,193号を参照）。

20

【0156】

そのほかのプロモーターエレメント、例えばエンハンサーなどは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは開始部位の30~110bp上流の領域に位置するが、数多くのプロモーターは、開始部位の下流にも機能的エレメントを含むことが最近示されている。多くの場合、プロモーターエレメント間の間隔には柔軟性があり、そのため、エレメントが互いに対して逆位になったり移動したりしてもプロモーター機能は保持される。チミジンキナーゼ（tk）プロモーターでは、反応性の低下を起こすことなく、プロモーターエレメント間の間隔を50bpまで隔てることができる。プロモーターによっては、個々のエレメントが協調的に、または独立して、転写を活性化しうるように思われる。

30

【0157】

プロモーターの例は、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それと機能的に連結した任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を作動させることのできる、強力な構成性プロモーター配列である。しかし、CAAR構築物での使用に適している場合は、シミアンウイルス40（SV40）初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）長末端反復配列（LTR）プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、伸長因子-1 α プロモーター、ならびに、これらに限定されるわけではないがアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターを非限定的に含む、他の構成性プロモーター配列を用いることもできる。

40

【0158】

さらに、本発明は、構成性プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターも本発明の一部として想定している。誘導性プロモーターの使用により、それと機能的に連結しているポリヌクレオチド配列の発現を、そのような発現が所望である場合

50

には有効にし、発現が所望でない場合には発現を無効にすることができる、分子スイッチがもたらされる。誘導性プロモーターの例には、メタロチオネイン (metallothionine) プロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーターおよびテトラサイクリンプロモーターが非限定的に含まれる。いくつかの態様において、誘導性プロモーターは、細胞外リガンドに応答して活性化される。例えば、いくつかの態様において、誘導性プロモーターは、合成受容体に結合する細胞外リガンドによって活性化される（かつCAARの発現が調節される）。例えば、いくつかの態様において、合成受容体、例えば、合成Notch受容体（すなわち、「synNotch」）が、そのリガンドに結合した場合に、CAARをコードする核酸配列が機能的に連結しているプロモーターを活性化し、結合誘因性転写スイッチとして使用されてもよい。したがって、非限定的な例として、そのようなシステムは、免疫細胞が（例えば、CAARが結合する）BCRまたは自己抗体に応答性であるために、（例えば、synNotchが結合する）リガンドの存在を必要とする。分子回路においてあるシグナル伝達アウトプットを生成するために特定の組み合わせを必要とすることは、論理ゲートを結果としてもたす。例えば、Roybal et al., 2016 Cell 164(4):770-9を参照されたい。

【0159】

キメラ受容体を発現させるため、またはその発現を調節するための他のシステムの例には、Wu et al. (2015) Science 350: aab4077; Fedorov et al. (2014) Cancer Journal 20:160-165; Kloss et al. (2013) Nature Biotechnology 31: 71-75; Sakemura et al. (2016) Cancer Immunol. Res. 4:658-668; Hill et al. (2018) Nature Chemical Biology 14:112-117; Di Stasi et al. (2011) N. Engl. J. Med. 365:1673-1683; Budde et al. (2013) PLoS One 8: e82742; Wei et al. (2012) Nature 488: 384-388; Ma et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113: E450-458; Rodgers et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113: E459-468; Kudo et al. (2014) Cancer Res. 74: 93-103、およびChen et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 8531-8536に記載されたものが含まれる。

【0160】

CAARポリペプチドまたはその部分の発現を評価する目的で、ウイルスベクターによってトランスフェクトまたは感染させようとする細胞の集団からの発現細胞の同定および選択を容易にするために、細胞に導入される発現ベクターに、選択マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子またはその両方を含有させることもできる。他の局面において、選択マーカーを別個のDNA小片上に保有させて、同時トランスフェクション手順に用いることもできる。宿主細胞における発現を可能にするために、選択マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子をいずれも、適切な調節配列に隣接させることができる。有用な選択マーカーには、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子が含まれる。

【0161】

レポーター遺伝子は、トランスフェクトされた可能性のある細胞を同定するため、および調節配列の機能性を評価するために用いられる。一般に、レポーター遺伝子とは、レシピエント生物または組織に存在しないかまたはそれらによって発現されず、かつ、その発現が何らかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によって顕在化するポリペプチドをコードする、遺伝子のことである。レポーター遺伝子の発現は、そのDNAがレシピエント細胞に導入された後の適した時点で評価される。適したレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌性アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光性タンパク質の遺伝子が含まれる（例えば、Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479:79-82）。適した発現系は周知であり、公知の手法を用いて調製すること、または販売されているものを入手することができる。一般に、レポーター遺伝子の最も高レベルでの発現を示す最小限の5'フランキング領域を有する構築物が、プロモーターとして同定される。そのようなプロモーター領域をレポーター遺伝子と連結させて、プロモーターにより作動する転写を作用物質がモジュレートする能力を評価するために用いることができる。

【0162】

細胞に遺伝子を導入して発現させる方法は、当技術分野において公知である。発現ベクターに関連して、ベクターは、宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞または昆虫細胞に、当技術分野における任意の方法によって容易に導入することができる。例えば、発現ベクターを、物理的、化学的または生物学的手段によって宿主細胞に導入することができる。

【0163】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション、微粒子銃法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。ベクターおよび／または外因性核酸を含む細胞を作製するための方法は、当技術分野において周知である。例えば、Sambrookら、2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NYを参照されたい。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入のために好ましい方法の1つは、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0164】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNAベクターおよびRNAベクターの使用が含まれる。RNAベクターは、RNAプロモーターおよび／またはRNA転写物の産生のための他の関連ドメインを有するベクターを含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞に遺伝子を挿入するために最も広く使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来する。例えば、米国特許第5,350,674号および第5,585,362号を参照されたい。

【0165】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段には、コロイド分散系、例えば高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズなど、ならびに、水中油型エマルション、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質ベースの系が含まれる。インビトロおよびインビボで送達媒体として用いるための例示的なコロイド系の1つは、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

【0166】

非ウイルス性送達系を利用する場合には、例示的な送達媒体の1つはリポソームである。脂質製剤の使用を、宿主細胞への核酸の導入のために想定している（インビトロ、エクスピボまたはインビボ）。別の局面において、核酸を脂質と結合させてもよい。脂質と結合した核酸をリポソームの水性内部の中に封入し、リポソームの脂質二重層の内部に配置させ、リポソームおよびオリゴヌクレオチドの両方と結合する連結分子を介してリポソームに付着させ、リポソーム内に封じ込め、リポソームと複合体化させ、脂質を含有する溶液中に分散させ、脂質と混合し、脂質と配合し、脂質中に懸濁物として含有させ、ミセル中に含有させるかもしくは複合体化させ、または他の様式で脂質と結合させることができる。脂質、脂質／DNAまたは脂質／発現ベクターが結合する組成物は、溶液中のいかなる特定の構造にも限定されない。例えば、それらは二重層構造の中に、ミセルとして、または「崩壊した」構造として存在する。それらはまた、溶液中に単に点在していて、大きさも形状も均一でない凝集物を形成する可能性があってもよい。脂質とは、天然脂質または合成脂質であってよい脂肪性物質のことである。例えば、脂質には、細胞質中に天然に存在する脂肪小滴、ならびに長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体を含む化合物のクラス、例えば脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドなどが含まれる。

【0167】

使用に適した脂質は、販売元から入手することができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）はSigma, St. Louis, MOから入手することができ；ジアセチルホスファート（「DCP」）はK & K Laboratories (Plainview, NY) から入手す

10

20

30

40

50

ることができ；コレステロール（「Choi」）はCalbiochem-Behringから入手することができ；ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL) から入手することができる。クロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中にある脂質の貯蔵溶液は、約-20℃で保存することができる。クロロホルムはメタノールよりも容易に蒸発するので、それを唯一の溶媒として用いることが好ましい。「リポソーム」とは、閉じた脂質二重層または凝集物の生成によって形成される、種々の単層および多重層の脂質媒体を包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜による小胞構造および内部の水性媒質を有するものとして特徴づけることができる。多重層リポソームは、水性媒質によって隔てられた複数の脂質層を有する。それらはリン脂質を過剰量の水性溶液中に懸濁させると自発的に形成される。脂質成分は自己再配列を起こし、その後に閉鎖構造の形成が起こり、水および溶解溶質を脂質二重層の間に封じ込める（Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5:505-10）。しかし、溶液中で通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物も包含される。例えば、脂質がミセル構造をとってもよく、または単に脂質分子の不均一な凝集物として存在してもよい。また、リポフェクタミン-核酸複合体も想定している。

10

【0168】

CAARの任意のドメインおよび／または断片、ベクター、ならびにプロモーターは、PCRまたは当技術分野において公知の任意の他の手段によって増幅された、合成遺伝子断片であってもよい。

【0169】

20

CAARを含む細胞

別の局面において、本発明は、本明細書に開示されたPLA2Rキメラ自己抗体受容体（CAAR）を含む遺伝子改変細胞を含む。

【0170】

別の態様において、遺伝子改変細胞は、PLA2R CAARを発現する。この態様において、細胞は、B細胞上の、またはまれに、まだそのBCRを下方制御していない、形質細胞に分化しているB細胞上の、PLA2R自己抗体ベースのB細胞受容体（BCR）に対して高い親和性を有する。結果として、遺伝子改変細胞は、抗PLA2R B細胞の直接の死滅、またはPLA2R自己抗体を発現する形質細胞の間接的な死滅を誘導することができる。さらに別の態様において、遺伝子改変細胞は、Fc受容体に結合した抗体に対して低い親和性を有する。

30

【0171】

1つの態様において、遺伝子改変細胞は、T細胞、例えば、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、調節性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ナチュラルキラー細胞、サイトカイン誘導性キラー細胞、それらの細胞株、Tメモリー幹細胞、または他のTエフェクター細胞である。T細胞が、健常細胞に対する限定された毒性、および自己抗体を発現する細胞に対する特異性を有することもまた、有用である。そのような特異性により、自己抗体に特異的ではない現在の療法において優勢であるオフターゲットの毒性が阻止されるか、または低下する。1つの態様において、T細胞は、健常細胞に対する限定された毒性を有する。1つの態様において、T細胞は自己細胞である。別の態様において、T細胞は同種細胞である。

40

【0172】

いくつかの態様において、本発明は、インビトロで分化した多能性幹細胞に由来する遺伝子改変免疫細胞を含む。他の態様において、本発明は、T細胞、例えば初代細胞、初代T細胞に由来する増大したT細胞、インビトロで分化した幹細胞に由来するT細胞、Jurkat細胞などのT細胞株、他の供給源のT細胞、それらの組み合わせ、および他のエフェクター細胞を含む。例えば、NFAT応答エレメントおよびそれに続くGFPが形質導入されたJurkat細胞株を、PLA2R特異的B細胞を検出して単離するため、およびPLA2R特異的抗体レパートリーを包括的様式かつ不偏様式でクローニングするために用いることができる。相互作用するB細胞とJurkat細胞を、GFP陽性のダブレットまたは多量体として検出し、フローサイトメトリーによってソーティングすることができる。B細胞受容体をコードする遺伝

50

子の発現クローニングにより、糸球体疾患および一次性膜性腎症などの自己抗体媒介性腎臓疾患における自己免疫および自己抗体がどのように発生するかについてのさらなる情報が提供されるであろう。

【0173】

自己抗体および血清、例えば、一次性膜性腎症血清に特異的に結合するCAARの機能的能力は、Jurkatレポーター細胞株において評価することができ、これは、プレートに結合した自己抗体に結合することによるCAARの活性化に依存する（それに応答して、活性化された細胞は、その中に含有されているNFAT-GFPレポーター構築物により緑色の蛍光を発する）。そのような方法は、機能的結合能力についての有用なかつ信頼できる定性的測定法である。細胞表面上の自己抗原の妥当なプロセッシングもまた、重要であり、モノクローナル抗体を用いて測定することができる。さらに、主要疾患エピトープに基づくPLA2Rの短縮もまた、有用であり、本明細書に含まれる。さまざまな長さのヒンジ領域またはGSリンカーを用いたバージョンもまた、有用である。安全性に関しては、形質導入細胞間のまたはポドサイトに対する、可能性のある同種親和性およびヘテロ親和性の相互作用および活性化（例えば、PLA2R-PLA2R）を阻止するかまたは低下させることが好ましい。

【0174】

CAARの効力および安全性のさらなる評価は、例えば、以下のように行うことができる。

【0175】

構築物を、293T/17などのヒト細胞中に一過性にトランスフェクトすることができる。表面発現を、上述の細胞外ドメイン、ドメイン間のリンカー、またはCAARに含まれる他の構造に特異的なモノクローナル抗体（IgGもしくはScFvのいずれか）またはPLA2R MN患者由来の血清抗体で検出することができる。結合を、特異的な二次抗体で検証し、フローサイトメトリーによって定量することができる。

【0176】

任意のアイソタイプのヒト抗PLA2R抗体の膜に発現される構築物の作製は、さまざまなPLA2R-CAARを試験するための標的細胞として働くことができる。追加的な標的細胞株を、細胞株（例えば、Nalm6またはK562細胞）の表面上でのヒトモノクローナル抗体の発現によって、必要とされる際に作製することができる。

【0177】

自己免疫疾患

本発明はまた、自己抗体媒介性腎臓疾患の文脈において、自己抗体発現細胞に関連する障害または自己免疫疾患を予防し、処置し、および／または管理するための方法も提供する。方法は、自己抗体発現細胞に結合する本発明のCAARを含む遺伝子改変T細胞を、それを必要とする対象に投与する段階を含む。1つの局面において、対象はヒトである。自己抗体媒介性腎臓疾患の非限定的な例には、糸球体疾患および一次性膜性腎症が含まれる。

【0178】

処置の方法において、対象から単離されたT細胞を、適切なCAARを発現するように改変し、エクスピボで増大させ、次いで、同じ対象中に再び輸注することができる（例えば、T細胞は自己T細胞である）。いくつかの態様において、T細胞は、元のT細胞のドナーとは異なる対象中に再び輸注される（例えば、T細胞は同種T細胞である）。改変T細胞は、標的細胞、例えば、抗PLA2R B細胞、またはPLA2R自己抗体を産生するB細胞もしくは形質細胞を認識し、活性化されて、自己免疫標的細胞の死滅を結果としてもたらす。

【0179】

自己免疫疾患を有する患者において、例えば、一次性膜性腎症患者において、再燃もまた起こりうる。リツキシマブで処置された患者において、再燃は、同じ自己抗体B細胞クローンの残存によって媒介されうるのに対して、寛解は、これらのクローンの消失に関連している。PLA2R CAAR T細胞を輸注することによって、恐らくPLA2R CAAR T細胞の長命のために、自己免疫細胞が枯渇されて長期の寛解を誘導し、かつ／または自己抗原反応クローンが再出現しない。

【0180】

インビトロ、インサイチュ、またはインビボでPLA2R CAAR発現細胞をモニタリングするために、PLA2R CAAR細胞は、検出可能なマーカーをさらに発現することができる。PLA2R CAARが標的に結合すると、検出可能なマーカーが活性化されて発現し、それを、フローサイトメトリーなどの当技術分野において公知のアッセイによって検出することができる。1つの態様において、PLA2R CAAR発現細胞を検出して定量するために、PLA2R CAARは、NFAT応答エレメント、および緑色蛍光タンパク質（GFP）などの検出可能なマーカーを含む。

【0181】

T細胞の供給源

増大および遺伝子改変の前に、T細胞（例えば、自己または同種T細胞）を対象から入手する。対象の例には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が含まれる。T細胞は、皮膚、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、数多くの供給源から入手することができる。本発明のある態様において、当技術分野において入手可能な任意のさまざまなT細胞株を用いることができる。本発明のある態様において、T細胞は、フィコール（商標）分離などの、当業者に公知の任意のさまざまな手法を用いて対象から収集された血液ユニットから得られる。1つの好ましい態様において、個体の流血由来の細胞はアフエーシスによって入手される。アフエーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含む。1つの態様においては、アフエーシスによって収集された細胞を、血漿画分を除去するために洗浄した上で、その後の処理段階のために細胞を適切な緩衝液または培地中に配置することができる。本発明の1つの態様においては、これらの細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄する。1つの代替的な態様において、洗浄溶液はカルシウムを含まず、かつ、マグネシウムを含まないか、またはすべてではないものの多くの二価カチオンを含まない。この場合にも、驚くべきことに、カルシウム非存在下での最初の活性化段階により、活性化の増強がもたらされる。当業者は容易に理解するであろうが、洗浄段階は、半自動化された「フロースルー」遠心分離機（例えば、Cobe 2991細胞プロセッサー、Baxter CytoMate、またはHaemonetics Cell Saver 5など）を製造元の指示に従って用いることなどによって、当技術分野において公知の方法によって実現することができる。洗浄の後に、細胞を、例えば、Ca非含有、Mg非含有PBS、PlasmaLyte A、または緩衝剤を含むかもしくは含まない他の食塩液といった、種々の生体適合性緩衝液中に再懸濁させることができる。または、アフエーシス試料の望ましくない成分を除去して、細胞を培養培地中に直接再懸濁させてもよい。

【0182】

別の態様においては、赤血球を溶解させた上で、例えばPERCOLL（商標）勾配での遠心分離によるか、または向流遠心分離溶出法によって単球を枯渇させることによって、T細胞を末梢血リンパ球から単離する。CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、およびCD45RO⁺T細胞といったT細胞の特定の部分集団を、陽性選択法または陰性選択法によってさらに単離することができる。例えば、1つの好ましい態様において、T細胞は、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 Tなどの抗CD3/抗CD28（すなわち、3x28）結合ビーズとの、所望のT細胞の陽性選択に十分な期間にわたるインキュベーションによって単離される。1つの態様において、この期間は約30分間である。1つのさらなる態様において、この期間は、30分間～36時間またはそれ以上、およびそれらの間の全ての整数値の範囲にわたる。1つのさらなる態様において、この期間は、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間または6時間である。さらに別の好ましい態様において、この期間は10～24時間である。1つの好ましい態様において、インキュベーション期間は24時間である。白血病の患者からのT細胞の単離のためには、24時間といった比較的長いインキュベーション時間を用いることにより、細胞収量を増やすことができる。腫瘍組織または免疫機能低下個体から腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）を単離する際のように、他の細胞型と比較してT細胞がわずかしき存在しないあらゆる状況で、T細胞を単離するために比

10

20

30

40

50

較的長いインキュベーション時間を用いることができる。さらに、比較的長いインキュベーション時間の使用により、CD8⁺ T細胞の捕捉効率を高めることもできる。したがって、この時間を短縮または延長させるだけでT細胞はCD3／CD28ビーズへ結合でき、かつ／または、T細胞に対するビーズの比を増加もしくは減少させることにより（本明細書でさらに説明するように）、T細胞の部分集団は、培養開始時もしくはこの過程の他の時点で、これについて優先的に選択もしくは除外されうる。加えて、ビーズまたは他の表面上の抗CD3および／または抗CD28抗体の比を増加または減少することにより、T細胞部分集団は、培養開始時もしくは他の望ましい時点で、これについてまたはこれに対して優先的に選択される。当業者は、本発明の状況において複数回の選択を使用することができることを認められる。ある態様においては、この選択手順を実行し、活性化および増大の過程において「選択されない」細胞を使用することが望ましいことがある。「選択されない」細胞に、さらに選択を施すこともできる。

【0183】

陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、陰性選択された細胞への独自の表面マーカに対する抗体の組合せにより実行することができる。1つの方法は、陰性選択された細胞上に存在する細胞表面マーカに対するモノクローナル抗体カクテルを使用する、負磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる細胞ソーティングおよび／または選択である。例えば、陰性選択によってCD4⁺細胞を濃縮するためのモノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。ある態様において、典型的にはCD4⁺、CD25⁺、CD62L⁺、GITR⁺、およびFoxP3⁺を発現する調節性T細胞を濃縮するかまたは陽性選択することが望ましいことがある。または、ある態様においては、抗CD25結合ビーズまたは他の類似の選択方法によって、調節性T細胞を枯渇させる。他の態様においては、T細胞の亜集団を、例えば、限定されるわけではないが、1つまたは複数の表面マーカについて陽性の細胞またはそれらを高レベルで発現する細胞、例えばCD28⁺、CD8⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD45RA⁺、および／もしくはCD45RO⁺ T細胞を、陽性または陰性選択技術によって単離することができる。

【0184】

陽性または陰性選択によって望ましい細胞集団を単離するために、細胞および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変化させることができる。ある態様においては、細胞とビーズの最大接触を確実にするために、ビーズおよび細胞と一緒に混合される容積の著しい減少（すなわち、細胞の濃度の増加）が望ましいことがある。例えば、1つの態様においては、細胞20億個／mlの濃度を用いる。1つの態様においては、細胞10億個／mlの濃度を用いる。さらなる態様においては、細胞1億個／mlよりも高いものを用いる。さらなる態様においては、1000万個／ml、1500万個／ml、2000万個／ml、2500万個／ml、3000万個／ml、3500万個／ml、4000万個／ml、4500万個／mlまたは5000万個／mlの細胞濃度を用いる。さらに別の態様においては、7500万個／ml、8000万個／ml、8500万個／ml、9000万個／ml、9500万個／ml、または1億個／mlからの細胞濃度を用いる。さらなる態様においては、1億2500万個／mlまたは1億5000万個／mlの濃度を用いることができる。高濃度を用いることにより、増加した細胞収量、細胞活性化および細胞増大を生じることができる。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞のような、または多くの腫瘍細胞が存在する試料（すなわち、白血病血、腫瘍組織など）からの、関心のある標的抗原を弱く発現する細胞の捕捉効率を高めることができる。そのような細胞集団は、治療的価値があり、かつ得ることが望ましい。例えば、高い濃度の細胞の使用は、通常弱くCD28を発現するCD8⁺ T細胞をより効率的に選択することを可能にする。

【0185】

1つの関連した態様においては、より低い濃度の細胞を用いることが望ましいことがある。T細胞および表面（例えばビーズなどの粒子）の混合物の高度の希釈により、粒子と細胞間の相互作用は最小化される。これにより、これらの粒子と結合する所望の抗原を大量発現する細胞が選択される。例えば、CD4⁺ T細胞は、より高いレベルのCD28を発現し、希釈した濃度でCD8⁺ T細胞よりもより効率的に捕捉される。1つの態様において、用い

られる細胞濃度は、 5×10^6 個/mlである。別の態様において、用いられる濃度は、約 1×10^5 個/ml～ 1×10^6 個/ml、およびその間の任意の整数であることができる。

【0186】

他の態様において、細胞を、回転器にて、さまざまな時間にわたって、さまざまな速度で、 $2 \sim 10^\circ\text{C}$ または室温のいずれかで、インキュベートすることもできる。

【0187】

また、刺激のためのT細胞を、洗浄段階の後に凍結することもできる。理論に拘束されることは望まないが、凍結段階およびそれに続く解凍段階は、細胞集団における顆粒球およびある程度の単球を除去することによって、より均一な製剤を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄段階の後に、これらの細胞を凍結液中に懸濁させてもよい。多くの凍結液およびパラメーターが当技術分野において公知であり、かつこの状況において有用であるが、1つの方法は、20% DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または、10%デキストラン40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミンおよび7.5% DMSO、または31.25% Plasmalyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45% NaCl、10%デキストラン40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミンおよび7.5% DMSO、または例えばHespanおよびPlasmaLyte Aを含有する他の適した細胞凍結培地の使用を伴い、続いてこれらの細胞は、1分間に 1°C の速度で -80°C に凍結され、液体窒素貯蔵タンク内で気相中に貯蔵される。その他の制御された凍結法に加え、即時 -20°C または液体窒素中の制御されない凍結を使用してもよい。

【0188】

ある態様においては、凍結保存細胞を本明細書に記載の通りに解凍および洗浄して、室温で1時間静置した後に、本発明の方法を用いる活性化を行う。

【0189】

また、本発明に関連して、本明細書に記載されたような増大された細胞が必要となる前の期間での、対象からの血液試料またはアフエレーシス産物の収集も想定している。そのために、増大させようとする細胞の供給源を、必要な任意の時点で収集し、T細胞などの所望の細胞を、本明細書に記載された説明されたもののような、T細胞療法による恩恵を受けると考えられる任意のさまざまな疾患または病状に対するT細胞療法に後に用いるために単離して凍結することができる。1つの態様においては、血液試料またはアフエレーシス物を、全般的に健常な対象から採取する。ある態様においては、血液試料またはアフエレーシス物を、疾患を発症するリスクがあるが、まだ疾患を発症していない全般的に健常な対象から採取し、関心対象の細胞を、後に用いるために単離して凍結する。ある態様においては、T細胞を増大させ、凍結して、後の時点で用いる。ある態様においては、本明細書に記載されたような特定の疾患の診断後間もなく、しかしいかなる治療も行わないうちに、患者から試料を収集する。1つのさらなる態様においては、細胞を、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス薬、化学療法、放射線療法、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレートおよびFK506などの免疫抑制剤、抗体、または他の免疫除去薬、例えばCAMPATH、抗CD3抗体、サイトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、および照射などの作用因子による治療を非限定的に含む、任意のさまざまな妥当な治療様式の前の対象由来の血液試料またはアフエレーシス物から単離する。これらの薬物は、例えば、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンを阻害するか（シクロスポリンおよびFK506）、または増殖因子で誘導されるシグナル伝達にとって重要なp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）ことができる（Liu et al., Cell, 66:807-815,1991; Henderson et al., Immun., 73:316-321,1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun., 5:763-773,1993）。別の態様においては、細胞を事前に単離した上で、例えばリツキサンなどによるB細胞除去療法後の治療のために後で用いるために凍結することができる。

【0190】

本発明の1つのさらなる態様においては、T細胞を、治療後に患者から直接入手する。こ

れに関して、ある種の治療、特に免疫系に障害を及ぼす薬物による治療の後には、患者が通常であれば治療から回復中であると考えられる治療後間もない時点で、得られるT細胞の品質が、それらがエキスピボで増大する能力の点で最適であるか改善されていることが観察されている。同様に、本明細書に記載された方法を用いるエキスピボ操作の後にも、これらの細胞は生着およびインビボ増大の増強のために好ましい状態にある可能性がある。したがって、本発明に関連して、この回復相の間に、T細胞、樹状細胞、または造血系統の他の細胞を含む血液細胞を収集することを想定している。さらに、ある態様においては、動員（例えば、GM-CSFによる動員）レジメンおよび条件付けレジメンを用いて、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生および／または増大にとって有利に働く状態を、特に治療法のある規定された時間枠の間に、対象において作り出すことができる。例示的な細胞型には、T細胞、B細胞、樹状細胞および免疫系の他の細胞が含まれる。

10

【0191】

T細胞の活性化および増大

一般に、例えば、米国特許第6,352,694号；第6,534,055号；第6,905,680号；第6,692,964号；第5,858,358号；第6,887,466号；第6,905,681号；第7,144,575号；第7,067,318号；第7,172,869号；第7,232,566号；第7,175,843号；第5,883,223号；第6,905,874号；第6,797,514号；第6,867,041号；ならびに米国特許出願公開第20060121005号に記載された方法を用いて、T細胞を活性化して増大させることができる。

【0192】

一般に、本発明のT細胞は、CD3／TCR複合体関連シグナルを刺激する作用物質、およびT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドが付着した表面との接触によって増大させられる。特に、T細胞集団は、本明細書に記載されたように、例えば、表面上に固定化された抗CD3抗体もしくはその抗原結合断片または抗CD2抗体との接触によって、またはカルシウムイオノフォアを伴うプロテインキナーゼCアクチベーター（例えば、プリオスタチン）との接触などによって、刺激することができる。T細胞の表面上のアクセサリー分子の同時刺激のためには、アクセサリー分子と結合するリガンドが用いられる。例えば、T細胞の集団を、T細胞の増殖を刺激するのに適した条件下で、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞のいずれかの増殖を刺激するためには、抗CD3抗体および抗CD28抗体。抗CD28抗体の例には、9.3、B-T3、XR-CD28 (Diacclone, Besancon, France) が含まれ、当技術分野において一般に公知である他の方法と同様に用いることができる (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。

20

30

【0193】

ある態様において、T細胞に対する一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、さまざまなプロトコールによって与えることができる。例えば、各シグナルを与える作用物質は、溶液中にあってよく、または表面と結合させてもよい。表面と結合させる場合、これらの作用物質を同じ表面に結合させてもよく（すなわち、「シス」フォーメーション）、または別々の表面に結合させてもよい（すなわち、「トランス」フォーメーション）。または、一方の作用物質を溶液中の表面に結合させ、もう一方の作用物質が溶液中にあってよく、1つの態様においては、共刺激シグナルを与える作用物質を細胞表面と結合させ、一次活性化シグナルを与える作用物質は溶液中にあるか、または表面と結合させる。ある態様においては、両方の作用物質が溶液中にあってよく、別の態様において、これらの物質は可溶形態にあり、続いて、Fc受容体を発現する細胞または抗体またはこれらの物質と結合する他の結合物質などの表面と架橋結合することができる。これに関しては、例えば、本発明においてT細胞を活性化および増大させるために用いることを想定している人工抗原提示細胞 (aAPC) についての、米国特許出願公開第20040101519号および第20060034810号を参照されたい。

40

【0194】

50

1つの態様においては、2種の作用物質を、同じビーズ上に、すなわち「シス」か、または別々のビーズ上に、すなわち「トランス」かのいずれかとして、ビーズ上に固定化する。一例として、一次活性化シグナルを与える作用物質は抗CD3抗体またはその抗原結合断片であり、共刺激シグナルを与える作用物質は抗CD28抗体またはその抗原結合断片である；そして、両方の作用物質を等モル量で同じビーズに同時固定化する。1つの態様においては、 $CD4^+$ T細胞の増大およびT細胞増殖のためにビーズと結合させる各抗体を1：1の比で用いる。本発明のある局面においては、ビーズと結合させる抗CD3：CD28抗体の比として、1：1の比を用いて観察される増大と比較してT細胞増大の増加が観察されるようなものを用いる。1つの特定の態様においては、1：1の比を用いて観察される増大と比較して約1～約3倍の増加が観察される。1つの態様においては、ビーズと結合させるCD3：CD28抗体の比は、100：1～1：100、およびそれらの間のすべての整数の範囲にある。本発明の1つの局面においては、抗CD3抗体よりも多くの抗CD28抗体が粒子と結合され、すなわちCD3：CD28の比は1未満である。本発明のある態様において、ビーズと結合させる抗CD28抗体と抗CD3抗体との比は、2：1よりも大きい。1つの特定の態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：100のCD3：CD28比を用いる。別の態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：75のCD3：CD28比を用いる。さらなる態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：50のCD3：CD28比を用いる。別の態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：30のCD3：CD28比を用いる。1つの好ましい態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：10のCD3：CD28比を用いる。別の態様においては、ビーズと結合させる抗体に1：3のCD3：CD28比を用いる。さらに別の態様においては、ビーズと結合させる抗体に3：1のCD3：CD28比を用いる。

【0195】

T細胞または他の細胞標的を刺激するには、粒子と細胞との比として1：500～500：1およびその間の任意の整数値を用いることができる。当業者が容易に理解するように、粒子と細胞との比は、標的細胞に対する粒子サイズに依存する。例えば、小さいサイズのビーズは2、3個の細胞と結合するに過ぎないが、一方、より大きいビーズは多くと結合すると思われる。ある態様において、細胞と粒子との比は1：100～100：1およびその間の任意の整数値の範囲にあり、さらなる態様において、この比は1：9～9：1およびその間の任意の整数値を含み、これと同じくT細胞を刺激するために用いることができる。T細胞の刺激をもたらす、抗CD3が結合した粒子および抗CD28が結合した粒子とT細胞との比は、上述したようにさまざまでありうるが、いくつかの好ましい値には、1：100、1：50、1：40、1：30、1：20、1：10、1：9、1：8、1：7、1：6、1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1および15：1が含まれ、ここで、T細胞1個あたり粒子少なくとも1：1が、1つの好ましい比である。1つの態様においては、1：1またはそれ未満である粒子と細胞との比を用いる。1つの特定の態様において、好ましい粒子：細胞比は1：5である。さらなる態様において、粒子と細胞との比は、刺激の日に応じて変化しうる。例えば、1つの態様において、粒子と細胞との比は第1日に1：1～10：1であり、その後最長10日間にわたって毎日または1日おきに追加の粒子を細胞に添加して、最終的な比が1：1～1：10となる（添加の日の細胞数に基づく）。1つの特定の態様において、粒子と細胞との比は刺激の1日目に1：1であり、刺激の3日目および5日目に1：5に調節される。別の態様において、粒子は毎日または1日おきに添加され、最終的な比は1日目に1：1であり、刺激の3日目および5日目には1：5である。別の態様において、粒子と細胞との比は刺激の1日目に2：1であり、刺激の3日目および5日目に1：10に調節される。別の態様において、粒子は毎日または1日おきに添加され、最終的な比は1日目に1：1であり、刺激の3日目および5日目には1：10である。当業者は、さまざまな他の比が、本発明における使用に適することを理解するであろう。特に、比は粒子サイズならびに細胞のサイズおよび型に応じて多様であると考えられる。

【0196】

本発明のさらなる態様においては、T細胞などの細胞を、作用物質でコーティングされ

たビーズと一緒にし、その後にビーズと細胞を分離した上で、続いて細胞を培養する。1つの代替的な態様においては、培養の前に、作用物質でコーティングされたビーズと細胞を分離せずに、一緒に培養する。1つのさらなる態様においては、ビーズおよび細胞を磁力などの力の印加によってまず濃縮して、細胞表面マーカーの連結を増加させて、それにより、細胞刺激を誘導する。

【0197】

例として、抗CD3および抗CD28が付着した常磁性ビーズ（3x28ビーズ）をT細胞と接触させることによって、細胞表面タンパク質を連結させることができる。1つの態様においては、細胞（例えば、 $10^4 \sim 10^9$ 個のT細胞）およびビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズ、1：1の比）を、緩衝液中、例えばPBS（カルシウムおよびマグネシウムなどの二価カチオンを含まない）中で一緒にする。この場合も、当業者は、あらゆる細胞濃度を用いることを容易に理解するであろう。例えば、標的細胞が試料中に非常に稀であって、試料のわずかに0.01%を構成してもよく、または試料の全体（すなわち、100%）が関心対象の標的細胞で構成されてもよい。したがって、あらゆる細胞数が本発明の状況の範囲に含まれる。ある態様においては、粒子と細胞と一緒にして混合する容積を著しく減らして（すなわち、細胞の濃度を高めて）、細胞と粒子の最大の接触を確実にすることが望ましいと考えられる。例えば、1つの態様においては、細胞約20億個/mlの濃度を用いる。別の態様においては、細胞1億個/ml超を用いる。1つのさらなる態様においては、1000万個、1500万個、2000万個、2500万個、3000万個、3500万個、4000万個、4500万個、または5000万個/mlの細胞濃度を用いる。さらに別の態様においては、7500万個、8000万個、8500万個、9000万個、9500万個または1億個/mlの細胞濃度を用いる。さらなる態様において、細胞1億2500万または1億5000万個/mlの濃度を用いることができる。高濃度を用いることにより、細胞収量、細胞活性化、および細胞増大の増加がもたらされうる。さらに、高い細胞濃度を用いることにより、CD28陰性T細胞のように関心対象の標的抗原を弱く発現する細胞のより効率的な捕捉が可能になる。ある態様においては、そのような細胞集団は治療的価値を有する可能性があり、入手することが望ましいと考えられる。例えば、高濃度の細胞を用いることにより、通常は比較的弱いCD28発現を有するCD8+ T細胞のより効率的な選択が可能になる。

【0198】

本発明の1つの態様においては、混合物を、数時間（約3時間）～約14日間、またはその間の任意の整数値単位の時間にわたって培養しうる。別の態様において、混合物を21日間培養しうる。本発明の1つの態様においては、ビーズとT細胞を約8日間一緒に培養する。別の態様においては、ビーズとT細胞は2～3日間一緒に培養する。数回の刺激サイクルも望ましく、その結果、T細胞の培養時間は60日間またはそれより長くなる。T細胞の培養に適した条件には、血清（例えばウシ胎仔血清またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β およびTNF- α 、または当業者に公知である細胞増殖のための他の添加物を含む、増殖および生存のために必要な因子を含みうる適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI Medium 1640または、X-vivo 15（Lonza））が含まれる。細胞の増殖のための他の添加剤には、界面活性剤、プラスマネート、および還元剤、例えばN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどが非限定的に含まれる。培地には、アミノ酸、ビルビン酸ナトリウムおよびビタミンが添加された、血清非含有であるか、またはT細胞の増殖および増大のために十分な、適量の血清（または血漿）もしくは規定されたホルモンのセットおよび/もしくは一定量のサイトカインが加えられた、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20が含まれうる。ペニシリンおよびストレプトマイシンなどの抗生物質は実験培養物のみを含められ、対象に輸注される細胞の培養物には含められない。標的細胞は、増殖を支えるために必要な条件下、例えば適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5% CO₂）の下で維持される。

。

【0199】

多様な刺激時間にわたって曝露されたT細胞は、異なる特性を示しうる。例えば、典型的な血液またはアフエーシスを受けた末梢血単核細胞産物は、ヘルパーT細胞集団（ T_H 、 $CD4^+$ ）を、細胞傷害性またはサプレッサーT細胞集団（ T_C 、 $CD8^+$ ）よりも多く有する。CD3受容体およびCD28受容体を刺激することによるT細胞のエクスピボ増大では、約8～9日目より前には主として T_H 細胞からなるT細胞集団が生じるが、約8～9日目以後、T細胞の集団は T_C 細胞の集団を次第に多く含むようになる。したがって、治療の目的によっては、主として T_C 細胞または T_H 細胞で構成されるT細胞集団を対象に輸注することが有利な場合がある。同様に、 T_C 細胞の抗原特異的サブセットが単離されている場合には、このサブセットをより高度に増大させることが有益な場合がある。

10

【0200】

さらに、CD4およびCD8マーカーのほかに、他の表現型マーカーも、細胞増大の過程で顕著に、しかし大部分は再現性を伴って変動する。このため、そのような再現性により、活性化T細胞製剤を特定の目的に合わせて作ることが可能になる。

【0201】

治療応用

1つの局面において、本発明は、対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置するための方法を含む。方法は、キメラ自己抗体受容体（CAAR）をコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子改変T細胞の有効量を対象に投与する段階を含み、該ポリヌクレオチドは、ホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）自己抗原またはその断片、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインをコードし、それにより、該対象において自己抗体媒介性腎臓疾患を処置する。

20

【0202】

別の局面において、本発明は、自己抗体媒介性腎臓疾患のリスクがあるかまたはそれに罹患している対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させるための方法を含む。方法は、CAARをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子改変T細胞の有効量を対象に投与する段階を含み、該ポリヌクレオチドは、PLA2R自己抗原またはその断片、ならびに任意で、膜貫通ドメイン、共刺激分子の細胞内ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインをコードし、それにより、該対象において糸球体損傷を阻止するかまたは低下させる。

30

【0203】

1つの態様において、自己抗体媒介性腎臓疾患は、糸球体疾患および一次性膜性腎症、例えば、公知の抗PLA2R自己抗体および／またはBCRによって媒介されるかまたは別の方法で関連している一次性膜性腎症からなる群より選択される。別の態様において、対象はヒトである。

【0204】

いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、CAAR改変T細胞によって惹起される抗自己抗体免疫応答は、能動免疫応答または受動免疫応答でありうる。さらに別の態様において、改変T細胞は、B細胞を標的とする。例えば、自己抗体発現B細胞は、近くの自己抗体発現細胞に対して以前に反応したことがあるCAAR再誘導T細胞による間接破壊を受けやすい可能性がある。

40

【0205】

1つの態様において、本発明の遺伝子改変T細胞は、完全ヒトCAARによって改変される。1つの態様において、完全ヒトCAAR遺伝子改変T細胞は、哺乳動物におけるエクスピボ免疫処置および／またはインビボ治療法のためのワクチンの一種であってもよい。1つの態様において、哺乳動物はヒトである。

【0206】

エクスピボ免疫処置に関しては、細胞を哺乳動物に投与する前に、以下のうちの少なくとも1つをインビトロで行う：i) 細胞の増大、ii) CAARをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入すること、iii) 細胞の凍結保存。

【0207】

50

エクスピボ手順は、当技術分野において周知であり、以下でより詳細に考察する。手短に述べると、細胞を哺乳動物（例えば、ヒト）から単離して、本明細書に開示されたCAARを発現するベクターで遺伝子改変する（すなわち、インビトロで形質導入するかまたはトランスフェクトする）。CAAR改変細胞を哺乳動物レシピエントに投与して、治療的利益を与えることができる。哺乳動物レシピエントはヒトであってもよく、CAAR改変細胞は、レシピエントに対して自己であることができる。あるいは、細胞は、レシピエントに対して同種、同系、または異種であることができる。

【0208】

造血幹細胞および前駆細胞のエクスピボ増大のための手順は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,199,942号に記載されており、本発明の細胞に適用することができる。他の適した方法は当技術分野において公知であり、このため、本発明は、細胞のエクスピボ増大のいずれかの特定の方法に限定されない。手短に述べると、T細胞のエクスピボ培養および増大は、以下を含む：（1）哺乳動物由来のCD34+造血幹細胞および前駆細胞を、末梢血採取物または骨髓エクスプラントから収集すること；ならびに（2）そのような細胞をエクスピボで増大させること。米国特許第5,199,942号に記載された細胞増殖因子に加えて、flt3-L、IL-1、IL-3、およびc-kitリガンドなどの他の因子を、細胞の培養および増大のために用いることができる。

【0209】

エクスピボ免疫処置に関して細胞ベースのワクチンを用いることに加えて、本発明はまた、患者において抗原に対する免疫応答を惹起するための、インビボ免疫処置用の組成物および方法も含む。

【0210】

一般に、本明細書に記載されたように活性化および増大させた細胞を、免疫機能が低下している個体において生じる疾患の処置および予防に利用してもよい。特に、本発明のPLA2R CAAR改変T細胞は、自己抗体の発現に関連する疾患、障害、および状態の処置において用いられる。ある態様において、本発明の細胞は、自己抗体の発現に関連する自己免疫腎臓疾患、障害、および状態を発症するリスクがある患者の処置において用いられる。したがって、本発明は、自己抗体（PLA2R）の発現に関連する自己免疫腎臓疾患、障害、および状態の処置または予防のための方法であって、本発明のCAAR改変T細胞の治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含む、方法を提供する。

【0211】

本発明のCAAR改変T細胞は、単独で、または、希釈剤とおよび／またはIL-2もしくは他のサイトカインもしくは細胞集団などの他の成分と組み合わせた薬学的組成物としてのいずれかで、投与されてもよい。手短に述べると、本発明の薬学的組成物は、本明細書に記載されたような標的細胞集団を、1つまたは複数の薬学的または生理的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて含んでもよい。そのような組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などのような緩衝液；ブドウ糖、マンノース、ショ糖またはデキストラン、マンニトールなどの糖質；タンパク質；ポリペプチド、またはグリシンなどのアミノ酸；酸化防止剤；EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；ならびに保存剤を含んでもよい。本発明の組成物は、1つの局面において、静脈内投与用に製剤化される。

【0212】

本発明の薬学的組成物は、処置（または予防）されるべき疾患に適切な方法で投与される。適切な投与量は臨床試験によって決定されるが、投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患の種類および重症度などの因子によって決定されるであろう。

【0213】

「免疫学的有効量」、「抗BCR有効量」、「自己免疫疾患阻害有効量」、または「治療量」が示される場合、投与されるべき本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および状態における個々の差を考慮して、医師が決定することができる。本明細書に記載されたT細胞を含む薬学的組成物は、細胞1

10

20

30

40

50

$0^4 \sim 10^9$ 個/kg体重、場合によっては細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg体重であって、これらの範囲内のすべての整数値を含む投与量で投与されてもよいと、一般に述べられる。T細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与されてもよい。細胞は、免疫療法において一般的に公知である輸注手法を用いることによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照されたい）。特定の患者のための最適な投与量および処置レジメンは、疾患の徴候に関して患者をモニタリングすること、およびそれに応じて処置を調整することによって、医療の当業者が容易に決定することができる。

【0214】

ある態様において、活性化されたT細胞が、対象に投与される。投与に続いて、血液を再び採取するか、またはアフエレーシスを行い、本明細書に記載された方法を用いてT細胞をそこから活性化および増大させて、次いで、患者に再び輸注して戻す。この過程を、2、3週間毎に複数回実施することができる。ある態様において、T細胞を、10cc~400ccの採取血から活性化させることができる。ある態様において、T細胞は、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、または100ccの採取血から活性化される。理論に拘束されるわけではないが、この複数回の採血／複数回の再輸注プロトコールを用いて、T細胞のある特定の集団を選別することができる。

【0215】

投与される本発明の細胞は、治療を受ける対象に対して自己、同種、または異種であってもよい。

【0216】

本発明の細胞の投与は、エアロゾル吸入、注射、経口摂取、注入、植え付け、または移植を含む、任意の好都合な手段を用いて実施されてもよい。本明細書に記載された組成物は、患者に対して、経動脈的、皮下、皮内、節内、髄内、筋肉内、静脈内（i.v.）注射により、または腹腔内に投与されてもよい。1つの態様において、本発明のT細胞組成物は、皮内注射または皮下注射によって患者に投与される。別の態様において、本発明のT細胞組成物は、i.v.注射によって投与される。T細胞の組成物は、リンパ節、または他の病態生化学的活性の部位中に直接注射されてもよい。

【0217】

本発明のある態様において、本明細書に記載された方法、またはT細胞を治療レベルまで増大させる当技術分野において公知の他の方法を用いて、活性化および増大させた細胞が、免疫抑制剤、例えばアザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノラート、抗体、または他の免疫除去剤、例えばCAMPATH、抗CD3抗体、もしくは他の抗体療法、Cytosan、フルダラビン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および放射線照射などの剤での処置を非限定的に含む、任意の数の関連した処置様式とともに（例えば、その前に、同時に、またはその後に）患者に投与される。これらの薬物は、例えば、カルシウム依存型ホスファターゼのカルシニューリンを阻害する（シクロスポリンおよびFK506）か、または増殖因子誘導性シグナル伝達に重要であるp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）かのいずれかでありうる（Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993）。1つのさらなる態様において、本発明の細胞組成物は、化学療法剤、例えばフルダラビン、外部ビーム放射線療法（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体のいずれかを用いるT細胞除去療法とともに（例えば、その前に、同時に、またはその後に）患者に投与される。別の態様において、本発明の細胞組成物は、CD20と反応する剤、例えば、RituxanなどのB細胞除去療法の後に投与される。さらなる態様において、本発明のT細胞は、補体媒介性細胞傷害のリスクを低下させるための補体阻害剤、または抗FcRn抗体、IVIg、または治療前に抗PLA2R抗体濃度を低下させるための血漿交換と組み合わせて用いられてもよい。さらに他の態様において、軽度のリンパ球枯渇レジメン（例えば、低用量フルダラビンまたはCytosan）が、本発明のT細胞での処置に先行してもよい。

【0218】

患者に投与される上記の治療の投与量は、治療される病状および治療のレシピエントの正確な性質に応じて異なると考えられる。ヒトへの投与に関する投与量の増減は、当技術分野において許容される実践に従って行うことができる。例えば、CAMPATHの用量は、一般に成人患者について1～約100mgの範囲であり、通常は1～30日の期間にわたって毎日投与される。好ましい一日量は1～10mg/日であるが、場合によっては、最大40mg/日までのより多くの用量を用いることもできる（米国特許第6,120,766号に記載）。

【実施例】

【0219】

実験例

ここで本発明を、以下の実験例を参照しながら説明する。これらの例は例示のみを目的として提供されるものであり、本発明はこれらの例に限定されるとは全くみなされるべきではなく、本明細書で提供される教示の結果として明らかになる任意かつすべての変更も包含するとみなされるべきである。

【0220】

それ以上の説明がなくても、当業者は、前記の説明および以下の例示的な例を用いて、本発明の化合物を作成して利用し、請求される方法を実施することができる。以下の実施例は、このため、本発明の好ましい態様を具体的に指摘しており、本開示の残りを限定するものとは全くみなされるべきでない。

【0221】

本明細書に開示された実験の実行において用いた材料および方法を、次に説明する。

【0222】

- CAAR構築物

A) PLA2R-CAAR構築物4027.CF12に含まれるドメイン

システインリッチ（CysR）ドメイン（リシンB型レクチンドメイン）（SEQ ID NO: 1）
AAGGGCATCTTCGTGATCCAGAGCGAGAGCCTGAAGAAGTGCATCCAGGCCG
GCAAGAGCGTGCTGACCCCTGGAAAATTGCAAGCAGGCCAACAAAGCACATGC
TGTGGAAATGGGTGTCCAACACGGCCTGTTCAACATCGGCGGCTCTGGATG
TCTGGGCCTGAATTTCTCTGCCCTGAGCAGCCTCTGAGCCTGTACGAGTGTG
ATAGCACCCCTGGTGTCCCTGAGATGGCGGTGCAACCGGAAGATGATCACAGG
CCCTCTGCAGTACTCTGTGCAGGTCGCCCACGACAATACCGTGGTGGCCAGC
AGAAAGTACATCCACAAGTGGATCAGCTACGGCAGCGGCGGAGGCGACATC
TGTGAATAC

リシンB型レクチンドメインとフィブロネクチンII型ドメインとの間のリンカー（SEQ ID NO: 2）

CTGCACAAGGATCTGCACACCATCAAGGGCAAC

フィブロネクチン2型ドメイン（SEQ ID NO: 3）

ACCCACGGAATGCCCTGCATGTTCCCGTTTCAGTACAACCACCAAGTGGCACC
ACGAGTGCACCAGAGAAGGCAGAGAGGACGACCTGCTTTGGTGCGCCACAA
CCAGCAGATACGAGCGGGATGAGAAGTGGGGCTTCTGCCCTGAT

フィブロネクチンII型ドメインとC型レクチンドメイン1との間のリンカー（SEQ ID NO: 4）

CCTACCTCTGCCGAAGTGGGCTGCGATACCATCTGGGAGAAAGACCTG

C型レクチンドメイン1（SEQ ID NO: 5）

AACAGCCACATCTGCTACCAGTTCAACCTGCTGTCCAGCCTGTCTTGGAGCGA
GGCCACAGCAGCTGTCAAATGCAAGGCGGCACACTGCTGAGCATCACCGAC
GAGACAGAGGAAAACCTTCATCCGCGAGCACATGAGCAGCAAGACCGTGGAA
GTGTGGATGGGACTGAACCAGCTGGATGAGCATGCCGGATGGCAGTGGAGTG
ATGGCACCCCTCTGAACTACCTGAACTGGTCCCCTGAAGTGAACTTCGAGCC
CTTCGTGGAAGATCACTGCGGCACCTTCAGCAGCTTCATGCCCAGCGCTTGG
AGAAGCAGAGACTGCGAGAGCACCTGCCTTACATCTGCAAG

C型レクチンドメイン1とC型レクチンドメイン2との間のリンカー (SEQ ID NO: 6)
AAGTACCTGAACCACATCGACCACGAGATCGTGGAAAAGGACGCCTGGAAG
TACTACGCCACACACTGCGAGCCTGGCTGGAACCCC

10

C型レクチンドメイン2 (SEQ ID NO: 7)

TACAACCGGAACTGCTACAAGCTGCAGAAAAGAGGAAAAGACCTGGCACGAG
GCCCTGAGAAGCTGCCAGGCCGATAATAGCGCCCTGATCGACATCACAAGCC
TGGCCGAGGTGGAATTTCTGGTCACTCTGCTGGGCGACGAGAACGCCTCTGA
GACATGGATCGGCCTGTCCAGCAACAAGATCCCCGTGTCCTTCGAGTGGTCC
AACGACAGCAGCGTGATCTTCACCAACTGGCACACCCTGGAACCTCACATCT
TCCCCAACAGATCCCAGCTGTGTGTGTCCGCCGAGCAGTCTGAAGGCCACTG
GAAAGTGAAGAACTGCGAGGAACGGCTGTTCTACATCTGTAAA

20

PLA2R CAAR構築物4027.CF12の細胞外ドメイン (SEQ ID NO: 8 ; 図2D参照)

AAGGGCATCTTCGTGATCCAGAGCGAGAGCCTGAAGAAGTGCATCCAGGCCG
GCAAGAGCGTGCTGACCCTGGAAAATTGCAAGCAGGCCAACAGCACATGC
TGTGGAATGGGTGTCCAACCACGGCCTGTTCAACATCGGCGGCTCTGGATG
TCTGGGCCTGAATTTCTCTGCCCTGAGCAGCCTCTGAGCCTGTACGAGTGTG
ATAGCACCCCTGGTGTCCCTGAGATGGCGGTGCAACCGGAAGATGATCACAGG
CCCTCTGCAGTACTCTGTGCAGGTCGCCACGACAATACCGTGGTGGCCAGC
AGAAAGTACATCCACAAGTGGATCAGCTACGGCAGCGGCGGAGGCGACATC
TGTGAATACCTGCACAAGGATCTGCACACCATCAAGGGCAACACCCACGGAA
TGCCCTGCATGTTCCCGTTTCAGTACAACCACAGTGGCACACGAGTGCACC
AGAGAAGGCAGAGAGGACGACCTGCTTTGGTGCGCCACAACCAGCAGATAC
GAGCGGGATGAGAAGTGGGGCTTCTGCCCTGATCCTACCTCTGCCGAAGTGG
GCTGCGATACCATCTGGGAGAAAGACCTGAACAGCCACATCTGCTACCAGTT
CAACCTGCTGTCCAGCCTGTCTTGGAGCGAGGCCACAGCAGCTGTCAAATG
CAAGGCGGCACACTGCTGAGCATCACCGACGAGACAGAGGAAAACCTTCATC
CGCGAGCACATGAGCAGCAAGACCGTGGAAGTGTGGATGGGACTGAACCAG
CTGGATGAGCATGCCGGATGGCAGTGGAGTGTGGCACCCCTCTGAACTACC
TGAAGTGGTCCCCTGAAGTGAAGTTCGAGCCCTTCGTGGAAGATCACTGCGG
CACCTTCAGCAGCTTCATGCCCAGCGCTTGGAGAAGCAGAGACTGCGAGAGC
ACCCTGCTTACATCTGCAAGAAGTACCTGAACCACATCGACCACGAGATCG
TGGAAGAGGACGCCTGGAAGTACTACGCCACACACTGCGAGCCTGGCTGGA
ACCCCTACAACCGGAACTGCTACAAGCTGCAGAAAGAGGAAAAGACCTGGC
ACGAGGCCCTGAGAAGCTGCCAGGCCGATAATAGCGCCCTGATCGACATCAC
AAGCCTGGCCGAGGTGGAATTTCTGGTCACTCTGCTGGGCGACGAGAACGCC
TCTGAGACATGGATCGGCCTGTCCAGCAACAAGATCCCCGTGTCCTTCGAGT
GGTCCAACGACAGCAGCGTGATCTTCACCAACTGGCACACCCTGGAACCTCA
CATCTTCCCCAACAGATCCCAGCTGTGTGTGTCCGCCGAGCAGTCTGAAGGC
CACTGGAAAGTGAAGAACTGCGAGGAACGGCTGTTCTACATCTGTAAA

30

40

構築物4027.CF12の細胞外ドメイン (SEQ ID NO: 70)

50

KGIFVIQSESLKKCIQAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWVSNHGLFNIGGSGCLG
LNFSAPEQPLSLYECDSLVSRLWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYI
HKWISYGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQBWHHECTREGRE
DDLWCATTSRYERDEKWGFCPDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNLLSSLS
WSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQLDEHAGWQW
SDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRSRDCESTLPYICKKYLNH
IDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQKEEKTWHEALRSCQADNSAL
IDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNKIPVSFEWSNDSSVIFTNWHLEPHIF
PNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNCEERLFYICKKAGHVLSDAESGCQ

10

C型レクチンドメイン2とCD8ヒンジとの間のリンク (SEQ ID NO: 9)

AAGGCCGGCCACGTGCTGTCCGATGCCGAGAGTGGATGTCAATCCGGA

CD8ヒンジ (SEQ ID NO: 10)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGC
AGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGT

PLA2R-CAAR構築物4027.CF12の核酸配列 (SEQ ID NO: 11)

20

30

40

50

ATGCTGCTGAGCCCTAGCCTGCTGCTGCTCCTGCTTCTTGGAGCCCCCTAGAGG
ATGTGCCGGATCTGAAGGTGTTGCCGCCGCTCTGACACCCGAGAGACTGCTG
GAATGGCAGGACAAGGGCATCTTCGTGATCCAGAGCGAGAGCCTGAAGAAG
TGCATCCAGGCCGGCAAGAGCGTGCTGACCCTGGAAAATTGCAAGCAGGCCA
ACAAGCACATGCTGTGGAAATGGGTGTCCAACCACGGCCTGTTCAACATCGG
CGGCTCTGGATGTCTGGGCCTGAATTTCTCTGCCCCTGAGCAGCCTCTGAGCC
TGTACGAGTGTGATAGCACCTGGTGTCCCTGAGATGGCGGTGCAACCGGAA
GATGATCACAGGCCCTCTGCAGTACTCTGTGCAGGTCGCCCCACGACAATACC
GTGGTGGCCAGCAGAAAGTACATCCACAAGTGGATCAGCTACGGCAGCGGC
GGAGGCGACATCTGTGAATACCTGCACAAGGATCTGCACACCATCAAGGGCA
ACACCCACGGAATGCCCTGCATGTTCCCGTTTCAGTACAACCACCAGTGCCA
CCACGAGTGCACCAGAGAAGGCAGAGAGGACGACCTGCTTTGGTGCGCCAC
AACCAGCAGATACGAGCGGGATGAGAAGTGGGGCTTCTGCCCTGATCCTACC
TCTGCCGAAGTGGGCTGCGATACCATCTGGGAGAAAGACCTGAACAGCCACA
TCTGCTACCAGTTCAACCTGCTGTCCAGCCTGTCTTGGAGCGAGGCCACAGC
AGCTGTCAAATGCAAGGCGGCACACTGCTGAGCATCACCGACGAGACAGAG
GAAAACCTTCATCCGCGAGCACATGAGCAGCAAGACCGTGGAAGTGTGGATG
GGACTGAACCAGCTGGATGAGCATGCCGGATGGCAGTGGAGTGATGGCACCC
CTCTGAACTACCTGAACTGGTCCCCTGAAGTGAACCTTCGAGCCCTTCGTGGAA
GATCACTGCGGCACCTTCAGCAGCTTCATGCCCAGCGCTTGGAGAAGCAGAG
ACTGCGAGAGCACCCCTGCCTTACATCTGCAAGAAGTACCTGAACCACATCGA
CCACGAGATCGTGGAAGAGGACGCCTGGAAGTACTACGCCACACACTGCGA
GCCTGGCTGGAACCCCTACAACCGGAACTGCTACAAGCTGCAGAAAGAGGA
AAAGACCTGGCACGAGGCCCTGAGAAGCTGCCAGGCCGATAATAGCGCCCT
GATCGACATCACAAGCCTGGCCGAGGTGGAATTTCTGGTCACTCTGCTGGGC
GACGAGAACGCCTCTGAGACATGGATCGGCCTGTCCAGCAACAAGATCCCCG
TGTCCTTCGAGTGGTCCAACGACAGCAGCGTGATCTTCACCAACTGGCACAC
CCTGGAACCTCACATCTTCCCCAACAGATCCCAGCTGTGTGTGTCCGCCGAGC
AGTCTGAAGGCCACTGGAAAGTGAAGAACTGCGAGGAACGGCTGTTCTACAT
CTGTAAAAAGGCCGGCCACGTGCTGTCCGATGCCGAGAGTGGATGTCAATCC
GGAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGT
CGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGC
AGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCC
TTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC
AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA
AGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
CCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAA
CTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA
GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCT
AA

10

20

30

40

PLA2R-CAARのアミノ酸配列（構築物4027.CF12；SEQ ID NO: 12）

50

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAGSEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCIQA
GKSVLTLENCKQANKHMLWKWVSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQPLSLYECD
STLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYSGGGGDICEY
LHKDLHTIKGNTHGMPCMFPFQYNHQWHHECTREGREDDLLWCATTSRYERDE
KWGFCDPDTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNLLSSLWSWSEAHSSCQMGGTLL
SITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVN
FEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYAT
HCEPGWNPYNRNCYKLQKEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLG
DENASETWIGLSSNKIPVSFEWSNDSSVIFTNWHITLPHIFPNRSQLCVSAEQSEG
HWKVKNCEERLFYICKKAGHVLSDAESGCQSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP
EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

【0223】

B) PLA2R-CAAR構築物4028.CF123に含まれるドメイン

システインリッチ (CysR) ドメイン (リシンB型レクチンドメイン) (SEQ ID NO: 1)
リシンB型レクチンドメインとフィブロネクチンII型ドメインとの間のリンカー (SEQ ID NO: 2)

フィブロネクチンII型ドメイン (SEQ ID NO: 3)

20

フィブロネクチンII型ドメインとC型レクチンドメイン1との間のリンカー (SEQ ID NO: 4)

C型レクチン1ドメイン (SEQ ID NO: 5)

C型レクチンドメイン1とC型レクチンドメイン2との間のリンカー (SEQ ID NO: 6)

C型レクチンドメイン2 (SEQ ID NO: 7)

C型レクチンドメイン2とC型レクチンドメイン3との間のリンカー (SEQ ID NO: 13)

AAGGCCGGCCACGTGCTGTCCGATGCCGAGAGTGGATGTCAAGAAGGCTGGG
AGAGA

C型レクチンドメイン3 (SEQ ID NO: 14)

30

CACGGCGGCTTTTGCTACAAGATCGACACCGTGCTGCGGAGCTTCGATCAGG
CCAGCAGCGGCTACTATTGCCCTCCTGCTCTGGTCACCATCACCAACAGATTC
GAGCAGGCCTTCATCACCAGCCTGATCAGCAGCGTCGTGAAGATGAAGGACA
GCTACTTCTGGATCGCCCTGCAGGACCAGAACGACACCGGCGAGTACACATG
GAAGCCCGTGGAACAGAAACCCGAGCCTGTGCAGTACACCCACTGGAACAC
ACACCAGCCTAGATACTCCGGCGGCTGCGTGGAATGAGAGGCAGACATCCT
CTCGGCAGATGGGAAGTGAAGCACTGTGCGCACTTCAAGGCCATGTCTCTGT
GC

PLA2Rの細胞外ドメイン (SEQ ID NO: 15 ; 図2D、構築物4028.CF123参照)

40

AAGGGCATCTTCGTGATCCAGAGCGAGAGCCTGAAGAAGTGCATCCAGGCCG
GCAAGAGCGTGCTGACCCTGGAAAATTGCAAGCAGGCCAACAAAGCACATGC
TGTGGAAATGGGTGTCCAACCACGGCCTGTTCAACATCGGCGGCTCTGGATG
TCTGGGCCTGAATTTCTCTGCCCTGAGCAGCCTCTGAGCCTGTACGAGTGTG
ATAGCACCCCTGGTGTCCCTGAGATGGCGGTGCAACCGGAAGATGATCACAGG
CCCTCTGCAGTACTCTGTGCAGGTCGCCCACGACAATACCGTGGTGGCCAGC
AGAAAGTACATCCACAAGTGGATCAGCTACGGCAGCGGCGGAGGCGACATC
TGTGAATACCTGCACAAGGATCTGCACACCATCAAGGGCAACACCCACGGAA
TGCCCTGCATGTTCCCGTTTCAGTACAACCACCAGTGGCACCACGAGTGCACC
AGAGAAGGCAGAGAGGACGACCTGCTTTGGTGCGCCACAACCAGCAGATAC
GAGCGGGATGAGAAGTGGGGCTTCTGCCCTGATCCTACCTCTGCCGAAGTGG
GCTGCGATACCATCTGGGAGAAAGACCTGAACAGCCACATCTGCTACCAGTT
CAACCTGCTGTCCAGCCTGTCTTGAGCGAGGCCCACAGCAGCTGTCAAATG
CAAGGCGGCACACTGCTGAGCATCACCGACGAGACAGAGGAAAACCTTCATC
CGCGAGCACATGAGCAGCAAGACCGTGGAAGTGTGGATGGGACTGAACCAG
CTGGATGAGCATGCCGGATGGCAGTGGAGTGTGGCACCCTCTGAACTACC
TGAAGTGGTCCCCTGAAGTGAAGTTCGAGCCCTTCGTGGAAGATCACTGCGG
CACCTTCAGCAGCTTCATGCCCAGCGCTTGGAAGAAGCAGAGACTGCGAGAGC
ACCCTGCCTTACATCTGCAAGAAGTACCTGAACCACATCGACCACGAGATCG
TGGAAAAGGACGCCTGGAAGTACTACGCCACACACTGCGAGCCTGGCTGGA
ACCCCTACAACCGGAACTGCTACAAGCTGCAGAAAGAGGAAAAGACCTGGC
ACGAGGCCCTGAGAAGCTGCCAGGCCGATAATAGCGCCCTGATCGACATCAC
AAGCCTGGCCGAGGTGGAATTTCTGGTCACTCTGCTGGGCGACGAGAACGCC
TCTGAGACATGGATCGGCCTGTCCAGCAACAAGATCCCCGTGTCCTTCGAGT
GGTCCAACGACAGCAGCGTGATCTTCACCAACTGGCACACCCTGGAACCTCA
CATCTTCCCCAACAGATCCCAGCTGTGTGTGTCCGCCGAGCAGTCTGAAGGC
CACTGGAAAGTGAAGAACTGCGAGGAACGGCTGTTCTACATCTGTAAAAAGG
CCGGCCACGTGCTGTCCGATGCCGAGAGTGGATGTCAAGAAGGCTGGGAGAG
ACACGGCGGCTTTTGCTACAAGATCGACACCGTGCTGCGGAGCTTCGATCAG
GCCAGCAGCGGCTACTATTGCCCTCCTGCTCTGGTCAACATCACCAACAGATT
CGAGCAGGCCTTCATCACAGCCTGATCAGCAGCGTCGTGAAGATGAAGGAC
AGCTACTTCTGGATCGCCCTGCAGGACCAGAACGACACCGGCGAGTACACAT
GGAAGCCCGTGGGACAGAAACCCGAGCCTGTGCAGTACACCCACTGGAACA
CACACCAGCCTAGATACTCCGGCGGCTGCGTGGCAATGAGAGGCAGACATCC
TCTCGGCAGATGGGAAGTGAAGCACTGTGCGCACTTCAAGGCCATGTCTCTG
TGC

10

20

30

構築物4028.CF123の細胞外ドメイン (SEQ ID NO: 71)

KGIFVIQSESLKKCIQAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWVSNHGLFNIGSGCLG
LNFSAPEQPLSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYI
HKWISYSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFPFQYNHQWHHECTREGRE
DDLLWCATTSRYERDEKWGFCPDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNLLSSL
WSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQLDEHAGWQW
SDGTPLNLYLNSWPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRSRDCESTLPYICKKYLNH
IDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQKEEKTWHEALRSCQADNSAL
IDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNKIPVSFEWSNDSSVIFTNWHLEPHIF
PNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNCEERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGG
FCYKIDTVLRSFDQASSGYYPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIAL
QDQNDTGEYTWKPVGQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEV
KHCRHFKAMSLCKQPVENQEKA EYEERWPFHPCYL

40

C型レクチンドメイン3とCD8ヒンジとの間のリンカー (SEQ ID NO: 16)

50

AAGCAGCCCGTGGAATAATCAAGAGAAGGCCGAGTACGAGGAACGCTGGCCT
TTTCACCCCTTGCTACCTGTCCGGA

CD8ヒンジ (SEQ ID NO: 10)

PLA2R-CAARの核酸配列 (構築物4028.CF123 ; SEQ ID NO: 17)

ATGCTGCTGAGCCCTAGCCTGCTGCTGCTCCTGCTTCTTGGAGCCCCTAGAGG
ATGTGCCGGATCTGAAGGTGTTGCCGCCGCTCTGACACCCGAGAGACTGCTG
GAATGGCAGGACAAGGGCATCTTCGTGATCCAGAGCGAGAGCCTGAAGAAG
TGCATCCAGGCCCGCAAGAGCGTGCTGACCCTGGAAAATTGCAAGCAGGCCA

10

ACAAGCACATGCTGTGGAATGGGTGTCCAACCACGGCCTGTTCAACATCGG
CGGCTCTGGATGTCTGGGCCTGAATTTCTCTGCCCCTGAGCAGCCTCTGAGCC
TGTACGAGTGTGATAGCACCCCTGGTGTCCCTGAGATGGCGGTGCAACCGGAA
GATGATCACAGGCCCTCTGCAGTACTCTGTGCAGGTCGCCCACGACAATACC
GTGGTGGCCAGCAGAAAGTACATCCACAAGTGGATCAGCTACGGCAGCGGC
GGAGGCGACATCTGTGAATACCTGCACAAGGATCTGCACACCATCAAGGGCA
ACACCCACGGAATGCCCTGCATGTTCCCGTTTCAGTACAACCACCAGTGGCA
CCACGAGTGCACCAGAGAAGGCAGAGAGGACGACCTGCTTTGGTGCGCCAC
AACCAGCAGATACGAGCGGGATGAGAAGTGGGGCTTCTGCCCTGATCCTACC
TCTGCCGAAGTGGGCTGCGATACCATCTGGGAGAAAGACCTGAACAGCCACA
TCTGCTACCAGTTCAACCTGCTGTCCAGCCTGTCTTGGAGCGAGGCCACAGC
AGCTGTCAAATGCAAGGCGGCACACTGCTGAGCATCACCGACGAGACAGAG
GAAAACCTTCATCCGCGAGCACATGAGCAGCAAGACCGTGGAAGTGTGGATG
GGACTGAACCAGCTGGATGAGCATGCCGGATGGCAGTGGAGTGTGGCAGCC
CTCTGAACTACCTGAACTGGTCCCCTGAAGTGAACCTCGAGCCCTTCGTGGAA
GATCACTGCGGCACCTTCAGCAGCTTCATGCCCAGCGCTTGGAGAAGCAGAG
ACTGCGAGAGCACCCCTGCCTTACATCTGCAAGAAGTACCTGAACCACATCGA
CCACGAGATCGTGGAAGAGGACGCCTGGAAGTACTACGCCACACACTGCGA
GCCTGGCTGGAACCCCTACAACCGGAAGTGTGCTACAAGCTGCAGAAAGAGGA
AAAGACCTGGCAGCAGAGGCCCTGAGAAGCTGCCAGGCCGATAATAGCGCCCT
GATCGACATCACAAGCCTGGCCGAGGTGGAATTTCTGGTCACTCTGCTGGGC
GACGAGAACGCCTCTGAGACATGGATCGGCCTGTCCAGCAACAAGATCCCCG
TGTCCTTCGAGTGGTCCAACGACAGCAGCGTGATCTTCACCAACTGGCACAC
CCTGGAACCTCACATCTTCCCCAACAGATCCCAGCTGTGTGTGTCCGCCGAGC
AGTCTGAAGGCCACTGGAAAGTGAAGAACTGCGAGGAACGGCTGTTCTACAT
CTGTAAAAAGGCCGGCCACGTGCTGTCCGATGCCGAGAGTGGATGTCAAGAA
GGCTGGGAGAGACACGGCGGCTTTTGTCTACAAGATCGACACCGTGCTGCGGA
GCTTCGATCAGGCCAGCAGCGGCTACTATTGCCCTCCTGCTCTGGTCACCATC
ACCAACAGATTTCGAGCAGGCCTTCATCACCAAGCCTGATCAGCAGCGTCGTGA
AGATGAAGGACAGCTACTTCTGGATCGCCCTGCAGGACCAGAACGACACCGG
CGAGTACACATGGAAGCCCGTGGGACAGAAACCCGAGCCTGTGCAGTACAC
CCACTGGAACACACACCAGCCTAGATACTCCGGCGGCTGCGTGGCAATGAGA
GGCAGACATCCTCTCGGCAGATGGGAAGTGAAGCACTGTGCGCACTTCAAGG
CCATGTCTCTGTGCAAGCAGCCCGTGGAATAATCAAGAGAAGGCCGAGTACGA
GGAACGCTGGCCTTTTACCCCTTGCTACCTGTCCGGAACACGACGCCAGCG
CCGCGACCAACACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGC
GCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGC
TGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGG
GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAA
ACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTG
AACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGG
GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG
ATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGA
GAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGA
TGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCA
AGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
CGACGCCCTTCATATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

20

30

40

50

PLA2R-CAARのアミノ酸配列（構築物4028.CF123；SEQ ID NO: 18）

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAGSEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCIQA
GKSVLTLENCKQANKHMLWKWVSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQPLSLYECD
STLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYSGGGDICEY
LHKDLHTIKGNTHGMPCMFPFQYNHQWHHECTREGREDDLLWCATTSTRYERDE
KWGFCDPDTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNLLSSLWSSEAHSSCQMGGTLL
SITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVN
FEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYAT
HCEPGWNPYNRNCYKLQKEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLG
DENASETWIGLSSNKIPVSFEWSNDSSVIFTNWHLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEG
HWKVKNCEERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQA
SSGYYCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKPV
GQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKAMSLCKQP
VENQEKA EYEERWPFHPCYLSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA
VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

pTRPE.CysR.CD8H.BBz CAAR（構築物C）のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 25）

<i>IgG</i> シグナルペプチド	1-57 (SEQ ID NO: 46)
CysR	64-459 (SEQ ID NO: 47)
CD8 ヒンジ領域	466-630 (SEQ ID NO: 64)
CD8 TMD	631-702 (SEQ ID NO: 20)
4-1BB 細胞内ドメイン	703-828 (SEQ ID NO: 66)
CD3ζ 細胞内ドメイン	829-1164 (SEQ ID NO: 24)
終止コドン	1165-1167

20

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAG
*TGC*_{gcatcc}*AAAGGAATATTTGTCATTTCAGTCAGAGTCTTTGAAAAAGTGCATAC*
AGGCTGGAAAAAGCGTGCTTACCCTGGAGAACTGCAAGCAAGCTAATAAGC
ATATGCTTTGGAAATGGGTTAGCAACCACGGACTCTTTAATATCGGAGGCTCC
GGCTGTCTGGGCCTGAACTTCAGTGCACCGGAGCAACCGCTTCTCTGTACGA
ATGTGATAGCACACTTGTTAGTCTTCGGTGGCGGTGTAACCGAAAAATGATT
ACAGGCCCTCTGCAATATAGTGTTCAAGTGGCCACGACAATACAGTTGTGG
CGTCTAGAAAAATATATTCACAAAGTGGATTTCTACGGGAGCGGCGGAGGGGA
*TATATGTGAATATCTTCACAAAGACTTGCATACAATC*_{gctagc}*TTCGTGCCGGTCT*
TCCTGCCAGCGAAGCCAACACGACGCCAGCACCGCGACCACCAACACCTGCGC
CCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCAGACCAGCAG
CGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATC
TGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTA
TCACCCTTTACTGCAAGCGCGGTGCAAGAACTGCTCTATATTTTAAACA
GCCATTTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGGAGGACGGATGTTCTCTGT
AGATTTCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGCAGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGC
AGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC
GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGT
GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA
GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAG
ATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTAC
CAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG
CCCTGCCCCCTCGCTAA

30

40

50

pTRPE.CysR.CD8H.BBz CAAR (構築物C) のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 26)

<u>IgG シグナルペプチド</u>	1-19 (SEQ ID NO: 48)
<u>CysR</u>	22-153 (SEQ ID NO: 49)
<u>CD8 ヒンジ領域</u>	156-210 (SEQ ID NO: 44)
CD8 TMD	211-234 (SEQ ID NO: 19)
<u>4-1BB 細胞内ドメイン</u>	235-276 (SEQ ID NO: 21)
<u>CD3 ζ 細胞内ドメイン</u>	277-388 (SEQ ID NO: 45)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGSKGIFVIQSESLKKCIQAGKSVLTLENCKQANKH
MLWKWVSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAP EQPLSLYEC DSTLVSLRWRCNRKMITG
PLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYGS GGGDICEYLHKDLHTIASFVPVFLPA
KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVOTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPOEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR

10

pTRPE.CysR-FNII-CTLD1.CD8H.BBz CAAR (構築物CF1) のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 27)

<u>IgG シグナルペプチド</u>	1-57 (SEQ ID NO: 46)
<u>CysR-FNII-CTLD1</u>	64-1053 (SEQ ID NO: 50)
<u>CD8 ヒンジ領域</u>	1060-1224 (SEQ ID NO: 64)
CD8 TMD	1225-1296 (SEQ ID NO: 20)
<u>4-1BB 細胞内ドメイン</u>	1297-1422 (SEQ ID NO: 66)
<u>CD3 ζ 細胞内ドメイン</u>	1423-1758 (SEQ ID NO: 24)
終止コドン	1759-1761

20

30

40

50

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAG
TGCg gatccAAAGGGATCTTTGTTATACAAAGTGAGAGCTTGAAAAAATGTATA
CAGGCTGGCAAAAGTGTACTGACTCTTGAAAATTGCAAACAAGCCAACAAAC
ACATGCTGTGGAAATGGGTGTCTAATCACGGTCTCTTCAATATTGGGGGAAG
TGGATGCCTCGGCCTGAATTTCTCCGCTCCCGAACAGCCCCCTCTCACTTTATG
AGTGTGATTCAACTCTGGTGTCTTGAGGTGGCGATGTAACCGCAAGATGAT
AACCGGCCCCCTCCAGTATTCCGTCCAAGTAGCACACGACAATACCGTGGTG
GCATCTAGGAAATACATTCATAAGTGGATATCTTATGGCAGTGGTGGCGGTG
ACATATGCGAGTACCTGCACAAGGACCTCCACACAATAAAGGGGAACACGC
ACGGGATGCCGTGTATGTTCCCGTTCCAATATAATCATCAATGGCACCATGAG
TGTACGAGAGAGGGGCGAGAAGACGACCTCCTGTGGTGTGCGACCACCTCAA
GATATGAACGGGATGAGAAGTGGGGCTTTTGCCCCGACCCAACCTCCGCCGA
GGTTGGTTGCGACACTATTTGGGAAAAAGATTTGAACAGTCATATATGCTATC
AATTTAATTTGTTGAGTTCACCTCTCCTGGAGCGAAGCGCACAGCTCTTGTGAG
ATGCAAGGTGGTACATTGCTTAGCATTACTGATGAAACTGAGGAGAATTTCA
TTAGGGAGCATATGTCCTCAAAGACAGTAGAGGTGTGGATGGGTCTGAACCA
GCTCGACGAACACGCCGGTTGGCAGTGGTCAGATGGAACGCCTCTGAATTAT
CTCAACTGGTCCCCTGAGGTCAACTTTGAACCGTTTGTGGAAGATCATTGTGG
TACTTTTTCCAGTTTTATGCCAAGCGCCTGGCGAAGCCGAGACTGCGAGTCTA
CGTTGCCCTATATCTGCAAGAAGTATTTGAATCACATAGATCATGAAATTGTT
GAAgctagcTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCAACCACGACGCCAGCACC
GCGACCACCAACACCTGCGCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCC
AGAGGCGTGCAGACCAGCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACT
TCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTC
CTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAGCGCGGTTCGCAAGAA
ACTGCTCTATATTTTTAAACAGCCATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAG
AGGAGGACGGATGTTTCCTGTAGATTTTCCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGGC
AGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG
GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG
ATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGA
GAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGA
TGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCA
AGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

10

20

30

pTRPE.CysR-FNII-CTLD1.CD8H.BBz CAAR (構築物CF1) のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 28)

IgG シグナルペプチド	1-19 (SEQ ID NO: 48)
<u>CysR-FNII-CTLD1</u>	22-351 (SEQ ID NO: 51)
CD8 ヒンジ領域	354-408 (SEQ ID NO: 43)
CD8 TMD	409-432 (SEQ ID NO: 19)
<u>4-1BB 細胞内ドメイン</u>	433-474 (SEQ ID NO: 21)
<u>CD3 ζ 細胞内ドメイン</u>	475-586 (SEQ ID NO: 45)

40

50

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGSKGIFVIOSESLKKCIQAGKSVLTLENCKQANKHML
WKWVSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQPLSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPL
QYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCM
FPFQYNHQWHHECTREGREDDLLWCATTSTRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTI
WEKDLNSHICYQFNLLSSLWSSEAHSSCOMQGGTLLSITDETEENFIREHMSSKT
VEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPS
AWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEASFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQ
PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR
KKLLYIFKQPFMRPVOTTOEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYOQGO
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

pTRPE.CysR-FNII-CTLD1-3.GS linker.BBz CAAR (構築物CF123) のヌクレオチド配

列 (SEQ ID NO: 29)

IgG シグナルペプチド

1-57 (SEQ ID NO: 46)

CysR-FNII-CTLD1-3

64-1911 (SEQ ID NO: 52)

GS リンカー

1918-1947 (SEQ ID NO: 68)

CD8 TMD

1954-2025 (SEQ ID NO: 20)

4-1BB 細胞内ドメイン

2026-2151 (SEQ ID NO: 66)

CD3 ζ 細胞内ドメイン

2152-2487 (SEQ ID NO: 24)

終止コドン

2488-2490

20

30

40

50

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAG
TGC_{cgatcc}AAAGGGATTTTCGTGATACAGTCCGAGAGTCTCAAAAAGTGTATC
CAGGCAGGCAAAAGTGTCTCACTCTGGAAACTGCAAACAAGCGAACAAG
CACATGTTGTGGAAGTGGGTAGTAACCATGGACTGTTCAACATCGGAGGTA
GTGGATGCCTTGGTCTCAATTTCTCTGCTCCGGAACAGCCTTTGTCACTGTAC
GAATGCGACTCCACTCTCGTTAGTCTTAGATGGCGATGCAATCGCAAAATGA
TTACGGGACCACTTCAATATTCAGTTCAAGTGGCACATGATAACACCGTAGT
GGCCTCACGGAAATACATCCATAAATGGATTTCTTATGGTAGCGGGGGCGGC
GATATATGTGAATACCTCCATAAGGATCTCCACACCATTAAGGGTAATACTC
ACGGTATGCCGTGTATGTTTCCTTTTCAGTACAATCATCAGTGGCATCATGAA
TGCACGAGGGAAGGACGCGAGGACGATTTGCTCTGGTGCGCAACCACCTCAC
GCTACGAGAGAGACGAAAAATGGGGCTTTTGCCCGGACCCCACTAGTGCTGA
GGTAGGATGTGATACGATTTGGGAAAAGGATTTGAATTCTCATATTTGCTACC
AGTTTAATCTTCTTTCATCCCTGTCTGGTCTGAGGCTCATTCTAGTTGCCAGA
TGCAAGGTGGGACTTTGCTTTCAATTACTGACGAGACTGAGGAAAATTTTATC
CGAGAGCATATGTCTTCTAAAACCGTAGAGGTATGGATGGGCCTGAACCAAT
TGGACGAACACGCGGGCTGGCAGTGGAGCGACGGGACACCTCTCAACTACCT
TAATTGGAGCCCTGAGGTAACTTTGAACCGTTTGTGAGGATCACTGCGGA
ACTTTCAGCAGCTTCATGCCTAGTGCATGGCGGTCCCGAGACTGTGAGAGCA
CCCTTCCATACATATGTAAAAAATACCTCAATCACATAGACCACGAGATCGT
AGAGAAGGATGCATGGAAATATTATGCTACGCACTGTGAGCCGGGATGGAAT
CCTTATAACCGCAACTGTTACAAGCTGCAAAAAGAAGAGAAGACATGGCATG
AGGCGCTGCGCTCATGTCAAGCGGACAATTCTGCACTTATAGATATAACTAG
TTTGCGGAGGGTAGAATTTTGGTTACGTTCTCGGCGATGAGAATGCGTCCG
AGACGTGGATAGGGTTGTCAAGCAATAAAATTCCTGTAAGTTTGAATGGTC
AAATGACTCTTCTGTCTCTTCACCAATTGGCACACACTCGAACCCCATATCT
TCCCAAACCGAAGCCAGTTGTGTGTGACGCGCTGAGCAATCAGAAGGACATTG
GAAAGTTAAAACTGTGAAGAAAGACTGTTCTACATCTGTAAGAAGGCAGGA
CATGTGCTTTCAGATGCGGAAAGCGGCTGTCAAGAAGGTTGGGAGCGCCATG
GAGGTTTCTGTTATAAAATCGACACAGTTTTGCGATCTTTCGATCAGGCTTCA

10

20

30

AGCGGGTACTATTGTCCTCCTGCACTGGTTACAATCACGAACCGGTTTGAACA
GGCTTTTATAACTTCTTTGATTTCAGCGTGGTTAAAATGAAGGACTCTTATTT
CTGGATAGCCCTGCAAGACCAAAATGATACCGGTGAGTACACATGGAAACCG
GTAGGTCAAAGCCAGAGCCAGTCCAGTACACTCATTGGAATACCCACCAGC
CTAGGTACTCCGGCGGGTGTGTGGCGATGCGGGGTCGCCACCCTCTCGGACG
CTGGGAGGTGAAGCATTGCCGCCACTTCAAGGCGATGAGCTTGTGTAAACAG
CCCGTCGAAAATCAGGAAAAGGCA_{gctagc}GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGA
GGTTCC_{tccgga}ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCC
TTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAGCGCGGTGCGAAGAAAC
TGCTCTATATTTTAAACAGCCATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAG
GAGGACGGATGTTCTGTAGATTTCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGCAG
CTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGC
CAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT
GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG
GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

40

<u>IgGシグナルペプチド</u>	1-19 (SEQ ID NO: 48)
<u>CysR-FNII-CTLD1-3</u>	22-637 (SEQ ID NO: 53)
<u>GSリンカー</u>	640-649 (SEQ ID NO: 69)
CD8 TMD	652-675 (SEQ ID NO: 19)
<u>4-1BB 細胞内ドメイン</u>	676-717 (SEQ ID NO: 21)
<u>CD3ζ細胞内ドメイン</u>	718-829 (SEQ ID NO: 45)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGSKGIFVIOQSESLKKCIQAGKSVLTLENCKQANKH
MLWKWVSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAP EQPLSLYEC DSTLVSLRWRCNRKMITG
PLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYGS GGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPC
MFPFQYNHQWHHECTREGREDDLLWCATT SRYERDEKWGFCDPTSAE VGCDT
IWEKDLNSHICYQFNLLSSLWS EAHSSCOMQGGTLLSITDETEENFIREHMSSKT
VEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPS
AWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKL
QKEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNKIPV
SFEWSNDSSVIFTNWH TLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNCEERLFYICKK
AGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSGYCCPPALVTITNRFE
QAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKPVGQKPEPVQYTHWNTHQP
RYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKA MSLCKQPVENQEKAASGGGSGGG
GSSGIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

pTRPE.CysR-FNII-CTLD1-3 7.GS linker.BBz CAAR (構築物CF1237) のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 31)

<u>IgGシグナルペプチド</u>	1-57 (SEQ ID NO: 46)
<u>CysR-FNII-CTLD1-3 7</u>	64-2331 (SEQ ID NO: 54)
<u>GSリンカー</u>	2338-2367 (SEQ ID NO: 68)
CD8 TMD	2374-2445 (SEQ ID NO: 20)
<u>4-1BB 細胞内ドメイン</u>	2446-2571 (SEQ ID NO: 66)
<u>CD3ζ細胞内ドメイン</u>	2572-2907 (SEQ ID NO: 24)
終止コドン	2908-2910

30

40

50

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAG
TGC_ggatccAAAGGGATTTTCGTGATACAGTCCGAGAGTCTCAAAAAGTGTATC
CAGGCAGGCAAAAGTGTTCTCACTCTGGAAAAC TGCAAACAAGCGAACAAG
CACATGTTGTGGAAGTGGGTTAGTAACCATGGACTGTTCAACATCGGAGGTA
GTGGATGCCTTGGTCTCAATTTCTCTGCTCCGGAACAGCCTTTGTCACTGTAC
GAATGCGACTCCACTCTCGTTAGTCTTAGATGGCGATGCAATCGCAAAATGA
TTACGGGACCACTTCAATATTCAGTTCAAGTGGCACATGATAACACCGTAGT
GGCCTCACGGAAATACATCCATAAATGGATTTCTTATGGTAGCGGGGGCGGC
GATATATGTGAATACCTCCATAAGGATCTCCACACCATTAAAGGGTAATACTC
ACGGTATGCCGTGTATGTTTCCTTTTCAGTACAATCATCAGTGGCATCATGAA
TGCACGAGGGAAGGACGCGAGGACGATTTGCTCTGGTGC GCAACCACCTCAC
GCTACGAGAGAGACGAAAAATGGGGCTTTTGCCCGGACCCCACTAGTGCTGA
GGTAGGATGTGATACGATTTGGGAAAAGGATTTGAATTCTCATATTTGCTACC
AGTTTAATCTTCTTTCATCCCTGTCTGGTCTGAGGCTCATTCTAGTTGCCAGA
TGCAAGGTGGGACTTTGCTTTCAATTACTGACGAGACTGAGGAAAATTTTATC
CGAGAGCATATGTCTTCTAAAACCGTAGAGGTATGGATGGGCCTGAACCAAT
TGGACGAACACGCGGGCTGGCAGTGGAGCGACGGGACACCTCTCAACTACCT
TAATTGGAGCCCTGAGGTAACTTTGAACCGTTTGTCGAGGATCACTGCGGA
ACTTTCAGCAGCTTCATGCCTAGTGCATGGCGGTCCCGAGACTGTGAGAGCA
CCCTTCCATACATATGTAAAAAATACCTCAATCACATAGACCACGAGATCGT
AGAGAAGGATGCATGGAAATATTATGCTACGCACTGTGAGCCGGGATGGAAT
CCTTATAACCGCAACTGTTACAAGCTGCAAAAAGAAGAGAAGACATGGCATG
AGGCGCTGCGCTCATGTCAAGCGGACAATTCTGCACTTATAGATATAACTAG
TTTGGCGGAGGTAGAATTTTTGGTTACGCTTCTCGGCGATGAGAATGCGTCCG
AGACGTGGATAGGGTTGTCAAGCAATAAAATTCCTGTAAGTTTTGAATGGTC
AAATGACTCTTCTGT CATCTTCACCAATTGGCACACACTCGAACCCCATATCT
TCCCAAACCGAAGCCAGTTGTGTGTCAGCGCTGAGCAATCAGAAGGACATTG
GAAAGTTAAAAACTGTGAAGAAAGACTGTTCTACATCTGTAAGAAGGCAGGA
CATGTGCTTTCAGATGCGGAAAGCGGCTGTCAAGAAGGTTGGGAGCGCCATG
GAGGTTTCTGTTATAAAATCGACACAGTTTTGCGATCTTTCGATCAGGCTTCA
AGCGGGTACTATTGTCCTCCTGCACTGGTTACAATCACGAACCGGTTTGAACA
GGCTTTTATAACTTCTTTGATTTCCAGCGTGGTTAAAATGAAGGACTCTTATTT
CTGGATAGCCCTGCAAGACCAAAATGATACCGGTGAGTACACATGGAAACCG
GTAGGTCAAAGCCAGAGCCAGTCCAGTACACTCATTGGAATACCCACCAGC
CTAGGTACTCCGGCGGGTGTGTGGCGATGCGGGGTCGCCACCCTCTCGGACG
CTGGGAGGTGAAGCATTGCCGCCACTTCAAGGCGATGAGCTTGTGTAAACAG

10

20

30

40

50

CCCGTCGAAAATCAGGAAAAGGCAGTTAACACATCTGATATGTACCCTATGC
CTAACACACTCGAATATGGGAATAGGACGTACAAGATTATAAACGCGAACAT
GACGTGGTATGCTGCAATCAAGACGTGCCTCATGCACAAAGCTCAGCTTGTG
TCTATTACTGACCAATACCACCAATCATTGACAGTCGTGTTGAATCGATT
GGGGTACGCCCATTTGGATCGGTCTCTTCACGACGGACAATGGGCTCAATTTTG
ACTGGAGTGACGGTACTAAATCATCCTTTACTTTTTGGAAGGATGAAGAAAG
TTCTCTGTTGGGCGATTGCGTGTTTGCTGACTCAAATGGCCGATGGCATTCCA
CAGCCTGTGAAAGTTTTCTGCAGGGAGCTATTTGCCACGTGCCTCCCGAAACG
CGGCAGTCCGAACACCCGGAATTGgctagcGGTGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAG
GTTCCtccggaATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTT
TCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAGCGCGGTGCGCAAGAACT
GCTCTATATTTTTTAAACAGCCATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGG
AGGACGGATGTTCTGTAGATTTCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGCAGCT
GAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT
TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGG
AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCG
GAGGCCTACAGTGAAGTTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG
CACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACG
CCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

10

20

pTRPE.CysR-FNII-CTLD1-3 7.GS linker.BBz CAAR (構築物CF1237) のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 32)

<u>IgG シグナルペプチド</u>	1-19 (SEQ ID NO: 48)
<u>CysR-FNII-CTLD1-3 7</u>	22-777 (SEQ ID NO: 55)
<u>GS リンカー</u>	780-789 (SEQ ID NO: 69)
CD8 TMD	792-815 (SEQ ID NO: 19)
<u>4-1BB 細胞内ドメイン</u>	816-857 (SEQ ID NO: 21)
<u>CD3ζ 細胞内ドメイン</u>	858-969 (SEQ ID NO: 45)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGSKGIFVIOSESLKKCIQAGKSVLTLENCKQANKH
MLWKWVSNHGLFNIGSGCLGLNFSAPQPLSLYECDSLVSRLWRRCNRKMITG
PLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPC
MFPPQYNHQWHHECTREGREDDLLWCATTSRYERDEKWGFCPDPTSAEVGCDT
IWEKDLNSHICYQFNLLSSLWSSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKT
VEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPS
AWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRCYKL
QKEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNKIPV
SFEWSNDSSVIFTNWHITLPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNCERLFYICKK
AGHVLSDAESGCOEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSGYCPCPALVTITNRFE
QAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKPVGQKPEPVQYTHWNTHQP
RYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKAMSLCKQPVENQEKAVNTSDMYPM
PNTLEYGNRTYKIINANMTWYAAIKTCLMHKAQLVSITDQYHQSFSLTVVLNRLG
YAHWIGLFTTDNGLNFDWSDGTKSSFTFWKDEESSLLGDCVFADSNRWHSTA
CESFLOGAICHVPETROSEHPELASGGGGSGGGGSSGIYIWAPLAGTCGVLLLS
LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR
SADAPAYQOGONQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

30

40

pTRPE.CysR-FNII-CTLD1 7.GS linker.BBz CAAR (構築物CF17) のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 33)

50

<i>IgG</i> シグナルペプチド	1-57 (SEQ ID NO: 46)
CysR-FNII-CTLD1 7	64-1473 (SEQ ID NO: 56)
<i>GS</i> リンカー	1480-1509 (SEQ ID NO: 68)
CD8 TMD	1516-1587 (SEQ ID NO: 20)
4-1BB 細胞内ドメイン	1588-1713 (SEQ ID NO: 66)
CD3ζ 細胞内ドメイン	1714-2049 (SEQ ID NO: 24)
終止コドン	2050-2052

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAG
TGC^{Cgatcc}AAAGGCATCTTCGTAATCCAGTCAGAAAGTTTGAAAAAATGTATC
CAAGCTGGCAAATCAGTACTTACCCTTGAGAACTGCAAGCAAGCCAATAAAC
ATATGCTGTGGAAATGGGTCTCAAACCACGGCCTCTTCAATATTGGTGGGTCA
GGTTGCTTGGGGTTGAATTTCTCCGCCCCAGAGCAACCACTCAGCCTTTACGA
GTGTGATTCCACACTTGTCTCTTTGCGATGGCGCTGCAATAGGAAAATGATCA
CAGGCCCCCTTCAGTACTCTGTGCAAGTTGCTCATGATAACACAGTCGTGGCG
AGTCGGAAATATATTCACAAATGGATTTCTTATGGGAGTGGTGGAGGAGATA
TATGCGAGTATTTGCATAAGGACTTGACACCATCAAGGGAAACACTCACGG
TATGCCATGTATGTTTCCGTTCCAATATAATCATCAATGGCACCACGAATGTA
CCCGAGAGGGACGCGAGGACGATCTTCTTTGGTGCGCCACAACCTCTCGATA
TGAACGAGATGAGAAGTGGGGGTTTTGTCCTGACCCAACCAGTGCAGAAGTA
GGGTGCGATACCATCTGGGAGAAAGACTTGAACCTCACACATATGCTATCAGT
TTAATTTGTTGTCTTCTTTGTCATGGAGCGAAGCTCATTTCATCATGCCAGATG
CAGGGCGGGACACTGCTTTCTATCACCGACGAGACTGAGGAAAATTTTATCC
GCGAGCACATGTCAAGCAAGACAGTTGAGGTTTGGATGGGGCTCAATCAACT
GGACGAACACGCAGGGTGGCAGTGGTCCGATGGCACTCCGCTCAACTACCTT
AACTGGAGCCCAGAGGTGAACCTTTGAGCCGTTTGTCTGAAGATCACTGTGGTA
CTTTTAGCTCCTTCATGCCGTCCGCATGGAGAAGTCGCGACTGCGAGTCAACC
CTCCCTTACATCTGTAAGAAATACCTCAACCACATAGATCACGAAATCGTAG
AGGTCAATACGTCCGACATGTACCCAATGCCAAATACGTTGGAATATGGGAA
TAGGACATACAAGATAATTAACGCAAATATGACGTGGTATGCCGCAATCAAA
ACGTGCCTCATGCACAAGGCACAGCTCGTGTCAATTACGGACCAGTACCACC
AATCATTTCTCACAGTCGTTCTTAATCGATTGGGTTATGCACACTGGATAGGC
TTGTTACGACGGACAATGGTTTGAACCTTGACTGGTCCGATGGAACATAAAA
GTTCTTTCACTTTTTGGAAGGATGAGGAGTCCTCCTTGCTCGGGGACTGCGTC
TTGCGAGATTCAAACGGGCGCTGGCACTCAACGGCATGTGAGTCCTTCCTGC
AGGGAGCTATATGCCATGTGCCACCAGAAACACGCCAGTCTGAGCACCCCTGA
GTTG^{gctagc}GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC^{tccgga}ATCTACATCTG
GGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATC
ACCCTTTACTGCAAGCGCGGTGCAAGAACTGCTCTATATTTTTAAACAGC
CATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGGAGGACGGATGTTCCCTGTAG
ATTTCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGCAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAG
GAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA
GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC
CTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG
GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGG
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCT
GCCCCCTCGCTAA

pTRPE.CysR-FNII-CTLD1 7.GS linker.BBz CAAR (構築物CF17) のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 34)

10

20

30

40

50

<i>IgG</i> シグナルペプチド	1-19 (SEQ ID NO: 48)
<u>CysR-FNII-CTLD1 7</u>	22-491 (SEQ ID NO: 57)
<i>GS</i> リンカー	494-503 (SEQ ID NO: 69)
CD8 TMD	506-529 (SEQ ID NO: 19)
<u>4-1BB 細胞内ドメイン</u>	530-571 (SEQ ID NO: 21)
<u>CD3 ζ 細胞内ドメイン</u>	572-683 (SEQ ID NO: 45)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGSKGIFVIOSESLKKCIQAGKSVLTLENCKQANKH
MLWKWVSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEOPLSLYECDSLVSRLWRRCNRKMITG
PLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYSGGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMP
MFPPQYNHQWHHECTREGREDDLLWCATTSRYERDEKWGFCPDPTSAEVGCDT
IWEKDLNSHICYQFNLLSSLWSSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKT
VEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPS
AWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEVNTSDMYPMPNTLEYGNRTYKIINANM
TWYAAIKTCLMHKAQLVSITDQYHQSFLLTVVLNRLGYAHWIGLFTTDNGLNFD
WSDGTKSSFTFWKDEESSLLGDCVFADSNRWHSTACESFLOGAICHVPPETRO
SEHPELASGGGGSGGGGSSGIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

20

pTRPE.CysR-CTLD1 7.GS linker.BBz CAAR (構築物C17) のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 35)

<i>IgG</i> シグナルペプチド	1-57 (SEQ ID NO: 46)
<u>CysR-CTLD1 7</u>	64-1314 (SEQ ID NO: 58)
<i>GS</i> リンカー	1321-1350 (SEQ ID NO: 68)
CD8 TMD	1357-1428 (SEQ ID NO: 20)
4-1BB 細胞内ドメイン	1429-1554 (SEQ ID NO: 66)
CD3 ζ 細胞内ドメイン	1555-1890 (SEQ ID NO: 24)
終止コドン	1891-1893

30

40

50

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAG
TGC_{cgatcc}AAAGGAATCTTCGTAATTCAATCTGAGAGTCTGAAAAAATGTATTC
AGGCCGGTAAGAGCGTACTCACGCTTGAAAATTGCAAACAGGCCAACAAAC
ACATGCTTTGGAAATGGGTTTCAAATCACGGGTTGTTTAAACATAGGGGGATC
AGGATGTCTGGGCCTTAACCTTTTCCGCACCTGAACAACCTCTTAGTCTGTATG
AGTGTGACTCAACGCTGGTCTCCTTGCGCTGGAGATGCAATCGGAAGATGAT
AACCGGGCCCCCTCCAGTATTCCGTTTCAGGTCGCCCCACGATAATACTGTTGTTG
CATCCCGAAAATATATTCATAAGTGGATCTCCTACGGGAGTGGAGGGGGCGA
TATTTGTGAATACCTCCACAAGGATCTGCACACTATCACTTCTGCGGAAGTAG
GCTGTGACACAATCTGGGAGAAAGATCTGAATTCACACATTTGCTATCAGTTC
AATCTTCTGAGTTCTTTGAGCTGGTCCGAAGCACATTTCATCCTGTCAGATGCA
AGGTGGAACACTCTTGTCAATAACAGATGAAACGGAAGAGAACTTTATTAGA
GAACATATGTCCTCAAAGACTGTGGAGGTGTGGATGGGACTTAACCAGCTCG
ATGAACATGCAGGATGGCAGTGGAGTGACGGAACGCCACTGAACTACCTGA
ATTGGAGCCCAGAGGTGAATTCGAGCCTTTCGTAGAGGACCATTGCGGTAC
TTTTTCATCTTTTATGCCCAGCGCATGGAGATCCCGAGATTGTGAAAGCACGC
TGCCCTATATTTGTAAAAAGTACCTGAACCACATAGATCATGAGATAGTTGA
GGTAAATACAAGTGATATGTACCCCATGCCGAACACACTCGAGTACGGAAAT
AGAACCTACAAGATAATCAACGCTAACATGACCTGGTACGCGGCCATTAAAGA
CCTGCCTCATGCACAAGGCTCAACTCGTCAGTATTACTGACCAATATCACCAG
TCATTTCTCACCGTCGTGTTGAATCGCCTCGGTTACGCCCACTGGATCGGTTT
GTTTACAACGGACAATGGACTCAATTCGATTGGTCAGACGGAACCAAATCT
AGTTTTACCTTCTGGAAAGACGAGGAATCAAGCCTGCTTGGGGACTGCGTAT
TTGCGGACTCTAATGGCCGATGGCATAGTACAGCGTGTGAGAGCTTTTTGCA
GGGGGCGATTTGTCATGTTCCGCCGAAACCCGCCAAAGCGAGCATCCAGAA
TTG_{gctagc}GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC_{tccgga}ATCTACATCTGG
GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCAGTGGTTATCA
CCCTTTACTGCAAGCGCGGTTCGCAAGAACTGCTCTATATTTTAAACAGCC
ATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGGAGGACGGATGTTCTGTAGA
TTTCCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTTCGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGG
AGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCC
GGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC
TGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG
GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGG
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCT
GCCCCCTCGCTAA

10

20

30

pTRPE.CysR-CTLD1 7.GS linker.BBz CAAR (構築物C17) のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 36)

IgG シグナルペプチド

1-19 (SEQ ID NO: 48)

CysR-CTLD1 7

22-438 (SEQ ID NO: 59)

GS リンカー

441-450 (SEQ ID NO: 69)

CD8 TMD

453-476 (SEQ ID NO: 19)

4-1BB 細胞内ドメイン

477-518 (SEQ ID NO: 21)

CD3ζ 細胞内ドメイン

519-630 (SEQ ID NO: 45)

40

50

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGSKGIFVIQSESLKKCIQAGKSVLTLENCKQANKH
MLWKWVSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQPLSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITG
PLOYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYSGGGDICEYLHKDLHTITSAEVGCDTI
WEKDLNSHICYQFNLLSSLWSSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKT
VEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPS
AWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEVNTSDMYPMPNTLEYGNRTYKIINANM
TWYAAIKTCLMHKAQLVSITDQYHQSFLLTVVLNRLGYAHWIGLFTTDNGLNFD
WSDGTKSSFTFWKDEESSLLGDCVFADSNGRWHSTACESFLOGAICHVPPETRO
SEHPELASGGGGSGGGGSSGIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

4025 pTRPE.CysR.CD8H.BBz CAAR (構築物4025.C) のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 37)

PLA2R シグナルペプチド

1-60 (SEQ ID NO: 65)

PLA2R プロペプチド

61-117 (SEQ ID NO: 67)

CysR

118-504 (SEQ ID NO: 60)

CD8 ヒンジ領域

511-645 (SEQ ID NO: 42)

CD8 TMD

646-717 (SEQ ID NO: 20)

4-1BB 細胞内ドメイン

718-843 (SEQ ID NO: 22)

CD3ζ 細胞内ドメイン

844-1179 (SEQ ID NO: 72)

終止コドン

1180-1182

20

ATGCTGCTGAGCCCTAGCCTGCTGCTGCTCCTGCTTCTTGAGCCCTAGAGG
ATGTGCCGATCTGAAGGTGTTGCCGCCGCTCTGACACCCGAGAGACTG
CTGGAATGGCAGGACAAGGGCATCTTCGTGATCCAGAGCGAGAGCCTGAAG
AAGTGCATCCAGGCCGCAAGAGCGTGCTGACCCTGGAAAATTGCAAGCAG
GCCAAACAAGCACATGCTGTGGAAATGGGTGTCCAACCACGGCCTGTTCAACA
TCGGCGGCTCTGGATGTCTGGGCCTGAATTTCTCTGCCCTGAGCAGCCTCTG
AGCCTGTACGAGTGTGATAGCACCCCTGGTGTCCCTGAGATGGCGGTGCAACC
GGAAGATGATCACAGGCCCTCTGCAGTACTCTGTGCAGGTGCGCCACGACAA
TACCGTGGTGGCCAGCAGAAAGTACATCCACAAGTGGATCAGCTACGGCAGC
GGCGGAGGCGACATCTGTGAATACCTGCACAAGGATCTGtccggaACCACGACG
CCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCC
CTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGACACGAGGG
GGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTT
GTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGC
AGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAA
CTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAG
GAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGT
ACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAG
AGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG
GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA
AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC
GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA
AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

30

40

4025 pTRPE.CysR.CD8H.BBz CAAR (構築物4025.C) のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 38)

50

PLA2R シグナルペプチド	1-20
<u>CysR</u>	40-168 (SEQ ID NO: 61)
<u>CD8</u> ヒンジ領域	171-215 (SEQ ID NO: 43)
CD8 TMD	216-239 (SEQ ID NO: 19)
<u>4-1BB</u> 細胞内ドメイン	240-281 (SEQ ID NO: 21)
<u>CD3ζ</u> 細胞内ドメイン	282-393 (SEQ ID NO: 23)

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAGSEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCIQ
AGKSVLTLENCKQANKHMLWKWVSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQPLSLYEC
DSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYGSGGGDICE
YLHKDLSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIEKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE
EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENG
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK
DTYDALHMQALPPR

10

4026 pTRPE. CysR-FNII-CTLD1.CD8H.BBz CAAR (構築物4026.CF1) のヌクレオチ
ド配列 (SEQ ID NO: 39)

PLA2R シグナルペプチド	1-60 (SEQ ID NO: 65)
PLA2R プロペプチド	61-117
<u>CysR-FNII-CTLD1</u>	118-1143 (SEQ ID NO: 62)
<u>CD8</u> ヒンジ領域	1149-1284 (SEQ ID NO: 42)
CD8 TMD	1285-1356 (SEQ ID NO: 20)
<u>4-1BB</u> 細胞内ドメイン	1357-1482 (SEQ ID NO: 22)
<u>CD3ζ</u> 細胞内ドメイン	1483-1818 (SEQ ID NO: 72)
終止コドン	1819-1821

20

30

40

50

ATGCTGCTGAGCCCTAGCCTGCTGCTGCTCCTGCTTCTTGGAGCCCCTAGAGG
ATGTGCCGGATCTGAAGGTGTTGCCGCCGCTCTGACACCCGAGAGACTG
CTGGAATGGCAGGACAAGGGCATCTTCGTGATCCAGAGCGAGAGCCTGAAG
AAGTGCATCCAGGCCGGCAAGAGCGTGCTGACCCTGGAAAATTGCAAGCAG
GCCAACAAGCACATGCTGTGGAAATGGGTGTCCAACCACGGCCTGTTCAACA
TCGGCGGCTCTGGATGTCTGGGCCTGAATTTCTCTGCCCTGAGCAGCCTCTG
AGCCTGTACGAGTGTGATAGCACCCCTGGTGTCCCTGAGATGGCGGTGCAACC
GGAAGATGATCACAGGCCCTCTGCAGTACTCTGTGCAGGTGCGCCACGACAA
TACCGTGGTGGCCAGCAGAAAGTACATCCACAAGTGGATCAGCTACGGCAGC
GGCGGAGGCGACATCTGTGAATACCTGCACAAGGATCTGCACACCATCAAGG
GCAACACCCACGGAATGCCCTGCATGTTCCCGTTTCAGTACAACCACCAGTG
GCACCACGAGTGCACCAGAGAAGGCAGAGAGGACGACCTGCTTTGGTGCGC
CACAACCAGCAGATACGAGCGGGATGAGAAAGTGGGGCTTCTGCCCTGATCCT
ACCTCTGCCGAAGTGGGCTGCGATACCATCTGGGAGAAAGACCTGAACAGCC
ACATCTGCTACCAGTTCAACCTGCTGTCCAGCCTGTCTTGGAGCGAGGCCAC
AGCAGCTGTCAAATGCAAGGCGGCACACTGCTGAGCATCACCGACGAGACA
GAGGAAAACCTTCATCCGCGAGCACATGAGCAGCAAGACCGTGGAAGTGTGG
ATGGGACTGAACCAGCTGGATGAGCATGCCGGATGGCAGTGGAGTGATGGC
ACCCCTCTGAACTACCTGAACTGGTCCCCTGAAGTGAACCTCGAGCCCTTCGT
GGAAGATCACTGCGGCACCTTCAGCAGCTTCATGCCAGCGCTTGGAGAAGC
AGAGACTGCGAGAGCACCCCTGCCTTACATCTGCAAGAAGTACCTGAACCACA
TCGACCACGAGATCGTGGAAGAGGACGCCTGGAAGTACTACGCCACACACTG
CGAGtccgaACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCG
CGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGG
GCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCC
CTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTT
ACTGCAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTAT
GAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC
GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATC
TAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACC
CTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA
AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCC
TCGCTAA

10

20

30

4026 pTRPE. CysR-FNII-CTLD1.CD8H.BBz CAAR (構築物4026.CF1) のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 40)

PLA2R シグナルペプチド

1-20

CysR-FNII-CTLD1

40-381 (SEQ ID NO: 63)

CD8 ヒンジ領域

384-428 (SEQ ID NO: 43)

CD8 TMD

429-452 (SEQ ID NO: 19)

4-1BB 細胞内ドメイン

453-494 (SEQ ID NO: 21)

CD3 ζ 細胞内ドメイン

495-606 (SEQ ID NO: 23)

40

MLLSPSLLLLLLGAPRGCAGSEGVAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCIQA
GKSVLTLENCKQANKHMLWKWVSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQPLSLYECD
STLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWISYGSGGGDICEY
LHKDLHTIKGNTHGMPCMFPOYNHQWHHECTREGREDDLLWCATTSTRYERDE
KWGFCPDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNLLSSLWSSEAHSSCOMQGGTLL
SITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVN
FEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYAT
HCESGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA
GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVOTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPOEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPR

10

> BC144631.1 Homo sapiens phospholipase A2 receptor 1, 180kDa, mRNA (c
DNA clone MGC:178179 IMAGE:9053162), complete cds (SEQ ID NO: 41)

20

30

40

50

50

TATCCCCAAGACCCAAGCAGTTGGAAGAACTGGACGCATGCTCAACATTTCTGTGCTGAAGAAGGGGGG
ACCTGGTCGCCATTGAAAGTGAGGTGGAGCAAGCTTTCATTACTATGAATCTTTTTGGCCAGACCACCA
GTGTGTGGATAGGTTTACAAAATGATGATTATGAAACATGGCTAAATGGAAAGCCTGTGGTATATTCTAA
CTGGTCTCCATTTGATATAATAAATATTTCCAAGTCACAATACCACTGAAGTTCAGAAACACATTCCTCTC
TGTGCCTTACTCTCAAGTAATCCTAATTTTCATTTCACTGGAAAATGGTATTTTGAAGACTGTGGAAAGG
AAGGCTATGGGTTTGTGTGAAAAAATGCAAGATACTTCTGGACACGGTGTAATAACATCTGATATGTA
TCCAATGCCCCAATACCTTAGAATATGGAAACAGAACTTACAAAATAATTAATGCAAATATGACTTGGTAT
GCAGCAATAAAAAACCTGCCTGATGCACAAAGCACAACTGGTCAGCATCACAGACCAGTATCACCAGTCCT
TCCTCACTGTTGTCTCAACCGGCTAGGATATGCCCACTGGATTGGACTGTTCCACCACAGATAATGGTCT
TAATTTTGAAGTGGTCTGATGGCACCAATCTTCTTTCACTTTTGGAAAGATGAGGAGTCCTCCCTCCTT
GGTGAAGTGCCTTTTGGCCGACAGCAACGGACGCTGGCATAGCACAGCCTGCGAGTCATTTCTGCAAGGTG
CCATTTGTCTGATGTGCCACCTGAAACAAGACAATCTGAACACCCAGAGTTGTGCTCAGAAACATCTATTCC
CTGGATAAAATTTAAAAGTAATTGCTACAGTTTTTCTACAGTCCTAGACAGTATGAGTTTTGAGGCTGCT
CATGAATTTTGCAAAAAGGAAGGTTCTAATCTTTTAAACAATCAAGGATGAGGCTGAAAATGCATTTCTCC
TAGAAGAGCTGTTTGTCTTTTGGTTCTTCTGTCCAGATGGTTTGGTTGAATGCTCAATTTGATGATGAAAC
CATAAAGTGGTTTGTGGAAGTCCACAGACAGTCAAACTGGGGCATTCGGAAGCCAGACACAGACTAC
TTCAAGCCCCATCATTGTGTGCTTGCCTTGAGGATCCCTGAAGGATTATGGCAGCTATCCCCGTGTCAAGAAA
AAAAAGGCTTTATATGTAAAATGGAGGCAGATATTCACACTGCAGAGGCGCTGCCAGAAAAAGGACCAAG
TCACAGCATCATTCCTCTTGCCTTGTACTGACACTGATAGTCATTGTGGCCATTTGCACACTTTCCTTC
TGCATATACAAGCATAACGGTGGCTTCTTCAGGAGACTTGCAGGGTTTCGGAATCCTTACTATCCTGCAA
CCAATTTAGTACAGTATATTTAGAAGAAAATATTTCTCATTCTGATCTTGAGAAGAGTGACCAATAATA
ATGAGGTGAGAGAAATGCCACAGACACCAGG

10

20

【0224】

- HIV-1ベースの自己不活性化レンチウイルスの作製

293T細胞に、90%コンフルエントで、Lipofectamine 2000との複合体中のpTRPE-
関心対象の遺伝子、パッケージングプラスミドpGAG-PolおよびpRSV-Rev、ならびにエン
ベローププラスミドpCI VSVgの混合物をトランスフェクトした。レンチウイルスを含
有する上清を、24時間後および48時間後に採取し、0.45ミクロンポリエーテルスルホン
(PES)膜を通して濾過し、12,000×gで24時間、4℃で濃縮して、-80℃で保存した。

【0225】

- 初代ヒトT細胞の刺激、形質導入、および増大

初代ヒトT細胞を、5% HSAB、2.6% サプリメント、1% ペニシリン／ストレプトマイ
シン、および1% glutamaxを含むCTS OpTmizer T cell expansion SFM中で培養した。
バルクT細胞 (CD4⁺およびCD8⁺) を、抗CD3および抗CD28ビーズで、3:1のビーズ：
細胞比で刺激した。培養培地に、100 IU/mlインターロイキン2を補給した。24時間の刺
激後に、10⁶個のT細胞に、CAARを形質導入したか、またはモック形質導入した。T細胞
の増大を、8～12日間モニタリングした。CAAR構築物の細胞表面発現を、一次性膜性腎
症を有する患者の血漿から精製されたIgGおよびアイソタイプ対照抗体で、フローサイト
メトリーによって確認した。

30

【0226】

- NFAT-GFP Jurkat T細胞を用いたレポーターアッセイ

Jurkat細胞を、RPMI1640、HEPES 10 mM、および10%のFBSを用いて、完全に加
湿した環境において5% CO₂、37℃で培養した。CAAR-標的の相互作用によるシグナル
伝達を試験するために、NFAT応答エレメント下で制御されるGFPの安定発現について選
択 (G418) されているJurkatレポーター細胞株において、CAAR構築物を発現させ、こ
れは、CAAR結合後のGFP発現、ならびにPLCγおよびIP3媒介性の細胞内カルシウム放出
を促進した。Jurkat細胞に、感染多重度3でCAARレンチウイルスを形質導入し、CAAR構
築物の発現を、72時間よりも後に、抗PLA2Rモノクローナル抗体 (Novus Biologicals
(登録商標)) および一次性膜性腎症を有する患者の血漿から精製されたIgGで、フロー
サイトメトリーによって確認した。CAAR-標的の相互作用の特徴決定のために、CAAR Ju
rkat細胞を、下記のように、プレートに結合した抗PLA2Rモノクローナルと37℃で6時間
インキュベートした。GFP発現を、フローサイトメトリーによって確認した。

40

50

【0227】

- 刺激

100万個のJurkat-NFAT-GFP細胞に、PLA2R CAAR構築物C、CF1、CF123、CF1237、CD17、C17、4025.C、4026.CF1、4027.CF12、4028.CF123をコードする各レンチウイルスを形質導入し、非形質導入Jurkat細胞を、陰性対照として用いた。形質導入細胞および非形質導入細胞を、100 μ lの細胞培養培地において 2×10^5 細胞/ウェルで96ウェルプレートにプレATINGした。

【0228】

刺激条件は、以下のようであった：

- 0.5 μ g/ウェルまたは1 μ g/ウェルのいずれかのNovusモノクローナル抗体 (mAb) 抗PLA2R；クローン12-6-5
- Sigmaポリクローナル抗体抗PLA2R 0.5 μ g/ウェル
- Novus mAb抗PLA2Rについてのアイソタイプ抗体 (0.5 μ g/染色)
- 培地のみ (刺激なし)
- PMA／イオノマイシン (最大活性化)

【0229】

または、形質導入細胞および非形質導入細胞を、100 μ lの細胞培養培地において 5×10^4 細胞/ウェルで96ウェルプレートにプレATINGした。

【0230】

細胞および抗体を、37℃で6時間インキュベートした。6時間の終わりに、細胞を、T細胞活性化の指標としてのNFAT-GFPの発現について、フローサイトメトリーによって検討した。

【0231】

- インビトロIFN γ サイトカインアッセイ

PLA2R CAAR形質導入またはモック形質導入された初代ヒトT細胞を、10 μ g/mlの一次性膜性腎症を有する患者の血漿から精製されたIgGまたは対照ヒトIgGのいずれかでコーティングされた96ウェルプレートにおいて、 5×10^4 個/ウェルで24時間培養した。次いで、培養上清を、ELISAによるIFN- γ の検出のために採取した。

【0232】

- CAAR T細胞のインビボ効力試験

インビボ効力を試験するために、ヒトPLA2Rを標的とする抗PLA2R BCR発現細胞、例えば、ハイブリドーマ細胞またはヒト細胞株を生成する。PLA2R BCR発現細胞に、コメツキムシ緑色ルシフェラーゼまたはコメツキムシ赤色ルシフェラーゼおよびGFPを発現するレンチウイルスベクターを形質導入する。PLA2R特異的標的細胞に対するCAAR-T細胞の効力を試験するために、およそ 2×10^5 個の抗PLA2R細胞を、NSGマウス (6～8週齢) 中に、BCR発現細胞に対するFc γ R媒介性毒性を最小限に抑えるための600 mg/kgの静脈内免疫グロブリンでの2日間毎日のマウスの前処置後に、静脈内注射する。4～5日後に、PLA2R CAAR T細胞 (マウス当たりおよそ 10^7 細胞) を静脈内注射する。生物発光および／または血清自己抗体を、注射後2～3日毎に定量して、CAAR T細胞効力をモニタリングする。

【0233】

実験の結果を、次に説明する。

【0234】

実施例1：

PLA2Rのさまざまなドメインに相当する4種類のPLA2R構築物を、CAAR発現系中にクローニングした (4025.C、4026.CF1、構築物4027.CF12、および4028.CF123)。本発明における特に関心対象のPLA2Rの細胞外ドメインの一般模式図を、図1に示す。N末端ドメインは、患者血清抗体によって認識される免疫優性エピトープである。CysRとCTLD3ドメインとは相互作用して、より良好に免疫優性エピトープを提示するリング様構造を形成する；したがって、CysRからCTLD3ドメインまでを含む構築物を生成した。シス

10

20

30

40

50

テインリッチドメインに加えて、C型レクチンドメイン1および7に対する血清抗体の免疫反応性もまた、報告されている。

【0235】

PLA2R CAAR構築物を、図2A～2Gに示す。すべての構築物は、CD8膜貫通ドメインおよびBBZ細胞内ドメインを用い、その細胞外組成が異なっている。

【0236】

構築物4025.Cは、システインリッチ細胞外ドメイン、CD8ヒンジ領域、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインから構成された（図2A、SEQ ID NO: 37および38）。

【0237】

構築物4026.CF1は、システインリッチドメイン、フィブロネクチンIIドメイン、およびC型レクチン1ドメインを含む細胞外ドメインから構成された。構築物4026.CF1はまた、CD8ヒンジ領域、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインも含んだ（図2B、SEQ ID NO: 39および40）。

【0238】

構築物4027.CF12は、システインリッチドメイン、フィブロネクチンIIドメイン、C型レクチン1ドメイン、およびC型レクチン2ドメインを含む細胞外ドメインから構成された。構築物4027.CF12はまた、CD8ヒンジ領域、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインも含んだ（図2C、SEQ ID NO: 11および12）。

【0239】

構築物4028.CF123は、システインリッチドメイン、フィブロネクチンIIドメイン、C型レクチン1ドメイン、C型レクチン2ドメイン、およびC型レクチン3ドメインを含む細胞外ドメインから構成された。構築物4028.CF123はまた、CD8ヒンジ領域、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインも含んだ（図2D、SEQ ID NO: 17および18）。PLA2R CAAR構築物4028.CF123の詳細なマップを、図3Aに示す。

【0240】

CAAR分子が機能的であるかどうかを試験するために、以下の実験を実施した。

【0241】

100万個のJurkat-NFAT-GFP細胞に、4025.C、4027.CF12、4028.CF123をコードする各レンチウイルスを形質導入し、非形質導入Jurkat細胞を、陰性対照として用いた。形質導入細胞および非形質導入細胞を、100μlの細胞培養培地において 2×10^5 細胞/ウェルで96ウェルプレートにプレーティングした。図4は、PLA2R CAAR発現を示す。さまざまなPLA2Rレンチウイルス構築物が形質導入されたJurkat NFAT-GFP細胞によるPLA2R CAARの発現を、PEにコンジュゲートされた可溶性抗PLA2Rモノクローナル抗体での染色によって測定した。構築物4027.CF12または4028.CF123を有するJurkat T細胞は、CAARの検出可能な表面発現を示したが、CTLD2ドメインを含まず、したがって用いたmAbによって検出可能ではない構築物4025.Cを有するJurkat T細胞は、CAARの検出可能な表面発現を示さなかった。

【0242】

図5および6は、示された構築物が形質導入されたJurkat細胞のGFP発現によるT細胞活性化を示す。陰性対照および陽性対照を、図5に示す。試験試料を、図6に示す。

【0243】

細胞および抗体を、37℃で6時間インキュベートした。6時間の終わりに、細胞を、T細胞活性化の指標としてのNFAT-GFPの発現について検討した。

【0244】

図5は、アイソタイプ対照（上、陰性対照）またはPMA+イオノマイシン（下、陽性対照）を用いた、PLA2R CAAR T細胞活性化についての陰性対照および陽性対照を図示する。

【0245】

10

20

30

40

50

図6は、Jurkat NFAT-GFP細胞（6時間活性化）によるGFP発現として測定した、特異的抗体によるPLA2R CAAR T細胞の活性化を示す。モノクローナル抗PLA2R Mabまたはポリクローナル抗PLA2R Abに対する曝露時に、構築物4025.Cおよび非形質導入細胞において、いかなるT細胞活性化の証拠も見られない。構築物4027.CF12および4028.CF123を用いて、モノクローナル抗PLA2R Abによる架橋に応答した特異的T細胞活性化が見られるが、ポリクローナル抗PLA2R Abによるものは見られない。

【0246】

実施例2：

6種類の追加的なPLA2R CAAR構築物を、本明細書で設計して生成した。構築物Cは、システインリッチドメイン、CD8ヒンジ領域、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインから構成された（図2A、SEQ ID NO: 25および26）。

【0247】

構築物CF1は、システインリッチドメイン、フィブロネクチンIIドメイン、およびC型レクチン1ドメインを含む細胞外ドメインから構成された。構築物CF1はまた、CD8ヒンジ領域、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインも含んだ（図2B、SEQ ID NO: 27および28）。

【0248】

構築物CF123は、システインリッチドメイン、フィブロネクチンIIドメイン、C型レクチン1ドメイン、C型レクチン2ドメイン、およびC型レクチン3ドメインを含む細胞外ドメインから構成された。また、構築物CF123中には、GSリンカー、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインも含まれた（図2C、SEQ ID NO: 29および30）。

【0249】

構築物CF1237は、システインリッチドメイン、フィブロネクチンIIドメイン、C型レクチン1ドメイン、C型レクチン2ドメイン、C型レクチン3ドメイン、およびC型レクチン7ドメインを含む細胞外ドメインから構成された。追加的に、構築物CF1237中には、GSリンカー、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインが含まれた（図2D、SEQ ID NO: 31および32）。

【0250】

構築物CF17は、システインリッチドメイン、フィブロネクチンIIドメイン、C型レクチン1ドメイン、およびC型レクチン7ドメインを含む細胞外ドメインから構成された。構築物CF17はまた、GSリンカー、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインも含んだ（図7E、SEQ ID NO: 33および34）。

【0251】

構築物C17は、システインリッチドメイン、C型レクチン1ドメイン、およびC型レクチン7ドメインを含む細胞外ドメインから構成された。構築物C17はまた、GSリンカー、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内ドメイン、およびCD3ζシグナル伝達ドメインも含んだ（図7F、SEQ ID NO: 35および36）。

【0252】

さまざまなPLA2R CAAR構築物を、Jurkat細胞および初代ヒトT細胞中に形質導入した。PLA2R CAARの表面発現を、MN患者IgG、およびそれに続くAPC標識抗ヒトIgG二次抗体を用いて、フローサイトメトリーによって評価した。形質導入されたJurkat（図7A）および初代ヒトT細胞（図7B）のすべては、CAAR構築物の検出可能な表面発現を示したが、非形質導入対照細胞は、示さなかった。

【0253】

抗PLA2R B細胞の表面を模倣する、プレートに結合した抗PLA2R IgGが、CAAR T細胞活性化をもたらすことができるかどうかを評定するために、 5×10^4 個のJurkat NFAT-GFPレポーター細胞を、 $10 \mu\text{g/ml}$ のMN患者IgGまたは対照ヒトIgGのいずれかでコーティングされた96ウェルプレートにおいて6時間培養した。次いで、細胞を、フローサイトメ

10

20

30

40

50

トリー解析のために採取した。MN患者IgGは、10種類の構築物の各々が形質導入されたJurkat細胞を活性化したが、対照ヒトIgGは、活性化しなかった（図8）。MN患者IgGまたは対照ヒトIgGのいずれかに対する曝露時に、非形質導入Jurkat細胞において、いかなるT細胞活性化の証拠も見られなかった（図8）。これらの研究により、CAARシグナル伝達は、標的遭遇時に活性化されることが示される。

【0254】

初代ヒトPLA2R CAAR T細胞が、プレートに結合した抗PLA2R IgGによって活性化されるかどうかを評価するために、PLA2R CAAR T細胞を、プレートに結合したMN患者IgGまたは対照ヒトIgGのいずれかに24時間曝露した。IFN- γ 分泌を、培養上清のELISAによって測定した。MN患者IgGは、対照ヒトIgGと比較して明らかに高いIFN- γ 産生を刺激し、これは、標的結合後の初代ヒトCAAR T細胞活性化を反映している（図9）。

【0255】

本明細書で引用される各々のおよびあらゆる特許、特許出願、および刊行物の開示は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。本発明は、具体的な態様に関して開示されているが、本発明の他の態様および変形物が、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、当業者によって考案されることが明らかである。添付の特許請求の範囲は、すべてのそのような態様および等価の変形物を含むように解釈されることが意図される。

10

20

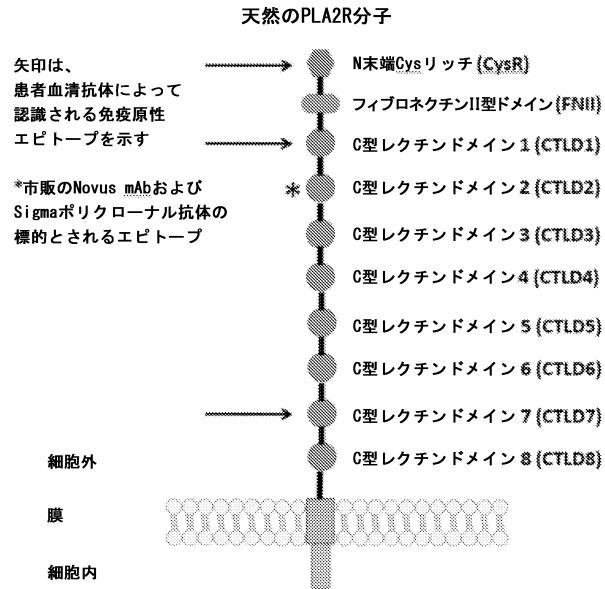
30

40

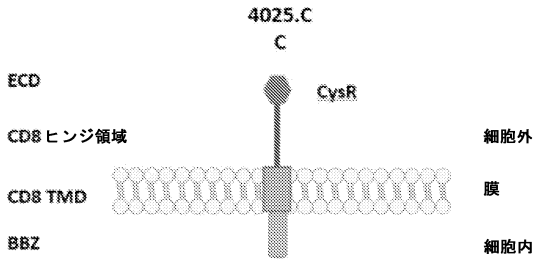
50

【図面】

【図 1】

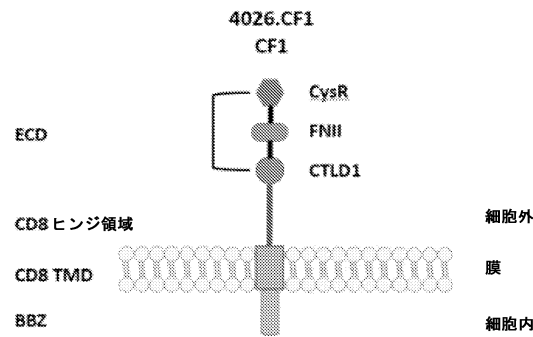


【図 2 A】

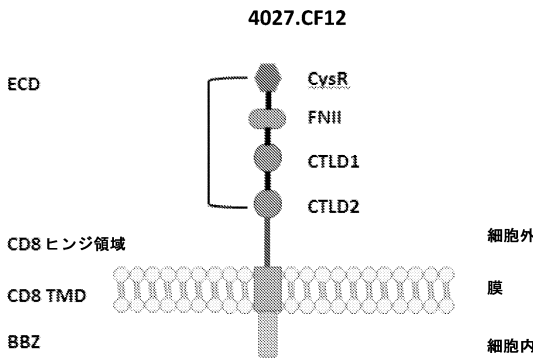


10

【図 2 B】



【図 2 C】



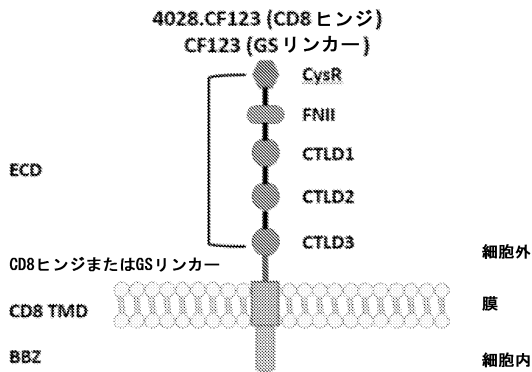
20

30

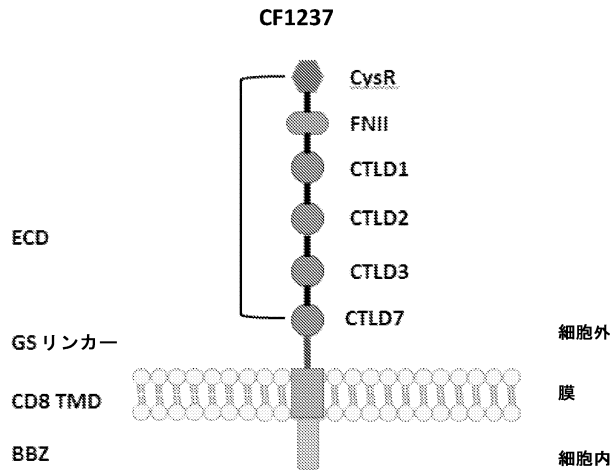
40

50

【図 2 D】

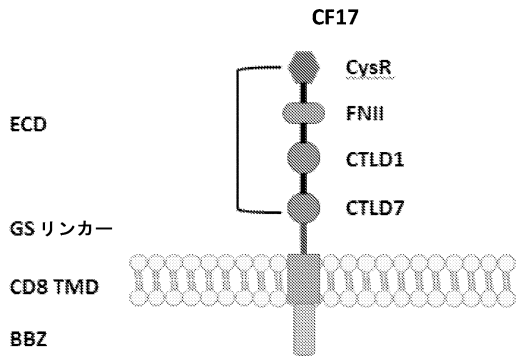


【図 2 E】

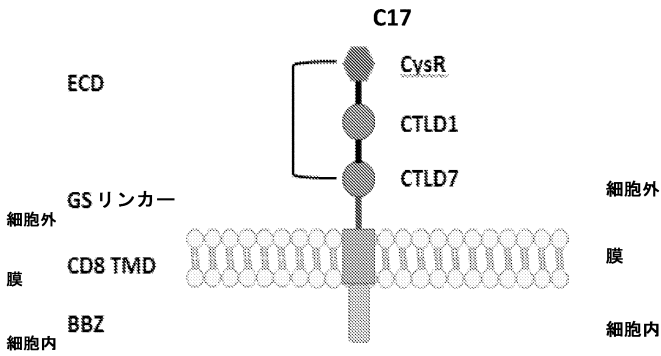


10

【図 2 F】



【図 2 G】



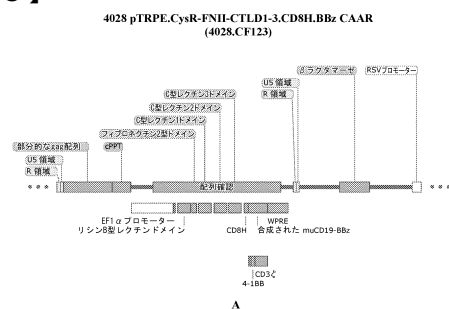
20

30

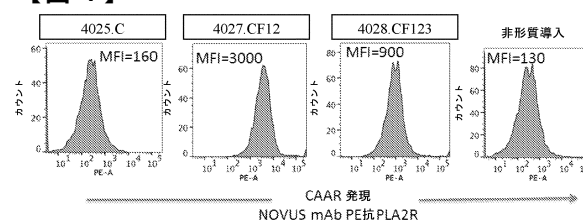
40

50

【圖 3】



【圖 4】

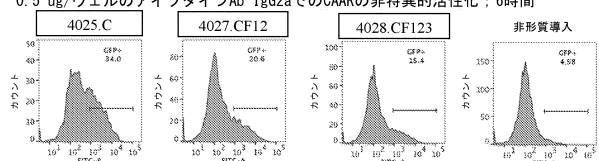


機体名称	機体カラー	エンジン	プロペラ	主翼	主翼配列 (完全なSAM)	舵配列 (PLA2Rドメインのみ)
4026 C1	C	p7000	天然のPIA2R	CDBR 25mm 45	機首に2本、機翼に1本、合計3本	機首に1本、機翼に1本、合計2本
4026 C1	C	p7000	天然のPIA2R	CDBR 25mm 55	機首に2本、機翼に1本、合計3本	機首に1本、機翼に1本、合計2本
4027 C12	p7100	天然のPIA2R	天然のPIA2R	CDBR 25mm 45	機首に2本、機翼に1本、合計3本	機首に1本、機翼に1本、合計2本
4028 C123	p7000	天然のPIA2R	天然のPIA2R	CDBR 25mm 45	機首に2本、機翼に1本、合計3本	機首に1本、機翼に1本、合計2本
C123	p7000	天然のPIA2R	天然のPIA2R	CDBR 25mm 45	機首に2本、機翼に1本、合計3本	機首に1本、機翼に1本、合計2本
C123	p7000	天然のPIA2R	天然のPIA2R	CDBR 25mm 45	機首に2本、機翼に1本、合計3本	機首に1本、機翼に1本、合計2本
C17	p7000	天然のPIA2R	天然のPIA2R	CDBR 25mm 45	機首に2本、機翼に1本、合計3本	機首に1本、機翼に1本、合計2本
C17	p7000	天然のPIA2R	天然のPIA2R	CDBR 25mm 45	機首に2本、機翼に1本、合計3本	機首に1本、機翼に1本、合計2本

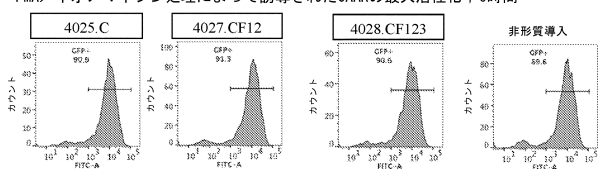
B

【图 5】

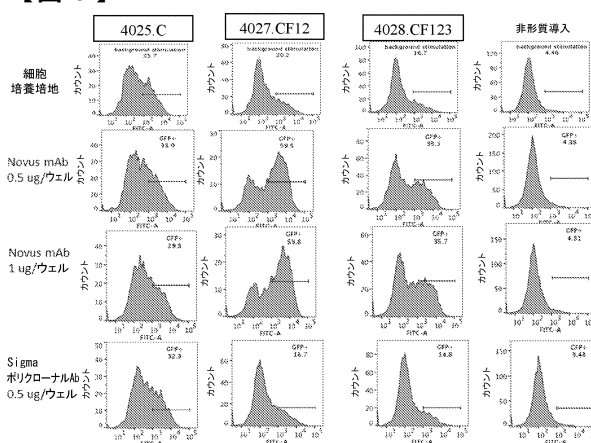
0.5 ug/ウェルのアイソタイプAb IgG2aでのCAARの非特異的活性化；6時間



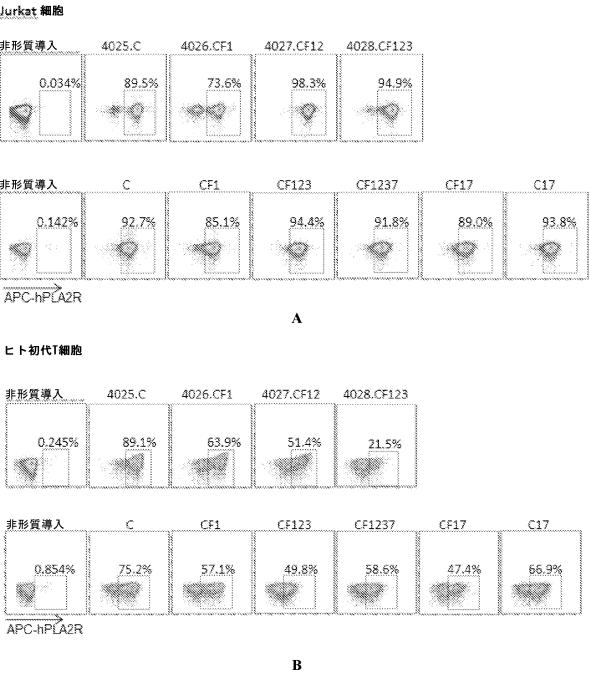
PMA/イオノマイシン処理によって誘導されたCAARの最大活性化；6時間



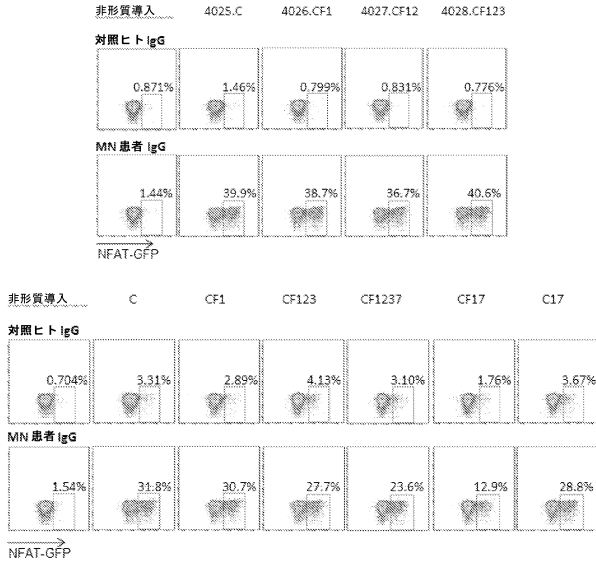
【图 6】



【図 7】



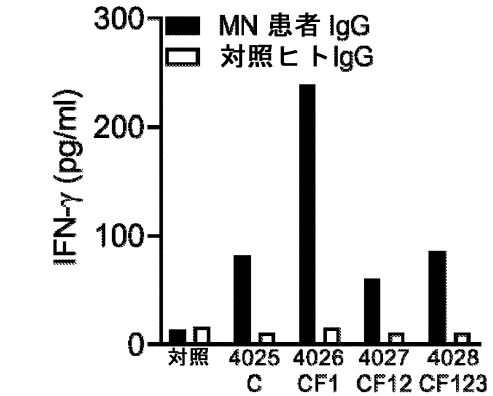
【図 8】



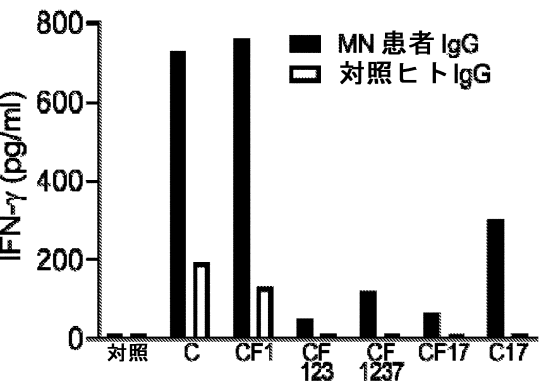
10

20

【図 9】



30



40

【配列表】

0007519906000001.app

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	14/435 (2006.01)	C 0 7 K	14/435
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ギル サー

アメリカ合衆国 1 9 1 2 3 ペンシルベニア州 フィラデルフィア ポプラー ストリート 4 3 8

(72)発明者 ホーガン ジョナサン

アメリカ合衆国 0 8 0 3 3 ニュージャージー州 ハドンフィールド リンデン アベニュー 3 1 1

(72)発明者 ペイン エイミー エス.

アメリカ合衆国 1 9 0 6 6 ペンシルベニア州 メリオン ステーション ハミルトン ロード 5 3 6

(72)発明者 ワン バオメイ

アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベニア州 フィラデルフィア サウス フォーティフォース
ストリート 4 3 4

審査官 福岡 信子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2017/0051035 (US, A1)

国際公開第2018/031947 (WO, A1)

国際公開第2013/007640 (WO, A1)

国際公開第2017/009245 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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 (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

S w i s s P r o t / G e n e S e q