

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-530456

(P2019-530456A)

(43) 公表日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-517933 (P2019-517933)	(71) 出願人	519112058 ガビッシューガリラヤ バイオ アプリケーションズ リミテッド イスラエル国, キリヤット シュモナ 1 1 0 1 6 0 2, ピー. オー. ボックス 8 3 1
(86) (22) 出願日	平成29年9月28日 (2017. 9. 28)	(71) 出願人	519112069 インパクトーバイオ リミテッド イスラエル国, ネスージオナ 7 4 0 3 6 3 5, イラン ラモン ストリート 2
(85) 翻訳文提出日	平成31年3月28日 (2019. 3. 28)	(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(86) 国際出願番号	PCT/IL2017/051102	(74) 代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(87) 国際公開番号	W02018/061012		
(87) 国際公開日	平成30年4月5日 (2018. 4. 5)		
(31) 優先権主張番号	62/400, 737		
(32) 優先日	平成28年9月28日 (2016. 9. 28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の新規抗原性シグネチャーを標的としたCAR療法のためのユニバーサルプラットフォーム

(57) 【要約】

エフェクター免疫細胞の望ましくない活性化を防止または減弱させることができる阻害性キメラ抗原受容体 (iCAR) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、iCARは、ヘテロ接合性の喪失 (LOH) により哺乳類腫瘍細胞には存在しないが、少なくとも関連する哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エプトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する細胞外ドメインと、エフェクター免疫細胞を阻害する少なくとも1つのシグナル伝達要素を含む細胞内ドメインとを含む、核酸分子が提供される。核酸分子を含むベクターおよび形質導入されたエフェクター免疫細胞、ならびに形質導入されたエフェクター免疫細胞を投与することを含む癌の治療のための方法がさらに提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エフェクター免疫細胞の望ましくない活性化を防止または減弱させることができる阻害性キメラ抗原受容体 (iCAR) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、前記 iCAR が、ヘテロ接合性の喪失 (LOH) により哺乳類腫瘍細胞には存在しないが、少なくとも関連哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する細胞外ドメインと、エフェクター免疫細胞を阻害する少なくとも 1 つのシグナル伝達要素を含む細胞内ドメインとを含む、核酸分子。

【請求項 2】

前記多形細胞表面エピトープが、HLA I 型、G タンパク質共役受容体 (GPCR)、イオンチャネルまたは受容体チロシンキナーゼなどのハウスキーピング遺伝子産物、好ましくは、HLA - A、HLA - B、または HLA - C のものである、請求項 1 に記載の核酸分子。

10

【請求項 3】

前記細胞外ドメインが、(i) ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の機能的フラグメント、ナノボディなどの単ドメイン抗体、組換え抗体、および一本鎖可変フラグメント (ScFv) などの抗体、その誘導体またはフラグメント、(ii) アフィボディ分子などの抗体模倣物、アフィリン、アフィマー、アフィチン、アルファボディ、アンチカリン、アピマー、DARPin、フィノマー、クニツドメインペプチド、およびモノボディ、または (iii) アプタマーを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

20

【請求項 4】

前記哺乳類組織がヒト組織であり、前記関連哺乳類正常組織が腫瘍の発生した正常組織である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記エフェクター免疫細胞が T 細胞、ナチュラルキラー細胞またはサイトカイン誘導性キラー細胞である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

エフェクター免疫細胞を阻害することができる前記少なくとも 1 つのシグナル伝達要素が、免疫チェックポイントタンパク質のシグナル伝達要素と相同である、請求項 1 に記載の核酸分子。

30

【請求項 7】

前記免疫チェックポイントタンパク質が、PD1; CTLA4; BTLA; 2B4; CD160; CEACAM1 などの CEACAM; KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR3DL1、KIR3DL2、KIR3DL3 などの KIR、LIR1、LIR2、LIR3、LIR5、LIR8、および CD94 - NKG2A などの KIR; LAG3; TIM3; T 細胞活性化の V ドメイン Ig 抑制因子 (VISTA); インターフェロン遺伝子の刺激因子 (STING); 免疫受容体チロシン系阻害モチーフ (ITIM) 含有タンパク質、T 細胞免疫グロブリンおよび ITIM ドメイン (TIGIT)、ならびにアデノシン受容体 (例えば、A2aR) からなる群より選択される、請求項 6 に記載の核酸分子。

40

【請求項 8】

前記細胞外ドメインが、可撓性のあるヒンジおよび膜貫通正準モチーフを介して前記細胞内ドメインへ融合している、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子と、前記核酸分子へ作動可能に連結された、プロモーターなどの少なくとも 1 つの制御要素と、を含むベクター。

【請求項 10】

抗原の非多形細胞表面エピトープまたは多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する細胞外ドメインを含む、aCAR をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子をさらに含み、前記エピトープが、腫瘍関連抗原であるかまたは少なく

50

とも関連腫瘍の細胞および正常組織によって共有されており、細胞内ドメインが、エフェクター免疫細胞を活性化させおよび/または共刺激する少なくとも1つのシグナル伝達要素を含む、請求項9に記載のベクター。

【請求項11】

前記 a C A R の前記細胞外ドメインが、抗原の非多形細胞表面エピトープへ特異的に結合し、前記 i C A R の前記細胞外ドメインが、前記 a C A R の前記細胞外ドメインが結合する抗原とは異なる抗原の多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する、請求項10に記載のベクター。

【請求項12】

前記 a C A R の前記細胞外ドメインが、C D 1 9 などの表1に列挙された抗原から選択される非多形細胞表面エピトープへ特異的に結合する、請求項10または11に記載のベクター。

【請求項13】

エフェクター免疫細胞を活性化させまたは共刺激する前記少なくとも1つのシグナル伝達要素が、例えば C D 3 鎖もしくは F c R 鎖の免疫受容体チロシン系活性化モチーフ (I T A M)、K I R 2 D S および K I R 3 D S などの活性化キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (K I R)、または D A P 1 2 などのアダプター分子、または例えば C D 2 7、C D 2 8、I C O S、C D 1 3 7 (4 - 1 B B) もしくは C D 1 3 4 (O X 4 0) の共刺激シグナル伝達要素と相同である、請求項10に記載のベクター。

【請求項14】

前記ヌクレオチド配列が、前記 a C A R をコードする前記ヌクレオチド配列と前記 i C A R をコードする前記ヌクレオチド配列との間に内部リボソーム進入部位 (I R E S) を含む、請求項10に記載のベクター。

【請求項15】

前記 a C A R をコードする前記ヌクレオチド配列が、前記 i C A R をコードする前記ヌクレオチド配列の下流にある、請求項14に記載のベクター。

【請求項16】

前記ヌクレオチド配列が、前記 a C A R をコードする前記ヌクレオチド配列と前記 i C A R をコードする前記ヌクレオチド配列との間にウイルス自己切断性 2 A ペプチドを含む、請求項10に記載のベクター。

【請求項17】

前記ウイルス自己切断性 2 A ペプチドが、ゾセア・アシグナ (T h o s e a a s i g n a) ウイルス (T a V) 由来の T 2 A、口蹄疫ウイルス (F M D V) 由来の F 2 A、ウマ鼻炎 A 型ウイルス (E R A V) 由来の E 2 A およびブタテッシュウウイルス 1 型 (P T V 1) 由来の P 2 A からなる群より選択される、請求項16に記載のベクター。

【請求項18】

可撓性のあるリンカーを介して前記 i C A R へ連結された前記構成的 a C A R をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項10に記載のベクター。

【請求項19】

請求項1～8に定義する、エフェクター免疫細胞の望ましくない活性化を防止または減弱させることができる阻害性キメラ抗原受容体 (i C A R) を調製する方法であって、

(i) 既知の変異体の少なくとも1つのデータベースからタンパク質をコードする遺伝子のヒトゲノム変異体のリストを検索することと、

(i i) (i) で検索した変異体の前記リストを

(a) 対応する参照対立遺伝子と比較して、前記それぞれの遺伝子によってコードされる前記タンパク質においてアミノ酸配列変異を結果的に生じる変異体を選択すること、

(b) 前記アミノ酸配列変異が前記コードされたタンパク質の細胞外ドメインにある遺伝子の変異体を選択すること、

(c) 少なくとも1つの腫瘍においてヘテロ接合性の喪失 (L O H) を受けている遺伝子の変異体を選択すること、および

10

20

30

40

50

(d)(c)によりLOHを受けている前記少なくとも1つの腫瘍の起源の組織において少なくとも発現する前記遺伝子の変異体を選択すること、によってフィルター処理し、

それにより、LOHにより前記少なくとも1つの腫瘍において喪失し、前記少なくとも1つの腫瘍の起源の組織において少なくとも発現する、前記それぞれの遺伝子によってコードされるタンパク質中の細胞外ドメインにおいてアミノ酸配列変異を有する変異体のリストを得ることと、

(iii)(ii)において得られた前記リストから少なくとも1つの単一の変異体を含む配列領域を定義し、前記少なくとも1つの単一の変異体を含む前記配列領域および前記対応する参照対立遺伝子を含む配列領域をサブクローニングして発現させ、それにより、前記それぞれのエピトープペプチドを得ることと、

(iv)(iii)において得られた、前記クローニングされた配列領域によってコードされるエピトープペプチドへ、または前記対応する参照対立遺伝子によってコードされるエピトープペプチドへのいずれかへ特異的に結合するiCAR結合ドメインを選択することと、

(vii)(iv)において定義されたiCAR結合ドメインをそれぞれ含む、請求項1～8のいずれか1項に定義されたiCARを調製することと、を含む、方法。

【請求項20】

各変異体についてのマイナー対立遺伝子頻度が1、2、3、4または5%以上である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

安全なエフェクター免疫細胞を調製するための方法であって、(i)腫瘍関連抗原に指向されるTCR操作されたエフェクター免疫細胞に、請求項1～8のいずれか1項に記載のiCARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子をトランスフェクトすること、もしくは前記細胞に請求項9に記載のベクターを形質導入すること、または(ii)請求項1～8のいずれか1項に記載のiCARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子および請求項10～13のいずれか1項に定義されるaCARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を、未処置のエフェクター免疫細胞にトランスフェクトすること、または請求項10～18のいずれか1項に記載のベクターをエフェクター免疫細胞に形質導入すること、を含む、方法。

【請求項22】

請求項21に記載の方法によって得られる安全なエフェクター免疫細胞。

【請求項23】

抗原の非多形細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含むaCAと、前記aCARの前記細胞外ドメインが結合する異なる抗原の多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合する細胞外ドメインを含むiCARと、をその表面上に発現する、請求項22に記載の安全なエフェクター免疫細胞。

【請求項24】

前記aCARの前記細胞外ドメインが、CD19などの、表1に列挙された抗原から選択される非多形細胞表面エピトープへ特異的に結合する、請求項22または23に記載の安全なエフェクター免疫細胞。

【請求項25】

前記aCARおよび前記iCARが別個のタンパク質として前記細胞表面上に存在する、請求項22に記載の安全なエフェクター免疫細胞。

【請求項26】

前記iCARをコードするヌクレオチド配列の発現レベルが、前記aCARをコードするヌクレオチド配列の発現レベル以上である、請求項22に記載の安全なエフェクター免疫細胞。

【請求項27】

LOHを特徴とする腫瘍に罹患している対象の個別化されたバイオマーカーを選択する

10

20

30

40

50

方法であって、

(i) 前記対象から腫瘍生検を得ることと、

(i i) 前記対象から正常組織の試料、例えば P B M C を得ることと、

(i i i) L O H のため前記腫瘍の細胞によって発現されないが前記正常組織の細胞によって発現される多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定することと、を含み、

それにより、前記対象について個別化されたバイオマーカーを同定する、方法。

【請求項 28】

請求項 22 に記載のエフェクター免疫細胞を患者へ投与することを含む、L O H を特徴とする腫瘍に罹患している前記患者における癌を治療するための方法であって、前記 i C A R が、ヘテロ接合性の喪失 (L O H) のため、前記腫瘍の細胞には存在しないが、少なくとも前記患者の関連哺乳類組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープをコードする単一の対立遺伝子変異体に指向される、方法。

10

【請求項 29】

前記 i C A R が、ヘテロ接合性の喪失 (L O H) のため、前記腫瘍の細胞には存在しないが、少なくとも前記患者の関連哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープをコードする単一の対立遺伝子変異体に指向される、L O H を特徴とする腫瘍に罹患している患者を治療することにおける使用のための、請求項 22 に記載の安全なエフェクター免疫細胞。

20

【請求項 30】

前記治療が、前記癌患者へ (i i i) の a C A R を発現するが (i i i) の i C A R が欠失している免疫エフェクター細胞の少なくとも 1 つの集団を投与することを含む治療と比較して、標的上の腫瘍外の反応性の低減を結果的に生じる、請求項 29 に記載の使用のための安全なエフェクター免疫細胞。

【請求項 31】

腫瘍関連抗原または抗原の非多形細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含む a C A R と、前記 a C A R の前記細胞外ドメインが結合する抗原とは異なる抗原である、前記腫瘍の起源の組織において少なくとも発現する抗原の、または H L A - A などのハウスキーピングタンパク質の、単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する細胞外ドメインを含む i C A R とをその表面上に発現する、請求項 29 に記載の使用のための安全なエフェクター免疫細胞。

30

【請求項 32】

自家またはユニバーサル (同種異系の) エフェクター細胞である、請求項 28 に記載の使用のための安全なエフェクター免疫細胞。

【請求項 33】

T 細胞、ナチュラルキラー細胞またはサイトカイン誘導性キラー細胞より選択される、請求項 28 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の使用のための安全なエフェクター免疫細胞。

【請求項 34】

2 つ以上の核酸分子の組み合わせであって、それぞれが、制御されたエフェクター免疫細胞活性化システムの異なるメンバーをコードするヌクレオチド配列を含み、前記核酸分子が、単一の連続核酸分子を形成するか、または 2 つ以上の別々の核酸分子を含み、前記制御されたエフェクター免疫活性化システムが、ヘテロ接合性の喪失 (L O H) により 1 つ以上の染色体またはその画分を喪失した腫瘍細胞を殺滅するようにエフェクター免疫細胞に指示し、関連正常組織の細胞を温存する、組み合わせであって、

40

(a) 第 1 のメンバーが、抗原の非多形細胞表面エピトープへまたは異なる多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する第 1 の細胞外ドメインを含む活性化キメラ抗原受容体 (a C A R) ポリペプチドを含み、前記非多形性または多形性の細胞表面エピトープが、腫瘍関連抗原であるか、または関連する異常なおよび正常な哺乳類組織の細胞によって共有されており、

(b) 第 2 のメンバーが、L O H により、異常な哺乳類組織によって発現しないが関連

50

する哺乳類正常組織の全ての細胞の上に存在する多形細胞表面エピトープの単一对立遺伝子変異体へ特異的に結合する第2の細胞外ドメインを含む調節ポリペプチドを含む、組み合わせ。

【請求項35】

前記第1のメンバーが、

(a) エフェクター免疫細胞を活性化させおよび/または共刺激する少なくとも1つのシグナル伝達要素を含む細胞内ドメインをさらに含む構成 a C A R、および

(b) ヘテロ二量体化小分子のための結合部位の第1のメンバーを含む細胞内ドメインと、場合により少なくとも1つの共刺激シグナル伝達要素とをさらに含むが、活性化シグナル伝達要素を欠く条件付き a C A R より選択され、前記第2のメンバーが、

(c) エフェクター免疫細胞を抑制する少なくとも1つのシグナル伝達要素を含む細胞内ドメインをさらに含む抑制性キメラ抗原受容体 (i C A R)、または

(d) シェダーゼのための基質を含む細胞外調節領域と、膜内切断プロテアーゼのための基質を含む膜貫通正準モチーフと、細胞内ドメインと、をさらに含む保護的キメラ抗原受容体 (p C A R) であって、前記細胞内ドメインが、エフェクター免疫細胞およびヘテロ二量体化小分子のための結合部位の第2のメンバーを活性化させおよび/または共刺激する少なくとも1つのシグナル伝達要素を含む、p C A R より選択される、請求項34に記載の組み合わせ。

【請求項36】

(i) 前記 i C A R または p C A R の前記細胞外ドメインが、前記 a C A R の前記細胞外ドメインが結合する抗原とは異なる抗原である、前記抗原の多形細胞表面エピトープの単一对立遺伝子変異体の特異的に結合する、(ii) 前記 p C A R または i C A R の前記細胞外ドメインが、前記 a C A R の前記細胞外ドメインが結合するのと同じ抗原の異なる多形細胞表面エピトープの単一对立遺伝子変異体の特異的に結合する、あるいは

(iii) 前記 p C A R または i C A R の前記細胞外ドメインが、前記 a C A R の前記細胞外ドメインが結合するのと同じ多形細胞表面エピトープの異なる単一对立遺伝子変異体の特異的に結合する、請求項34または35に記載の組み合わせ。

【請求項37】

前記シェダーゼのための基質が、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ (A D A M) またはベータ - セクレターゼ 1 (B A C E 1) のための基質である、請求項34に記載の組み合わせ。

【請求項38】

前記基質が前記細胞外ドメインの一部を形成し、L i n 1 2 / N o t c h 反復と A D A M プロテアーゼ切断部位とを含む、請求項37に記載の組み合わせ。

【請求項39】

前記膜内切断プロテアーゼの基質が、S P 2、セクレターゼ、シグナルペプチドペプチダーゼ (s p p)、s p p 様プロテアーゼまたはロンボイドプロテアーゼのための基質である、請求項34に記載の組み合わせ。

【請求項40】

前記基質が、前記膜貫通正準モチーフの一部を形成し、ノッチ、E r b B 4、E - カドヘリン、N - カドヘリン、エフリン - B 2、アミロイド前駆体タンパク質または C D 4 4 の膜貫通ドメインと相同である/に由来する、請求項39に記載の組み合わせ。

【請求項41】

前記条件付き a C A R の細胞外ドメインおよび細胞内ドメインを別々のタンパク質としてコードするヌクレオチド配列を含み、各ドメインが独立して膜貫通正準モチーフに融合し、ヘテロ二量体化小分子に対する結合部位の異なるメンバーを含む、請求項34に記載の組み合わせ。

【請求項42】

ヘテロ二量体化小分子のための前記結合部位の前記第1および第2のメンバーのそれぞれが、

10

20

30

40

50

(i) タクロリムス (F K 5 0 6) 結合タンパク質 (F K B P) および F K B P 、
 (i i) F K B P およびカルシニューリン触媒サブユニット A (C n A) 、
 (i i i) F K B P およびシクロフィリン、
 (i v) F K B P および F K B P - ラパマイシン関連タンパク質 (F R B) 、
 (v) ジャイレース B (G y r B) および G y r B 、
 (v i) ジヒドロ葉酸還元酵素 (D H F R) および D H F R 、
 (v i i) D m r B ホモ二量体化ドメイン (D m r B) および D m r B 、
 (v i i i) P Y L タンパク質 (別名アブシジン酸受容体および R C A R として) およ
 び A B I 、

(i x) G A I シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) タンパ
 ク質 (別名ジベレリン酸非感受性および D E L L A タンパク質 G A I (G A I)) およ
 び G I D 1 シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) タンパク質 (ジベレリン受容体 G I D 1 としても既知) (G I D 1) より選択されるタンパク質に由来
 する、請求項 3 4 に記載の組み合わせ。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍細胞の表面上に発現する抗原を認識する活性化キメラ抗原受容体 (a C
 A R) 、阻害性 C A R (i C A R) および正常細胞によって発現するが、ヘテロ接合性の
 喪失 (L O H) により腫瘍によって発現することがない同じまたは他の細胞表面抗原の対
 立遺伝子変異体に向かう保護的 C A R (p C A R) を採用する、養子細胞移植による癌免
 疫療法の分野に関する。

20

【背景技術】

【0002】

腫瘍細胞によって独占的に発現するが健常な組織によっては発現しない標的化可能抗原
 の同定は、今日、癌免疫療法における間違いなく主要な課題である。T細胞が腫瘍細胞を
 根絶することができるという臨床的証拠は、T細胞を利用して癌を治療するための非常に
 多様なアプローチを評価している多数の研究から来ている (R o s e n b e r g a n d
 R e s t i f o , 2 0 1 5) 。これらは、ドナーリンパ球注入による骨髄移植、腫瘍浸
 潤リンパ球 (T I L) の養子移植、C A R (G r o s s a n d E s h h a r , 2 0 1
 6 a) または T 細胞受容体 (T C R) を介した予め選択された抗原に遺伝的に向け直され
 た T 細胞による治療、免疫チェックポイント阻害剤の使用または能動的ワクチン接種を採
 用する。これらのうち、遺伝子操作された T 細胞の使用および能動免疫のための異なる戦
 略は、耐久性のある臨床反応を示すが有害作用は最小限であると思われる候補抗原に関す
 る既存の情報を必要とする。しかし、S . R o s e n b e r g による最近の総説の表題に
 記載のとおり、「適切な標的を見つけることは癌遺伝子療法に対する大きな障壁である」
 (R o s e n b e r g , 2 0 1 4) 。

30

【0003】

M H C 非依存的様式で選択した抗原に対して T 細胞 (またはナチュラルキラー (N K)
 細胞およびサイトカイン誘導性キラー細胞などの免疫系の他のキラー細胞) を遺伝的に向
 け直すためのキメラ抗原受容体 (または C A R) を使用する概念が、1980年代後半に
 G r o s s および E s h h a r によって初めて導入された (G r o s s e t a l . ,
 1 9 8 9) 。それらは、T細胞活性化が可能な C D 3 - または F c R 鎖の免疫受容体
 チロシン系活性化モチーフを含むシグナル伝達成分へ、可撓性のあるヒンジおよび膜貫通
 正準モチーフを介して融合した細胞外一本鎖抗体可変フラグメント (s c F v) をコード
 するキメラ遺伝子から合成で産生される。現在、C A R は数十の臨床試験で検討されてお
 り、B細胞悪性腫瘍において非常に高い効能を示している (D o t t i e t a l . ,
 2 0 1 4 、 G i l l a n d J u n e , 2 0 1 5 、 G r o s s a n d E s h h a r
 , 2 0 1 6 a) 。C A R - T 細胞療法の安全性は、全体として、腫瘍と健常組織とを区別

40

50

するその能力によって決定される。臨床試験および前臨床試験で報告されている主なリスクおよび有害な自己免疫作用についての直接の原因は、標的抗原の腫瘍外発現に起因する腫瘍外の標的に当たる毒性である（本発明者らの近年の総説（Gross and Eshhar, 2016b）および（Klebanoff et al., 2016）において詳細に取り扱い）。このリスクに関して、現在臨床的にまたは前臨床的にCAR療法について試験されている、共有された変異していない細胞表面抗原は、一般に、それらの組織分布および発現様式により、いくつかのカテゴリーに分けることができる。

- 厳密に腫瘍特異的な抗原。おそらくすでに臨床的に検討されているこの群の唯一のメンバーは、神経膠芽腫で頻繁に過剰発現し、また非小細胞肺癌ならびに正常組織にはない前立腺癌、乳癌、頭頸部癌および卵巣癌でも認められる表皮成長因子受容体（EGFRvIII）の変異体IIIである。

- 腫瘍上および非生命維持健全組織上に発現した表面抗原。この群の潜在的なCAR抗原は、B細胞系譜に主として制限されている分化関連分子である。これら（および多数の臨床試験における標的抗原）のうちで著名なものは、CD19であり、B細胞分化のごく初期に獲得され、B細胞受容体（BCR）によるシグナル伝達に關与する膜B細胞マーカーである。膜前立腺抗原は、このカテゴリーの別のクラスの抗原を構成する。

- 非悪性腫瘍促進細胞によって通常発現する抗原。1つのこのような抗原は、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）であり、多様な原発癌および転移癌において腫瘍関連線維芽細胞によってほぼ常に発現する細胞表面セリンプロテアーゼである。別の抗原は血管内皮成長因子（VEGF）であり、これは腫瘍血管形成の間に多量に発現し、多くの生命維持器官における血管細胞およびリンパ内皮細胞上に通常発現する。

- 生命維持健全組織と共有される腫瘍関連抗原（TAA）。

【0004】

前臨床試験および臨床試験で現在評価されている他のほとんどのTAAは腫瘍によって過剰発現するが、通常より低いレベルで、必須の正常組織にも存在している。

【0005】

CAR T細胞療法における自己免疫に取り組むために考案された広範な戦略は、損傷が明白になった時点で導入されたT細胞を除去または抑制しようとするもの（反応性手段）と、そもそも潜在的な損傷を予防することを目的とするもの（予防的手段）とに分けることができる（Gross and Eshhar, 2016a）。反応性アプローチはしばしば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV-tk）および、短縮型ヒトカスパーゼ9と変異型FK506結合タンパク質とを含む融合ポリペプチドであるiC9などの自殺遺伝子を使用する。他のアプローチは、破壊される操作された細胞を選択的に除去するための抗体、または近年実証されたように、細胞内シグナル伝達ドメインへのCAR認識部分のカップリングを支配するヘテロ二量体化小分子薬を利用する（Wu et al., 2015）。いくつかの予防的手段は、CAR T細胞の生体内での持続性または機能を制限するように設計されている（例えば、遺伝子送達のためのmRNA電気穿孔法の使用）が、その他は、非腫瘍組織への損傷を回避するよう、治療用CARの抗原選択性を高める臨床的な課題に直接対処する。これらのうちの2つは、CAR T細胞が安全に標的とされることができる腫瘍抗原の範囲を潜在的に広げることができるので、特に関心が寄せられる。

- コンビナトリアル（または「スプリット」）抗原認識。真の腫瘍特異的抗原はまれであるが、所与の腫瘍によって共発現する腫瘍関連抗原として必ずしも分類されない2つの異なる抗原の組み合わせは、新たな腫瘍特異的シグネチャーを定義することができる。CAR T細胞の活性をこのような抗原対に制限することは、重要な安全基準を提供し、結果として、腫瘍特異的標的の範囲を拡大し、実質的な治療的価値となり得る。第2世代および第3世代のCARは、CARエンドドメインで2つ以上のシグナル伝達部分をつなぎ合わせるによって単一の抗原と係合すると、治療用T細胞に活性化シグナルおよび共刺激シグナルを提供するように設計されてきた。しかしながら、活性化および共刺激が、それぞれ異なる抗原に特異的な2つのCARの間で同じT細胞において分けられる場

10

20

30

40

50

合、完全な生じる応答は、2つの抗原の存在下でのみ達成され得る2つの相補的シグナルの協力を必要とするであろう。この原理はいくつかの前臨床試験で実証されている (K l o s s e t a l . , 2 0 1 3、L a n i t i s e t a l . , 2 0 1 3、W i l k i e e t a l . , 2 0 1 2、W O 2 0 1 6 / 1 2 6 6 0 8)。

【0006】

疑いなく興味をそそるものの、このアプローチは依然として、有効な標的に当たり、腫瘍に当たるT細胞反応性を可能にしかしないであろう最適なバランスに達するために、活性化シグナルおよび共刺激シグナルの両方の大きさの細かい滴定における必要性に直面する。このようなバランスが臨床現場で日常的に達成できるかどうかは依然として疑問である。

10

【0007】

2つの抗原の独特な組み合わせを発現する標的細胞のみにT細胞応答を制限するための全く新たなアプローチが最近公開された (R o y b a l e t a l . , 2 0 1 6 a)。その中枢要素は、N o t c hを含むいくつかの細胞表面受容体の作用様式を利用する「遺伝子スイッチ」として機能する。このような受容体のそのリガンドへの結合に続いて、それは二重切断を受け、それが細胞内ドメインを結果的に遊離させ、それが細胞核に輸送され、そこでそれは転写因子として機能する。この原理の実行は、エフェクターT細胞への2つの遺伝子の共導入を伴う。第1のものは構成的に発現し、第1の抗原に向けられた認識部分を備えたこのようなキメラ切断可能な受容体をコードする。標的細胞の表面上のこの抗原との係合は、第2の抗原に向けられた従来のC A Rをコードする第2の遺伝子の発現をオンにするであろう。標的細胞は、それがこの第2の抗原を同様に共発現する場合にのみ殺滅されるであろう。

20

【0008】

阻害性C A R腫瘍外反応性は、C A Rに再度向けられたキラー細胞の標的抗原が正常組織と共有されているときに生じる。この正常組織が腫瘍に存在しない別の表面抗原を発現する場合、阻害シグナル伝達部分を有するこの非共有抗原を標的とする追加のC A Rを、遺伝子改変細胞中で共発現することは、正常細胞によるT細胞活性化を防止することができる。

【0009】

活性化ドメイン (F c R またはC D 3 - など) の代わりに、i C A Rは、C T L A - 4、P D - 1またはN K阻害受容体など、T細胞活性化に拮抗することができる阻害受容体に由来するシグナル伝達ドメインを有する。候補のa C A R抗原を腫瘍と共有する正常組織が、腫瘍と共有されない別の表面抗原を発現する場合、この非共有抗原を標的とする同じT細胞によって発現するi C A Rが正常組織を保護することができる (図1)。

30

【0010】

体細胞的に再配置された遺伝子セグメントによってコードされる独特の二本鎖T C Rをそれぞれ発現するT細胞とは異なり、N K細胞は抗原特異的受容体を発現しない。その代わりに、N K細胞は、感染細胞および健常細胞の細胞表面で多数の活性化リガンドおよび阻害リガンドをそれぞれ認識する、生殖細胞系列がコードした一連の活性化受容体および阻害受容体を発現する。K I R 3 D L 1などのN K阻害受容体に基づくi C A Rの保護能力が説明されている (米国特許第9, 745, 368号)。K I R 3 D L 1および他のN K阻害受容体は、免疫学的シナプスを迅速かつ包括的な様式で解体することによって機能する。単一のN K細胞が阻害リガンドおよび活性化リガンドの両方を発現する耐性細胞を免れさせながら、同時にそれが関与する感受性細胞を殺すことができ、そのことが活性化リガンドのみを発現するという有力な証拠がある (A b e y w e e r a e t a l . , 2 0 1 1、E r i k s s o n e t a l . , 1 9 9 9、T r e a n o r e t a l . , 2 0 0 6、V y a s e t a l . , 2 0 0 1)。この絶妙な能力は、結果として細胞溶解性顆粒のエキソサイトーシスに影響するそれぞれの免疫シナプスの各々において形成されるシグナル伝達分子の異なる空間的組織化によって支配される (総説については (H u s e e t a l . , 2 0 1 3) を参照されたい)。より近年では、F e d o r o vら

40

50

(Fedorov et al., 2013a, WO2015/142314)は、この目的のためにPD-1およびCTLA-4の細胞内ドメインをうまく採用した。NK阻害受容体とは異なり、これらのiCARの調節作用は細胞全体に影響した。それでも、これらの効果は一時的なものであり、aCAR抗原のみを発現する標的細胞とのその後の遭遇時に完全なT細胞活性化を可能にした。

【0011】

iCARおよびaCARが標的とする抗原の組織分布は、臨床的効能を犠牲にすることなく最大限の安全性を付与するのに必要とされるiCARの最適な作用様式を決定する。例えば、腫瘍および保護されるべき正常組織(複数可)の解剖学的部位が交差しない場合、一過性阻害(CTLA-4またはPD-1様)でおそらく十分であろう。しかし、これらの部位が重複している場合、シナプス限定阻害(すなわち、NK作用様式)のみが治療用細胞の一定の麻痺を防ぎ、それらの有効な殺腫瘍活性を可能にするであろう。標的上の腫瘍外反応性を低減させるためにiCARを使用するアプローチは、腫瘍細胞の中で下方調節されるが正常組織の上に存在する抗原の悲惨な欠失を被る。

10

【0012】

次世代配列決定(NGS)により、所与の腫瘍生検における全タンパク質コード遺伝子(全ゲノムの約1%)のDNA配列の決定、および同じ患者の癌の「エクソーム」と健常組織のそれ(通常白血球由来)との比較を可能にする。エクソーム配列決定は、生検後の除去後数日以内に比較的低コストで完了することができる。並行して、トランスクリプトーム解析(RNA-seq)は、同じ細胞試料によって実際に発現する遺伝子に関する補足情報を提供することができる。

20

【0013】

各個々の腫瘍の変異の様相が独特であることがますます明らかになりつつある(Lawrence et al., 2013, Vogelstein et al., 2013)。非同義変異の結果として、腫瘍細胞は、患者のHLA産物のうちの1つ以上において患者の免疫系へ新生ペプチドの個人用セットを潜在的に提示する可能性がある。実際、近年、患者自身のCD8またはCD4T細胞レパートリーによって認識され、免疫療法の標的として役立つことができる腫瘍特異的新生エペトープの同定にここ数年多大な努力が注がれている(総説については(Blankenstein et al., 2015, Van Buuren et al., 2014, Heemskerk et al., 2013, Overwijk et al., 2013, Schumacher and Schreiber, 2015)を参照されたい)。しかしながら、累積的な知見は、新生抗原系T細胞免疫療法が、黒色腫および肺癌などのより高い変異量を示す癌には有効である可能性がより高いが、より少数の変異を有するたいていの癌においては利点をしばしば示し損ね得ることを示唆している(Savage, 2014, Schumacher and Schreiber, 2015)。さらに、かなりの腫瘍内不均一性(Burrell et al., 2013)は、変異喪失変異体の出現を回避するためにいくつかの抗原を同時に共標的化することを必要とし、これは有用な免疫原性新生ペプチドの不足の点ですますます需要が高まりつつある課題である。

30

【0014】

結局のところ、遺伝的に再び向けられたキラー細胞の養子伝達を介した癌免疫療法のための適切な標的を同定する喫緊の必要性は依然として広く満たされていない。

40

【発明の概要】

【0015】

一態様において、本発明は、エフェクター免疫細胞の望ましくない活性化を防止または減弱させることができる阻害性キメラ抗原受容体(iCAR)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供し、ここで、iCARは、ヘテロ接合性の喪失(LOH)のために哺乳動物腫瘍細胞には存在しないが少なくとも関連する哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する、多形細胞表面エペトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する細胞外ドメインと、エフェクター免疫細胞を阻害する少なくとも1つのシグナル伝達要素を含

50

む細胞内ドメインとを含む。

【0016】

さらなる態様において、本発明は、本明細書に定義の本発明の核酸分子と、核酸分子へ操作可能に連結された、プロモーターなどの、少なくとも1つの制御要素とを含むベクターを提供する。

【0017】

別の態様において、本発明は、本明細書に定義の本発明により、エフェクター免疫細胞の望ましくない活性化を防止または減弱させることができる阻害性キメラ抗原受容体(iCAR)を調製する方法であって、(i)既知の変異体の少なくとも1つのデータベースからタンパク質コード遺伝子のヒトゲノム変異体のリストを検索することと、(ii)(a)対応する参照対立遺伝子と比較して、個々の遺伝子によってコードされるタンパク質においてアミノ酸配列変異を結果的に生じる変異体を選択することと、(b)アミノ酸配列の変化が、コードされるタンパク質の細胞外ドメインである、遺伝子の変異体を選択することと、(c)少なくとも1つの腫瘍においてヘテロ接合性の喪失(LOH)を受ける遺伝子の変異体を選択することと、(d)(c)によってLOHを受けている少なくとも1つの腫瘍の少なくとも起源の組織において発現する遺伝子の変異体を選択し、それによりLOHにより少なくとも1つの腫瘍において喪失した個々の遺伝子によってコードされ、少なくとも1つの腫瘍の少なくとも起源の組織において発現するタンパク質における細胞外ドメインにおけるアミノ酸配列変化を有する変異体のリストを得ることとによって、(i)において検索された変異体のリストをフィルター処理することと、(iii)(ii)で得られたリストから少なくとも1つの単一の変異体を含む配列領域を定義し、少なくとも1つの単一の変異体を含む配列領域および、対応する参照対立遺伝子を含む配列領域をサブクロニングして発現させ、それにより個々のエピトープペプチドを得ること、(iv)(iii)で得られた、クロニングされた配列領域によってコードされるエピトープペプチドまたは対応する参照対立遺伝子によってコードされるエピトープペプチドのいずれかへ特異的に結合するiCAR結合ドメインを選択することと、(vii)(iv)に定義のiCAR結合ドメインを各々含む、本明細書に定義のiCARを調製することと、を含む方法を提供する。

【0018】

なおも別の態様において、本発明は、(i)腫瘍関連抗原に対して向けられたTCR操作エフェクター免疫細胞に、本明細書に定義のiCARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子をトランスフェクトすること、もしくはこの細胞に本明細書に定義のベクターを形質導入すること、または(ii)未処置のエフェクター免疫細胞に、本明細書に定義のiCARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、および本明細書に定義のaCARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子をトランスフェクトすること、もしくはエフェクター免疫細胞に本明細書に定義のベクターを形質導入すること、を含む、安全なエフェクター免疫細胞を調製するための方法を提供する。

【0019】

さらに別の態様において、本発明は、本明細書に説明の本発明の方法によって得られる安全なエフェクター免疫細胞を提供する。安全なエフェクター免疫細胞は、外来性T細胞受容体(TCR)およびiCARを発現する再び向けられたT細胞であり得、ここで、外来性TCRは、抗原の非多形細胞表面エピトープまたは多形細胞の単一の対立遺伝子変異体に向けられ、ここで、当該エピトープは腫瘍関連抗原であるか、もしくは少なくとも関連腫瘍および正常組織の細胞によって共有され、iCARは本明細書に定義の通りであり、または安全なエフェクター免疫細胞は、本明細書に定義のiCARおよびaCARを発現するナチュラルキラー細胞もしくはT細胞などの再び向けられたエフェクター免疫細胞である。

【0020】

さらなる態様において、本発明は、LOHを特徴とする腫瘍を有する対象のための個別化バイオマーカーを選択する方法であって、(i)対象から腫瘍生検を得ることと、(i

10

20

30

40

50

i) 対象から正常組織、例えば末梢血単核球 (P B M C) の試料を得ることと、(i i i) L O H のため腫瘍の細胞によって発現することはないが、正常組織の細胞によって発現する多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定し、それにより、対象の個別化バイオマーカーを同定することと、を含む方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

さらなる態様において、本発明は、L O H を特徴とする腫瘍を有する患者へ、本明細書に定義のエフェクター免疫細胞を投与することを含む、当該患者において癌を治療するための方法を提供し、i C A R は、ヘテロ接合性の喪失 (L O H) のために腫瘍の細胞には存在しないが、少なくとも患者の関連哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープをコードする単一の対立遺伝子変異体へ向けられる。

10

【 0 0 2 2 】

なおもさらなる態様において、本発明は、L O H を特徴とする腫瘍を有する患者を治療するのに使用するための本明細書に定義の安全なエフェクター免疫細胞に向けられ、ここで i C A R は、ヘテロ接合性の喪失 (L O H) のため腫瘍の細胞には存在しないが、少なくとも患者の関連哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープをコードする単一の対立遺伝子変異体に向けられる。

【 0 0 2 3 】

なおさらなる態様において、本発明は、(i) L O H のため腫瘍細胞によって発現することはないが、正常組織の細胞によって発現する多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定するかまたはその情報を受容することと、(i i) 抗原の非多形細胞表面エピトープまたは多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定するかまたはその情報を受容することと、ここで、当該エピトープは腫瘍関連抗原であるか、または当該癌患者における少なくとも関連腫瘍および正常組織の細胞によって共有される、同定するかまたは受容することと、(i i i) 本明細書に定義の i C A R を定義する少なくとも1つの核酸分子、および本明細書に定義の a C A R をコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子、または本明細書に定義の少なくとも1つのペクターを選択するかまたは受容することと、i C A R は (i) の細胞表面エピトープに特異的に結合する細胞外ドメインを含み、a C A R は (i i) の細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含むことと、(i v) (i i i) の核酸分子をエフェクター免疫細胞にトランスフェクトすること、または (i i i) のペクターをエフェクター免疫細胞に形質導入することによって、安全な再び向けられたエフェクター免疫細胞の少なくとも1つの集団を調製するかまたは受容することと、(v) 当該癌患者へ、(i v) の安全な再び向けられた免疫エフェクター細胞の少なくとも1つの集団を投与することと、を含む、L O H を特徴とする腫瘍を有する患者における癌を治療するための方法に向けられる。

20

30

【 0 0 2 4 】

同様の態様において、本発明は、L O H を特徴とする腫瘍を有する患者において癌を治療するための安全な再び向けられた免疫エフェクター細胞の少なくとも1つの集団を提供し、ここで、安全な再び向けられた免疫細胞は、(i) L O H のため腫瘍細胞によって発現することはないが、正常組織の細胞によって発現する、多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定するかまたはその情報を受容することと、(i i) 抗原の非多形細胞表面エピトープまたは多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定するかまたはその情報を受容することと、ここで、当該エピトープは腫瘍関連抗原であるか、または当該癌患者の少なくとも関連腫瘍および正常組織の細胞によって共有されている、同定するかまたは受容することと、(i i i) 本明細書に定義の i C A R を定義する少なくとも1つの核酸分子、および本明細書に定義の a C A R をコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子、または本明細書に定義の少なくとも1つのペクターを選択するかまたは受容することと、i C A R は (i) の細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含み、a C A R は (i i) の細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含む、選択するかまたは受容することと、(i v) エフェクター免

40

50

疫細胞に (i i i) の核酸分子をトランスフェクトすること、またはエフェクター免疫細胞に (i i i) のベクターを形質導入することによって、安全な再び向けられたエフェクター免疫細胞の少なくとも1つの集団を調製するかまたは受容すること、によって得られる。

【 0 0 2 5 】

別の態様において、本発明は、各々1つが制御エフェクター免疫細胞活性化システムの異なるメンバーをコードするヌクレオチド配列であって、単一の一部であるかまたは単一を形成する当該核酸分子は、核酸分子を続行すること、または2つ以上の別個の核酸分子を含む、2つ以上の核酸分子の組み合わせに向けられており、ここで、制御エフェクター免疫活性化システムは、エフェクター細胞に、ヘテロ接合性の喪失 (L O H) のため、1つ以上の染色体またはその一部を喪失した腫瘍細胞を殺滅させ、関連する正常組織の細胞を免れさせ、(a) 第1のメンバーは、抗原の非多形細胞表面エピトープへまたは異なる多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する第1の細胞外ドメインを含む活性化キメラ抗原受容体 (a C A R) ポリペプチドを含み、当該非多形または多形細胞表面エピトープは、腫瘍関連抗原であるかまたは関連する異常および正常哺乳類組織の細胞によって共有され、(b) 第2のメンバーは、L O H のために異常な哺乳類組織によって発現することはないが関連する哺乳類正常組織の全ての細胞上に存在する多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する第2の細胞外ドメインを含む調節ポリペプチドを含む。

10

【 図面の簡単な説明 】

20

【 0 0 2 6 】

【 図 1 】 i C A R の概念を示す ((F e d o r o v e t a l . , 2 0 1 3 a) より引用) 。

【 図 2 】 a C A R / p C A R 分子設計および作用様式を示す。p C A R が正常細胞上のその抗原へ結合することは、これらが a C A R 抗原を発現するか否かにかかわらず、迅速な R I P およびポリペプチドの3つの別個のフラグメントへの分解を結果的に生じると期待される。

【 図 3 A 】 H L A クラス I 遺伝子座をコードする染色体領域における L O H を受けている腫瘍試料の百分率を示す。T C G A データベースからの腫瘍型における A . H L A - G 、 B . H L A - A 、 C . Z N R D 1 。嫌色素性腎 (K I C H) 、副腎皮質癌 (A C C) 、膵腺癌 (P A A D) 、肉腫 (S A R C) 、腎臓腎乳頭細胞癌 (K I R P) 、食道癌 (E S C A) 、肺扁平上皮癌 (L U S C) 、腎臓腎明細胞癌 (K I R C) 、膀胱尿路上皮癌 (B L C A) 、卵巣漿液性嚢胞腺癌 (O V) 、胸腺腫 (T H Y M) 、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸内腺癌 (C E S C) 、頭頸部扁平上皮癌 (H N S C) 、乳房浸潤癌 (B R C A) 、胃腺癌 (S T A D) 、リンパ性新生物びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (D L B C) 、多形性膠芽腫 (G B M) 、結腸腺癌 (C O A D) 、直腸腺癌 (R E A D) 、肺腺癌 (L U A D) 、精巣胚細胞腫瘍 (T G C T) 、中皮腫 (M E S O) 、胆管癌 (C H O L) 、子宮癌肉腫 (U C S) 、皮膚黒色腫 (S K C M) 、子宮体部子宮内腺癌 (U C E C) 、脳低悪性度神経膠腫 (L G G) 、前立腺癌 (P R A D) 、肝細胞癌 (L I H C) 、甲状腺癌 (T H C A) 、褐色細胞腫および傍神経節腫 (P C P G) 、急性骨髄性白血病 (L A M L) 、ぶどう膜黒色腫 (U V M)

30

40

【 図 3 B 】 H L A クラス I 遺伝子座をコードする染色体領域における L O H を受けている腫瘍試料の百分率を示す。T C G A データベースからの腫瘍型における A . H L A - G 、 B . H L A - A 、 C . Z N R D 1 。嫌色素性腎 (K I C H) 、副腎皮質癌 (A C C) 、膵腺癌 (P A A D) 、肉腫 (S A R C) 、腎臓腎乳頭細胞癌 (K I R P) 、食道癌 (E S C A) 、肺扁平上皮癌 (L U S C) 、腎臓腎明細胞癌 (K I R C) 、膀胱尿路上皮癌 (B L C A) 、卵巣漿液性嚢胞腺癌 (O V) 、胸腺腫 (T H Y M) 、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸内腺癌 (C E S C) 、頭頸部扁平上皮癌 (H N S C) 、乳房浸潤癌 (B R C A) 、胃腺癌 (S T A D) 、リンパ性新生物びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (D L B C) 、多形性膠芽腫 (G B M) 、結腸腺癌 (C O A D) 、直腸腺癌 (R E A D) 、肺腺癌 (L U

50

A D)、精巢胚細胞腫瘍(TGCT)、中皮腫(MESO)、胆管癌(CHOL)、子宮癌肉腫(UCS)、皮膚黒色腫(SKCM)、子宮体部子宮内膜癌(UCEC)、脳低悪性度神経膠腫(LGG)、前立腺癌(PRAD)、肝細胞癌(LIHC)、甲状腺癌(THCA)、褐色細胞腫および傍神経節腫(PCPG)、急性骨髄性白血病(LAML)、ぶどう膜黒色腫(UVM)

【図3C】HLAクラスI遺伝子座をコードする染色体領域におけるLOHを受けている腫瘍試料の百分率を示す。TCGAデータベースからの腫瘍型におけるA.HLA-G、B.HLA-A、C.ZNRD1。嫌色素性腎(KICH)、副腎皮質癌(ACC)、膵腺癌(PAAD)、肉腫(SARC)、腎臓腎乳頭細胞癌(KIRP)、食道癌(ESCA)、肺扁平上皮癌(LUSC)、腎臓腎明細胞癌(KIRC)、膀胱尿路上皮癌(BLCA)、卵巣漿液性嚢胞腺癌(OV)、胸腺腫(THYM)、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸内膜腺癌(CESC)、頭頸部扁平上皮癌(HNSC)、乳房浸潤癌(BRCA)、胃腺癌(STAD)、リンパ性新生物びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBC)、多形性膠芽腫(GBM)、結腸腺癌(COAD)、直腸腺癌(READ)、肺腺癌(LUAD)、精巢胚細胞腫瘍(TGCT)、中皮腫(MESO)、胆管癌(CHOL)、子宮癌肉腫(UCS)、皮膚黒色腫(SKCM)、子宮体部子宮内膜癌(UCEC)、脳低悪性度神経膠腫(LGG)、前立腺癌(PRAD)、肝細胞癌(LIHC)、甲状腺癌(THCA)、褐色細胞腫および傍神経節腫(PCPG)、急性骨髄性白血病(LAML)、ぶどう膜黒色腫(UVM)

【図4A】HLAクラスI遺伝子座をコードする染色体領域におけるLOHを受けている腫瘍試料の百分率を示す。図1と同じ腫瘍型におけるA.HLA-B、B.HLA-C。

【図4B】HLAクラスI遺伝子座をコードする染色体領域におけるLOHを受けている腫瘍試料の百分率を示す。図1と同じ腫瘍型におけるA.HLA-B、B.HLA-C。

【発明を実施するための形態】

【0027】

1971年にA.G.Knudson(Knudson Jr., 1971)によって提唱された腫瘍抑制遺伝子(TSG)の革命的な概念を参照して、Devilee、Cleton-JansenおよびCornelisseは、「Ever since Knudson」(Devilee et al., 2001)という表題のエッセイの冒頭の段落において「多くの公開物が、広範な種々の腫瘍における多くの異なる染色体についてLOHを記録しており、複数のTSGの存在を含意しているKnudsonの2ヒット仮説は、これらのLOH事象がTSGのいずれの対立遺伝子の不活性化においても第2のステップであると予測している」と述べた。Lengauer、Kinzler、およびVogelsteinは、ヒトの癌における遺伝的不安定性に関する影響力の強い総説(Lengauer et al., 1998)において、「核型研究は、癌の大部分が染色体を喪失または獲得することを示しており、分子レベルの研究は、核型データが実際には、このような変化の真の範囲を過小評価していることを示している。ヘテロ接合性の喪失、すなわち腫瘍における母方または父方の対立遺伝子の喪失は広範囲であり、しばしば反対側の対立遺伝子の獲得を伴っている。腫瘍は、例えば、父方の第8染色体を複製しながら、母方の第8染色体を喪失し、細胞に正常な第8染色体の核型であるが異常な第8染色体の「対立遺伝子型」を残したままにし得る。結腸、乳房、膵臓、または前立腺の「平均的な」癌は、その対立遺伝子の25%を喪失し得、腫瘍がその対立遺伝子の半分超を喪失したことは珍しいことではない」と記した。これらの見解はそれ以来、数多くの報告で補強されており、実質的にすべての癌腫を含むヒトのほぼすべての癌へ広がってきた(総説については(McGranahan et al., 2012)を参照されたい)。現在では、ほぼすべての個々の腫瘍が、全染色体、全染色体アーム、または様々なサイズの染色体の下位領域の多数の喪失を示すことが明白に確立されている。エクソーム配列データに基づいた何らかの所与の細胞試料におけるLOH特性の決定の新たなアルゴリズムが急速に開発されている(例えば、Sathirapongsasuti et al., 2011)。統計的偏りは現在のところいくつかの解釈の妥当性に疑問を呈し得る(Te

10

20

30

40

50

o et al., 2012) が、このようなアルゴリズムはNGS以前の時代にこの目的のために採用されてきたLOH特性を確立するための他のほとんどの方法論を改良し置き換えているようである。

【0028】

初期のLOH事象は、同じ組織の前悪性細胞では検出することができるが、周囲の正常細胞では検出することはできない(Barrett et al., 1999)。LOHは不可逆的であり、事象は蓄積することしかできないので、腫瘍の不均一性は腫瘍進行全体にわたる喪失の蓄積を反映する。より後期のLOH事象において異なる腫瘍サブクローンが発生する可能性があるが、所与の患者における前悪性細胞、推定上の腫瘍幹細胞およびすべての腫瘍サブクローンによって共有される最小のLOHシグネチャーの存在が通例であると予想される。この「体幹」のLOHパターンから生じる枝は、同じ患者におけるすべての腫瘍細胞をまとめて網羅する部分的に重複するシグネチャーの限られたセットを依然として創出するであろう。

10

【0029】

全体的なLOH事象の避けられない結果は、欠失した染色体材料上に存在する他の全ての遺伝子の付随的な喪失であり、これらは当然、膜貫通タンパク質をコードする多くの遺伝子を含む。それらの同一性に関して、3,702の異なるヒト細胞表面タンパク質(「サーフェソーム」)のカタログが編集されてきた(Da Cunha et al., 2009)。約42%のサーフェソーム遺伝子の発現は広範な組織分布を示すのに対し、約85の遺伝子は検査したすべての組織によって発現し、これはハウスキーピング遺伝子の特徴である。これらの遺伝子は候補であり、それらの異なる多型変異体は、本発明のiCARおよびaCARの標的として役立ち得る。

20

【0030】

さらに近年、Bausch-Fluck et al. (Bausch-Fluck et al., 2015) は、41のヒト細胞型における1492の細胞表面糖タンパク質の組み合わせセットを同定するために彼らのケモプロテオミクス細胞表面捕捉技術を適用した。サーフェソームの大部分は何らかの所与の腫瘍によって発現すると予想され、各々は異なる特性を呈する。細胞表面タンパク質をコードする遺伝子は、それらのコード領域において一塩基多型(SNP)が他の全ての遺伝子よりもわずかに濃縮されていることが発見された(Da Cunha et al., 2009)。より稀である多型インフレーション挿入および欠失はさらに、変異体の数に寄与しており、ペプチド配列変更(非同義)SNPよりもポリペプチド産物に及ぼす頑強な構造効果を発揮する可能性が高い。全体として、典型的なゲノムは、非同義変異体および190~210のインフレーション挿入/欠失を有する10,000~12,000の部位を含有する(Abecasis et al., 2010、Auton et al., 2015)。これらの変異体は、HLA遺伝子座(<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>)またはある特定のGタンパク質共役受容体(GPCR)遺伝子(Lee et al., 2003、Rana et al., 2001)などの高度に多型の遺伝子が異なる変異体の「ホットスポット」を創出するので、ゲノムのいたるところで均一に分布していない。LOH関連のホットスポットの別の層は、ある特定の染色体、または異なる癌における染色体アームの頻繁な喪失に起因する(例えば、小細胞肺癌における3pおよび17p(Lindblad-Toh et al., 2000)、大腸癌における17pおよび18q(Vogelstein et al., 1989)、乳癌における17qおよび19(Li et al., 2014、Wang et al., 2004)黒色腫における9p(Stark and Hayward, 2007)、膠芽腫における10q(Ohgaki et al., 2004)など)。

30

40

【0031】

表面タンパク質における対立遺伝子変異の有意な部分が個々の遺伝子産物の細胞外部分に影響し、原則として高度に特異的なmAbによって認識され他の変異体と区別されることができる異なる対立遺伝子制限エピトープを潜在的に創出するであろう。単一のアミノ

50

酸のみが異なる同じタンパク質の2つの変異体を区別するmAbを単離することができることは十分に実証されている(例えば、Ras癌遺伝子の点変異産物を絶妙な特異性で認識するmAbの初期の例を参照されたい(Carney et al., 1986))。興味深いことに、タンパク質エピトープ中の単一アミノ酸交換に特異的な2つのmAbは、それらの重鎖および軽鎖V遺伝子プールとは構造的に異なる可変領域を使用できることが示された(Stark and Caton, 1991)。近年、Skoraら(Skora et al., 2015)は、変異したKRASタンパク質およびEGFRタンパク質に由来するHLA-I結合新生ペプチドとそれらの野生型対応物とを区別することができるペプチド特異的scFvの単離を報告しており、いずれの場合も1アミノ酸だけ異なっていた。

10

【0032】

すべてまとめると、個々の患者の全身における他の全ての細胞からの明確な識別を可能にする、腫瘍細胞の独特の抗原シグネチャーが出現する。そのことは、LOHのために腫瘍細胞表面には存在しないが、起源の癌組織の正常細胞またはこれらの遺伝子を発現する他の組織の正常細胞に存在する対立遺伝子変異体によってコードされる全ての膜貫通タンパク質を含む。当然、LOHによって影響される各遺伝子は、真のハウスキーピング遺伝子を除き、組織分布の異なるパターンを特徴とするであろう。これらの遺伝子の大部分は、腫瘍形成または形質転換した表現型の維持に直接関与しているとは予想されず、この意味で、それらの喪失は「パッセンジャー」性のものである。

20

【0033】

先に示した理論的根拠は、ほとんどすべての腫瘍について、独特の分子描写が必然的にLOHによって形作られていることを主張しており、このことは正常細胞上に存在する多数の多形表面構造の欠失を特徴とする。個々の腫瘍のこの仮定されたシグネチャーを、標的化可能な抗原性エピトープのセットに変換することは、特定の「欠如」の認識を、標的細胞殺滅を誘起することができる活性化の手がかりに翻訳するための実用的な免疫学的戦略を伴う。重要なことに、標的に当たるが腫瘍外の反応性が厳密に回避されることを確実にするための安全装置の組み込みは、この戦略の将来の臨床的实施において非常に好ましいであろう。

【0034】

本発明は、単一对の遺伝子の各治療用キラー細胞における共発現を通してこの課題に取り組む。この対の一方のパートナーは活性化CAR(aCAR)をコードし、もう一方は保護CAR(pCAR)または阻害性CAR(iCAR)をコードする。

30

【0035】

本発明は、正常細胞を安全に保ちながら腫瘍細胞の特異的標的化を可能にする新たな手段を提供することを強調すべきである。本明細書に提示の概念は、iCAR(またはpCAR)についての新たな標的の同定を準備しており、これらの標的は、正常組織上で発現したままであるが、存在する染色体領域のLOHのため、腫瘍細胞から喪失された多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を含むと定義される。多型変異のために、この2つの対立遺伝子を区別し、腫瘍細胞において欠けている対立遺伝子のみを標的とすることは可能である。さらに、標的抗原は、それ自体が必ずしも腫瘍抑制遺伝子、または癌に關与すると予測される遺伝子ではないかもしれないが、その理由は、それがLOHによって喪失された領域内にあるために選択され、それゆえこのような遺伝子に単純に連結され得るからである。このことは、腫瘍関連抗原または多形にかかわらず腫瘍において下方調節された抗原を標的とする癌療法において今日まで採用されているかまたは示唆されている方法とは概念上異なる。

40

【0036】

ゲノム事象であるLOHが、喪失した対立遺伝子を取り戻す可能性が非常に低い腫瘍からの特定の変異体の完全な喪失を結果として生じるので、この区別は極めて重要である。LOH事象が腫瘍発生のごく早期に起こる場合、それは転移性腫瘍を含む初期の前悪性組織に由来する全ての腫瘍細胞において均一な標的シグネチャーを確実にする。さらに、L

50

LOHはほぼすべての型の癌で起こり、それゆえこの概念は、これらすべての癌の型と関連するマーカーを開発するための普遍的なツールとして信頼することができる。LOH事象はある程度無作為であるので、本発明はさらに、各個々の癌患者に対して起こった特定のLOH事象に基づいて、当該患者に対する個別化腫瘍マーカーの選択を準備する。この概念を実行する際に信頼されるツールであるaCARおよびiCARは、よく知られており、例えば、本明細書で完全に開示されているかのように参照によりいずれも組み込まれたWO2015/142314号および米国特許第9,745,368号に教示されている分野でよく知られている方法を使用して容易に調製することができる。

【0037】

1つの戦略によれば、所与の対ごとの2つのCARは、患者がヘテロ接合性である同じ標的遺伝子の異なる対立遺伝子変異体の産物を特異的に認識する。基本原理は次の通りである。aCARは所与の腫瘍細胞によって発現し、LOHによって影響されない選択された細胞表面タンパク質の対立遺伝子変異体を標的とし、一方、pCARまたはiCARは、LOHによりこれらの腫瘍細胞から喪失された同じ遺伝子の対立遺伝子変異体によってコードされる産物を標的とする。当該遺伝子を発現するその個々の患者の他の正常組織では、いずれの対立遺伝子も存在し、等しく機能的であることが知られており、すなわち、発現はすべての組織において2対立遺伝子である（無作為な1対立遺伝子発現を呈し得る他の遺伝子とは対照的（Chess, 2012, Savova et al., 2016））。1つのシナリオでは、2つのCARは、タンパク質産物上の同じ位置に存在する2つの関連エピトープを標的とし、それらは1つ、またはごく数個のアミノ酸だけ異なる。別のシナリオでは、aCARは同じタンパク質上の非多形エピトープを標的とするが、pCARまたはiCARは対立遺伝子特異的である。この場合、正常細胞上のaCARエピトープの密度は、概して、iCARまたはpCARのそれよりも2倍高いであろう。

【0038】

別の戦略は、pCARまたはiCARがハウスキーピング遺伝子のタンパク質産物を標的とするときに利用する。定義により、これらの遺伝子は体内のすべての細胞で発現するので、これらはpCARまたはiCARの安全な標的である。すなわち、所与の患者がヘテロ接合性であるハウスキーピング遺伝子の膜産物をpCARまたはiCARが標的とする場合、LOHのためにこの対立遺伝子を喪失した腫瘍細胞を除く、体内のすべての細胞が保護されるであろう。この戦略は、pCARまたはiCARからのaCAR標的遺伝子産物の脱共役を可能にする。実際、このため、aCAR標的は、腫瘍によって発現する何らかの非多形エピトープであり得る。この戦略の変形は、所与の患者がヘテロ接合性であり、少なくとも腫瘍の起源の組織において、好ましくはaCAR標的抗原が発現する追加の生命維持正常組織において発現する遺伝子の膜産物に対するiCARまたはpCARと組み合わせ、非多形性腫瘍関連抗原を標的とする既知のaCAR、例えば臨床使用中または臨床試験中のaCARを利用することであろう。

【0039】

iCARによって伝達される阻害性シグナルがaCARシグナルよりも厳密かつ恒久的に優勢であり、iCARとaCARの間の相互認識が起こらないことを確実にするように注意を払わなければならない。iCARの優位性は、両方の対立遺伝子を発現する正常細胞と遭遇した際のキラー細胞の活性化が防止されるであろうことを保証する。しかしながら、この既定のブレーキは腫瘍細胞との関わり合いでは作動しないであろうし、その標的抗原の非存在下では、iCARは阻害性シグナルを送達せず、したがって予想されるaCAR仲介性細胞活性化およびその後の腫瘍細胞溶解を自由にさせる。

【0040】

iCAR技術は免疫チェックポイントに基づき得る。この点において、PD-1およびCTLA-4の調節要素がiCARシグナル伝達成分として組み込まれた場合に強力なT細胞阻害能力を有するという実証（Fedorov et al., 2013b, WO2015/142314）は有望であるが、これらの所見は近年疑問視された（Chicamybam and Bonamino, 2014, 2015）。さらに、これらのチェッ

10

20

30

40

50

クポイントタンパク質によって誘起される精確な分子経路は完全には理解されていないが、それらの関与は近位および遠位の両機序を通じてT細胞活性化を減弱させ、T細胞を、付随する活性化刺激に対して無応答にする(Nirschl and Drake, 2013)。このゆえに、PD-1およびCTLA-4 iCARによって保証される不活性化状態は実際、一時的かつ可逆的である(Fedorov et al., 2013b)が、そのことはiCARおよびaCARの両標的を発現する組織におけるT細胞活性化を可能にしないであろう。対照的に、活性化受容体に対するNK阻害受容体の優位性は、健常細胞が時間的機序よりもむしろ空間的機序を通じてNK細胞攻撃から免れることを保証する。(Long et al., 2013)。単一のNK細胞が阻害性リガンドと活性化リガンドの両方を発現する耐性細胞をなおも守ることができ、同時にそれが関与する、活性化リガンドのみを発現する感受性細胞を殺すことができるという説得力のある証拠がある。この絶妙な能力は、結果として細胞溶解性顆粒のエキソサイトーシスに影響するそれぞれの免疫シナプスの各々において形成されるシグナル伝達分子の異なる空間的な組織化によって支配される(例えば、Abeyweera et al., 2011年、Eriksson et al., 1999年、Treanor et al., 2006、Vyasa et al., 2001、米国特許第9,745,368号)。

10

20

30

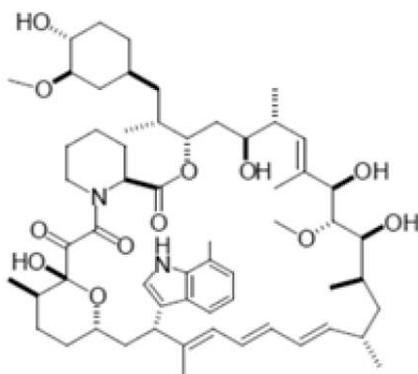
【0041】

iCARによって現れた制御に基づく戦略は、先に説明したように、aCAR活性に対するiCAR活性の優位性に依存する。いったん態様では、本発明は、シナプス選択の様式でCAR T細胞中で作動し、共発現したaCARを上回る完全な優位性を保証するように設計された、本明細書でpCAR(保護CARについては、図1を参照されたい)と称する全く新しいタイプのiCARを導入する。それは2つの技術的快挙を統合します。

1. aCARの活性化部分(FcR / CD3-)を認識単位および共刺激要素(例えば、CD28、4-1BB)から、それらを2つの異なるポリペプチド産物上に遺伝的に置くことにより脱連結させること。aCAR機能に必須であるこれらの要素の再連結は、各ポリペプチドに別個に組み込まれたそれぞれの結合部位を架橋することができるヘテロ二量体化薬の添加によってのみ起こるのである(図2B)。ヘテロ二量体化薬によって同様に分割された認識部分および活性化部分を架橋することによる完全に機能的なCARの再構築は、近年、Wuらによって報告された(Wu et al., 2015)。この目的のために、本著者らは、ラパマイシン類似体AP21967の存在下でヘテロ二量体化するFK506結合タンパク質ドメイン(FKBP、104アミノ酸)およびFKBP-ラパマイシン結合ドメインのT2089L変異体(FRB、89アミノ酸)を使用した(スキームI)。この薬剤は、ラパマイシンと比較して1000倍低い免疫抑制活性を有し(Bayle et al., 2006、Graef et al., 1997、Liberles et al., 1997)、市販されている(ARGENT(商標)、Regulated Heterodimerization Kit, ARIAD)。

【化1】

スキームI. AP21967の構造



40

50

2. 2つの膜内切断部位を含有するRIP制御受容体の膜貫通ドメインの2つの表面上に、それぞれpCAR認識単位および欠損活性化ドメインを移植すること(図2A)。pCARをその抗原へ結合することは、まず外部ドメインを除去する細胞外ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ(ADAM)ファミリーのメンバーによって、次いで細胞内 - セクレターゼによって、コードされたポリペプチドの二重切断を誘起し、それによってpCARの細胞内ドメインを遊離する。この事象は、欠損している活性化要素の機能的な膜固定構造へのアクセスを獲得するための切詰型aCARの能力を破壊し、それにより作動様式を獲得すると予測される(図2C)。この原理は、CAR T細胞活性を腫瘍細胞上の2つの異なる抗原の同時認識に制限して、RIPを介して機能する2つのよく研究されている受容体であるNotch受容体(Morsut et al., 2016、Roybal et al., 2016b)または上皮細胞接着分子(EpCAM、Pizem, Y., 本発明者の監督下での科学修士論文)のいずれかを適用するように設計された新たな遺伝子スイッチの開発において近年利用された。これらの研究では、RIP系のCARが1つの抗原に結合すると、遺伝子操作された細胞内ドメインが放出され、それが細胞核に輸送され、そこで第2のCARの発現がオンになる。これとは異なり、本発明は、防御抗原の存在下でいかなる潜在的なaCAR活性も解除するためにこの過程を利用する。

10

【0042】

先に説明した提唱された作用様式は、隣接するaCARのみが影響され、それらの抗原を生産的に結合して免疫学的シナプスを形成することはもはやできないので、局所的効果を及ぼすと予測される。結果として、aCARと多数の非腫瘍細胞との複数の相互作用が起こる可能性がある場合でさえ、細胞がさらなる相互作用が完全にできるので、これらの相互作用は一過性かつ非機能的であると予想されるに過ぎない。

20

【0043】

aCARの機能はpCARの存在に完全に依存するので、aCAR対応物に対するpCARの優位性はこのシステムに固有である。所与のT細胞におけるpCARの相対的な不足は、活性化ドメインの欠失のため、aCARを非機能的にするであろう。

【0044】

認識ドメインおよび活性化ドメインの両方が形質膜に局在することは極めて重要である(Wu et al., 2015)。それゆえ、形質膜からの活性化ドメインを切り離す第2の切断は、このドメインを非機能的にし、望ましくない細胞活性化を防止する。

30

【0045】

aCARおよびpCARは、相互に排他的な機序を介して機能するように設計されている。pCARが切断を受ける能力は、阻害性シグナル伝達の強度に依存しないので、シグナル伝達結果の完成は起こらないであろう。pCARが切断されている限り、aCARは、別の極めて重要なレベルの安全性を確保するシナリオであるそれらのそれぞれの抗原との相互作用の相対的な結合力とは無関係に、機能することができない。

【0046】

aCARおよびpCARまたはiCARの標的に対するこれらの特異的結合を付与する認識部分を操作するために、何らかの関連技術を使用してもよい。例えば、このiCAR - aCARライブラリーを含む認識部分は、理想的にはコンビナトリアルディスプレイライブラリーより選択されたマスター認識部分プールに由来してもよく、それにより、

40

- まとめると、選択された認識部分は、全22のヒト常染色体の2本の腕の各々に存在する一連の遺伝子の細胞表面産物を標的とする。隣接する遺伝子間の距離が短ければ短いほど、網羅性は広くなり、使用の普遍性は大きくなる。

- 選択された遺伝子の各々について、一組の対立遺伝子特異的認識部分が単離され、各々は、ヒト集団において優勢である異なる対立遺伝子変異体間の厳密な識別を可能にする。標的変異体の数が多ければ多いほど、患者へ提供することができる治療用遺伝子対の数は多い。

【0047】

50

所与の対立遺伝子産物は、各場合における特定のLOHパターンに応じて、1人の患者において潜在的なpCAR標的またはiCAR標的となることができ、同じ対立遺伝子を有する別の患者において有用なaCAR標的となることができる。このゆえに、適切な認識部分遺伝子が同定されると、各々がpCARまたはiCARとaCAR遺伝子足場との両方へ移植されるであろう。それゆえ、同じ遺伝子の対立遺伝子変異体に向けられたすべての認識部分が、類似の範囲の結合親和性を有することが望ましい。このような所与の認識部分のセット内で、集団全体におけるその遺伝子の潜在的な対立遺伝子組成物の最も高い網羅性を確実にするために、pCAR - aCAR対またはiCAR - aCAR対のすべての可能な組み合わせを予め組み立てることができる。

【0048】

より一般的なシナリオでは、患者は、メジャー対立遺伝子およびマイナー対立遺伝子についてヘテロ接合性であり、それらの産物は、非同義SNP、またはそれほど頻繁ではないが挿入欠失の結果としてコードされるポリペプチドに沿った単一の位置において異なる。それほど一般的ではないシナリオでは、患者は、2つの別個の位置においてメジャーな対立遺伝子とは異なる2つのマイナーな対立遺伝子についてヘテロ接合性である。個々の患者における当該遺伝子を包含する特定のLOH事象に応じて、所与の変異体エピトープは、ある患者においてはiCAR標的として、別の患者においてはaCAR標的として役立つことができる。

【0049】

変異体特異的mAb（例えば、マイナー対立遺伝子「a」によってコードされるエピトープに特異的なmAb）の同定は、当該分野において周知であり、原則として、何らかの従来の抗原決定基に対するmAbの同定に類似しており、例えば、ファージ（Barbas et al., 2004）、リボソーム（Hanes et al., 1997）または酵母（Chao et al., 2006）のディスプレイ技術を利用する組換え抗体scFvライブラリーの高処理量スクリーニングを介して最もよく達成されることができる。ライブラリースクリーニングに採用される抗原は、2つの対立遺伝子間の変異の位置にまたがる合成ペプチド（典型的には長さ15~20アミノ酸以上）、この分野で稼働している多くの企業のうちの1つによって市販されているかもしくは手動合成されているかのいずれかであることができる組換え全長ポリペプチド、またはさらにはこの対立遺伝子を発現しない同じ細胞で行われるサブトラクションステップ後の遺伝子トランスフェクション（例えば、pGEM4Z/A64ベクターにおける試験管内mRNA転写のためのテンプレートとしてクローン化された全長のcDNAをコードするmRNAの電気穿孔法（Boczkowski et al., 2000））による高レベルで当該対立遺伝子変異体を発現する全細胞のいずれかであり得る。これらの方法は周知であり、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第4版）Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press、Antibodies: A Laboratory Manual（第2版）、Edward A. Greenfield編、2012 CSH laboratory press、Using Antibodies, A laboratory manual by Ed Harlow and David Lane, 1999 CSH laboratory pressにおいて説明されている。

【0050】

定義により、メジャー対立遺伝子（「A」）によってコードされる対応するエピトープ（同じ位置にある）は、単一アミノ酸（SNP）の同一性における「a」または長さ（挿入欠失）によって作られるものとは異なる独特な抗原決定基を創出する。この決定基は、原則として、同じまたは他の抗体ディスプレイスクリーニング技術によって同定された異なるセットのmAbによって認識されることができる。2セットの同定されたmAbの各々において異なるメンバーが2つのエピトープについて識別する能力、すなわち第1セット由来の抗体が対立遺伝子「a」の産物に結合するが「A」の産物に結合せず、第2セッ

10

20

30

40

50

ト由来のAbは「A」に相互に結合するが、「a」には結合しないことは、ELISAまたはフローサイトメトリーなどの従来の結合アッセイを用いて決定することができる (Skora et al., 2015)。あるいは、いったん「A」に結合しない「a」結合性Abが同定され、そのタンパク質配列が決定されると、「A」に結合するが「a」には結合しない「相補的」抗体scFvの配列を予測するために計算方法を潜在的に使用することができる。このような計算方法については、例えば (Sela-Culang et al., 2015a, b) を参照されたい。

【0051】

標的遺伝子としてHLAクラスI遺伝子座遺伝子HLA-A、HLA-B、およびHLA-Cを提示する私的な例では、利用可能な多数の対立遺伝子特異的モノクローナル抗体、例えば実施例3に列挙する抗体がある。

10

【0052】

これらの抗体の可変領域をコードする配列は、関連するハイブリドーマから容易にクローニングされることができ、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第4版) Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press、Antibodies: A Laboratory Manual (第2版), Edward A. Greenfield編, 2012 CSH laboratory press、Using Antibodies, A laboratory manual by Ed Harlow and David Lane, 1999 CSH laboratory pressに開示されているように広く利用可能なツールを用いてCARコンストラクトへの組込みに適した具体的なHLAクラスI対立遺伝子エピトープ変異体に対するscFvをコードする遺伝子を構築するために使用できる。

20

【0053】

本発明は、LOHのために腫瘍細胞において喪失され、細胞表面産物をコードする多型変異体のDNA配列を含むデータベースを提供し、ここで、DNA配列における変化は、コードされたタンパク質の細胞外ドメインにおけるアミノ酸の変化を結果として生じる。この情報は、TCGAなど、とりわけ、種々の腫瘍型における遺伝子の相対的なコピー数を推測するために使用することができるデータを提供する公共のNational Institute of Health TCGAデータポータル (<https://gdcc.cancer.gov/>)、およびとりわけ、種々の集団におけるSNP変異体の対立遺伝子頻度を提供する<http://www.cbioportal.org>におけるTCGAデータについてのcbioポータル (Cerami et al., 2012、Gao et al., 2013)、遺伝子についての組織発現データを含むGenotype-Tissue Expression (GTEX) データベースv6p (dbGap Accession phs000424.v6.p1) (<https://gtexportal.org/home>, Consortium GT.Human genomics, 2015)、N-グリコシル化した細胞表面タンパク質の質量分析系データベースであるCell Surface Protein Atlas (Bausch-Fluck et al., 2015)、ならびにUniProtデータベース (www.uniprot.org/downloads) において利用可能な一般人に公開されているいくつかのデータベースから検索した。Human genomics, 2015) which includes tissue expression data for genes; and databases providing structural information of proteins, such as the Human Protein Atlas (Uhlen et al., 2015); the Cell Surface Protein Atlas (Bausch-Fluck et al., 2015), a mass-spectrometry based database of N-glycosylated cell-surface proteins, and the UniProt

30

40

50

database (www.uniprot.org/downloads).

【0054】

本発明はさらに、LOHを受ける発現した細胞表面タンパク質をコードする遺伝子のゲノム全体での同定のための方法を提供する。同定された遺伝子は、次の基準を満たさなければならない。1) 遺伝子は膜貫通タンパク質をコードし、それゆえ、細胞表面上に発現してiCAR結合を可能にする部分を有し、2) 遺伝子は少なくとも2つの発現した対立遺伝子を有し(少なくともチェックされた1つの民族集団において)、3) 当該遺伝子について見出された対立遺伝子変異は、タンパク質の細胞外領域において参照配列と比較してアミノ酸変化を引き起こし、4) 遺伝子は、癌においてLOHを受ける染色体領域に位置し、5) 遺伝子は、対応する領域がLOHを受けることが見出された腫瘍型の起源組織において発現する。

10

【0055】

原則として、iCAR結合のための標的をコードするのに適した先に説明したような遺伝子は、データベースマイニングだけでなく、当該技術分野において公知の何らかの方法によって同定されてもよい。例えば、LOHの概念は新しいものではなく、特定の腫瘍における特定の遺伝子、染色体、またはゲノム/染色体領域についてのLOH情報はすでに文献において公開されており、それゆえ、候補遺伝子は利用可能な公開物から得ることができる。あるいは、このような情報は、マイクロサテライトプローブなどの染色体マーカーとの全ゲノムハイブリッド形成(Medintz et al., 2000, Genome Res. 2000 Aug; 10(8): 1211~1218)によって、または

20

【0056】

同様に、対立遺伝子変異体に関する情報は、様々なデータベースで公的に入手可能であり、疑わしい領域のゲノム配列決定によって個別化された症例についても容易に得ることができる。また、タンパク質構造および発現パターンに関する情報は、先に説明したとおり、公的に入手可能であり、容易にアクセス可能である。

【0057】

したがって、多くの遺伝子およびSNPについての様々な基準に関する情報は公的に入手可能であり、それを検索するための技術は概して知られているので、本出願の主たる新規性は、iCAR認識のための標的を選択するための基準としてLOHを使用すること、および特定の患者において喪失された特定の対立遺伝子に基づいて治療を個別化することである。

30

【0058】

非限定的な例として、本発明によれば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-CのLOHは、様々な頻度で、多くの腫瘍型において比較的頻繁な事象であることが見出され(図4を参照されたい)、このことによって、これらの遺伝子は、本発明の目的のためにiCAR認識のための標的として使用されるための優れた候補となるであろう。

【0059】

pCAR標的またはiCAR標的の非存在下での何らかの健常な必須組織における正常細胞上のaCAR標的の認識は有害であろうし、厳密に禁止されている。この点において、本明細書で提唱されているように、pCAR-aCAR対またはiCAR-aCAR対の概念は、以下のように失敗-安全活性化スイッチを構成する。i) aCAR標的抗原が存在しないことにより、選択された遺伝子を発現しない細胞は(同じ遺伝子のaCAR標的およびpCAR標的またはiCAR標的の異なる産物の場合)標的とされないであろうし、ii) この同じ遺伝子を発現する正常細胞は両方の対立遺伝子を共発現するであろうし、pCARまたはiCARの優勢のために標的化されないであろうし、iii) pCARまたはiCARが多型ハウスキーピング遺伝子の産物を標的とする場合、体内の全ての細胞は保護されるであろうし、iv) aCAR標的を発現するがpCAR標的またはiC

40

50

A R 標的を発現しない腫瘍細胞のみが攻撃されるであろう。

【0060】

先に強調したように、活性化シグナルに対する阻害シグナルの恒久的な優位性は絶対的に必須である。それゆえ、所与のキラー細胞において、その i C A R 保護機能がない場合は、いかなるときでも a C A R 遺伝子が発現しないことを確保することは極めて重要である。このことは、これらの i C A R - a C A R 遺伝子対を一本鎖産物として直列に組み立てることを通じて、または例えば内部リボソーム進入部位に基づくもしくはいくつかのウイルス自己切断性 2 A ペプチドのうちの一つに基づく適切なニシストロン様式を介して実施され得る。ニシストロン性発現に関して報告された膨大な量のデータによって示唆されるように、i C A R 遺伝子は常に、好ましい化学量論量を保証するためにその a C A R パートナーの上流に位置するだろう。もちろん、これは、p C A R - a C A R 遺伝子対を使用するときには問題ではない。

10

【0061】

i C A R 優位性を確実にするための別の魅力的な選択肢は、ヘテロ二量体化小分子の存在下でいずれの実体も一つの機能的受容体へのみ組み立てられることができるように、a C A R 認識部分をその活性化/共刺激部分から切り離すことである。精確なタイミング、薬用量および位置によってこのような分裂受容体の作動状態を厳密に制御する能力が、抗腫瘍性 C A R の脈絡において近年実証された (W u e t a l . , 2 0 1 5) 。

【0062】

さらに、予想される優位性はまた、選択された a C A R プラットフォームのシグナル伝達強度と「競合する」べきである、選択された i C A R 設計において細胞内部分へと組み込まれた i C A R シグナル伝達要素の特定の組成に固有である可能性が高い。この能力はまた、それらのそれぞれの標的エピトープに対する 2 つの認識部分の相対的親和性 (このことは、上述で取り扱った) およびそれらの相互作用の全体的な結合力によって影響されるであろう。後者に関しては、提唱された戦略は、正常細胞上での好ましい i C A R / a C A R 化学量論量およびそれらの個々の標的エピトープのバランスのとれた分布の両方を保証する。なお、このことは、p C A R - a C A R 遺伝子対を使用するときには問題ではない。

20

【0063】

安全性をさらに確実にするために、自殺遺伝子の使用または一過性発現のための m R N A 電気穿孔法の使用など、C A R および T C R 免疫療法の分野において現に実施されている他の従来的手段を採用することができる。

30

【0064】

L O H はしばしば所与の遺伝子のたった一つの対立遺伝子を有する細胞を残すが、それにはしばしば、残存する染色体または染色体部分の重複を伴い、結果的に「コピー数が中性の」L O H を生じる (L o e t a l . , 2 0 0 8 , O ' K e e f e e t a l . , 2 0 1 0 , S a t h i r a p o n g s a s u t i e t a l . , 2 0 1 1) 。これらの状況下では、エピトープ喪失変異体の出現は 2 つの独立した事象を必要とし、したがってあまり起こりそうもない。遺伝子改変細胞の異なる部分においていくつかの p C A R - a C A R 対または i C A R - a C A R 対を発現させることは、標的対立遺伝子の単一コピーのみが保持されている「コピー数喪失」L O H の場合でさえも変異を逃れた細胞の出現を防ぐであろう。それでも、単一コピー遺伝子が必須になるかもしれないので、それらの機能喪失ははるかに低い可能性がある。

40

【0065】

先の点において、一態様において、本発明は、エフェクター免疫細胞の望ましくない活性化を防止するかまたは減弱させることができる阻害性キメラ抗原受容体 (i C A R) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供し、ここでヘテロ接合性の喪失 (L O H) のために哺乳類腫瘍細胞には存在しないが少なくとも関連する哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する細胞外ドメインと、エフェクター免疫細胞を阻害する少なくとも一つのシグナル伝達要素

50

を含む細胞内ドメインとを含む。

【0066】

ある特定の実施形態において、多形細胞表面エピトープは、腫瘍抑制遺伝子、またはそのような遺伝子は腫瘍においてLOHによって欠失している可能性が高いため、腫瘍抑制遺伝子に遺伝的に連結された遺伝子によってコードされる抗原の一部である。さらに、多形細胞表面エピトープは、癌細胞においてしばしばLOHを受ける、染色体アーム3p、6p、9p、10q、17p、17q、もしくは18q、または第19染色体などの染色体または染色体アームに通常存在する遺伝子によってコードされる抗原の一部であり得る。これらのエピトープは、本明細書に説明の関連データベースにおいて容易に同定することができる。

10

【0067】

ある特定の実施形態では、多形細胞表面エピトープは、未分類のAP2S1、CD81、GPA1、LGALS9、MGAT2、MGAT4B、VAMP3などのハウスキーピング遺伝子産物、細胞接着タンパク質CTNNA1 NM_001903、CTNNB1、CTNNBIP1 NM_020248、CTNNBL1 NM_030877、CTNND1 NM_001085458デルタカテニン、チャネルおよびトランスポーター-ABCB10 NM_012089、ABCB7 NM_004299、ABCD3 NM_002857、ABCE1 NM_002939、ABCF1 NM_001090、ABCF2 NM_005692、ABCF3 NM_018358、CALM1 [1] [7]カルモジュリン捕捉カルシウム、MSFD10別名TETRANまたはテトラサイクリン輸送体様タンパク質と同様のMFSD11 NM_024311 [1]、MFSD12 NM_174983、MFSD3 NM_138431、MFSD5 NM_032889、SLC15A4 NM_145648、SLC20A1 NM_005415、SLC25A11 [1]ミトコンドリアオキソグルタル酸/リンゴ酸担体、SLC25A26 NM_173471、SLC25A28 NM_031212、SLC25A3 NM_002635、SLC25A32 NM_030780、SLC25A38 NM_017875、SLC25A39 NM_016016、SLC25A44 NM_014655、SLC25A46 NM_138773、SLC25A5 NM_001152、SLC27A4 NM_005094、SLC30A1 NM_021194、SLC30A5 NM_022902、SLC30A9 NM_006345、SLC35A2 NM_005660、SLC35A4 NM_080670、SLC35B1 NM_005827、SLC35B2 NM_178148、SLC35C2 NM_015945、SLC35E1 NM_024881、SLC35E3 NM_018656、SLC35F5 NM_025181、SLC38A2 NM_018976、SLC39A1 NM_014437、SLC39A3 NM_144564、SLC39A7 NM_006979、SLC41A3 NM_017836、SLC46A3 NM_181785、SLC48A1 NM_017842、ACVRL1 TGFβ受容体ファミリーのRendu-Osler-Weber症候群と同様の受容体ACVR1 NM_001105、ACVR1B NM_004302、CD23 [1] FCER2低親和性IgE受容体(レクチン)、ならびにRNAスプライシングに關与するHLA/免疫グロブリン/細胞認識群BAT1、別名DDX39B、BSG Basigin Immunoglobulinスーパーファミリー、細胞外メタロプロテイナーゼ、MIFマクロファージ遊走阻止因子、TAPBPのものである(Wikipedia)。

20

30

40

【0068】

ある特定の実施形態において、ハウスキーピング遺伝子は、I型HLA、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)、イオンチャネルまたは受容体チロシンキナーゼ、好ましくはHLA-A、HLA-BまたはHLA-Cである。

【0069】

aCARおよびpCARまたはiCARの標的へのこれらの特異的結合を付与する認識

50

部分を操作するために、何らかの関連技術を使用してもよい。ある特定の実施形態において、細胞外ドメインは、(i)ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の機能的フラグメント、ナノボディなどの単一ドメイン抗体、組換え抗体、一本鎖可変フラグメント(ScFv)などの、抗体、その誘導体もしくはフラグメント、(ii)アフィボディ分子、アフィリン、アフィマー、アフィチン、アルファボディ、アンチカリン、アビマー、DARPin、フィノマー、クニツドメインペプチド、およびモノボディなどの、抗体模倣物、または(iii)アプタマーを含む。好ましくは、細胞外ドメインはScFvを含む。

【0070】

ある特定の実施形態では、哺乳類組織はヒト組織であり、他の実施形態では、関連哺乳類正常組織は、腫瘍が発症した正常組織である。

10

【0071】

ある特定の実施形態では、エフェクター免疫細胞は、T細胞、ナチュラルキラー細胞、またはサイトカイン誘導性キラー細胞である。

【0072】

ある特定の実施形態では、エフェクター免疫細胞を阻害することができる少なくとも1つのシグナル伝達要素は、PD1、CTLA4、BTLA、2B4、CD160、CEACAM1などのCEACAM、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR3DL1、KIR3DL2、KIR3DL3などのKIR、LIR1、LIR2、LIR3、LIR5、LIR8、およびCD94-NKG2A、LAG3、TIM3、T細胞活性化のVドメインIg抑制因子(VISTA)、インターフェロン遺伝子の刺激因子(STING)、免疫受容体チロシン系阻害モチーフ(ITIM)含有タンパク質、T細胞免疫グロブリンおよびITIMドメイン(TIGIT)、ならびにアデノシン受容体(例えば、A2aR)からなる群より選択される免疫チェックポイントタンパク質などの免疫チェックポイントタンパク質のシグナル伝達要素と相同である。

20

【0073】

ある特定の実施形態では、免疫チェックポイントタンパク質は、ナチュラルキラー細胞阻害受容体、例えばKIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR3DL1、KIR3DL2、KIR3DL3などのKIR、またはLIR1、LIR2、LIR3、LIR5、LIR8などの白血球Ig様受容体、およびCD94とヘテロ二量体を形成し、2つのITIMを含有するC型レクチン受容体であるCD94-NKG2Aである。

30

【0074】

iCARにおいてキラー細胞受容体を調製しおよび使用するための方法は、本明細書に完全に開示されているかのように参照により組み込まれる米国特許第9,745,368号に説明されている。

【0075】

ある特定の実施形態では、先の実施形態のいずれか1つの細胞外ドメインは、可撓性のあるヒンジおよび膜貫通正準モチーフを介して当該細胞内ドメインへ融合している。

【0076】

ある特定の実施形態では、iCARは、エフリン受容体(例えば、EPHA7)およびクローディンを含まない、抗原の単一の対立遺伝子変異体に対して向けられるかまたは当該変異体へ特異的に結合する。

40

【0077】

ある特定の実施形態では、iCARは、HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子またはHLA-C遺伝子の単一の対立遺伝子変異体によってコードされるエピトープに対して向けられるかまたは当該エピトープへ特異的に結合する。

【0078】

さらなる態様では、本発明は、先の実施形態のいずれか1つに定義の本発明の核酸分子と、核酸分子へ操作可能に連結されたプロモーターなどの少なくとも1つの制御要素とを

50

含むベクターを提供する。

【0079】

ある特定の実施形態では、ベクターは、抗原の非多形細胞表面エピトープまたは多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合する細胞外ドメインであって、当該エピトープが腫瘍関連抗原であるかまたは少なくとも関連する腫瘍および正常組織の細胞によって共有される、細胞外ドメインと、エフェクター免疫細胞を活性化するおよび/または共刺激する少なくとも1つのシグナル伝達要素を含む細胞内ドメインとを含む a C A R をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子をさらに含む。

【0080】

ある特定の実施形態では、ベクターに含まれる核酸によってコードされる a C A R の細胞外ドメインは、抗原の非多形細胞表面エピトープへ特異的に結合し、i C A R の細胞外ドメインは当該 a C A R の細胞外ドメインが結合するものとは異なる抗原の多形細胞表面の単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合する。

10

【0081】

ある特定の実施形態では、ベクターに含まれる核酸によってコードされる i C A R の細胞外ドメインは、H L A - A 遺伝子、H L A - B 遺伝子または H L A - C 遺伝子の単一の対立遺伝子変異体に対して向けられるかまたは当該変異体へ特異的に結合する。

【0082】

ある特定の実施形態では、ベクターに含まれる核酸によってコードされる a C A R の細胞外ドメインは、C D 19 など、表 1 に列挙される抗原より選択される非多形細胞表面エピトープに対して向けられるかまたは当該エピトープへ特異的に結合する。

20

【0083】

ある特定の実施形態では、ベクターに含まれる核酸によってコードされる i C A R の細胞外ドメインは、H L A - A 遺伝子、H L A - B 遺伝子または H L A - C 遺伝子の単一の対立遺伝子変異体に対して向けられるかまたは当該変異体へ特異的に結合する。ベクターに含まれる核酸によってコードされる a C A R の細胞外ドメインは、C D 19 など、表 1 に列挙される抗原より選択される非多形細胞表面エピトープに対して向けられるかまたは当該エピトープへ特異的に結合する。

【0084】

ある特定の実施形態では、エフェクター免疫細胞を活性化または共刺激する a C A R の少なくとも1つのシグナル伝達要素は、例えば、C D 3 鎖もしくは F c R 鎖の免疫受容体チロシン系活性化モチーフ (I T A M)、正に帯電したアミノ酸残基もしくは正に帯電した側鎖を含む活性化キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (K I R) の膜貫通ドメイン、または例えば K I R 2 D S および K I R 3 D S の活性化 K I R 膜貫通ドメイン、または D A P 1 2 などのアダプター分子、または例えば C D 27、C D 28、I C O S、C D 137 (4 - 1 B B) もしくは C D 134 (O X 40) の共刺激シグナル伝達要素と相同である。

30

【0085】

ある特定の実施形態では、ベクターのヌクレオチド配列は、a C A R をコードするヌクレオチド配列と i C A R をコードするヌクレオチド配列との間に内部リボソーム進入部位 (I R E S) を含む。概して、a C A R をコードするヌクレオチド配列および i C A R をコードするヌクレオチド配列は、何らかの順序にあり得るが、特定の実施形態では、a C A R をコードするヌクレオチド配列は、i C A R をコードするヌクレオチド配列の下流にある。

40

【0086】

ある特定の実施形態では、ベクターのヌクレオチド配列は、a C A R をコードするヌクレオチド配列と i C A R をコードするヌクレオチド配列との間にウイルス自己切断性 2 A ペプチドを含む。特に、ウイルス自己切断性 2 A ペプチドは、T h o s e a a s i g n a ウイルス (T a V) 由来の T 2 A、口蹄疫ウイルス (F M D V) 由来の F 2 A、ウマ鼻炎 A ウイルス (E R A V) 由来の E 2 A、およびプタテッシュウウイルス 1 (P T V 1)

50

由来の P 2 A からなる群より選択され得る。

【 0 0 8 7 】

ある特定の実施形態では、ベクターは、可撓性のあるリンカーを介して当該 i C A R へ連結された構成的 a C A R をコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 8 8 】

免疫細胞は、例えば、RNA トランスフェクションによって、あるいは真核細胞における複製および/もしくは転写に適したプラスミドにおけるまたはウイルスベクターにおける組込みによって、本明細書に説明する適切な核酸分子をトランスフェクトされ得る。ある特定の実施形態では、ベクターはレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターから選択される。

【 0 0 8 9 】

カプシドタンパク質がヒト細胞を感染させるのに機能的であろう場合、レトロウイルスベクターと適切なパッケージング株との組み合わせも使用することができる。PA 1 2 (Miller , et al (1 9 8 5) Mol Cell Biol . 5 : 4 3 1 ~ 4 3 7)、PA 3 1 7 (Miller , et al (1 9 8 6) Mol Cell Biol . 6 : 2 8 9 5 ~ 2 9 0 2)、および CRIP (Danos , et ai . (1 9 8 8) Proc Natl Acad Sci USA 85 : 6 4 6 0 ~ 6 4 6 4) を含む、いくつかの両種指向性ウイルス産生細胞株が知られている。Bio I . 5 : 4 3 1 - 4 3 7) ; PA 3 1 7 (Miller , et al . (1 9 8 6) Mol Cell Biol . 6 : 2 8 9 5 - 2 9 0 2) ; and CRIP (Danos , et ai . (1 9 8 8) Proc Natl Acad Sci USA 85 : 6 4 6 0 - 6 4 6 4) . あるいは、VSVG、RD 1 1 4 または GAL V エンベロープでシュードタイプ分類された粒子など、非両種指向性粒子を使用することができる。細胞は、産生細胞とも直接的な共培養によって、例えば Bregni , et ai . (1 9 9 2) Blood 80 : 1 4 1 8 ~ 1 4 2 2 の方法によって、またはウイルス上清単独もしくは濃縮したベクターストックとの培養で、例えば、Xu , et ai . (1 9 9 4) Exp Hemat . 22 : 2 2 3 ~ 2 3 0 および Hughes , et ai . (1 9 9 2) J Clin Invest . 89 : 1 8 1 7 の方法によってさらに形質導入することができる。

【 0 0 9 0 】

別の態様では、本発明は、先に定義したような本発明により、エフェクター免疫細胞の望ましくない活性化を防止しまたは減弱させることができる阻害性キメラ抗原受容体 (i C A R) を調製する方法であって、(i) 既知の変異体の少なくとも 1 つのデータベースからタンパク質コード遺伝子のヒトゲノム変異体のリストを検索することと、(i i) (a) 対応する参照対立遺伝子と比較して、個々の遺伝子によってコードされるタンパク質においてアミノ酸配列変異を結果的に生じる変異体を選択することと、(b) アミノ酸配列の変化が、コードされるタンパク質の細胞外ドメインである、遺伝子の変異体を選択することと、(c) 少なくとも 1 つの腫瘍においてヘテロ接合性の喪失 (LOH) を受ける遺伝子の変異体を選択することと、(d) (c) によって LOH を受けている少なくとも 1 つの腫瘍の少なくとも起源の組織において発現する遺伝子の変異体を選択し、それにより LOH により少なくとも 1 つの腫瘍において喪失した個々の遺伝子によってコードされ、少なくとも 1 つの腫瘍の少なくとも起源の組織において発現するタンパク質における細胞外ドメインにおけるアミノ酸配列変化を有する変異体のリストを得ることとによって、(i) において検索された変異体のリストをフィルター処理することと、(i i i) (i i) で得られたリストから少なくとも 1 つの単一の変異体を含む配列領域を定義し、少なくとも 1 つの単一の変異体を含む配列領域および、対応する参照対立遺伝子を含む配列領域をサブクローニングして発現させ、それにより個々のエピトープペプチドを得ること、(i v) (i i i) で得られた、クローニングされた配列領域によってコードされるエピトープペプチドまたは対応する参照対立遺伝子によってコードされるエピトープペプチドのいずれかへ特異的に結合する i C A R 結合ドメインを選択することと、(v i i) (i

10

20

30

40

50

v) に定義の i C A R 結合ドメインを各々含む、本明細書に定義の i C A R を調製することと、を含む方法を提供する。

【0091】

ある特定の実施形態では、選択される遺伝子の候補変異体は、ある特定の腫瘍型において少なくとも2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%でLOHを受ける。

【0092】

ある特定の実施形態では、選択された各変異体についてのマイナー対立遺伝子頻度は、少なくとも1つの集団において1、2、3、4または5%以上である。

【0093】

なおも別の態様において、本発明は、(i) 腫瘍関連抗原に対して向けられたTCR操作エフェクター免疫細胞に、本明細書に定義のiCARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子をトランスフェクトすること、もしくはこの細胞に請求項9に記載のベクターを形質導入すること、または(ii) 未処置のエフェクター免疫細胞に、本明細書に定義のiCARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、および先に本明細書に定義のaCARをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子をトランスフェクトすること、もしくはエフェクター免疫細胞に先に本明細書に定義のベクターを形質導入すること、を含む、安全なエフェクター免疫細胞を調製するための方法を提供する。

【0094】

さらに別の態様において、本発明は、本明細書に説明の本発明の方法によって得られる安全なエフェクター免疫細胞を提供する。安全なエフェクター免疫細胞は、外来性T細胞受容体(TCR)およびiCARを発現する再び向けられたT細胞であり得、ここで、外来性TCRは、抗原の非多形細胞表面エピトープまたは多形細胞の単一の対立遺伝子変異体に向けられ、ここで、当該エピトープは腫瘍関連抗原であるか、もしくは少なくとも関連腫瘍および正常組織の細胞によって共有され、iCARは本明細書に定義の通りであり、または安全なエフェクター免疫細胞は、先に定義のiCARおよびaCARを発現するナチュラルキラー細胞もしくはT細胞などの再び向けられたエフェクター免疫細胞である。

【0095】

ある特定の実施形態では、安全なエフェクター免疫細胞は、その表面に、抗原の非多形細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含むaCAR、および当該aCARの細胞外ドメインが結合する異なる抗原の多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合する細胞外ドメインを含むiCARを発現する。ある特定の実施形態では、iCARの細胞外ドメインは、異なる多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合し、当該aCARの細胞外ドメインが結合するのと同じ抗原であり、または、iCARの細胞外ドメインは、当該aCARの細胞外ドメインが結合するのと同じ多形細胞表面エピトープ領域の異なる単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合する。

【0096】

ある特定の実施形態において、細胞表面上に発現するaCARの細胞外ドメインは、CD19など、表1に列挙される抗原より選択される非多形細胞表面エピトープへ特異的に結合する。

【0097】

ある特定の実施形態において、細胞表面上に発現するiCARの細胞外ドメインは、HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子またはHLA-C遺伝子の単一の対立遺伝子変異体に対して向けられるかまたは当該変異体へ特異的に結合する。

【0098】

ある特定の実施形態において、細胞表面上に発現するiCARの細胞外ドメインは、HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子またはHLA-C遺伝子の単一の対立遺伝子変異体に対して向けられるかまたは当該変異体へ特異的に結合し、細胞表面上に発現するaCAR

10

20

30

40

50

の細胞外ドメインは、CD19など、表1に列挙される抗原より選択される非多形細胞表面エピトープに対して向けられるかまたは当該エピトープへ特異的に結合する。

【0099】

ある特定の実施形態では、aCARおよびiCARは別個のタンパク質として細胞表面に存在する。

【0100】

ある特定の実施形態において、iCARをコードするヌクレオチド配列の細胞表面上の発現レベルは、aCARをコードするヌクレオチド配列の発現レベル以上である。

【0101】

さらに別の態様では、本発明は、LOHを特徴とする腫瘍を有する対象のための個別化バイオマーカーを選択する方法であって、(i)対象から腫瘍生検を得ることと、(ii)対象から正常組織、例えばPBMCの試料を得ることと、(iii)LOHのため腫瘍の細胞によって発現することはないが、正常組織の細胞によって発現する多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定し、それにより、対象の個別化バイオマーカーを同定することと、を含む方法を提供する。

10

【0102】

ある特定の実施形態では、バイオマーカーは対象の治療を個別化するために使用されるので、方法は、LOHを特徴とする腫瘍を有する患者へ、先に定義のエフェクター免疫細胞を投与することを含む、患者において癌を治療するステップをさらに含み、ここで、iCARは、(iii)で同定された単一の対立遺伝子変異体に向けられる。

20

【0103】

さらなる態様において、本発明は、LOHを特徴とする腫瘍を有する患者へ、先に定義のエフェクター免疫細胞を患者へ投与することを含む、患者において癌を治療するための方法を提供し、ここで、iCARは、ヘテロ接合性の喪失(LOH)のため腫瘍の細胞には存在しないが、少なくとも患者の関連哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープをコードする単一の対立遺伝子変異体に向けられる。

【0104】

同様の態様において、本発明は、患者へ、先に定義するようなエフェクター免疫細胞を投与することを含む、LOHを特徴とする腫瘍を有する対象における腫瘍量を低減させる方法を提供し、ここで、iCARは、ヘテロ接合性(LOH)の喪失のため腫瘍の細胞には存在しないが、少なくとも患者の関連哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープをコードする単一の対立遺伝子変異体に向けられる。

30

【0105】

別の同様の態様では、本発明は、LOHを特徴とする腫瘍を有する対象の生存率を増大させる方法を提供し、ここで、iCARは、ヘテロ接合性の喪失(LOH)のため腫瘍の細胞には存在しないが、少なくとも患者の関連哺乳類正常組織の全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープをコードする単一の対立遺伝子変異体に向けられる。

【0106】

なおもさらなる態様では、本発明は、LOHを特徴とする腫瘍を有する患者を治療し、当該患者における腫瘍量を低減させ、または当該患者の生存率を増大させる上での使用のための、先に定義の安全なエフェクター免疫細胞に向けられており、ここで、iCARは、ヘテロ接合性の喪失(LOH)のため腫瘍の細胞には存在しないが患者の関連哺乳類正常組織の少なくとも全ての細胞に存在する多形細胞表面エピトープをコードする単一の対立遺伝子変異体に向けられる。

40

【0107】

なおさらなる態様において、本発明は、(i)LOHのため腫瘍細胞によって発現することはないが、正常組織の細胞によって発現する多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定するかまたはその情報を受容することと、(ii)抗原の非多形細胞表面エピトープまたは多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定するかまたはその情報を受容することであって、ここで、当該エピトープは腫瘍関連抗原であるか、

50

または当該癌患者における少なくとも関連腫瘍および正常組織の細胞によって共有される、同定するかまたは受容することと、(iii)本明細書に定義のiCARを定義する少なくとも1つの核酸分子、および本明細書に定義のaCARをコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子、または本明細書に定義の少なくとも1つのペクターを選択するかまたは受容することであって、iCARは(i)の細胞表面エピトープに特異的に結合する細胞外ドメインを含み、aCARは(ii)の細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含むことと、(iv)(iii)の核酸分子をエフェクター免疫細胞にトランスフェクトすること、または(iii)のペクターをエフェクター免疫細胞に形質導入することによって、安全な再び向けられたエフェクター免疫細胞の少なくとも1つの集団を調製するかまたは受容することと、(v)当該癌患者へ、(iv)の安全な再び向けられた免疫エフェクター細胞の少なくとも1つの集団を投与することと、を含む、LOHを特徴とする腫瘍を有する患者における癌を治療するための方法に向けられる。

10

【0108】

同様の態様において、本発明は、LOHを特徴とする腫瘍を有する患者において癌を治療するための安全な再び向けられた免疫エフェクター細胞の少なくとも1つの集団を提供し、ここで、安全な再び向けられた免疫細胞は、(i)LOHのため腫瘍細胞によって発現することはないが、正常組織の細胞によって発現する、多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定するかまたはその情報を受容すること、(ii)抗原の非多形細胞表面エピトープまたは多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体を同定するかまたはその情報を受容することであって、当該エピトープは腫瘍関連抗原であるか、または当該癌患者の少なくとも関連腫瘍および正常組織の細胞によって共有されている、同定するかまたは受容すること、(iii)本明細書に定義のiCARを定義する少なくとも1つの核酸分子、および本明細書に定義のaCARをコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子、または本明細書に定義の少なくとも1つのペクターを選択するかまたは受容することであって、iCARは(i)の細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含み、aCARは(ii)の細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含む、選択するかまたは受容すること、(iv)エフェクター免疫細胞に(iii)の核酸分子をトランスフェクトすること、またはエフェクター免疫細胞に(iii)のペクターを形質導入することによって、安全な再び向けられたエフェクター免疫細胞の少なくとも1つの集団を調製するかまたは受容すること、によって得られる。

20

30

【0109】

癌の治療または癌の治療に使用するための安全な免疫エフェクター細胞に向けられた先の実施形態のうちのいずれか1つを参照するある特定の実施形態では、(i)iCARの細胞外ドメインは、aCARの細胞外ドメインが結合する抗原とは異なる抗原である抗原の多形表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合するか、(ii)当該iCARの細胞外ドメインは、当該aCARの細胞外ドメインが結合するのと同じ抗原の異なる多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合するか、または(iii)当該iCARの細胞外ドメインは、当該aCARの細胞外ドメインが結合するのと同じ多形細胞表面エピトープの異なる単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合する。

40

【0110】

ある特定の実施形態において、治療することは、(iii)のaCARを発現するが(iii)のiCARを欠失する免疫エフェクター細胞の少なくとも1つの集団を癌患者へ投与することを含む治療と比較して、標的に当たるが、腫瘍を外す反応性の低減を結果的に生じる。

【0111】

ある特定の実施形態において、先に定義の癌を治療するために使用される安全なエフェクター免疫細胞は、それらの表面上に、腫瘍関連抗原または抗原の非多形細胞表面エピトープへ特異的に結合する細胞外ドメインを含むaCARと、少なくとも腫瘍の起源の組織

50

においてHLA-A、HLA-BまたはHLA-Cなど、当該aCARの細胞外ドメインが結合する抗原とは異なる抗原であるハウスキーピングタンパク質の組織において発現する抗原の多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体に特異的に結合する細胞外ドメインを含むiCARとを発現する。

【0112】

ある特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞の1つを超える集団が投与され、異なる集団は、異なる遺伝子産物の細胞表面エピトープへの特異的結合を有する異なる対のaCARおよびiCARを発現する。

【0113】

ある特定の実施形態において、癌を治療する方法において使用される安全なエフェクター免疫細胞は、T細胞、ナチュラルキラー細胞またはサイトカイン誘導性キラー細胞より選択される。ある特定の実施形態では、安全なエフェクター免疫細胞は自家細胞または普遍的（同種異系）エフェクター細胞である。ある特定の実施形態において、先に定義の癌を治療する方法のうちのいずれか1つにおいて使用されるiCARは、aCARの標的抗原が存在する患者の全ての組織へ向けられ、ここで、aCARの標的抗原は、抗原の非多形細胞表面エピトープであるか、または多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体が存在し、当該エピトープは腫瘍関連抗原であるか、または少なくとも関連腫瘍および正常組織の細胞によって共有される。

10

【0114】

ある特定の実施形態において、癌は、急性骨髄性白血病（LAM L）、副腎皮質癌（ACC）、膀胱尿路上皮癌（BLCA）、脳低悪性度神経膠腫（LGG）、乳房浸潤癌（BRCA）、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸内膜腺癌（CESC）、胆管癌（CHOL）、結腸腺癌（COAD）、食道癌（ESCA）、多形性膠芽腫（GBM）、頭頸部扁平上皮癌（HNSC）、嫌色素性腎（KICH）、腎臓腎明細胞癌（KIRC）、腎臓腎乳頭細胞癌（KIRP）、肝細胞癌（LIHC）、肺腺癌（LUAD）、肺扁平上皮癌（LUSC）、リンパ性新生物びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBC）、中皮腫（MESO）、卵巣漿液性嚢胞腺癌（OV）、膵腺癌（PAD）、褐色細胞腫および傍神経節腫（PCPG）、前立腺癌（PRAD）、直腸腺癌（READ）、肉腫（SARC）、皮膚黒色腫（SKCM）、胃腺癌（STAD）、精巣胚細胞腫瘍（TGCT）、胸腺腫（THYM）、甲状腺癌（THCA）、子宮癌肉腫（UCS）、子宮体部子宮内膜癌（UCEC）、ぶどう膜黒色腫（UVM）より選択される。

20

30

【0115】

ある特定の実施形態では、先に列挙した癌型のうちのいずれか1つなどの癌を治療するために使用されるiCARは、HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子またはHLA-C遺伝子の単一の対立遺伝子変異体に向けられるかまたは当該変異体へ特異的に結合する。

【0116】

ある特定の実施形態では、先に列挙した癌型のうちのいずれか1つなどの癌を治療するために使用されるaCARは、CD19など、表1に列挙される抗原より選択される非多形細胞表面エピトープに対して向けられるかまたは当該エピトープへ特異的に結合する。

【0117】

ある特定の実施形態では、先に列挙した癌型のうちのいずれか1つなどの癌を治療するために使用されるiCARは、HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子またはHLA-C遺伝子の単一の対立遺伝子変異体に対して向けられるかまたは当該変異体へ特異的に結合し、先に列挙した癌型のうちのいずれか1つなどの癌を治療するために使用されるaCARは、CD19など、表1に列挙される抗原より選択される非多形細胞表面エピトープに対して向けられるかまたは当該エピトープへ特異的に結合する。

40

【0118】

別の態様において、本発明は、各々1つが制御エフェクター免疫細胞活性化システムの異なるメンバーをコードするヌクレオチド配列であって、単一の一部であるかまたは単一を形成する当該核酸分子は、核酸分子を続行すること、または2つ以上の別個の核酸分子

50

を含む、2つ以上の核酸分子の組み合わせに向けられており、ここで、制御エフェクター免疫活性化システムは、エフェクター細胞に、ヘテロ接合性の喪失（LOH）のため、1つ以上の染色体またはその一部を喪失した腫瘍細胞を殺滅させ、関連する正常組織の細胞を免れさせ、（a）第1のメンバーは、抗原の非多形細胞表面エピトープへまたは異なる多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する第1の細胞外ドメインを含む活性化キメラ抗原受容体（aCAR）ポリペプチドを含み、当該非多形または多形細胞表面エピトープは、腫瘍関連抗原であるかまたは関連する異常および正常哺乳類組織の細胞によって共有され、（b）第2のメンバーは、LOHのために異常な哺乳類組織によって発現することはないが関連する哺乳類正常組織の全ての細胞上に存在する多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合する第2の細胞外ドメインを含む調節ポリペプチドを含む。

10

【0119】

ある特定の実施形態では、第1のメンバーは、（a）エフェクター免疫細胞を活性化させおよび/または共刺激する少なくとも1つのシグナル伝達要素を含む細胞内ドメインをさらに含む構成的aCAR、ならびに（b）ヘテロ二量体化小分子のための結合部位の第1のメンバーを含む細胞内ドメインと、場合により少なくとも1つの共刺激シグナル伝達要素とをさらに含むが、活性化シグナル伝達要素を欠く条件付きaCARより選択され、第2のメンバーは、（c）エフェクター免疫細胞を阻害する少なくとも1つのシグナル伝達要素を含む細胞内ドメインをさらに含む阻害性キメラ抗原受容体（iCAR）、または（d）シェダーゼのための基質を含む細胞外調節領域と、膜内切断プロテアーゼのための

20

【0120】

ある特定の実施形態において、（i）iCARまたはpCARの細胞外ドメインは、抗原の多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体の特異的に結合し、これは、aCARの細胞外ドメインが結合する抗原とは異なる抗原であるか、（ii）pCARまたはiCARの細胞外ドメインは、当該aCARの細胞外ドメインが結合するのと同じ抗原の異なる多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体の特異的に結合するか、または

30

【0121】

ある特定の実施形態において、シェダーゼのための基質は、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ADAM）またはベータ-セクレターゼ1（BACE1）のための基質である。ある特定の実施形態において、基質は細胞外ドメインの一部を形成し、Lin 12/Notch反復とADAMプロテアーゼ切断部位とを含む。

【0122】

ADAM切断を予測する一貫した配列モチーフはないことが概して受け入れられているが、Caescuら（Caescu et al., 2009）は、表2に、本明細書に完全に開示されたかのように参照により本明細書により組み込まれた、本発明のpCARにおけるADAMのための基質として役立つ多数のADAM10および/またはADAM17の基質配列を開示している。ある特定の実施形態において、ADAM基質配列は、アミロイド前駆体タンパク質、BTC、CD23、コラーゲン、DII-1、エボラ糖タンパク質、E-カドヘリン、EGF、エプレグリン、Fasリガンド、成長ホルモン受容体、HB-EGF、II型インターロイキン1受容体、IL-6受容体、L-セレクチン、N-カドヘリン、Notch、p55TNF受容体、p75TNF受容体、Pmel17、プリオンタンパク質、受容体型タンパク質チロシンホスファターゼZ、TGF-、TNFまたはTRのものである（Caescu et al., 2009）。

40

50

【0123】

A D A M 1 0 は、例えばリンパ球上に比較的高レベルで構成的に存在するので、本発明の p C A R において A D A M 1 0 切断配列を使用することは有利であり得る。A D A M 1 0 とは対照的に、刺激されていない細胞では、比較的近い T A C E / A D A M 1 7 が低レベルでしか検出されない。T 細胞芽細胞上の A D A M 1 7 表面発現は刺激によって迅速に誘導される (E b s e n e t a l . , 2 0 1 3) 。

【0124】

H e m m i n g r a (H e m m i n g e t a l . , 2 0 0 9) は、基質対非基質において、B A C E 1 切断を予測する一貫した配列モチーフが同定されていなかったことを報告しているが、表 1 に、本明細書に完全に開示されているかのように参照により本明細書により組み込まれ、本発明の p C A R における B A C E 1 の基質として役立ち得る、B A C 1 切断配列を有する多数の B A C E 1 基質を開示している。

10

【0125】

ある特定の実施形態において、膜内切断プロテアーゼの基質は、S P 2、 α -セクレターゼ、シグナルペプチドペプチダーゼ (s p p)、s p p 様プロテアーゼまたは菱形プロテアーゼの基質である。

【0126】

R a w s o n r a (R a w s o n , 2 0 1 3) は、S P 2 基質が少なくとも 1 つの 2 型膜貫通ヘリックスを有し、S P 2 基質中に A s p - P r o モチーフなどのヘリックス不安定化モチーフを含むことを開示している。この論文は、表 1 に、本明細書に完全に開示されているかのように参照により本明細書により組み込まれ、本発明の p C A R において S P 2 の基質として役立ち得る、S P 2 - 切断配列を有する多数の S P 2 基質を開示している。

20

【0127】

H a a p a s a l o および K o v a c s (H a a p a s a l o a n d K o v a c s , 2 0 1 1) は、アミロイドタンパク質前駆体 (A P P) がプレセニリン (P S) 依存性セクレターゼ (P S / α -セクレターゼ) の基質であり、少なくとも 9 0 のさらなるタンパク質がこの酵素複合体によって同様のタンパク質分解を受けることがわかった。セクレターゼ基質はいくつかの共通の特色を有する。ほとんどの基質タンパク質は I 型膜貫通タンパク質であり、P S / α -セクレターゼ伸介性様切断 (A I C D を放出する、A P P における α -切断に対応) は、膜貫通ドメインと細胞質ドメインとの境界またはその近くで起こる。様開裂部位は、リジン残基および / またはアルギニン残基が豊富な疎水性アミノ酸配列鎖に隣接する。P S / α -セクレターゼ開裂は、開裂部位におけるまたはそれに隣接する特定のアミノ酸標的配列に依存せず、むしろ膜貫通ドメインの立体配座状態に依存すると思われる。H a a p a s a l o および K o v a c s は、表 1 に、その切断配列が本明細書に完全に開示されているかのように参照により本明細書により組み込まれ、本発明の p C A R における α -セクレターゼの基質として役立ち得るセクレターゼ基質のリストを開示している。

30

【0128】

V o s s r a (V o s s e t a l . , 2 0 1 3) は、G x G D アスパルチルプロテアーゼ (s p p s) について、基質内の一次配列要素に基づいたコンセンサス開裂部位がこれまで説明されていなかったことを教示している。膜タンパク質の膜貫通ドメインは、それらのペプチド結合がプロテアーゼにほとんど接近できないヘリックス構造を優先的に採用する。それゆえ、膜貫通ドメインを膜内タンパク質分解に対して高感度にするために、膜貫通ドメインのヘリックス含有量は、ヘリックス不安定化アミノ酸によって低減される必要があると仮定された。この仮説と一致して、様々なシグナルペプチドは、それらの h 領域内に、S P P によるそれらのタンパク質分解プロセッシングに決定的に影響するヘリックス不安定化アミノ酸を含有することが示されている。さらに、種々の H C V 株のシグナルペプチド内の例えばセリン残基およびシステイン残基は、S P P 切断に極めて重要であるので、シグナルペプチドの h 領域内にある極性残基は、S P P による開裂に影響し

40

50

得る。これらの極性残基が、シグナルペプチドのらせん含有量にも単純に影響するのか、それと特にヒドロキシル基もしくはスルフヒドリル基がSPPによる切断を誘起するのに必要とされるかどうかはまだ完全には理解されていない。同様に、SPLL2bによるBri2膜貫通ドメインの開裂は、Bri2膜貫通ドメインのヘリックス含有量が減少すると有意に増大する。興味深いことに、推定ヘリックス不安定化力価を有する4つの残基のうち1アミノ酸残基のみが、リン脂質系の環境におけるBri2膜貫通ドメインのヘリックス含有量を有意に低減させた。このことは、ヘリックス膜貫通ドメインの不安定化が単にある特定のアミノ酸残基によって引き起こされるのではなく、むしろこれらのアミノ酸の脈絡および位置がそれらのらせん不安定化能力、したがってSPP/SPLLによる膜内タンパク質分解への膜貫通ドメインの接近可能性を決定することを示唆している。Vossらはさらに、表1に、本明細書に完全に開示されたかのように参照により本明細書により組み込まれ、本発明のpCARにおけるsppの基質として役立ち得るsp基質およびspp様基質のリストを開示している。

10

20

30

40

50

【0129】

Bergboldら(Bergbold and Lemberg, 2013)は、菱形プロテアーゼについて、基質認識についての2つの異なるモデルが示唆されたことを教示している。第1のモデルでは、菱形活性部位の近傍での膜の浸漬と組み合わされた基質ペプチド骨格の立体配座の可撓性は、特異性を提供するのに十分である。十分に特徴付けられたショウジョウバエ基質Spitzについては、グリシン-アラニンモチーフは、膜貫通ドメインが菱形活性部位へと展開できるヘリックス破壊として役立つことが示されている。第2のモデルは、菱形プロテアーゼが主に、切断部位を取り囲む特定の配列を認識すること、および膜貫通ヘリックス不安定化残基がいくつかの基質にのみ必要とされる二次的特色であることを示唆している。この特定の配列はまだ同定されていない。Bergboldらは、表2に、本明細書に完全に開示されたかのように参照により本明細書により組み込まれ、本発明のpCARにおける菱形プロテアーゼの基質として役立ち得る菱形プロテアーゼ基質のリストを開示している。

【0130】

先の点において、ほとんどの場合、膜内切断プロテアーゼについてコンセンサスモチーフは未だ確立されておらず、膜内切断プロテアーゼ基質を同定するためのアッセイは、本明細書中に引用された文献において先に説明したように当該技術分野で周知であるので、pCARは、このように同定されたアミノ酸配列を含み得、膜貫通ヘリックス不安定化残基をさらに含み得る。

【0131】

ある特定の実施形態では、基質は膜貫通正準モチーフの一部を形成し、Notch、Erbb4、E-カドヘリン、N-カドヘリン、エフリン-B2、アミロイド前駆体タンパク質またはCD44の膜貫通ドメインと相同であり/これに由来する。

【0132】

ある特定の実施形態では、当該条件付きaCARの細胞外ドメインおよび細胞内ドメインを別個のタンパク質としてコードするヌクレオチド配列を含み、各ドメインは、膜貫通正準モチーフへ独立して融合し、ヘテロ二量体化小分子のための結合部位の異なるメンバーを含む。

【0133】

ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体化小分子についての結合部位の第1および第2のメンバーの各1は、以下より選択されるタンパク質に由来する。(i)タクロリムス(FK506)結合タンパク質(FKBP)およびFKBP、(ii)FKBPおよびカルシニューリン触媒サブユニットA(CnA)、(iii)FKBPおよびシクロフィリン、(iv)FKBPおよびFKBP-ラパマイシン関連タンパク質(FRB)、(v)ジャイレースB(GyrB)およびGyrB、(vi)ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)およびDHFR、(vii)DmrBホモ二量体化ドメイン(DmrB)およびDmrB、(viii)PYLタンパク質(別名アブシジン酸受容体およびRCARとして)

およびABI、(ix)GAIシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)タンパク質(別名ジベレリン酸非感受性およびDELLAタンパク質GAI(GAI))およびGID1シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)タンパク質(ジベレリン受容体GID1としても既知)(GID1)。

【0134】

定義：

本明細書で使用する「核酸分子」という用語は、DNA分子またはRNA分子を指す。

【0135】

本明細書で使用する「ゲノム変異体」という用語は、同じゲノム位置での参照配列またはコンセンサス配列と比較される、配列決定した試料中のゲノムレベルでの少なくとも1つのヌクレオチドの変化を指す。

10

【0136】

変異体に関して本明細書で使用する「対応する参照対立遺伝子」という用語は、その変異体と同じゲノム位置にある参照配列もしくはコンセンサス配列または参照ヌクレオチドもしくはコンセンサスヌクレオチドを意味する。

【0137】

タンパク質に関して本明細書で使用する「細胞外ドメイン」という用語は、細胞膜の外側にあるタンパク質の領域を意味する。

【0138】

本明細書で使用する「ヘテロ接合性の喪失」または「LOH」という用語は、体細胞中の2つの染色体のうちの1つのコピーにおける、完全な染色体またはその一部などの染色体材料の喪失を意味する。

20

【0139】

変異体または参照対立遺伝子に関して本明細書で使用する「配列領域」という用語は、抗体によって認識されることができる「エピトープペプチド」へ翻訳されることができる、変異体の位置から上流で始まり、下流で終わる配列を意味する。

【0140】

多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体へ特異的に結合するs c F vなどの細胞外ドメインの脈絡における本明細書で使用する「特異的結合」という用語は、1つの対立遺伝子変異体に対するs c F vの相対的な結合、および同じ多形細胞表面エピトープの対応する異なる対立遺伝子変異体へ結合することができないことを指す。このことは、結合活性(T細胞上のCARコピー数、標的細胞(または保護されるべき細胞)の表面上にある抗原分子数)、および使用される具体的なCARの親和性に依存するので、機能的定義は、具体的なs c F vが、特異的である多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体に対してELISAにおける有意なシグナルを提供するであろうことか、またはs c F vを提示するCARをトランスフェクトした細胞がFACSアッセイにおける多形細胞表面エピトープの単一の対立遺伝子変異体で明確に標識されるであろうが、同じ多形細胞表面エピトープの対応する異なる対立遺伝子変異体を用いる同じアッセイがいかなる検出可能なシグナルも付与しないであろうということであろう。

30

【0141】

本明細書で使用する「治療すること」という用語は、所望の生理学的効果を得る手段を指す。その効果は、疾患および/またはその疾患に起因する症状を部分的にまたは完全に治癒させることに関して治療的であり得る。この用語は、疾患を阻害すること、すなわちその発症を捕捉すること、または疾患を改善すること、すなわち疾患の後退を引き起こすことを指す。

40

【0142】

本明細書で使用する場合、「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳類」は、診断、予後、または療法が望まれる何らかの対象、特に哺乳類対象、例えば、ヒトを指す。

【0143】

50

本発明に従った使用のための医薬組成物は、1つ以上の生理学的に許容され得る担体または賦形剤を使用する従来の様式で製剤され得る。担体（複数可）は、組成物の他の成分と相溶性があり、その受け手に有害ではないという意味で「許容され得」なければならない。

【0144】

担体、投与様式、剤形などの次の例示は、担体、投与様式、剤形などが本発明を用いた使用のために選択され得る既知の可能性として列挙される。しかしながら、当業者は、選択された何らかの所与の製剤および投与の様式が所望の結果を達成することを判断するためにまず検査されるべきであることを理解するであろう。

【0145】

投与の方法には、非経口経路、例えば静脈内経路、腹腔内経路、筋肉内経路、皮下経路、粘膜経路（例えば経口経路、鼻腔内経路、頬側経路、膣内経路、直腸内経路、眼内経路）、髄腔内経路、局所経路および皮内経路が含まれるが、これらに限定されない。投与は全身的または局所的であり得る。ある特定の実施形態では、医薬組成物は経口投与に適している。

【0146】

「担体」という用語は、活性のある薬剤が共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。医薬組成物中の担体は、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン（ポリビニルまたはポビドン）、トラガカントゴム、ゼラチン、デンプン、ラクトースまたはラクトース-水和物などの結合剤、アルギン酸、トウモロコシデンプンなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムまたはラウリル硫酸ナトリウムなどの滑沢剤または界面活性剤、およびコロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤を含み得る。

【0147】

経口投与については、医薬製剤は、液状、例えば液剤、シロップ剤もしくは懸濁剤であり得るか、または使用前に水もしくは他の適切なビヒクルによる再構成のための薬品製剤として呈され得る。このような液体製剤は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素添加食用脂肪）、乳化剤（例えばレシチンまたはアカシア）、非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油性エステル、または分別植物油）、および防腐剤（例えば、メチルもしくはプロピル-p-ヒドロキシベンゾアートまたはソルビン酸）などの薬学的に許容され得る助剤を用いる従来の手段によって調製され得る。医薬組成物は、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、充填剤（例えば、ラクトース、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）、崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンまたはグリコール酸デンプンナトリウム）、または湿潤剤（例、ラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容され得る賦形剤を用いる従来の手段によって調製された、例えば、錠剤またはカプセル剤の形態をとり得る。錠剤は当該技術分野で周知の方法でコーティングされ得る。

【0148】

経口投与用調製物は、活性のある化合物の徐放性を与えるように適切に製剤され得る。

【0149】

頬側投与の場合、組成物は従来の様式で製剤された錠剤またはロゼンジ剤の形態をとり得る。

【0150】

組成物は、注射による、例えばボーラス注射または持続注入による非経口投与用に製剤され得る。注射用製剤は、防腐剤を加えた単位剤形、例えばアンプルまたは複数回用量容器に入れて呈され得る。組成物は、油性または水性のビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルションのような形態をとり得、懸濁剤、安定剤および/または分散剤などの処方用剤を含有し得る。あるいは、有効成分は、使用前に適切なビヒクル、例えば滅菌済み発熱物質非含有水を用いた構成のための粉末形態にあり得る。

【0151】

組成物はまた、例えばカカオバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を含有する、坐剤または停留浣腸などの直腸用組成物中にも製剤され得る。

【0152】

吸入による投与のために、本発明による使用のための組成物は、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体の使用で、加圧パックまたはネプライザーからのエアゾールスプレーの形態で簡便に送達される。加圧エアゾールの場合、薬用量単位は、定量された量を送達するための弁を提供することによって決定され得る。吸入器または吹送器における使用のための、例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物とラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤との粉末混合物を含有して製剤され得る。

10

【0153】

本明細書で使用する「末梢血単核球(PBMC)」という用語は、リンパ球、単球またはマクロファージなど、円形核を有するあらゆる血球を指す。血液からPBMCを単離する方法は当業者には容易に明らかである。非限定的な例は、血液の層を分離する親水性多糖であるフィコールを用いた全血からのこれらの細胞の抽出であり、単球およびリンパ球は血漿の層の下にパフィーコートを形成し、または白血球分離によって、赤血球および白血球の少ない血漿をドナーに戻して、白血球濃縮物を調製する。

【0154】

明確にする目的で、および決して教示の範囲を制限しない方法で、別段に示さない限り、本明細書中に列挙する量、百分率または比率を表すすべての数、および他の数値は、「約」という用語によってすべての場合において先行されるものとして解釈されるべきである。したがって、本明細書に列挙される数値パラメータは、所望の結果に応じて変わり得る近似値である。例えば、各数値パラメータは、報告された有意な桁の数に鑑みて、および通常の丸め技術を適用することによって解釈され得る。

20

【0155】

本明細書で使用する「約」という用語は、示された値の上下10%以内の値も含まれることを意味する。

【実施例】

【0156】

実施例1. 発現した細胞表面タンパク質をコードし、ヘテロ接合性の喪失(LOH)を受けける多型遺伝子のゲノム全体の同定

30

iCAR標的として役立つことができる遺伝子を同定するために、次の必要条件を採用した。

1. 遺伝子は膜貫通タンパク質をコードし、それゆえ細胞表面上に発現してiCAR結合を可能にする部分を有する。

2. 遺伝子は少なくとも2つの発現する対立遺伝子を有する(チェックされた少なくとも1つの民族集団において)。

3. 当該遺伝子について見出された対立遺伝子変異は、タンパク質の細胞外領域において参照配列と比較してアミノ酸変化を引き起こす。

4. 遺伝子は癌においてLOHを受ける染色体領域に位置する。

40

5. 遺伝子は、対応する領域がLOHを受けることが判明した腫瘍型の起源組織において発現する。

【0157】

対立遺伝子の同定:

Exome Aggregation Consortiumデータベース(ExAC、exac.broadinstitute.org)を解析への入力として使用した。ExACデータベースは、合計60,706のエクソームを含む、さまざまな集団レベルの配列決定研究からのエクソームの編集物である(Lek et al., 2016)。ExACは、変異体対立遺伝子の計数の数と比較した参照対立遺伝子の計数の数(対立遺伝子頻度 - 染色体の総数からの変異体対立遺伝子の計数の数)を含む各変異体についての

50

情報を含む。対立遺伝子頻度情報は、表2に詳述されるようにデータベース内の下位集団にわたっており、閾値は少なくとも1つの集団において5%以上の対立遺伝子頻度であった。

【表1】

表2. ExACデータベース内の下位集団。

集団の祖先	集団の略語	個体の数
アフリカ人	AFR	5, 203
ラテン系	AMR	5, 789
東アジア系	EAS	4, 327
フィンランド人	FIN	3, 307
フィンランド人以外の欧州系	NFE	33, 370
南アジア系	SAS	8, 256
その他	OTH	454

10

【0158】

先に列挙する必要条件に従って、ExACデータベースから検索した変異体へ次のフィルターを適用した。

1) 変異体は、コードされたタンパク質のアミノ酸組成に影響しなければならない。ii) 変異体は、ExACデータベースに現れる少なくとも1つの集団において0.05(5%)以上のマイナー対立遺伝子の頻度を有しなければならない。マイナー対立遺伝子が0.5(50%)よりも大きな対立遺伝子部分を有するシナリオについて、分析を修正した。ある部位に3つを超える対立遺伝子が観察された場合、最も一般的な置換を用いた。

20

2) 変異体(この場合、一塩基多型(SNP))は、その変異が次の変異体クラスのいずれかに分類される場合、タンパク質の組成に与える影響を有するものと注釈された: 「ミスセンス変異体」、「インフレーム欠失」、「終止喪失」、「終止獲得」、「インフレーム挿入」、「終止保有変異体」、「フレームシフト変異体」、「終止喪失」、「コード配列変異体」、「タンパク質変化変異体」。

【0159】

解析は、9,362,319のSNP変異体から始まり、そのうちの29,904の変異体がこれら2つのフィルターを通過した。これらの変異体は、5%以上のマイナー対立遺伝子の頻度を有する対立遺伝子を有し、タンパク質アミノ酸配列に影響を与える10,322の遺伝子に分類された。これら2つのフィルターと一致する全ての対立遺伝子を解析に含めた。

30

【0160】

発現遺伝子の同定

遺伝子型-組織発現(GTEX)データベースv6p(dbGaP Accession phs000424.v6.p1)を、種々の組織型において発現する遺伝子の同定のために使用した(<https://gtexportal.org/home>, Consortium GT.Human Genomics, 2015)。GTEXデータベースは、多様な健常組織型からの8,555のヒト試料のRNA配列決定からなる。

40

【0161】

解析物がTCGAデータベースに存在する各腫瘍型に対応する起源組織における各遺伝子の平均発現レベルも含めた。これらのデータを得るために、本発明者らは、対応する正常組織への腫瘍型のマッピングを作成した。例えば、TCGAデータベース由来の膵癌データは、GTEX由来の膵臓組織で注釈を付けられるであろう。いくつかの場合、マッピングは、腫瘍型についての明確な起源組織の欠如のため、概算であった。例えば、膠芽腫の発現データは、GTEXにおいて脳として注釈をつけられているすべての組織からマッピングした。

【0162】

特定の組織で過剰発現している遺伝子は、優れたaCAR標的である可能性がある。逆

50

に、すべての組織にわたって均一に発現する遺伝子は、より優れた i C A R 標的である可能性がある。

【 0 1 6 3 】

次の基準を満たす場合、遺伝子を「普遍的に発現する」と定義した。(i) 組織間での平均発現が 1 0 R P K M (1 0 0 万のマッピングされた読み取りあたりの転写産物 1 キロ塩基あたりの読み取り) よりも大きかった。(i i) 最も発現が少ない組織は、1 よりも大きな R P K M を有した。(i i i) 平均 R P K M と比較した、組織にわたる R P K M 中央値の標準偏差の比は 1 未満であった。1 つ前のステップで検索された 1 0 , 3 2 2 個の遺伝子のうち、1 , 0 9 2 個の遺伝子のみを普遍的に発現すると注釈づけた。

【 0 1 6 4 】

細胞表面タンパク質の注釈づけ：

タンパク質が C A R - T 媒介性治療薬のための優れた標的となるためには、その一部を細胞表面に発現させる必要がある。細胞表面タンパク質の同定に役立つように、本発明者らは、いくつかのデータベースを使用した。第 1 のデータベースは、Human Protein Atlas であり、3 2 種類の組織を解析するために使用された 2 4 , 0 2 8 の抗体に由来する解析である (U h l e n e t a l . , 2 0 1 5) 。第 2 のデータベースは、Cell Surface Protein Atlas であり、N - グリコシル化した細胞表面タンパク質の質量分析に基づくデータベースである (B a u s c h - F l u c k e t a l . , 2 0 1 5) 。第 3 のデータベースは、細胞表面発現を含むタンパク質の細胞内局在を同定するための、高処理量免疫蛍光法および自動画像解析を用いた近年公開された解析物である (T h u l e t a l . , 2 0 1 7) 。各 S N P に、タンパク質が出現したデータベースの数を注釈づけた。3 つのデータベース全てにおいて遺伝子によってコードされるタンパク質は、「高い信頼度」、2 つのデータベースで「中等度の信頼度」、1 つのデータベースで「低い信頼度」で細胞表面に発現すると言われた。表 3 に示すように、1 0 , 3 2 2 個の遺伝子のうちの 3 , 3 5 9 個が上述のように膜発現の何らかの証拠を有した。

【表 2】

表 3. 膜発現の証拠に基づく遺伝子の分布

遺伝子を有するデータベース数	分類	遺伝子数
0	膜以外	6 9 6 3
1	低い信頼度	2 9 0 4
2	中程度の信頼度	4 0 8
3	高い信頼度	4 7

【 0 1 6 5 】

S N P に先のデータベースによって注釈づけたが、候補を後述のように UniProt 注釈のみに基づいて選択した。

【 0 1 6 6 】

タンパク質機能に及ぼす対立遺伝子の影響：

i C A R が膜タンパク質のうちの 1 つの対立遺伝子を喪失した癌細胞だけを有効に認識するためには、タンパク質の構造はどの対立遺伝子がコードされているかに基づいて十分に異なっているべきである。S I F T (耐容性から非耐容性を選別すること) アルゴリズムは、タンパク質変異体がタンパク質構造に影響を及ぼし、それゆえ機能するであろうかどうかを予測しようと試みる (N g a n d H e n i k o f f , 2 0 0 3) 。スコアは 0 (有害) から 1 (良性) の範囲であり得る。S I F T スコア (第 s i f t 5 . 2 . 2 版) は、スコアが利用可能であるあらゆる S N P について含めた。

【 0 1 6 7 】

タンパク質の細胞外部分に収まっている対立遺伝子の分類：

i C A R が対立遺伝子を認識するためには、対立遺伝子はタンパク質の細胞外部分に収まっていなければならない。各 S N P について、コンセンサス翻訳において影響されたア

10

20

30

40

50

ミノ酸の位置を抽出し、www.uniprot.org/downloadsからダウンロードした、UniProtデータベースから細胞外として注釈を付けたドメインと比較した。全てのタンパク質のドメインの特徴付けの欠如のため、多くの偽陰性が起こり得る。1146個の遺伝子における合計4577個のSNPに細胞外として注釈づけた。

【0168】

LOHを受けている腫瘍の比率

優れたiCAR標的は、腫瘍の大部分でヘテロ接合性の喪失(LOH)を受けるSNPであろう。セグメントコピー数ファイルを、TCGAデータベース<http://www.cbioportal.org>のcbioポータルからダウンロードした(Ceramiet al., 2012、Gao et al., 2013)。各遺伝子についてLOHを受けているTCGAデータベース中の32の腫瘍のうちの腫瘍の比率を、HLA遺伝子についてより詳細に後述の通り決定した。

10

【0169】

実施例2. HLAクラスIタンパク質のヘテロ接合性の喪失

HLAクラスI遺伝子は、それらの既知の特徴、すなわち、いずれの対立遺伝子からも発現する細胞表面タンパク質、幅広い組織分布、高レベルの多型、および腫瘍の回避機序としての腫瘍における記録されたLOHにより、第1のセットの潜在的なiCAR標的として選択した。このゆえに、本発明者らは、HLAクラスIタンパク質が様々な腫瘍型において喪失された割合を決定することによって解析を開始した。本発明者らは、表4に列挙するHLA-A、BおよびCのゲノム遺伝子座におけるヘテロ接合性の喪失の存在についてこれらのコピー数特性を解析した。

20

【表3】

表4. HLA-Iゲノム遺伝子座

遺伝子	タンパク質	染色体	開始位置	終了位置
HLA-A	HLA-A	6	29941260	29945884
HLA-B	HLA-B	6	31353872	31357188
HLA-C	HLA-C	6	31268749	31272130

【0170】

TCGAから公的に利用可能な何千もの腫瘍試料についてのSNPアレイデータは、コピー数計算のための情報源として役立つことができ、公的NIH TCGAデータポータル(<https://gdc.cancer.gov/>)上で利用可能な全ての腫瘍型にわたるHLA LOH頻度を予測するために使用した。

30

【0171】

LOH呼び出しがゲノム位置の変化に対して頑強であるかどうかを決定するために、本発明者らはHLA-Aの上流にある遺伝子(HLA-G、図3A)および下流にある遺伝子(ZNRD1、図3A)のLOHパターンを検査し、すべての遺伝子がHLA-Aと同じLOHパターンを示すと結論付けた(図3B)

【0172】

全てのHLAクラスI遺伝子(HLA-A、B、C)が第6染色体の短いアーム上の主要組織適合遺伝子座(MHC)において互いに染色体上で近くに位置しているため、これらは腫瘍型にわたってLOHの同じパターンおよび頻度をすべて呈することがわかった(HLA-BおよびCについてはそれぞれ図4AおよびB)。

40

【0173】

上述に基づき、および図4に示すように、本発明者らは、HLAクラスI領域LOHが多く腫瘍における共通の事象であるが、LOHの百分率が腫瘍型の間で変化すると結論付けた。それゆえ、HLA遺伝子はiCAR標的の優れた候補である。

【0174】

実施例3. LOHの免疫細胞化学的検証および対立遺伝子特異的抗体の特異性。

異なる腫瘍において同定された数対の保存されおよび喪失した対立遺伝子変異体を選択

50

するので、それらのポリペプチド産物は変異体特異的 m A b の生成に役立つであろう。候補 m A b の識別力は、次のように、二重染色およびフローサイトメトリー実験または免疫組織化学によってアッセイされる。

【表 4】

IHC プロトコル

対立遺伝子特異的抗 H L A 抗体：

抗体	製造元
抗ヒト H L A - A 2 APC (B B 7 . 2)	e B i o s c i e n c e s
抗ヒト H L A - A 2 PE - c y 7 (B B 7 . 2)	e B i o s c i e n c e s
抗ヒト H L A - A 3 FITC (G A P A 3)	e B i o s c i e n c e s
抗ヒト H L A - A 3 PE (G A P A 3)	e B i o s c i e n c e s
マウス抗ヒト H L A - B 7 - P E (B B 7 . 1)	M i l l i p o r e
H L A - A 2 抗体 (B B 7 . 2)	N o v u s
H L A B 7 抗体 (B B 7 . 1)	N o v u s
マウス抗ヒト H L A - B 2 7 - F I T C (H L A . A B C . m 3)	M i l l i p o r e

10

【 0 1 7 5 】

凍結組織試料 -

凍結組織をしばしばホルマリン系の溶液中で固定し、試料の凍結切片化を可能にする O C T (O p t i m a l C u t t i n g T e m p e r a t u r e 化合物) 中で包埋する。O C T 中の組織を - 8 0 で凍結保存する。凍結ブロックを、切片化の前に - 8 0 から取り出し、クリオスタットチャンパー中で平衡化し、薄い切片 (しばしば 5 ~ 1 5 μ m 厚) に切断する。切片を組織学的スライド上に載せる。スライドは - 2 0 ~ - 8 0 で保存することができる。I H C 染色の前に、スライドを室温 (R T) で 1 0 ~ 2 0 分間解凍する。

20

【 0 1 7 6 】

パラフィン包埋組織 -

組織をホルムアルデヒド固定液中に包埋した。パラフィン蠟の添加前に、室温で特定の回数および持続時間で、漸増濃度のエタノール (7 0 % 、 9 0 % 、 1 0 0 %) およびキシレン中での徐々の浸漬によって組織を脱水する。次に、組織をパラフィン蠟中に包埋する。

30

パラフィン包埋組織をマイクロームで 5 ~ 1 5 μ m 厚の切片へと切断し、5 6 の水浴中で浮遊させ、組織学的スライド上に載せる。スライドは室温で保つことができる。

I H C 染色の前に、パラフィン包埋切片は再水和ステップを必要とする -

再水和 - 切片をキシレン中での浸漬 (2 × 1 0 分) 、続いて低下する濃度のエタノール中での 1 0 分ずつの浸漬によって再水和させる。1 0 0 % × 2

9 5 % エタノール - 5 分

7 0 % エタノール - 5 分

5 0 % エタノール - 5 分

d H 2 O 中でのすすぎ

40

【 0 1 7 7 】

免疫蛍光検出：

1 . スライドを洗浄緩衝液 (P B S X 1) 中で 1 0 分間再水和させる。洗浄緩衝液を排水する

2 . 抗原検索を実行する - 必要な場合 (熱誘導抗原検索または酵素検索)

3 . 細胞内抗原については、透過処理を行う - スライドを P B S × 1 中の 0 . 1 % トリトン X - 1 0 0 中で室温で 1 0 分間インキュベートする。

4 . ブロッキング - ブロッキング緩衝液中で組織を室温で 3 0 分間ブロッキングする。ブロッキングバッファーは検出方法に依存し、通常は P B S × 1 中 5 % の動物血清、または P B S X 1 中 1 % の B S A である

50

5. 一次抗体 - 抗体の製造元の説明書により、一次抗体をインキュベーション緩衝液（すなわち、PBS中1%BSA、1%ロバ血清）中に希釈する（他のインキュベーション緩衝液も使用することができる）。希釈した一次抗体中で組織を4で一晚インキュベートする。一次抗体は、先に詳述したように、モノクローナル抗HLA-A、抗HLA-Bまたは抗HLA-C対立遺伝子特異的抗体であり得る。

結合型一次抗体を使用する場合は、遮光してステップ8へ進む

陰性対照として、一次抗体を含まないインキュベーション緩衝液のみで組織をインキュベートする

また、実験に使用したモノクローナル抗体のアイソタイプを一致させた対照を行う

6. 洗浄 - スライドを洗浄緩衝液中で洗浄する（3×5～15分）。 10

7. 二次抗体 - 抗体の製造元の説明書により、インキュベーション緩衝液中に二次抗体を希釈する。室温で30～60分間、希釈した二次抗体中で組織をインキュベートする。遮光する

8. 洗浄 - スライドを洗浄緩衝液中で洗浄する（3×5～15分）。

9. DAPI染色 - DAPIインキュベーション緩衝液を希釈する（約300nM～3μM）。各切片に300μlのDAPI溶液を加える。室温で5～10分間インキュベートする。

10. 洗浄 - スライドをX1PBSで1回洗浄する

11. 退色防止用マウントメディアでマウントする

12. スライドを遮光したままにする 20

13. 蛍光顕微鏡を使用してスライドを可視化する

【0178】

色素生成検出：

1. スライドを洗浄緩衝液（PBSX1）中で10分間再水和させる。洗浄緩衝液を排水する

2. 抗原検索を行う - 必要な場合 - 上述を参照されたい

3. HRP試薬については、内在性ペルオキシダーゼ活性をメタノール中の3.0%過酸化水素で少なくとも15分間遮断する

4. 切片をdH₂O中で5分間浸漬することによって洗浄する

5. 細胞内抗原については、透過処理を行う - スライドをPBSX1中0.1%トリトンX-100中で室温で10分間インキュベートする。 30

6. ブロッキング - ブロッキング緩衝液中で組織を室温で30分間ブロッキングする。ブロッキング緩衝液は検出方法に依存し、通常はPBSX1中5%の動物血清、またはPBSX1中1%のBSAである。

7. 一次抗体 - 抗体の製造元の説明書により、一次抗体をインキュベーション緩衝液（すなわち、PBS中1%BSA、1%ロバ血清）中で希釈する（他のインキュベーション緩衝液も使用することができる）。希釈した一次抗体中で組織を4で一晚インキュベートする

8. 洗浄 - スライドを洗浄緩衝液中で洗浄する - 3×5～15分。

9. 二次抗体 - HRP結合二次抗体中で組織を室温で30～60分間インキュベートする。 40

10. 洗浄 - スライドを洗浄緩衝液中で3×5～15分間洗浄する。

11. 製造元の指針により、ABC-HRP試薬を添加する。室温で60分間インキュベートする。

12. 製造元の指針により、DAB溶液（または他の色素原）を調製し、組織切片に適用する。色素生成反応は、エピトープ部位を褐色にする（通常、数秒～10分間）。シグナルの強度が撮像に適しているとき、次のステップへ進む

13. 洗浄 - スライドを洗浄緩衝液中で洗浄する - 3×5～15分間。

14. スライドをdH₂O中で洗浄する - 2×5～15分間。

15. 核染色 - ヘマトキシリン溶液を添加する。室温で5分間インキュベートする。 50

- 16. 組織切片を脱水する -
- 95%エタノール - 2 × 2 分間。
- 100%エタノール - 2 × 2 分間。
- キシレン - 2 × 2 分間。
- 17. 退色防止用マウントメディアでマウントする
- 18. 明視野照明を使用してスライドを可視化する

【0179】

実施例4. CAR-Tの構築

本研究の目的は、CAR-T療法の標的に当たるが「腫瘍オフ」効果を阻害するであろう合成受容体を創製することとする。その程度まで、活性化CARおよび阻害性CARから構成されるCARコンストラクトのライブラリーが確立されるであろう。

【0180】

コンストラクトの第1のセットは、HLA-I型配列（例えば、HLA-A2）に向けられた阻害性CAR、および腫瘍抗原（例えば、CD19）に向けられた活性化CARを含むであろう。次のセットのコンストラクトは、本発明者らの生物情報学解析によって同定された標的抗原に向けられるCAR配列を含むであろう。標的候補は、示された基準（例えば、標的発現パターン、標的発現レベル、抗原性など）によって優先順位付けされるであろう。

【0181】

iCARコンストラクトについては、本発明者らは、HLA-A2scFVの下流で、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインをPD-1の第1の注釈付き細胞外ドメイン（アミノ酸145~288）またはCTLA4（アミノ酸161~223）まで融合させるであろう。iCARの検出および選別のために、レポーター遺伝子（すなわち、GFP、DsRED、RFP、mCherryなど）は、IRES配列または2A配列を介してiCAR配列の下流に組み込まれるであろう。

【0182】

HLA-A2scFVは、実施例2に上記した抗体のいずれか1つを発現するハイブリドーマからクローニングされ構築される。

【0183】

aCARコンストラクトについては、CD19scFVは、aCARの検出のために、第2世代のCAR（CD8ヒンジまたはCD28ヒンジ、CD28の膜貫通、CD28または41BB共刺激1およびCD3）または第3世代のCAR（CD8ヒンジまたはCD28ヒンジ、CD28の膜貫通、CD28および41BBおよびCD3）に融合し、レポーター遺伝子（すなわち、GFP、DsRed、RFP、mCherryなど）を選別することは、IRES配列または2A配列を介してaCAR配列に対して下流に組み込まれるであろう。

【0184】

aCAR配列およびiCAR配列の両方は、レトロウイルス輸送ベクターまたはレンチウイルス輸送ベクターへとクローン化され、次に、例えばHEK-293Tのような適切なパッケージング細胞を用いるウイルス粒子産生に使用されるであろう。

【0185】

Jurkat、Jurkat-NFAT-Luciferase、および健常ドナー由来の活性化T細胞には、異なる感染多重度（MOI）でaCAR、iCAR、またはその両方を形質導入するであろう。レポーター遺伝子発現に基づくFACS選択は、異なるレベルのaCAR、iCAR、またはその両方を発現する細胞集団の選別および選択のために使用されるであろう。

【0186】

標的細胞の調製 -

標的外細胞に対するaCARの活性を阻害する上でのiCARコンストラクトの機能性を検査するための試験管内組換え系が確立されるであろう。この目的のために、aCAR

10

20

30

40

50

エピトープ、iCARエピトープまたは両方を発現する標的細胞が作出されるであろう。aCARエピトープを発現する組換え細胞は、標的上の「腫瘍オン」細胞を表すのに対し、aCARエピトープおよびiCARエピトープの両方を発現する細胞は、標的上の「腫瘍外」健常細胞を表すであろう。

【0187】

本発明者らの第1のiCAR/aCARセットはそれぞれ、HLA-A2、CD19であるので、HLA-A2、CD19、またはその両方を発現する組換え細胞は、これらの遺伝子をコードする発現ベクターを細胞株（すなわち、HeLa、HeLa-LuciferaseまたはRaji）にトランスフェクトすることによって作出されるであろう。組換えCD19およびHLA-A-2発現の検出のために、両方の遺伝子をタンパク質タグ（すなわち、HAまたはFlagまたはMycなど）へ融合させるであろう。

10

【0188】

アッセイ -

iCARの阻害効果は試験管内および生体内の両方で検査されるであろう。

【0189】

試験管内アッセイにおいて、本発明者らは、サイトカイン分泌および細胞毒性効果を測定することに焦点を当てるであろうが、生体内では、標的腫瘍外異種移植片に対するiCARの阻害および保護を評価するであろう。レポーター遺伝子を用いてiCAR/aCAR二重陽性であるようにT細胞を選別することによる結果を混入することから、iCARを欠失するT細胞を制限するであろう。iCAR遮断活性についての陰性対照として、scFvドメインを欠失する偽のトランスフェクトしたCARを使用してもよい。

20

【0190】

試験管内アッセイ -

ルシフェラーゼ細胞毒性アッセイ - ホタルルシフェラーゼを発現するように組換え標的細胞（T）を操作するであろう。試験管内ルシフェラーゼアッセイは、Bright-Glo Luciferaseアッセイ（Promega）により行われるであろう。形質導入されたエフェクター（E）T細胞（iCARおよびaCARまたは偽CARの両方で形質導入）を、異なるエフェクター対標的比で、HLA-A2、CD19またはその両方を発現する組換え細胞と共に24～48時間インキュベートする。細胞殺滅は、Bright-Glo Luciferaseシステムを用いて定量化するであろう。

30

【0191】

形質導入したT細胞集団をiCAR/aCAR発現レベルによって選別することによって、または組換え標的細胞の下位集団をそれらのCD19発現レベルもしくはHLA-A2発現レベルによって選択することによって、「腫瘍外」細胞毒性を最適化してもよい。

【0192】

iCARを形質導入したT細胞が試験管内で「腫瘍オン」細胞と「腫瘍外」細胞とを識別することができるかどうかを検査するために、1:1の比での「腫瘍オン」と「腫瘍オフ」の細胞の混合物とともにインキュベートした、形質導入したT細胞の殺滅効果を検査するであろう。腫瘍オン組換え細胞は、ルシフェラーゼ発現によって「腫瘍外」組換え細胞と区別されるであろう（一度に1つの細胞集団のみがルシフェラーゼ遺伝子を発現するように操作されるであろう）。殺滅することは、Bright-Glo Luciferaseアッセイ（Promega）を用いて、24～48時間の共インキュベーションの後、に定量されるであろう。

40

【0193】

活性化された切断カスパーゼ3に対する抗体によるCTL誘導性アポトーシスのカスパーゼ3検出。

CTLが標的細胞を殺滅する経路のうちの1つは、Fasリガンドを介してアポトーシスを誘導することによる。CASP3タンパク質は、システイン-アスパラギン酸プロテアーゼ（カスパーゼ）ファミリーの一員である。カスパーゼの連続的な活性化は、細胞アポトーシスの実行相において有意な役割を担っている。プロカスパーゼ3のカスパーゼ3

50

への切断は、立体配座の変化および触媒活性の発現を結果的にもたらず。カスパーゼ3の切断された活性化型は、モノクローナル抗体によって特異的に認識されることができる。

【0194】

形質導入されたT細胞は、2～4時間、予めCFSEで標識された「腫瘍オン」組換え細胞または「腫瘍外」組換え細胞のいずれかと共にインキュベートされるであろう。標的細胞のアポトーシスはフローサイトメトリーによって定量されるであろう。細胞を透過処理し、内側染色キット(Miltenyi)によって固定し、活性化型カスパーゼ3に対する抗体(BD bioscience)で染色するであろう。

【0195】

時間差マイクロCTL -

標的細胞はレポーター遺伝子(例えば、mCherry)で標識されるであろう。形質導入されたT細胞は、最長5日間、「腫瘍」細胞または「腫瘍外」細胞のいずれかと共にインキュベートされるであろう。時間差顕微鏡は殺滅を可視化するために使用されるであろう。あるいは、終点時点で標的細胞数を決定するための生細胞数染色およびCount Brightビーズ(Invitrogen)を使用するフローサイトメトリー分析を実施するであろう。

【0196】

aCAR/iCARを形質導入したT細胞が試験管内で標的を識別することができるかどうかを確認するために、本発明者らは、各組換え標的細胞(「腫瘍オン」または「腫瘍オフ」)に異なるレポータータンパク質(例えば、GFPおよびmCherry)を標識するであろう。形質導入されたT細胞(エフェクター細胞)は、1:1の比のE/Tで組換え細胞(標的細胞)と共にインキュベートされるであろう。次に、本発明者らは、顕微鏡撮像によって細胞の運命を追跡するであろう。

【0197】

サイトカイン放出 -

形質導入されたT細胞を組換え標的細胞と共にインキュベートし、BioLegendのELISA MAX(商標)Deluxe Setキットにより細胞培養上清中のサイトカイン分泌を測定することによって、またはサイトカインを産生するT細胞の百分率のフローサイトメトリー解析によってのいずれかで、サイトカイン産生(IL2またはINF)を定量するであろう。フローサイトメトリー解析については、サイトカインの分泌を防止するためにゴルジ体の停止を使用するであろう。形質導入されたT細胞を標的細胞と共に6および18～24時間インキュベートした後、T細胞を内側染色キット(Miltenyi)によって浸透および固定し、T細胞マーカー(CD3およびCD8)に対する抗体ならびにサイトカインIL2およびINFに対する抗体で染色するであろう。

【0198】

CD107aについての染色

T細胞の脱顆粒は、リソソーム関連膜タンパク質(LAMP-1)であるCD107aの表面発現によって同定することができる。LAMP-1の表面発現はCD8T細胞の細胞毒性と相関することが示されてきた。この分子はリソソームの内腔側に位置する。活性化の際、CD107aは、活性化されたリンパ球の細胞膜表面へ輸送される。CD107aは、一過性に細胞表面上に発現し、エンドサイトーシス経路を介して迅速に再内在化する。それゆえ、CD107aの検出は、細胞刺激中の抗体染色によって、およびモネンシンの添加(酸性化およびそれに続くエンドサイトーシスを受けたCD107a抗体複合体の分解を防ぐため)によって最大限となる。

【0199】

本発明者らは、モネンシンの存在下で、形質導入されたT細胞を標的細胞と共に6～24時間インキュベートするであろうし、T細胞表面マーカー(CD3、CD8)に対する結合型抗体、およびCD107aに対する結合型抗体を用いるフローサイトメトリーによってCD8T細胞上のCD107a発現を追跡するであろう。

【0200】

10

20

30

40

50

生体内

NOD / SCID / c - マウスに腫瘍細胞を静脈内接種するであろう。腫瘍細胞の1つの可能性は、ホタルルシフェラーゼを発現するように操作されるであろうCD19陽性NALM6 (ATCC、ヒトB - ALL細胞株)細胞であり得る。さらに、「標的オン」、「腫瘍オフ」細胞の確立のために、NALM6もiCARエピトープ(例えば、HLA - A2)を発現するように操作され、それによって健常細胞を提示するであろう。マウスを試験群に分け、一方の群にNALM6細胞を注射し、もう一方の群にiCARエピトープを発現するNALM - 6を注射するであろう。数日後、マウスに、aCAR、aCAR / iCARおよび形質導入していないT細胞のまたはT細胞を有さない対照群であろう。マウスを屠殺し、腫瘍量を総フラックスにより定量するであろう。

10

iCARコンストラクトを発現するT細胞が同じ生物内での生体内で標的細胞と標的オフ細胞を識別できるかどうかを検査するために、「腫瘍オン」/「腫瘍オフ」のNALM - 6細胞の1 : 1混合物をマウスに注射し、続いてaCAR単独またはaCARおよびiCARの両方のいずれかを発現する形質導入したT細胞の注射が行われるであろう。マウスの屠殺の際に、脾臓および骨髄における「腫瘍オン」および「腫瘍オフ」細胞の存在が、2つのマーカー、すなわちCD19およびiCARエピトープについてのフローサイトメトリーによって解析されるであろう。

【0201】

付録 .

【表5】

20

表1.

1. ClinicalTrials. govに登録されている治験において評価されたCAR標的抗原

抗原	主な構造上/機能上の特色	悪性腫瘍	潜在的な腫瘍オフ標的
CD19	BCRによるシグナル伝達に関与する膜B細胞マーカー	ALL、CLL、NHL、HL、PLL	正常B細胞
CD20	4回膜貫通、Ca ²⁺ 輸送の調節およびB細胞活性化	CLL、NHL	正常B細胞
CD22	B系列特異的接着受容体、シアル酸結合Ig型レクチンファミリー	ALL、NHL	正常B細胞
Igκ	正常ヒトB細胞のおよそ65%が発現するIg軽鎖アイソタイプ	CLL、NHL、MM	正常B細胞
ROR1	腫瘍におけるI型オーファン受容体チロシキナーゼ様生存シグナル伝達受容体	CLL、NHL	脾臓、脂肪細胞
CD30	TNFRメンバー、NF-κBを含む細胞の成長および生存に及ぼす多指向性効果	NHL、TCL、HL	静止期CD8T細胞、活性化型B細胞およびTh2細胞
ルイス ^x	(CD174) 2つのフコース基を有する膜オリゴ糖	AML、MM	初期骨髄前駆細胞
CD33	骨髄単球系統の接着分子として役立つシアル酸結合Ig型レクチン	AML	造血前駆細胞、骨髄単球前駆細胞、単球
CD123	IL-3受容体のα鎖	AML	BM骨髄前駆細胞、DC、B細胞、マスト細胞、単球、マクロファージ、巨核芽球、内皮細胞
NRG2D-L	MHC-1分子に対する類似性を有する、NK細胞およびT細胞活性化受容体NKGD1に対するリガンド、炎症中に上方調節される	AML、MM	消化管上皮、内皮細胞および線維芽細胞

30

40

固形腫瘍	CD138	シンデカン1、細胞表面ヘパ ランスルファートプロテオグ リカン、ECM受容体	MM	前駆体およびブラズ マB細胞、上皮
	BCMA	TNFRメンバーは、増殖シ グナル伝達に關与する、BA FFおよびAPRILに結合 する。	MM	B細胞
	GD2	ジシアロガングリオシド	NB、肉腫、固形腫 瘍	皮膚、ニューロン
	FR-α	GPI結合型葉酸受容体、選 元葉酸補因子の取り込みに 機能する	卵巣癌	腎臓における頂端 面、肺、甲状腺、腎 臓、および乳房の上 皮
	L1-CAM	CD171、Igスーパーフ ァミリーの神経細胞接着分子	NB	中枢神経系、交感神 経節、副腎髄質
	Erbb2	HER2、受容体型チロシン ータンパク質キナーゼのEG FRファミリーのメンバー	脳、中枢神経系、神 経膠腫、GBM、頭 頸部、固形腫瘍	消化管、呼吸器、生 殖器上皮および尿路 上皮、皮膚、乳房な らびに胎盤、造血細 胞
	EGFRv11	生存促進シグナルを絶えず送 達する切詰型細胞外ドメイン をコードする増幅EGFR遺 伝子においてインフレーム欠 失したスプライス変異体	脳、中枢神経系、神 経膠腫、GBM	なし
	VEGFR-2	IgスーパーファミリーのI I型膜貫通キナーゼ受容 体、血管内皮機能を調節する	固形腫瘍	血管内皮およびリン パ管内皮
	IL-13Ra2	2つのIL-13受容体のう ちの1つのα鎖	脳、中枢神経系、神 経膠腫、GBM	星状細胞、脳、H& N組織
	FAP	細胞表面セリンプロテアーゼ	中皮腫	慢性炎症、創傷治 癒、組織リモデリン グにおける線維芽細 胞
メソセリン	機能未知の40kDa細胞表 面糖タンパク質	中皮腫、膵臓、卵巣	腹膜、胸膜、および 心臓中皮表面	

10

20

C-MET	肝細胞成長因子受容体 (HG FR)、ジスルフィド結合型 α-βヘテロ二量体受容体チ ロシンキナーゼ	TNBC	肝臓、消化管、甲状 腺、腎臓、脳
PSMA	N-アセチル化アルファ結合 型酸性ジペプチダーゼと葉酸 加水分解酵素活性とを有する II型膜糖タンパク質	前立腺	正常前立腺および腸 管上皮の頂端面なら びに腎臓近位尿管細 管細胞
CEA	表面糖タンパク質、Igスー パーファミリーのメンバーお よび細胞接着分子のCEA関 連ファミリーの細胞接着分子 のメンバー	大腸、乳房、固形腫 瘍	頂部上皮表面：結 腸、胃、食道および 舌
EGFR	Erbb1、Her1、リガ ンド結合の際の細胞分化およ び増殖をシグナル伝達する受 容体チロシンキナーゼ	固形腫瘍	上皮起源、間葉起源 および神経起源の組 織

30

40

【表 6】

II. その他のCAR標的抗原

抗原	主な構造上/機能上の特色	悪性腫瘍	
血液学的悪性	CD38	膜貫通シグナル伝達および細胞接着に関与する表面環状ADPリボースヒドロラーゼ	CLL、NHL、MM
	CS1	細胞表面シグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAM)	MM
固形腫瘍	PSCA	Thy-1/Ly-6ファミリーのGPIアンカー型膜糖タンパク質	前立腺、膀胱、膵臓
	CD44v6	ヒアルロン酸受容体CD44のオルタナティブスプライス変異体6	頭頸部、肝臓、膵臓、胃、乳房、結腸、AML、NHL、MM
	CD44v7/8	ヒアルロン酸受容体CD44のオルタナティブスプライス変異体7/8	乳房、子宮頸部
	MUC1	糖タンパク質のムチンファミリーの高密度グリコシル化メンバー	結腸、肺、膵臓、乳房、卵巣、前立腺、腎臓、胃、頭頸部
	IL-11Ra	IL-11受容体のαサブユニット	結腸、胃、乳房、前立腺、骨肉腫
	EphA2	受容体チロシンキナーゼのEphファミリーのメンバーであるエリスロポエチン産生肝細胞癌A2 (EphA2) 受容体	神経膠腫、乳房、結腸、卵巣、前立腺、膵臓
	CAIX	膜貫通亜鉛メタロエンザイム	RCC、低酸素状態下にある腫瘍
	CSPG4	高分子量黒色腫関連抗原、細胞表面プロテオグリカン	黒色腫、TNBC、GBM、中皮腫、頭頸部骨肉腫

10

20

略語：ADP (アデノシン二リン酸)、ALL (急性リンパ芽球性白血病)、AML (急性骨髄性白血病)、APRIL (増殖誘導リガンド)、BAFF (TNFファミリーのB細胞活性化因子)、BCMA (B細胞成熟化抗原)、BCR (B細胞受容体)、BM (骨髄)、CAIX (炭酸脱水酵素)、CAR (キメラ抗原受容体)、CEA (癌胎児性抗原)、CLL (慢性リンパ性白血病)、CNS (中枢神経系)、CSPG4 (コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4)、DC (樹状細胞)、ECM (細胞外マトリックス)、EGFR (表皮成長因子受容体)、EGFRvIII (EGFRの変異体III)、EphA2 (エリスロポエチン産生肝細胞癌A2)、FAP (線維芽細胞活性化タンパク質)、FR- (葉酸受容体)、GBM (多形性膠芽腫)、GPI (糖ホスファチジルイノシール)、H&N (頭頸部)、HL (ホジキンリンパ腫)、Ig (免疫グロブリン)、L1-CAM (L1細胞接着分子)、MM (多発性骨髄腫)、NB (神経芽細胞腫)、NF-B (核因子 B)、NHL (非ホジキンリンパ腫)、NK (ナチュラルキラー)、NKGD2-L (NKGD2リガンド)、PBMc (末梢血単核球)、PC (形質細胞)、PLL (前リンパ球性白血病)、PSCA (前立腺幹細胞抗原)、PSMA (前立腺特異的膜抗原)、RCC (腎細胞癌)、ROR1 (受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1)、TCL (T細胞白血病/リンパ腫)、Th2 (Tヘルパー2)、TNBC (三重陰性乳癌)、TNFR (腫瘍壊死因子受容体)、VEGFR-2 (血管内皮成長因子2)。

30

40

参考文献

Abecasis, G.R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Gibbs, R.A., Hurles, M.E., and McVean, G.A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature 467, 1061-1073.

Abeyweera, T.P., Merino, E., and Huse, M. (2011). Inhibitory signaling blocks acti

50

- vating receptor clustering and induces cytoskeletal retraction in natural killer cells. *J. Cell Biol.* 192, 675-690.
- Auton, A., Abecasis, G.R., Altshuler, D.M., Durbin, R.M., Bentley, D.R., Chakravarti, A., Clark, A.G., Donnelly, P., Eichler, E.E., Flicek, P., et al. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature* 526, 68-74.
- Barbas, Carlos F., Dennis R. Burton, Jamie K. Scott, G.J.S. 2004. Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bausch-Fluck, D., Hofmann, A., Bock, T., Frei, A.P., Cerciello, F., Jacobs, A., Moest, H., Omasits, U., Gundry, R.L., Yoon, C., et al. (2015). A mass spectrometric-derived cell surface protein atlas. *PLoS One* 10.
- Bayle, J.H., Grimley, J.S., Stankunas, K., Gestwicki, J.E., Wandless, T.J., and Crabtree, G.R. (2006). Rapamycin analogs with differential binding specificity permit orthogonal control of protein activity. *Chem. Biol.* 13, 99-107.
- Bergbold, N., and Lemberg, M.K. (2013). Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2840-2848.
- Blankenstein, T., Leisegang, M., Uckert, W., and Schreiber, H. (2015). Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy. *Curr. Opin. Immunol.* 33, 112-119.
- Boczkowski, D., S. K. Nair, J.H. Nam, H. K. Lyerly, and E. Gilboa. 2000. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res* 60: 1028-34.
- Barratt, M.T., Sanchez, C.A., Prevo, Burrell, R.A., McGranahan, N., Bartek, J., and Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 501, 338-345.
- Van Buuren, M.M., Calis, J.J.A., and Schumacher, T.N.M. (2014). High sensitivity of cancer exome-based CD8 T cell neo-antigen identification. *Oncoimmunology* 3.
- Caescu, C.I., Jeschke, G.R., and Turk, B

- . E. (2009). Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem. J.* 424, 79-88.
- Carney, W.P., Petit, D., Hamer, P., Der, C.J., Finkel, T., Cooper, G.M., Lefebvre, M., Mobtaker, H., Delellis, R., and Tischler, A.S. (1986). Monoclonal antibody specific for an activated RAS protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 7485-7489. 10
- Cerami E, et al. The cbio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery.* 2012;2:401-404.
- Chao, G., W. L. Lau, B.J. Hackel, S. L. Szazinsky, S. M. Lippow, and K. D. Witttrup. 2006. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat. Protoc.* 1.
- Chess, A. (2012). Mechanisms and consequences of widespread random monoallelic expression. *Nat. Rev. Genet.* 13, 421-428. 20
- Chicaybam, L., and Bonamino, M.H. (2014). Abstract 2797: Construction and validation of an activating and inhibitory chimeric antigen receptor (CAR) system. *Cancer Res.* 74, 2797-2797.
- Chicaybam, L., and Bonamino, M.H. (2015). Abstract 3156: Construction and validation of an activating and inhibitory chimeric antigen receptor (CAR) system. *Cancer Res.* 75, 3156-3156. 30
- Consortium GT. Human genomics. The genotype-tissue expression (gtex) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science.* 2015;348:648-660.
- Da Cunha, J.P.C., Galante, P.A.F., De Souza, J.E., De Souza, R.F., Carvalho, P.M., Ohara, D.T., Moura, R.P., Oba-Shinja, S.M., Marie, S.K.N., Silva Jr., W.A., et al. (2009). Bioinformatics construction of the human cell surfaceome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16752-16757. 40
- Devilee, P., Cleton-Jansen, A.-M., and Cornelisse, C.J. (2001). Ever since Knudson. *Trends Genet.* 17, 569-573.
- Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B., and Brenner, M.K. (2014). Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol. R* 50

ev.257, 107-126.

Ebsen, H., Schroder, A., Kabelitz, D., and Janssen, O. (2013). Differential surface expression of ADAM10 and ADAM17 on human T lymphocytes and tumor cells. *PLoS One* 8, e76853.

Eriksson, M., Leitz, G., Fallman, E., Axner, O., Ryan, J.C., Nakamura, M.C., and Sentman, C.L. (1999). Inhibitory receptors alter natural killer cell interactions with target cells yet allow simultaneous killing of susceptible targets. *J. Exp. Med.* 190, 1005-1012.

Fedorov, V.D., Themeli, M., and Sadelain, M. (2013a). PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci. Transl. Med.* 5, 215ra172.

Fedorov, V.D., Themeli, M., and Sadelain, M. (2013b). PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. In *Science Translational Medicine*, (Affiliation: Center for Cell Engineering, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC), New York, NY 10065, United States; Affiliation: Tri-Institutional MSTP Program (MSKCC, Rockefeller University, Weill-Cornell Medical College), New York, NY 10065, Un), .

Feenstra, M., Veltkamp, M., van Kuik, J., Wiertsema, S., Slootweg, P., van den Tweel, J., de Weger, R., and Tilanus, M. (1999). HLA class I expression and chromosomal deletions at 6p and 15q in head and neck squamous cell carcinomas. *Tissue Antigens* 54, 235-245.

Gao J. et al, Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBio Portal. *Sci Signal.* 2013 2;6(269)

Gill, S., and June, C.H. (2015). Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol. Rev.* 263, 68-89.

Gordon, W.R., Zimmerman, B., He, L., Miles, L.J., Huang, J., Tiyanont, K., McArthur, D.G., Aster, J.C., Perrimon, N., Loparo, J.J., et al. (2015). Mechanical Allostery: Evidence for a Force Requirement

10

20

30

40

50

in the Proteolytic Activation of Notch. *Dev. Cell* 33, 729-736.

Graef, I.A., Holsinger, L.J., Diver, S., Schreiber, S.L., and Crabtree, G.R. (1997). Proximity and orientation underlie signaling by the non-receptor tyrosine kinase ZAP70. *EMBO J.* 16, 5618-5628.

Gross, G., and Eshhar, Z. (2016a). Therapeutic Potential of T-Cell Chimeric Antigen Receptors in Cancer Treatment: Counteracting Off-Tumor Toxicities for Safe CAR T-Cell Therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2016.56:59-83. 10

Gross, G., and Eshhar, Z. (2016b). Therapeutic Potential of T Cell Chimeric Antigen Receptors (CARs) in Cancer Treatment: Counteracting Off-Tumor Toxicities for Safe CAR T Cell Therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 59-83.

Gross, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10024-10028. 20

Haapasalo, A., and Kovacs, D.M. (2011). The many substrates of presenilin/ -secretase. *J. Alzheimers. Dis.* 25, 3-28.

Hanes, J., and A. Pluckthun. 1997. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 94. 30

Heemskerk, B., Kvistborg, P., and Schumacher, T.N.M. (2013). The cancer antigenome. *EMBO J.* 32, 194-203.

Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J. (2009). Identification of beta-secretase (BACE1) substrates using quantitative proteomics. *PLoS One* 4, e8477. 40

Huse, M., Catherine Milanowski, S., and Abeyweera, T.P. (2013). Building tolerance by dismantling synapses: inhibitory receptor signaling in natural killer cells. *Immunity. Rev.* 251, 143-153.

Jimenez, P., Canton, J., Collado, A., Cabrera, T., Serrano, A., Real, L.M., Garcia, A., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (1999). Chromosome loss is the most frequent mechanism contributing to HLA haplo 50

- type loss in human tumors. *Int. J. Cancer* 83, 91-97.
- Klebanoff, C.A., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2016). Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nat. Med.* 22, 26-36.
- Kloss, C.C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M., and Sadelain, M. (2013). Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 71-75. 10
- Knudson Jr., A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 820-823.
- Lanitis, E., Poussin, M., Klattenhoff, A.W., Song, D., Sandaltzopoulos, R., June, C.H., and Powell Jr, D.J. (2013). Chimeric antigen receptor T cells with dissociated signaling domains exhibit focused anti-tumor activity with reduced potential for toxicity. *Cancer Immunol. Res.* 1, 10.1158/2326-6066.CIR-13-0008. 20
- Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A., et al. (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499, 214-218. 30
- Lee, A., Rana, B.K., Schiffer, H.H., Schork, N.J., Brann, M.R., Insel, P.A., and Weiner, D.M. (2003). Distribution analysis of nonsynonymous polymorphisms within the G-protein-coupled receptor gene family. *Genomics* 81, 245-248.
- Lek M, et al., Exome Aggregation C. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016; 536:285-291. 40
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Li, H., Yang, B., Xing, K., Yuan, N., Wang, B., Chen, Z., He, W., and Zhou, J. (2014). A preliminary study of the relationship between breast cancer metastasis and loss of heterozygosity by using exome sequencing. *Sci. Rep.* 4.
- Liberles, S.D., Diver, S.T., Austin, D.J. 50

- . , and Schreiber , S.L.(1997).Inducible gene expression and protein translocation using nontoxic ligands identified by a mammalian three-hybrid screen.Proc.Natl.Acad.Sci.94, 7825-7830.
- Lindblad-Toh, K., Tanenbaum, D.M., Daly, M.J., Winchester, E., Lui, W.-O., Villa-pakkam, A., Stanton, S.E., Larsson, C., Hudson, T.J., Johnson, B.E., et al.(2000).Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays.Nat.Biotechnol. 18, 1001-1005. 10
- Lo, K.C., Bailey, D., Burkhardt, T., Gardina, P., Turpaz, Y., and Cowell, J.K.(2008).Comprehensive analysis of loss of heterozygosity events in glioblastoma using the 100K SNP mapping arrays and comparison with copy number abnormalities defined by BAC array comparative genomic hybridization.Genes Chromosom.Cancer 47, 221-237. 20
- Long, E.O., Sik Kim, H., Liu, D., Peterson, M.E., and Rajagopalan, S.(2013).Controlling natural killer cell responses: Integration of signals for activation and inhibition.Annu. Rev.Immunol.31, 227-258.
- Maleno, I., Lopez-Nevot, M.A., Cabrera, T., Salinero, J., and Garrido, F.(2002).Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21.Cancer Immunol.Immunother.51, 389-396. 30
- Maleno, I., Cabrera, C.M., Cabrera, T., Paco, L., Lopez-Nevot, M.A., Collado, A., Ferron, A., and Garrido, F.(2004).Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21.Immunogenetics 56, 244-253. 40
- Maleno, I., Romero, J.M., Cabrera, T., Paco, L., Aptsiauri, N., Cozar, J.M., Tallada, M., Lopez-Nevot, M.A., and Garrido, F.(2006).LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas.Immunogenetics 58, 503-510. 50

- Maleno, I., Aptsiauri, N., Cabrera, T., Gallego, A., Paschen, A., Lopez-Nevot, M. A., and Garrido, F. (2011). Frequent loss of heterozygosity in the 2-microglobulin region of chromosome 15 in primary human tumors. *Immunogenetics* 63, 65-71.
- McGranahan, N., Burrell, R. A., Endesfelder, D., Novelli, M. R., and Swanton, C. (2012). Cancer chromosomal instability: The therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Rep.* 13, 528-538. 10
- Morsut, L., Roybal, K. T., Xiong, X., Gordley, R. M., Coyle, S. M., Thomson, M., and Lim, W. A. (2016). Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell* 164, 780-791.
- Ng PC, Henikoff S. Sift: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research*. 2003;31:3812-3814. 20
- Nirschl, C. J., and Drake, C. G. (2013). Molecular pathways: Coexpression of immune checkpoint molecules: Signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 19, 4917-4924.
- O'Keefe, C., McDevitt, M. A., and Maciejewski, J. P. (2010). Copy neutral loss of heterozygosity: A novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood* 115, 2731-2739. 30
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.-L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., et al. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 64, 6892-6899.
- Overwijk, W. W., Wang, E., Marincola, F. M., Rammensee, H. G., and Restifo, N. P. (2013). Mining the mutanome: developing highly personalized Immunotherapies based on mutational analysis of tumors. *J. Immunother. Cancer* 1, 11. 40
- Rana, B. K., Shiina, T., and Insel, P. A. (2001). Genetic variations and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 593-624.
- Rawson, R. B. (2013). The site-2 protease. *B* 50

- iochim. Biophys. Acta 1828, 2801-2807.
- Rosenberg, S.A. (2014). Finding suitable targets is the major obstacle to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 21, 45-47.
- Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348, 62-68.
- Roybal, K.T., Rupp, L.J., Morsut, L., Walker, W.J., McNally, K.A., Park, J.S., and Lim, W.A. (2016a). Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell*.
- Roybal, K.T., Rupp, L.J., Morsut, L., Walker, W.J., McNally, K.A., Park, J.S., and Lim, W.A. (2016b). Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell* 164, 770-779.
- Sathirapongsasuti, J.F., Lee, H., Horst, B.A.J., Brunner, G., Cochran, A.J., Binder, S., Quackenbush, J., and Nelson, S.F. (2011). Exome sequencing-based copy-number variation and loss of heterozygosity detection: ExomeCNV. *Bioinformatics* 27, 2648-2654.
- Savage, P.A. (2014). Tumor antigenicity revealed. *Trends Immunol.* 35, 47-48.
- Savova, V., Chun, S., Sohail, M., McCole, R.B., Witwicki, R., Gai, L., Lenz, T.L., Wu, C.-T., Sunyaev, S.R., and Gimelbrant, A.A. (2016). Genes with monoallelic expression contribute disproportionately to genetic diversity in humans. *Nat. Genet.* 48, 231-237.
- Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* (80-.). 348, 69-74.
- Sela-Culang, I., Y. Ofran, and B. Peters. 2015a. Antibody specific epitope prediction - Emergence of a new paradigm. *Curr. Opin. Virol.* 11.
- Sela-Culang, I., S. Ashkenazi, B. Peters, and Y. Ofran. 2015b. PEASE: Predicting B-cell epitopes utilizing antibody sequence. *Bioinformatics* 31.
- Skora, A.D., Douglass, J., Hwang, M.S., Tam, A.J., Blosser, R.L., Gabelli, S.B., Cao, J., Diaz, L.A., Papadopoulos, N.,

- Kinzler, K.W., et al. (2015). Generation of MANA bodies specific to HLA-restricted epitopes encoded by somatically mutated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 9967-9972.
- Stark, M., and Hayward, N. (2007). Genome-wide loss of heterozygosity and copy number analysis in melanoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res.* 67, 2632-2642. 10
- Stark, S.E., and Caton, A.J. (1991). Antibodies that are specific for a single amino acid interchange in a protein epitope use structurally distinct variable regions. *J. Exp. Med.* 174, 613-624.
- Teo, S.M., Pawitan, Y., Ku, C.S., Chia, K.S., and Salim, A. (2012). Statistical challenges associated with detecting copy number variations with next-generation sequencing. *Bioinformatics* 28, 2711-2718. 20
- Thul PJ, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science*. 2017; 356.
- Treanor, B., Lanigan, P.M.P., Kumar, S., Dunsby, C., Munro, I., Auksorius, E., Cullley, F.J., Purbhoo, M.A., Phillips, D., Neil, M.A.A., et al. (2006). Microclusters of inhibitory killer immunoglobulin-like receptor signaling at natural killer cell immunological synapses. *J. Cell Biol.* 174, 153-161. 30
- Uhlen M, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015; 347: 1260419.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y., and White, R. (1989). Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* (80-.). 244, 207-211.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz Jr., L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* (80-.). 340, 1546-1558. 40
- Voss, M., Schroder, B., and Fluhrer, R. (2013). Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2828-2839.
- Vyas, Y.M., Mehta, K.M., Morgan, M., Maniar, H., Butros, L., Jung, S., Burkhardt, J.K., and Dupont, B. (2001). Spatial organization of signal transduction molecul 50

es in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J. Immunol.* 167, 4358-4367.

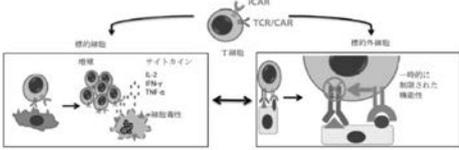
Wang, Z.C., Lin, M., Wei, L.-J., Li, C., Miron, A., Lodeiro, G., Harris, L., Ramaswamy, S., Tanenbaum, D.M., Meyerson, M., et al. (2004). Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. *Cancer Res.* 64, 64-71. 10

Wilkie, S., Van Schalkwyk, M.C.I., Hobbs, S., Davies, D.M., Van, D.S., Pereira, A.C.P., Burbidge, S.E., Box, C., Eccles, S.A., and Maher, J. (2012). Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J. Clin. Immunol.* 32, 1059-1070.

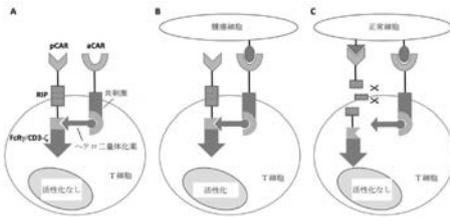
Wu, C.-Y., Roybal, K.T., Puchner, E.M., Onuffer, J., and Lim, W.A. (2015). Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science* (80-.). 350, aab4077. 20

Yeung, J.T., Hamilton, R.L., Ohnishi, K., Ikeura, M., Potter, D.M., Nikiiforova, M.N., Ferrone, S., Jakacki, R.I., Pollack, I.F., and Okada, H. (2013). LOH in the HLA class I region at 6p21 is associated with shorter survival in newly diagnosed adult glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 19, 1816-1826. 30

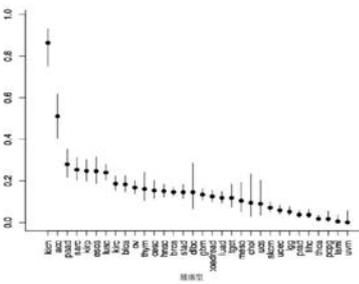
【 図 1 】



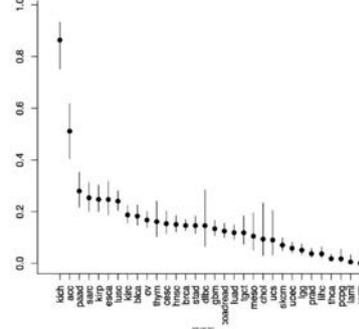
【 図 2 】



【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IL2017/051102
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC (2017.01) C12N 5/10, A61P 35/00, A61K 35/17, C07K 14/705 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC (2017.01) C12N, A61K, C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases consulted: THOMSON INNOVATION, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, Google Scholar, DWPI Search terms used: Inhibitory chimeric antigen receptor, loss of heterozygosity, HLA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Fedorov, Victor D., Maria Themeli, and Michel Sadelain. "PD-1-and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses." <i>Science translational medicine</i> 5.215 (2013): 215ra172-215ra172. doi:10.1126/scitranslmed.3006597 Retrieved from the internet: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4238416/> 11 Dec 2013 (2013/12/11) the whole document	1-42
X	WO 2015142314 A1 SLOAN KETTERING INST CANCER[US] 24 Sep 2015 (2015/09/24) examples, claims	1-42
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 Jan 2018		Date of mailing of the international search report 14 Jan 2018
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Facsimile No. 972-2-5651616		Authorized officer HOROWITZ Anat Telephone No. 972-2-5651689

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2017/051102

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
WO 2015142314 A1	24 Sep 2015	WO 2015142314 A1	24 Sep 2015
		WO 2015142314 A8	29 Oct 2015
		AU 2014386824 A1	22 Oct 2015
		CA 2904265 A1	15 Sep 2014
		CN 105246504 A	13 Jan 2016
		EP 2968492 A1	20 Jan 2016
		HK 1220387 A1	05 May 2017
		JP 2017503472 A	02 Feb 2017
		KR 20150128997 A	18 Nov 2015
		MX 2015013104 A	16 Jun 2016
		PH 12015502271 A1	01 Feb 2016
		RU 2015143207 A	20 Apr 2017
		SG 11201507688V A	29 Oct 2015
		US 2015376296 A1	31 Dec 2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869	Z
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	

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

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72)発明者 グロス, ギデオ

イスラエル国, モシャブ アルマゴー 1 2 9 2 2 0 0, エム・ピー・コラジム

(72)発明者 バイマン, メラブ

イスラエル国, ネス ジオナ 7 4 2 0 8 2 7, ハオゲン ストリート 3

(72)発明者 ギブソン, ウィリアム

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 1 6, ボストン, フェアフィールド ストリート
3 4 アpartment ナンバー 1

F ターム(参考) 4B063 QA13 QQ03 QQ08 QQ53 QR08 QR58 QR62 QS25 QS36 QX02
4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA13 MA21 MA22 MA23 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59
MA60 MA66 NA14 ZB262
4C085 AA13 AA14 BB11 CC23 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04
GG05 GG06 GG08
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 CA12 NA14 ZB26