

(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2015-513399

(P2015-513399A)

(43) 公表日 **平成27年5月14日(2015.5.14)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁)

(21) 出願番号	特願2014-558871 (P2014-558871)	(71) 出願人	500429103 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー シティ オブ ペンシルバニア アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191 04-6283, フィラデルフィア, チェスナット ストリート 3160, スイート 200
(86) (22) 出願日	平成25年2月22日 (2013.2.22)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成26年10月3日 (2014.10.3)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/027337	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02013/126712	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成25年8月29日 (2013.8.29)		
(31) 優先権主張番号	61/601, 890		
(32) 優先日	平成24年2月22日 (2012.2.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療のために有用なT細胞の存続的集団を作製するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3シグナル伝達ドメインを有するキメラ抗原受容体 (CAR) を含む遺伝的に改変されたT細胞を作製するための組成物および方法を提供し、ここで、該T細胞は培養下で長期にわたる指数的増大を呈し、これはリガンド非依存的であり、かつ外因性サイトカインやフィーダー細胞の添加にも依存しない。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする単離された核酸配列であって、該CARが抗原結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3シグナル伝達ドメインを含み、かつ、さらに、該CARがT細胞に形質導入された場合に、該CARが、該形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、該形質導入T細胞の平均細胞体積 (MCV) の増加、該形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、該形質導入T細胞の増殖の増加、該形質導入T細胞の子孫の数の増加、エフェクターサイトカイン分泌の増加、グランザイムの継続的発現、インビトロでの該形質導入T細胞集団の存続性の増加、またはインビボでの該形質導入T細胞集団の存続性の増加のうち少なくとも1つに寄与する、前記単離された核酸配列。 10

【請求項 2】

前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインである、請求項1記載の単離された核酸配列。

【請求項 3】

前記抗原結合ドメインが抗cMet結合ドメインであり、前記ヒンジドメインがIgG4であり、前記膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインであり、かつ前記共刺激シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域である、請求項1記載の単離された核酸配列。

【請求項 4】

前記CARがSEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む、請求項3記載の単離された核酸配列。 20

【請求項 5】

前記抗原結合ドメインが抗メソテリン結合ドメインであり、前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインであり、前記膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインであり、かつ前記共刺激シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域である、請求項1記載の単離された核酸配列。

【請求項 6】

前記CARがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む、請求項5記載の単離された核酸配列。

【請求項 7】

前記抗原結合ドメインが抗CD19結合ドメインであり、前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインであり、前記膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインであり、かつ前記共刺激シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域である、請求項1記載の単離された核酸配列。 30

【請求項 8】

前記CARがSEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む、請求項7記載の単離された核酸配列。

【請求項 9】

前記抗原結合ドメインが抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項1記載の単離された核酸配列。

【請求項 10】

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸配列を含むT細胞であって、該CARが抗原結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3シグナル伝達ドメインを含み、かつ、該CARがT細胞に形質導入された場合に、該CARが、該形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、該形質導入T細胞の平均細胞体積 (MCV) の増加、該形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、該形質導入T細胞の増殖の増加、エフェクターサイトカイン分泌の増加、グランザイムの発現の増加、該形質導入T細胞の子孫の数の増加、インビトロでの該形質導入T細胞集団の存続性の増加、またはインビボでの該形質導入T細胞集団の存続性の増加のうち少なくとも1つに寄与する、前記T細胞。 40

【請求項 11】

前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインである、請求項10記載のT細胞。

【請求項 12】

前記抗原結合ドメインが抗cMet結合ドメインであり、前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインであり、前記膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインであり、かつ前記共刺激シグ 50

ナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域である、請求項10記載のT細胞。

【請求項 1 3】

前記CARがSEQ ID NO：1のアミノ酸配列を含む、請求項12記載のT細胞。

【請求項 1 4】

前記抗原結合ドメインが抗メソテリン結合ドメインであり、前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインであり、前記膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインであり、かつ前記共刺激シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域である、請求項10記載のT細胞。

【請求項 1 5】

前記CARがSEQ ID NO：2のアミノ酸配列を含む、請求項14記載のT細胞。

【請求項 1 6】

前記抗原結合ドメインが抗CD19結合ドメインであり、前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインであり、前記膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインであり、かつ前記共刺激シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域である、請求項10記載のT細胞。

【請求項 1 7】

前記CARがSEQ ID NO：3のアミノ酸配列を含む、請求項16記載のT細胞。

【請求項 1 8】

前記抗原結合ドメインが抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項10記載のT細胞。

【請求項 1 9】

前記抗原結合ドメインがその対応する抗原と結合した場合に抗腫瘍免疫を呈する、請求項10記載のT細胞。

【請求項 2 0】

キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含むベクターであって、該CARが抗原結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3シグナル伝達ドメインを含み、かつ、該CARがT細胞に形質導入された場合に、該CARが、該形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、該形質導入T細胞の平均細胞体積（MCV）の増加、該形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、該形質導入T細胞の増殖の増加、該形質導入T細胞の子孫の数の増加、インビトロでの該形質導入T細胞集団の存続性の増加、またはインビボでの該形質導入T細胞集団の存続性の増加のうち少なくとも1つに寄与する、前記ベクター。

【請求項 2 1】

前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインである、請求項20記載のベクター。

【請求項 2 2】

前記抗原結合ドメインが抗cMet結合ドメインであり、前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインであり、前記膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインであり、かつ前記共刺激シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域である、請求項20記載のベクター。

【請求項 2 3】

前記CARがSEQ ID NO：1のアミノ酸配列を含む、請求項22記載のベクター。

【請求項 2 4】

前記抗原結合ドメインが抗メソテリン結合ドメインであり、前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインであり、前記膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインであり、かつ前記共刺激シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域である、請求項20記載のベクター。

【請求項 2 5】

前記CARがSEQ ID NO：2のアミノ酸配列を含む、請求項24記載のベクター。

【請求項 2 6】

前記抗原結合ドメインが抗CD19結合ドメインであり、前記ヒンジドメインがIgG4ヒンジドメインであり、前記膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインであり、かつ前記共刺激シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域である、請求項20記載のベクター。

【請求項 2 7】

前記CARがSEQ ID NO：3のアミノ酸配列を含む、請求項26記載のベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

前記抗原結合ドメインが抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項20記載のベクター。

【請求項 29】

遺伝的に改変されたT細胞の存続的集団であって、該T細胞がキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸配列を含み、該CARが抗原結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3 シグナル伝達ドメインを含み、かつ、該CARがT細胞に形質導入された場合に、該CARが、該形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、該形質導入T細胞の平均細胞体積 (MCV) の増加、該形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、該形質導入T細胞の増殖の増加、該形質導入T細胞の子孫の数の増加、インビトロでの該形質導入T細胞集団の存続性の増加、またはインビボでの該形質導入T細胞集団の存続性の増加のうち少なくとも1つに寄与する、前記遺伝的に改変されたT細胞の存続的集団。

10

【請求項 30】

前記遺伝的に改変されたT細胞が、前記抗原結合ドメインがその対応する抗原と結合した場合に抗腫瘍免疫を呈する、請求項29記載の遺伝的に改変されたT細胞の存続的集団。

【請求項 31】

前記T細胞が、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムB、パーフォリン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つのサイトカインを含むサイトカインシグネチャーを呈する、請求項29記載の遺伝的に改変されたT細胞の存続的集団。

20

【請求項 32】

前記T細胞が外因性サイトカインおよびフィーダー細胞の非存在下で増殖する、請求項29記載の遺伝的に改変されたT細胞の存続的集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年2月22日に提出された米国仮出願第61/601,890号の優先権を主張し、その内容は全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

30

【0002】

発明の背景

キメラ抗原受容体 (CAR) を発現させるための遺伝的改変による腫瘍特異的Tリンパ球の作製は、強力な抗腫瘍効果を生じさせる合成生物学の一形態として勢いを増している (Jena et al., 2010, Blood. 116:1035-1044 (非特許文献1); Bonini et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant 17(1 Suppl):S15-20 (非特許文献2); Restifo et al., 2012, Nat Rev Immunol 12:269-281 (非特許文献3); Kohn et al., 2011, Mol Ther 19:432-438 (非特許文献4); Savello et al., 2011, J Clin Invest 121:1822-1825 (非特許文献5); Ertl et al., 2011, Cancer Res 71:3175-3181 (非特許文献6))。抗体フラグメントによって特異性が付与されるため、CAR T細胞はMHC拘束性ではなく、それ故に、MHCマ

40

【0003】

CD19特異的CAR⁺ T細胞を投与された患者からの臨床データにより、輸注されたT細胞の活発なインビボ増殖が、腫瘍の免疫アブレーション (immunoablation) のための鍵となる要件であることが指し示されている (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-733 (非特許文献7); Kalos et al., 2011, Sci Transl Med 3:95ra73 (非特許文献8))。このため、CD28、OX40および4-1BBといった補助刺激分子のシグナル伝達エンドドメインをCARに組み入れるための取り組みが行われてきた。1998年に、CD28共刺激シグナルとT細胞受容体/CD3 鎖 (CO3) 活性化シグナルとを同時送達しうるキメラ単鎖 (scFv) 受容体を発現する遺伝子操作されたT細胞の使用により、CAR T細胞の機能および増殖が増すこ

50

とが初めて報告された (Krause et al., 1998, J Exp Med 188:619-626 (非特許文献9) ; Finney et al., 1998, Journal of Immunology 161:2791-2797 (非特許文献10))。数多くの研究室が、CD28シグナル伝達ドメインの組み入れによってCARの機能がCD3 またはFc R1と比較して強化されることを前臨床試験で確かめている (Geiger et al., 2001, Blood 98:2364-2371 (非特許文献11) ; Arakawa et al., 2002, Anticancer Research 4285-4289 (非特許文献12) ; Haynes et al., 2002, J Immunol 169(10):5780-6 (非特許文献13) ; Maher et al., 2002, Nature Biotechnology 20:70-75 (非特許文献14) ; Finney et al., 2004, J Immunol 172:104-113 (非特許文献15) ; Gyobu et al., 2004, Cancer Res 64:1490-1495 (非特許文献16) ; Moeller et al., 2004, Cancer Gene Ther 11:371-379 (非特許文献17) ; Teng et al., 2004, Hum Gene Ther 15:699-708 (非特許文献18) ; Friedmann-Morvinski et al., 2005, Blood 105:3087-3093 (非特許文献19) ; Pule et al., 2005, Molecular Therapy 12:933-941 (非特許文献20) ; Westwood et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102:19051-19056 (非特許文献21) ; Willemsen et al., 2005, J Immunol 174:7853-7858 (非特許文献22) ; Kowolik et al., 2006, Cancer Res 66:10995-11004 (非特許文献23) ; Loskog et al., 2006, Leukemia 20:1819-1828 (非特許文献24) ; Shibaguchi et al., 2006, Anticancer Res 26:4067-4072 (非特許文献25) ; Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13:5426-5435 (非特許文献26) ; Teng et al., 2006, Human Gene Therapy 17:1134-1143 (非特許文献27))。B細胞悪性腫瘍の患者における試験において、CD28:CD3 CARは、CD3 シグナル伝達ドメインのみを有するCARと比較して、生存性を改善した (非特許文献5)。

10

20

【0004】

しかし、当技術分野にはまだ、高度なT細胞増殖を可能にするCARの構築をさらに改善する必要性が依然として存在する。本発明は、当技術分野におけるこの必要性を満たす。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Jena et al., 2010, Blood. 116:1035-1044

【非特許文献2】Bonini et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant 17(1 Suppl):S15-20

【非特許文献3】Restifo et al., 2012, Nat Rev Immunol 12:269-281

30

【非特許文献4】Kohn et al., 2011, Mol Ther 19:432-438

【非特許文献5】Savoldo et al., 2011, J Clin Invest 121:1822-1825

【非特許文献6】Ertl et al., 2011, Cancer Res 71:3175-3181

【非特許文献7】Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-733

【非特許文献8】Kalos et al., 2011, Sci Transl Med 3:95ra73

【非特許文献9】Krause et al., 1998, J Exp Med 188:619-626

【非特許文献10】Finney et al., 1998, Journal of Immunology 161:2791-2797

【非特許文献11】Geiger et al., 2001, Blood 98:2364-2371

【非特許文献12】Arakawa et al., 2002, Anticancer Research 4285-4289

【非特許文献13】Haynes et al., 2002, J Immunol 169(10):5780-6

40

【非特許文献14】Maher et al., 2002, Nature Biotechnology 20:70-75

【非特許文献15】Finney et al., 2004, J Immunol 172:104-113

【非特許文献16】Gyobu et al., 2004, Cancer Res 64:1490-1495

【非特許文献17】Moeller et al., 2004, Cancer Gene Ther 11:371-379

【非特許文献18】Teng et al., 2004, Hum Gene Ther 15:699-708

【非特許文献19】Friedmann-Morvinski et al., 2005, Blood 105:3087-3093

【非特許文献20】Pule et al., 2005, Molecular Therapy 12:933-941

【非特許文献21】Westwood et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102:19051-19056

【非特許文献22】Willemsen et al., 2005, J Immunol 174:7853-7858

【非特許文献23】Kowolik et al., 2006, Cancer Res 66:10995-11004

50

【非特許文献 2 4】 Loskog et al., 2006, Leukemia 20:1819-1828

【非特許文献 2 5】 Shibaguchi et al., 2006, Anticancer Res 26:4067-4072

【非特許文献 2 6】 Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13:5426-5435

【非特許文献 2 7】 Teng et al., 2006, Human Gene Therapy 17:1134-1143

【発明の概要】

【0006】

本発明は、キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする単離された核酸配列であって、CARが抗原結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、および CD3 シグナル伝達ドメインを含み、かつ、さらに、CARがT細胞に形質導入された場合に、CARが、形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、形質導入T細胞の平均細胞体積 (MCV) の増加、形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、形質導入T細胞の増殖の増加、形質導入T細胞の子孫の数の増加、エフェクターサイトカイン分泌の増加、グランザイムの継続的発現、インビトロでの形質導入T細胞集団の存続性の増加、またはインビボでの形質導入T細胞集団の存続性の増加のうち少なくとも1つに寄与する、単離された核酸配列を提供する。

10

【0007】

1つの態様において、ヒンジドメインはIgG4ヒンジドメインである。

【0008】

1つの態様において、抗原結合ドメインは抗cMet結合ドメインであり、ヒンジドメインはIgG4であり、膜貫通ドメインはCD28膜貫通ドメインであり、かつ共刺激シグナル伝達領域はCD28シグナル伝達領域である。1つの態様において、CARはSEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む。

20

【0009】

1つの態様において、抗原結合ドメインは抗メソテリン結合ドメインであり、ヒンジドメインはIgG4ヒンジドメインであり、膜貫通ドメインはCD28膜貫通ドメインであり、かつ共刺激シグナル伝達領域はCD28シグナル伝達領域である。1つの態様において、CARはSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む。

【0010】

1つの態様において、抗原結合ドメインは抗CD19結合ドメインであり、ヒンジドメインはIgG4ヒンジドメインであり、膜貫通ドメインはCD28膜貫通ドメインであり、かつ共刺激シグナル伝達領域はCD28シグナル伝達領域である。1つの態様において、CARはSEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む。

30

【0011】

1つの態様において、抗原結合ドメインは抗体またはその抗原結合フラグメントである。

【0012】

本発明はまた、キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸配列を含むT細胞であって、CARが抗原結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3 シグナル伝達ドメインを含み、かつ、CARがT細胞に形質導入された場合に、CARが、形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、形質導入T細胞の平均細胞体積 (MCV) の増加、形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、形質導入T細胞の増殖の増加、エフェクターサイトカイン分泌の増加、グランザイムの発現の増加、形質導入T細胞の子孫の数の増加、インビトロでの形質導入T細胞集団の存続性の増加、またはインビボでの形質導入T細胞集団の存続性の増加のうち少なくとも1つに寄与する、T細胞も提供する。

40

【0013】

本発明はまた、キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸配列を含むベクターであって、CARが抗原結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3 シグナル伝達ドメインを含み、かつ、CARがT細胞に形質導入された場合に、CARが、形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、形質導入T細胞の平均細胞体積 (MCV) の増加、形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、形質導入T細胞の増殖の増加、形

50

質導入T細胞の子孫の数の増加、インビトロでの形質導入T細胞集団の存続性の増加、またはインビボでの形質導入T細胞集団の存続性の増加のうち少なくとも1つに寄与する、ベクターも提供する。

【0014】

本発明はまた、遺伝的に改変されたT細胞の存続的集団であって、T細胞がキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸配列を含み、CARが抗原結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達領域、およびCD3 シグナル伝達ドメインを含み、かつ、CARがT細胞に形質導入された場合に、CARが、形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、形質導入T細胞の平均細胞体積 (MCV) の増加、形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、形質導入T細胞の増殖の増加、形質導入T細胞の子孫の数の増加、インビトロでの形質導入T細胞集団の存続性の増加、またはインビボでの形質導入T細胞集団の存続性の増加のうち少なくとも1つに寄与する、遺伝的に改変されたT細胞の存続的集団も提供する。

10

【0015】

1つの態様において、遺伝的に改変されたT細胞は、抗原結合ドメインがその対応する抗原と結合した場合に抗腫瘍免疫を呈する。

【0016】

1つの態様において、遺伝的に改変されたT細胞の存続的集団は、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムB、パーフォリン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つのサイトカインを含むサイトカインシグネチャーを呈する。

20

【0017】

1つの態様において、T細胞は外因性サイトカインおよびフィーダー細胞の非存在下で増殖する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

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

【図1】図1A~1Bで構成される図1は、キメラ抗原受容体構築物および相対的発現レベルを描写している一連の画像である。図1Aは、さまざまなscFv、ヒンジ領域、膜貫通ドメインおよびサイトゾルドメインを描写しているCAR構築物の代表を示している。CARはすべて、CD28およびCD3 細胞内シグナル伝達ドメインを含有するが、CD28細胞内ドメインではなく4-1BBを含有するCART 19 CARは例外である。図1Bは、レンチウイルス形質導入から6日後に (図1A) 中の各CAR構築物の表面発現を分析して、相対的発現レベルを定量したことを明示している。

30

【図2】図2A~2Dで構成される図2は、構成性でリガンド非依存的なCD4⁺ CAR T細胞増殖の誘導を描写している一連の画像である。図2Aは、CD3 / CD28でコーティングした磁性ビーズによる刺激および表記のCAR構築物によるレンチウイルス形質導入から5日後のヒトCD4⁺ T細胞のインビトロ増殖を示している (左のパネル)。c-Met IgG4 CARおよびいずれのSS1 CARとも、60日間にわたる構成性増殖を呈する。増大中のいずれの時点にも培地にサイトカインは添加しなかった。構成性増殖を伴うCAR T細胞は、より大きな平均細胞体積も維持する (右のパネル)。結果は、n > 10の正常ヒトドナーを表す。図2Bおよび2Cは、CD4⁺およびCD8⁺ T細胞を、外因性IL-2を伴うかまたは伴わずに (図2A) と同じように刺激したことを明示している。図2Dは、3人の健常ドナーからCD4⁺ T細胞を単離し、刺激した上で、c-Met IgG4、CD19⁻ CD8⁻、およびCART19 CAR構築物をコードするレンチウイルスによる形質導入を行うかまたはモック形質導入を行い、新鮮な培地を添加して、外因性サイトカインは添加せずに培養したことを明示している。エラーバーは標準偏差を表している。

40

【図3】図3Aおよび3Bで構成される図3は、持続的T細胞増殖を伴うCAR T細胞が構成性の

50

サイトカイン分泌を有することを明示している一連の画像である。図3Aは、CD3 / CD28 刺激および増大の後の、さまざまなCAR構築物によるサイトカイン産生の連続測定値を描写している。記録した各時点で、c-Met IgG4、CD19 CD8⁻ CARを形質導入したCD4⁺ T細胞、および非形質導入CD4⁺ T細胞を培養物から収集し、洗浄した上で、 1×10^6 個 / mLで再びプレATINGした。細胞を培養下に24時間保ち、その時点で各培養物から上清を収集した。上清をluminexアッセイによって分析して、値を刺激前の細胞（ベースライン）からの変化倍数の対数値（ $\log(10)$ ）としてプロットした。各分析物に関するベースライン値（pg / ml）は以下の通りであった：IFN- γ : 3.66pg / mL ; TNF- α : 0.29pg / mL ; IL-2 : 0.51pg / mL ; GM-CSF : 4.58pg / mL ; IL13 : 4.79pg / mL ; IL-10 : 1.29pg / mL。図3Bは、成長表現型（growth phenotype）を提示するCARからの上清が、ナイーブ非刺激T細胞の活性化を誘導することを示している。培養第56日に採集したc-Met IgG4 CAR T細胞培養物からの培養上清を、非刺激ナイーブCD4⁺ T細胞に対して、出発培地に比してc-Met IgG4上清が12.5%、25%または50%の最終濃度となるように添加した。対照として、100IUのIL-2を伴うかまたは伴わない培地も含め、さらに第0日に初回刺激および第12日に再刺激を行って培養下に保ったCD3 / CD28ビーズ刺激細胞も含めた。本明細書の他所に記載したように、MCVを決定し、対照群における上清濃度およびIL-2濃度を維持するために細胞培地を2日毎に添加した。

【図4】図4Aおよび4Bで構成される図4は、構成性の成長表現型を有するCARが独特な遺伝子シグネチャーを呈することを明示している一連の画像である。図4Aは、サイトカイン、パーフォリンおよびグランザイムの発現を描写している。c-Met IgG4、CD19 CD8⁻ CAR T 19 CARおよび非形質導入T細胞のサイトカイン発現をベースラインでならびに培養第6日、22日および24日に比較したマイクロアレイ分析；第24日にはc-Met IgG4培養物のみを分析したが、これは他の培養物は細胞死が原因で終了したためである。外因性サイトカインは培地に添加しなかった。標準化絶対 \log_2 遺伝子発現強度を、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムBおよびパーフォリンに関してプロットしている。図4Bは、構成性の成長表現型を有するCAR T細胞が特異な転写因子を呈することを明示している。T細胞の極性化、成長および生存のために重要な遺伝子：T-bet、Eomes、GATA-3、RORc、FoxP3、Bcl-xL、KLRG1、およびhTERTの発現。標準化絶対 $\log(2)$ 遺伝子発現強度をプロットしている。データは、刺激前ならびに第6日、11日および24日に分析した正常ドナーの三重反復試験を集計したものである；第24日にはc-Met IgG4培養物のみを分析したが、これは他の培養物は細胞死が原因で終了したためである。各ドットは、各時点におけるc-Met IgG4 CAR、CD19 CD8⁻ CARのいずれかを発現する単一のドナー、または非形質導入対照を表している。ボックスプロットは、上位75パーセントイルおよび下位25パーセントイルを中央値とともに表している。ひげは上位90パーセントイルおよび下位10パーセントイルを表している。第11日の時点でのANOVAによるc-Met IgG4 CARとCD19 CD8⁻ CAR（赤）との比較：T-bet（ $p = 0.888$ ）；Eomes（ $p = 0.003$ ）；GATA-3（ $p < 0.001$ ）；FoxP3（ $p = 0.122$ ）；RORc（ $p = 0.089$ ）；KLRG1（ $P = 0.076$ ）；hTERT（ $p = 0.405$ ）；およびBcl-xL（ $p < 0.001$ ）。

【図5】図5Aおよび5Bで構成される図5は、CAR T細胞の増殖表現型にAKT、NF-kBおよびMAPKシグナル伝達経路の構成性活性化が伴うことを明示している一連の画像である。図5Aは、培養第10日から第30日までの培養中のc-Met IgG4 CAR(+)T細胞の濃縮（enrichment）を提示している代表的なFACSヒストグラムである。図5Bは、刺激およびc-Met IgG4 CARまたはCD19 CD8⁻ CARによる形質導入を行ったCD4⁺ T細胞のPhosFlowプロットを描写している。第6日、10日および25日に細胞を固定し、透過処理を行った上で、PE抗Erk1 / 2（pT202 / pY204）、PE抗Akt（pS473）、PE抗NF-kB p65（pS529）およびPE抗S6（pS235 / pS236）を用いて染色した；CD19 CD8⁻ CARは第25日までは増殖を続けず、そのため、第6日および10日にのみ分析した。陽性対照は、固定前にPMA / イオノマイシンを用いて10分間刺激した各条件からの試料とし、一方、陰性対照細胞はPE結合IgG2b アイソタイプ対照を用いて染色した完全刺激T細胞とした。

【図6】図6A～6Cで構成される図6は、構成性増殖を伴うCAR T細胞のゲノムワイドマイク

10

20

30

40

50

ロアレイ分析による結果をまとめた一連の画像である。図6Aは、持続的c-Met IgG4 CARまたは古典的CD19 CD8 CARを発現する3人のドナーからのCD4+ T細胞、またはモック形質導入を行った細胞を、培養第0日から第24日まで、マイクロアレイ分析および階層的クラスタリングに供したことを明示している。クラスタリングは、平均連結法による標準化絶対log(2)遺伝子発現強度の中央値のユークリッド距離を用いて行った。プロットは、不偏全ゲノムクラスタリングに基づく。第11日の時点でのCD19 CD8 CAR T細胞および非形質導入細胞は、休止T細胞により類似したクラスターを形成するが、一方、第11日および第24日のc-Met IgG4 CAR T細胞は活性化したままであり、密にクラスターを形成する。図6Bは、構成性増殖を伴うCAR T細胞の別個の遺伝子発現シグネチャーを示している。3人のドナーのT細胞培養物からの第6日の遺伝子発現シグネチャーを、第11日および第24日の培養物と比較している。第6日のCAR T細胞は、モック形質導入を行ったT細胞と類似している。対照的に、第11日および第24日には、持続的c-Met IgG4細胞は、完全に活性化された第6日の表現型とは異なる独特なRNAシグネチャーを呈している。図6Cは、c-Met CARとCD19 CARとの間の遺伝子発現の差を示している。

【図7】図7A~7Cで構成される図7は、導入遺伝子の発現レベルが構成性のCAR成長表現型を伝達するのに十分であることを明示している一連の画像である。抗CD3+CD28刺激、および、表記のプロモーター下でCARを発現するc-METのレンチウイルス形質導入から5日後の、ヒトCD4+ T細胞のインビトロ増殖。CMV(1)およびCMV(2)は、同一のヒトドナーにおけるレンチウイルスベクター産生の複製物を表している。図7Aは、集団倍加を、CMVおよびEF-1の両者によって駆動されるc-MET CAR細胞に関して決定したことを明示している。ほぼ12日間の培養後に、CMV-c-MET CAR細胞は増殖を継続することができずに死滅したが、一方、EF-1 c-MET CAR T細胞は増殖し続けている。図7Bは、平均細胞体積(MCV)も決定したことを明示している。CMV-c-MET CAR T細胞は10日後に細胞サイズが縮小し、これは細胞が休止に入ったことを指し示している。図7Cは、形質導入後第6日の時点での、CMVプロモーターおよびEF-1プロモーターにより発現されたCARの発現レベルの比較を描写している。平均蛍光強度が指し示されている。

【図8】構成性増殖を伴うCAR T細胞が特異的細胞傷害性を保っていることを示している画像である。M30腫瘍株(c-Metの内因性発現)およびNCI-H522腫瘍株(c-Met発現を欠く)を、表記のエフェクター：標的比の下でc-Met IgG4 CAR T細胞と共に培養した。CD19 CD8 CAR T細胞を、アロジェニック効果について否定するための特異性対照として用いた。挿入枠：M108およびNCI-H522上でのc-Met発現。

【図9】c-Metおよびメソテリンの発現がヒトCD4+ T細胞上で検出されないことを明示している画像である。CD4+ T細胞は検出可能なレベルのc-Metもメソテリンも発現しない。試料を、非小細胞肺腫瘍細胞株であるL55、ならびに非染色CD4+ T細胞と比較した。活性化の後に、ヒトCD4+ T細胞および腫瘍株をc-Met(PE)またはメソテリン(PE)に関して染色した。ヒストグラムは、記載の抗原に関して染色された非染色活性化CD4+ T細胞、活性化CD4+ T細胞およびL55腫瘍を描写している。平均蛍光強度が指し示されている。

【図10】構成性または誘導性の増殖表現型を有するCARのウエスタンプロット分析の画像である。形質導入後第8日の試料からの溶解物について、マウス抗ヒトCD3を0.250ug/mLで用い、続いて抗マウスHRPを1:5000で用いる、CD3をプローブ検索する還元条件および非還元条件の下でウエスタンプロットを行った。還元条件下のCARモノマー(50~70kD)(左)ならびに非還元条件下でのダイマーおよびモノマー(右)。内部ローディング対照としての内因性CD3。

【図11】構成性の成長表現型を有するCAR T細胞が多様なTCR Vレパートリーを保有していることを明示している画像である。記載したように、ヒトCD4 T細胞を単離し、抗CD3/CD28で刺激し、c-Met IgG4 CARによる形質導入を行った上で、外因性サイトカインを伴わずに培養下に維持した。ドナーと一致させたモック形質導入細胞を刺激して、対照として同時に増大させたが、これらの培養物を培養下に維持するためにはさらなる刺激が必要であった。細胞を凍結保存し、その第0日、13日および34日後に同時に解凍して、IO Test Beta Mark TCR Vキットを用いてTCR V分析を行った。

10

20

30

40

50

【図12】構成性増殖を伴うCAR T細胞がリガンド非依存的NFAT活性化を有することを明示している画像である。NFATプロモーターの制御下でGFPを発現するように操作したJurkat T細胞に対して、持続的c-Met IgG4、SS1 IgG4、SS1 CD8 に関するCARをコードするレンチウイルス、ならびにCD19 IgG4、CD19 CD8 およびSS1 CD8a 尾部をコードする古典的CARによる形質導入を行った。形質導入の3日後に、細胞をGFPおよびCARの発現に関して分析した。

【図13】構成性のCAR T細胞増殖が、別個の細胞表面表現型の分化および進展をもたらすことを明示している画像である。前記の通りに、CD4 T細胞を刺激し、c-Met IgG4 CAR構築物による形質導入を行った。刺激前の細胞を後の分析のために凍結保存した。細胞試料を第6日、14日、23日、38日および70日に単離して、凍結保存した。細胞を同時に解凍して、サイトカインを添加せずに一晩静置した。細胞を、CARならびにCD25、CD70、PD-1、CD27、CD28、CD62L、CCR7およびCrtamに関して染色した。

【図14】非形質導入T細胞の分化に対する刺激および細胞培養の影響を描写している画像である。随伴性CD4 T細胞を陰性枯渇によって単離し、図12に示したCAR T細胞によって同時発生的に刺激した。刺激前の細胞を後の分析のために凍結保存した。細胞試料を第6日、ピーズ除去の24時間後、および第14日に分析のために単離した。細胞をCAR T細胞と同時に解凍して、増殖因子もサイトカインも添加せずに一晩静置した。細胞を、CAR発現、ならびにCD25、CD70、PD-1、CD27、CD28、CD62L、CCR7およびCrtamに関して分析した。

【図15】持続的CAR T細胞およびモック形質導入T細胞におけるテロメア制限断片長 (TRF) の時間パターンを描写している画像である。持続的c-Met IgG4 CARによる形質導入を行ったCD4 T細胞またはモック形質導入細胞を、表記の期間にわたって培養した。DNAをT細胞から単離し、末端テロメア制限断片長を、HinfI/RsaIで消化したDNAの電気泳動分離の後にテロメア反復配列プローブに対するゲル中ハイブリダイゼーションによって評価した。持続的CAR T細胞は少なくとも61日間にわたって培養下で増殖し、一方、モック形質導入T細胞は31日後に増殖を停止した。ラダーは、完全長ラムダDNAおよびHindIIIで消化したラムダDNAの32P標識混合物である。

【図16】NSGマウスにおける持続的CAR T細胞の生着および増殖を描写している画像である。持続的c-Met IgG4 CAR、古典的CD19 CD8 CAR (CAR陽性を50%に調整) を発現するヒトCD4 T細胞 (10^6 個)、またはモック形質導入T細胞を、NSGマウスに輸注した (n = マウス10匹/群)。マウス血液1 μ L当たりのhuCD45+細胞を定量するために、輸注60日後にマウスを末梢血TruCountsによって分析した。試料の平均値に差はなかった (両側Mann-Whitney p = 0.39) ; バーはS.D.を表している。

【発明を実施するための形態】

【0019】

詳細な説明

本発明は、T細胞に形質導入された特定のキメラ抗原受容体 (CAR) が、インビトロおよびインビボの両方で、少なくとも、形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、形質導入T細胞の平均細胞体積 (MCV) の増加、形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、形質導入T細胞の増殖の増加、形質導入T細胞の子孫の数の増加、および形質導入T細胞集団の存続性の増加に寄与するという発見に関する。したがって、本発明は、形質導入T細胞集団の活性化および存続性の増加に寄与するCARが形質導入されたT細胞の投与によって、血液悪性腫瘍および固形腫瘍を非限定的に含む癌を治療するための組成物および方法に関する。本発明は、キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように形質導入されたT細胞の養子細胞移入の戦略に関する。CARとは、特異的な抗腫瘍細胞免疫活性を呈するキメラタンパク質を作製するために、抗体に基づく所望の抗原 (例えば、腫瘍抗原) に対する特異性と、T細胞受容体を活性化する細胞内ドメインとを組み合わせた分子のことである。

【0020】

本発明は、外因性サイトカインの投与もフィーダー細胞も伴わずに高度なT細胞増殖を可能にするCARのデザインの同定のための方法を提供する。1つの局面において、本発明は、長期的な自律増殖を行う能力をT細胞に与えるCARを作製するための組成物および方法を

提供する。1つの局面において、CAR T細胞の長期的な増殖および増大は抗原刺激に依存せず、外因性サイトカインの添加もフィーダー細胞の添加も必要としない。

【0021】

1つの局面において、CAR T細胞の長期的な増殖および増大は、構成性のサイトカイン産生によって部分的に媒介される。したがって、本発明は、構成性の増殖表現型を有するCAR T細胞の独特な分子シグネチャーを提供する。1つの局面において、CAR T細胞の独特な分子シグネチャーには、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムBおよびパーフォリンのうち1つまたは複数の発現が含まれる。

【0022】

もう1つの態様において、本発明は、持続的成長の表現型を呈するCAR T細胞を作製する方法を提供する。1つの局面において、持続的成長の表現型は、正規のTCRおよびCD28シグナル伝達経路にかかわる持続的なリガンド非依存的シグナル伝達を伴う。もう1つの局面において、CAR T細胞の持続的増殖の表現型は、CAR T細胞上でのscFv表面発現レベルを評価することによって同定しうるが、これは、細胞表面で鮮明に発現されるCARは増殖を継続させた一方で、scFv表面発現がより低レベルであるCARは継続的増殖およびサイトカイン分泌を呈しなかったためである。

10

【0023】

1つの態様において、本発明のCARは、抗原認識ドメインを有する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含む。1つの態様においては、CARにおけるドメインの1つに天然に結合する膜貫通ドメインが用いられる。もう1つの態様において、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、膜貫通ドメインを、そのようなドメインと同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとの結合を回避するように選択すること、またはアミノ酸置換によって改変することもできる。好ましくは、ヒンジドメインはIgG4またはCD8 ヒンジドメインである。

20

【0024】

さまざまな態様において、本発明の存続的CAR T細胞は、インビトロおよびインビボの両方で、形質導入T細胞の抗原非依存的活性化の増加、形質導入T細胞の平均血球体積(MCV)の増加、形質導入T細胞の細胞集団増大の増加、形質導入T細胞の増殖の増加、形質導入T細胞の子孫の数の増加、および形質導入T細胞集団の存続性の増加のうち少なくとも1つに寄与する所望のCARを含むレンチウイルスベクターを導入することによって作製することができる。一例として、本発明のCARは、抗c-Metドメイン、IgG4ヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む。もう一例として、本発明のCARは、抗メソテリン(SS1)ドメイン、IgG4ヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む。もう一例として、本発明のCARは、抗メソテリンドメイン、CD8aヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む。もう一例として、本発明のCARは、抗CD19ドメイン、IgG4ヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む。もう一例として、本発明のCARは、抗CD19ドメイン、CD8aヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む。本発明のCAR T細胞は、インビボで複製して、継続的腫瘍制御を導きうる長期的な存続性をもたらすことができる。

30

40

【0025】

1つの態様において、本発明は、CARを発現する遺伝的に改変されたT細胞を、癌を有するかまたは癌を有するリスクのある患者の治療のために、リンパ球輸注を用いて投与することに関する。自己リンパ球輸注を治療に用いることが好ましい。治療を必要とする患者から自己PBMCを収集し、T細胞を活性化した上で、本明細書に記載された当技術分野において公知の方法を用いて増大させ、続いて患者に輸注して戻す。

【0026】

定義

別に定める場合を除き、本明細書で用いる技術用語および科学用語はすべて、本発明が

50

属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書中に記載されたものと同様または同等な任意の方法および材料を、本発明の実施に、および/またはその試験のために用いることができるが、本明細書では好ましい材料および方法について説明する。本発明の説明および特許請求を行う上では、以下の専門用語を、定義が提示される箇所で、それが定義されている様式に従って用いる。

【0027】

また、本明細書中で用いる専門用語は、特定の態様を説明することのみを目的とすること、および限定的であるとは意図されないことも、理解される必要がある。

【0028】

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

10

【0029】

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

【0030】

「活性化」とは、本明細書で用いる場合、検出可能な細胞増殖を誘導するように十分に刺激されたT細胞の状態のことを指す。また、活性化が、サイトカイン産生の誘導、および検出可能なエフェクター機能を伴うこともある。「活性化されたT細胞」という用語は、とりわけ、細胞分裂を行っているT細胞のことを指す。

20

【0031】

「抗体」という用語は、本明細書で用いる場合、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子のことを指す。抗体は、天然供給源または組換え供給源に由来する無傷の免疫グロブリンであってもよく、無傷の免疫グロブリンの免疫応答部分であってもよい。抗体は典型的には、免疫グロブリン分子のテトラマーである。本発明における抗体は、例えば、単ドメイン抗体フラグメント(sdAb)、単鎖抗体(scFv)およびヒト化抗体を含む、抗体の抗原結合部分が連続したポリペプチド鎖の部分として発現される種々の形態で存在する(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。

30

【0032】

「抗体フラグメント」という用語は、無傷の抗体の少なくとも1つの部分のことを指し、無傷の抗体の抗原決定可変領域のことを指す。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント、直鎖状抗体、sdAb(V_LまたはV_Hのいずれか)、ラクダ科動物(camelid)V_HHドメイン、ScFv抗体、ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が非限定的に含まれる。「scFv」という用語は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体フラグメントおよび重鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体フラグメントを含む融合タンパク質のことを指し、ここで軽鎖および重鎖の可変領域は短い柔軟なポリペプチドリンカーを介して持続的に連結しており、単鎖ポリペプチドとして発現されることができ、scFvはその由来となった無傷の抗体の特異性を保っている。特記する場合を除き、本明細書で用いる場合、scFvはV_LおよびV_H可変領域を、例えばポリペプチドのN末端およびC末端に対していずれの順序で有してもよく、scFvがV_L-リンカー-V_Hを含んでもよく、またはV_H-リンカー-V_Lを含んでもよい。

40

【0033】

「抗体重鎖」とは、本明細書で用いる場合、天然に存在するコンフォメーションにある抗体分子中に存在しかつ通常、該抗体が属するクラスを決定する2種類のポリペプチド鎖のうち、大きい方のことを指す。

50

【0034】

「抗体軽鎖」とは、本明細書で用いる場合、天然に存在するコンフォメーションにある抗体分子中に存在する2種類のポリペプチド鎖のうち、小さい方のことを指す。カッパ()軽鎖およびラムダ()軽鎖とは、2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプのことを指す。

【0035】

本明細書で用いる「合成抗体」とは、組換えDNA技術を用いて作製される抗体、例えば、本明細書に記載のバクテリオファージによって発現される抗体のことを意味する。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子の合成によって作製される抗体であって、そのDNA分子が抗体タンパク質またはその抗体を指定するアミノ酸配列を発現し、そのDNA配列またはアミノ酸配列が、利用可能であって当技術分野において周知であるDNA配列またはアミノ酸配列の合成技術を用いて得られたような抗体も意味するとみなされるべきである。

10

【0036】

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

20

【0037】

本明細書で用いる「抗腫瘍効果」という用語は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞の数の減少、転移の数の減少、期待余命の延長、または癌性病状に付随するさまざまな生理的症状の改善によって明らかになる生物学的効果のことを指す。「抗腫瘍効果」はまた、腫瘍のそもそもの発生を予防する、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および抗体の能力によっても明らかになる。

30

【0038】

「自己抗原」という用語は、本発明によれば、免疫系によって外来性であると誤って認識されるあらゆる自己抗原のことを意味する。自己抗原には、細胞表面受容体を含む、細胞タンパク質、リンタンパク質、細胞表面タンパク質、細胞脂質、核酸、糖タンパク質が非限定的に含まれる。

【0039】

本明細書で用いる「自己免疫疾患」は、自己免疫反応に起因する障害と定義される。自己免疫疾患は、自己抗原に対する不適切かつ過剰な反応の結果である。自己免疫疾患の例には、とりわけ、アジソン病、円形脱毛症 (alopecia areata)、強直性脊椎炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、糖尿病 (1型)、栄養障害型表皮水疱症、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー (Guillain-Barré) 症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、血管炎、尋常性白斑、粘液水腫、悪性貧血、潰瘍性大腸炎が非限定的に含まれる。

40

【0040】

50

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

【0041】

「同種」とは、同じ種の異なる動物に由来する移植片のことを指す。

【0042】

「異種」とは、異なる種の動物に由来する移植片のことを指す。

【0043】

本明細書で用いる「癌」という用語は、異常細胞の急速かつ制御不能な増殖を特徴とする疾患と定義される。癌細胞は局所的に広がることもあれば、または血流およびリンパ系を通じて身体の他の部分に広がることもある。さまざまな癌の例には、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膀胱癌、結腸直腸癌、腎癌、肝臓癌、脳悪性腫瘍、リンパ腫、白血病、肺癌などが非限定的に含まれる。

10

【0044】

「共刺激リガンド」には、この用語が本明細書で用いられる場合、T細胞上の同族共刺激分子と特異的に結合し、それにより、例えば、ペプチドが負荷されたMHC分子のTCR/CD3複合体への結合によって与えられる一次シグナルに加えて、増殖、活性化、分化などを非限定的に含むT細胞応答を媒介するシグナルも与えることのできる、抗原提示細胞（例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上の分子が含まれる。共刺激リガンドには、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド（ICOS-L）、細胞内接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンホトキシン受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3に特異的に結合するリガンドが非限定的に含まれる。共刺激リガンドはまた、とりわけ、これらに限定されるわけではないがCD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3などのT細胞上に存在する共刺激分子に特異的に結合する抗体、およびCD83に特異的に結合するリガンドも包含する。

20

【0045】

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

30

【0046】

「共刺激シグナル」とは、本明細書で用いる場合、TCR/CD3連結などの一次シグナルとの組み合わせで、T細胞の増殖、および/または鍵となる分子のアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションを導く分子のことを指す。

【0047】

「疾患」とは、動物が恒常性を維持することができず、その疾患が改善しなければその動物の健康が悪化し続ける、動物の健康状態のことを指す。対照的に、動物における「障害」とは、その動物が恒常性を維持することはできるが、その動物の健康状態が、障害の非存在下にあるよりもより不都合である健康状態のことである。治療されないままであっても、障害は必ずしもその動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすとは限らない。

40

【0048】

本明細書で用いる「有効量」とは、治療的または予防的な有益性をもたらす量のことを意味する。

【0049】

「コードする」とは、所定のヌクレオチド配列（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）または所定のアミノ酸配列のいずれか、およびそれに起因する生物学的特性を有する、生物過程において他のポリマーおよび高分子の合成のためのテンプレートとして働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAなどのポリヌクレオチド中の特定のヌクレオチド配列の固有の特性のことを指す。すなわち、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によって細

50

胞または他の生体系においてタンパク質が産生される場合、そのタンパク質をコードする。mRNA配列と同一であって通常は配列表として提示されるヌクレオチド配列を有するコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のためのテンプレートとして用いられる非コード鎖の両方を、タンパク質、またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードすると称することができる。

【0050】

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

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

「発現ベクター」とは、発現させようとするヌクレオチド配列と機能的に連結した発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターのことを指す。発現ベクターは、発現のために十分なシス作用エレメントを含む；発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、またはインビトロ発現系において供給されうる。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを組み入れたコスミド、プラスミド（例えば、裸のもの、またはリボソーム中に含まれるもの）およびウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）といった、当技術分野において公知であるすべてのものが含まれる。

【0054】

「相同な」とは、2つのポリペプチドの間または2つの核酸分子の間の配列類似性または配列同一性を指す。比較する2つの配列の両方において、ある位置が同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットによって占められている場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおいて、ある位置がアデニンによって占められている場合には、それらの分子はその位置で相同である。2つの配列間の相同度（percent of homology）は、2つの配列が共通して持つ一致する位置または相同な位置の数を、比較する位置の数によって除算した上で100を掛けた関数である。例えば、2つの配列中の10個の位置のうち6個が一致するかまたは相同であるならば、2つの配列は60%相同である。一例として、DNA配列ATTGCCおよびTATGGCは50%の相同性を有する。一般に、比較は、最大の相同性が得られるように2つの配列のアラインメントを行った上で行われる。

【0055】

「免疫グロブリン」または「Ig」という用語は、本明細書で用いる場合、抗体として機能するタンパク質のクラスと定義される。B細胞によって発現される抗体は、BCR（B細胞受容体）または抗原受容体と称されることも時にある。このタンパク質のクラスに含まれる5つのメンバーは、IgA、IgG、IgM、IgDおよびIgEである。IgAは、唾液、涙液、母乳、消化管分泌物、ならびに気道および泌尿生殖路の粘液分泌物などの身体分泌物中に存在する主要な抗体である。IgGは、最も一般的な流血中抗体である。IgMは、ほとんどの哺乳動物で一次免疫応答において産生される主な免疫グロブリンである。これは凝集反応、補体固定および他の抗体応答において最も効率的な免疫グロブリンであり、細菌およびウイルスに対する防御に重要である。IgDは抗体機能が判明していない免疫グロブリンであるが、抗原受容体として働いている可能性がある。IgEは、アレルゲンに対する曝露時にマスト細胞および好塩基球からのメディエーターの放出を引き起こすことによって即時型過敏症を媒介する免疫グロブリンである。

【0056】

本明細書で用いる場合、「説明資料（instructional material）」には、本発明の組成物および方法の有用性を伝えるために用いられる、刊行物、記録、略図または他の任意の表現

10

20

30

40

50

媒体が含まれる。本発明のキットの説明資料は、例えば、本発明の核酸、ペプチドおよび/もしくは組成物を含む容器に添付してもよく、または核酸、ペプチドおよび/もしくは組成物を含む容器と一緒に出荷してもよい。または、説明資料および化合物がレシピエントによって一体として用いられることを意図して、説明資料を容器と別に出荷してもよい。

【0057】

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

10

【0058】

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

【0059】

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

20

【0060】

本明細書で用いる「レンチウイルス」とは、レトロウイルス科(Retroviridae)ファミリーの属のことを指す。レンチウイルスは、非分裂細胞を感染させようという点で、レトロウイルスの中でも独特である；それらはかなりの量の遺伝情報を宿主細胞のDNA中に送達することができるため、それらは遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIVおよびFIVはすべて、レンチウイルスの例である。レンチウイルスに由来するベクターは、インビボでかなり高いレベルの遺伝子移入を達成するための手段を与える。

【0061】

「マイクロアレイ」および「アレイ」という用語は、「DNAマイクロアレイ」および「DNAチップ」の両方を広く指し、当技術分野で認知されたすべての固体支持体、および、核酸分子をそれに固定するためまたはその上での核酸の合成のための当技術分野で認知されたすべての方法を包含する。好ましいアレイは、典型的には、異なる既知の場所で、基質の表面に連結された、複数の異なる核酸プローブを含む。「マイクロアレイ」または口語的に「チップ」とも記載されるこれらのアレイは、当技術分野において一般に、例えば、米国特許第5,143,854号、第5,445,934号、第5,744,305号、第5,677,195号、第5,800,992号、第6,040,193号、第5,424,186号、およびFodor et al., 1991, Science, 251:767-777に記載されており、これらのそれぞれはその全体があらゆる目的で参照により組み入れられる。アレイは一般に、機械的合成法、またはフォトリソグラフィ法と固相合成法の組み合わせを組み入れた光による合成法といった種々の手法を用いて作製することができる。機械的合成法を用いるこれらのアレイの合成のための手法は、例えば、米国特許第5,384,261号および第6,040,193号に記載されており、それらはそれらの全体があらゆる目的で参照により本明細書に組み入れられる。平面的なアレイ表面が好ましいが、アレイは事実上任意の形状の表面上に、またはさらには複数の表面上に製造されてもよい。アレイは、ビーズ、ゲル、ポリマー表面、光ファイバーなどのファイバー、ガラスまたは他の任意の他の適切な基質上の核酸であってよい(米国特許第5,770,358号、第5,789,162号、5,708,153号、6,040,193号および第5,800,992号を参照。これらはそれらの全体があらゆる目的で参照により本明細書に組み入れられる)。アレイは、診断的利用を可能にするための様式でパッケージ化されてもよく、または包括的デバイスであってよい；例えば、それら

30

40

50

の全体があらゆる目的で組み入れられる米国特許第5,856,174号および第5,922,591号。アレイは、例えば、Affymetrix (Santa Clara, Calif.) およびApplied Biosystems (Foster City, Calif.) から販売されており、これらは、種々の真核生物および原核生物に関する遺伝子型判定、診断法、突然変異分析、マーカー発現、および遺伝子発現モニタリングを含む、種々の目的を対象とする。固体支持体上のプローブの数は、個々の特徴物のサイズを変えることによって変更することができる。1つの態様において、特徴物のサイズは 20×25 平方マイクロメートルであり、他の態様において、特徴物は例えば、 8×8 、 5×5 または 3×3 平方マイクロメートルであってよく、その結果、約2,600,000個、6,600,000個または18,000,000個の個々のプローブ特徴物がもたらされる。

【0062】

「モジュレートする」という用語は、本明細書で用いる場合、治療もしくは化合物の非存在下でのその対象における反応のレベルと比較して、および/または他の点では同一であるが治療を受けていない対象における反応のレベルと比較して、対象における反応のレベルの検出可能な増加または減少を媒介することを意味する。この用語は、対象、好ましくはヒトにおいて、天然のシグナルまたは反応を擾乱させかつ/またはそれに影響を及ぼすことにより、有益な治療反応を媒介することを包含する。

【0063】

別に指定する場合を除き、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、相互に縮重型であって、かつ同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチドが含まれる。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列が、イントロンを含んでもよい。

【0064】

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

【0065】

「過剰発現された」腫瘍抗原または腫瘍抗原の「過剰発現」という用語は、患者の特定の組織または臓器の内部にある固形腫瘍のような疾患領域からの細胞における腫瘍抗原の発現が、その組織または臓器からの正常細胞における発現のレベルに比して異常なレベルであることを指し示すことを意図している。腫瘍抗原の過剰発現を特徴とする固形腫瘍または血液悪性腫瘍を有する患者は、当技術分野において公知の標準的なアッセイによって判定することができる。

【0066】

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

【0067】

「患者」、「対象」、「個体」などの用語は、本明細書において互換的に用いられ、本明細書に記載の方法を適用しうる、インビトロまたはインサイチューの別を問わない、任意の動物またはその細胞のことを指す。ある非限定的な態様において、患者、対象または個体はヒトである。

【0068】

本明細書で用いる「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの連鎖と定義される。その上、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書で用いる核酸およびポリヌクレオチドは互換的である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、それらはモノマー性「ヌクレオチド」に加水分解されうるという一般知識を有する。モノマー性ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解されうる。本明細書で用いるポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドには、組換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCR（商標）などを用いて組換えライブラリーまたは細胞ゲノムから核酸配列をクローニングすること、および合成手段を非限定的に含む、当技術分野で利用可能な任意の手段によって得られる、すべての核酸配列が非限定的に含まれる。

【0069】

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

10

【0070】

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

20

【0071】

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

【0072】

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

30

【0073】

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

【0074】

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

40

【0075】

「特異的に結合する」という用語は、抗体に関して本明細書で用いる場合、試料中の特異的な抗原を認識するが、他の分子は実質的に認識もせず、それらと結合もしない抗体のことを意味する。例えば、1つの種由来の抗原と特異的に結合する抗体が、1つまたは複数の種由来のその抗原と結合してもよい。しかし、そのような種間反応性はそれ自体では、抗体の分類を特異的として変更させることはない。もう1つの例において、抗原と特異的に結合する抗体が、その抗原の異なるアレル形態と結合してもよい。しかし、そのような

50

交差反応性はそれ自体では、抗体の分類を特異的として変更させることはない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語を、抗体、タンパク質またはペプチドの第2の化学種との相互作用に言及して、その相互作用が、化学種での特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味して用いることができる；例えば、ある抗体は、タンパク質全体ではなく特定のタンパク質構造を認識してそれと結合する。抗体がエピトープ「A」に対して特異的であるならば、エピトープAを含有する分子（または遊離した非標識A）の存在は、標識「A」およびその抗体を含む反応において、その抗体と結合した標識Aの量を減少させると考えられる。

【0076】

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

10

【0077】

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

【0078】

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

20

【0079】

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

30

【0080】

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

【0081】

「治療的有効量」という用語は、研究者、獣医、医師または他の臨床専門家が詳しく調べようとしている、組織、系または対象の生物学的または医学的な反応を誘発すると考えられる対象化合物の量のことを指す。「治療的有効量」という用語には、投与された場合に、治療される障害または疾患の徴候または症状のうち1つもしくは複数の発生を予防するか、またはそれをある程度改善するのに十分な、化合物の量が含まれる。治療的有効量は、化合物、疾患およびその重症度、ならびに治療される対象の年齢、体重などに応じて異なると考えられる。

40

【0082】

ある疾患を「治療する」とは、この用語が本明細書で用いられる場合、対象が被っている疾患または障害の少なくとも1つの徴候または症状の頻度または重症度を軽減することを意味する。

【0083】

本明細書で用いる「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質

50

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

【0084】

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

【0085】

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

10

【0086】

範囲：本開示の全体を通じて、本発明のさまざまな局面を、範囲形式で提示することができる。範囲形式による記載は、単に便宜上かつ簡潔さのためであって、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定とみなされるべきではないことが理解される必要がある。したがって、ある範囲の記載は、その範囲内におけるすべての可能な部分的範囲とともに、個々の数値も具体的に開示されていると考慮されるべきである。例えば、1~6などの範囲の記載は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などの部分的範囲とともに、その範囲内の個々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6も、具体的に開示されていると考慮されるべきである。これは範囲の幅広さとは関係なく適用される。

20

【0087】

説明

本発明は、それらの非形質導入対応物と比較して、インビトロおよびインビボの両方で、抗原非依存的活性化の増加、平均細胞体積(MCV)の増加、細胞集団増大の増加、増殖の増加、子孫の数の増加、構成性サイトカイン分泌の誘導、および形質導入T細胞集団の存続性の増加を呈する、T細胞の存続的集団を生じさせるキメラ抗原受容体(CAR)によるT細胞の形質導入を行う、組成物および方法に関する。したがって、本発明は、さまざまな疾患の中でもとりわけ、癌を治療するための組成物および方法を含む。癌は、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、原発性または転移性の腫瘍であってよい。本発明の組成物および方法を用いて治療する他の疾患には、ウイルス感染症、細菌感染症および寄生虫感染、ならびに自己免疫疾患が含まれる。

30

【0088】

1つの態様において、本発明は、形質導入されたT細胞の活性化上昇または増殖上昇に寄与するCARを発現するように操作された該細胞(例えば、T細胞)を提供し、該CAR T細胞は抗腫瘍性を呈する。本発明のCARは、T細胞抗原受容体複合体鎖(例えば、CD3)の細胞内シグナル伝達ドメインと融合した抗原結合ドメインを有する細胞外ドメインを含むように操作することができる。本発明のCARは、T細胞で発現された場合に、抗原結合特異性に基づく抗原認識を再誘導することができる。例示的な抗原には、cMet、メソテリン、およびCD19が含まれる。しかし、本発明は、cMet、メソテリン、およびCD19のターゲティングには限定されない。むしろ本発明は、その同族抗原と結合した場合に腫瘍細胞に影響を及ぼし、その結果、腫瘍細胞が成長できなくなるか、死滅するように促されるか、または患者における腫瘍総量(tumor burden)が漸減するかもしくは消失する他の様式で影響を受けるような、あらゆる抗原結合モイエティーを含む。抗原結合モイエティーは、共刺

40

50

激分子および鎖のうち1つまたは複数からの細胞内ドメインと融合していることが好ましい。抗原結合モイエティーは、CD137 (4-1BB) シグナル伝達ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3 シグナル伝達ドメイン、およびこれらの任意の組み合わせの群から選択される1つまたは複数の細胞内ドメインと融合していることが好ましい。

【0089】

組成物

本発明は、細胞外および細胞内のドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) を含む。細胞外ドメインは、別の言い方では抗原結合モイエティーとも称される標的特異的結合エレメントを含む。いくつかの態様において、細胞外ドメインはまた、ヒンジドメインも含む。細胞内ドメイン、または別の言い方では細胞質ドメインは、共刺激シグナル伝達領域および鎖部分を含む。共刺激シグナル伝達領域とは、共刺激分子の細胞内ドメインを含む、CARの一部のことを指す。共刺激分子とは、抗原に対するリンパ球の効率的な反応のために必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子のことである。

10

【0090】

CARの細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、またはCARの細胞質ドメインと膜貫通ドメインとの間に、スペーサドメインを組み入れてもよい。本明細書で用いる場合、「スペーサドメイン」という用語は、一般に、ポリペプチド鎖中の膜貫通ドメインを、細胞外ドメインまたは細胞質ドメインのいずれかと連結させる働きをするオリゴペプチドまたはポリペプチドのことを意味する。スペーサドメインは、最大で300アミノ酸、好ましくは10~100アミノ酸、最も好ましくは25~50アミノ酸で構成されうる。

20

【0091】

抗原結合モイエティー

1つの態様において、本発明のCARは、別の言い方では抗原結合モイエティーとも称される標的特異的結合エレメントを含む。モイエティーの選択は、標的細胞の表面を規定するリガンドの種類および数によって決まる。例えば、抗原結合ドメインを、特定の疾病状態と関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択することができる。このように、本発明のCARにおける抗原モイエティードメインとして作用しうる細胞表面マーカーの例には、ウイルス感染、細菌感染症および寄生虫感染症、自己免疫疾患ならびに癌細胞と関連するものが含まれる。

【0092】

1つの態様において、本発明のCARは、腫瘍細胞上の抗原と特異的に結合する所望の抗原結合モイエティーを作製することによって、関心対象の腫瘍抗原を標的とするように操作することができる。本発明に関連して、「腫瘍抗原」または「過剰増殖性 (hyperproliferative) 障害抗原」または「過剰増殖性障害と関連する抗原」とは、癌などの特定の過剰増殖性障害に共通する抗原のことを指す。本明細書で考察する抗原は、単に一例として含めているに過ぎない。リストは排他的であることを意図してはならず、そのほかの例も当業者には容易に明らかとなるであろう。

30

【0093】

腫瘍抗原とは、免疫応答、特にT細胞媒介性免疫応答を誘発する腫瘍細胞によって産生されるタンパク質のことである。本発明の抗原結合モイエティーの選択は、治療される癌の具体的な種類に依存すると考えられる。腫瘍抗原は当技術分野において周知であり、これには例えば、神経膠腫関連抗原、癌胎児性抗原 (CEA)、 α -ヒト絨毛性ゴナドトロピン、フェトプロテイン (AFP)、レクチン反応性AFP、チログロブリン、RAGE-1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2 (AS)、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ、前立腺特異的抗原 (PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン、PSMA、Her2/neu、サバイピンおよびテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、好中球エラストラーゼ、エフリンB2、CD22、インスリン増殖因子 (IGF) -I、IGF-II、IGF-I受容体ならびにメソテリンが含まれる。

40

【0094】

1つの態様において、腫瘍抗原は、悪性腫瘍と関連する1つまたは複数の抗原性癌エピト

50

ープを含む。悪性腫瘍は、免疫攻撃のための標的抗原としての役を果たしうる数多くのタンパク質を発現する。これらの分子には、黒色腫におけるMART-1、チロシナーゼおよびgp100、ならびに前立腺癌における前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）および前立腺特異的抗原（PSA）などの組織特異的抗原が非限定的に含まれる。他の標的分子には、腫瘍遺伝子HER-2 / Neu / ErbB-2などの形質転換関連分子の群に属するものがある。標的抗原のさらにもう1つの群には、腫瘍胎児性抗原などの癌胎児性抗原（CEA）がある。B細胞リンパ腫において、腫瘍特異的イディオタイプ免疫グロブリンは、個々の腫瘍に固有である、真に腫瘍特異的である免疫グロブリン抗原で構成される。CD19、CD20およびCD37などのB細胞分化抗原は、B細胞リンパ腫における標的抗原の別の候補である。これらの抗原のいくつか（CEA、HER-2、CD19、CD20、イディオタイプ）は、モノクローナル抗体を用いる受動免疫療法の標的として用いられ、ある程度の成果を上げている。

10

【0095】

本発明において言及される腫瘍抗原の種類は、腫瘍特異的抗原（TSA）または腫瘍関連抗原（TAA）であってもよい。TSAは腫瘍細胞に固有であり、体内の他の細胞上には存在しない。TAA関連抗原は腫瘍細胞に固有ではなく、抗原に対する免疫寛容の状態を誘導することができない条件下で、正常細胞上でも発現される。腫瘍上での抗原の発現は、免疫系が抗原に応答することを可能にする条件下で起こりうる。TAAは、免疫系が未熟であって応答することができない胎児発生中に正常細胞上で発現される抗原であってよく、またはそれらは、正常細胞上に極めて低いレベルで通常存在するが、腫瘍細胞上でははるかに高いレベルで発現される抗原であってもよい。

20

【0096】

TSA抗原またはTAA抗原の非限定的な例には、以下のものが含まれる：MART-1 / MelanA（MART-1）、gp100（Pmel 17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2などの分化抗原、およびMAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15などの腫瘍特異的多系列抗原；過剰発現される胎児抗原、例えばCEAなど；過剰発現される腫瘍遺伝子および突然変異した腫瘍抑制遺伝子、例えばp53、Ras、HER-2 / neuなど；染色体転座に起因する固有の腫瘍抗原；BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RARなど；ならびに、ウイルス抗原、例えばエプスタイン・バーウイルス抗原EBVAならびにヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6およびE7など。その他の大型のタンパク質ベースの抗原には、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、cMet、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tg p72、 β -フェトプロテイン、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3 \ CA 27.29 \ BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68 \ P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733 \ EpCAM、HTg p-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB / 70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90 \ Mac-2結合タンパク質 \ シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、およびTPSが含まれる。

30

【0097】

1つの好ましい態様において、CARの抗原結合モイエティー部分は、cMet、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33 / IL3Ra、cMet、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ES O-1 TCR、MAGE A3 TCRなどを非限定的に含む抗原を標的とする。

40

【0098】

標的にすることが望まれる抗原に応じて、本発明のCARを、所望の抗原標的に対して特異的な適切な抗原結合モイエティーを含むように操作することができる。例えば、標的にすることが望まれる抗原がCD19であるならば、CD19に対する抗体を、本発明のCARに組み入れるための抗原結合モイエティーとして用いることができる。

【0099】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、CARは、CARの細胞外ドメインと融合した膜貫通ドメインを含むように設計することができる。1つの態様においては、CARの中のドメインの1つに天然に結合する膜貫通ドメインを用いる。場合によっては、膜貫通ドメインを、受容体複合体

50

の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに対するそのようなドメインの結合を避けるように選択すること、またはそのためのアミノ酸置換によって選択もしくは改変することもできる。

【0100】

膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源のいずれに由来してもよい。供給源が天然である場合には、ドメインは任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来しうる。本発明において特に有用性のある膜貫通領域は、T細胞受容体の、または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に、あるいはIgG4などの免疫グロブリンに由来しうる（すなわち、それらの少なくとも膜貫通領域を含む）。または、膜貫通ドメインが合成性であつてもよく、この場合には、それは主として、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含むと考えられる。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットが合成膜貫通ドメインの各末端に認められるであろう。任意で、好ましくは長さが2~10アミノ酸である短いオリゴペプチドまたはポリペプチドのリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連鎖を形成してもよい。グリシン-セリンのダブルットは特に適したリンカーとなる。

10

【0101】

細胞質ドメイン

本発明のCARの細胞質ドメイン、または別の言い方では細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが入れられた免疫細胞の正常なエフェクター機能のうち少なくとも1つの活性化の原因となる。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特化した機能のことを指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であろう。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達して、細胞が特化した機能を遂行するように導く、タンパク質の部分指す。通常は細胞内シグナル伝達ドメインの全体を使用しうるが、多くの場合には、その鎖全体を用いることは必要でない。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮部分（truncated portion）が用いられる範囲内において、そのような短縮部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、無傷の鎖の代わりに用いることができる。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、それ故に、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの任意の短縮部分を含むものとする。

20

30

【0102】

本発明のCARに用いるための細胞内シグナル伝達ドメインの好ましい例には、抗原と受容体との係合後にシグナル伝達を惹起するように協調的に作用するT細胞受容体（TCR）および補助受容体の細胞質配列、ならびに、同じ機能的な能力を有する、これらの配列の任意の誘導体または変異体および任意の合成配列が含まれる。

【0103】

TCRのみを通じて生成されるシグナルは、T細胞の完全な活性化のためには不十分であること、および二次シグナルまたは共刺激シグナルも必要とされることが公知である。このため、T細胞活性化は、2つの別個のクラスの細胞質シグナル伝達配列によって媒介されることができると言うことができる：TCRを通じての抗原依存的な一次活性化を惹起するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）、および、抗原非依存的な様式で作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルをもたらすもの（二次細胞質シグナル伝達配列）。

40

【0104】

一次細胞質シグナル伝達配列は、刺激的な方式または阻害的な方式で、TCR複合体の一次活性化を調節する。刺激的な様式で作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif）すなわちITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含有しうる。

【0105】

本発明において特に有用性のある、ITAMを含有する一次細胞質シグナル伝達配列の例には、TCR、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD6

50

6dに由来するものが含まれる。本発明のCARにおける細胞質シグナル伝達分子は、CD3 に由来する細胞質シグナル伝達配列を含むことが特に好ましい。

【0106】

1つの好ましい態様において、CARの細胞質ドメインは、CD3- シグナル伝達ドメインを、それ自体で、または本発明のCARの文脈において有用な他の任意の所望の細胞質ドメインと組み合わせて含むように、設計することができる。例えば、CARの細胞質ドメインは、CD3 鎖部分および共刺激シグナル伝達領域を含むことができる。共刺激シグナル伝達領域とは、共刺激分子の細胞内ドメインを含む、CARの一部分のことを指す。共刺激分子とは、抗原に対するリンパ球の効率的な反応のために必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子のことである。そのような分子の例には、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83と特異的に結合するリガンドなどが含まれる。したがって、本発明は、主として4-1BBを共刺激シグナル伝達エレメントとして用いて例示されるものの、他の共刺激エレメントも本発明の範囲内にある。

【0107】

本発明のCARの細胞質シグナル伝達部分の内部の細胞質シグナル伝達配列は、ランダムな順序または指定された順序で互いに連結させることができる。任意で、好ましくは長さが2~10アミノ酸である短いオリゴペプチドまたはポリペプチドのリンカーが連鎖を形成してもよい。グリシン-セリンのダブルレットは特に適したリンカーとなる。

【0108】

1つの態様において、細胞質ドメインは、CD3- のシグナル伝達ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。もう1つの態様において、細胞質ドメインは、CD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。さらにもう1つの態様において、細胞質ドメインは、CD3- のシグナル伝達ドメインならびにCD28および4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。

【0109】

ベクター

本発明は、CARの配列を含むDNA構築物を包含し、ここでその配列は、細胞内ドメインの核酸配列と機能的に連結された抗原結合モイエティーの核酸配列を含む。本発明のCARにおいて用いる例示的な細胞内ドメインには、CD3-、CD28、4-1BBなどの細胞内ドメインが非限定的に含まれる。場合によっては、CARは、CD3-、CD28、4-1BBなどの任意の組み合わせを含みうる。

【0110】

1つの態様において、本発明のCARは、抗cMetドメイン、IgG4ヒンジドメイン、およびCD28膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む。もう1つの態様において、本発明のCARは、抗メソテリンドメイン、IgG4ヒンジドメイン、ならびにCD28およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む。さらなる態様において、本発明のCARは、抗メソテリンドメイン、CD8aヒンジドメインおよびCD28膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む。さらにもう1つの態様において、本発明のCARは、抗CD19ドメイン、IgG4ヒンジドメインおよびCD28膜貫通ドメイン、ならびにCD3 シグナル伝達ドメインを含む。さらにもう1つの態様において、本発明のCARは、抗CD19ドメイン、CD8aヒンジドメインおよびCD28膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3 シグナル伝達ドメインを含む。

【0111】

1つの態様において、本発明のCARは、SEQ ID NO : 1に示された核酸配列を含む。もう1つの態様において、本発明のCARは、SEQ ID NO : 2に示された核酸配列を含む。さらなる態様において、本発明のCARは、SEQ ID NO : 3に示された核酸配列を含む。

【0112】

所望の分子をコードする核酸配列は、当技術分野において公知の組換え方法、例えば、標準的な手法を用いて、その遺伝子を発現する細胞からのライブラリーをスクリーニング

10

20

30

40

50

することによって、それを含むことが公知であるベクターから遺伝子を導き出すことによって、またはそれを含有する細胞および組織から直接的に単離することなどによって、入手することができる。または、関心対象の遺伝子を、クローニングするのではなくて、合成によって作製することもできる。

【0113】

本発明はまた、本発明のDNAが挿入されたベクターも提供する。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターは、長期的遺伝子移入を達成するための適したツールであるが、これはそれらが、導入遺伝子の長期的で安定的な組み込み、および娘細胞におけるその伝播を可能にするためである。レンチウイルスベクターは、マウス白血球ウイルスなどのオンコレトロウイルスに由来するベクターを上回る利点を有するが、これはそれらが、肝細胞などの非増殖性細胞の形質導入も行うことができるためである。また、それらには免疫原性が低いという利点も加わっている。

10

【0114】

概要を述べると、CARをコードする天然性または合成性の核酸の発現は、典型的には、CARポリペプチドまたはその部分をコードする核酸をプロモーターと機能的に連結させて、その構築物を発現ベクター中に組み入れることによって達成される。ベクターは、真核生物における複製および組み込みのために適している。典型的なクローニングベクターは、転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター、開始配列、ならびに所望の核酸配列の発現の調節のために有用なプロモーターを含有する。

20

【0115】

また、本発明の発現構築物を、標準的な遺伝子送達プロトコルを用いる核酸免疫処置および遺伝子治療のために用いることもできる。遺伝子送達のための方法は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,399,346号、第5,580,859号、第5,589,466号を参照されたく、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。もう1つの態様において、本発明は、遺伝子療法ベクターを提供する。

【0116】

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

30

【0117】

さらに、発現ベクターを、ウイルスベクターの形態で細胞に与えることもできる。ウイルスベクター技術は当技術分野において周知であり、例えば、Sambrookら(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、ならびにウイルス学および分子生物学の他のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスおよびレンチウイルスが非限定的に含まれる。一般に、適したベクターは、少なくとも1つの生物において機能する複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つまたは複数の選択可能なマーカーを含有する(例えば、WO 01/96584号; WO 01/29058号; および米国特許第6,326,193号を参照)。

40

【0118】

数多くのウイルスベースの系が、哺乳動物細胞への遺伝子移入のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための好都合なプラットフォームとなる。当技術分野において公知の手法を用いて、選択された遺伝子をベクターに挿入し、レトロウイルス粒子の中にパッケージングすることができる。続いて、組換えウイルスを単離して、対象の細胞にインビボまたはエクビボで送達することができる。数多くのレトロウイルス系が当技術分野において公知である。いくつかの態様においては、アデノウイルスベクターを用いる。数多くのアデノウイルスベクターが当技術分野において公知である。1つの態様においては、レンチウイルスベクターを用いる。

50

【0119】

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

【0120】

適したプロモーターの一例は、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それと機能的に連結した任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を作動させることのできる、強力な構成性プロモーター配列である。適したプロモーターのもう1つの例は、伸長成長因子-1(Elongation Growth Factor-1)(EF-1)である。しかし、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)長末端反復配列(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびに、これらに限定されるわけではないがアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーターおよびクレアチンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターを非限定的に含む、他の構成性プロモーター配列を用いることもできる。さらに、本発明は、構成性プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターも本発明の一部として想定している。誘導性プロモーターの使用により、それと機能的に連結しているポリヌクレオチド配列の発現を、そのような発現が所望である場合には有効にし、発現が所望でない場合には発現を無効にすることができる、分子スイッチがもたらされる。誘導性プロモーターの例には、メタロチオネイン(metallothionine)プロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーターおよびテトラサイクリンプロモーターが非限定的に含まれる。

【0121】

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

【0122】

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

10

20

30

40

50

モーター領域をレポーター遺伝子と連結させて、プロモーターにより作動する転写を作用物質がモジュレートする能力を評価するために用いることができる。

【0123】

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

【0124】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション、微粒子銃法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。ベクターおよび/または外因性核酸を含む細胞を作製するための方法は、当技術分野において周知である。例えば、Sambrookら(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)を参照されたい。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入のために好ましい方法の1つは、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

10

【0125】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、DNAベクターおよびRNAベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞に遺伝子を挿入するために最も広く使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス1型、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来しうる。例えば、米国特許第5,350,674号および第5,585,362号を参照されたい。

20

【0126】

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

【0127】

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

30

40

【0128】

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

50

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

10

20

30

40

50

【0129】

宿主細胞における組換えDNA配列の存在を確かめる目的で、宿主細胞に外因性核酸を導入するため、または他の様式で細胞を本発明の阻害因子に曝露させるために用いられる方法にかかわらず、種々のアッセイを用いることができる。そのようなアッセイには、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば、サザンブロット法およびノーザンブロット法、RT-PCRおよびPCRなど；「生化学的」アッセイ、例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウエスタンブロット）または本発明の範囲内にある作用物質を同定するための本明細書に記載のアッセイにによって、特定のペプチドの有無を検出すること、などが含まれる。

【0130】

T細胞の供給源

本発明のT細胞の増大および遺伝子改変の前に、T細胞の供給源を対象から入手する。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、数多くの供給源から入手することができる。本発明のある態様において、当技術分野において入手可能な任意のさまざまなT細胞株を用いることができる。本発明のある態様において、T細胞は、フィコール（商標）分離などの、当業者に公知の任意のさまざまな手法を用いて対象から収集された血液ユニットから得られる。1つの好ましい態様において、個体の流血由来の細胞はアフエレーシスによって入手される。アフエレーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含む。1つの態様においては、アフエレーシスによって収集された細胞を、血漿画分を除去するために洗浄した上で、その後の処理段階のために細胞を適切な緩衝液または培地中に配置することができる。本発明の1つの態様においては、これらの細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄する。1つの代替的な態様においては、洗浄溶液はカルシウムを含まず、かつ、マグネシウムを含まないか、またはすべてではないものの多くの二価カチオンを含まない。この場合にも、驚くべきことに、カルシウム非存在下での最初の活性化段階により、活性化の増強がもたらされる。当業者は容易に理解するであろうが、洗浄段階は、半自動化された「フロースルー」遠心分離機（例えば、Cobe 2991細胞プロセッサー、Baxter CytoMate、またはHaemonetics Cell Saver 5など）を製造元の指示に従って用いることなどによって、当技術分野において公知の方法によって実現することができる。洗浄の後に、細胞を、例えば、Ca²⁺非含有、Mg²⁺非含有PBS、PlasmaLyte A、または緩衝剤を含むかもしくは含まない他の食塩液といった、種々の生体適合性緩衝液中に再懸濁させることができる。または、アフエレーシス試料の望ましくない成分を除去して、細胞を培養培地中に直接再懸濁させてもよい。

【0131】

もう1つの態様においては、赤血球を溶解させた上で、例えばPERCOLL（商標）勾配での

遠心分離によるか、または向流遠心分離溶出法によって単球を枯渇させることによって、T細胞を末梢血リンパ球から単離する。CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、およびCD45RO⁺T細胞といったT細胞の特定の部分集団を、陽性選択法または陰性選択法によってさらに単離することができる。例えば、1つの好ましい態様において、T細胞は、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3 / CD28 Tなどの抗CD3 / 抗CD28（すなわち、3x28）結合ビーズとの、所望のT細胞の陽性選択に十分な期間にわたるインキュベーションによって単離される。1つの態様において、この期間は約30分間である。1つのさらなる態様において、この期間は、30分間～36時間またはそれ以上、およびそれらの間の全ての整数値の範囲にわたる。1つのさらなる態様において、この期間は、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間または6時間である。さらにもう1つの好ましい態様において、この期間は10～24時間である。1つの好ましい態様において、インキュベーション期間は24時間である。白血病の患者からのT細胞の単離のためには、24時間といった比較的長いインキュベーション時間を用いることにより、細胞収量を増やすことができる。腫瘍組織または免疫機能低下個体から腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）を単離する際のように、他の細胞型と比較してT細胞がわずかしか存在しないあらゆる状況で、T細胞を単離するために比較的長いインキュベーション時間を用いることができる。さらに、比較的長いインキュベーション時間の使用により、CD8⁺ T細胞の捕捉効率を高めることもできる。したがって、単にこの時間を短縮または延長することによって、T細胞はCD3 / CD28ビーズへの結合が可能になるか、および / またはビーズのT細胞に対する比を増加もしくは減少することにより（本明細書でさらに説明するように）、T細胞の部分集団は、培養開始時もしくはこの過程の他の時点で、これ

10

20

【0132】

陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、陰性選択された細胞への独自の表面マーカに対する抗体の組合せにより実行することができる。1つの方法は、陰性選択された細胞上に存在する細胞表面マーカに対するモノクローナル抗体カクテルを使用する、負磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる細胞ソーティングおよび / または選択である。例えば、陰性選択によってCD4⁺細胞を濃縮するためのモノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。ある態様において、典型的にはCD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺、およびFoxP3⁺を発現する調節性T細胞を濃縮するかまたは陽性選択することが望ましいことがある。または、ある態様においては、抗CD25結合ビーズまたは他の類似の選択方法によって、調節性T細胞を枯渇させる。

30

【0133】

陽性または陰性選択によって望ましい細胞集団を単離するために、細胞および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変化させることができる。ある態様においては、細胞とビーズの最大接触を確実にするために、ビーズおよび細胞と一緒に混合される容積の著しい減少（すなわち、細胞の濃度の増加）が望ましいことがある。例えば、1つの態様においては、細胞20億個 / mlの濃度を用いる。1つの態様において、細胞10億個 / mlの濃度を用いる。さらなる態様においては、細胞1億個 / mlよりも高いものを用いる。さらなる態様においては、1000万個 / ml、1500万個 / ml、2000万個 / ml、2500万個 / ml、3000万個 / ml、3500万個 / ml、4000万個 / ml、4500万個 / mlまたは5000万個 / mlの細胞濃度を用いる。さらにもう1つの態様においては、7500万個 / ml、8000万個 / ml、8500万個 / ml、9000万個 / ml、9500万個 / ml、または1億個 / mlからの細胞濃度を用いる。さらなる態様においては、1億2500万個 / mlまたは1億5000万個 / mlの濃度を用いることができる。高濃度を用いることにより、増加した細胞収量、細胞活性化および細胞増大を生じることができる

40

50

。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞のような、または多くの腫瘍細胞が存在する試料（すなわち、白血病血、腫瘍組織など）からの、関心のある標的抗原を弱く発現する細胞の捕捉効率を高めることができる。そのような細胞集団は、治療的価値があり、かつ得ることが望ましい。例えば、高い濃度の細胞の使用は、通常弱くCD28を発現するCD8⁺ T細胞をより効率的に選択することを可能にする。

【0134】

1つの関連した態様においては、より低い濃度の細胞を用いることが望ましいことがある。T細胞および表面（例えばビーズなどの粒子）の混合物の高度の希釈により、粒子と細胞間の相互作用は最小化される。これにより、これらの粒子と結合する所望の抗原を大量発現する細胞が選択される。例えば、CD4⁺ T細胞は、より高いレベルのCD28を発現し、希釈した濃度でCD8⁺ T細胞よりもより効率的に捕捉される。1つの態様において、用いられる細胞濃度は、 5×10^6 個/mlである。もう1つの態様において、用いられる濃度は、約 1×10^5 個/ml ~ 1×10^6 個/ml、およびその間の任意の整数であることができる。

10

【0135】

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

【0136】

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

20

30

【0137】

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

【0138】

また、本発明に関連して、本明細書に記載されたような増大された細胞が必要となる前の期間での、対象からの血液試料またはアフエレーシス産物の収集も想定している。そのために、増大させようとする細胞の供給源を、必要な任意の時点で収集し、T細胞などの所望の細胞を、本明細書に記載された説明されたもののような、T細胞療法による恩恵を受けると考えられる任意のさまざまな疾患または病状に対するT細胞療法に後に用いるために単離して凍結することができる。1つの態様においては、血液試料またはアフエレーシス物を、全般的に健常な対象から採取する。ある態様においては、血液試料またはアフエレーシス物を、疾患を発症するリスクがあるが、まだ疾患を発症していない全般的に健常な対象から採取し、関心対象の細胞を、後に用いるために単離して凍結する。ある態様においては、T細胞を増大させ、凍結して、後の時点で用いる。ある態様においては、本明細書に記載されたような特定の疾患の診断後間もなく、しかしいかなる治療も行わないうちに、患者から試料を収集する。1つのさらなる態様においては、細胞を、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス薬、化学療法、放射線療法、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレートおよびFK506などの免疫抑制剤、抗体、または他の免疫除去薬、例えばCAMPATH、抗CD3抗体、サイトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、お

40

50

よび照射などの作用因子による治療を非限定的に含む、任意のさまざまな妥当な治療様式の前の対象由来の血液試料またはアフエーシス物から単離する。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンを阻害するか（シクロスポリンおよびFK506）、または増殖因子で誘導されるシグナル伝達にとって重要なp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）（Liu et al., Cell, 66:807-815,1991; Henderson et al., Immun., 73:316-321,1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun., 5:763-773,1993）。1つのさらなる態様においては、細胞を患者のために単離して、骨髄移植もしくは幹細胞移植、フルダラビンなどの化学療法薬、外部ビーム照射療法（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体のいずれかを用いるT細胞除去療法とともに（例えば、その前、同時またはその後）、後に用いるために凍結する。もう1つの態様においては、細胞を事前に単離した上で、CD20と反応する薬剤、例えばリツキサンなどによるB細胞除去療法後の治療のために後で用いるために凍結する。

10

【0139】

本発明の1つのさらなる態様においては、T細胞を、治療後に患者から直接入手する。これに関して、ある種の癌治療、特に免疫系を障害を及ぼす薬物による治療の後には、患者が通常であれば治療から回復中であると考えられる治療後間もない時点で、得られるT細胞の品質が、それらがエクスピボで増大する能力の点で最適であるか改善されていることが観察されている。同様に、本明細書に記載された方法を用いるエクスピボ操作の後にも、これらの細胞は生着およびインスピボ増大の増強のために好ましい状態にある可能性がある。したがって、本発明に関連して、この回復相の間に、T細胞、樹状細胞、または造血系統の他の細胞を含む血液細胞を収集することを想定している。さらに、ある態様においては、動員（例えば、GM-CSFによる動員）レジメンおよび条件付けレジメンを用いて、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生および/または増大にとって有利に働く状態を、特に治療後のある規定された時間枠の間に、対象において作り出すことができる。例示的な細胞型には、T細胞、B細胞、樹状細胞および免疫系の他の細胞が含まれる。

20

【0140】

T細胞の活性化および増大

所望のCARを発現させるためのT細胞の遺伝子改変の前または後のいずれかにおいて、一般に、例えば、米国特許第6,352,694号；第6,534,055号；第6,905,680号；第6,692,964号；第5,858,358号；第6,887,466号；第6,905,681号；第7,144,575号；第7,067,318号；第7,172,869号；第7,232,566号；第7,175,843号；第5,883,223号；第6,905,874号；第6,797,514号；第6,867,041号；ならびに米国特許出願公開第20060121005号に記載された方法を用いて、T細胞を活性化して増大させることができる。

30

【0141】

一般に、本発明のT細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する作用物質、およびT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドが付着した表面との接触によって増大させられる。特に、T細胞集団は、本明細書に記載されたように、例えば、表面上に固定化された抗CD3抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは抗CD2抗体との接触によって、またはカルシウムイオノフォアを伴うプロテインキナーゼCアクチベーター（例えば、プリオスタチン）との接触などによって、刺激することができる。T細胞の表面上のアクセサリ分子の同時刺激のためには、アクセサリ分子と結合するリガンドが用いられる。例えば、T細胞の集団を、T細胞の増殖を刺激するのに適した条件下で、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞のいずれかの増殖を刺激するためには、抗CD3抗体および抗CD28抗体。抗CD28抗体の例には、9.3、B-T3、XR-CD28（Diaclone, Besancon, France）が含まれ、当技術分野において一般に公知である他の方法と同様に用いることができる（Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999）。

40

【0142】

ある態様において、T細胞に対する一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、さまざま

50

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

10

20

30

40

50

【0143】

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

【0144】

T細胞または他の細胞標的を刺激するには、粒子と細胞との比として1：500～500：1およびその間の任意の整数値を用いることができる。当業者が容易に理解するように、粒子と細胞との比は、標的細胞に対する粒子サイズに依存しうる。例えば、小さいサイズのビーズは2、3個の細胞と結合しうるに過ぎないが、一方、より大きいビーズは多くと結合しうると考えられる。ある態様において、細胞と粒子との比は1：100～100：1およびその間の任意の整数値の範囲にあり、さらなる態様において、この比は1：9～9：1およびその間の任意の整数値を含み、これを同じくT細胞を刺激するために用いることができる。T細胞の刺激をもたらす、抗CD3が結合した粒子および抗CD28が結合した粒子とT細胞との比は、上述したようにさまざまでありうるが、いくつかの好ましい値には、1：100、1：50、1：40、1：30、1：20、1：10、1：9、1：8、1：7、1：6、1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1および15：1が含まれ、ここで、T細胞1個あたり粒子少なくとも1：1が、1つの好ましい比である。1つの態様においては、1：1またはそれ未満である粒子と細胞との比を用いる。1つの特定の態様において、好ましい粒子：細胞比は1：5である。さらなる態様において、粒子と細胞との比は、刺激の

日に応じて変化しうる。例えば、1つの態様において、粒子と細胞との比は第1日に1:1~10:1であり、その後最長10日間にわたって毎日または1日おきに追加の粒子を細胞に添加して、最終的な比が1:1~1:10となる(添加の日の細胞数に基づく)。1つの特定の態様において、粒子と細胞との比は刺激の1日目に1:1であり、刺激の3日目および5日目に1:5に調節される。もう1つの態様において、粒子は毎日または1日おきに添加され、最終的な比は1日目に1:1であり、刺激の3日目および5日目には1:5である。もう1つの態様において、粒子と細胞との比は刺激の1日目に2:1であり、刺激の3日目および5日目に1:10に調節される。もう1つの態様において、粒子は毎日または1日おきに添加され、最終的な比は1日目に1:1であり、刺激の3日目および5日目には1:10である。当業者は、さまざまな他の比が、本発明における使用に適することを理解するであろう。特に、比は粒子サイズならびに細胞のサイズおよび型に応じて多様であると考えられる。

【0145】

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

【0146】

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

【0147】

本発明の1つの態様においては、混合物を、数時間(約3時間)~約14日間、またはその間の任意の整数値単位の時間にわたって培養しうる。もう1つの態様においては、混合物を21日間培養しうる。本発明の1つの態様においては、ビーズとT細胞を約8日間一緒に培養する。もう1つの態様においては、ビーズとT細胞は2~3日間一緒に培養する。数回の刺激サイクルも望ましく、その結果、T細胞の培養時間は60日間またはそれより長くなる。T細胞の培養に適した条件には、血清(例えばウシ胎仔血清またはヒト血清)、インターロイキン-2(IL-2)、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β およびTNF- α 、または当業者に公知である細胞増殖のための他の添加物を含む、増殖およ

び生存のために必要な因子を含みうる適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI Medium 1640または、X-vivo 15（Lonza））が含まれる。細胞の増殖のための他の添加剤には、界面活性剤、プラスマネート、および還元剤、例えばN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどが非限定的に含まれる。培地には、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウムおよびビタミンが添加された、血清非含有であるか、またはT細胞の増殖および増大のために十分な、適量の血清（または血漿）もしくは規定されたホルモンのセットおよび/もしくは一定量のサイトカインが加えられた、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、-MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20が含まれうる。ペニシリンおよびストレプトマイシンなどの抗生物質は実験培養物のみを含められ、対象に輸注される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、増殖を支えるために必要な条件下、例えば適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5% CO₂）の下で維持される。

10

【0148】

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

20

【0149】

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

【0150】

治療適用

本発明は、レンチウイルスベクター（LV）によって形質導入された細胞（例えば、T細胞）を包含する。例えば、LVは、特異的抗体の抗原認識ドメインを、CD3-、CD28、4-1BBの細胞内ドメインまたはこれらの任意の組み合わせと組み合わせたCARをコードする。このため、場合によっては、形質導入されたT細胞は、CARにより媒介されるT細胞応答を誘発することができる。

30

【0151】

本発明は、一次T細胞の特異性を腫瘍抗原に向けて再誘導するためのCARの使用を提供する。したがって、本発明はまた、哺乳動物において標的細胞集団または組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法であって、CARを発現するT細胞を哺乳動物に投与する段階を含み、該CARが、所定の標的と特異的に相互作用する結合モイエティー、例えばヒトCD3の細胞内ドメインを含む鎖部分、および共刺激シグナル伝達領域を含む、方法を提供する。

【0152】

1つの態様において、本発明は、CARを発現するようにT細胞を遺伝子改変し、そのCAR T細胞をそれを必要とするレシピエントに輸注する、一種の細胞療法を含む。輸注された細胞は、レシピエントにおける腫瘍細胞を死滅させることができる。抗体療法とは異なり、CAR T細胞はインピボで複製して、持続的腫瘍制御につながりうる長期存続性をもたらすことができる。

40

【0153】

1つの態様において、本発明のCAR T細胞は、頑強なインピボT細胞増大を起こすことができ、より延長した時間にわたって存続することができる。もう1つの態様において、本発明のCAR T細胞は、あらゆる追加的な腫瘍形成または増殖を阻害するように再活性化されうる、特異的なメモリーT細胞になることができる。例えば、本発明のCART19細胞が頑

50

強なインビボT細胞増大を起こして、血液および骨髄において延長した時間にわたって高レベルに存続して、かつ特異的なメモリーT細胞を形成しうることは予想外であった。いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、CAR T細胞は、インビボでサロゲート抗原を発現する標的細胞に遭遇するとセントラルメモリー様状態に分化することができ、その後それを排除することができる。

【0154】

いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、CAR改変T細胞によって誘発される抗腫瘍免疫応答は、能動的な免疫応答でも受動的な免疫応答でもありうる。加えて、CARにより媒介される免疫応答は、CAR改変T細胞がCARにおける抗原結合モイエティーに対して特異的な免疫応答を誘導する養子免疫療法アプローチの一部となりうる。例えば、CART 19細胞は、CD19を発現する細胞に対して特異的な免疫応答を誘発する。

10

【0155】

本明細書に開示されたデータは、FMC63マウスモノクローナル抗体に由来する抗CD19 sc Fv、ヒトCD8 のヒンジおよび膜貫通ドメイン、ならびにヒト4-1BBおよびCD3 のシグナル伝達ドメインを含むレンチウイルスベクターを具体的に開示しているが、本発明は、本明細書中の別所に記載されたような構築物の構成要素のそれぞれに関してあらゆるさまざまな変形物を含むとみなされるべきである。すなわち、本発明は、抗原結合モイエティーに対して特異的な、CARにより媒介されるT細胞応答を生じさせるための、CARにおける任意の抗原結合モイエティーの使用を含む。例えば、本発明のCARにおける抗原結合モイエティーは、癌の治療を目的として腫瘍抗原を標的とすることができる。

20

【0156】

治療しうる可能性のある癌には、血管が発達していないか、またはまだ実質的に血管が発達していない腫瘍、ならびに血管が発達した腫瘍が含まれる。癌は非固形腫瘍（血液腫瘍、例えば、白血病およびリンパ腫）を含んでもよく、または固形腫瘍を含んでもよい。本発明のCARを用いて治療される癌の種類には、癌腫、芽細胞腫および肉腫、ある種の白血病またはリンパ性悪性腫瘍、良性および悪性腫瘍、ならびに悪性腫瘍、例えば、肉腫、癌腫および黒色腫が非限定的に含まれる。成人腫瘍/癌および小児腫瘍/癌も含まれる。

【0157】

血液悪性腫瘍は、血液または骨髄の癌である。血液（または造血器）悪性腫瘍の例には、白血病、急性白血病（急性リンパ性白血病、急性骨髄急性白血病、急性骨髄性白血病、ならびに骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性の白血病および赤白血病など）、慢性白血病（慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病、慢性骨髄性白血病および慢性リンパ性白血病など）、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（無症候型およびハイグレード型）、多発性骨髄腫、ワルデンストローム・マクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、毛様細胞白血病および骨髄異形成が含まれる。

30

【0158】

固形腫瘍とは、通常は嚢胞も液体領域も含まない組織の異常腫瘍のことである。固形腫瘍は良性のことも悪性のこともある。さまざまな種類の固形腫瘍が、それを形成する細胞の種類によって名付けられている（肉腫、癌腫およびリンパ腫など）。肉腫および癌腫などの固形腫瘍の例には、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫および他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ性悪性腫瘍、膵癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞種 皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、セミノーマ、膀胱癌、黒色腫、ならびにCNS腫瘍（神経膠腫（脳幹神経膠腫および混合神経膠腫など）、神経膠芽細胞腫（多形性神経膠芽細胞腫としても知られる）、星状細胞腫、CNSリンパ腫、胚細胞腫、髄芽細胞腫、神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫（menangioma）、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫および脳転移など）が含まれる。

40

50

【0159】

1つの態様において、本発明のCARのモイエティー部分と結合する抗原は、特定の癌を治療するように設計される。例えば、CD19を標的とするように設計されたCARを、プレB ALL（小児適応）、成人ALL、マンツル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、同種骨髄移植後サルベージなどを非限定的に含む癌および障害を治療するために用いることができる。もう1つの態様において、CARを、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫を治療するために、CD22を標的とするように設計することができる。

【0160】

1つの態様において、CD19、CD20、CD22およびROR1を標的とするCARの組み合わせを用いて治療する癌および障害には、プレB ALL（小児適応）、成人ALL、マンツル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、同種骨髄移植後サルベージなどが非限定的に含まれる。

10

【0161】

1つの態様において、CARを、中皮腫、膵癌、卵巣癌などを治療するために、メソテリンを標的とするように設計することができる。もう1つの態様において、CARを、急性骨髄性白血病などを治療するために、標的CD33/IL3Raを標的とするように設計することができる。さらなる態様において、CARを、トリプルネガティブ乳癌、非小細胞肺癌などを治療するために、cMetを標的とするように設計することができる。

【0162】

1つの態様において、CARを、前立腺癌などを治療するために、PSMAを標的とするように設計することができる。もう1つの態様において、CARを、前立腺癌などを治療するために、糖脂質F77を標的とするように設計することができる。さらなる態様において、CARを、神経膠芽細胞腫（glioblastoma）などを治療するために、EGFRvIIIを標的とするように設計することができる。

20

【0163】

1つの態様において、CARを、神経芽細胞腫、黒色腫などを治療するために、GD-2を標的とするように設計することができる。もう1つの態様において、CARを、骨髄腫、肉腫、黒色腫などを治療するために、NY-ESO-1 TCRを標的とするように設計することができる。さらなる態様において、CARを、骨髄腫、肉腫、黒色腫などを治療するために、MAGE A3 TCRを標的とするように設計することができる。

30

【0164】

しかし、本発明は、本明細書に開示された抗原標的および疾患のみに限定されるとみなされるべきではない。むしろ本発明は、疾患を治療するためにCARを用いる疾患と関連するあらゆる抗原標的を含むとみなされるべきである。

【0165】

本発明のCAR改変T細胞はまた、哺乳動物におけるエキスビボ免疫処置および/またはインビボ治療法のためのワクチンの一種としても役立つことができる。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0166】

エキスビボ免疫処置に関しては、細胞を哺乳動物に投与する前に、以下の少なくとも1つをインビトロで行う：i) 細胞の増大、ii) CARをコードする核酸を細胞に導入すること、および/またはiii) 細胞の凍結保存。

40

【0167】

エキスビボ手順は当技術分野において周知であり、以下でより詳細に考察する。手短かに述べると、細胞を哺乳動物（好ましくはヒト）から単離した上で、本明細書で開示されたCARを発現するベクターによって遺伝子改変する（すなわち、インビトロで形質導入またはトランスフェクトを行う）。CAR改変細胞を哺乳動物レシピエントに投与することにより、治療的利益を得ることができる。哺乳動物レシピエントはヒトであってよく、CAR改変細胞はレシピエントに対して自己であることができる。または、細胞がレシピエントに対して同種、同系または異種であることもできる。

50

【0168】

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

10

【0169】

エクスピボ免疫処置に関して細胞ベースのワクチンを用いることに加えて、本発明はまた、患者における抗原に向けての免疫応答を誘発するためのインピボ免疫処置のための組成物および方法も提供する。

【0170】

一般に、本明細書に記載の通りに活性化および増大された細胞は、免疫機能が低下した個体において生じる疾患の治療および予防に利用することができる。特に、本発明のCAR改変T細胞は、CCLの治療に用いられる。ある態様において、本発明の細胞は、CCLを発症するリスクのある患者の治療に用いられる。したがって、本発明は、CCLの治療または予防のための方法であって、それを必要とする対象に対して、本発明のCAR改変T細胞の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。

20

【0171】

本発明のCAR改変T細胞は、単独で、または希釈剤および/またはIL-2もしくは他のサイトカインもしくは細胞集団などの他の成分と組み合わせた薬学的組成物として投与することができる。手短に述べると、本発明の薬学的組成物は、本明細書に記載の標的細胞集団を、1つまたは複数の薬学的または生理的に許容される担体、希釈剤または添加剤と組み合わせて含む。そのような組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液；ブドウ糖、マンノース、ショ糖またはデキストラン、マンニトールのような炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンのようなアミノ酸；酸化防止剤；EDTAまたはグルタチオンのようなキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；並びに保存剤を含有してもよい。本発明の組成物は、静脈内投与用に製剤されることが好ましい。

30

【0172】

本発明の薬学的組成物は、治療（または予防）される疾患に適した方法で投与することができる。投与量および投与回数は、患者の状態、並びに患者の疾患の種類および重症度などの因子により決定されるが、適量は臨床試験により決定され得る。

【0173】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍的有效量」、「腫瘍阻害的有效量」または「治療量」が指示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染症または転移の程度、および患者（対象）の状態の個体差を考慮して、医師が決定することができる。一般に、本明細書に記載のT細胞を含む薬学的組成物は、細胞 $10^4 \sim 10^9$ 個/kg体重、好ましくは細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個/kg体重であって、これらの範囲内のすべての整数値を含む投与量で投与することができる。また、T細胞組成物をこれらの用量で多回投与することもできる。細胞は、免疫療法において一般的に公知である輸注手法を用いることによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照）。特定の患者に関する最適な投与量および治療レジメンは、疾患の徴候に関して患者をモニタリングして、それに応じて治療を調節することによって、医療の当業者によって容易に決定されうる。

40

【0174】

ある態様においては、活性化されたT細胞を対象に投与し、続いてその後に血液を再び

50

採取して（またはアフエーシスを行って）、それ由来のT細胞を本発明に従って活性化した上で、これらの活性化および増大されたT細胞を患者に再び輸注することが望まれると考えられる。この過程を2、3週毎に複数回行うことができる。ある態様において、T細胞は10cc～400ccの採取血から活性化させることができる。ある態様において、T細胞は20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90ccまたは100ccの採取血から再活性化される。理論に拘束されるわけではないが、この複数回の採血／複数回の再輸注プロトコルを用いることは、T細胞のある特定の集団を選別するために役立つ可能性がある。

【0175】

本組成物の投与は、エアゾール吸引、注射、経口摂取、輸液、植え付けまたは移植を含む、任意の好都合な様式で実施することができる。本明細書に記載された組成物は、患者に対して、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内（i.v.）注射により、または腹腔内に投与することができる。1つの態様において、本発明のT細胞組成物は、患者に対して、皮内注射または皮下注射によって投与される。もう1つの態様において、本発明のT細胞組成物は、好ましくは静脈内注射によって投与される。T細胞の組成物を腫瘍内、リンパ節内または感染部位に直接注射してもよい。

【0176】

本発明のある態様においては、本明細書に記載のCARおよび方法、またはT細胞を治療的レベルまで増大させることが当技術分野において公知である他の方法を用いて活性化および増大された細胞を、MS患者に対する抗ウイルス療法、シドホビルおよびインターロイキン-2、シタラビン（ARA-Cとしても公知）もしくはナタリズマブ治療、乾癬患者に対するエファリズマブ治療、またはPML患者に対する他の治療などの薬剤による治療を非限定的に含む、任意のさまざまな妥当な治療様式とともに（例えば、前に、同時に、または後に）患者に投与する。さらなる態様において、本発明のT細胞を、化学療法、放射線照射、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレートおよびFK506など、抗体、またはCAMPATHなどの他の免疫除去薬、抗CD3抗体または他の抗体療法、サイトキシン、フルダリビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および照射と組み合わせて用いてもよい。これらの薬物は、カルシウム依存型ホスファターゼのカルシニューリンを阻害するか（シクロスポリンおよびFK506）、または増殖因子が誘導したシグナル伝達に重要であるp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）かのいずれかである（Liu et al., Cell, 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun., 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993）。1つのさらなる態様において、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、フルダラビンなどの化学療法薬、外部ビーム照射（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体のいずれかを用いるT細胞除去療法と組み合わせて（例えば、その前、同時またはその後に）、患者に投与される。もう1つの態様において、本発明の細胞組成物は、CD20と反応する薬剤、例えばリツキサンなどによるB細胞除去療法の後に投与される。例えば、1つの態様において、対象は、高用量の化学療法薬に続いて末梢血幹細胞移植を行う標準治療を受けることができる。ある態様においては、移植後に、対象は本発明の増大された免疫細胞の輸注を受ける。1つの追加的な態様において、増大された細胞は、手術の前または後に投与される。

【0177】

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

【実施例】

【0178】

実験例

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

【0179】

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

【0180】

10

実施例1：構成性のCAR T細胞の増殖

養子免疫療法は、宿主における移入T細胞の生着および増殖に依存する強力な抗腫瘍効果を有する。本明細書に提示された結果は、ある特定のキメラ抗原受容体（CAR）が、長期的な自律増殖を行う能力をT細胞に与えることを実証している。CD28およびCD3 エンドドメインをコードする第二世代CARによるヒトT細胞の形質導入は、TCRを介する単回刺激後に最長3か月にわたる継続的増殖をもたらした。この数的増大は抗原刺激に依存せず、外因性サイトカインの添加もフィーダー細胞の添加も必要としなかった。遺伝子アレイおよび機能的アッセイの両方により、長期的成長は構成性サイトカイン産生によって部分的に媒介されることが同定されている。マイクロアレイ分析により、構成性の増殖表現型を有するCAR T細胞の独特な分子シグネチャーが同定された。内因性IL-2座位の継続的発現は、初代T細胞ではこれまで報告されていない。CD28およびCD3 エンドドメインが、NFkB、Akt、ErkおよびNFATを介する構成性シグナル伝達として決定的であるように思われることが観察されている。さらに、CD28およびCD3 を介してシグナルを伝達するCARのすべてが、リガンド非依存的なT細胞増殖を継続させるわけではなかった。繁殖させたCAR+ T細胞は多様なTCRレパトリーを保ち、形質転換は観察されなかった。細胞表面でのCAR発現の密度は、そのCARが構成性または誘導性のいずれの成長表現型を有するかを判定する上での重要な変数である。外因性サイトカイン投与もフィーダー細胞も伴わずに高度なT細胞増殖を可能にするCARのデザインの同定は、構成性活性を有するCARを利用するためおよび回避するための両方に対して意味があると考えられる。

20

【0181】

30

本実施例に用いた材料および方法について以下に説明する。

【0182】

材料および方法

さまざまな真核生物プロモーターおよびCARを有するレンチウイルスベクターの構築

図1Aは、本研究に用いたCARの略図を示している。CARはすべて、ヒトCD19、メソテリンまたはc-Met抗原のいずれかを認識するscFvを含有する。抗CD19 FMC63 CD8 (Tammana et al., 2010, Hum Gene Ther 21:75-86)、抗メソテリンSS1 CD8、および抗メソテリンSS1 CD8 尾部CAR構築物 (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365) をコードさせるために、以前に発表された研究によるレンチウイルスベクターを用いた。c-Met 5D5 IgG4構築物を、PCRプライミングおよびオーバーラップ伸長を通じてSS1 IgG4およびCD19 IgG4 CAR構築物を作製するためのテンプレートとして用いた。PCRプライマーを介して制限部位を導入し、それにより、第三世代の自己不活性化レンチウイルスプラスミド中へのクローニングが可能になった。サイトメガロウイルス（CMV）および伸長因子-1（EF-1）プロモーター配列は、以前に構築されたプラスミドからPCRを介して増幅し、標準的な分子生物学手法を用いて、既存のCAR含有構築物中に導入した (Milone et al., 2009, Mol Ther 17: 1453-1464)。代表的なCARを以下に描写している。

40

【0183】

cMet IgG4 28z

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccacccgccttctgctgatccccgacatccagatgacc
agagccccagcagcgtgagcggcagcgtggcgaccgggtgaccatcacctgccggccagccagggcatcaaac
ctggctggcctggtatcagcagaagccccggcaaggcccccaagctgctgatctacgccgccagcagcctgaagagcgg
cgtgcccagccgggtttagcggcctctggctctggcgccgacttcacctgaccatcagcagcctgcagcccaggacttcg
ccacctactactgccagcaggccaacagcttccccctgaccttggcgccggaacaaaggtggagatcaagggcagcac
ctccggcagcggcaagcctggcagcggcgaggcagcaccaaagggccaggtgcagctggtgcagagcgggagccga
ggtgaagaagcctggcgccctccgtcaaggtgtcctgcgaggccagcggctacacctaccagctacggctcagctgg
gtgctggcagcaccaggccaggcctcgaatggatgggctggatcagcggcagcaacggcaacacctactacgcca
gaagctgcagggcagggcaccatgaccaccgacaccagcaccagcagcgcctacatggaactgcggagcctgagaa
gcgacgacaccgccgtgactactgcgccagggtgtacgccgactacgccgattactggggccaggccacctggtgac
cgtgagcagcagagcaagtacggccctccctgcccccttgcctgccccgagttcctgggcgaccacgcgtgttc
ctgtccccccaagccaaggacacctgatgatcagccggacccccgaggtgacctgtgtggtggtggacgtgtccca
ggaggacccccaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagccccgggagg
agcagttcaatagcactaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggactggctgaacggcaaggaatacag
tgaaggtgtccaacaagggcctgccagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagcctcgggagccc
caggtgtacacctgccccctagccaagaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaaggccttca
ccccagcagatcgcctgaggagtgaggagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctgg
acagcgacggcagcttctctgtacagccggctgacctggacaagagccgggtggcagggaggcaacgtctttagctg
ctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagagcctgagcctgtccctgggcaagatgttctgggtgc
tggctgtgtggggcgctgctggcctgctacagcctgctggtgacagtggccttcatcatctttgggtgaggagcaagc
gagcagactgctgcacagcactacatgaacatgacccccggaggcctggccccaccgggaagcactaccagcccta
cgccccctccagggttccgcccctaccggagccgggtgaagttcagccggagcggcagcggcctgcctaccagca
gggccagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggcccggaggaggagtagcagctgctggacaagcggagagggc
cgggacctgagatgggcccgaagccccggagaaagaacccccaggaggcctgtataacgaactgcagaaagacaa
gatggcccaggcctacagcagatcggcatgaaggcagcggagggcggggcaagggccacgagcggcctgtaccag
ggcctgagcaccgccaccaaggatactacgacgcctgcacatgcaggccctgccccccagatga (SEQ ID

10

20

30

NO:1)

【 0 1 8 4 】

SS1 IgG4 28z

atggccttaccagtgaccgccttgcctcctgccgctggccttgcctccacgccagccgggatcccaggtacaactg
cagcagtctgggctgagctggagaagcctggcgcctcagtgaaagatactcgaaggcttctggttactcattcactggct
acaccatgaactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggacttattactcctfacaatgggtcttagc
tacaaccagaagttcaggggaaggccacattaactgtagacaagtcaccagcacagcctacatggacctcctcagctg
acatctgaagactctgcagtctatttctgtgcaagggggggttacgacgggaggggtttgactactggggccaagggacc
acggtcaccgtctcctcaggtggagggcgggtcagggcggcgggtgctctagcgggtggatcggacatcgagctactca
gtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgaagtacatgcac
tggtagcagagaagtcaggcacctccccaaaagatggattatgacacatccaaactggctctggagtcaccaggtcgc
tfcagtggcagtggtctggaaactcttactctctcacaatcagcagcgtggaggctgaagatgatgcaacttattactgcca
gcagtggagtaagcaccctctcacgtacgggtgctgggacaaaagttggaatcaaaagcagcagagcaagtacggcct
ccctgcccccttgcctgccccgagttcctgggaggaccagcgtgtcctgttcccccaagcccaaggacacct
gatgatcagccggacccccgaggtgacctgtgtgggtggacgtgtccaggaggacccccgaggtccagttcaactgg
tacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagccccgggaggagcagttcaatagcacctaccgggtgggtg
tccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaggaatacaagtgaaggtgtccaacaaggcctgccca
gcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagcctcgggagccccaggtgtacacctgccccctagccaa
gaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaagggtcttaccacagcgacatcgccgtggagtggg
agagaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggcagcttcttctgtacag
ccggtgaccgtggacaagagccgggtggcaggaggcaacgtctttagctgtccgtgatgcacgaggccctgcacaac
cactacaccagaagagcctgagcctgtccctgggcaagatgttctgggtgctggtcgttgggcgccgtgctggcctgc
tacagcctgctggtgacagtgccctcatcatctttgggtgaggagcaagcggagcagactgctgcacagcgactacatg
aacatgacccccggaggcctggccccaccggaagcactaccagccctacgccccctccagggttccgccctacc
ggagccgggtgaagttcagccggagcggcagccctgcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacgagctg
aacctgggcccggaggagggtacgacgtgctggacaagcggagaggccggaccctgagatgggaggcaagcccc
ggagaaaagaacccccaggaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgagcctacagcgagatggc
atgaaggcgagcggaggcggggcaagggccacgacggcctgtaccaggcctgagcaccgccaccaaggatact
acgacgcctgcacatgcaggcctgccccagatga (SEQ ID NO:2)

10

20

30

【 0 1 8 5 】
CD19 IgG4 28z

atggccttaccagtgaccgccttgcctcctgccgctggccttgcctccacgccgccaggccggacatccagatgacaca
gactacatcctccctgtctgcctcctctgggagacagagtcacatcagttgcaggcaagtcaggacattagtaaatttaa
attggtatcagcagaaccagatggaactgtfaaacctctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaagg
ttcagtgccagtggtctggaacagattattctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccactacttttgccaa
cagggtataacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacaggtggcgggtggctcgggcggtggt
gggtcgggtggcggcgatctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctgggtggcgcctcacagagcctgtcc
gtcacatgcactgtctcaggggtctcattaccgactatggtgtaagctggattcggcagcctccacgaaagggtctggagt
ggctgggagtaatatggggtagtgaaccacatactataattcagctctcaaatccagactgacatcatcaaggacaactc
caagagccaagttttcttaaaaatgaacagctgtcgaactgatgacacagccatttactactgtccaaacattattactacgg
tggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgtctcctcaagcagcagagcaagtacggccctc
cctgcccccttgcctgccccgagttctgggggaccaccagcgtgttctgttcccccaagccaaggacacctg
atgatcagccggacccccgaggtgacctgtgtggtggtggacgtgtcccaggaggacccccgaggtccagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagccccgggaggagcagttcaatagcacctaccgggtggtgtc
cgtgctgacctgctgcaccaggactggctgaacggcaaggaatacaagtgtaaagggtccaacaaggcctgcccagc
agcatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagcctcgggagccccaggtgtacacctgccccctagccaaga
ggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaagggttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggag
agcaacggccagccccgagaacaactacaagaccacccccctgtgtgacagcgacggcagcttctctctgtacagcc
ggctgacctggacaagagccggtggcaggagggaacgtctttagctgtccgtgatgcacgaggccctgcacaacca
ctacaccagaagagcctgagcctgtccctgggcaagatgttctgggtgctggtcgttggcggcgtgctggcctgcta
cagcctgctggtgacagtgcccttcatctctttgggtgaggagcaagcggagcagactgctgcacagcgactacatgaa
catgacccccggaggcctgccccaccgggaagcactaccagccctacgcccctcccagggttccggcctaccg
gagccgggtgaagttcagccggagcggcagccccctgctaccagcagggccagaaccagctgtacaacgagctga
acctgggcccggaggaggaggtacgacgtgctggacaagcggagaggccgggaccctgagatgggcccgaagcccc
ggagaaagaacccccaggaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggc
atgaaggcgagcggaggcggggcaagggccacgacggcctgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacct
acgacgcctgcacatgcaggcctgccccccagatga (SEQ ID NO:3)

10

20

30

【 0 1 8 6 】
マイクロアレイ試験

試料収集。3人の正常ドナー由来のヒトCD4+ T細胞を刺激して、c-Met IgG4またはCD19
CD8 CAR構築物のいずれかを形質導入した。細胞ペレットの収集および凍結は、すべて
の試料について刺激前の第0日、静置下での第6日および第11日に行い、c-Met IgG4 CARに
ついては第24日にも行った。

40

【 0 1 8 7 】

マイクロアレイ標的の調製およびハイブリダイゼーション。マイクロアレイサービスは
、Agilent BioanalyzerおよびNanodrop分光測定による全RNA試料の品質管理検査を含め、
UPenn Microarray Facilityによって提供された。プロトコールはすべて、Affymetrix Ge
neChip Expression Analysis Technical Manualに記載された通りに実施した。手短に述
べると、100ngの全RNAを、ポリ(T)オリゴマーおよびT7プロモーター配列を組み入れた
ランダムオリゴマーによってプライミングを行った逆転写酵素を用いて、第一鎖cDNAに変
換させた。続いて、第二鎖cDNAの合成を、各転写物の線形増幅のためのT7 RNAポリメラー
ゼによるインビトロ転写によって行い、その結果得られたcRNAをcDNAに変換させ、断片化

50

し、Bioanalyzerによって評価して、ターミナルトランスフェラーゼ末端標識によってピオチン化した。cRNA収量は36~89 µgの範囲であり、cDNAをAffymetrixハイブリダイゼーション用カクテルに添加し、99 に5分間加熱した上で、Human Gene 1.0ST GeneChips (Affymetrix Inc., Santa Clara CA) に対して45 で16時間ハイブリダイズさせた。続いてマイクロアレイを低ストリンジェンシー (6X SSPE) および高ストリンジェンシー (100mM MES、0.1M NaCl) で洗浄し、ストレプトアビジン-フィコエリトリンで染色した。共焦点スキャナーを用いて、570nmでの励起後に蛍光シグナルを収集した。

【0188】

初期データ解析。Affymetrix Command ConsoleおよびExpression Consoleを、標的とした遺伝子について発現レベルを定量するために用いた；Affymetrixによって提供されたデフォルト値をすべての分析パラメーターに適用した。各プローブについて、辺縁ピクセルを除外し、75パーセント以内のピクセルの平均強度を算出した。16箇所のマイクロアレイセクターのそれぞれで生じたプローブ強度の最低から2%の平均値をバックグラウンドとして設定し、そのセクターにおけるすべての特徴物から差し引いた。陽性対照および陰性対照用のプローブセットはExpression Consoleで検討し、Facility品質管理パラメーターが正常範囲内にあることを確かめた。標的とした各遺伝子に関するプローブについて平均を求め、RMAアルゴリズムを用いてアレイ間標準化を行った。

10

【0189】

末端テロメア制限断片長の分析

テロメア制限断片長分析は、本質的には記載されている通りに行った (Lukens et al., 2009, *Alzheimers Dement* 5:463-469)。手短に述べると、ゲノムDNAの2 µgをRsaI + HinfIで消化して、0.5%アガロースゲル上で分離させ、これを次に乾燥させ、³²P標識 (CCCTAA) 4オリゴヌクレオチドによってプローブ検索した。洗浄後に、試料をPhosphor imagerによって可視化した。

20

【0190】

統計分析

マイクロアレイのコアから得られた生データを、ロバストマルチチップ平均法 (robust multichip average) (RMA) によって標準化した。分析は、試料採取日、投与群およびドナーIDを因子とする三元混合モデルANOVAを用いて行った。試料と収集日との相互作用項を加えた。p値を考察する多重対対比 (multiple pairwise contrast) とともに、倍数変化を決定した。すべてのp値について、本発明者らは、Partek Genomic Suite (Partek) に実装されているような、Benjamini and Hochbergの方法を用いるFDR補正によるp値を計算した。転写因子およびサイトカインのドットプロットについては、標準化絶対log(2) 遺伝子発現強度をプロットした。クラスター分析は、平均連結法による標準化log(2) 遺伝子発現強度の中央値のユークリッド距離を用いて行った。成長曲線、MFIおよび生着プロットは、Prism (GraphPad Software) を用いてプロットした。エラーバーはすべて、標準偏差を表す。インビボ生着試験については両側Mann-Whitney検定を行った。

30

【0191】

細胞株および培養

血液試料は、末梢血CD4+ T細胞がRosetteSep Kit (Stem cell Technologies) を用いて陰性単離されている、ペンシルベニア大学のHuman Immunology Coreから入手した。細胞は、37 および5% CO₂のインキュベーター内で、R10 (10% FCS、100U/mlペニシリン、100 µg/ml硫酸ストレプトマイシン、10mM HEPESを加えたRPMI 1640培地) 中にて培養した。刺激のために、CD4+ T細胞を、CD3およびCD28に対する抗体をコーティングした活性化ビーズとともに、1:3の細胞-ビーズ比で培養した。刺激からおよそ24時間後に、CAR構築物を含有するレンチウイルスベクターによる細胞の形質導入を行った。T細胞をモニターし、0.75 × 10⁶個/mlの濃度に保ち、MCVが175未満であれば休止状態にあると判断した。M30およびNCI-H522腫瘍株を細胞死滅アッセイに用いた。M30細胞株 (Crisanti et al., 2009, *Mol Cancer Ther* 8:2221-2231) は、個々の患者に由来する中皮腫瘍組織からペンシルベニア大学で得られ、E培地 (10% FCS、1 × ITES、10mM HEPES、0.5mMピルビン酸

40

50

ナトリウム、0.1mM MEM NEAA、100ug/mLのPen/Strep、1ng/mL EGF、18ng/mL HC、0.1 nM T3、RPMI中)中で培養した中皮腫瘍であり、一方、NCI-H522(腺癌)は、National Cancer Instituteで得られ、R10中で培養したものである。NFATコンセンサス結合配列を保有する最小プロモーターの制御下にあるd2EGFPを含有するプラスミド(pNFAT-d2EGFP)が安定的にトランスフェクトされたJurkat細胞株は、Arthur Weiss氏(カリフォルニア大学、San Francisco)に寄贈いただいた。

【0192】

フローサイトメトリーおよび抗体

CAR表面染色は、FACS緩衝液(3%ウシ胎仔血清を有するPBS)中で、ビオチン結合ポリクローナル抗体(Jackson ImmunoResearch)を用いて行った。cMetIgG4、SS1 IgG4およびCD19 IgG4に対してはウサギ抗ヒトIgG(H+L)を用い、一方、SS1 CD8a、CD19 CD8aおよびSS1 尾部に対してはヤギ抗マウス(Fab')₂を一次用として用いた。CARに対する二次染色は、ストレプトアビジン-APCeFluor780(eBioscience)を用いて行った。細胞表面マーカー分析は、CD25 PerCp-Cy5.5(eBioscience、クローンBC96)、CD70 PE(BD、クローンKi-24)、PD-1 PerCP-eFluor710(eBioscience、クローンJ105)、CD45RO eFluor450(eBioscience、クローンUCHL1)、CD27 v450(BD、クローンM-T271)、CD28 FITC(eBioscience、クローンCD28.2)、CD62L PE(eBioscience、クローンDREG-56)、CCR7 FITC(BD、クローン150503)、Crtam APC(Biolegend、クローンCr24.1)およびc-Met PE(R&D systems、クローン95106)を推奨濃度で用いて行った。c-Met抗原染色はモノクローナル抗ヒトHGF R/c-MET-PE(R&D、クローン番号95106)を用いて行い、メソテリン発現は、一次モノクローナルマウス抗ヒトCAK1(Covance)を1:50で用いた後にポリクローナルヤギ抗マウスPE(BD)を1:100で用いて分析した。試料はLSR II(BD)上で分析し、FlowJoソフトウェア(TreeStar)を用いて分析した。

【0193】

PhosFlowを第6日、10日および25日に行った。細胞をBD cytofix緩衝液(BD)を用いて37Cで10分間かけて固定し、その後にBD Phosflow Perm緩衝液III(BD)を4Cで30分間用いて透過処理を行った。PE抗Erk1/2(pT202/pY204)(BD、クローン20A)、PE結合抗Akt(pS473)(BD、クローンM89-61)、PE結合抗NF-kB p65(pS529)(BD、クローンK10-895.12.50)またはPE結合抗S6(pS235/pS236)(BD、クローンN7-548)を製造元の推奨濃度で用いて、細胞を暗所にて室温で30分間かけて染色した。陽性対照は、固定前にPMA/イオノマイシンを用いて10分間刺激した各群からの試料とし、一方、陰性対照は、PE結合IgG2b アイソタイプ対照(BD、クローン27-35)を用いて染色した完全刺激T細胞とした。試料をLSR II(BD Biosciences)に投入し、FlowJoソフトウェア(TreeStar)を用いて分析した。

【0194】

サイトカイン測定

本明細書の他所に記載したように、CD4⁺ T細胞にCAR構築物による形質導入を行った。第6日、10日および30日に100万個の細胞を各群から採取し、ペレット化し、R10中で洗浄した上で、新鮮な培地中に1×10⁶個/mLでプレーティングした。24時間の時点で上清を収集し、-80℃で凍結させた。可溶性サイトカイン因子の定量は、Luminexビーズアレイ技術、およびLife Technologiesから購入したキット(Invitrogen 30-plex)を用いて行った。アッセイは製造元プロトコールに従って行い、3倍希釈系列を用い、検査SOPに従った上で、9点の標準曲線を作成した。各試料は、1:3希釈で二重反復試験によって評価した；二重反復測定に関する算出%CVは、ほとんどの場合に5%未満であり、常に15%未満であった。データはFlexMAP-3Dに収集した上で、XPonent 4.0ソフトウェアおよび5パラメーターのロジスティック回帰分析を用いて解析した。標準曲線の定量範囲は80~120%(観測値/期待値)の範囲によって決定した。

【0195】

馴化培地の移入

c-Met IgG4形質導入T細胞の培養物からの上清を第56日に収集し、70µmフィルターに通

10

20

30

40

50

して濾過した上で、10mLアリコートとして-80 で凍結させた。第56日の培地を解凍して、培養下にある非刺激ナイーブCD4+ T細胞に添加して、出発培地に比してc-Met IgG4上清が12.5%、25%または50%の最終濃度に達するようにした。対照として、100IUのIL-2を伴うかまたは伴わない培地、ならびに、第0日に初回刺激および第12日に再刺激を行って培養下に保ったCD3 / CD28ビーズ刺激細胞も含めた。平均細胞体積を決定して、対照群におけるIL-2濃度および本明細書中の他所に記載した適切なc-Met IgG4培地移入比が維持されるように細胞培地を2日毎に再調整した。

【0196】

V 多様性の決定

本明細書中の他所に記載したように、CD4+ ヒトT細胞を単離し、刺激して、c-Met IgG4 CARによる形質導入を行った。対照として、ドナーを一致させた非形質導入細胞を同時に刺激し、増大させた。非形質導入対照は、培養下に維持するためにさらに2回のビーズ刺激を必要とした。細胞をD0、D13およびD34に凍結保存した。細胞を同時に解凍して、一晚静置した。TCR V 分析を、以下のV ファミリーに対して特異的な直接結合抗体を含有するIOtest Beta Mark TCR Vキット (Beckman Coulter) を用いて行った: 1、2、3、4、5.1、5.2、5.3、7.1、7.2、8、9、11、12、13.1、13.2、13.6、14、16、17、18、20、21.3、22および23。試料をLSR II (BD) に投入し、その後に全集団のパーセントを決定するためにFlowJo (TreeStar) における分析を行った。

【0197】

細胞傷害性アッセイ

指定のCARをコードするmRNAによるエレクトロポレーションを行ったCD4+およびCD8+ ヒトT細胞を、インビトロ死滅のために用いた。CD19 CD8 およびc-Met IgG4 CARを、以前に記載されたpGEM.64Aをベースとするベクター (Zhao et al., 2006, Mol Ther 13: 151-159) 中にサブクローニングした。SS1 CD8 CAR mRNAは、記載された通りに作製した (Zhao et al., 2010, Cancer Res 70:9062-9072)。置き換えられたCAR cDNAを直接シーケンシングによって確認し、SpeI消化によって線状化した後、RNAIVTを行った。キャップドIVT RNAの作製には、mScript RNA System (Epicentre, Madison, WI) を用いた。IVT RNAをRNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) を用いて精製し、精製されたRNAをRNase非含有水の中に1~2mg/mlで溶出させた。ヒトT細胞は、記載された通りにCD3 / CD28ビーズによって刺激した (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365)。第0日に、刺激されたT細胞をOpti-MEMで3回洗浄し、Opti-MEM中に最終濃度 $1 \sim 3 \times 10^8$ 個/mlで再懸濁させ、その後にエレクトロポレーションを行った。その後に、刺激されたT細胞を10 μ g / 0.1mlのIVT RNA (前述の通り) と混合して、2mmキュベット (Harvard Apparatus BTX, Holliston, MA) 内で、ECM830 Electro Square Wave Porator (Harvard Apparatus BTX) を用いてエレクトロポレーションを行った。続いて、腫瘍株をトリプシンを用いて採集し、6ウェル培養皿に 0.2×10^6 個/mLでプレーティングした。T細胞のエレクトロポレーションおよび腫瘍プレーティングの24時間後に、T細胞と標的細胞とを、エフェクター: 標的 (E:T) 比を高めながら6ウェルプレート中で一緒にし、その横にT細胞のない対照も用意した。細胞を37 で18時間インキュベートした。インキュベーション後に細胞を収集し、ウェルのトリプシン処理を再び行い、繰り返し洗浄して、すべての腫瘍およびT細胞を収集した。細胞混合物を、抗EpCAM (BD、クローンEBA-1) を有する腫瘍、抗CD45 (BD、クローン2D1) および7-AAD (Invitrogen) を有するT細胞に関して染色した。細胞を、試料間のデータ収集について標準化するための計数ビーズ (Invitrogen) を含有する400uLのFACS緩衝液中に再懸濁させた。続いて試料を35 μ mフィルター (BD Falcon) に通して濾過し、分析のために氷上に置いた。細胞をLSR II (BD) に投入し、すべての試料について1500件のビーズイベントを収集することによって収集を行った。分析は、FlowJo (TreeStar) におけるEpCAM(+), CD45(-) および7-AAD(-) 細胞に関するゲーティングによって行った。E:T比を高めていく各実験条件毎に、T細胞なしの対照群における生細胞の合計を除算することによって、溶解率を計算した。

【0198】

10

20

30

40

50

インビボT細胞存続性実験

動物実験はすべて、ペンシルベニア大学の施設内動物管理使用委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) によって承認された。NSGマウス (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl} / SzJ) を生着実験および存続性実験のために用いた。マウスはマイクロアイソレーターケージ内で特定病原菌非汚染条件下で飼育し、オートクレーブ処理した食餌および酸性水を自由に摂取させた。両方の性別の動物をおよそ20週齢で実験に用いた。前記の通りに、ヒトCD4+ T細胞を単離し、刺激して、形質導入を行った。マウス1匹当たり合計10 × 10⁶個の細胞を尾静脈注射によって末梢注射し、そのうち50%をc-Met IgG4群におけるCAR(+)とした。末梢血採取を60日後に行い、絶対的定量のために抗ヒトCD45 APC-H7染色を用いてTruCount (BD) を行った。試料をLSR II (BD Bioscience) 上で分析し、FlowJo (TreeStar) を用いて定量を行った。

10

【 0 1 9 9 】

DNA単離およびQ-PCR分析

Q-RT / PCR分析 : RNAqueous RNA単離キット (Ambion) を用いて細胞株からRNAを単離し、iScript cDNA合成キット (Bio-Rad) を用いてcDNAを合成した。ABI Taqmanに基づく技術、および、エクソン / イントロン境界にまたがる、ABI推奨の以下の遺伝子特異的プライマープロブセットを用いて、試料をc-met、メソテリンおよびPP1B (ハウスキーピング転写物) の発現に関して分析した : c-met : Hs01565584_m1^{*} ; メソテリン : HS00245879_m1^{*} およびPP1B : Hs00168719_m1^{*}。増幅反応はすべて、ABI 7500 FAST装置 (ABI-Life technologies) および確立された検査プロトコールを用いて行った。各転写物を三重反復試験で評価した。各増幅反応に関するCt値は予め確立されたアッセイ特異的閾値を用いて決定し、Ct値を記録するためには反復試験物の少なくとも2 / 3で%CVが15%未満であることを必要とした。平均Ct値を計算して報告した。各転写物に関するRQ (相対定量) 値は、以下の式に従って決定した : $RQ = 2^{-Ct}$ 、ここで $Ct = -Ct_{試料} - Ct_{参照基準}$ であり、 $-Ct_{試料} = Ct_{試料} - Ct_{試料標準化物}$ であり、 $-Ct_{参照基準} = Ct_{参照基準} - Ct_{参照基準標準化物}$ である (Pfaffl, 2001, Nucleic Acids Res 29(9):e45)。すべての分析について、卵巣癌細胞株OV79 (いずれのMAGE-A3についても陽性) を参照基準試料として利用した。卵巣癌由来細胞株OV-79は以前に記載されている (Bertozzi et al., 2006, In Vitro Cell Dev Biol Anim 42(3-4):58-62)。

20

【 0 2 0 0 】

この実験例の結果について、以下に詳述する。

30

【 0 2 0 1 】

キメラ抗原受容体の構築および特性決定

サロゲート抗原認識を媒介する、抗体フラグメントの下流でCD28およびCD3 を発現するCARが、非常に数多く作製されている (Geiger et al., 2001, Blood 98:2364-2371 ; Arakawa et al., 2002, Anticancer Research 4285-4289 ; Haynes et al., 2002, J Immunol 169(10):5780-6 ; Maher et al., 2002, Nature Biotechnology 20:70-75 ; Finney et al., 2004, J Immunol 172:104-113 ; Gyobu et al., 2004, Cancer Res 64:1490-1495 ; Moeller et al., 2004, Cancer Gene Ther 11:371-379 ; Teng et al., 2004, Hum Gene Ther 15:699-708 ; Friedmann-Morvinski et al., 2005, Blood 105:3087-3093 ; Pule et al., 2005, Molecular Therapy 12:933-941 ; Westwood et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102:19051-19056 ; Willemsen et al., 2005, J Immunol 174:7853-7858 ; Kowolik et al., 2006, Cancer Res 66: 10995-11004 ; Loskog et al., 2006, Leukemia 20:1819-1828 ; Shibaguchi et al., 2006, Anticancer Res 26:4067-4072 ; Teng et al., 2006, Human Gene Therapy 17:1134-1143 ; Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13:5426-5435)。これらの導入遺伝子が、異なる形で、異なる施設の異なる研究者によって構築されたことを考慮すれば、これらのCARが、臨床利用のために最適化された共通の発現系および標準化された培養系を用いてどのような性能を発揮するかは未だに不明である。このため、c-Met、メソテリンおよびCD19を標的とするCARのセットを、初代ヒトCD4+ T細胞において発現させた (図1A)。これらのCARは、IgG4またはCD8 ヒンジドメイン、CD28また

40

50

はCD8 膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3 で構成されるシグナル伝達ドメインをコードしていた。短縮型シグナル伝達ドメインを有するCAR、および以前の臨床試験に用いられたCD19 4-1BB : CD3 CAR (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-733) を、対照として利用した。CARはすべて、EF-1 プロモーターを用いて構成性に発現させ、ある典型的な実験では、細胞の50%がまずCARを発現し、形質導入後の第6日までに表面上の発現が同程度のレベルを有するようになった(図1B)。c-Met CAR T細胞は特異的かつ強力な細胞傷害性を有し(図8)、以前の諸研究により、CD19およびメソテリンに対して特異的なCARが同程度に強力なエフェクター機能を有することが示されている(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365; Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-1464)。

10

【0202】

CD28およびCD3 を有するキメラ抗原受容体は構成性のT細胞増殖を誘導しうる

以前の諸研究により、CAR T細胞輸注後の抗腫瘍効果には、養子移入後のインビボでのCAR T細胞の継続的増大が必要なが示唆されている(Kalos et al., 2011, Sci Transl Med 3:95ra73)。CAR T細胞の増殖能を明らかにするために、CD4+ T細胞を抗CD3およびCD28ピーズによって活性化し、CARをコードするレンチウイルスベクターによる形質導入を行い、続いて外因性サイトカインおよびフィーダー細胞の非存在下で、さらなる刺激を伴わずに繁殖させた。予想外のことに、CAR T細胞集団のいくつかの構成性増殖が観察された(図2A、左)。指数的成長が、CD28およびCD3 シグナル伝達ドメインをコードするc-Met IgG4構築物による形質導入を受けたCAR T細胞において、60~90日間にわたって観察された(図2Aおよび2B)。同様に、キメラCD28およびCD3 ドメインを通じてシグナルを伝達する抗メソテリンSS1 : IgG4およびSS1 : CD8 CARを発現するT細胞も、外因性増殖因子の補充に依存しない継続的増殖を伴った。抗原刺激に依存せず、かつ外因性サイトカインおよびフィーダー細胞の添加を必要としないCD8+ T細胞の長期的増殖も観察された(図2C)。しかし、実験変数を最小限にするために、本研究における残りの実験はバルクCD4+ T細胞を用いて行った。

20

【0203】

対照的に、他のCAR T細胞集団を有する培養物では、初期期間は同じ速度の指数的増殖がみられたが、第10日の後には成長速度が低下し、20日以内に培養物の死滅が続いて起こった(図2Aおよび2B)。簡潔でわかりやすくするために、以後は、構成性増殖を誘導するCAR構築物を「持続的CAR」と称し、一方、以前の報告に類似する誘導性増殖を呈するCARを「古典的CAR」と称する。

30

【0204】

代謝状態および細胞周期の尺度として、平均細胞体積を頻回な間隔でモニターした(図2A、右)。さまざまなCAR構築物による形質導入を受けたすべてのT細胞培養物が、ほぼ190flの休止(G0)細胞体積から、培養第6日までにほとんど600fl近くに増加し、これはDNA合成の誘導および細胞数の指数的増加と一致した。しかし、古典的CAR T細胞および非形質導入T細胞は急速に休止細胞体積に戻った一方、持続的CAR T細胞(c-Met IgG4、SS1 IgG4およびSS1 CD8)は休止細胞体積まで戻ることはなく、これは継続的な細胞増殖に一致した。培養第20日の時点で、持続的CARおよび古典的CARの培養物における平均細胞体積はそれぞれ、ほぼ400flおよび180flであった。注目されることとして、CAR T細胞の長期的増殖は、サロゲートリガンドcMetおよびメソテリンが活性化ヒトCD4+ T細胞の表面上に検出可能なレベルで発現されなかったことからみて、リガンド非依存的であり(図9)、これは以前の報告と一致する(Skibinski et al., 2001, Immunology 102:506-514)。Q-PCR分析では、休止CD4 T細胞においてメソテリンおよびc-Metのいずれの転写物も検出されなかった。しかし、モック形質導入を行うか、または持続的CARによる形質導入のいずれかを行って、長期的成長を導く条件下で培養した活性化T細胞は、c-Metに対して特異的な、極めて微量ではあるが検出可能な転写物を発現した一方、メソテリン転写物は検出不能なままであった。c-Metおよびメソテリン特異的CARの両方が持続的成長の表現型を呈したことを考慮すれば、活性化T細胞における低レベルのc-Met発現がT細胞の継続的成長の

40

50

ために必要である可能性は低い。加えて、培養物における同胞死滅 (fratricide) が存在しないことも、リガンド非依存的な持続的成長に一致する。

【0205】

持続的CARおよび古典的CARはいずれも、抗CD3 抗体によってプローブ検索したウエスタンブロットによって判定された予想されるサイズで移動した。より長いIgG4ヒンジをコードするCARは、CD8 ヒンジをコードするCARよりも緩徐に移動した (図10)。非還元条件下では、これらのCARはホモダイマーおよびモノマーとして存在する。CD28:CD3 CARによって媒介される持続的なサイトカイン非依存的ポリクローナルCD4+ T細胞増殖は内因性TCRの特異性に依存せず、培養中にT細胞集団が多様なままであったことからみてクローン増殖の結果ではなかった (図11)。さらに、上記の結果は、少なくとも10人の異なる健康ドナーから得られたT細胞上で再現性があった。

10

【0206】

IL-2ならびに多種多様なサイトカインおよびケモカインの構成性発現

いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、CARが初代T細胞の長期的な構成性増殖を媒介するという観察所見は以前には報告されていなかった。この現象の機序の解明に着手するために、培養下で通常でない長寿命を継続する可能性のある培養物からの上清中の、さまざまなサイトカインおよび他の免疫関連因子のレベルを決定するための実験をデザインした。タンパク質レベルでの分析により、持続的CARからの培養上清は、Th1およびTh2 CD4+ T細胞の両方に特徴的なサイトカインを高レベルで含有することが判明した (図3A)。対照的に、古典的CAR T細胞の培養物は、培養時間に伴って減少する低レベルのサイトカインを有していた。持続的CARの培養物におけるサイトカイン濃度は古典的CARの培養物における濃度よりも100倍~1000倍超高かったため、この違いの規模は大きかった。持続的CAR T細胞培養物からの第56日馴化培地の移入が非刺激ナイーブCD4+ T細胞の活性化を誘導したことからみて、これらのサイトカインは増殖に寄与した可能性が高い (図3B)。これらの結果は転写レベルでも確認され、構成性に増殖するCAR T細胞から単離された細胞では、古典的CAR T細胞と比較して、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-13、IL-3およびGM-CSFの転写物の顕著な発現がみられた (図4A)。この所見に一致して、初期にはCAR T細胞とCARを発現しないT細胞との混合物であった培養物において、持続的CAR T細胞の成長が正常T細胞を上回ることも観察された (図5A)。サイトカインおよびケモカインの継続的転写および分泌に加えて、持続的CAR CD4+ T細胞ではグランザイムBおよびパーフォリンのレベルも上昇しており (図4A)、これは、観察される (図8) とともに、以前にも報告されている (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365)、強力な細胞傷害性エフェクター機能に一致した。

20

30

【0207】

構成性のCAR T細胞増殖の分子シグネチャー

長期的なCAR T細胞増殖の機序についてさらに調査するために、遺伝子アレイ分析を行う実験をデザインした。T細胞の極性化、成長および生存に關与する、鍵となる転写因子および遺伝子の分子シグネチャーを図4Bに示している。持続的CAR CD4+ T細胞では、マスター転写因子であるT-bet (TBX21)、EomesおよびGATA-3が誘導され、高レベルに維持された。対照的に、FoxP3およびRORCは、持続的CAR T細胞において、非形質導入活性化T細胞および一過性T細胞増殖表現型を有するT細胞と同等なレベルで発現された。早くも第11日の時点で、Bcl-xLは、持続的CAR T細胞において、古典的CARおよび他の対照T細胞集団と比較して高度に発現され ($p < 0.001$)、このことはアポトーシスに対する耐性ならびに増殖強化がCAR T細胞の長期的増殖の原因になったことを示唆する。持続的CAR T細胞はまた、終末分化したCD4+ T細胞および老化CD4+ T細胞においてしばしば発現される遺伝子であるKLRG1の低レベル発現を維持しており (Voehringer et al., 2002, Blood 100:3698-3702)、このことはそれらの増殖能をさらに強く示すものである。

40

【0208】

マイクロアレイデータセットの階層的クラスタリング分析により、構成性のT細胞増殖を伴うCAR T細胞が独特な分子シグネチャーを有することが指し示されている (図6)。第

50

11日までに、長期的成長表現型を有するcMet IgG4 CAR T細胞が樹状図において密なクラスターを形成することが認められるようになる。対照的に、ナイーブT細胞は、培養第11日の時点で、非形質導入T細胞および非継続的な成長表現型を有する古典的CARと最も密に関連していた(図6A)。同様に、すべての群からの完全に活性化した第6日のT細胞は一緒にクラスターを形成するが、一方、持続的CAR構築物を発現するT細胞は第11日までに分岐して、第6日の時点で非形質導入T細胞または古典的CAR T細胞において発現される遺伝子とは異なる独特なRNAシグネチャーを呈するようになる(図6B)。

【0209】

持続的CAR T細胞(c-Met IgG4)および古典的CAR T細胞(CD19 CD8)において差異を伴って発現される遺伝子を、2つの集団の関係を描写するためにヒートマップとしてプロットした(図6C)。培養第11日の時点で、5倍という厳格なカットオフを用いて分析したところ、持続的CARでは古典的CAR T細胞と比較して183個の遺伝子がアップレギュレートされ、36個の遺伝子がダウンレギュレートされていた。最も注目されることとして、持続的CAR T細胞は、細胞周期および多様なサイトカイン群の制御に関連する遺伝子に富んでいる。

【0210】

持続的CARによるシグナル伝達の構成性誘導

持続的CAR依存的でリガンド非依存的なT細胞成長の機序についてさらに調査するために、T細胞の活性化および成長に関連するとみられる正規のシグナル伝達経路を調べる実験をデザインした(図5B)。古典的CARまたは持続的CARを発現するT細胞は、培養第6日の時点で、Akt、ERK1/2、NF- κ B p65(ReIA)およびS6のリン酸化に関して同程度のレベルであった。対照的に、培養第10日および第25日の時点では、持続的CAR T細胞のみが、Akt pS473、ERK1/2 pT202およびpY204、ならびにReIA pS529の継続的活性化を有していた。しかし、細胞における持続的CARの発現は、S6 pS240リン酸化に対してわずかな影響しか及ぼさず、このことは、CARがT細胞シグナル伝達経路の普遍的活性化を導くのではないことを指し示している。この構成性シグナル伝達を、継続的サイトカイン分泌を実証した上記の結果と総合すると、CARの細胞内因性の効果および外因性の効果の両方が初代ヒトT細胞の長期的増大を導きうることを示唆される。

【0211】

上記の実験では、初代ヒトT細胞を抗CD3およびCD28ビーズによる単回の活性化に供し、続いて外因性サイトカインを添加することなしに培養した。この培養方法を選んだのは、それが臨床試験に用いられており、かつ、高効率なCAR発現を媒介するためには初期活性化が必要なためである。抗CD3および抗CD28シグナル伝達によるT細胞の初期活性化が、CARによるその後の構成性シグナル伝達のために必要か否かを明らかにするために、本発明者らは、NFATプロモーターの制御下でGFPを安定的に発現するJurkat T細胞株においてさまざまなCARを発現させた(図12)。形質導入3日後に細胞を分析したところ、初代T細胞における成長表現型によって分類された持続的CARのみが、Jurkat細胞における構成性のNFAT活性化を導いた。CARを表面に発現したJurkat細胞のみがGFP発現を有していたことからみて、この効果は細胞内因性であった。対照的に、古典的CAR(短縮型サイトゾルドメインを有するSS1 CAR、およびCD19 CAR)の発現は、Jurkat細胞における構成性のNFAT活性化を導かなかった。

【0212】

表面発現のレベルは古典的CARまたは持続的CAR T細胞の表現型に寄与する

初代T細胞において種々の真核生物プロモーターの制御下で発現されるCARは、表面発現レベルの点で多種多様であることが示されている(Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-1464)。表面発現のレベルが持続的CAR表現型に寄与するか否かを明らかにするために、EF-1 またはCMVプロモーターを用いてCARを発現させ、より高度または軽度の発現を生じさせた(図7A)。c-Met CARは、EF-1 の制御下にある場合に持続的表現型を呈した(図7Bおよび7C)。対照的に、同じCARは、CMVプロモーターの制御下で発現された場合には古典的CAR表現型に復帰し、表面発現のおよそ5分の1への減少がもたらされた。しかし

、いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、鮮明な表面発現だけでは持続的CAR表現型のために十分ではないと考えられている。すなわち、細胞表面での高レベルの発現は、持続的CAR表現型のために必要ではあるが十分ではないと考えられる。

【0213】

持続的CARは形質転換を伴うことなくT細胞の分化および増殖を誘導する

構成性増殖を伴うCAR T細胞をさらに特徴づけるために、多色フローサイトメトリーを用いた。活性化および分化と関連性のあるT細胞分子の発現を、CARを発現するかまたは発現しない細胞の培養物において検討した(図13)。さらに、非形質導入T細胞を、抗CD3およびCD28ピースによる単回の刺激後に経時的に追跡した(図14)。これらの結果は、CAR T細胞の漸進的濃縮が観察され、その結果、培養第23日までに本質的にすべての細胞がCARを発現したことを示している。これはすべての時点でCAR T細胞上でのCD25の鮮明な発現を伴っていたが、一方、随伴する非形質導入対照培養物では第14日までにCD25が検出不能となった(図14)。同様に、CD70はCAR T細胞培養物において漸進的により高い頻度で発現されたが、これは対照培養物では観察されない特徴であった。対照的に、CD70のリガンドであるCD27は対照培養物で発現されたものの、CAR T細胞培養物ではCD27は漸進的に減少した。CD28、CD62LおよびCCR7の発現は対照培養物において維持されたものの、持続的CAR T細胞の多くはこれらの分子に関して不明瞭または陰性であった。対照的に、PD-1は対照培養物において第6日に一過性に発現され、一方、CAR T細胞はPD-1の発現を保った顕著な細胞部分集団を有した。さらに、細胞極性の調節と関連性のある分子であるCrtam (Yeh et al., 2008, Cell 132:846-859) は、持続的CAR T細胞培養物において発現され、Crtamの発現はCARを表面に発現するT細胞のみに顕著に限定された。

【0214】

CAR T細胞が形質転換する能力を、インビトロでの長期的培養物の観察、および免疫欠損マウスへのCAR T細胞の移入によって評価した。長期培養したCAR T細胞は、hTERT発現による評価ではテロメラーゼの構成性発現を有しておらず(図4B)、持続的CAR T細胞の培養物におけるテロメア長は経時的に減少した(図15)。対照的に、形質転換したヒトT細胞は、構成性のテロメラーゼ活性を有することが報告されている(Hsu et al., 2007, Blood 109:5168-5177)。これまでに、20回を上回る実験において、持続的CARによる形質導入を受けたT細胞における形質転換は観察されていない。

【0215】

形質転換の能力を検出するための可能性のあるより高感度のアッセイとして、以前の諸研究により、養子移入された形質転換T細胞および悪性T細胞が免疫欠損マウスにおいて腫瘍を形成しうることが示されていることから(Newrzela et al., 2011, Mol Med 17: 1223-1232)、NSG (NOD-SCID- c-/-) マウスを用いた。マウスの群に対して完全に活性化したT細胞または持続的CAR T細胞を輸注した上で、マウスにおけるT細胞の定量によって増殖を評価し、マウスにおける異種移植片対宿主病の誘導によってエフェクター機能を評価した(図16)。第60日までに、非形質導入群ではマウス10匹中5匹で異種反応性(グレード1~3のxGVHD)が観察されたが、これに対してc-Met IgG4 CAR群では10匹中3匹であった。腫瘍形成は剖検時に観察されず、T細胞生着のレベルは、持続的CAR T細胞、または抗CD3およびCD28で刺激した非形質導入初代T細胞を移植したマウスにおいて同程度であった(p=0.39)。

【0216】

キメラ抗原受容体は形質転換を伴うことなく長期的なT細胞増殖を継続させることができる

本明細書に提示された結果は、CD28およびCD3 縦列シグナル伝達ドメインを含有するある種のCARの発現が、初代ヒトT細胞の構成性の活性化および増殖を導くという、予想外の知見に関する。ある種のCAR T細胞が、多様なサイトカインの大量の構成性分泌を呈し、その結果として、増殖を維持するのに外因性サイトカインの添加もフィーダー細胞の添加も必要としないことが観察された。CD28ドメインを付与したCARに関する以前の数多くの報告(Krause et al., 1998, J Exp Med 188:619-626; Finney et al., 1998, Journal

of Immunology 161:2791-2797 ; Geiger et al., 2001, Blood 98:2364-2371 ; Arakawa et al., 2002, Anticancer Research 4285-4289 ; Haynes et al., 2002, J Immunol 169(10):5780-6 ; Maher et al., 2002, Nature Biotechnology 20:70-75 ; Finney et al., 2004, J Immunol 172:104-113 ; Feldhaus et al., 1997, Gene Ther 4:833-838 ; Moeller et al., 2004, Cancer Gene Ther 11:371-379 ; Teng et al., 2004, Hum Gene Ther 15:699-708 ; Friedmann-Morvinski et al., 2005, Blood 105:3087-3093 ; Westwood et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102:19051-19056 ; Pule et al., 2005, Molecular Therapy 12:933-941 ; Willemsen et al., 2005, J Immunol 174:7853-7858 ; Loskog et al., 2006, Leukemia 20:1819-1828 ; Kowolik et al., 2006, Cancer Res 66:10995-11004 ; Shibaguchi et al., 2006, Anticancer Res 26:4067-4072 ; Teng et al., 2006, Human Gene Therapy 17:1134-1143 ; Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13:5426-5435 ; Alvarez-Vallina et al., 1996, Eur J Immunol 26:2304-2309 ; Gyobu et al., 2004, Cancer Res 64:1490-1495) では、そのような縦列CARの増殖はリガンド依存的であり、増殖を維持するためにはCAR T細胞の再刺激が必要とされていたことからみて、これは驚くべきことであった。今回、これらの結果は、持続的T細胞増殖を伴うCARの表現型をもたらす1つの機序が細胞表面でのCARの密度であることを示している。

10

【0217】

これは、「持続的CAR」についての、すなわち、培養下で、リガンド非依存的であり、かつ外因性サイトカインの添加にもフィーダー細胞の添加にも非依存的である長期にわたる指数的増大を呈する初代T細胞についての初めての記載であると考えられる。非形質転換T細胞による数カ月間にわたる大量のサイトカインの構成性分泌は予想外であった。持続的CAR T細胞は、培養中に終末エフェクター細胞へと漸進的に分化し、形質転換は観察されていない。この成長表現型の機序は、正規のTCRおよびCD28シグナル伝達経路がかかわる持続的リガンド非依存的シグナル伝達を伴う。細胞表面での発現が鮮明なCARは継続的増殖を伴い、一方、より低いレベルで発現するCARは継続的増殖およびサイトカイン分泌を呈しなかったことからみて、持続的CAR T細胞を導く、同定された1つの機序は、scFv表面発現のレベルである。

20

【0218】

これらの結果はいくつかの理由から注目に値する。本発明者らによってc-Metおよびメソテリンに対して特異的なscFvでは持続的CAR表現型が観察されたものの、CD19に対して特異的なFMC63ではそうでなかったことからみて、scFvの性状は表現型においてある役割を果たす。この知見の意味は、ある所与のscFvと連結されたシグナル伝達ドメインの挙動を、別個のscFvを発現させた場合と同一であると仮定することはできないということである。CAR発現の方法も、成長表現型に対して予期せぬ寄与があった。これまでのところ、Sleeping BeautyトランスポゾンコードするmRNAまたはプラスミドのエレクトロポレーションによってCARを発現させた場合にT細胞の構成性成長は観察されていない (Zhao et al., 2010, Cancer Res 70:9062-9072 ; Huang et al., 2006, Blood 107:483-491 ; Singh et al., 2008, Cancer Research 68:2961-2971)。レンチウイルスベクターを用いて発現させた場合には、EF-1 プロモーターを使用したベクターでのみ持続的成長が観察されている。レンチウイルスベクターにおいていくつかのプロモーターを比較した以前の諸研究では、このプロモーターが初代CD4およびCD8 T細胞においてより安定的でかつより高レベルの発現をもたらすことが見いだされている (Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-1464)。ヒンジおよび細胞外ドメインの細かなデザインは、より長いIgG4ヒンジまたはより短いCD8 スカフォールドのいずれをコードするCARでもこの現象が観察されていることからみて、持続的成長の表現型に大きくは寄与しないように思われる。持続的成長の表現型のためには、CARの高レベル発現が必要であるように思われる。

30

40

【0219】

これは、初代非形質転換T細胞における内因性IL-2遺伝子の構成性発現の初めての報告であると考えられる。以前の諸研究では、IL-2およびCD25の構成性発現が、T細胞の形質転換を導く条件下において、最も顕著にはHTLV-1感染時に起こることが示されている (Mc

50

Guire et al., 1993, J Virol 67(3):1590-1599)。CARによってコードされるCD28サイトゾルドメインの継続的シグナル伝達が、IL-2および多数の他のサイトカインの構成性分泌の原因となる可能性が高い。taxによるHTLV-1媒介性のIL-2発現、および内因性CD28経路によって駆動されるIL-2分泌の両方が、カルシニューリンホスファターゼを阻害する免疫抑制剤であるシクロスポリンに対して耐性であると報告されていることは興味深い (Good et al., 1997, J Biol Chem 272(3):1425-1428 ; June et al., 1987, Mol Cell Biol 7(12):4472-4481)。

【0220】

本明細書に提示された結果は、ある種のCARに関連したCD28膜貫通およびサイトゾルドメインの過剰発現が、構成性シグナル伝達を導きうることを示唆している。このため、内因性CD28遺伝子発現の調節はT細胞恒常性の重要な決定因子である可能性が高く、このことはCD28リガンドの過剰発現がマウスにおけるT細胞過形成を導くことを示している諸研究と一致する (Yu et al., 2000, J Immunol 164:3543-3553)。

10

【0221】

ヒトT細胞で加齢および細胞分裂に伴ってCD28発現が漸進的にダウンレギュレートされる理由はほとんど解明されていない (Goronzy et al., 2012, Semin Immunol 24(5):365-72)。構成性CAR T細胞は、CAR発現を鮮明なレベルで維持し、かつ、古典的CARまたは非形質導入T細胞よりもはるかに迅速な内因性CD28分子のダウンレギュレーションを呈した。CD28におけるジロイシンモチーフはマウスT細胞上でのCARの発現を限定する原因になり、この配列を突然変異させることはCARの発現の増加を導く (Nguyen et al., 2003, Blood 102(13):4320-5)。検討した構成性CAR T細胞は、CD28エンドドメイン中に野生型ジロイシンモチーフを使用していた。

20

【0222】

本明細書に提示されたデータは、複製可能なscFvを考慮すると、発現レベルの5倍の変化により持続的CAR表現型が導かれうることを示している。これは、他の研究室で他の発現系を用いてこの現象が検出されていない理由の説明になると考えられる。

【0223】

以前の諸研究では、IL-2を構成性に発現するように形質導入された腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を検討しており、IL-2 TILは転移性黒色腫の患者において従来のTILよりも優れた有効性を有しなかった (Heemskerk et al., 2008, Human Gene Therapy 19:496-510)。同様に、ヒトCD8 T細胞におけるIL-15の構成性発現は、IL-15遺伝子のレトロウイルス形質導入後に、外因性サイトカインの非存在下でのクローン増生を導いた (Hsu et al., 2007, Blood 109:5168-5177)。

30

【0224】

4-1BBシグナル伝達ドメインを用いたCD19 CARについて安全性および臨床的有益性が報告されている (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-733 ; Kalos et al., 2011, Sci Transl Med 3:95ra73)。このCARを発現するT細胞はリガンド非依存的増殖の強化を有する (Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-1464) が、本明細書に記載してきた長期的な持続的成長の表現型は有しない。CD28シグナル伝達ドメインを含有するCARは現在、いくつかの臨床試験において試験され、安全性が認められている (Savoldo et al., 2011, J Clin Invest 121:1822-1825 ; Brentjens et al., 2011, Blood 118:4817-4828 ; Kochenderfer et al., 2010, Blood 116:4099-4102 ; Till et al., 2012, Blood 119:3940-3950 ; Kochenderfer et al., 2012, Blood 119:2709-2720)。しかし、それらの治験では、異なる細胞培養系を用い、本研究で用いたレンチウイルスベクターではなくレトロウイルスベクターを用いて製造した後のCARを発現させていることに留意することが重要である。本明細書に報告されたもののような持続的CARが臨床の場で有用かつ安全であるかを明らかにするために、実験を実施することができる。

40

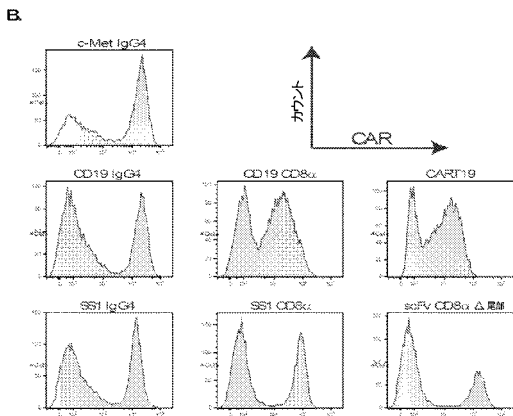
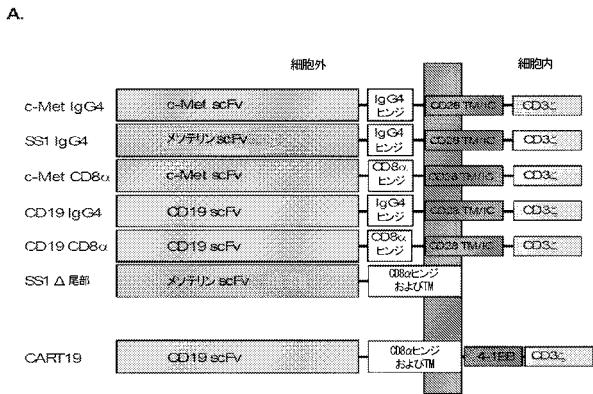
【0225】

本明細書に引用された特許、特許出願および刊行物のそれぞれおよびすべての開示内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。具体的な態様を参照しながら本発

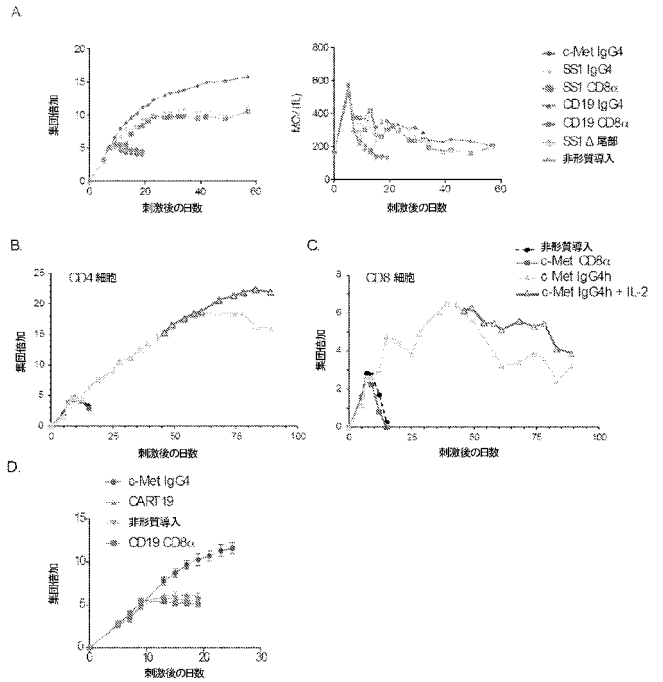
50

明を開示してきたが、本発明の真の趣旨および範囲を逸脱することなく、本発明の他の態様および変形物も当業者によって考案されうことは明らかである。添付された特許請求の範囲は、そのようなすべての態様および等価な変形物を含むことを意図している。

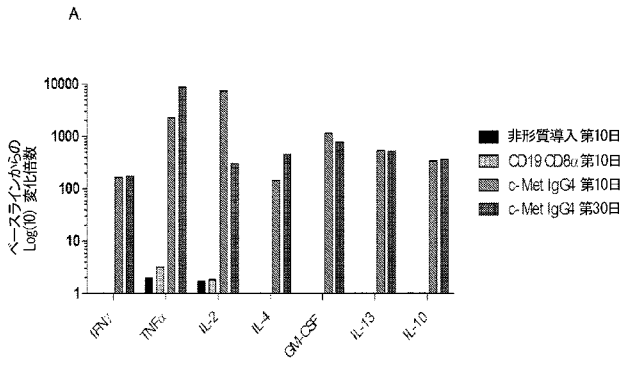
【 図 1 】



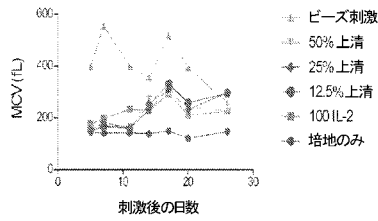
【 図 2 】



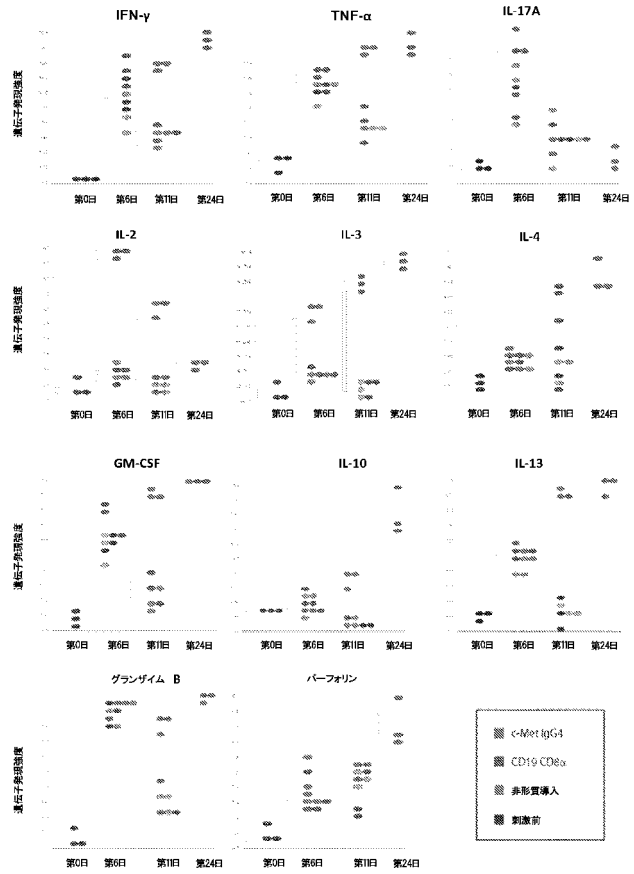
【 図 3 】



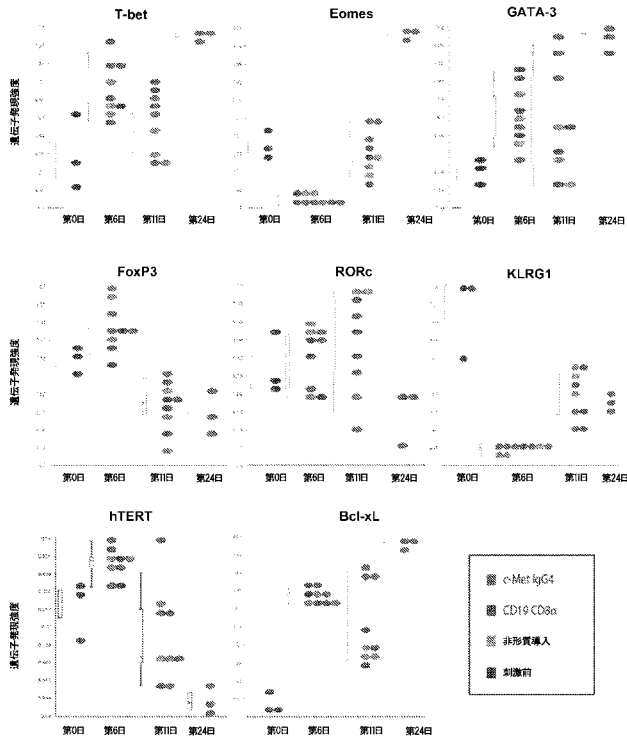
B.



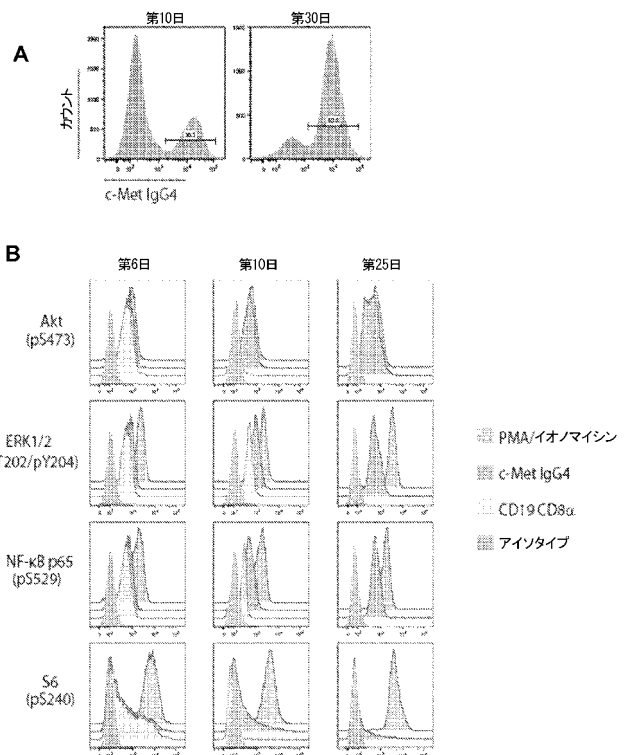
【 図 4 A 】



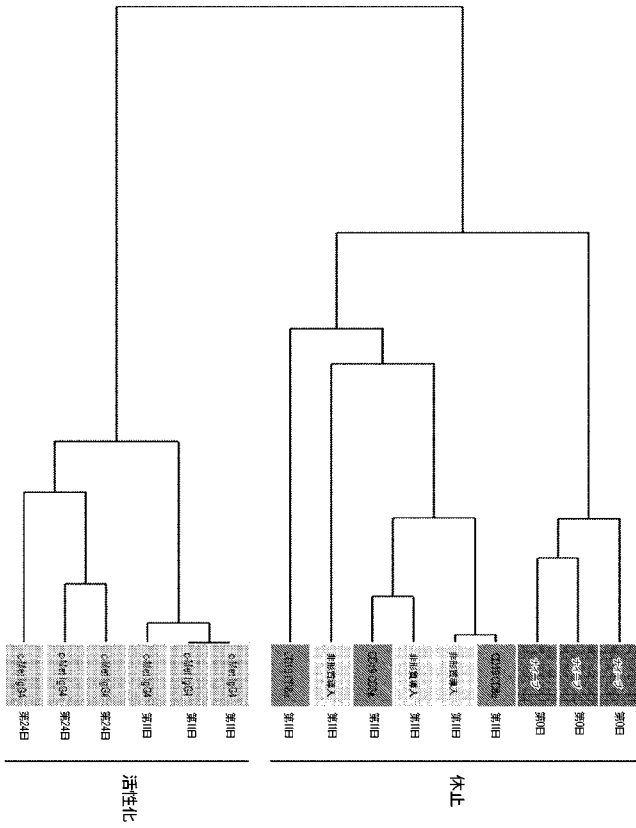
【 図 4 B 】



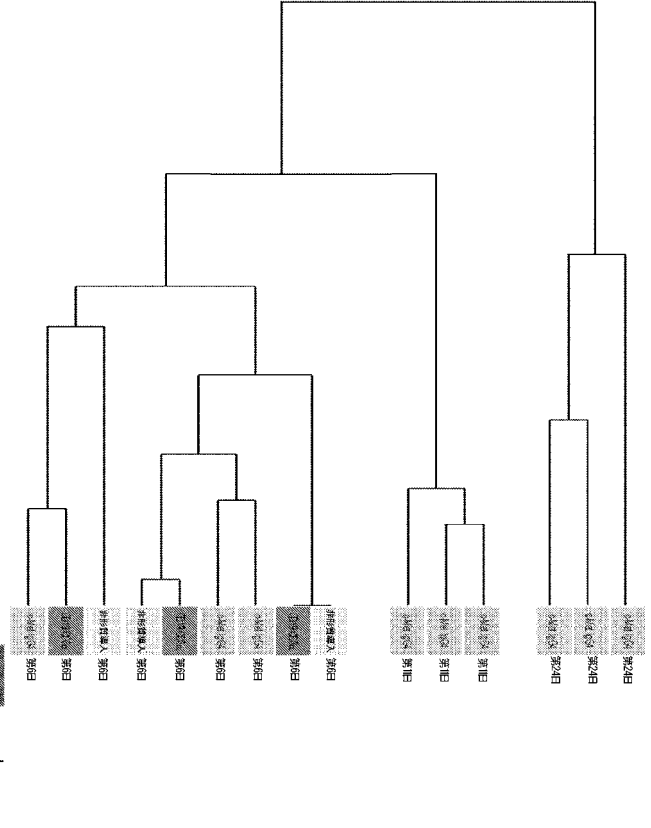
【 図 5 】



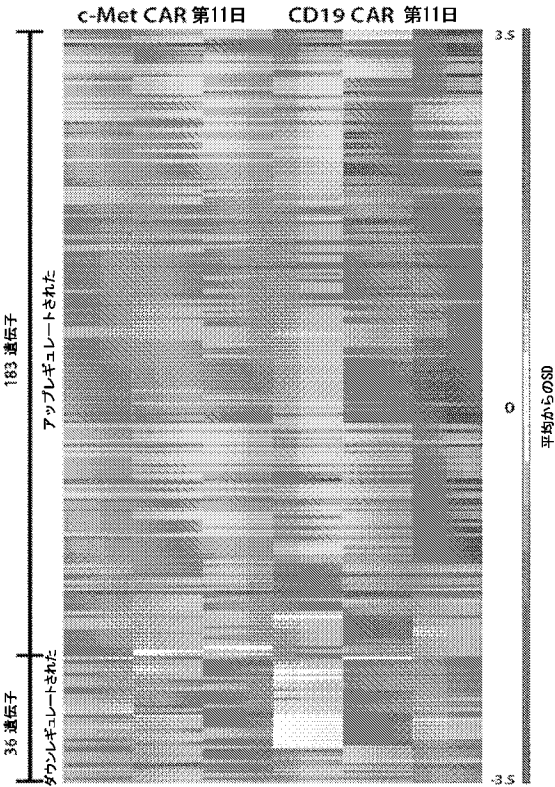
【 図 6 A 】



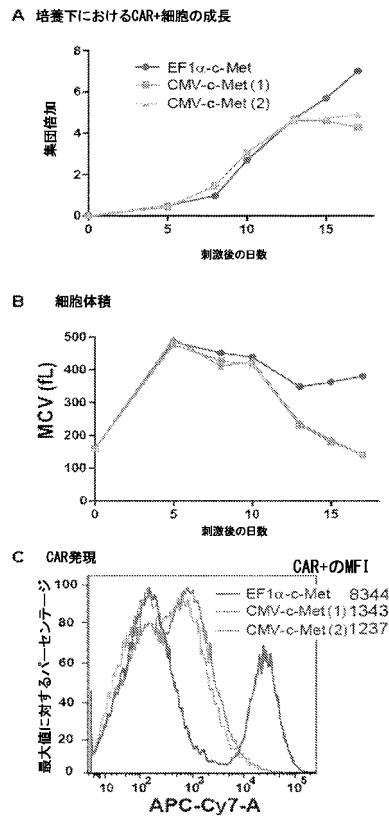
【 図 6 B 】



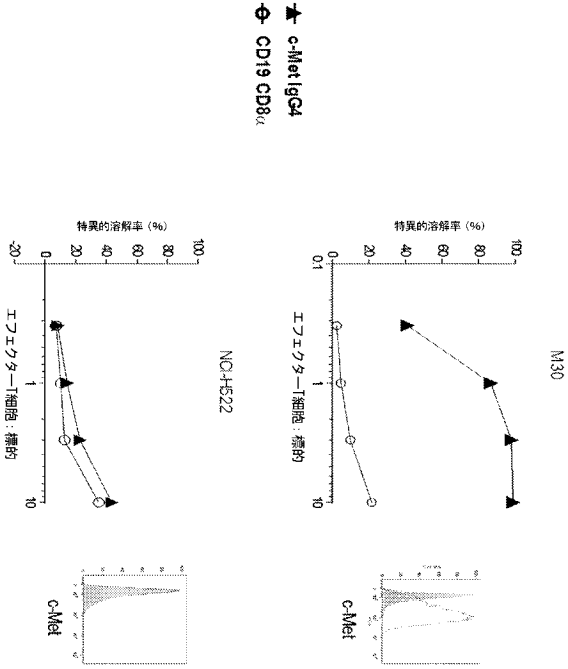
【 図 6 C 】



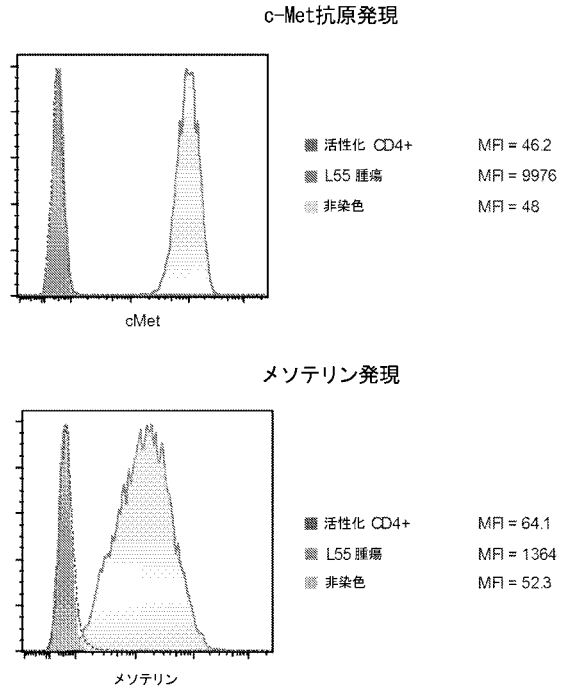
【 図 7 】



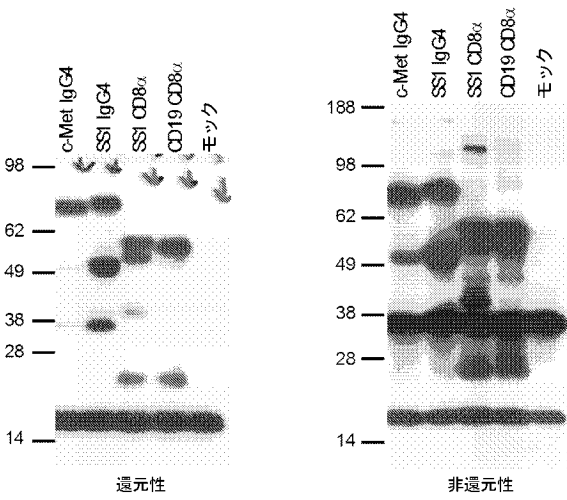
【 図 8 】



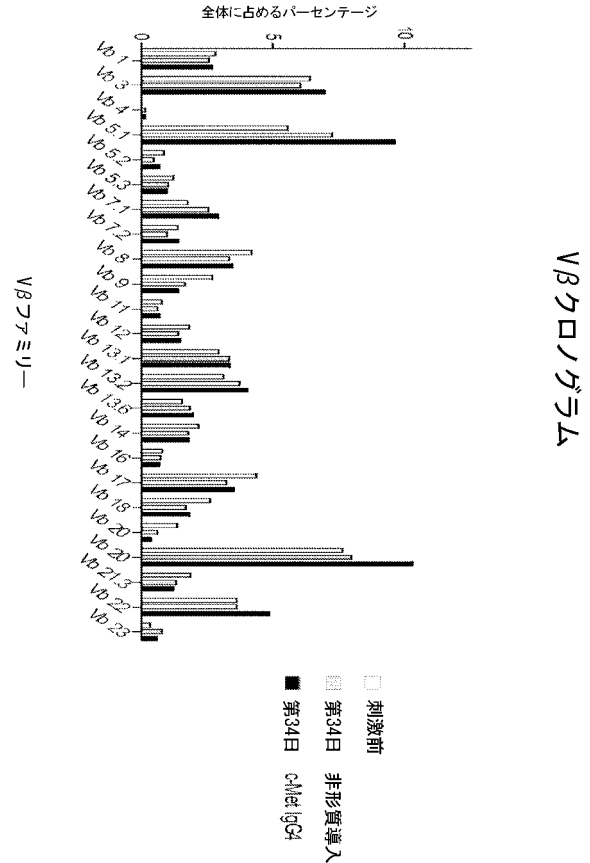
【 図 9 】



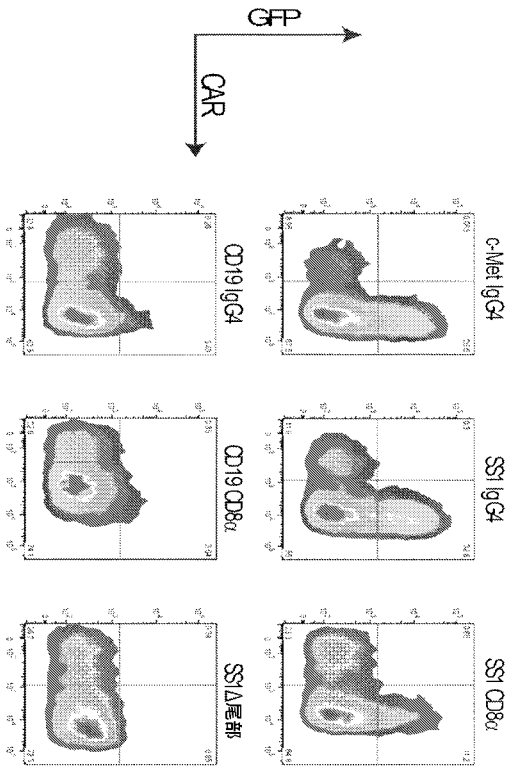
【 図 10 】



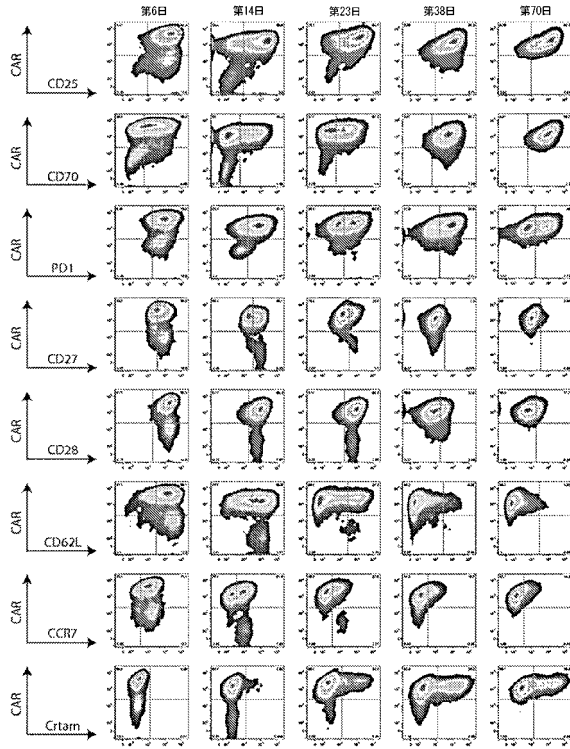
【 図 11 】



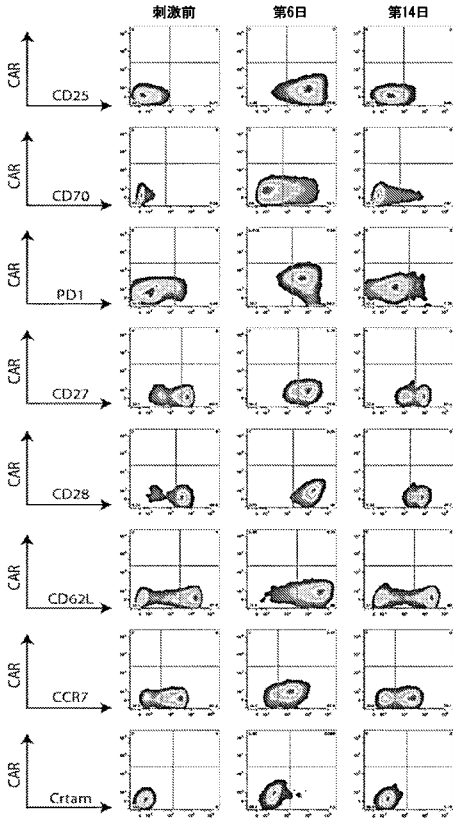
【 図 1 2 】



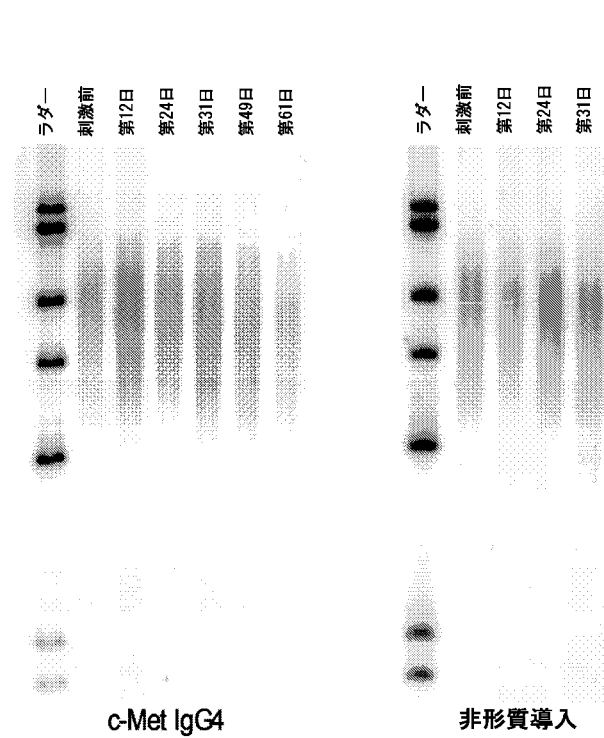
【 図 1 3 】



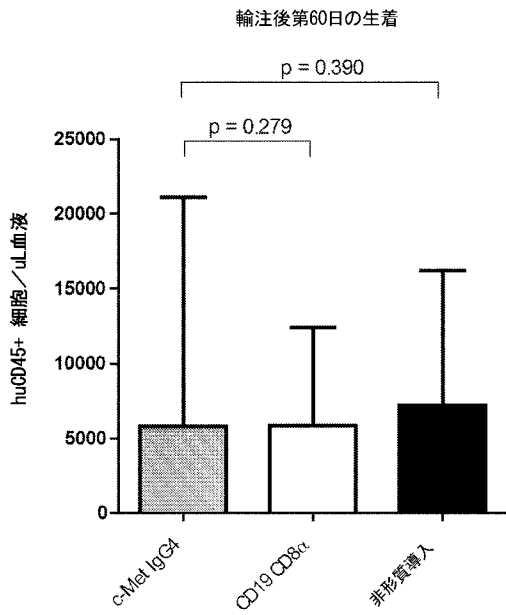
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 配 列 表 】

2015513399000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 13/27337
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07H 21/04, A61K 48/00; A01N 63/00 (2013.01) USPC - 536/23.4, 514/44R, 424/93.71 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) USPC- 536/23.4, 514/44R, 424/93.71 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 530/387.3; 536/23.5, 424/93.21, 435/320.1; 435/372.3; 435/455; 435/325; 435/375 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar: chimeric antigen receptor, tumor-specific T lymphocyte, antigen binding domain, a hinge domain, a transmembrane domain, a costimulatory signaling region, CD3 zeta signaling domain GenCore 6.4.1: SEQ ID NO: 1		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Zhao, et al. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. J Immunol. 2009, 183(9):5563-5574; Abstract, pg 5564, pg 5567, Fig 3A and its legend	1, 2, 9-11, 18-21, 28-32
X — Y	Kowolik, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. Cancer Res. 2006, 66(22):10995-1004; Abstract, pg 10996, col 1; pg 10998, col 1 and Fig 2 and its legend; pg 11002, col 2 to pf 11003, col 1	1-2, 9-11, 18-21, 28-32 3, 12, 22
Y	Jin, et al. MetMAb, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. Cancer Res. 2008, 68(11):4360-8; Abstract, pg 4360, col 2	3, 12, 22
A	WO 2009/091826 A9 (Cooper, et al.) 23 July 2009 (23.07.2009) claim 10, SEQ ID NO: 3	4, 13, 23
X,P	Guedan, et al. Redirection of TH17 cells with an ICOS-based CAR enhances function, antitumor activity and persistence of TH17 cells. OR008. European Society of Gene and Cell Therapy French Society of Cell and Gene Therapy Collaborative Congress 2012 October 25-29, 2012 Palais des Congrès de Versailles Versailles, France. Human Gene Therapy October 2012, 23(10): A1-A173.	1-2, 9-11, 18-21, 28-32
A	US 2009/0202547 A1 (Yayon, et al.) 13 August 2009 (13.08.2009) para [0052], [0110], [0122]	1-2, 9-11, 18-21, 28-32
A	Jena, et al. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. Blood. 2010, 116(7):1035-1044	1-3, 9-12, 18-22, 28-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/>		
* 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 "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 June 2013 (08.06.2013)		Date of mailing of the international search report 19 JUN 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/27337

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Maier, et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. Nat Biotechnol. 2002, 20(1):70-75	1-4, 9-13, 18-23, 28-32
A,P	Curran, et al. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. J Gene Med. June 2012, 14(6):405-15	1-4, 9-13, 18-23, 28-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 13/27337

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I*: claims 1-32, drawn to an isolated nucleic acid sequence encoding a chimeric antigen receptor (CAR), wherein the CAR comprises an antigen binding domain, a hinge domain, a transmembrane domain, a costimulatory signaling region, and a CD3 zeta signaling domain. The first invention (claims 1-4, 9-13, 18-23, 29-32) is restricted to an anti-cMet-binding domain and SEQ ID NO: 1. Should an additional fee be paid, Applicant is invited to elect an additional antigen binding domain and/or SEQ ID NO to be searched. Exact claims to be searched will depend on the election. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "*" group will result in only the first claimed invention to be searched.

***** See Supplemental Sheet to continue *****

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 9-13, 18-23, 28-32, restricted to an anti-cMet-binding domain and SEQ ID NO: 1

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/27337

***** Supplemental Sheet *****

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The special technical feature of each invention of Group I+ is the specific antigen binding domain and polynucleotide sequence encoding the specific antigen binding domain recited therein.

Common Technical Features

The inventions of Group I+ share the technical feature of an isolated nucleic acid sequence encoding a chimeric antigen receptor (CAR), wherein the CAR comprises an antigen binding domain, a hinge domain, a transmembrane domain, a costimulatory signaling region, and a CD3 zeta signaling domain, and further wherein when the CAR is transduced into a T cell, the CAR contributes to at least one of the claimed properties. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by an article titled "A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity" by Zhao, et al. (J Immunol. 2009, 183(9):5563-74) (hereinafter "Zhao").

Zhao discloses an isolated nucleic acid sequence encoding a chimeric antigen receptor (CAR) (Fig 1, legend, vector MSGV-4D5-28Z (4D5-28Z) encoding the Herceptin (4D5)-based CAR against ErbB2?; pg 5564, col 1- "Generation of retroviral constructs. The ErbB2-specific scFv 4D5 (25) sequence derives from the humanized mAb that was used to produce Herceptin. The sequence for the anti-VEGFR2-specific scFv 2C6 (26) was derived from a human Ab. ... Supplemental Fig. 1 shows the sequences of the 4D5 and 2C6 scFvs (including the linker sequence) and the primers used to synthesize these genes. The synthesized DNA fragments were sequence confirmed and subcloned in frame into MSGV-1-based vector (28) containing CD28 and CD3zeta signaling moieties (12) to generate MSGV-4D5-28Z or MSGV-2C6-28Z. ... FMC63-28Z is a CAR vector in which scFv against human CD19 derived from mAb FMC63 as described (30) was constructed and subcloned into MSGV-1-based retroviral vector containing CD28-CD3zeta cassette", -- wherein the CAR comprises (pg 5567, Fig 3A and its legend, "A schematic representation of the 4D5-based CAR constructs") an antigen binding domain (pg 5567, Fig 3A and its legend, 4D5, wherein 4D5 is "The ErbB2-specific scFv 4D5 (25) sequence derives from the humanized mAb that was used to produce Herceptin"; pg 5564, col 1), a hinge domain (pg 5567, Fig 3A and its legend, Hinge), a transmembrane domain (pg 5567, Fig 3A and its legend, transmembrane region, TM), a costimulatory signaling region (pg 5567, Fig 3A and its legend, "CD28 intracellular domain (CD28 IC)", wherein said CD28 intracellular domain is the same CD28 signaling region as in instant application, claim 3, and therefore inherently costimulatory signaling region), and a CD3 zeta signaling domain (pg 5567, Fig 3A and its legend, "CD3zeta intracellular domain (CD3 zeta IC)", and further -- wherein when the CAR is transduced into a T cell, the CAR contributes to increased effector cytokine secretion (Abstract, "we found increased transgene persistence in 4D5 CAR-transduced PBLs. Furthermore, constructs with 4-1BB sequences demonstrated increased cytokine secretion and lytic activity in 4D5 CAR-transduced T cells").

Because Zhao discloses a nucleic acid encoding the claimed CD19 antigen binding domain (pg 5564, col 2, "FMC63-28Z is a CAR vector in which scFv against human CD19 derived from mAb FMC63"), and no significant structural similarities can readily be ascertained among the antigen binding domains, there is no shared technical feature that would otherwise unify the inventions of Group I+.

Therefore, Inventions of Groups I+ lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 フライゴールト マシュー ジェイ .
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 フィラデルフィア サウス 第24 ストリート 324
アパートメント 2アール

(72)発明者 チャオ ヤンビン
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 チェリー ヒル ドンカスター ロード 23

(72)発明者 シェラー ジョン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ナーバース ギルピン ロード 410

(72)発明者 ジューン カール エイチ .
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 メリオン ステーション ベアード ロード 409

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA63 CA02 CA10 CA11 DA03 EA02 FA02 GA14 GA18
HA01 HA12 HA14
4B065 AA93X AA93Y AA97X AB01 AC20 BA02 BA03 BB25 BB37 BC03
BC07 CA24 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB262 ZB272