

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7372920号  
(P7372920)

(45)発行日 令和5年11月1日(2023.11.1)

(24)登録日 令和5年10月24日(2023.10.24)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	Z N A	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
請求項の数 16 (全75頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2020-534499(P2020-534499)	(73)特許権者	512213549
(86)(22)出願日	平成30年12月28日(2018.12.28)		セレクトイス
(65)公表番号	特表2021-508456(P2021-508456 A)		CELLECTIS
(43)公表日	令和3年3月11日(2021.3.11)		フランス、75013 パリ、リュドラ
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/097080		クロワ ジャリ 8
(87)国際公開番号	WO2019/129851		8 rue de la Croix Ja
(87)国際公開日	令和1年7月4日(2019.7.4)		rry, 75013 Paris, F
審査請求日	令和3年12月13日(2021.12.13)	(74)代理人	rance
(31)優先権主張番号	62/611,987		100102978
(32)優先日	平成29年12月29日(2017.12.29)		弁理士 清水 初志
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100102118
(31)優先権主張番号	PA201870015		弁理士 春名 雅夫
(32)優先日	平成30年1月10日(2018.1.10)	(74)代理人	100160923
	最終頁に続く		弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CAR T細胞の作製を改良するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

操作された細胞を製造するための方法であって、  
 内在性T細胞受容体(TCR)構成要素をコードする少なくとも1つの遺伝子を破壊することによってドナーからの免疫細胞が操作される、破壊工程、  
 次に、または同時に、  
 第1の組換えキメラ抗原受容体(CAR)をコードする少なくとも1つの外因性ポリヌクレオチドを該細胞のゲノムに導入することによって細胞が改変される、第1形質転換工程、  
 次に、  
 TCRのエピトープ、TCRサブユニットのエピトープ、TCRサブユニットの組合せ、またはCD3のエピトープに特異的である、第2のキメラ抗原受容体(CAR)を一過性に発現させるための第2形質転換工程  
 を少なくとも含む、方法。

【請求項2】

第2形質転換工程が、  
 前記第2のCARをコードする合成mRNA、またはコンディショナルプロモーターの制御下に前記第2のCARをコードする配列を含むDNAを、細胞に導入すること  
 を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記第2のCARが、

CD3サブユニットのエピトープに特異的である、  
 TCRアルファサブユニットのエピトープに特異的である、  
 TCRベータ1またはTCRベータ2サブユニットのエピトープに特異的である、または  
 TCRアルファベータサブユニットの（共通）エピトープに特異的である、  
 請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

前記第2のCARをコードする前記合成mRNAまたは前記DNAが、SEQ ID NO:2の配列、  
 または以下の一連の配列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4  
 、およびSEQ ID NO:5を含む、請求項2～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

あるゲノム配列に特異的なレアカッターエンドヌクラーゼ、例えばTALエフェクター  
 タンパク質またはCRISPR CAS9をコードするmRNAを導入することを含む、少なくとも1  
 つの破壊工程を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

第1形質転換工程において、第1のCARをコードする外因性遺伝子が、ウイルスベクター  
 、好ましくはAAV6ウイルスベクターを含むウイルスベクターを用いて、細胞に導入され  
 る、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

前記破壊工程の1工程が、TCR遺伝子に含まれる配列に特異的である、第1のレアカッター  
 エンドヌクラーゼをコードするmRNAを導入することを含む、請求項5記載の方法。

【請求項8】

前記破壊工程のさらなる1工程が、薬物に対する感受性または抵抗性を付与する遺伝子  
 、サイトカイン遺伝子、およびそれらの組合せからなる群より選択される遺伝子に含まれ  
 る配列に特異的である、第2のレアカッターエンドヌクラーゼをコードするmRNAを導入  
 することを含む、請求項7記載の方法。

【請求項9】

破壊工程の少なくとも1工程が行われる前記免疫細胞が、T細胞、炎症性Tリンパ球、細胞  
 傷害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球またはヘルパーTリンパ球、NK T細胞を含むか、ま  
 たはそれらに由来する、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

第1のCARが、ROR1、EGFRvIII、BCMA、CD33、GD3、CD19、CD38、HSP70、C  
 D30、FAP、HER2、CD79a、CD79b、CD123、CD22、CLL-1、MUC-1 GD2、Oアセ  
 チルGD2、およびCS1からなる群より選択される細胞表面抗原標的に特異的である、請求  
 項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

アロ反応性に関与する少なくとも1つの遺伝子、例えば、ベータ2M、制御因子X関連ア  
 ンキリン含有タンパク質（RFXANK）、制御因子5（RFX5）、制御因子X関連タンパク質  
 （RFXAP）、およびクラスIIトランス活性化因子（CIITA）、TAP-1、またはそれらの組  
 合せを不活化するさらなる工程、および/または

PDL1、プログラム細胞死1（PD-1）、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）、LAG3  
 、Tim3、BTLA、BY55、TIGIT、B7H5、LAIR1、SIGLEC10、および2B4からなる群よ  
 り選択される少なくとも1つの遺伝子を不活化するさらなる追加の破壊工程、および/ま  
 たは

デオキシシチジンキナーゼ（dCk）、ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランス  
 フェラーゼ（HPRT）、グルココルチコイド受容体（GR）、CD52、およびそれらの組合  
 せから選択される薬物耐性に関与する少なくとも1つの遺伝子を不活化するかまたは過剰  
 発現させるさらなる工程、および/または

薬物過敏症に関与する免疫細胞中の少なくとも1つの遺伝子、例えばGGH、RhoA、CDK  
 5、CXCR3、NR1H2、URG4、PARP14、AMPD3、CCDC38、NFU1、またはCACNG5  
 タンパク質をコードする遺伝子を不活化するさらなる工程、

10

20

30

40

50

を含む、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

請求項1～11のいずれか一項記載の方法に従って得ることができるTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団であって、TCRのエピトープ、TCRサブユニットのエピトープ、TCRサブユニットの組合せ、またはCD3のエピトープに特異的である、キメラ抗原受容体(CAR)を一過性に発現する細胞を含む、集団。

【請求項13】

3%未満のアルファベータTCR+細胞、0.03%未満のアルファベータTCR+細胞、0.01%未満のアルファベータTCR+細胞、0.001%未満のアルファベータTCR+細胞、または0.00001%未満のアルファベータTCR+細胞を含む、請求項12記載のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団。

10

【請求項14】

医薬の調製における、請求項12または13記載のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団の使用。

【請求項15】

請求項12～13のいずれか一項記載のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団と、薬学的に許容される媒体とを含む、薬学的組成物。

【請求項16】

がん、感染症、または免疫疾患の処置のための医薬の調製における、請求項12～13のいずれか一項記載のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団の使用または請求項15記載の薬学的組成物の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は概して免疫学の分野に関し、部分的には、特にTCRの発現は阻害されているが少数の細胞は依然としてTCRを発現している同種異系免疫治療用の細胞調製物において、抗TCRキメラ抗原受容体(CAR)をコードする外因性ポリヌクレオチドまたは合成RNAを使って細胞表面における一過性の制御された発現と最終的にはTCRを依然として発現しているT細胞の抑制とを行うことにより、TCR陽性細胞の比率を低減し、よってTCR陰性(TCR-)T細胞を精製するための方法に関する。

30

【0002】

配列表

本願はASCIIフォーマットで電子提出された配列表を含み、この配列表は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

キメラ抗原受容体(CAR)は、T細胞に抗原特異性を付与するために設計された人工的抗体様分子である。CARを発現するT細胞は、特定タイプのがんの処置に関して長期有効性を示している(Eshhar, 1997, Cancer Immunol Immunother 45(3-4):131-1) 36(非特許文献1)、Eshhar et al, 1993, Proc Natl Acad Sci U S A 90(2):720-724(非特許文献2)、Brockner and Karjalainen, 1998, Adv Immunol 68:257-269(非特許文献3)。第一世代のCARは、T細胞を活性化して特異的免疫を提供するように選択された抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよびCD3などの細胞内ドメインを含む。しかし、これらのCAR改変T細胞のインビボでの拡大増殖(expansion)および存続は、標的抗原とのエンゲージメント後の共刺激シグナルの欠如によって妨げられた。多くの腫瘍細胞は、最適で持続的なT細胞の機能、増殖(proliferation)および存続に必要な共刺激分子の腫瘍細胞における発現を、ダウンレギュレートするからである。T細胞応答を強化するために第2世代および第3世代のCARコンストラクトが作製された。これらはCD3とタンデムに1つまたは2つの二次共刺激シグナルを含んでいた。共刺激分子はCD28、4-

40

50

1BB、OX-40およびCD27などの「第2シグナル」を模倣し、この第2シグナルは、前臨床モデルでも (Carpenito et al., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 3360-3365 (非特許文献4)、Song et al., 2012, Blood 119:696-706) (非特許文献5)、臨床研究でも (Porter et al., 2011, N. Engl. J. Med. 365:725-733 (非特許文献6)、Kalos et al., 2011, Sci. Transl. Med. 3:95ra73 (非特許文献7); Savoldo et al., 2011, J. Clin. Invest. 121:1822-1826 (非特許文献8); Hwu P, Yang JC, Cowherd R, Treisman J, Shafer GE, Eshhar Z, Rosenberg SA, 1995, 「In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes」 Cancer Res; 55:3369-73 (非特許文献9))、CAR T細胞の活性化を増幅することで、大量に拡大増殖させ、長期にわたる機能的存続を維持する。しかしこれらの高活性化T細胞はサイトカインストームおよび腫瘍溶解症候群による毒性の増大をもたらした。

10

## 【0004】

B細胞系譜に特異的なCD19 (Cluster of Differentiation 19) 糖タンパク質は、それに対するCARが調製されてがん免疫治療に使用された最初の標的の1つである (Nadler, et al., 1983 J Immunol 131 (1):244-250 (非特許文献10))。B細胞性急性リンパ芽球性白血病 (B-ALL) の大多数が一様にCD19を発現するのに対して、非造血細胞には、骨髄系細胞、赤血球系細胞およびT細胞、ならびに骨髄幹細胞と共に、発現がない。B細胞悪性疾患上のCD19を標的とする臨床試験は進行中であり、抗腫瘍応答が刺激されている。したがってCD19は免疫ベースの治療法の魅力的な標的である。以来、EP3125934 A1 (特許文献1) に開示されているように具体的TCRサブユニットに特異的なCARを含めて、他にも数多くのCARが設計され、病的細胞に対するそれらの活性が試験されてきた。

20

## 【0005】

T細胞において発現する抗原、例えばTCR、CD38を標的とするCARに見られる課題の1つは、T細胞ソロリサイド (sorocicide)、すなわち細胞が互いに殺し合うことである。

## 【0006】

CD38 CAR+T細胞が犯すソロリサイドを低減するために、本発明者らは以前に、WO201515121454 (特許文献2) に記載したとおり、免疫治療用のT細胞において抗CD38 CAR+を調製する方法であって、内在性CD38遺伝子をヌクレアーゼで不活化することで、CD38 CAR+CD38neg表現型のT細胞とし、よってそれらの相互破壊、自己刺激または凝集を回避する方法を記載した。しかしそのような系の活性は制御されなかった。

30

## 【0007】

同種異系CART T細胞で処置された患者に見られる別の課題は移植片対宿主病 (GvHD) の出現である。GVHDは、遺伝的に異なる人から移植された組織の受容に続発する医学的合併症である。供与された組織 (移植片) 中の免疫細胞 (白血球) はレシピエント (宿主) を異物 (非自己) と認識する。すると移植された免疫細胞は宿主の体細胞を攻撃する。使用される血液製品が放射線照射も承認された病原体低減システムによる処理も受けていない場合には、輸血後にも、GvHDが起こりうる。宿主が移植片を拒絶する場合に移植拒絶が起こるのに対して、GvHDは移植片が宿主を拒絶する場合に起こる。これを改善するために、T細胞受容体 (TCR) 複合体の遺伝子、例えばTRAC遺伝子のTCRアルファサブユニットの定常領域を、レアカッターエンドヌクレアーゼ (rare cutting endonuclease) を使って特異的にターゲティングすることで、移植片対宿主病 (GvHD) が低減または消失するように1つまたは複数の遺伝子を改変することによって、T細胞を操作することは公知である。これは、例えば、細胞中にエレクトロポレーションされたmRNAから一過性に発現させたレアカッターエンドヌクレアーゼを使って調製することができる。うまく設計され十分に特異的であれば、レアカッターエンドヌクレアーゼは、変異もしくは欠失を導入するか外因性ヌクレオチドの挿入を可能にすることにより、TCRサブユニットの発現を、そして最終的には細胞表面におけるTCR発現を、妨害することになる。

40

## 【0008】

今までのところ、TCR遺伝子を欠失させるための最も正確で安全な技法は、特異性が高く効率のよいTALEN (登録商標) 遺伝子編集ツールの使用であった。この技法を使えば細

50

胞の90パーセント超を操作することができ、オフターゲットはguide seq.分析による決定では検出できないレベルである。次に、細胞を約10～12日間成長させて、十分な注射可能量を得る。

【0009】

製造プロセスの最終工程は、典型的には、製品をバイアルに充填する前に、成長した細胞からTCR陰性細胞画分を精製することにある。

【0010】

この精製工程は、アルファベータTCR陽性T細胞画分を可能な限り枯渇させるために極めて重要である。この画分は、操作された細胞が患者に注入されたときに、GvHDの直接的原因になりうるからである。そのうえ、最終製品は患者の中でいったん増幅を起こすことになるので、わずかな数のTCR陽性細胞でも、増幅されるとGvHDの発生をもたらすことになる。対費用効果の高い洗練された精製技法をもってしても、患者に移植されたときに有害な活性を持たない均一な集団を得ることは難しく、今なお大きな課題である。

10

【0011】

したがって、そのような治療用遺伝子改変細胞の製造を改良することには、大きなニーズがある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【文献】EP3125934 A1

20

【文献】WO201515121454

【非特許文献】

【0013】

【文献】Eshhar, 1997, Cancer Immunol Immunother 45 (3-4) 131-1) 36

【文献】Eshhar et al, 1993, Proc Natl Acad Sci U S A 90 (2):720-724

【文献】Brocker and Karjalainen, 1998, Adv Immunol 68:257-269

【文献】Carpenito et al., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 3360-3365

【文献】Song et al., 2012, Blood 119:696-706

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

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

30

【文献】Savoldo et al., 2011, J. Clin. Invest. 121:1822-1826

【文献】Hwu P, Yang JC, Cowherd R, Treisman J, Shafer GE, Eshhar Z, Rosenberg SA, 1995, 「In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes」 Cancer Res; 55:3369-73

【文献】Nadler, et al., 1983 J Immunol 131 (1):244-250

【発明の概要】

【0014】

本発明者らは、同種異系細胞を含む組成物を改良するための手段またはそのような医薬を調製するための方法を改良するための手段を突き止めた。

【0015】

40

一般的方法として、本発明は、以下の方法を提供する。

1. TCR陽性細胞を消滅させるための方法であって、以下の工程を含む方法:

(a) TCR陽性細胞を含む細胞の集団を用意する供給工程、

(b) 細胞の表面に抗TCRキメラ抗原受容体(抗TCR CAR)、好ましくは抗アルファベータTCRを一過性に発現させる工程を含む形質転換工程、

(c) 抗TCR CARを一過性に発現する細胞を、TCR陽性細胞を含む細胞の集団と接触させる工程。

【0016】

2. 抗TCR CARをコードする外因性または合成ポリヌクレオチドを細胞中に導入する工程を含む、第2項記載の方法。

50

## 【0017】

3. 抗TCR CARをコードする外因性または合成ポリヌクレオチドが、コンディショナルプロモーター (conditional promoter) の制御下に該抗TCR CARをコードする配列を含むmRNAまたはDNAである、第1項または第2項記載の方法。

## 【0018】

抗TCR CARを一過性に発現する細胞は、細胞傷害性細胞であるか、抗TCR CARがTCRに結合すると細胞傷害性になり、抗TCR CARがTCRに結合すると、TCR陽性細胞を殺す。

## 【0019】

いくつかの態様において、本明細書に記載するTCR陽性細胞を消滅させるための方法は、治療用の操作された細胞を製造するための一般的方法の一部である。

10

## 【0020】

本発明の方法は高感度であり、極めて少数のTCR + 細胞を殺すことを可能にするので、患者への生着を目的とする任意の細胞または器官の調製にとって、TCR + 細胞を取り除くのに役立つ。

## 【0021】

コンディショナルプロモーターの制御下に抗TCR CARをコードする配列を含むDNAとは、その発現がコンディショナルであって、薬物によって制御することができるトランスジェーンを意味する。これは、その発現が外因性作用物質に対して感受性であるプロモーターを使用する。一例として、この目的にはいくつかのプロモーターが適しうるが、よく使用される2種のプロモーターとして、テトラサイクリン (抗生物質) またはエクジソン (昆虫が作るステロイドホルモン) に対して感受性である調節要素が挙げられる。哺乳動物細胞にはこれらの化合物に応答する内在性遺伝子がないので、これらのプロモーターの存在およびtet結合タンパク質またはエクジソン結合タンパク質の発現は、内在性遺伝子の機能にはほとんど影響を及ぼさないだろう。一般にこの戦略は、すべての組織における協調的発現をもたらすが、より複雑なコンストラクトであれば、発現をユニークな組織タイプに制限することができる。

20

## 【0022】

本発明は、以下の方法を提供する。

4. 操作された細胞を製造するための方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法:  
ドナーからの免疫細胞が用意される供給工程、

30

内在性T細胞受容体 (TCR) 構成要素をコードする少なくとも1つの遺伝子を破壊することによって細胞が操作される破壊工程と、それに続く、またはそれと同時の、

組換えキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする少なくとも1つの外因性ポリヌクレオチドを該細胞のゲノムに導入することによって細胞が改変される第1形質転換工程と、

それに続く、

抗TCRキメラ抗原受容体 (抗TCR CAR) を一過性に発現させるための第2形質転換工程。

## 【0023】

一態様において、破壊工程および第1形質転換工程は同時に実行される。

## 【0024】

好ましい一態様において、破壊工程は、第1形質転換工程の少なくとも12時間前もしくは少なくとも1日前、または第1形質転換工程の少なくとも2日前、または第1形質転換工程の少なくとも3日前、または第1形質転換工程の少なくとも4日前に行われる。

40

## 【0025】

破壊工程は、レアカッターエンドヌクレアーゼ、好ましくはTALエフェクターエンドヌクレアーゼまたはCRISPR関連エンドヌクレアーゼを使って実行される。

## 【0026】

特定の態様において、第2形質転換工程は第1形質転換工程後に行われる。

## 【0027】

一態様において、第1形質転換工程および第2形質転換工程は同時に実行される。

## 【0028】

50

好ましい一態様において、第1形質転換工程は、第2形質転換工程の少なくとも1日前、または第2形質転換工程の少なくとも2日前、または第2形質転換工程の少なくとも3日前、または第2形質転換工程の少なくとも4日前に行われる。

【0029】

したがって、好ましい一態様において、CARをコードする遺伝子を細胞に導入するための第1形質転換工程は、TCRをコードする遺伝子にCARを導入する工程を意味する。

【0030】

第2形質転換工程が、抗TCR CARをコードする外因性または合成ポリヌクレオチド、例えば抗TCR CARをコードする合成mRNA、またはコンディショナルプロモーターの制御下に抗TCR CARをコードする配列を含むDNAを、細胞に導入する工程を含む、第4項記載の方法。

10

【0031】

好ましい一態様において、CARをコードする外因性遺伝子を導入するための第1形質転換工程は、TCRをコードする遺伝子中にCARコード配列を挿入する工程を意味し、その結果として、TCRを不活化するための破壊工程は、TCR遺伝子、好ましくはアルファTCRサブユニットの定常領域をコードする配列（TRAC遺伝子）中に、オープンリーディングフレームを挿入することによって達成される。

【0032】

本発明では、他の内在性（またはゲノム）配列を操作してもよく（追加破壊工程）、追加外因性配列をゲノムに導入してもよい（第3形質転換工程）。

20

【0033】

好ましくは、抗TCR CARを一過性に発現する細胞は、TCR陽性細胞に対して細胞傷害性である潜在能力を有する。

【0034】

不活化されるTCR構成要素は、アルファTCRサブユニット、ベータ1TCRサブユニット、ベータ2TCRサブユニット、ガンマTCRサブユニット、デルタTCRサブユニット、それらの組合せであってよく、好ましくはアルファTCRサブユニット、ベータ1TCRサブユニット、ベータ2TCRサブユニット、それらの組合せ、より好ましくはアルファTCRサブユニットでありうる。

【0035】

5. 以下の工程を順次含む、第4項または第5項のいずれか一項記載の方法:

- ・供給工程、
- ・任意で、活性化工程、
- ・TCR構成要素を不活化するための破壊工程、
- ・CARを導入するための第1形質転換工程、
- ・抗TCR CARを一過性に発現させるための第2形質転換工程、
- ・追加破壊工程、
- ・拡大増殖工程、
- ・任意の精製工程、
- ・充填および仕上げ工程。

40

【0036】

特定の態様において、本発明の方法は、

- ・供給工程、
- ・任意で、活性化工程、
- ・破壊工程、
- ・精製工程、
- ・追加破壊工程、
- ・第1形質転換工程、
- ・拡大増殖工程、
- ・抗TCR CARを一過性に発現させるための第2形質転換工程、

50

・ 充填および仕上げ工程

を順次含むか、

または

- ・ 供給工程、
- ・ 任意で、活性化工程、
- ・ 破壊工程、
- ・ 第1形質転換工程、
- ・ 追加破壊工程、
- ・ 拡大増殖工程、
- ・ 分化および/または成熟工程
- ・ 任意の精製工程、
- ・ 抗TCR CARを一過性に発現させるための第2形質転換工程、
- ・ 充填および仕上げ工程、

を順次含むか、

または

- ・ 供給工程、
- ・ 任意で、活性化工程、
- ・ 破壊工程、
- ・ 追加破壊工程、
- ・ 第1形質転換工程、
- ・ 拡大増殖工程、
- ・ 分化および/または成熟工程
- ・ 抗TCR CARを一過性に発現させるための第2形質転換工程、
- ・ 充填および仕上げ工程

を順次含む。

#### 【0037】

本発明は、抗TCR CARの一過性発現が、細胞傷害活性を持つ細胞において、好ましくは細胞溶解活性を持つ細胞において、TCR陽性細胞の存在下で起こる限り、一般的方法のものを含む工程の任意の組合せを、包含する。

#### 【0038】

本発明は以下の方法に関する。

6. 第4項～第6項のいずれか一項記載の操作された細胞を製造するための方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法:

- ・ 患者ではない健常ドナーからの細胞が用意される供給工程、
- ・ 内在性T細胞受容体(TCR)構成要素をコードする少なくとも1つの遺伝子を破壊することによって細胞が改変される破壊工程と、それに続く、またはその後、その前、もしくはそれと同時の、
- ・ 組換えキメラ受容体をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを細胞に導入することによって細胞が改変される第1形質転換工程と、
- それに続く、
- ・ 抗TCR CARを一過性に発現させるための第2形質転換工程、
- 充填および仕上げ工程。

#### 【0039】

7. 抗TCR CARが

TCRのエピトープに特異的である、

TCR関連タンパク質のエピトープに特異的である、

CD3サブユニットのエピトープに特異的である、

TCRサブユニットのエピトープに特異的である、

TCRサブユニットの組合せに特異的である、

TCRアルファサブユニットのエピトープに特異的である、

10

20

30

40

50

TCRベータ1またはTCRベータ2サブユニットのエピトープに特異的である、  
TCRアルファベータサブユニットの（共通）エピトープに特異的である、  
第4項～第7項のいずれか一項記載の方法。

【0040】

CD3はタンパク質複合体からなり、4本の別個の鎖から構成される。哺乳動物では、この複合体は、CD3 鎖、CD3 鎖および2本のCD3 鎖を含有する。CD3、CD3 およびCD3 鎖は、単一の細胞外免疫グロブリンドメインを含有する免疫グロブリンスーパーファミリーの関連性が高い細胞表面タンパク質である。これらの鎖は、T細胞受容体（TCR）および 鎖（ゼータ鎖）と会合することで、Tリンパ球における活性化シグナルを生成する。TCR、 鎖およびCD3分子は全体としてTCR複合体を構成する。

10

【0041】

8. 抗TCR CARをコードする外因性または合成ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:2の配列、または以下の一連の配列:SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:4 およびSEQ ID NO:5を含む、第4項～第8項のいずれか一項記載の方法。

【0042】

本発明は、

a. TCR（アルファベータTCR、ガンマデルタTCR、ベータベータTCR、TCRサブユニット（アルファまたはベータ1、またはベータ2、またはガンマまたはデルタ）またはTCR関連タンパク質（CD3、CD28）に対するモノクローナル抗体からのVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、

20

b. CD8、FcERIIIガンマおよびIgG1からなる群において選ばれるヒンジ、

c. CD8 膜貫通ドメイン、

d. CD3 シグナリングドメインを含む細胞質ドメイン、および4-1BB共刺激ドメイン

を含む抗TCR CARを包含する。

SEQ ID NO:22の抗TCR CAR。

【0043】

本発明は、抗TCR CARをコードするベクター、好ましくはSEQ ID NO:8またはSEQ ID NO:12のベクターを包含する。

【0044】

本発明は、好ましくはSEQ ID NO:2の、抗TCR scfvをコードするscfv、または好ましくはSEQ ID NO:16の、該scfvをコードする配列を包含する。

30

【0045】

本発明は、本発明のscfvまたは抗TCR CARを調製するための手段、好ましくはSEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14の手段を包含する。

【0046】

一態様では、以下の配列が作製され、本発明に従って使用される。

【0047】

40

50

CD8 シグナル 配列	ATGGCTTTGCCTGTCACTGCCTTGCTGCTTCCACTTGCTCTGTTGTTGCACGCCGCAAGACCC
抗 CD3 scFv	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCTTCCGTCGGCGATAGAGTCACCATTA CCTGTTCAAGCCAGTAGTTCCGTGTCTTACATGAACTGGTATCAGCAGACCCCAGGCAAGGCACC TAAGCGGTGGATCTACGACACATCCAAGCTGGCCTCTGGAGTGCCCAGCCGGTTCTCCGGCTC TGGCAGCGGCACCGACTATACCTTTACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATCGCCACATAC TATTGCCAGCAGTGGTCTAGCAATCCATTCACTTTGGCCAGGGAACAAAGCTGCAGATCGGAG GAGGAGGCAGCGCGGAGGAGGCTCCGGCGGGCGGGCTCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC CGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCCGCAGAAGCCTGCGGCTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACA CCTTCACACGGTATACCATGCACTGGGTGAGACAGGCACCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCG GCTACATCAACCCCAGCAGAGGCTACACAACTATAATCAGAAGGTGAAGGACAGGTTACCAT CTCCGCGATAACTCTAAGAATACAGCCTTTCTGCAGATGGACTCCCTGAGGCCTGAGGATACC GGCGTGATTTTTGCGCCCGCTATTATGATGACCATTACTGTCTGGACTATTGGGGGCAGGGAA CACCCGTGACTGTGAGCTCGGATCCC
CD8 ヒンジ	ACCACAACCCCGCTCCAAGGCCCCCTACCCCGCACCAACTATTGCCTCCCAGCCACTCTCAC TGCGGCCTGAGGCCTGTCGGCCCGCTGCTGGAGGCGCAGTGCATACAAGGGCCTCGATTTTC GCCTGCGAT

10

20

30

40

50

CD8 貫膜	ATTTACATCTGGGCACCCCTCGCCGGCACCTGCGGGGTGCTTCTCCTCTCCCTGGTGATTACCC TGTATTGC
41BB- CD3z	AGACGGGGCCGGAAGAAGCTCCTCTACATTTTTAAGCAGCCTTTTCATGCGGCCAGTGCAGACAA CCCAAGAGGAGGATGGGTGTTCTGCAGATTCCCTGAGGAAGAGGAAGGCGGGTGCGAGCTGA GAGTGAAGTTCTCCAGGAGCGCAGATGCCCCCGCCTATCAACAGGGCCAGAACCAGCTCTACA ACGAGCTTAACCTCGGGAGGCGGAAGAATACGACGTGTTGGATAAGAGAAGGGGGCGGGACC CCGAGATGGGAGGAAAGCCCCGGAGGAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAG AAGGATAAGATGGCCGAGGCCTACTCAGAGATCGGGATGAAGGGGGAGCGGCGCCGCGGGAA GGGGCACGATGGGCTCTACCAGGGGCTGAGCACAGCCACAAAGGACACATACGACGCCTTGCA CATGCAGGCCCTTCCACCCCGGGAA
2A	TCCCATGGAGGAAGCGGAGAGGGACGAGGAAGCCTGCTGACCTGCGGGGACGTGGAGGAAAA CCCAGGACCTCAT
BFP	ATGATGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGGA ACCATCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGA GAATCAAGGTGGTGCAGGGCGGCCCTCTCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACTAGCTTCT CTACGGCAGCAAGACCTTTCATCAACCACCCAGGCATCCCCGACTTCTTCAAGCAGCTGCTG CCTGAGGGCTTTCACATGGGAGAGATCACCACATACGAGGACGGGGGCGTGCCTGACCGCTACC CAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAAGTCAAGATCAGAGGGGTGAATTCA CATCCAACCGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTTACCCGAGACGCTGT ACCCCGCTGACGGCGCCCTGGAAGGCAGAAACGACATGGCCCTGAAGCTCGTGGGCGGGAGC CATCTGATCGCAAACATCAAGACCACATATAGATCCAAGAAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCC TGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAGAATCAAGGAGGCCAACACAGACCTACGTC GAGCAGCACGAGGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACCTGGGGCACAAAGCTG AAT
30527	ATGGCTTTCCTGTCACTGCCTTGTCTCCACTTGCTCTGTTGTTGCACGCCGAAGACCCG ATATTAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCTTCCGTGCGGCGATAGAGTACCATTAC CTGTTACGCCAGTAGTTCCGTGTCTTACATGAAGTGGTATCAGCAGACCCAGGCAAGGCACCT AAGCGGTGGATCTACGACACATCCAAGCTGGCCTCTGGAGTGCCCAGCCGGTTCTCCGGCTCT GGCAGCGGCACCGACTATACCTTTACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATCGCCACATACT ATTGCCAGCAGTGGTCTAGCAATCCATTACCTTTGGCCAGGGAACAAAGCTGCAGATCGGAGG AGGAGGCAGCGCGGAGGAGGCTCCGGCGGGCGGCTCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCC GGAGGAGGAGTGGTGCAGCCCGGCAGAAAGCCTGCGGCTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACAC CTTCACACGGTATACCATGCACTGGGTGAGACAGGCACCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGG CTACATCAACCCAGCAGAGGCTACACAACTATAATCAGAAGGTGAAGGACAGGTTACCATC TCCCGCGATAACTCTAAGAATACAGCCTTTCTGCAGATGGACTCCCTGAGGCCTGAGGATACCG GCGTGTATTTTTGCGCCCGCTATTATGATGACCATTACTGTCTGGACTATTGGGGCAGGGAAC ACCCGTGACTGTGAGCTCGGATCCCACCACAACCCCGCTCCAAGGCCCCCTACCCCCGCACC AATATTGCCTCCCAGCCACTCTACTGCGGCCTGAGGCCTGTCGGCCCGCTGCTGGAGCGC AGTGCAACAAGGGCCCTGATTTTCGCTGCGATATTTACATCTGGGCACCCCTCGCCGGCACC TGCGGGGTGCTTCTCCTCTCCCTGGTATTACCCTGTATTGCAGACGGGGCCGGAAGAAGCTC CTCTACATTTTTAAGCAGCCTTTTCATGCGGCCAGTGCAGACAACCCAAGAGGAGGATGGGTGTT CCTGCAGATTCCTGAGGAAGAGGAAGGCGGGTGCAGCTGAGAGTGAAGTTCTCCAGGAGCG CAGATGCCCCCGCCTATCAACAGGGCCAGAACCAGCTCTACAACGAGCTTAACTCGGGAGGC GCGAAGAATACGACGTGTTGGATAAGAGAAGGGGGCGGGACCCCGAGATGGGAGGAAAGCCC CGGAGGAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCCGAGGC CTACTCAGAGATCGGGATGAAGGGGGAGCGGGCCGCGGGAAGGGGCACGATGGGCTTACC AGGGGCTGAGCACAGCCACAAGGACACATACGACGCCTTGCACATGCAGGCCCTTCCACCCC GGGAATCCCATGGAGGAAGCGGAGAGGGACGAGGAGCCTGCTGACCTGCGGGGACGTGGAG GAAAACCCAGGACCTCATATGATGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACA TGGAGGGCACCGTGGACAACCATCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACG AGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGGTGCAGGGCGGCCCTCTCCCTTCGCTTTCGACA TCTGGCTACTAGCTTCTCTACGGCAGCAAGACCTTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGA CTTCTTCAAGCAGTCTTCCCTGAGGGCTTTCATGGGAGAGATCACCACATACGAGGACGGG GGCGTGTGACCGCTACCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAG ATCAGAGGGGTGAACCTCACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAG GCCTTACCAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAAACGACATGGCCCTG AAGCTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGAAACATCAAGACCACATATAGATCCAAGAAAACCCG CTAAGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAGAATCAAGGAGGC CAACAACGAGACCTACGTCGAGCAGCAGGAGGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAG CAAACCTGGGGCACAAAGCTGAAT

10

20

30

40

50



CD8 シグナル 配列	MALPVTALLLPLALLLHAARP	
抗 CD3 scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGS GTDYFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQIGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGV VQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQVKDKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVSSDP	
CD8 ヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	
CD8 貫膜	IYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	10
41BB- CD3z	RRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPSEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL LYQGLSTATKDTYDALHMALPPRE	
2A	SHGGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPH	
BFP	MMSELIKENMHMKLYMEGTVDNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVGGPLPFAFDILATSFLYGS KTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVKIRGVNFTSNGPVM QKKTLLGWEAFTETLYPADGGLEGRNDMALKLVGGSHLIANIKTTYRSKKPAKLNKMPGVVYVDYRLE RIKEANNETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHLN	
30527	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRW IYDTSKLAGVPSRFSGSGSDYFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQIGGGGSGGG GSGGGGSQVQLVQSGGGVQVQGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGY TNYNQVKDKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVSSDPTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRR GRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPSEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL QGLSTATKDTYDALHMALPPRESHGGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPHMMSELIKENMHMKLYME GTVDNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVGGPLPFAFDILATSFLYGSKTFINHTQGIPDFFKQSF PEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVKIRGVNFTSNGPVMQKKTLLGWEAFTETLYPAD GGLEGRNDMALKLVGGSHLIANIKTTYRSKKPAKLNKMPGVVYVDYRLERIKEANNETYVEQHEVAV ARYCDLPSKLGHLN	20

## 【 0 0 4 8 】

細胞がT細胞である、より好ましくは、抗TCR CARがTCR陽性細胞に結合したときに細胞溶解活性を呈する抗TCR CAR発現細胞を得るための、細胞溶解活性を呈するT細胞である、第4項～第9項のいずれか一項記載の方法。

30

## 【 0 0 4 9 】

外因性または合成ポリヌクレオチドを導入する工程がエレクトロポレーションによって実行される、第4項～第10項のいずれか一項記載の方法。

## 【 0 0 5 0 】

mRNAの導入が、ウイルスベクターを用いる形質導入またはトランスフェクションもしくはリポフェクションによって達成される、第4項～第9項のいずれか一項記載の方法。

## 【 0 0 5 1 】

抗TCR CARの半減期が12時間超～10日である、第4項～第11項のいずれか一項記載の方法。

## 【 0 0 5 2 】

抗TCR CAR mRNAの半減期が3時間～72時間である、第4項～第12項のいずれか一項記載の方法。

40

## 【 0 0 5 3 】

mRNAが、約2日にわたって、または約1～約7日もしくは約2～5日の範囲の期間にわたって、抗TCR CARを一過性に発現する、第1項～第9項のいずれか一項記載の方法。

## 【 0 0 5 4 】

11. TCR、TCRサブユニットまたはTCRサブユニットの組合せに特異的な抗TCR CARをコードするmRNAが、細胞表面における該抗TCR CARの一過性発現、CD3への、内在性アルファベータへの、ガンマ/デルタTCR発現細胞への該抗TCR CARの結合、ならびにCD3、アルファベータおよび/またはガンマTCR発現細胞の溶解をもたらす、第4項～第13項

50

のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 5 5 】

12. アルファベータTCRタンパク質の細胞表面発現に影響を及ぼす変異、欠失または挿入を導入する工程、好ましくはTRAC (TCRアルファサブユニット) 遺伝子に外因性ポリヌクレオチドの挿入を導入する工程、より好ましくはキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外因性ポリヌクレオチドの挿入を導入する工程を含む、第1項～第10項のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 5 6 】

13. [ 検出不能レベルのTCR陽性細胞～40%のTCR陽性細胞が達成されるように ] TCR陰性細胞を精製するまたはTCR陽性細胞からTCR陰性細胞を分離する任意の工程と、  
それに続く、

CD3を認識してそれに結合するか内在性アルファベータTCRおよび/もしくはガンマ/デルタTCRを認識してそれに結合する抗TCRキメラ抗原受容体 (CAR) の細胞表面における一過性発現、TCR発現標的細胞への結合、およびTCR+細胞の溶解を達成するために、該抗TCR CARをコードするmRNAを導入する工程を含む形質転換工程と

を含む、第1項～第12項のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 5 7 】

14. 5%未満または0.05%以下のアルファベータTCR陽性細胞～好ましくは検出不能レベルのTCR陽性細胞に達するための、第4項～第13項のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 5 8 】

全細胞を100として0.05%以下のアルファベータTCR陽性細胞～合計1015細胞、1014細胞、1013細胞、1012細胞、1011細胞、1010細胞、109細胞、108細胞、107細胞、106細胞、105細胞において検出不能レベルのTCR陽性細胞に達するための、上記いずれか一項記載の方法。

【 0 0 5 9 】

15. 破壊工程が、あるゲノム配列に特異的なレアカッターエンドヌクレアーゼをコードするmRNAを導入する工程を含む、第4項～第14項のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 6 0 】

16. レアカッターエンドヌクレアーゼがTALエフェクタータンパク質またはCRISPR CAS9である、第4項～第15項のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 6 1 】

17. ウイルスベクター、好ましくはAAV6ウイルスベクターを含むウイルスベクターを使って、CARをコードする外因性遺伝子を細胞に導入する形質転換工程を含む、第4項～第16項のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 6 2 】

18. エンドヌクレアーゼの標的となる遺伝子が、TCR遺伝子、ベータ2ミクログロブリン遺伝子、薬物に対する感受性または抵抗性を付与する遺伝子、サイトカイン遺伝子、またはそれらの組合せからなる群より選択される遺伝子に含まれる配列に特異的である、第4項～第17項のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 6 3 】

19. 抗原をコードするmRNAの量が、 $10 \times 4 \sim 10 \times 15$ 細胞のトランスフェクションまたは $10 \times 6 \sim 10 \times 7$ 細胞のトランスフェクションの場合は、 $0.1 \sim 50 \mu\text{g}$  RNAの範囲内である、第4項～第18項のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 6 4 】

20. 得られた遺伝子改変免疫細胞が、1人または数人の患者にそのまま投与される、第4項～第19項のいずれか一項記載の方法。

【 0 0 6 5 】

21. 供給工程における細胞が、T細胞、炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球またはヘルパーTリンパ球、NK T細胞を含むか、またはそれらに由来する、第4項～第20項のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 6 】

22. T細胞がCD4 + Tリンパ球および/またはCD8 + Tリンパ球を含むか、またはそれらに由来する、第4項 ~ 第21項のいずれか一項記載の方法。

## 【 0 0 6 7 】

細胞が免疫細胞、好ましくはT細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞である、上記のいずれか一項記載の方法。

## 【 0 0 6 8 】

分化および/または成熟工程を含み、細胞が造血幹細胞である、上記の方法。

## 【 0 0 6 9 】

細胞がレシピエントに関して自家または同種異系とさらに規定される、上記のいずれか一項記載の方法。

10

## 【 0 0 7 0 】

23. CARが、ROR1、EGFRvIII、BCMA、CD33、GD3、CD19、CD38、HSP70、CD30、FAP、HER2、CD79a、CD79b、CD123、CD22、CLL-1、MUC-1 GD2、OアセチルGD2、CS1からなる群より選択される細胞表面抗原標的に特異的である、第4項 ~ 第22項のいずれか一項記載の方法。

## 【 0 0 7 1 】

CARが、CD19、BCMA、CD33、EGFRVIII、Flt3、WT1、CD70、MUC16、PRAME、TSPAN10、クローディン18.2、DLL3、LY6G6D、Liv-1、CHRNA2、ADAM10、CD38、HSP70、CD30、FAP、HER2、CD79、CD123、CD22、CLL-1、MUC-1 GD2、OアセチルGD2、CS1、およびそれらの組合せからなる群より選択される細胞表面抗原標的に特異的である、第1項 ~ 第24項のいずれか一項記載の方法。

20

## 【 0 0 7 2 】

CARが、CD19、BCMA、CD33、EGFRVIII、Flt3、WT1、CD70、MUC16、PRAME、TSPAN10、クローディン18.2、DLL3、LY6G6D、Liv-1、CHRNA2、ADAM10、およびそれらの組合せからなる群より選択される細胞表面抗原標的に特異的である、第1項 ~ 第24項のいずれか一項記載の方法。

## 【 0 0 7 3 】

24. CARが単鎖（single chain）CAR（scCAR）または多鎖（multichain）CAR（mcCAR）である、第4項 ~ 第23項のいずれか一項記載の方法。

30

## 【 0 0 7 4 】

scCARが、少なくとも細胞表面抗原標的に対するモノクローナル抗体からのVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、  
CD8 $\alpha$ 、FcERIIIガンマおよびIgG1からなる群において選ばれるヒンジ、  
CD8 $\alpha$  膜貫通ドメイン、  
CD3 $\zeta$  シグナリングドメインを含む細胞質ドメイン、および  
4-1BB共刺激ドメイン  
を含むポリペプチド構造の1つを有する、第4項 ~ 第24項のいずれか一項記載の方法。

## 【 0 0 7 5 】

好ましいCARは、以下の抗原のいずれか1つに対して特異的である:CD38、HSP70、CD30、FAP、HER2、CD79aまたはCD79b、CD123、CD22、CLL-1、MUC-1 GD2、OアセチルGD2、CS1。

40

## 【 0 0 7 6 】

好ましいCAR構成は病的細胞上の抗原のアクセシビリティに適合させたものであり、WO2015107075A1に記載のCARであることができる。

## 【 0 0 7 7 】

25. アロ反応性に関与する少なくとも1つの遺伝子、例えばTCR、ベータ2M、制御因子X関連アンキリン含有タンパク質（RFXANK）、制御因子5（RFX5）、制御因子X関連タンパク質（RFXAP）、およびクラスIIトランス活性化因子（CIITA）、TAP-1、それら

50

の組合せ)を不活化するさらなる工程を含む、第4項～第24項のいずれか一項記載の方法。

【0078】

以下の遺伝子の編集はWO2013158292に準じ、本発明の目的のために設計された特異的TALエフェクタータンパク質を用いる制御因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、制御因子5(RFX5)、制御因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)またはそれらの組合せの編集に関する。

【0079】

26. PDL1、プログラム細胞死(Programmed Death)1(PD-1)、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)、LAG3、Tim3、BTLA、BY55、TIGIT、B7H5、LAIR1、SIGLEC10、2B4などの少なくとも1つの遺伝子を不活化するさらなる追加破壊工程を含む、第4項～第25項のいずれか一項記載の方法。

10

【0080】

27. デオキシシチジンキナーゼ(dCk)、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)、グルコシルコイド受容体(GR)、CD52、およびそれらの組合せから選択される薬物耐性に関与する少なくとも1つの遺伝子を不活化するかまたは過剰発現させるさらなる工程を含む、第4項～第26項のいずれか一項記載の方法。

【0081】

28. 薬物過敏症に関与する免疫細胞中の少なくとも1つの遺伝子、例えばGGH、RhoA、CDK5、CXCR3、NR1H2、URG4、PARP14、AMPD3、CCDC38、NFU1またはCACNG5タンパク質をコードする遺伝子を不活化するさらなる工程を含む、第4項～第27項のいずれか一項記載の方法。

20

【0082】

29. 第1項～第28項のいずれか一項記載の方法に従って得ることができるTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団。

【0083】

30. 医薬として使用するための第29項記載のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団。

【0084】

31. 第29項または第30項記載のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団と薬学的に許容される媒体とを含む薬学的組成物。

30

【0085】

32. がん、感染症または免疫疾患の処置に使用するための第29項～第30項のいずれか一項記載のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団または第33項記載の薬学的組成物。

【0086】

33. 急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、ホジキンリンパ腫(HL)(再発性、難治性)、非ホジキンリンパ腫(NHL)(再発性、難治性)、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、BPDCN、神経膠腫; 膵臓がんもしくは肺がん、膀胱がん、大腸がん、乳がんを含む他の固形腫瘍から選択されるがんの処置または予防において使用するための、第1項～第30項のいずれか一項記載のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団または第32項記載の薬学的組成物。

40

【0087】

34. 患者を処置するための方法であって、以下の工程を含む方法:

細胞表面に抗原マーカーを発現する病的細胞の存在について患者を診断する工程、  
第1項～第28項のいずれか一項記載の遺伝子改変CAR発現免疫細胞の集団を調製する工程、および

該病的細胞について診断された該患者に該遺伝子改変細胞を投与する工程。

【0088】

本発明者らは、TCR陽性細胞の数、特に5%以下のTCR陽性細胞を含む細胞集団におけるTCR陽性細胞の数を、mRNAとして供給される内在性TCRを標的とするキメラ抗原受容

50

体（CAR）の一過性発現で、すなわち抗TCR CAR+免疫細胞を制御された期間にわたって使用することで、検出不能レベルまで、さらに著しく低減させうことを立証した。抗TCR CARをコードするmRNAの発現は自己限定性（self-limited）であり、本明細書において使用する技法を使って制御することができる。TCR+免疫細胞の細胞表面での抗TCR CARの一過性発現に続いて、TCR+T細胞間での溶解が予想される。抗TCR CARはその細胞上に提示されたTCRに対して直接応答するからである。\$。本発明者らによる観察では、TCR-T細胞の濃縮は、インビトロでの改良された抗腫瘍活性、およびTCR陰性細胞を免疫治療に使用した場合のGVHDの有意な減少を伴った。

【0089】

本発明の方法は、今までのCARに基づく処置の欠点の多くを回避する細胞調製をもたらす。本発明は、TCR-T細胞精製工程を必要とせず、対費用効果が高く、患者に投与されたときのCAR+免疫細胞の拡大増殖を防止または限定する方法も提供している。すなわち、本明細書で述べるように、細胞表面上のTCRを標的とするCARをコードするmRNAを約1日～約11日の限られた時間にわたってTCR+免疫細胞にトランスフェクトすることにより、TCR+発現細胞の存在下での抗TCR CAR+細胞の自己活性化、TRC+細胞の溶解、そして最終的に、発現したmRNAの、標的TCRの非存在下での分解、およびTCR陰性細胞（TCR-細胞）の濃縮が可能になるだろう。

10

【0090】

本発明の利点の1つは、拡大増殖させたTCR-免疫細胞を、患者への投与前に精製する必要がないことである。別の利点は、CAR+免疫細胞を、外因性サイトカインによってさらに拡大増殖させる必要がないことである。

20

【0091】

一態様において、本発明の方法および組成物は、遺伝子改変細胞であって、TCR遺伝子が不活化されており、aCARがゲノムに組み込まれてTCR陰性細胞中で安定に発現している遺伝子改変細胞を含む。一態様において、本発明の方法および組成物は、遺伝子改変CAR発現細胞T細胞を含む。

【0092】

本発明の方法および本発明の組成物で 사용할ことができるCAR（抗TCR CARおよび安定発現用のCAR）には、第1世代、第2世代および第3世代デザインを含めて、あらゆるタイプのキメラタンパク質が含まれる。本明細書に記載する方法に従って免疫細胞に導入されるCARは、参照により本明細書に組み入れられるWO2014039523に記載されている単鎖構造または多鎖構造などのデザインを採用することもできる。

30

【0093】

免疫細胞としては、T細胞、ヘルパーT細胞（例えばCD4+細胞）、細胞傷害性T細胞（例えばCD8+）、メモリーT細胞、制御性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL、CD3+）、CD8+T細胞、CD4+T細胞、ナチュラルキラー型T細胞（NK-T）、TCR発現またはナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0094】

免疫細胞としては、ヒト初代免疫細胞、ヒト初代免疫T細胞、ヒト初代リンパ系細胞、ヒト初代幹細胞、ヒト初代前駆細胞が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

40

【0095】

一態様において、本発明の方法および組成物は、T細胞受容体を欠く遺伝子改変CAR+ナチュラルキラー（NK）細胞（CD56+CD3陰性）を含む。

【0096】

一態様において、本発明の方法および組成物は、細胞表面アルファベータT細胞受容体を発現する遺伝子改変CAR+T細胞を含む。

【0097】

一態様において、本発明の方法および組成物は、細胞表面アルファベータT細胞受容体を発現し、かつTCRアルファサブユニットの定常領域をコードする遺伝子（TRAC遺伝子）に挿入を持つTCRアルファ遺伝子を含む、遺伝子改変CAR+T細胞を含む。

50

## 【0098】

一態様において、本発明の組成物および方法は、レアカッターエンドヌクレアーゼによって生成させた遺伝子挿入であって内在性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を及ぼす遺伝子挿入をTRAC遺伝子が含んでいるヒト初代細胞を含み、該ゲノムTRAC遺伝子は、5'から3'に向かって、

(a) ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b) 任意で、該レアカッターエンドヌクレアーゼが標的とするドメイン、

(c) 野生型TRAC遺伝子と比較して、アルファベータTCRの細胞外ドメインまたはアルファベータTCRの膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を及ぼす挿入、

を含み、該挿入は、キメラ抗原受容体をコードする外因性ポリヌクレオチドと、停止コドン、IRES、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチド、終結配列、それらの組合せから選択される外因性ポリヌクレオチド配列とを含む。

10

## 【0099】

一態様において、本発明の組成物および方法は、guide seq分析による決定ではオフサイトカットを検出することができないTALタンパク質改変ヒト初代細胞を含む。

## 【0100】

一態様において、本発明の方法および組成物は、T細胞受容体を欠く、好ましくは遺伝子改変CAR+T細胞の少なくとも95%がT細胞受容体を欠く、遺伝子改変CAR+T細胞の少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.99%がT細胞受容体を欠く（ひいてはTCR陽性細胞が検出不能レベルである）、遺伝子改変CAR+T細胞を含む。

20

## 【0101】

好ましい態様において、本発明の組成物、例えば本発明の方法を使って得られるものは、95%超の、T細胞受容体を欠く遺伝子改変CAR+T細胞、96%超、97%超、98%超、99%超、99.99%超の、T細胞受容体を欠く遺伝子改変CAR+T細胞、さらに好ましくは検出不能レベルのTCR陽性細胞を含む。

## 【0102】

別の態様において、本発明の方法および組成物は、遺伝子改変CAR+造血幹細胞を含む。

## 【0103】

特に本発明は、一過性に発現される抗TCR CARをコードするmRNA配列を含む核酸分子またはポリヌクレオチドを含む組成物および方法を包含し、ここに抗TCR CARは、細胞表面における抗TCR CARの発現が限られた期間にわたって達成されるように、TCRに特異的な抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および共刺激分子の細胞内ドメインを含む。いくつかの態様において、CARの細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間、またはCARの細胞質ドメインと膜貫通ドメインの間には、スペーサドメインもしくはヒンジおよび/またはWO2016120216A1に記載されているように分子状抗体に特異的なエピトープが組み込まれていてもよい。

30

## 【0104】

本発明は、概して、CARを安定に発現するT細胞の使用に関し、例えばCARは、TCR遺伝子への挿入とTCR遺伝子の不活化のために、レンチウイルスまたはAAVに入れて細胞に送達され、一方、TCRによって認識される抗TCR CARはmRNAとして供給される。抗TCR CARが、細胞において限られた時間、すなわちインビトロ形質導入後、1日~7日間、発現される、RNAで操作されたT細胞を使用することが考えられる。また、抗TCR CAR遺伝子がヌクレアーゼを使ってセーフ・ハーバー遺伝子に挿入されていてコンディショナルプロモーターを含む、遺伝子改変細胞を使用することも考えられる。

40

## 【0105】

一態様において、CAR+TCR-免疫細胞の集団を作製するための方法は以下の工程を含む：(a) 細胞を用意する工程、(b) CARを免疫細胞中に形質導入する工程、(c) 抗TCR CARをコードするmRNAをCAR+免疫細胞にトランスフェクトすることで、約1~約11日の

50

限られた時間にわたって、これらの細胞の表現型が抗TCR CAR+になり、mRNAの一過性発現後は、細胞の表現型がCAR+,抗TCR-CAR-細胞に戻るように、細胞表面における抗TCR CARの一過性発現を達成する工程、(d)任意で、工程(c)で得られたCAR+細胞を拡大増殖させる工程、および(e)工程(c)または(d)に続いて、CAR+細胞を患者に直接投与するか、そうでなければ凍結保存する工程。

【0106】

一態様において、CAR+TCR-免疫細胞の集団を誘導するための方法は以下の工程を含む：(a)細胞を用意する工程、(b)細胞表面における抗TCR CARの一過性発現を達成するために、抗TCR CARをコードするmRNAを細胞にトランスフェクトする工程、(c)工程(b)によって得た細胞にCARを形質導入する工程、(d)任意で、CAR+細胞を拡大増殖させる工程、および(e)工程(c)または(d)に続いて、CAR+細胞を患者に直接投与するか、そうでなければ凍結保存する工程。

10

【0107】

別の一態様において、抗TCR CARをコードするmRNAを導入する工程(b)に続いて、細胞は、約1~約11日の範囲の持続時間にわたって、細胞表面にCARの抗原標的を一過性に発現させた後、患者に投与されるか、そうでなければ凍結乾燥される。

【0108】

一態様において、CARの抗原結合ドメインは、CD123、CD19、CS1、CD38、CLL1、hsp70、CD22、ROR1、EGFRvIII、BCMA、CD33、FLT3、CD70、WT1、MUC16、PRAME、TSPAN10、ROR1、GD3、CT83、メソテリンに結合する。

20

【0109】

一態様において、CARの抗原結合ドメインは病的T細胞上に発現する抗原CS1に結合し、mRNAは抗TCR CARおよびCS1を標的とするレアカッターエンドヌクレアーゼをコードする。

【0110】

一態様において、CARの抗原結合ドメインは病的T細胞上に発現する抗原CD38に結合し、mRNAは抗TCR CARおよびCD38を標的とするレアカッターエンドヌクレアーゼをコードする。

【0111】

一態様において、CARの抗原結合ドメインは、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD40、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD123およびCD138)から選択される任意のCD(cluster of differentiation)分子、腫瘍関連表面抗原、例えばErbB2(HER2/neu)、癌胎児性抗原(CEA)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、上皮成長因子受容体(EGFR)、EGFR変異体III(EGFRvIII)、CD20、CD40、ジシアロガングリオシドGD2、導管上皮ムチン、gp36、TAG-72、グリコスフィンゴリピド、神経膠腫関連抗原、 $\alpha$ -ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン(AFP)、レクチン反応性AFP、チログロブリン、RAGE-1、MN-CA IX、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、RUI、RU2(AS)、腸カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ(prostase)、プロスターゼ特異抗原(prostase specific antigen)(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-Ia、p53、プロステイン(prostein)、PSMA、サバイビング(surviving)およびテロメラゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インスリン様成長因子(IGF1)-I、IGF-II、IGF1受容体、メソテリン、腫瘍特異的ペプチドエピトープを提示している主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、腫瘍間質抗原、フィブロネクチンのエクストラドメイン(extra domain)A(EDA)およびエクストラドメインB(EDB)ならびにテネイシン-CのA1ドメイン(TnC A1)および線維芽細胞関連タンパク質(fap)、系譜特異的または組織特異的抗原、例えばCD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、CTLA-4、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、サイトカイン受容体、エンドグリン、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子、BCMA(CD269、TNFRSF17)、またはウイルス特異的表面抗原、例えばHIV特異

30

40

50

的抗原（HIV gp120など）、EBV特異的抗原、CMV特異的抗原、HPV特異的抗原、ラッサウイルス（Lassa virus）特異的抗原、インフルエンザウイルス特異的抗原、ならびにこれらの表面マーカーの任意の誘導体または変異体に結合する。抗原は必ずしも表面マーカー抗原ではなく、細胞の表面にHLAクラスIによって提示される内在性の小さな抗原であることもできる。

【0112】

一例として、本発明は、CD38、CS1などの細胞表面マーカーを特異的に標的とする単鎖CARを、該CARを発現する細胞におけるそれぞれCD38、CS1および/またはCD70をコードする遺伝子の不活化と共に包含する。

【0113】

一例として、本発明は、CD38、HSP70、CD30、FAP、HER2 CD79aまたはCD79b、CD123、CD22、CLL-1、MUC-1 GD2、OアセチルGD2、CS1またはCD70などの細胞表面マーカーを特異的に標的とする単鎖CARを包含する。

【0114】

一例として本発明は、BCMA-CD33-EGFRVIII-Flt3-WT1-CD70、MUC16-PRAME-TSPAN10、クローディン18.2-DLL3-LY6G6D、Liv-1-CHRNA2-ADAM10などの細胞表面マーカーを特異的に標的とする単鎖CARを包含する。

【0115】

多鎖CARは、特に、Fc RIから誘導されうる。この構成では、Fc RIアルファ鎖の高アフィニティーIgE結合ドメインが、T細胞特異性を細胞標的に対してリダイレクトするためにscFvなどの細胞外リガンド結合ドメインで置き換えられ、Fc RIベータ鎖のN末端テールおよび/またはC末端テールが、通常の膜近傍位置に共刺激シグナルを置くために使用される。

【0116】

多鎖CARは、特に、以下の構成要素のうち少なくとも2つを含み、それにより、異なるポリペプチドが自発的に集まって多量体化することで、二量体、三量体または四量体型のCARを形成する：

- a) Fc RIアルファ鎖の膜貫通（transmembrane）ドメインと細胞外リガンド結合ドメインとを含む1つのポリペプチド、
- b) Fc RIベータ鎖のN末端およびC末端細胞質テールの一部と膜貫通ドメインとを含む1つのポリペプチド、および/または
- c) Fc RIガンマ鎖の細胞質内テールおよび膜貫通ドメインのそれぞれ一部を含む少なくとも2つのポリペプチド。

【0117】

そのような構成では、リガンド結合ドメインおよびシグナリングドメインが、別々のポリペプチド上に担持される。異なるポリペプチドは、膜中に近接して固定されることで、互いの相互作用が可能になる。そのような構成では、シグナリングドメインおよび共刺激ドメインが、膜近傍に（すなわち細胞膜に隣接してその内側に）位置することができ、それが、共刺激ドメイン機能の改良を可能にすると思われる。また、マルチサブユニット構成は、T細胞活性化に対する制御が強化されたCARの設計に、より多くの自由度と可能性を与える。例えば、特異性が異なる数種の細胞外抗原認識ドメインを含めることで多重特異性CAR構成を得ることが可能である。

【0118】

多鎖CARにおける異なるサブユニット間の相対比を制御することも可能である。このタイプの構成は、参照により本明細書に組み入れられる文書WO 2014/039523に記載されている。

【0119】

単一の多鎖CARのパーツとしての異なる鎖の集合は、例えば、IgEの高アフィニティー受容体（Fc RI）の異なるアルファ、ベータおよびガンマ鎖を使用し、そこにシグナリングドメインおよび共刺激ドメインを融合することによって可能になる。ガンマ鎖は、膜貫

10

20

30

40

50

通領域と、1つの免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含有する細胞質テールとを含む。

【0120】

多鎖CARは、標的中の異なる要素に同時に結合し、それによって免疫細胞の活性化および機能を増強するように、数個の細胞外リガンド結合ドメインを含むことができる。いくつかの態様において、細胞外リガンド結合ドメインは同じ膜貫通ポリペプチド上にタンデムに配置することができ、任意で、リンカーによって分離することができる。別の態様では、異なる細胞外リガンド結合ドメインを、多鎖CARを構成する異なる膜貫通ポリペプチド上に配置することができる。

【0121】

細胞は、異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む多鎖CARを発現しうる。特定の態様において、細胞は、シグナル伝達ドメインに融合されたFc $\gamma$ RI $\beta$ および/またはガンマ鎖の少なくとも一部と、異なる細胞外リガンド結合ドメインに融合されたFcERI $\alpha$ 鎖のいくつかの部分とを、その表面に発現しうる。別の態様において、細胞は、シグナル伝達ドメインに融合されたFc $\gamma$ RI $\beta$ および/またはガンマ鎖と、異なる細胞外リガンド結合ドメインに融合された数個のFc $\gamma$ RI $\alpha$ 鎖とを発現しうる。

【0122】

したがって、好ましくは標的中の異なる要素に同時に結合し、それによって免疫細胞の活性化および機能を増強するために、それぞれが異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の多鎖CARを細胞中で発現させうる。

【0123】

本発明の好ましい一態様において、本発明のエンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドまたは本発明の抗TCR CARをコードするmRNAは、外来DNAの一過性発現を達成し、その染色体組込みを避けるために、エレクトロポレーションにより、mRNAの形態でトランスフェクトされる。本発明者らは、初代細胞におけるmRNAエレクトロポレーションについて、さまざまな最適条件を決定した。本発明者は、細胞中に物質を送達するためにパルス電場を利用して生細胞を一過性に透過性にするcytoPulse技術を使用した (米国特許第6,010,613号およびWO 2004/083379)。パルスの持続時間、強度およびパルス間の間隔は、初代細胞において最小限の死亡率で高いトランスフェクション効率を得るのに最適な条件になるように、修正することができる。一般に、最初の高電場パルスは小孔の形成を可能にし、一方、後続の低電場パルスはポリヌクレオチドを細胞中に移動させる。

【0124】

本発明の一面において、本発明者は、T細胞における>95%のmRNAトランスフェクション効率の達成につながる工程、およびT細胞において異なる種類のタンパク質を一過性に発現させるためのエレクトロポレーションプロトコールの使用を記述する。特に本発明は、T細胞を形質転換する方法であって、T細胞をRNAと接触させ、T細胞に、

1センチメートルあたり500~3000Vの電圧範囲、好ましくは800V/cm、パルス幅0.1msおよび工程(a)と工程(b)の電気パルス間のパルス間隔0.2~10msで、1回の電気パルス、

1センチメートルあたり500~3000Vの電圧範囲、好ましくは800V、パルス幅100msおよび工程(b)の電気パルスと工程(c)の第1電気パルスとの間のパルス間隔100msで、1回の電気パルス、および

電圧150~325V、好ましくは130V、パルス幅0.2msおよび4回の電気パルスのそれぞれ間のパルス間隔2msで、4回の電気パルス

からなるアジャイルパルスシーケンスを印加する工程を含む方法に関する。

【0125】

好ましい一態様において、初代細胞は、活性化の4~5日後にトランスフェクションに付される。例えば5 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞に、TALENの左アームおよび右アームをコードする各mRNA 10 $\mu$ gをトランスフェクトする。

10

20

30

40

50

## 【0126】

特定の態様において、T細胞を形質転換する方法は、T細胞をRNAと接触させ、T細胞に

(a) 1センチメートルあたり500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1800、2000、2250、2300、2350、2400、2450、2500、2550、2400、2450、2500、2600、2700、2800、2900または3000Vの電圧、パルス幅0.1msおよび工程(a)と工程(b)の電気パルス間のパルス間隔0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10msで、1回の電気パルス、

(b) 500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1800、2000、2250から、2250、2300、2350、2400、2450、2500、2550、2400、2450、2500、2600、2700、2800、2900または3000Vまでの電圧範囲、パルス幅100msおよび工程(b)の電気パルスと工程(c)の第1電気パルスとの間のパルス間隔100msで、1回の電気パルス、および

(c) 50、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、250、300、325Vの電圧、パルス幅0.2msおよび4回の電気パルスのそれぞれの間のパルス間隔2msで、4回の電気パルス

からなるアジャイルパルスシーケンスを印加する工程を含む。

## 【0127】

上述した値の範囲内に含まれる値はいずれも、本願において開示されている。エレクトロポレーション培地は当技術分野において公知の任意の適切な培地であることができる。好ましくは、エレクトロポレーション培地は、0.01~1.0ミリジーメンズにわたる範囲の伝導度を有する。

## 【0128】

以下のエレクトロポレーションプロセスをここに提供する。

	グループ1	グループ2	グループ3	単位
振幅	800	800	130	V
持続時間	0.1	0.1	0.2	ms
間隔	0.2	100	2	ms
回数	1	1	4	

## 【0129】

一態様において、抗TCR CARをコードするmRNAなどの外因性ポリヌクレオチドのトランスフェクションは、エレクトロポレーションによって実施される。

## 【0130】

一態様において、CARの抗原標的をコードするmRNAの細胞表面における一過性発現は、約1~11日、好ましくは約2~5日、より好ましくは約2日超にわたって持続する。

## 【0131】

一態様において、CARの抗原標的をコードするmRNAは、0.5  $\mu\text{g}$  ~ 1  $\mu\text{g}$ の範囲で、 $10^4$  ~  $10^{10}$ 個の免疫細胞にトランスフェクトされる。

## 【0132】

本発明の方法は、アルファベータTCR陽性細胞に結合するか、またはアルファベータTCR発現細胞、CD3発現細胞、アルファTCR発現細胞、ベータTCR発現細胞、もしくは細胞表面に発現されたアルファベータTCRの抗原に選択的に結合する、本発明の抗TCR CARが発現している免疫細胞の存在下で、90%~0.00001%のTCR陽性細胞(例えばアルファベータTCR陽性細胞)を含む細胞がインキュベートされるインキュベーション工程を、さらに含む。

## 【0133】

一態様において、抗TCR CARをコードするmRNAの投与は、抗TCR CAR<sup>+</sup>免疫細胞の増殖および活性化の速度および規模を決定する。したがって、抗TCR CAR<sup>+</sup>免疫細胞を自

己活性化するための方法には、抗TCR CAR<sup>+</sup>免疫細胞の自己活性化の最適レベルの決定が含まれる。本方法は、(a)抗TCR CARをコードするmRNAを0.5 μg ~ 1 μgの用量で適用する工程、(b)(a)においてトランスフェクションに使用したmRNAの各用量について、活性化抗TCR CAR<sup>+</sup>免疫細胞の収率を決定する工程、および(c)(b)で得られる最も高収率の自己活性化CAR<sup>+</sup>細胞を作製することができるmRNAの用量を選択する工程を含む。

#### 【0134】

一態様において、CAR<sup>+</sup>免疫細胞を自己活性化するための方法は、抗TCR CARをコードするmRNAの導入に加えて、免疫チェックポイントとして関与する少なくとも1つの遺伝子、例えばPD1、PDL1リガンドまたはCTLA-4の不活化をさらに含み、この追加工程は、工程(a)の後かつ工程(d)の前に実施される。

10

#### 【0135】

TRAC KO CAR<sup>+</sup>T細胞において破壊される少なくとも1つの追加遺伝子は、例えば限定するわけではないが、免疫細胞を直接阻害するプログラム細胞死1(PD-1、PDCD1またはCD279としても公知である、アクセッション番号:NM\_005018)、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4、CD152としても公知である、GenBankアクセッション番号AF414120.1)、LAG3(CD223としても公知である、アクセッション番号:NM\_002286.5)、Tim3(HAVCR2としても公知である、GenBankアクセッション番号:JX049979.1)、BTLA(CD272としても公知である、アクセッション番号:NM\_181780.3)、BY55(CD160としても公知である、GenBankアクセッション番号:CR541888.1)、TIGIT(VSTM3としても公知である、アクセッション番号:NM\_173799)、B7H5(C10orf54、マウスvista遺伝子のホモログとしても公知である、アクセッション番号:NM\_022153.1)、LAIR1(CD305としても公知である、GenBankアクセッション番号:CR542051.1)、SIGLEC10(GeneBankアクセッション番号:AY358337.1)、2B4(CD244としても公知である、アクセッション番号:NM\_001166664.1)を含む遺伝子のうちの1つであってよい。

20

#### 【0136】

特定の態様において、本発明の方法の破壊工程は、(TRAC遺伝子に加えて)1つの追加遺伝子の不活化、好ましくはPD1、CTLA-4、LAG3、Tim3、BTLA、BY55、TIGIT、B7H5、LAIR1、SIGLEC10、2B4、ならびにTCRベータ1およびTCRベータ2からなる群より選択される2つの遺伝子の不活化に依拠する。いくつかの態様において、本方法の遺伝子改変工程は、PD1とTCRアルファ、PD1とTCRベータ、CTLA-4とTCRアルファ、CTLA-4とTCRベータ、LAG3とTCRアルファ、LAG3とTCRベータ、Tim3とTCRアルファ、Tim3とTCRベータ、BTLAとTCRアルファ、BTLAとTCRベータ、BY55とTCRアルファ、BY55とTCRベータ、TIGITとTCRアルファ、TIGITとTCRベータ、B7H5とTCRアルファ、B7H5とTCRベータ、LAIR1とTCRアルファ、LAIR1とTCRベータ、SIGLEC10とTCRアルファ、SIGLEC10とTCRベータ、2B4とTCRアルファ、2B4とTCRベータからなる群より選択される2つの遺伝子の不活化に依拠する。別の態様において、本方法の遺伝子改変工程は3つ以上の遺伝子の不活化に依拠する。遺伝子改変は好ましくはエクスピボで行われる。

30

40

#### 【0137】

下記表1は、操作されたTCR陰性T細胞の効率および適合性を改良するために、本発明の教示に従って不活化するかまたは過剰発現させることができる遺伝子である遺伝子を示しているが、それらを網羅しているわけではない。

#### 【0138】

免疫チェックポイント遺伝子は、好ましくは、共抑制性受容体機能、細胞死、サイトカインシグナリング、アルギニントリプトファン飢餓、TCRシグナリング、誘導性T-reg抑制、疲弊またはアネルギーを制御する転写因子、および低酸素媒介性寛容に関与するこの表に列挙するものに対して同一性を有する、そのような遺伝子から選択される。ヒト系の場合、編集された遺伝子は編集されたヒト遺伝子である。

50

【 0 1 3 9 】

パスウェイ	不活化することができる パスウェイ中の遺伝子	2014年5月13日時点の NCBIデータベース遺伝子ID (ヒト (Homo sapiens) )
共抑制性受容体	LAG3 (CD223)	3902
	HAVCR2 (TIM3)	84868
	BTLA (CD272)	151888
	CD160 (NK1)	11126
	TIGIT (VSIG9)	201633
	CD96 (TACTILE)	10225
	CRTAM (CD355)	56253
	LAIR1 (CD305)	3903
	SIGLEC7 (CD328)	27036
	A2A (IGKV2-29)	28882
	SIGLEC9 (CD329)	27180
	CD244 (2B4)	51744
	細胞死	TNFRSF10B (CD262)
TNFRSF10A (CD261)		8797
CASP3		836
CASP6		839
CASP7		840
CASP8		841
CASP10		843
Arhgap5 (GFI2)		394
Akap8i		10270
FADD (GIG3)		8772
FAS (RP11)		355
Stk17b (DRAK2)		9262
サイトカインシグナリング	TGFBRII (AAT3)	7048
	TGFBRI	7046
	SMAD2 (JV18)	4087

10

20

30

40

50

	SMAD3	4088	
	SMAD4	4089	
	SMAD10 (SMAD7)	394331	
	SKI (SGS)	6497	
	SKIL (SNO)	6498	
	TGIF1 (HPE4)	7050	
	IL10RA (CD210)	3587	
	IL10RB	3588	
	HMOX2 (HO-2)	3163	
	Jun (AP1)	3725	10
	Ppp3cc	5533	
	Ppm1g	5496	
	Socs1	8651	
	Soc3	9021	
	IL6R (CD126)	3570	
	IL6ST (CD130)	3572	
	Lck	3932	
	Fyn	2534	
	ADAP (FYB)	2533	
	Carma1 (CARD11)	84433	
	Bcl10	8915	20
	Malt1 (IMD12)	10892	
	TAK1 (NR2C2)	7182	
アルギニン/トリプトファン 飢餓	EIF2AK4 (GCN2)	440275	
	Nuak2	81788	
TCR シグナリング	CSK	1445	
	PAG1 (CBP)	55824	
	SIT1	27240	
	CRTAM (CD355)	56253	
	Egr2 (AT591)	1959	
	DGK-a (DAGK)	1606	
	DGK-z	8525	
	Cblb	868	30
	Inpp5b	3633	
	Ptpn2 (PTN2)	5771	
	Vamp7	6845	
	Mast2	23139	
	tnk1	8711	
	stk17b (DRAK2)	9262	
	Mdfic (HIC)	29969	
F11r (CD321)	50848		
誘導性 Treg	FOXP3 (JM2)	50943	
	Entpd1 (CD39)	953	
	PRDM1 (blimp1)	12142	40

疲弊/エネルギーを 制御する転写因子	BATF	10538
	Ypel2	388403
	Ppp2r2d	55844
	Rock1	6093
	Sbf1	6305
	Hipk1 (MYAK)	204851
	Map3k3	4215
	Grk6	2870
	Eif2ak3 (PEK)	9451
	Fyn	2534
	NFAT1 (NFATC2)	4773
低酸素媒介性寛容	GUCY1A2	2977
	GUCY1A3	2982
	GUCY1B2	2974
	GUCY1B3	2983

10

(表1) 本発明に従って操作 (KO、不活化、過剰発現...) された場合に、同種異系TCR陰性T細胞を、免疫治療用に、より活性にする遺伝子

#### 【0140】

特定の態様では、操作されたTCR陰性T細胞であって、CARを発現し、かつ以下から選択される少なくとも1つの内在性ポリヌクレオチド配列の発現を低減または不活化するために少なくとも1つの遺伝子改変を含む操作された細胞が提供される:

20

a) その転写および/または翻訳が、低グルコース条件にตอบสนองして起こる解糖およびカルシウムシグナリングの低減に参与するポリヌクレオチド配列、例えばカルシウムシグナリングを増加させるSERCA3、解糖を増加させるmiR101およびmiR26A、解糖予備能を動員するBCAT、および/または

b) その発現が免疫チェックポイントタンパク質 (例えばTIM3、CEACAM、LAG3、TIGIT) 発現をアップレギュレートするポリヌクレオチド配列、例えばIL27RA、STAT1、STAT3、および/または

c) その発現がHLA-Gとの相互作用を媒介するポリヌクレオチド配列、例えばILT2またはILT4、および/または

30

d) その発現がT細胞増殖のダウンレギュレーションに参与するポリヌクレオチド配列、例えばSEMA7A、Treg増殖を低減するSHARPIN、アポトーシスを低下させるSTAT1、IL-2分泌を増加させるPEA15、およびCD8メモリー分化にとって有利に作用するRICTOR、および/または

e) その発現がT細胞活性化のダウンレギュレーションに参与するポリヌクレオチド配列、例えばmiR21、および/または

f) その発現がサイトカインにตอบสนองするシグナリングパスウェイに参与するポリヌクレオチド配列、例えばJAK2およびAURKA、および/または

g) その発現がT細胞疲弊に参与するポリヌクレオチド配列、例えばDNMT3、miRNA31、MT1A、MT2A、PTGER2。

40

#### 【0141】

特定の態様において、操作されたTCR陰性免疫T細胞は、TRAC遺伝子中に挿入されたキメラ抗原受容体 (CAR) を発現し、マイクロRNAゲノム配列の発現を低減または不活化する遺伝子改変を含み、より具体的には、該マイクロRNAゲノム配列は、miR21、miR26AおよびmiR101から選択される。

#### 【0142】

特定の態様において、操作された細胞はTRAC遺伝子中に挿入されたキメラ抗原受容体 (CAR) を発現し、細胞をある薬物に対して耐性にしかつ/または (別の) ある薬物に対して過敏にする遺伝子改変を含む。

50

## 【0143】

一態様において、本発明の方法は、抗TCR CAR mRNAの導入に加えて、デオキシシチジンキナーゼ (dCk)、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT)、グルココルチコイド受容体 (GR) およびCD52などといった、薬物耐性に関与する少なくとも1つの遺伝子の不活化をさらに含む。

## 【0144】

一態様において、本発明の方法は、抗TCR CARの導入に加えて、GGH、RhoA、CDK5、CXCR3、NR1H2、URG4、PARP14、AMPD3、CCDC38、NFU1およびCACNG5タンパク質をコードする遺伝子など、薬物過敏症に関与する少なくとも1つの遺伝子の不活化をさらに含む。

10

## 【0145】

一態様において、本発明の方法は、抗TCR CAR mRNAの導入に加えて、CAR発現細胞の活性の調整を可能にするオン (ON) またはオフ (OFF) スイッチシステムをさらに含み、このスイッチシステムは、エピトープタギング、薬物耐性、薬物過敏症、およびアレムツズマブ選択と組み合わせられたCD52不活化からなる群より選択される。

## 【0146】

一態様において、抗TCR CARはエピトープタギングドメインを含み、有害反応が生じた場合には免疫細胞を枯渇させるために、モノクローナル抗体をこれに結合させることができる。

## 【0147】

一態様において、抗TCR CARは単鎖CAR (scCAR) である。ssCARは以下のポリペプチドの構造のうちの1つを有する。ssCARは、(a) TCR、TCRサブユニット、またはTCR関連タンパク質、例えばCD3に対するモノクローナル抗体からのVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b) CD8 膜貫通ドメイン、(c) CD8 シグナリングドメインを含む細胞質ドメイン、および (e) 4-1BB共刺激ドメインを含む。

20

## 【0148】

本発明は、抗TCR CAR<sup>+</sup>T細胞を一時的に発現する少なくとも1つの集団を含む薬学的組成物に関する。

## 【0149】

本発明は、がん、感染症または免疫疾患の処置において使用するための薬学的組成物に関する。

30

## 【0150】

mRNAを使って一過性に共発現させた複数のCARを含み、各CARがTCR抗原に対する異なる抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激分子の細胞内ドメインを含む遺伝子改変細胞が考えられる。

## 【0151】

一態様において、一過性トランスフェクト細胞における抗原コードmRNA (antigen-encoded mRNA) の安定性および翻訳効率は、アデノシン塩基、ポリ (A) テールの伸長または短縮によってモニターすることができる。一態様において、mRNAの核酸配列は、約50~5000個のアデノシン塩基 (A)、好ましくは120個のAを含むポリ (A) テールを含む。

40

## 【0152】

一態様において、mRNAの核酸配列は、ヒトベータ-グロブリンに由来する3' UTRのリピートを少なくとも1つは含む3' UTRを含む。一態様において、mRNAは、1つまたは複数のb-グロビン3' UTRのタンデムコピーを含む。この要素はmRNAも翻訳効率も増加させたからである (Holtkamp, Blood, 2006, 108:4009-4017)。

## 【0153】

一態様において、CARの共刺激分子は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3

50

、CD83と特異的に結合するリガンド、およびそれらの任意の組合せからなる群より選択される。

【0154】

一態様において、腫瘍抗原は、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝がん、腎がん、リンパ腫、白血病、肺がん、黒色腫、転移性黒色腫、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの任意の組合せからなる群より選択されるがんに関連する抗原である。

【0155】

本明細書に提示する結果は、本発明のTCR陰性CAR T細胞の投与が、患者から単離された腫瘍に対して溶解活性を有することを実証している。したがって一態様において、本発明の組成物は、がんまたは腫瘍に対する細胞治療として役立つ。

10

【0156】

本発明はがんを持つヒトを処置する方法をさらに包含する。本発明は、TCRが検出不能レベルである、好ましくはfacs分析で検出不能レベルである、本発明に従って得られたTCR陰性CAR + T細胞の有効量を、ヒトに投与する工程を含む。

【0157】

したがって、(a)導入された抗TCR CARをコードするmRNAの分解による細胞活性化の時間的制御、(b)自己活性化抗TCR CAR表現型細胞の、元の表現型抗TC CAR<sup>-</sup>への可逆性を伴い、(c)高度に活性化されたCAR<sup>+</sup>細胞の存続による毒性副作用の可能性が限定されている、TCR陰性CAR + 発現免疫細胞の集団を濃縮するための方法が、本発明によって提供されることは明らかである。

20

【0158】

定義

別段の定義がある場合を除き、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が関係する技術分野の当業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本発明の試験のための実施では、本明細書に記載するものと類似するか等価な任意の方法および材料を使用することができるが、本明細書では好ましい材料および方法を説明する。本発明の説明および特許請求では、以下の術語を使用する。

【0159】

本明細書において使用する術語には、特定の態様を説明する目的しかなく、限定を意図していないことも、理解すべきである。

30

【0160】

本明細書にいう5'キャップ(RNAキャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップまたはRNA m7Gキャップとも呼ばれる)は、真核メッセンジャーRNAの「前方」、すなわち5'端に、転写の開始後まもなく付加された修飾グアニンヌクレオチドである。5'キャップは転写された最初のヌクレオチドに連結された末端基からなる。その存在は、リボソームによる認識およびRNaseからの保護にとって極めて重要である。キャップ付加は転写と共役しており、それぞれが互いに影響を及ぼし合うように、転写と同時に起こる。合成途中のmRNAの5'端は、転写の開始後まもなく、RNAポリメラーゼと会合したキャップ合成複合体によって結合される。この酵素複合体はmRNAキャッピングに必要な化学反応を触媒する。合成プロセスは多段階性化学反応として進行する。キャッピング部分は、mRNAの機能性、例えばその安定性または翻訳の効率を調整するために改変することができる。

40

【0161】

冠詞「a」および「an」は、本明細書では、1つのまたは複数の(すなわち少なくとも1つの)その冠詞の文法上の対象を指すために使用される。一例として「an element(ある要素)」とは、1つの要素または複数の要素を意味する。

【0162】

本明細書にいう「約」は、測定可能な値、例えば量、持続時間などを指す場合には、明示された値からの±20%または±10%、より好ましくは±5%、さらに好ましくは±1%

50

、より一層好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。そのような変動は開示される方法を実施するのに適当だからである。

【0163】

本明細書にいう「活性化」は、検出可能な細胞増殖を誘導するのに十分な刺激を受けたT細胞の状態を指す。活性化には、誘導されたサイトカイン生産および検出可能なエフェクター機能も付随しうる。「活性化T細胞」という用語は、なかんずく、細胞分裂を起こしているT細胞を指す。

【0164】

本明細書において使用する「抗体」という用語は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子を指す。抗体は、自然源または組換え源由来のインタクト免疫グロブリンであることができ、インタクト免疫グロブリンの免疫反応性部分であることもできる。抗体は多くの場合、免疫グロブリン分子である。本発明における抗体は、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体を含むさまざまな形態で存在しうる (Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Harlow et al., 1989 『Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。

10

【0165】

「抗体フラグメント」という用語はインタクト抗体の一部を指し、インタクト抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>およびFvフラグメント、線状抗体、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挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0166】

本明細書にいう「抗体重鎖」または「VH」は、天然のコンフォメーションにあるすべての抗体分子中に存在する2タイプのポリペプチド鎖のうちの大きい方を指す。

【0167】

本明細書にいう「抗体軽鎖」または「VL」は、天然のコンフォメーションにあるすべての抗体分子中に存在する2タイプのポリペプチド鎖のうちの小さい方を指す。軽鎖および軽鎖は2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプを指す。

30

【0168】

本明細書において使用する「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を惹起する分子と定義される。この免疫応答は抗体の生産もしくは特異的免疫適格細胞の活性化またはその両方を伴いうる。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、抗原として機能しうることは、当業者には理解されるであろう。さらにまた抗原は組換えDNAまたはゲノムDNAにも由来しうる。したがって、免疫応答を引き出す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、本明細書において使用される用語としての「抗原」をコードすることは、当業者には理解されるであろう。さらにまた、抗原が必ずしも遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によってコードされる必要はないことも、当業者には理解されるであろう。本発明が、限定するわけではないが、1つまたは複数の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を包含すること、およびこれらのヌクレオチド配列が所望の免疫応答を引き出すためにさまざまな組合せで配置されることは明白である。さらにまた、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要も全くないことは、当業者には理解されるであろう。抗原を合成的に生成させること、または抗原が生物学的試料に由来しうることは、明白である。そのような生物学的試料としては、組織試料、腫瘍試料、細胞または生体液を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。

40

【0169】

本明細書において使用する「抗腫瘍効果」という用語は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、余命の増加、またはがん状態に関連するさまざまな生理学的症状

50

の改善によって明示されうる生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」は、腫瘍発生を最初から防止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示されうる。

【0170】

本明細書において使用する「自家」という用語は、後でその物質を再導入することになる個体と同じ個体に由来する任意の材料を指すものとする。

【0171】

「同種異系」とは、同じ種の異なる動物に由来する移植片を指す。

【0172】

「異種」とは、異なる種の動物に由来する移植片を指す。

10

【0173】

本明細書において使用する「がん」という用語は、異常な細胞の迅速で無制御な成長を特徴とする疾患と定義される。がん細胞は、局所的に広がるか、血流およびリンパ系を介して身体の他の部分に広がりうる。さまざまながんの例として、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵がん、結腸直腸がん、腎がん、肝がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がんなどが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0174】

T細胞および活性化T細胞（これがCD3<sup>+</sup>細胞を意味することを包含する）:T細胞（Tリンパ球ともいう）はリンパ球と呼ばれる白血球の1グループに属する。リンパ球は一般的には細胞媒介性免疫に関与する。「T細胞」の「T」は、胸腺（thymus）由来の細胞またはその成熟が胸腺による影響を受ける細胞を指す。T細胞は、B細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞などの他のリンパ球タイプとは、T細胞受容体として公知の細胞表面タンパク質の存在によって区別することができる。本明細書において使用する「活性化T細胞」という用語は、クラスII主要組織適合性（MHC）マーカーを背景として提示される抗原決定基の認識によって、免疫応答（例えば活性化T細胞のクローン拡大）を生じるように刺激を受けたT細胞を指す。T細胞は、抗原決定基、サイトカインおよび/またはリンホカインならびにCD細胞表面タンパク質（例えばCD3、CD4、CD8などおよびそれらの組合せ）の存在によって活性化される。CDタンパク質を発現する細胞は、T細胞表面でのそのタンパク質の発現について「陽性」とであると言われることが多い（例えばCD3またはCD4発現について陽性である細胞はCD3<sup>+</sup>またはCD4<sup>+</sup>と呼ばれる）。CD3タンパク質およびCD4

20

30

【0175】

「キメラ抗原受容体」または「CAR」とは、例えば、膜貫通ポリペプチドに連結された標的抗原を認識するポリペプチド配列（抗原認識ドメイン）とT細胞を活性化して特異的免疫を与えるように選択された細胞内ドメインポリペプチドとを含むキメラポリペプチドを意味する。最も一般的には、結合ドメインは、特異性ドメイン内の抗体鎖間にフレキシブルリンカーを導入することによって単鎖scFvに変形されたFab抗体フラグメントに由来する。考えうる他の特異性ドメインとして、ホルモンまたはサイトカイン分子のシグナリング部分、受容体の細胞外ドメイン、およびペプチドリガンド、またはライブラリー（例えばファージ）スクリーニングによって単離されるペプチドを挙げるができる（Ramos and Dotti, (2011) Expert Opin Bio Ther 11 (7):855参照）。CARのシグナリング部分と結合部分の間のフレキシビリティは、標的と結合ドメインの間のよりよい相互作用を可能にするために望ましい特徴でありうるので、しばしばヒンジ領域が含まれる。使用することができる構造の一例は、IgG分子などの免疫グロブリンのCH2-CH3領域である。典型的CARのシグナリングドメインは、ゼータ鎖などのTCR-CD3複合体の細胞内ドメインを含む。あるいは、Fc受容体の鎖を使用してもよい。典型的CARの膜貫通部分は、CD4、CD8またはCD28などのタンパク質の膜貫通部分を含みうる（Ramos and Dotti, 前掲書）。いくつかのCARの特徴には、T細胞の特異性および反応性を選択された標的へと非MHC拘束的にリダイレクトするそれらの能力が含まれる。非MHC拘束的な標的認識

40

50

は、CARを発現するT細胞に、抗原プロセッシングに依存せずに標的を認識する能力を与え、これにより、腫瘍エスケープの主要な機序が回避される。

【0176】

「第一世代」のCARは、多くの場合、単一の内部シグナリングドメイン、例えばCD3ゼータ鎖を含むが、それらは、おそらくは活性化が不完全であるために、臨床では効力に不十分な面がある。これらのCARを担持するT細胞の性能を向上させるために、別の刺激ドメイン、多くの場合、CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOSおよびDAP10などの他の受容体の細胞間ドメイン (intercellular domain) に由来するものを含めることによって、T細胞に追加の活性化シグナルを提供する能力を持つ第2世代のCARが作られた。さらに、CARが3つ以上の刺激ドメインを含有する第3世代のCARも開発された (Ramos and Dotti、前掲書)。

10

【0177】

いくつかの例において、CARは、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、および任意で、CD8を含む細胞内ヒンジドメイン、ならびにCD28、4-1BBおよびCD3ゼータを含む細胞内T細胞受容体シグナリングドメインを含むことができる。CD28はT細胞共刺激において重要なT細胞マーカーである。CD8もT細胞マーカーである。4-1BBは、Tリンパ球の分化を促進し長期生存を増進する強力な共刺激シグナルをT細胞に伝達する。CD3ゼータはTCRと会合してシグナルを生じ、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含有する。別の例では、CARは、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3ゼータを含む細胞内T細胞シグナリングドメインを含むことができる。さらなる例において、CARは、細胞外ヒンジドメインおよびCD8を含む膜貫通ドメイン、ならびにCD28およびCD3ゼータを含む細胞内T細胞受容体シグナリングドメインを含むことができる。

20

【0178】

本明細書にいう「共刺激シグナル」は、TCR/CD3ライゲーションなどの一次シグナルと組み合わせられて、T細胞の増殖および/またはキー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につながるシグナルを指す。

【0179】

「疾患」とは、動物がホメオスタシスを維持できず、その疾患が改善されなければ、その動物の健康が悪化し続けるという、動物の健康状態である。これに対し、動物における「障害」とは、動物はホメオスタシスを維持することはできるが、その動物の健康状態は、その障害がない場合よりも好ましくないという、健康状態である。無処置のまま放置しても、障害は、その動物の健康状態のさらなる低下を、必ずしも引き起こさない。

30

【0180】

本明細書で使用する「ドナーT細胞」という用語は、同種異系幹細胞移植後に抗ウイルス免疫および/または抗腫瘍免疫を付与するためにレシピエントに投与されることが多いT細胞を指す。ドナーT細胞は骨髄移植拒絶を阻害し、アロ生着 (alloengraftment) の成功を増加させるために利用されることが多いが、同じドナーT細胞が、宿主抗原に対するアロ攻撃的応答 (alloaggressive response) を引き起こして、それが移植片対宿主病 (GVHD) をもたらす場合もある。一定の活性化ドナーT細胞は、他の活性化T細胞より高いまたは低いGvHD応答を引き起こしうる。ドナーT細胞には、レシピエント腫瘍細胞に対する反応性があり、それが有益な移植片対腫瘍効果を引き起こす場合もある。

40

【0181】

本明細書にいう「有効量」は、治療的利益または予防的利益を与える量を意味する。

【0182】

「コードする」とは、生物学的プロセスにおいて、所定のヌクレオチド配列を有するか (すなわちrRNA、tRNAおよびmRNA) または所定のアミノ酸配列を有する他のポリマーおよび高分子の合成のために、テンプレートとして役立つという、遺伝子、cDNAまたはmRNAなどのポリヌクレオチド中の特定ヌクレオチド配列の固有の性質、およびそこからもたらされる生物学的性質を指す。したがって、ある遺伝子に対応するmRNAの転写および

50

翻訳が細胞または他の生物学的な系においてタンパク質を生産するのであれば、その遺伝子はタンパク質をコードする。コード鎖、すなわちmRNA配列と同一であって通常は配列表に掲載されているヌクレオチド配列と、遺伝子またはcDNAの転写にテンプレートとして使用される非コード鎖は、どちらも、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しているということができる。

【0183】

本明細書にいう「内在性」とは、ある生物、細胞、組織もしくは系の内部に由来するか、またはある生物、細胞、組織もしくは系の内部で生産される、任意の物質を指す。

【0184】

本明細書において使用する「外因性」という用語は、ある生物、細胞、組織もしくは系に導入される任意の物質であって、その生物、細胞、組織もしくは系の外部で生産されたものを指す。

10

【0185】

本明細書において使用する「発現」という用語は、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。

【0186】

「操作された細胞」とは、本明細書では、例えば外因性核酸配列の導入または内在性遺伝子配列の特異的変更などによって操作された細胞を指す。導入される外因性核酸配列は、改変されていてもよい任意の種の野生型配列を含みうる。操作された細胞は、内在性遺伝子中に1つまたは複数の変異、挿入および/または欠失などの遺伝子改変を含み、かつ/またはゲノムへの外因性核酸（例えば遺伝子コンストラクト）の挿入を含みうる。操作された細胞は、単離された細胞または培養細胞を指しうる。操作された細胞は「形質導入細胞」であってよく、この場合、細胞は、例えば操作されたウイルスに感染している。例えば、実施例に記載するようにレトロウイルスベクターを使用しうるが、適切なウイルスベクターは、レンチウイルスなど、他にも考えられる。DNAベクターのトランスフェクションまたはエレクトロポレーションなどといった非ウイルス法も使用しうる。使用しうるDNAベクターはトランスポゾンベクターである。したがって、操作された細胞は、「安定にトランスフェクトされた細胞」または「一過性にトランスフェクトされた細胞」でもありうる。トランスフェクションとは、遺伝子が発現されるようにDNA（またはRNA）を細胞に導入するための非ウイルス法を指す。トランスフェクション法は、リン酸カルシウムトランスフェクション、PEGトランスフェクション、および核酸のリポソームトランスフェクションもしくはリポプレックストランスフェクションなど、当技術分野では広く公知である。そのようなトランスフェクションは一過性であってよいが、安定なトランスフェクションであってもよく、その場合は、遺伝子コンストラクトがそれぞれのゲノムに組み込まれている細胞を選択することができる。

20

30

【0187】

「過剰増殖性疾患」という用語は、細胞の過剰増殖に起因する疾患と定義される。例示的な過剰増殖性疾患として、がんまたは自己免疫疾患が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。他の過剰増殖性疾患として、血管閉塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化または炎症性腸疾患を挙げることができる。

40

【0188】

本明細書にいう「インビトロ転写RNA」とは、インビトロで合成されたRNA、好ましくはmRNAを指す。一般に、インビトロ転写RNAは、インビトロ転写ベクターから生成する。インビトロ転写ベクターは、インビトロ転写RNAを生成するために使用されるテンプレートを含む。

【0189】

「単離され」とは、自然状態から変更されまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きている動物中に自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、その自然状態の共存物質から部分的に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

50

在するか、または例えば宿主細胞などの非ネイティブ環境に存在することができる。

【0190】

別段の明示がある場合を除き、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重物であって同じアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列をすべて包含する。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は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が一部のバージョンではイントロンを含有しうるという限りにおいて、イントロンも包含しうる。

【0191】

本明細書にいう「オープンリーディングフレーム」または「ORF」は、潜在的にポリペプチドまたはタンパク質をコードしうる塩基の配列を含有する一連のヌクレオチドである。オープンリーディングフレームはスタートコード配列（開始コドン（initiation codon））またはスタートコドン（start codon）と停止コドン配列（終止コドン）の間に位置する。

10

【0192】

mRNAの安定性を高め、より効率のよい翻訳が得られるように、リーダー配列を付加してもよい。通常、リーダー配列は小胞体へのmRNAの誘導に参与する。例として、自分自身の切断を遅らせるHIV-1エンベロープ糖タンパク質（Env）のシグナル配列、およびIgE遺伝子リーダー配列が挙げられる（Kutzler, M.A., and Weiner, D.B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88、Li, V., et al., 2000. *Virology* 272:417-28、Xu, Z.L., et al. 2001. *Gene* 272:149-56、Malin, A.S., et al., 2000. *Microbes Infect.* 2:1677-85、Kutzler, M.A., et al., 2005. *J. Immunol.* 175:112-125、Yang, J.S., et al., 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1379-84、Kumar, S., et al., 2006. *DNA Cell Biol.* 25:383-92、Wang, S., et al., 2006. *Vaccine* 24:4531-40）。IgEリーダーは小胞体への挿入を増進するために使用しうる（Tepler, I, et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5912）。

20

【0193】

本明細書にいう「レンチウイルス」はレトロウイルス科の一属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染することができる点で、レトロウイルスの中ではユニークであり、レンチウイルス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ので、最も効率のよい遺伝子送達ベクター法の1つである。HIV、SIVおよびFIVはいずれもレンチウイルスの例である。レンチウイルス由来のベクターは、インビボでかなりのレベルの遺伝子導入を達成するための手段になる。

30

【0194】

AAVはアデノ随伴ウイルスに由来するウイルス粒子であり、好ましいのはWO2017053729A1またはPA2017 70240に記載のAAV6である。

【0195】

ナチュラルキラー細胞（NK細胞）は大型顆粒リンパ球（LGL）と定義され、Bリンパ球およびTリンパ球を生成する共通のリンパ系前駆細胞から分化する3つ目の種類の細胞を構成する。NK細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃および胸腺において分化し、成熟した後、循環系に入ることが知られている。NK細胞はT細胞抗原受容体（TCR）も汎TマーカーCD3も表面免疫グロブリン（Ig）B細胞受容体も発現しないが、通常は、ヒトでは表面マーカーCD16（FCYRIII）およびCD56を発現し、C57BL/6マウスではNK1.1またはNK1.2を発現する。ヒトNK細胞の最大80%はCD8も発現する。

40

【0196】

別段の明示がある場合を除き、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重物であって同じアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列をすべて包含する。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含みうる。

【0197】

「機能的に連結される」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間の機能的連結であって、後者の発現をもたらすものを指す。例えば、第1核酸配列が第2核酸配列と機能的

50

な関係に配置されている場合、第1核酸配列は第2核酸配列と機能的に連結されている。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のであれば、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に連結されている。一般に、機能的に連結された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合する必要がある場合には、同じ読み枠にある。

【0198】

「過剰発現した」腫瘍抗原または腫瘍抗原の「過剰発現」という用語は、患者の特定組織内または特定器官内での、その組織または器官からの正常細胞における発現レベルと比較して、固形腫瘍のような罹患領域からの細胞における腫瘍抗原の異常な発現レベルを示すものとする。腫瘍抗原の過剰発現を特徴とする固形腫瘍または血液学的悪性疾患を有する患者は、当技術分野において公知の標準的アッセイによって決定することができる。

10

【0199】

「患者」、「対象」、「個体」などの用語は、本明細書では相互可換的に使用され、本明細書に記載する方法を適用することができる任意の動物、またはインビトロであるかインサイチューであるかを問わず、その細胞を指す。一定の非限定的態様において、患者、対象または個体はヒトである。

【0200】

本明細書において使用する「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖と定義される。さらにまた、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書において使用される核酸とポリヌクレオチドは相互可換である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであって、それを単量体型「ヌクレオチド」に加水分解することができるという一般知識を有している。単量体型ヌクレオチドはヌクレオシドに加水分解することができる。本明細書にいうポリヌクレオチドとしては、当技術分野において利用可能な任意の手段によって、例えば限定するわけではないが、組換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCRなどを使った組換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングによって得られる、および合成手段によって得られる、すべての核酸配列が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0201】

本明細書において使用する「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は相互可換的に使用され、ペプチド結合によって共有結合的に連結されたアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成することができるアミノ酸の最大数には制限はない。ポリペプチドは、ペプチド結合によって互いに接合された2つ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を包含する。本明細書において使用する場合、この用語は、当技術分野においてペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーなどともよく呼ばれる短い鎖と、当技術分野において一般にタンパク質と呼ばれて多くのタイプが存在する長い鎖を、どちらも包含する。「ポリペプチド」は、例えば、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変異体、改変されたポリペプチド、誘導體、アナログ、融合タンパク質などを包含する。ポリペプチドは、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組合せを包含する。

30

40

【0202】

免疫学的チェックポイントとは、免疫系によって発現される分子であって、抗原に対する免疫応答において通常は必須であるシグナルを強めるか（共刺激分子）または弱める分子である。多くのがんは、T細胞シグナルを阻害することによって、自分自身を免疫系から保護している。

【0203】

免疫チェックポイント遺伝子はT細胞刺激をT細胞阻害に向かわせうる。例えば、プログラム細胞死受容体（programmed death receptor）の略であるPD1と、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質（cytotoxic T-lymphocyte-associated protein）4の略であっ

50

てCD152とも呼ばれるCTLA-4は、主要なキープレイヤーの2つである。T細胞活性化が起こると、T細胞においてPD1発現が誘導される。PD1受容体のリガンドはPD1リガンド（PDL1、B7-H1およびCD272としても公知である）およびPDL2（B7-DCおよびCD273としても公知である）であり、通常は抗原提示細胞において発現する。PD1-PDL（PD1リガンド）カップリングはT細胞の不活化を引き起こし、T細胞寛容の誘導に参与する（Pardoll（2012）Nat Rev 12:252参照）。HIV感染がそうであるように慢性的抗原曝露の存在下でT細胞機能障害が観察される場合、PD1アップレギュレーションは何らかの形でT細胞疲弊（キーエフェクター機能の漸進的喪失と定義される）に関連していると考えられる。PD1は免疫監視機構からの腫瘍特異的エスケープにも役割を果たしうる。PD1は、慢性骨髄性白血病（CML）でも急性骨髄性白血病（AML）でも、腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）において大量に発現することが実証されている。PD1は黒色腫浸潤T細胞（TIL）でもアップレギュレートされる（Dotti（2009）Blood 114（8）:1457-58参照）。腫瘍は、PD1リガンドPD-L1またはそれよりは稀ではあるがPD1リガンドPDL2を発現することが見出されており、これらはCTLにおけるPD1のアップレギュレーションと組み合わせられると、T細胞機能性の喪失およびCTLの効果的な抗腫瘍応答を媒介する能力の欠如の一因となりうる。研究者らは、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）に慢性的に感染しているマウスでは、抗PD-1抗体の投与により、PD1-PDL相互作用を遮断し、一部のT細胞機能性（増殖およびサイトカイン分泌）を回復させて、ウイルス量の減少につなげることができたことを示している（Barber et al（2006）Nature 439（9）:682-687）。

10

20

#### 【0204】

別の免疫学的チェックポイント遺伝子であるCTLA-4受容体は、T細胞受容体共刺激因子CD28と同様に、抗原提示細胞上のCD80リガンドおよびCD86リガンドと相互作用する。しかし、これらの抗原とCD28との相互作用がT細胞の活性化を引き起こすのに対し、CD80またはCD86とCTLA-4の相互作用は、IL-2分泌およびIL-2受容体発現を妨害し、重要な細胞周期構成要素の発現を阻害することによって、T細胞活性化を拮抗する。CTLA-4は、大半の休止T細胞の表面には見出されないが、T細胞活性化後は一過性にアップレギュレートされる。したがってCTLA-4はT細胞活動の活性化と阻害のバランスにも参与する（Attia et al.（2005）J Clin Oncol.23（25）:6043-6053参照）。転移性黒色腫を持つ対象においてCTLA4抗体が使用された初期の臨床研究では疾患の退縮が見られたが（Attia、前掲書）、後の研究では、この抗体で処置された対象は、自己寛容の破壊に関係すると思われる治療の副作用（免疫関連有害事象:発疹、大腸炎、肝炎など）を呈することがわかった。このデータの分析から、抗CTLA4抗体の結果としての腫瘍退縮の強さは免疫関連有害事象の重症度の強さと直接相関することが示唆された（Weber（2007）Oncologist 12（7）:864-872）。

30

#### 【0205】

「刺激」という用語は、刺激分子（例えばTCR/CD3複合体）とそのコグネイトリガンドとが結合し、それによりシグナル伝達事象、例えば限定するわけではないがTCR/CD3複合体によるシグナル伝達を媒介することによって誘導される一次応答を意味する。刺激は、一定の分子の発現の変化、例えばTGF- $\beta$ 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編成などを媒介することができる。

40

#### 【0206】

「刺激分子」とは、この用語を本明細書において使用する場合には、抗原提示細胞上に存在するコグネイト刺激リガンドと特異的に結合するT細胞上の分子を意味する。

#### 【0207】

本明細書において使用する「治療」という用語は、処置および/または予防を意味する。治療効果は、疾患状態の抑制、寛解または根絶によって得られる。

#### 【0208】

「治療有効量」という用語は、研究者、獣医師、医師または他の臨床家が求めている、組織、系または対象の生物学的または医学的応答を引き出す対象化合物の量を指す。「治

50

療有効量」という用語は、投与されたときに、処置される障害または疾患の徴候または症状のうちの1つまたは複数の発達を防止し、またはある程度緩和するのに十分な化合物の量を包含する。治療有効量は、化合物、疾患およびその重症度、ならびに処置される対象の年齢、体重などに依存して変動するだろう。

【0209】

疾患を「処置する」とは、この用語を本明細書において使用する場合には、対象が経験す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低減することを意味する。

【0210】

本明細書にいう「トランスフェクト」または「形質転換」または「形質導入」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。「トランスフェクト」または「形質転換」または「形質導入」細胞とは、外因性核酸によるトランスフェクションまたは形質転換または形質導入を受けた細胞である。細胞には初代対象細胞およびその子孫が含まれる。

10

【0211】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）とは、標的を絞って腫瘍に浸潤し、腫瘍細胞を殺す、さまざまな受容体を有するT細胞を指す。本願の方法を使ってTILの活性を調節すれば、腫瘍細胞の排除の、より直接的な制御が可能になるだろう。

【0212】

範囲:本開示の全体を通して、本発明のさまざまな局面を、範囲形式で表すことができる。範囲形式での説明は、単に便宜上および簡潔な表現のためであって、本発明の範囲に対する確固たる限定であると解釈してはならないと、理解すべきである。したがって、ある範囲の記載は、その範囲内の考えうる部分的範囲および個々の数値を具体的に開示しているとみなすべきである。例えば、1~6などの範囲の説明は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などの部分的範囲、ならびにその範囲内の個々の数字、例えば1、2、2.7、3、4、5、5.3および6などを、具体的に開示しているとみなすべきである。これは範囲の幅とは無関係に適用される。

20

[本発明1001]

TCR陽性細胞を消滅させるための方法であって、  
TCR陽性細胞を含む初代細胞の集団を用意する供給工程、  
コンディショナルプロモーターの制御下に抗TCR CARをコードする配列を含むmRNAまたはDNAを導入することによって細胞の表面に抗TCRキメラ抗原受容体（抗TCR CAR）を一過性に発現させることを含む、形質転換工程、  
抗TCR CARを一過性に発現する細胞を、TCR陽性細胞を含む細胞の集団と接触させる工程を含む、方法。

30

[本発明1002]

操作された細胞を製造するための方法であって、  
ドナーからの免疫細胞が用意される、供給工程、  
内在性T細胞受容体（TCR）構成要素をコードする少なくとも1つの遺伝子を破壊することによって細胞が操作される、破壊工程、  
次に、または同時に、  
組換えキメラ抗原受容体（CAR）をコードする少なくとも1つの外因性ポリヌクレオチドを該細胞のゲノムに導入することによって細胞が改変される、第1形質転換工程、  
次に、  
抗TCRキメラ抗原受容体（抗TCR CAR）を一過性に発現させるための第2形質転換工程を少なくとも含む、方法。

40

[本発明1003]

第2形質転換工程が、  
抗TCR CARをコードする外因性または合成ポリヌクレオチド、例えば抗TCR CARをコードする合成mRNA、またはコンディショナルプロモーターの制御下に抗TCR CARをコー

50

ドする配列を含むDNAを、細胞に導入することを含む、本発明1002の方法。

[本発明1004]

供給工程、  
任意で、活性化工程、  
TCR構成要素を不活化するための破壊工程、  
CARを導入するための第1形質転換工程、  
抗TCR CARを一過性に発現させるための第2形質転換工程、  
追加破壊工程、  
拡大増殖工程、  
任意の精製工程、  
充填および仕上げ工程  
を順次含む、本発明1002または本発明1003の方法。

10

[本発明1005]

患者ではない健常ドナーからの細胞が用意される、供給工程、  
内在性T細胞受容体(TCR)構成要素をコードする少なくとも1つの遺伝子を破壊することによって細胞が改変される、破壊工程、  
それに続く、またはその後、その前、もしくはそれと同時の、  
組換えキメラ受容体をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを該細胞に導入することによって細胞が改変される、第1形質転換工程、  
それに続く、  
抗TCR CARを一過性に発現させるための第2形質転換工程、  
充填および仕上げ工程  
を少なくとも含む、本発明1002~1004のいずれかの操作された細胞を製造するための方法。

20

[本発明1006]

抗TCR CARが、  
TCRのエピトープに特異的である、  
TCR関連タンパク質のエピトープに特異的である、  
CD3サブユニットのエピトープに特異的である、  
TCRサブユニットのエピトープに特異的である、  
TCRサブユニットの組合せに特異的である、  
TCRアルファサブユニットのエピトープに特異的である、  
TCRベータ1またはTCRベータ2サブユニットのエピトープに特異的である、  
TCRアルファベータサブユニットの(共通)エピトープに特異的である、  
本発明1002~1005のいずれかの方法。

30

[本発明1007]

抗TCR CARをコードする外因性または合成ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:2の配列、  
または以下の一連の配列:SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:5を含む、本発明1002~1006のいずれかの方法。

40

[本発明1008]

細胞がT細胞である、より好ましくは、抗TCR CARがTCR陽性細胞に結合したときに細胞溶解活性を呈する抗TCR CAR発現細胞を得るための、細胞溶解活性を呈するT細胞である、本発明1002~1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

外因性または合成ポリヌクレオチドを導入する工程がエレクトロポレーションによって実行される、本発明1002~1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

抗TCR CARの半減期が12時間超~10日である、本発明1002~1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

50

抗TCR CAR mRNAの半減期が3時間～72時間である、本発明1002～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

5%未満または0.05%以下のアルファベータTCR陽性細胞、好ましくは検出不能レベルのTCR陽性細胞に達するための、本発明1002～1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

破壊工程が、あるゲノム配列に特異的なリアクターエンドヌクLEASEをコードするmRNAを導入することを含む、本発明1002～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

リアクターエンドヌクLEASEがTALエフェクタータンパク質またはCRISPR CAS9である、本発明1002～1013のいずれかの方法。

10

[本発明1015]

ウイルスベクター、好ましくはAAV6ウイルスベクターを含むウイルスベクターを用いて、細胞に、CARをコードする外因性遺伝子を導入する形質転換工程を含む、本発明1002～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

エンドヌクLEASEの標的となる遺伝子が、TCR遺伝子、ベータ2ミクログロブリン遺伝子、薬物に対する感受性または抵抗性を付与する遺伝子、サイトカイン遺伝子、またはそれらの組合せからなる群より選択される遺伝子に含まれる配列に特異的である、本発明1002～1015のいずれかの方法。

20

[本発明1017]

抗原をコードするmRNAの量が、 $10^{\times 4}$ ～ $10^{\times 15}$ 細胞のトランスフェクションまたは $10^{\times 6}$ ～ $10^{\times 7}$ 細胞のトランスフェクションの場合は、0.1～50  $\mu$ g RNAの範囲内である、本発明1002～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

得られた遺伝子改変免疫細胞が、1人または数人の患者にそのまま投与される、本発明1002～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

供給工程における細胞が、T細胞、炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球またはヘルパーTリンパ球、NK T細胞を含むか、またはそれらに由来する、本発明1002～1018のいずれかの方法。

30

[本発明1020]

T細胞がCD4<sup>+</sup>Tリンパ球および/またはCD8<sup>+</sup>Tリンパ球を含むか、またはそれらに由来する、本発明1002～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

CARが、ROR1、EGFRvIII、BCMA、CD33、GD3、CD19、CD38、HSP70、CD30、FAP、HER2、CD79a、CD79b、CD123、CD22、CLL-1、MUC-1 GD2、OアセチルGD2、CS1からなる群より選択される細胞表面抗原標的に特異的である、本発明1002～1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

CARが単鎖CAR (scCAR) または多鎖CAR (mcCAR) である、本発明1002～1021のいずれかの方法。

40

[本発明1023]

アロ反応性に関与する少なくとも1つの遺伝子、例えばTCR、ベータ2M、制御因子X関連アンキリン含有タンパク質 (RFXANK)、制御因子5 (RFX5)、制御因子X関連タンパク質 (RFXAP)、およびクラスIIトランス活性化因子 (CIITA)、TAP-1、それらの組合せを不活化するさらなる工程を含む、本発明1002～1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

PDL1、プログラム細胞死1 (PD-1)、細胞傷害性Tリンパ球抗原4 (CTLA-4)、LAG3、Tim3、BTLA、BY55、TIGIT、B7H5、LAIR1、SIGLEC10、2B4などの少なくとも1つ

50

の遺伝子を不活化するさらなる追加の破壊工程を含む、本発明1002～1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

デオキシシチジンキナーゼ(dCk)、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)、グルコシルコイド受容体(GR)、CD52、およびそれらの組合せから選択される薬物耐性に関与する少なくとも1つの遺伝子を不活化するかまたは過剰発現させるさらなる工程を含む、本発明1002～1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

薬物過敏症に関与する免疫細胞中の少なくとも1つの遺伝子、例えばGGH、RhoA、CDK5、CXCR3、NR1H2、URG4、PARP14、AMPD3、CCDC38、NFU1、またはCACNG5タンパク質をコードする遺伝子を不活化するさらなる工程を含む、本発明1002～1025のいずれかの方法。

10

[本発明1027]

本発明1002～1026のいずれかの方法に従って得ることができるTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団。

[本発明1028]

3%未満のアルファベータTCR+、0.03%未満のアルファベータTCR+、0.01%未満のアルファベータTCR+、0.001%未満のアルファベータTCR+、0.00001%未満のアルファベータTCR+を含む、本発明1027のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団。

[本発明1029]

医薬として使用するための、本発明1027または本発明1028のTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団。

20

[本発明1030]

本発明1027～1029のいずれかのTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団と、薬学的に許容される媒体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1031]

がん、感染症、または免疫疾患の処置に使用するための、本発明1027～1029のいずれかのTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団または本発明1030の薬学的組成物。

[本発明1032]

急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、ホジキンリンパ腫(HL)(再発性、難治性)、非ホジキンリンパ腫(NHL)(再発性、難治性)、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、BPD、CN、神経膠腫；膵臓がんまたは肺がん、膀胱がん、大腸がん、乳がんを含む他の固形腫瘍から選択されるがんの処置または予防において使用するための、本発明1027～1029のいずれかのTCR陰性CAR発現免疫細胞の集団または本発明1030の薬学的組成物。

30

[本発明1033]

患者を処置するための方法であって、

・細胞表面に抗原マーカーを発現する病的細胞の存在について患者を診断する工程、  
・本発明1001～1029のいずれかの遺伝子改変CAR発現免疫細胞の集団を調製する工程、  
および

40

・該病的細胞について診断された該患者に該遺伝子改変細胞を投与する工程を含む、方法。

【図面の簡単な説明】

【0213】

添付の図面を参照して態様を本明細書に記載する。

【0214】

【図1】10%未満のTCR陽性細胞を含む同種異系細胞に本発明で使用される抗TCR CARをコードするmRNAをトランスフェクトした後に算出された枯渇効率を表す。D2は、TRAC TALENエレクトロポレーション後のD2におけるCD3 CAR mRNAのエレクトロポレーション(EP)ならびにCD3 CARエレクトロポレーションの4日後に実施したフローサイト

50

メトリー（FACS）によるTCRおよびCD3の細胞表面発現の検出に対応する。D7 = TRAC TALEN EP後のD7に行ったCD3 CAR mRNAのEPならびにCD3 CAR EPの3日後に行ったTCRおよびCD3のFACS。D9 = TRAC TALEN EP後のD9に行ったCD3 CAR mRNAのEP、CD3 CAR EPの4日後に行ったTCRおよびCD3のFACS。

【図2】TRAC遺伝子mRNAに特異的なTALENを使ったTCR遺伝子阻害後の細胞との比較で抗TCR CARを一過性に発現する細胞を異なる用量で使用した場合の枯渇効率（%）を示す。

【図3】（A）CD3 + TCR + 集団排除の概略図。（B）48時間の間隔をおいたTRAC TALEN mRNAと抗CD3 CAR mRNAの逐次的トランスフェクション後のCD3 + TCR + 細胞のパーセンテージ。N = 7、5人の個別T細胞ドナー。（C）拡大増殖期の開始時と終了時における残存CD3 + TCR + 細胞。N = 7、5人の個別T細胞ドナー。（D）抗CD3 CAR mRNAのトランスフェクションありまたはなしでの、拡大増殖期の終了時におけるT細胞集団のCD4 + /CD8 + 比。N = 5、5人の個別T細胞ドナー。（E）CD8 + 集団におけるCD62L/CD45RAの発現。（F）全T細胞集団におけるPD1およびLAG3の発現。N = 5、5人の個別T細胞ドナー。有意性は標準的な対応のあるt検定で決定する。\* = p 0.05、\*\* = p 0.01。

【図4】（A）抗CD3 CAR mRNAのトランスフェクションありまたはなしでの、CAR T細胞の10日間にわたる抗原依存的増殖。N = 7、5人の個別T細胞ドナー。（B）3日間にわたる標的細胞死滅。N = 3、3人の個別T細胞ドナー。（C） $5 \times 10^5$ 個のCAR T細胞（抗CD3 CAR mRNAトランスフェクションありまたはなしで作製されたもの）で処置されたRaji担持マウスの腫瘍負荷量（平均放射輝度）。（D）マウス生存率のカプラン-マイヤー分析。1人のドナーからのCAR T細胞。1群あたり3匹のマウス。有意性は標準的な対応のあるt検定で決定する。\* = p 0.05、\*\* = p 0.01。

【図5】Aは、2日、7日および9日の間隔をおいた（CD22 CAR非存在下での）TRAC TALEN mRNAとCD3 CAR mRNAの逐次的トランスフェクション後のCD3 + TCR + 細胞のパーセンテージを表す。B.T細胞ドナー1からの、48時間の間隔をおいたTRAC TALEN mRNAとCD3 CAR mRNAの逐次的トランスフェクション後のCD3 + TCR + 細胞のパーセンテージ。

【図6】CD3 CAR mRNAのトランスフェクションあり（赤）またはなし（青）での、CD4 + 集団におけるCD62L/CD45RAの発現。N = 5、5人の個別T細胞ドナー。

【図7】CD3 CAR mRNAトランスフェクションありまたはなしで作製された $10 \times 10^6$ 個のUCAR T細胞またはUCAR T細胞で処置されたRaji担持マウスの腫瘍負荷量（生物発光シグナル）。

【発明を実施するための形態】

【0215】

発明の詳細な説明

本明細書には、有害性（例えば腫瘍溶解症候群、サイトカインストーム、オフターゲット毒性、移植片対宿主病、GVHD）は低い、患者に投与される前に、効率が向上するように活性化CAR<sup>+</sup>細胞は十分に濃縮されている、TCR陰性CAR<sup>+</sup>免疫細胞を作るための新しい方法および組成物を記載する。本発明者らは、TCR陰性CAR T細胞のT細胞刺激能は、完全長抗TCR CARをコードするmRNA、特にSEQ ID NO:12のmRNAを一過性に発現させることで、著しく高めうることを見出した。抗TCR CARをコードするmRNAの発現は自己限定性である。すなわち、本明細書で述べるように、抗TCR CARをコードするmRNAを約1～約11日の限られた時間にわたってCAR<sup>+</sup>免疫T細胞にトランスフェクトすることにより、TCR陰性CAR<sup>+</sup>T細胞の精製およびCAR<sup>+</sup>T細胞の活性化が可能になり、抗TCR CAR mRNAの分解後は、CAR<sup>+</sup>T-APC細胞は、その元のCAR<sup>+</sup>表現型に戻ることができて、CAR<sup>+</sup>表現型は長く持続する。予想外なことに、抗TCR-CARをコードするmRNAの用量に依存して、CAR<sup>+</sup>T細胞の集団が濃縮された。本発明者らの観察によると、CAR<sup>+</sup>T細胞の濃縮は、インビトロでの抗腫瘍活性の改良と、副作用の低減を伴った。

【0216】

本方法の利点は、T細胞の増殖および生存をサポートするためにCAR<sup>+</sup>免疫細胞を拡大増殖させる必要がないことであり、これは、インビトロ刺激を報告している大半の研究とは対照的である。典型的には、形質導入、レンチウイルス形質導入、AAV6による形質導入またはエレクトロポレーションによってT細胞中にCARを導入するための工程に続いて、サイトカイン処理によってT細胞を拡大増殖させる。外因性サイトカインを省略すると、CAR<sup>+</sup>T細胞の活性化度は低くなる。別の利点は、必要としている患者に投与する前に、CAR<sup>+</sup>免疫細胞を精製する必要がないことである。

## 【0217】

細胞は、T細胞;腫瘍浸潤T細胞;CD56<sup>+</sup>T細胞およびCD57<sup>+</sup>T細胞を含むナチュラルキラー型T細胞(NK-T);TCR発現細胞でありうる。T細胞としては、ヘルパーT細胞(例えばCD4<sup>+</sup>細胞)、細胞傷害性T細胞(例えばCD8<sup>+</sup>)、メモリーT細胞、制御性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL、CD3<sup>+</sup>)などが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

## 【0218】

本発明に包含される操作された遺伝子改変細胞は、ナチュラルキラー(NK)細胞(TCR<sup>neg</sup>/CD56<sup>+</sup>CD3<sup>neg</sup>)、造血幹細胞である。

## 【0219】

本発明は、概して、CARを発現するレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターまたはAAVベクターを使ってCARを安定に発現する自家または同種異系T細胞の使用に関する。RNAで操作されたT細胞であって、抗TCR CARが細胞内で限られた時間にわたって発現される細胞を使用することが考えられる。TALEN(登録商標)などのヌクレアーゼによってCARを安定に発現するように遺伝子操作された細胞を含むことも考えられる。後者の場合、CARの配列はゲノム中に組み込まれる。

20

## 【0220】

一態様において、抗TCR CARを一過性に発現させるための方法は、以下の工程を含む:  
 (a) 細胞を用意する工程、  
 (b) 抗TCR CARではないCARを細胞に形質導入する工程、  
 (c) 抗TCR CARをコードするmRNAを(b)で得られた免疫細胞にトランスフェクトすることで、約1~約11日の限られた時間にわたって、これらの細胞の表現型が抗TCR CAR<sup>+</sup>Tになり、mRNAの一過性発現後は、細胞の表現型がCAR<sup>+</sup>(抗TCR CARではないCAR<sup>+</sup>)に戻るように、細胞表面における抗TCR CARの一過性発現を達成する工程、  
 (d) 任意で、工程(c)で得られたCAR<sup>+</sup>細胞を拡大増殖させる工程、および  
 (e) 工程(c)または(d)に続いて、TCR陰性CAR<sup>+</sup>細胞を患者に投与するか、そうでなければ凍結保存する工程。

30

## 【0221】

別の一態様において、CAR<sup>+</sup>免疫T細胞の集団を誘導するための方法は、以下の工程を含む:

(a) 免疫T細胞を用意する工程、  
 (b) 細胞表面における抗TCR CARの一過性発現を達成するために、抗TCR CARをコードするmRNAを免疫T細胞にトランスフェクトする工程、  
 (c) 抗TCR CARではないCARを(b)で得た免疫T細胞に形質導入する工程、  
 (d) 任意で、免疫T細胞を拡大増殖させる工程、  
 (e) 工程(c)または(d)に続いて、免疫T細胞を患者に投与するか、そうでなければ凍結保存する工程。

40

## 【0222】

一態様では、抗TCR CARをコードするmRNAが0.5 μg ~ 1 μgの範囲で、10<sup>5</sup> ~ 10<sup>7</sup>個の範囲の免疫細胞にトランスフェクトされる。

## 【0223】

一態様において、CARの抗原標的をコードするmRNAの投与は、抗TCR CAR<sup>+</sup>免疫細胞の増殖および活性化の速度および規模を決定する。したがって、CAR<sup>+</sup>免疫細胞を自己活性化するための方法には、抗TCR CAR<sup>+</sup>免疫の自己活性化の最適レベルの決定が含まれる

50

。本方法は、(a) 抗TCR CARをコードするmRNAを0.5  $\mu$ g ~ 1.0  $\mu$ gの間で変動する用量で適用する工程、(b) (a)においてトランスフェクションに使用したmRNAの各用量について、自己活性化CAR発現細胞の収率を決定する工程、および(c) (b)で得られる最も高収率の自己活性化細胞を作製することができるmRNAの用量を選択する工程を含む。

【0224】

本発明者らは、使用される混合免疫細胞集団からTCR陰性CAR<sup>+</sup>T細胞を濃縮するために、抗TCR CARをコードするmRNAについて、用量依存性を決定した。加えて、本発明者らは、一過性抗TCR CAR mRNAの存在下でのTCR-neg CAR<sup>+</sup>T細胞集団の濃縮が、以前に細胞をより低用量のレンチウイルス粒子で形質導入した場合よりも大きいことを観察した。

【0225】

さらに別の実験において、本発明者らは、抗TCR CARをコードするmRNAが、CD4およびCD8の発現に及ぼす効果を調べた。その結果から、細胞表面でのmRNAの一過性発現はCD4/CD8比を変化させないことがわかる。

【0226】

以下の実験において、本発明者らは、一過性に発現させた抗TCR mRNAが抗腫瘍活性を改良するかどうかを分析した。その結果から、抗TCR mRNAの一過性発現は実験に使用した抗CD123 CARの細胞溶解活性を変化させないことがわかるが、TCR陰性抗CD123 CAR<sup>+</sup>T細胞はインビトロ抗腫瘍活性がわずかに改良されているようである。

【0227】

一態様において、自己活性化抗TCR CAR<sup>+</sup>免疫細胞の集団は、抗TCR CAR発現細胞におけるT細胞活性化の細胞表面マーカーを使って決定すると、免疫細胞全体の40% ~ 99%、好ましくは75% ~ 95%の範囲を占める。

【0228】

本発明の方法は、レシピエント以外のドナーからT細胞を調達する追加の工程を含んでもよく、したがって同種異系処置に関わりうる。したがって本発明の方法は、ドナーからT細胞を調達する追加の工程、ならびに例えばWO 2013/176915に記載されているようなMHC認識に関与するおよび/または免疫抑制薬の標的であるその遺伝子を不活化するための工程を含みうる。T細胞受容体(TCR)は、抗原の提示に応答してT細胞の活性化に参加する細胞表面受容体である。TCRは一般に2つの鎖アルファおよびベータで構成され、それらが集合してヘテロ二量体を形成し、CD3伝達サブユニットと会合して細胞表面に存在するT細胞受容体複合体を形成する。インタクト抗原を認識する免疫グロブリンとは対照的に、T細胞は、プロセッシングされたペプチドフラグメントがMHC分子と会合したものによって活性化され、それがT細胞による抗原認識にMHC拘束性として知られる追加の側面を導入する。T細胞受容体によるドナーとレシピエントの間のMHC不一致の認識は、T細胞増殖および移植片対宿主-ドナー(Graft-versus-Host-Donor)(GvHD)疾患の潜在的発生につながる。TCRの正常な表面発現は、この複合体の7つの構成要素すべての協調的な合成および集合に依存することが示されている(Ashwell and Klusner 1990)。TCRアルファまたはTCRベータの不活化は、結果として、T細胞表面からTCRを排除することで、アロ抗原の認識を防止し、よってGvHDを防止する。主にGVHDはアルファベータTCRの存在と関連する。したがって、さらに本発明によれば、TCR構成要素をコードする少なくとも1つの遺伝子を不活化することによって、TCR陰性CAR<sup>+</sup>T細胞の生着が改良されうる。TCRアルファ遺伝子および/またはTCRベータ遺伝子を不活化することによって、TCRは細胞中で非機能的になる。

【0229】

同種異系細胞は、「既製(off-the-shelf)」の凍結保存された操作された同種異系CAR<sup>+</sup>T細胞を含めて、本明細書に記載する方法で使用できると考えられる。したがって、細胞の適正な生着を保証するために、それらが非アロ反応性になるように、細胞をさらに操作することが好ましい。一態様において、本明細書に記載するCAR発現免疫細胞を自己活性化するための方法は、同種異系性に関与する少なくとも1つの遺伝子、例えばTCR、ベータ2MまたはTAP-1の不活化を含み、この追加工程は、本明細書に記載する方法

10

20

30

40

50

の工程 (a) の後かつ工程 (d) の前に実施される。例えば内在性T細胞発現は、shRNA発現によるRNAi、ジンクフィンガー、CRISPRまたはTALENS、メガヌクレアーゼ (Meganuclease) などの方法によって抑制することができる。本発明者らは、TALEN (商標) (Collectics、8, rue de la Croix Jarry, 75013、パリ、フランス) という商標の方がよく知られている特異的TALヌクレアーゼを使って、T細胞受容体をコードする遺伝子を遺伝子的に不活化する方法を、以前に開示した。この方法は同種異系T細胞の作製を可能にする (WO 2013/176915)。したがって、自己活性化した操作されたCAR<sup>+</sup>T細胞は、内在性アルファベータT細胞受容体を発現するT細胞の (すべてではないにしても) 大半が除去されており、それゆえに、内在性アルファベータT細胞受容体が望まれていないターゲットを引き起こすいかなるリスクも避けることができる。

10

## 【0230】

正常な免疫能を持つ宿主において、同種異系細胞は通常は、宿主免疫系によって迅速に拒絶される。非放射線照射血液製品中に存在する同種異系白血球は5~6日を超えて持続しないことが実証されている。したがって、同種異系細胞の拒絶を防止するには、宿主の免疫系を効果的に抑制しなければならない。グルココルチコイドステロイドは、免疫抑制のために広く治療的に使用されている。この種類のステロイドホルモンは、T細胞のサイトゾル中に存在するグルココルチコイド受容体 (GR) に結合して、核内へのトランスロケーションと、免疫学的プロセスに参与するいくつかの遺伝子の発現を調節する特異的DNAモチーフの結合をもたらす。グルココルチコイドステロイドによるT細胞の処理は、T細胞アレルギーにつながりT細胞活性化を妨害するサイトカイン生産レベルの低減をもたらす。CAMPATH1-Hとしても公知であるアレムツズマブは、12アミノ酸グリコシルホスファチジル-イノシトール (GPI) 連結糖タンパク質であるCD52を標的とするヒト化モノクローナル抗体である (Waldmann and Hale, 2005)。CD52は、Tリンパ球およびBリンパ球上に高レベルに発現しており、単球にはそれよりは低レベルに発現しているが、顆粒球および骨髄前駆細胞上には存在しない。CD52に対するヒト化モノクローナル抗体であるアレムツズマブによる処置は、循環するリンパ球および単球の急速な枯渇を誘導することが示されている。これは、T細胞リンパ腫の処置に、そして場合によっては移植のためのコンディショニングレジメンの一部として、頻繁に使用されている。しかし養子免疫治療の場合、免疫抑制薬の使用は、導入された治療用T細胞に有害な効果も有するだろう。それゆえに、これらの条件において養子免疫治療アプローチを効果的に使用するには、導入された細胞が、免疫抑制処置に対して抵抗性であることが必要だろう。

20

30

## 【0231】

したがって、一過性に発現させた抗TCR mRNAでTCR-neg CAR<sup>+</sup>免疫細胞を精製するための本明細書記載の方法は、本発明者らが以前にWO2015121454で述べたように、レシピエントの免疫抑制処置に参与する少なくとも1つの遺伝子を不活化するための工程を含む。例えば一態様において、レシピエントの免疫抑制処置がCD52抗原を標的とするヒト化抗体が関わるものである場合、不活化されるべき遺伝子は内在性CD52遺伝子である。CD52を不活化するための工程は (a) の後かつ工程 (d) の前に実施される。別の態様として、レシピエントの免疫抑制処置がデキサメタゾンなどのコルチコステロイドが関わるものである場合、不活化されるべき遺伝子はグルココルチコイド受容体 (GR) である。内在性GR遺伝子を不活化するための工程は (a) の後かつ工程 (d) の前に実施される。別の態様として、レシピエントの免疫抑制処置がタクロリムスまたはフジマイシンとしても公知であるFK506が関わるものである場合、不活化されるべき内在性遺伝子はFKBPファミリー遺伝子メンバーまたはその変異体である。内在性FKBPファミリー遺伝子を不活化するための工程は (a) の後かつ工程 (d) の前に実施される。別の態様として、レシピエントの免疫抑制処置がシクロスポリンが関わるものである場合、不活化されるべき内在性遺伝子はシクロフィリンファミリー遺伝子メンバーまたはその変異体である。内在性FKBPファミリー遺伝子を不活化するための工程は (a) の後かつ工程 (d) の前に実施される。

40

## 【0232】

50

一部の患者が化学療法剤の活性に対する耐性を獲得することは詳細に記録されている。例えばキナーゼ阻害剤はがんの処置に使用されて成功を収めているが、一部の患者は薬物の活性に対する耐性を獲得する(WO2008089388)。本発明者らは、化学療法剤に対して耐性な同種異系T細胞を工学的に作製する方法を、以前に開発した(WO2015075195、WO201515867、WO2015140268、WO2016120218)。さらにまた、薬物耐性には、操作されたT細胞を選択的に拡大増殖して、これらの細胞への不十分な遺伝子移入による問題を回避することができるという利点もある。

#### 【0233】

一態様において、本明細書に記載するように一過性に発現する抗TCR mRNAでTCR-neg CAR<sup>+</sup>免疫細胞を精製するための本明細書記載の方法は、デオキシシチジンキナーゼ(dCk)、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)、グルココルチコイド受容体(GR)およびCD52などといった、薬物耐性に関与する少なくとも1つの遺伝子の不活化を含む。この不活化工程は、本明細書に記載する方法の工程(a)の後かつ工程(d)の前に実施される。例えば、CD52遺伝子をロックアウトすると、ドナーT細胞は、リンパ球除去剤(lymphodepleting agent)アレムツズマブ(CAMPATH-1H(登録商標))に対して耐性になる。アレムツズマブは、12アミノ酸の28kDのグリコシル化グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)連結細胞表面タンパク質であるヒトCD52(hCD52)に対する組換えヒト化IgG1モノクローナル抗体である(Hale et al., Tissue Antigens 35:118-27 (1990)、Hale et al., 2001、前掲、Waldmann and Hale 2005)。CD52は、正常、悪性両方のBリンパ球およびTリンパ球によって高レベルに発現される細胞表面タンパク質である(Hale et al., J Biol Reg Homeost Agents 15:386-391 (2001)、Huh et al., Blood 92:Abstract 4199 (1998)、Elsner et al., Blood 88:4684-4693 (1996)、Gilleece et al., Blood 82:807-812 (1993)、Rodriguez et al., Clin Cancer Res 12:7174-7179 (2006)、Ginaldi et al., Leuk Res 22:185-191 (1998))。CD52は、単球、マクロファージおよび好酸球では、それより低レベルに発現し、成熟ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球および血液幹細胞ではほとんど発現が見られない(同上書)。アレムツズマブによる処置は、循環するリンパ球および単球の急速な枯渇を誘導することが示されている。

#### 【0234】

別の局面によれば、薬物耐性遺伝子を発現させることによって、薬物に対する耐性をT細胞に付与することができる。ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ2(IMPDH2)、カルシニューリンまたはメチルグアニントランスフェラーゼ(MGMT)など、いくつかの遺伝子の変異体アレルは、細胞に薬物耐性を付与することが確認されている。例えばヒトアルキルグアニントランスフェラーゼ(hAGT)をコードする薬物耐性遺伝子MGMTは、ニトロソウレアおよびテモゾロミド(TMZ)などのアルキル化剤の細胞傷害効果に対する耐性を付与するDNA修復タンパク質である。6-ベンジルグアニン(6-BG)はニトロソウレアの毒性を増すAGTの阻害剤であり、TMZの細胞傷害効果を増すために、この作用物質と共投与される。AGTの変異体をコードするMGMTのいくつかの突然変異型は、6-BGによる不活化に対して高い耐性を有するが、DNA損傷を修復するそれぞれの能力は保っている(Maze et al., (1999) J.Pharmacol.Exp.Ther.290:1467-1474)。P140KMGMTベースの薬物耐性遺伝子治療は、マウス、イヌ、アカゲザルおよびヒト細胞、特に造血細胞に、ケモプロテクションを付与することが示されている(Zielske et al., (2003) J.Clin.Invest.112:1561-1570、Pollok et al., (2003) Hum. Gene Ther.14:1703-1714、Gerull et al., (2007) Hum. Gene Ther. 18:451-456、NefFei a/., (2005) Blood 105:997-1002、Larochelle et al., (2009) J. Clin. Invest. 119:1952-1963、Sawai et al., (2001) Mol. Ther. 3:78-87)。遺伝子を不活化するための工程は、本明細書に記載する方法の工程(a)の後かつ工程(d)の前に実施される。

#### 【0235】

CARが付加されたT細胞の活性化は、T細胞活性化をT細胞阻害と釣り合わせるように設

計された免疫学的チェックポイントのエンゲージメントゆえに、阻害されうる。PD1受容体（プログラム細胞死受容体）を発現するPDCD1、PDL1リガンドまたはCTLA-4（細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4、CD152としても公知である）などといった免疫チェックポイントをコードする遺伝子は公知である。PD1-PD-L1/PD-L2相互作用は、T細胞を不活化し、アポトーシスおよび細胞疲弊を増加させることによって、腫瘍がCAR誘導（CAR-targeted）T細胞による作用をエスケープすることを可能にする。例えばPD-1はB7-4（B7-4分子は抗原提示細胞上に発現する）の受容体であり、B7-4は免疫細胞上の阻害性受容体に結合したときに免疫細胞活性化を阻害することができる。したがってT細胞阻害を防止または低減するために、本発明では、PD1、PDL1リガンドまたはCTLA-4に関して、免疫チェックポイントの阻害剤の使用が考えられる。

10

## 【0236】

したがって、一過性に発現させた抗TCR mRNAでTCR-neg CAR<sup>+</sup>免疫細胞を精製するための本明細書記載の方法は、PDCD1、PDL1リガンドまたはCTLA-4などの免疫チェックポイントとして関与する少なくとも1つの遺伝子を不活化するための工程を含む。この追加工程は工程（a）の後かつ工程（d）の前に実施される。例えば、PDCDまたはCTLA-4遺伝子がノックアウトされるPDCDおよび/またはCTLA-4特異的ヌクレアーゼまたは転写因子によるCAR<sup>+</sup>T細胞の処理は、がん細胞によって生産されたPD1リガンドに対して耐性であり、それゆえにPD-1が媒介するT細胞疲弊を起こすことがなく、かつ/またはCTLA-4が媒介するT細胞阻害に対して耐性である、関心対象のCARを発現するT細胞をもたらす。あるいは、CAR中のエンドドメインは、CARを発現する細胞、例えばT細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞などにおける阻害シグナル（例えばPD1）を含みうる。例えばCARは、抗原を選択的に認識する抗原結合ドメインを含みうる。また、エンドドメインは、CARを含む細胞が細胞死滅を活性化する原因となりまたはそれを促進し、細胞における阻害シグナルの誘導ももたらす。

20

## 【0237】

上で説明したとおり、第2世代または第3世代のCAR<sup>+</sup>免疫細胞による医学的処置は、場合によっては、無制御なT細胞の増殖もしくは活性化または患者の健常細胞上の予期せぬ抗原に対する活性化による有害副作用につながりうる。したがって、直接的な毒性および無制御な増殖のリスクを減少させるために、操作されたTCR陰性CAR<sup>+</sup>T細胞は、抗TCR mRNAに加えて、例えば必要に応じてトランスジェニック細胞を排除する自殺遺伝子その他の遺伝子、例えばHSV-TKなどをコードするさらなる遺伝子コンストラクトを含む（Bondanza et al., Blood 107, 1828-1836（2006）に総説がある。したがって一定の態様において、一過性に発現させた抗TCR mRNAを使ってTCR-neg CAR<sup>+</sup>免疫細胞を精製するための本明細書記載の方法は、誘導性自殺遺伝子をコードするコンストラクトの導入を含む。自殺遺伝子を導入する工程は、本明細書に記載する方法の工程（a）の後かつ工程（d）の前に実施される。

30

## 【0238】

形質転換細胞または形質導入細胞を排除するための自殺遺伝子の使用は、当技術分野において周知である。したがって一定の態様において、本明細書に記載する方法では、CARをコードし、かつ誘導性自殺遺伝子（例えばカスパーゼ9、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ（HSV-tk）、シトシンデアミナーゼ（CD）およびシトクロムP450）を含む、発現ベクターが考えられる。

40

## 【0239】

ドナーリンパ球輸注のための自殺遺伝子の1つは、免疫原性でありうるものの、単純ヘルペスウイルスI型のチミジンキナーゼ遺伝子（HSV-tk）であり、これはそのプロドラッグである抗ウイルス物質ガンシクロビルと組み合わせられる（Bonini et al., (1997), Science 276:1719-1724）、Bordignon et al., 1995、Tiberghin et al. 2001）。Boniniらは、HSV-TK自殺遺伝子が形質導入されたドナーリンパ球が患者において最大1年にわたって抗腫瘍活性を提供し、形質導入細胞の排除はガンシクロビルを使って達成されることを教示している。さらに、Gonzalezら（（2004）J. Gene Med. 6:704-711）は、L1-

50

CAM上のエピトープに特異的なキメラscFvFc:ゼータ免疫受容体を発現するように遺伝子改変された細胞傷害性Tリンパ球クローンによる神経芽細胞腫のターゲティングを記載しており、ここでは、トランスジェニッククローンを排除するために、コンストラクトがハイグロマイシンチミジンキナーゼ (HyTK) 自殺遺伝子をさらに発現させる。

#### 【0240】

一定の態様において、誘導性自殺遺伝子は、カスパーゼ9もしくはカスパーゼ8またはシトシンデアミナーゼなど、ヒトに対して非免疫原性である。例えばカスパーゼ9は特異的な化学的二量体化誘導因子 (chemical inducer of dimerization) (CID) を使って活性化することができる (US20130071414)。Buddeら (2013) は、誘導性カスパーゼ9 (iC9) 自殺スイッチと組み合わされたCAR、すなわちCD20 CARを教示している。出願US 2014/0286987では、後者の遺伝子が、変異型FK506結合タンパク質 (FKBP1) への結合により、プロドラッグAP1903 (タクロリムス) の存在下で機能的になる。上記カスパーゼ技術 (CaspasCIDE (商標)) がGD2を標的とする第3世代CAR T細胞に応用された臨床試験が、Bellicum社による資金提供を受けて進行中である。多量体化剤に基づく同様のアポトーシス誘導系が、出願WO 2014/152177にも記載されている。

10

#### 【0241】

一態様において、CAR (抗TCR CARではないもの) をコードすると共に、抗原をコードするmRNAの導入に加えて、望ましくない効果が生じた場合に操作された免疫細胞の枯渇を可能にするRQR8自殺遺伝子をさらに含む発現ベクターを含む免疫細胞がある。Philipら (2014) は、形質導入細胞の選択を可能にするコンパクトなマーカー/自殺遺伝子として使用されるRQR8系を記載している。RQR8は、CD34抗原とCD20抗原の両方からの標的エピトープの組合せに由来する。このコンストラクトは、臨床的に承認されたCliniMACS CD34システム (Miltenyi) による選択を可能にする。そのうえ、このRQR8コンストラクトは、幅広く使用されている医薬抗体リツキシマブに結合して、トランスジーン発現細胞の選択的欠失をもたらす。このシステムでは、RQR8がレトロウイルスベクターにおいて口蹄疫2Aペプチドを使ってCARと一緒に共発現されることにより、2つの独立したトランスジーン (RQR8およびCAR) の発現がT細胞の表面において起こる。

20

#### 【0242】

自殺遺伝子はCARと同じプロモーターから発現させることができる。あるいは、自殺遺伝子は別のプロモーターから発現させることもできる。すなわち、1つのプロモーターでCARの発現を駆動しつつ、自殺遺伝子は独立したプロモーターから発現させることができる。CARと同じプロモーターからの自殺遺伝子の発現は好ましく、任意の周知の配列内リボソーム進入部位 (IRES) または自己切断性2aペプチドコード配列を使って達成することができる。CARの核酸コンストラクトにおいて使用することができる公知のIRES配列としては、EMCV、c-myc、FGF-2、ポリオウイルスおよびHTLV-1由来のIRESが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

#### 【0243】

CAR T細胞は患者に移入された後に急性有害事象を促進する場合がある。詳細に記録された有害事象には、移植片対宿主病 (GvHD)、オンターゲットオフ腫瘍 (on-target off-tumor) 活性、またはベクター由来の挿入変異導入 (vector derived insertional mutagenesis) による異常リンパ増殖能がある。したがって一態様において、CARの細胞外結合ドメインはエピトープタギングドメインを含んでもよく、免疫細胞を枯渇させるには、モノクローナル抗体をこれに結合させることができる。以前、本発明者らは、参照により本明細書に組み入れられるWO 2016120216に記載のとおり、細胞選別と細胞枯渇の両方が可能であるようにCARの細胞外結合ドメイン (scFv) が改変されている、mAbによる選別/枯渇システムを記述した。このシステムの構造は、選択されたエピトープをscFv内に挿入することであり、このエピトープは特異的抗体 (好ましくはmAb) によって認識される特異性を有する。主として、CARの外部リガンド結合ドメインがエピトープを含むように改変されるという事実を考慮すると、異なるCAR構成、すなわち単鎖構成または多鎖構成を想定することができる。VHポリペプチドおよびVLポリペプチドならびに特異的エ

40

50

ピトープから形成される本発明のキメラscFvは、それ自体が、エピトープの挿入位置とリンカーの使用に依存して異なる構造を有しうる。そのようなシステムを生成させるには、数組のエピトープ-mAb対、特に既に医療用に承認されているもの、例えば限定するわけではないがCD20/リツキシマブなどを、使用することができる。

#### 【0244】

薬物過敏症は予測することができず、今なお、CAR T細胞治療にとって重大な臨床上の問題である。これは、さまざまな表現型からなり、主として、軽度の皮膚反応（例えば発疹、じんま疹、および血管性浮腫）から命を脅かす有害反応までにわたる皮膚有害反応である。したがって一態様において、CAR免疫細胞を誘導するための方法は、薬物過敏症に関与する少なくとも1つの遺伝子、例えばGGH（グルカゴン）、RhoA（Rasホモログ遺伝子ファミリーメンバーA）、CDK5、CXCR3、NR1H2、URG4、PARP14、AMPD3、CCDC38、NFU1およびCACNG5タンパク質をコードする遺伝子の不活化を含む。この不活化工程は、本明細書に記載する方法の工程（a）の後かつ工程（d）の前に実施される。

10

#### 【0245】

本発明のCAR<sup>+</sup>免疫細胞へのオンまたはオフスイッチシステムの追加導入は、細胞へのCARの活性の調整を可能にするだろう。この場合、スイッチシステムは、エピトープタギング、薬物耐性、薬物過敏症、およびアレムツズマブ選択と組み合わされたCD52不活化のリストから選択される。例えば、CD52遺伝子をロックアウトすると、ドナーT細胞はリンパ球除去剤アレムツズマブ（CD52に対する抗体）に対して耐性になる。オンおよびオフスイッチシステムを導入する工程は、本明細書に記載する方法の工程（a）の後かつ工程（d）の前に実行される。

20

#### 【0246】

mRNAを使って一過性に共発現させた複数のCARを含み、各CARがTCR、TCRサブユニット、TCR関連タンパク質に対する異なる抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激分子の細胞内ドメインを含む細胞も考えられる。

#### 【0247】

本発明には、哺乳動物、好ましくは腫瘍抗原の発現量の上昇に関連する疾患、障害または状態を有するヒトを処置するための組成物も包含される。本組成物は、抗TCR CARではないCARを含むTCR陰性CAR<sup>+</sup>細胞の有効量を哺乳動物に投与することを含み、前記CARは、結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および共刺激分子の細胞内ドメインを含む。

30

#### 【0248】

本発明は、がんを持つヒトを処置するための、または抗TCR CARではないCARを含むTCR-neg CAR<sup>+</sup>T細胞を前記ヒトに投与するための、これらの組成物をさらに含む。

#### 【0249】

方法および組成物

一般事項

方法の実施、ならびに本明細書に開示する組成物の調製および使用では、別段の表示がある場合を除き、当技術分野の技能の範囲内にある分子生物学、生化学、クロマチン構造および解析、計算化学、細胞培養、組換えDNAおよび関連分野における従来の技法を使用する。これらの技法は文献に詳しく説明されている。例えばSambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989およびThird edition, 2001、Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987および定期改定版、METHODS IN ENZYMOLOGYシリーズ, Academic Press, San Diego、Wolff e, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998、METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, 「Chromatin」 (P.M. Wasserman and A.P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999、およびMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, 「Chromatin Protocols」 (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999を参照されたい。

40

#### 【0250】

50

エレクトロポレーションによるmRNAトランスフェクションは一過性発現系である。初代Tリンパ球へのmRNAのエレクトロポレーションの成功は、現在では、効率のよいTCR遺伝子移入に使用されている (Zhao, et al., 2006, Mol Ther 13 (1):151-159, Zhao, et al., 2005, J. Immunol. 174 (7):4415-4423)。(Rabinovich, et al., 2009, Hum Gene Ther 20 (1):51-61)。

【0251】

CAR

通例、CARをコードする天然核酸または合成核酸の発現は、CARポリペプチドまたはその一部分をコードする核酸をプロモーターに機能的に連結し、そのコンストラクトを発現ベクターに組み入れることによって達成される。ベクターは複製および真核生物への組込みに適しうる。典型的クローニングベクターは、所望の核酸配列の発現の調節に有用な転写および翻訳終結因子、開始配列、ならびにプロモーターを含有する。核酸は、限定するわけではないが、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス、およびコスミドなど、いくつかのベクタータイプにクローニングすることができる。特に興味深いベクターとして、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挙げられる。

10

【0252】

ウイルスベクター技術は当技術分野では周知であり、例えばSambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY)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、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびヘルペスウイルスなどがあるが、それらに限定されるわけではない。一般に、適切なベクターは、少なくとも1種の生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、便利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マーカーを含有する (例えばWO 01/96584、WO 01/29058および米国特許第6,326,193号)。

20

【0253】

ウイルスに基づく系は、哺乳動物細胞への遺伝子移入のために、いくつか開発されている。例えばレトロウイルスは遺伝子送達システムのための便利なプラットフォームを提供する。選択された遺伝子は、当技術分野において公知の技法を使ってベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次に、その組換えウイルスを単離し、インピボまたはエクスピボで、対象の細胞に送達することができる。いくつかのレトロウイルス系が当技術分野では公知である。いくつかの態様ではレトロウイルスベクターが使用される。いくつかの態様ではアデノウイルスベクターが使用される。いくつかのアデノウイルスベクターが当技術分野では公知である。好ましい態様ではレンチウイルスベクターが使用される。より好ましい態様ではAAV6ベクターが使用される。

30

【0254】

一般にCARでは、scFvをコードする核酸がPCRアプローチによってまず構築され、配列が検証される。それらが、膜貫通ドメイン、CD3 シグナリング部分、共刺激ドメインに連結され、(例えばレトロウイルスの、もしくはレンチウイルスの、または他の、ターゲティング/送達機序によって)細胞に導入される。

40

【0255】

本明細書に記載する方法に従って免疫細胞中に導入されるCARには、単鎖CARまたは多鎖CARなど、異なるデザインを採用することができる。これらの異なるデザインは、標的とする病的細胞に対する特異性および結合効率を改良するためのさまざまな戦略を可能にする。これらの戦略の一部を本願の図面に例示する。単鎖CARは当技術分野において最も古典的なバージョンである。多鎖CAR構成は、T細胞の活性を特異性および強さに関して調整することを可能にするものとして、本出願人らが以前に開発した。複数のサブユニットが、追加の共刺激ドメインを格納したり、それらのドメインおよび他のタイプの受容体を隔てておいたりすることができるのに対して、古典的な単鎖構成は、時には、あまりに

50

高感度であり、多重特異性相互作用の余地も少ないとみなされる場合もある。

【0256】

単一サブユニットCAR (ssCAR)

一例として、単鎖CAR (scCAR) (単一サブユニットCAR (ssCAR)ともいう)は、(a)該CARの細胞表面抗原標的に対するモノクローナル抗体からのVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメイン、(b)CD8<sub>α</sub>、FcεRIIIガンマおよびIgG1からなる群より選ばれるヒンジ、(c)CD8<sub>α</sub>膜貫通ドメイン、(d)CD3シグナリングドメインを含む細胞質ドメイン、および(e)4-1BB共刺激ドメインを含む、V1、V3またはV5から選択されるポリペプチド構造の1つを有する。

【0257】

一態様において、CARは、本発明者らが以前にWO2015121454に記載したように、抗CD38モノクローナル抗体の単鎖可変ドメインの細胞外ドメインを含む。

【0258】

別の一態様において、CARは、以前に記載されているように、抗CD123モノクローナル抗体の単鎖可変ドメインの細胞外ドメインを含む。

【0259】

別の一態様において、CARは、以前に記載されているように、抗CD22モノクローナル抗体の単鎖可変ドメイン細胞外ドメインを含む。

【0260】

別の一態様において、CARは、以前に記載されているように、抗CS1モノクローナル抗体の単鎖可変ドメインの細胞外ドメインを含む。

【0261】

別の一態様において、CARは、以前に記載されているように、抗CLL-1モノクローナル抗体の単鎖可変ドメインの細胞外ドメインを含む。

【0262】

別の一態様において、CARは、以前に記載されているように(Carpenito, Milone et al. 2009, Milone, Fish et al. 2009)、抗CD19モノクローナル抗体の単鎖可変ドメインの細胞外ドメインを含む。

【0263】

一態様において、CARは、抗αアセチルGD2モノクローナル抗体の単鎖可変ドメインの細胞外ドメインを含む。

【0264】

一態様において、CARの抗原結合ドメインは以下の抗原のうちの1つに結合する:CD123、CD19、CS1、CD38、CLL1、hsp70、CD22、ROR1、EGFRvIII、BCMA、CD33、FLT3、CD70、WT1、MUC16、PRAME、TSPAN10、ROR1、GD3。

【0265】

TCRが単独で生成するシグナルはT細胞の完全な活性化には不十分であり、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知られている。すなわち、T細胞活性化は、TCRによる抗原依存の一次活性化を開始するもの(一次細胞質シグナリング配列)と、抗原非依存的に作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを与えるもの(二次細胞質シグナル配列)という、2種類の異なる細胞質シグナリング配列によって媒介されるということが出来る。したがって、CARのエンドドメイン(すなわち細胞質)ドメインに関して、刺激性に作用する一次細胞質シグナリング配列は、免疫受容体チロシン活性化モチーフ、すなわちITAMとして公知であるシグナリングモチーフを含有しうる。一態様において、CARのエンドドメインは、TCR<sub>β</sub>、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するITAMを含む。

【0266】

共刺激分子は、抗原に対するリンパ球の効率のよい応答に必要な、抗原受容体でもそれらのリガンドでもない細胞表面分子である。一態様において、CARのエンドドメインドメ

10

20

30

40

50

インは、例えば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に特異的に結合するリガンドなどの共刺激分子、およびそれらの任意の組合せを含む。

【0267】

一態様において、腫瘍抗原は、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝がん、腎がん、リンパ腫、白血病、肺がん、黒色腫、転移性黒色腫、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵がん、腎がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの任意の組合せからなる群より選択されるがんに関連する抗原である。

10

【0268】

マルチサブユニットCARまたは多鎖CAR

T細胞に導入される先行技術のキメラ抗原受容体は、シグナリングドメインを次々と順に追加していくことを必要とする単鎖ポリペプチドで形成されていた。しかしシグナリングドメインを、その天然の膜近傍位置から移動させることは、それらの機能を妨害することになりうる。この欠点を克服するために、本出願人らは最近、すべての関連シグナリングドメインが通常膜近傍位置につけるように、FCERIに由来する多鎖CARを設計した。この新しい構成では、FCERIアルファ鎖の高アフィニティーIgE結合ドメインが、T細胞特異性を細胞標的に対してリダイレクトするためにscFvなどの細胞外リガンド結合ドメインで置き換えられ、FCERIベータ鎖のN末端テールおよび/またはC末端テールが、通常膜近傍位置に共刺激シグナルを置くために使用される。

20

【0269】

したがって、本発明の操作されたT細胞によって発現されるCARは、本発明の操作されたT細胞の作製および拡大に特に適合させた多鎖キメラ抗原受容体 (CAR) であることができる。そのような多鎖CARは、以下の構成要素のうち少なくとも2つを含み、それにより、異なるポリペプチドが自発的に集まって多量化化することで、二量体、三量体または四量体型のCARを形成する:a) FCERIアルファ鎖の膜貫通ドメインと細胞外リガンド結合ドメインとを含む1つのポリペプチド、b) FCERIベータ鎖のN末端およびC末端細胞質テールの一部と膜貫通ドメインとを含む1つのポリペプチド、および/またはc) FCERIGamma鎖の細胞質内テールおよび膜貫通ドメインのそれぞれ一部を含む少なくとも2つのポリペプチド。

30

【0270】

そのような構成では、リガンド結合ドメインおよびシグナリングドメインが、別々のポリペプチド上に担持される。異なるポリペプチドは、膜中に近接して固定されることで、互いの相互作用が可能になる。そのような構成では、シグナリングドメインおよび共刺激ドメインが、膜近傍に(すなわち細胞膜に隣接してその内側に)位置することができ、それが、共刺激ドメインの機能の改良を可能にすると思われる。また、マルチサブユニット構成は、T細胞活性化に対する制御が強化されたCARの設計に、より多くの自由度と可能性を与える。例えば、特異性が異なる数種の細胞外抗原認識ドメインを含めることで多重特異性CAR構成を得ることが可能である。多鎖CARを構成する異なるサブユニット間の相対比を制御することも可能である。このタイプの構成は、最近、本出願人により、PCT/US2013/058005 (WO2014/039523) に記載されている。

40

【0271】

単一の多鎖CARのパーツとしての異なる鎖の集合は、例えば、IgEの高アフィニティー受容体 (FCERI) の異なるアルファ、ベータおよびガンマ鎖を使用し (Metzger, Alcaraz et al. 1986)、そこにシグナリングドメインおよび共刺激ドメインを融合することによって可能になる。ガンマ鎖は、膜貫通領域と、1つの免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含有する細胞質テールとを含む (Cambier 1995)。

【0272】

多鎖CARは、標的中の異なる要素に同時に結合し、それによって免疫細胞の活性化およ

50

び機能を増強するように、数個の細胞外リガンド結合ドメインを含むことができる。一態様において、細胞外リガンド結合ドメインは同じ膜貫通ポリペプチド上にタンデムに配置することができ、任意で、リンカーによって分離することができる。別の一態様では、異なる細胞外リガンド結合ドメインを、多鎖CARを構成する異なる膜貫通ポリペプチド上に置くことができる。別の一態様において、本発明は、それぞれ1つの異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む多鎖CARの集団に関する。特に本発明は、免疫細胞を用意する工程と、それぞれが異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む多鎖CARの集団を該細胞の表面に発現させる工程とを含む、免疫細胞を操作する方法に関する。別の一特定態様において、本発明は、免疫細胞を用意する工程と、それぞれが異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む多鎖CARの集団を構成するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを該細胞に導入する工程とを含む、免疫細胞を操作する方法に関する。特定の一態様において、免疫細胞を操作する方法は、シグナル伝達ドメインに融合されたFCERIベータおよび/またはガンマ鎖の少なくとも一部と、異なる細胞外リガンド結合ドメインに融合されたFCERIアルファ鎖のいくつかの部分とを、細胞の表面に発現させる工程を含む。より具体的な一態様において、該方法は、該細胞に、シグナル伝達ドメインに融合されたFCERIベータおよび/またはガンマ鎖の一部と、異なる細胞外リガンド結合ドメインに融合されたいくつかのFCERIアルファ鎖とをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを導入する工程を含む。多鎖CARの集団とは、それぞれが異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む少なくとも2種、3種、4種、5種、6種またはそれ以上の多鎖CARを意味する。本発明の異なる細胞外リガンド結合ドメインは、好ましくは、標的中の異なる要素に同時に結合し、それによって免疫細胞の活性化および機能を増強することができる。

10

20

【0273】

本発明は、それぞれが異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む多鎖CARの集団を含む単離された免疫細胞にも関係する。

【0274】

本発明の多鎖CARのシグナル伝達ドメインまたは細胞内シグナリングドメインは、標的への細胞外リガンド結合ドメインの結合に続く細胞内シグナリングを担っていて、免疫細胞の活性化と免疫応答とをもたらす。言い換えると、シグナル伝達ドメインは、多鎖CARを発現する免疫細胞の通常のエフェクター機能のうちの少なくとも1つの活性化を担っている。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ることができる。

30

【0275】

本願において「シグナル伝達ドメイン」という用語は、タンパク質のうち、エフェクターシグナル機能シグナルを伝達して細胞に特殊化した機能を果たすように指示する部分を指す。

【0276】

単鎖または多鎖CARにおいて使用するためのシグナル伝達ドメインの好ましい例として、Fc受容体またはT細胞受容体および抗原受容体エンゲージメントに続いてシグナル伝達を開始するために協調的に作用する補助受容体の細胞質配列、ならびにそれらの配列の任意の派生物または変異体および同じ機能的能力を有する任意の合成配列を挙げることができる。シグナル伝達ドメインは、2種の異なる細胞質シグナル配列、すなわち抗原依存的な一次活性化を開始するものと、抗原非依存的に作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供するものを含む。一次細胞質シグナリング配列は、免疫受容体チロシン活性化モチーフ、すなわちITAMとして公知であるシグナリングモチーフを含みうる。ITAMは、さまざまな受容体の細胞質内テールに見出される明確なシグナリングモチーフであり、syk/zap70クラスのチロシンキナーゼの結合部位として機能する。本発明において使用されるITAMの例としては、非限定的な例として、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、FcRイプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79bおよびCD66dに由来するものを挙げることができる。好ましい一態様において、多鎖CARのシグナリング伝達ドメインは、CD3ゼータシグナリングドメインまたはFCERIベータ

40

50

鎖もしくはガンマ鎖の細胞質内ドメインを含みうる。

【0277】

特定の態様において、本発明の多鎖CARのシグナル伝達ドメインは共刺激シグナル分子を含む。共刺激分子は、効率のよい免疫応答に必要な、抗原受容体でもそれらのリガンドでもない細胞表面分子である。

【0278】

リガンド結合ドメインは、文献において言及された単鎖CARに関して、これまでに使用され、言及された任意の抗原受容体、特にモノクローナル抗体からのscFvであることができる。WO 2014/4011988に記載の二重特異性または多重特異性CARは、参照により組み入れられる。

【0279】

#### RNA

一般に、mRNAは、リボソーム結合、翻訳の開始および細胞におけるmRNAの安定性を増加させる5'端のキャップと3'ポリ(A)テールとを、どちらも有する。リードアウト(半減期)は、3'ポリ(A)テールがないmRNAと比較して、少なくとも2倍は増加する。

【0280】

ファージT7 RNAポリメラーゼは、テンプレートの最後の塩基を超えて転写産物の3'端を伸長することができる(Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985)、Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)。

【0281】

一般に、64~100ヌクレオチドのポリ(A/T)ストレッチの下流にある配列はよいテンプレートになる(Saebøe-Larssen et al., *J. Immunol. Meth.*, 259:191-203 (2002)、Boczkowski et al., *Cancer Res.*, 60:1028-34 (2000)、Elango et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 330:958-966 (2005)。

折りたたまれてステムループ構造をとることができ、その後ろに一連のウリジン残基が続いていて(Dunn and Studier, *J. Mol. Biol.*, 166:477-535 (1983)、Arnaud-Barbe et al., 1998 *Nuc. Acids Res.*, 26:3550-54 (1998))、潜在的異常転写、すなわちポリ(A/T)ストレッチを超えるRNA転写産物の3'伸長および逆方向への転写を防ぐためのある種の「ダイナミック」ターミネーターを形成しているRNAは、成長する終結様シグナル(growing termination-like signal)-伸長されたポリ(U)ストレッチおよびポリ(A/U)ヘアピンを作り出すだろう。

【0282】

これに基づき、抗TCRまたは抗CD3 CAR遺伝子のコード配列下流の3'アンカリング配列と5'100塩基ポリ(T)ストレッチとの、リバースPCRプライマー(reversed PCR primer)を設計した。

【0283】

転写DNAテンプレートのポリA/Tセグメントは、ポリTテール、例えば100Tテール(サイズは50~5000Tであることができる)を含有するリバースプライマーを使うことにより、PCR中に作製するか、またはPCR後に、限定するわけではないが、DNAライゲーションまたはインビトロ組換えなど、他の何らかの方法によって作製することができる。ポリ(A)テールはRNAに安定性も提供し、それらの分解を低減する。一般に、ポリ(A)テールの長さは転写されたRNAの安定性と正に相関する。一態様において、ポリ(A)テールは100~5000アデノシン(A)である。下記の例は、RNA転写産物の効率のよい翻訳を可能にするには、100塩基対のポリ(A)ストレッチで十分であることを実証している。

【0284】

RNAのポリ(A)テールは、大腸菌(*E. coli*)ポリAポリメラーゼ(E-PAP)などのポリ(A)ポリメラーゼを使って、さらに伸長することができる。ポリ(A)テールの長さを100ヌクレオチドから300~400ヌクレオチドに増やすと、RNAの翻訳効率が約2倍増加する。

【0285】

10

20

30

40

50

加えて、3'端への異なる化学基の取り付けも、mRNAの安定性を増加させることができる。そのような取り付けは、修飾/人工ヌクレオチド、アプタマーおよび他の化合物を含有することができる。例えば、ポリ(A)ポリメラーゼを使って、ATPアナログをポリ(A)テールに組み入れることができる。ATPアナログはRNAの安定性をさらに増加させることができる。適切なATPアナログとしては、コルジオシピン(cordiocipin)および8-アザアデノシンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0286】

5'キャップもRNA分子に安定性を与える。好ましい一態様において、本明細書に開示する方法によって作製されるRNAは5'キャップを含む。5'キャップは、例えば、いずれも市販のm7G(5')ppp(5')G、m7G(5')ppp(5')A、G(5')ppp(5')GまたはG(16')ppp(5')Aキャップアナログでありうる。5'キャップは、アンチリバースキャップアナログ(anti-reverse-cap-analog)(ARCA)(Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95(2001)も参照されたい)または他の適切なアナログであることもできる。5'キャップは、当技術分野において公知の、本明細書に記載する技法を使って与えることができる(Cougot, et al., Trends in Biochem.Sci., 29:436-444(2001)、Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95(2001)、Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966(2005))。

【0287】

加えて、本発明のmRNAには、WO2017123242 A1に記載の方法および手段を応用した。

20

【0288】

ここに提供されるRNAは、配列内リボソーム進入部位(IRES)配列も含有することができる。IRES配列は、mRNAへのキャップ非依存的なリボソーム結合を開始して、翻訳の開始を容易にする、任意のウイルス配列、染色体配列、または人工的に設計された配列であってよい。

【0289】

細胞の透過性および生存性を増進する因子、例えば糖類、ペプチド、脂質、タンパク質、酸化防止剤および界面活性剤などを含有することができる、細胞エレクトロポレーションに適した任意の溶質を含めることができる。

【0290】

細胞表面における抗TCR CARの一時的発現を達成するための遺伝子改変CAR<sup>+</sup>免疫細胞への抗TCR CARをコードするmRNAの導入は、患者に投与する前にCAR発現免疫細胞を濃縮するのに有益であることが示された。

30

【0291】

一態様において、導入されたmRNAは、細胞表面上に、TCR、すなわちアルファTCRサブユニット、ベータTCRサブユニット、CD3によって認識される対応する抗原を発現させる。抗TCR CARによって認識される抗原はいずれも本発明の範囲内である。したがって、アルファベータTCRに特異的なCARをコードするmRNAのためのテンプレートは、細胞中に形質導入されたまたは細胞中に形質導入されるアルファベータTCRの任意の抗原結合ドメインに向けられるように設計される。

40

【0292】

トランスフェクションに使用するためのmRNAを生成させる方法は、3'および5'非翻訳配列(「UTR」)、5'キャップおよび/または配列内リボソーム進入部位(IRES)、発現させるべき核酸、および通例50~2000塩基長、好ましくは120塩基のポリAテール(SEQ ID NO:11)を含有するコンストラクトを作製するための、特別に設計されたプライマーによるテンプレートのインビトロ転写(IVT)と、それに続くポリA付加を伴いうる。そうして作製されたRNAは、さまざまなタイプの真核細胞に効率よく送達することができ、トランスフェクト細胞を担体として使用して、または封入されたmRNA、結合させたmRNAもしくは裸のmRNAの局所的もしくは全身性の無細胞送達を使って、組織および丸ごとの生物に送達することもできる。

50

## 【0293】

腫瘍抗原は、自然源から、例えば初代臨床分離物、細胞株などから、精製し、単離することができる。がんペプチドは、化学合成によって、または当技術分野において公知の組換えDNA技法によって得ることもできる。化学合成のための技法は、Steward et al. (1969)、Bodansky et al. (1976)、Meienhofer (1983)、およびSchroder et al. (1965)に記載されている。さらにまた、Renkvist et al. (2001)に記載されているように、当技術分野では、数多くの抗原が公知である。抗体によって同定され、Serex技術 (Sahin et al. (1997) およびChen et al. (2000) 参照) によって検出される他の抗原は、Ludwig Institute for Cancer Researchのデータベースにおいて同定される。

## 【0294】

トランスフェクションに使用されるmRNAのインビトロ転写のためのテンプレートを生成させるにはPCRが使用される。PCRを実施するための方法は当技術分野において周知である。PCRにおいて使用するためのプライマーは、PCR用のテンプレートとして使用されるDNAの領域に実質的に相補的な領域を有するように設計される。PCRに役立つDNAポリメラーゼはどれでも本明細書に開示する方法において使用することができる。試薬およびポリメラーゼはいくつかの供給源から市販されている。

## 【0295】

一態様において、PCRに使用されるDNAはオープンリーディングフレームを含有する。DNAは、ある生物のゲノムからの天然のDNA配列に由来しうる。一態様において、DNAは関心対象の完全長遺伝子またはある遺伝子の一部分である。遺伝子は、5' および/または3' 非翻訳領域 (UTR) の一部または全部を含むことができる。遺伝子はエクソンおよびイントロンを含むことができる。一態様において、PCRに使用されるDNAはヒト遺伝子である。別の態様において、PCRに使用されるDNAは5' および3' UTRを含むヒト遺伝子である。あるいは、DNAは、天然の生物では通常は発現しない人工的DNA配列であることもできる。例示的な人工的DNA配列は、1つにライゲーションされることで融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成する複数の遺伝子部分を含有するものである。1つにライゲーションされる複数のDNA部分は、単一の生物または2以上の生物に由来することができる。

## 【0296】

安定性および/または翻訳効率を高める能力を持つ化学構造も使用しうる。RNAは、好ましくは、5' および3' UTRを有する。一態様において、5' UTRは0~3000ヌクレオチド長である。コード領域に付加される5' および3' UTR配列の長さは、限定するわけではないが、UTRの異なる領域にアニールするPCR用プライマーを設計することなど、さまざまな方法によって変化させることができる。したがって、転写されたRNAのトランスフェクション後に最適な翻訳効率を達成するために必要な5' および3' UTRの長さを、当業者は容易に改変することができる。

## 【0297】

5' および3' UTRは、関心対象の遺伝子の天然の内在性5' および3' UTRであることができる。あるいは、フォワードプライマーおよびリバースプライマーにUTR配列を組み入れることによって、またはテンプレートの他の改変によって、関心対象の遺伝子にとって内在性でないUTR配列を付加することもできる。例えば、センスmRNA分子の安定性を増加させるために、安定なmRNA分子 (例えばグロビン、アクチン、GAPDH、チューブリン、ヒストン、またはクエン酸回路酵素) からの3' または5' 配列を、センスmRNA核酸分子の3' および/または5' 領域に組み入れることができる。5' UTRは細胞内で安定なRNAゲノムを持つRNAウイルスに由来することができる。3' UTR配列中のAUリッチ要素がmRNAの安定性を減少させることも公知である。mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨げるために、さまざまなヌクレオチドアナログを3' または5' UTR中に使用することができる。それゆえに、3' UTRは、当技術分野において周知のUTRの性質に基づいて、転写されたRNAの安定性を増加させるように選択しまたは設計することができる。

## 【0298】

10

20

30

40

50

Kozakコンセンサス配列はタンパク質翻訳の開始に関与し、抗原をコードする本発明の mRNA 核酸にそのような Kozak コンセンサス配列を含めることにより、mRNA 核酸の活性をさらに延長または引き延ばしうる (Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15 (20): 81-25-48 (1987))。ただし、Kozak コンセンサス配列は、効率のよい翻訳を可能にするために、すべての mRNA が必要としているわけではないようである。したがって、5' UTR は内在性遺伝子の Kozak 配列を含有しうる。あるいは、関心対象の遺伝子にとって内在性でない 5' UTR が、上述のように PCR によって付加されている場合は、コンセンサス Kozak 配列を、その 5' UTR 配列の付加によって再設計することもできる。

#### 【0299】

5' キャップも RNA 分子に安定性を与えることができる。5' キャップは、本明細書に記載する、当技術分野において公知の技法を使って与えられる (Cougot, et al, *Trends in Biochem. Sci.*, 29: 436-444 (2001)、Stepinski, et al, *RNA*, 7: 1468-95 (2001)、Elango, et al, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330: 958-966 (2005))。 10

#### 【0300】

一過性にトランスフェクト (例えばエレクトロポレーション) された細胞における抗原コード mRNA の安定性および翻訳効率は、アデノシン塩基、ポリ (A) テールの伸長または短縮によってモニターすることができる。ポリ A テールは、天然メッセンジャーおよび合成センス RNA を安定化すると考えられる。それゆえに、一態様では、長いポリ A テールを mRNA 分子に付加することで、その RNA をより安定にすることができる。ポリ A テールは当技術分野において認識されている種々の技法を使って付加することができる。例えば、大腸菌ポリ A ポリメラーゼ (E-PAP) などのポリ A ポリメラーゼを使って、長いポリ A テールを合成 RNA またはインビトロ転写 RNA に付加することができる (Yokoe, et al. *Nature Biotechnology*.1996;14:1252-1256)。転写ベクターは長いポリ (A) をコードすることもできる。あるいは、転写 DNA テンプレートのポリ A/T セグメントは、ポリ (A) テール、例えば 100T テール (サイズは 50 ~ 5000T であることができる) を含有するリバースプライマーを使うことにより、PCR 中に作製するか、または PCR 後に、限定するわけではないが、DNA ライゲーションまたはインビトロ組換えなど、他の何らかの方法によって作製することができる。ポリ (A) は、RNA リガーゼを使って、センス RNA の 3' 端にライゲーションしてもよい (例えば *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1991 edition) 参照)。加えて、3' 端への異なる化学基の取り付けも、mRNA の安定性を増加させることができる。そのような取り付けは、修飾/人工ヌクレオチド、アプタマーおよび他の化合物を含有することができる。例えば、ポリ (A) ポリメラーゼを使って、ATP アナログをポリ (A) テールに組み入れることができる。ATP アナログは RNA の安定性をさらに増加させることができる。 20 30

#### 【0301】

一態様において、mRNA の核酸配列は、約 50 ~ 5000 個のアデノシン塩基、好ましくは 120 個の A を含むポリ (A) テール (SEQ ID NO:11) を含む。

#### 【0302】

RNA は配列内リボソーム進入部位 (IRES) 配列も含有することができる。IRES 配列は、mRNA へのキャップ非依存的なリボソーム結合を開始して、翻訳の開始を容易にする、任意のウイルス配列、染色体配列、または人工的に設計された配列であってよい。 40

#### 【0303】

加えて、適切な改変には、同じアミノ酸をコードするが、野生型バージョンの核酸に見出されるコドンよりも安定なコドンになるように、コドンの 1 つまたは複数のヌクレオチドを変化させることが含まれる。例えば、RNA の安定性とシチジン (C) 残基および/またはウリジン (U) 残基の数の多さとの間には逆の関係が実証されており、C 残基および U 残基を欠く RNA は大半の RNase に対して安定であることが見出されている (Heidenreich, et al. *J Biol Chem* 269, 2131-8 (1994))。いくつかの態様では、mRNA 配列中の C 残基および/または U 残基の数を低減させる。別の一態様では、ある特定アミノ酸をコード 50

するコドン、同じアミノ酸または関連するアミノ酸をコードする別のコドンの代わりに使用することによって、C残基および/またはU残基の数を低減させる。本発明のmRNA核酸への改変として考えられるものには、プソイドウリジンの組み入れも含まれる。本発明のmRNA核酸へのプソイドウリジンの組み入れは、安定性および翻訳能を高めると共に、インビボでの免疫原性を減少させうる。(例えばKariko, K., et al., *Molecular Therapy* 16(11):1833-1840(2008)参照)。本発明の核酸に対する置換および改変は、当業者には容易にわかる方法によって実施することができる。

【0304】

一態様において、本発明は、本発明のCARによって認識される抗原をコードする合成RNAおよびRNA様アナログを含む。すなわち抗原をコードするmRNAコンストラクトの合成は、ヌクレオチド/ヌクレオシド誘導体またはヌクレオチド/ヌクレオシドアナログの組み入れを含む。例えば、アナログのタイプは、ベータ-D-オキシ-LNA、アルファ-L-オキシ-LNA、ベータ-D-アミノ-LNAおよびベータ-D-チオ-LNA、およびベータ-D-オキシ-LNAなどのLNAである。合成RNAを作製する方法は当技術分野において周知であり、例えば米国特許第8,242,248号、米国特許第6,111,095号、米国特許出願公開第2010/0324278号、米国特許出願公開第2010/0137010号、およびPCT国際公開第WO 2007/031081号に記載されており、これらの文献はそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0305】

遺伝子クローニングを必要とせずにDNAテンプレートからのRNAの合成を可能とするために、DNAテンプレートには、転写されるべき配列の上流に転写のプロモーターを取り付けるべきである。RNAポリメラーゼのためのプロモーターとして機能する配列をフォワードプライマーの5'端に付加すれば、RNAポリメラーゼプロモーターが、PCR産物の、転写されるべきオープンリーディングフレームの上流に組み入れられることになる。好ましい一態様において、プロモーターは、本明細書において項を改めて記載するT7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターとして、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。T7、T3およびSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は当技術分野において公知である。

20

【0306】

遺伝子クローニングを必要とせずにDNAテンプレートからのRNAの合成を可能とするために、DNAテンプレートには、転写されるべき配列の上流に転写のプロモーターを取り付けるべきである。RNAポリメラーゼのためのプロモーターとして機能する配列をフォワードプライマーの5'端に付加すれば、RNAポリメラーゼプロモーターが、PCR産物の、転写されるべきオープンリーディングフレームの上流に組み入れられることになる。好ましい一態様において、プロモーターは、本明細書において項を改めて記載するT7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターとして、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。T7、T3およびSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は当技術分野において公知である。

30

【0307】

CAR mRNAによって認識される抗原標的をコードするmRNAの送達

本発明の抗TCR mRNAトランスフェクション法は、本質的に一過性であり、ベクターフリーである。インビトロ転写したmRNAを使ったトランスフェクションは、当技術分野において公知の任意の手段によって達成することができる。

40

【0308】

当業者に公知の多くの利用可能なデバイスおよびエレクトロポレーションシステムのいずれかを利用する、発現コンストラクトを含む核酸の、細胞へのエレクトロポレーションによる投与。エレクトロポレーションは、ヒト初代Tリンパ球およびマウス初代Tリンパ球のどちらにとっても、遺伝子を導入するための強力なツールになるので、エレクトロポレーションが使用される(Zhao et al., 「High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation」 *Mol. Ther.* 13(1):151-9, 2006. Epub 2005 Sep 2)。例えば、US 2004/0014645、US 2005/00526

50

30A1、US 2005/0070841A1、US 2004/0059285A1、US 2004/0092907A1に教示されている哺乳動物細胞への核酸コンストラクトのエレクトロポレーションの製剤および方法を参照されたい。任意の公知細胞タイプのエレクトロポレーションに必要な電界強度を含むさまざまなパラメータは、この分野の関連研究文献ならびに数多くの特許および特許出願において、一般に公知である。例えば米国特許第6,678,556号、米国特許第7,171,264号、および米国特許第7,173,116号参照。エレクトロポレーションの治療的応用のための装置は、例えばMedPulser（商標）DNAエレクトロポレーション治療システム（Inovio/Genetronics、カリフォルニア州サンディエゴ）などが市販されており、米国特許第6,567,694号、米国特許第6,516,223号、米国特許第5,993,434号、米国特許第6,181,964号、米国特許第6,241,701号、および米国特許第6,233,482号などの特許に記載されている。また、エレクトロポレーションは、例えばUS20070128708A1に記載されているように、インピトロでの細胞のトランスフェクションにも使用しうる。

10

#### 【0309】

好ましい態様において、本発明者らは、細胞中に物質を送達するために、パルス状の電場を利用することで、生きている細胞を一過性に透過可能にするcytoPulse技術（PulseAgile（登録商標）としても公知である）を使って、エレクトロポレーションを実行した（米国特許第6,010,613号およびWO 2004/083379）。

#### 【0310】

別の態様では、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション、パーティクルボンバードメント、マイクロインジェクション、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、ならびに水中油型エマルジョン、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システムによって、抗TCR mRNAを細胞中に送達することができる。インピトロおよびインピボで送達媒体として使用するための例示的コロイド系はリポソーム（例えば人工膜小胞）である。核酸の最新の標的送達法は、標的ナノ粒子によるポリヌクレオチドの送達など、他にも利用することができる。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 et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY）を参照されたい。

20

#### 【0311】

免疫細胞への抗TCR mRNAの導入（インピトロ、エクスピボまたはインピボ）には、脂質製剤の使用が考えられる。脂質と会合したmRNAは、リポソームの水溶性内部に封入するか、リポソームの脂質二重層内に分散するか、リポソームとオリゴヌクレオチドとの両方と会合する連結分子を介してリポソームに取り付けるか、リポソームに閉じ込めるか、リポソームとの複合体を形成させるか、脂質を含有する溶液中に分散させるか、脂質と混合するか、脂質と組み合わせるか、脂質中に懸濁液として含有されるか、ミセルと共に含有しまたはミセルと複合体を形成させるか、その他の形で脂質と会合させることができる。脂質/RNAが会合した組成物は、溶液中の何らかの特定構造に限定されない。例えば、それらは二重層構造中にミセルとしてまたは「崩壊した（collapsed）構造」として存在しうる。それらは単に溶液中に散在していて、場合によってはサイズまたは形状が不均質な凝集体を形成していてもよい。脂質は脂肪物質であり、これは天然脂質であっても合成脂質であってもよい。例えば脂質は、細胞質中に自然に存在する脂肪小滴、ならびに長鎖脂肪酸炭化水素およびそれらの誘導體、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を含有する化合物クラスを含む。

30

40

#### 【0312】

使用に適した脂質は商業的供給源から得ることができる。例えばジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）はSigma（ミズーリ州セントルイス）から入手することができる。ジセチルホスフェート（「DCP」）はK&K Laboratories（ニューヨーク州プレーンビュー）から入手することができる。コレステロール（「Chol」）はCalbiochem-Behringから入手することができる。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.（アラバマ州バーミングハム）から得ることが

50

できる。

【0313】

操作された遺伝子改変“CAR-T細胞

抗TCR CARをコードするmRNAが細胞表面に一過性に発現する、CARを発現させるT細胞集団を生成させるために、CAR含有T細胞を生成させる。細胞（例えばPBMC、T細胞、例えばTIL、CD4+またはCD8+細胞）は、標準的な手順に従って、自然源、例えば転移性黒色腫患者から精製し、培養し、かつ/または拡大増殖させることができる。細胞は、例えば米国特許出願公開第20080311095号に記載されているように刺激しうる。細胞にはCARが形質導入される。あるいは、CARの形質導入に先だって、抗TCR CARをコードするmRNAが導入される。本発明の範囲内にあるCARの例として、抗CD38 CAR、抗CD19 CAR、抗CD123 CAR、抗CD30 CAR、または抗CD22 CARが挙げられる。ただし本発明は、標的分子としてのこれらの抗原に限定されるべきではない。むしろ、一過性に共発現される抗TCR CARCARをコードするmRNAとの関連において、任意の標的分子に対する抗原結合ドメインを含む任意のCARを使用することができる。

10

【0314】

抗原CD38の場合のように、抗原マーカーが病的細胞と免疫細胞の両方に共通する特定態様では、末梢血単核球（PBMC）を刺激し、まず転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN（登録商標））遺伝子編集技術で処理することによってCD38遺伝子の内在性発現を不活化し、細胞を2日間休ませてから、以前にWO2015121454に記述したように抗CD38 CARを形質導入する（Mathilde Dusseaux, Le Clerre D, Gouble A, Smith J, EHA Posters (2016), Collectis SA Press Release 06/11/2016, 'Allogeneic TCR A/CD38 Double Knockout T Cells Bearing an Anti-CD38 Chimeric Antigen Receptor (CAR): An Improved Immunotherapy for the Treatment of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) and Multiple Myeloma (MM)にも記述されており、これらの文献は参照により本明細書に組み入れられる。すなわち、内在性CD38遺伝子の不活化は、抗CD38 CARの形質導入またはCD38抗原をコードするmRNAのトランスフェクションの前に行われる。

20

【0315】

いくつかの態様において、CAR配列は、レトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターまたはAAVベクターを使って、細胞中に送達される。CARを発現するレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターは、さまざまなタイプの真核細胞に送達することができ、形質導入細胞を担体として使用して、または封入されたベクター、結合させたベクターもしくは裸のベクターの局所的もしくは全身性の無細胞送達を使って、組織および丸ごとの生物に送達することもできる。

30

【0316】

好ましい態様において、本明細書に記載する方法は、個別化された治療（personalized therapy）を評価するために使用される。例えば、腫瘍の処置であれば、患者の血液または細胞を、アフエレーシス、生検または静脈穿刺（venapuncture）などの適当な方法で収集する。細胞を少なくとも24時間は培養し、その間に、細胞を適当なCAR含有レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターで形質導入する。抗TCR CAR CARをコードするmRNAを細胞に導入して、抗TCR CARを細胞表面に一過性に発現させることにより、抗TCR CARと結合したときに、TCR+免疫細胞を自己活性化して増殖させる。抗TCR CAR+免疫細胞は、必要であれば、凍結保存することができる。

40

【0317】

細胞の供給源

拡大増殖および遺伝子改変または他の改変に先だって、細胞源、例えばT細胞源を、対象から得ることができる。「対象」という用語は、そこでの免疫応答を引き出すことができる、生きた生物（例えば哺乳動物）を包含するものとする。対象の例として、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が挙げられる。T細胞は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染

50

部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含むいくつかの供給源から得ることができる。

【0318】

本開示の一定の局面において、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞は、例えばFicoll (商標) 分離法など当業者に公知の数ある技法を使って対象から収集された1単位の血液から得ることができる。好ましい一局面において、細胞はアフエーシスによって個体の循環血から得られる。アフエーシス産物は典型的には、T細胞を含むリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含有する。一局面では、アフエーシスによって収集された細胞を洗浄することで、血漿画分を除去し、任意で、後続の処理工程のための適当な緩衝液または培地に細胞を入れることができる。一態様において、細胞はリン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄される。代替的態様において、洗浄溶液はカルシウムを欠き、またマグネシウムを欠いてもよく、あるいはすべてではないとしても多くの二価カチオンを欠いてもよい。

10

【0319】

カルシウム非存在下での初回活性化工程は活性加の強化につながりうる。当業者には容易に理解されるであろうが、洗浄工程は、当技術分野において公知の方法によって、例えば半自動「フロースルー」遠心機 (例えばCobe 2991細胞処理装置 (Baxter CytoMate) またはHaemonetics Cell Saver 5) を製造者の説明書に従って使用することにより、達成しうる。洗浄後は、例えばCaフリー、MgフリーPBS、PlasmaLyte Aまたは緩衝剤を含むもしくは含まない他の食塩水溶液など、さまざまな生体適合性緩衝液に細胞を再懸濁しうる。あるいは、アフエーシス試料の望ましくない構成要素を除去し、細胞をそのまま培養培地に再懸濁してもよい。

20

【0320】

本発明では、本明細書に記載するようにPBMC凍結保存細胞を融解、洗浄し、室温で1時間休ませてから、本発明の方法を使って活性化した。

【0321】

本明細書に記載する拡大増殖済みの細胞が必要になるかもしれない時点より先の期間における対象からの血液試料またはフェーシス産物の収集が考えられる。したがって、拡大増殖させる細胞の供給源は、任意の必要な時点で収集することができ、後に、免疫エフェクター細胞治療による利益を受けるであろう数ある疾患または状態、例えば本明細書に記載する疾患または状態の、免疫エフェクター細胞治療において使用するために、T細胞などの所望の細胞を単離し、凍結しておくことができる。一局面において、血液試料またはアフエーシスは、概して健常な対象から採取される。一定の局面において、血液試料またはアフエーシスは、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、概して健常な対象から採取され、後に使用するために、関心対象の細胞が単離され、凍結される。一定の局面では、T細胞を拡大増殖させ、凍結し、後の時点で使用することができる。一定の局面において、試料は、本明細書に記載する特定疾患の診断後まもなく、ただしあらゆる処置の前に、収集される。さらなる一局面において、細胞は、限定するわけではないが、例えばナタリズマブ、エファリズマブなどの作用物質、抗ウイルス剤、化学治療、放射線、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、ミコフェノラート、およびFK506、抗体、または他の免疫アブレーション剤 (immunoablative)、例えばCAMPATH、抗CD3抗体、サイトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、および放射線照射などによる処置など、数ある関連処置モダリティーに先だって、対象からの血液試料またはアフエーシスから単離される。

30

40

【0322】

患者に機能的T細胞を残す処理の後に、患者から直接T細胞を得ることも考えられる。これに関して、一定のがん処置後、特に、免疫系を損傷する薬物による処置後まもなく、通常は患者が処置から回復しつつあるであろう期間中は、得られるT細胞の品質が、それらのエクスピボでの拡大増殖能に関して、最適であるか、改良されうることが観察されてい

50

る。同様に、本明細書に記載する方法を使ったエクスピボ操作後は、これらの細胞が、生着およびインピボ拡大増殖の増進にとって、好ましい状態にありうる。したがって、本発明との関連においては、この回復期間中に、T細胞を含む血液細胞または造血系譜の他の細胞を収集することが考えられる。さらに、一定の局面では、とりわけ治療後の所定の時間枠中は、特定細胞タイプの再増殖、再循環、再生および/または拡大増殖にとって有利な条件を対象において作り出すために、可動化 (mobilization) (例えばGM-CSFによる可動化) およびコンディショニングレジメンを使用することができる。

【0323】

一態様において、対象からNK細胞を得ることができる。別の態様において、NK細胞はNK細胞株、例えばNK-92細胞株 (Conkwest) である。

10

【0324】

本発明では造血細胞を使用しうると考えられる。

【0325】

一時的に高度に活性化されたCAR<sup>+</sup>T細胞の活性化および拡大増殖

一特定態様では、簡単に述べると、細胞をTCR遺伝子の内在性発現についてロックアウトした後、2日の休息期間を置き、次に、本明細書に記載する抗TCR CARをコードする核酸を、細胞に形質導入し、インターロイキン-2 (IL-2) の存在下で2日間にわたって拡大増殖させる。さらに、T細胞をモノクローナル抗体リツキシマブに対して感受性にするを目的として、安全機構としてのRQR8遺伝子を共発現するようにT細胞を操作する。RQR8は、インピボでの形質導入細胞の選択的欠失を可能にする自殺遺伝子である。抗TCR CAR mRNAをCAR T細胞に導入すると、その結果生じる細胞の表現型は抗TCR CAR<sup>+</sup>Tになる。次に4~11日にわたって培養下で細胞を拡大増殖させる。一態様では、4日にわたって、または5日にわたって、または7日にわたって、細胞を拡大増殖させる。

20

【0326】

治療的応用

本発明のTCR陰性CAR<sup>+</sup>免疫細胞の有効性は、関心対象の特定適応症に関して当技術分野において認識されている動物モデルを使って試験することができる。例えば、がんの場合、確立されたがんマウスモデルを、関心対象の特定のがんに関して、広く利用することができる。

【0327】

エクスピボ手順は当技術分野において周知である。簡単に述べると、細胞を、哺乳動物 (好ましくはヒト) から単離し、細胞表面をCARで、そしてまた抗TCR CARをコードするmRNAで一過性に、遺伝子改変 (すなわちインピトロで形質導入またはトランスフェクション) する。細胞は本明細書に記載する別の改変をさらに含んでもよい。改変された細胞は、治療的利益を与えるために哺乳動物レシピエントに投与することができる。哺乳動物レシピエントはヒトであり、遺伝子改変細胞はレシピエントに関して自家であることができる。あるいは、細胞はレシピエントに関して同種異系、同系または異種であることができる。

30

【0328】

したがって本発明は、キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するようにT細胞を遺伝子改変し、抗TCR CARをコードするmRNAを細胞表面に一過性に共発現させて、表現型CAR<sup>+</sup>T-APCをもたらす、細胞治療の1タイプを包含する。治療は、TCR-neg CAR<sup>+</sup>T細胞を、それを必要とするレシピエントに注入することによって達成される。注入された細胞は、CARの抗原結合ドメインが結合する抗原を発現する細胞を、GVHDを伴わずに殺すことができる。特に、患者に投与されたTCR-neg CAR<sup>+</sup>細胞は、20日を超えては存続しないはずである。これは、TCR<sup>+</sup>T細胞を有する細胞で以前に観察されたものより安全でもある。

40

【0329】

本発明によって処置することができるがんの非限定的な例として、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝がん、腎がん、リンパ腫、白血病、肺がん、黒色腫、転移性黒色腫、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵がん、腎がん、皮

50

膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、およびそれらの組合せが挙げられる。

【0330】

好ましい一態様では、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、ホジキンリンパ腫（HL）（再発性、難治性）、非ホジキンリンパ腫（NHL）（再発性、難治性）、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、BPDCN、神経膠腫、または膵臓がんもしくは肺がん、膀胱がん、大腸がん、乳がんを含む他の固形腫瘍から選択される、がんおよびそれらの再燃性難治性型を、本発明の組成物で処置することができる。

【0331】

薬学的組成物

本発明は、TCR-neg CAR<sup>+</sup>免疫細胞の少なくとも1つの集団を含む薬学的組成物に関する。そのような薬学的組成物は、がん、感染症または免疫疾患の処置における使用のために考えられる。

【0332】

本発明の遺伝子改変T細胞は、単独で、または希釈剤および/または他の構成要素、例えばIL-2もしくは他のサイトカインまたは細胞集団と組み合わせられた薬学的組成物として、投与することができる。簡単に述べると、本発明の薬学的組成物は、1つまたは複数の薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせられた、本明細書に記載する標的細胞集団を含みうる。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、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの糖質、タンパク質、ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸、酸化防止剤、EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤、アジュバント（例えば水酸化アルミニウム）、および保存剤を含みうる。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与用に製剤化される。

【0333】

薬学的に許容される担体は、1つには、投与される特定組成物によって、またその組成物を投与するために使用される特定方法によって決まる。したがって、後述するように、利用することができる薬学的組成物の適切な製剤は多種多様にある（例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989参照）。

【0334】

本発明の薬学的組成物は、処置（または防止）すべき疾患にとって適当な方法で投与されうる。適当な投薬量は臨床治験によって決定されうるが、投与の量および頻度は、患者の状態、患者の疾患のタイプおよび重症度などといった因子によって決定されるだろう。「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」または「治療量」が示される場合、投与されるべき本発明の正確な量は、個体差、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および患者（対象）の状態を考慮して医師によって決定されうる。本明細書に記載するT細胞を含む薬学的組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg体重、好ましくは $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重の投薬量（これらの範囲内の任意の整数値を含む）で投与できると、一般にいうことができる。CAR T細胞組成物は、これらの投薬量で複数回投与してもよい。細胞は、免疫治療において一般に公知の注入技法を使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）。医学分野の当業者であれば、患者を疾患の徴候についてモニターし、それに応じて処置を調節することにより、特定の患者に最適な投薬量および処置レジメンを容易に決定することができる。

【0335】

抗TCR CAR<sup>+</sup>免疫細胞の送達

本発明の態様において、本発明の方法によって生成させた細胞は、哺乳動物に送達される。細胞送達媒体は当技術分野において公知であり、それらを本発明の細胞を送達するために使用しうる。本発明の方法で改変されたT細胞またはNKは、通常、静脈内に注入されるか、具体的疾患の体腔部位に注入され、注入前に食塩溶液に再懸濁される。

10

20

30

40

50

## 【0336】

一態様において、拡大増殖させたTCR-neg CAR<sup>+</sup>免疫T細胞を患者に投与する前に精製する必要がない。すなわち自己活性化CAR<sup>+</sup>免疫細胞はそれを必要とする患者にそのまま投与することができる。

## 【0337】

治療効果を得るための適切な用量は、当技術分野における標準的手段によって決定される。具体的態様において、適切な用量は、好ましくは一連の投与サイクルにおいて、一例として、1回あたり約 $10^6$ ～約 $10^9$ 細胞である。好ましい投与レジメンは、0日目の約 $10^6$ 細胞から開始して、その後、約 $10^9$ 細胞の標的用量まで徐々に増加させる、複数回にわたる1週間単位の用量漸増投与サイクル (multiple one-week dosing cycles of escalating doses) を含みうる。適切な投与モードとしては、静脈内、腔内 (例えばリザーバークセスデバイス (reservoir-access device) による)、腹腔内、および腫瘍塊への直接注射が挙げられる。

10

## 【0338】

本組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、埋植または移植によるなど、都合のよい任意の方法で実行される。本明細書に記載する組成物は、患者に、皮下投与、皮内投与、腫瘍内投与、節内投与、髄質内投与、筋肉内投与するか、静脈内 (i.v.) 注射によって投与するか、腹腔内投与しうる。一態様において、本発明のT細胞組成物は、皮内注射または皮下注射によって、患者に投与される。別の態様において、本発明のT細胞組成物は、好ましくは、i.v.注射によって投与される。T細胞の組成物は、腫瘍、リンパ節または感染部位に、直接注射されうる。本発明の一定の態様において、本明細書に記載する方法またはT細胞を治療レベルにまで拡大増殖させる当技術分野において公知の他の方法を使って活性化し拡大増殖させた細胞は、限定するわけではないが、例えば抗ウイルス治療、シドフォビルおよびインターロイキン-2などの作用物質による処置、MS患者のためのシタラビン (ARA-Cとしても公知である) もしくはナタリズマブ処置、または乾癬患者のためのエファリズマブ処置、またはPML患者のための他の処置など、数ある関連処置モダリティーと一緒に (例えば事前に、同時に、事後に)、患者に投与される。さらなる態様において、本発明のT細胞は、化学治療、放射線、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、ミコフェノラート、およびFK506、抗体、または他の免疫アブレーション剤、例えばCAM PATH、抗CD3抗体または他の抗体治療、サイトキシン (cytotoxin)、フルダリピン (fludarabine)、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、および放射線照射と組み合わせて使用されうる。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) または成長因子誘導性シグナリングにとって重要な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)。さらなる態様において、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、フルダラピンなどの化学治療剤、外部ビーム放射線治療 (XRT)、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAM PATHなどの抗体を使ったT細胞アブレーション治療と一緒に (例えば事前に、同時に、または事後に)、患者に投与される。別の態様において、本発明の細胞組成物は、CD20と反応する作用物質、例えばリツキサンなどといった、B細胞アブレーション治療後に投与される。例えば、一態様において、対象は、高用量化学治療とそれに続く末梢血幹細胞移植による標準的処置を受けうる。一定の態様では、移植後に、本発明の拡大増殖させた免疫細胞の注入を、対象に対して行う。さらなる態様では、拡大増殖させた細胞が外科的処置の前または後に投与される。

20

30

40

## 【0339】

患者に投与されるべき上記の処置の投薬量は、処置される状態および処置のレシピエントの厳密な性質と共に変動するだろう。ヒト投与のための投薬量のスケールリングは、当技術分野において認識されている慣行に従って行うことができる。関連処置モダリティーの用量は、成人患者の場合、1～約100mgの範囲にあって、通常は1～30日の期間にわたっ

50

て毎日投与されうる。好ましい1日量は1日あたり1～10mgであるが、場合によっては、1日あたり40mgまでのそれより大きい用量を使用してもよい（米国特許第6,120,766号に記載されている）。

#### 【実施例】

#### 【0340】

##### 実験実施例

以下に実験例を挙げて、本発明を、さらに詳しく説明する。これらの例は、別段の明示がある場合を除き、例示のために提供されるに過ぎず、限定を意図していない。したがって本発明は、決して、以下の例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書において提供される教示の結果として自明になるありとあらゆるバリエーションを包含すると解釈されるべきである。

10

#### 【0341】

これ以上の説明がなくても、当業者であれば、上記の説明と以下の具体例とを使って、本発明の化合物を作り、利用し、かつ請求項の方法を実施することができると思われる。それゆえに、以下の実施例は、本発明の好ましい態様を具体的に指し示すものであり、決して本開示の他の部分を限定していると解釈してはならない。

#### 【0342】

##### 実施例1

同種異系細胞調製物からTCR陰性T細胞を排除するための一過性抗TCR発現

##### 一般的方法

20

##### 抗TCR CAR配列

##### 抗CD3 CAR配列

抗CD3 CARの配列は、5'から3'に向かって、構築において使用されるヒトCD8アルファからのシグナルペプチドなど、シグナルペプチドをコードする配列を含んだ。このペプチドは切断される。構築では、抗CD3 CAR配列が、5'から3'に向かって、抗CD3 scFVをコードする配列、ヒンジドメインをコードする配列、CD8 膜貫通ドメインをコードする配列、4-1BB細胞内共刺激ドメインおよび/CD3z細胞内活性化ドメインをコードする配列を、さらに含む。配列は、2A要素をコードする配列およびBFPレポーター遺伝子をコードする配列をさらに含有するプラスミドに挿入することができる。この配列は、5'端にT7プロモーターを含有し、3'端にマウスhba 3' UTRおよび120ヌクレオチド長ポリAを含有するプラスミドに、さらにサブクローニングすることができる。ポリAの長さは、CAPの性質、およびプロモーター中の配列は、SEQ ID NO:8または12の配列を有するコンストラクトと比較して抗TCR CARをコードするmRNAの半減期を延長または短縮するために、改変することができる。

30

#### 【0343】

PCR、酵素的制限消化およびライゲーションなどの標準的な分子生物学的技法を、すべてのコンストラクトの作製に応用することができる。

#### 【0344】

##### 抗TCRアルファベータCAR配列

抗TCR CARの配列は、5'から3'に向かって、少なくとも、シグナルペプチド配列、（抗アルファTCR scFVまたは抗ベータTCR scFVまたは抗アルファベータTCR scFV）をコードする配列、CD8アルファヒンジドメイン、CD8アルファ膜貫通ドメイン、4-1BB/CD3z共刺激および活性化細胞内ドメインを含む。

40

#### 【0345】

個々のコンストラクト、抗TCR CARをコードするmRNA、およびタンパク質産物はすべて、いずれも本発明の一部である（SEQ ID NO:1～SEQ ID NO:22またはその組合せ）。

#### 【0346】

##### 抗CD3 CAR配列の例

抗CD3 CARの配列は、5'から3'に向かって、ヒトCD8aからのシグナル配列（SEQ ID NO:1）、抗CD3 scFV（SEQ ID NO:2）、CD8aヒンジドメイン（SEQ ID NO:3）、CD

50

8a膜貫通ドメイン (SEQ ID NO:4)、4-1BB/CD3z共刺激および活性化細胞内ドメイン (SEQ ID NO:5)を、2A要素 (SEQ ID NO:6)およびBFPレポーター遺伝子 (SEQ ID NO:7)を含有するプラスミド中に集合させて、30527 (SEQ ID NO:8)とすることによって得られた。この配列を、5'にT7プロモーター (SEQ ID NO:9)を含有し、3'にマウスhba 3' UTR (SEQ ID NO:10)および120ヌクレオチド長ポリA (SEQ ID NO:11)を含有するプラスミドに、さらにサブクローニングすることで、配列30697 (SEQ ID NO:12)とした。

【0347】

このコンストラクトは以下のアミノ酸配列の連続物をもたらした:

CD8シグナル配列 (SEQ ID NO:15)

抗CD3 scFv (SEQ ID NO:16)

CD8ヒンジ (SEQ ID NO:17)

CD8貫膜 (SEQ ID NO:18)

41BB-CD3z (SEQ ID NO:19)

2A (SEQ ID NO:20)

BFP (SEQ ID NO:21)。

【0348】

SEQ ID NO:22はプラスミド30527 (SEQ ID NO:12)で得られる産物に対応する。

【0349】

すべての構築物は、単独でも、組合せでも、本発明の一部である。

【0350】

構築は他の抗TCR scfvと組み合わせてもよい。

【0351】

PCR、酵素的制限消化およびライゲーションなどといった標準的な分子生物学的技法がすべての構築物の作製に応用される。

【0352】

トランスフェクション

活性化の4日後に、AgilePulse MAXシステム (Harvard Apparatus)を用いる電気導入 (electrotransfer)によって、ヒトTリンパ球のトランスフェクションを行った。細胞をペレット化し、サイトポレーション (cytoporation)培地Tに $> 28 \times 10^6$ 細胞/mlの密度で再懸濁した。三つ一組にして、 $5 \times 10^6$ 細胞を合計5 $\mu$ gのTRAC TALEN mRNA (各2.5 $\mu$ gの右および左TALENアーム)と混合し、0.4cmキュベットに入れた。並行して2つのモックトランスフェクション (mRNAなし)も実施した。エレクトロポレーションは、800Vで2回の0.1msパルスと、それに続く130Vで4回の0.2msパルスからなった。エレクトロポレーション後に、細胞を2mLの培養培地に希釈し、37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。TRAC TALENトランスフェクション後の2日目、7日目または9日目に、TRAC TALEN-トランスフェクト細胞の別々のアリコートに、30527 (SEQ ID NO:8)から得られたPCR産物 (SEQ ID NO:22)とオリゴ1 (SEQ ID NO:13)およびオリゴ2 (SEQ ID NO:14)とからmMessage mMachine T7 Ultraキット (Thermo fisher scientific)を使ってEPAP媒介ポリアデニル化で作製された20 $\mu$ gの抗CD3 CAR mRNA、またはTALENコード配列の後ろにマウスhba 3' UTR (SEQ ID NO:10)および120ヌクレオチド長ポリA (SEQ ID NO:11)を含有しポリAの下流で線状化されたプラスミドDNAテンプレート30697 (SEQ ID NO:12)からのT7 RNAポリメラーゼ転写によって得られた20 $\mu$ gの抗CD3 CAR mRNAを、再びエレクトロポレーションした。

【0353】

フローサイトメトリー

抗CD3 CAR発現に関するBFPの検出は各CD3 CAR mRNAエレクトロポレーションの24時間後に実施した。efluor780 (ebioscience 65-0865-18)を使って、細胞生存率をPBS中、4 $^{\circ}$ Cで20分間、モニターした後、PBS中の2%FBSでの洗浄工程を行い、PFA 4%で固定した。2日後、3日後または4日後に、TCRおよびCD3陽性細胞の頻度を評価した。

10

20

30

40

50

PBS中の2%FBS、EDTA 2mM、アジド0.1%に希釈した抗ヒトTCR $\alpha$ b (Miltenyi) (アルファベータTCR特異的)および抗ヒトCD3 (Miltenyi)抗体を使って4で20分間、二重標識を行った後、PBS中の2%FBS、EDTA 2mM、アジド0.1%による洗浄工程を行った。生存率をVicellで評価した。フローサイトメトリーはMACSQUANT (Miltenyi Biotec)を使って実施し、データ解析はFlowJoソフトウェアで実施した。TRAC TALENのみで処理された細胞と比較してCD3/TCR陽性細胞の90~98%の枯渇が測定されたので、収集されたデータにより、抗CD3 mRNAの極めて効率のよい枯渇が実証された(図1)。

【0354】

(NB:TRAC TALEN mRNAのみのエレクトロポレーションは、TRAC TALENがエレクトロポレーションされていない細胞と比較して、約90%~97%のTCR低減をもたらした; 10  
エレクトロポレーション後4日目。図1における枯渇効率 (depletion deficiency) (%)の計算結果は、トランスフェクション2日目におけるアルファベータTCR発現の減少に対応し、0%はエレクトロポレーション後2日目におけるTRAC TALEN処理細胞中のアルファベータTCRに対応する。

【0355】

抗TCR CARの一過性発現後は、アルファベータTCRのレベルが、抗TCR CARのトランスフェクション後2日目、7日目または9日目に、facs解析では検出不可能であった。

【0356】

これにより、抗TCR CARの一過性発現に曝されたTCR欠乏細胞におけるTCR+発現細胞の完全な排除が示唆された。 20

【0357】

TRAC TALEN PBMCとTRAC TALEN/抗CD3 CAR mRNA PBMCとの共培養

TALEN処理の7日後にTRAC TALEN処理細胞に抗CD3 CAR mRNA (3' UTR-120Aフォーマット) (SEQ ID NO:12)をエレクトロポレーションした。24時間後に、さまざまな比のTRAC TALENだけで処理した細胞とTRAC TALEN+抗CD3 CAR二重処理細胞とを、さまざまな比で混合した。48時間の共培養後に、TCRおよびCD3の表面発現を上記のように評価した(図2)。

【0358】

TRAC TALEN+抗CD3 CAR二重処理細胞の用量依存的効果を図2に示す。

【0359】

60~5%のTCR+細胞を含む細胞集団における抗TCR CARの一過性発現 30

供給工程のための細胞は、使用前に融解され、80%超の生存細胞を含む、白血球アフェレーシスなどによる個別健常ドナーからの凍結ヒト末梢単核球である。

【0360】

アルファベータTCRを発現する細胞

アルファベータTCRを発現する細胞の任意の調製物を使用しうる。

【0361】

TRAC遺伝子座へのTALEN標的CAR遺伝子組込み

活性化後に、上記の細胞100万個あたり1 $\mu$ gのTRAC TALENコードmRNAの電気導入によるトランスフェクションを、細胞に行うか、または行わなかった。1.5時間後に、培養物に、CARを含むrAAV6ドナーベクターを $3 \times 10^4$ vg/細胞の感染多重度で加えるか、または加えなかった。CARは、任意のCAR (例えば本明細書に記載したものの中では、好ましくは、CD123、CD22、CS1、CLL-1 CAR)であってよく、CAR発現は、CD4、CD 8、TCR mAb、組換えタンパク質 (CARの完全長標的)を、生細胞/死細胞マーカーと組み合わせて使用することにより、生存T細胞でのフローサイトメトリーによって評価した。 40

【0362】

CAR+TCR-細胞の頻度は40%超に達したので、結果は、TRAC遺伝子座におけるCARの組込みが高効率であることを示している。

【0363】

抗原提示細胞に対する全細胞またはCAR<sup>+</sup>T細胞の溶解能は、フローベースの (flow-based) 細胞毒性アッセイで評価した。それぞれ10:1、5:1、2:1および1:1または1:1、0.5:1、0.2:1および0.1:1のエフェクター/標的比で、CAR<sup>+</sup>T細胞との4時間の共培養後および終夜共培養後に、細胞生存率を測定した。

【0364】

結果は、これらの細胞の細胞溶解活性が、他の方法 (古典的形質導入) によって得られるCAR発現細胞に匹敵したことを示している。

【0365】

活性化の3日後に、細胞100万個あたり各1 $\mu$ gのTRACおよびCD52 TALENコードmRNAの電気導入によるトランスフェクションを、T細胞に行うか、または行わなかった。

【0366】

TCR KOおよびCAR KIのこの2イン1 (2-in-1) 戦略は、2つ以上のTALENの使用に拡張できることを、この結果は示している。CAR<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup>細胞の頻度は47%超に達したので、TRAC遺伝子座におけるCARの組込みは高効率である。重要なことに、T細胞に1 $\mu$ gのCD52 TALENコードmRNAだけをトランスフェクトした場合、CD52遺伝子座ではCAR発現は検出されなかった。CAR<sup>+</sup>T細胞の集団の80%超は、TCR<sup>-</sup> およびCD52の両方についてノックアウトされている。

【0367】

無改変T細胞の約90%は予想どおりTCR<sup>+</sup>陽性であったが、TCR陰性細胞の精製は主としてTCR<sup>-</sup>陰性 (約95~98%) をもたらした。

【0368】

これらの細胞における抗TCR CAR (SEQ ID NO8または12) の一過性発現により、フローサイトメトリー (FACS) 解析では、TCRは検出不能レベルになった。

【0369】

加えて、生着前の器官においてTCR<sup>+</sup>T細胞を枯渇させるための一過性発現抗TCR CAR T細胞の使用が、ここで実施される。

【0370】

さらに、抗TCR CARの一過性発現は、最大60%のTCR<sup>+</sup>細胞を発現する集団からTCR<sup>+</sup>細胞の完全な枯渇をもたらした。

【0371】

CAR<sup>+</sup>T細胞に抗TCR CARをコードするmRNAをトランスフェクトすると、CAR陰性細胞集団の明確な濃縮が起こる。この濃縮は、トランスフェクトされたmRNAの用量に依存し、よってCART細胞の表面に一過性に発現した抗TCR CARのレベルに依存する。CAR<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup>T細胞の頻度は経時的に増加するが、この増加はもはや用量依存的ではない。

【0372】

CART細胞に抗TCR CARをコードするmRNAをトランスフェクトすると、CAR陽性細胞集団の明確な濃縮が起こる。抗原をコードするmRNAをトランスフェクトした場合に観察される利益は、MOIが1および2と低用量のレンチウイルス粒子で、CAR<sup>+</sup>T細胞の頻度が5%未満である場合には、より重要である。

【0373】

CD8<sup>+</sup>T細胞の濃縮が観察され、それは、トランスフェクトされた細胞とトランスフェクトされていない細胞との間で等しく、mRNAの量には依存しない。

【0374】

抗TCR CARをコードするmRNAの一過性トランスフェクションは、患者から単離されこの実験に使用された標的細胞に対するCD38 CARまたはCD123 CARの細胞溶解活性を改変しない。CAR<sup>+</sup>T細胞は、インビトロでわずかに改良された抗腫瘍活性 (標準偏差未満) を有する傾向があるようである。

【0375】

実施例2

GVHDの評価

10

20

30

40

50

抗TCR CARをコードするmRNAを発現することにより、同種異系CAR Tの品質が完了されうるかどうか、特にTCR+T細胞の存在による副作用が減少するかどうかを調べるために、TCR陰性細胞を上述（実施例1）のように調製し、GVHD測定を行うために、さまざまな用量をマウスに投与した。

【0376】

結果は、CAR T細胞に抗TCR CARをコードするmRNAをトランスフェクトして、FACSでCAR陽性TCR陰性細胞集団の明確な濃縮がある場合の、GVHD症状の、特に体重減少およびひっかき行動の、用量依存的減少を示している。この濃縮は、トランスフェクトされたmRNAの用量に依存し、よってCART細胞の表面に一過性に発現した抗TCR CARのレベルに依存する。

10

【0377】

ヒトでは、TCR陽性細胞が3%未満であり、アルファベータTCR陰性T細胞が97%超である、TALEN（登録商標）で操作されたT細胞調製物は、操作されていないT細胞（グレード1のGVHDが反応性患者において測定された）よりもアロ反応性が低いことがわかり、本発明に従って調製された細胞は、基本的にGVHDフリーであった。

【0378】

動態実験

動態実験により、本発明の抗CD3 CAR（SEQ ID 8または12）の発現は、トランスフェクションの3時間後から5日後（最高用量の場合）およびヒトグロビン配列を構築に加えた場合は7日後まで検出されることが示された。

20

【0379】

ボランティアにおいて、本発明のプロセスに従って得られた細胞は、投与した用量（最大 $7 \times 10^7$ 細胞/kg体重）を問わず、GVHDを誘発しなかった。

【0380】

1つまたは複数の例示的態様を例として記載した。請求項において規定する本発明の範囲から逸脱することなく、いくつかのバリエーションおよび改変を加えうることは、当業者には理解されるであろう。

【0381】

そのようなCARベースのTCR<sup>+</sup>細胞集団枯渇戦略を開発することを目指して、本発明者らは、まず、TALENベースのTCR<sup>+</sup>不活化<sup>1</sup>後にCD3 CAR（mRNAトランスフェクション）を一過性に発現させることの効果をモニターすることに集中した。CD3 CARトランスフェクション時点（TALEN処置の2、7または9日後）には依存せず、本発明者らは、残存CD3+TCR<sup>+</sup>集団（6.5~10.4%の陽性細胞から出発）が、CD3 CAR mRNA処理試料における0.04~0.93%（メジアンは0.17%）へと、実質的に排除されることを観察した。これは、全体として91~99%の枯渇効率（メジアンは97.7%、図5A）に相当する。次の工程は、潜在的腫瘍抗原を標的とするCAR（CD22、レンチウイルスベクター化）<sup>10</sup>を安定に発現するT細胞において一過性に発現するCD3 CARの枯渇能を評価することであった。この目標に向けて、本発明者らは、凍結PBMCから出発して、レンチウイルス粒子形質導入工程（CD22 CAR組込み）と2つのmRNAトランスフェクション工程とを含むように、プロトコールを開発した。第1mRNAエレクトロポレーション（TRAC TALEN）に続いて、TCR<sup>+</sup>/CD3表面提示を強く低減させるタイミングである48時間後に、CD3 CARエレクトロポレーションが行われる（図3A）。CD3 CARエレクトロポレーションの4日後に、本発明者らは、最小の残存CD3+TCR<sup>+</sup>集団（メジアンCD3+TCR<sup>+</sup>:0.25%、メジアン枯渇:98.5%）を観察したことから、安定に発現された抗腫瘍CARが事前に存在することは、この系の枯渇可能性に影響を及ぼさないことが示された。次に、これらの操作されたUCAR-T細胞集団を、10~11日間、IL-2の存在下で、さらに拡大増殖させた。拡大増殖後に、CD3+TCR<sup>+</sup>細胞（図3B）を考慮した場合、先のCD3 CAR一過性発現による成長上の利点または欠陥を本発明者らが認めることはなく、CD3+TCR<sup>+</sup>集団は影響を受けないまま（p値:0.756、図3C）であり、ごくわずかであった（メジアン:0.41%）。全体として、試験した5人のドナー中4人に、1%未満の残存TCR<sup>+</sup>T

30

40

50

細胞を得た(図3C)。さらにまた、本発明者らは、所与のT細胞ドナー内では、遺伝子編集後に得られたCD3陽性細胞の出発パーセンテージ(10~36%の範囲、図5B)には依存することなく、CD3+TCR<sup>+</sup>の効率のよい排除(98.7~99.6%の枯渇)が得られることも示した。

#### 【0382】

CD3 CARの一過性発現の影響を解析するために、本発明者らは、5人の個別ドナーから生成させたT細胞集団の3つの特徴、すなわち(i)CD4対CD8比、(ii)T細胞分化、および(iii)疲弊マーカーをモニターした。

#### 【0383】

CD3 CARをトランスフェクトした試料は、均衡したCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>比を維持している非トランスフェクト試料と比較して、中等度のCD8<sup>+</sup>に偏った傾斜(CD8<sup>+</sup>-biased skewing)を示した(図3D)。T細胞分化の程度、特に低減したインビボ抗腫瘍機能に関連するターミナルエフェクター細胞(CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>)<sup>11,12</sup>の比率を考慮したところ、CD3 CARの有意な影響は何も見つからなかった(図3E、図6)。加えて、CD3 CARをトランスフェクトしたT細胞もトランスフェクトされていないT細胞も、改良された抗腫瘍機能に関連するエフェクターメモリー細胞(CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>)およびナイーブ/セントラルメモリー細胞(CD62L<sup>+</sup>)の比率は大きかった(図3E、図7)。疲弊表現型の獲得も低減したインビボ機能と以前に関連付けられているので、本発明者らは、詳しく記録された2種の疲弊マーカー<sup>13</sup>であるPD1とLAG3の表面発現をモニターした。意外にも、CD3 CAR処理試料ではPD1、LAG3またはPD1/LAG3共発現細胞の頻度が低く、無処理試料と比較して実質的なアップレギュレーションはないことがわかった(図3F)。

#### 【0384】

最後に本発明者らは、操作されたCAR T細胞の適合性および機能をインビトロおよびインビボで、さらに綿密に評価した。本発明者らはまず、IL2の非存在下で適当な抗原を発現する標的細胞(CD22<sup>+</sup>、Raji)による単一の刺激に反応して起こるT細胞増殖を、10日間にわたってモニターした。この実験設定では、CD3 CARで処理されたT細胞またはCD3 CARで処理されていないT細胞の抗原依存的増殖能の著しい相違は明らかにならなかった(図4A)。3人のドナーからの操作されたCAR T細胞を使って、本発明者らは、UCAR-T細胞を両日とも標的細胞(ルシフェラーゼ発現Raji細胞)で攻撃するインビトロ3日間死滅アッセイを行った。標的細胞ルシフェラーゼシグナルの減少によってモニターしたところ、本発明者らは、各ドナーについて、CD3 CARをトランスフェクトしたT細胞またはCD3 CARをトランスフェクトしていないT細胞のどちらの試料も、標的細胞死滅を同様のレベルまで効率よく促進できることを見出した(図4B)。インビトロ機能研究では著しい有意差は見られなかったので(p値:1日目は0.49、2日目は0.64、3日目は0.67)、本発明者らは、最後に、操作されたCAR T細胞のインビボでの機能的性質を、ヒトCD22<sup>+</sup>リンパ腫異種移植片モデル(マウスに注射されたルシフェラーゼ発現Raji細胞)を使って調べた。このモデルでは、操作されたCAR T細胞(+/-CD3 CAR処理)はどちらも、実質的に遅延した腫瘍進行と、対象CARと比較して生存期間の延長を誘導した(図4Cおよび図4D、図7)。これらの知見は、急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)に対する同種異系設定でのT細胞において、操作された細胞の適合性に影響を及ぼすことなく、CD3特異的CARを安定に発現させうることを実証したQasimとその共同研究者<sup>4</sup>による最近のレポートによって裏付けられる。

#### 【0385】

要約すると、本発明者らは、移植片対宿主病(GvHD)のリスクを最小限に抑えまたは防止するために、同種異系CAR T細胞生成プロセスの初期段階において残存TCR<sup>+</sup>細胞を排除するための、広く実装可能な新規方法を提案する。このわかりやすく実装が用意な精製アプローチは、機械的精製に起因する収率損失を低減し、最終産物の凍結前の細胞の取扱いを簡略化することができるだろう。養子免疫治療用の同種異系「既製」CAR T細胞の生成に加えて、本発明者らは、出発材料内に存在する任意の微量集団を排除するために拡張することができるアプローチとして、他の特異的表面抗原の一過性ターゲティング

を、さらに想定している。

#### 【0386】

##### 方法

##### T細胞増殖

T細胞は、5%ヒト血清hAB (Gemini) および20ng/ml IL-2 (Miltenyi) を補足したX-Vivo 15 (Lonza) 中、 $1 \times 10^6$ 細胞/mlの密度で培養した。

#### 【0387】

##### mRNAの作製

mRNAは、CD3 CARをコードするPCR産物から、EPAP媒介ポリアデニル化により、m Message mMachine T7 Ultraキット (Thermo fisher scientific) を使って作製する  
か、EPAP媒介ポリアデニル化なしで、CD3 CAR、マウスhba 3' UTRおよび120-ヌクレ  
オチド長ポリAをコードする線状化したプラスミドDNAテンプレートから作製した。

10

#### 【0388】

##### レンチウイルス粒子の作製

10%FBS (Gibco)、1%HEPES (Gibco)、1%L-グルタミン (Gibco) および1%ペ  
ニシリン/ストレプトマイシン (Gibco) を補足したRPMI 1640培地 (ThermoFisher)  
で培養した293FT細胞 (ThermoFisher) において、Opti-MEM培地 (Gibco) およびLi  
pofectamine 2000 (ThermoFisher) を使用し、標準的なトランスフェクション手順に  
従って、レンチウイルス粒子を生成させた。トランスフェクションの48時間後および/ま  
たは72時間後に、上清を回収し、超遠心分離によって濃縮した。

20

#### 【0389】

##### T細胞形質導入

凍結保存されたヒトPBMC (ALLCELLS) を融解し、5%hAB血清 (Gemini) またはCT  
S免疫細胞SR (ThermoFisher) および20ng/ml IL-2 (Miltenyi Biotech) を補足した  
X-vivo-15培地 (Lonza) に、 $1 \times 10^6$ 細胞/mlでプレティングして、37 °Cで一晩培養  
した。翌日、IL-2を含まない無血清X-vivo-15培地中で、ヒトTアクチベーターCD3/CD2  
8 (Life Technology) を使ってPBMCを活性化した。30 µg/mlのレトロネクチン (Tak  
ara) でプレコートした無処理12ウェルプレートにおいて、CD22標的CARをコードする  
レンチウイルス粒子の存在下、37 °Cで2時間、100万個の活性化PBMC (600 µl中) を、  
ビーズを除去することなく直ちにインキュベートした。2~3時間後に600マイクロリット  
ルの2 x X-vivo-15 培地 (X-vivo-15、10%hAB血清および40ng/ml IL-2) を加え、  
細胞を37 °Cで72時間インキュベートした。

30

#### 【0390】

##### T細胞トランスフェクション

活性化/形質導入の4日後に、AgilePulse MAXシステム (Harvard Apparatus) を用  
いる電気導入によって、ヒトTリンパ球のトランスフェクションを行った。細胞をペレッ  
ト化し、サイトポレーション培地Tに再懸濁した。 $5 \times 10^6$ 細胞を合計5 µgのTRAC TALE  
N mRNA (各2.5 µgの右および左TALENアーム) と混合し、0.4cmキュベットに入れた  
。TRAC TALENトランスフェクト細胞またはモックトランスフェクト細胞の別々のアリコ  
ートに、さまざまな時点 (TRAC TALENトランスフェクション後の2日目、7日目または9  
日目) に、20 µgのCD3 CAR mRNAをエレクトロポレーションした。次に、操作されたT  
細胞を培養中に最大4日間保ってから、40mlの完全X-vivo-15培地中、G-Rex10 (Wilso  
n Wolf) において、6~7日間の拡大増殖を行った。

40

#### 【0391】

##### マーカー表面検出

次に、CARをその表面に発現しているT細胞の比率を、以下の抗体を使って定量した:CD  
3:クローンBW264/56、Vioblue (Miltenyi # 130-094-363)、TCR :クローンR  
EA652、PE (Miltenyi # 130-109-920)、CD4:クローンVIT4、PEVio770 (Milten  
yi # 130-096-552)、CD8:クローンSK1、BV510 (Biolegend # 344732)、CD62  
L:クローン145/15、APC (Miltenyi # 130-113-617)、CD45RA:クローンT6D11、

50

Vioblue (Miltenyi # 130-113-360)、PD1:クローンREA1165、PE (Miltenyi # 130-120-388) およびLAG3:クローン11C3C65、BV421 (Biolegend # 369313)。

【0392】

抗原依存的増殖

Raji細胞をCellRad X線照射システム (Faxitron、米国アリゾナ州トゥーソン) を使って、20Gyで処理し、2回洗浄し、計数し、24ウェルプレートにおいて、二つ一組にして、500,000個を500,000個のT細胞 (1:1) と共に、5% hAB血清を含むがIL-2は含まない最終体積1mlのX-vivo-15培地に入れてプレーティングした。4日目および7日目に、細胞をVicellで計数し、500,000細胞/0.5ml培地を48ウェルプレートに継代した。10日目に、細胞を混合し、最終時点として計数した。

10

【0393】

CAR細胞傷害性の評価

12ウェルプレートにおいて、形質導入されたT細胞 ( $1.5 \times 10^6$ 細胞) を、5% hAB血清を含みIL-2を欠くX-vivo-15培地中で、CAR標的抗原を提示しルシフェラーゼを発現する標的細胞 (Raji) ( $0.5 \times 10^6$ 細胞) と共に3:1 (T細胞:標的) の比でインキュベートした。24時間後に、細胞を収集し、混合し、100  $\mu$ lの細胞をルシフェラーゼ定量 (OneGlo、Promega) に使用した。残りの細胞をペレット化し、新鮮なX-vivo15培地、5% hAB血清、IL-2なしに再懸濁し、 $0.5 \times 10^6$ 個の標的細胞を追加した。この工程を2日連続して繰り返した。

【0394】

20

NGS異種移植片モデルを使ったインビボ実験 (図7)

動物に関わる手順はすべて規制および確立された指針に従って実施され、Cellecctisの施設内動物実験委員会 (IACUC) によって精査され承認された。

【0395】

NSGマウスに $0.25 \times 10^6$ 個のCD22 + Raji標的細胞を注射した。マウスのランダム化を行うまで腫瘍細胞を拡大増殖させ、マウスのランダム化は、4日目に、ベースバイオルミネセンスイメージング (based bioluminescence imaging) (BLI) (XenoLight D-ルシフェリン (PerkinElmer) に基づいて行った。翌日、CD3 CARで処理したまたはCD3 CARで処理していない生きているモック形質導入T細胞またはCAR形質導入T細胞 $10 \times 10^6$ 個を、マウスに養子移入 (i.v.) した (各群マウス3匹)。次に、4日目、8日目、12日目および16日目に、マウスを再び撮像した。

30

【0396】

参考文献

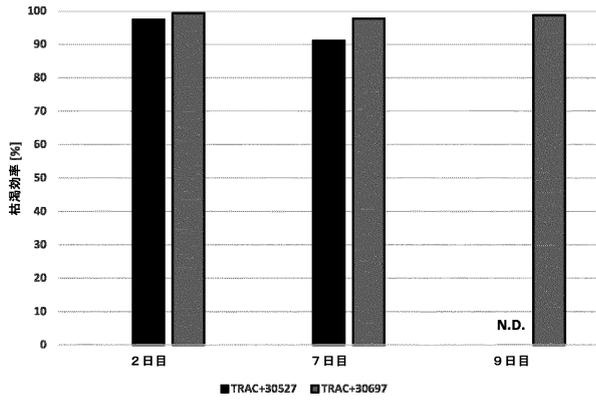
40

50

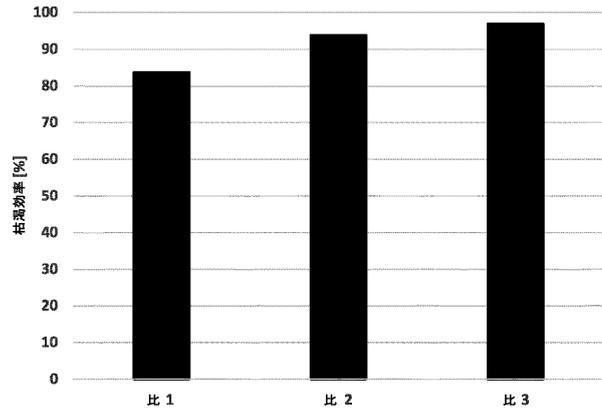
1. Poirot, L. et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res* **75**, 3853-3864 (2015).
2. Qasim, W. et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med* **9** (2017).
3. Valton, J. et al. A Multidrug-resistant Engineered CAR T Cell for Allogeneic Combination Immunotherapy. *Mol Ther* **23**, 1507-1518 (2015).
4. Rasaiyaah, J., Georgiadis, C., Preece, R., Mock, U. & Qasim, W. TCRalpha/CD3 disruption enables CD3-specific antileukemic T cell immunotherapy. *JCI Insight* **3** (2018).
5. Provasi, E. et al. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat Med* **18**, 807-815 (2012). 10
6. MacLeod, D.T. et al. Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells. *Mol Ther* **25**, 949-961 (2017).
7. Hale, M. et al. Homology-Directed Recombination for Enhanced Engineering of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* **4**, 192-203 (2017).
8. Eyquem, J. et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* **543**, 113-117 (2017).
9. Georgiadis, C. et al. Long Terminal Repeat CRISPR-CAR-Coupled "Universal" T Cells Mediate Potent Anti-leukemic Effects. *Mol Ther* **26**, 1215-1227 (2018).
10. Xiao, X., Ho, M., Zhu, Z., Pastan, I. & Dimitrov, D.S. Identification and characterization of fully human anti-CD22 monoclonal antibodies. *MAbs* **1**, 297-303 (2009). 20
11. Gattinoni, L. et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* **17**, 1290-1297 (2011).
12. Sommermeyer, D. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* **30**, 492-500 (2016).
13. Blackburn, S.D. et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* **10**, 29-37 (2009). 30

【図面】

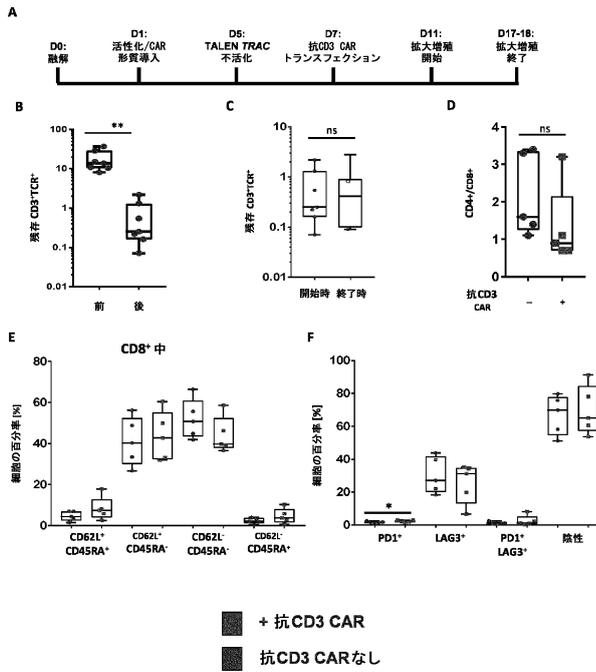
【図 1】



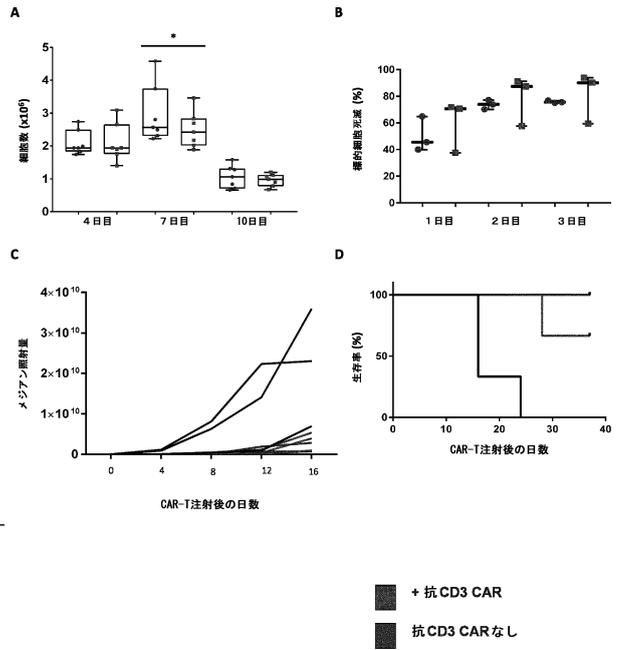
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

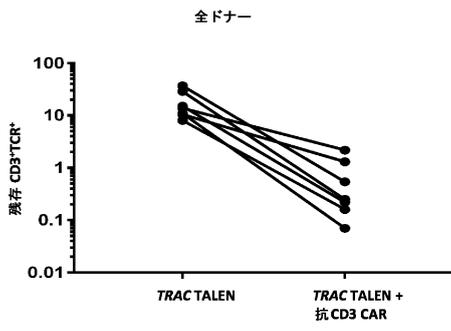
30

40

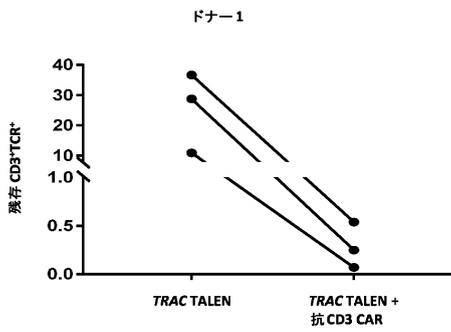
50

【 図 5 】

A

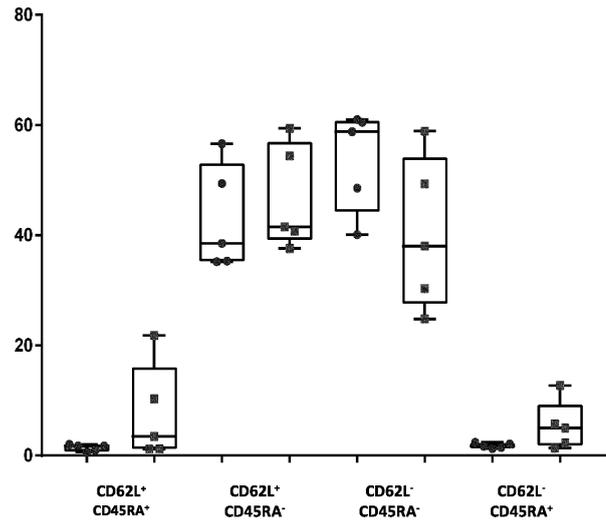


B



【 図 6 】

CD4 表現型

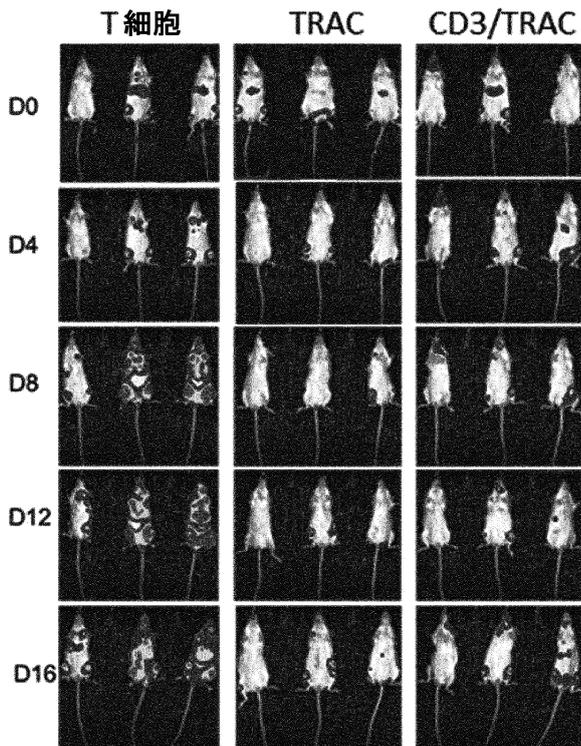


10

20

【 図 7 】

インビボ



30

40

【 配列表 】

0007372920000001.app

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 15/62 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/864(2006.01)  
 A 6 1 K 35/17 (2015.01)  
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)

## F I

C 1 2 N 15/13  
 C 1 2 N 15/62 Z  
 C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z  
 A 6 1 K 35/17  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 31/00  
 A 6 1 P 37/02  
 A 6 1 P 21/00

## (33)優先権主張国・地域又は機関

デンマーク(DK)

弁理士 刑部 俊

(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 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ボイン アレックス

アメリカ合衆国 0 7 3 0 2 ニュージャージー州 ジャージー シティー ウェスト ハミルトン プ  
 レイス 4 8 - 5 0 ユニット 2 エイ

(72)発明者 ボアロ ローラン

フランス共和国 7 5 0 2 0 パリ リュー ドゥ ラ リユニオン 1 0

(72)発明者 ドゥシャトー フィリップ

フランス共和国 9 1 2 1 0 ドラヴェイユ ケ デ ダームス バトー ファウエン

(72)発明者 ジュイレラット アレクサンドル

アメリカ合衆国 1 0 0 2 8 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト エイティセカンド ストリ  
 ート 4 4 4 # 5 エイ

審査官 西 賢二

(56)参考文献 特表 2 0 1 7 - 5 1 0 2 5 7 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 6 / 1 3 8 4 9 1 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 6 / 0 6 9 2 8 2 ( W O , A 1 )

Qasim, W. et al. , "Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN ge  
 ne-edited CAR T cells" , Sci. Transl. Med. , 2017年01月25日 , Vol. 9; eaaj2013 , pp. 1-8

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
 N )

P u b M e d

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

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq