

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7005346号

(P7005346)

(45)発行日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日 令和4年1月7日(2022.1.7)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/17

Z Z M D

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04

請求項の数 36 (全50頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-522502(P2017-522502)

(86)(22)出願日 平成27年10月27日(2015.10.27)

(65)公表番号 特表2017-531687(P2017-531687
A)

(43)公表日 平成29年10月26日(2017.10.26)

(86)国際出願番号 PCT/US2015/057652

(87)国際公開番号 WO2016/069647

(87)国際公開日 平成28年5月6日(2016.5.6)

審査請求日 平成30年10月26日(2018.10.26)

(31)優先権主張番号 62/069,168

(32)優先日 平成26年10月27日(2014.10.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 506139369

フレッド ハッチンソン キャンサー リ
サーチ センターアメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
フェアビュー アベニュー ノース 1 1
0 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 養子細胞免疫療法の有効性を増強させるための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

養子細胞免疫療法を改善するための方法において使用するための、(i) 改変ヒトT細胞の第1の集団、および(ii) 改変ヒトT細胞の第2の集団を含む組合せ物であって、前記方法は、以下：

(a) 被験体に対して有効量の前記(i) 改変ヒトT細胞の第1の集団を投与するステップであって、ここで、前記(i) 改変ヒトT細胞の第1の集団は抗原結合タンパク質をコードする外因性核酸分子を含み、前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、前記結合成分は、抗体可変断片(Fv)、好ましくは、scFv、受容体エクストドメインまたはリガンドであり、前記疎水性部分はCD4膜貫通ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメインまたはCD27膜貫通ドメインを含み、前記細胞内エフェクター成分は、CD3、CD3、CD3、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CD134、CD137、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2もしくはこれらの任意の組合せの細胞内領域を含み、前記改変ヒトT細胞は前記抗原結合タンパク質を発現する、ステップ；

(b) 前記被験体に対して有効量の前記(ii) 改変ヒトT細胞の第2の集団を投与する

ステップであって、ここで、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団は抗原をコードし前記抗原を発現する外因性核酸分子を含み、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団からの前記抗原結合タンパク質の前記細胞外結合成分が、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団によりコードされる前記抗原に特異的であり、ここで、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団は、CD 4 + T 細胞、CD 8 + T 細胞、CD 4 - CD 8 - 二重陰性 T 細胞、 T 細胞、またはこれらの任意の組合せを含む、ステップ；ならびに、(c) 任意選択でステップ (a)、ステップ (b) またはステップ (a) と (b) の両方を反復するステップと

を含み、

それにより、前記養子細胞免疫療法の有効性を増強、強化もしくは向上させる、組合せ物。

10

【請求項 2】

養子細胞免疫療法を改善するための方法において使用するための、改変ヒト T 細胞の第 1 の集団を含む組成物であって、

ここで、前記改変ヒト T 細胞の第 1 の集団は抗原結合タンパク質をコードする外因性核酸分子を含み、前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、前記結合成分は、抗体可変断片 (F v)、好ましくは、s c F v、受容体エクドメインまたはリガンドであり、前記疎水性部分は CD 4 膜貫通ドメイン、CD 8 膜貫通ドメイン、CD 2 8 膜貫通ドメインまたは CD 2 7 膜貫通ドメインを含み、前記細胞内エフェクター成分は、CD 3 、 CD 3 、 CD 3 、 CD 2 5、CD 2 7、CD 2 8、CD 7 9 A、CD 7 9 B、CD 1 3 4、CD 1 3 7、CARD 1 1、DAP 1 0、Fc R 、 Fc R 、 Fc R 、 F y n、HVEM、ICOS、L c k、LAG 3、LAT、LRP、NKG 2 D、NOTCH 1、NOTCH 2、NOTCH 3、NOTCH 4、ROR 2、Ry k、SLAMF 1、Slp 7 6、p T 、TCR 、TCR 、TRIM、Zap 7 0、PTCH 2 もしくはこれらの任意の組合せの細胞内領域を含み、前記改変ヒト T 細胞は前記抗原結合タンパク質を発現し、

20

前記組成物は、改変ヒト T 細胞の第 2 の集団と組み合わせて投与されることを特徴とし、ここで、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団は抗原をコードし前記抗原を発現する外因性核酸分子を含み、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団からの前記抗原結合タンパク質の前記細胞外結合成分が、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団によりコードされる前記抗原に特異的であり、ここで、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団は、CD 4 + T 細胞、CD 8 + T 細胞、CD 4 - CD 8 - 二重陰性 T 細胞、 T 細胞、またはこれらの任意の組合せを含み、

30

ここで、任意選択で前記組成物は、単独で、または前記改変ヒト T 細胞の第 2 の集団と組み合わせて反復して投与され、前記養子細胞免疫療法の有効性を増強、強化もしくは向上させる、組成物。

【請求項 3】

養子細胞免疫療法を改善するための方法において使用するための、改変ヒト T 細胞の第 2 の集団を含む組成物であって、

前記組成物は、改変ヒト T 細胞の第 1 の集団と組み合わせて投与されることを特徴とし、ここで、前記改変ヒト T 細胞の第 1 の集団は抗原結合タンパク質をコードする外因性核酸分子を含み、前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、前記結合成分は、抗体可変断片 (F v)、好ましくは、s c F v、受容体エクドメインまたはリガンドであり、前記疎水性部分は CD 4 膜貫通ドメイン、CD 8 膜貫通ドメイン、CD 2 8 膜貫通ドメインまたは CD 2 7 膜貫通ドメインを含み、前記細胞内エフェクター成分は、CD 3 、 CD 3 、 CD 3 、 CD 2 5、CD 2 7、CD 2 8、CD 7 9 A、CD 7 9 B、CD 1 3 4、CD 1 3 7、CARD 1 1、DAP 1 0、Fc R 、 Fc R 、 Fc R 、 F y n、HVEM、ICOS、L c k、LAG 3、LAT、LRP、NKG 2 D、NOTCH 1、NOTCH 2、NOTCH 3、NOTCH 4、ROR 2、Ry k、SLAMF 1、Slp 7 6、p T 、TCR 、TCR 、TRIM、Zap 7 0、PTCH 2 もしくはこれらの任意の組合せの細胞内領域を

40

50

含み、前記改変ヒトT細胞は前記抗原結合タンパク質を発現し、
 ここで、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団は抗原をコードし前記抗原を発現する
 外因性核酸分子を含み、前記(i)改変ヒトT細胞の第1の集団からの前記抗原結合タン
 パク質の前記細胞外結合成分が、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団によりコード
 される前記抗原に特異的であり、ここで、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団は、
 CD4 + T細胞、CD8 + T細胞、CD4 - CD8 - 二重陰性T細胞、 T細胞、また
 はこれらの任意の組合せを含み、
 ここで、任意選択で前記組成物は、単独で、または前記改変ヒトT細胞の第1の集団と組
 み合わせて反復して投与され、前記養子細胞免疫療法の有効性を増強、強化もしくは向上
 させる、組成物。

10

【請求項4】

疾患を処置するための方法において使用するための、(i)改変ヒトT細胞の第1の集団
 、および(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団を含む組合せ物であって、前記方法は、以
 下：

(a)被験体に対して有効量の前記(i)改変ヒトT細胞の第1の集団を投与するステッ
 プであって、ここで、前記(i)改変ヒトT細胞の第1の集団は抗原結合タンパク質をコ
 ードする外因性核酸分子を含み、前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エ
 フェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、前記結合成分は、抗体可変断片(F
 v)、好ましくは、scFv、受容体エクドメインまたはリガンドであり、前記疎水性
 部分はCD4膜貫通ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメインまたはC
 D27膜貫通ドメインを含み、前記細胞内エフェクター成分は、CD3、CD3、C
 D3、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CD134、CD1
 37、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、
 ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH
 2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT
 、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2もしくはこれらの任意の組
 合せの細胞内領域を含み、前記改変ヒトT細胞は前記抗原結合タンパク質を発現する、ス
 テップ；

20

(b)前記被験体に対して有効量の前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団を投与する
 ステップであって、ここで、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団は抗原をコードし
 前記抗原を発現する外因性核酸分子を含み、前記(i)改変ヒトT細胞の第1の集団から
 の前記抗原結合タンパク質の前記細胞外結合成分が、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2
 の集団によりコードされる前記抗原に特異的であり、ここで、前記(i i)改変ヒトT細
 胞の第2の集団は、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞、CD4 - CD8 - 二重陰性T細胞
 、 T細胞、またはこれらの任意の組合せを含む、ステップ；ならびに、

30

(c)任意選択でステップ(a)、ステップ(b)またはステップ(a)と(b)の両方
 を反復するステップと

を含み、

それにより、養子細胞免疫療法によって前記疾患を処置するかまたは前記疾患を処置する
 、組合せ物。

40

【請求項5】

疾患を処置するための方法において使用するための、改変ヒトT細胞の第1の集団を含む
 組成物であって、

前記組成物は、改変ヒトT細胞の第2の集団と組み合わせて投与されることを特徴とし、
 ここで、前記改変ヒトT細胞の第1の集団は抗原結合タンパク質をコードする外因性核酸
 分子を含み、前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との
 間に位置する疎水性部分を含み、前記結合成分は、抗体可変断片(Fv)、好ましくは、
 scFv、受容体エクドメインまたはリガンドであり、前記疎水性部分はCD4膜貫通
 ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメインまたはCD27膜貫通ドメイ
 ンを含み、前記細胞内エフェクター成分は、CD3、CD3、CD3、CD25、

50

CD27、CD28、CD79A、CD79B、CD134、CD137、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2もしくはこれらの任意の組合せの細胞内領域を含み、前記改変ヒトT細胞は前記抗原結合タンパク質を発現し、

ここで、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団は抗原をコードし前記抗原を発現する外因性核酸分子を含み、前記(i)改変ヒトT細胞の第1の集団からの前記抗原結合タンパク質の前記細胞外結合成分が、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団によりコードされる前記抗原に特異的であり、ここで、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団は、

CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4-CD8-二重陰性T細胞、T細胞、またはこれらの任意の組合せを含み、ここで、任意選択で前記組成物は、単独で、または前記改変ヒトT細胞の第2の集団と組み合わせて反復して投与され、養子細胞免疫療法によって前記疾患を処置するかまたは前記疾患を処置する、組成物。

【請求項6】

疾患を処置するための方法において使用するための、改変ヒトT細胞の第2の集団を含む組成物であって、

前記組成物は、改変ヒトT細胞の第1の集団と組み合わせて投与されることを特徴とし、ここで、前記改変ヒトT細胞の第1の集団は抗原結合タンパク質をコードする外因性核酸分子を含み、前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、前記結合成分は、抗体可変断片(Fv)、好ましくは、scFv、受容体エクストドメインまたはリガンドであり、前記疎水性部分はCD4膜貫通ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメインまたはCD27膜貫通ドメインを含み、前記細胞内エフェクター成分は、CD3、CD3、CD3、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CD134、CD137、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2もしくはこれらの任意の組合せの細胞内領域を含み、前記改変ヒトT細胞は前記抗原結合タンパク質を発現し、

ここで、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団は抗原をコードし前記抗原を発現する外因性核酸分子を含み、前記(i)改変ヒトT細胞の第1の集団からの前記抗原結合タンパク質の前記細胞外結合成分が、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団によりコードされる前記抗原に特異的であり、ここで、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団は、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4-CD8-二重陰性T細胞、T細胞、またはこれらの任意の組合せを含み、

ここで、任意選択で前記組成物は、単独で、または前記改変ヒトT細胞の第1の集団と組み合わせて反復して投与され、養子細胞免疫療法によって前記疾患を処置するかまたは前記疾患を処置する、組成物。

【請求項7】

疾患を処置するための方法において使用するための、(i)改変ヒトT細胞の第1の集団、および(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団を含む組合せ物であって、前記方法は、以下：

(a)被験体に対して有効量の前記(i)改変ヒトT細胞の第1の集団を投与するステップであって、ここで、前記(i)改変ヒトT細胞の第1の集団は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードする外因性核酸分子を含み、前記改変ヒトT細胞は前記CARを発現する、ステップ；

(b)前記被験体に対して有効量の前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団を投与するステップであって、ここで、前記(i i)改変ヒトT細胞の第2の集団は抗原をコードし

10

20

30

40

50

前記抗原を発現する外因性核酸分子を含み、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団からの前記 C A R の前記細胞外結合成分が、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団によりコードされる前記抗原に特異的であり、ここで、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団は、任意選択で C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、C D 4 - C D 8 - 二重陰性 T 細胞、

T 細胞、またはこれらの任意の組合せを含む、ステップ ; ならびに、
(c) 任意選択でステップ (a)、ステップ (b) またはステップ (a) と (b) の両方を反復するステップと

を含み、

それにより、養子細胞免疫療法によって前記疾患を処置するかまたは前記疾患を処置する、組合せ物。

10

【請求項 8】

疾患を処置するための方法において使用するための、改変ヒト T 細胞の第 1 の集団を含む組成物であって、

前記組成物は、改変ヒト T 細胞の第 2 の集団と組み合わせて投与されることを特徴とし、ここで、前記改変ヒト T 細胞の第 1 の集団は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含むキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする外因性核酸分子を含み、前記改変ヒト T 細胞は前記 C A R を発現し ;

前記改変ヒト T 細胞の第 2 の集団は抗原をコードし前記抗原を発現する外因性核酸分子を含み、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団からの前記 C A R の前記細胞外結合成分が、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団によりコードされる前記抗原に特異的であり、ここで、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団は、任意選択で C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、C D 4 - C D 8 - 二重陰性 T 細胞、 T 細胞、またはこれらの任意の組合せを含み ;

20

ここで、任意選択で前記組成物は、単独で、または前記改変ヒト T 細胞の第 2 の集団と組み合わせて反復して投与され、養子細胞免疫療法によって前記疾患を処置するかまたは前記疾患を処置する、組成物。

【請求項 9】

疾患を処置するための方法において使用するための、改変ヒト T 細胞の第 2 の集団を含む組成物であって、

前記組成物は、改変ヒト T 細胞の第 1 の集団と組み合わせて投与されることを特徴とし、ここで、前記改変ヒト T 細胞の第 1 の集団は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含むキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする外因性核酸分子を含み、前記改変ヒト T 細胞は前記 C A R を発現し ;

30

前記改変ヒト T 細胞の第 2 の集団は抗原をコードし前記抗原を発現する外因性核酸分子を含み、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団からの前記 C A R の前記細胞外結合成分が、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団によりコードされる前記抗原に特異的であり、ここで、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団は、任意選択で C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、C D 4 - C D 8 - 二重陰性 T 細胞、 T 細胞、またはこれらの任意の組合せを含み ;

ここで、任意選択で前記組成物は、単独で、または前記改変ヒト T 細胞の第 1 の集団と組み合わせて反復して投与され、養子細胞免疫療法によって前記疾患を処置するかまたは前記疾患を処置する、組成物。

40

【請求項 10】

請求項 4 または 7 に記載の組合せ物、あるいは、請求項 5、6、8 または 9 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記疾患が、ウイルス性疾患、細菌性疾患、がん、炎症性疾患、免疫疾患、加齢性疾患または過剰増殖性疾患であり、前記過剰増殖性疾患が (a) 好ましくは、急性リンパ芽球性白血病 (A L L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、慢性好酸球性白血病 (C E L)、骨髄異形成症候群 (M D S)、非ホジキンリンパ腫 (N H L) もしくは多発性骨髄腫 (M M) から選択される血液学的悪性疾患、または

50

(b) 好ましくは、胆管がん、膀胱がん、骨および軟部組織癌腫、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、結腸がん、結腸直腸腺癌、結腸直腸がん、類腱腫、胚性がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、胃腺癌、多形膠芽腫、婦人科腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、肝臓がん、肺がん、悪性黒色腫、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、膵管腺癌、原発性星状細胞腫瘍、原発性甲状腺がん、前立腺がん、腎臓がん、腎細胞癌、横紋筋肉腫、皮膚がん、軟部組織肉腫、精巣胚細胞腫瘍、尿路上皮がん、子宮肉腫もしくは子宮がんから選択される固形がんである、組合せ物あるいは組成物。

【請求項 1 1】

請求項 1、4、7 または 10 のいずれか一項に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記細胞外結合成分が、可変領域リンカーを含む s c F v であり、前記可変領域リンカーが好ましくは (G l y x S e r y)_n を含み、式中、x および y は、独立に 1 ~ 5 の整数であり、n は、1 ~ 10 の整数である、組合せ物あるいは組成物。

10

【請求項 1 2】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 11 のいずれか一項に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記細胞内エフェクター成分が、C D 3、ならびに C D 2 7、C D 2 8、C D 1 3 4 および C D 1 3 7 のうちの 1 つもしくは複数の細胞内領域を含むか、ならびに / または前記細胞内エフェクター成分が、L R P、N O T C H 1、N O T C H 2、N O T C H 3、N O T C H 4、R O R 2 もしくは R y k を含む、組合せ物あるいは組成物。

20

【請求項 1 3】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記細胞外結合成分が、 α -フェトプロテイン (A F P)、B 7 H 4、B T L A、C D 3、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 5、C D 2 2、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 4 4 v 6、C D 5 2、C D 5 6、C D 7 9 b、C D 8 0、C D 8 1、C D 8 6、C D 1 3 4 (O X 4 0)、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 1 5 1、C D 2 7 6、C A 1 2 5、C E A、C E A C A M 6、c - M e t、C T - 7、C T L A - 4、E G F R、E G F R v I I I、E r b B 2、E r b B 3、E r b B 4、E p h A 2、F L T 1、F L T 4、F r i z z l e d、O - アセチル - G D 2、G D 2、G H R H R、G H R、G I T R、g p 1 3 0、H V E M、I G F 1 R、I L 6 R、K D R、L 1 C A M、L e w i s A、L e w i s Y、L T R、L I F R、L R P 5、M A G E、メソセリン、M U C 1、N Y - E S O - 1、がん特異的新抗原、O S M R、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、P S M A、P T C H 1、R A N K、R o b o 1、R O R 1、T E R T、T G F B R 2、T G F B R 1、T L R 7、T L R 9、T N F R S F 4、T N F R 1、T N F R 2、チロシナーゼ、T W E A K - R もしくは W T - 1 に特異的であるか、および / または前記細胞内エフェクター成分は、(1) C D 3 および C D 2 7、(2) C D 3 および C D 2 8、(3) C D 3 および C D 1 3 4、(4) C D 3 および C D 1 3 7 の細胞内領域を含む、組合せ物あるいは組成物。

30

【請求項 1 4】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 13 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団が、ナイーブ T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞もしくはそれらの任意の組合せを含む、組合せ物あるいは組成物。

40

【請求項 1 5】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 14 に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 14 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団が、C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞もしくは C D 4 + と C D 8 + T 細胞の両方からなるか、および / または

50

前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団が、CD 4 + T 細胞、CD 8 + T 細胞もしくは CD 4 + と CD 8 + T 細胞の両方からなる、組合せ物あるいは組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記細胞が *ex vivo* で組換えにより改変され、前記 *ex vivo* 改変細胞が好ましくはウイルスベクターを使用して改変され、前記ウイルスベクターがより好ましくは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である、組合せ物あるいは組成物。

【請求項 1 7】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 16 のいずれか一項に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、改変細胞の前記集団が前記被験体に対して同種異系、同系または自己のものである、組合せ物あるいは組成物。

10

【請求項 1 8】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 17 のいずれか一項に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 17 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記改変細胞が静脈内投与される、組合せ物あるいは組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 18 のいずれか一項に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記方法が、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団の複数回用量、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団の複数回用量を前記被験体に投与するステップを含み、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団の前記複数回用量が、好ましくは約 1 週間から約 4 週間までの投与の間の間隔で投与される、組合せ物あるいは組成物。

20

【請求項 2 0】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 19 のいずれか一項に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 19 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団が、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団と同時にまたは逐次的に投与され、

前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団の初回用量が、好ましくは前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団を投与して約 1 日から約 28 日後までに投与されるか、または前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団が、好ましくは前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団を投与してから約 24 時間以内に逐次的に投与されるか、または前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団が、好ましくは前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団を投与してから約 24 時間以内に逐次的に投与されるか、または初回の投与が、好ましくは前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団と前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団との混合物を含む組成物を投与することを含む、組合せ物あるいは組成物。

30

【請求項 2 1】

請求項 20 に記載の組合せ物あるいは組成物であって、ここで、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団が、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団を投与した後約 365 日間まで、1 つまたは複数の間隔で 1 回または複数回用量でさらに投与される、組合せ物あるいは組成物。

40

【請求項 2 2】

請求項 1、4、7、または 10 ~ 21 に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団が、前記被験体に約 10^6 細胞 / m^2 ~ 約 10^{11} 細胞 / m^2 の用量で投与され、前記 (i i) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団が、前記被験体に約 10^6 細胞 / m^2 ~ 約 10^{11} 細胞 / m^2 の用量で投与される、組合せ物あるいは組成物。

【請求項 2 3】

50

請求項 1、4、7、または 10～22 に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8～22 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記方法はサイトカインを投与するステップをさらに含み、前記サイトカインが、好ましくは IL-2、IL-15、IL-21 またはそれらの任意の組合せであり、前記サイトカインがより好ましくは IL-2 であり、より好ましくは前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団と同時にまたは逐次的に投与される、組合せ物あるいは組成物。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の組合せ物あるいは組成物であって、ここで、前記被験体にサイトカインの投与前に前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団が少なくとも 3 もしくは 4 回投与された場合、前記サイトカインが逐次的に投与されるか、および/または前記サイトカインが IL-2 であり、IL-2 を皮下投与する、組合せ物あるいは組成物。

10

【請求項 25】

請求項 1、4、7、または 10～24 に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8～24 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記被験体が免疫抑制療法をさらに受けており、前記免疫抑制療法が、好ましくはカルシニューリン阻害剤、コルチコステロイド、微小管阻害剤、低用量のミコフェノール酸プロドラッグまたはそれらの任意の組合せから選択される、組合せ物あるいは組成物。

【請求項 26】

請求項 1、4、7、または 10～25 に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8～25 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記被験体が非骨髄破壊的または骨髄破壊的造血細胞移植を受けており、前記造血細胞移植が好ましくは自己のものであるか、または前記造血細胞移植が好ましくは同種異系のものである、組合せ物あるいは組成物。

20

【請求項 27】

請求項 26 に記載の組合せ物あるいは組成物であって、ここで、前記非骨髄破壊的造血細胞移植の少なくとも 3 ヶ月後にまたは前記骨髄破壊的造血細胞移植の少なくとも 2 ヶ月後に、前記 (i) 改変ヒト T 細胞の第 1 の集団および/または前記 (ii) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団を前記被験体に投与する、組合せ物あるいは組成物。

【請求項 28】

請求項 1、4、7、または 10～27 に記載の組合せ物、あるいは、請求項 2、3、5、6、または 8～27 のいずれか一項に記載の組成物であって、ここで、前記 (ii) 改変ヒト T 細胞の第 2 の集団の改変が、前記抗原をコードする外因性核酸からなる、組合せ物あるいは組成物。

30

【請求項 29】

養子細胞免疫療法組成物であって、前記養子細胞免疫療法組成物は、
(i) 抗原結合タンパク質をコードする外因性核酸分子を含み、前記抗原結合タンパク質を発現する、改変ヒト T 細胞の第 1 の集団、ならびに、
(ii) 抗原をコードする外因性核酸分子を含み、前記抗原を発現する、改変ヒト T 細胞の第 2 の集団

を含み、

40

前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、

前記結合成分は、抗体可変断片 (Fv)、好ましくは、scFv、受容体エクドメインまたはリガンドであり、

前記疎水性部分は好ましくは CD4 膜貫通ドメイン、CD8 膜貫通ドメイン、CD28 膜貫通ドメインまたは CD27 膜貫通ドメインであり、

前記細胞内エフェクター成分は、CD3、CD3、CD3、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CD134、CD137、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH

50

4、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2もしくはこれらの任意の組合せの細胞内領域を含み、前記細胞外結合成分は、前記(i i) 改変ヒトT細胞の第2の集団によりコードされる前記抗原に特異的であり、

前記(i i) 改変ヒトT細胞の第2の集団は、任意選択でCD4 + T細胞、CD8 + T細胞、CD4 - CD8 - 二重陰性T細胞、T細胞、またはこれらの任意の組合せを含む、養子細胞免疫療法組成物。

【請求項30】

前記細胞外結合成分が、可変領域リンカーを含むscFvであり、前記可変領域リンカーがより好ましくは(GlyxSery)_nを含み、式中、xおよびyは、独立に1～5の整数であり、nは、1～10の整数である、請求項29に記載の組成物。

10

【請求項31】

前記細胞内エフェクター成分が、CD3、ならびにCD27、CD28、CD134およびCD137のうちの1つもしくは複数を含むか、ならびに/または前記細胞内エフェクター成分が、LRP、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2もしくはRykを含む、請求項29または30に記載の組成物。

【請求項32】

前記細胞外結合成分が、-フェトプロテイン(AFP)、B7H4、BTLA、CD3、CD19、CD20、CD25、CD22、CD28、CD30、CD40、CD44v6、CD52、CD56、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD151、CD276、CA125、CEA、CEACAM6、c-Met、CT-7、CTLA-4、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、FLT1、FLT4、Frizzled、O-アセチル-GD2、GD2、GHRHR、GHR、GITR、gp130、HVEM、IGF1R、IL6R、KDR、L1CAM、Lewis A、Lewis Y、LTR、LIFR、LRP5、MAGE、メソセリン、MUC1、NY-ESO-1、がん特異的新抗原、OSMR、PD1、PD-L1、PD-L2、PSMA、PTCH1、RANK、Robo1、ROR1、TERT、TGFB2、TGFB1、TLR7、TLR9、TNFRSF4、TNFR1、TNFR2、チロシナーゼ、TWEAK-RもしくはWT-1に特異的であるか、および/または

20

前記抗原結合タンパク質がキメラ抗原受容体(CAR)であるか、および/または前記(i i) 改変ヒトT細胞の第2の集団が、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞、CD4 - CD8 - 二重陰性T細胞、T細胞もしくはそれらの任意の組合せであるか、および/または

30

前記(i) 第1の集団のT細胞および/もしくは前記(i i) 第2の集団のT細胞が、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞もしくはそれらの任意の組合せを含むか、および/または

前記(i) 改変ヒトT細胞の第1の集団が、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞もしくはCD4 + とCD8 + T細胞の両方からなるか、および/または

前記抗原結合タンパク質がCARであるか、および/または

40

前記(i i) 改変ヒトT細胞の第2の集団が、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞もしくはCD4 + とCD8 + T細胞の両方からなる、

請求項29から31のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項33】

前記改変ヒトT細胞がex vivoで組換えにより改変され、前記ex vivo改変細胞が好ましくはウイルスベクターを使用して改変され、前記ウイルスベクターがより好ましくは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である、請求項29から32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項34】

前記改変ヒトT細胞の第1および/または第2の集団が被験体に対して同種異系、同系ま

50

たは自己のものである、請求項 29 から 33 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 35】

薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤をさらに含む、請求項 29 から 34 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 36】

前記改変ヒト T 細胞の第 2 の集団の改変が、前記抗原をコードする核酸からなる、請求項 34 から 35 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2014 年 10 月 27 日に提出された米国仮出願第 62/069,168 号（この出願は、その全体が参考として本明細書に援用される）に対する利益を主張する。

【0002】

政府の利益についての声明

本発明は、National Institutes of Health によって付与された助成金第 CA114536 号、同第 AI053193 号および同第 P51-OD010425 号の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。本開示は、一般的に免疫療法の有効性を向上または増強させるための組成物および方法に関する。より具体的には、本開示は、がんなどの、標的化された抗原の発現と関連する疾患または障害を処置するために、抗原結合タンパク質（例えば、キメラ抗原受容体）を発現する T 細胞を、養子細胞免疫療法を増強するための改変 T 細胞の抗原結合タンパク質により特異的に結合される抗原を発現するように改変された細胞（例えば、造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せ）と共に使用することに関する。

【背景技術】

【0003】

遺伝子移入による T 細胞への腫瘍標的化受容体の導入は、養子 T 細胞療法のための任意のがん患者からの腫瘍特異的 T 細胞の速やかな生成を可能にする。有望な戦略は、腫瘍細胞表面分子に特異的であり、1 つまたは複数の T 細胞シグナル伝達分子に連結する単鎖抗体または他の結合ドメインからなる合成キメラ抗原受容体 (CAR) により T 細胞を操作することを含む (Turtleら、Curr. Opin. Immunol.、24 巻、633 頁、2012 年; Barrettら、Annu. Rev. Med.、65 巻、101 頁、2014 年; Sadelainら、Cancer Discovery、3 巻、388 頁、2013 年)。B 細胞悪性疾患における CD19 分子に特異的な CAR 改変 T 細胞 (CAR-T 細胞) を使用した最近の試験で、進行疾患を有する患者のサブセットにおける著明な腫瘍退縮が示された (Barrettら、2014 年; Sadelainら、2013 年; Kalosら、Sci. Transl. Med.、3 巻、95ra73 頁、2011 年; Kochenderfer および Rosenberg、Nat. Rev. Clin. Oncol.、10 巻、267 頁、2013 年)。この療法を一般的な上皮がんにも拡大することは、T 細胞により安全に標的化することができる腫瘍細胞上に発現する分子の同定を含めて、いくつかの課題を課すものである。これは、標的分子を発現する正常細胞に対する CAR 療法のオンターゲット/オフ腫瘍効果に起因して認められた重篤でありさらには致死性である毒性によって強調される (Lammersら、Mol. Ther.、21 巻、904 頁、2013 年; Morganら、Mol. Ther.、18 巻、843 頁、2010 年)。さらに、in vivo で生存し機能するその能力を決定づける T 細胞の特性を特定することができることは、依然として研究の重要な分野である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

20

30

40

50

【0004】

【文献】Turtleら、Curr. Opin. Immunol. (2012年) 24巻、633頁

Barrettら、Annu. Rev. Med. (2014年) 65巻、10.1頁

Sadelainら、Cancer Discovery (2013年) 3巻、388頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

明らかに、白血病および腫瘍などの、様々ながんに向けられた養子細胞免疫療法を向上または増強させるための代替組成物および方法が必要である。本明細書で開示される実施形態は、この必要性に対処し、他の関連する利点をもたらすものである。

10

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

養子細胞免疫療法を改善するための方法であって、前記方法は：

(a) 抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を含む改変ヒトT細胞の集団の有効量を被験体に投与するステップであって、前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含む、ステップと、

(b) 抗原をコードする核酸分子を含む改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せの集団の有効量を前記被験体に投与するステップであって、ステップ(a)の前記改変ヒトT細胞からの前記抗原結合タンパク質の前記細胞外結合成分が、このステップ(b)の改変細胞の前記集団によりコードされる前記抗原に特異的である、ステップと

20

を含み、

それにより、前記養子細胞免疫療法の有効性を増強、強化もしくは向上させる、方法。

(項目2)

被験体における疾患を処置するための方法であって、前記方法は：

(a) 抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を含む改変ヒトT細胞の集団の有効量を被験体に投与するステップであって、前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含む、ステップと、

(b) 抗原をコードする核酸分子を含む改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せの集団の有効量を前記被験体に投与するステップであって、ステップ(a)の前記改変ヒトT細胞からの前記抗原結合タンパク質の前記細胞外結合成分が、このステップ(b)の改変細胞の前記集団によりコードされる前記抗原に特異的である、ステップと

30

(c) 任意選択でステップ(a)、ステップ(b)またはステップ(a)と(b)の両方を反復するステップと

を含み、

それにより、養子細胞免疫療法により疾患を処置する、方法。

(項目3)

前記疾患がウイルス性疾患、細菌性疾患、がん、炎症性疾患、免疫疾患または加齢性疾患である、項目2に記載の方法。

40

(項目4)

過剰増殖性疾患を処置するための方法であって、前記方法は：

(a) 抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を含む改変ヒトT細胞の集団の有効量を被験体に投与するステップであって、前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含む、ステップと、

(b) 抗原をコードする核酸分子を含む改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せの集団の有効量を前記被験体に投与するステップであって、ステップ(a)の前記改変ヒトT細胞からの前記抗原結合タンパク質の前記細胞外結合成分が、このステップ(b)の改変細胞の前記集団によりコードされる前記抗原に特異的である、ス

50

テップと

(c)任意選択でステップ(a)、ステップ(b)またはステップ(a)と(b)の両方を反復するステップと

を含み、

それにより、前記過剰増殖性疾患を処置する、方法。

(項目5)

前記過剰増殖性疾患が血液学的悪性疾患または固形がんである、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記血液学的悪性疾患が、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性好酸球性白血病(CEL)、骨髄異形成症候群(MDS)、非ホジキンリンパ腫(NHL)または多発性骨髄腫(MM)から選択される、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記固形がんが、胆管がん、膀胱がん、骨および軟部組織癌腫、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、結腸がん、結腸直腸腺癌、結腸直腸がん、類腱腫、胚性がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、胃腺癌、多形膠芽腫、婦人科腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、肝臓がん、肺がん、悪性黒色腫、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、膵管腺癌、原発性星状細胞腫瘍、原発性甲状腺がん、前立腺がん、腎臓がん、腎細胞癌、横紋筋肉腫、皮膚がん、軟部組織肉腫、精巣胚細胞腫瘍、尿路上皮がん、子宮肉腫または子宮がんから選択される、項目5に記載の方法。

(項目8)

前記結合成分が、抗体可変断片(Fv)、TCR可変ドメイン、受容体エクストドメインまたはリガンドである、項目1から7のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記結合成分が、可変領域リンカーを含むscFvまたはscTCRである、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記可変領域リンカーが(Gly_xSer_y)_nを含み、式中、xおよびyは、独立に1~5の整数であり、nは、1~10の整数である、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記疎水性部分が膜貫通ドメインである、項目1から10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記膜貫通ドメインがCD4、CD8、CD28またはCD27膜貫通ドメインである、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記細胞内エフェクター成分が、CD3、CD3、CD3、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CD134、CD137、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2またはそれらの任意の組合せの細胞内領域を含む、項目1から12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

前記細胞内エフェクター成分が、CD3ならびにCD27、CD28、CD134およびCD137のうちの1つまたは複数を含む、項目1から13のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記細胞内エフェクター成分が、LRP、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2またはRykを含む、項目1から13のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目16)

前記結合成分が、α - フェトプロテイン (AFP)、B7H4、BTLA、CD3、CD19、CD20、CD25、CD22、CD28、CD30、CD40、CD44v6、CD52、CD56、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD151、CD276、CA125、CEA、CEACAM6、c-Met、CT-7、CTLA-4、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、FLT1、FLT4、Frizzled、O-アセチル-GD2、GD2、GHRHR、GHR、GITR、gp130、HVEEM、IGF1R、IL6R、KDR、L1CAM、Lewis A、Lewis Y、LTR、LIFR、LRP5、MAGE、メソセリン、MUC1、NY-ESO-1、がん特異的新抗原、OSMR、PD1、PD-L1、PD-L2、PSMA、PTCH1、RANK、Robo1、ROR1、TERT、TGFR2、TGFR1、TLR7、TLR9、TNFRSF4、TNFR1、TNFR2、チロシナーゼ、TWEAK-RまたはWT-1に特異的である、項目1から15のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目17)

前記抗原結合タンパク質がT細胞受容体 (TCR) またはキメラ抗原受容体である、項目1から16のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

前記免疫系細胞が、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞、CD4 - CD8 - 二重陰性T細胞、 $\alpha\beta$ T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞またはそれらの任意の組合せである、項目1から17のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目19)

前記改変T細胞がナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞またはそれらの任意の組合せである、項目1から18のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

改変T細胞の第1の集団が、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞またはCD4 + とCD8 + T細胞の両方から本質的になる、項目1から19のいずれか一項に記載の方法。

(項目21)

改変細胞の第2の集団が改変ヒト造血前駆細胞を含む、項目1から20のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目22)

改変細胞の第2の集団が改変ヒト免疫系細胞を含む、項目1から20のいずれか一項に記載の方法。

(項目23)

前記改変免疫系細胞が、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞またはCD4 + とCD8 + T細胞の両方から本質的になる、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記細胞が *ex vivo* で組換えにより改変される、項目1から23のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記 *ex vivo* 改変細胞がウイルスベクターを使用して改変される、項目24に記載の方法。

40

(項目26)

前記ウイルスベクターがレンチウイルスベクターまたは γ - レトロウイルスベクターである、項目25に記載の方法。

(項目27)

改変細胞の前記集団が同種異系、同系または自己のものである、項目1から26のいずれか一項に記載の方法。

(項目28)

前記改変ヒトT細胞からの前記抗原結合タンパク質の前記細胞外結合成分が、前記抗原

50

を過剰発現する細胞に対して向けられている、項目 1 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 29)

前記改変細胞が静脈内投与される、項目 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 30)

ステップ (a) の前記改変 T 細胞の複数回用量、ステップ (b) の改変細胞の複数回用量、またはそれらの組合せを前記被験体に投与するステップを含む、項目 1 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 31)

ステップ (a) の改変 T 細胞の前記複数回用量が、約 1 週間から約 4 週間までの投与の間隔で投与される、項目 30 に記載の方法。

10

(項目 32)

ステップ (a) の前記改変 T 細胞が、ステップ (b) の前記改変細胞と同時にまたは逐次的に投与される、項目 1 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 33)

ステップ (b) の改変細胞の初回用量が、ステップ (a) の前記改変 T 細胞を投与して約 1 日から約 28 日後までに投与される、項目 32 に記載の方法。

(項目 34)

ステップ (b) の前記改変細胞が、ステップ (a) の前記改変 T 細胞を投与してから約 24 時間以内に逐次的に投与されるか、またはステップ (a) の前記改変 T 細胞が、ステップ (b) の前記改変細胞を投与してから約 24 時間以内に逐次的に投与される、項目 32 に記載の方法。

20

(項目 35)

初回の投与がステップ (a) の前記改変 T 細胞とステップ (b) の前記改変細胞との混合物を含む組成物を投与することを含む、項目 32 に記載の方法。

(項目 36)

ステップ (b) の前記改変細胞が、ステップ (a) の前記改変 T 細胞を投与した後約 36.5 日間まで、1 つまたは複数の間隔で 1 回または複数回用量でさらに投与される、項目 32 から 35 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 37)

ステップ (b) の前記改変細胞が改変造血前駆細胞である、項目 32 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 38)

ステップ (b) の前記改変細胞が改変 T 細胞である、項目 32 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 39)

ステップ (a) の前記改変 T 細胞が、前記被験体に約 1.0×10^6 細胞 / m^2 ~ 約 1.0×10^{11} 細胞 / m^2 の用量で投与され、ステップ (b) の前記改変 T 細胞が、前記被験体に約 1.0×10^6 細胞 / m^2 ~ 約 1.0×10^{11} 細胞 / m^2 の用量で投与される、項目 1 から 38 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 40)

サイトカインを投与するステップをさらに含む、項目 1 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 41)

前記サイトカインが、IL - 2、IL - 15、IL - 21 またはそれらの任意の組合せである、項目 40 に記載の方法。

(項目 42)

前記サイトカインが IL - 2 であり、ステップ (a) の前記改変 T 細胞と同時にまたは逐次的に投与される、項目 41 に記載の方法。

(項目 43)

50

前記被験体にサイトカインの投与前にステップ (a) の前記改変 T 細胞が少なくとも 3 または 4 回投与された場合、前記サイトカインが逐次的に投与される、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記サイトカインが I L - 2 であり、I L - 2 を皮下投与する、項目 4 0 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記被験体が免疫抑制療法をさらに受けている、項目 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記免疫抑制療法が、カルシニューリン阻害剤、コルチコステロイド、微小管阻害剤、低用量のミコフェノール酸プロドラッグまたはそれらの任意の組合せから選択される、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記被験体が非骨髄破壊的または骨髄破壊的造血細胞移植を受けた、項目 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記造血細胞移植が自己のものである、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記造血細胞移植が同種異系のものである、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記非骨髄破壊的造血細胞移植の少なくとも 3 ヶ月後にまたは前記骨髄破壊的造血細胞移植の少なくとも 2 ヶ月後に、ステップ (a) の前記改変 T 細胞および / またはステップ (b) の前記改変細胞を前記被験体に投与する、項目 4 7 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 1)

改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せの集団を含む養子細胞免疫療法組成物であって、改変細胞の第 1 の集団は、抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を含む T 細胞であり、改変細胞の第 2 の集団は、抗原をコードする核酸分子を含み、

前記抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、

前記細胞外結合成分は、改変細胞の前記第 2 の集団によりコードされる前記抗原に特異的である、養子細胞免疫療法組成物。

(項目 5 2)

前記結合成分が、抗体可変断片 (F v)、T C R 可変ドメイン、受容体エクドドメインまたはリガンドである、項目 5 1 に記載の組成物。

(項目 5 3)

前記結合成分が、可変領域リンカーを含む s c F v または s c T C R である、項目 5 2 に記載の組成物。

(項目 5 4)

前記可変領域リンカーが (G l y _x S e r _y) _n を含み、式中、x および y は、独立に 1 ~ 5 の整数であり、n は、1 ~ 1 0 の整数である、項目 5 3 に記載の組成物。

(項目 5 5)

前記疎水性部分が膜貫通ドメインである、項目 5 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 6)

前記膜貫通ドメインが、C D 4、C D 8、C D 2 8 または C D 2 7 膜貫通ドメインである、項目 5 5 に記載の組成物。

(項目 5 7)

10

20

30

40

50

前記細胞内エフェクター成分が、CD3、CD3、CD3、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CD134、CD137、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT、TCR、TCR、TRIM、Zap70、PTCH2またはそれらの任意の組合せの細胞内領域を含む、項目51から56のいずれか一項に記載の組成物。

(項目58)

前記細胞内エフェクター成分が、CD3ならびにCD27、CD28、CD134およびCD137のうちの1つまたは複数を含む、項目51から57のいずれか一項に記載の組成物。

10

(項目59)

前記細胞内エフェクター成分が、LRP、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2またはRykを含む、項目51から57のいずれか一項に記載の組成物。

(項目60)

前記結合成分が、-フェトプロテイン(AFP)、B7H4、BTLA、CD3、CD19、CD20、CD25、CD22、CD28、CD30、CD40、CD44v6、CD52、CD56、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD151、CD276、CA125、CEA、CEACAM6、c-Met、CT-7、CTLA-4、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、FLT1、FLT4、Frizzled、O-アセチル-GD2、GD2、GHRHR、GHR、GITR、gp130、HVEM、IGF1R、IL6R、KDR、L1CAM、Lewis A、Lewis Y、LTR、LIFR、LRP5、MAGE、メソセリン、MUC1、NY-ESO-1、がん特異的新抗原、OSMR、PD1、PD-L1、PD-L2、PSMA、PTCH1、RANK、Robo1、ROR1、TERT、TGFB2、TGFB1、TLR7、TLR9、TNFRSF4、TNFR1、TNFR2、チロシナーゼ、TWEAK-RまたはWT-1に特異的である、項目51から59のいずれか一項に記載の組成物。

20

(項目61)

前記抗原結合タンパク質がT細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体である、項目51から60のいずれか一項に記載の組成物。

30

(項目62)

前記免疫系細胞が、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4-CD8-二重陰性T細胞、T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞またはそれらの任意の組合せである、項目51から61のいずれか一項に記載の組成物。

(項目63)

前記T細胞が、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞またはそれらの任意の組合せである、項目51から62のいずれか一項に記載の組成物。

40

(項目64)

改変T細胞の前記第1の集団が、CD4+T細胞、CD8+T細胞またはCD4+とCD8+T細胞の両方から本質的になる、項目51から63のいずれか一項に記載の組成物。

(項目65)

改変細胞の前記第2の集団が改変ヒト造血前駆細胞を含む、項目51から64のいずれか一項に記載の組成物。

(項目66)

改変細胞の前記第2の集団が改変ヒト免疫系細胞を含む、項目51から64のいずれか一項に記載の組成物。

(項目67)

50

前記改変ヒト免疫系細胞が、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞またはCD4 + とCD8 + T細胞の両方から本質的になる、項目66に記載の組成物。

(項目68)

前記細胞がex vivoで組換えにより改変される、項目51から67のいずれか一項に記載の組成物。

(項目69)

前記ex vivo改変細胞がウイルスベクターを使用して改変される、項目68に記載の組成物。

(項目70)

前記ウイルスベクターが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である、項目69に記載の組成物。

10

(項目71)

改変細胞の前記集団が同種異系、同系または自己のものである、項目51から70のいずれか一項に記載の組成物。

(項目72)

薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤をさらに含む、項目51から71のいずれか一項に記載の養子細胞免疫療法組成物。

(項目73)

項目51から72のいずれか一項に記載の組成物を含む単位用量形態。

(項目74)

20

項目1から50のいずれか一項に記載される、ステップ(a)の改変T細胞を含む単位用量形態およびステップ(b)の改変細胞を含む単位用量形態。

(項目75)

ステップ(b)の前記改変細胞が改変ヒト造血前駆細胞または改変ヒトT細胞である、項目66に記載の単位用量形態。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1A】図1Aは、Rhesus macaque ROR1の機能および特徴付けを示す図であり、ヒトまたはマカク4-1BBおよびCD3ドメインを有するR12-ROR1 CARを発現するように改変されたrhesus macaque T細胞の機能を示す図である。

30

【図1B】図1Bは、Rhesus macaque ROR1の機能および特徴付けを示す図であり、tCD19マーカを使用するROR1 CAR改変CD4 + およびCD8 + T細胞の純度および表現型のフローサイトメトリー解析を示す図である。データは、形質導入されていないT細胞(モック)、tCD19上の選択前および後ならびにCD4(上パネル)またはCD8(下パネル)上の選択後の形質導入T細胞の表現型を示す。すべての試料はCD3 + 細胞でゲーティングされる。3匹の動物における独立した実験を代表するマカクA13002からのデータを示す。

【図1C】図1Cは、Rhesus macaque ROR1の機能および特徴付けを示す図であり、4時間細胞毒性アッセイにおける⁵¹Cr標識K562/ROR1またはK562細胞に対するCD4 + およびCD8 + ROR1 CAR-T細胞の細胞溶解活性を示すグラフである。3匹の動物における独立した実験を代表するマカクA13002からのデータを示す。

40

【図1D】図1Dは、Rhesus macaque ROR1の機能および特徴付けを示す図であり、方法で述べる通りに、 5×10^4 個のROR1 CAR-T細胞とK562/ROR1細胞またはPMA/イオノマイシン、または培地のみとの3連共培養から24時間後に得られた上清のルミネックスサイトカインアッセイを示すグラフである。培地対照試料中のサイトカインレベルは、検出レベルを下回っていた。3匹の動物における独立した実験を代表するマカクA13002からのデータを示す。

【0007】

50

【図2-1】図2A~2Eは、ROR1 CAR-T細胞の毒性および*in vivo*での持続性のモニタリングを示す。(A) T細胞注入の前および後の表示した日における体重および血清化学。灰色の網掛け部分は、各パラメーターの*rhesus macaque*特異的な正常範囲を示す。(B) アカゲザル特異的マルチプレックスサイトカインアッセイを使用して注入前および後に血漿サイトカインレベルを測定した。(C) PBM Cは、ROR1 CAR- および対照EGFRt+ T細胞の注入の前および後の表示した日に得られた。CD3+CD4+サブセットおよびCD3+CD8+サブセット内の移入T細胞の頻度(%)をCD3、CD4、CD8およびCD19にまたはEGFRtに特異的なmAbによる染色の後にフローサイトメトリーにより測定した。(D) 認定臨床研究室における表示した日におけるフローサイトメトリーにより測定したおよびCBCの結果に基づいて計算した末梢血液中のR12-ROR1 CAR+およびEGFRt+ T細胞の絶対数。(E) DNAは、表示した日に得られ、導入遺伝子ベクター特異的配列の存在についてリアルタイムqPCR(TaqMan)により検討したPBM Cの試料から単離した。

10

【図2-2】図2A~2Eは、ROR1 CAR-T細胞の毒性および*in vivo*での持続性のモニタリングを示す。(A) T細胞注入の前および後の表示した日における体重および血清化学。灰色の網掛け部分は、各パラメーターの*rhesus macaque*特異的な正常範囲を示す。(B) アカゲザル特異的マルチプレックスサイトカインアッセイを使用して注入前および後に血漿サイトカインレベルを測定した。(C) PBM Cは、ROR1 CAR- および対照EGFRt+ T細胞の注入の前および後の表示した日に得られた。CD3+CD4+サブセットおよびCD3+CD8+サブセット内の移入T細胞の頻度(%)をCD3、CD4、CD8およびCD19にまたはEGFRtに特異的なmAbによる染色の後にフローサイトメトリーにより測定した。(D) 認定臨床研究室における表示した日におけるフローサイトメトリーにより測定したおよびCBCの結果に基づいて計算した末梢血液中のR12-ROR1 CAR+およびEGFRt+ T細胞の絶対数。(E) DNAは、表示した日に得られ、導入遺伝子ベクター特異的配列の存在についてリアルタイムqPCR(TaqMan)により検討したPBM Cの試料から単離した。

20

【0008】

【図3-1】図3A~3Dは、R12-ROR1 CAR-T細胞の*in vivo*移動および機能を示す。(A) T細胞の注入の前および後の5日目に得られたBMおよびLN試料を、CD3、CD4、CD8およびCD19にまたはEGFRtに特異的なmAbで染色し、CD3+CD4+またはCD3+CD8+ T細胞についてゲーティングした後にフローサイトメトリーにより検討した。(B) BM中のROR1+B細胞前駆体の検出。BMの試料は、注入の前および後の5日目に取得し、ROR1発現CD19+CD45*intermediate* B細胞サブセットの存在についてフローサイトメトリーにより検討した。(C) CD19、CD3、CD4およびCD8に特異的なmAbにより染色し、CD19+CD3-B細胞を検出するためのフローサイトメトリーにより測定したT細胞の注入の前後に得られた末梢血液試料中のCD19+B細胞の絶対数。絶対数は、認定臨床研究室において同時に得られ、測定されたCBCにおけるリンパ球数に基づいて決定した。(D) CD107A脱顆粒アッセイ。方法で述べる通りに、PBM Cを、注入の前および後の7日目に取得し、K562/ROR1細胞、培地またはPMAおよびイオノマイシンで*ex vivo*で刺激し、CD107Aの発現についてフローサイトメトリーにより検討した。培養ROR1 CAR-T細胞を陽性対照とした。

30

40

【図3-2】図3A~3Dは、R12-ROR1 CAR-T細胞の*in vivo*移動および機能を示す。(A) T細胞の注入の前および後の5日目に得られたBMおよびLN試料を、CD3、CD4、CD8およびCD19にまたはEGFRtに特異的なmAbで染色し、CD3+CD4+またはCD3+CD8+ T細胞についてゲーティングした後にフローサイトメトリーにより検討した。(B) BM中のROR1+B細胞前駆体の検出。BMの試料は、注入の前および後の5日目に取得し、ROR1発現CD19+CD45*intermediate* B細胞サブセットの存在についてフローサイトメトリーにより検討した。(C) CD19、CD3、CD4およびCD8に特異的なmAbにより染色し、C

50

D 1 9 + C D 3 - B 細胞を検出するためのフローサイトメトリーにより測定したT細胞の注入の前後に得られた末梢血液試料中のC D 1 9 + B 細胞の絶対数。絶対数は、認定臨床研究室において同時に得られ、測定されたC B Cにおけるリンパ球数に基づいて決定した。(D) C D 1 0 7 A 脱顆粒アッセイ。方法で述べる通りに、P B M C を、注入の前および後の7日目に取得し、K 5 6 2 / R O R 1 細胞、培地またはP M A およびイオノマイシンでe x v i v o で刺激し、C D 1 0 7 A の発現についてフローサイトメトリーにより検討した。培養R O R 1 C A R - T 細胞を陽性対照とした。

【0009】

【図4-1】図4A~4Eは、高細胞用量で与えたR O R 1 C A R - T 細胞の持続性、移動および安全性を示す。(A) T細胞注入の図式的概観。自己R O R 1 C A R - T 細胞を $5 \times 10^8 / \text{kg}$ の総用量で養子移入した。対照t C D 3 4 + 遺伝子マークT細胞を等価用量で投与した。B M およびL N の試料は、T細胞の注入の前および後の3日目に得た。(B) T細胞の注入の前および1日目のマカクA 1 3 0 1 1 およびA 1 3 0 0 2 から得られたP B M C のフローサイトメトリー解析。(C) C D 3 + C D 4 + サブセットおよびC D 3 + C D 8 + サブセット内の移入T細胞の頻度(%)をC D 3、C D 4、C D 8 およびC D 1 9 にまたはt C D 3 4 に特異的なm A b による染色の後に測定した。C、P B M C、B M およびL N 試料をT細胞注入後3日目に両マカクから取得し、C D 3、C D 4、C D 8 およびC D 1 9 またはt C D 3 4 に特異的なm A b で染色し、C D 3 + C D 4 + またはC D 3 + C D 8 + 細胞についてゲーティングした後にフローサイトメトリーにより検討した。各サブセットにおけるR O R 1 C A R および対照t C D 3 4 マークT細胞の頻度を各動物について棒グラフで示す。(D) R O R 1 C A R - T 細胞の前および後のB M 中のR O R 1 + B 細胞前駆体の頻度。R O R 1 C A R - T 細胞の移入の前および後の3日目に得たB M の試料をR O R 1 発現C D 1 9 + C D 4 5 i n t e r m e d i a t e B 細胞の存在についてフローサイトメトリーにより検討した。C D 1 9 + 細胞についてゲーティングしたマカクA 1 3 0 1 1 の代表的染色を示す。(E) L N 中のR O R 1 + B 細胞の頻度。L N の試料をT細胞の注入の前および3日後に取得し、C D 1 9、C D 4 5 およびR O R 1 またはアイソタイプに特異的なm A b で染色し、C D 1 9 + サブセット内のR O R 1 + C D 4 5 + 細胞の存在についてフローサイトメトリーにより検討した。マカクA 1 3 0 1 1 からのデータを示す。

【図4-2】図4A~4Eは、高細胞用量で与えたR O R 1 C A R - T 細胞の持続性、移動および安全性を示す。(A) T細胞注入の図式的概観。自己R O R 1 C A R - T 細胞を $5 \times 10^8 / \text{kg}$ の総用量で養子移入した。対照t C D 3 4 + 遺伝子マークT細胞を等価用量で投与した。B M およびL N の試料は、T細胞の注入の前および後の3日目に得た。(B) T細胞の注入の前および1日目のマカクA 1 3 0 1 1 およびA 1 3 0 0 2 から得られたP B M C のフローサイトメトリー解析。(C) C D 3 + C D 4 + サブセットおよびC D 3 + C D 8 + サブセット内の移入T細胞の頻度(%)をC D 3、C D 4、C D 8 およびC D 1 9 にまたはt C D 3 4 に特異的なm A b による染色の後に測定した。C、P B M C、B M およびL N 試料をT細胞注入後3日目に両マカクから取得し、C D 3、C D 4、C D 8 およびC D 1 9 またはt C D 3 4 に特異的なm A b で染色し、C D 3 + C D 4 + またはC D 3 + C D 8 + 細胞についてゲーティングした後にフローサイトメトリーにより検討した。各サブセットにおけるR O R 1 C A R および対照t C D 3 4 マークT細胞の頻度を各動物について棒グラフで示す。(D) R O R 1 C A R - T 細胞の前および後のB M 中のR O R 1 + B 細胞前駆体の頻度。R O R 1 C A R - T 細胞の移入の前および後の3日目に得たB M の試料をR O R 1 発現C D 1 9 + C D 4 5 i n t e r m e d i a t e B 細胞の存在についてフローサイトメトリーにより検討した。C D 1 9 + 細胞についてゲーティングしたマカクA 1 3 0 1 1 の代表的染色を示す。(E) L N 中のR O R 1 + B 細胞の頻度。L N の試料をT細胞の注入の前および3日後に取得し、C D 1 9、C D 4 5 およびR O R 1 またはアイソタイプに特異的なm A b で染色し、C D 1 9 + サブセット内のR O R 1 + C D 4 5 + 細胞の存在についてフローサイトメトリーにより検討した。マカクA 1 3 0 1 1 からのデータを示す。

10

20

30

40

50

【0010】

【図5-1】図5A~5Dは、*in vivo*での移入ROR1 CAR-T細胞に対するROR1+T細胞(T-APC)チャレンジの効果を示す。(A)PBMCの試料を表示した日にA13011およびA13002から取得し、CD3、CD4、CD8およびCD19にまたはCD34に特異的なmAbで染色した後にフローサイトメトリーにより検討した。CBCは、認定臨床研究室において測定された。CD3+CD4+およびCD3+CD8+サブセットにおける末梢血液中のROR1 CAR+およびtCD34+T細胞の絶対数を示す。(B)T-APCチャレンジ後の血液中のROR1 CAR-T細胞の絶対数の変化倍率。血液1 μ L当たりのCD3+CD8+T細胞およびCD19+CD8+T細胞の数は、T-APC投与の前およびその後の指定された日にフローサイトメトリーによって測定された。データは、T-APC投与後の内因性非マークCD4+およびCD8+T細胞、R12 ROR1 CAR CD4+およびCD8+T細胞ならびにtCD34マークCD4+およびCD8+T細胞の絶対数のベースラインと比べた増加倍率を示す。(C)持続性ROR1 CAR-T細胞を有する動物(A13011)から1、5および7日目に得られたPBMC試料中のT-APC注入の前および後のtROR1+T細胞の存在。PBMCを抗CD3および抗ROR1 mAbで染色した。(D)ROR1 CAR-T細胞を有さない動物(A12022)から1、5および7日目に得られたPBMC試料中のT-APC注入の前および後のtROR1+T細胞の存在。

10

【図5-2】図5A~5Dは、*in vivo*での移入ROR1 CAR-T細胞に対するROR1+T細胞(T-APC)チャレンジの効果を示す。(A)PBMCの試料を表示した日にA13011およびA13002から取得し、CD3、CD4、CD8およびCD19にまたはCD34に特異的なmAbで染色した後にフローサイトメトリーにより検討した。CBCは、認定臨床研究室において測定された。CD3+CD4+およびCD3+CD8+サブセットにおける末梢血液中のROR1 CAR+およびtCD34+T細胞の絶対数を示す。(B)T-APCチャレンジ後の血液中のROR1 CAR-T細胞の絶対数の変化倍率。血液1 μ L当たりのCD3+CD8+T細胞およびCD19+CD8+T細胞の数は、T-APC投与の前およびその後の指定された日にフローサイトメトリーによって測定された。データは、T-APC投与後の内因性非マークCD4+およびCD8+T細胞、R12 ROR1 CAR CD4+およびCD8+T細胞ならびにtCD34マークCD4+およびCD8+T細胞の絶対数のベースラインと比べた増加倍率を示す。(C)持続性ROR1 CAR-T細胞を有する動物(A13011)から1、5および7日目に得られたPBMC試料中のT-APC注入の前および後のtROR1+T細胞の存在。PBMCを抗CD3および抗ROR1 mAbで染色した。(D)ROR1 CAR-T細胞を有さない動物(A12022)から1、5および7日目に得られたPBMC試料中のT-APC注入の前および後のtROR1+T細胞の存在。

20

30

【発明を実施するための形態】

【0011】

一態様では、本開示は、抗原結合タンパク質(例えば、キメラ抗原受容体、CAR)をコードする核酸分子を含む改変ヒトT細胞の集団を含む有効量の組成物をヒト被験体に投与することにより、養子細胞免疫療法の有効性を増強、強化もしくは向上させるまたは過剰増殖性障害を処置するための組成物および方法であって、抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せの集団は、抗原結合タンパク質の細胞外結合成分によって特異的に認識される抗原をコードする核酸分子を含む、組成物および方法を提供する。

40

【0012】

本開示をより詳細に説明する前に、本明細書で使用される特定の用語の定義を示すことは、それを理解するのに有用であり得る。付加的な定義は、本開示を通して説明する。

【0013】

本説明では、任意の濃度範囲、百分率範囲、比率範囲または整数範囲は、特に示さない限

50

り、列挙範囲内の任意の整数および、適切な場合、その分数（整数の十分の一および百分の一など）の値を含むと理解すべきである。また、ポリマーのサブユニット、サイズまたは厚さなどの、任意の物理的特徴に関連して本明細書で列挙する任意の数の範囲は、特に示さない限り、列挙範囲内の任意の整数を含むと理解すべきである。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特に示さない限り、表示された範囲、値または構造の±20%を意味する。「1つの(a)」および「1つの(an)」という用語は、本明細書で使用される場合、「1つまたは複数」の列挙された構成要素を意味することが理解されるものとする。選択肢（例えば、「または」）の使用は、選択肢のいずれか1つ、両方またはその任意の組合せを意味すると理解すべきである。本明細書で使用される場合、「包含する」、「有する」および「含む」という用語は、同義で使用され、それらの用語およびその変形形態は、非限定的と解釈するものとする。

10

【0014】

さらに、本明細書に記載する構造および置換基の様々な組合せに由来する、個々の化合物または化合物の群は、あたかも各化合物または化合物の群が個別に示されたかのような場合と同じ程度に本出願により開示されていると理解されるものとする。したがって、特定の構造または特定の置換基の選択は、本開示の範囲内にある。

【0015】

「から本質的になる」という用語は、指定された材料もしくはステップに、または特許請求の範囲に記載されている発明の基本的特性に実質的に影響を及ぼさない材料もしくはステップに特許請求の範囲を限定する。例えば、タンパク質ドメイン、領域、またはモジュール（例えば、結合ドメイン、ヒンジ領域、リンカーモジュール）もしくはタンパク質（1つまたは複数のドメイン、領域、またはモジュールを有し得る）は、ドメイン、領域、モジュールまたはタンパク質のアミノ酸配列が、一緒に、ドメイン、領域、モジュールまたはタンパク質の長さの多くて20%（例えば、多くて15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%または1%）に寄与し、ドメイン（複数可）、領域（複数可）、モジュール（複数可）またはタンパク質の活性（例えば、結合タンパク質の標的結合親和性）に実質的に影響を及ぼさない（すなわち、活性を40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%または1%以下など、50%超低下させない）伸長、欠失、変異またはそれらの組合せ（例えば、アミノもしくはカルボキシ末端またはドメイン間におけるアミノ酸）を含む場合、特定のアミノ酸配列「から本質的になる」。

20

30

【0016】

本明細書で使用される場合、「造血前駆細胞」は、造血幹細胞または胎児組織に由来し得る細胞であり、成熟細胞型（例えば、免疫系細胞）にさらに分化することができる。例示的な造血前駆細胞は、CD24^{Lo}Lin⁻CD117⁺表現型を有するものまたは胸腺に見いだされるもの（前駆胸腺細胞と呼ばれる）を含む。

【0017】

「造血幹細胞」は、*in vivo*で自己再生、*in vitro*で本質的に無制限の増殖の能力があり、T細胞系統の細胞を含む他の細胞型に分化することができる未分化の造血細胞を指す。造血幹細胞は、例えば、胎児肝臓、骨髄および臍帯血から単離することができる。

40

【0018】

「胚性幹細胞」または「ES細胞」または「ESC」は、発生中の胚の生殖系列に統合し、その一部になる能力を有する未分化胚性幹細胞を指す。胚性幹細胞は、造血前駆細胞および任意の組織または臓器に分化することができる。本明細書で使用するのに適する胚性幹細胞は、J1 ES細胞株、129J ES細胞株、マウス幹細胞株D3 (American Type Culture Collection)、129/Svマウスに由来するR1またはE14K細胞株、Balb/cおよびC57B1/6マウスに由来する細胞株、ならびにヒト胚性幹細胞（例えば、WiCell Research Institute、WI；またはES cell International、Melbourne、Australiaからの）に由来する細胞を含む。

50

【 0 0 1 9 】

本明細書で使用される場合、「免疫系細胞」は、2つの主要な系統である骨髄系前駆細胞（単球、マクロファージ、樹状細胞、巨核球および顆粒球などの骨髄系細胞を生じる）およびリンパ系前駆細胞（T細胞、B細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞などのリンパ系細胞を生じる）を生じる、骨髄における造血幹細胞に由来する免疫系の任意の細胞を意味する。例示的な免疫系細胞は、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4-CD8-二重陰性T細胞、T細胞、調節T細胞、ナチュラルキラー細胞および樹状細胞を含む。マクロファージおよび樹状細胞は、APCの表面上の主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）受容体がT細胞の表面上のTCRと相互作用するときにT細胞を活性化し得る特殊化した細胞である、「抗原提示細胞」または「APC」と呼ぶことができる。あるいは、任意の造血幹細胞または免疫系細胞は、TCRによりまたは別の抗原結合タンパク質（例えば、CAR）により認識される抗原を発現する核酸分子を導入することによってAPCに転換することができる。

10

【 0 0 2 0 】

本明細書で使用される場合、「宿主」という用語は、目的のポリペプチド（例えば、がん抗原特異的CAR）を産生するために異種または外因性核酸分子による遺伝子改変のために標的とされる細胞（例えば、T細胞、造血前駆細胞）または微生物を指す。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、異種または外因性タンパク質の生合成に関連性のあるまたは非関連性の所望の特性（例えば、検出可能マーカーの包含；欠失、改変または切断型CD34；共刺激因子発現の増大）を付与する他の遺伝子改変を任意選択で既に有しまたは含むように改変され得る。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、疾患に関連し、抗原結合タンパク質（例えば、CAR）により特異的に結合される抗原をコードする異種または外因性核酸分子により形質導入されたヒト造血前駆細胞である。

20

【 0 0 2 1 】

「T細胞」は、胸腺において成熟し、T細胞受容体（TCR）を生成する免疫系細胞である。T細胞は、ナイーブ（抗原に曝露されていない；TCMと比較してCD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127およびCD45RAの発現の増大、ならびにCD45ROの発現の低下）、メモリーT細胞（TM）（抗原経験済みおよび長寿命）およびエフェクター細胞（抗原経験済み、細胞傷害性）であり得る。TMは、セントラルメモリーT細胞（TCM、ナイーブT細胞と比較してCD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45ROおよびCD95の発現の増大、ならびにCD54RAの発現の低下）およびエフェクターメモリーT細胞（TEM、ナイーブT細胞またはTCMと比較してCD62L、CCR7、CD28、およびCD45RAの発現の低下、ならびにCD127の発現の増大）のサブセットにさらに分けることができる。エフェクターT細胞（TE）は、TCMと比較してCD62L、CCR7、CD28の発現の低下を有し、グランザイムおよびパーフォリンについて陽性である抗原経験済みCD8+細胞傷害性Tリンパ球を指す。

30

【 0 0 2 2 】

「結合成分」（「結合領域」または「結合部分」とも呼ばれる）は、本明細書で使用される場合、標的分子（例えば、CD19、CD20、EGFRvIII、GD2、MUC16、ROR1、メソセリン、PD-L1、PD-L2、PSMA、がん関連新抗原）と特異的かつ非共有結合により会合、合体または化合（combine）する能力を保有するペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を指す。結合ドメインは、目的の生体分子、分子複合体（すなわち、2つまたはそれ超の生体分子を含む複合体）または他の標的の、任意の天然に存在する、合成、半合成または組換えにより生成した結合パートナーを含む。例示的な結合ドメインは、目的の生体分子、分子複合体もしくは他の標的に結合する特異的能力について選択される、単鎖免疫グロブリン可変領域（例えば、scTCR、scFv）、受容体エクストドメイン、リガンド（例えば、サイトカイン、ケモカイン）または合成ポリペプチドを含む。

40

【 0 0 2 3 】

50

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」または「に特異的」は、試料中の任意の他の分子または成分と有意に会合も合体もしないが、 $10^5 M^{-1}$ に等しいまたはより大きい親和性または K_a （すなわち、 $1/M$ の単位を有する特定の結合相互作用の平衡会合定数）（この会合反応のオン速度（*on-rate*） $[k_{on}]$ とオフ速度（*off-rate*） $[k_{off}]$ との比に等しい）による標的分子への結合タンパク質（例えば、CARもしくはTCR）または結合成分（またはその融合タンパク質）の会合または合体を指す。結合タンパク質または結合ドメイン（またはその融合タンパク質）は、「高親和性」結合タンパク質または結合ドメイン（もしくはその融合タンパク質）または「低親和性」結合タンパク質または結合ドメイン（もしくはその融合タンパク質）と分類することができる。「高親和性」結合タンパク質または結合ドメインは、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ または少なくとも $10^{13} M^{-1}$ の K_a を有する結合タンパク質または結合ドメインを指す。「低親和性」結合タンパク質または結合ドメインは、最大で $10^7 M^{-1}$ まで、最大で $10^6 M^{-1}$ まで、最大で $10^5 M^{-1}$ までの K_a を有する結合タンパク質または結合ドメインを指す。あるいは、親和性は、 M の単位を有する特定の結合相互作用の平衡解離定数（ K_d ）（例えば、 $10^{-5} M$ から $10^{-13} M$ ）と定義することができる。

【0024】

ウエスタンブロット、ELISA、分析用超遠心、分光法および表面プラズモン共鳴（*Biacore*（登録商標））分析などの、特定の標的に特異的に結合する本開示の結合ドメインを同定するためのならびに結合ドメインまたは融合タンパク質親和性を決定するための様々なアッセイが公知である（例えば、*Scatchard*ら、*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51巻、660頁、1949年；*Wilson*、*Science* 295巻、2103頁、2002年；*Wolff*ら、*Cancer Res.* 53巻、2560頁、1993年；および米国特許第5,283,173号、同第5,468,614号または同等物を参照）。

【0025】

本明細書で使用される場合、「ヒンジ領域」または「ヒンジ」は、（a）免疫グロブリンヒンジ配列（例えば、上部およびコア領域で構成されている）もしくはその機能的改変体、（b）II型C-レクチンドメイン間（スターク）領域もしくはその機能的改変体、または（c）表面抗原分類（CD）分子スターク領域もしくはその機能的改変体を指す。本明細書で使用される場合、「野生型免疫グロブリンヒンジ領域」は、抗体の重鎖に見いだされる（IgG、IgAおよびIgDに関して）CH1およびCH2ドメイン間に介在し、連結するまたは（IgEおよびIgMに関して）CH1およびCH3ドメイン間に介在し、連結する天然に存在する上部および中間ヒンジアミノ酸配列を指す。ある特定の実施形態では、ヒンジ領域は、ヒトのものであり、また特定の実施形態では、ヒトIgGヒンジ領域を含む。

【0026】

「疎水性部分」は、本明細書で使用される場合、細胞膜中で熱力学的に安定である三次元構造を有する任意のアミノ酸配列を意味し、一般的に長さが約15アミノ酸から約30アミノ酸までの範囲にある。疎水性ドメインの構造は、アルファヘリックス、ベータバレル、ベータシート、ベータヘリックスまたはそれらの任意の組合せを含み得る。

【0027】

本明細書で使用される場合、「エフェクター成分」または「エフェクタードメイン」は、適切なシグナルを受けた場合に細胞における生物学的または生理学的反応を直接的または間接的に促進し得る融合タンパク質または受容体の細胞内部分である。ある特定の実施形態では、エフェクター成分は、結合した場合にシグナルを受けるタンパク質、融合タンパク質もしくはタンパク質複合体の一部であるか、またはそれは、エフェクタードメインからのシグナルを誘発する、標的分子に直接結合する。エフェクタードメインは、それが、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）などの、1つまたは複数のシグナル伝達ド

10

20

30

40

50

メインまたはモチーフを含む場合に細胞反応を直接的に促進し得る。他の実施形態では、エフェクター成分は、細胞反応を直接的に促進する1つまたは複数の他のタンパク質と会合することによって細胞反応を間接的に促進する。

【0028】

「リンカー」は、2つのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ドメイン、領域またはモチーフを連結するアミノ酸配列を指し、得られるポリペプチドが標的分子に対する特異的結合親和性を保持する（例えば、scTCR）またはシグナル伝達活性を保持する（例えば、TCR複合体）ように2つのサブ結合ドメインの相互作用と適合性のあるスペーサー機能を備え得る。ある特定の実施形態では、リンカーは、例えば、約2～約35アミノ酸、または約4～約20アミノ酸または約8～約15アミノ酸または約15～25アミノ酸で構成される。さらなる実施形態では、リンカーは、重鎖免疫グロブリン可変領域を軽鎖免疫グロブリン可変領域に連結するまたはT細胞受容体V_H / およびC_H / 鎖を連結する（例えば、V_H - C_H、V_H - C_H、V_H - V_H）または各V_H - C_H、V_H - C_H、V_H - V_H 対をヒンジもしくは疎水性ドメインに連結する可変領域リンカーである。

10

【0029】

「接合部アミノ酸」または「接合部アミノ酸残基」は、結合ドメインと隣接定常ドメインとの間またはTCR鎖と隣接自己切断ペプチドとの間などの、ポリペプチドの2つの隣接モチーフ、領域またはドメインの間の1つまたは複数（例えば、約2～10）のアミノ酸残基を指す。接合部アミノ酸は、融合タンパク質の構築デザインに起因し得る（例えば、融合タンパク質をコードする核酸分子の構築中の制限酵素部位の使用に起因するアミノ酸残基）。

20

【0030】

「改変成分」または「改変ドメイン」または「改変タンパク質」は、少なくとも85%（例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または99.5%）の野生型モチーフ、領域、ドメイン、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、野生型細胞内ドメインCD3、CD134、CD137）との配列同一性を有するモチーフ、領域、ドメイン、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を指す。

【0031】

本明細書で使用される場合、改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せに含まれる核酸分子によりコードされる「抗原」は、疾患または障害（例えば、がん）に関連し、免疫療法のために標的化される任意の生体分子（例えば、タンパク質、炭水化物）を指す。ある特定の実施形態では、抗原は、抗イディオタイプ抗体もしくはその抗イディオタイプ抗体結合断片、または改変T細胞により発現される抗原結合タンパク質（例えば、CAR）に特異的な抗体もしくはその抗体結合断片であり得る。例示的な抗原は、 α -フェトプロテイン（AFP）、B7H4、BTLA、CD3、CD19、CD20、CD25、CD22、CD28、CD30、CD40、CD44v6、CD52、CD56、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD151、CD276、CA125、CEA、CEACAM6、c-Met、CT-7、CTLA-4、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、FLT1、FLT4、Frizzled、O-アセチル-GD2、GD2、GHRHR、GHR、GITR、gp130、HVEM、IGF1R、IL6R、KDR、L1CAM、Lewis A、Lewis Y、LTR、LIFR、LRP5、MAGE、メソセリン、MUC1、NY-ESO-1、がん特異的新抗原、OSMR、PD1、PD-L1、PD-L2、PSMA、PTCH1、RANK、Robo1、ROR1、TERT、TGFBR2、TGFBR1、TLR7、TLR9、TNFRSF4、TNFR1、TNFR2、チロシナーゼ、TWEAK-RまたはWT-1を含む。

30

40

【0032】

「T細胞受容体」（TCR）は、MHC受容体に結合した抗原ペプチドに特異的に結合す

50

ることができる免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー（可変結合ドメイン、定常ドメイン、膜貫通領域および短い細胞質尾部（short cytoplasmic tail）を有する；例えば、Janewayら、Immunobiology: The Immune System in Health and Disease、第3版、Current Biology Publications、4:33頁、1997年参照）を指す。TCRは、細胞の表面上にまたは可溶性の形態で見いだすことができ、一般的におよび鎖（それぞれTCR およびTCR としても公知）または および鎖（それぞれTCR およびTCR としても公知）を有するヘテロダイマーで構成されている。免疫グロブリンと同様に、TCR鎖の細胞外部分（例えば、鎖、鎖）は、2つの免疫グロブリンドメインである、N末端における可変ドメイン（例えば、鎖可変ドメインまたはV_H、鎖可変ドメインまたはV_L；一般的にKabat番号付けに基づくアミノ酸1~116、Kabatら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest、US Dept. Health and Human Services、Public Health Service National Institutes of Health、1991年、第5版）および細胞膜に隣接した1つの定常ドメイン（例えば、鎖定常ドメインまたはC_H、一般的にKabatに基づいてアミノ酸117~259、鎖定常ドメインまたはC_L、一般的にKabatに基づいてアミノ酸117~295）を含む。また免疫グロブリンと同様に、可変ドメインは、フレームワーク領域（FR）により分離された相補性決定領域（CDR）を含む（例えば、Joresら、Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.、87巻、9138頁、1999年；Chothiaら、EMBO J.、7巻、3745頁、1988年を参照；Lefrancら、Dev. Comp. Immunol.、27巻、55頁、2003年も参照）。ある特定の実施形態では、TCRは、T細胞（またはTリンパ球）の表面上に見いだされ、CD3複合体と会合する。本開示に使用するTCRの供給源は、ヒト、マウス、ラット、ウサギまたは他の哺乳動物などの、様々な動物種に由来し得る。

10

20

【0033】

「CD3」は、当技術分野で6つの鎖の多タンパク質複合体として公知である（AbbasおよびLichtman、2003年；Janewayら、172および178頁、1999年参照）。哺乳動物では、複合体は、CD3鎖、CD3鎖、2つのCD3鎖およびCD3鎖のホモダイマーを含む。CD3_ε、CD3_γ およびCD3_δ鎖は、単一免疫グロブリンドメインを含む免疫グロブリンスーパーファミリーの高度に関連する細胞表面タンパク質である。CD3_ε、CD3_γ およびCD3_δ鎖の膜貫通領域は、負に荷電しており、これは、これらの鎖が正に荷電したT細胞受容体鎖と会合することを可能にする特性である。CD3_ε、CD3_γ およびCD3_δ鎖の細胞内尾部は、それぞれ免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして公知の単一保存モチーフを含むのに対して、各CD3鎖は、3つを有する。理論により拘束されることを望むものではないが、ITAMは、TCR複合体のシグナル伝達能力に重要であると考えられる。本開示で使用するCD3は、ヒト、マウス、ラットまたは他の哺乳動物を含む、様々な動物種に由来し得る。

30

40

【0034】

本明細書で使用される場合、「TCR複合体」は、CD3とTCRとの会合により形成された複合体を指す。例えば、TCR複合体は、CD3鎖、CD3鎖、2つのCD3鎖、CD3鎖のホモダイマー、TCR鎖およびTCR鎖から構成され得る。あるいは、TCR複合体は、CD3鎖、CD3鎖、2つのCD3鎖、CD3鎖のホモダイマー、TCR鎖およびTCR鎖から構成され得る。

【0035】

「TCR複合体の成分」は、本明細書で使用される場合、TCR鎖（すなわち、TCR_α、TCR_β、TCR_γ またはTCR_δ）、CD3鎖（すなわち、CD3_ε、CD3_γ、CD3_δ またはCD3_ζ）あるいは2つもしくはそれ超のTCR鎖またはCD3鎖により形

50

成された複合体（例えば、TCR と TCR との複合体、TCR と TCR との複合体、CD3 と CD3 との複合体、CD3 と CD3 との複合体、または TCR 、 TCR 、 CD3 、 CD3 および 2 つの CD3 鎖のサブ TCR 複合体）を指す。

【0036】

本明細書で使用される場合、「核酸」または「核酸分子」は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、オリゴヌクレオチド、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によりまたは *in vitro* 翻訳により生成した断片、およびライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用もしくはエキソヌクレアーゼ作用のいずれかにより生成した断片のいずれかを指す。ある特定の実施形態では、本開示の核酸は、PCR により生成する。核酸は、天然に存在するヌクレオチド（デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドなど）、天然に存在するヌクレオチドの類似体（例えば、天然に存在するヌクレオチドの鏡像異性体）または両方の組合せであるモノマーから構成され得る。修飾ヌクレオチドは、糖部分またはピリミジンもしくはプリン塩基部分の修飾もしくは置換を有し得る。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合またはそのような結合の類似体により連結され得る。ホスホジエステル結合の類似体は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、ホスホルアミデートなどを含む。核酸分子は、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。

10

【0037】

「単離された」という用語は、物質がその元の環境（例えば、それが天然に存在する場合、天然環境）から除去されることを意味する。例えば、生存動物に存在する天然に存在する核酸またはポリペプチドは、単離されていないが、天然系における共存物質の一部またはすべてから分離された、同じ核酸またはポリペプチドは、単離されている。そのような核酸は、ベクターの一部であり得、かつ/またはそのような核酸もしくはポリペプチドは、組成物（例えば、細胞溶解物）の一部であり得、そのようなベクターまたは組成物が核酸もしくはポリペプチドの天然環境の一部でないという点で、それでもなお単離されている。「遺伝子」という用語は、ポリペプチド鎖を生成することに関与する DNA のセグメントを意味し、コード領域に先行および後続する領域「リーダーおよびトレーラー」ならびに個別のコードセグメント（エクソン）間に介在する配列（イントロン）を含む。

20

【0038】

本明細書で使用される場合、「組換え」という用語は、外因性核酸分子の導入により改変された細胞、微生物、核酸分子もしくはベクターを指し、または内因性核酸分子もしくは遺伝子の発現が制御、脱制御され、もしくは構成的であるように改変された細胞もしくは微生物を指し、そのような改変または修飾は、遺伝子工学により導入することができる。遺伝子改変は、例えば、1つまたは複数のタンパク質または酵素をコードする核酸分子（プロモーターなどの、発現制御エレメントを含み得る）を導入する修飾、または他の核酸分子の付加、欠失、置換、または細胞の遺伝物質の他の機能的破綻もしくはそれへの付加を含み得る。例示的修飾は、参照または親分子からの異種または相同ポリペプチドのコード領域またはその機能的断片におけるものを含む。

30

【0039】

本明細書で使用される場合、「変異」は、それぞれ参照もしくは野生型核酸分子またはポリペプチド分子と比較して核酸分子またはポリペプチド分子の配列の変化を指す。変異は、ヌクレオチド（複数可）またはアミノ酸（複数可）の置換、挿入または欠失を含む、いくつかの異なる種類の配列の変化をもたらし得る。ある特定の実施形態では、変異は、1つもしくは3つのコドンもしくはアミノ酸の置換、1つから約5つのコドンもしくはアミノ酸の欠失またはその組合せである。

40

【0040】

「保存的置換」は、1つのアミノ酸の、類似の特性を有する別のアミノ酸による置換と当技術分野で認識されている。例示的な保存的置換は、当技術分野で周知である（例えば、国際公開第 97/09433 号 10 頁；Lehninger、Biochemistry

50

、第2版、Worth Publishers, Inc. NY, NY、71~77頁、1975年；Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA、8頁、1990年を参照）。

【0041】

「構築物」という用語は、組換え核酸を含む任意のポリヌクレオチドを指す。構築物は、ベクター（例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター）に存在し得るまたはゲノムに組み込まれ得る。「ベクター」は、別の核酸を輸送することができる核酸分子である。ベクターは、例えば、染色体、非染色体、半合成もしくは合成核酸を含み得るプラスミド、コスミド、ウイルス、RNAベクターまたは線状もしくは環状DNAもしくはRNA分子であり得る。例示的なベクターは、自律複製（エピソードベクター）またはそれらが連結されている核酸の発現（発現ベクター）を可能にするものである。

10

【0042】

ウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス（例えば、アデノ関連ウイルス）、コロナウイルス、オルトミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）などのマイナス鎖RNAウイルス、ラブドウイルス（例えば、狂犬病および水疱性口内炎ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、麻疹およびセンダイ）、ピコルナウイルスおよびアルファウイルスなどのプラス鎖RNAウイルス、ならびにアデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純疱疹ウイルス1および2型、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス）およびボックスウイルス（例えば、ワクシニア、鶏痘およびカナリア痘）などの二本鎖DNAウイルスを含む。他のウイルスは、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルスおよび肝炎ウイルスを含む。レトロウイルスの例は、トリ白血症-肉腫、哺乳動物C型、B型ウイルス、D型ウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、スプマウイルスを含む（Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, 第3版、B. N. Fieldsら編、Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996年）。

20

【0043】

「レンチウイルスベクター」は、本明細書で使用される場合、統合的または非統合的であり得、比較的大きいパッケージング能力を有し、一連の異なる細胞型に形質導入することができる、遺伝子送達用のHIVベースのレンチウイルスベクターを意味する。レンチウイルスベクターは、通常、3つ（パッケージング、エンベロープおよび移入）またはそれ超のプラスミドの産生細胞への一過性トランスフェクションの後に生成される。HIVと同様に、レンチウイルスベクターは、ウイルス表面糖タンパク質と細胞表面上の受容体との相互作用により標的細胞に侵入する。侵入により、ウイルスRNAは、ウイルス逆転写酵素複合体により媒介される、逆転写を受ける。逆転写の産物は、感染細胞のDNAへのウイルスの組み込みの基質である、二本鎖線状ウイルスDNAである。

30

【0044】

「作動可能に連結した」という用語は、1つの核酸分子の機能が他のものによる影響を受けるように、単一核酸断片上の2つまたはそれ超の核酸分子の関連を意味する。例えば、プロモーターがコード配列の発現に影響を及ぼすことができる場合、プロモーターは、コード配列と作動可能に連結している（すなわち、コード配列は、プロモーターの転写制御下にある）。「連結されていない」は、関連遺伝エレメントが互いに密接に関連しておらず、1つの機能が他に影響を及ぼさないことを意味する。

40

【0045】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」は、適切な宿主において核酸分子の発現に影響を及ぼすことができる適切な制御配列と作動可能に連結している核酸分子を含むDNA構築物を指す。そのような制御配列は、転写をもたらすためのプロモーター、そのような転写を制御するための任意選択のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部

50

位をコードする配列ならびに転写および翻訳の終結を制御する配列を含む。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、ウイルスまたは単に潜在的ゲノム挿入であり得る。適切な宿主内に形質転換されたならば、ベクターは、宿主ゲノムに無関係に複製し、機能し得る、または場合によって、ゲノム自体に組み込まれ得る。本明細書では、「プラスミド」、「発現プラスミド」、「ウイルス」および「ベクター」は、しばしば交換可能に使用される。

【0046】

「発現」という用語は、本明細書で使用される場合、ポリペプチドが遺伝子の核酸配列に基づいて生成される過程を指す。過程は、転写と翻訳の両方を含む。

【0047】

細胞内に核酸配列を挿入するという文脈における「導入される」という用語は、「トランスフェクション」または「形質転換」または「形質導入」を意味し、核酸分子が細胞のゲノム（例えば、染色体、プラスミド、プラスチドまたはミトコンドリアDNA）に組み込まれ、自律性レプリコンに変換されまたは一過性に発現し得る（例えば、トランスフェクトされたmRNA）、核酸配列の真核または原核細胞内への組込みへの言及を含む。

10

【0048】

本明細書で使用される場合、「異種」または「外因性」核酸分子、構築物または配列は、宿主細胞にとって天然のものでないが、宿主細胞に由来する核酸分子または核酸分子の一部と相同であり得る、核酸分子または核酸分子の一部を指す。異種または外因性核酸分子、構築物または配列の供給源は、異なる属または種に由来し得る。ある特定の実施形態では、異種または外因性核酸分子を、例えば、コンジュゲーション、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーションなどにより宿主細胞または宿主ゲノムに加え（すなわち、内因性でも天然でもない）、加えられた分子は、宿主ゲノムに組み込まれまたは染色体外遺伝物質として（例えば、プラスミドまたは他の形の自己複製ベクターとして）存在し、複数のコピーで存在し得る。さらに、「異種」は、宿主細胞が相同タンパク質または活性をたとえコードするとしても、宿主細胞に導入された外因性核酸分子によってコードされる非天然酵素、タンパク質または他の活性を指す。

20

【0049】

本明細書に記載するように、複数の異種または外因性核酸分子を、別個の核酸分子として、複数の個別に制御される遺伝子として、ポリシストロン性核酸分子として、融合タンパク質をコードする単一核酸分子として、またはそれらの任意の組合せとして宿主細胞に導入することができる。例えば、本明細書で開示したように、宿主細胞は、所望の抗原特異的結合タンパク質（例えば、CAR、TCR およびTCR）をコードする2つまたはそれ超の異種または外因性核酸分子を発現するように改変することができる。2つまたはそれ超の外因性核酸分子を宿主細胞に導入する場合、2つまたはそれ超の外因性核酸分子は、別個のベクター上で、（例えば、単一ベクター上の）単一核酸分子として導入し、単一部位または複数部位で宿主染色体に組み込むことができると理解すべきである。言及される異種核酸分子またはタンパク質活性の数は、コード化核酸分子の数またはタンパク質活性の数を指し、宿主細胞に導入された別個の核酸分子の数ではない。

30

【0050】

本明細書で使用される場合、「内因性」または「天然(native)」という用語は、宿主細胞に通常存在する遺伝子、タンパク質または活性を指す。さらに、親遺伝子、タンパク質または活性と比較して変異させ、過剰発現させ、シャッフルされ、重複され、または別の方法で改変した遺伝子、タンパク質または活性は、当該特定の宿主細胞にとって依然として内因性または天然であると見なされる。例えば、第1の遺伝子からの内因性制御配列（例えば、プロモーター、翻訳減弱配列）を使用して、第2の天然遺伝子または核酸分子の発現を改変または調節することができ、この場合、第2の天然遺伝子または核酸分子の発現または調節は、親細胞における正常な発現または調節と異なる。

40

【0051】

「相同」または「ホモログ」という用語は、宿主の細胞、種または株に見いだされるまたは由来する分子または活性を指す。例えば、異種または外因性核酸分子は、天然宿主細胞

50

遺伝子と相同であり得、任意選択で発現レベルの変更、異なる配列、活性の変更またはそれらの任意の組合せを有し得る。

【0052】

「配列同一性」は、本明細書で使用される場合、配列を整列させ、最大%の配列同一性を達成するために必要な場合にギャップを導入した後の、配列同一性の一部として任意の保存的置換を考慮しない、別の参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である1つの配列におけるアミノ酸残基の百分率を指す。配列同一性百分率値は、デフォルト値に設定されたパラメーターを用いた、Altschulら(1997年)「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」、Nucleic Acids Res.、25巻、3389~3402頁により定義されたNCBI BLAST 2.0ソフトウェアを使用して得ることができる。

10

【0053】

本明細書で使用される場合、「過剰増殖性障害」は、正常または非罹患細胞と比較して過度の成長または増殖を指す。例示的な過剰増殖性障害は、腫瘍、がん、新生物性組織、癌腫、前悪性細胞ならびに非新生物性または非悪性過剰増殖性障害(例えば、腺腫、線維腫、脂肪腫、平滑筋腫、血管腫、再狭窄ならびに関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、炎症性腸疾患などの自己免疫疾患)を含む。

【0054】

抗原結合タンパク質または抗原を発現する改変細胞

20

ある特定の態様では、本開示は、改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せの集団を含む養子細胞免疫療法組成物であって、改変細胞の第1の集団は、抗原結合タンパク質(例えば、CAR)をコードする核酸分子を含むT細胞であり、改変細胞の第2の集団は、抗原(例えば、がん特異的抗原、抗イデオタイプ抗体またはその結合断片)をコードする核酸分子を含む、養子細胞免疫療法組成物を提供する。これらの実施形態では、抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、細胞外結合成分は、改変細胞の第2の集団によってコードされた抗原に特異的である。例えば、抗原結合タンパク質は、T細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体であり得る。

【0055】

30

これらの組成物の利点は、より低用量の、例えば、抗原特異的CAR T細胞を患者に投与し、次いでCARにより認識される抗原を発現する細胞の第2の集団を投与すること(例えば、同時にまたは逐次的に)により、養子免疫療法の効果を増強することができることである。別の利点は、効果を増強することが、細胞が目的の組織に移動するようにホーミングも改善することができることである。CAR発現T細胞と人工APCの組合せの別の利点は、腫瘍の部位において活性がより高い細胞を得るために養子免疫療法の効果を全身的に増強することである。

【0056】

ある特定の他の態様では、抗原をコードする核酸分子を含む改変造血前駆細胞を被験体に投与し、コードされた抗原は、調節プロモーターの制御下にある。改変造血前駆細胞は、目的の組織に位置し、複製する(例えば、骨髄またはリンパ節)。次いで、拡大させた改変造血前駆細胞における抗原の発現は、被験体に抗原結合タンパク質(例えば、CAR)をコードする核酸分子を含む改変T細胞の第1の集団を投与すると同時にまたはその直後に誘導することができ、導入された「APC」の数は、*ex vivo*での拡大および投与によって利用可能となるよりもはるかに大きい。ある特定の実施形態では、投与される細胞の第2の集団は、投与前に照射する。

40

【0057】

上述の実施形態のいずれかにおいて、抗原結合タンパク質は、結合成分、疎水性部分および細胞内エフェクター成分を含む。例えば、結合成分は、抗体可変断片(Fv)、TCR可変ドメイン、受容体エクドメインまたはリガンドであり得る。さらなる実施形態では

50

、結合成分は、可変領域リンカーを含む s c F v または s c T C R であり、例えば、リンカーは (G l y x S e r y)_n を含み、式中、x および y は、独立に 1 ~ 5 の整数であり、n は、1 ~ 10 の整数である。さらなる実施形態では、結合成分は、 - フェトプロテイン (A F P)、B 7 H 4、B T L A、C D 3、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 5、C D 2 2、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 4 4 v 6、C D 5 2、C D 5 6、C D 7 9 b、C D 8 0、C D 8 1、C D 8 6、C D 1 3 4 (O X 4 0)、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 1 5 1、C D 2 7 6、C A 1 2 5、C E A、C E A C A M 6、c - M e t、C T - 7、C T L A - 4、E G F R、E G F R v I I I、E r b B 2、E r b B 3、E r b B 4、E p h A 2、F L T 1、F L T 4、F r i z z l e d、O - アセチル - G D 2、G D 2、G H R H R、G H R、G I T R、g p 1 3 0、H V E M、I G F 1 R、I L 6 R、K D R、L 1 C A M、L e w i s A、L e w i s Y、L T R、L I F R、L R P 5、M A G E、メソセリン、M U C 1、N Y - E S O - 1、がん特異的新抗原、O S M R、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、P S M A、P T C H 1、R A N K、R o b o 1、R O R 1、T E R T、T G F B R 2、T G F B R 1、T L R 7、T L R 9、T N F R S F 4、T N F R 1、T N F R 2、チロシナーゼ、T W E A K - R または W T - 1 に特異的である。

【 0 0 5 8 】

なおさらなる実施形態では、疎水性部分は、C D 4、C D 8、C D 2 8 または C D 2 7 膜貫通ドメインなどの、膜貫通ドメインである。

【 0 0 5 9 】

ある特定の実施形態では、細胞内エフェクター成分は、C D 3、C D 3、C D 3、C D 2 5、C D 2 7、C D 2 8、C D 7 9 A、C D 7 9 B、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C A R D 1 1、D A P 1 0、F c R、F c R、F c R、F y n、H V E M、I C O S、L c k、L A G 3、L A T、L R P、N K G 2 D、N O T C H 1、N O T C H 2、N O T C H 3、N O T C H 4、R O R 2、R y k、S L A M F 1、S l p 7 6、p T、T C R、T C R、T R I M、Z a p 7 0、P T C H 2 またはそれらの任意の組合せの細胞内領域を含む。特定の実施形態では、細胞内エフェクター成分は、C D 3 ならびに C D 2 7、C D 2 8、C D 1 3 4 および C D 1 3 7 のうちの 1 つまたは複数を含むか、または細胞内エフェクター成分は、L R P、N O T C H 1、N O T C H 2、N O T C H 3、N O T C H 4、R O R 2 もしくは R y k を含む。

【 0 0 6 0 】

上述の実施形態のいずれかにおいて、改変細胞は、C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、C D 4 - C D 8 - 二重陰性 T 細胞、T 細胞、調節 T 細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞またはそれらの任意の組合せなどの、免疫系細胞である。ある特定の実施形態では、T 細胞は、ナイーブ T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞またはそれらの任意の組合せである。例えば、改変 T 細胞の第 1 の集団は、C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞または C D 4 + と C D 8 + T 細胞の両方から本質的になり得、改変細胞の第 2 の集団は、改変ヒト造血前駆細胞を含む。他の例において、改変 T 細胞の第 1 の集団は、C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞または C D 4 + と C D 8 + T 細胞の両方から本質的になり得、改変細胞の第 2 の集団は、C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞または C D 4 + と C D 8 + T 細胞の両方から本質的になる細胞などの、改変ヒト免疫系細胞を含む。

【 0 0 6 1 】

上述の実施形態のいずれかにおいて、改変細胞集団は、例えば、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などの、ウイルスベクターを使用することにより e x v i v o で組換えにより改変されている。さらなる実施形態では、改変される細胞集団は、同系、同種異系または自己細胞である。上述の実施形態のいずれかにおいて、改変細胞集団は、本明細書に記載するように薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を用いてさらに製剤化する。

【 0 0 6 2 】

当業者に公知の様々な基準により、ペプチドまたはポリペプチドにおける特定の位置において置換されているアミノ酸が保存的である (または類似している) かどうかを示される

10

20

30

40

50

。例えば、類似アミノ酸または保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである。類似アミノ酸は、以下のカテゴリーに含められ得る：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）；酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）；非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、ヒスチジン）；非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）；ベータ分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン）。分類するのにより困難であると考えられる、プロリンは、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（例えば、ロイシン、バリン、イソロイシンおよびアラニン）と特性を共有している。特定の状況において、グルタミンによるグルタミン酸の置換またはアスパラギンによるアスパラギン酸の置換は、グルタミンおよびアスパラギンがそれぞれグルタミン酸およびアスパラギン酸のアミド誘導体である点で類似置換であると考えられることができる。当技術分野で理解されているように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、ポリペプチドのアミノ酸配列およびその保存的アミノ酸置換配列を第2のポリペプチドの配列と比較することによって決定される（例えば、GENEWORKS、Align、the BLASTアルゴリズム、または本明細書で述べ、当技術分野で実施された他のアルゴリズムを使用して）。

10

【0063】

ある特定の実施形態では、抗原特異的結合タンパク質は、(a) CDRの少なくとも3つまたは4つが変異を有さず、(b) 変異を有するCDRが最大で2または3アミノ酸置換、最大で連続する5アミノ酸欠失、あるいはその組合せのみを有するならば、元の野生型配列のアミノ酸配列と少なくとも約90%または少なくとも約95%同一である結合成分である。

20

【0064】

ある特定の実施形態では、抗原結合タンパク質または抗原をコードする核酸分子は、養子移入療法に使用するために宿主細胞（例えば、造血幹細胞、T細胞）にトランスフェクト/形質導入するのに使用される。本明細書における教示に基づいて、ここに開示する実施形態へのこれらの方法の適応が予期されるように、所望の核酸をT細胞にトランスフェクト/形質導入するための方法の最近の進歩が、所望の抗原特異性のT細胞を使用する養子移入手順（例えば、Schmittら、Hum. Gen., 20巻、1240頁、2009年；Dosssettら、Mol. Ther., 17巻、742頁、2009年；Tillら、Blood, 112巻、2261頁、2008年；Wangら、Hum. Gene Ther., 18巻、712頁、2007年；Kuballら、Blood, 109巻、2331頁、2007年；米国特許出願公開第2011/0243972号；米国特許出願公開第2011/0189141号；Leenら、Ann. Rev. Immunol., 25巻、243頁、2007年）として記載された（例えば、米国特許出願公開第2004/0087025号）。

30

【0065】

本明細書に記載する抗原結合タンパク質または成分は、T細胞の結合、活性化または誘導の測定を含む、また抗原特異的であるT細胞応答の測定も含む、T細胞活性をアッセイする多数の当該分野で認められた方法のいずれかに従って機能的に特徴付けることができる。例としては、T細胞増殖、T細胞サイトカイン放出、抗原特異的T細胞刺激、MHC拘束T細胞刺激、CTL活性（例えば、予めローディングした標的細胞からの ^{51}Cr の放出を検出することによる）、T細胞表現型マーカー発現の変化およびT細胞機能の他の尺度の測定などがある。これらおよび類似のアッセイを実施する手順は、例えば、Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998年)に見いだすことができる。Current Protocols in Immunolo

40

50

gy; Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986年); MishellおよびShigii (編) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979年); GreenおよびReed, Science, 281巻, 1309頁 (1998年) ならびにそれらに引用された参考文献も参照のこと。

【0066】

サイトカインのレベルは、例えば、ELISA、ELISPOT、細胞内サイトカイン染色およびフローサイトメトリーならびにそれらの組合せ（例えば、細胞内サイトカイン染色およびフローサイトメトリー）を含む、本明細書で述べ、当技術分野で実施された方法に従って測定することができる。免疫応答の抗原特異的誘発または刺激により生ずる免疫細胞増殖およびクローン拡大は、末梢血液細胞の試料中の循環リンパ球またはリンパ節からの細胞などの、リンパ球を単離すること、抗原により細胞を刺激すること、ならびにトリチウム化チミジンの取込みまたはMTTアッセイなどの非放射性アッセイなどにより、サイトカイン産生、細胞増殖および/または細胞生存率を測定することによって決定することができる。Th1免疫応答とTh2免疫応答とのバランスに対する本明細書に記載する免疫原の効果は、例えば、IFN-、IL-12、IL-2およびTNF-などの、Th1サイトカインならびにIL-4、IL-5、IL-9、IL-10およびIL-13などの、2型サイトカインのレベルを測定することによって検討することができる。

【0067】

抗原結合タンパク質または抗原をコードするポリヌクレオチド

本明細書に記載するCARのような抗原結合タンパク質、抗原に特異的な高親和性組換えTCR、または抗原もしくは抗原特異的結合成分に対する抗イデオタイプ抗体をコードする単離もしくは組換え核酸分子は、分子生物学の様々な方法および技術またはポリペプチド精製技術により生成し、調製することができる。CARのような抗原結合タンパク質、抗原に特異的な高親和性組換えTCR、または抗原もしくは目的の抗原特異的結合成分に対する抗イデオタイプ抗体を組換えにより生成するために使用する発現ベクターの構築は、例えば、Sambrookら(1989年および2001年版; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY)およびAusubelら(Current Protocols in Molecular Biology (2003年))に記載されているような、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製およびDNA配列決定の使用を含む、当技術分野で公知の任意の適切な分子生物学工学技術を使用することによって遂行することができる。効率的な転写および翻訳を得るために、各組換え発現構築物におけるポリヌクレオチドは、リーダー配列およびとりわけ免疫原をコードするヌクレオチド配列に作動可能に（すなわち、作動可能なように）連結したプロモーターなどの、少なくとも1つの適切な発現制御配列（調節配列とも呼ばれる）を含む。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的宿主細胞における効率的な発現のために、コドンが最適化されている。

【0068】

ある特定の実施形態は、本明細書において予期されるポリペプチド、例えば、キメラ抗原受容体、高親和性組換えTCR、目的の抗原および抗原結合タンパク質に特異的な抗イデオタイプ抗体をコードする核酸に関する。当業者が認識するように、核酸は、あらゆる形態の一本鎖または二本鎖DNA、cDNAもしくはRNAを指し、アンチセンスDNA、cDNAおよびRNAを含む、互いに相補的であるプラスおよびマイナス鎖の核酸を含み得る。siRNA、マイクロRNA、RNA-DNAハイブリッド、リボザイムおよび他の様々な天然に存在するかまたは合形成態のDNAまたはRNAも含まれる。

【0069】

組換えDNA、ペプチドおよびオリゴヌクレオチド合成、イムノアッセイならびに組織培

10

20

30

40

50

養および形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）に標準的技術を使用することができる。酵素反応および精製技術は、製造業者の仕様に従って、または当技術分野で一般的に遂行されているように、または本明細書に記載するように実施することができる。これらならびに関連する技術および手順は、一般的に、当技術分野で周知の通常の方法に従って、また本明細書を通して引用し、考察する微生物学、分子生物学、生化学、分子遺伝学、細胞生物学、ウイルス学および免疫学の技術における様々な一般のおよびより具体的な参考文献に記載されているように実施することができる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons、2008年7月更新); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover、DNA Cloning: A Practical Approach、IおよびII巻 (IRL Press、Oxford Univ. Press USA、1985年); Current Protocols in Immunology (John E. Coligan、Ada M. Kruisbeek、David H. Margulies、Ethan M. Shevach、Warren Strober編、2001年、John Wiley & Sons、NY、NY); Real-Time PCR: Current Technology and Applications、Julie Logan、Kirstin Edwards および Nick Saunders編、2009年、Caister Academic Press、Norfolk、UK; Anand、Techniques for the Analysis of Complex Genomes (Academic Press、New York、1992年); GuthrieおよびFink、Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press、New York、1991年); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait編、1984年); Nucleic Acid Hybridization (B. HamesおよびS. Higgins編、1985年); Transcription and Translation (B. HamesおよびS. Higgins編、1984年); Animal Cell Culture (R. Freshney編、1986年); Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning (1984年); Next-Generation Genome Sequencing (Janitz、2008年、Wiley-VCH); PCR Protocols (Methods in Molecular Biology) (Park編、第3版、2010年、Humana Press); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press、1986年); the treatise、Methods In Enzymology (Academic Press、Inc.、N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. MillerおよびM. P. Calos編、1987年、Cold Spring Harbor Laboratory); HarlowおよびLane、Antibodies (Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1998年); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (MayerおよびWalker編、Academic Press、London、1987年); Handbook Of Experimental Immunology、I~IV巻 (D. M. WeirおよびCC Blackwell編、1986年

); Roitt, Essential Immunology, 第6版、(Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988年); Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen編、2002年); Embryonic Stem Cell Protocols: I巻: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen編、2006年); Embryonic Stem Cell Protocols: II巻: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen編、2006年); Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kursad Turksen編、2006年); Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, および Bruce A. Bunnell編、2008年); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine) (Christopher A. Klug および Craig T. Jordan 編、2001年); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kevin D. Bunting編、2008年); Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Leslie P. Weiner編、2008年)を参照のこと。

10

20

【0070】

ある特定の実施形態は、ベクターに含められる核酸を含む。当業者は、本明細書で開示するある特定の実施形態と共に使用する適切なベクターを容易に確認することができる。一般的なベクターは、それが結合した別の核酸を輸送することができる、または宿主生物内で複製することができる核酸分子を含み得る。ベクターのいくつかの例は、プラスミド、ウイルスベクター、コスミドおよびその他を含む。一部のベクターは、それらが導入される宿主細胞における自律複製の能力があり得る(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター)のに対して、他のベクターは、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと共に複製し得る。さらに、一部のベクターは、それらが作動可能に連結した遺伝子の発現を誘導することができる(これらのベクターは、「発現ベクター」と呼ぶことができる)。関連実施形態によれば、1つまたは複数の作用物質(例えば、本明細書に記載する、CARのような抗原結合タンパク質、抗原に特異的な高親和性組換えTCR、または抗原もしくは抗原特異的結合成分に対する抗イディオタイプ抗体をコードするポリヌクレオチド)を被験体に共投与(co-administer)する場合、当該各作用物質が別個または同じベクターに存在し得、複数のベクター(それぞれが異なる作用物質、同じ作用物質を含む)を細胞もしくは細胞集団に導入または被験体に投与することができることがさらに理解される。

30

40

【0071】

ある特定の実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質または抗原をコードする核酸は、ベクターの特定のエレメントに作動可能であるように連結することができる。例えば、それらがライゲーションされるコード配列の発現およびプロセッシングを達成するのに必要であるポリヌクレオチド配列は、作動可能であるように連結することができる。発現制御配列は、適切な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列; スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的RNAプロセッシングシグナル; 細胞質mRNAを安定化する配列; 翻訳効率を高める配列(すなわち、コザックコンセンサス配列); タンパク質の安定性を高める配列; ならびにタンパク質分泌を高めると思われる配列を含み

50

得る。発現制御配列は、それらが目的の遺伝子と隣接している場合、作動可能なように連結される可能性があり、発現制御配列は、目的の遺伝子を制御するためにトランスで作用するか、または離れて作用する。

【0072】

特定の実施形態では、組換え発現ベクターは、適切な細胞、例えば、造血幹細胞、T細胞、抗原提示（例えば、樹状細胞）などに送達される。したがって、組換え発現ベクターは、例えば、Bリンパ球、Tリンパ球、または樹状細胞特異的TREなどのリンパ系組織特異的転写調節エレメント（TRE）も含み得る。リンパ系組織特異的TREは、当技術分野で公知である（例えば、Thompsonら、Mol. Cell. Biol.、12巻、1043頁、1992年）；Toddら、J. Exp. Med.、177巻、1663頁、1993年）；Penixら、J. Exp. Med.、178巻、1483頁、1993年を参照）。

10

【0073】

ベクターに加えて、ある特定の実施形態は、現在開示しているベクターを含む宿主細胞に関する。当業者は、多くの適切な宿主細胞が当技術分野で入手可能であることを容易に理解する。宿主細胞は、ベクターあるいは核酸および/またはタンパク質の組込みを受け得る任意の個々の細胞もしくは細胞培養物ならびに子孫細胞を含み得る。用語は、遺伝的または表現型的に同じかまたは異なるかを問わず、宿主細胞の子孫も含む。適切な宿主細胞は、ベクターに依存し、哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞および細菌細胞を含み得る。これらの細胞は、ウイルスベクター、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、マイクロインジェクションまたは他の方法による形質転換の使用により、ベクターまたは他の物質を組み込むように誘導することができる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版（Cold Spring Harbor Laboratory、1989年）を参照のこと。

20

【0074】

処置の方法

ある特定の態様では、本開示は、抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を含む改変ヒトT細胞の集団を含む有効量の組成物をヒト被験体に投与することにより過剰増殖性障害または状態（例えば、抗原過剰発現によって特徴付けられる）を処置する方法を対象とするものであって、抗原結合タンパク質は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含み、改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せの集団は、抗原結合タンパク質の細胞外結合成分によって特異的に認識される抗原をコードする核酸分子を含む。ある特定の実施形態では、投与ステップは、複数回で、数週間、数ヵ月または最長で2年もしくはそれ超の期間にわたり反復することができる。

30

【0075】

ある特定の実施形態では、過剰増殖性障害は、血液学的悪性疾患または固形がんである。例示的な血液学的悪性疾患は、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性好酸球性白血病（CEL）、骨髄異形成症候群（MDS）、非ホジキンリンパ腫（NHL）または多発性骨髄腫（MM）を含む。例示的な固形がんは、胆管がん、膀胱がん、骨および軟部組織癌腫、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん（cervical cancer）、結腸がん、結腸直腸腺癌、結腸直腸がん、類腱腫、胚性がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、胃腺癌、多形膠芽腫、婦人科腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、肝臓がん、肺がん、悪性黒色腫、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、膵管腺癌、原発性星状細胞腫瘍、原発性甲状腺がん、前立腺がん、腎臓がん、腎細胞癌、横紋筋肉腫、皮膚がん、軟部組織肉腫、精巣胚細胞腫瘍、尿路上皮がん、子宮肉腫または子宮がんを含む。

40

【0076】

さらなる態様では、本開示は、（a）抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を含む改変ヒトT細胞の集団の有効量を被験体に投与するステップであって、抗原結合タンパク質

50

は、細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含む、ステップと、(b) 抗原をコードする核酸分子を含む改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せの集団の有効量を被験体に投与するステップであって、ステップ(a)の改変ヒトT細胞からの抗原結合タンパク質の細胞外結合成分が、このステップ(b)の改変細胞の集団によりコードされる抗原に特異的である、ステップと、(c) 任意選択でステップ(a)、ステップ(b)またはステップ(a)と(b)の両方を反復するステップとを含み、それにより、養子細胞免疫療法により疾患を処置することにより、被験体における疾患を処置することを対象とする。

【0077】

さらなる態様では、本開示は、(a) 細胞外結合成分と細胞内エフェクター成分との間に位置する疎水性部分を含む、抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を含む改変ヒトT細胞の集団の有効量を被験体に投与するステップと、(b) 抗原をコードする核酸分子を含む改変ヒト造血前駆細胞、改変ヒト免疫系細胞またはそれらの組合せの集団の有効量を被験体に投与するステップであって、ステップ(a)の改変ヒトT細胞からの抗原結合タンパク質の細胞外結合成分が、このステップ(b)の改変細胞の集団によりコードされる抗原に特異的である、ステップとにより養子細胞免疫療法を改善する方法を対象とする。これらの投与は、本明細書に記載するように反復することができ、それにより、養子細胞免疫療法の有効性を増強、強化もしくは向上させる。

【0078】

前述の実施形態のいずれかにおいて、方法は、ウイルス性疾患、細菌性疾患、がん、炎症性疾患、免疫疾患または加齢性疾患を処置するために使用する。

【0079】

前述の実施形態のいずれかにおいて、方法は、結合成分、疎水性部分および細胞内エフェクター成分を含む抗原結合タンパク質をコードする細胞と共に使用する。例えば、結合成分は、抗体可変断片(Fv)、TCR可変ドメイン、受容体エクドメインまたはリガンドであり得る。さらなる実施形態では、結合成分は、可変領域リンカーを含むscFvまたはscTCRであり、そのようなリンカーは、(Gly_xSer_y)_nを含み、式中、xおよびyは、独立に1~5の整数であり、nは、1~10の整数である。さらなる実施形態では、結合成分は、
 - フェトプロテイン(AFP)、B7H4、BTLA、CD3、CD19、CD20、CD25、CD22、CD28、CD30、CD40、CD44v6、CD52、CD56、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD151、CD276、CA125、CEA、CEACAM6、c-Met、CT-7、CTLA-4、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、FLT1、FLT4、Frizzled、O-アセチル-GD2、GD2、GHRHR、GHR、GITR、gp130、HVEM、IGF1R、IL6R、KDR、L1CAM、Lewis A、Lewis X、LTRA、LIFR、LRP5、MAGE、メソセリン、MUC1、NY-ESO-1、がん特異的新抗原、OSMR、PD1、PD-L1、PD-L2、PSMA、PTCH1、RANK、Robo1、ROR1、TERT、TGFB2、TGFB1、TLR7、TLR9、TNFRSF4、TNFR1、TNFR2、チロシナーゼ、TWEAK-RまたはWT-1に特異的である。これらの実施形態のいずれにおいても、改変ヒトT細胞からの抗原結合タンパク質の細胞外結合成分は、抗原を過剰発現する疾患の細胞に対して向けられている。

【0080】

なおさらなる実施形態では、疎水性部分は、CD4、CD8、CD28またはCD27膜貫通ドメインなどの、膜貫通ドメインである。

【0081】

ある特定の実施形態では、細胞内エフェクター成分は、CD3、CD3、CD3、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CD134、CD137、CARD11、DAP10、FcR、FcR、FcR、Fyn、HVEM、ICOS

10

20

30

40

50

、L c k、L A G 3、L A T、L R P、N K G 2 D、N O T C H 1、N O T C H 2、N O T C H 3、N O T C H 4、R O R 2、R y k、S L A M F 1、S l p 7 6、p T 、T C R 、T C R 、T R I M、Z a p 7 0、P T C H 2またはそれらの任意の組合せの細胞内領域を含む。特定の実施形態では、細胞内エフェクター成分は、C D 3 ならびにC D 2 7、C D 2 8、C D 1 3 4およびC D 1 3 7のうちの1つまたは複数を含むか、または細胞内エフェクター成分は、L R P、N O T C H 1、N O T C H 2、N O T C H 3、N O T C H 4、R O R 2もしくはR y kを含む。

【0082】

上述の実施形態のいずれかにおいて、方法は、C D 4 + T細胞、C D 8 + T細胞、C D 4 - C D 8 - 二重陰性T細胞、 T細胞、調節T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞またはそれらの任意の組合せなどの、改変免疫系細胞の使用を提供する。ある特定の実施形態では、T細胞は、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞またはそれらの任意の組合せである。例えば、改変T細胞の第1の集団は、C D 4 + T細胞、C D 8 + T細胞またはC D 4 + とC D 8 + T細胞の両方から本質的になり得る。改変細胞の第2の集団は、改変ヒト造血前駆細胞を含む。他の例において、改変T細胞の第1の集団は、C D 4 + T細胞、C D 8 + T細胞またはC D 4 + とC D 8 + T細胞の両方から本質的になり得る。改変細胞の第2の集団は、C D 4 + T細胞、C D 8 + T細胞またはC D 4 + とC D 8 + T細胞の両方から本質的になる細胞などの、改変ヒト免疫系細胞を含む。

10

【0083】

上述の実施形態のいずれかにおいて、方法は、例えば、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などの、ウイルスベクターにより *ex vivo* で組換えにより改変されている改変細胞集団の使用を提供する。さらなる実施形態では、改変される細胞集団は、同系、同種異系または自己細胞である。上述の実施形態のいずれかにおいて、改変細胞集団は、本明細書に記載するように薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を用いてさらに製剤化する。

20

【0084】

上述の実施形態のいずれかにおいて、方法は、改変細胞集団を静脈内に投与することを含む。

【0085】

上述の実施形態のいずれかにおいて、方法は、ステップ (a) の改変T細胞の複数回用量、ステップ (b) の改変細胞の複数回用量、またはそれらの組合せを被験体に投与することを含む。例えば、ステップ (a) の改変T細胞の複数回用量は、約1週間から約4週間までの投与の間の間隔で投与される。ある特定の実施形態では、ステップ (a) の改変T細胞は、ステップ (b) の改変細胞と同時にまたは逐次的に投与される。さらなる実施形態では、ステップ (b) の改変細胞の初回用量は、ステップ (a) の改変T細胞を投与して約1日から約28日後までに投与される。

30

【0086】

上述の実施形態のいずれかにおいて、方法は、ステップ (b) の改変細胞を、ステップ (a) の改変T細胞を投与してから約24時間以内に逐次的に投与するか、またはステップ (a) の改変T細胞を、ステップ (b) の改変細胞を投与してから約24時間以内に逐次的に投与することを含む。特定の実施形態では、混合物を被験体に投与するまでステップ (b) の細胞がステップ (a) の細胞を活性化しないならば、初回の投与は、ステップ (a) の改変T細胞とステップ (b) の改変細胞との混合物を含む組成物を投与することを含む。さらなる態様では、ステップ (b) の改変細胞は、ステップ (a) の改変T細胞を投与した後約365日間まで、1つまたは複数の間隔で1回または複数回用量でさらに投与される。上述の実施形態のいずれかにおいて、ステップ (b) の改変細胞は、改変造血前駆細胞を含むもしくはそれから本質的になる、またはT細胞を含むもしくはそれから本質的になる。

40

【0087】

50

上述の実施形態のいずれかにおいて、ステップ (a) の改変 T 細胞は、被験体に約 10^6 細胞 / m^2 ~ 約 10^{11} 細胞 / m^2 の用量で投与され、ステップ (b) の改変 T 細胞は、被験体に約 10^6 細胞 / m^2 ~ 約 10^{11} 細胞 / m^2 の用量で投与され、いずれかまたは両方の改変細胞集団の投与を本明細書に記載するように反復することができる。

【 0 0 8 8 】

被験体における過剰増殖性障害または悪性状態の存在は、例えば、新生物、腫瘍、非接触阻害もしくは腫瘍形成的形質転換細胞などを含む、被験体における異形成、癌性および / または形質転換細胞の存在 (例えば、固形がん ; 急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病などの、リンパ腫および白血病を含む血液学的がん) を指し、これは、当技術分野で公知であり、その診断および分類のための基準は、確立されている (例えば、Hanahan および Weinberg、2011年、Cell、144巻、646頁 ; Hanahan および Weinberg、2000年、Cell、100巻、57頁 ; Cavallaro、2011年、Canc. Immunol. Immunother.、60巻、319頁 ; Kyrigideisら、2010年、J. Carcinog.、9巻、3頁)。ある特定の実施形態では、そのようながん細胞は、これらの種類のがんのいずれかを発症させ、逐次的に移植することができるがん幹細胞を含む、急性骨髄性白血病、B細胞リンパ芽球性白血病、T細胞リンパ芽球性白血病または骨髄腫の細胞であり得る (例えば、Parkら、Molec. Therap.、17巻、219頁、2009年)。

10

【 0 0 8 9 】

別の態様では、本開示は、本明細書で提供するポリペプチド複合体をコードする有効量の細胞またはその組成物をそれを必要とする被験体に投与することを含む、悪性疾患 (例えば、固形悪性疾患または血液学的悪性疾患) の成長、転移または転移成長を抑制する方法を提供する。

20

【 0 0 9 0 】

固形悪性疾患または血液学的悪性疾患を含む、様々ながんは、本明細書で開示する組成物および方法に感受性 (amenable) である。処置することができる種類のがんは、乳房、前立腺、膵臓、結腸および直腸の腺癌 ; 肺のすべての型の気管支原性癌 (扁平上皮癌、腺癌、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む) ; 骨髄系 (myeloid) ; 黒色腫 ; 肝がん ; 神経芽腫 ; 乳頭腫 ; アドノーマ ; 分離腫 ; 嚢腫 ; 悪性カルチノイド症候群 ; カルチノイド心疾患 ; ならびに癌腫 (例えば、ウォーカー、基底細胞、基底有棘細胞、ブラウン - ピアス、管、エールリッヒ腫瘍、クレブス2、メルケル細胞、粘液性、非小細胞肺、エンバク細胞、乳頭、硬性、細気管支、気管支原性、扁平上皮細胞および移行細胞) を含む。処置することができるさらなる種類のがんは、組織球性障害 ; 白血病 ; 組織球性悪性 ; ホジキン病 ; 非ホジキンリンパ腫 ; 形質細胞腫 ; 細網内皮症 ; 黒色腫 ; 腎細胞癌 ; 軟骨芽細胞腫 ; 軟骨腫 ; 軟骨肉腫 ; 線維腫 ; 線維肉腫 ; 巨細胞腫 ; 組織球腫 ; 脂肪腫 ; 脂肪肉腫 ; 中皮腫 ; 粘液腫 ; 粘液肉腫 ; 骨腫 ; 骨肉腫 ; 脊索腫 ; 頭蓋咽頭腫 ; 未分化胚細胞腫 ; 過誤腫 ; 間葉腫 ; 中腎腫 ; 筋肉腫 ; エナメル上皮腫 ; セメント質腫 ; 歯牙腫 ; 奇形腫 ; 胸腺腫 ; 栄養膜腫瘍を含む。

30

【 0 0 9 1 】

さらに、以下の種類のがんも処置に感受性であると考えられる : 腺腫 ; 胆管腫 ; コレステリン腫 ; 円柱腫 (cylindroma) ; 嚢胞腺がん ; 嚢胞腺腫 ; 顆粒膜細胞腫 ; 半陰陽性卵巣腫瘍 ; 肝がん ; 汗腺腫 ; 膵島細胞腫瘍 ; ライジッヒ細胞腫 ; 乳頭腫 ; セルトリ細胞腫 ; 卵胞膜細胞腫 ; 平滑筋腫 (leiomyoma) ; 平滑筋肉腫 ; 筋芽細胞腫 ; 筋腫 (myoma) ; 筋肉腫 ; 横紋筋腫 ; 横紋筋肉腫 ; 上衣腫 ; 神経節神経腫 ; 神経膠腫 ; 髄芽腫 ; 髄膜腫 ; 神経鞘腫 ; 神経芽細胞腫 ; 神経上皮腫 ; 神経線維腫 ; 神経腫 ; 傍神経節腫 ; 非クロム親和性傍神経節腫 ; および多形膠芽細胞腫。処置することができる種類のがんは、被角血管腫 ; 好酸球増加随伴性血管類リンパ組織増殖症 ; 硬化性血管腫 ; 血管腫症 ; グロムス血管腫 ; 血管内皮腫 ; 血管腫 ; 血管外皮細胞腫 ; 血管肉腫 ; リンパ管腫 ; リンパ管筋腫 ; リンパ管肉腫 ; 松果体腫 ; 癌肉腫 ; 軟骨肉腫 ; 葉状嚢肉腫 ; 線維肉腫 ; 血管肉腫 ; 平滑筋肉腫 ; 白血肉腫 (leukosarcoma) ; 脂肪肉腫 ; リンパ管肉腫 ; 筋

40

50

肉腫；粘液肉腫；卵巣癌腫；横紋筋肉腫；肉腫；新生物；神経線維腫症（*nerofibromatosis*）；および子宮頸部異形成をも含む。

【0092】

本明細書で開示する組成物および方法にも感受性であるさらなる例示的ながんは、B細胞リンパ腫〔様々な種類のホジキン病、非ホジキンリンパ腫（*NHL*）または中枢神経系リンパ腫など〕、白血病〔急性リンパ芽球性白血病（*ALL*）、慢性リンパ球性白血病（*CLL*）、ヘアリーセル白血病および慢性骨髄芽球性白血病（*myoblastic leukemia*）など〕ならびに骨髄腫（多発性骨髄腫など）を含む、B細胞がんである。さらなるB細胞がんは、小リンパ球性リンパ腫、B細胞性前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、骨の孤立性形質細胞腫、骨外性形質細胞腫、粘膜関連（*MALT*）リンパ組織型節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦郭（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、パーキットリンパ腫/白血病、悪性の可能性のあるB細胞増殖、リンパ腫様肉芽腫症および移植後リンパ増殖性障害を含む。

10

【0093】

ある特定の実施形態では、固形悪性疾患の成長または固形悪性疾患もしくは血液学的悪性疾患の転移もしくは転移成長を抑制するのに有用な抗原結合タンパク質をコードする細胞は、腫瘍またはがん抗原およびがん細胞上の第2の標的抗原に特異的に結合するものを含む。

20

【0094】

医療分野の当業者により理解されるように、「処置する」および「処置」という用語は、被験体（すなわち、ヒトまたは非ヒト動物であり得る、患者、宿主）の疾患、障害または状態の医学的管理を指す（例えば、*Stedman's Medical Dictionary*を参照）。一般的に、適切な用量および処置レジメンは、ヒト標的抗原に特異的な抗原結合タンパク質（例えば、*CAR*）または高親和性組換えTCRのうちの1つもしくは複数を、それを発現する宿主T細胞に、また任意選択で補助療法（例えば、*IL-2*、*IL-15*、*IL-21*またはそれらの任意の組合せなどのサイトカイン）を、治療的または予防的利益をもたらすのに十分な量で与える。治療的処置または予防的もしくは防止的方法によって得られる治療的または予防的利益は、例えば、臨床転帰の改善を含み、その目的は、望ましくない生理学的変化もしくは障害を防止もしくは遅延または別の方法で低減すること（例えば、無処置対照と比べて統計的に有意な低減）、あるいはそのような疾患または障害の拡大または重症度を防止、遅延または別の方法で低減することである。被験体を処置することによる有益なもしくは所望の臨床的結果は、処置される疾患または障害に起因するまたは関連する症状の除去、軽減もしくは緩和；症状の発生の減少；生活の質の改善；より長い無病状態（すなわち、被験体が疾患の診断が下されることに基づく症状を示す可能性または傾向の減少）；疾患の程度の低下；疾患の安定化（すなわち、悪化しない）状態；疾患の進行の遅延もしくは緩徐化；疾患状態の改善または緩和；および検出可能もしくは検出不可能であるかを問わず、寛解（部分的もしくは完全であるかを問わず）；または全生存を含む。

30

40

【0095】

「処置」は、被験体が処置を受けなかった場合に予想された生存期間と比較した場合の生存期間の延長も意味し得る。本明細書に記載する方法および組成物を必要とする被験体は、疾患または障害を既に有する被験体、ならびに疾患または障害を有する傾向があるあるいは発生させるリスクがある被験体を含む。予防的処置を必要とする被験体は、疾患、状態または障害を防止すべき被験体を含む（すなわち、疾患または障害の発生または再発の可能性を低減する）。本明細書に記載する組成物（および組成物を含む調製物）ならびに方法によってもたらされる臨床的利益は、*in vitro*アッセイ、前臨床研究、および実施例に記載するように、組成物の投与が利益を受けることを目的とする被験体における臨床研究の設計および実行によって評価することができる。

50

【 0 0 9 6 】

本明細書に記載する、ヒト疾患関連抗原に特異的な抗原結合タンパク質または高親和性組換え T C R を発現する細胞、加えて標的抗原を発現する細胞は、薬学的にまたは生理学的に許容されるまたは適切な賦形剤または担体において被験体に投与することができる。薬学的に許容される賦形剤は、ヒトまたは他の非ヒト哺乳動物被験体への投与に適している、生物学的に適合性のビヒクル、例えば、本明細書でより詳細に記載する、生理食塩水である。

【 0 0 9 7 】

治療有効用量は、処置されるヒトまたは非ヒト哺乳動物における臨床的に望ましい結果をもたらすことができる養子移入に使用される宿主 T 細胞（ヒト疾患関連抗原に特異的な抗原結合タンパク質または高親和性組換え T C R を発現する）および標的抗原を発現する細胞の量（すなわち、抗原を過剰発現する細胞に対する特異的 T 細胞免疫応答（例えば、細胞傷害性 T 細胞応答）を統計的に有意に誘導または増強するのに十分な量）である。医療分野で周知のように、いずれかの患者に対する投与量は、患者のサイズ、体重、体表面積、年齢、施行される個別の療法、性別、投与時間および経路、一般健康状態ならびに同時に投与される他の薬物を含む、多くの因子に依存する。用量は、変化するが、本明細書に記載する組換え発現ベクターを含む宿主細胞の投与のための好ましい用量は、約 10^6 細胞 / m^2 、約 5×10^6 細胞 / m^2 、約 10^7 細胞 / m^2 、約 5×10^7 細胞 / m^2 、約 10^8 細胞 / m^2 、約 5×10^8 細胞 / m^2 、約 10^9 細胞 / m^2 、約 5×10^9 細胞 / m^2 、約 10^{10} 細胞 / m^2 、約 5×10^{10} 細胞 / m^2 、または約 10^{11} 細胞 / m^2 である。

【 0 0 9 8 】

医薬組成物は、医療分野の当業者によって決定される処置（または防止）すべき疾患または状態に適切な方法で投与することができる。組成物の適切な用量ならびに好適な投与の期間および頻度は、患者の健康状態、患者のサイズ（すなわち、体重、大きさ（*mass*）または身体の面積（*body area*））、患者の疾患の種類および重症度、有効成分の特定の形態、ならびに投与方法のような因子により決定される。一般的に、適切な用量および処置レジメンは、治療的および/または予防的利益（より高頻度の完全または部分寛解、あるいはより長い無病および/または全生存期間、あるいは症状の重症度の軽減などの、臨床転帰の改善を含む、本明細書に記載するような）をもたらすのに十分な量の組成物（複数可）を提供する。予防的使用のために、用量は、疾患または障害に関連する疾患を防止する、その発症を遅延させる、またはその重症度を低減するのに十分であるべきである。本明細書に記載する方法に従って投与される免疫原性組成物の予防的利益は、すべてが当業者により容易に実施され得る、前臨床（*in vitro* および *in vivo* 動物試験を含む）ならびに臨床研究を実施し、それにより得られたデータを適切な統計学的、生物学的および臨床的方法ならびに技術により解析することによって決定することができる。

【 0 0 9 9 】

抗原過剰発現に関連する状態は、抗原に関連する細胞事象または分子事象の活性低下（*under activity*）、過剰活性（*over activity*）または不適切な活性が存在し、正常細胞と比較して、罹患細胞（例えば、白血病細胞）における異常に高い（統計的有意性を有する）レベルの抗原発現に一般的に起因する任意の障害または状態を含む。そのような障害または状態を有する被験体は、現在述べている実施形態の組成物または方法による処置が有益である。したがって、抗原過剰発現に関連するいくつかの状態は、被験体を特定の障害に罹患させる素因となる病的状態などの、急性ならびに慢性障害および疾患を含み得る。

【 0 1 0 0 】

抗原過剰発現に関連する状態のいくつかの例は、腫瘍、新生物、がん、悪性疾患等を含む被験体における活性化および/または増殖性細胞（転写的に過剰活動性でもあり得る）の状態を指す、過剰増殖性障害を含む。活性化または増殖性細胞に加えて、過剰増殖性障害

10

20

30

40

50

は、壊死によるかまたはアポトーシスによるかを問わず、細胞死過程の異常または調節不全も含み得る。細胞死過程のそのような異常は、がん（原発性、二次性悪性疾患ならびに転移を含む）または他の状態を含む、様々な状態に関連し得る。

【0101】

ある特定の実施形態によれば、抗原発現または過剰発現によって特徴付けられる、血液学的がん（例えば、急性骨髄性白血病（AML）を含む白血病、TまたはB細胞リンパ腫、骨髄腫、およびその他）を含む、実質的にいかなる種類のがんは、本明細書で開示した組成物および方法の使用により処置することができる。さらに、「がん」は、固形腫瘍、腹水腫瘍、血液またはリンパまたは他の悪性疾患；結合組織悪性疾患；転移性疾患；臓器または幹細胞の移植後の微小残存病変；多剤耐性がん、原発性または二次性悪性疾患、悪性疾患に関連する血管新生、または他の種類のがんを含む、任意の細胞の加速増殖を指し得る。上記の種類の疾患の1つのみが含まれる、または標的抗原の過剰発現によって特徴付けられるか否かにかかわらずに特定の状態を除外することができる、特定の実施形態も現在開示している実施形態の範囲にあると考えられる。

10

【0102】

本明細書において予期される処置または防止の特定の方法は、細胞の染色体に安定に組み込まれる本明細書に記載する所望の核酸分子を含む宿主細胞（自己、同種異系または同系であり得る）を投与することを含む。例えば、そのような細胞組成物は、養子免疫療法として所望の抗原標的化T細胞組成物を抗原発現細胞組成物と共に被験体に投与するために自己、同種異系または同系免疫系細胞（例えば、T細胞、抗原提示細胞、ナチュラルキラー細胞）を使用して *ex vivo* で得ることができる。

20

【0103】

本明細書で使用される場合、組成物の投与または療法の実施は、送達の経路または様式にかかわらず、被験体にそれを送達することを指す。投与は、連続的にまたは間欠的に、非経口的に実施することができる。投与は、認識された状態、疾患もしくは疾患状態を有すると既に確認された被験体を処置するため、またはそのような状態、疾患もしくは疾患状態を発生させやすいまたはリスクがある被験体を処置するためであり得る。補助療法との共投与は、任意の順序でのおよび任意の投与スケジュールに基づく複数の薬剤の同時および/または逐次的送達を含み得る（例えば、抗原特異的組換え宿主T細胞および抗原発現細胞と1つまたは複数のサイトカイン；カルシニューリン阻害剤、コルチコステロイド、微小管阻害剤、低用量のミコフェノール酸プロドラッグまたはそれらの任意の組合せなどの免疫抑制療法）。

30

【0104】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載する組換え宿主T細胞の複数回用量を被験体に投与するが、これを約2～約4週間の投与の間隔で投与し、また被験体に本明細書に記載する抗原発現細胞を組換え（改変）T細胞の投与と同時に、並行してまたはその後に任意選択で投与することができる。さらなる実施形態では、被験体にサイトカインの投与前に組換え宿主T細胞が少なくとも3または4回投与された場合、サイトカインが逐次的に投与される。ある特定の実施形態では、サイトカインを皮下に投与する（例えば、IL-2、IL-15、IL-21）。なおさらなる実施形態では、処置を受けている被験体は、カルシニューリン阻害剤、コルチコステロイド、微小管阻害剤、低用量のミコフェノール酸プロドラッグまたはそれらの任意の組合せなどの免疫抑制療法をさらに受けている。なおさらなる実施形態では、処置を受けている被験体は、非骨髄破壊的または骨髄破壊的造血細胞移植（例えば、自己、同種異系）を既に受けており、処置は、骨髄破壊的または非骨髄破壊的造血細胞移植の少なくとも2～少なくとも3ヵ月後に施行することができる。

40

【0105】

治療用または医薬組成物の有効量は、本明細書に記載するように、必要とされる投与量および期間で、所望の臨床結果または有益な処置を達成するのに十分な量を指す。有効量は、1回または複数回の投与で送達することができる。投与が疾患または疾患状態を有する

50

ことが既に知られているかまたは確認されている被験体に対するものである場合、「治療量」という用語を処置に関して使用することができるが、疾患または疾患状態を発生させやすいまたは発生させる（例えば、再発の）リスクがある被験体に防止的な過程として有効量を投与することを記載するために「予防的有効量」を使用することができる。

【0106】

CAR - CTL免疫応答のレベルは、本明細書に記載し、当技術分野で通常実施されている多くの免疫学的方法のいずれか1つにより測定することができる。CAR - CTL免疫応答のレベルは、本明細書に記載する改変造血幹細胞、免疫系細胞（例えば、T細胞）またはそれらの任意の組合せのいずれか1つの投与の前および後に測定することができる。CTL活性を測定するための細胞毒性アッセイは、当技術分野で通常実施されているいくつかの技術および方法のいずれか1つを使用して実施することができる（例えば、Henkartら、「Cytotoxic T - Lymphocytes」 in *Fundamental Immunology*, Paul (編) (2003年 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA) 1127 ~ 50 頁およびそれにおける参考文献を参照)。

10

【0107】

抗原特異的T細胞応答は、適切な文脈で同族抗原（例えば、改変T細胞を刺激（prime）または活性化するために使用される抗原またはAg - APC）に曝露したT細胞と代わりに構造的に異なるまたは無関係の対照抗原に曝露した同じ供給源集団からのT細胞との間で行うことができる本明細書に記載するT細胞機能パラメーター（例えば、増殖、サイトカイン放出、CTL活性、改変細胞表面マーカー表現型等）のいずれかによる観察されたT細胞応答の比較によって一般的に測定される。対照抗原に対する応答より、統計的有意性を伴って、大きい同族抗原に対する応答は、抗原特異性を意味する。

20

【0108】

生物学的試料は、本明細書に記載する免疫応答の存在およびレベルを決定するために被験体から得ることができる。「生物学的試料」は、本明細書で使用される場合血液試料（それから血清または血漿を調製することができる）、生検標本、体液（例えば、肺洗浄液、腹水、粘膜洗浄液、滑液）、骨髄、リンパ節、組織外植片、臓器培養物または被験体もしくは生物学的供給源からの任意の他の組織もしくは細胞調製物であり得る。生物学的試料はまた、任意の免疫原性組成物を受ける前の被験体から得ることができ、この生物学的試料は、ベースライン（すなわち、免疫療法前）データを確立するための対照として有用である。

30

【0109】

本明細書に記載する医薬組成物は、密封アンプルまたはバイアルなどの、単位用量または多用量容器で提示されることができる。そのような容器は、用時まで製剤の安定性を保つために凍結することができる。ある特定の形態では、単位用量は、本明細書に記載する組換え宿主細胞を約 10^6 細胞/ m^2 ~ 約 10^{11} 細胞/ m^2 の用量で含む。適切な投与および処置レジメンの開発は、例えば、製剤の非経口または静脈内投与を含む、様々な処置レジメンで本明細書に記載する特定の組成物を使用するためである。

【0110】

対象組成物を非経口的に投与する場合、組成物は、滅菌水性または油性溶液または懸濁物も含み得る。適切な非毒性で、非経口的に許容される希釈剤または溶媒は、水、リンゲル液、等張性塩溶液、1, 3 - ブタンジオール、エタノール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール（水との混合物中の）を含む。水溶液または懸濁物は、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウムまたは酒石酸ナトリウムなどの、1つまたは複数の緩衝剤をさらに含む。もちろん、任意の投与単位製剤を調製するのに使用される任意の物質は、用いられる量で薬学的に純粋で、実質的に非毒性であるべきである。さらに、活性化化合物は、持続放出調製物および製剤に組み込むことができる。単位剤形は、本明細書で使用される場合、処置を受ける被験体に対する単位投与量として適する物理的に個別の単位を指し、各単位は、適切な医薬担体とともに所望の治療効果をもたらす

40

50

ように計算された所定の量の組換え細胞または活性化化合物を含み得る。

【0111】

一般的に、適切な投与量および処置レジメンは、治療的または予防的利益をもたらすのに十分な量の活性分子または細胞を提供する。そのような反応は、処置されていない被験体と比較して処置被験体における臨床転帰の改善（例えば、より高頻度の完全もしくは部分寛解、またはより長い無病生存期間）を確立することによりモニターすることができる。腫瘍タンパク質に対する先在性の免疫応答の増大は、臨床転帰の改善と一般的に相関する。そのような免疫応答は、当技術分野で慣用的なものであり、処置の前後に被験体から得られる試料を使用して実施することができる標準的な増殖、細胞毒性またはサイトカインアッセイを使用して一般的に評価することができる。

10

【実施例】

【0112】

（実施例1）

養子移入免疫療法用のROR1 CAR-T細胞の特徴付け

ヒトおよびマカクの4-1BBおよびCD3 シグナル伝達分子は、高度に保存されており（95%）、CD3 の免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフの100%の同一性が認められる。ROR1 CARがマカクT細胞において機能的であることを保証するために、T細胞にヒトまたはマカクの4-1BBおよびCD3 シグナル伝達ドメインをコードするROR1 CARを形質導入し、ROR1+ 標的細胞の認識を評価した。形質導入T細胞を精製するための選択マーカーを提供するために、アカゲザルtCD19をコードする配列をT2Aリポソームスキップエレメントの下流のベクターに組み込んだ（Bergerら、J. Med. Primatol.、40巻、88頁、2011年）。ヒト4-1BB/CD3 を含むROR1 CARまたはマカク4-1BB/CD3 を含むROR1 CARを形質導入したマカクT細胞によるK562/ROR1腫瘍細胞の認識は、同等であった（図1A）。したがって、ヒトシグナル伝達ドメインを含む構築物を使用したin vivo安全性試験を使用して、このベクターの臨床への移行の可能性を評価した。

20

【0113】

養子移入実験のために、末梢血液の試料を3匹の成体rhesus macaqueから取得し、各動物からのPBMCを抗CD3/CD28 mAbにより刺激し、次いでT細胞にROR1 CARレトロウイルスベクターを形質導入した。tCD19の共発現により測定したCD4+およびCD8+ T細胞の平均形質導入効率は、28.2%（6.6~58.1%）であり、形質導入細胞を形質導入の4~5日後に免疫磁気選択により90%を超える純度まで濃縮した（図1B）。拡大の後、第2の免疫磁気選択を実施して、CD4+およびCD8+ CAR-T細胞を精製し、各サブセットを別個に拡大して、1:1混合物の処方を実現した。これは、各養子移入実験におけるROR1 CAR-T細胞の均一な組成を保証した。さらに、EGFRtまたはtCD34を発現するように改変した自己CD4+およびCD8+ T細胞を生成し、ROR1 CAR-T細胞との共注入のための対照形質導入CD4+およびCD8+ T細胞の1:1混合物として調製した。

30

【0114】

CD4+およびCD8+ T細胞におけるROR1 CARの機能は、K562/ROR1細胞との共培養の後に細胞毒性、増殖およびサイトカイン放出アッセイにより確認した。CD8+ ROR1 CAR-T細胞は、K562/ROR1標的をCD4+ ROR1 CAR-T細胞より効率的に溶解し（図1C）、両サブセットは、K562/ROR1細胞に反応して増殖し、サイトカインを特異的に産生させた（図1D）。

40

【0115】

（実施例2）

ROR1 CAR-T細胞はin vivoで機能する

自己ROR1 CAR-T細胞を安全に移入することができるかどうかを決定し、in vivoでのそれらの持続性および移動を解析するために、 1×10^8 個のROR1 CA

50

R - T細胞 / kg (1 : 1 の CD 4 : CD 8 比) の用量を 1 匹のマカクに投与した。この細胞の用量は、マカクに安全に投与された CMV 特異的 T 細胞の用量より低いが、CD 19 + B 細胞悪性疾患に対する CAR - T 細胞療法の臨床試験 (Maus ら、Blood、123 巻、2625 頁、2014 年) に使用された用量に等しいかまたは超えている。並行して、同じ用量の EGFRt + T 細胞を、細胞の持続性および移動についての対照に投与した。動物を、T 細胞の注入の後に発熱、呼吸困難、食欲、下痢および体重減少についてモニターし、注入前後の血液試料を CBC、血清化学およびサイトカインレベルについて検査した。即時または遅延型の臨床的異常は、この細胞用量では観察されなかった。T 細胞の注入の前の動物の鎮静のための筋肉内 (i . m .) ケタミン注射後にマカクで観察された筋肉由来のクレアチンホスホキナーゼ (CPK) の一過性の増加は別として、体重、CBC および血清化学は、正常限界内に留まっていた (図 2 A)。IFN - および IL - 6 の血漿レベルが ROR1 CAR - T 細胞の後の 1 日目に増加したが、3 日目までに正常に戻った (図 2 B)。IFN - および IL - 6 の増加は、別の動物へのマーカー遺伝子のみを形質導入した自己 T 細胞の 5 倍高い細胞用量の移入後には観察されず (データは示さず)、これは、ROR1 CAR - T 細胞を注入した後のサイトカインレベルの上昇が *in vivo* での CAR - T 細胞の一時的な活性化を反映していたことを示すものである。

10

【 0 1 1 6 】

血液中の ROR1 CAR - T 細胞および対照 T 細胞の頻度の解析により、注入後の最も早い時点で差が始まっていたことが明らかになった。ROR1 CAR - T 細胞は、注入の 1 日後に血液中に 0 . 3 % の CD 4 + および 0 . 8 % の CD 8 + T 細胞 (7 細胞 / μ L および 6 細胞 / μ L) の頻度で検出され、次の 2 週間にわたり 4 ~ 11 細胞 / μ L のレベルで持続していた。対照 CD 4 + および CD 8 + EGFRt + T 細胞の頻度は、1 日目により高かった (137 細胞 / μ L および 36 細胞 / μ L に対応する 6 . 2 % の CD 4 + および 4 . 6 % の CD 8 + T 細胞)。EGFRt + T 細胞は、4 週間の追跡中に 6 ~ 13 細胞 / μ L の安定レベルに徐々に低下した (図 2 C ~ D)。導入遺伝子特異的配列の qPCR 解析により、*in vivo* での持続性の異なるパターンが確認された (図 2 E)。

20

【 0 1 1 7 】

持続性データは、ROR1 CAR - T 細胞が血液から、おそらく ROR1 が発現され得る組織中に移動し得ることを示すものであった。骨髄 (BM) における未熟 B 細胞のサブセットが ROR1 を発現し、養子移入されたマカク T 細胞が BM およびリンパ節 (LN) に移動することが以前に示された (Hudecek ら、Blood、116 巻、4532 頁、2010 年)。したがって、注入前および注入後 5 日目に得た BM および LN 試料のアリコートで ROR1 + B 細胞および移入 T 細胞両方の存在について検査した。EGFRt + および ROR1 CAR - T 細胞が注入後 5 日目の BM および LN 試料中に存在していたが、ROR1 CAR - T 細胞は、対照 EGFRt + T 細胞より 1 . 1 ~ 2 . 3 倍高い頻度で存在していた (図 3 A)。CD 19 + CD 45 intermediate B 細胞のサブセットを検出するためのゲーティング戦略を、ヒトにおける ROR1 を発現するプレ BII ラージステージ (pre - BII - large stage) の B 細胞を含む、BM 細胞懸濁物について使用した (データは示さず)。ROR1 発現は、T 細胞の注入の前に得られた BM 中の CD 19 + CD 45 intermediate B 細胞のサブセット (8 . 3 %) に検出され、このサブセットは、ROR1 CAR - T 細胞の移入後 5 日目に得られた BM 試料中では除去された (図 3 B)。ROR1 - である、末梢血 CD 19 + B 細胞の数え上げにより、ROR1 CAR - T 細胞が、28 日間の研究にわたり成熟 CD 19 + B 細胞プールに対して影響を及ぼさなかったことが示された (図 3 C)。これらの結果は、移入 ROR1 CAR - T 細胞が、BM に移動し、ROR1 + B 細胞前駆体を認識し、除去したが、臓器毒性をもたらさず、循環成熟 B 細胞を枯渇もさせなかったことを示すものである。

30

40

【 0 1 1 8 】

ROR1 CAR - T 細胞が *in vivo* で機能し続けることを確認するために、注入の

50

1 週後に得られた P B M C を K 5 6 2 / R O R 1 細胞、P M A / イオノマイシンまたは培地単独により刺激した。注入前 P B M C および R O R 1 C A R - T 細胞をアッセイにおける対照とした。刺激の 4 時間後に、C D 8 + T 細胞による抗原認識後の脱顆粒のマーカ-である (C h a n および K a u r , J . I m m u n o l . M e t h o d s , 3 2 5 巻、2 0 頁、2 0 0 7 年)、C D 1 0 7 A の発現について細胞を解析した。C D 1 0 7 A 発現の増加が、刺激後に *i n v i v o* で存続した C D 8 + R O R 1 C A R - T 細胞のサブセットで検出され、この増加は、注入の前の R O R 1 C A R - T 細胞で観察されたものと同様のレベルであった (図 3 D)。したがって、B 細胞前駆体の枯渇を超える観察される臓器毒性の欠如を示す、*i n v i v o* で血液中に存続した移入 R O R 1 C A R - T 細胞が機能し得るままであったことは、R O R 1 C A R - T 細胞の機能不全に起因してい

10

【 0 1 1 9 】

(実施例 3)

R O R 1 C A R - T 細胞は *i n v i v o* で抗原に応答する

より高い C A R - T 細胞用量の注入は、R O R 1 + 悪性疾患を処置するために必要である可能性があり、とりわけ、C A R - T 細胞が、高レベルの R O R 1 を発現する腫瘍細胞の認識により *i n v i v o* で活性化された場合に、正常組織に対する毒性を示す可能性がある。マカクにおける B 細胞上の R O R 1 発現の解析中に、ヒトと異なり、一部の動物が R O R 1 を発現する L N における高頻度の成熟 B 細胞を有することが観察された (データは示さず)。L N に高レベルの R O R 1 + B 細胞を有する 2 匹の動物をより高用量 ($5 \times 10^8 / \text{kg}$) の R O R 1 C A R - T 細胞の安全性の解析に選択した。なぜなら、最初の動物における経験で、R O R 1 + B 細胞の減少が C A R - T 細胞の *i n v i v o* 機能の代用となることが示唆されたからである。C D 3 4 の濃縮が E G F R t 選択より効率的であったため、t C D 3 4 をこれらの動物における対照 T 細胞におけるマーカ-遺伝子として使用した。これにより、この実験に必要なより高い T 細胞用量を得ることが促進された。*i n v i v o* での R O R 1 C A R - T 細胞の活性化が毒性を示す可能性を最大限にするために、毒性が以前に観察されなかった場合、C A R - T 細胞の投与の 5 日後に細胞表面 t R O R 1 を発現するようにトランスフェクトした自己 T 細胞の注入を使用した (図 4 A)。

20

【 0 1 2 0 】

より高い用量の R O R 1 C A R - T 細胞は、耐容性が良好であり、C D 4 + および C D 8 + R O R 1 C A R - T 細胞が両動物で容易に検出できたが、養子移入の 1 日後の血液中の対照 t C D 3 4 T 細胞と比較して R O R 1 C A R - T 細胞の頻度の低下が再び観察された (図 4 B)。対照動物における t C D 1 9 または t C D 3 4 のみによりマークした T 細胞の共注入が *i n v i v o* で両集団の同等に高いレベルをもたらした (データは示さず) ことから、ピーク頻度の差は、移動に影響を及ぼし得るマーカ-遺伝子の特有の特性を反映するものでなかった。

30

【 0 1 2 1 】

注入後 3 日目に各動物から得られた P B M C、B M および L N からの細胞懸濁物を移入 T 細胞の存在について染色した。対照 t C D 4 + T 細胞ではなく、R O R 1 C A R - T 細胞が、両動物において P B M C 中より B M 中により高頻度で存在し、L N 中の R O R 1 C A R - T 細胞の頻度は、対照 t C D 4 + T 細胞の頻度を超えていた (図 4 C)。養子移入後 3 日目に B M および L N 中の R O R 1 C A R - T 細胞の蓄積は、処置前の B M および L N と比較して R O R 1 + B 細胞の > 6 5 % ~ 8 0 % の減少と一致していた (図 4 D および 4 E を参照)。これらのデータは、より低用量の R O R 1 C A R - T 細胞で処置した最初の動物で観察されたデータと一致し、移入 R O R 1 C A R - T 細胞が血液から移動し、R O R 1 + B 細胞が存在する部位に蓄積することを示している。

40

【 0 1 2 2 】

R O R 1 C A R - T 細胞を *i n v i v o* で全身的に活性化することが毒性を示すかどうかを決定するために、t R O R 1 を発現するように形質導入した自己 T 細胞 (t R O R +

50

T細胞)を各動物に注入した。in vitroでは、tROR1改変T細胞が自己ROR1 CAR-T細胞によってK562/ROR1細胞と同様に効率的に認識された(データは示さず)。tROR1+T細胞の注入は、いずれの動物においても急性副作用をもたらさず、5~7日にわたりそれぞれ30細胞/μLおよび52細胞/μL(A13011)への、ならびに22細胞/μLおよび34細胞/μL(A13002)へのCD4+およびCD8+ROR1 CAR-T細胞の増加が観察された(図5A)。これは、内因性またはtCD34マークCD4+およびCD8+T細胞の数の実質的な変化を伴わないROR1 CAR-T細胞の7.7倍(A13011)および4.3倍(A13002)での増加に相当していた(図5A~B)。ROR1 CAR-T細胞がtROR+T細胞をin vivoで除去するかどうかを決定するために、T-APCチャレンジ後1、5および7日目に得られたPBMCの試料を循環tROR+T細胞の存在について検査した。A13011では、tROR+T細胞は、移入の1日後にCD8+T細胞の1.0%の頻度で存在し、これらの細胞の大多数は、インプットtROR1+T細胞と比較して低レベルのROR1発現を示したにすぎなかった(図5C)。重要なことに、ROR1^{low}T細胞は、5および7日目までにそれぞれCD8+T細胞の0.3%および<0.1%の頻度にさらに減少した(図5C)。tROR+T細胞の持続性の同様のパターンがA13002で観察され、まれなROR1^{low}T細胞がin vivoで存続していた(データは示さず)。これと対照的に、1、5および7日目における血液中のtROR1+T細胞の頻度は、検出可能なROR1 CAR-T細胞を有さない動物へのこれらのT細胞の注入後に5.5%、8.6%および8.0%であった(図5Cおよび5D)。

10

20

【0123】

要約すると、これは、CAR改変T細胞により認識される同じ抗原を発現する組換えにより作製された「抗原提示細胞」(この場合には抗原をもたらすT細胞であるが、他の免疫系細胞および造血幹細胞さえもAPCとして使用することができる)は、養子移入免疫療法を増強または向上させ得ることを示すものである。

【0124】

上述の様々な実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。本明細書で言及され、かつ/または出願データシートに示された米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許刊行物のすべては、それらの全体として参照により本明細書に組み込まれる。さらなる実施形態を提供するために様々な特許、出願および刊行物の概念を用いることが必要である場合、実施形態の態様を修正することができる。

30

【0125】

上記の詳細な説明に照らして実施形態についてこれらおよび他の変更を行うことができる。一般的に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、特許請求の範囲を、明細書および特許請求の範囲に開示される特定の実施形態に限定すると解釈されるべきではないが、すべての可能な実施形態、加えてそのような特許請求の範囲により権利が与えられる同等物のすべての範囲を含むと解釈すべきである。したがって、特許請求の範囲は本開示に限定されない。

40

50

【図面】

【図 1 A】

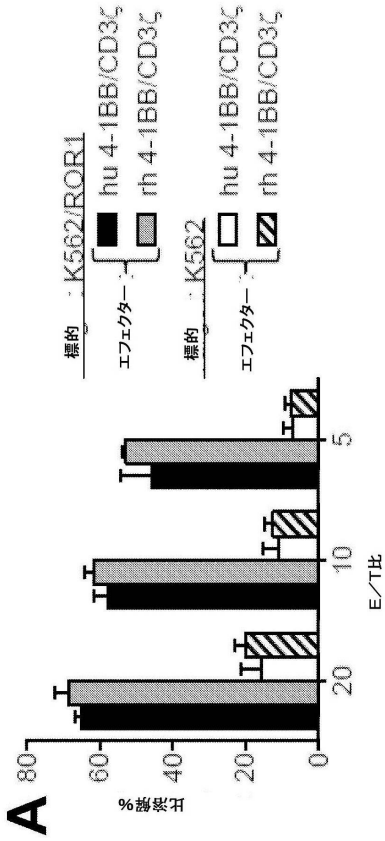


Fig. 1A

【図 1 B】

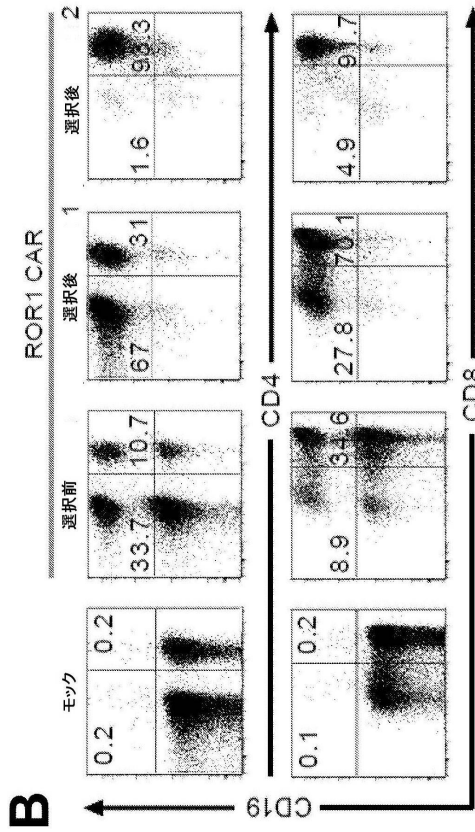


Fig. 1B

【図 1 C】

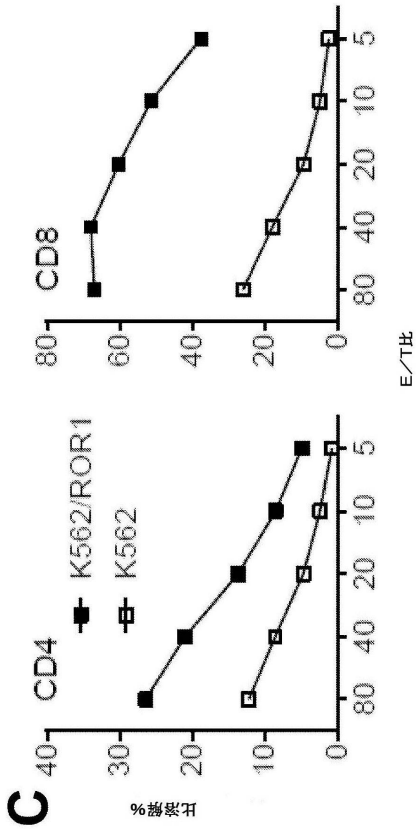


Fig. 1C

【図 1 D】

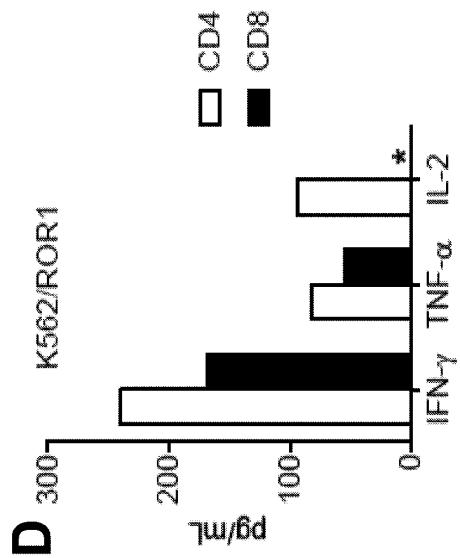


Fig. 1D

10

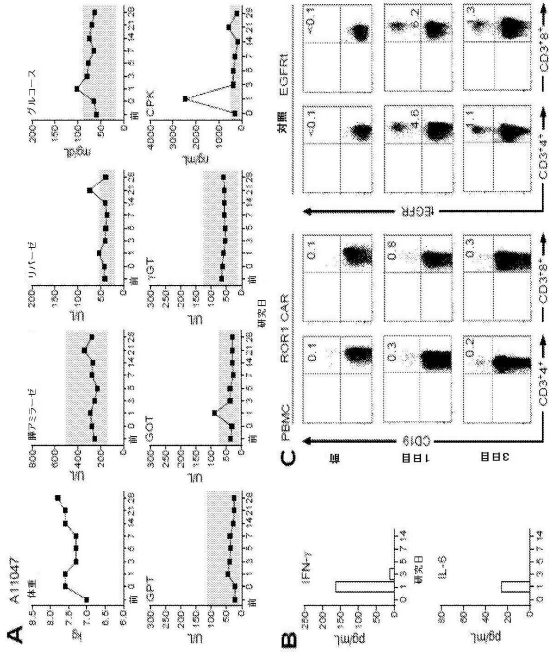
20

30

40

50

【 図 2 - 1 】



Figs. 2A - 2C

【 図 2 - 2 】

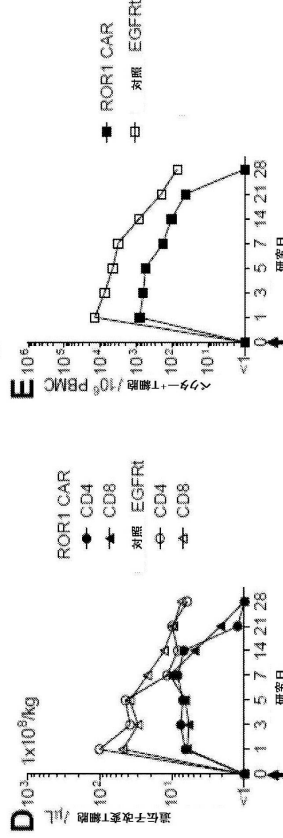
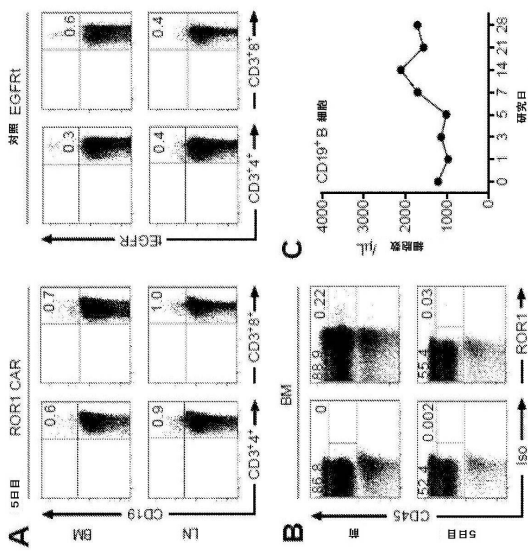


Fig. 2D and 2E

10

20

【 図 3 - 1 】



Figs. 3A - 3C

【 図 3 - 2 】

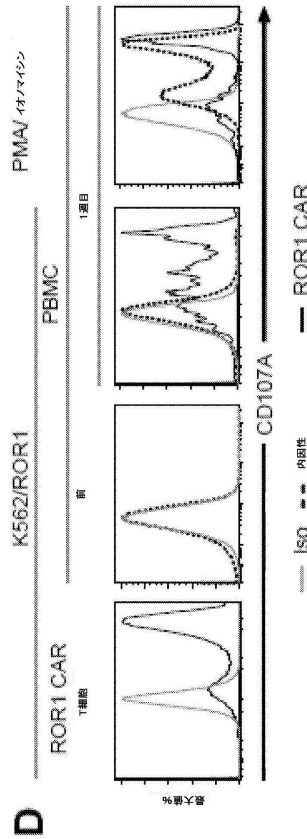


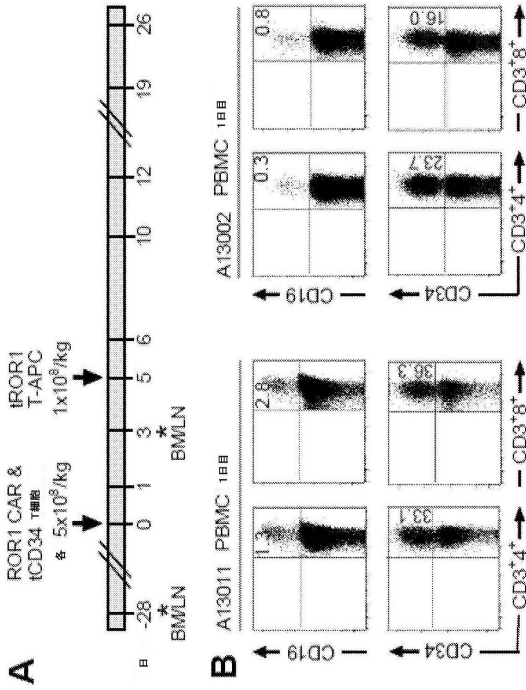
Fig. 3D

30

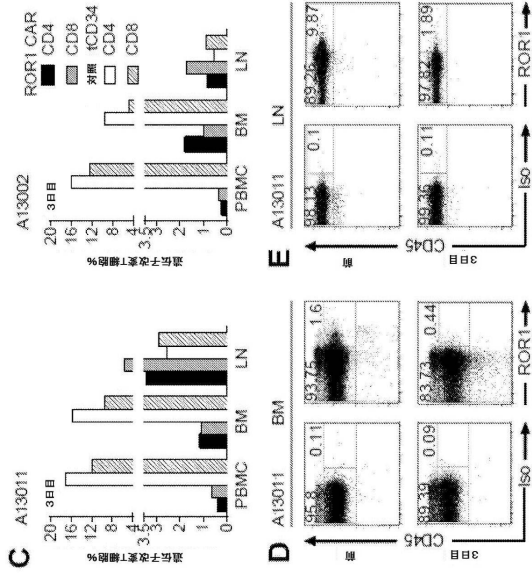
40

50

【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】



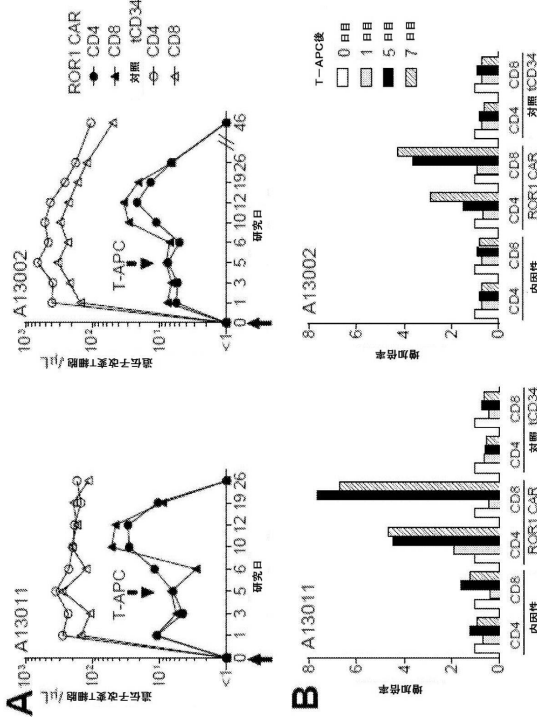
Figs. 4A and 4B

Figs. 4C - 4E

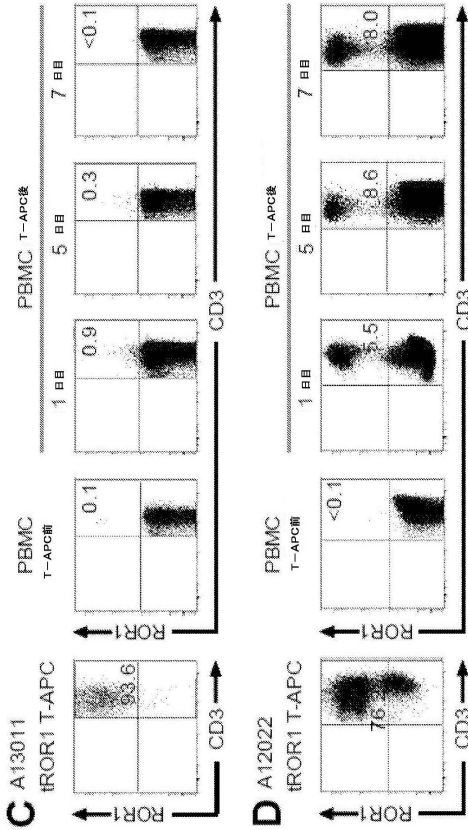
10

20

【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】



Figs. 5A and 5B

Figs. 5C and 5D

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

弁護士 山本 健策

(72)発明者 バーガー, スザンナ キャロライナ
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 5 , シアトル, 1 9 ティーエイチ アベニュー ノースイ
 ースト 6 5 1 9

(72)発明者 リデル, スタンリー アール.
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 7 5 , サマミッシュ, 2 6 8 ティーエイチ プレイス サウ
 スイースト 1 7 6 3

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 特開 2 0 1 3 - 1 1 6 8 9 1 (J P , A)
 特表 2 0 1 4 - 5 1 0 1 0 8 (J P , A)
 Cancer Research , 2004年 , Vol.64 , pp.6783-6790

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
 A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8
 A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)