

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-533928
(P2014-533928A)

(43) 公表日 平成26年12月18日(2014.12.18)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 5/10 (2006.01)
A 61 P 35/02 (2006.01)
A 61 P 35/00 (2006.01)
A 61 P 35/04 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00
C 12 N 5/00
A 61 P 35/02
A 61 P 35/00
A 61 P 35/04

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 B 06 5
4 C 08 4
4 C 08 6
4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2014-530925 (P2014-530925)

(86) (22) 出願日

平成24年9月17日 (2012.9.17)

(85) 翻訳文提出日

平成26年5月7日 (2014.5.7)

(86) 国際出願番号

PCT/US2012/055760

(87) 国際公開番号

W02013/040557

(87) 国際公開日

平成25年3月21日 (2013.3.21)

(31) 優先権主張番号

61/535,608

(32) 優先日

平成23年9月16日 (2011.9.16)

(33) 優先権主張国

米国(US)

(71) 出願人

500429103
ザ ト拉斯ティーズ オブ ザ ユニバ
シティ オブ ペンシルバニア
アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191
04-6283, フィラデルフィア,
チェスナット ストリート 3160,
スイート 200

(74) 代理人

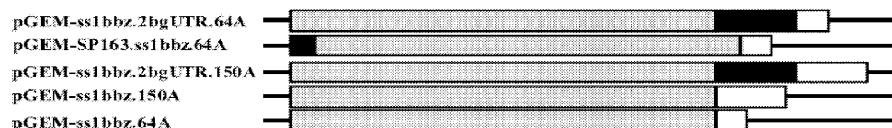
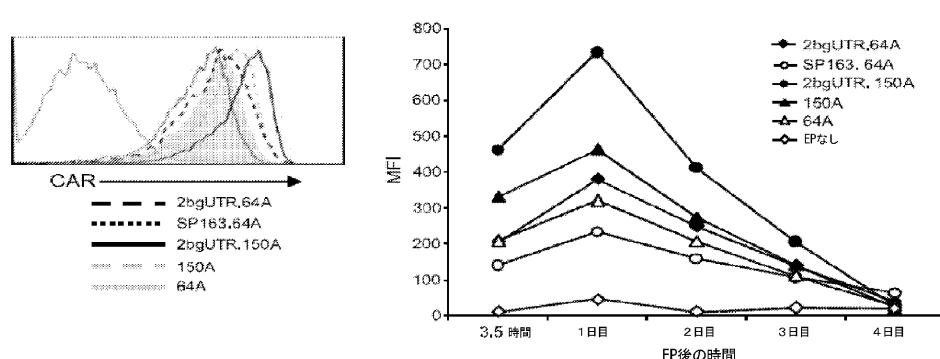
100102978
弁理士 清水 初志
100102118
弁理士 春名 雅夫
100160923
弁理士 山口 裕孝
100119507
弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌を処置するためのRNA操作T細胞

(57) 【要約】

本発明は、RNAキメラ抗原受容体(CAR)でトランスフェクトされたT細胞を作製するための組成物および方法に関する。癌を処置するために、RNA操作T細胞を養子療法において使用することができる。

A**B**

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、およびCD3- のシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む、インビトロで転写されたRNAまたは合成RNA。

【請求項 2】

細胞外ドメインが抗原結合部分を含む、請求項1記載のRNA。

【請求項 3】

抗原結合部分が腫瘍抗原に結合する、請求項2記載のRNA。

【請求項 4】

10

腫瘍抗原が、脳腫瘍、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、胰臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される癌に関連する抗原である、請求項3記載のRNA。

【請求項 5】

pD-A.ss1.OF.BBZ.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:4の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項1記載のRNA。

【請求項 6】

20

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8からなる群より選択される配列を含む、請求項1記載のRNA。

【請求項 7】

pD-A.19.OF.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:5の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項1記載のRNA。

【請求項 8】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、およびSEQ ID NO:24からなる群より選択される配列を含む、請求項1記載のRNA。

【請求項 9】

pD-A.GD2.OF.8TMBBZ.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:28の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項1記載のRNA。

30

【請求項 10】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、およびSEQ ID NO:13からなる群より選択される配列を含む、請求項1記載のRNA。

【請求項 11】

pD-A.cMet.OF.8TMBBZ.2bgUTR.150Aであり、SEQ ID NO:27の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項1記載のRNA。

【請求項 12】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:18からなる群より選択される配列を含む、請求項1記載のRNA。

40

【請求項 13】

補助刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される補助刺激分子の細胞内ドメインを含む、請求項1記載のRNA。

【請求項 14】

核酸配列が、約150アデノシン塩基を含むポリ(A)テールを含む、請求項1記載のRNA。

【請求項 15】

核酸配列が、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRを含む、請求項1記載のRNA。

50

【請求項 1 6】

細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、およびCD3- のシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含むインビトロで転写されたRNAまたは合成RNAを含む、T細胞。

【請求項 1 7】

細胞外ドメインが抗原結合部分を含む、請求項16記載のT細胞。

【請求項 1 8】

抗原結合部分が腫瘍抗原に結合する、請求項17のT細胞。

【請求項 1 9】

腫瘍抗原が、脳腫瘍、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される癌に関連する抗原である、請求項18記載のT細胞。 10

【請求項 2 0】

RNAが、pD-A.ss1.OF.BBZ.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:4の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項16記載のT細胞。

【請求項 2 1】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8からなる群より選択される配列を含む、請求項16記載のT細胞。 20

【請求項 2 2】

RNAが、pD-A.19.OF.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:5の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項16記載のT細胞。

【請求項 2 3】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23およびSEQ ID NO:24からなる群より選択される配列を含む、請求項16記載のT細胞。

【請求項 2 4】

RNAが、pD-A.GD2.OF.8TMBBZ.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:28の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項16記載のT細胞。 30

【請求項 2 5】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、およびSEQ ID NO:13からなる群より選択される配列を含む、請求項16記載のT細胞。

【請求項 2 6】

RNAが、pD-A.cMet.OF.8TMBBZ.2bgUTR.150Aであり、SEQ ID NO:27の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項16記載のT細胞。

【請求項 2 7】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:18からなる群より選択される配列を含む、請求項16記載のT細胞。

【請求項 2 8】

補助刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される補助刺激分子の細胞内ドメインを含む、請求項16記載のT細胞。 40

【請求項 2 9】

核酸配列が、約150アデノシン塩基を含むポリ(A)テールを含む、請求項16記載のT細胞。

【請求項 3 0】

核酸配列が、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRを含む、請求項16記載のT細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

インビトロで転写されたRNAまたは合成RNAをT細胞に導入する工程を含む、外因性RNAを一過的に発現するRNA操作T細胞の集団を作製する方法であって、該RNAが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、およびCD3- のシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む、方法。

【請求項 3 2】

細胞外ドメインが抗原結合部分を含む、請求項31記載の方法。

【請求項 3 3】

抗原結合部分が腫瘍抗原に結合する、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

10

腫瘍抗原が、脳腫瘍、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される癌に関連する抗原である、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

RNAが、pD-A.ss1.OF.BBZ.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:4の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項31記載の方法。

【請求項 3 6】

20

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8からなる群より選択される配列を含む、請求項31記載の方法。

【請求項 3 7】

RNAが、pD-A.19.OF.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:5の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項31記載の方法。

【請求項 3 8】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、およびSEQ ID NO:24からなる群より選択される配列を含む、請求項31記載の方法。

【請求項 3 9】

RNAが、pD-A.GD2.OF.8TMBBZ.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:28の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項31記載の方法。

30

【請求項 4 0】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、およびSEQ ID NO:13からなる群より選択される配列を含む、請求項31記載の方法。

【請求項 4 1】

RNAが、pD-A.cMet.OF.8TMBBZ.2bgUTR.150Aであり、SEQ ID NO:27の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項31記載の方法。

【請求項 4 2】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:18からなる群より選択される配列を含む、請求項31記載の方法。

40

【請求項 4 3】

補助刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される補助刺激分子の細胞内ドメインを含む、請求項31記載の方法。

【請求項 4 4】

核酸配列が、約150アデノシン塩基を含むポリ(A)テールを含む、請求項31記載の方法。

【請求項 4 5】

核酸配列が、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRを含む、請求項31記載の方法。

50

【請求項 4 6】

外因性RNAを一過的に発現するように操作されたT細胞を患者に投与する工程を含む、癌患者を処置する方法であって、該RNAが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、およびCD3- のシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む、方法。

【請求項 4 7】

細胞外ドメインが抗原結合部分を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 4 8】

抗原結合部分が腫瘍抗原に結合する、請求項47記載の方法。

【請求項 4 9】

腫瘍抗原が、脳腫瘍、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される癌に関連する抗原である、請求項48記載の方法。

10

【請求項 5 0】

T細胞の投与を繰り返す工程を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 5 1】

患者に化学療法剤を投与する工程を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 5 2】

RNAが、pD-A.ss1.OF.BBZ.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:4の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項46記載の方法。

20

【請求項 5 3】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8からなる群より選択される配列を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 5 4】

RNAが、pD-A.19.OF.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:5の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項46記載の方法。

30

【請求項 5 5】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、およびSEQ ID NO:24からなる群より選択される配列を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 5 6】

RNAが、pD-A.GD2.OF.8TMBBZ.2bg.150Aであり、SEQ ID NO:28の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項46記載の方法。

40

【請求項 5 7】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、およびSEQ ID NO:13からなる群より選択される配列を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 5 8】

RNAが、pD-A.cMet.OF.8TMBBZ.2bgUTR.150Aであり、SEQ ID NO:27の核酸配列を含むインビトロ転写ベクターから転写される、請求項46記載の方法。

40

【請求項 5 9】

RNAが転写されるDNAが、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:18からなる群より選択される配列を含む、請求項46記載の方法。

【請求項 6 0】

補助刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される補助刺激分子の細胞内ドメインを含む、請求項46記載の方法。

【請求項 6 1】

50

核酸配列が、150アデノシン塩基を含むポリ(A)テールを含む、請求項46記載の方法。

【請求項 6 2】

核酸配列が、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRを含む、請求項46記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願に関する相互参照

本願は、2011年9月16日に出願された米国特許仮出願第61/535,608号に係る優先権を主張する。米国特許仮出願第61/535,608号の内容はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

10

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

造血幹細胞移植(SCT)を受けた患者において移植片対白血病(GVL)の影響が明らかにされており、このことは急性リンパ球性白血病(ALL)が細胞性免疫を介した経路によって制御される可能性があることを示唆しているが、ALLに対するドナーリンパ球注入の効力が比較的乏しいことは白血病細胞の免疫原性が低いことを示唆している。低い腫瘍免疫原性を克服することができ、かつSCTを含む、高リスクで再発性の疾患を処置するのに用いられる標準的なアプローチより毒性の低いALL処置に有効な可能性を秘めている新たな方法を追求する必要がある(Horowitz, et al., 1990, *Blood* 75(3):555-562; Mehta, 1993, *Lymphoma* 10(6):427-432)。

20

【0 0 0 3】

キメラ抗原受容体(CAR)は、腫瘍関連表面抗原に対する抗体ベースの特異性と、特異的な抗腫瘍性細胞性免疫活性を有するT細胞受容体活性化細胞内ドメインを組み合わせた分子である(Eshhar, 1997, *Cancer Immunol Immunother* 45(3-4): 131-136; Eshhar et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(2):720-724; Brocker and Karjalainen, 1998, *Adv Immunol* 68:257-269)。これらのCARを用いると、T細胞活性化および補助刺激シグナルを提供する細胞内ドメインと融合した単鎖Fv(scFv)抗原特異的細胞外領域を介してT細胞はMHC非依存的に一次活性化することができる。第二世代CARおよび第三世代CARも、様々な固形腫瘍および白血病モデルにおいてサイトカイン分泌および抗腫瘍活性を増大させるCD28および/またはCD137(4-1BB)細胞内活性化モチーフを介して適切な補助刺激シグナルを提供することができる(Pinthus, et al., 2004, *J Clin Invest* 114(12):1774-1781; Milone, et al., 2009, *Mol Ther* 17(8):1453-1464; Sadelain, et al., 2009, *Curr Opin Immunol* 21(2):215-223)。

30

【0 0 0 4】

ほとんどの研究者達が、レトロウイルスまたはHIV由来レンチウイルスを介してヒトT細胞へのヒト腫瘍抗原およびHIV抗原の効率的なCAR遺伝子導入を成し遂げており、これらの細胞療法製品の一部が第I/II相臨床試験に進んでいる(Deeks et al., 2002, *Mol Ther* 5(6):788-797; Kershaw, et al., 2006, *Clin Cancer Res* 12(20 Pt 1):6106-6115; Pule, et al., 2008, *Nat Med* 14(11):1264-1270; Till, et al., 2008, *Blood* 112(6):2261-2271)。最近、3人のCLL患者において、CD19を標的とするCAR+T細胞が用いられたことが報告された(Porter et al., 2011, *N Eng J Med*, 365: 725-733)。難治性疾患および高腫瘍量を持つこれらの患者3人のうち2人が4週間後に完全寛解した。これらの応答は維持され、CAR+T細胞は>6ヶ月存続した。このことは、この技術の効力を示唆している。組込み型ウイルスベクターを用いたアプローチには、複数回の細胞分裂にわたって注入細胞表面上にCARが長期発現することを含めて明らかな利点がある。しかしながら、CAR設計イノベーションを素早く取り入れた反復臨床試験は、リリース試験が複雑で、ベクター製造費が高いためにウイルスベクターの使用を実施することが難しい場合がある。さらに、このアプローチを使用する規制上の懸念材料がある。これは、X連鎖性重症複合免疫不全症処置におい

40

50

て造血幹細胞遺伝子改変において用いられるレトロウイルスベクターの場合にはっきりと示されてきた(Hacein-Bey-Abina et al., 2008, *J Clin Invest* 118(9):3132-3142)。これは、レンチウイルスベクターの場合または成熟リンパ球遺伝子改変の状況では理論上の懸念材料であるが、遺伝子療法技術および細胞療法技術の規制機関にとっての問題事項である。

【0005】

エレクトロポレーションを介したmRNAトランスフェクションは、細胞を恒久的に遺伝子組換えしない、補完的な役割を果たす可能性のある遺伝子発現アプローチである。遺伝子療法用途のためにmRNAを使用することは、リポソームを介したトランスフェクションの状況においてMaloneらにより初めて述べられた(Malone, et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(16):6077-6081)。効率的なTCR遺伝子導入のために、初代Tリンパ球への首尾良いmRNAエレクトロポレーションが現在、開発および使用されている(Zhao, et al., 2006, *Mol Ther* 13(1):151-159; Zhao, et al., 2005, *J Immunol.* 174(7):4415-4423)。つい最近、Her2/neu抗原に対するCARがmRNAエレクトロポレーションによってT細胞に導入され、乳癌異種移植片モデルにおいてHer2/neu抗体より有効性が高いことが見出された(Yoon, et al., 2009, *Cancer Gene Ther* 16(6):489-497)。mRNAエレクトロポレーションによってT細胞に導入された、ヒト標的抗原に対する他のCARには、CEAおよびErbB2を標的とするCARが含まれる(Birkholz et al., 2009, *Gene Ther* 16(5):596-604)。腫瘍内注射後の固形腫瘍または局所注射腹腔内モデルにおいて、このアプローチを用いた効力を多数の文献が報告しているが、播種性白血病前臨床モデルにおいて同様の成功は証明されていない。おそらく、播種性モデルでは一過的発現系を用いて効力を実現することは難しいことが原因であろう(Rabinovich, et al., 2009, *Hum Gene Ther* 20(1):51-61)。

10

20

30

【0006】

CD19は、B細胞に限定され、かつ初期プレB細胞ならびに大多数のB細胞白血病およびリンパ腫において発現している表面抗原である(Nadler, et al., 1983 *J Immunol* 131(1):244-250)。このことから、CD19は悪性細胞系列ならびに初期Bリンパ球および成熟Bリンパ球のある特定のサブセットにおいて発現しているが、造血幹細胞では発現していないので標的療法にとって魅力的な抗原となっている。CD19が枯渇すると、CD19陰性前駆集団から正常B細胞プールが最終的に回復するとみなされている(Cheadle et al., 2010, *J Immunol* 184(4):1885-1896)。B細胞悪性疾患および自己免疫障害の処置に用いられる抗CD20モノクローナル抗体であるリツキシマブを手がけた経験から、療法によって誘導されるB細胞欠乏は忍容性が高いことが分かっている(Plosker and Figgitt, 2003, *Drug* 63(8):803-843; van Vollenhoven, et al., 2010, *J Rheumatol* 37(3):558-567)。

【0007】

CTL養子移入はウイルス感染および癌において大いに有望であることを示した。キメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法を用いた期待はずれの結果が何年も続いた後に、改善された培養系および細胞操作技術が、強力な抗腫瘍効果を持つCAR T細胞につながっている(Sadelain et al., 2009, *Curr Opin Immunol* 21:215-23)。最近の臨床試験からの結果は、レトロウイルスベクターを用いて導入されたCARを用いた改善された臨床結果を示している(Tili et al., 2008, *Blood* 112:2261-71; Pule et al., 2008, *Nat Med* 14:1264-70)。おそらく驚くことではないが、これらのCAR T細胞は強い毒性も示す(Brentjens et al., 2010, *Mol Ther* 18:666-8; Morgan et al., 2010, *Mol Ther* 18:843-51)。最近の記事では、より安全なCARの必要性が議論されている(Heslop, 2010, *Mol Ther* 18:661-2; Buning et al., 2010, *Hum Gene Ther* 21:1039-42)。

40

【0008】

従って、CTL養子移入に影響を及ぼす、さらなる組成物および方法を提供するための組成物および方法が当技術分野において緊急に必要とされている。本発明はこの必要性に取り組む。

【発明の概要】

【0009】

50

本発明は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、およびCD3-のシグナル伝達ドメインをコードする核酸を含むインビトロで転写されたRNAまたは合成RNAを提供する。1つの態様において、細胞外ドメインは抗原結合部分を含む。1つの態様において、抗原結合部分は腫瘍抗原に結合する。1つの態様において、腫瘍抗原は、脳腫瘍、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、脾臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される癌に関連する抗原である。

【0010】

1つの態様において、RNAは、pD-A.ss1.0F.BBZ.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:4の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8からなる群より選択される配列を含む。

【0011】

1つの態様において、RNAは、pD-A.19.0F.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:5の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、およびSEQ ID NO:24からなる群より選択される配列を含む。

【0012】

1つの態様において、RNAは、pD-A.GD2.0F.8TMBBZ.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:28の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、およびSEQ ID NO:13からなる群より選択される配列を含む。

【0013】

1つの態様において、RNAは、pD-A.cMet.0F.8TMBBZ.2bgUTR.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:27の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:18からなる群より選択される配列を含む。

【0014】

1つの態様において、補助刺激シグナル伝達領域は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される補助刺激分子の細胞内ドメインを含む。

【0015】

1つの態様において、核酸配列は、約150アデノシン塩基を含むポリ(A)テールを含む。1つの態様において、核酸配列は、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRを含む。

【0016】

本発明はまた、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、およびCD3-のシグナル伝達ドメインをコードする核酸を含むインビトロで転写されたRNAまたは合成RNAを含むT細胞を提供する。1つの態様において、細胞外ドメインは抗原結合部分を含む。1つの態様において、抗原結合部分は腫瘍抗原に結合する。1つの態様において、腫瘍抗原は、脳腫瘍、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、脾臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される癌に関連する抗原である。

【0017】

1つの態様において、RNAは、pD-A.ss1.0F.BBZ.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクター

10

20

30

40

50

から転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:4の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8からなる群より選択される配列を含む。

【0018】

1つの態様において、RNAは、pD-A.19.OF.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:5の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、およびSEQ ID NO:24からなる群より選択される配列を含む。

【0019】

1つの態様において、RNAは、pD-A.GD2.OF.8TMBBZ.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:28の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、およびSEQ ID NO:13からなる群より選択される配列を含む。

【0020】

1つの態様において、RNAは、pD-A.cMet.OF.8TMBBZ.2bgUTR.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:27の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:18からなる群より選択される配列を含む。

【0021】

1つの態様において、補助刺激シグナル伝達領域は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される補助刺激分子の細胞内ドメインを含む。

【0022】

1つの態様において、核酸配列は、約150アデノシン塩基を含むポリ(A)テールを含む。1つの態様において、核酸配列は、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRを含む

【0023】

本発明はまた、外因性RNAを一過的に発現するRNA操作T細胞の集団を作製する方法を提供する。前記方法は、インビトロで転写されたRNAまたは合成RNAをT細胞に導入する工程を含み、RNAは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、およびCD3-のシグナル伝達ドメインをコードする核酸を含む。1つの態様において、細胞外ドメインは抗原結合部分を含む。1つの態様において、抗原結合部分は腫瘍抗原に結合する。1つの態様において、腫瘍抗原は、脳腫瘍、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される癌に関連する抗原である。

【0024】

1つの態様において、RNAは、pD-A.ss1.OF.BBZ.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:4の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8からなる群より選択される配列を含む。

【0025】

1つの態様において、RNAは、pD-A.19.OF.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:5の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、およびSEQ ID NO:24からなる群より選択される配列を含む。

10

20

30

40

50

【0026】

1つの態様において、RNAは、pD-A.GD2.OF.8TMBBZ.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:28の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、およびSEQ ID NO:13からなる群より選択される配列を含む。

【0027】

1つの態様において、RNAは、pD-A.cMet.OF.8TMBBZ.2bgUTR.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:27の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:18からなる群より選択される配列を含む。

10

【0028】

1つの態様において、補助刺激シグナル伝達領域は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される補助刺激分子の細胞内ドメインを含む。

【0029】

1つの態様において、核酸配列は、約150アデノシン塩基を含むポリ(A)テールを含む。1つの態様において、核酸配列は、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRを含む。

20

【0030】

本発明はまた、癌患者を処置する方法を提供する。前記方法は、外因性RNAを一過的に発現するように操作されたT細胞を患者に投与する工程を含む。RNAは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、およびCD3- のシグナル伝達ドメインをコードする核酸を含む。1つの態様において、細胞外ドメインは抗原結合部分を含む。1つの態様において、抗原結合部分は腫瘍抗原に結合する。1つの態様において、腫瘍抗原は、脳腫瘍、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される癌に関連する抗原である。

30

【0031】

1つの態様において、前記方法は、T細胞の投与を繰り返す工程を含む。1つの態様において、前記方法は、患者に化学療法剤を投与する工程を含む。

【0032】

1つの態様において、RNAは、pD-A.ss1.OF.BBZ.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:4の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8からなる群より選択される配列を含む。

【0033】

1つの態様において、RNAは、pD-A.19.OF.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:5の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、およびSEQ ID NO:24からなる群より選択される配列を含む。

40

【0034】

1つの態様において、RNAは、pD-A.GD2.OF.8TMBBZ.2bg.150Aであるインビトロ転写ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターは、SEQ ID NO:28の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、およびSEQ ID NO:13からなる群より選択される配列を含む。

【0035】

1つの態様において、RNAは、pD-A.cMet.OF.8TMBBZ.2bgUTR.150Aであるインビトロ転写

50

ベクターから転写される。1つの態様において、前記ベクターはSEQ ID NO:27の核酸配列を含む。1つの態様において、RNAが転写されるDNAは、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:18からなる群より選択される配列を含む。

【0036】

1つの態様において、補助刺激シグナル伝達領域は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される補助刺激分子の細胞内ドメインを含む。

【0037】

1つの態様において、核酸配列は、約150アデノシン塩基を含むポリ(A)テールを含む。1つの態様において、核酸配列は、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRを含む。

【図面の簡単な説明】

【0038】

本発明の好ましい態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と組み合わせて読めばさらに深く理解されるだろう。本発明を例示するために、本発明において好ましい態様を図面に示した。しかしながら、本発明は、図面に示した態様の正確な配置および手段に限定されないことが理解されるはずである。

【0039】

【図1】UTR改変によるmRNA最適化が、エレクトロポレーション処理されたT細胞におけるCARの高レベル発現を付与することを証明する一連の画像である。図1Aは、5'UTRまたは3'UTRの異なる改変を有するss1-bbz構築物の模式図である。ss1-bbzを含有するpGEMベースのIVTベクター(pGEM-ss1bbz.64A)を、本明細書の他の場所に記載のように3'UTR(2bgUTR.64A)、5'UTR(SP163.64A)、長いポリ(A)テール(150A)、または3'UTRおよび長いポリ(A)(2bgUTR.150A)を付加するように改変した。図1Bは、改変された構築物から作られたRNAをT細胞にエレクトロポレーション処理によって導入し、トランスジーン発現をフローサイトメトリーによって追跡したことを証明する画像である。図1Biは、エレクトロポレーション後1日目のトランスジーン発現のヒストグラムを図示した画像である。図1Biiは、エレクトロポレーション後4日間のCARの平均蛍光強度(MFI)を図示した画像である。データは少なくとも2回の独立した実験を表す。

【図2】RNAキャッピングの最適化が、エレクトロポレーション処理されたT細胞表面におけるCAR発現を向上させ、維持することを証明する一連の画像である。図2Aは、2.5 μg/100 μL T細胞という決まったRNA量において、RC類似体、ARCA、またはCEの使用を含む示されたキャッピング法によってキャッピングされたIVT RNAをT細胞にエレクトロポレーション処理によって導入したことを証明する画像である。エレクトロポレーション(EP)後、示された時間でフローサイトメトリーを用いてMFIを測定することによってトランスジーン発現をモニタリングした。図2Bは、トランスジーンを発現する細胞の画分を確かめるために、前記の実験からのT細胞をフローサイトメトリーによってモニタリングしたことを証明する画像である。図2Cは、10 μg RNA/100 μL T細胞のRNA用量において、ARCA、CE、CEと付加ポリ(A)(CE+A)、CEシステムによって作製されたcap1 RNA(CE1)、またはCEシステムによって作製されたcap1 RNA+酵素ポリ(A)(CE1+A)を含む異なるキャッピング法によってキャッピングされたss1-bbzをコードするIVT RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を図示した画像である。エレクトロポレーション後、3日間、フローサイトメトリー(MFI)によってトランスジーン発現をモニタリングした。データは少なくとも2回の独立した実験を表す。

【図3】規制準拠ベクター構築物から作製したRNAを用いた持効性のRNA CAR発現および機能を証明する一連の画像である。エレクトロポレーションして4時間後に、示されたRNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を、K562-メソまたはK562-CD19と16時間、共培養した。図3Aは、抗原特異的T細胞活性化が4-1BB発現誘導によって検出されたことを証明する画像である。図3Bは、IL-2産生がELISAによって測定されたことを証明す

10

20

30

40

50

る画像である。図3Cは、pD-A.ss1.0F(上)またはpD-A.19.0F(下)から作製した臨床用RNA(10 μg RNA/100 μL T細胞)を刺激済みT細胞にエレクトロポレーション処理によって導入し、示された時間でトランスジーン発現をモニタリングしたことを証明する画像である。図3Dは、エレクトロポレーションして1日後、示されたRNA CARを発現するT細胞をK562-CD19またはK562-メソ標的と4時間共培養した後にCD107a表面移動を測定することによってRNA操作T細胞の機能を試験したことを証明する画像である。エフェクター細胞をCD3でゲーティングした。データは少なくとも2回の独立した実験を表す。

【図4】RNA操作T細胞で処置したマウスにおける血管化した進行腫瘍の退縮を証明する一連の画像である。図4Aは、NOD/scid/ c(-/-)(NSG)マウス(n=6)においてM108注射(s.c.)によって側腹部腫瘍が樹立されたことを証明する画像である。腫瘍を接種して66日後、腫瘍量を等しくするようにマウスを無作為化し、ss1-bbz RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞で処置した。4日ごとに合計4回の注射にわたって、同じ健常ドナーを用いてT細胞(10×10^6 ~ 15×10^6)を腫瘍内注射した。食塩水(saline)で処置したマウスは対照として役立った(n=3)。腫瘍サイズを毎週測定した。図4Bは、NSGマウス(n=6/群)において 8×10^6 個のM108-Luc細胞をi.p.注射することによって播種性i.p.腫瘍が樹立されたことを証明する画像である。58日目から、RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したss1-bbz発現T細胞(1×10^7)を2週間にわたって週2回注射した。CD19-bbz RNA CARを発現するRNA操作T細胞または食塩水を対照として注射した。78日目に、ss1-bbzマウスにおけるルミネセンスシグナルはCD19-bbzマウスと比較して有意に減少した($P < 0.01$)。図4Cは、58日目に、レンチウイルスベクターを用いてss1-bbzCAR発現T細胞(1×10^7)単回注射で処置した1匹のマウスからのBLIを図示した画像である。図4Bに記載の実験のBLIデータをプロットした。バー、SE。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.01$ 。食塩水群のBLIシグナルはイメージングシステムの飽和のために上端が切り捨てられている。

【図5】自己由来RNA操作T細胞の複数回注射によって、異種マウスマodelにおける播種性進行癌の成長が制御されることを証明する一連の画像である。図5Aは、NOD/scid/ c(-/-)マウス(n=30)に 8×10^6 個のM108-Luc腫瘍細胞(i.p.)を注射し、マウスを3つの群に無作為化した後に、腫瘍接種後56日目に、ss1-bbz CAR、対照CD19-bbz CARを発現する、RNAをエレクトロポレーション処理によって導入した自己由来T細胞(10^7 /注射)、または食塩水を用いた療法を開始したことを証明する画像である。自己由来T細胞をi.p.注射し、示したように生存動物を画像化した。T細胞処置開始の5日前に画像化を開始した。最初の6回の投与後に、ss1 CARマウスの腫瘍BLI(38.6%)はCD19 CAR(243.6%)および食塩水マウス(23.7.1%)と比較して有意に減少した($P < 0.001$)。図5Bはカプラン・マイヤー分析を証明する画像である。ss1 CARマウスの生存率中央値はCD19 CARおよび食塩水マウスと比較して有意に延びた($P < 0.05$)。図5Cは、ss1 CARマウスにおいて蓄積した腹水が有意に少なく、総体重変化の平均がCD19 CARマウス群および食塩水マウス群と比較して少なかったことを証明する画像である($P < 0.001$)。

【図6】T細胞表面におけるCARトランスジーン発現の様々なレベルを図示した画像である。活性化T細胞に、示されたシグナル伝達部分を有する抗メソテリンscFv ss1 CARをコードするRNAをエレクトロポレーション処理によって導入した。エレクトロポレーションして19時間後にフローサイトメトリーを用いて表面発現を測定した。RNAなしでエレクトロポレーション処理したT細胞を負の対照として使用した。データは少なくとも2回の独立した実験を表す。

【図7】異なる方法によって作製した、エレクトロポレーション処理によってss1 RNA CARを導入したT細胞を、エレクトロポレーション後1日目に、メソテリンを発現する標的(K562-メソ)または対照標的(K562-CD19)と1:1で共培養し、48時間培養した後に、表面トランスジーン発現(MFI)をフローサイトメトリーによって測定したことを図示した画像である。略語:ARCA、アンチリバースキャッピング類似体; CE1+A、キャッピング酵素1+長いポリ(A); CE1、キャッピング酵素1と64ポリ(A); CE+A、キャッピング酵素+長いポリ(A) 150; RC、通常キャッピング類似体; NoEP、モックエレクトロポレーション処理。データは2回の独立した実験を表す。

10

20

30

40

50

【図8】エレクトロポレーションして20時間後の、臨床グレードIVTベクターpD-A.ss1.0F(ss1.0F)およびpD-A.19.0F(19.0F)から作製したRNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞のトランスジーン発現を親ベクターpDrive-ss1.2bgUTR.150A(pDrive.ss1)およびpDrive-19.2bgUTR.150A(pDrive.19)と比較して図示した画像である。データは少なくとも2回の独立した実験を表す。

【図9】ss1-bbzまたは19-bbz CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞の特異的溶解活性を図示した画像である。エレクトロポレーションして20時間後に、標識K562-CD19またはK562-メソ標的の混合物を10:1のエフェクター:標的比で含有する4時間フローベースCTLアッセイを使用した。右上四半分に列挙したパーセント値は、関連する標的の特異的死滅の計算値である。データは少なくとも2回の独立した実験を表す。

【図10】図4Aに示したように処置したマウスを腫瘍接種後98日目に屠殺し、写真を撮つたことを証明する画像である。矢印は腫瘍を示す。

【図11】図5に記載の腫瘍と同じ自系のRNA操作T細胞の複数回注射を試験する実験のためのBLIおよびT細胞注射のスケジュールを図示した画像である。30匹のマウスに8x106個のM108-Luc腫瘍細胞(IP)を注射し、マウスを3つの群に無作為化した後に、示されたCARをエレクトロポレーション処理によって導入した自己由来T細胞を用いた療法を56日目に開始した。T細胞注射(1回の注射につき 1×10^7 個のT細胞)およびBLIの時間を示した。腫瘍量のベースライン測定値を得るためにT細胞注射の5日前にBLIを開始した。

【図12】最適化されたmRNAエレクトロポレーション手順によって、インビトロでRNA操作T細胞の均一な高レベル表面発現および特異的機能が得られたことを証明する一連の画像である。図12Aは、抗CD3および抗CD28で刺激した末梢血T細胞においてCD19-BBz mRNAをエレクトロポレーションした後、異なる時点において平均蛍光強度(MFI)によって測定したCAR発現を図示した画像である(白抜きヒストグラム)。エレクトロポレーション処理されていないT細胞を負の対照として使用した(塗りつぶしたヒストグラム)。図12Bは、RNA CAR+T細胞がCD19標的を特異的に死滅させることを証明する画像である。標的としてK562-CD19を使用し、対照としてK562-メソを使用して、エレクトロポレーション後の示された日にフローベースCTLアッセイを行った。図12Cは、PBLに、ss1-BBz、CD19-BBzをエレクトロポレーション処理によって導入した、またはmRNAをエレクトロポレーション処理によって導入しなかった(モック)ことを証明する画像である。エレクトロポレーションして4時間後に、T細胞を、K562、NALM-6、またはCD19を発現するK562(K562-CD19)もしくはメソリンを発現するK562(K562-メソ)と共に培養し、CD107a染色について分析した。CD3陽性T細胞をゲーティングした。抗原特異的なCD107a発現しか観察されなかった。図12Dは、エレクトロポレーションして4時間後に、CD19-BBzまたはss1-BBzをコードするmRNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞をK562-メソ標的細胞またはK562-CD19標的細胞と16時間共培養したことを証明する画像である。上清中のIL-2産生をELISAによって測定した。IL-2産生は抗原特異的に有意に増加した($^*=p<0.01$)。データは少なくとも2回の独立した実験を表す。

【図13】RNA CAR+T細胞の潜在的に調整可能なトランスジーン発現およびエフェクター機能を図示した一連の画像である。図13Aは、示された量のCD19-BBz RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したRNA CAR+T細胞のトランスジーン発現を時間の関数として示したことを証明する画像である。エレクトロポレーション処理した19-BBz CAR mRNAのトランスジーン発現のヒストグラム。図13Bは、折れ線グラフとしてプロットした図13Aからのトランスジーン発現データを図示した画像である。図13Aにおいて見られた異なるMFIにもかかわらず低下率は似ている。図13Cは、示された量のRNAをエレクトロポレーション処理によって導入したCAR T細胞を用いたCD19+腫瘍細胞の特異的溶解を図示した画像である。エレクトロポレーション後、1日目(左パネル)および3日目(右パネル)に標的としてK562-CD19を使用したフローサイトメトリー-CTLアッセイを用いて溶解を測定した。1日目に差はほとんど存在しないが、RNA用量と関連する用量依存的な特異的溶解減少が3日目までに観察された。図13Dは、段階希釈した標的細胞(K562-CD19)または対照標的(K562-メソ、1:1)と一緒に培養した、示された量のRNAを用いたRNA操作T細胞(エレクトロポレーション

10

20

30

40

50

ンの4時間後)によるELISAによってアッセイしたIFN- γ 分泌を図示した画像である。IFN- γ 分泌の量は標的の量と共に決まり、CD19 CAR陽性群間で統計学的に有意差がないが、RNA用量が少なくなるとサイトカイン分泌が少なくなる傾向が示唆される。

【図14】インビボでのRNA CARの発現および機能を図示した一連の画像である。図14Aは、ss1-BBzまたはCD19-BBzをエレクトロポレーションして4時間後に 10^7 個のPBLをNOD/SCID/gc^{-/-}ヌル(NSG)マウスにIVまたは腹腔内(IP)に注射したことを証明する画像である。48時間後にマウスを屠殺し、T細胞負の選択キット(Dynal Magnetic Beads)を用いて、末梢血、脾臓、骨髓、および腹腔内洗浄液(IP)からヒトPBLを単離した。精製された細胞を(汎特異的(panspecific)ヤギ抗マウスIgGを介して)ヒトCD3およびCARが発現しているかどうか染色し、フローサイトメトリーによって分析した。負の選択にもかかわらず、マウス骨髓前駆細胞の有意なバックグラウンド染色が骨髓区画において観察された。CD3+CAR+細胞が血液、脾臓、および腹膜洗浄液から回収されたが、この時点で大腿骨髓からほとんど回収されなかつた。図14Bは、IV経路またはIP経路によりマウスにCD19-BBzを注射した2日後に腹腔内洗浄液から回収した精製T細胞をフローベースCTLアッセイにおいて使用したことを図示した画像である。2日間インビトロ培養されている、CD19-BBz RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞(CD19インビトロ)およびモックエレクトロポレーション処理T細胞(mRNAなし)を対照として使用した。グラフは、K562-CD19標的またはK562-メソ標的に対する精製PBLのパーセント溶解を示す。回収されたCAR CTLにおいて観察された標的特異的溶解は、インビトロ培養されたCAR+PBLの標的特異的溶解に匹敵し、mRNAなしの対照より有意に高い($p<0.01$)。

【図15】担癌マウスにおけるRNA CARの特異的な輸送および増殖を図示した一連の画像である。図15Aは、NOD/SCID/gc^{-/-}(NSG)マウスに 10^6 個のNaLm-6細胞をIV注射した7日後、示されたmRNA構築物をエレクトロポレーションした4時間後の 5×10^6 個のT細胞をIV注射したことを証明する画像である。T細胞は、ホタルルシフェラーゼを発現するようにレンチウイルス構築物で安定にトランスフェクトされている。バイオルミネセンスがあるかどうかマウスを画像化した。グラフは、示された群($n=8$)それぞれの個々の全光量子束(total photon flux)の平均±標準誤差を示す。図15Bは、CD19 RNA CARが、疾患部位への移動およびRNA操作T細胞の増殖と一致する増加性のバイオルミネセンスシグナルおよび解剖学的分布を示すことを証明する画像である。注射後3日目の光子密度ヒートマップから、モックT細胞、またはメソテリンに対して関係のない特異性を有するRNA CARを発現するT細胞は脾臓(ヒートマップの左側腹部)に消極的にプールし、光子密度を増加させないことが示唆される。このことから増殖は無いことが分かる。 5×10^6 個の細胞から約 2×10^7 p/s/cm²の束が生じ、注射直後の全ての群の間で等しいことに留意のこと。食塩水で処置したマウスは、 5×10^5 p/s/cm²のバックグラウンド自己ルミネッセンスを示す。

【図16】NaLm-6異種移植片モデルにおけるRNA CAR+T細胞の単回注射の治療効力および特異性を図示した一連の画像である。図16Aは、図17と同様にホタルルシフェラーゼを安定発現するように形質導入した 10^6 個のNaLm-6をNSGマウスに注射した後、7日後(矢印)に、CD19-BBzまたはメソ-BBz mRNAをエレクトロポレーション処理によって導入した 2.5×10^7 個のT細胞を単回尾静脈注射したことを証明する画像である。注射後、示された時点で動物を画像化した。Y軸に全光量子束±SEを示した。 5×10^5 p/sec/cm²/srは、ルシフェラーゼ含有細胞を有さないマウスに相当する($^*=p<0.01$)。図16Bは、5日目(処置の2日前)および8日目(CAR+PBLの24時間後)の代表的なマウスにおけるホタルルシフェラーゼ陽性白血病の光子密度ヒートマップを図示した画像である。マウスは同じ白血病負荷量(burden)から開始するが、CD19に対して作られたCAR+PBLは、光子密度により測定された時に疾患負荷量を2log低減させる(が、疾患負荷量はなくならない)。図16Cは、CD19-BBz RNA CAR+T細胞で処置したマウスの生存期間が食塩水対照およびメソ-BBz RNA CAR T細胞群と比較して有意に延びたことを図示した画像である(ログランク分析により $p<0.01$)。図16Dは、RNA CAR CTLを用いた生存期間が、同じモデルにおけるレンチウイルスによって作製したCAR CTLの生存期間と併存しているが、長期間生存したマウスはRNA CAR CTL単回注入では認められないことを図示した画像である。これは、単回注射では疾患は完全になくならないとい

10

20

30

40

50

う本発明者らの観察(n=12、2回の独立した実験の合計)と一致する。

【図17】異種移植NSGマウスにおけるNa1m-6の急速な腫瘍成長および致死性を図示した画像である。NSGマウス(n=8)に、ホタルルシフェラーゼを安定発現するように形質導入した10⁶個のNa1m-6細胞を注射した。注射後の示された時点で動物を画像化した。Y軸に全光量子束を示した。5×10⁵p/sec/cm²/srは、ルシフェラーゼ含有細胞を有さないマウスのバックグラウンドに相当する。画像は、全ての時点を通して追跡した代表的なマウスの画像である。動物は24日目に瀕死になった。

【図18】潜在的に調整可能なIL-2分泌におけるRNA滴定結果を図示した一連の画像である。図18Aは、2:1のE:T比で標的細胞(K562-CD19)と一緒に共培養した、示された量のRNAを用いたRNA操作T細胞(エレクトロポレーションして4時間後)による、Luminexアレイによって測定したIL-2分泌を図示した画像である。図18Bは、RNA CAR CTLまたはレンチウイルスCAR CTLを代表するマウスにおける時間経過および再発部位を図示した画像である。図16に記載のようにマウスを処置した。歯周領域は、RNA CTLで処置したマウスおよびレンチウイルスCTLで処置したマウス両方における白血病の棲息部位(harbor site)である。時が経つにつれて、RNA操作T細胞で処置したマウスは全身に再発するのに対して、レンチウイルスで処置したマウスは、歯周領域および傍脊柱領域を取り除くことができなければ局所合併症および/または全身再発で死亡する。図18Cは、歯周棲息部位は変わらないが再発にばらつきがあることを示した35日目のマウスの画像である。最も右側のマウスは、芽が出ている(building)びまん性の再発を示し、シグナルは脾臓、頸椎、および大腿の上にある。3番目のマウスは、芽が出ている傍脊柱再発を示し、最終的に後肢麻痺となつた。

【図19】pD-A.ss1.0F.BBZ.2bg.150Aプラスミド(SEQ ID NO:4)の模式図である。

【図20】pD-A.19.0F.2bg.150Aプラスミド(SEQ ID NO:5)の模式図である。

【図21】pGEM-64AをベースとするIVT GD2-BBZベクターの構築の模式図である。

【図22】エレクトロポレーションして1日後の、GD2に対して作られたCARの発現を示した一組のグラフである。

【図23】CD107aアッセイを用いてGD2 RNA CAR T細胞の機能を調べた実験の結果を図示する。様々なGD2に対して作られたCAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入した細胞をSY5Y(GD2+腫瘍細胞株)またはNLFwt(GD2-腫瘍細胞株)と共に培養し、CD107a発現を4時間培養アッセイにおいてフローサイトメトリーによって検出した。

【図24】SY5Y(GD2+腫瘍細胞株)またはNLFwt(GD2-腫瘍細胞株)との共培養時に、エレクトロポレーション処理されたT細胞が産生および分泌したIFN- γ のレベルを図示したグラフである。共培養して24時間後に上清を採取し、IFN- γ をELISAによって検出した。

【図25】GD2 CAR GMP RNA產生用のpD-A.GD2.0F.8TMBBZ.abg.150Aベクターの構築を図示した模式図である。オーバーラッピングPCRを用いて内部ORFフリー(OF)GD2-8TMBBZを作製した。CARオープンリーディングフレームを変えることなく、ATGコドンのPCR変異によって2つの内部ORFを除去した。

【図26】神経芽細胞腫GD2 RNA CAR動物試験のタイムラインを図示した画像である。

【図27】GD2に対して作られたCARまたはCD19に対して作られたCARをコードするRNAを与えるようにエレクトロポレーション処理したT細胞による処置の時間経過全体を通した腫瘍量の程度を、負の対照として処置したPBSと比較して示したグラフである。

【図28】GD2 RNA CARおよびCD19 RNA CARで処置したマウスにおける腫瘍細胞の存在を示した一組の画像である。

【図29】K562-CD19、K562-cMet、L55、SK-OV3、およびOV79細胞株におけるcMet発現レベルを図示した一組のグラフである。

【図30】内部ORFフリー(OF)cMet.BBZ CAR構築物の構築を詳述した模式図である。

【図31】cMetに対して作られたRNA CARの臨床バージョンの発現および機能を調べた実験の結果を図示する。図31は、cMet陽性細胞株(L55もしくはSK-OV3)またはcMet陰性細胞株(K562-CD19)と共に培養した時の様々なcMet RNA CARの機能を調べたCD107aアッセイの結果を示した一組のグラフである。CD107aを4時間培養アッセイにおいてフローサイトメトリーによって検出した。図31Bは、エレクトロポレーションして24時間後のCAR発現を示し

10

20

30

40

50

た一組のグラフを図示する。

【図32】腫瘍細胞株と共に培養した時の、cMet RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞のIFN- γ 産生を調べた実験の結果を図示する。図32Aは、様々なcMet CARの1つをコードするIVT RNAをT細胞にエレクトロポレーション処理によって導入し、次いで、T細胞をcMet陽性腫瘍細胞株(L55もしくはSK-OV3)またはcMet陰性細胞株(K562-CD19)と共に培養した実験の結果を示したグラフを図示する。共培養して24時間後に上清を採取し、分泌されたIFN- γ を検出するためにELISAに供した。図32Bは、トランスジーン発現および機能に基づいて動物実験および考えられる臨床試験のために選択されたpD-A.cMet. OF.8TMBBZ.2bgUTR.150A構築物の地図を図示する。

【図33】SK-OV3、888meli、624meli、526meli、およびK562腫瘍細胞株におけるcMet発現レベルを図示した一組のグラフである。

【図34】エレクトロポレーション処理したT細胞におけるCAR発現レベルを図示した一組のグラフである。10日目に、刺激済みT細胞にCD19 CAR RNAまたはcMet CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したか、エレクトロポレーションを行わなかった(EPなし)。一晩培養後に、CD19 CARまたはcMet CARの発現をフローサイトメトリーによって検出した。

【図35】cMet RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入し、メラノーマによって刺激したT細胞のCD107a発現を示した一組のグラフである。RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を、CD19+Nalm6、cMet+SK-OV3、ならびにcMet+メラノーマ株(888meli、624meli、および526meli)を含む示された腫瘍細胞株によって刺激した。K562をCD19対照およびcMet対照として使用した。4時間の刺激後に、CD107a発現をフローサイトメトリーによってモニタリングした。細胞をCD8+でゲーティングした。

【図36】cMet RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入し、メラノーマによって刺激したT細胞のIFN- γ 産生量を図示したグラフである。RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を、CD19+Nalm6、cMet+SK-OV3、ならびにcMet+メラノーマ株(888meli、624meli、および526meli)を含む示された腫瘍細胞株によって刺激した。K562をCD19対照およびcMet対照として使用した。24時間の刺激後、IFN- γ 産生をELISAによってアッセイした。

【図37】cMet RNA CARの治療効果を調べたインビボ実験の設計を図示する。

【図38】PBS(負の対照)、cMet RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞、またはCD19 RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞で処置したマウスの腫瘍量を示したグラフである。CAR T細胞療法と、T細胞注射の一日前に投与するシトキサン処置(I.P. 60mg/kg)と組み合わせた。

【図39】IVT RNAまたはレンチウイルスベクターによって送達したCARで処置したCD19陽性白血病マウスにおける腫瘍量を図示したグラフである。CD19 RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞は対照と比較して少ない腫瘍量を示すが、レンチウイルスによって送達したCD19 CARにより見られるように腫瘍を除去しない。矢印は、RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞の注射時間を示す。

【図40】シトキサン処置と組み合わせて、またはシトキサン処置と組み合わせずに、RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞で処置したマウスにおける腫瘍量を図示したグラフである。特にことわらない限り、マウスには、シトキサン(化学療法)とCAR処置の組み合わせを与えた。提示されたデータから、シトキサンによる以前のCAR T細胞の枯渇が、RNA CAR T細胞の反復注入によって付与される処置を向上させることが証明される。

【図41】シトキサン処置と組み合わせて、またはシトキサン処置と組み合わせずに、RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞で処置したマウスのパーセント生存率を図示したグラフである。特にことわらない限り、マウスには、シトキサン(化学療法)とCAR処置の組み合わせを与えた。データから、シトキサンとRNA CAR T細胞療法の反復注入の組み合わせにおいて全生存期間が伸びたことが示される。

【図42】CAR T細胞で処置したマウスにおける腫瘍量の程度を図示したグラフである。C

10

20

30

40

50

ARをレンチウイルスベクターまたはIVT RNAによって送達した。RNA群の場合、2回目のRNA CAR T細胞注入の24時間前に送達する60mg/kg シトキサンと療法を組み合わせた。使用したCAR構築物は野生型であったか(WT)、コドン最適化されていたか(CO)、ジロイシンモチーフを除去するように変異されていた(LL)。

【図43】CD19-BBz CAR T細胞(上)およびCD19-28BBz CAR T細胞で処置したマウスのパーセント生存率を図示した一組のグラフである。RNA群の場合、RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したCAR T細胞を反復投与する24時間前に送達する60mg/kg シトキサンと療法を組み合わせた。使用したCAR構築物は野生型であったか(WT)、コドン最適化されていたか(CO)、ジロイシンモチーフを除去するように変異されていた(LL)。

【図44】CAR T細胞を単回注射した5日後のマウスにおけるバイオルミネセンスによって測定した時の腫瘍の程度を図示した一組の画像である。レンチウイルスベクター(レンチ)によって送達したと述べていない限り、CARをコードするIVT RNAを送達することによってT細胞を変更した。使用したCAR構築物は野生型であったか(WT)、コドン最適化されていたか(CO)、ジロイシンモチーフを除去するように変異されていた(LL)。

【図45】21日目に、2回目のCAR T細胞注入およびシトキサン処置の併用処置の7日後のマウスにおけるバイオルミネセンスによって測定した時の腫瘍の程度を図示した一組の画像である。レンチウイルスベクター(レンチ)によって送達したと述べていない限り、CARをコードするIVT RNAを送達することによってT細胞を変更した。レンチウイルスで処置した動物には、シトキサンも2回目のT細胞注入も与えなかった。使用したCAR構築物は野生型であったか(WT)、コドン最適化されていたか(CO)、ジロイシンモチーフを除去するように変異されていた(LL)。

【図46】19-BBz CAR T細胞で処置したマウスにおける腫瘍量を図示したグラフである。マウスを、レンチウイルス送達19-BBz T細胞の単回投与または19-BBz RNA CAR T細胞の複数回投与で処置した。RNA CAR T細胞を単独で送達した、またはシトキサン処置と組み合わせて送達した(T細胞注入の1日前に投与した)。1回の注入ごとにT細胞数を変えるRNA CAR T細胞の複数回投薬戦略を調べた。

【図47】19-BBz CAR T細胞で処置したマウスにおける22日目の腫瘍の程度を図示した一組の画像である。マウスを、レンチウイルス送達19-BBz T細胞の単回投与または19-BBz RNA CAR T細胞の複数回投与で処置した。RNA CAR T細胞を単独で送達した、またはシトキサン処置と組み合わせて送達した(T細胞注入の1日前に投与した)。1回の注入ごとにT細胞数を変えるRNA CAR T細胞の複数回投薬戦略を調べた。

【図48】19-BBz CAR T細胞で処置したマウスにおける試験時間経過全体を通した腫瘍の程度を図示した一組の画像である。マウスを、レンチウイルス送達19-BBz T細胞の単回投与または19-BBz RNA CAR T細胞の複数回投与で処置した。RNA CAR T細胞を単独で送達した、またはシトキサン処置と組み合わせて送達した(T細胞注入の1日前に投与した)。1回の注入ごとにT細胞数を変えるRNA CAR T細胞の複数回投薬戦略を調べた。

【図49】19-BBz CAR T細胞で処置したマウスにおけるパーセント生存率を図示したグラフである。マウスを、レンチウイルス送達19-BBz T細胞の単回投与または19-BBz RNA CAR T細胞の複数回投与で処置した。RNA CAR T細胞を単独で送達した、またはシトキサン処置と組み合わせて送達した(T細胞注入の1日前に投与した)。1回の注入ごとにT細胞数を変えるRNA CAR T細胞の複数回投薬戦略を調べた。

【図50】19-BBz CAR T細胞、19-28BBz CAR T細胞、またはメソ-BBz CAR T細胞で処置したマウスにおけるパーセント生存率を図示した一組のグラフである。マウスを、レンチウイルス送達CAR T細胞の単回投与またはRNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞の複数回投与で処置した。RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を単独で送達した、または(T細胞注入の1日前に投与した)シトキサン処置と組み合わせて送達した。1回の注入ごとにT細胞数を変えるRNA CAR T細胞の複数回投薬戦略を調べた。

【発明を実施するための形態】

【0040】

10

20

30

40

50

詳細な説明

本発明は、患者を処置するための有効な療法を提供するために、癌患者に由来する自己由来T細胞をRNAで操作することができるという発見に関する。RNA操作T細胞は、癌処置のための融通のきくプラットフォームを可能にする、養子細胞移入用の新規のアプローチを提供する。場合によっては、レトロウイルス操作T細胞およびレンチウイルス操作T細胞の使用を補完するものとしてRNA操作T細胞を使用することができる。RNA操作T細胞の使用は、宿主細胞ゲノムに組み込まれる可能性があるウイルスベクターの使用の付随する安全上の懸念なく、強力な活性化ドメインを発現するように操作されたT細胞の治療指數を高めることができる。

【0041】

本発明は、概して、キメラ抗原受容体(CAR)をコードするRNAでトランスフェクトされたT細胞の使用に関する。CARをコードするRNAでトランスフェクトされたT細胞は本明細書においてRNA操作T細胞と呼ばれる。CARは、ある特定の抗体の抗原認識ドメインと細胞内シグナル伝達分子を組み合わせている。例えば、細胞内シグナル伝達分子は、CD3-鎖、4-1BB、およびCD28シグナル伝達モジュールの1つまたは複数を含んでもよい。従って、本発明は、RNA操作T細胞および養子療法のためにRNA操作T細胞を使用する方法を提供する。

【0042】

RNA操作T細胞を使用する利点は、CARが細胞内で限られた期間に発現されることである。CARの一過的発現の後に、細胞表現型は野生型に戻る。従って、CARで一過的にトランスフェクトされた細胞を用いて処置期間を制御することができる。

【0043】

1つの態様において、本発明は、抗CD19 CAR、抗メソテリンCAR、抗GD2 CAR、または抗cMet CARを発現するmRNAがエレクトロポレーション処理によって導入された自己由来細胞を含む。しかしながら、本発明は、標的分子としてCD19、メソテリン、GD2、およびcMetに限定してはならない。逆に、任意の標的分子に対する任意の抗原結合ドメインをCARの状況において使用することができる。好ましくは、本発明のCARは、ある特定の抗体の抗原認識ドメインとCD3-鎖またはFc RIタンパク質の細胞内ドメインを組み合わせて1つのキメラタンパク質となっている。従って、本発明は、このような組み合わせをコードするRNAを含む。

【0044】

1つの態様において、CARは4-1BBシグナル伝達ドメインをさらに含む。例えば、本発明のRNA操作T細胞は、CAR、例えば、CD19、CD8 ヒンジおよび膜貫通ドメイン、ならびにヒト4-1BBおよびCD3-シグナル伝達ドメインのインビトロで転写されたmRNAを細胞に導入することによって作製することができる。本発明のRNA操作T細胞は治療目的で患者に注入することができる。場合によっては、CARはCD28をさらに含む。

【0045】

1つの態様において、本発明は、養子T細胞療法を用いて患者を処置する方法であって、T細胞がCARをコードするRNA配列を含むように改変されている方法を提供する。前記方法は、癌および免疫障害を含む任意の数の障害を処置するために用いられてもよい。場合によっては、前記方法は、療法の経過にわたってRNA改変T細胞を複数回投与する工程を含む。1つの態様において、前記方法は、さらなる治療用組成物を投与する工程を含む。例えば、1つの態様において、前記方法は化学療法剤を投与する工程を含む。

【0046】

定義

特に定義のない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様のまたは等価な任意の方法および材料を本発明の試験のための実施において使用することができるが、好ましい方法および材料を本明細書において説明する。本発明の説明および主張において、以下の専門用語が用いられる。

【0047】

10

20

30

40

50

本明細書において用いられる専門用語は、特定の態様を説明することだけを目的とし、限定することを目的としていないことも理解されるはずである。

【0048】

本明細書で使用する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、転写開始直後に真核生物メッセンジャーRNAの「フロント(front)」または5'末端に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、最初に転写されたヌクレオチドと連結された末端基からなる。5'キャップの存在は、リボソームによる認識およびRNアーゼからの保護に極めて重要である。キャップ付加は転写と連結しており、それぞれが他に影響を及ぼすように転写と同時に発生する。転写開始直後に、合成されているmRNAの5'末端は、RNAポリメラーゼと会合しているキャップ合成複合体に結合する。この酵素複合体は、mRNAキャッピングに必要とされる化学反応を触媒する。合成は多段階生化学反応として進行する。キャッピング部分は、mRNAの機能、例えば、mRNAの安定性または翻訳効率を調節するように改変することができる。

10

【0049】

冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」は、冠詞の文法上の対象の1つまたは複数(すなわち、少なくとも1つ)を指すために本明細書において用いられる。例として、「要素」は1つの要素または複数の要素を意味する。

【0050】

本明細書で使用する「約」とは、測定可能な値、例えば、量、期間などを指している場合、指定値からの±20%または±10%、より好ましくは±5%、さらにより好ましくは±1%、さらにより好ましくは±0.1%のばらつきが、開示された方法を実施するのに適している時に、このようなばらつきを含むことを意味する。

20

【0051】

本明細書で使用する「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。抗体は天然供給源または組換え供給源に由来するインタクトな免疫グロブリンでもよく、インタクトな免疫グロブリンの免疫反応性部分でもよい。抗体は典型的に免疫グロブリン分子四量体である。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)₂、ならびに単鎖抗体(scFv)およびヒト化抗体を含む様々な形式で存在してもよい(Harlow et al., 1999, In: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426)。

30

【0052】

本明細書で使用する「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、抗体の產生もしくは特定の免疫適格細胞の活性化のいずれか、またはその両方を伴ってもよい。当業者であれば、実質的に全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役立ち得ることを理解するだろう。さらに、抗原は組換えDNAに由来してもよく、ゲノムDNAに由来してもよい。従って、当業者であれば、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、その用語が本明細書において用いられるように「抗原」をコードすることを理解するだろう。さらに、当業者であれば、抗原は、遺伝子の完全長ヌクレオチド配列にのみコードされる必要はないことを理解するだろう。本発明は、複数種の遺伝子の部分的ヌクレオチド配列の使用を含むが、これに限定されず、これらのヌクレオチド配列は望ましい免疫応答を誘発する様々な組み合わせで並べられることが容易に明らかである。さらに、当業者であれば、抗原は「遺伝子」によってコードされる必要は全くないことを理解するだろう。抗原は合成により作製されてもよく、生物学的試料から得られてもよいことが容易に明らかである。このような生物学的試料は組織試料、腫瘍試料、細胞、または生物学的液体を含んでもよいが、これに限定されない。

40

【0053】

50

本明細書で使用する「抗腫瘍効果」という用語は、腫瘍量の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、平均余命の増加、または癌状態に関する様々な生理学的症状の寛解によって表れてもよい生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」はまた、最初の場所での腫瘍発生の阻止におけ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表れてもよい。

【0054】

本明細書で使用する「自己由来の」という用語は、後で再導入される個体と同じ個体に由来する任意の材料を指すことが意図される。

【0055】

「同種異系の」は、同種の異なる動物に由来する移植片を指す。 10

【0056】

「異種の」は、異なる種の動物に由来する移植片を指す。

【0057】

本明細書で使用する「癌」という用語は、異常細胞の迅速かつ制御されていない増殖を特徴とする疾患と定義される。癌細胞は、局所的に、または血流およびリンパ系を通じて身体の他の部分に広がることができる。様々な癌の例には、脳腫瘍、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、リンパ腫、白血病、肺癌、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、皮膚癌、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌などが含まれるが、これに限定されない。 20

【0058】

「コードする」とは、生物学的プロセスにおいて、規定されたヌクレオチド配列(すなわち、rRNA、tRNA、およびmRNA)または規定されたアミノ酸配列を有し、結果として生じる生物学的特性を有する他のポリマーおよび高分子を合成するためのテンプレートとして働くようなポリヌクレオチド、例えば、遺伝子、cDNA、またはmRNAにおける特定のヌクレオチド配列の固有の性質を指す。従って、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によって細胞または他の生物系においてタンパク質が産生されるのであればタンパク質をコードする。mRNA配列と同一であり、通常、配列表に示されているヌクレオチド配列であるコード鎖、および遺伝子またはcDNAの転写用のテンプレートとして用いられる非コード鎖がいずれも、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードすると言いうことができる。 30

【0059】

他で特定しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。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んでもよい。

【0060】

「有効量」または「治療的有効量」は本明細書において同義に用いられ、ある特定の生物学的結果を実現するのに有効であると本明細書に述べられたような、化合物、製剤、材料、または組成物の量を指す。このような結果には、当技術分野において適切な任意の手段によって確かめられるようなウイルス感染阻害が含まれ得るが、これに限定されない。 40

【0061】

本明細書で使用する「内因性」とは、生物、細胞、組織、もしくは系に由来する任意の材料、または生物、細胞、組織、もしくは系の内部で産生された任意の材料を指す。

【0062】

本明細書で使用する「外因性」という用語は、生物、細胞、組織、もしくは系から導入された任意の材料、または生物、細胞、組織、もしくは系の外部で産生された任意の材料を指す。

【0063】

本明細書で使用する「発現」という用語は、ヌクレオチド配列のプロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳と定義される。 50

【0064】

本明細書で使用する「相同的」とは、2つのポリマー分子、例えば、2つの核酸分子、例えば、2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子間、または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列同一性を指す。2つの分子の両方におけるサブユニット位置が同じ単量体サブユニットによって占められている時、例えば、2つのDNA分子のそれぞれにある位置がアデニンによって占められているのであれば、2つの分子はその位置において相同である。2つの配列間の相同性は、一致する位置または相同な位置の数の一次関数である。例えば、2つの配列の位置の半分(例えば、長さが10サブユニットのポリマーにおいて5つの位置)が相同であれば、2つの配列は50%相同である。位置の90%(例えば、10のうち9)が一致または相同であれば、2つの配列は90%相同である。

10

【0065】

本明細書で使用する「教材」とは、本発明の組成物および方法の有用性を伝えるのに使用することができる刊行物、記録、図、または他の任意の表現媒体を含む。本発明のキットの教材は、例えば、本発明の核酸、ペプチド、および/または組成物を含有する容器に貼り付けられてもよく、核酸、ペプチド、および/または組成物を含有する容器と一緒に発送されてもよい。または、教材は、教材および化合物がレシピエントによって協力して用いられるつもりで容器とは別に発送されてもよい。

【0066】

本明細書で使用する「インビトロで転写されたRNA」とは、インビトロで合成されたRNA、好ましくはmRNAを指す。一般的に、インビトロで転写されたRNAはインビトロ転写ベクターから作製される。インビトロ転写ベクターは、インビトロで転写されたRNAを作製するために用いられるテンプレートを含む。

20

【0067】

「単離された」とは、自然状態から変えられている、または取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物に天然で存在する核酸またはペプチドは「単離され」ていないが、自然状態の同時に存在する材料から部分的または完全に分離されている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で存在してもよく、例えば、宿主細胞などの自然ではない環境において存在してもよい。

【0068】

本発明の文脈において、普通に現れる核酸塩基には以下の略語が用いられる。「A」はアデノシンを指し、「C」はシトシンを指し、「G」はグアノシンを指し、「T」はチミジンを指し、「U」はウリジンを指す。

30

【0069】

他で特定しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。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句はまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、あるバージョンにおいてインtronを含有し得る程度までインtronも含んでよい。

【0070】

本明細書で使用する「オープンリーディングフレーム」または「ORF」は、ポリペプチドまたはタンパク質を潜在的にコードする可能性のあ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、開始コード配列(開始コドン(initiation codon)または開始コドン(start codon))と停止コドン配列(終結コドン)との間に位置する。

40

【0071】

免疫原性組成物の「非経口」投与は、例えば、皮下(s.c.)注射、静脈内(i.v.)注射、筋肉内(i.m.)注射、もしくは胸骨内注射、または注入法を含む。

【0072】

本明細書で使用する「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

50

。さらに、核酸はヌクレオチドのポリマーである。従って、本明細書で使用する核酸およびポリヌクレオチドは交換可能である。当業者には、核酸は、単量体「ヌクレオチド」に加水分解することができるポリヌクレオチドだという一般知識がある。単量体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。本明細書で使用するポリヌクレオチドは、組換え手段、すなわち、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を含むが、それに限定されるわけではない当技術分野において利用可能な任意の手段によって、通常のクローニング技術およびPCR(商標)などを用いて、ならびに合成手段によって得られる全ての核酸配列を含むが、これに限定されない。

【0073】

本明細書で使用する「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は同義に用いられ、ペプチド結合によって共有結合したアミノ酸残基からなる化合物を指す。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、タンパク質配列またはペプチド配列を含むことができる最大数のアミノ酸に関して制限は設けられない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって互いにつながった2個以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書で使用する、この用語は、当技術分野において一般的に、例えば、ペプチド、オリゴペプチド、およびオリゴマーとも呼ばれる短い鎖、ならびに当技術分野において一般的にタンパク質と呼ばれる長い鎖の両方を指す。タンパク質の中には多くのタイプがある。「ポリペプチド」には、例えば、特に、生物学的に活性な断片、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、ポリペプチド変種、改変ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはその組み合わせが含まれる。

10

20

30

40

50

【0074】

本明細書で使用する「ポリ(A)」は、ポリアデニル化によってmRNAに取り付けられた一連のアデノシンである。一過的発現のための構築物の好ましい態様において、ポリ(A)は、50～5000であり、好ましくは64より多く、より好ましくは100より多く、最も好ましくは300または400より多い。局在性、安定性、または翻訳効率などのmRNA機能を調節するためにポリ(A)配列を化学的または酵素的に改変することができる。

【0075】

本明細書で使用する「ポリアデニル化」は、ポリアデニルイル部分またはその改変された変種とメッセンジャーRNA分子の共有結合を指す。真核生物では、ほとんどのメッセンジャーRNA(mRNA)分子は3'末端でポリアデニル化されている。3'ポリ(A)テールは、酵素ポリアデニル酸ポリメラーゼの働きによってプレmRNAに付加される(しばしば数百個の)アデニンヌクレオチドの長い配列である。高等真核生物では、ポリ(A)テールは、特定の配列ポリアデニル化シグナルを含有する転写物に付加される。ポリ(A)テールおよびそれに結合しているタンパク質は、エキソヌクレアーゼによってmRNAが分解されるのを防ぐ助ける。ポリアデニル化はまた転写集結、核からのmRNAの輸送、および翻訳にも重要である。ポリアデニル化はDNAがRNAに転写された直後に核内で生じるが、さらにその後に細胞質内で発生することもある。転写が終結した後に、RNAポリメラーゼに結合しているエンドヌクレアーゼ複合体の働きによってmRNA鎖は切断される。切断部位は、通常、切断部位の近くに塩基配列AAUAAAが存在することを特徴とする。mRNAが切断された後に、切断部位の遊離3'末端にアデノシン残基が付加される。

【0076】

「対象」という用語は、免疫応答を誘発することができる生物(例えば、哺乳動物)を含むことが意図される。

【0077】

本明細書で使用する「実質的に精製された」細胞は、他の細胞タイプを本質的に含まない細胞である。実質的に精製された細胞はまた、天然状態で通常関連している他の細胞タイプから分離されている細胞を指す。場合によっては、実質的に精製された細胞の集団は均一な細胞集団を指す。他の場合では、この用語は、単に、天然状態で通常関連している

細胞から分離されている細胞を指す。一部の態様において、細胞はインビトロで培養される。他の態様において、細胞はインビトロで培養されない。

【0078】

本明細書で使用する「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。

【0079】

本明細書で使用する「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外因性核酸でトランスフェクトされた、形質転換された、または形質導入された細胞である。この細胞は初代対象細胞およびその子孫を含む。

10

【0080】

本明細書で使用する「一過的な」とは、組み込まれていないトランスジーンの数時間、数日間、または数週間の発現を指し、発現期間は、ゲノムに組み込まれた場合、または宿主細胞において安定したプラスミドレプリコンに含まれている場合の発現期間より短い。

【0081】

「ベクター」とは、単離された核酸を含み、単離された核酸を細胞内部に送達するに使用することができる組成物(composition of matter)である。直鎖ポリヌクレオチド、イオン性化合物または両親媒性化合物と会合したポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスを含むが、これに限定されない非常に多くのベクターが当技術分野において公知である。従って、「ベクター」という用語は自己複製プラスミドまたはウイルスを含む。この用語はまた、細胞への核酸の移入を容易にする非プラスミド化合物および非ウイルス化合物、例えば、ポリリジン化合物、リポソームなどを含むと解釈すべきである。ウイルスベクターの例には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが含まれるが、これに限定されない。

20

【0082】

本明細書で使用する「特異的に結合する」という用語は、試料中に存在するコグネイト結合パートナー(例えば、T細胞上に存在する刺激分子および/または補助刺激分子)タンパク質を認識し、これに結合する抗体またはリガンドを意味するが、この抗体またはリガンドは試料中の他の分子を実質的に認識せず、これに結合しない。

30

【0083】

範囲：

本願全体を通じて、本発明の様々な局面を範囲の形で提示することができる。範囲の形での説明は単なる便宜および簡略のためのものであり、本発明の範囲に対する融通の利かない限定として解釈してはならないことが理解されるはずである。従って、範囲の説明は、可能性のある全ての部分範囲(subrange)ならびにその範囲内にある個々の数値を具体的に開示したとみなされるはずである。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などの部分範囲、ならびにその範囲内にある個々の数値、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6を具体的に開示したとみなされるはずである。これは範囲の幅に關係なく適用される。

40

【0084】

説明

本発明は、細胞におけるCAR発現のためにウイルスを使用する別の戦略を提供する。本発明は、細胞にトランスフェクトされ、細胞内で一過的に発現される、CARをコードするRNAに関する。細胞におけるCARの一過的な非組込み型発現は、細胞におけるCARの恒久的な組込み型発現に関連した懸念を和らげる。従って、本発明は、細胞におけるCAR発現を可逆的にすることができる、さらなるCARベースの療法を提供する。細胞におけるCAR発現のこのような逆転は、特定の臨床状況ではCARの非可逆的発現より望ましい場合がある。従って、本発明は、特定の臨床状況においてCARの恒久的発現より優れた、特定の望ましい

50

利点を提供する。

【0085】

本発明は、CARを一過的に発現する細胞を作製するための組成物および方法を提供し、このような細胞を対象に投与するための組成物および方法も提供する。

【0086】

長期(組込み型)発現系と比較して、RNAトランスフェクションは、GMPに準拠した系に適したCAR設計のより迅速で反復した変化を容易にする。製造費はかなり少ない。リリース試験は複雑でない。

【0087】

組成物

本発明は、細胞に直接トランスフェクトすることができるRNA構築物を含む。トランスフェクションにおいて使用するためのmRNAを作製するための方法は、特別に設計されたプライマーを用いてテンプレートをインビトロ転写(IVT)した後にポリ(A)を付加して、3'非翻訳配列および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)、発現させようとする遺伝子、ならびにポリ(A)テール、典型的に長さが50~2000塩基のポリ(A)テールを含有する構築物を生成することを伴う。このように生成されたRNAは様々な種類の細胞を効率的にトランスフェクトすることができる。

【0088】

1つの態様において、RNA構築物は、ヒト グロブリンに由来する少なくとも1つの3'UTRを含む3'UTRを含む。1つの態様において、RNA構築物は、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも2つの反復を含む3'UTR(2bgUTR)を含む。1つの態様において、RNA構築物は、約150アデノシン塩基を含むポリ(A)テール(150A)を含む。1つの態様において、RNA構築物は、5'キャップを含む5'UTRを含む。1つの態様において、5'キャップはアンチリバースキャップ類似体(ARCA)を含む。1つの態様において、5'キャップはcap1を含む。本発明は、1つには、5'UTR、3'UTR、およびポリ(A)テールの特定の構造がRNA生成および結果として生じるCAR発現に影響を及ぼすという発見に基づく。

【0089】

1つの態様において、テンプレートはCARの配列を含む。好ましくは、CARは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含む。細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインは、このようなドメインの任意の望ましい供給源に由来してよい。

【0090】

抗原結合ドメイン

細胞外ドメインは、リガンド結合および/またはシグナル伝達と関連する任意の多種多様な細胞外ドメインまたは分泌タンパク質から得ることができる。1つの態様において、細胞外ドメインはIg重鎖からなり、次に、このIg重鎖はCH1およびヒンジ領域の存在によってIg軽鎖と共有結合していてもよく、ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインの存在によって他のIg重鎖/軽鎖複合体と共有結合していてもよい。後者の場合、キメラ構築物とつなぎ合わされた重鎖/軽鎖複合体は、キメラ構築物の抗体特異性とは異なる特異性を有する抗体を構成してもよい。抗体の機能、望ましい構造、およびシグナル伝達に応じて、鎖全体が用いられてもよく、切断された鎖が用いられてもよい。切断された鎖の場合、CH1、CH2、またはCH3ドメインの全てまたは一部が除去されてもよく、ヒンジ領域の全てまたは一部が除去されてもよい。

【0091】

細胞外ドメインは任意の望ましい抗原に対して作ることができる。例えば、抗腫瘍性CARが望ましい場合、CARに組み込まれるように選択される細胞外ドメインは、腫瘍に関連する抗原でもよい。腫瘍は、CARによって認識される細胞表面抗原を有する限り任意のタイプの腫瘍でよい。別の態様において、CARは、特定のモノクローナル抗体が現在存在するCARでもよく、将来作製される可能性のあるCARでもよい。

【0092】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは、望ましい抗原を操作してCARに入れる

10

20

30

40

50

ことによって関心対象の抗原に対して作られるように設計される。本発明の文脈において、「腫瘍抗原」または「過剰増殖(hyperproliferative)障害抗原」または「過剰増殖障害に関連した抗原」とは、特定の過剰増殖障害に共通して見られる抗原を指す。ある特定の局面において、本発明の過剰増殖障害抗原は、原発性メラノーマまたは転移性メラノーマ、中皮腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、神経芽細胞腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎臓癌および腺癌、例えば、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などを含むが、これに限定されない癌に由来する。

【0093】

腫瘍抗原は、免疫応答、特に、T細胞性免疫応答を誘発する腫瘍細胞によって産生されるタンパク質である。1つの態様において、本発明の腫瘍抗原は、哺乳動物の癌腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球(TIL)によって免疫学的に認識される1つまたは複数の抗原性癌エピトープを含む。本発明の抗原結合ドメインの選択は、処置しようとする特定のタイプの癌によって決まる。腫瘍抗原は当技術分野において周知であり、例えば、神経膠腫関連抗原、癌胎児抗原(CEA)、-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、フェトプロテイン(AFP)、レクチン反応性AFP、チログロブリン、RAGE-1、MN-CA IX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2(AS)、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターーゼ(prostase)、前立腺特異的抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン(protein)、P-SMA、Her2/neu、サバイビンおよびテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、好中球エラスターーゼ、エフリンB2、CD22、インシュリン増殖因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受容体、ならびにメソテリンを含む。

10

【0094】

1つの態様において、腫瘍抗原は、悪性腫瘍に関連した1つまたは複数の抗原性癌エピトープを含む。悪性腫瘍は、免疫攻撃のための標的抗原として役立ち得る多数のタンパク質を発現する。これらの分子には、組織特異的抗原、例えば、メラノーマにおけるメソテリン、MART-1、チロシナーゼ、およびGP100、ならびに前立腺癌における前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)および前立腺特異的抗原(PSA)が含まれるが、これに限定されない。標的分子の他の非限定的な例は、癌遺伝子HER-2/Neu/ErbB-2などのトランスフォーメーション関連分子のグループに属する。標的抗原のさらに他の非限定的な例は、癌胎児抗原(CEA)などの癌胎児性抗原である。B細胞リンパ腫において、腫瘍特異的イディオタイプ免疫グロブリンは、個々の腫瘍に特有の真に腫瘍特異的な免疫グロブリン抗原を構成する。CD19、CD20、およびCD37などのB細胞分化抗原がB細胞リンパ腫における標的抗原の他の候補である。これらの抗原の一部(CEA、HER-2、CD19、CD20、イディオタイプ)の一部が、モノクローナル抗体を用いた受動免疫療法の標的として用いられており、限られた成功したおさめていないが、本発明において有用だと考えられている。

20

30

【0095】

本発明において言及される腫瘍抗原のタイプはまた腫瘍特異的抗原(TSA)または腫瘍関連抗原(TAA)でもよい。TSAは腫瘍細胞に特有のものであり、体内の他の細胞の表面に生じない。TAA関連抗原は腫瘍細胞に特有のものではなく、その代わりに、抗原に対する免疫学的寛容の状態を誘導しない条件下で正常細胞の表面にも発現している。免疫系が抗原に応答する条件下で、抗原が腫瘍の表面に発現している場合がある。TAAは、胎児発生中に、免疫系が未熟であり、かつ応答できない時に正常細胞表面に発現している抗原でもよい。または、TAAは、通常、正常細胞表面に極めて低レベルで存在するが、腫瘍細胞表面に非常に高いレベルで発現している抗原でもよい。

40

【0096】

TSA抗原またはTAA抗原の非限定的な例には、以下:分化抗原、例えば、MART-1/MelanA(MART-1)、gp100(Pmel17)、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、および腫瘍特異的多系列抗原、例えば、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;過剰発現している胚抗原、例えば、CEA;過剰発現している癌遺伝子および変異腫瘍抑制遺伝子、例えば、p53、Ras、HER-2/neu;染色体転座に起因するユニークな腫瘍抗原;例えば、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-1GK、MYL-RAR;ならびにウイルス抗原、例えば、エブスタイン-バーウイルス抗原EBVAお

50

およびヒトパピローマウイルス(HPV)抗原E6およびE7が含まれる。他の大きなタンパク質ベース抗原には、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA19-9、CA72-4、CAM17.1、NuMa、K-ras、-カテニン、CDK4、Mum-1、p15、p16、43-9F、5T4、791Tgp72、-フェトプロテイン、-HCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3、CA27.29、BCAA、CA195、CA242、CA-50、CAM43、CD68、P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733、EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、Mac-2結合タンパク質、シクロフィリンC結合タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、およびTPSが含まれる。

【0097】

好ましい態様において、CARの抗原結合ドメイン部分は、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCRなどを含むが、これに限定されない抗原を標的とする。

【0098】

GD2は、神経芽細胞腫およびメラノーマを含む神経外胚葉由来の腫瘍の表面に発現しているジシアロガングリオシドであり、本発明において有用な別の標的である。さらに、受容体型チロシンキナーゼcMetは、非小細胞肺癌腫(NSCLC)、胃癌、卵巣癌、肺腺癌、甲状腺癌、乳癌、頭頸部癌、結腸癌、および腎臓癌を含む様々な癌腫において過剰発現していることが多いので本発明において有用な別の標的である。

【0099】

腫瘍抗原およびその抗原性癌エピトープは、例えば、初代臨床分離株、細胞株などの天然供給源から精製および単離されてもよい。癌ペプチドおよびその抗原性エピトープはまた当技術分野において公知の化学合成または組換えDNA法によって得られてもよい。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、Renkvist et al. (2001)に記載のように、当技術分野において公知の非常に多くの抗原がある。類似体または人工的に改変されたエピトープは列挙されていないが、当技術分野における標準的な手段によって類似体または人工的に改変されたエピトープ入手または作製する方法が当業者により認められる。抗体によって特定され、Serex技術(Sahin et al. (1997)およびChen et al. (2000)を参照されたい)によって検出されるような他の抗原は、Ludwig Institute for Cancer Researchのデータベースにおいて特定される。

【0100】

標的化される望ましい抗原に応じて、本発明のCARは、望ましい抗原標的に特異的な適切な抗原結合部分を含むように操作することができる。例えば、CD19が、標的化される望ましい抗原であれば、本発明のCARに組み込むための抗原結合部分としてCD19に対する抗体を使用することができる。

【0101】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、RNA CARのテンプレートは、CARの細胞外ドメインと融合された膜貫通ドメインを含むように設計することができる。1つの態様において、天然でCAR内のドメインの1つと結合している膜貫通ドメインが用いられる。場合によっては、膜貫通ドメインと、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとの結合を回避して、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限にするように、膜貫通ドメインを選択し、アミノ酸置換によって改変することができる。

【0102】

膜貫通ドメインは天然供給源に由来してもよく、合成供給源に由来してもよい。供給源が天然である場合、ドメインは任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来してもよい。本発明において特に有用な膜貫通領域は、T細胞受容体、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154の鎖、鎖、または鎖に由来してもよい(すなわち、少なくとも、これらの膜貫通領域を含んでもよい)。または、膜貫通ドメインは合成でもよく、この場合、主として疎水

10

20

30

40

50

性の残基、例えば、ロイシンおよびバリンを含む。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが合成膜貫通ドメインの各末端に見出される。任意で、短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、好ましくは、長さが2~10個のアミノ酸が、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成してもよい。グリシン-セリンダブルレット(doublet)が特に適切なリンカーを提供する。

【0103】

1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB膜貫通ドメイン、またはCD3- 膜貫通ドメインより選択される。場合によっては、膜貫通ドメインはヒンジドメインも含んでよい。1つの態様において、ヒンジドメインはCD8aヒンジドメインである。別の態様において、ヒンジドメインはIgGヒンジドメインである。

10

【0104】

細胞質ドメイン

本発明のCARの細胞質ドメインまたはそうでなければ細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが配置されている免疫細胞の正常エフェクター機能の少なくとも1つの活性化を担う。

「エフェクター機能」という用語は、細胞の特化した機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性でもよく、サイトカイン分泌を含むヘルパー活性でもよい。従って、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、特化した機能を細胞が果たすように指示するタンパク質部分を指す。通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を使用することができるが、多くの場合において、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断された部分が用いられる程度まで、エフェクター機能シグナルを伝達する限り、このような切断された部分が完全な鎖の代わりに用いられてもよい。従って、細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断された部分を含むことが意図される。

20

【0105】

本発明のCARにおいて使用するための細胞内シグナル伝達ドメインの好ましい例には、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するように協力して働くT細胞受容体(TCR)および補助受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導体または変種、ならびに同じ機能能力を有する任意の合成配列が含まれる。

30

【0106】

TCRだけで発生したシグナルは完全なT細胞活性化に十分でなく、二次シグナルまたは補助刺激シグナルも必要とされることが知られている。従って、T細胞活性化は、2つの特異なクラスの細胞質シグナル伝達配列:TCRを介して抗原依存的一次活性化を開始する細胞質シグナル伝達配列(一次細胞質シグナル伝達配列)、および二次シグナルまたは補助刺激シグナルを提供するように抗原非依存的に働く細胞質シグナル伝達配列(二次細胞質シグナル伝達配列)によって媒介されると言うことができる。

【0107】

一次細胞質シグナル伝達配列はTCR複合体の一次活性化を刺激するように、または阻害するように調節する。刺激するように働く一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含有してもよい。

40

【0108】

本発明において特に有用な一次細胞質シグナル伝達配列を含有するITAMの例には、TCR、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するITAMが含まれる。本発明のCARにおける細胞質シグナル伝達分子はCD3に由来する細胞質シグナル伝達配列を含むことが特に好ましい。

【0109】

好ましい態様において、CARの細胞質ドメインは、CD3- シグナル伝達ドメインそれ自

50

体、または本発明のCARの状況において有用な他の任意の望ましい細胞質ドメインと組み合わされたCD3- シグナル伝達ドメインを含むように設計することができる。例えば、CARの細胞質ドメインはCD3 鎖部分および補助刺激シグナル伝達領域を含んでもよい。補助刺激シグナル伝達領域とは、補助刺激分子の細胞内ドメインを含むCAR部分を指す。補助刺激分子は、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。このような分子の例には、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIG HT、NKG2C、B7-H3、およびCD83と特異的に結合するリガンドなどが含まれる。従って、本発明は補助刺激シグナル伝達エレメントとして主に4-1BBを用いて例示されたが、他の補助刺激エレメントが本発明の範囲内である。

10

【0110】

本発明のCARの細胞質シグナル伝達部分の中にある細胞質シグナル伝達配列はランダムな順序または指定された順序で互いに連結されてもよい。任意で、短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、好ましくは、長さが2~10個のアミノ酸が連結を形成してもよい。グリシン-セリンダブレットが特に適切なリンカーを提供する。

【0111】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは、4-1BBシグナル伝達ドメインそれ自体、または本発明のCARの状況において有用な他の任意の望ましい細胞質ドメインと組み合わされた4-1BBシグナル伝達ドメインを含むように設計することができる。1つの態様において、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。別の態様において、細胞質ドメインは、CD3- のシグナル伝達ドメイン、4-1BBのシグナル伝達ドメイン、およびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。

20

【0112】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗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み、膜貫通ドメインはCD8aのヒンジおよび膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。

【0113】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗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み、膜貫通ドメインはCD8aのヒンジおよび膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインは、CD3- のシグナル伝達ドメイン、CD28のシグナル伝達ドメイン、および4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。

30

【0114】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗メソテリン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み、膜貫通ドメインはCD8aのヒンジおよび膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。

【0115】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗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み、膜貫通ドメインはCD8の膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。

40

【0116】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗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み、膜貫通ドメインはCD28の膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。

【0117】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗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み、膜貫通ドメインはCD3- の膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む

50

。

【0118】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗cMet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み、膜貫通ドメインはCD8の膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。

【0119】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗cMet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み、膜貫通ドメインはCD28の膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。

【0120】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗cMet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み、膜貫通ドメインは4-1BBの膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。

。

【0121】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗cMet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み、細胞質ドメインはCD3- のシグナル伝達ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含む。

【0122】

1つの態様において、RNA CARのテンプレートは抗cMet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み、膜貫通ドメインはCD28の膜貫通ドメインを含み、細胞質ドメインは、CD3- のシグナル伝達ドメイン、CD28のシグナル伝達ドメイン、および4-1Bのシグナル伝達ドメインを含む。

【0123】

場合によっては、テンプレートは、内部オープンリーディングフレーム(ORF)を除去して、内部オープンリーディングフレームフリー(OF)のテンプレートを生成するように改変される。1つの態様において、テンプレートは、ある特定の種における使用のためにコドン最適化される。例えば、1つの態様において、テンプレートはヒトにおける使用のためにコドン最適化される。1つの態様において、テンプレートはジロイシンモチーフを除去するように改変される。

【0124】

1つの態様において、テンプレートはIVTベクターまたはプラスミドの中に含まれる。1つの態様において、プラスミドは、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:5からなる群より選択される配列を含むヌクレオチド配列を含む。

【0125】

1つの態様において、テンプレートは、SEQ ID NO:6～24からなる群より選択される配列を含むヌクレオチド配列を含む。別の態様において、本発明のRNA構築物は、SEQ ID NO:6～24からなる群より選択される配列を含むヌクレオチド配列から転写される。

【0126】

1つの態様において、テンプレートはポリ(A)テールを含む。1つの態様において、ポリ(A)テールは150アデノシン塩基を含む。1つの態様において、ポリ(A)テールは、SEQ ID NO:25を含むヌクレオチド配列を含む。

【0127】

1つの態様において、テンプレートは、ヒト グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも1つの反復を含む3'UTRを含む。1つの態様において、テンプレートは、SEQ ID NO:26を含むヌクレオチド配列を含む3'UTRを含む。

【0128】

RNAトランスフェクション

本発明のインビトロで転写されたRNA CARを生成するための方法が本明細書において開示される。1つの態様において、インビトロで転写されたRNA CARは、一過的なトランスク

10

20

30

40

50

エクションの1つとして細胞に導入することができる。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって生じたテンプレートを用いたインビトロ転写によって生成される。適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを用いたPCRによって、任意の供給源に由来する関心対象のDNAをインビトロmRNA合成用のテンプレートに直接変換することができる。DNA供給源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列、または他の任意の適切なDNA供給源でもよい。インビトロ転写用の望ましいテンプレートは本発明のCARである。例えば、RNA CARのテンプレートは、抗腫瘍抗体の単鎖可変ドメインを含む細胞外ドメイン;膜貫通ドメイン;およびCD3- のシグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインを含む。1つの態様において、テンプレートは、SEQ ID NO 6~24からなる群より選択される配列を含むヌクレオチド配列を含む。

10

【0129】

1つの態様において、PCRに用いられるDNAはオープンリーディングフレームを含有する。DNAは、生物のゲノムに由来する天然DNA配列に由来してもよい。1つの態様において、DNAは、遺伝子の一部の関心対象の完全長遺伝子である。遺伝子は、5'非翻訳領域および/または3'非翻訳領域(UTR)の一部または全てを含んでもよい。遺伝子はエキソンおよびイントロンを含んでもよい。1つの態様において、PCRに用いられるDNAはヒト遺伝子である。別の態様において、PCRに用いられるDNAは、5'UTRおよび3'UTRを含むヒト遺伝子である。または、DNAは、天然の生物において通常発現していない人工DNA配列でもよい。例示的な人工DNA配列は、一緒に連結して、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遺伝子部分を含有する人工DNA配列である。一緒に連結されるDNA部分は1種類の生物に由来してもよく、複数種の生物に由来してもよい。

20

【0130】

PCR用のDNA供給源として使用することができる遺伝子には、生物に対して治療効果もしくは予防効果を提供するポリペプチドをコードする遺伝子、または生物において疾患もしくは障害を診断するのに使用することができる遺伝子が含まれる。好ましい遺伝子は、短期処置に有用な遺伝子、または投与量もしくは発現される遺伝子に関して安全上の懸念がある場合に有用な遺伝子である。例えば、癌、自己免疫障害、寄生生物感染、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、または他の感染を処置するために、発現されるトランスジーンは、免疫系細胞のリガンドまたは受容体として機能するポリペプチドをコードしてもよく、生物の免疫系を刺激または阻害するように機能してもよい。免疫系の長期の継続した刺激を有することは望ましくなく、首尾良い処置の後に続く変化が新たな問題を引き出す場合があるので、首尾良い処置の後に続く変化を生じることは必要でない。自己免疫障害を処置するために、突然の再発(flare-up)の間に免疫系を阻害または抑制することが望ましいことがあるが、長期にわたって免疫系を阻害または抑制することは望ましくない。長期にわたって免疫系を阻害または抑制すると、患者の感染に対する感受性が過度に高くなる可能性がある。

30

【0131】

トランスフェクションに用いられるmRNAインビトロ転写用テンプレートを作製するためPCRが用いられる。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用テンプレートとして用いられるDNA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。本明細書で使用する「実質的に相補的な」とは、プライマー配列中の塩基の大半もしくは全てが相補する、または1つもしくは複数の塩基が相補しない、もしくはミスマッチするヌクレオチド配列を指す。実質的に相補的な配列は、PCRに用いられるアニーリング条件下で目的のDNA標的とアニールまたはハイブリダイズすることができる。DNAテンプレートの任意の部分に実質的に相補的になるようにプライマーを設計することができる。例えば、5'UTRおよび3'UTRを含む、細胞において通常転写される遺伝子部分(オープンリーディングフレーム)を増幅するようにプライマーを設計することができる。関心対象の特定のドメインをコードする遺伝子部分を増幅するようにプライマーも設計することができる。1つの態様において、プライマーは、5'UTRおよび3'UTRの全てまたは一部を含むヒトcDNAコード領域を増幅するように設計される。PCR

40

50

に有用なプライマーは、当技術分野において周知の合成方法によって作製される。「フォワードプライマー」は、増幅しようとするDNA配列の上流にあるDNAテンプレート上のヌクレオチドに実質的に相補的なヌクレオチド領域を含有するプライマーである。「上流」は、コード鎖に対して、増幅しようとするDNA配列の5側の位置を指すために本明細書において用いられる。「リバースプライマー」は、増幅しようとするDNA配列の下流にある二本鎖DNAテンプレートに実質的に相補的なヌクレオチド領域を含有するプライマーである。「下流」は、コード鎖に対して、増幅しようとするDNA配列の3'側の位置を指すために本明細書において用いられる。

【0132】

PCRに有用な任意のDNAポリメラーゼを、本明細書において開示された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多くの供給元から市販されている。 10

【0133】

安定性および/または翻訳効率を向上させる能力を有する化学構造も使用してよい。好ましくは、RNAには5'UTRおよび3'UTRがある。1つの態様において、5'UTRは長さが0~3000ヌクレオチドである。コード領域に付加される5'UTR配列および3'UTR配列の長さは、UTRの異なる領域にアニールするPCR用プライマーの設計を含むが、これに限定されない様々な方法によって変えることができる。このアプローチを用いて、当業者は、転写RNAをトランسفェクトした後の最適な翻訳効率を実現するのに必要な5'UTRおよび3'UTRの長さを改変することができる。 20

【0134】

5'UTRおよび3'UTRは、関心対象の遺伝子の天然の内因性5'UTRおよび3'UTRでもよい。または、フォワードプライマーおよびリバースプライマーにUTR配列を組み込むことによって、またはテンプレートの他の任意の改変によって、関心対象の遺伝子に内在しないUTR配列を付加することができる。関心対象の遺伝子に内在しないUTR配列の使用は、RNAの安定性および/または翻訳効率を改変するのに有用な場合がある。例えば、3'UTR配列にあるAUリッチエレメントはmRNA安定性を弱めることができることが知られている。従って、当技術分野において周知のUTRの特性に基づいて転写RNAの安定性を高めるように3'UTRを選択または設計することができる。 30

【0135】

1つの態様において、5'UTRは内因性遺伝子のKozak配列を含有してもよい。または、関心対象の遺伝子に内在しない5'UTRが前記のようにPCRによって付加される時、5'UTR配列を付加することによってコンセンサスKozak配列を再設計することができる。Kozak配列は一部のRNA転写物の翻訳効率を高めることができるが、効率的な翻訳を可能にするために全てのRNAに必要とされるようには見えない。多くのmRNAのKozak配列の要件は当技術分野において公知である。他の態様において、5'UTRは、細胞内で安定しているRNAゲノムを有するRNAウイルスに由来してもよい。他の態様において、mRNAのエキソヌクレアーゼ分解を妨げるために、3'UTRまたは5'UTRにおいて様々なヌクレオチド類似体を使用することができる。 40

【0136】

遺伝子クローニングを必要とすることなくDNAテンプレートからRNAを合成するためには、転写しようとする配列の上流側にDNAテンプレートに転写プロモーターを取り付けなければならない。RNAポリメラーゼ用プロモーターとして機能する配列がフォワードプライマーの5'末端に付加された時、RNAポリメラーゼプロモーターは、転写しようとするオープンリーディングフレームの上流側にPCR産物に組み込まれる。1つの好ましい態様において、プロモーターは、本明細書の他の場所に記載の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にはT3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが含まれるが、これに限定されない。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。

【0137】

好ましい態様において、mRNAは、細胞におけるリボソーム結合、翻訳開始、および安定 50

性mRNAを決定する5'末端のキャップと3'ポリ(A)テールを両方とも有する。環状DNAテンプレート、例えば、プラスミドDNA上では、RNAポリメラーゼは、真核細胞における発現には適さない長いコンカテマー産物を生成する。3'UTR末端で直線化されているプラスミドDNAが転写されると、転写後にポリアデニル化されても真核生物トランスフェクションにおいて有効でない正常サイズのmRNAが生じる。

【0138】

直鎖DNAテンプレート上では、ファージT7 RNAポリメラーゼは転写物の3'末端をテンプレートの最後の塩基を越えて延ばすことができる(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65(2003))。

10

【0139】

DNAテンプレートにポリ(A)/T配列を組み込む従来法は分子クローニングである。しかしながら、プラスミドDNAに組み込まれたポリ(A)/T配列はプラスミドを不安定にすることがある。こういう理由で、細菌細胞から得られたプラスミドDNAテンプレートは欠失および他の異常にかなり汚染されていることが多い。このため、クローニング手順は手間と時間がかかるだけでなく、多くの場合、信頼性もない。こういう理由で、クローニングすることなくポリ(A)/T 3'配列を有するDNAテンプレートの構築を可能にする方法が極めて望ましい。

【0140】

転写用DNAテンプレートのポリ(A)/Tセグメントは、PCR中には、ポリTテール、例えば、100Tテール(サイズは50～5000Tでよい)を含有するリバースプライマーを使用することによって、またはPCR後には、DNA連結またはインビトロ組換えを含むが、これに限定されない他の任意の方法によって生成することができる。ポリ(A)テールはRNAに対して安定性もたらし、RNA分解を低減する。一般的に、ポリ(A)テールの長さは転写RNAの安定性と正の相関関係がある。1つの態様において、ポリ(A)テールは100～5000アデノシンである。

20

【0141】

インビトロ転写後に、大腸菌ポリ(A)ポリメラーゼ(E-PAP)などのポリ(A)ポリメラーゼを用いてRNAのポリ(A)テールをさらに延ばすことができる。1つの態様において、ポリ(A)テールの長さを100ヌクレオチドから300～400ヌクレオチドに延ばすと、RNAの翻訳効率は約2倍増加する。さらに、異なる化学基を3'末端に取り付けるとmRNA安定性を増加することができる。このような取り付けは、改変された/人工のヌクレオチド、アブタマーおよび他の化合物を含有してもよい。例えば、ポリ(A)ポリメラーゼを用いてATP類似体をポリ(A)テールに組み込むことができる。ATP類似体はRNA安定性をさらに高めることができる。

30

【0142】

5'キャップもRNA分子に対して安定性をもたらす。好ましい態様では、本明細書において開示された方法によって生成されたRNAは5'キャップを含む。5'キャップは、当技術分野において公知の、かつ本明細書に記載の技法を用いて提供される(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))。

40

【0143】

本明細書において開示された方法によって生成されるRNAは配列内リボソーム進入部位(IRES)配列も含有してよい。IRES配列は、mRNAとのキャップ非依存性リボソーム結合を開始し、翻訳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よい。細胞の透過性および生存を容易にする因子を含有してもよい、細胞エレクトロポレーションに適した任意の溶質、例えば、糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化物質、および界面活性剤も含めることができる。

【0144】

1つの態様において、本発明は、CARをコードする合成RNAおよびRNA様類似体を含む。すなわち、本発明は、例えば、IVT RNAおよび合成RNAを含む当技術分野において公知の任意

50

の方法において製造された、CARをコードするRNAおよびRNA様構築物を含む。1つの態様において、RNAは公知のオリゴヌクレオチド合成法によって合成される。オリゴヌクレオチド合成法には、例えば、H-ホスホネート合成、ホスホジエステル合成、ホスホトリエステル合成、亜リン酸トリエステル合成、およびホスホルアミダイト法が含まれる。場合によっては、RNA構築物の合成はヌクレオチド/ヌクレオシドの誘導体または類似体の組込みを含む。従って、1つの態様において、本発明のRNAはヌクレオチド/ヌクレオシドの誘導体または類似体を含む。例えば、類似体の1つのタイプは、LNA、例えば、-D-オキシ-LNA、-L-オキシ-LNA、-D-アミノ-LNAおよび-D-チオ-LNA、ならびに-D-オキシ-LNAである。合成RNAを生成するための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国際公開番号WO2007/031081に記載されている。これらはそれぞれ参照として組み入れられる。さらに、本発明は、本明細書に記載のCAR成分をコードする配列を構築物が含むのであれば、従来知られていなかった方法を介して製造されたCARをコードするRNAおよびRNA様構築物を含む。

10

【0145】

任意の多数の異なる方法、例えば、エレクトロポレーション(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX)(Harvard Instruments, Boston, Mass.)またはGene Pulser II(BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator(Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを用いたカチオン性リポソームを介したトランスフェクション、ポリマークセル化、ペプチドを介したトランスフェクション、またはバイオリスティック粒子送達系、例えば、「遺伝子銃」(例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70(2001)を参照されたい)を含むが、これに限定されない市販の方法を用いて、RNAを標的細胞に導入することができる。

20

【0146】

RNA操作T細胞

インビトロで転写されたmRNA CARを、異なるタイプの真核細胞に、ならびにカプセル化された、結合した、または裸のmRNAの担体または無細胞局所送達もしくは全身送達としてトランスフェクト細胞を用いて組織および生物全体に送達することができる。使用される方法は、一過的発現が必要とされる、または一過的発現で十分な任意の目的の方法でよい。

30

【0147】

基礎研究および療法において、癌、幹細胞、急性感染症および慢性感染症、ならびに自己免疫疾患の分野において、開示された方法を、発生経路の調節を含む細胞活動の調節に適用することができる。

【0148】

前記方法はまた、インプットRNA量を変えることによって広範囲にわたって発現レベルを制御する能力を提供し、このため、それぞれのトランスフェクトされた遺伝子の発現レベルを個々に調節することが可能になる。さらに、PCRベースのmRNA生成法によって、異なる構造を有するキメラ受容体mRNAおよびそのドメインの組み合わせの設計がかなり容易になる。例えば、同じ細胞内の複数のキメラ受容体上にある様々な異なる細胞内エフェクター/補助刺激ドメインは、多重抗原性(multi-antigenic)標的に対して最高レベルの細胞傷害性を評価すると同時に正常細胞に対して最低の細胞傷害性を評価する受容体組み合わせの構造を決定することができる。

40

【0149】

本発明の方法の利点は、RNAトランスフェクションが本質的に一過的であり、かつベクターフリーであることである。すなわち、RNAトランスジーンを、さらなるウイルス配列を必要とすることなく最小発現力セットとしてリンパ球に送達し、短時間のインビトロ細胞活性化の後にリンパ球内で発現させることができる。これらの条件下では、宿主細胞ゲノムへのトランスジーンの組込みはありそうにない。RNAトランスフェクション効率およびRNAがリンパ球集団全体を均一に改変する能力のために細胞クローニングは必要でない

50

。従って、開示された方法に従って導入されたRNA構築物を含有する細胞を治療に使用することができる。例えば、リンパ球細胞集団が患者から取り出され、異なるRNA構築物でトランスフェクトされ、次いで、患者に再導入される。次いで、トランスフェクトされた細胞集団は、リンパ腫またはCD19もしくは他の標的抗原を含有する他の癌細胞を標的とする。RNAでトランスフェクトされた細胞を使用する利点は、RNAトランスジーンの半減期が短いことである。コードされるタンパク質は、トランスフェクトされた細胞によって限られた期間しか産生されない。これは、遺伝子組換えされた細胞が患者に導入された時に、意図されない結果のリスクを下げるのに役立つ。

【0150】

好ましい態様において、この技術は個別化療法に用いられる。例えば、腫瘍を処置する場合、患者の血液または細胞は、アフェレーシス、生検、または静脈穿刺(venapuncture)などの適切な方法によって収集される。腫瘍を処置するために、細胞は適切なRNA構築物でトランスフェクトされている間、少なくとも24時間、培養される。必要に応じて、トランセクションの前に細胞を凍結して保管することができる。次いで、細胞は適切な時間および適切な用量で患者に戻される。1つの態様において、RNAによって改変された細胞は患者に複数回投与される。

【0151】

インビトロ転写RNA(IVT-RNA)を用いた免疫療法は2つの異なる戦略を利用する。これらはいずれも様々な動物モデルにおいて首尾良く試験されている。細胞は、リポフェクションまたはエレクトロポレーションによってインビトロ転写RNAでトランスフェクトされ、対象に投与される。好ましくは、移入されたIVT-RNAの長期発現を実現するために様々な改変を用いてIVT-RNAを安定化することが望ましい。

【0152】

インビトロ転写用のテンプレートとして標準化されたやり方で利用され、かつ安定化されたRNA転写物が生成されるように遺伝子組換えされている一部のIVTベクターが文献において知られている。現在、当技術分野において用いられるプロトコールは、以下の構造:RNA転写を可能にする5'RNAポリメラーゼプロモーターに続いて、3'非翻訳領域および/または5'非翻訳領域(UTR)が隣接する関心対象の遺伝子、ならびに1本のAヌクレオチド鎖を含有する3'ポリアデニルカセットを有するプラスミドベクターに基づいている。インビトロ転写の前に、環状プラスミドは、II型制限酵素(認識配列が切断部位に対応する)によってポリアデニルカセットの下流で直線化される。従って、ポリアデニルカセットは転写物における後のポリ(A)配列に対応する。この手順の結果として、ヌクレオチドの中には直線化後に酵素切断部位の一部として残り、3'末端にあるポリ(A)配列を延ばす、または隠すものもある。この非生理学的なオーバーハングが、このような構築物から細胞内で産生されるタンパク質の量に影響を及ぼすかどうかは明らかでない。

【0153】

RNAには従来のプラスミドアプローチまたはウイルスアプローチより優れた、いくつかの利点がある。RNA供給源からの遺伝子発現は転写を必要とせず、トランセクション後にタンパク質産物は迅速に産生される。さらに、RNAは核ではなく細胞質にだけ接近しなければならず、従って、典型的なトランセクション方法は極めて高いトランセクション率をもたらす。さらに、プラスミドをベースとするアプローチには、関心対象の遺伝子の発現を駆動するプロモーターが研究中の細胞において活性であることが必要である。

【0154】

別の局面では、エレクトロポレーションによってRNA構築物を細胞に送達することができる。例えば、US2004/0014645、US2005/0052630A1、US2005/0070841A1、US2004/0059285A1、US2004/0092907A1に開示される哺乳動物細胞への核酸構築物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。任意の公知の細胞タイプのエレクトロポレーションに必要とされる電界強度を含む様々なパラメータが、関連する研究文献ならびにその分野における非常に多くの特許および出願において一般に知られている。例えば、米国特許第6,

10

20

30

40

50

678,556号、米国特許第7,171,264号、および米国特許第7,173,116号を参照されたい。エレクトロポレーションを治療に適用するための器具、例えば、MedPulser(商標) DNA Electroporation Therapy System(Inovio/Genetronics, San Diego, Calif.)は市販されており、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。例えば、US20070128708A1に記載のようにインビトロで細胞をトランスフェクトするためにエレクトロポレーションが使用されてもよい。インビトロで核酸を細胞に送達するためにエレクトロポレーションが使用されてもよい。従って、当業者に公知の多くの利用可能な装置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した、エレクトロポレーションを介した細胞への、発現構築物を含む核酸の投与は、関心対象のRNAを標的細胞に送達するための刺激的で新たな手段を提示する。

10

【0155】

T細胞の供給源

拡大および遺伝子組換えの前にT細胞供給源が対象から得られる。「対象」という用語は、免疫応答を誘発することができる生物(例えば、哺乳動物)を含むことが意図される。対象の例には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそのトランスジェニック種が含まれる。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、感染部位に由来する組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む多数の供給源から入手することができる。本発明のある特定の態様において、当技術分野において利用可能な任意の数のT細胞株を使用することができる。本発明のある特定の態様において、当業者に公知の任意の数の技法、例えば、Ficoll(商標)分離を用いて対象から収集された血液ユニットからT細胞を得ることができる。1つの好ましい態様において、個体の循環血液からの細胞はアフェレーシスによって得られる。アフェレーシス製品は、典型的に、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含むリンパ球を含有する。1つの態様において、血漿画分を除去するために、および後の処理工程のために細胞を適切な緩衝液または培地に入れるために、アフェレーシスによって収集された細胞は洗浄されてもよい。本発明の1つの態様において、細胞はリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄される。別の態様では、洗浄溶液はカルシウムを欠き、マグネシウムを欠いてもよく、全てではない多くの二価カチオンを欠いてもよい。またもや驚いたことに、カルシウムの非存在下での初期活性化工程は活性化を増大させる。当業者であれば、洗浄工程は、当業者に公知の方法によって、例えば、半自動「フロースル」遠心機(例えば、Cobe 2991 cell processor, Baxter CytoMateまたはHaemonetics Cell Saver 5)を用いて製造業者の説明書に従って達成され得ることを容易に理解するだろう。洗浄後、細胞は、例えば、CaフリーMgフリーPBS、PlasmaLyte A、または緩衝液を含む、もしくは緩衝液を含まない他の食塩水などの様々な生体適合性緩衝液に再懸濁されてもよい。または、アフェレーシス試料の望ましくない成分は除去されてもよく、細胞は培養培地に直接、再懸濁されてもよい。

20

【0156】

別の態様では、T細胞は、赤血球を溶解し、例えば、PERCOLL(商標)勾配に通す遠心分離または向流遠心水篅(counterflow centrifugal elutriation)によって単球を枯渇させることによって末梢血リンパ球から単離される。CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、およびCD45RO⁺T細胞などの特定のT細胞サブポピュレーションを正の選択法または負の選択法によってさらに単離することができる。例えば、1つの態様において、T細胞は、抗CD3/抗CD28(すなわち、3x28)結合ビーズ、例えば、DYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28Tと、望ましいT細胞の正の選択に十分な期間にわたってインキュベートすることによって単離される。1つの態様において、期間は約30分である。さらなる態様において、期間は30分～3時間またはそれより長い時間およびその間の全ての整数値である。さらなる態様において、期間は少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、または6時間である。さらに別の好ましい態様において、期間は10～24時間である。1つの好ましい態様において、インキュベーション期間は24時間である。白血病患者からT細胞を単離する場合、24時間などの長いインキュベーション時間を使用すると細胞収率を増加させることができる。他の

30

40

50

細胞タイプと比較してT細胞が少ない任意の状況において、例えば、腫瘍組織または免疫無防備状態の個体からの腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の単離においてT細胞を分離するために、さらに長いインキュベーション時間が用いられてもよい。さらに、長いインキュベーション時間を使用するとCD8+T細胞の捕捉効率を高めることができる。従って、T細胞がCD3/CD28ビーズに結合する時間を単に短くする、もしくは長くすることによって、および/または(本明細書においてさらに記載されるように)ビーズ:T細胞比を増加もしくは減少させることによって、培養開始時にまたはプロセス中の他の時点でT細胞サブポピュレーションを優先的に選択または排除することができる。さらに、ビーズまたは他の表面にある抗CD3抗体および/または抗CD28抗体の比を増加もしくは減少させることによって、培養開始時にまたは他の望ましい時点でT細胞サブポピュレーションを優先的に選択または排除することができる。当業者であれば、本発明の文脈において複数回の選択も使用できることを認識するだろう。ある特定の態様において、選択手順を実施し、活性化および拡大プロセスにおいて「選択されない」細胞を使用することが望ましい場合がある。「選択されない」細胞をさらなる回の選択に供することもできる。

10

【0157】

負の選択によるT細胞集団の濃縮は、負に選択される細胞に特有の表面マーカーに対して作られた抗体の組み合わせを用いて達成することができる。1つの方法は、負に選択される細胞に存在する細胞表面マーカーに対して作られたモノクローナル抗体のカクテルを使用する負の磁気免疫付着(negative magnetic immunoadherence)またはフローサイトメトリーを介した細胞選別および/または選択である。例えば、負の選択によってCD4⁺細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。ある特定の態様において、典型的にはCD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺、およびFoxP3⁺を発現する調節性T細胞を濃縮する、または正に選択することが望ましい場合がある。または、ある特定の態様において、調節性T細胞は、抗C25結合ビーズまたは他の類似した選択方法によって枯渇される。

20

【0158】

正の選択または負の選択によって望ましい細胞集団を単離するために、細胞および表面(例えば、ビーズなどの粒子)の濃度を変えることができる。ある特定の態様において、細胞およびビーズの最大接触を確実にするために、ビーズおよび細胞が一緒に混合される体積を大幅に減らす(すなわち、細胞濃度を増やす)ことが望ましい場合がある。例えば、1つの態様において、 2×10^9 細胞/mlの濃度が用いられる。1つの態様において、 1×10^9 細胞/mlの濃度が用いられる。さらなる態様において、 100×10^6 細胞/ml超が用いられる。さらなる態様において、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50×10^6 細胞/mlの細胞濃度が用いられる。さらに別の態様において、75、80、85、90、95、または 100×10^6 細胞/mlの細胞濃度が用いられる。さらなる態様において、125または 150×10^6 細胞/mlの濃度を使用することができる。高濃度を使用すると、細胞収率、細胞活性化、および細胞拡大を高めることができる。さらに、高い細胞濃度を使用すると、関心対象の標的抗原を弱く発現することができる細胞、例えば、CD28陰性T細胞、または多くの腫瘍細胞が存在する試料(すなわち、白血病の血液、腫瘍組織など)に由来する細胞をより効率的に捕捉することが可能になる。このような細胞集団は治療的価値を有する場合があり、入手することが望ましいであろう。例えば、高濃度の細胞を使用すると、通常、CD28発現が弱いCD8⁺T細胞をより効率的に選択することができる。

30

【0159】

関連する態様において、低濃度の細胞を使用することが望ましい場合がある。T細胞および表面(例えば、ビーズなどの粒子)の混合物を大幅に希釈することによって、粒子と細胞との相互作用が最小化される。これにより、粒子に結合する望ましい抗原を多量に発現する細胞が選択される。例えば、CD4⁺T細胞は高レベルのCD28を発現し、薄い濃度でCD8⁺T細胞より効率的に捕捉される。1つの態様において、使用される細胞の濃度は 5×10^6 /mlである。他の態様において、使用される濃度は約 1×10^5 /ml ~ 1×10^6 /mlおよびその間の任意の整数値でよい。

40

50

【0160】

他の態様において、細胞は、ローテータ上で様々な長さの時間にわたって様々な速度、2~10または室温でインキュベートされてもよい。

【0161】

刺激用のT細胞は洗浄工程後に凍結することもできる。理論に拘束されないが、凍結工程およびその後の解凍工程は、細胞集団内にある顆粒球を除去し、単球をある程度まで除去することによって均一な生成物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄工程後に、細胞は凍結溶液に懸濁されてもよい。多くの凍結溶液およびパラメータが当技術分野において公知であり、この状況において有用であるが、1つの方法は、20%DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含有するPBS、または10%デキストラン40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミンおよび7.5%DMSO、または31.25%Plasmalyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45%NaCl、10%デキストラン40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミンおよび7.5%DMSOを含有する培養培地、または例えば、HespanおよびPlasmaLyteAを含有する他の適切な細胞凍結培地を使用することを伴う。次いで、細胞は1分当たり1

10

の速度で-80まで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの気相中に保管される。管理された凍結の他の方法が用いられてもよく、-20でまたは液体窒素中ですぐに、管理されていない凍結が用いられてもよい。

【0162】

ある特定の態様では、凍結保存された細胞が本明細書に記載のように解凍および洗浄され、本発明の方法を用いて活性化の前に室温で1時間、静止される。

20

【0163】

本明細書に記載の拡大された細胞が必要とされ得る時間より前の時間に対象から血液試料またはアフェレーシス製品を収集したものも本発明の文脈において意図される。従って、拡大しようとする細胞の供給源を必要な任意の時点で収集することができ、T細胞療法、例えば、本明細書に記載のT細胞療法から利益を得る任意の数の疾患または状態のためのT細胞療法において後で使用するために、T細胞などの望ましい細胞を単離および凍結することができる。1つの態様において、概して健常な対象から血液試料またはアフェレーシスが採取される。ある特定の態様において、疾患を発症するリスクがあるが、疾患をまだ発症していない概して健常な対象から血液試料またはアフェレーシスが採取される。関心対象の細胞は後で使用するために単離および凍結される。ある特定の態様において、後の時間でT細胞が拡大、凍結、および使用されてもよい。ある特定の態様において、試料は、本明細書に記載のように特定の疾患の診断直後であるが、任意の処置前に患者から収集される。さらなる態様において、薬剤、例えば、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスボリン、アザチオプリン、メトトレキセート、ミコフェノール酸、およびFK506、抗体、または他の免疫除去剤(immunosuppressive agent)、例えば、CAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスボリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、ならびに放射線照射を用いた処置を含むが、これに限定されない任意の数の関連する治療モダリティーの前に、細胞は対象に由来する血液試料またはアフェレーシスから単離される。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(シクロスボリンおよびFK506)、または増殖因子によって誘導されるシグナル伝達に重要な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、患者のために細胞は単離され、骨髄移植または幹細胞移植、フルダラビンなどの化学療法剤を用いたT細胞除去療法(ablative therapy)、外部ビーム放射線療法(XRT)、シクロホスファミド、または抗体、例えば、OKT3もしくはCAMPATHと組み合わせて(例えば、前、同時、または後に)後で使用するために凍結される。別の態様において、細胞は、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサンを用いたB細胞除去療法前に単離され、B細胞除去療法後の処置のために後で使用するために凍結することができる。

30

40

【0164】

50

本発明のさらなる態様において、T細胞は非細胞処置による処置後に患者から直接得られ、T細胞は本発明のRNA CARを含むように操作される。この点に関しては、ある特定の癌処置後に、特に、免疫系を傷つける薬剤を用いた処置後に、患者が通常、処置から回復している間、処置直後に、得られたT細胞の品質は最適な場合があるか、またはエクスピボで拡大する能力について改善されている場合があることが観察されている。同様に、本明細書に記載の方法を用いたエクスピボ操作後に、これらの細胞は、向上した生着およびインビボ拡大のために好ましい状態になっている場合がある。従って、この回復期の間に、T細胞、樹状細胞、または造血系列の他の細胞を含む血球を収集することが本発明の文脈にあることが意図される。さらに、ある特定の態様において、動員(例えば、GM-CSFを用いた動員)および前処置(conditioning)レジメンを用いて、特定の細胞タイプの再増殖、再循環、再生、および/または拡大が好ましい状態、特に、療法後の規定された期間中に、特定の細胞タイプの再増殖、再循環、再生、および/または拡大が好ましい状態を対象において作り出すことができる。例示的な細胞タイプには、T細胞、B細胞、樹状細胞、および免疫系の他の細胞が含まれる。

10

【0165】

T細胞の活性化および拡大

T細胞のトランスフェクションの前に、一般的に、例えば、米国特許第6,352,694号；同第6,534,055号；同第6,905,680号；同第6,692,964号；同第5,858,358号；同第6,887,466号；同第6,905,681号；同第7,144,575号；同第7,067,318号；同第7,172,869号；同第7,232,566号；同第7,175,843号；同第5,883,223号；同第6,905,874号；同第6,797,514号；同第6,867,041号；および米国特許出願公開第20060121005号に記載の方法を用いて、細胞を活性化および拡大することができる。

20

【0166】

一般的に、本発明のT細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する薬剤およびT細胞表面にある補助刺激分子を刺激するリガンドが取り付けられている表面との接觸によって拡大される。特に、T細胞集団は、本明細書に記載のように、例えば、抗CD3抗体もしくはその抗原結合断片、または表面に固定化された抗CD2抗体との接觸によって、あるいはカルシウムイオノフォアと組み合わせたプロテインキナーゼCアクチベーター(例えば、ブリオスタチン)との接觸によって刺激されてもよい。T細胞表面にあるアクセサリー分子の補助刺激の場合、アクセサリー分子に結合するリガンドが用いられる。例えば、T細胞増殖の刺激に適した条件下でT細胞集団を抗CD3抗体および抗CD28抗体と接觸させることができる。CD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞の増殖を刺激するために、抗CD3抗体および抗CD28抗体。抗CD28抗体の例には、9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, Besancon, France)が含まれ、同様に、当技術分野において一般に知られている他の方法を使用することができる(Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。

30

【0167】

ある特定の態様において、T細胞に対する一次刺激シグナルおよび補助刺激シグナルは異なるプロトコールによって提供されてもよい。例えば、それぞれのシグナルを提供する薬剤は溶解状態にあってもよく、表面に結合されてもよい。表面に結合された場合、薬剤は同じ表面(すなわち、「シス(cis)」形成)に結合されてもよく、別々の表面(すなわち、「トランス(trans)」形成)に結合されてもよい。または、一方の薬剤が表面に結合されてもよく、他方の薬剤が溶解状態にあってもよい。1つの態様において、補助刺激シグナルを提供する薬剤は細胞表面に結合され、一次活性化シグナルを提供する薬剤は溶解状態にあるか、表面に結合される。ある特定の態様において、両薬剤は溶解状態にあってもよい。別の態様において、薬剤は可溶型でもよく、次いで、Fc受容体、または抗体、または薬剤に結合する他の結合剤を発現する細胞などの表面と架橋されてもよい。この点に関しては、例えば、本発明におけるT細胞の活性化および拡大における使用が意図される人工抗原提示細胞(aAPC)についての米国特許出願公開第20040101519号および同第20060034810号を参照されたい。

40

50

【0168】

1つの態様において、2種類の薬剤は、ビーズに、同じビーズに、すなわち「シス」で、または別々のビーズに、すなわち「トランス」で固定化される。

例として、一次活性化シグナルを提供する薬剤は抗CD3抗体またはその抗原結合断片であり、補助刺激シグナルを提供する薬剤は抗CD28抗体またはその抗原結合断片である。両薬剤とも等モル量で同じビーズに同時に固定化される。1つの態様において、CD4⁺T細胞拡大およびT細胞増殖のためにビーズに結合した1:1の比の各抗体が用いられる。本発明のある特定の局面において、1:1の比を用いて観察された拡大と比較してT細胞拡大の増加が観察されるような、ビーズに結合した抗CD3:CD28抗体の比が用いられる。1つの特定の態様において、1:1の比を用いて観察された拡大と比較して約1～約3倍の増加が観察される。1つの態様において、ビーズに結合したCD3:CD28抗体の比は100:1～1:100およびその間の全ての整数値である。本発明の1つの局面において、抗CD3抗体より多くの抗CD28抗体が粒子に結合される、すなわち、CD3:CD28の比は1未満である。本発明のある特定の態様において、ビーズに結合した抗CD28抗体:抗CD3抗体の比は2:1より大きい。1つの特定の態様において、ビーズに結合した1:100 CD3:CD28抗体比が用いられる。別の態様において、ビーズに結合した1:75 CD3:CD28抗体比が用いられる。さらなる態様において、ビーズに結合した1:50 CD3:CD28抗体比が用いられる。別の態様において、ビーズに結合した1:30 CD3:CD28抗体比が用いられる。別の態様において、ビーズに結合した1:10 CD3:CD28抗体比が用いられる。さらに別の態様において、ビーズに結合した3:1 CD3:CD28抗体比が用いられる。

10

20

30

40

【0169】

T細胞または他の標的細胞を刺激するために、1:500～500:1およびその間の任意の整数値の粒子:細胞比が用いられてもよい。当業者であれば容易に理解することができるよう、粒子:細胞比は、標的細胞に対する粒径によって決まる場合がある。例えば、小さなサイズのビーズは少数の細胞にしか結合することができないのに対して、大きなビーズは多数の細胞に結合することができる。ある特定の態様において、細胞:粒子比は1:100～100:1およびその間の任意の整数値であり、さらなる態様において、T細胞を刺激するために1:9～9:1およびその間の任意の整数値を含む比も使用することができる。T細胞を刺激する、抗CD3および抗CD28が結合した粒子とT細胞との比は前記のように異なってもよい。しかしながら、ある特定の好ましい値は、1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、および15:1を含み、好ましい比の1つは少なくとも1:1の粒子/T細胞である。1つの態様において、1:1以下の粒子:細胞比が用いられる。1つの特定の態様において、好ましい粒子:細胞比は1:5である。さらなる態様において、刺激日に応じて粒子:細胞比を変えることができる。例えば、1つの態様において、粒子:細胞比は1日目に1:1～10:1であり、追加の粒子が、1:1～1:10の最終比(添加日の細胞数に基づく)で毎日または1日おきに、その後10日まで細胞に添加される。1つの特定の態様において、粒子:細胞比は刺激の初日に1:1であり、刺激の3日目および5日目に1:5に調節される。別の態様において、粒子は、刺激の初日に1:1の最終比ならびに3日目および5日目に1:5まで毎日または1日おきに添加される。別の態様において、粒子:細胞比は刺激の初日に2:1であり、刺激の3日目および5日目に1:10に調節される。別の態様において、粒子は、刺激の初日に1:1の最終比ならびに3日目および5日目に1:10まで毎日または1日おきに添加される。当業者であれば、様々な他の比が本発明における使用に適している場合があることを理解するだろう。特に、比は粒径ならびに細胞のサイズおよびタイプに応じて異なる。

【0170】

本発明のさらなる態様において、T細胞などの細胞は、薬剤でコーティングされたビーズと組み合わされ、その後に、ビーズおよび細胞は分離され、次いで、細胞は培養される。別の態様では、培養前に、薬剤でコーティングされたビーズおよび細胞は分離されないが、一緒に培養される。さらなる態様では、最初に、ビーズおよび細胞は磁力などの力を加えることによって濃縮され、その結果、細胞表面マーカーの連結が増大し、それによっ

50

て細胞刺激が誘導される。

【0171】

例として、細胞表面タンパク質は、抗CD3および抗CD28が取り付けられる常磁性ビーズ(3x28ビーズ)をT細胞と接触させることによって連結されてもよい。1つの態様において、細胞(例えば、 10^4 ~ 10^9 個のT細胞)およびビーズ(例えば、1:1の比のDYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズ)が緩衝液、好ましくは、PBS(カルシウムおよびマグネシウムなどの二価カチオンを含まない)の中で組み合わされる。さらにまた、当業者であれば、任意の細胞濃度が使用され得ることを容易に理解することができる。例えば、標的細胞は試料中に非常にまれに見られ、試料の0.01%しか構成しなくてもよく、試料全体(すなわち、100%)が関心対象の標的細胞を含んでもよい。従って、任意の細胞数が本発明の文脈の中にある。ある特定の態様において、細胞および粒子の最大接触を確実にするために、粒子および細胞が一緒に混合される体積を大幅に減らす(すなわち、細胞濃度を増やす)ことが望ましい場合がある。例えば、1つの態様において、約 2×10^9 細胞/mlの濃度が用いられる。別の態様において、 100×10^6 細胞/ml超が用いられる。さらなる態様において、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50×10^6 細胞/mlの細胞濃度が用いられる。さらに別の態様において、75、80、85、90、95、または 100×10^6 細胞/mlの細胞濃度が用いられる。さらなる態様において、125または 150×10^6 細胞/mlの濃度を使用することができる。高濃度を使用すると、細胞収率、細胞活性化、および細胞拡大を上げることができる。さらに、高い細胞濃度を使用すると、関心対象の標的抗原を弱く発現することができる細胞、例えば、CD28陰性T細胞をより効率的に捕捉することが可能になる。このような細胞集団は治療的価値を有する場合があり、ある特定の態様では入手することが望ましいであろう。例えば、高濃度の細胞を使用すると、通常、CD28発現が弱いCD8⁺T細胞をより効率的に選択することが可能になる。

10

20

30

40

【0172】

本発明の1つの態様において、混合物は、数時間(約3時間) ~ 約14日またはその間の任意の1時間ごとの整数値にわたって培養されてもよい。別の態様において、混合物は21日間、培養されてもよい。本発明の1つの態様において、ビーズおよびT細胞は約8日間、一緒に培養される。別の態様において、ビーズおよびT細胞は2 ~ 3日間、一緒に培養される。T細胞の培養期間が60日以上になり得るように、数回の刺激サイクルも望ましい場合がある。T細胞培養に適した条件には、血清(例えば、胎仔ウシ血清またはヒト血清)、インターロイキン-2(IL-2)、インシュリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β 、およびTNF- α 、または当業者に公知の細胞増殖のための他の任意の添加物を含む増殖および生存率に必要な因子を含有し得る適切な培地(例えば、最小必須培地培地もしくはRPMI培地1640またはX-vivo15, (Lonza))が含まれる。細胞増殖のための他の添加物には、界面活性剤、プラスマネート(plasmanate)、および還元剤、例えば、N-アセチルシステインおよび2-メルカプトエタノールが含まれるが、これに限定されない。培地は、RPMI1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo15、およびX-Vivo20、Optimizerを含んでもよく、アミノ酸、ビルビン酸ナトリウム、およびビタミンが添加されてもよく、無血清でもよく、適切な量の血清(もしくは血漿)または規定された一組のホルモン、ならびに/あるいはT細胞の増殖および拡大に十分な量のサイトカインが添加されてもよい。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは実験培養物にのみ含まれ、対象に注入される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、増殖を支えるのに必要な条件下で、例えば、適切な温度(例えば、37°C)および雰囲気(例えば、空気+5%CO₂)の下で維持される。

50

【0173】

様々な刺激時間に曝露されているT細胞は異なる特徴を示すことがある。例えば、典型的な血液またはアフェレーシス末梢血単核球製品には、細胞傷害性T細胞集団またはサプレッサーT細胞集団(T_C、CD8⁺)より多いヘルパーT細胞集団(T_H、CD4⁺)がある。CD3受容体およびCD28受容体の刺激によるT細胞のエクスビオ拡大によって、約8 ~ 9日目より前には主にT_H細胞からなるT細胞集団が產生されるのに対して、約8 ~ 9日目の後にはT細胞集団

はますます多くのT_C細胞集団を含む。従って、処置目的に応じて、主にT_H細胞からなるT細胞集団を対象に注入することが有利な場合がある。同様に、T_C細胞の抗原特異的サブセットが単離されているのであれば、このサブセットをさらに大幅に拡大することが有益な場合がある。

【0174】

さらに、CD4マーカーおよびCD8マーカーに加えて他の表現型マーカーが大幅に変化するが、主に、細胞拡大プロセスの間に再現性よく変化する。従って、このような再現性は、活性化T細胞製品を特定の目的に合わせる能力を可能にする。

【0175】

治療用途

本発明は、T細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)を一過的に発現するように遺伝子組換えされ、RNA操作T細胞が、それを必要とするレシピエントに注入される細胞療法の一種を含む。注入された細胞はレシピエントの中にある腫瘍細胞を死滅することができる。いかなる特定の理論にも拘束されないが、RNA操作T細胞によって誘発される抗腫瘍免疫応答は能動的免疫応答でもよく、受動的免疫応答でもよい。この応答は、CAR T19細胞などのRNA操作T細胞を用いた養子免疫治療アプローチの一部になり得る。

【0176】

本発明のRNA操作T細胞は、哺乳動物におけるエクスピボ免疫化および/またはインビボ療法のためのワクチンの一種になり得る。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0177】

エクスピボ免疫化に関して、細胞を哺乳動物に投与する前に、以下:i)細胞の拡大、ii)細胞へのRNA CARの導入、またはiii)細胞の凍結保存の少なくとも1つがインビトロで発生する。

【0178】

エクスピボ手順は当技術分野において周知であり、下記でさらに詳細に議論される。簡単に述べると、細胞は哺乳動物(好ましくは、ヒト)から単離され、本発明のRNA CARを用いて遺伝子組換えされる(すなわち、インビトロで形質導入またはトランスフェクトされる)。RNA操作細胞は、治療利益を得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もよく、RNA操作細胞はレシピエントに対して自己由来でもよい。または、この細胞はレシピエントに対して同種異系でもよく、同系でもよく、異種でもよい。

【0179】

造血幹細胞および前駆細胞のエクスピボ拡大のための手順は、参照として本明細書に組み入れられる米国特許第5,199,942号に記載され、本発明の細胞に適用することができる。他の適切な方法が技術分野において公知である。従って、本発明は、細胞の特定のエクスピボ拡大法に限定されない。簡単に述べると、T細胞のエクスピボ培養および拡大は、(1)哺乳動物に由来する末梢血採取物または骨髄外植片からCD34+造血幹細胞および前駆細胞を収集する工程;ならびに(2)このような細胞をエクスピボで拡大する工程を含む。米国特許第5,199,942号に記載されている細胞増殖因子に加えて、細胞の培養および拡大のために、flt3-L、IL-1、IL-3、およびc-kitリガンドなどの他の因子を使用することができる。

【0180】

エクスピボ免疫化の点で細胞ベースワクチンを使用することに加えて、本発明はまた、患者において抗原に対する免疫応答を誘発するインビボ免疫化のための組成物および方法も提供する。

【0181】

本発明のRNA操作T細胞は単独で投与されてもよく、希釈剤および/あるいは他の成分、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て薬学的組成物として投与されてもよい。簡単に述べると、本発明の薬学的組成物は、1種類または複数種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て本明細書に

10

20

30

40

50

記載の標的細胞集団を含んでもよい。このような組成物は、緩衝液、例えば、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水など;炭水化物、例えば、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;タンパク質;ポリペプチドまたはアミノ酸、例えば、グリシン;抗酸化物質;キレート剤、例えば、EDTAまたはグルタチオン;アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム);および防腐剤を含んでもよい。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与のために投与される。

【0182】

本発明の薬学的組成物は、処置しようとする(または予防しようとする)疾患に適したやり方で投与することができる。投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患のタイプおよび重篤度などの要因によって決まるが、適切な投与量は臨床試験によって決まることがある。

10

【0183】

「免疫学的に有効な量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示された時、投与される本発明の組成物の正確な量は、医師が、患者(対象)の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および状態の個人差を考慮して決めることができる。本明細書に記載の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、これらの範囲内の全ての整数値を含めて、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重の投与量で投与され得ると一般的に述べることができる。T細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与されてもよい。それぞれの用量で投与されるT細胞量は異なってもよい。例えば、1つの態様において、1回目の投与は比較的高い用量を含み、その後の用量は比較的低い用量を含む。細胞は、免疫療法において一般に知られている注入法を用いて投与することができる(例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照されたい)。ある特定の患者に最適な投与量および処置体制は、医学分野の当業者が患者の疾患徴候をモニタリングし、それに応じて処置を調節することによって容易に決定することができる。

20

【0184】

ある特定の態様において、活性化T細胞を対象に投与し、次いで、その後に採血し(またはアフェレーシスを実施し)、本発明に従って採血から得られたT細胞を活性化し、これらの活性化および拡大されたT細胞を患者に再注入することが望ましい場合がある。このプロセスは数週間ごとに複数回実施することができる。ある特定の態様において、10cc~400ccの採血からT細胞を活性化することができる。ある特定の態様において、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、または100ccの採血からT細胞は活性化される。理論に拘束されないが、この複数回の採血/複数回の再注入プロトコールを用いて、ある特定のT細胞集団が排除されることがある。

30

【0185】

本発明の組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸血、移植(implantation)、または移植(transplantation)を含む任意の便利なやり方で実施することができる。本明細書に記載の組成物は患者に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、結節内に(intranodally)、髄内に、筋肉内に、静脈内(i.v.)注射によって、または腹腔内に投与されてもよい。1つの態様において、本発明のT細胞組成物は皮内注射または皮下注射によって患者に投与される。別の態様において、本発明のT細胞組成物は、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てもよい。

40

【0186】

本発明のある特定の態様において、本明細書に記載の方法を用いて、またはT細胞が治療レベルまで拡大される当技術分野において公知の他の方法を用いて活性化および拡大された細胞は、抗ウイルス療法、シドホビルおよびインターロイキン-2、シタラビン(ARA-Cとも知られる)などの薬剤による処置、またはMS患者の場合はナタリズマブ処置もしくは乾癬患者の場合はエファリズマブ処置、またはPML患者の場合は他の処置を含むが、これに限定されない任意の数の関連する治療モダリティーと組み合わせて(例えば、前、同時、または後に)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、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスボリン、アザチオプリン、メトレキセート、ミ

50

コフェノール酸、およびFK506、抗体、または他の免疫除去剤、例えば、CAMPATH、抗CD3抗体、または他の抗体療法、サイトキシン(cytokine)、フルダリビン(flu daribine)、シクロスボリン、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、ならびに放射線照射と併用されてもよい。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(シクロスボリンおよびFK506)、または増殖因子によって誘導されるシグナル伝達に重要な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、化学療法剤、例えば、フルダラビンを用いたT細胞除去療法、外部ビーム放射線療法(XRT)、シクロホスファミド(シトキサン)、または抗体、例えば、OKT3もしくはCAMPATHと組み合わせて(例えば、前、同時、または後に)患者に投与される。別の態様において、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサンなどのB細胞除去療法後に本発明の細胞組成物は投与される。例えば、1つの態様において、対象は、高用量化学療法を用いた標準的な処置の後に末梢血幹細胞移植を受けてもよい。ある特定の態様において、移植後に、対象には本発明の拡大された免疫細胞が注入される。さらなる態様において、外科手術の前または後に、拡大された細胞が投与される。例えば、シトキサン療法とRNA CAR T細胞の複数注入との組み合わせが腫瘍クリアランスおよび生存率を改善することが本明細書において発見された。

10

【0187】

患者に投与される前記処置の投与量は、処置される状態および処置のレシピエントが正確にがどういったものであるかに応じて異なる。ヒト投与のための投与量の調整は、当技術分野において認められている手法に従って実施することができる。CAMPATHの用量は、例えば、一般的に、成人患者については1～約100mgの範囲であり、通常、1～30日間、毎日投与される。好ましい一日量は1～10mg/日であるが、場合によっては、40mg/日までの高用量が用いられてもよい(米国特許第6,120,766号に記載)。

20

【実施例】

【0188】

実験実施例

本発明は以下の実験例を参照することによってさらに詳述される。これらの実施例は例示のためだけに提供され、他で特定しない限り限定することが意図されない。従って、本発明は以下の実施例に限定されると解釈してはならず、むしろ、本明細書において提供される開示の結果として明らかになる任意のおよび全てのバリエーションを包含すると解釈すべきである。

30

【0189】

これ以上説明することなく、当業者であれば前述の説明および以下の例示的な実施例を用いて、本発明の化合物を製造および利用し、請求された方法を実施することができると考えられる。従って、以下の実際に役立つ例は本発明の好ましい態様を具体的に指摘し、本開示の残りの部分において限定するものであると解釈してはならない。

【0190】

実施例1: キメラ抗原受容体を発現するエレクトロポレーション処理された自己由来T細胞はヒト播種性腫瘍の退縮を媒介する

40

遺伝子導入によってTリンパ球抗原特異性を再指向(redirecting)させると、養子免疫治療用の多数の腫瘍反応性Tリンパ球を得ることができる。しかしながら、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するT細胞の臨床適用ではウイルスベクター製造に関連した安全上の懸念がある場合がある。組込みに関連した安全上の懸念なくRNAエレクトロポレーションによってTリンパ球を遺伝子組換えすることができると考えられている。養子免疫治療用の安全なプラットフォームを確立するために、高レベルのトランスジーン発現を実現するようにRNAインビトロ転写用ベクターバックボーンを最適化した。エレクトロポレーションして1週間後まで、RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞のCAR発現および機能が検出された。本明細書において示された結果から、RNA CARをエレクトロポレーションして

50

ヨン処理によって導入したT細胞を複数回注射することによって、NOD/scid/c(-/-)マウスにある大きな血管化した側腹部中皮腫腫瘍の退縮が媒介されたことが証明される。抗メソテリンCAR mRNAをエレクトロポレーション処理によって導入した自己由来ヒトT細胞を複数回注射することによって、インビボで>50日成長している既存の腹腔内ヒト由来腫瘍を処置した時も劇的な腫瘍縮小が生じた。

【0191】

これらの実験において使用した材料および方法を今から説明する。

【0192】

材料および方法CAR用のインビトロ転写mRNAベクターの構築

10

メソテリン(ss1)およびCD19に特異的なCAR(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5; Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-64)を、プライマー-ss1F(cctaagcttaccgccatggccttaccagtgac; SEQ ID NO:1)、CD19F(cctaagcttaccgccatggccta ccagtgaccgccc; SEQ ID NO:2)、およびzetaR(cctgcggccgc tttagcgagggggcagggcc; SEQ ID NO:3)を用いてPCR増幅した。pGEM-GFP.64A(Zhao et al., 2006, Mol Ther 13:151-9)のGFPを置換することによってPCR産物をpGEM.64Aベースのベクターにサブクローニングして、pGEM.64Aベースのss1ベクターおよびCD19ベクターを生成した。5' 非翻訳領域または3' 非翻訳領域(UTR)およびさらに長いポリ(A)を構築物に付加するために、pGEM.ss1.bbz.64AベクターまたはpGEM-CD19.bbz.64Aベクターの中にある64ポリ(A)配列を、PCRによって合成された150ポリ(A)配列(150A)を含む、または含まない グロブリンに由来する3'UTRの2つの反復(2bgUTR)によって置換し、配列決定によってさらに確認した。しかしながら、pGEMベースのベクターでは選択用にアンピシリンを使用し、これは、GMP製造および後の臨床適用のためのFDA規制ガイダンスと一致しない。従って、UTRを有するCAR cDNAをpDrive(Qiagen)に導入した。pDrive(Qiagen)は選択用にカナマイシンも使用する。最初に、pGEMベクターからHindIII消化およびNdeI消化(フィルイン平滑末端)によってss1.bbz.2bgUTR.150AまたはCD19.bbz.2bgUTR.150Aを切断し、KpnIおよびNotI(フィルイン平滑末端)によってpDriveにサブクローニングした。pDrive.ss1.bbz.2bgUTR.150AおよびpDrive.CD19.bbz.2bgUTR.150Aを作製するために、正しい方向を有するインサートを配列決定によって確認した。考えられる臨床使用のためのベクターを完成させるために2つの工程があった。1)pDriveベクター内のアンピシリン耐性遺伝子をAhdIおよびBcI VIによる二重消化によって欠失させた。2)CD19.bbzおよびss1.bbzの中にある内部オープンリーディングフレームを変異誘発PCRによって欠失させて、pD-A.19.0F.2bg.150A(SEQ ID NO:5)およびpD-A.ss1.0F.2bg.150A(SEQ ID NO:4)を生成した。

20

30

40

【0193】

RNAインビトロ転写

RNAの質、量、および費用を比較するために、3種類のRNA IVTシステム:通常キャップ(RC)類似体7-メチルGpppGを使用するmMESSAGE mMACHINE(登録商標)T7キット(Ambion, Inc);アンチリバースキャップ類似体(ARCA、7-メチル(3'-O-メチル)GpppG)m7G(5')ppp(5')G)を用いてIVT RNAを生じるmMESSAGE mMACHINE(登録商標)T7 Ultra(Ambion, Inc)、ならびにキャッピング酵素(CE)および2'-O-メチルトランスフェラーゼキャッピング酵素を用いてCap1 IVT RNA(Epicentre)を生じるmScript(商標)RNA System(Epicentre, Madison, WI)を使用した。RCは40%までのキャッピング効率で組み込まれるのに対して、ARCAはキャッピング効力を80%まで高め、CEシステムは100%までのキャッピング効率をもたらすことができる。様々なIVT RNA産物をRNeasy Mini Kit(Qiagen, Inc., Valencia, CA)を用いて精製し、精製RNAを1~2mg/mlでRNアーゼフリー水に溶出させた。

50

【0194】

臨床グレードIVT RNAの調製

内部ORFのないCARオープンリーディングフレーム(ORF)を含有する規制機関に準拠したプラスミドDNAベクターを作製するために、前記のように、UTRおよびポリ(A)配列を有するCAR cDNA用のDNAインサートをpGEMベースのベクターから、カナマイシン選択マーカー

50

を含有するpDriveベクターにサブクローニングして、pdrive.19bbz(CD19-bbz用)およびpDrive.ss1bbz(ss1-bbz用)を作製した。CAR ORF内に入れ子になっている内部ORFから翻訳される、可能性のある異常タンパク質を排除するために、CD19-bbzおよびss1-bbzの中にあるサイズが60bpより大きな全ての内部ORFを変異誘発PCRによって変異させた。従って、19-bbz用およびss1-bbz用にそれぞれ、内部ORFを含まないpD-A.19.0FおよびpD-A.ss1.0Fを作製した。親ORFを含有するss1-bbz RNAを、SEQ ID NO:6を含むヌクレオチド配列から転写させた。内部ORFを含まないss1-bbz構築物を、SEQ ID NO:8を含むヌクレオチド配列から転写させた。親ORFを含有するss1-bbz RNAを、SEQ ID NO:7を含むヌクレオチド配列から転写させた。内部ORFを含まないCD19-bbz構築物を、SEQ ID NO:9を含むヌクレオチド配列から転写させた。

10

【 0 1 9 5 】

T細胞培養

匿名の健常ドナーによって提供されたリンパ球およびT細胞を水簸(elutriation)によって精製した。一部の実験では、同じ患者に由来する凍結保存したT細胞および腫瘍細胞を使用した。「患者108」には悪性中皮腫があった。初期臨床試験の一環として、この患者は白血球アフェレーシスを受け、彼の悪性胸水から腫瘍細胞が作製された。記載(Levine et al., 1997, J Immunol 159:5921-30)のように、CD3/CD28ビーズ(Invitrogen)の添加および1サイクルの刺激によってT細胞を活性化した。図5に示した実験のために、患者108のT細胞を、4-1BBLを発現する放射線照射済み人工抗原提示細胞で刺激し、記載(Suhoski et al., 2007, Mol Ther 15:981-8)のように抗CD3モノクローナル抗体(mAb)OKT3およびCD28 mAb 9.3を添加した。ビーズ刺激後に、T細胞を10%FCSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン(R10)を含むRPMI 1640に入れて $0.8 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLの密度で維持した。

20

【 0 1 9 6 】

T細胞のRNAエレクトロポレーション

培養10日目に、活性化T細胞を収集し、エレクトロポレーション処理した。2種類のエレクトロポレーションシステム:BTX CM830(Harvard Apparatus BTX, Holliston, MA, USA)およびMaxcyte(Maxcyte Inc, Rockville, MD, USA)を使用した。BTX EM830を用いたエレクトロポレーションの場合、エレクトロポレーションに供された刺激済みT細胞をOPTI-MEM(Invitrogen)で3回洗浄し、 $1 \sim 3 \times 10^8 / \text{ml}$ の最終濃度でOPTI-MEMに再懸濁した。その後に、 $0.1 \sim 0.2 \text{ml}$ の細胞を $10 \mu\text{g} / 0.1 \text{ml}$ T細胞のIVT RNAと混合し(または示したように混合し)、2mmキュベット(Harvard Apparatus BTX, Holliston, MA, USA)に入れてエレクトロポレーション処理した。Maxcyteを用いたエレクトロポレーションの場合、OC-400処理チャンバー(Maxcyte Inc, Rockville, MD, USA)と内臓プログラムを用いて説明書マニュアルに従った。

30

【 0 1 9 7 】

エレクトロポレーション処理されたT細胞におけるCAR検出

細胞をFACs緩衝液(PBS+0.1%アジ化ナトリウムおよび0.4%BSA)で洗浄および懸濁した。ビオチン標識ポリクローナルヤギ抗マウスF(ab)2抗体(抗Fab, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)をチューブに添加し、細胞を4℃で25分間インキュベートし、2回洗浄した。次いで、細胞をフィコエリトリン標識ストレプトアビジン(BD Pharmingen, San Diego, CA)で染色した。

40

【 0 1 9 8 】

ELISA

標的細胞を洗浄し、 10^6 細胞/mLでR10に懸濁した。10万個のそれぞれの標的細胞タイプを96ウェル丸底プレート(Corning)の2個のウェルにそれぞれ添加した。エフェクターT細胞培養物を洗浄し、 10^6 細胞/mLでR10に懸濁した。96ウェルプレートの示されたウェルの中で10万個のエフェクターT細胞を標的細胞と組み合わせた。さらに、T細胞のみを含有するウェルを調製した。プレートを37℃で18~20時間インキュベートした。インキュベーション後、上清を採取し、標準的な方法を用いたELISAアッセイ(Pierce, Rockford, IL)に供した。

50

【 0 1 9 9 】

CD107a染色

細胞を、1:1のE:T(10^5 個のエフェクター: 10^5 個の標的)で $160\mu\text{l}$ の完全RPMI培地が入っている96ウェルプレートに入れてプレーティングした。 $20\mu\text{l}$ のフィコエリトリン標識抗CD107a Ab(BD Pharmingen, San Diego, CA)を添加し、プレートを37℃で1時間インキュベートした後に、Golgi Stopを添加し、さらに2.5時間インキュベートした。2.5時間後に、 $10\mu\text{l}$ のFITC-抗CD8およびAPC-抗CD3を添加し、37℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後、試料をFACS緩衝液で1回洗浄した。フローサイトメトリー取得をBD Facs Calibur(BD Biosciences)を用いて行い、分析をFlowJo(Treestar Inc, Ashland, OR)を用いて行った。

10

【 0 2 0 0 】

フロー-CTL

わずかに変更を加えたバージョンのフローサイトメトリー細胞傷害アッセイを使用した(Cao et al., 2010 Cytometry Part A 77:534-45)。このアッセイでは、負の対照細胞の生存率に対して標的細胞の生存率を比較することによって標的細胞の細胞傷害性を測定する。負の対照細胞および標的細胞をエフェクターT細胞と同じチューブ内で組み合わせる。記載(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5; Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-64)のように、親K562細胞にヒトCD19またはメソテリンを形質導入することによって標的細胞を調製した。この実験では、CD19-CAR T細胞およびメソ-CAR T細胞の細胞溶解作用を、両標的細胞(K562-CD19またはK562-メソ)の混合物を用いて試験した。K562-メソを 1.5×10^6 細胞/ mL の濃度でR10培地に懸濁し、蛍光色素CellTracker(商標)Orange CMRA(Invitrogen)を $5\mu\text{M}$ の濃度で添加した。細胞を混合し、次いで、37℃で30分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、R10に懸濁した。次に、K562-メソを37℃で60分間インキュベートした。次いで、細胞を2回洗浄し、R10に懸濁した。K562-CD19を 1×10^6 細胞/ mL でPBS+0.1% BSAに懸濁した。この細胞懸濁液に、蛍光色素カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル(CFSE)(Invitrogen)を $1\mu\text{M}$ の濃度で添加した。細胞を37℃で10分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞懸濁液の体積に等しい体積のFBSを添加することによって標識反応を止め、細胞をRTで2分間インキュベートした。細胞を洗浄し、R10に懸濁した。培養を、以下のT細胞:標的細胞比:10:1、3:1、および1:1で96ウェル培養プレート内で2回繰り返して設定した。標的細胞は、常に、 0.1mL 中、10,000個のK562-メソであった。それぞれの培養は、 10^4 個のK562-CD19負の対照細胞も含んだ。さらに、K562-CD19+K562-メソ細胞のみを含有する培養を設定した。培養物を37℃で4時間インキュベートした。インキュベーション直後に、7-AAD(7-アミノアクチマイシンD)(BD Pharmingen)を製造業者により推奨されたように添加し、フローサイトメトリー取得をBD Calibur(BD Biosciences)を用いて行った。分析物を7AAD陰性(生)細胞でゲーティングし、それぞれのT細胞+標的細胞培養についてK562-CD19生細胞およびK562-メソ生細胞のパーセントを求めた。K562-メソのパーセント生存率は、K562-メソ生細胞のパーセントをK562-CD19対照生細胞のパーセントで割ることによって求めた。K562-メソの補正済みパーセント生存率は、それぞれのT細胞+標的細胞培養物におけるK562-メソのパーセント生存率を、エフェクターT細胞を含まず、K562-メソ標的細胞およびK562-CD19対照細胞しか含有しないチューブにおけるパーセントK562-メソ標的細胞:パーセントK562-メソ負の対照細胞の比で割ることによって計算した。この補正是、出発細胞数のばらつきおよび自発的標的細胞死を説明するのに必要であった。細胞傷害性は、K562-メソのパーセント細胞傷害性= $100 - \text{K562-メソの補正済みパーセント生存率}$ として計算した。全てのエフェクター:標的比について、細胞傷害性を2回繰り返して求め、結果を平均した。

20

30

40

【 0 2 0 1 】

マウス異種移植片研究

以前に述べられたように若干の変更を加えて(Teachey et al., 2006, Blood 107:1149-55; Teachey et al., 2008, Blood 112:2020-3)、研究を行った。簡単に述べると、6~10週齢のNOD-SCID- c-/- (NSG)マウスをJackson Laboratory(Bar Harbor, ME)から入手した

50

か、または承認を受けた実験動物委員会(institutional animal care and use committee)(IACUC)プロトコールの下、組織内で飼育し、病原体フリーの条件下で維持した。以前に述べられたように(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5)、患者108に由来するM108ヒト中皮腫の派生物を使用し、 5×10^6 個の細胞を用いて側腹部腫瘍を樹立した。レンチウイルスベクターを用いてM108腫瘍細胞をホタルルシフェラーゼも発現するように操作して、M108-Luc細胞株を得た。 8×10^6 個の生存しているM108-Lucを動物に腹腔内(IP)注射した。腫瘍成長を、側腹部腫瘍の場合はカリパス測定を用いてサイズによって、IP腫瘍の場合はバイオルミネセンスイメージングおよび体重によってモニタリングした。

【0202】

10

バイオルミネセンスイメージング(BLI)

腫瘍成長をBLIによってモニタリングした。麻酔したマウスを、Xenogen SpectrumシステムおよびLiving Image v3.2ソフトウェアを用いて画像化した。マウスに、15mg/mLの濃度で滅菌PBSに懸濁した150mg/kg体重のD-ルシフェリン(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)(100 μ Lのルシフェリン溶液/10gのマウス体重)をIP注射した。M108-Lucの以前の滴定から、光子放射ピークまでの時間は5分であり、ピーク放出は6~10分間続くことが示された。それぞれの動物を単独で(光子定量の場合)または5匹までのマウスの群(表示目的の場合)において前後うつぶせになった位置にしてルシフェリン注射後同じ相対的な時点(6分)で画像化した。直線スケールの中域(600~60000カウント)に達するまで、または最大露出設定(f/stop 1、大きなビニング(binning)、および1~2秒)に達するまで、データを収集し、次いで、それぞれの画像を露出時間、f/stop、ビニング、および動物サイズについて規準化するために、photon/秒/cm²/ステラジアンに変換した。解剖学的局在性のために、光強度を表す疑似カラー地図をグレースケール体表参照画像の上に重ね合わせた。データ表示のために、ルシフェラーゼ含有細胞のないマウスを最大設定で画像化し、 3.6×10^5 p/s/cm²/srの平均値を得た。

20

【0203】

統計の面で考慮すべき事項

分析は、STATAバージョン10(StataCorp)またはPrism4(GraphPad Software)を用いて行った。インビトロデータは2回の繰り返しの平均を表し、マン・ホイットニー検定を介して平均を比較した。複数の群間で比較するために、クラスカル・ワリス分析を、個々の群を比較するダン(Dunn)多重比較検定を用いて行った。複数の曲線を比較するために生存曲線をログランク検定とボンフェローニ補正を用いて比較した。

30

【0204】

実験結果を今から説明する。

【0205】

RNA CARのエレクトロポレーションは刺激済みT細胞において可変発現を媒介する

CD3、CD28、および4-1BB活性化ドメインの組み合わせを有する抗メソテリンss1 scFv CARはレンチウイルスベクター技術を用いて導入された時に、T細胞において高度にかつ安定して発現されることが以前に報告されている(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5)。以前に述べられたように(Levine et al., 1997, J Immunol 159:5921-30)、ヒトT細胞を10日間、活性化し、細胞が静止に近い状態に戻った時に、以前に述べられたシグナル伝達部分組み合わせと共にss1 scFvをコードするRNAをエレクトロポレーション処理によって導入した。CD3のみを有するCAR(ss1-z)をエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞が最も高いトランスジーン発現を示し、それに続いてss1-28z(CD28+CD3)およびss1-bbz(4-1BB+CD3)発現のレベルがほぼ等しかったので、トランスジーン発現レベルは均一でないことが見出された(図6)。いくつかの前臨床段階および初期段階の臨床試験において、補助刺激ドメインを含有する「第二世代」CARがウイルスベクターシステムと共に発現された時に優れているように思われたので(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5; Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-64; Zhao et al., 2009, J Immunol 183:5563-74; Zhong et al., 2009, Mo

40

50

I Ther 18:413-20)、「第一世代」ss1-z CARの発現を最適しないということになった。逆に、第二世代ss1-bbzおよびCD19-bbz CARがレンチウイルスベクター技術を用いた臨床試験において試験されているので、RNAエレクトロポレーションを用いたさらなる最適化のために選択した。

【0206】

RNA構築物の最適化は刺激済みT細胞におけるトランスジーン発現を改善する

グロブリンに由来する3'非翻訳領域(UTR)の2つの反復および長いポリ(A)配列の組込みによる非コード領域の構造改変は、RNAでトランスフェクトされた樹状細胞のRNA安定性、翻訳効率、および機能を向上させることができることが示されている(Holtkamp et al., 2006, Blood 108:4009-17)。しかしながら、これらの戦略は、RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞において体系的に評価されたことがない。このアプローチがヒトTRINパ球に適用されるかどうか試験するために、5'UTR(SP163)または3'UTR[図1Aに示したような、ヒト -グロブリンに由来する3'UTRの少なくとも2つの反復(2bgUTR)または延長されたポリ(A)(150A)配列]を添加することによってIVTベクター(pGEM-ss1bbz.64A)を改変した。SP163翻訳エンハンサーは血管内皮増殖因子遺伝子の5'UTRに由来し、プロモーター単独と比較して発現レベルを2~5倍増大させると報告されている(Stein et al., 1998, Mol Cell Biol 18:3112-9)。これらの構築物から作製したRNAを刺激済みT細胞にエレクトロポレーション処理によって導入した。図1Bに示したように、64ポリ(A)トラクトを含有する基本IVT構築物と比較して、 -グロブリンに由来する3'UTR(2bgUTR)および長いポリ(A)(150A)テールを付加すると、特に、これらを組み合わせた時に(2bgUTR.150A)、トランスジーン発現が向上した。対照的に、ss1-bbzの5'末端にSP163配列を組み込むとトランスジーン発現が抑制された。これは、SP163配列を付加した時のキャッピング効率の低下によるものかもしれない。

【0207】

5'キャップ構造の最適化は、エレクトロポレーション処理されたT細胞におけるCARの発現および機能を向上させる

mRNA分子末端に位置する5'キャップは、5' 5'三リン酸結合を介してmRNAにつながったグアニンヌクレオチドからなる。cap0および1(Banerjee, 1980, Microbiol Rev 44:175-205)を含む、いくつかのキャップ構造が述べられている。トランスジーンおよびポリ(A)テール構築物に5'キャップ構造を組み込むために、いくつかの方法が用いられている。市販のシステムは、キャッピングされたmRNAを生じるために同時転写アプローチまたは酵素的アプローチを用いてcap0または1を組み込む。翻訳効率が向上するように最適化するために、および様々なキャッピングシステムの費用がかなり高いために、このプロセスは重要である。異なるキャッピングシステムを用いて作製したRNAを刺激済みT細胞にエレクトロポレーション処理によって導入し、トランスジーン発現をフローサイトメトリーによってモニタリングした(図2Aおよび2B)。結果から、アンチリバースキャップ類似体(ARCA)によってキャッピングされたRNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞のトランスジーン発現は、4時間で、通常キャップ(RC)類似体によってキャッピングされたRNAより3倍高いことが分かった。図2Bに示したようにエレクトロポレーション後5日目にT細胞の>50%がCARを依然として発現していたので、ARCAによってキャッピングされたRNAのトランスジーン持続性も改善された。

【0208】

次に、cap0および1の酵素的付加とARCAの非酵素的付加を比較した。キャッピング酵素(CE)システムを使用する考えられる利点は、このアプローチが、cap1構造を生じるように一緒に働くCEおよびmScript 2'-O-メチルトランスフェラーゼを含むことである。cap1構造はARCAと非常によく似ており、多くのインビオシステムにおいて優れた翻訳効率を提供する。ss1-bbzをコードするcap0または1 RNAの効率を評価するために、ARCA、CE、cap1 CEs、またはCEs+さらなるポリ(A)によって作製されたRNAをヒトT細胞にエレクトロポレーション処理によって導入した。図2Cに示したように、cap1 RNAエレクトロポレーションを用いたCAR発現はARCA IVT mRNAと同等であった。長いポリ(A)テールを組み込むことによ

10

20

30

40

50

ってトランスジーン発現がさらに向上した。これは図1の結果と一致する。

【0209】

最適化IVT RNAの考えられる機能上の利点の1つは、さらなるCARが翻訳されることで発現が持続し、標的認識またはホメオスタシス拡大により誘導されるダウンレギュレーションが克服されるので、CAR発現を持続できることである。活性化T細胞に、ss1-bbzをコードする様々なRNA調製物をエレクトロポレーション処理によって導入し、次いで、K562-メソ標的細胞または対照K562-CD19標的細胞と2日間、共培養した(図7)。ARCAおよびCE1またはCE1+Aによるキャッピングのあるss1-bbz RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞は、対照標的細胞と共培養した同じT細胞と比較して、K562-メソ細胞株で刺激された後でも依然としてトランスジーン発現を維持することができた。対照的に、RC類似体によるキャッピングのあるss1-bbz RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞には、抗原を有する標的と共に培養した後に、検出可能なCARが表面になかった。

【0210】

前記の結果および他のデータに基づいて、ARCAまたはcap1および長いポリ(A)テールによってキャッピングされたRNAは、試験されたRNAの中で最高のRNA生成システムであると結論付けることができる。IVT RNAの大規模GMP产生のために、製造費も考慮される場合はcap1が好ましい。

【0211】

最適化IVT RNA CARのインビトロ機能

親CAR配列を有するプラスミドまたは内部ORFフリーCAR配列を有するプラスミドから調製したRNAをT細胞にエレクトロポレーション処理によって導入した。エレクトロポレーションして20時間後に、内部ORFフリーRNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞からのトランスジーン発現は、親配列を有するRNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞と同等であることが見出された(図8)。しかしながら、cap1および延長されたポリ(A)をIVT RNAに組み込むCEシステムを用いて内部ORFフリーpD-A.ss1.0FまたはpD-A.19.0F RNAから作製した臨床用RNAをエレクトロポレーション処理によって導入した活性化T細胞において、CAR発現の大幅な延長が観察された(図3)。図3Cに示したようにメソRNA CARおよびCD19 RNA CARの両方について、RNAエレクトロポレーション後、7日間と長期間にわたって最適化IVT RNAのトランスジーン発現を検出することができた。

【0212】

以前の研究から、T細胞受容体刺激後のCD8⁺T細胞において4-1BBはアップレギュレートされることが分かっている(Wolfl et al., 2007, Blood 110:201-10)。ss1-bbz RNAまたはCD19-bbz RNAをエレクトロポレーション処理によって導入した大量のT細胞を、メソテリンまたはCD19を発現する標的細胞とインキュベートした。特に、CD8⁺T細胞表面に、標的特異的な4-1BBが活発にアップレギュレートされることが見出された(図3A)。RNA CARを発現するT細胞はまた、かなりの量のインターロイキン-2(IL-2)を分泌し、標的特異的認識時にCD107aを移動させた(図3Bおよび3D)。最後に、フローベースの溶解アッセイにおいて、CD19(19.0F)CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞およびss1(ss1.0F)CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞はいずれも効率的に標的細胞を特異的溶解できることが見出された(図9)。

【0213】

RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞はヒト播種性中皮腫異種移植片の退縮を媒介する

最初に、予め樹立された大きな腫瘍を有するマウスにおける最適化RNA CAR発現T細胞の治療能力を評価するためにパイロット実験を行った。以前に述べられたように(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5)、NSGマウスにおいてメソテリン陽性腫瘍を樹立した。腫瘍を接種して66日後に、ss1-bbz RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入した 10×10^6 ~ 15×10^6 個の健常ドナー由来T細胞を2週間にわたって週2回、腫瘍内注射した。週2回投与計画は、図3に示したインビトロ発現データに基づいた。図4Aから分かるように、ss1 RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞

10

20

30

40

50

で処置したマウスでは腫瘍は退縮したのに対して、マウス対照群では進行性の腫瘍成長が観察された。98日目にマウスを屠殺した時、T細胞をエレクトロポレーション処理によって導入したマウスの全てにおいて腫瘍サイズは食塩水で処置したマウスよりかなり小さかった(図10)。これらの結果は、RNA操作T細胞の複数回注射の治療能力を示している。しかしながら、RNA操作T細胞は、レンチウイルスによって形質導入されたT細胞を用いた同じ腫瘍モデルほど効力はない。レンチウイルスによって形質導入したT細胞を用いた同じ腫瘍モデルでは、2回のT細胞腫瘍内注射によって、ほとんどのマウスを治癒することができた(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5)。

【0214】

RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞が大きな播種性腫瘍を有するマウスを処置できるかどうか試験するために、M108-Lucモデルを開発した。バイオルミネセンスイメージング(BLI)を可能にするために、M108親細胞にホタルルシフェラーゼを安定して形質導入した。予備実験では、NSGマウスは、進行性腹水を伴う広範囲に散在する疾患を発症し、全てのマウスが100日目までに死亡するか、または瀕死になることが見出された。NSGマウス(n=18)にM108-Lucを注射し、3つのi.p.処置群に無作為化した。腫瘍注射後58日目に、全てのマウスに、腹水および腹腔を裏打ちしている転移性小結節を伴う大きな血管化した腫瘍があった時に、ss1-bbz RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入した健常ドナー由来T細胞をマウスに2週間にわたって週2回、注射した(i.p.)。CAR特異性の対照として、マウス群にCD19-bbz RNA操作T細胞を注射し、別の群を食塩水で処置した。53日目に、ss1-bbz RNA CAR群における腫瘍量はベースラインから連続的に減少した。さらに、腫瘍接種後78日目に、ss1-bbz RNA操作T細胞処置群における腫瘍成長は、食塩水処置群またはCD19-bbz RNA T細胞処置群と比較して有意に抑制された($P<0.01$)(図4B)。並行実験では、レンチウイルスベクターを用いて発現されるss1-bbz CAR T細胞で処置されたマウスは、以前に公表されたデータ(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5)に似た強い効果を示した(図4C)。しかしながら、ss1-bbz RNA操作T細胞処置群には、72日目～92日目の間に生存上の利点および腫瘍成長の大幅な減速があった。この時点で、対照マウスは全て腫瘍進行により死亡した(図4C)。

【0215】

RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入した自己由来T細胞は播種性中皮腫の退縮を媒介する

前記の研究から、RNA操作T細胞を週2回注射することによって、進行した側腹部腫瘍およびi.p.腫瘍を制御することができ、CD19 RNA CARを発現するT細胞が有効でなかったので、阻害はCAR特異性に依存することが分かる。しかしながら、これらの実験におけるT細胞は健常ドナーに由来し、腫瘍に対して同種異系であった。同種異系抗腫瘍効果がRNA CAR T細胞の反復長期投与を用いて観察されたので、M108腫瘍が得られた患者に由来する自己由来末梢血単核球を使用した。T細胞を刺激し、GMPグレードのRNAを用いてエレクトロポレーション処理した。図11の図に図示したように、30匹のNSGマウスを3つのi.p.処置群に無作為化した。0日目にマウスにM108-Luc(i.p.)を接種し、ss1-bbzもしくはCD19-bbz RNA CAR T細胞または食塩水対照で処置し、腫瘍量を、示したように連続BLIおよび体重によってモニタリングした。56日目に身体検査時の腹水の発見および高いBLIシグナルに基づいて腫瘍が進行した時、療法を開始した。ss1-bbz RNA CAR T細胞をエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞で処置した群では腫瘍量は劇的に低減したのに対して、CD19-bbz RNA CAR T細胞または食塩水で処置した対照マウスでは腫瘍は成長し続けた(図5Aおよび5C)。T細胞が腫瘍に対して自己由来である、この設定でさえも、依然として中程度のCD19 CAR治療効果があった。これらのマウスにB細胞がないことを考慮すると、このことがCD19 scFv CARと関連していることはまずないので、RNAバックボーンが原因である可能性がある。しかしながら、最初の6回のT細胞投与の後、画像化によって、ss1 CARマウスにおける腫瘍バイオルミネセンス変化の平均(39%)がCD19 CAR(244%)および食塩水マウス(237%; $P<0.001$)と比較して低いことが明らかになった。ss1 CARマウスにおけるT細胞注射後の50%生存期間中央値(73日)はCD19 CAR(62日)および食塩水マウス(36日; 図5

10

20

30

40

50

B)と比較して有意に長かった($P<0.05$)。最初の6回の投与を与えた後、ss1 RNA CARマウスにおける総体重の変化の平均(1.62g)は、CD19 CAR(6.21g)および食塩水マウス(11.4g; $P<0.001$; 図5C)と比較して低かった。ss1 CARマウスの一部において画像化によって疾患の安定および「治癒」さえも観察されたが、最終的には腫瘍は再発した。さらに8回の投与の処置を与えたのにもかかわらず、ss1 CARマウスにおいて腫瘍進行が観察された。従って、ss1-bbz RNA CAR T細胞を反復注射することによって、播種性進行腫瘍に対する生存利益を得ることができる。連続した療法にもかかわらず腫瘍が再発した機構は調査中である。

【0216】

エレクトロポレーション処理によって導入したRNA CARを発現する活性化T細胞の複数回注射

10

これらの実験の目的は、エレクトロポレーション処理によって導入したRNA CARを発現する活性化T細胞の治療能力を確かめることであった。本明細書において示された結果から、mRNA CARは、新しい標的を評価するための、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターより安全かつ経済的だと期待されるプラットフォームを提供することができる。もし毒性が発生したら、RNA CAR T細胞の注射を終わらせることができ、毒性は急速に弱まると予想されるだろう。しかしながら、RNA CAR T細胞は、特に、中皮腫などの区画化された腫瘍において、かなりの治療可能性を秘めている。RNA CAR T細胞は、レトロウイルスCARおよびレンチウイルスCARを用いて現在開発されている療法を補完すると予想される。

20

【0217】

このアプローチは、最初にRNA発現を最適化し、次いで、頑強な腫瘍モデルにおいて複数回投薬戦略を試験するアプローチであった。これは、組込み型ベクターシステムを使用することなく、再標的化されたT細胞が強力なインビボ抗腫瘍効果を有し得ることを示した初めての報告である。最適化IVT mRNAを用いて、本明細書において示された結果から、進行した側腹部腫瘍および腹腔内腫瘍に対してRNA CAR T細胞は強力な抗腫瘍効果を有することが分かる。さらに、これらの研究は進行癌患者に由来する自己由来T細胞を操作できることを示した最初の研究であり、頑強な前臨床モデルにおいて転移性腫瘍を制御すると示された。

30

【0218】

RNAエレクトロポレーションはインビトロでT細胞機能を改変できることが以前に示されている(Smits et al., 2004, Leukemia 18:1898-902; Schaft et al., 2006, Cancer Immunol Immunother 55:1132-41; Zhao et al., 2006, Mol Ther 13:151-9)。Mitchellおよび同僚ら(Mitchell et al., 2008, Hum Gene Ther 19:511-21)は、ケモカイン受容体CXCR2のRNAトランスフェクションによって、インビトロおよびインビボで様々なCXCR2特異的ケモカインに向かって効率的に移動できるようにT細胞を機能的に改変できることを報告した。Yoonおよび同僚ら(Yoon et al., 2009, Cancer Gene Ther 16:489-97)は、最近、Her2/neu RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞をSKOV3異種移植片モデルに養子移入することによって、モックトランスフェクトT細胞の移入と比較して腫瘍成長速度が遅くなることを示した。最近の報告から、ナチュラルキラー細胞株へのCD19キメラ受容体mRNAトランスフェクションの実現可能性が示されたが、前臨床モデルもインビボ効果の証明もなかった(Li et al., 2010, Cancer Gene Ther 17:147-54)。しかしながら、これらの報告はいずれも、RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を用いて、インビボで大きな進行腫瘍が退縮し、生存期間が延びたことは証明されていない。

40

【0219】

T細胞を操作する様々な非組込み型アプローチがある(June et al., 2009, Nat Rev Immunol 9:704-16)。mRNAトランスフェクションなどのCAR免疫療法に向けた一時的発現アプローチはこの分野の一般的な取り組みと相反する。しかしながら、RNAトランスフェクションのための改善技術は、組込み型ウイルスベクターまたはトランスポゾンシステムによ

50

って安定発現されるCARの使用を引き立たせるかもしない。3'UTRおよび5'UTRの体系的な比較、長いポリ(A)テールの組込み、RNAの効率的なキャッピング、ならびに内部ORFの除去によって、本発明者らは、エレクトロポレーション処理T細胞においてRNA CARの高レベルかつ長期間の発現を実現することができた。

【0220】

養子移入分野において主流となっているパラダイムは、患者の中で細胞が長期間持続することが効力に重要なことである(June, 2007, *J Clin Invest* 117:1466-76; Rosenberg et al., 2008, *Nat Rev Cancer* 8:299-308)。しかしながら、導入された細胞は腫瘍微小環境内で機能する能力をかなり急速に失う可能性があることがあります認識されてきている(Teague et al., 2006, *Nat Med* 12:335-41)。本明細書において示されたデータから、えり抜きのトランスジーンを一時的にしか発現しないT細胞を高頻度で複数回注射することによって、寛容化されたCAR T細胞の蓄積を回避し、従って、抗腫瘍効力と改善した安全性プロファイルを実現する可能性があることが示唆されている。または、RNAトランスフェクションのための改善技術は、組込み型ウイルスベクターまたはトランスポンシステムによって安定発現されるCARの使用を補完するかもしない。

【0221】

CAR T細胞療法を用いて、いくつかの有害事象が観察されており、その他の有害事象が理論的に可能である。最近、レトロウイルスにより改変されたCAR T細胞を用いた処置後に2件の死亡が報告されている。初期毒性事象はサイトカイン放出による全身作用と関連付けられている(Brentjens et al., 2010, *Mol Ther* 18:666-8; Morgan et al., 2010, *Mol Ther* 18:843-51)。これらの臨床事象の結果として、最近の記事では、より安全なCARの必要性が議論されている(Heslop, 2010, *Mol Ther* 18:661-2; Buning et al., 2010, *Hum Gene Ther* 21:1039-42)。安定して形質導入されたCAR T細胞が遭遇した他の毒性は、CD 19 CAR療法後の正常B細胞の枯渇または炭酸脱水酵素IX療法後の肝臓毒性の誘導などのオンターゲット(on-target)、オフオルガン(off-organ)効果であった(Lamers et al., 2006, *J Clin Oncol* 24:e20-2)。特定の理論に拘束されるつもりはないが、この種の毒性を誘発するにはRNA CARの反復投与が必要であり、RNA CAR T細胞注入を中断した後に毒性がなくなると考えられている。最後に、CTLへのCARのレンチウイルス導入またはレトロウイルス導入に対する懸念には、挿入変異誘発による悪性トランスフォーメーションの公知のリスクが含まれる(Nienhuis et al., 2006, *Mol Ther* 13:1031-49; Bushman et al., 2007, *J Clin Invest* 117:2083-6)。宿主細胞ゲノムへの組込みはなく、CAR発現は一過性であるので、これらの懸念はmRNAトランスフェクションによって回避される。

【0222】

特定の理論に拘束されるつもりはないが、CAR療法の考えられる主な制約は、RNA CARの持続性が比較的短いことだと考えられている。リンパ球が枯渇されている宿主にRNA CAR T細胞を投与した時に、CAR T細胞のホメオスタシス増殖が誘導され、結果として、T細胞表面におけるCAR発現の消失が加速すると予想されるので、この制約は悪化すると予想することができる。従って、RNA CAR T細胞は、中皮腫または中枢神経系腫瘍などの区画化された腫瘍に対して与えられた場合に効果が高くなる可能性がある。さらに、リンパ球が枯渢された宿主では高頻度のRNA CAR投与が必要とされる可能性がある。

【0223】

本明細書の他の場所で議論された一種の毒性管理を提供することに加えて、RNA CAR T細胞療法のいくつかの考えられる機会がある。第1に、RNA CARは、柔軟性が高く、かつ迅速な診療室への道を提供し、それによって、効率的で反復性のアプローチがCARの設計および効力を最適化するのを可能にすることによってCAR開発速度を加速する可能性を秘めている。本明細書において示されたデータに基づいて、抗メソテリンRNA CARを試験する第1相試験を開始する計画が立てられた。RNA CARの規制認可プロセスは、ゲノム組込みを必要とする安定発現CARより比較的楽である。臨床用mRNAは組込み型のレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターより製造費がかからないが、トランスフェクションまたはトランスポンベースのプロトコールにおいて用いられているプラスミドDNAより

10

20

30

40

50

費用が高い(Till et al., 2008, *Blood* 112:2261-71; Singh et al., 2008, *Cancer Res* 68:2961-71)。第2に、寛解誘導のために強力であるが、潜在的に毒性のあるCARを用いたRNA CAR「ノックダウン」療法と、CAR細胞に記憶能力を提供する戦略として安定発現CARを用いた地固め療法および維持療法を組み合わせることが魅力的な場合がある。

【0224】

要約すると、RNA操作T細胞の複数回注射は養子細胞移入の新規のアプローチであり、これによって、癌疾患を処置するための費用対効果が大きく、かつ柔軟性の高いプラットフォームが得られる。さらに、このアプローチは、組込み型ウイルスベクターの付随する安全上の懸念がなく、強力な活性化ドメインを発現するように操作されたT細胞の治療指数を高める可能性がある。

10

【0225】

実施例2:mRNA操作T細胞を用いたマウスにおける進行白血病の処置

組込み型ウイルスベクターによって作製された安定発現CARを有する細胞傷害性Tリンパ(CTL)は有効であり、潜在的な長期持続性を有するが、代替の療法は、一過的に発現するCARを使用する療法であり、この場合、望ましい標的(例えば、CD19)に対するCARをコードする最適化インビトロ転写RNAがT細胞にエレクトロポレーション処理によって導入される。本明細書において示された結果から、エレクトロポレーションによって最適化mRNAが導入された抗CD19 CAR発現T細胞は、強力かつ特異的なCD19標的細胞のキラー(killer)であることが証明される。異種移植白血病を有する免疫不全マウスに与えたCD19 RNA CAR T細胞は疾患部位に迅速に移動し、有意な標的特異的溶解活性を保持した。予期せずに、CD 20
19 RNA CAR T細胞の単回注射によって投与後1日以内に疾患負荷量が低減し、その結果、高悪性度白血病異種移植片モデルにおいて生存期間が有意に延びた。RNA CARの表面発現を滴定し、それによって、潜在的に調整可能なレベルのエフェクター機能、例えば、サイトカイン放出および細胞傷害性を有するT細胞を得ることができる。RNA CARは、遺伝毒性を受けるはずがない遺伝子工学アプローチであり、費用と手間がかかる安定発現系に進む前にCAR設計を迅速に最適化するためのプラットフォームを提供する。

20

【0226】

これらの実験において使用した材料および方法を今から説明する。

【0227】

材料および方法

30

インビトロ転写(IVT)ベクターの構築およびRNAエレクトロポレーション

CD19およびメソテリン(メソ)に標的化された、4-1BBおよびCD3シグナル伝達ドメインを有するCAR(それぞれ、19-BBzおよびss1-BBz)は以前に述べられている(Milone, et al., 2009, *Mol Ther* 17(8):1453-1464; Carpenito et al., 2009, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9):3360-3365)。pGEM-GFP.64A(Zhao, et al., 2006, *Mol Ther* 13(1):151-159)に由来するGFPを、HindIIIおよびNotIを用いた制限酵素消化PCR産物で置換することによって、PCR産物をpGEM.64Aベースベクターにサブクローニングして、pGEM-ss1.bbz.64AおよびpGEM-CD19bbz.64Aを得た。同様に、CD28シグナル伝達ドメインを用いて第三世代バージョンのCARを構築した。置換されたCAR cDNAを直接配列決定によって確認し、RNA IVTの前にSpeI消化によって直線化した。mScript RNAシステム(Epicentre, Madison, WI)を用いて、キャッピングされたIVT RNAを作製した。IVT RNAをRNeasy Mini Kit(Qiagen, Inc., Valencia, CA)を用いて精製し、精製RNAを1~2mg/mlでRNアーゼフリー水に溶出させた。記載のように(Carpenito et al., 2009, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9):3360-3365)、ヒトT細胞をCD3/CD28ビーズによって刺激した。刺激済みT細胞をOPTI-MEMで3回洗浄し、1~3x10⁸/mlの最終濃度でOPTI-MEMに再懸濁した後に、エレクトロポレーションを行った。その後に、刺激済みT細胞を(示したように)10 μg/0.1ml T細胞のIVT RNAと混合し、2mmキュベット(Harvard Apparatus BTX, Holliston, MA, USA)に入れて、ECM830 Electro Square Wave Porator (Harvard Apparatus BTX)を用いてエレクトロポレーション処理した。トランسفェクション後の生存率は50~80%であり、全ての場合において、注射用の生存T細胞のCAR発現は使用時に>99%であった。輸送実験のために、mRNAトランسفェクション前

40

50

にT細胞にホタルルシフェラーゼレンチウイルス構築物を安定して形質導入した。

【0228】

異なるCARを有するレンチウイルスベクターの構築

以前に述べられたように(Imai et al., 2004, Leukemia 18(4): 676-684; Milone, et al., 2009, Mol Ther 17(8):1453-1464)、EF-1プロモーターの転写制御下で様々なCARをコードするレンチウイルスベクターを作製した。CAR配列の前に、eGFP配列またはホタルルシフェラーゼ(FFluc)に続いて、FMDVに由来する2Aリボソームスキッピング(ribosomal skipping)配列がインフレームであるCAR発現レンチウイルスベクターも作製した。これらのベクターは、1本のRNA転写物からのGFPまたはFFlucおよびCARの二重発現を可能にする。全ての構築物を配列決定によって検証した。

10

【0229】

エレクトロポレーション処理されたT細胞の表面におけるCAR検出

細胞を洗浄し、FACS緩衝液(0.1%アジ化ナトリウムおよび0.4%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むリン酸緩衝食塩水(PBS))に懸濁した。細胞をビオチン標識ポリクローナルヤギ抗マウスF(ab)2抗体(抗Fab, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)と4℃で25分間インキュベートし、次いで、FACS緩衝液で2回洗浄した。次いで、細胞をフィコエリトリン標識ストレプトアビシン(BD Pharmingen, San Diego, CA)で染色した。フローサイトメトリー取得をBD FacsCalibur(BD Biosciences)を用いて行い、分析をFlowJo(Treestar Inc, Ashland, OR)を用いて行った。

20

【0230】

ELISAおよびLuminexアッセイ

標的細胞を洗浄し、 10^6 細胞/mLでC10(10%ウシ胎児血清(FCS), Invitrogenを添加したRPMI1640)に懸濁した。それぞれのタイプの 10^5 個の標的細胞を96ウェル丸底プレート(Corning)の2個のウェルにそれぞれ添加した。エフェクターT細胞培養物を洗浄し、 10^6 細胞/mLでC10に懸濁した。96ウェルプレートの示されたウェルの中で 10^5 個のエフェクターT細胞を標的細胞と組み合わせた。さらに、T細胞のみを含有するウェルを調製した。プレートを37℃で18~20時間インキュベートした。インキュベーション後、上清に対してELISAアッセイを製造業者の説明書(Pierce, Rockford, IL)を用いて行った。50マイクロリットルの培養上清を2回繰り返して試験し、結果をpg/mlで報告した。

30

【0231】

CD107a染色

細胞を、1:1のエフェクター:標的(E:T)(10^5 個のエフェクター: 10^5 個の標的)で、 $160\mu\text{l}$ のC10培地が入っている平底96ウェルプレートに入れてプレーティングした。CD107aのバックグラウンドレベルを評価するために、対照は標的細胞を含まないウェルを含んだ。 $20\mu\text{l}$ のフィコエリトリン標識抗CD107a Ab(BD Pharmingen, San Diego, CA)を添加し、プレートを穏やかに攪拌し、37℃で1時間インキュベートした。Golgi Stop溶液を添加し、プレートをさらに2.5時間インキュベートした。次いで、細胞を $10\mu\text{l}$ のFITC-抗CD8およびAPC-抗CD3(BD Pharmingen, San Diego, CA)で染色し、洗浄した。フローサイトメトリー取得をBD FacsCalibur(BD Biosciences)を用いて行い、分析をFlowJo(Treestar Inc, Ashland, OR)を用いて行った。

40

【0232】

細胞傷害性Tリンパ球フローサイトメトリアッセイ

わずかに変更を加えたバージョンのフローサイトメトリー細胞傷害アッセイを使用した(Hermans et al., 2004, J Immunol Methods 285(1):25-40)。このアッセイでは、エフェクター細胞と同じチューブ内で標的細胞の生存率を負の対照細胞の生存率と比較することによって標的細胞の細胞傷害性を測定する。本明細書に記載の実験では、標的細胞は、ヒトCD19を発現するK562細胞(K562-CD19)であり、負の対照細胞は、メソテリンを発現するK562細胞(K562-メソ)であった。K562-メソを蛍光色素5-(および-6)-(((4-クロロメチル)ベンゾイル)アミノ)テトラメチルローダミン(CMTMR)で標識した。(Invitrogen)K562-CD19細胞をカルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル(CFSE)で標識した

50

。(Invitrogen) 培養は2つ同じものを、96ウェル培養プレート内で 10^4 個のCD19+標的細胞および 10^4 個のメソ+対照細胞を用いて以下のT細胞:標的細胞比:10:1、3:1、および1:1で用意した。K562-CD19およびK562-メソを両方とも標的細胞として使用し、CFSEで標識する一部の実験では、CD19陰性ミエローマ細胞株NSOを負の対照としてCMRAで標識した。培養物を37℃で4時間インキュベートした。インキュベーション直後に、7-AAD(7-アミノアクトマイシンD)(BD Pharmingen)を製造業者により推奨されたように添加した。分析物を7AA D陰性(生)細胞でゲーティングし、それぞれのT細胞+標的細胞培養物についてK562-CD19生細胞およびK562-メソ生細胞のパーセントを求めた。それぞれの培養物について、K562-CD19のパーセント生存率は、K562-CD19生細胞のパーセントをK562-メソ対照生細胞のパーセントで割ることによって求めた。K562-CD19の補正済みパーセント生存率は、それぞれのT細胞+標的細胞培養物におけるK562-CD19のパーセント生存率を、エフェクターT細胞を含まず、K562-CD19標的細胞およびK562-メソ負の対照細胞しか含有しないチューブにおけるパーセントK562-CD19標的細胞:パーセントK562-メソ負の対照細胞の比で割ることによって計算した。この補正是、出発細胞数のばらつきおよび自発的標的細胞死を説明するのに必要であった。細胞傷害性を100-(K562-CD19の補正済みパーセント生存率)として計算した。全てのエフェクター:標的比について、細胞傷害性を2回繰り返して求め、結果を平均した。

10

【0233】

マウス異種移植片研究

以前に述べられたように若干の変更を加えて(Teachey, et al., 2006, Blood 107(3): 149-1155 Teachey, et al., 2008, Blood 112(5): 2020-2023)、研究を行った。簡単に述べると、6~10週齢のNOD-SCID- γ -c^{-/-}(NSG)マウスをJackson Laboratory(Bar Harbor, ME)から入手したか、または承認を受けた実験動物委員会(institutional animal care and use committee)(IACUC)プロトコールの下、組織内で飼育し、病原体フリーの条件下で維持した。CD19+ヒト ALL Nalm-6株をAmerican Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)から入手した。動物の尾静脈に、0.2mLの滅菌PBSに溶解した 10^6 個のNalm-6生細胞を注射した。Nalm-6注射の7日後に、 5×10^6 、 1×10^7 、または 2.5×10^7 個の細胞を0.2mLの体積の滅菌PBSに溶解してT細胞を尾静脈に注射した。放置しておけば、この用量のNalm-6によって、22~25日でNSGマウスにおいて致死性の白血病が確実に発生する。以前の実験から、大腿骨髄における信頼性の高く、最も早い疾患検出(>0.1%)は注射して7日後であることが証明された。従って、この時点が治療介入のために選択され、バイオルミネセンス疾患と相関付けられた。動物を、>10%重量減少、毛の消失、下痢、または結膜炎により証明されるように移植片対宿主病および他の毒性の徴候について、ならびに白血病に関連する後肢麻痺について綿密にモニタリングした。末梢血を眼窩後採血によって入手し、ALLの存在およびT細胞生着を、製造業者の説明書に記載のようにBD Trucount(BD Biosciences)チューブを用いてフローサイトメトリーによって確かめた。CD19、CD20、CD4、CD3、CD10、および/またはCD8の発現(必要に応じて)が、蛍光色素に結合したモノクローナル抗体(BD Biosciences)による染色によって検出された。CD19またはSS1 scFv CARの発現が、(マウス由来scFvに特異的な)ヤギ抗マウスIgG血清に由来するビオチン化F(ab')2断片(Jackson ImmunoResearch)の後に、ストレプトアビジン-PE(BD Biosciences/Pharmingen)を用いた染色を用いて検出された。

20

30

40

【0234】

バイオルミネセンスイメージング

麻酔したマウスを、Xenogen SpectrumシステムおよびLiving Image v4.0ソフトウェアを用いて画像化した。マウスに150mg/kg体重のD-ルシフェリン(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)を腹腔内注射した。ホタルルシフェラーゼエフェクターが形質導入されたNalm-6およびヒトT細胞の以前の滴定から、光子放射ピークまでの時間は5分であり、ピーク放出は6~10分間続くことが示された。それぞれの動物を単独で(光子定量の場合)または5匹までのマウスの群(表示目的の場合)において、前後うつぶせになった位置にしてルシフェリン注射後同じ相対的な時点(6分)で画像化した。直線スケールの中域(600~60000カウン

50

ト)に達するまで、または最大露出設定(f/stop 1、大きなビニング、および120秒)に達するまでデータを収集し、次いで、それぞれの画像を露出時間、f/stop、ビニング、および動物サイズについて規準化するためにphoton/秒/cm²/ステラジアンに変換した。解剖学的局在性のために、光強度を表す疑似カラー地図をグレースケール体表参照画像の上に重ね合わせた。データ表示のために、ルシフェラーゼ含有細胞のないマウスを最大設定で画像化し、3.6×10⁵p/s/cm²/srの平均値を得た。典型的に、ルシフェラーゼ含有NaIm-6のあるマウスは、光量子束が5×10¹¹p/s/cm²/srに達した時に白血病で瀕死になり、6桁の検出範囲が生じた。同様に、腫瘍部位へのT細胞の輸送を検出するために、および宿主マウスにおける導入されたT細胞の拡大を評価するために、ルシフェラーゼを発現するバージョンの様々なCARを使用した。

10

【0235】

細胞株同一性試験

NaIm-6およびK562親細胞株をATCC(Manassas, VA)から入手し、短いタンデム反復分析(Masters, et al., 2001, Proc Natl Acad Sci U S A 98(14):8012-8017)によって遺伝子型を同定した。同一性を確保するために、6ヶ月ごとに、またはCD19もしくはルシフェラーゼ形質導入などの任意の遺伝子組換えの後に細胞株を検証した。

【0236】

統計の面で考慮すべき事項

分析は、STATAバージョン10 (Statacorp, College Station, Texas) または Prism 4(Graphpad Software, La Jolla, CA)を用いて行った。インビトロデータは2回の繰り返しの平均を表し、マン・ホイットニー検定を介して平均を比較した。複数の群間で比較するために、個々の群を比較するダン(Dunn)多重比較検定を用いてクラスカル・ワリス分析を行った。複数のデータセットを比較するために、生存曲線をログランク検定とボンフェロー二補正を用いて比較した。

20

【0237】

実験結果を今から説明する。

【0238】

mRNAトランスフェクションによるCAR発現T細胞の作製によって10日間まで検出可能な溶解活性を伴う表面発現が生じる

mRNAでトランスフェクトされたCAR+CTL(RNA CAR)の発現および細胞溶解活性の持続性をインビトロで評価した。高い表面発現がインビトロで6日間、持続した後に、10日までにベースライン非発現細胞に向かっていった(図1Aおよびデータ示さず)。この延長された高いトランスジーン持続性は、mRNAトランスフェクション後の表面抗原発現のピークおよび期間の大部分の報告とは異なる(Birkholz et al., 2009, Gene Ther 16(5):596-604; Rabinovich, et al., 2009, Hum Gene Ther 20(1):51-61; Yoon, et al., 2009, Cancer Gene Ther 16(6):489-497; Li, et al., 2010, Cancer Gene Ther 17(3):147-154)。これは、おそらく、最適化IVTベクターおよびRNA生成(データ示さず)が原因である。同時に、インビトロでのCAR発現T細胞の細胞傷害能力を、フローサイトメトリーベースの殺傷アッセイを用いて評価した。E:T比2:1で50%を超える標的細胞の特異的溶解が1~4日目に認められた。細胞傷害活性は5~6日目に低下したが、CAR表面発現が2~3log低減しても、ある程度の溶解活性が観察され、モックトランスフェクト細胞のバックグラウンド溶解を大幅に超えていた(図12B)。発現されたトランスジーンのMFIの低下と同時に特異的溶解活性は低下したが、エレクトロポレーションの6日後に、E:T比20:1でエレクトロポレーション処理されていない対照を上回る有意な溶解活性($p<0.05$)が観察された。

30

【0239】

RNA CAR+T細胞の溶解活性をさらに評価するために、RNA CAR+T細胞を前記のように刺激およびエレクトロポレーション処理し、次いで、エレクトロポレーションの4時間後に様々な標的細胞と共に培養して細胞溶解能および標的特異性を調べた。CD107a発現を細胞溶解細胞脱顆粒マーカーとして使用した(Betts and Koup, 2004, Methods Cell Biol 75:497-512)。関心対象の標的(CD19)に加えて、関係のない抗原メソテリン(リンパ球の表面に発

40

50

現していない)に対して作られたCARを対照として使用した。K562細胞はCD19もメソテリンも発現せず、様々な遺伝子を発現するように容易に形質導入されるので、K562細胞はインビトロ細胞傷害性評価のための柔軟性の高い標的細胞となる(Suhoski et al., 2007, Mol Ther 15(5):981-988)。CD19に対して作られたRNA CAR+T細胞は脱顆粒し、CD19⁺標的の存在下でのみCD107aを発現する。このことは抗原特異的認識および溶解機能を示している(図12C)。これは、CD19⁺標的の白血病細胞株Na1m-6ならびにCD19を発現するように形質導入されたK562細胞を含んだ。対照として、同じCD107aアッセイによって測定された時に、メソテリンを認識するCARだけがメソテリン+K562細胞を特異的に溶解する。メソテリンに対して作られたCAR+T細胞は、メソテリン陰性親K562、CD19⁺/メソテリン-ALL Na1m-6株、または表面CD19を発現するが、メソテリンを発現しないように形質導入されたK562の存在下ではCD107aを発現しない。4-1BBおよびTCR シグナル伝達ドメイン(BBz)を有する抗メソCARならびに抗CD19-BBz CARを用いた共培養実験からも、上清ELISAによって測定された時に適切な標的の存在下でインターロイキン-2(IL-2)の特異的放出が証明された(図12D)。これは、抗原特異的にT細胞が活性化されたことを示唆する。

10

【0240】

CAR発現レベルとインプットRNA用量との関係

レトロウイルス遺伝子導入によって操作されたCAR T細胞を投与した後の重篤な有害事象の最近の報告(Brentjens et al., 2010, Molecular Therapy 18(4):666-668; Morgan, et al., 2010, Mol Ther 18(4):843-851)から、予め決定された表面発現レベルでCARを発現するためのプラットフォーム、または自己限定期的な発現(例えば、RNA)を確実なものにするプラットフォームが望ましい場合があることが示唆される。mRNA用量を滴定することによって、MFIによってRNA CAR表面発現の約100倍のばらつきが観察された(図13A)。表面MFIのばらつきにもかかわらず、発現の低下率(パーセントで表した)は似ている(図13B)。RNA CAR+T細胞は、エレクトロポレーション後1日目に、類似した溶解活性(図13C、左パネル)およびIFN- γ 分泌(図13D)を示す。IL-2分泌も試験した。このことは、異なる方法を用いた最近の報告(James, et al., 2010, The Journal of Immunology 184(8):4284)と一致する。しかしながら、3日目までに用量依存的な溶解活性低下が観察された。この場合、少ないRNA用量の効果は1日目の効果と比較して低いが、3日目に高用量(40 μ gおよび20 μ g)の溶解プロファイルは、それぞれのE:T比において1日目と似ている。このことから、初期表面発現はインプットRNAと比例するように思われ、溶解活性の時間および程度を決定できることが示唆される。これは、効果の期間、場合によってはサイトカイン放出の期間の制御において有用であるかもしれないが、まだ研究されていない。

20

【0241】

CAR+CTLのインビオ輸送

RNA CAR発現を1週間まで証明した前記のインビトロデータに基づいて、異種移植片マウスモデルにおいて、mRNAでトランスフェクトされたCAR+T細胞の細胞溶解機能を48時間後に評価した。 10^7 個の19-BBzまたは抗メソ(SS1)-BBz RNA CAR+T細胞を注入する7日前に、NSGマウスの尾静脈にCD19⁺ALL Na1m-6株を接種した(図14)。T細胞を注入して48時間後にマウスを屠殺し、負の選択プロトコールを用いてT細胞を末梢血、脾臓、大腿骨髄、および腹膜洗浄液から回収および濃縮した。インビオ増殖し、CD19⁺Na1m-6標的に曝露して48時間後でも、CARを発現するT細胞を末梢血、脾臓、および腹膜において依然として検出することができた。表面抗CD19 CAR発現は、インビトロでコンパニオン(companion)対照培養T細胞より適度に少ない(図14A)。コグネイトメソテリン代用(surrogate)抗原を発現する標的に曝露されたことのないメソ-BBz CAR T細胞もこれらの区画から回収された。この時点で、脾臓に由来する全CAR陽性集団はCD19については75%(回収された全ヒトCD3+細胞に対するパーセント)、メソテリンについては68%であった。そのため、バイオルミネセンスに基づいてCD19 CAR CTLが拡大しており(図15)、メソテリンCAR CTLは拡大していないが、増殖中のCD19 CAR CTLはCAR+子孫を産生しているように思われる。CARによって媒介される増殖がCAR陰性子孫をもたらしているのであれば、CD19 CAR陽性細胞のパーセントは、増殖していないメソテリンCAR CTLのパーセントより少なくなるはずである。この時点

30

40

50

で、どちらの構築物もヒトCD3⁺細胞は大腿骨髄からほとんど回収されなかった。これは、1つには、骨髄の接近不可能な領域(椎体、頭蓋冠)全体にT細胞が薄く分布したことが原因である可能性が高い。CARを染色するのに使用したヤギ抗マウスIgG血清は多くの骨髄前駆細胞とも交差反応し、その結果、この区画の評価において高いバックグラウンドが生じた。

【0242】

さらなるインビトロ特徴付けのために、48時間腹膜洗浄液から回収した細胞を使用した。T細胞をIP投与したか、IV投与したかに関係なく、48時間腹膜洗浄液には最大のヒトCD3⁺CAR⁺濃縮集団があった。10⁷個のCAR+T細胞を注射して48時間後のマウス腹膜から回収したT細胞の抗原特異的細胞傷害性を、フローサイトメトリーベースのCTLアッセイにおいて試験した(図14B)。48時間後にマウスから回収したRNA CAR+T細胞を用いて、インビトロで48時間培養したRNA CAR+T細胞に匹敵する有意な抗原特異的標的溶解が得られた。

10

【0243】

次に、RNA CAR CTLの解剖学的分布を、インビオバイオルミネセンスを用いて3日間、評価した。マウスにNalm-6を注入し、7日目に5x10⁶個のRNA CAR+T細胞(50% CD4⁺および50% CD8⁺、両方ともIV)を注入した。生体内分布に対する抗原認識およびCARシグナル伝達の効果を評価するために、19-BBz、ss1-BBzを発現するRNA CAR+T細胞、ならびにモックトランスフェクトT細胞を比較した。インビオバイオルミネセンスを追跡し、相対的に定量するために、mRNAトランスフェクションの前にホタルルシフェラーゼレンチウイルス構築物が安定して形質導入されたT細胞を使用した。全バイオルミネセンスシグナルの増加ならびに公知の疾患部位上のヒートマップにより示されるような疾患部位における保持およびその後の増殖には標的抗原の認識が必要であった(図15)。モデルに存在しない抗原(メソテリン)に対するCARを有するT細胞またはモックトランスフェクト細胞は脾臓に集まり、注射からある期間にわたってバイオルミネセンスの増加を示さなかった。ルミネセンスシグナルと細胞数は正比例するので、バイオルミネセンス活性の増加がなかったことはインビオT細胞拡大がなかったことを示唆している(Zhao, et al., 2005, J Biomed Opt 10(4):41210; Dobrenkov et al., 2008, J Nucl Med 49(7):1162-1170)。19-BBzを有するT細胞は疾患部位(中軸骨格および大腿骨髄、脾臓、おそらく、右側腹部にある肝臓)に移動し、保持され、増殖した(図15B)。さらに、全バイオルミネセンスシグナルはマウス全体ならびにNalm-6が関与することが知られている部位で増加し、これはT細胞数の増殖性拡大と一致する(図15A)。ホタルルシフェラーゼが安定して形質導入されたNalm-6を用いた時間経過実験から、疾患は同じ場所(中軸骨格、大腿骨髄、脾臓、および肝臓)に存在し、バイオルミネセンスシグナルの4log増加が疾患負荷量の増加と一致することが明らかになった(図17および18)。以前の実験と一致して、T細胞を注射して最初の3日後にCTLは末梢血区画にあったとしても、ほとんど存在しなかった。10個未満のヒトT細胞 / μ LがTruCount定量によって検出されたのに対して、後の時点で末梢血中に多数のヒトT細胞が検出された。同様に、このモデルにおいて末梢血中のNalm-6の出現は後期事象であり、動物が瀕死になるすぐ前まで、典型的に21日目までマウスは10個未満のヒトALL細胞 / μ L末梢血を示す(データ示さず)。この実験モデルの複数回の繰り返しにわたって、これは依然として一貫性のある結果である。そのため、末梢血中のCTLまたは芽細胞を定量するためにバイオルミネセンスの感度がフローサイトメトリーを用いた従来の評価より優れていることが強調される。

20

【0244】

異種移植片モデルにおけるCD19+ALLに対するCAR+CTLのインビオ効力

RNA CAR CTLの潜在的なインビオ効力を評価するために、動物を前記のように処置したが、腫瘍接種後7日目に単回高用量のT細胞(2.5x10⁷)を与えた。受容体発現は数日まで自己限定向であるので、CARによって動かされる細胞拡大が同様に制限され、高腫瘍量において効力を証明するのに高い細胞出発用量が必要とされる可能性があると仮定することによって、10⁷個の細胞の代わりに2.5x10⁷個の用量を選択した。レトロウイルスを用いて安定して形質導入されたCD19 CAR+T細胞を用いた前臨床モデルでは、同様のモデルにおいて

30

40

50

3~4×10⁷個の総T細胞を用いた3回または4回の別個の注射計画が用いられている(Shaffer, et al., 2011, Blood 117(16):4304-14; Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13 (18 Pt 1):5426-5435)。驚いたことに、注射後24時間と早い段階でバイオルミネセンスシグナルの2log低減が観察された。この低減は、ある期間にわたって持続した($p<0.01$ 、図5A)。CTLが侵入しない貯蔵庫(reservoir)の証拠もなくバイオルミネセンスシグナルは全体的に低減したが(図16B)、シグナルは検出不可能なレベルに一度も達しなかった。このことから、完全に除去されなかつたことが分かる。注目すべきことに、二次元ヒートマップではCNS疾患と他の部位を見分けることができず、そのため、脳、頭蓋、脊椎、および頸椎のエクスピボ画像化を行った。エクスピボ画像化から、この時点(5日目)でCNSはあまり関与していないように見えることが明らかになった。逆に、頭蓋冠/頭蓋底および椎体は白血病と関連があり、このため、マウスの頭部および背中の上にヒートマップが得られた。このことは、光学イメージングによって評価された免疫不全マウスにおけるヒト造血細胞の初期移動の他の報告と一致する(Kalchenko, et al., 2006, J Biomed Opt 11(5):050507)。

10

20

30

40

50

【0245】

メソテリンに対して作られたCAR CTLにはバイオルミネセンス疾患負荷量に対して有意な効果がなかった。このことから、非特異的な同種異系効果または異種効果はほとんどなかつたことが分かる。注射して4日以内にバイオルミネセンス疾患が上昇し始めるので、疾患負荷量の初期低減は迅速であるが、短期間である。疾患低減の程度およびその後の致死疾患負荷量($>2\times10^{11}\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$)への到達の遅れは生存と直接の相関関係がある。最後に、CTLを与えなかつた対照動物および同用量の 2.5×10^7 個の、関係のない抗原メソテリンに対して作られたRNA CAR+CTLを与えた対照動物と比較して、RNA CAR+CTL注射により生存が有意に延びた(生存データのログランク検定により $p<0.01$)(図16C)。総合して、これらの結果から、RNA CAR+CTLは、進行性の播種性白血病異種移植片を有するマウスにおいて移動および増殖した後に標的細胞を特異的に死滅させることによって強い抗腫瘍効果を示すことが分かる。重要なことに、同じNalm-6モデルにおいてRNA CAR+CTLの生存を、安定発現している、レンチウイルスによって作製されたCAR CTLと比較した。この場合、RNAによって作製されたCTLと同じ19-BBz CARを含有するように、CAR CTLをレンチウイルス形質導入によって作製した。以前に求められた用量に基づいて、Nalm-6後7日目に 10^7 個のレンチウイルスCAR CTLを注射した。以前のようにマウスを追跡した。生存期間中央値はRNA CAR CTLとレンチウイルスCAR CTLとの間で違いはなかつたが、持続的に発現するレンチウイルスCAR CTLでは1匹の長期生存マウスが見られた(図5D)。

【0246】

mRNA操作T細胞を用いたマウスにおける進行白血病の処置

最近の臨床試験からの結果は、レトロウイルスベクターを用いて導入されたCARによる改善された臨床結果を示している(Pule, et al., 2008, Nat Med 14(11):1264-1270; Till, et al., 2008, Blood 112(6):2261-2271)。最近の記事では、より安全なCARの必要性が議論されている(Buning et al., 2010, Human Gene Therapy 21(9):1039-42; Heslop, 2010, Molecular Therapy 18(4):661-662)。本明細書に記載のデータは、ますます効力が高まつてきているシグナル伝達ドメインを含有するCARを用いた、治療可能時間域を延ばす可能性を秘めたプラットフォームの開発について述べている。本明細書において示された発見は、前臨床モデルにおいて播種性白血病に対するRNA CAR+CTLの治療効果を証明した初めてのものである。

【0247】

mRNAトランスフェクションなどのCAR免疫療法への一時的発現アプローチは、本発明者らの以前の取り組みおよびこの分野における大部分の研究者達の取り組みと対立する。本明細書に記載のデータは、mRNAでトランスフェクトされたCAR+T細胞の単回注射が全身作用を実現して、播種性白血病の遠く離れた部位に移動するのに、ならびに細胞傷害作用を保持するのに十分にインビボで拡大および持続することを示した初めてのものである。CAR発現の間に、CARによって動かされるT細胞拡大が観察された。この結果から、急速なヒ

トALL生着を特徴とする高悪性度異種移植片モデルにおいて白血病負荷量が2log低減し、生存期間が延びたことが証明される。重要なことに、RNA CAR CTL単回注射が投与された、異種移植白血病を有するマウスの生存期間は、安定したレンチウイルスCAR CTLによって実現した生存期間に匹敵する。これらの群間で再発の部位およびタイミングは似ているが、安定発現されたCARだけが長期治癒(>180日)をもたらす。RNA CARモデルにおける生存期間は初期疾患低減の程度と直接の相関関係があるが、歯周領域および傍脊柱領域は依然としてRNA CARモデルおよびレンチウイルスCARモデルの両方における最初の再発部位である。

【0248】

CAR表面発現が比較的mRNA用量依存的であり、その結果、ある期間にわたるIFN- γ 分泌およびIL-2サイトカイン分泌が比較的mRNA用量依存的であるという本発見は、毒性となり得るサイトカイン放出を軽減するように発現レベルを調整する将来の可能性をもたらす。安定して形質導入されたCAR T細胞が遭遇した他の毒性は、CD19 CAR療法後の予想された正常B細胞枯渇または炭酸脱水酵素IX療法後の肝臓毒性の誘導などのオントーゲット/オフオルガン効果であった(Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24(13):e20-e22)。特定の理論に拘束されるつもりはないが、この種の毒性を誘発するにはRNA CARの反復投与が必要であると考えられている。最後に、CTLへのCARのレンチウイルス導入またはレトロウイルス導入に対する懸念には、成熟T細胞でさえも重大な規制監督の対象である挿入変異誘発による悪性トランスフォーメーションが理論的に起こる可能性が含まれる(Nienhuis, et al., 2006, Molecular Therapy 13(6):1031-1049; Bushman, 2007, J Clin Invest 117(8):2083-2086)。宿主細胞ゲノムへの組込みはなく、CAR発現は自己限定的であるので、これらの懸念はmRNAトランスフェクションによって潜在的に回避される。同様に重要なことに、インピトロで、およびインピボで前臨床動物モデルにおいて短期的には、RNAにより発現されたCARは安定発現CARと同様に機能するように思われるが、このプラットフォームは、安定発現系に戻すことができる、CAR設計における反復作業を評価するための潜在的に迅速なやり方を提供する。

【0249】

本明細書において調べられたRNA CAR CTLを用いたデータが、そのレンチウイルス対応物の標的ベース細胞傷害性を全て示すことは心強い(Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106(9):3360-3365; Milone, et al., 2009, Mol Ther 17(8):1453-1464)。RNA CAR CTLは、抗原特異性と、それに付随する、単回IV注射後に播種性白血病部位に移動し、そこで拡大する能力を示した。前立腺癌異種移植片モデルにおいて証明されたように(Dobrenkov et al., 2008, J Nucl Med 49(7):1162-1170)、CAR CTLが疾患部位に輸送されることはCAR CTLの抗腫瘍機能に極めて重要である。この研究は、単回尾静脈注射後に、CD19 RNA CAR CTLが播種性白血病の全ての部位と行き交い、そこで機能することができると証明した初めてのものである。重要なことに、RNA CARは担癌異種移植片において循環および拡大した後に依然として高レベル発現していることが本明細書において述べられている。このことは、抗原結合後の増殖によるRNAの考えられる受容体内部移行および希釈にもかかわらず機能的CTLがあることを示している。RNA CAR CTL療法のためのいくつかの考えられる機会がある。第1に、RNA CAR CTLは、安定発現しているCARに自殺システムを組み込むという例外はあり得るが(Marktel, et al., 2003, Blood 101(4):1290-1298; Sato, et al., 2007, Mol Ther. 15(5):962-970)、安定発現しているCARでは不可能な毒性軽減のための考えられる戦略(自己限定的発現)を提供する。第2に、RNA CARは、柔軟性が高く、かつ迅速な診療室への道を提供し、それによって、効率的で反復性のアプローチがCARの設計および効力を最適化するのを可能にすることによってCAR開発速度を加速する可能性をもたらす。RNA CARの規制認可プロセスは、ゲノム組込みを必要とする安定発現しているCARより比較的楽な可能性がある。臨床用mRNAは、組込み型のレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターより製造費がかからないが、トランスフェクションまたはトランスポゾンベースのプロトコールにおいて用いられているプラスミドDNAより費用が若干高い(Singh, et al., 2008, Cancer Research 68(8):2961-2971; Till, et al.

10

20

30

40

50

., 2008, Blood 112(6):2261-2271)。真の対費用効果がどのように現れるかは、まだ分かっていない要因であるT細胞数、注入回数、および応答期間によって最終的に決まる。最後に、寛解誘導のための強力であるが、潜在的に毒性のあるCARを用いたRNA CAR「ノックダウン」療法と、記憶CAR+細胞を提供する戦略として、安定発現しているCARを用いた地固め療法および維持療法を組み合わせることが魅力的な場合がある。要約すると、本明細書において開発が述べられた短期発現プラットフォームは細胞療法の代替を提供し、ある特定の用途において有利である場合がある。ある期間にわたって反復注入することによって、別の方では治療抵抗性の白血病の長期疾患管理または根絶を実現する可能性があり得る。

【0250】

10

実施例3:再指向された自己由来T細胞の臨床試験

このプロトコールにおける治験薬は、キメラ抗メソテリン免疫受容体scFvでトランスフェクトされた自己由来T細胞である。安全性を最大にするために、この試験では、メソテリンCAR mRNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を使用する。代表的なCAR mRNAは、pD-A.ss1.0F.BBZ.2bg.150Aプラスミド(図19を参照されたい)またはpD-A.19.0F.2bg.150A(図20を参照されたい)のインビトロ転写によって作製することができる。本明細書の他の場所で議論されたように、CAR mRNAを使用すると、ほんの限られた発現期間が可能になる。副作用が認められた場合、mRNA CARの発現が数日に限定されるのでT細胞注入を終わらせ、毒性は急速に弱めることができる。従って、副作用は一過的かつ管理可能である。

20

【0251】

このプロトコールは、IV自己由来抗メソテリン再指向CAR T細胞の投与の安全性を確かめるために設計された。予想され得る一次毒性は、操作されたT細胞が、腹膜および胸膜-心膜表面において正常な低レベルメソテリンが発現しているために、これらの漿膜表面において炎症、すなわち、漿膜炎を引き起こす可能性があることである。

【0252】

これらの実験において使用した材料および方法を今から説明する。

【0253】

材料および方法

30

プラスミド

最終プラスミド構築物の誘導は、中間プラスミドへのクローニングを伴う多段階プロセスであった。2つの異なるプラスミドを用いて、ss1.bb2断片をクローニングした。最初に、メソテリンscFv断片(ss1)が、トランスレーショナルリサーチプログラム(Translation Research Program)(TRP)研究室によってDr.Pastan(Chowdhury et al., 1998)の以前に公表された構築物からクローニングされた。以前に述べられたpELNS.CD19-BB-プラスミド(Milone et al., 2009)から、ヒトCD8 ヒンジおよび膜貫通ドメインと41BBおよびCD3 配列をPCRによってクローニングした。最初に、ss1.bb2断片をpGEM.GFP.64Aベクターにクローニングした。トランスジーン発現を向上させるために、2つの3'UTR グロビン反復および150bpのポリ(A)配列(pGEM.GFP.64Aの中にある64ポリ(A)配列を置換する)を付加することによって、このベクターを改変した(Holtkamp 2006)。臨床使用のためのGMPに準拠したプラスミドを、pGEMに由来するss1.bb2.2bgUTR.150A断片をpDriveベクターにサブクローニングすることによって得た。pDriveクローニングベクター(Qiagen)は、UAハイブリダイゼーションによるPCR産物の高効率クローニング用に設計されている。これを用いると、組換えクローンのアンピシリン選択およびカナマイシン選択が両方とも可能になり、ユニバーサル配列決定プライマー部位ならびにインビトロ転写用のT7プロモーターおよびSP6プロモーターが付いている。最初に、HindIIIおよびNdeI(フィルイン平滑末端)によってpGEMベクターからss1.bb2.2bgUTR.150Aを切断し、KpnIおよびNotI(フィルイン平滑末端)によって切断したpDriveにサブクローニングした。正しい方向を有するインサートを配列確認して、pDrive.ss1.bb2.2bgUTR.150Aを作製した。AhdIおよびBciVIを用いた二重消化によってpDriveベクターの中にあるアンピシリン耐性遺伝子を欠失させた。CAR ORF内にあ

40

50

る内部オープンリーディングフレーム(ORF)から翻訳される、可能性のある異常タンパク質を排除するために、サイズが60bpより大きな全ての内部ORFを変異誘発PCRによって変異させたのに対して、ss1 CARのORFは完全な状態で維持した。結果として生じたプラスミドをpD-A.ss1.bbz.OF.2bg.150Aと名付けた。

【0254】

細菌形質転換

最終pD-A.ss1.bbz.OF.2bg.150A構築物を、CVPF SOP 1188に従ってOneShot TOP10 Chemically Competent E Coli細胞(Invitrogen)に導入した。マスター細胞バンクを作製し、TCF SOP 1190に記載のように細胞の安全性、純度、および同一性を試験した。

【0255】

DNA調製

1パッチとして調製した10mgまでのプラスミドDNAを、SOP 1191に従って、2つの1.25リットル100 µg/mlカナマイシン含有LB培地からQIAfilter Plasmid Giga DNA単離キットを用いて作製した。1回につき1mgのDNAをSpeI制限酵素で37℃で一晩、直線化した。直線化をゲル電気泳動によって確認した後に、Qiagen Plasmid Maxi Kitを用いてラージスケール精製を行った。DNA出荷基準には、外観、濃度純度、無菌性、および直線化のゲル確認が含まれる。

【0256】

RNA調製

翻訳効率を試験するために、本明細書の他の場所に記載のように多数の異なる市販のシステムからRNAを作製した。同時転写システムと比較して、mScript mRNAシステムは実質的に100%の転写物キャッピング、100%正しいキャップ方向を提供し、翻訳効率を高める可能性のあるCap1翻訳ブースティング(boosting)構造を組み込むので選択された。キットの試験成績書(Certificate of Analysis)が付いているmScript(商標)mRNA Systemの特注ロットが提供された。RNAをRNeasy Maxiキット(Qiagen)を用いて単離した。インビトロで転写されたRNAを1mg/mLの濃度で0.5mLのアリコートで凍結保存した。mRNA変性緩衝液(Invitrogen, Carlsbad, CA)に入れて70℃で15分間変性した後にRNAの質および量を1%アガロースゲル電気泳動によって分析し、UV分光光度法(OD260/280)によって定量した。機能特徴付けの一環として、このmRNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞のトランスジーン発現の評価も行った。

【0257】

CAR T細胞産物の製造

CaridianBCT Elutraによる向流遠心水篩を介して単球を枯渇させることによって白血球搬出産物からCD3+T細胞を濃縮した。CaridianBCT Elutraでは使い捨ての閉鎖系ディスポーザブルセットを使用する。0日目に、T細胞製造プロセスを、抗CD3/CD28モノクローナル抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いた活性化から開始し、静置組織培養バッグの中で拡大を開始する。5日目に、さらなる拡大が必要であれば細胞をWAVEバイオリアクターに移すことができる。培養の終わりに、細胞を磁気ビーズから枯渇させ、洗浄し、Haemonetics Cell Saverシステムを用いて濃縮する。翌朝エレクトロポレーションするために、採取後のT細胞を37℃で一晩インキュベートする。細胞を洗浄し、エレクトロポレーション緩衝液(Maxcyte)に再懸濁し、Maxcyteプロセシングアセンブリにロードする。細胞にss1 RNAをエレクトロポレーション処理によって導入し、4時間回復させ、次いで、注入可能な凍結保存培地に溶解して処方する。

【0258】

エレクトロポレーション処理された細胞を採取している間の細胞総数を用いて、凍結保存可能な6回分の用量を計算することができる。>80%のCD3+出荷基準、ならびに凍結保存前に>80%の生存率およびセンチネルバイアル(sentinel vial)の場合は>70%の工程間基準があれば、全ての対象に、同量の生存CD3+T細胞+/-20%を投与することができる。フローサイトメトリーを用いてCAR発現を測定するために、凍結保存時に試料を採取することができる。しかしながら、この情報はリアルタイムでは利用することができない。従って

10

20

30

40

50

、その後にCAR陽性細胞のパーセントを計算し、出荷基準として使用することができるが、CAR陽性細胞数に対して最終製品用量を規準化することができない。CAR発現陽性が20%以上という出荷基準を満たし、プロトコールに述べられた他の出荷基準を満たす最終製品のみを投与する。

【0259】

さらに、約10個のSS1 T細胞バイアルを凍結保存し、最初の注入時にエンドトキシングル凝固および生存率カウントを行うための、ならびにその後の注入ごとに生存率を評価するためのセンチネルバイアルとして保持することができる。残っているバイアルを用いて、「参考までの(for information only)(F10)」機能アッセイを行うことができる。全ての凍結保存細胞を、モニタリングされている-130 以下の中の冷凍庫の中で保管することができる。

10

【0260】

エレクトロポレーション後のCAR発現は最終細胞製品の出荷基準の一部である。これは、ヤギ抗マウス IgG, F(ab')2抗体 (Jackson ImmunoResearch)の次にPE標識ストレプトアビジン(BD Pharmingen)で細胞を表面染色し、その後に、フローサイトメトリー分析することによって行われる。出荷基準を $>20\%$ 陽性細胞に設定した。

【0261】

CAR T細胞製品の安定性

エレクトロポレーションの4時間後にss1 CAR T細胞を凍結保存し、T細胞製造後、3ヶ月以内に解凍および投与する。約30日間、-130 以下で凍結保存したss1 CAR T細胞のメソテリンscFv発現は97.4%であり、凍結保存時(96.9%)とほぼ同一であることが証明されている。他の凍結保存されたT細胞製品は少なくとも6ヶ月間、安定している。トリパンブルーカウントに基づく解凍後の生存率は98.7%と比較して75.2%であった。発現データから、最終製品は、試験のために保管されている間に安定しており、さらなる投与のためのセンチネルバイアルは70%の生存率および $>20\%$ のCAR発現という出荷基準を満たさなければならないことが示唆される。凍結保存の3ヶ月後、6ヶ月後、9ヶ月後、および12ヶ月後にss1 CAR T細胞のさらなるバイアルを解凍し、さらなる製品安定性データを得るために生存率およびトランスジーン発現を試験する。

20

【0262】

CAR T細胞IV投与

30

- ・注入を、免疫抑制患者のための対策を用いてCTRCにある隔離室で行う。
- ・プロトコールコーディネーターまたは看護師が、トランスフェクトされたT細胞の1つまたは2つのバッグを水で濡らした氷の上に載せてペンシルバニアホスピタル大学(University of Pennsylvania Hospital)の臨床細胞・ワクチン製造施設(CVPF)から治験薬サービス(Investigational Drug Services)(IDS)に運ぶ。
- ・IDSは、説明責任のために製品の到着を記録し、臨床試験コーディネーターによって提供された患者名および識別子を確認し、IDS記録の中に維持するために、バッグに貼られている穴の開いた二部構成のラベルから一方のラベルを引きはがす。プロトコールコーディネーターまたは看護師が、トランスフェクトされたT細胞をIDSからCTRCにいる対象のベッドサイドに運ぶ。

40

- ・CVPFスタッフの一員が、トランスフェクトされたT細胞をIDSから運んだ直後に、対象のベッドサイドにある37 ウォーターバスに入れて解凍する。CAR T細胞製品が、傷のあるバッグもしくは液漏れしているバッグの中に入っているように見えたなら、または別の方法で損なわれているように見えたなら、CAR T細胞製品を注入してはならず、以下に定めたようにCVPFに戻さなければならない。

- ・解凍後約10~15分以内にCTRC看護師が細胞を冷やしながら対象に注入する。三方コック付き18ゲージラテックスフリーY型血液セットに通して、トランスフェクトされたT細胞(約100mLの体積)を迅速に静脈内注入する。重力注入(gravity infusion)により投薬を行う。重力による注入速度が遅すぎるのであれば、コックを介して、トランスフェクトされたT細胞製剤を50mL注射器に吸い出し、必要な速度で手作業で注入する。凍っている凝集塊

50

をバッグ内に放置してはならない。

- ・注入前に、2人の人物が、対象の立ち会いのもとで、それぞれバックに貼ってあるラベルの情報を独立して確かめ、情報が参加者と正しく一致していることを確認する。
- ・トランスフェクトされたT細胞を注入している間および注入した後に患者をモニタリングする。投薬の直前および注入が完了した後、2時間にわたって15分ごとに血圧、心拍、呼吸数、およびパルスオキシメトリーを入手および記録する。緊急事態のためにクラッシュカードを用意しなければならない。
- ・注入して3時間後に症状が現れず、対象のバイタルサインが正常なままであれば、症状が発症したら病院に戻るように説明して対象を帰宅させる。バイタルサインの測定が安定しなければ、対象のバイタルサインが安定するまで、または医師が患者を退院させるまで約15分ごとにバイタルサインを入手し続ける。対象が帰っても安全だと医師がみなすまで帰らないように対象に求める。
- ・形質導入されたCIRT細胞数のベースライン測定のために、形質導入されたCAR T細胞投薬が完了した後、60分(±5分)以内に血液試料を入手する。
- ・血液検査および追跡調査のために24時間でCTRCに戻るように対象を指示する。

【0263】

特定の理論に拘束されるつもりはないが、提案された試験は、1)注入前リンパ球枯渇(lymphodepletion)レジメンが利用されていない;2)レトロウイルスではなくmRNAを用いてT細胞形質導入が行われ、それによって、これらの細胞の持続性が数日までと短い;3)メソテリンの天然発現が心膜腔、胸膜腔、および腹膜腔にある漿膜表面に限定されるという、いくつかの理由により致死リスクを最小限にするはずだと考えられている。もし体液蓄積につながるメソテリン交差反応および炎症性プロセスが発生したら、体液を除去するために抗リンパ球療法(ステロイド)を開始するので、これらの腔に速やかにかつ容易に低侵襲的にアクセスすることができる。

【0264】

これは、新たな分子実体のファースト・イン・ヒューマン臨床試験である。しかしながら、類似したCAR T細胞を用いて他の第I相試験が行われている。NOD/SCID/ c-/-マウス腫瘍異種移植片におけるCAR T細胞の薬理学的に有効な用量(PED)は 1×10^7 CAR T細胞/マウスである。この用量で、マウスの一部は異種移植片対宿主病を発症する。

【0265】

コホート1患者(n=3)には、0日目に抗メソ RNA CAR T細胞を用いたフラットドーリング(flat dosing)により 1×10^8 個を単回注入し、7日目の注入前に患者がプロトコールにより定められた安全性評価を満たしているのであれば、7日目に 1×10^9 個のRNA CAR T細胞を単回注入する。

【0266】

注入毒性を評価するために、コホート2の対象(n=6)には、改変されたCAR T細胞を1週間の間隔を開けて2サイクル与える。1サイクルは隔日3回(月曜日、水曜日、金曜日)の注入からなる。サイクル1は、MWFで投与される 1×10^8 個のCAR T細胞の3回の投与(0日目、2日目、4日目)からなる。安全性評価に合格した後、サイクル2は、MWFで投与される 1×10^9 個のCAR T細胞の3回の投与(14日目、16日目、18日目)からなる。予期せぬ出来事によって計画通り14日目に注入が始まらなかったら、コホート2のサイクル2が21日目まで延期される場合がある。それに応じて21~35日目の日程を変更する。2ヶ月目、3ヶ月目、6ヶ月目は変わらない。

【0267】

モニタリング期間の終わりに(最後に注入して3ヶ月後)、コホート1の対象が全ての組み入れ基準/除外基準を満たすのでればコホート2に登録することができる。コホートにおいて患者登録がずれることがあり、そのため、前の患者が安全性評価を完了するまで新規の患者は処置されない。対象を連続して登録することができる。各対象は、次の患者が処置される前に、処置サイクルとそれに統いて、コホート1の場合は7日毒性観察期間(14日目)およびコホート2の場合は10日毒性観察期間(28日目)を両方とも完了しなければならない

10

20

30

40

50

。

【0268】

もしDLTが発生したら用量を1/10に縮小することができる。従って、サイクル1の間に10⁸個のCAR T細胞で毒性が発生したら、全ての注入(投与1~6)を10⁷CIRに縮小する。もし管理不可能な毒性が10⁷個のCAR T細胞で発生したら、試験を中止する。

【0269】

注入1回当たりの標的用量は、1回目のサイクルについては $1 \times 10^8 \pm 20\%$ 個の細胞(コホート1については1回の投与およびコホート2については3回の投与)ならびに2回目のサイクルについては $1 \times 10^9 \pm 20\%$ 個の細胞(コホート1については1回の投与およびコホート2については3回の投与)である。最小許容量は 1×10^8 である。全細胞拡大が、許容される全細胞用量より少なければ、さらに多くの細胞を拡大し、全標的用量を満たそうとして、患者は2回目のアフェレーシスを受けることがある。2回目のアフェレーシスに対して禁忌症があれば、または2回目のアフェレーシスおよび拡大が最小許容量を生じなければ、この投与は製造不良とみなされる。

【0270】

実施例4:RNA操作CAR T細胞のコンパッショネット・ユース

このプロトコールは、メソテリンに特異的なRNA CAR T細胞のIV注射を試験するために設計された。IV ROAによる計画された9回までの注射の忍容性を確かめた後に、対象にRNA CAR T細胞x2をIT投与する。進行性疾患の非存在下では、約6~8週間間隔で忍容性によりIVおよびIT RNA CAR T細胞のサイクルを繰り返す。この患者からの結果は、これに続く、完全に展開した第I相概念実証(proof of concept)プロトコールの開発の指針となる。

【0271】

癌療法用CAR T細胞の開発における主な問題は、治療可能時間域の安全性、この場合、考えられる抗腫瘍効果と、メソテリンの標的化によって起こり得る漿膜炎のバランスを確かめることである。この目的のために、前臨床の2種類の頑強な前臨床モデルにおいて抗腫瘍効果を観察することができるようRNA CAR T細胞が開発されている。毒性管理計画は、もし毒性が発生したら、CAR T細胞注射を中断した後2~3日以内にRNA CAR T細胞が急速に消失するという事実によって処理される。このコンパッショネット・ユースパイロット試験によって、転移性膵臓癌患者におけるメソテリン特異的T細胞の安全性、忍容性、および生着能力が確かめられる。このプロトコールにおいてITおよびIV投与経路の安全性および実現可能性が特定される。一般的なプロトコール計画を図21に示した。

【0272】

本試験は、1)スクリーニング期間、2)その後に、静脈切開/アフェレーシス、T細胞の注入および注射、腫瘍生検からなる約8週間の介入/処置期間、ならびに3)病期分類および経過観察からなる。評価が安定した疾患またはそれより良ければ、細胞の反復サイクルを対象に提供する。

【0273】

アフェレーシス/静脈切開

患者または双子のドナーは処置前に標準的な白血球アフェレーシススクリーニングを受ける。IT T細胞の場合、100ml静脈切開によって、製造に十分なリンパ球が得られることがある。T細胞IV投与の場合、約 1×10^9 個以上のT細胞を収集するために7~12リットルのアフェレーシスが必要な場合がある。静脈へのアクセスが十分でない対象には、アフェレーシスで使用するためにカテーテルを一時的に留置してもよい。このカテーテルをアフェレーシス前に挿入し、アフェレーシス手順が完了したら取り外す。ベースラインイムノアッセイのために末梢試料を採取する。FDA遡及調査要件および研究のためにベースライン血液白血球も入手および凍結保存する。

【0274】

注射前の評価

試験薬剤を投薬する前の週に、患者は、インターバルヒストリー(interval history)検査および身体検査、併用薬物療法の調査、ECOGパフォーマンスステータス、AEスクリーニ

10

20

30

40

50

ングを受ける。投薬前、2週間以内に以下:EKGおよびCXR(漿膜炎のベースラインスクリーニング)、CBC、化学検査(LFT)、CEAおよびCA-19-9を行わなければならない。

【0275】

試験薬物の調製および投与

T細胞は臨床細胞・ワクチン製造施設(CVPF)において調製され、注入細胞についてFDAにより定められた出荷基準(例えば、細胞純度、無菌性、発熱性など)が満たされるまで出荷されない。

【0276】

臨床・トランスレーショナルリサーチセンター(Clinical and Translational Research Center)(CTRC)におけるIV投与

投与のために適宜、1つまたは2つのバッグに入っているT細胞を、新鮮な場合はコールドパック(cold pack)に載せて、凍結保存されている場合はドライアイスに載せてCTRCにいる対象のベッドサイドに輸送する。細胞を、三方コックの付いた18ゲージまたは同等のラテックスフリーY型血液セットを通して約10~20mL/分の流速の急速静脈内注入によって与える。細胞が解凍するまでバッグを優しくマッサージする。凍っている凝集塊を容器内に放置してはならない。注入期間は約15分である。それぞれの注入バッグに、以下:「自己由来/同系使用のみ(FOR AUTOLOGOUS/SYNGENEIC USE ONLY)」を記載したラベルを貼る。さらに、ラベルには、対象のイニシャル、誕生日、および試験番号などの少なくとも2つの特有の識別子がある。注入前に、2人の人物が、対象の立ち会いのもとで、この情報を全て独立して確かめ、情報が参加者と正しく一致していることを確認する。T細胞製品が、傷のあるバッグもしくは液漏れしているバッグの中に入っているように見えたら、または別のある方法で損なわれているように見えたら、T細胞製品を注入してはならない。

【0277】

対象にアレルギー反応、または重篤な低血圧危機(hypotensive crisis)、または注入に対する他の任意の反応があった場合に備えて、注入している間に救急医療機器(すなわち、救急トロリー(emergency trolley))を用意する。バイタルサイン(体温、呼吸数、脈拍、および血圧)を、注入の前後に、次いで少なくとも1時間にわたって15分ごとに、ならびにこれらのサインが十分であり、かつ安定するまで、測定する。詳細は以下の通りである。

- ・併用薬物療法を調査する。
- ・T細胞をコールドパックに載せて臨床細胞・ワクチン製造施設(CVPF)から患者のベッドサイドに運ぶ。
- ・注入をCTRCで行う。
- ・凍結されている場合は、自己由来T細胞を患者対象のベッドサイドにある37ウォーターバスに入れて解凍する。解凍後、約10~40分以内に細胞を注入する。T細胞(凍結保存されている場合は約50~100mLの体積、新鮮な場合は100~300mL)を、三方コックの付いた18ゲージまたは同等のラテックスフリーY型血液セットを通して約10/分の流速の静脈内に注入する。重力注入により投薬を行う。重力による注入速度が遅すぎるのであれば、コックを介して、自己由来T細胞製剤を50mL注射器に吸い出し、必要な速度で手作業で注入してもよい。
- ・投薬の直前および注入が開始した後、2時間にわたって15分ごとに血圧、心拍、呼吸数、パルスオキシメトリーを入手および記録する。緊急事態のためにクラッシュカートを用意しなければならない。
- ・注入されたT細胞の数のベースライン測定のために、T細胞投薬が完了した後、15分(±5分)以内に血液試料を入手する。
- ・注射して1時間後に症状が現れず、患者対象のバイタルサインが正常なままであれば、患者対象を帰宅させる。バイタルサインの測定が安定しなければ、患者対象のバイタルサインが安定するまで、または医師が患者を退院させるまで約15分ごとにバイタルサインを入手し続ける。
- ・初回注入の後、一晩観察するために患者を収容する。qod M-W-Fに基づいて注入を行い

10

20

30

40

50

、忍容性が確かめられたら、可能な限り外来で対象に注入を行う。SOEに従って血液検査および追跡調査のために24時間で戻るように対象を指示する。

【0278】

前投薬

T細胞注入後の副作用には、一過性の発熱、悪寒、疲労、および/または恶心が含まれる。注入前に、対象に経口によりアセトアミノフェン650mgを前投薬し、経口またはIVにより塩酸ジフェンヒドラミン25~50mgを前投薬した後に、T細胞を注入することが推奨される。これらの薬物療法を必要に応じて6時間ごとに繰り返してもよい。患者に発熱があり、アセトアミノフェンによって軽減しないことが続くのであれば、1コースの非ステロイド抗炎症薬物療法が処方されてもよい。命を脅かす緊急事態を除いて、いかなる時でも、患者にはヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン(Solu-Medrol)、またはデキサメタゾン(Decadron)などの全身コルチコステロイドを与えないことが推奨される。なぜなら、これにはT細胞に対して副作用があり得るからである。急性注入反応にコルチコステロイドが必要とされるのであれば、ヒドロコルチゾン100mgの初回投与が推奨される。IT注射の場合、患者には、注射疼痛のための麻酔薬の他に前投薬を日常的に与えない。

10

【0279】

IV T細胞注射

試験薬剤を注射する前に、患者のECOGパフォーマンスステータス、AEスクリーニング、CBC、およびLFTを検査する。この目的は、T細胞を3週間にわたって週3回、すなわち、MWF投与することである。例えば、医学的合併症の介入または休日によって計画が変更する可能性が高い。忍容性により週3回注射することを目標にして、計画された注入を必要に応じて調整する。

20

【0280】

隔離室で対象に注入を行う。患者のベッドサイドで細胞を解凍する。それぞれの注入時間が約10~15分になるように、解凍した細胞を、許容値と同程度の速さの注入速度で与える。混合を容易にするために、Yアダプターを用いて細胞を同時に投与する。注入前および注入して20分後に、ベースラインT細胞レベルを求めるために血液試料を入手する。対象に注入し、適宜、前投薬する。投薬前、注入の終わりに、およびその後1時間にわたって15分ごとに、およびバイタルサインとパルスオキシメトリーが安定するまで、対象のバイタルサインを評価し、パルスオキシメトリーを行う。初回注入後、一晩、患者を入院させる。許可された時に後の注入を外来で投与する。血液検査および経過観察のために24時間でHUPオフィスに戻るよう患者対象を指示する。

30

【0281】

T細胞注入の遅れの理由となる特異的毒性には、以下:1)肺:95%を超える飽和を保つために補充酸素が必要であること、または胸部X線時に進行性のX線撮影異常が存在すること、2)心臓:医学的管理によって管理されない新たな心不整脈、3)昇圧サポートを必要とする低血圧、4)活動性感染:T細胞注入の48時間以内に細菌、菌類、またはウイルスについて陽性を示した血液培養物が含まれる。

30

【0282】

試験薬剤注入の後に、サイトカインおよびフローサイトメトリーのために注射/注入して約20分後に血液を入手しなければならない。サイトカイン測定のために血清を入手する。

40

【0283】

インターベンションナルラジオロジー(IT注射)T細胞注射および腫瘍生検

超音波誘導または侵襲放射線学(invasive radiology)により推奨される他の画像化を用いてT細胞を腫瘍病変部に注入する。患者に抗不安薬(すなわち、アチパン)を前投薬してもよく、意識下鎮静の状態で注射してもよい。局所麻酔のために、処置の少なくとも30分前に患者の注射部位に2.5~5.0グラムのリドカイン/ブリロカインクリーム(EMLA)を塗布してもよい。注射しようとする皮膚の領域をベタジンで清浄にし、その後に、さらに多くのリドカイン(1%)を皮膚および皮下組織に注射し、腫瘍周辺部から中心領域に注射し

50

ようと腫瘍および腫瘍周囲領域にT細胞を浸潤させる。

【0284】

CAR T細胞注射の前に、メソテリン発現および二次エンドポイントに列挙した他のパラメータのベースラインとして役立つように、16Ga針を用いてコア針生検材料を入手する。サイトカインおよびフローサイトメトリーのために注射の前後に末梢血を入手しなければならない。

【0285】

腫瘍応答評価は腹部画像化(PET/CT、CT、またはMRI)によって+4週間および+8週間から開始し、次いで、標準的なケアおよび診療に従ってT細胞注入後2年にわたって2ヶ月ごとに、または患者が疾患のために代替療法を必要とするまで行う。T細胞によって誘発される炎症から腫瘍代謝活性を解釈することが難しい場合があるので、T細胞代謝活性がPETスキャンの解釈を不明瞭にする場合があると予想される。

10

【0286】

さらなるT細胞療法

進行性疾患の非存在下では、連続6~8週間のサイクルでIT T細胞注入およびIV T細胞注入を行うことができる。もしCAR T細胞に対する体液性免疫応答が発生したら全身(IV)T細胞注射を続けるのを止める。しかしながら、疾患進行の非存在下では、患者は忍容性により活動性疾患部位にIT T細胞注射を毎月受け続けることができる。

【0287】

対象はT細胞注入後、3ヶ月目および6ヶ月目に復帰する。これらの来診時に、対象は、以下:身体検査、有害事象の文書化、ならびに血液検査、化学検査、尿検査、CA-19-9、および研究室のための採血を受ける。

20

【0288】

実施例5:GD2に対して作られたRNA CAR

GD2は、神経芽細胞腫およびメラノーマを含む神経外胚葉由来の腫瘍表面に発現しているジシアロガングリオシドである。GD2に腫瘍特異性があるために、RNA CARを発現する遺伝子組換えCTLを標的化するためにGD2を使用することができる。本明細書において示されたデータから、GD2 scFvを含むCARをコードするIVT RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したCTL(scFvはGD2に結合する)はGD2発現腫瘍を効果的に検出および処置することが証明される。

30

【0289】

pGEM-64Aベクターを用いてIVT GD2-BBZベクターを作り出した。オーバーラッピングPCRを使用し、GD2 scFvおよびIgGヒンジを提供するGD2- CARを有するレンチウイルスベクターを用いてpGEM-GD2-8TMBBZ、pGEM-GD2-28TMBBZ、およびpGEM-GD2-ZTMBBZ、ならびに4-1BB- を提供するpD-A.cMet.OF.8TMBBZを作製した(図21)。それぞれの膜貫通はPCRプライマーによって導入された。これらのベクターを用いて生成されたIVT RNAはそれぞれ、GD2 scFv抗原結合ドメインならびに4-1BBおよびCD3- 細胞内シグナル伝達ドメインを含む。さらに、3つの異なるベクターを生成した。それぞれ膜貫通ドメインの同一性の点で異なる。従って、GD2 RNA CARは、CD8膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、またはCD3- 膜貫通ドメインのいずれかを含んだ。

40

【0290】

GD2-8TMBBZ RNA(CD8膜貫通ドメインを含有する)は、SEQ ID NO:10を含むヌクレオチド配列から転写される。GD2-28TMBBZ(CD28膜貫通領域を含有する)は、SEQ ID NO:11を含むヌクレオチド配列から転写される。GD2-ZTMBBZ(CD3- 膜貫通ドメインを含有する)は、SEQ ID NO:12を含むヌクレオチド配列から転写される。

【0291】

エレクトロポレーションの1日後に、フローサイトメトリーを用いて様々なGD2 CAR組成物の表面発現を確かめた。図22に示したように、エレクトロポレーション処理された細胞においてGD2-8TMBBZおよびGD2-28TMBBZは高発現していた。

【0292】

50

GD2 RNA CAR T細胞の機能を調べるために、エレクトロポレーション処理されたT細胞に対してCD107aアッセイを行った。示したように、T細胞に異なるGD2 CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入し(対照としてCD19 CARを使用した)、T細胞をGD2陽性腫瘍株(SY5Y)または負の対照(NLFwt)と共に培養した。本明細書の他の場所に記載のように4時間培養アッセイにおいてフローサイトメトリーによってCD107aアップレギュレーションが検出された。図23は、標的認識を示す、GD2 RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入した細胞におけるCD107aアップレギュレーションを証明する。

【0293】

エレクトロポレーション処理されたT細胞を、様々な腫瘍細胞株と共に培養した後のIFN- 分泌についても評価した。示したように、異なるGD2 CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞(対照としてCD19 CARを使用した)を、GD2陽性腫瘍株(SY5Y)および負の対照(NLFwt)と共に培養した。培養して24時間後に上清を採取し、IFN- 分泌検出用のELISAアッセイに供した。図24は、GD2 RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入した細胞が、GD2発現腫瘍とのインキュベーション後にIFN-_αを分泌したが、CD19 CARをエレクトロポレーション処理によって導入した細胞もエレクトロポレーション処理されていない細胞もIFN-_αを分泌しなかったことを示す。

10

【0294】

GD2-8TMBBZ構築物内に存在する内部オープンリーディングフレーム(ORF)を除去するために、オーバーラッピングPCRを用いてpD-A.GD2.OF.8TMBBZを作製した。pGEM-GD2-8TMBBZをテンプレートとして使用し、PCR産物をpD-A.190F.2bgUTR.150Aに由来するpD-Aベクターにサブクローニングした。CAR ORFを変えることなく、2つの内部ORFをATGコドンのPCR変異によって除去した(図25)。内部オープンリーディングフレームフリーGD2.OF.8TMBBZは、SEQ ID NO:13を含むヌクレオチド配列から転写される。

20

【0295】

インビボでGD2発現腫瘍を処置するGD2 RNA CARの有効性を評価するために、ルシフェラーゼを発現するように改変されたSY5Y神経芽細胞腫細胞を注射したマウスを用いて動物試験を行った。pD-A.GD2.OF.8TMBBZ.2bg.150Aから作られたRNAをエレクトロポレーション処理によってT細胞に導入した。このベクターは、ヒト グロブリン由来する3'UTRの2つの反復および150 A塩基を含むポリ(A)テールを含む。pD-A.GD2.OF.8TMBBZ.2bg.150Aベクターは、SEQ ID NO:28を含むヌクレオチド配列を含む。図26は、エレクトロポレーション処理されたT細胞(5M RNA T細胞)を最初に投与する8日前に腫瘍を注射した試験タイムラインを図示する。これに続いて14日目(14M RNA T細胞)および16日目(16M RNA T細胞)に、エレクトロポレーション処理されたT細胞を静脈内投与した。図示したように、試験の時間経過全体を通してバイオルミネセンスイメージング(BLI)を行った。

30

【0296】

腫瘍を注射したマウスにおいてGD2発現神経芽細胞腫量を定量したものを図27に図示した。GD2 CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を注射したマウスは、CD19 CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を注射したマウスおよびPBSのみで処置されたマウスと比較して腫瘍量が減少していた。図28は、GD2 RNA CARおよびCD19 RNA CARで処置されたマウスにおける腫瘍細胞のヒートマップを示す。これにより、GD2 RNA CAR処置動物では腫瘍が縮小することが証明された。

40

【0297】

実施例6:cMetに対して作られたRNA CAR

cMetは、非小細胞癌(NSCLC)癌、胃癌、卵巣癌、膵臓癌、甲状腺癌、乳癌、頭頸部癌、結腸癌、および腎臓癌を含む非常に多くのタイプの癌に見出される受容体型チロシンキナーゼである。従って、本明細書において示されたように、cMetを標的とするIVT RNA CARを開発できることは様々な種類の癌を処置するのに有用だと分かるだろう。

【0298】

最初に、様々な腫瘍株表面でのcMet発現を調べた。異なる細胞株のcMet発現が、抗cMet抗体(抗ヒトHGF R/c-METフルオレセインMAb, R&D System)を用いたフローサイトメトリー

50

によって検出された。図29に図示したように、K562-cMet、L55、SK-OV3、およびOV79腫瘍細胞株は全てある程度までcMetを発現し、従って、cMet RNA CARの機能活性を調べる実験において使用することができた。

【0299】

初期スクリーニング試験に基づいて、異なる膜貫通(TM)領域(CD8、CD28、または4-1BBに由来するTM領域)を有し、内部ORFのないcMet.BBZ CAR(cMet.OF)(図30)をオーバーラッピングPCRによって作製し、pD-A.19OF.BBZ.2bgUTR.150AのCD19.OF.BBZをcMet.OF.BBZsで置換することによってpDriveをベースとするベクターにサブクローニングした。ここで構築および試験したcMet RNA CARは、cMet.OF.8TM.BBZ、cMet.OF.28TMBBZ、cMet.OF.BBTMBBZ、cMet.28TM28BBZ、およびcMet.28Zである。従って、本明細書に記載の構築物は全て、cMetに標的化されたscFv抗原結合ドメイン、ならびにCD28、4-1BB、およびCD3-細胞内ドメインの少なくとも1つを含有する。cMet.OF.8TMBBZは、SEQ ID NO:14を含むヌクレオチド配列から転写される。cMet.OF.28TMBBZは、SEQ ID NO:15を含むヌクレオチド配列から転写される。cMet.OF.BBTMBBZは、SEQ ID NO:16を含むヌクレオチド配列から転写される。cMet.28TM28BBZは、SEQ ID NO:17を含むヌクレオチド配列から転写される。cMet.28Zは、SEQ ID NO:18を含むヌクレオチド配列から転写される。

10

【0300】

様々な形のcMET RNA CARの機能をCD107aアッセイにおいて評価した。図31に示したように異なるcMet CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞(対照としてCD19 CAR、CD19.OF BBZを使用した)をcMet陽性腫瘍株、L55およびSL-OV3、ならびに負の対照K562-CD19と共に培養した。CD107aのアップリギュレーションが4時間培養アッセイにおいてフローサイトメトリーによって検出された(図31A)。図31Bは、エレクトロポレーションして24時間後のCAR発現レベルを示す。

20

【0301】

様々な細胞株との共培養後に、cMet RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞によるIFN- γ 産生および分泌も調べた。図32(対照としてCD19 CAR、19BBZを使用した)に示したように、異なるcMet CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を、cMet陽性腫瘍株L55およびSL-OV3ならびに負の対照K562-CD19と共に培養した。共培養して24時間後に上清を採取し、IFN- γ 分泌用のELISAアッセイに供した(図32A)。cMet CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞のトランスジン発現および機能に基づいて、pD-A.cMet.OF.8TMBBZ.2bgUTR.150A(図32Bに示した構築物)を動物実験および考えられる臨床試験のために選択した。このベクターは、ヒトグロブリンに由来する3'UTRの2つの反復および150 A塩基を含むポリ(A)テールを含む。pD-A.cMet.OF.8TMBBZ.2bgUTR.150Aベクターは、SEQ ID NO:27を含むヌクレオチド配列を含む。cMet.OF.8TMBBZ CARは、SEQ ID NO:14を含むヌクレオチド配列から転写され、cMet scFv抗原結合ドメイン、CD8膜貫通領域、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3-シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0302】

次の実験セットのために、cMet.OF.8TMBBZをcMET RNA CARとして使用した。cMetが表面に発現しているかどうか、さらなるメラノーマ腫瘍細胞株を評価した(図33)。細胞をPE結合抗cMet AbまたはアイソタイプIgG Abで染色した。これにより、SK-OV3、888me1、624me1、および526me1細胞株は全てcMetを発現しているが、K562株は発現していないことが示された。

40

【0303】

cMet.OF.8TMBBZ RNA CARのCAR発現をフローサイトメトリーによって評価した。10日目刺激済みT細胞に、CD19 CAR RNAまたはcMet CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入した。または、10日目刺激済みT細胞をエレクトロポレーション処理しなかった(EPなし)。一晩培養後に、CD19 CARまたはcMet CARの発現がフローサイトメトリーによって検出された。このことから、cMet.OF.8TMBBZをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞のCAR発現はかなり高いことが示された(図34)。

50

【0304】

次に、様々な腫瘍細胞株と共に培養した時のcMet.OF.8TMBBZ RNA CARの機能活性を調べるためにCD107aアッセイを行った。CD19+Nalm6、cMet+SK-OV3、ならびにcMet+メラノーマ株(888me1、624me1、および526me1)を含む腫瘍細胞株を用いて、RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を刺激した。CD19対照およびcMet対照としてK562を使用した。4時間刺激後に、CD107a発現をフローサイトメトリーによってモニタリングした。細胞をCD8+でゲーティングした。図35に示したように、cMet+腫瘍細胞株と共に培養した、cMet RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞の全条件においてCD107aはアップレギュレートされた。

【0305】

10

様々な腫瘍株と共に培養した、cMet RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞によるIFN- γ 産生および分泌を評価した。エレクトロポレーション処理によってcMet.OF.8TMBBZ CAR RNAを導入したT細胞を、CD19+Nalm6、cMet+SK-OV3、ならびにcMet+メラノーマ株(888me1、624me1、および526me1)を含む腫瘍細胞株を用いて刺激した。K562をCD19対照およびcMet対照として使用した。24時間刺激後に、IFN- γ 産生をELISAによってアッセイした。図36に図示したように、cMet+腫瘍細胞株と共に培養した、cMet RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞の全ての条件においてIFN- γ 分泌は増加した。

【0306】

20

次に、インビボでcMet RNA CARを用いてcMet+腫瘍を処置する有効性を評価するために動物試験を設計および実施した。図37は、0日目にSKOV3-Luc腫瘍細胞を皮下移植し、7週目、9週目、および11週目に、cMet.OF.8TMBBZ CAR RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を腫瘍内投与した試験設計を示す。さらに、それぞれのT細胞投与の24時間前に動物をシトキサンで処置した。

【0307】

全束(total flux)の変化の倍率によって測定されたように腫瘍量を定量したものを図38に図示した。cMet RNA CAR+シトキサンで処置されたマウスの腫瘍量は少ないことが示された。このデータから、cMetに標的化されたRNA CARはcMet+腫瘍処置において有効であることが証明される。

【0308】

30

実施例7:RNA CARおよびシトキサンの併用処置

RNA CARを用いた複数回の動物腫瘍処置実験に基づいて、処置して数日後に、レンチ-CD19z T細胞およびCD19 RNA T細胞はいずれも同様の処置効力を示すことが見出された。CD19 RNA CAR T細胞は対照T細胞または食塩水処置マウスより有意に少ない腫瘍量(1~2log少ないBLI)を示したが、CD19 CARをコードするレンチウイルスほど効果的に腫瘍を取り除かない(図39)。追加のT細胞注射(2回目および3回目)は、継続的な腫瘍抑制を示したレンチ-CD19Z T細胞処置マウスと比較して、さらなる処置利益を付け加えるようには見えない(図39)。複数回のT細胞注射の処置効力は、単回投与T細胞注射を用いた前の実験と同等である。このことは、再注射されたT細胞の処置効力の欠如が観察されたことは、1回目のT細胞注射から拡大された非機能的T細胞が既に存在することが原因であり得ることを示している。本明細書において示されたように、新たなT細胞注射の前に非機能的T細胞を除去することによって、RNA CAR T細胞の複数回注射の処置が向上するかどうかを調べた。

40

【0309】

初期実験のために、T細胞にCD19-z、CD19-BBz、CD19-28z、およびCD19-28BBzの1つをエレクトロポレーション処理によって導入した。SS1-BBzをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を対照として使用した。CD19-zは、SEQ ID NO:19を含むヌクレオチド配列から転写される。CD19-BBzは、SEQ ID NO:7を含むヌクレオチド配列から転写される。CD19-28zは、SEQ ID NO:20を含むヌクレオチド配列から転写される。CD19-28BBzは、SEQ ID NO:21を含むヌクレオチド配列から転写される。

【0310】

50

NSGマウスにNalm-6-Lucを注射した後5日目に、エレクトロポレーション処理によってRNAを導入した10⁷個のT細胞を(iv)注射した。1回目のT細胞注射の7日後に、既に存在するT細胞を除去するために化学療法(シトキサン；CYTX、80mg/kg)を(ip)投与した。化学療法の1日後に2回目の10⁷個のT細胞注射を行った。3回目および4回目のT細胞注射の1日前にシトキサン(CYTX、50mg/kg)を与えた。食塩水または食塩水+化学療法で処置したマウスを対照として使用した。マウスを画像化し、腫瘍およびT細胞負荷量をモニタリングするために毎週採血した。図40は、CD19に対して作られたRNA CARを繰り返し注入することによって媒介される腫瘍除去をCYTX化学療法処置が向上させることを証明する。図41は、様々な処置群における動物の全生存を図示する。これから、RNA CAR T細胞の反復注射は、以前の注入のシトキサンに基づく枯渇と組み合わせた時にだけ生存期間を延ばすことが分かる。

10

【0311】

次の実験セットでは5日初代白血病-CBG/NSGマウスを使用した。コメツキムシ緑色(click beetle green)(CBG)遺伝子を発現するように改変された初代白血病細胞株に由来する細胞を投与した後5日目に、RNAをエレクトロポレーション処理によって導入した10⁷個のT細胞を(iv)注射した。1回目のT細胞注射の7日後に、既に存在するT細胞を除去するために化学療法(シトキサン、60mg/kg)を(ip)投与した。化学療法の1日後に2回目の10⁷個のT細胞注射を与えた。3回目のT細胞注射の1日前にシトキサンを投与した。マウスを画像化し、腫瘍およびT細胞負荷量をモニタリングするために毎週採血した。以下の処置群を使用した：レンチウイルスベクター.19.28BBZ, IVT RNA. 19.28BBZ CO(コドン最適化CD19-28BBZ CAR DNA配列), IVT RNA 19.28BBZ LL(CD28ジロイシンモチーフを変異させた), IVT RNA 19.28BBZ wt(ジロイシンモチーフを有するCD28)、レンチウイルスベクター19BBZ, IVT RNA 19BBZ CO(コドン最適化CD19-BBZ CAR DNA配列), IVT RNA 19BBZ wt。19.28BBZ COは、SEQ ID NO:22を含むヌクレオチド配列から転写される。19.28BBZ LLは、SEQ ID NO:23を含むヌクレオチド配列から転写される。19BBZ COは、SEQ ID NO:24を含むヌクレオチド配列から転写される。

20

【0312】

IVT RNA ss1BBZをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を対照として使用した。複数回のT細胞注射を、RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を用いた処置群にのみ行った(レンチウイルスによって形質導入したT細胞では行わなかった)。図42は、試験の最初の3週間にわたる腫瘍量を図示する。これにより、シトキサン効果は反復し、RNA CARの複数回投与をシトキサンと組み合わせた時に腫瘍量はさらに減少することが分かる。図43は、処置された動物のパーセント生存率を図示する。

30

【0313】

図44は、10日目、10⁷個のCAR T細胞を単回注射して5日後の各処置群における動物のヒートマップを図示する。これに対して、図45は、21日目、シトキサン処置および2回目10⁷個の細胞を注射して7日後の各処置群における動物のヒートマップを図示する(RNA CAR群では2回目の注射のみ)。ヒートマップから、レンチウイルスCAR処置と同様に、シトキサンおよびRNA CARの複数回注射の併用処置によって腫瘍細胞が低減することが証明される。

40

【0314】

翌日、複数回注射で投与されるT細胞量の異なる投薬戦略を調べた。7日Nalm-6-Luc/NSGマウスを使用した。白血病細胞の送達後7日目に、RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞を異なる用量で(iv)注射した。1回目のT細胞注射の7日後に、既に存在するT細胞を除去するために化学療法(シトキサン、60mg/kg)を(ip)投与した。化学療法の1日後に2回目のT細胞注射を与えた。3回目のT細胞注射の1日前にシトキサンを適用した。マウスを画像化し、腫瘍およびT細胞負荷量をモニタリングするために毎週採血した。以下の処置群を使用した：レンチウイルスベクター-CD19BBZ-10e6/マウス;CD19BBZ RNA、3回全ての注射について10e6/マウス;CD19BBZ RNA、1回目の注射-20e6/マウス、2回目および3回目-10e6/マウス;CD19BBZ RNA、1回目の注射-20e6/マウス、2回目および3回目-5e6/マウス。

50

ス;CD19BBZ RNA、3回全ての注射について10e6/マウス-シトキサンなし;CD19BBZ RNA、1回目の注射-20e6/マウス、2回目および3回目-10e6/マウス-シトキサンなし。ss1BBZ RNAをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞-1回目の注射:20e6/マウス、2回目および3回目-10e6/マウスを対照として使用した。図46は、試験の最初の3週間にわたる各処置群における動物の腫瘍量を図示する。この中で示されたデータから、シトキサンと組み合わせてCD19-BBz RNA CAR T細胞の複数回注射が与えられた動物の腫瘍量は、CD19-BBz RNA CAR T細胞の複数回注射のみが与えられた動物より少ないことが証明される。

【0315】

図47は、試験22日目の各処置群における動物のヒートマップを示す。シトキサンによって提供された化学療法は、RNA CARの複数回注射で処置されたマウスにおける腫瘍消失において非常に重要であることが分かる。図48は、試験の時間経過全体を通した動物のさらなるヒートマップを示す。このことは、シトキサン処置と組み合わせた時の20-5-5群および20-10-10群における持続的な腫瘍縮小を示している。

10

【0316】

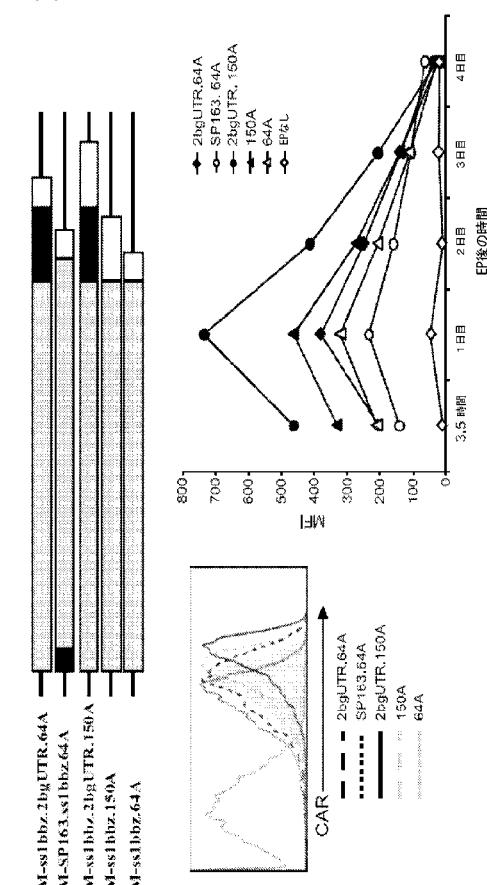
図49および50に図示したようにパーセント生存率からも、シトキサンが、RNA CAR T細胞の複数回注射によって付与される処置を向上させることができることが分かる。この結果から、白血病を誘導して約75日後、高用量RNA CARレジメン(20-5-5)とシトキサン処置は約40%の生存率となつたが、シトキサンを含まない全ての処置群の生存率は遅くとも65日までに0%になったことが分かる。本明細書において示されたデータから、化学療法は、RNA CARによって付与される処置および腫瘍縮小を劇的に向上させることができることが証明される。

20

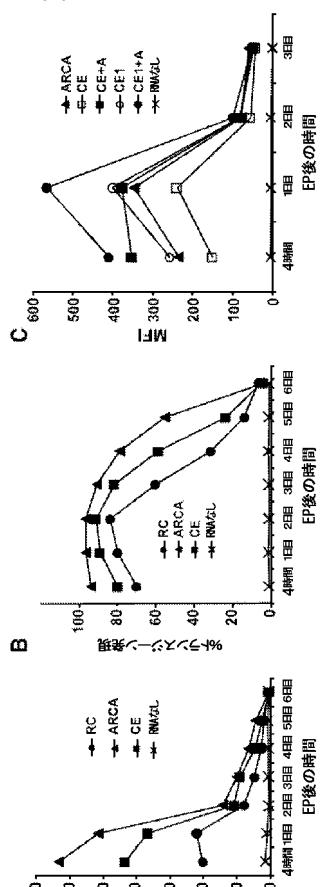
【0317】

本明細書において引用された、それぞれのおよび全ての特許、特許出願、および刊行物の開示はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。本発明は特定の態様に関して開示されたが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の他の態様およびバリエーションが当業者によって考案され得ることが明らかである。添付の特許請求の範囲は、このような全ての態様および等価なバリエーションを含むと解釈されることが意図される。

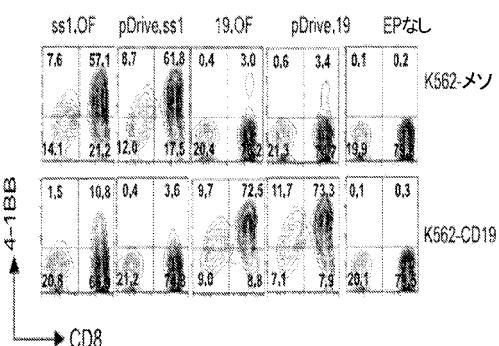
【図1】



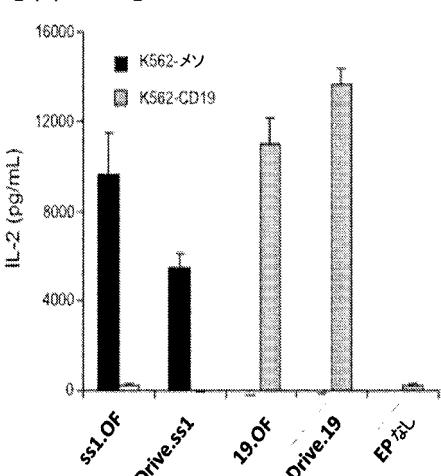
【図2】



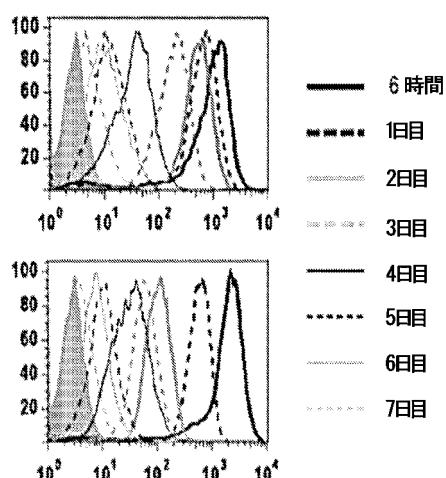
【図3 A】



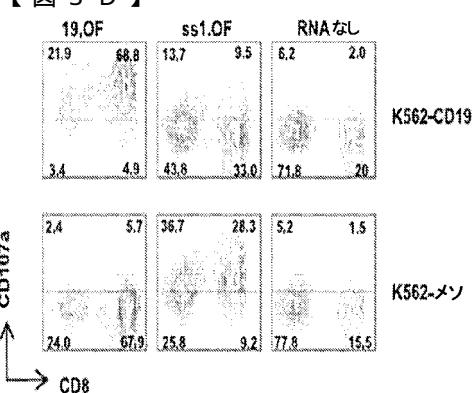
【図3 B】



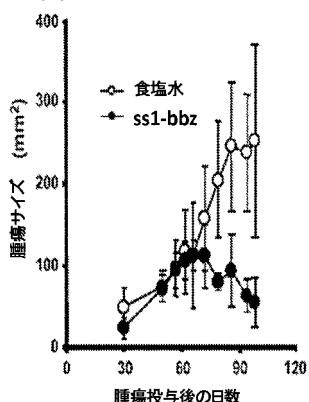
【図3 C】



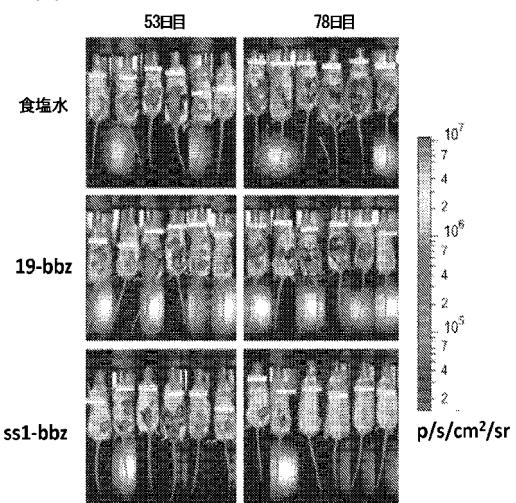
【図3 D】



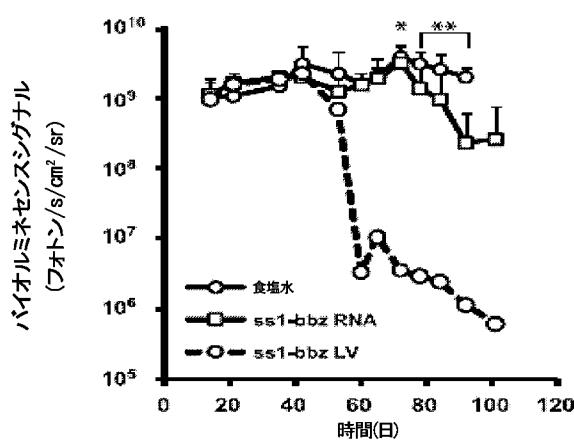
【図 4 A】



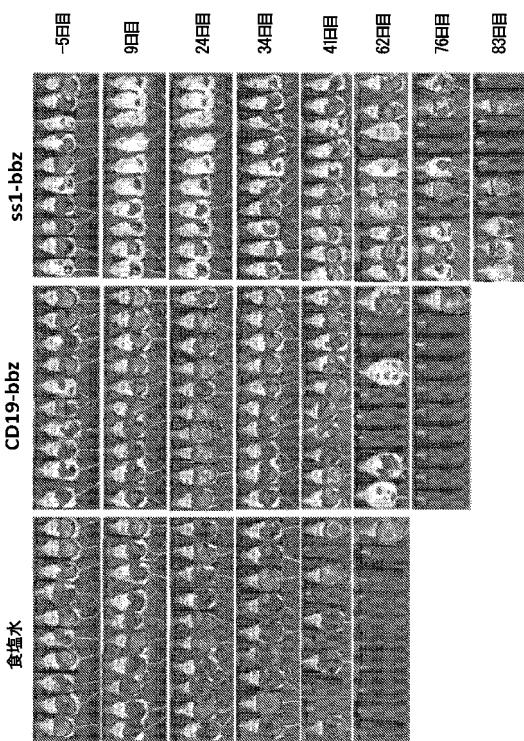
【図 4 B】



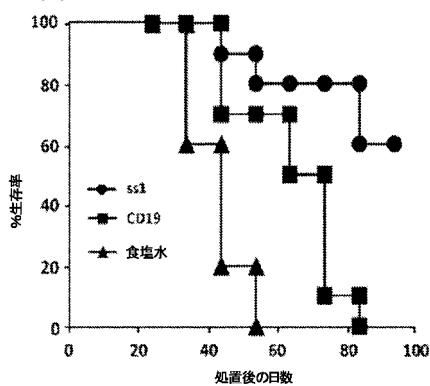
【図 4 C】



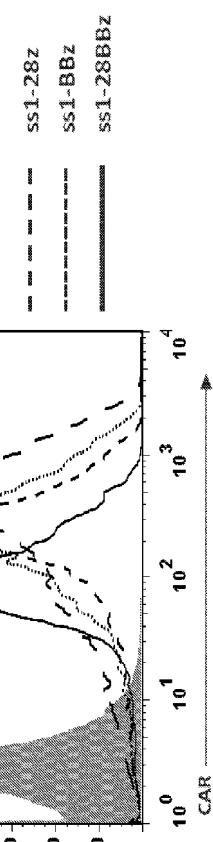
【図 5 A】



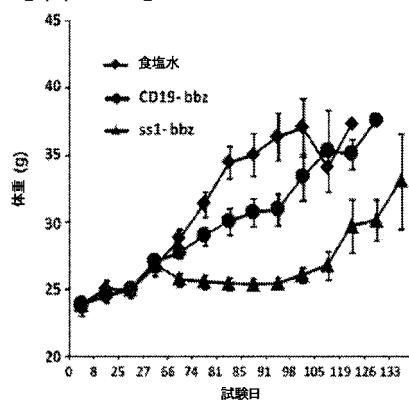
【図 5 B】



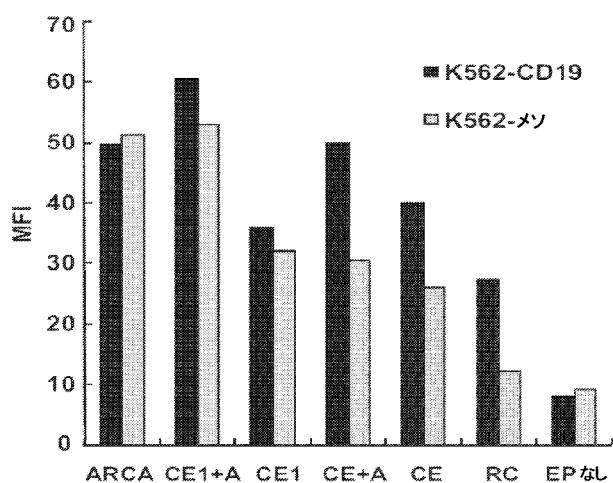
【図 6】



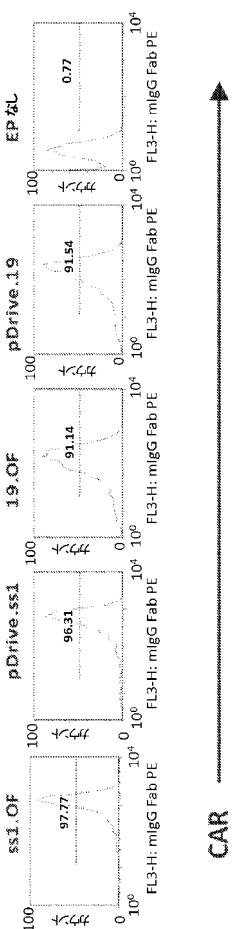
【図 5 C】



【図 7】



【図 8】



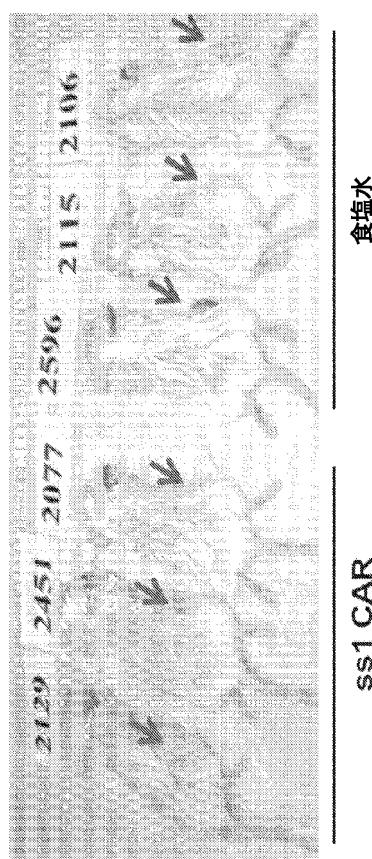
【図 9】



KCD19-CFSE

K- $\alpha\gamma$ -CMRA

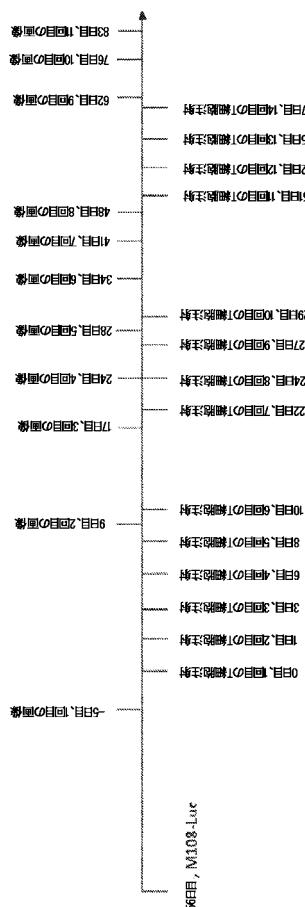
【図 10】



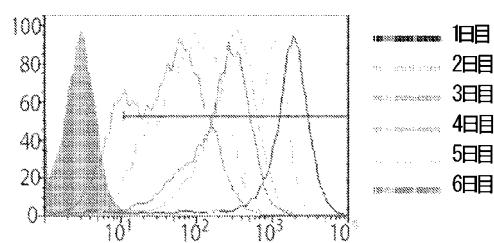
ss1 CAR

食塩

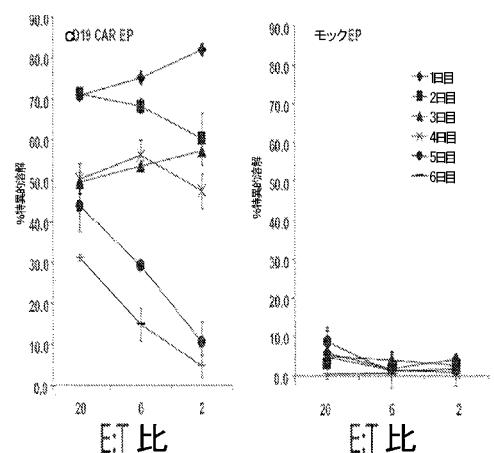
【図 11】



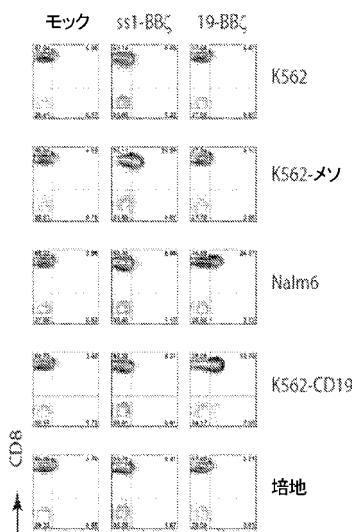
【図 12 A】



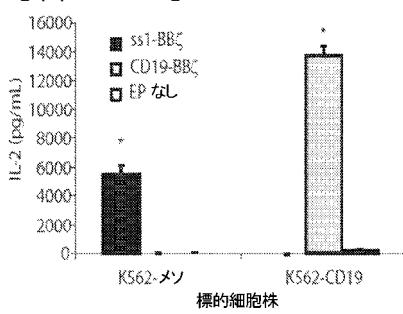
【図 12 B】



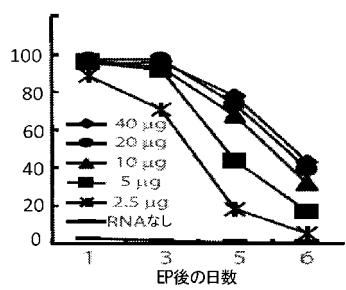
【図 1 2 C】



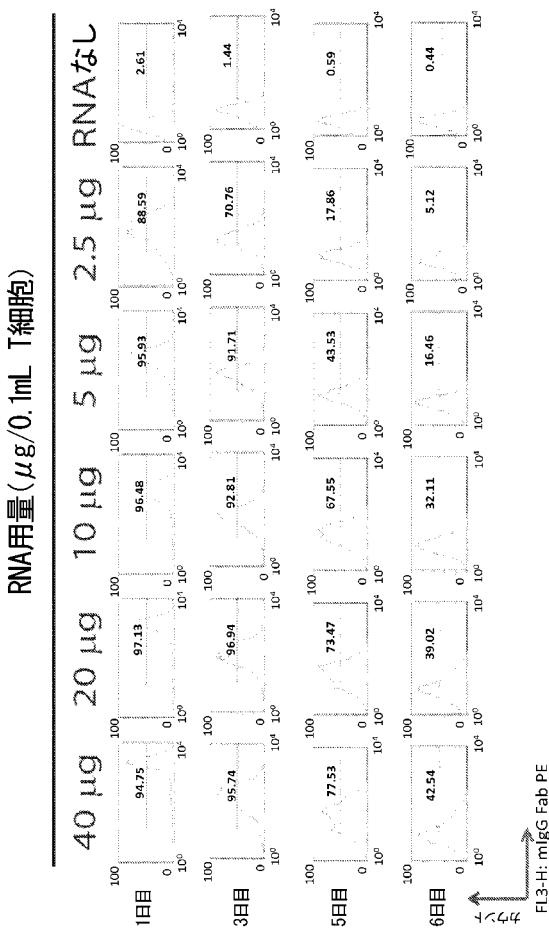
【図 1 2 D】



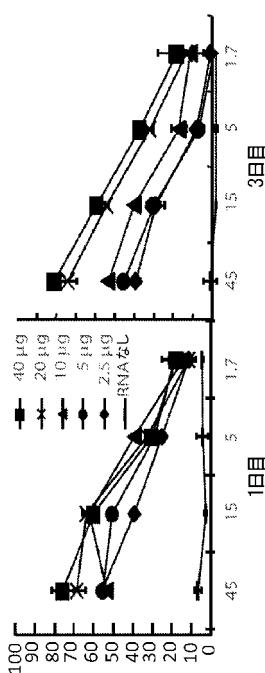
【図 1 3 B】



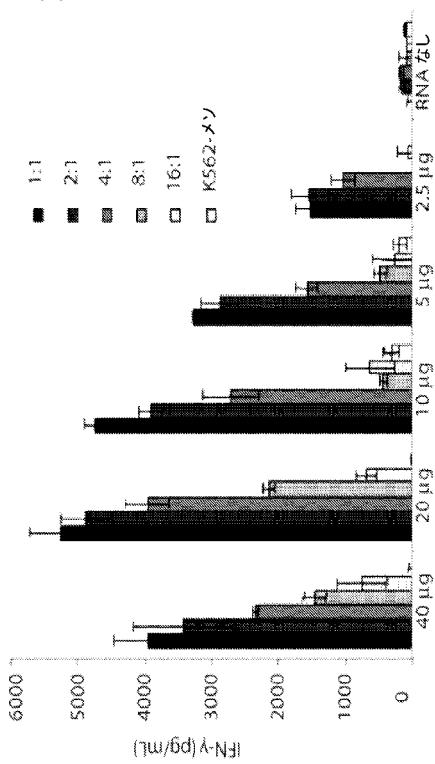
【図 1 3 A】



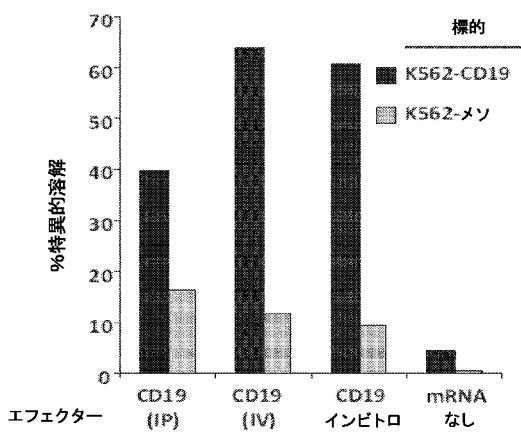
【図 1 3 C】



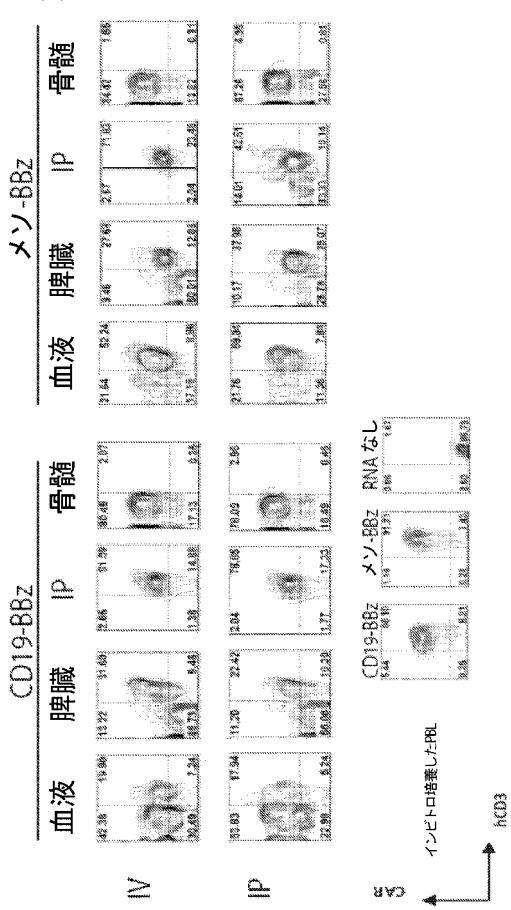
【図13D】



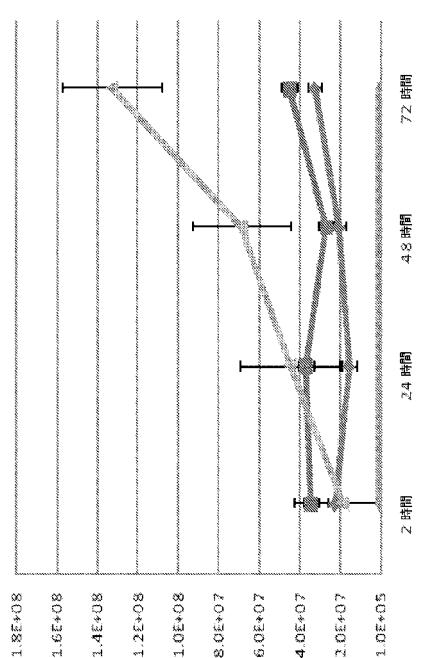
【図14B】



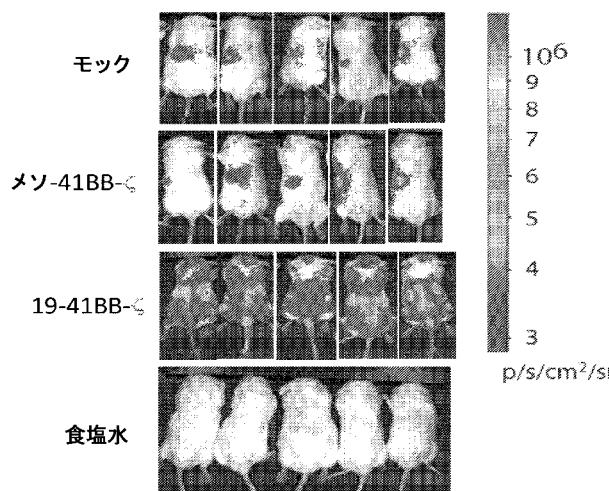
【 図 1 4 A 】



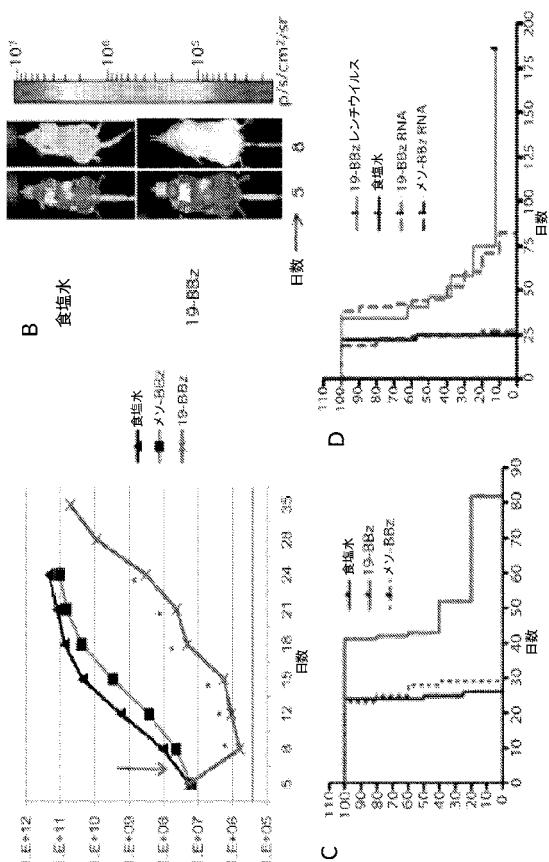
【 図 15A 】



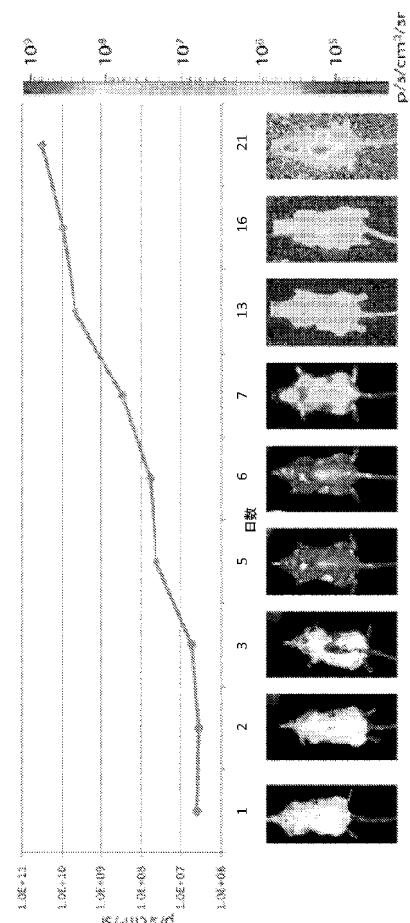
【図 15 B】



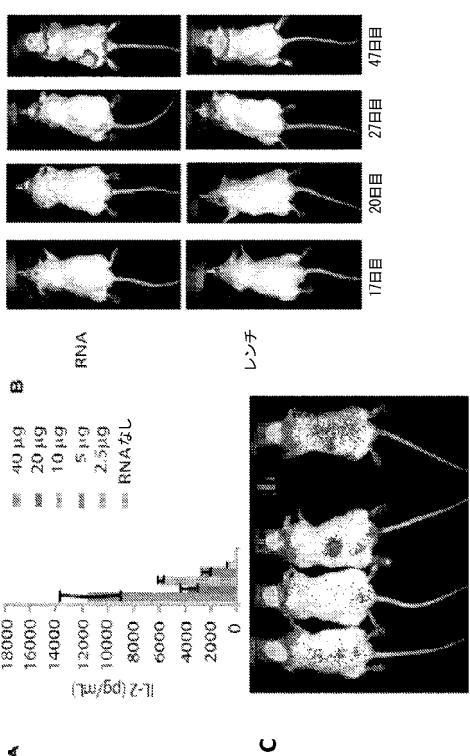
【図 16】



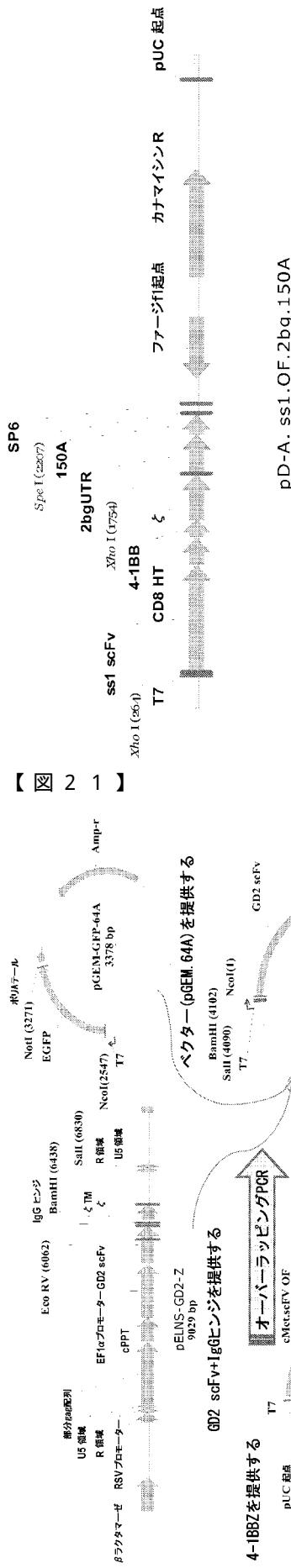
【図 17】



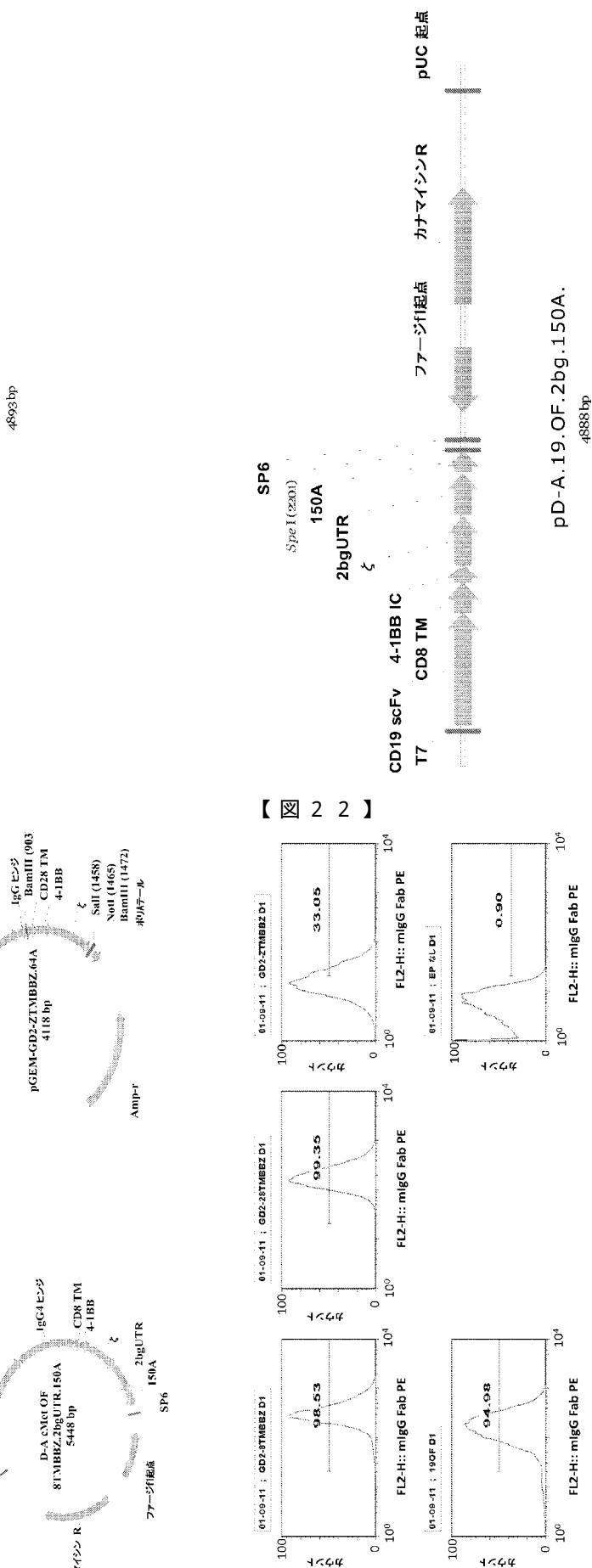
【図 18】



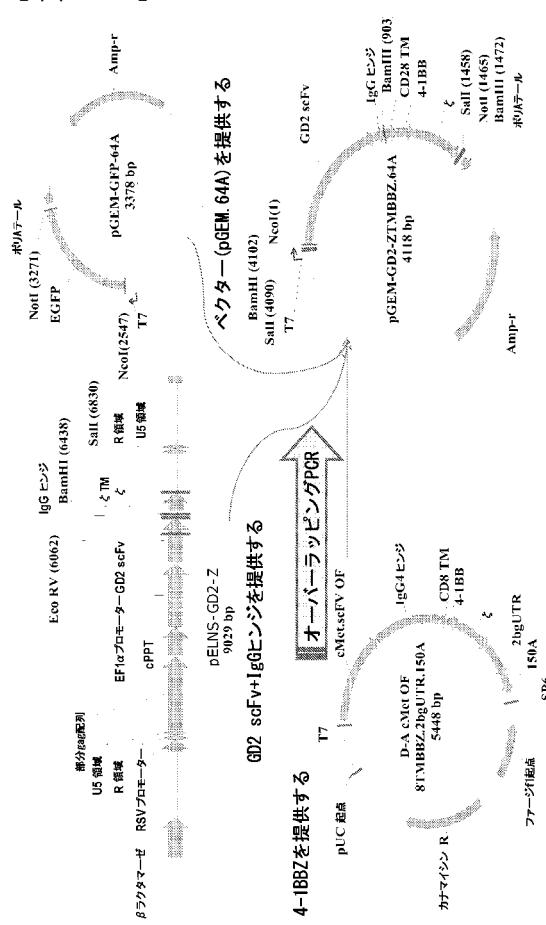
【 図 1 9 】



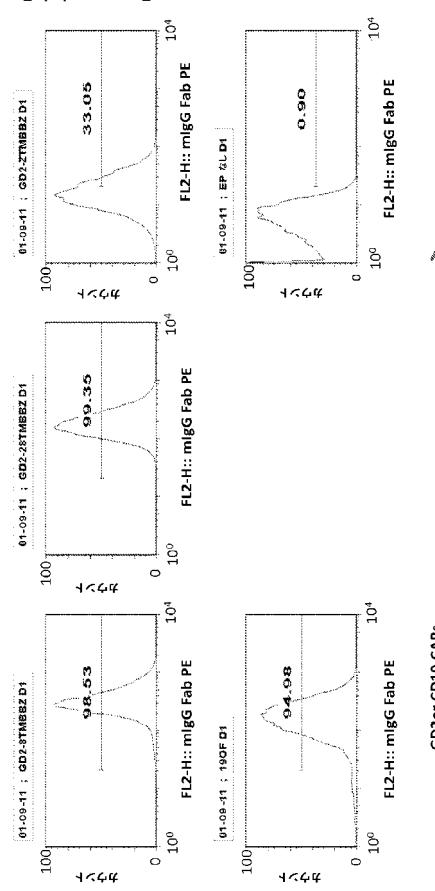
【 図 2 0 】



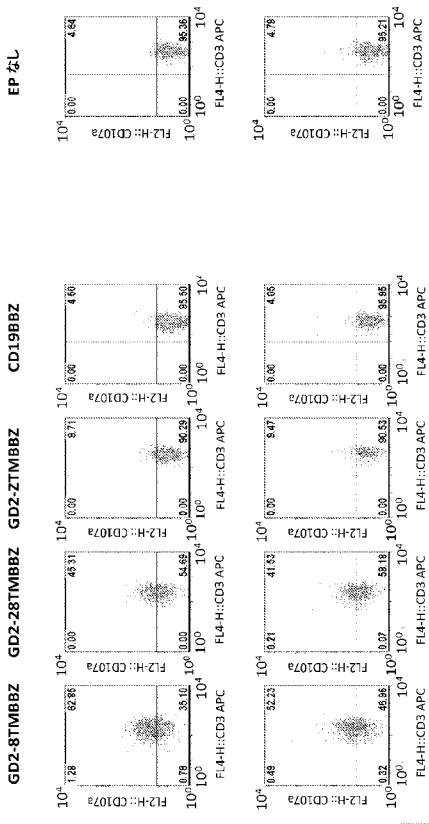
【 2 1 】



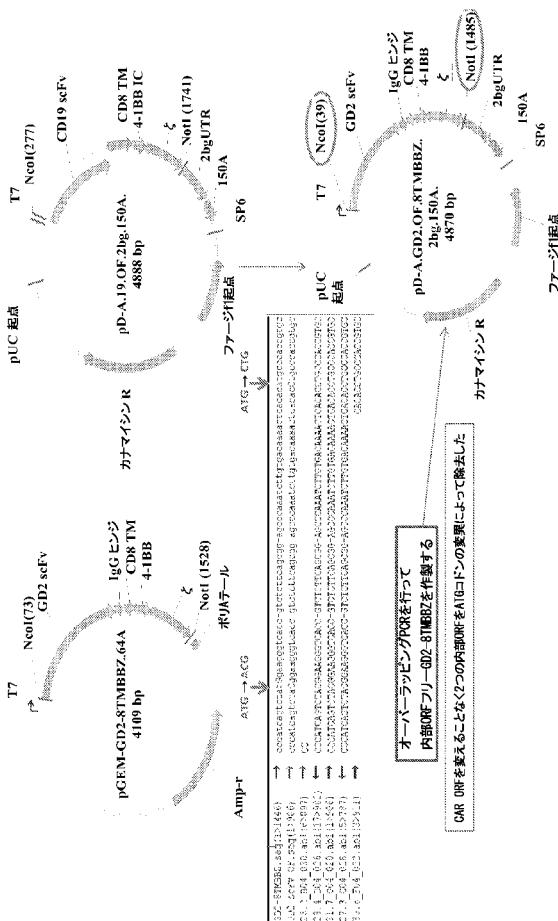
【 図 2 2 】



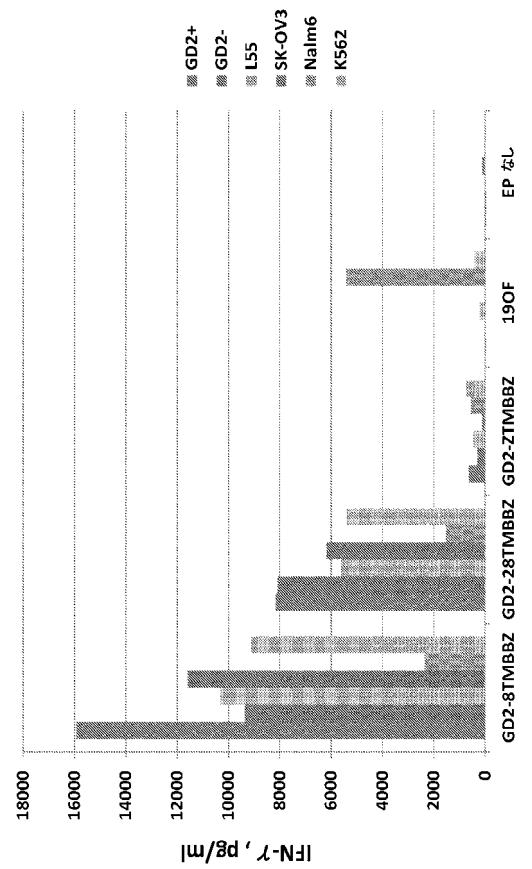
【図 2 3】



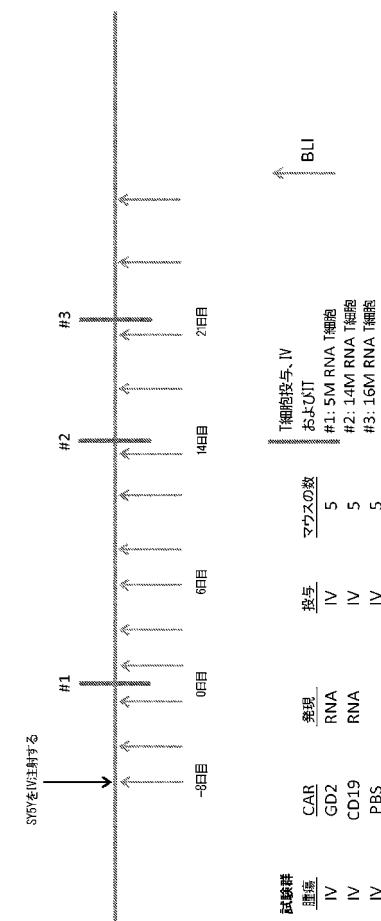
【図 2 5】



【図 2 4】



【図 2 6】



RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞

RNA CARをエレクトロポレーション処理によって導入したT細胞

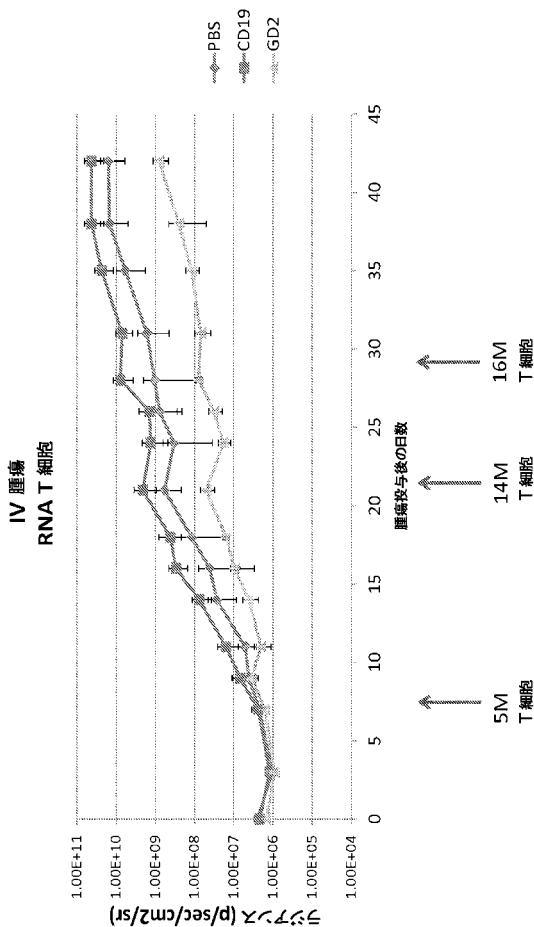
EPなし

EPなし

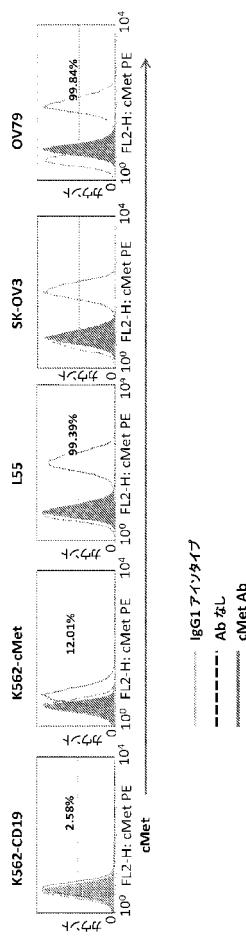
190F

190F

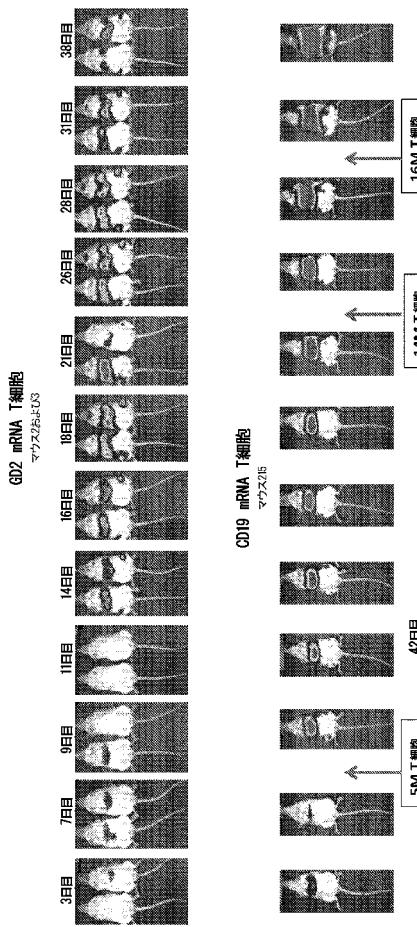
【図27】



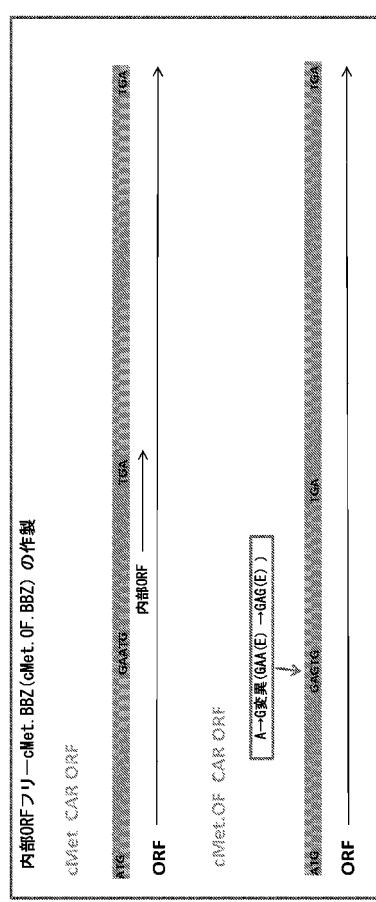
【図29】



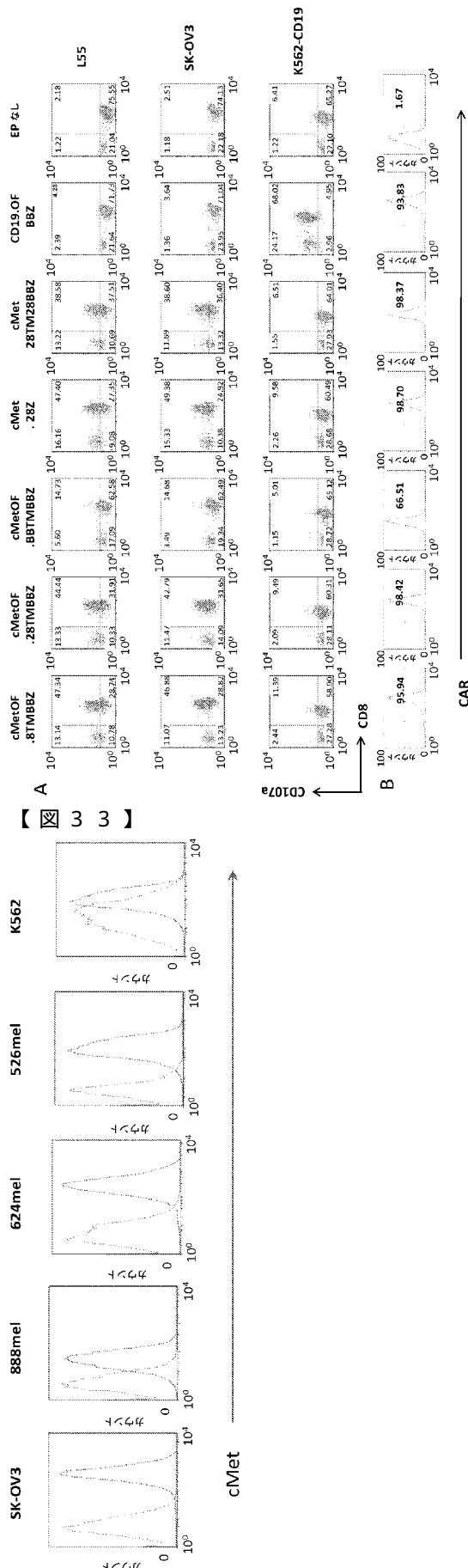
【 図 2 8 】



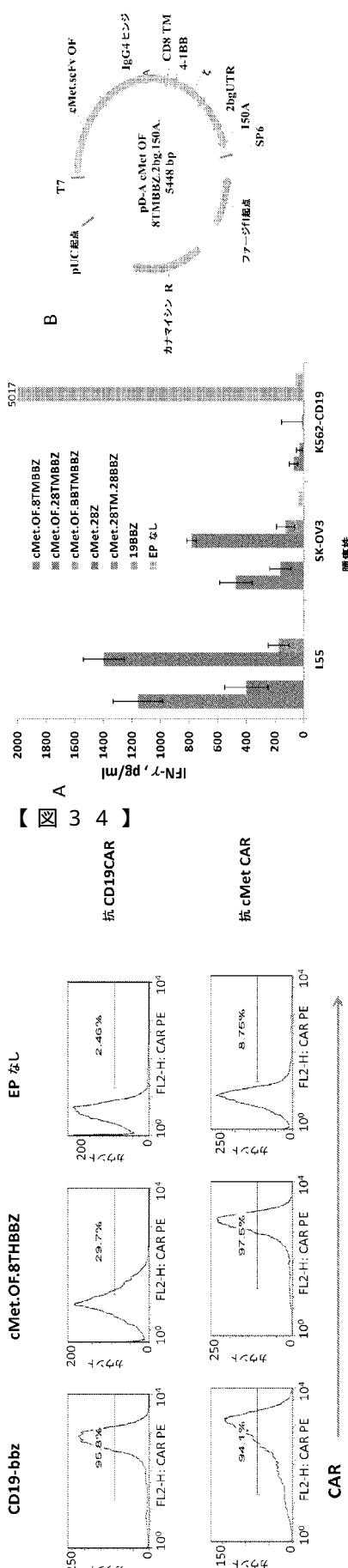
【図30】



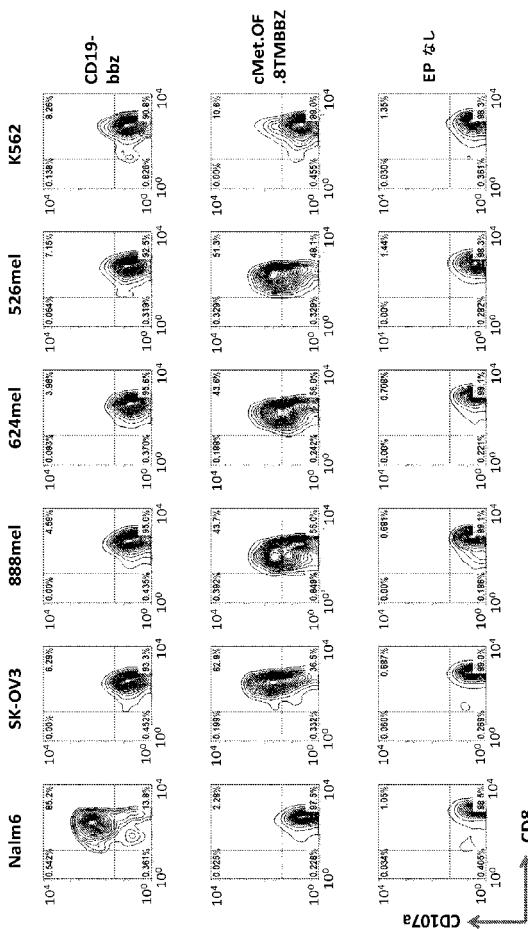
【 図 3 1 】



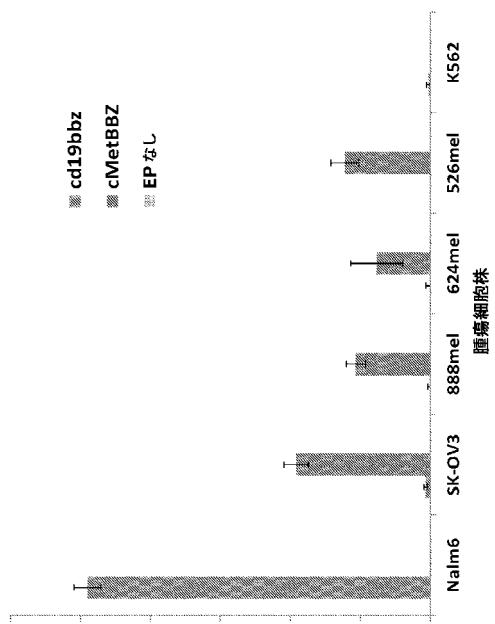
【 図 3-2 】



【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】

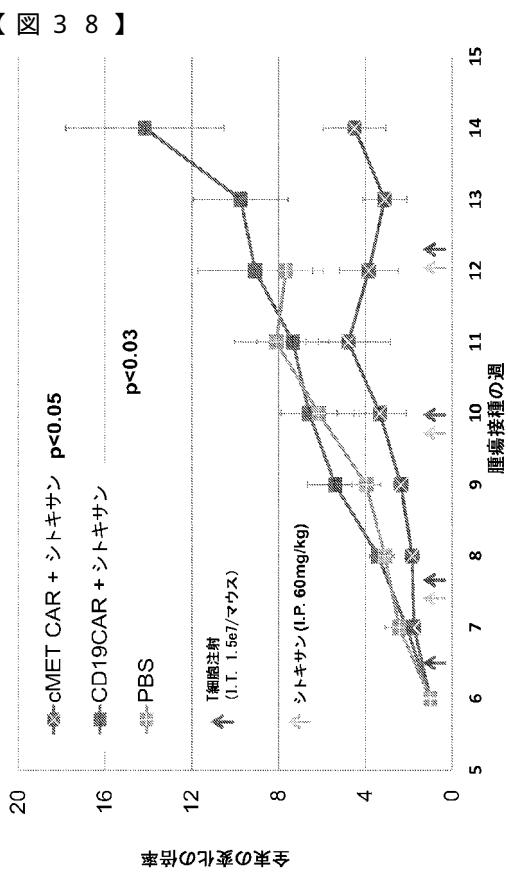
群	マウス (数)	腫瘍細胞 s.c.	処置
cMET CAR + シトキサン	9	SKOV3-Luc	cMET CAR + シトキサン
CD19CAR + シトキサン	9	SKOV3-Luc	CD19 CAR + シトキサン
PBS	7	SKOV3-Luc	PBS

実験デザイン
0日目に雌NSGマウスにおいてSKOV3-Luc腫瘍を用いて、血管化した側腹部異種移植片腫瘍を樹立する。
(n=7~9匹/群)

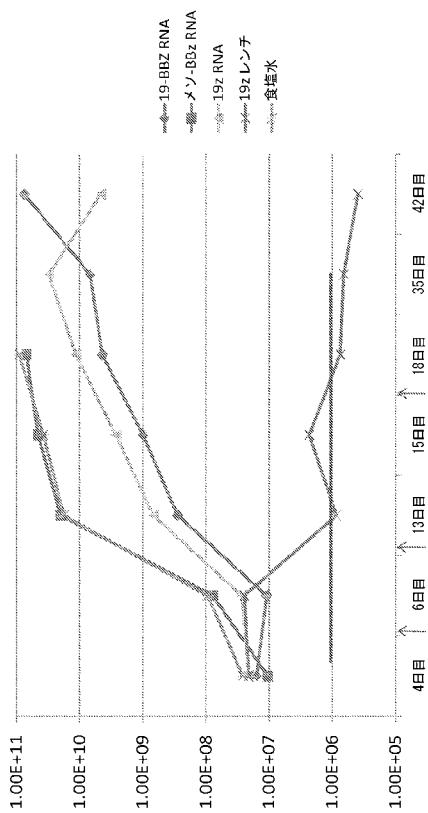
処置を6週目、7週目、9週目、および11週目から開始する: 1×10⁶/匹のCAR細胞をi.t.注射する。
7週目、9週目、および11週目の処置の24時間前にシトキサンをi.p.注射する。

エンドポイント: 生存および腫瘍負荷量(ハイオルミネセンス)

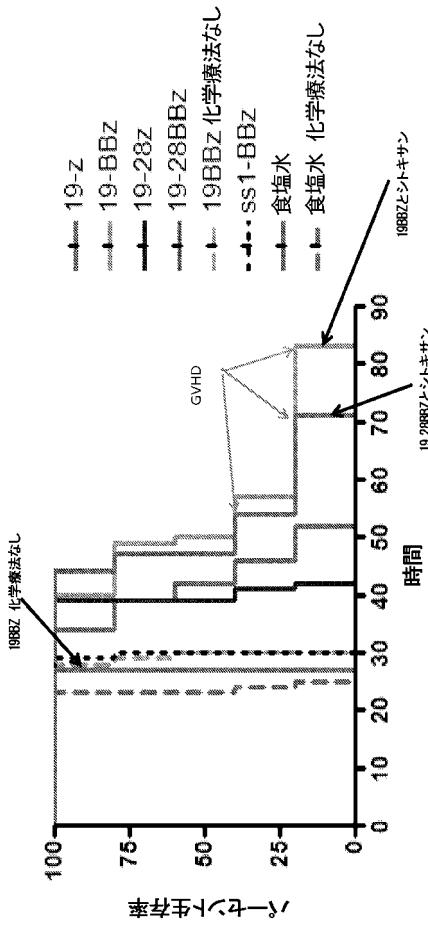
全系の群平均の規準化されたデータ



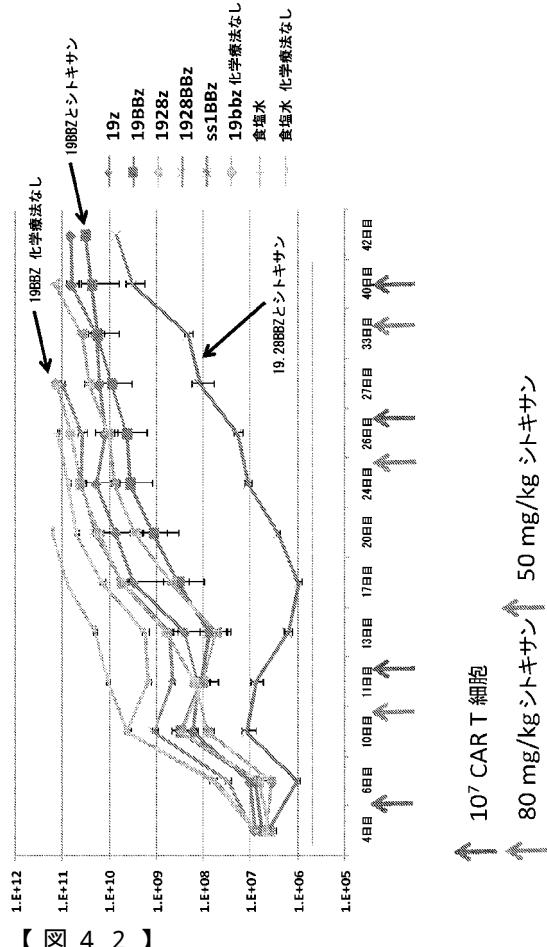
【図 39】



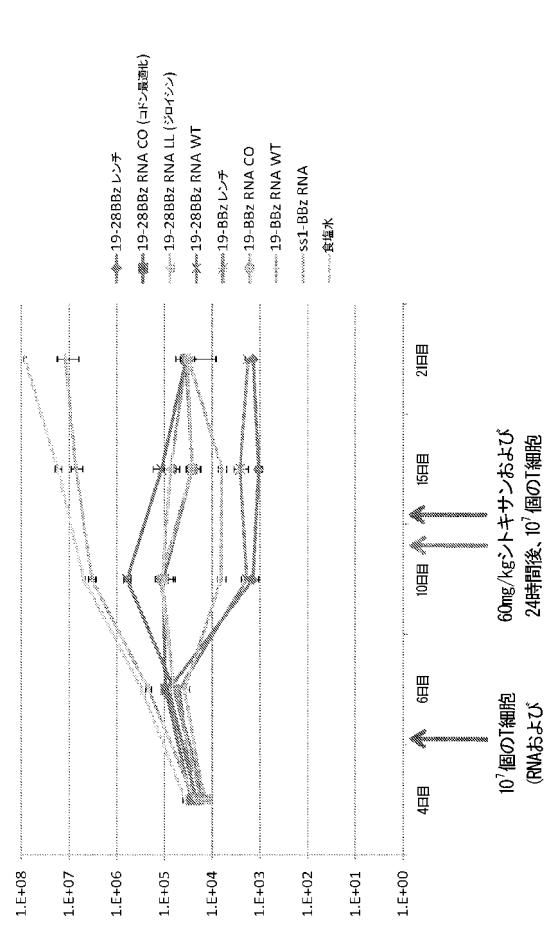
【図 41】



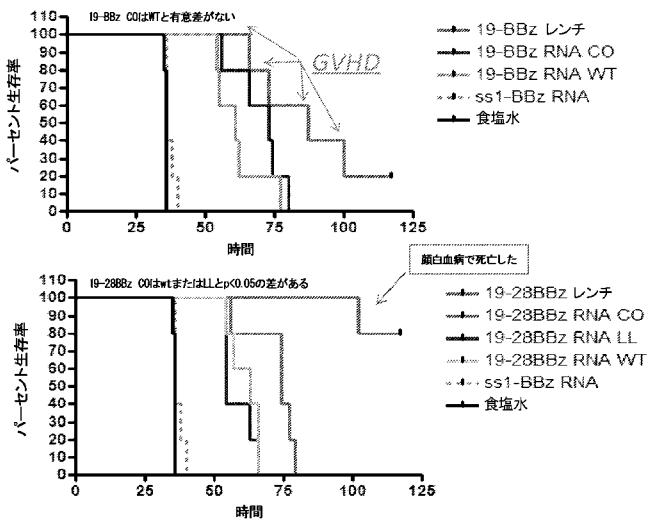
【図 40】



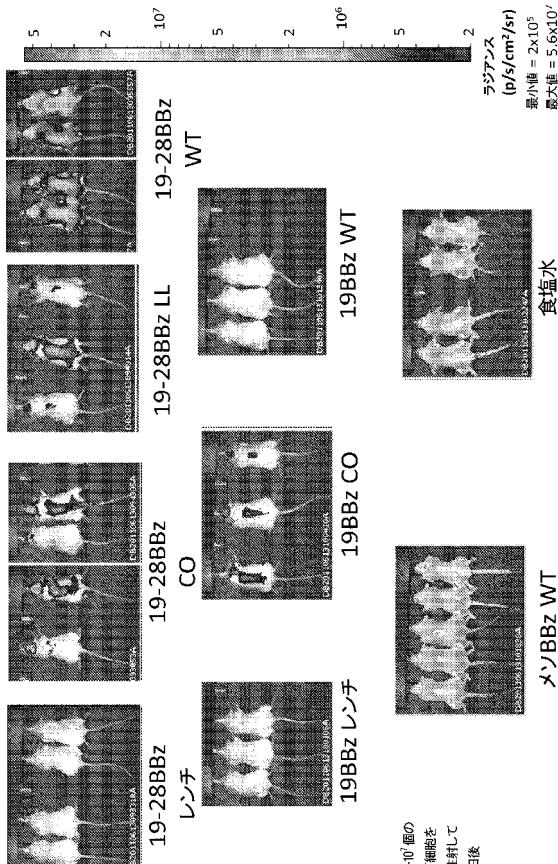
【図 42】



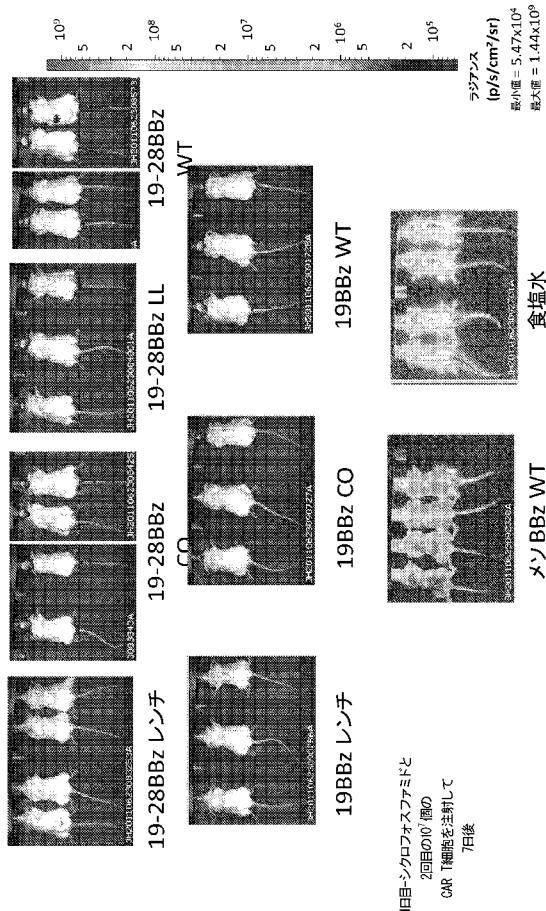
【 図 4 3 】



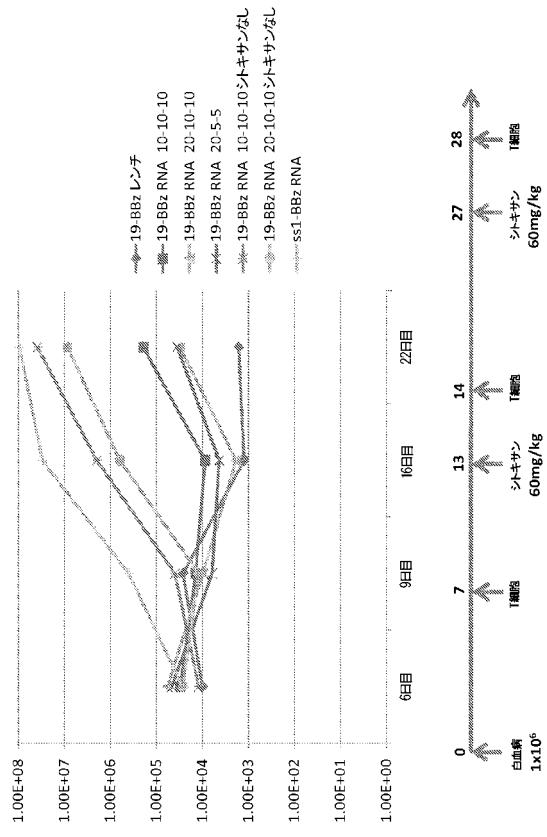
【 図 4 4 】



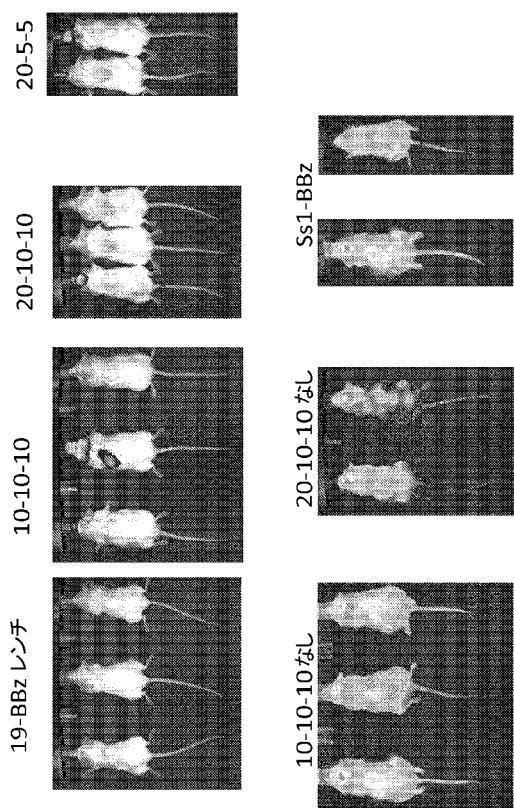
【 図 4 5 】



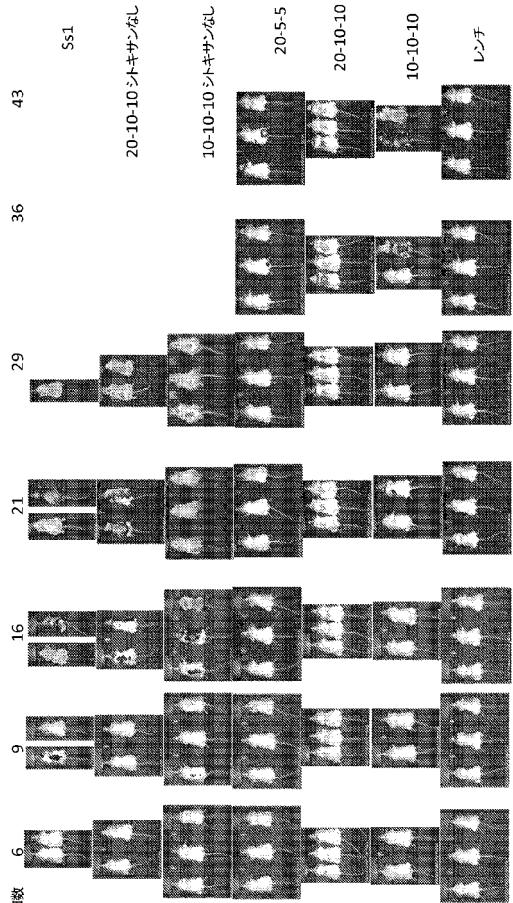
【 図 4 6 】



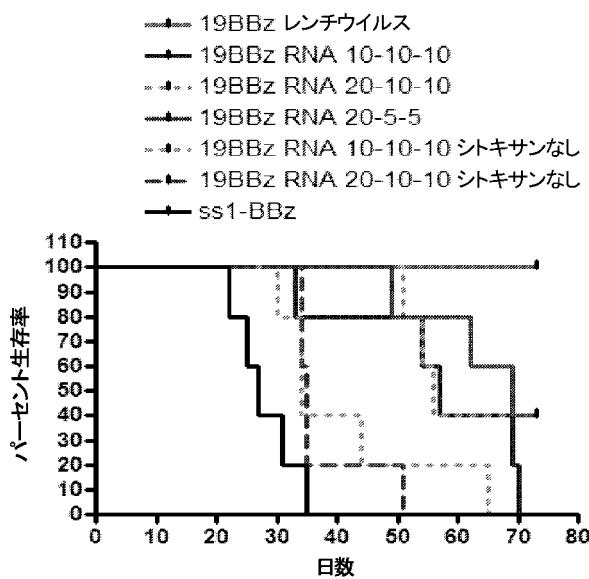
【図47】



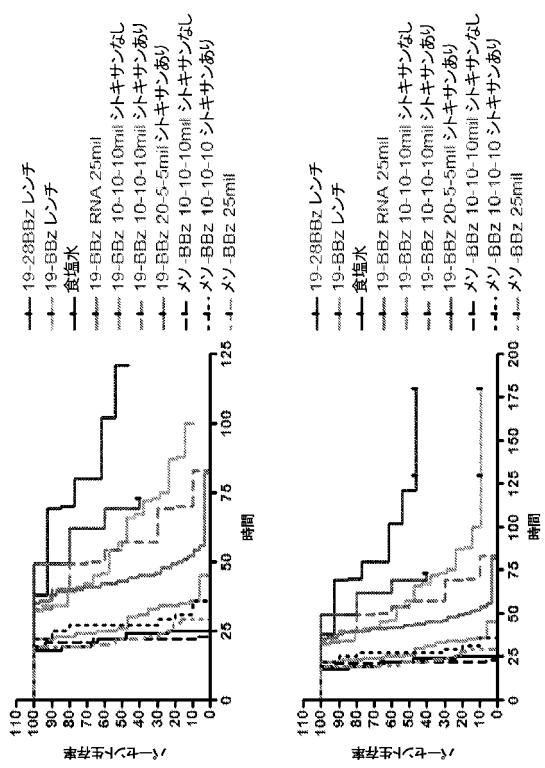
【図48】



【図49】



【図50】



【配列表】

2014533928000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/55760
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - H01L 21/00; C12P 21/00; A61K 35/12 (2013.01) USPC - 536/23.1; 435/69.1; 424/93.21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - H01L 21/00; C12P 21/00; A61K 35/12 (2013.01) USPC - 536/23.1; 435/69.1; 424/93.21		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched (keyword limited; terms below)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase; Google; PubMed Search terms: chimeric antigen receptor, CD3-zeta, extracellular, transmembrane, costimulatory, signaling domain, T cell, in vitro, transcribed, RNA, pd-a.ss1.of.bb2.bb2.150a, pd-a.19.of.2bb.150a, pd-a.gd2.of.8tmbbz.2bb.150a, pd-a.cmet.of.8tmbbz.2bbgr.150a		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- A	ZHAO et al., Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. <i>Cancer Res</i> , 15 November 2010 (15.11.2010), Vol. 70, No. 22, pages 9053-9061. Especially abstract; pg 9054, para 3, 5, 9-10; Suppl. Methods pg 2, para 1	1-4, 13-19, 28-30 5-12, 20-27
A	KORONFEL et al., Cloning vector pMAK28, complete sequence; GenBank Accession No. FJ230962; 9 December 2008 (09.12.2008); [online]. [Retrieved on 19 February 2013 (19.02.2013)]. Retrieved from the internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/fj230962 > nucleotides 158-2706	5, 7, 9, 11, 20, 22, 24, 26
A	KORONFEL et al., Cloning vector pMAK27, complete sequence; GenBank Accession No. FJ040214; 3 September 2008 (03.09.2008); [online]. [Retrieved on 19 February 2013 (19.02.2013)]. Retrieved from the internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/fj040214 > nucleotides 1733-1959	5, 7, 9, 20, 22, 24
A	US 2008/0014208 A1 (REITER et al.) 17 January 2008 (17.01.2008) nucleotides 1247-1974 of SEQ ID NO: 22	5, 6, 20, 21
A	KOCHENDERFER et al., Synthetic construct FMC63-28Z receptor protein gene, complete cds. GenBank Accession No. HM852952; 9 September 2010 (09.09.2010); [online]. [Retrieved on 19 February 2013 (19.02.2013)]. Retrieved from the internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/305690546?sat=15&satkey=10430630 > nucleotides 64-1470	7, 8, 22, 23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 19 February 2013 (19.02.2013)		Date of mailing of the international search report 18 MAR 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/55760

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/041093 A1 (ROSENBERG et al.) 7 April 2011 (07.04.2011) nucleotides 59-1641 of SEQ ID NO:16	8, 23
A	US 2011/0044953 A1 (ALLISON et al.) 24 February 2011 (24.02.2011) nucleotides 16-818 of SEQ ID NO: 7.	9, 10, 24, 25
A	WO 2009/091826 A2 (COOPER et al.) 23 July 2009 (23.07.2009) nucleotides 1-2028 of SEQ ID NO: 3	12, 27
A	CARPENITO et al., Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 3 March 2009 (03.03.2009), Vol 106, No 9, pages 3360-3365. Especially Fig. 1a.	1-30
A	HASSAN et al., Mesothelin: a new target for immunotherapy; Clin. Cancer Res, 15 June 2004 (15.06.2004), Vol 10, No 12, Pt. 1, pages 3937-3942	1-30
A	US 2005/0118185 A1 (HOMBACH et al.) 2 June 2005 (02.06.2005)	1-30
A	US 2008/0260706 A1 (RABINOVICH et al.) 23 October 2008 (23.10.2008)	1-30
A	WO 2010/025177 A1 (JENSEN) 4 March 2010 (04.03.2010)	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/55760

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- on paper
 in electronic form

b. (time)

- in the international application as filed
 together with the international application in electronic form
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/55760

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-30, directed to an in vitro transcribed RNA or synthetic RNA comprising a nucleic acid sequence encoding an extracellular domain, a transmembrane domain, a costimulatory signalling region, and a signalling domain of CD3-zeta, or a T cell comprising said in vitro transcribed or synthetic RNA.

- Please see extra sheet for continuation -

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-30

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/55760

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Groups II+: claims 31-45, directed to a method of generating a population of RNA-engineered T cells transiently expressing exogenous RNA, the method comprising introducing an in vitro transcribed RNA or synthetic RNA into a T cell, wherein the RNA comprises a nucleic acid sequence encoding an extracellular domain, a transmembrane domain, a costimulatory signaling region, and a signaling domain of CD3-zeta.

Group III: claims 46-62, directed to a method of treating a cancer patient, the method comprising administering to the patient a T cell engineered to transiently express exogenous RNA, wherein the RNA comprises a nucleic acid sequence encoding an extracellular domain, a transmembrane domain, a costimulatory signaling region, and a signaling domain of CD3-zeta.

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

The special technical features of the claims of Groups I-III are indicated in the Group descriptions, above. Group II is directed to a method, not required by the claims of Group I. Group III is directed to a method of treating a cancer patient, not required by the claims of either of Groups I or II.

The only common technical element shared by all of the above groups is that they are related to T cells comprising an RNA molecule which comprises a nucleic acid sequence encoding an extracellular domain, a transmembrane domain, a costimulatory signaling region, and a signaling domain of CD3-zeta. Groups I and II share the common technical element of being related to in vitro transcribed or synthetic RNA molecules. Groups II and III share the common technical element of being related to T cells engineered to transiently express an exogenous RNA molecule. These common technical elements do not represent an improvement over the combined prior art of US 2005/0118185 A1 to Hombach et al. (hereinafter "Hombach") and US 2008/0260706 A1 to Rabinovich et al. (hereinafter "Rabinovich"), as follows:

Hombach teaches a nucleic acid sequence encoding (para [0014], [0018]) an extracellular domain (Fig. 1 - scFv-Fc-CD28/CD28-zeta construct, scFv and hlgG1-Fc domains), a transmembrane domain (Fig. 1 - scFv-Fc-CD28/CD28-zeta construct, CD28 TM-domain), a costimulatory signaling region (Fig. 1 - scFv-Fc-CD28/CD28-zeta construct, CD28 IC-domain), and a signaling domain of CD3-zeta (Fig. 1 - scFv-Fc-CD28/CD28-zeta construct, CD3zeta IC-domain). Hombach does not specifically recite that the nucleic acid sequence is an in vitro transcribed RNA or synthetic RNA. However, Hombach does teach that the nucleic acid sequence may be expressed in cells, including T cells (para [0014]). In a related disclosure, Rabinovich teaches the use of in vitro transcribed RNA to transiently transfet cells (abstract), including T cells (para [0071]), and that the method of transfection has higher efficiency and is less time consuming than known cloning techniques, and possessed a variety of other advantages (abstract). Accordingly, it would have been obvious to provide the nucleic acid sequence of Hombach as an in vitro transcribed RNA, in order to enable more efficient transfection of the nucleic acid sequence into T cells.

Therefore, the inventions of Groups I - III lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14	Z

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

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ジューン カール エイチ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 メリオン ステーション ベアード ロード 409
(72)発明者 チャオ ヤンピン
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 チェリー ヒル ドンカスター ロード 23

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA11 GA11 HA17
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA01 CA44
4C084 AA02 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB26 ZB27
4C087 AA01 AA02 BB34 MA02 NA05 ZB26 ZB27