

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5897035号  
(P5897035)

(45) 発行日 平成28年3月30日 (2016. 3. 30)

(24) 登録日 平成28年3月11日 (2016. 3. 11)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 35/17 (2015. 01)	A 6 1 K 35/17
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 T
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)	C 1 2 N 5/0783

請求項の数 18 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2013-544725 (P2013-544725)	(73) 特許権者	511298990
(86) (22) 出願日	平成23年12月14日 (2011. 12. 14)		ユニバーシティ オブ メリーランド, ボ ルチモア
(65) 公表番号	特表2014-504294 (P2014-504294A)		アメリカ合衆国 2 1 2 0 1 - 1 6 2 7
(43) 公表日	平成26年2月20日 (2014. 2. 20)		メリーランド州 ボルチモア 4階 ウエ スト・レキシントン・ストリート 620
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/064808		110000796
(87) 国際公開番号	W02012/082841	(74) 代理人	特許業務法人三枝国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成24年6月21日 (2012. 6. 21)		ダヴィラ エドゥアルド
審査請求日	平成26年5月23日 (2014. 5. 23)	(72) 発明者	アメリカ合衆国 2 1 0 3 0 メリーラン ド州 コッキーズヴィル ペニー レン 5 2 5
(31) 優先権主張番号	61/422, 681	(72) 発明者	玉田 耕治
(32) 優先日	平成22年12月14日 (2010. 12. 14)		山口県宇部市東小串 1-1-31-304
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 汎用の抗タグキメラ抗原受容体発現T細胞及びがんを治療する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がん細胞に結合する 1 つ又は複数のタグ付き抗体の配合物と同時に又は別々に被験体に投与される、

前記タグ付き抗体に結合し、がん細胞死を誘導する 1 つ又は複数の治療的に有効な抗タグキメラ抗原受容体 (A T - C A R) 発現 T 細胞集団

を含む、抗がん剤であって、

前記 A T - C A R が、タグ結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び活性化ドメインを含み、

前記タグ結合ドメインが抗体又はその抗原結合フラグメントである、

抗がん剤。

【請求項 2】

がん細胞に結合する少なくとも 2 つのタグ付き抗体の配合物と同時に又は別々に被験体に投与される、

前記タグ付き抗体に結合し、がん細胞死を誘導する少なくとも 2 つの治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団

を含む、抗がん剤であって、

前記 A T - C A R が、タグ結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び活性化ドメインを含み、

前記タグ結合ドメインが抗体又はその抗原結合フラグメントである、

抗がん剤。

【請求項 3】

10

20

各々のタグ付き抗体の配合物のタグが同じであるか又は異なり、該タグがフルオレセインイソチオシアネート ( F I T C )、ストレプトアビジン、ビオチン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン ( P E )、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ及びマルトース結合タンパク質からなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の抗がん剤。

【請求項 4】

各々のタグ付き抗体の配合物の抗体が同じであるか又は異なり、該抗体が全長抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗がん剤。

【請求項 5】

前記全長抗体又はその抗原結合フラグメントが、セツキシマブ、ニモツズマブ、パニツムマブ、リツキシマブ、オマリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、アレムツズマブ、又はそのいずれかの抗原結合フラグメントである、請求項 4 に記載の抗がん剤。

【請求項 6】

各々の A T - C A R 発現 T 細胞集団の A T - C A R が同じであるか又は異なる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗がん剤。

【請求項 7】

前記タグ結合ドメインが F I T C、ビオチン、P E、又はストレプトアビジンに特異的に結合する、請求項 1 又は 2 に記載の抗がん剤。

【請求項 8】

前記抗原結合フラグメントが一本鎖可変フラグメント ( s c F v ) である、請求項 1 又は 2 に記載の抗がん剤。

【請求項 9】

前記抗原結合フラグメントが、F I T C、ビオチン、P E、又はストレプトアビジンに特異的に結合する一本鎖可変フラグメント ( s c F v ) である、請求項 1 又は 2 に記載の抗がん剤。

【請求項 10】

前記膜貫通ドメインがヒト C D 8 鎖のヒンジ領域及び膜貫通領域である、請求項 1 又は 2 に記載の抗がん剤。

【請求項 11】

前記活性化ドメインが C D 2 8 の細胞質領域、C D 1 3 7 ( 4 1 B B ) の細胞質領域、O X 4 0、H V E M、C D 3 及び F c R のうち 1 つ又は複数を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗がん剤。

【請求項 12】

各々の A T - C A R 発現 T 細胞集団の T 細胞が同じであるか又は異なり、該 T 細胞が、末梢血単核細胞 ( P B M C ) に由来する任意の H L A バックグラウンドの T 細胞、前記被験体の腫瘍移植片から単離された T 細胞、及び前記被験体の腫瘍内 T 細胞からなる群から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗がん剤。

【請求項 13】

各々の A T - C A R 発現 T 細胞集団の T 細胞が、H L A - A 2 + 末梢血単核細胞 ( P B M C ) からなる、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗がん剤。

【請求項 14】

前記タグ付き抗体の配合物 ( 単数又は複数 ) が、前記治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団 ( 単数又は複数 ) の投与の前に前記被験体に投与される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗がん剤。

【請求項 15】

前記タグ付き抗体の配合物 ( 単数又は複数 ) が、前記治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団 ( 単数又は複数 ) の投与の後に前記被験体に投与される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗がん剤。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

前記タグ付き抗体の配合物（単数又は複数）及び前記治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団（単数又は複数）が、任意の順序で前記被験体に投与される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗がん剤。

## 【請求項 17】

前記タグ付き抗体に結合する A T - C A R 発現 T 細胞が、細胞傷害性 T 細胞活性化を誘導する、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗がん剤。

## 【請求項 18】

前記被験体がヒトである、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗がん剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、T 細胞ベースの抗がん治療薬及び該治療薬をがんの治療に使用する方法に関する。

## 【0002】

[ 連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載 ]

本発明は、米国国立がん研究所によって授与された助成金番号 R 0 1 C A 1 4 0 9 1 7 - 0 1 及び R 0 1 H L 0 8 8 9 5 4 による政府の支援を受けてなされたものである。合衆国政府は本発明における一定の権利を有し得る。

## 【背景技術】

## 【0003】

様々なタイプのがんを認識することが可能な T 細胞を生成するための汎用であり多用途の系を作製可能であることは、T 細胞ベースの療法の使用にとって重要な臨床的意義を有する。現行の一戦略は、キメラ抗原受容体（C A R）を T 細胞上に発現させるための遺伝子工学の使用を伴う。典型的な C A R の細胞外ドメインは、モノクローナル抗体の抗原結合部位に由来する V<sub>H</sub> ドメイン及び V<sub>L</sub> ドメイン（一本鎖可変フラグメント（single-chain fragment variable）（s c F v））からなる。s c F v はフレキシブルな膜貫通ドメインに連結し、続いて例えば C D 3 に由来するようなチロシンベースの活性化モチーフに連結する（非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3）。いわゆる第二世代及び第三世代の C A R は、T 細胞の生存及び増殖を向上させる働きがある、C D 2 8 及び C D 1 3 7（4 1 B B）等の共刺激分子に由来する付加的な活性化ドメインを含む。C A R T 細胞は、がん細胞の表面上に発現される腫瘍関連抗原（T A A）を認識することによってがん細胞を見つけ出し、破壊する機会を提供する（非特許文献 1）。そのため、腫瘍細胞の認識は M H C 非依存性機構によって行われる。様々な前臨床試験及び初期臨床試験から、固形腫瘍及び造血器悪性腫瘍を有するがん患者を治療するための C A R T 細胞の有効性が浮かび上がる（非特許文献 4、非特許文献 5、非特許文献 6、非特許文献 7、非特許文献 8）。

## 【0004】

C A R T 細胞ががん患者の治療において有し得る有望性にもかかわらず、C A R T 細胞の一般的臨床応用には幾つかの制限がある。第一に、単一の腫瘍抗原が全てのがんタイプによって普遍的に発現されるわけではないため、C A R 内の s c F v は標的とする腫瘍抗原毎に構築する必要がある。第二に、様々な腫瘍抗原に対する s c F v の同定及び操作に伴う金銭のコスト及び労働集約的作業は大きな課題をもたらす。第三に、C A R の標的とされる腫瘍抗原は治療に応じて下方制御又は突然変異し、腫瘍回避（tumor evasion）を引き起こす場合がある。現行の C A R T 細胞は 1 つの標的抗原しか認識しないため、腫瘍におけるかかる変化は治療効果を打ち消すこととなる。したがって、多数の腫瘍抗原を認識することが可能な C A R T 細胞の生成が非常に望ましい。最後に、C A R T 細胞は非腫瘍細胞で弱く発現される標的抗原と反応し、重大な有害作用を引き起こす可能性がある（非特許文献 6）。かかる「標的に対するが、腫瘍外の（on-target off-tumor）」反応を回避するために、腫瘍抗原に対してより高い特異性を有する s c F v の使用が

10

20

30

40

50

必要となる。また、進行中の研究がC A R T細胞をi n v i v oで遮断する方法を創出することに焦点を合わせているが、この系は未だ開発されておらず、付加的な固有の課題をもたらし得る。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Sadelain et al. Curr. Opin. Immunol. 21, 215-223 (2009)

【非特許文献2】Gross et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10024-10028 (1989)

【非特許文献3】Ertl et al. Cancer Res. 71, 3175-3181 (2011)

【非特許文献4】Kershaw et al. Clin. Cancer Res. 12, 6106-6115 (2006)

【非特許文献5】Lamers et al. J. Clin. Oncol. 24, e20-e22 (2006)

【非特許文献6】Morgan et al. Mol. Ther. 18, 843-851 (2010)

【非特許文献7】Pule et al. Nat. Med. 14, 1264-1270 (2008)

【非特許文献8】Till et al. Blood 112, 2261-2271 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、有効なi n v i v o治療手段への既存のC A R T細胞系の発展を妨げている障害に対処し克服する、この系の変更が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、現行の系の欠陥に完全に対処する、汎用であり適応性のある抗タグキメラ抗原受容体(A T - C A R)発現T細胞系を提供する。この系は、様々ながんタイプを認識することが可能であり、T細胞ベースの療法の使用にとって広範かつ有益な臨床的意義を有する免疫細胞を生成するために遺伝子療法プラットフォームを用いる。本明細書中で開示されるように、抗体等のタグ付きタンパク質を認識し、それと結合する特異性をT細胞に与える多用途のA T - C A R系を開発した。

【0008】

例えば、本明細書中に更に記載するように、様々なヒトがん細胞を、これらの細胞にがん反応性F I T C標識抗体が結合している場合に特異的に認識するF I T C - C A R発現ヒトT細胞を開発した。F I T C - C A R発現T細胞の活性化は、効率的な標的溶解、T細胞増殖及びサイトカイン/ケモカイン産生をi n v i t r o及びe x v i v oで誘導することが示されている。i n v i v oでは、F I T C - C A R発現T細胞 + F I T C - セツキシマブ(C t x)は、結腸がん腫瘍の確立を遅らせるが、腫瘍関連抗原(T A A)陰性がん細胞の選択を引き起こす。一様なT A A発現を有する膵臓腫瘍モデルを用いて、F I T C - C A R発現T細胞が確立された腫瘍を根絶し、腫瘍の成長を抑えることが観察されている。この「汎用の(off-the-shelf)」系は、がん患者の治療において様々なタグ付きタンパク質を標的とするその可能性から既存のC A R技術を進展させたものである。

【0009】

或る特定の実施の形態では、本発明は、被験体内のがんを治療する方法であって、(a)治療を必要とする被験体に、被験体内のがん細胞に結合するタグ付きタンパク質の配合物を投与することと、(b)被験体に、タグ付きタンパク質に結合し、がん細胞死を誘導する治療的に有効な抗タグキメラ抗原受容体(A T - C A R)発現T細胞集団を投与し、それにより被験体内のがんを治療することと、を含む、方法に関する。

【0010】

関係する実施の形態では、本発明は、被験体内のがんを治療する方法であって、(a)治療を必要とする被験体に、被験体内のがん細胞に結合する1つ又は複数のタグ付きタンパク質の配合物を投与することと、(b)被験体に、タグ付きタンパク質に結合し、がん細胞死を誘導する1つ又は複数の治療的に有効なA T - C A R発現T細胞集団を投与し、

10

20

30

40

50

それにより被験体内のがんを治療することと、を含む、方法に関する。

【 0 0 1 1 】

更に関係する実施の形態では、本発明は、被験体内のがんを治療する方法であって、( a ) 治療を必要とする被験体に、被験体内のがん細胞に結合する少なくとも2つのタグ付きタンパク質の配合物を投与することと、( b ) 被験体に、タグ付きタンパク質に結合し、がん細胞死を誘導する少なくとも2つの治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団を投与し、それにより被験体内のがんを治療することとを含む、方法に関する。

【 0 0 1 2 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、各々のタグ付きタンパク質の配合物のタグは同じであるか又は異なり、タグはフルオレセインイソチオシアネート ( F I T C )、ストレプトアビジン、ビオチン、ヒスチジン、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、フィコエリトリン ( P E )、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ及びマルトース結合タンパク質からなる群から選択される。

10

【 0 0 1 3 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、各々のタグ付きタンパク質の配合物のタンパク質は同じであるか又は異なり、タンパク質は抗体又はその抗原結合フラグメントである。好ましい態様では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、セツキシマブ、ニモツズマブ、パニツムマブ、リツキシマブ、オマリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、又はそのいずれかの抗原結合フラグメントである。

20

【 0 0 1 4 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、各々の A T - C A R 発現 T 細胞集団の A T - C A R は同じであるか又は異なり、A T - C A R はタグ結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び活性化ドメインを含む。好ましい態様では、タグ結合ドメインは抗体又はその抗原結合フラグメントである。好ましい態様では、タグ結合ドメインは F I T C、ビオチン、P E、ヒスチジン又はストレプトアビジンに特異的に結合する。タグ結合ドメインが抗原結合フラグメントである好ましい態様では、抗原結合フラグメントは一本鎖可変フラグメント ( s c F v )、例えば F I T C、ビオチン、P E、ヒスチジン又はストレプトアビジンに特異的に結合する s c F v である。好ましい態様では、膜貫通ドメインはヒト C D 8 鎖のヒンジ領域及び膜貫通領域である。好ましい態様では、活性化ドメインは C D 2 8 の細胞質領域、C D 1 3 7 ( 4 1 B B ) の細胞質領域、O X 4 0、H V E M、C D 3 及び F c R のうち1つ又は複数を含む。

30

【 0 0 1 5 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、各々の A T - C A R 発現 T 細胞集団の T 細胞は同じであるか又は異なり、T 細胞は、末梢血単核細胞 ( P B M C ) に由来する任意の H L A バックグラウンドの T 細胞、被験体の腫瘍移植片から単離された T 細胞、及び被験体の腫瘍内 T 細胞からなる群から選択される。

【 0 0 1 6 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、各々の A T - C A R 発現 T 細胞集団の T 細胞は、H L A - A 2 + 末梢血単核細胞 ( P B M C ) からなる。

40

【 0 0 1 7 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、タグ付きタンパク質の配合物 ( 単数又は複数 ) を、治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団 ( 単数又は複数 ) の投与の前に被験体に投与する。

【 0 0 1 8 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、タグ付きタンパク質の配合物 ( 単数又は複数 ) を、治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団 ( 単数又は複数 ) の投与と同時に被験体に投与する。

【 0 0 1 9 】

50

本発明の実施の形態の特定の態様では、タグ付きタンパク質の配合物（単数又は複数）を、治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団（単数又は複数）の投与の後に被験体に投与する。

【 0 0 2 0 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、タグ付きタンパク質の配合物（単数又は複数）及び治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団（単数又は複数）を、任意の順序で被験体に投与する。

【 0 0 2 1 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、タグ付きタンパク質に結合する A T - C A R 発現 T 細胞は細胞傷害性 T 細胞活性化を誘導する。

10

【 0 0 2 2 】

本発明の実施の形態の特定の態様では、被験体はヒトである。

【 0 0 2 3 】

以下の発明を実施するための形態をよりよく理解することができるように、上記に幾らか広範に本発明の特徴及び技術的利点を概説した。本発明の特許請求の範囲の対象となる本発明の付加的な特徴及び利点を本明細書中で記載する。当業者であれば、本明細書中で開示される任意の概念及び具体的な実施形態を、本発明の同じ目的を遂行するために、他の配合物の変更又は設計の基礎として容易に利用することができることを理解するであろう。かかる均等な配合物が、添付の特許請求の範囲に記載される本発明の趣旨及び範囲を逸脱するものではないことも当業者には認識されるであろう。その構成及び操作方法の両方について本発明の特徴であると考えられる新規の特徴は、更なる目的及び利点とともに、添付の図面と関連して検討することによって以下の記載からよりよく理解される。しかしながら、任意の記載、図面、実施例等は例示及び説明のみを目的として提示され、本発明を限定することを決して意図するものではないことが明白に理解されよう。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 4 】

【図 1】抗 F I T C - C A R の発現、特性化及び *i n v i t r o* 機能性を示す図である。（ A ）抗 F I T C - C A R （ F I T C - C A R ）の図。左側の箱図は、 F I T C - C A R を発現するように操作されたポリヌクレオチドに含まれる遺伝要素を示し、5' 長末端反復から始まり、抗 F I T C s c F v 、 C D 2 8 膜貫通ドメイン、C D 2 8 、4 1 B B 、ゼータ鎖（ ）のコード領域及び3' 長末端反復が続く。右側の図は、T 細胞膜を横断する F I T C - C A R ポリペプチド、及び F I T C で標識された腫瘍反応性抗体の結合位置を示す。（ B ） H L A - A 2 + P B M C を、抗 C D 3 抗体を用いて I L - 2 の存在下で活性化し、続いて F I T C - C A R レトロウイルスを用いた形質導入を行った。

30

F I T C - C A R 発現を、細胞を C D 3 及び F I T C 結合セツキシマブ（ F I T C - C t x ）又は F I T C 結合デキストランビーズ（ F I T C - D e x ）で染色することによって決定した。セツキシマブは、E G F R 発現腫瘍細胞に対して結合特異性を有する抗体である。（ C ）形質導入 T 細胞及び対照 T 細胞についての F I T C - C A R 機能性を、プレートに結合した F I T C - C t x 、 F I T C - D e x 又は C t x を用いる増殖アッセイにおいて検証した。（ D ） F I T C - C A R T 細胞及び対照 T 細胞の増殖を、漸増濃度の F I T C - C t x で染色した S W 4 8 0 結腸がん細胞による刺激に応じて測定した。（ E ） F I T C - C A R 及び対照 T 細胞による T 細胞細胞毒性を、 F I T C - C t x 又は F I T C - マウス I g G で染色した S W 4 8 0 結腸がん細胞に対して測定した。（ F ） F I T C - C A R の細胞毒性を、非標識 C t x 及び H e r 2 抗体で染色した、又は F I T C - C t x 若しくは F I T C - H e r 2 で染色した P a n c 6 . 0 3 に対して様々なエフェクター対標的比で測定した。代替的に、A U 5 6 5 乳がん細胞を F I T C - H e r 2 又は非標識 H e r 2 m A b で染色した。全てのデータは、各々が同一の傾向を生じる 3 回以上の独立実験を代表するものである。

40

【図 2】 F I T C - C A R T 細胞が腫瘍の確立を遅らせるが、抗原陰性腫瘍細胞の成長を促進することを示す図である。（ A ） S W 4 8 0 ヒト結腸がん細胞を N S G マウスに

50

皮下注射し、続いて翌日にF I T C - C t xを注射 ( i . p . ) した。24時間後、 $5 \times 10^6$  個の F I T C - C A R T細胞を尾静脈に注射した。F I T C - C t xを3週間にわたって毎週注射 ( i . p . ) した。データは2回又は3回の実験を代表するものである (1つの群当たりマウス3匹以上)。\*、 $P = 0.02$ 、ANOVA; n.s. 有意差なし。(B) C D 3 + F I T C - C A R 陽性T細胞及び陰性T細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって決定した。注射前又は4匹のマウスの腫瘍移植片に由来する F I T C - C A R + T細胞の平均パーセンテージを示す。(C) 腫瘍移植片を細かく刻み、37℃で2時間、トリプシン中で培養し、続いて陰性選択キットを用いてT細胞濃縮を行った。T細胞を、F I T C - C t x又はC t x ( $0.5 \mu\text{g} / 1 \times 10^6$  細胞) をパルスしたS W 4 8 0 結腸がん細胞と共培養した。3日後に、増殖を [ $^3\text{H}$ ] チミジン取り込み ( $\pm \text{SD}$ ) によって決定した。(D) 代替的に、サイトカイン及びケモカインの産生を、刺激の72時間後にM i l l i p l e x アレイを用いて測定した。(E) 組織培養物から採取したS W 4 8 0 腫瘍移植片又はS W 4 8 0 細胞でのE G F R発現を、F I T C - C t xを用いたフローサイトメトリーによって検証した。

【図3】 F I T C - C A R T細胞が腫瘍の成長を抑え、確立された腫瘍を根絶することを示す図である。(A) ヒト膵臓がん細胞 (P a n c 6 . 0 3) でのE G F R発現を、細胞をF I T C - C t x又は対照抗体F I T C - m I g Gで染色することによって決定し、フローサイトメトリーによって分析した。(B) 予防的腫瘍モデルでは、P a n c 6 . 0 3細胞をN S Gマウス ( $n = 5$ ) に皮下注射し、続いて翌日にF I T C - C t xを注射 ( i . p . ) した。24時間後、 $5 \times 10^6$  個の F I T C - C A R T細胞を尾静脈に注射した。 $25 \mu\text{g}$  のF I T C - C t x又はC t xを3週間にわたって毎週注射 ( i . p . ) した。腫瘍の成長及びマウスの生存を示す。(C) 治療的モデルでは、P a n c 6 . 0 3腫瘍を $3 \text{mm}^2 \sim 10 \text{mm}^2$  のサイズまで成長させた後、 $25 \mu\text{g}$  のF I T C - C t x又はC t xを3週間にわたって毎週注射 ( i . p . ) した。F I T C - C t xの最初の注射の翌日に、マウスに $5 \times 10^6$  個の F I T C - C A R T細胞を尾静脈注射によって投与した。\*、 $P = 0.02$ 、ANOVA; n.s. 有意差なし。

【発明を実施するための形態】

【0025】

#### I. 定義

特に指定のない限り、技術用語は従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は例えば、Benjamin Lewin, Genes VII, Oxford University Press刊行、2000 ( I S B N 0 1 9 8 7 9 2 7 6 X )、Kendrew et al. (編); The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Publishers刊行、1994 ( I S B N 0 6 3 2 0 2 1 8 2 9 )、及びRobert A. Meyers (編), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, Wiley, John & Sons, Inc. 刊行、1995 ( I S B N 0 4 7 1 1 8 6 3 4 1 )、並びに他の同様の技術的参考文献に見ることができる。

【0026】

本明細書中で使用される場合、「a」又は「an」は1つ又は複数を意味する場合がある。本明細書中で使用される場合、「a」又は「an」という単語は、「を含む (comprising)」という単語とともに使用される場合に1つ又は2つ以上を意味する場合がある。本明細書中で使用される場合、「別の」は少なくとも2つ目又はそれ以上を意味する場合がある。さらに、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、単数形の用語は複数のものを含み、複数形の用語は単数のものを含む。

【0027】

本明細書中で使用される場合、「約」は、明示されているか否かを問わず、例えば整数、分数及びパーセンテージを含む数値を指す。「約」という用語は一般に、当業者が列挙した値と同等である (例えば、同じ機能又は結果を有する) と考え得る数値の範囲 (例えば、列挙した値の $\pm 5\% \sim 10\%$ ) を指す。場合によっては、「約」という用語は、最も近い有効数字まで四捨五入した数値を含み得る。

【0028】

10

20

30

40

50

## I I . 本 発 明

個別のT細胞ベースの免疫療法の広範な使用を可能にする、適応性のあるCARの生成方法を開発した。ヒトT細胞を、抗FITC CAR - CD28 - 41BB - CD3 (FITC - CARと称される)を発現するように操作した。このプラットフォームは、抗FITC scFv (細胞表面上)とFITCとの高親和性相互作用、並びにFITC分子(又は他のタグ)を、様々なタイプのがんを有する患者の治療に使用されるセツキシマブ(抗EGFR)、リツキシマブ(抗CD20)及びハーセプチン(抗Her2)等の任意の抗がん型(anti-cancer-based)モノクローナル抗体に安価かつ容易に結合させる能力を利用するものである。この系は抗原に対する極めて高い特異性を可能にし、「自己抗原」に対する交差反応性なしに、強力なエフェクター機能及び増殖能を伴う。

10

## 【0029】

## エフェクター細胞

本発明の方法に使用されるエフェクター細胞は自家、同系又は同種異系であってもよく、その選択は治療対象の疾患及び治療に利用可能な手段によって決まる。本方法に使用することができる好適なエフェクター細胞の集団は、T細胞等の細胞溶解活性を有する任意の免疫細胞を含む。例示的なT細胞の亜集団としては、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞及びNK細胞を含むCD3<sup>+</sup>を発現するT細胞が挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、T細胞はHLA-A2<sup>+</sup>末梢血単核細胞(PBMC)であるが、T細胞はPBMCに由来する任意のHLAバックグラウンドのものであってもよく、自家、同系又は同種異系の系で利用することができる。また、T細胞は治療を受ける被験体の腫瘍移植片、又は治療を受ける被験体の腫瘍内T細胞に由来するものを含む任意の供給源から単離することができる。便宜上、エフェクター細胞は本明細書中でT細胞と一般に称されるが、任意のT細胞への言及は、他に指示のない限り、本明細書中で規定される全てのエフェクター細胞タイプへの言及であることを理解されたい。

20

## 【0030】

## 抗タグキメラ抗原受容体(AT-CAR)

当業者であれば、本発明の方法に使用されるT細胞によって発現される抗タグキメラ抗原受容体(AT-CAR)が高い柔軟性を可能にすることを理解するであろう。本方法に使用されるAT-CARの唯一の要件は、(i)AT-CARが、腫瘍関連抗原(TAA)に結合するタンパク質(抗体等)に結合させることができる特定のタグに対して結合特異性を有すること、及び(ii)T細胞をAT-CARを発現するように操作することができることである。要求されるわけではないが好ましい付加的特徴としては、(i)AT-CARが、T細胞の結合及び活性化の際に効率的な標的溶解を誘導する活性化ドメインを含むこと、並びに(ii)AT-CARのscFv部分を、in vivoで使用される抗体等の標的(すなわち腫瘍)反応性タンパク質に結合させることができる他のタグ、例えばビオチン又はフィコエリトリンに対して特異性を有するものに置き換えることが可能であることが挙げられる。

30

## 【0031】

特定の態様では、AT-CARは3つのドメインを含む。第1のドメインはタグ結合ドメインである。このドメインは通常、AT-CARを含むポリペプチドのアミノ末端に存在する。タグ結合ドメインがアミノ末端に位置することにより、タグ結合ドメインが標的細胞に結合するタグ付きタンパク質に自由にアクセスすることが可能となる。本明細書中で使用される場合、タグ結合ドメインは通常、抗体又はその抗原結合フラグメントである。抗体又はフラグメントの同一性は、タグ付きタンパク質のタグの同一性によってのみ制限される。例えば、抗体は好ましくはヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ又はネコ等の哺乳動物から得るのが好ましいが、任意の種の動物から得ることができる。好ましくは、抗体はヒト抗体又はヒト化抗体である。使用することができる抗体も特定のクラスに限定されず、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、IgM抗体、IgA1抗体、IgA2抗体、IgD抗体及びIgE抗体が挙げられる。抗体フラグメントとしては、一本鎖可変フラグメント

40

50



(s c F v)、一本鎖抗体、F (a b')<sub>2</sub> フラグメント、F a b フラグメント、及び F a b 発現ライブラリーによって産生されるフラグメントが挙げられ、唯一の限定は抗体フラグメントが選択されたタグに結合する能力を保持していることである。

【0032】

抗体は、例えば非ヒト抗体の抗原結合領域（例えば、F (a b')<sub>2</sub> 又は超可変領域）を、組換え DNA 法によってヒト抗体のフレームワークに移入して、実質的にヒトの分子が産生される場合のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体又はキメラ抗体であってもよい。s c F v 等の抗原結合フラグメントをそれから調製することができる。

【0033】

本発明の A T - C A R の利点の 1 つは、市販の抗体を用いて産生することができることである。代替的に、選択されたタグに対する抗体を産生することができる。抗体の産生のために、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト等を含むが、これらに限定されない様々な宿主を特定のタンパク質、又は該タンパク質の免疫特性を保持する任意の部分、フラグメント若しくはオリゴペプチドの注射によって免疫化することができる。宿主の種に応じて、免疫応答を増大させるために様々なアジュバントを使用することができる。かかるアジュバントとしては、大腸菌 (E. coli) に由来する解毒易熱性毒素、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウム等のゲル状鉱物 (mineral gels)、並びにリゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシニアン及びジニトロフェノール等の界面活性物質が挙げられるが、これらに限定されない。B C G (カルメットゲラン桿菌) 及びコリネバクテリウム・パルヴム (Corynebacterium parvum) も潜在的に有用なアジュバントである。

【0034】

抗体及びそのフラグメントは、抗体分子の産生をもたらす任意の技法を用いて、例えばモノクローナル抗体の産生のための培養における連続細胞株によって調製することができる。かかる技法としては、Koehler and Milsteinによって初めて記載されたハイブリドーマ法 (Nature 256:495-497 (1975))、ヒト B 細胞ハイブリドーマ法 (Kosbor et al., Immunol Today 4:72 (1983)、Cote et al., Proc Natl. Acad. Sci 80:2026-2030 (1983))、及び E B V ハイブリドーマ法 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96 (1985)) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0035】

「キメラ抗体」の産生のために開発された技法、すなわち適切な抗原特異性及び生物活性を有する分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングも用いることができる (Morrison et al., Proc Natl. Acad. Sci 81:6851-6855 (1984)、Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)、Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985))。代替的に、例えば米国特許第 4, 946, 778 号 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に開示される一本鎖抗体の産生について記載される技法を、タグ特異的一本鎖抗体を産生するように適応させて用いることができる。

【0036】

一態様では、タグ結合ドメインは一本鎖可変フラグメント (s c F v) である。s c F v は、通常 10 アミノ酸 ~ 約 25 アミノ酸の短ペプチドによって連結した、抗体の重鎖 (V H) 及び軽鎖 (V L) の可変領域を含む。リンカーは V H の N 末端と V L の C 末端とを接続するか、又はその逆であり得る。

【0037】

上記で示したように、タグ結合ドメインの結合特異性は、標的細胞に結合するために使用されるタンパク質に結合させるタグの同一性によって決まる。例えば、タグが F I T C (フルオレセインイソチオシアネート) である場合、タグ結合ドメインは抗 F I T C s c F v を構成し得る。代替的に、タグがビオチン又は P E (フィコエリトリン) である場合、タグ結合ドメインは抗ビオチン s c F v 又は抗 P E s c F v を構成し得る。

【0038】

第2のドメインは膜貫通(TM)ドメインである。TMドメインはCARをT細胞の細胞膜に固定する。例示的なTMドメインとしては、ヒトCD8鎖のヒンジ領域及び膜貫通領域が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0039】

第3のドメインは、存在する場合、T細胞活性化ドメインである。このドメインは、標的細胞に結合するタグ付きタンパク質にCARが結合する際のT細胞活性化を助ける。T細胞活性化には、サイトカイン及びケモカインの産生の誘導、並びに細胞の細胞溶解活性の活性化が含まれる。例示的なT細胞活性化ドメインとしては、T細胞の生存及び増殖を向上させる働きがあるCD28、CD137(41BB)、OX40及びHVEMの細胞質領域、並びにT細胞活性化を誘導するCD3及びFcRが挙げられるが、これらに限定されない。1つ又は2つ以上のT細胞活性化ドメイン、例えば2つ、3つ、4つ又はそれ以上のT細胞活性化ドメインがCARに含まれ得る。

10

#### 【0040】

##### AT-CAR T細胞産生

T細胞は、当業者に容易に知られる手段によってAT-CARを発現するように操作することができる。一般に、AT-CARをコードするポリヌクレオチドベクターを構築し、このベクターをT細胞集団にトランスフェクトする。次いで、細胞をT細胞によるAT-CARの発現を促進する条件下で成長させる。良好なトランスフェクション(すなわちウイルス媒介性の遺伝子組込みを指す形質導入)及びT細胞によるAT-CARの提示は、従来の手段によって行われ、その幾つかを本明細書の実施例で開示する。

20

#### 【0041】

一態様では、T細胞は、選択されたAT-CARをコードするレトロウイルスベクターを初めに構築することによってAT-CARを産生するように操作することができる。例示的なレトロウイルスベクターとしては、pMSGV(マウス幹細胞ウイルススペースのsplice-gagベクター)に由来するベクター骨格pMSGV1-CD8-28BBZが挙げられるが、これに限定されない。DNAシーケンシングを、T細胞のトランスフェクション前に適当なベクターの構築を確認するために用いることができる。レトロウイルス形質導入は既知の技法、例えばJohnson et al. (Blood 114, 535-546 (2009))の技法を用いて行うことができる。形質導入したT細胞でのAT-CARの表面発現は、例えば細胞をタグ結合タンパク質又はタグ結合デキストランビーズで染色した後のフローサイトメトリーによって決定することができる。タンパク質又はビーズのタグ部分には、細胞によって発現されるCARのタグ結合ドメインが結合する。

30

#### 【0042】

##### AT-CAR T細胞投与

AT-CAR発現T細胞集団は、被験体に投与するために当業者に既知の技法を用いて配合することができる。AT-CAR発現T細胞集団を含む配合物には、薬学的に許容される添加剤(単数又は複数)が含まれ得る。配合物に含まれる添加剤は、例えばAT-CARを含むタグ結合ドメインの性質、使用されるT細胞の亜集団、及び投与様式に応じて異なる目的を有する。一般に使用される添加剤の例としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、注射用水、グリセロール、エタノール及びこれらの組合せ、安定剤、可溶化剤及び界面活性剤、緩衝剤及び防腐剤、等張化剤、充填剤、並びに潤滑剤が挙げられるが、これらに限定されない。AT-CAR発現T細胞集団を含む配合物は、通常は動物血清(例えばウシ血清アルブミン)等の任意の非ヒト構成要素の非存在下で調製及び培養される。

40

#### 【0043】

配合物は、1つのAT-CAR発現T細胞集団、又は2つ以上、例えば2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又はそれ以上のAT-CAR発現T細胞集団を含み得る。種々のAT-CAR T細胞集団はタグ結合ドメインの同一性、活性化ドメインの同一性、T細胞の亜集団の同一性、又はそれらの組合せに基づいて異なり得る。例えば、配合物は1つ、又は2つ以上、例えば2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又はそれ以上の異なるタグ付きタンパク質

50

を認識し、それと結合する A T - C A R 発現 T 細胞集団を含み得る。一例として、配合物は F I T C、ビオチン及び P E を認識し、それと結合する A T - C A R 発現 T 細胞集団を含み得る。このため、この例では、配合物は F I T C 結合抗体、ビオチン結合抗体及び P E 結合抗体によってタグ付けられた細胞を認識し、それと結合する 3 つの異なる A T - C A R 発現 T 細胞集団を含む。この配合物は、したがって F I T C - C A R 発現 T 細胞、ビオチン - C A R 発現 T 細胞及び P E - C A R 発現 T 細胞を含む。

#### 【 0 0 4 4 】

A T - C A R T 細胞集団（単数又は複数）を含む配合物は、当業者に既知の様式及び技法を用いて被験体に投与することができる。例示的な様式としては、静脈内注射が挙げられるが、これに限定されない。他の様式としては、腫瘍内、皮内、皮下（s . c .、s . q .、s u b - Q、ハイポ）、筋肉内（i . m .）、腹腔内（i . p .）、動脈内、髄内、心臓内、関節内（関節）、滑液嚢内（関節液領域）、頭蓋内、髄腔内及びくも膜下（髄液）の様式が挙げられるが、これらに限定されない。配合物の非経口注射又は注入に有用な既知の任意のデバイスを、かかる投与を行うために使用することができる。

#### 【 0 0 4 5 】

被験体に投与される A T - C A R 発現 T 細胞集団（単数又は複数）を含む配合物は、特定の適応症又は疾患の治療及び / 又は予防に有効な多数の A T - C A R 発現 T 細胞を含む。このため、本発明の方法を実施する場合、治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団が被験体に投与される。概して、約  $1 \times 10^4$  個 ~ 約  $1 \times 10^{10}$  個の A T - C A R 発現 T 細胞を含む配合物を投与する。大抵の場合、配合物は約  $1 \times 10^5$  個 ~ 約  $1 \times 10^9$  個の A T - C A R 発現 T 細胞、約  $5 \times 10^5$  個 ~ 約  $5 \times 10^8$  個の A T - C A R 発現 T 細胞、又は約  $1 \times 10^6$  個 ~ 約  $1 \times 10^7$  個の A T - C A R 発現 T 細胞を含む。しかしながら、被験体に投与される A T - C A R 発現 T 細胞の数は、がんの位置、原因、同一性、程度及び重症度、治療を受ける個体の年齢及び状態等に応じて広い範囲で変化する。医師によって使用すべき適切な投与量が最終的に決定される。

#### 【 0 0 4 6 】

##### タグ付きタンパク質

タグ付きタンパク質は、A T - C A R 発現 T 細胞の投与の前、又はそれと同時、又はその後被験体に投与される。タグ付きタンパク質は被験体内の標的細胞に結合する。概して、タグ付きタンパク質の「タンパク質」部分は標的細胞に結合する分子の部分である。例えば、タンパク質は、標的細胞によって発現される腫瘍関連抗原（T A A）又は腫瘍特異的抗原（T S A）に結合する抗体であり得る。しかしながら、「タンパク質」は標的細胞に結合する任意の分子であってもよい。例示的なタンパク質としては、セツキシマブ（抗 E G F R）、ニモツズマブ（抗 E G F R）、パニツムマブ（抗 E G F R）、リツキシマブ（抗 C D 2 0）、オマリズマブ（抗 C D 2 0）、トシツモマブ（抗 C D 2 0）、トラスツズマブ（抗 H e r 2）、ゲムツズマブ（抗 C D 3 3）、アレムツズマブ（抗 C D 5 2）及びベバシズマブ（抗 V E G F）等の抗がん型のモノクローナル抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 4 7 】

タグ付きタンパク質の「タグ」部分は、A T - C A R、具体的には A T - C A R のタグ結合ドメインが認識し、特異的に結合することができる分子であることによるのみ制約される。例示的なタグとしては、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、ビオチン、フィコエリトリン（P E）、ヒスチジン、ストレプトアビジン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタチオン S - トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、及び量子ドットナノ結晶を含む任意のタイプの蛍光物質が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 4 8 】

このため、一部の態様では、タグ付きタンパク質は F I T C 結合抗体、ビオチン結合抗

体、P E 結合抗体、ヒスチジン結合抗体及びストレプトアビジン結合抗体を含み、抗体は標的細胞によって発現されるT A A又はT S Aに結合する。例えば、本発明のタグ付きタンパク質としては、F I T C 結合セツキシマブ、F I T C 結合リツキシマブ、F I T C 結合ハーセプチン、ビオチン結合セツキシマブ、ビオチン結合リツキシマブ、ビオチン結合ハーセプチン、P E 結合セツキシマブ、P E 結合リツキシマブ、P E 結合ハーセプチン、ヒスチジン結合セツキシマブ、ヒスチジン結合リツキシマブ、ヒスチジン結合ハーセプチン、ストレプトアビジン結合セツキシマブ、ストレプトアビジン結合リツキシマブ、及びストレプトアビジン結合ハーセプチンが挙げられるが、これらに限定されない。代替的に、A T - C A R 細胞を、腫瘍に栄養を与える血管細胞を標的とし、及び/又はそれを破壊するように再指向化することができる。例えば、A T - C A R として F I T C - V E G F を発現するT細胞は、F I T C タグ付きV E G F が結合する血管内皮細胞を標的とすることができ、この場合、F I T C タグ付きV E G F にV E G F 受容体が結合する。

10

**【 0 0 4 9 】**

一部の態様では、タグを欠いたタンパク質をタグ付きタンパク質として使用することができる。例えば、標的細胞上のT A A又はT S Aに結合する裸の(タグの付いていない)タンパク質(抗体等)をタグ付きタンパク質として使用することができる。かかる状況下では、A T - C A R はタンパク質を認識し、それと特異的に結合する。一例として、タグ結合ドメインは第2の抗体を認識し、それと結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであってもよく、この場合、第2の抗体はタグ付きタンパク質として機能し、第2の抗体はタグを欠いている。

20

**【 0 0 5 0 】**

タグは、化学カップリング及び化学架橋剤等の技法を用いてタンパク質に結合させることができる。代替的に、融合タンパク質としてタグ付きタンパク質をコードするポリヌクレオチドベクターを調製することができる。次いで、細胞株をタグ付きタンパク質を発現するように操作することができ、タグ付きタンパク質を培養培地から単離し、精製し、本明細書中で開示される方法に使用することができる。

**【 0 0 5 1 】**

タグ付きタンパク質は、被験体に投与するために当業者に既知の技法を用いて配合することができる。タグ付きタンパク質の配合物には、薬学的に許容される添加剤(単数又は複数)が含まれ得る。配合物に含まれる添加剤は、例えばタグの性質、タンパク質、及び投与様式に応じて異なる目的を有する。一般に使用される添加剤の例としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、注射用水、グリセロール、エタノール及びこれらの組合せ、安定剤、可溶化剤及び界面活性剤、緩衝剤及び防腐剤、等張化剤、充填剤、並びに潤滑剤が挙げられるが、これらに限定されない。

30

**【 0 0 5 2 】**

タグ付きタンパク質の配合物は、1つのタイプのタグ付きタンパク質、又は2つ以上、例えば2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又はそれ以上のタイプのタグ付きタンパク質を含み得る。種々のタイプのタグ付きタンパク質はタグの同一性、タンパク質の同一性、又はその両方に基づいて異なり得る。例えば、3つのタイプのタグ付きタンパク質を含む配合物は、F I T C 結合セツキシマブ、F I T C 結合リツキシマブ及びF I T C 結合ハーセプチン、又はF I T C 結合セツキシマブ、ビオチン結合セツキシマブ及びP E 結合セツキシマブを含み得る。

40

**【 0 0 5 3 】**

タグ付きタンパク質は、当業者に既知の様式及び技法を用いて被験体に投与することができる。例示的な様式としては、静脈内注射、腹腔内注射及び腫瘍内注射が挙げられるが、これらに限定されない。他の様式としては、皮内、皮下(s . c . 、 s . q . 、 s u b - Q 、 ハイボ)、筋肉内(i . m . )、動脈内、髄内、心臓内、関節内(関節)、滑液嚢内(関節液領域)、頭蓋内、髄腔内及びくも膜下(髄液)の様式が挙げられるが、これらに限定されない。配合物の非経口注射又は注入に有用な既知の任意のデバイスを、かかる投与を行うために使用することができる。

50

## 【0054】

タグ付きタンパク質を含む配合物は、特定の適応症又は疾患の治療及び／又は予防に有効な量で被験体に投与される。概して、少なくとも約  $0.1 \text{ mg/kg}$  (体重) ~ 約  $100 \text{ mg/kg}$  (体重) のタグ付きタンパク質を含む配合物を治療を必要とする被験体に投与する。大抵の場合、投与量は投与経路、症状等を考慮して1日当たりタグ付きタンパク質約  $1 \text{ mg/kg}$  (体重) ~ 約  $10 \text{ mg/kg}$  (体重) である。一例としては、タグ付きペバシズマブを約  $2.5 \text{ mg/kg}$  ~ 約  $5 \text{ mg/kg}$  の投与量で投与する。更なる例としては、タグ付きセツキシマブを約  $100 \text{ mg/m}^2$  ~ 約  $400 \text{ mg/m}^2$  の投与量で投与する。しかしながら、被験体に投与される配合物中のタグ付きタンパク質の量は、がんの位置、原因、同一性、程度及び重症度、治療を受ける個体の年齢及び状態等に応じて広い範囲で変化する。医師によって使用すべき適切な投与量が最終的に決定される。

10

## 【0055】

がん

本発明は、がんを有する被験体を治療する方法であって、治療を必要とする被験体に、がん細胞に結合する1つ又は複数のタグ付きタンパク質の配合物を投与することと、タグ付きタンパク質に結合し、がん細胞死を誘導する1つ又は複数の治療的に有効な A T - C A R 発現 T 細胞集団を投与することと、を含む、方法に関する。「がん」という用語は広範に解釈されることを意図し、異常な細胞成長及び／又は細胞分裂の全ての側面を包含する。例としては、腺癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、未分化癌、大細胞癌、小細胞癌を含むが、これらに限定されない癌、及び皮膚、乳房、前立腺、膀胱、膣、頸部、子宮、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、肺、気管、気管支、結腸、小腸、胃、食道、胆嚢のがん；軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫を含むが、これらに限定されない肉腫、並びに骨組織、軟骨組織、脂肪組織、筋組織、血管組織及び造血組織のがん；成熟 B 細胞新生物、例えば慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B 細胞前リンパ球性白血病、リンパ腫及び形質細胞新生物、成熟 T 細胞新生物及びナチュラルキラー (NK) 細胞新生物、例えば T 細胞前リンパ球性白血病、T 細胞大型顆粒リンパ球性白血病、侵襲性 NK 細胞白血病、及び成人 T 細胞白血病／リンパ腫、ホジキンリンパ腫、及び免疫不全関連リンパ増殖異常症を含むが、これらに限定されないリンパ腫及び白血病；精巣がん及び卵巣がんを含むが、これらに限定されない胚細胞腫瘍；肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫及び網膜芽腫を含むが、これらに限定

20

30

## 【0056】

本明細書中で使用される場合、「治療する (treat)」、「治療する (treating)」及び「治療 (treatment)」という用語は、それらの通常及び慣例の意味を有し、被験体におけるがんの症状の重症度及び／又は頻度の抑止、改善若しくは軽減、及び／又は被験体におけるがん細胞の成長、分裂、拡散若しくは増殖、若しくはがんの進行 (例えば新たな腫瘍の発生) の抑制の1つ又は複数を含む。治療とは、本発明の方法を実施していない被験体に対する約 1% ~ 約 100% の抑止、改善、軽減又は抑制を意味する。好ましくは、抑止、改善、軽減又は抑制は、本発明の方法を実施していない被験体に対する約 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5% 又は 1% の抑止、改善、軽減又は抑制である。

40

## 【0057】

A T - C A R 発現 T 細胞集団を含む配合物及びタグ付きタンパク質の配合物のどちらの投与頻度も、治療対象の疾患、A T - C A R 発現 T 細胞及びタグ付きタンパク質を含む要素、並びに投与様式を含む因子によって異なる。各々の配合物を1日4回、3回、2回又は1回、1日おき、2日おき、3日おき、4日おき、5日おき、週1回、7日おき、8日おき、9日おき、週2回、月1回及び月2回独立して投与することができる。

## 【0058】

治療期間は治療対象の疾患に基づき、担当医によって最良のものが決定される。しかしながら、治療の継続は数日、数週間又は数ヶ月の間続けられることが企図される。

50

## 【 0 0 5 9 】

本発明は治療方法に柔軟性をもたらし、その結果として、タグ付きタンパク質の配合物（単数又は複数）及び A T - C A R 発現 T 細胞集団（単数又は複数）を被験体に任意の順序で投与することができる。このため、タグ付きタンパク質の配合物（単数又は複数）を、A T - C A R 発現 T 細胞集団（単数又は複数）の前、後又はそれと同時に被験体に投与することができる。代替的に、2 つ以上のタグ付きタンパク質の配合物及び / 又は 2 つ以上の A T - C A R 発現 T 細胞集団を被験体に投与する場合、投与を調整することができる。例えば、第 1 のタグ付きタンパク質の配合物の投与に続いて第 1 の A T - C A R 発現 T 細胞集団を投与することができ、これに続いて第 2 のタグ付きタンパク質の配合物、次いで第 2 の A T - C A R 発現 T 細胞集団を投与することができる。

10

## 【 0 0 6 0 】

本発明は、被験体への A T - C A R 発現 T 細胞の投与の前に A T - C A R 発現 T 細胞集団をタグ付きタンパク質でコーティングする方法も含む。

## 【 0 0 6 1 】

本発明の実施形態の各々において、治療を受ける被験体はヒト又は非ヒト動物、例えば非ヒト霊長類、鳥類、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、コンパニオンアニマル、例えばイヌ、ネコ若しくは齧歯類等、又は他の哺乳動物である。

## 【 0 0 6 2 】

本発明は、1 つ又は複数の A T - C A R 発現 T 細胞集団及び 1 つ又は複数のタグ付きタンパク質の配合物を充填した 1 つ又は複数の容器を含むキットも提供する。キットは使用説明書も含み得る。医薬品又はバイオ製品の製造、使用又は販売を規制する行政機関によって指定される形式の、機関によるヒト投与のための製造、使用又は販売の認可を反映する通知もキットに更に付属し得る。

20

## 【 実施例 】

## 【 0 0 6 3 】

## I V . 実施例

## マウス及び細胞株

N O D - s c i d I L 2 R <sup>n u l l</sup> ( N S G ) マウスは、Jackson Laboratory ( Bar Harbor , ME , USA ) から購入し、メリーランド大学ボルチモア校の特定病原体除去動物施設に収容し、養子免疫療法のレシピエントとして使用した。実験はメリーランド大学ボルチモア校の動物管理使用委員会によって審査され、承認された。ヒト E G F R + 結腸腺癌細胞株 S W 4 8 0 ( ATCC , Manassas , VA ) は、1 0 % 加熱不活性化ウシ胎仔血清 ( Gemini Bio-Products , West Sacramento , CA , USA ) 、2 m M L - グルタミン ( G I B C O ブランド ; Invitrogen ) 及び 1 % ペニシリン - ストレプトマイシン ( G I B C O ブランド ; Invitrogen ) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 ( D M E M ) ( G I B C O ブランド ; Invitrogen , Carlsbad , CA , USA ) で維持した。E G F R + H E R 2 + 膵臓腺癌細胞株 P a n c 6 . 0 3 は、Elizabeth Jaffee 博士 ( ジョンズホプキンス大学シドニーキンメルがんセンター ) の厚意で提供され、2 0 % F B S 、1 % M E M 非必須アミノ酸 ( G I B C O ブランド ; Invitrogen ) 、1 % ピルビン酸ナトリウム ( G I B C O ブランド ; Invitrogen ) 、2 m M L - グルタミン、1 % ペニシリン - ストレプトマイシン及び 1 0 0 I U / m l のインスリンを添加した R P M I 1 6 4 0 培地 ( G I B C O ブランド ; Invitrogen ) で培養した。H E R - 2 + 乳腺癌細胞株 A U 5 6 5 ( ATCC ) は、1 0 % F B S 、2 m M L - グルタミン及び 1 % ペニシリン - ストレプトマイシンを添加した R P M I 1 6 4 0 培地で培養した。P h o e n i x A m p h o パッケージング細胞株は、Orbigen ( San Diego , CA , USA ) から購入し、D M E M 、1 0 % F B S 、1 % ピルビン酸ナトリウム、2 m M L - グルタミン及び 1 % ペニシリン - ストレプトマイシンを含有する D 1 0 培地で維持した。S W 4 8 0 細胞株、P a n c 6 . 0 3 細胞株及び A U 5 6 5 細胞株での E G F R 又は H E R 2 の表面発現は、F I T C 結合セツキシマブ ( C t x ) 又は F I T C 結合ハーセプチン ( H e r 2 ) を用いたフローサイトメトリーによって決定した。

30

40

## 【 0 0 6 4 】

50

## レトロウイルスベクターの構築

レトロウイルスベクター骨格 pMSGV1-CD8-28BBZ (Hughes M.S. et al., Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005 Apr;16(4):457-72) は、Richard Morgan 博士 (米国国立がん研究所) の厚意で提供され、pMSGV (マウス幹細胞ウイルススペースの splice-gag ベクター) に由来するものである。図 1A は、ベクター構築物及び 5' 末端から 3' 末端へのフレーム単位の構成要素の配置順序の概略図である。FITC に対するマウス scFv は FITC-CAR と称され、ヒト CD8 鎖 (ヌクレオチド配列 1271~1519、Genbank NM001768.6) のヒンジ領域及び膜貫通領域、並びにヒト CD28 分子 (ヌクレオチド配列 760~882、Genbank NM006139.2)、4-1BB 分子 (ヌクレオチド配列 886~1026、Genbank NM001561.5) 及び CD3 分子 (ヌクレオチド配列 299~637、Genbank NM000734.3) の細胞質領域に連結する。FITC-CAR 配列は、BlueHeron (Bothell, WA) によって合成されている。

## 【0065】

この配列は DNA シークエンシングにより確認され、以下の配列を有するものであった：

```

a g t t g c c t g t t a g g t t g t t g g t g c t g a t g t t c t g g a t t c c
t g c t t c c a g c a g t g a t g t c g t g a t g a c c c a a a c t c c a c t c
t c c c t g c c t g t c a g t c t t g g a g a t c a a g c c t c c a t c t c t t
g c a g a t c t a g t c a g a g c c t t g t a c a c a g t a a t g g a a a c a c
c t a t t t a c g t t g g t a c c t g c a g a a g c c a g g c c a g t c t c c a
a a g g t c c t g a t c t a c a a a g t t t c c a a c c g a t t t t c t g g g g
t c c c a g a c a g g t t c a g t g g c a g t g g a t c a g g g a c a g a t t t
c a c a c t c a a g a t c a g c a g a g t g g a g g c t g a g g a t c t g g g a
g t t t a t t t c t g c t c t c a a a g t a c a c a t g t t c c g t g g a c g t
t c g g t g g a g g c a c c a a g c t g g a a a t c a a a a g t a g t g c t g a
t g a t g c t a a g a a g g a t g c t g c t a a g a a g g a t g a t g c t a a g
a a g g a t g a t g c t a a g a a g g a t g g t g a g g t g a a g c t g g a t g
a g a c t g g a g g a g g c t t g g t g c a a c c t g g g a g g c c c a t g a a
a c t c t c c t g t g t t g c c t c t g g a t t c a c t t t a g t g a c t a c
t g g a t g a a c t g g g t c c g c c a g t c t c c a g a g a a a g g a c t g g
a g t g g g t a g c a c a a a t t a g a a a c a a a c c t t a t a a t t a t g a
a a c a t a t t a t t c a g a t t c t g t g a a a g g c a g a t t c a c c a t c
t c a a g a g a t g a t t c c a a a a g t a g t g t c t a c c t g c a a a t g a
a c a a c t t a a g a g t t g a a g a c a t g g g t a t c t a t t a c t g t a c
g g g t t c t t a c t a t g g t a t g g a c t a c t g g g g t c a a g g a a c c
t c a g t c a c c g t c t c c (配列番号 1)。この配列を pMSGV1 へとライゲー

```

## 【0066】

## ヒト T 細胞のレトロウイルス形質導入

健常ドナーに由来する HLA-A2+ 末梢血単核細胞 (PBMC) を、Biological Specialty Corp (Colmar, PA, USA) から購入し、Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 密度勾配遠心分離によって単離した。単離した PBMC を、24 ウェル組織培養プレートで 5% ヒト AB 血清 (Sigma-Aldrich)、1% MEM 非必須アミノ酸、1% ペニシリン - ストレプトマイシン及び 100 U/ml の組換えヒト IL-2 (BioLegend, San Diego, CA, USA) を添加した AIM-V 培地 (GIBCO ブランド; Invitrogen) 中、 $3 \times 10^6$  個/ウェルで培養し、50 ng/ml の OKT3 (eBioscience, San Diego, CA, USA) で活性化した。2 日後、レトロウイルス形質導入のために細胞

を回収した。形質導入のために、24ウェル非組織培養処理プレート (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) に、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の組換えヒトフィブロネクチンフラグメント (RetroNectin; タカラバイオ株式会社、日本、滋賀県大津市)  $0.5 \text{ ml}$  /ウェルを4で一晚コーティングした。インキュベーション後、ウェルを2.5%ヒトAB血清を加えた $1 \text{ ml}$ のハンクス液 (GIBCOブランド; Invitrogen) を用いて室温で30分間ブロッキングし、2.5% N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES) (GIBCOブランド; Invitrogen) を加えたハンクス液で洗浄した。形質導入は以前に記載されているように行った (Johnson et al. Blood 114, 535-546 (2009))。簡潔に述べると、およそ2.5 mlのレトロウイルス上清を各々のコーティングウェルに添加し、続いて32で2時間、2000gで遠心分離した。 $1.5 \text{ ml}$ のウイルス上清を取り出し、 $1 \times 10^6$ 個 ( $0.5 \text{ ml}$ ) の活性化PBMCを、 $100 \text{ U}/\text{ml}$ のIL-2の存在下で各々のウェルに添加した。プレートを1000gで10分間遠心分離した後、37で一晩インキュベートした。形質導入後、細胞を洗浄し、IL-2 ( $100 \text{ U}/\text{ml}$ ) の存在下で維持し、形質導入の5日後に実験に使用した。形質導入ヒトT細胞でのFITC-CARの表面発現を、細胞をCD3又はCD8及びFITC結合セツキシマブで染色した後にフローサイトメトリーによって決定した。一部の実験では、FITC-CAR形質導入T細胞をFITC結合デキストランビーズで染色した。FITC結合精製ヒトIgG (Invitrogen) で染色した細胞をアイソタイプ対照として使用した。

#### 【0067】

T細胞増殖アッセイ、サイトカイン産生及びケモカイン産生のアッセイ

形質導入の3日～5日後に、 $1 \times 10^5$ 個のT細胞をセツキシマブ、FITC結合セツキシマブ又はFITC-デキストランでコーティングした96ウェル丸底プレートで72時間培養した。腫瘍細胞に対するT細胞特異的反応性のために、SW480細胞に指定の濃度の抗体を37で1時間パルスし、3回洗浄した。 $1 \times 10^5$ 個のエフェクターT細胞及び $1 \times 10^5$ 個の腫瘍細胞を、96ウェル丸底プレートで72時間、 $200 \mu\text{l}$ の培養液量で共培養した。採取の16時間前に、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $^3\text{H}$ -チミジンを各々のウェルに添加した後、1450 LSC&ルミネッセンスカウンター (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いてチミジン取り込みを測定した。サイトカイン及びケモカインの産生レベルを、刺激の48時間後に回収した培養上清からサイトカイン/ケモカインキット (Millipore, Billerica, MA, USA) を用いてメーカーの使用説明書に従って測定した。一部の実験では、腫瘍移植片を細かく刻み、37で2時間トリプシン中で培養し、続いて陰性選択キット (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY) を用いてT細胞濃縮を行った。 $200000$ 個のT細胞をSW480結腸がん細胞 ( $50000$ 個) と共培養し、これにFITC-Ctx又はCtx ( $0.5 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 細胞) をパルスした。3日後に $^3\text{H}$ チミジン取り込み ( $\pm \text{SD}$ ) によって増殖を決定するか、又はMilliplexアレイを用いてサイトカイン及びケモカインの産生を測定した。

#### 【0068】

細胞毒性アッセイ

腫瘍標的細胞に対する細胞毒性活性を、標準的な $^{51}\text{Cr}$ 放出アッセイを用いて測定した。 $1 \times 10^6$ 個の標的細胞を37で2時間、 $200 \mu\text{Ci}$ の $^{51}\text{Cr}$ で標識し、3回洗浄し、抗ヒト抗体を37で1時間パルスした。次いで、 $1 \times 10^4$ 個の標識標的細胞を96ウェル丸底プレート、 $200 \mu\text{l}$ の培養液量で漸減数のエフェクターT細胞と指定のエフェクター対標的 (E:T) 比で共培養した。培地単独でインキュベートした標的細胞を使用して自然 $^{51}\text{Cr}$ 放出を決定し、標識標的細胞を10% Triton X-100中でインキュベートすることによって最大放出を決定した。37で5時間後、 $50 \mu\text{l}$ の上清を回収し、 $^{51}\text{Cr}$ 放射活性を1450 LSC&ルミネッセンスカウンターで測定した。特異的溶解の平均パーセンテージを以下の方程式に従って算出した：特異的溶解% = (試験放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放出)  $\times 100$ 。全ての試験を三連ウェルで行った。結果は平均値  $\pm \text{SD}$  として示す。



## 【0069】

## 腫瘍モデル及び養子免疫療法

予防的腫瘍モデルでは、6週齢～8週齢の雄NSGマウス（各群について $n = 5$ ）の後肢側面に、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個のSW480腫瘍細胞又はPanc 6.03腫瘍細胞を皮下（s.c.）注射した。翌日、マウスにFITC-Ctx又はCtx（ $25 \mu\text{g}$ /マウス）を腹腔内（i.p.）注射した。Ctx注射の翌日、マウスに $5 \times 10^6$ 個のFITC-CAR形質導入ヒトT細胞を静脈内（i.v.）注射した。養子T細胞移入の後、マウスに抗体（ $25 \mu\text{g}$ /マウス）を3週間にわたって毎週i.p.注射した。腫瘍部をデジタルキャリパーを用いて盲検下で週2回～3回測定し、腫瘍サイズ（ $\text{mm}^2$ ）を縦径による垂直測定によって算出した。腫瘍サイズが $200 \text{mm}^2$ に達した場合、又はマウスが瀕死状態若しくは歩行困難となった場合にマウスを安楽死させた。全ての実験を独立して少なくとも2回行い、同様の結果を得た。生存データを直接ログランク検定で分析した。

10

## 【0070】

## 実験1

末梢血単核細胞をIL-2の存在下で抗CD3 mAbによって活性化し、続いて図1Aに示され、上に記載したようにFITC-CD28-41BB-CD3-CARベクター（FITC-CARと称される）を形質導入した。T細胞でのFITC-sCFvの発現を、細胞を抗CD8（又は抗CD3）及びFITC標識セツキシマブビーズ（FITC-Ctx）又はFITC標識デキストランビーズ（FITC-Dex）で染色することによって分析した。平均すると、全T細胞の60%がFITC-CARを発現した（図1B）。それらの機能性及び特異性を確認するために、FITC-CAR T細胞又は対照（モック形質導入）T細胞を、漸増濃度のプレート結合FITC-Ctxビーズ、非結合セツキシマブビーズ、又はFITC-Dexビーズを用いて活性化した。FITC-CAR T細胞は、FITC-Ctx及びFITC-Dexによる刺激を受けて活発かつ用量依存的に増殖したが、Ctx単独による刺激に応じて分裂しなかった（図1C、左パネル）。対照的に、対照T細胞はFITC-Ctx又はFITC-Dexに対して増殖しなかった（図1C、右パネル）。また、T細胞を漸増濃度のFITC-Ctxで染色したEGFR<sup>+</sup>結腸がん細胞（SW480）と共培養した。FITC-CAR T細胞によるFITC反応性が、FITC-Ctx染色がん細胞による活性化を受けて分裂するそれらの能力によって実証された（図1D）。しかしながら、増殖は最低濃度のFITC-Ctxでの対照の増殖と同様であった。対照T細胞は、いずれの濃度のFITC-Ctx染色がん細胞によっても増殖性を示さなかった（図1D）。

20

30

## 【0071】

それらの細胞溶解能を決定するために、FITC-CAR T細胞をFITC-Ctx染色SW480結腸がん細胞とともに様々なエフェクター対標的比で培養した。FITC-CAR T細胞は、T細胞対標的細胞が1:20という低いエフェクター対標的比でSW480結腸がん細胞を溶解したが（図1E、左パネル）、FITC-マウスIgGで標識したがん細胞を溶解しなかった（図1E、右パネル）。同様に、対照T細胞は、FITC-Ctx標識SW480がん細胞又はFITC-IgG標識SW480がん細胞に対して感知され得るレベルの細胞溶解活性を示さなかった（図1E）。種々の抗原を発現する様々な標的細胞を認識するそれらの能力を確認するために、FITC-CAR T細胞を、FITC-Ctxで染色した又はFITC-ハーセプチン（抗Her-2 mAb; FITC-Her2）で染色した膵臓がん細胞（Panc 6.03）及びFITC-Her2で染色した乳がん細胞（AU565）と共培養した。FITC-CAR T細胞は、FITC-Ctx又はFITC-Her2で染色したがん細胞を効果的かつ特異的に溶解した（図1F）。FITC-Ctxで染色した細胞を上回る、FITC-Her2染色膵臓がん細胞に対する細胞溶解活性の増大が、EGFRと比較してより高いHer-2の発現レベルと関連する可能性があるということは注目に値する（データは示さない）。さらに、FITC-CAR T細胞はT細胞の生存、拡大及び走化性に有益である

40

50

多様なサイトカインを産生した(表1)。FITC-Ctx又はCtxで染色したがん細胞を用いて活性化した対照T細胞によって生じるバックグラウンドサイトカインレベルは、それぞれ同一であった。

【0072】

【表1】

	+Ctx	+FITC-Ctx	倍数変化
FGF-2	1.9±(0.79)	15.8±(2.59)	8.1
GM-CSF	45.7±(5.26)	2803.3±(57.74)	61.2
IL-2	13.4±(2.6)	193±(8.5)	14.4
IL-3	1.1±(0.22)	31.4±(6.50)	26.5
IL-5	1.7±(0.01)	6.3±(0.07)	3.6
IL-7	0.7±(0.64)	2.2±(0.32)	3.0
IL-9	0.6±(1.06)	1.8±(0.25)	2.9
IL-12 p70	0.3±(0.59)	1.0±(0.10)	3.1
IL-13	0.3±(0.62)	311.6±(6.51)	873.8
IL-17	16.6±(2.15)	644.6±(20.84)	38.6
sIL-2Ra	61.4±(5.18)	919.6±(59.03)	14.9
sCD40L	27.6±(5.92)	1406.6±(158.22)	50.90
IFN-γ	4.3±(0.98)	2906.6±(162.58)	662.1
TNF-α	4.5±(0.41)	395.6±(33.26)	87.8
TNF-β	1.3±(0.10)	81.1±(7.71)	61.4
MCP-1 (CCL2)	5.1±(0.53)	2243.3±(284.31)	437.8
MIP-1α (CCL3)	6.7±(0.89)	3234.3±(225.02)	483.8
MIP-1β (CCL4)	7.8±(1.39)	986.3±(40.99)	125.3
RANTES (CCL5)	0	778.3±(66.37)	778
MCP-3 (CCL7)	2.0±(1.77)	194.3±(4.73)	94.9
MDC (CCL22)	136.3±(13.65)	6503.3±(551.75)	47.7
エカシン (CCL11)	3.2±(1.29)	32.1±(3.56)	9.8
IP-10 (CXCL10)	14.9±(1.60)	14166.6±(1484.3)	950.7

表1. αFITC-CAR T細胞によるサイトカイン及びケモカインの産生。HLA-A2+PBMCをIL-2の存在下で抗CD3抗体で活性化し、続いてαFITC-CARレトロウイルスを形質導入した。形質導入した細胞についてのαFITC-CARの機能性を、FITC-Ctx又はCtxで染色したSW480結腸がん細胞による活性化を受けてサイトカイン及びケモカインを産生するそれらの能力によって決定した。αFITC-CAR T細胞によって産生される様々なサイトカイン及びケモカインのレベルを、刺激の72時間後にMiliplexサイトカイン/ケモカインアレイを用いて測定した。これらのデータは、各実験で同じ傾向を生じる3回の独立実験(3人の異なるドナー)を代表するものである。

【0073】

まとめると、これらのデータは、1) FITC-CAR T細胞の機能性、2) 可溶性FITCではなく、FITC-Ab染色細胞に対するそれらの特異性、3) 多様な腫瘍細胞タイプを溶解するそれらの能力、及び4) 様々なFITCタグ付き抗体の使用を実証するものである。

【0074】

## 実験2

FITC-CAR T細胞を再指向化して、腫瘍細胞をin vivoで排除する能力を検証した。マウスにSW840結腸がん細胞をs.c.注射し、続いてFITC-Ctx又はCtxをi.p.注射によって投与した。翌日、FITC-CAR T細胞を尾静脈へのi.v.注射によって投与した。腫瘍成長動態はFITC-CAR T細胞+Ctxを与えたマウスと、Ctx単独を与えたマウスとで同様であった(図2A、左パネル)。全く対照的に、FITC-CAR T細胞+FITC-Ctxを与えたマウスにおいて腫瘍成長は著しく抑制された(図2A、左パネル)。同様に、腫瘍消失率(tumor-free occurrence)(図2A、中央パネル)及び全生存(図2A、右パネル)は、F

I T C - C A R T 細胞 + F I T C - C t x を与えたマウスにおいて対照群と比較して顕著に改善された。しかしながら、この生存利点にもかかわらず、 - I T C - C A R T 細胞 + F I T C - C t x を与えたマウスは、腫瘍生着の 5 5 日以内に腫瘍チャレンジのため死亡した。

#### 【 0 0 7 5 】

長期治療における F I T C - C A R T 細胞の減少に寄与する機構を更に調査した。T 細胞は C D 3 m A b 及び I L - 2 で活性化されたため、C A R T 細胞は C D 2 8 又は 4 1 B B から生存促進性シグナルを受けたにもかかわらず短い寿命を示し得る（非特許文献 1、Brentjens et al. Nat. Med. 9, 279-286 (2003)）。脾臓、肝臓、骨髄、循環系を含む様々な組織及び腫瘍移植片における F I T C - C A R T 細胞の存在をアッセイした。F I T C - C A R T 細胞は分析した全ての組織において見られた。腫瘍移植片において検出された全てのヒト T 細胞のおよそ 1 0 % が F I T C - C A R T 細胞であった（図 2 B）。同様のパーセンテージが他の組織でも見られた（データは示さない）。しかしながら、臓器摘出時（3 8 日目～4 5 日目）の F I T C - C A R T 細胞の全パーセンテージは、注入時の 6 0 % という開始パーセンテージよりも顕著に低かった。4 0 % ～ 5 0 % という開始パーセンテージと比較して、マウスから回収した T 細胞の 6 0 % ～ 9 0 % が C D 8 <sup>+</sup> であったことも注目に値する。これらのデータから、i n v i v o の C D 4 <sup>+</sup> T 細胞に対する C D 8 <sup>+</sup> サブセットの潜在的な生存利点が示される。C D 4 T <sub>R e g</sub> の頻度又は役割は検証しなかったが、これは依然として更に調査する価値がある実行可能な選択肢である。

#### 【 0 0 7 6 】

代替的に、F I T C - C A R T 細胞は、おそらくはアナジー又は他の抑制機構のために抗原（F I T C）によって十分に活性化されなかったと考えられる。全 T 細胞を腫瘍移植片から濃縮し、F I T C - C t x 又は C t x 単独で染色した組織培養物に由来する S W 4 8 0 細胞を用いて即座に再活性化した。F I T C - C A R T 細胞は、F I T C - C t x 染色 S W 4 8 0 細胞による刺激後に増殖し（図 2 C）、様々なエフェクター分子及びケモカインを産生したが（図 2 D）、C t x で染色した S W 4 8 0 細胞に応答しなかった。残念ながら、腫瘍移植片から単離された F I T C - C A R T 細胞の数は、それらの殺傷適性を試験するのに十分ではなかった。しかしながら、e x v i v o で分裂し、エフェクター分子を産生するそれらの能力に基づくと、- F I T C - C A R T 細胞は明らかに F I T C 刺激に応答することが可能である。

#### 【 0 0 7 7 】

- F I T C - C A R がマウスに存在し、F I T C - C A R 刺激に応答性であるという観察結果に基づいて、腫瘍移植片での E G F R 発現を検証した。フローサイトメトリーによって検証されるように、アイソタイプ対照及び組織培養物から採取した S W 4 8 0 細胞と比較して、全ての腫瘍移植片が完全に E G F R 発現を欠いている（図 2 E）。加えて、組織培養物から採取した S W 4 8 0 細胞の大半が E G F R を発現するが、その発現は E G F R を欠く一部の細胞とは異質であった。

#### 【 0 0 7 8 】

総合すると、これらのデータは、F I T C - C A R が E G F R <sup>+</sup> 細胞を死滅させるが、やがて F I T C - C A R T 細胞の標的ではない E G F R <sup>-</sup> 細胞の成長を許すという主張を裏付けている。また、E G F R 発現の欠如、したがって F I T C 媒介刺激の欠如が、注射前の F I T C - C A R T 細胞のパーセンテージと比較して、後の時点で担腫瘍マウスにおいて観察された F I T C - C A R T 細胞の頻度の低下に寄与していたと考えられる。さらに、これらのデータは、T A A が不均一に発現される患者において腫瘍回避が起こる可能性を浮き彫りにする。これらの研究から、幾つかの T A A に対して特異性を有する C A R T 細胞を使用することの潜在的必要性も強調される。抗タグ C A R T 細胞の使用の利点の 1 つは、幾つかの F I T C 「タグ付き」腫瘍反応性抗体を同時に使用することが可能であることである。また、ビオチンに特異的な s c F v 又は P E 結合抗体を発現する C A R の使用は、抗タグ C A R の多様性を増大させ得る。

## 【0079】

## 実験3

SW480がん細胞でのEGFR発現の不均一性を考慮して、全ての細胞が抗原を発現するがん細胞集団を破壊するFITC-CAR T細胞の能力を検証した。膵臓がん細胞株Panc 6.03を、EGFRを一様に発現する細胞として選択した(図3A)。

FITC-CAR T細胞の細胞溶解活性を、予防的腫瘍モデルにおいて実験2に記載したものと同一手順を用いて検証した。腫瘍成長は、FITC-CAR T細胞+FITC-Ctxを与えたマウスにおいて明らかに抑制され、-FITC-CAR T細胞+Ctxを与えたマウスは急速な腫瘍成長を示した(図3B、左パネル)。FITC-CAR T細胞+Ctxを与えた全てのマウスが、腫瘍生着の35日以内に腫瘍チャレンジのため死亡した(図3B、右パネル)。i.v.注射、i.p.注射又は腫瘍内注射によるFITC-Ctxの投与は、全て腫瘍への抗体局在をもたらした(データは示さない)ことは注目に値する。T細胞を腫瘍に再指向化することの代替的方法是、養子移入前にFITC-CAR T細胞をFITC-Ctxでコーティングすることである。

10

## 【0080】

## 実験4

確立された膵臓腫瘍を破壊するFITC-CAR T細胞の能力を検証した。膵臓腫瘍を腫瘍が十分に血管新生される $3\text{ mm}^2 \sim 10\text{ mm}^2$ のサイズまで成長させた後、FITC-Ctx又はCtxを注射(i.p.)した。翌日、マウスにFITC-CAR T細胞を尾静脈注射によって投与した。EGFRに対して再指向化された特異性を有するT細胞は、全てのマウスにおいて確立された膵臓腫瘍を根絶し(図3C、左パネル)、Ctx及びFITC-CAR T細胞で処理したマウスと比較して生存を改善した(図3C、右パネル)。観察期間中に腫瘍の再発は起こらなかった。

20

## 【0081】

要約すると、これらの研究は、T細胞特異性を、様々ながんタイプに結合して腫瘍破壊を媒介するFITCタグ付き抗体に与える汎用であり適応性のあるCAR系の生成を初めて説明するものである。この報告は、TAA陰性腫瘍変異株が生じ、最終的に宿主を死に至らせる可能性があるために、2つ以上のTAAを標的とするためにCAR T細胞を使用することの重要性を初めて強調するものでもある。このプラットフォームは、様々ながんタイプを標的とするために、様々なタグ付きタンパク質(すなわち抗体)を標的とするその可能性から既存のCAR技術を大幅に進展させる「汎用の」系とみなされる。

30

## 【0082】

本発明の範囲又は趣旨を逸脱することなく、本発明において様々な変更形態及び変形形態を行うことができることが当業者には明らかである。本発明の他の実施形態は、本明細書を検討し、本明細書に開示される本発明を実施することによって当業者に明らかである。本明細書及び実施例は単なる例示とみなされ、本発明の真の範囲及び趣旨は添付の特許請求の範囲によって示されることが意図される。

## 【0083】

本願全体を通して、様々な刊行物、特許及び/又は特許出願は、本発明が関連する現行の技術水準をより完全に説明するために参照される。これらの刊行物、特許及び/又は特許出願の開示は、各々独立した刊行物、特許及び/又は特許出願が具体的かつ個別に引用することにより本明細書の一部をなすかのように、それらの全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

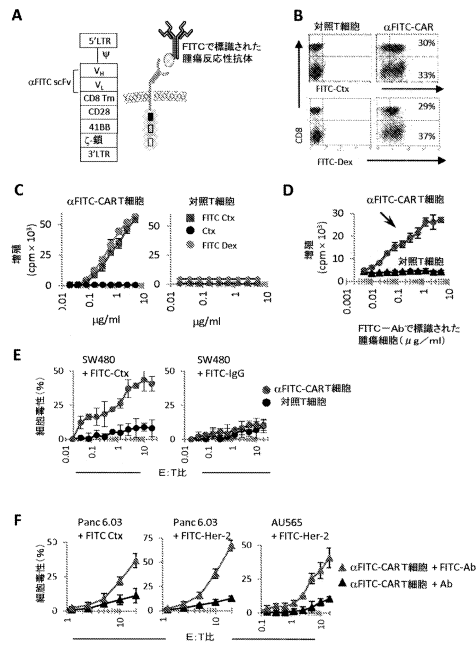
40

## 【配列表フリーテキスト】

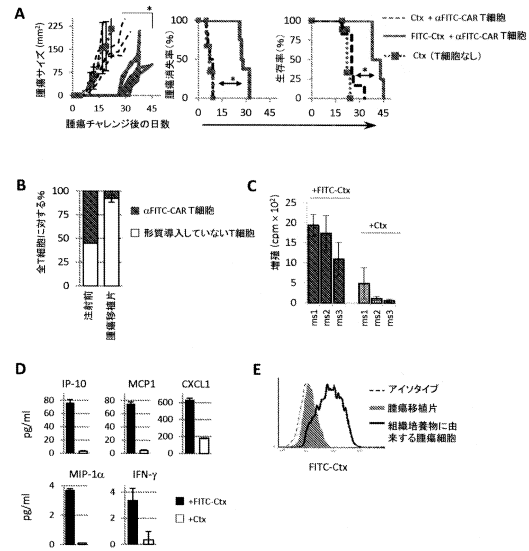
## 【0084】

配列番号1: 化学的に合成された抗FITC-CAR配列

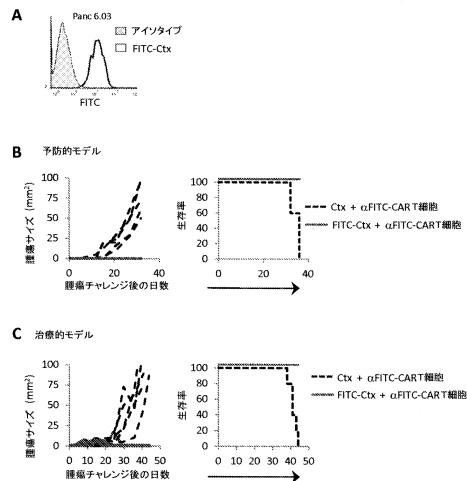
【図 1】

Figure 1.  $\alpha$  FITC-CAR の発現及び *in vitro* 機能性

【図 2】

Figure 2.  $\alpha$  FITC-CAR T細胞は腫瘍の確立を遅らせるが、抗原陰性腫瘍の拡大を促進する

【図 3】

Figure 3.  $\alpha$  FITC-CAR T細胞は腫瘍の成長を抑え、確立された腫瘍を根絶する

【配列表】

0005897035000001.app

---

フロントページの続き

審査官 六笠 紀子

- (56)参考文献 特表2002-506046(JP,A)  
特開2001-213804(JP,A)  
Current Opinion in Immunology, 2009年, 21, p.215-223  
日本化学会講演予稿集, 2008年, 88(1), p.613, 2PA-055  
日本薬学会年会要旨集, 2008年, 128(4), p.131, 28PE-am253

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A61P 35/00 - 35/768  
A61K 39/00 - 39/44  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
WPI  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)