

(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2018-521069

(P2018-521069A)

(43) 公表日 平成30年8月2日(2018.8.2)

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

F 1

A 61 K 35/17
A 61 P 35/00
A 61 K 45/00
A 61 K 38/17
C 07 K 14/725

Z

テーマコード(参考)

4 B 06 5
4 C 08 4
4 C 08 7
4 H 04 5
Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-501870 (P2018-501870)
(86) (22) 出願日 平成28年7月14日 (2016.7.14)
(85) 翻訳文提出日 平成30年2月28日 (2018.2.28)
(86) 國際出願番号 PCT/US2016/042302
(87) 國際公開番号 WO2017/011670
(87) 國際公開日 平成29年1月19日 (2017.1.19)
(31) 優先権主張番号 62/193,217
(32) 優先日 平成27年7月16日 (2015.7.16)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 62/298,980
(32) 優先日 平成28年2月23日 (2016.2.23)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 517361535
プロスペクト チャーターケア アールダ
ブリュエムシー、エルエルシー ディ／ビ
ー／エイ ロジャー ウィリアムズ メデ
ィカル センター
PROSPECT CHARTERCAR
E RWMC, LLC D/B/A RO
GER WILLIAMS MEDICA
L CENTER
アメリカ合衆国 02908 ロード ア
イランド州 プロビデンス チョークスト
ーン アベニュー 825
(74) 代理人 100105957
弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腹膜癌を治療するための組成物及び方法

(57) 【要約】

本開示は、対象において腹膜癌を治療するための組成物及び方法を提供する。該方法は、キメラT細胞受容体タンパク質を発現するように遺伝子改変されたT細胞を投与することを含む。該キメラT細胞受容体タンパク質は、抗体の腫瘍関連抗原結合断片に融合されたT細胞受容体シグナル伝達ドメイン、または腫瘍細胞表面タンパク質に特異的に結合する天然に存在するリガンドに融合されたT細胞受容体シグナル伝達ドメインを含み得る。本明細書に開示した組成物及び方法は、例えば、腫瘍組織量、腹水、腹膜ムチン、または血清腫瘍マーカーレベルを低減させるのに治療上有効である。

【選択図】図1A

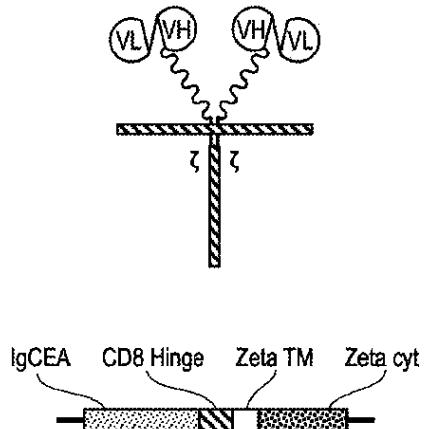


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象における腹膜癌を治療する方法であって、

前記対象の腹腔内に、キメラ抗原T細胞受容体タンパク質またはキメラリガンドT細胞受容体タンパク質を発現する遺伝子操作されたT細胞の実質的に純粋な集団を含む組成物を注入することであって、前記キメラ抗原T細胞受容体タンパク質またはキメラリガンドT細胞受容体タンパク質が、悪性細胞に発現した抗原に結合する、前記注入することを含む、方法。

【請求項 2】

前記悪性細胞が、前記腹腔内に存在する、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記悪性細胞が、前記腹腔の外側に存在する、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

第2の治療剤を、前記対象の腹腔内に注入することをさらに含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記第2の治療剤を前記注入することが、前記遺伝子操作されたT細胞を含む前記組成物の前記注入の前、前記注入の間、または前記注入の後に行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記第2の治療剤が、GM-CSF、STAT3、PD-1、PD-L1、IL10、またはTGF の活性の阻害剤である、請求項4または5に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記組成物が、前記対象の腹腔内に、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、または4週間に1回注入される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記対象の腹腔内に前記組成物を前記注入することが、 10^6 個～ 10^{11} 個の遺伝子操作されたT細胞を注入することを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記組成物を前記注入することが、腹膜腫瘍の数、腹膜腫瘍のサイズ、腹水、腹膜ムチン、及び血清腫瘍マーカーレベルのうちの少なくとも1つの減少をもたらす、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、2015年7月16日に出願された米国仮特許出願第62/193,217号、及び2016年2月23日に出願された米国仮特許出願第62/298,980号に対する優先権の利益を主張するものであり、これらの出願の各々は、参照によりその全体が本明細書に援用される。 40

【0002】**配列表の参照**

配列表は、2016年7月13日に作成された、「0962010125SequenceList.txt」(13,957バイト)という名称のテキストファイルの形式で、EFSを通して電子的に提出されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0003】

本明細書に記載の主題は、T細胞であって、その表面に、腫瘍抗原を結合させ、かつT細胞活性を活性化させる受容体タンパク質を発現するように操作された、該T細胞の設計及び使用に関する。方法は、腹膜腔における腫瘍細胞の増殖及び/または生存を阻害する

キメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T 細胞) の腹腔内投与を含む。

【背景技術】

【0004】

腹膜偽粘液腫 (PMP) 及び腹膜癌腫症 (PC) は、世界で毎年百万人あたり 1 人 ~ 2 人の推定罹患率を有するまれな疾患である。初発時に壊滅的な影響を伴っている全大腸癌患者の 15 % が PC を発症している (非特許文献 1)。これらの患者は予後が極めて不良であり、進行性腸閉塞を含めた、疾患の種々の合併症を患う。至適な治療には、温熱腹腔内化学療法と併用した腫瘍縮小手術 (CRS-HIPEC) があり、これは、限定された疾病負荷を持つごく限られた患者に使用され、ある程度の効果をもたらしてきた。CRS-HIPEC 中に、肉眼で見える全ての腹腔内腫瘍を減量し、顕微鏡的残存病変を局所送達化学療法で治療する。CRS-HIPEC は、2.5 mm よりも大きい任意の腫瘍結節を除去する CRS の後に、腫瘍組織量が少ない場合に最も効果的である。結果は腫瘍悪性度に依存し、低悪性度疾患に対しては 63 % ~ 100 %、高悪性度疾患に対しては 0 % ~ 65 % の 5 年生存率となる (非特許文献 2)。無作為化対照試験により、大腸癌 PC 患者に対する CRS-HIPEC が、全身化学療法に比べて生存時間の有意な改善をもたらすことが示された (非特許文献 3、非特許文献 4)。残念なことに、ほとんどの PC 患者は CRS-HIPEC の対象にはならず、最終的に進行し、病死することになる (非特許文献 1; 非特許文献 5)。たとえそうであっても、PC に対して CRS-HIPEC を用いた結果は、局所送達治療法が、この未だ対処されていない高い臨床的必要性に取り組むための有望なアプローチであることを示唆するものである。

10

20

20

【0005】

進行性 固形腫瘍に対する免疫療法は、近年多くの注目を集めている (非特許文献 6; 非特許文献 7; 非特許文献 8; 非特許文献 9)。数種類の免疫療法があり、ワクチン、抗体、及び免疫細胞注入が含まれる。固形腫瘍に対する細胞免疫療法は、概してキメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T) の適用により進歩してきた。CAR-T は、ほとんどの患者に対しても作製でき、また主要組織適合性複合体の型により制限されないため (非特許文献 10)、一つにはその適用範囲が広いということに基づき特に関心が持たれている。

30

【0006】

癌胎児性抗原 (CEA) を標的とする CAR-T が、近年第 I 相の転移の肝免疫療法 (HITM) 臨床試験 (NCT01373047、NCT02416466) で評価され、安全性、及びこれらの細胞の大腸癌 LM に対する臨床活性が調べられた (非特許文献 11)。腹膜腔は、ステージ IV の CRC 患者における不全のもう 1 つの好発部位であり、PC に対する局所的な CAR-T 送達を評価するのに値していた。局所送達は CAR-T の抗腫瘍効果を増強し得る一方で、腫瘍内免疫抑制にはさらなる課題があると考えられている。転移性 固形腫瘍の微小環境には、CAR-T を抑制する多くの免疫抑制細胞型が含まれ、骨髓由来サプレッサー細胞 (MDSC) 及び制御性 T 細胞 (Treg) 等がある (非特許文献 12)。MDSC は CAR-T 細胞を抑制し、肝 B 細胞の抗原提示機能を阻害することが以前に示されている (非特許文献 13)。MDSC は、PD-1 / PD-L1 軸及びIDO を介してこの免疫抑制機能を果たす (非特許文献 14)。また、Treg は腫瘍微小環境において十分に研究されており、PD-L1 及び CTLA4 を介して CAR-T を抑制することが示されている (非特許文献 15)。

40

【0007】

それゆえに、本明細書では、PMP / PC と診断された対象を治療するために、キメラ T 細胞受容体を発現する免疫応答性細胞を注入する方法が提供される。これらの遺伝的にプログラムされた細胞が、特定の抗原 (PMP または PC に見られる腺癌細胞に発現または特異的に発現した抗原等) を発現する腫瘍を攻撃することを示すデータが提示される。さらに、そのデータは、PC に対する iP-CAR-T 療法の有効性が、免疫抑制細胞集団を抑制することによってさらに高められるはずであるという考えを支持する。

従来技術の前述の例、及びそれらに関連する制限は、例示的であり、排他的なものではないことが意図される。従来技術の他の制限は、本明細書を読み、図面の検討を行い次第

50

、当業者に明らかとなるであろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Coccoliniら、2013, World J Gastroenterol, 19:6979-6994

【非特許文献2】Sugarbakerら、1999, Ann Surg Oncol, 6:727-731

【非特許文献3】Verwaalら、2003, J Clin Oncol, 21:3737-3743

【非特許文献4】Verwaalら、2008, Ann Surg Oncol, 15:2426-2432

【非特許文献5】Caoら、2009, Ann Surg Oncol, 16:2152-2165

【非特許文献6】Hodiら、2010, N Engl J Med, 363:711-723

【非特許文献7】Kantoffら、2010, N Engl J Med, 363:411-422

【非特許文献8】Khanaら、2014, J Surg Res, 191:189-195

【非特許文献9】Saiedら、2014, J Surg Res, 187:525-535

【非特許文献10】Eshhar, 2010, Curr Opin Mol Ther, 12:55-63

【非特許文献11】Katzら、2015, Clin Cancer Res, 21:3149-3159

【非特許文献12】Kershawら、2013, Nat Rev Cancer, 13:525-541

【非特許文献13】Thornら、2014, J Leukoc Biol, 96:883-894

【非特許文献14】Burgaら、2015, Cancer Immunol Immunother, 64:817-829

【非特許文献15】Leeら、2011, Cancer Res, 71:2871-2881

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1A】図1Aは、種々の抗CEA CAR-T構築物の概略図を提供する。

【図1B】図1Bは、種々の抗CEA CAR-T構築物の概略図を提供する。

【図2】図2は、非形質導入脾細胞及びキメラ受容体形質導入リンパ球による溶解を示す。

【図3A】図3Aは、腫瘍を保有し、キメラ受容体形質導入リンパ球を腹腔内（IP）注射または尾静脈（TV）注射によって投与された動物におけるルミネッセンスを示す。

【図3B】図3Bは、腫瘍を保有し、キメラ受容体形質導入リンパ球を腹腔内（IP）注射または尾静脈（TV）注射によって投与された動物における腫瘍体積の減少を示す。

【図4A】図4Aは、腫瘍を保有し、キメラ受容体形質導入リンパ球を腹腔内（IP）注射または尾静脈（TV）注射によって処置され、かつ腫瘍細胞で再負荷された動物におけるルミネッセンスを示す。

【図4B】図4Bは、キメラ受容体タンパク質を発現する白血球による（図4B）、またはエフェクターメモリー表現型を持つ白血球による（図4C）、in vivoでの腫瘍浸潤を示す。

10

20

30

40

50

【図4C】図4Cは、キメラ受容体タンパク質を発現する白血球による(図4B)、またはエフェクターメモリー表現型を持つ白血球による(図4C)、in vivoでの腫瘍浸潤を示す。

【図5A】図5Aは、腹膜腔外側の腫瘍におけるIPキメラ受容体T細胞注入の治療有効性を示す。

【図5B】図5Bは、キメラ受容体T細胞のTV投与後対IP投与後におけるバイオルミネッセンスで測定したIP腫瘍の減少を示す。

【図5C】図5Cは、キメラ受容体T細胞のTV投与後対IP投与後におけるノギスで測定した側腹部の腫瘍組織量の減少を示す。

【図5D】図5Dは、キメラ受容体T細胞のIP投与後の全身IFNレベルを示す。 10

【図6A】図6Aは、IP腫瘍及び脾臓内のCD11b+細胞及びMDSC(Ly6G+)細胞の存在を示す。

【図6B】図6Bは、IP腫瘍及び脾臓内のCD11b+細胞及びMDSC(Ly6G+)細胞の存在を示す。

【図7A】図7Aは、IP腫瘍及び脾臓内のMDSC Ly6G+細胞及びMDSC PD-L1+細胞の存在を示す。

【図7B】図7Bは、IP腫瘍及び脾臓内のMDSC Ly6G+細胞及びMDSC PD-L1+細胞の存在を示す。 20

【図8A】図8Aは、IP腫瘍及び脾臓内のTreg(FoxP3+)及びCD4T細胞の存在を示す。

【図8B】図8Bは、IP腫瘍及び脾臓内のTreg(FoxP3+)及びCD4T細胞の存在を示す。

【図9A】図9Aは、TV及びIPキメラ受容体T細胞注入が、腫瘍組織量に及ぼす注入後8日目における影響を示す。

【図9B】図9Bは、PD-L1、Gr-1、またはGITRを結合させる抗体の投与が、IPキメラ受容体T細胞注入の有効性に及ぼす注入後8日目における影響を示す。 30

【図10A】図10AはTV及びIPキメラ受容体T細胞注入が、腫瘍組織量に及ぼす注入後14日目における影響を示す。

【図10B】図10BはPD-L1、Gr-1、またはGITRを結合させる抗体の投与が、IPキメラ受容体T細胞注入の有効性に及ぼす注入後14日目における影響を示す。 30

【図11】図11はPD-L1、Gr-1、またはGITRを結合させる抗体の投与が、IPキメラ受容体T細胞注入の有効性に及ぼす注入後14日間にわたる影響を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

以下に説明及び図示される下記の態様及びその実施形態は、典型的及び例示的なものであることを意味し、範囲の限定を意味するものではない。

【0011】

一態様では、対象における腹腔内腫瘍または腹腔内癌の治療方法であって、該対象の腹腔内に、腹腔内悪性細胞の腫瘍関連抗原に結合するキメラT細胞受容体を発現する遺伝子操作されたリンパ球の集団を注入することを含む方法が提供されている。 40

【0012】

一部の実施形態では、リンパ球の集団には、T細胞、B細胞、及び/またはNK細胞が含まれる。他の実施形態では、T細胞には、CD4+細胞、CD8+細胞、ガンマデルタT細胞(γT細胞)、NKT細胞、及び/または制御性T細胞(Treg)が含まれる。

【0013】

一部の実施形態では、キメラ受容体は、免疫グロブリンの抗原結合ドメインと、T細胞受容体シグナル伝達ドメインとで構成されている。他の実施形態では、キメラ受容体は、悪性細胞の細胞表面に発現したタンパク質に対する天然リガンドと、T細胞受容体シグナル伝達ドメインとで構成されている。 50

【0014】

一部の実施形態では、方法は、遺伝子操作されたリンパ球を、対象の腹腔内の悪性細胞数を減少させるのに有効な量で投与することを含む。他の実施形態では、方法は、遺伝子操作されたリンパ球を、対象の腹腔内の悪性細胞の質量を減少させるのに有効な量で投与することを含む。さらに他の実施形態では、腹腔内の悪性細胞の数及び／または質量が、イメージングにより測定される。

【0015】

一部の実施形態では、方法は、遺伝子操作されたリンパ球を、対象の腹腔外側の悪性細胞数を減少させるのに有効な量で投与することを含む。他の実施形態では、方法は、遺伝子操作されたリンパ球を、対象の腹腔外側の悪性細胞の質量を減少させるのに有効な量で投与することを含む。さらに他の実施形態では、腹腔外側の悪性細胞の数及び／または質量が、イメージングにより測定される。

10

【0016】

一部の実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球を注入することを含む方法により、腹膜腫瘍細胞の数が減少する。他の実施形態では、該方法により、遺伝子操作されたリンパ球の初回投与時または該初回投与前の腫瘍サイズの少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が減少する。

【0017】

一部の実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球を注入することを含む方法により、腹膜腫瘍のサイズが減少する。他の実施形態では、該方法により、キメラ受容体T細胞の初回投与時または該初回投与前の腹膜腫瘍サイズの少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が減少する。

20

【0018】

一部の実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球を注入することを含む方法により、遺伝子操作されたリンパ球の初回投与時または該初回投与前に測定された腹膜体積の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が減少する。

【0019】

一部の実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球は、対象の腹腔内に1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、または4週間に1回注入される。

30

【0020】

一部の実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球は、対象に対して自己由来である。他の実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球は、対象に対して自己由来ではない。

【0021】

一部の実施形態では、対象の腹腔に遺伝子操作されたリンパ球を注入することは、 10^6 個～ 10^{11} 個の遺伝子操作されたリンパ球を注入することを含む。

【0022】

一部の実施形態では、方法は、10%DMSO含有または非含有生理食塩水中のキメラ受容体T細胞を含む、遺伝子操作されたリンパ球と薬学的適合溶液との組成物を注入することを含んでおり、該組成物の全容量は約100mL～500mLの範囲である。

40

【0023】

一部の実施形態では、キメラT細胞受容体タンパク質は、腺癌細胞、肉腫細胞、または神経内分泌腫瘍細胞の表面に発現した腫瘍関連抗原に特異的に結合する細胞外ドメインを含む。他の実施形態では、腺癌細胞、肉腫細胞、または神経内分泌腫瘍細胞は、対象の腹膜腔内に存在する。他の実施形態では、腺癌細胞、肉腫細胞、または神経内分泌腫瘍細胞は、対象の腹膜腔の外側に存在する。

【0024】

一部の実施形態では、方法は、第2の治療剤を対象の腹腔内に注入することをさらに含む。他の実施形態では、第2の治療剤は、抑制細胞内の免疫抑制経路を遮断する免疫抑制細胞阻害剤である。さらに他の実施形態では、抑制細胞は、骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)または制御性T細胞(Treg)である。一部の実施形態では、第2の治療剤

50

は、PD-1、PD-L1、PD-L2、IDO、STAT3、GM-CSF、IL10、またはTGFによって媒介される免疫抑制を阻害する。さらに他の実施形態では、第2の治療剤は、PD-1、PD-L1、PD-L2、IDO、STAT3、GM-CSF、IL10、またはTGFを結合させる抗体またはその断片である。

【0025】

一部の実施形態では、第2の治療剤を注入することは、キメラ受容体タンパク質を発現するリンパ球の注入の前、該注入の間、または該注入の後に行われる。他の実施形態では、第2の治療剤は腹腔内または静脈内に注入される。

【0026】

ここで以下に、種々の態様をさらに詳しく説明する。しかしながら、こうした態様は、様々な異なる形態で具現化されてもよく、本明細書に記載した実施形態に制限されるものと解釈されるべきではない。むしろ、これらの実施形態は、本開示を徹底的かつ完全なものにし、当業者に本開示の範囲を十分に伝えるように提供されるものである。

【0027】

定義

本明細書で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、特に文脈で明らかに指示されない限り、複数の指示対象を含むものである。したがって、例えば、「ポリマー」への言及は、単一のポリマーだけではなく、2つ以上の同一または異なるポリマーをも含み、「賦形剤」への言及は、単一の賦形剤だけではなく、2つ以上の同一または異なる賦形剤をも含む等となる。

【0028】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限の間の各中間値、及び明記された範囲における任意の他の明記された値または中間値は、本開示の範囲内に包含されることを意図する。例えば、1 μm ~ 8 μm の範囲が明記された場合、2 μm、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、及び7 μmも明示的に開示されるのと同様に、1 μm以上の値の範囲かつ8 μm以下の値の範囲も明示的に開示される。

【0029】

本明細書で使用される場合、用語「実質的に純粋」または「実質的に精製」とは、CAR-T細胞が、本発明が属する技術分野における当業者に周知の標準技術及び方法によって得ることができると同等に純粋であることを意味するものである。しかしながら、単球が実質的に純粋であるためには、70%、80%、90%、またはそれより高い純度を要する。

【0030】

本明細書で使用される場合、用語「腹膜腔」とは、壁側腹膜と内臓腹膜の間の凹窩、または空隙もしくは潜在空隙を意味するものである。

【0031】

本明細書で使用される場合、用語「腹腔内癌」、「腹腔内腫瘍」、「腹腔内悪性腫瘍」またはそれに類するものは、腹膜腔内に位置する、例えば腫瘍または1つ以上の腫瘍細胞を含む悪性腫瘍を意味するものである。腹膜癌、腹膜悪性腫瘍、または腹膜腫瘍は、腹膜または腹膜腔に源を発する悪性腫瘍である。

【0032】

用語「患者」、「対象」、「個体」及びそれに類するものは本明細書で交換可能に使用され、in vitroであるかin situであるかにかかわらず、本明細書に記載した方法の対象となる任意の動物またはその細胞を意味する。特定の非限定的な実施形態では、患者、対象、または個体は、ヒトである。

【0033】

本明細書で使用される場合、用量または量に適用される用語「治療有効」とは、化合物の量、または本開示のキメラ受容体を含み、かつ薬剤耐性ポリペプチドをさらに含む医薬組成物（例えば、Tリンパ球及び/またはNK細胞等の免疫細胞を含む組成物）の量であって、それを必要とする対象に投与する場合、所望の活性をもたらすのに十分な量を意味

10

20

30

40

50

するものである。本開示の文脈の範囲内では、用語「治療有効」とは、本開示の方法により治療される障害の発現を遅らせるか、進行を阻止するか、または少なくとも1つの症状を軽減もしくは緩和するのに十分な化合物または医薬組成物の量を意味するものである。各活性成分の組み合わせが投与された場合、その組み合わせの有効量は、成分が個々に投与された場合に有効であったと考えられる量を含んでいても含んでいなくてもよいことに留意されたい。

【0034】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ受容体」とは、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び1つ以上の細胞質共刺激シグナル伝達ドメインを、天然には単一のタンパク質に纏めて備わることのない組み合わせの状態で含む、細胞表面受容体として定義されるものである。これは、特に、受容体であって、その細胞外ドメイン及び細胞質ドメインが天然には単一の受容体タンパク質に纏めて備わることのない受容体を含んでいる。本開示のキメラ受容体は、主としてT細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞と共に使用することが意図される。本明細書に記載したキメラ受容体は、本明細書で、キメラ抗原受容体(CAR)、キメラリガンド受容体、またはキメラT細胞受容体とも称される。

10

【0035】

本明細書で使用される場合、用語「腫瘍関連抗原」または「抗原」とは、腫瘍細胞によって特異的に発現されるか、または同じ組織型の非腫瘍細胞よりも腫瘍細胞によってより高頻度またはより高密度に発現される抗原を意味するものである。腫瘍関連抗原は、通常では宿主によって発現されることのない抗原であってもよく、該抗原は突然変異、切断、もしくはミスフォールドされていても、または宿主により通常発現される分子の異常発現であってもよく、該抗原は通常発現される分子だが異常に高いレベルで発現される分子と同一であってもよく、あるいは該抗原は異常である状況または環境で発現されていてもよい。例えば、腫瘍関連抗原は、タンパク質もしくはタンパク質断片、複合糖質、 Ganglioside、ハブテン、核酸、またはこれらの生体分子もしくは他の生体分子の任意の組み合わせであってもよい。

20

【0036】

用語「免疫抑制細胞阻害剤」とは、哺乳動物の免疫抑制細胞の数または機能を低減させるか、または抑制することができる物質を意味するものである。免疫抑制細胞の例として、制御性T細胞(「T_{reg}」)、骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)、及び腫瘍関連マクロファージが挙げられる。

30

【0037】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」とは、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味するものである。抗体は、天然源由来または組み換え源由来のインタクトな免疫グロブリンであり得、またインタクトな免疫グロブリンの免疫反応性部分であり得る。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、及びF(ab)2、ならびに一本鎖抗体及びヒト化抗体を含めた種々の形態で存在していてもよい(Harlowら、1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlowら、1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houstonら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Birdら、1988, Science 242:423-426)。

40

【0038】

用語「抗体断片」とは、インタクトな抗体の一部分を意味し、インタクトな抗体の抗原性決定可変領域を意味するものである。

【0039】

本明細書で使用される場合、用語「抗体由来標的ドメイン」または「抗原結合ドメイン」とは、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小の抗体断片を意味するものである。

50

また、「Fv」ドメインは、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含み、かつ1本の重鎖と1本の軽鎖の可変ドメインとが強固に非共有結合性会合した二量体からなる、最小の抗体断片を意味する。この構成の際には、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、 $V_H - V_L$ 二量体の表面に抗原結合部位を画定している。全体として、6つの超可変領域が、その抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（または、ある抗原に特異的な3つの超可変領域のみを備えたFvの半分）であっても、全結合部位よりは低い親和性ではあるものの、抗原を認識し結合させる能力を有する。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語「天然リガンド」とは、別の天然に存在するタンパク質に特異的に結合する天然に存在するタンパク質を意味するものである。「天然リガンド」は、同一の天然に存在するタンパク質に特異的に結合する完全長タンパク質とその断片の両方を包含する。本明細書で使用される天然リガンドは、組み換えで作製されるか、または合成され得る。10

【0041】

本明細書で使用される場合、用語「抗原」または「Ag」は、免疫応答を誘発する分子として定義される。この免疫応答は、抗体産生、もしくは特定の免疫適格細胞の活性化のいずれか、または両方を含んでもよい。当業者は、実質的に全てのタンパク質またはペプチドを含めた任意の高分子が、抗原として機能することができることを理解するであろう。さらに、抗原は、組み換えDNA由来またはゲノムDNA由来であり得る。したがって、当業者は、免疫応答を引き出すタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的なヌクレオチド配列を備えた任意のDNAが、本明細書で使用される「抗原」をコードすることを理解するであろう。20

【0042】

本明細書で使用される場合、キメラT細胞受容体に関する語句「特異的に結合」とは、キメラT細胞受容体が、その標的タンパク質に、構造的に異なるタンパク質に結合する際の親和力よりも大きい親和力で結合することを意味するものである。

【0043】

本明細書で使用される場合、語句「腫瘍負荷」または「腫瘍組織量」とは、癌細胞の数、腫瘍のサイズ、または対象の身体における癌の量を意味するものである。

【0044】

キメラ受容体免疫細胞の腹腔内投与

腹腔内腫瘍等の播種性腫瘍を治療するための治療法を開発する際には、腫瘍選択性治療を利用するのが有利である。腫瘍関連抗原を認識し結合するキメラ受容体（例えば、CAR-T細胞）を発現するように操作された免疫療法用の細胞が、癌治療に対する有望なアプローチであることが一層わかってきてている。しかし、腫瘍細胞を標的にすることを目的に操作された細胞の能力にもかかわらず、全身血管内投与によって、腫瘍細胞のCAR-T細胞への不適切な曝露や、CAR-T細胞が正常細胞に結合することに伴う有害な副作用が生じ得る。したがって、CAR-T細胞を、腫瘍を含む臓器または解剖学的空间に直接投与するための方法を提供することが有利である。本開示の一部の態様において、本明細書に記載したキメラ受容体リンパ球の腹腔内投与を含む方法が提供されている。一部の実施形態では、リンパ球はT細胞である。3040

【0045】

現行のCAR-T治療法は、操作された細胞の患者への全身注入を必要とする。しかし、こうした投与方法では、疾患部位におけるその細胞の濃度減少、または細胞の活性に伴う有害な副作用の発現に見舞われる恐れがある。本明細書には、腹腔内癌と診断された患者を治療することを目的に操作された免疫細胞を、腹腔内（IP）注入するための組成物及び方法が提供されており、以下に説明する実験には、その細胞の局所的なIP注入が、細胞の全身注入に比べて、腹膜腫瘍に対して優れた防御をもたらしたことが示されている。さらに、IP細胞（IPC）療法を受けた患者に免疫経路阻害剤を投与することで、腹膜転移治療の治療有効性がさらに改善された。50

【0046】

キメラ受容体免疫細胞療法

癌研究では、悪性腫瘍疾患と闘う免疫系成分の使用にますます重点を置いている。例えば、多くの治療用の抗体が癌の治療に有効であることが実証されており、目下世界中で市販されている。さらに最近では、細胞に基づく免疫療法が、癌治療への有望なアプローチとして台頭してきており、そこでは、患者自身の免疫細胞が、患者の身体内の腫瘍を認識し攻撃するように操作される。悪性腫瘍を有する対象の診断は、どの腫瘍抗原タンパク質（腫瘍関連抗原）が腫瘍細胞表面に発現するかを判定することを含み得る。続いて、その対象を、腫瘍関連抗原を標的とし、かつ該抗原に結合するように操作された抗腫瘍免疫細胞で治療し、最終的には、その免疫細胞と、場合によっては同時投与された細胞または治療剤とで腫瘍細胞を致死させることができる。本明細書には、腹腔内の腫瘍を、操作された免疫細胞の腹腔内注入により治療するための組成物及び方法が開示されている。

【0047】

キメラ受容体を発現するように操作されたリンパ球が、一態様で示される。本方法による使用のためのリンパ球集団には、以下に限定されないが、T細胞、B細胞、及びNK細胞が挙げられる。一部の実施形態では、T細胞は、CD4+細胞、CD8+細胞、ガンマデルタT細胞（γT細胞）、NKT細胞、及び/または制御性T細胞（T_{reg}）を含む。キメラ受容体を発現するT細胞（「キメラ受容体T細胞」）は、特に関心が持たれている。キメラ受容体免疫細胞は、細胞表面タンパク質を発現する罹病細胞または悪性細胞に、キメラ受容体タンパク質を介して結合するように設計される。例えば、腹腔内における悪性細胞は、癌胎児性抗原（CEA、GenBank登録番号NP_04354及びその関連アイソフォーム）、KITチロシンキナーゼ受容体タンパク質（GenBank登録番号P10721）、上皮細胞接着分子タンパク質（EpCAM、GenBank登録番号NP_002345及びその関連アイソフォーム）、またはムチン1タンパク質（MUC1、GenBank登録番号NP_001018016及びその関連アイソフォーム）を発現し得る（例えば、Yamamotoら、2014, J Cancer Res Clin Oncol, 140:607-612; Joensuu, 2006, Ann Oncol, 17:x280-x286; Chauhanら、2009, J Ovarian Res, 2:21-29; Flatmarkら、2013, Int J Cancer, 133:1497-1506）。癌細胞に発現し、かつ現在CAR-T細胞療法用に研究されている抗原標的の他の例として、CD20またはGD2（濾胞性リンパ腫）、CD171（神経芽細胞腫）、CD20（非ホジキンリンパ腫）、CD19（リンパ腫）、IL13R₂（膠芽細胞腫）、及びCD19（慢性リンパ球性白血病（CLL）及び急性リンパ球性白血病（ALL））が挙げられる。また、ウイルス特異的CAR-T細胞が、HIV等のウイルスを保有する細胞を攻撃するために開発されている。例えば、臨床試験が、HIVの治療向けにGp100に特異的なCARを用いて開始された（Chicagoら、(2011) Int Rev Immunol 30:294-311）。本方法及び組成物は、限定されないが、上記に列挙した抗原標的を含むと理解される。

【0048】

キメラ受容体タンパク質及びこれらのタンパク質を発現する免疫細胞の產生は、当該技術分野で周知であり、リガンド、または抗体もしくはその断片の標的機能及び特異性を、免疫細胞の抗腫瘍活性と組み合わせるものである。例えば、Sadelaireら、2013, Cancer Discov, 3:388-398を参照されたい。キメラ受容体タンパク質は、N末端からC末端の方向に、罹病標的細胞（例えば、腹膜腔内に存する癌細胞または悪性細胞）の表面に発現したタンパク質を特異的に結合させる標的結合ドメインと、ヒンジドメインと、膜貫通ドメインと、免疫調節性シグナル伝達ドメインとを含む。一部の実施形態では、構築物は、標的結合ドメインのN末端に融合された单一のペプチドをさらに含む。

【0049】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、キメラ受容体タンパク質の標的結合ドメインは、罹病細胞の表面にあるタンパク質を結合させる免疫グロブリンの抗原結合部分を含む。あるいは、この構築物が本明細書でキメラ抗原受容体（C A R）と称される。抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、合成抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、及びそれらの断片を含むが、これらに限定されない細胞表面抗原に結合する任意のドメインであってもよい。好ましい実施形態では、C A Rの抗原結合ドメインは、C A R構築物の一部分である場合に抗原に特異的に結合することができる抗体の断片である。一部の例では、抗原結合ドメインは、C A Rが最終的に用いられる種と同一の種由来であることが有利である。例えば、ヒトに使用する場合、C A Rの抗原結合ドメインが、ヒト抗体またはヒト化抗体の断片を含むことが有利である場合がある。したがって、一部の実施形態では、C A Rの抗原結合ドメイン部分は、ヒト抗体またはヒト化抗体の腫瘍抗原結合断片を含む。これらの実施形態のそれぞれにおいて、一本鎖可変断片（s c F v またはF a b）等の抗体の抗原結合ドメインは、T細胞受容体の膜貫通ドメイン及びシグナル伝達細胞内ドメイン（エンドドメイン）に融合されている。多くの場合、スペーサーまたはヒンジを細胞外抗原結合ドメインと膜貫通ドメインの間に導入して、抗原認識や結合を促すために、抗原結合ドメインを様々な方向に指向させることができる可撓性を付与している。

【0050】

一部の実施形態では、キメラ抗原T細胞受容体の抗原結合部分の一部分が、C E A抗原を標的とし、細胞表面に発現したC E Aを結合させるとわかっている抗体のC E A結合ドメインを含む。キメラ受容体構築物は、当業者に既知の方法及び組成物によって產生され得る。例えば、以下の実施例で使用されるC E A C A R - T構築物は、ヒト化M N 1 4抗体の可変ドメインの一部分を含むものである（米国特許第5,874,540号に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に援用される）。F a b構築物またはs c F v構築物は、N o l a n r a (1999, Clinical Cane Res., 5:3928-3941)の方法により、C E A抗体から產生されて、C E A抗体のC E A結合ドメインを備えることができる。一部の実施形態では、C E A C A R - T構築物は、以下に示す配列番号1のアミノ酸配列を含む：

D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V G T S V A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y W T S T R H T G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P
E D I A T Y Y C Q Q Y S L Y R S F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S
D E Q L K S G T A S W C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S
S P V T K S F N R G E C (配列番号1)。

【0051】

一部の実施形態では、C E A C A R - T構築物は、配列番号1のN末端にシグナル配列をさらに含むが、これはC E A C A R - T構築物のin vivo発現の後に、その構築物から切断される。他の実施形態では、シグナル配列は、配列M G W S C I I L F L V A T A T G V H S (配列番号2)を有する。そして、F a bドメインまたはs c F vドメインが、C D 8ヒンジドメイン (GenBank登録番号N P _ 0 0 1 7 5 9を参照)由来等のヒンジドメインに融合され得る。続いて、ヒンジドメインは、そのC末端で膜貫通ドメインに融合され得る。一実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 3ゼータ鎖 (例えば、GenBank登録番号N P _ 0 0 0 7 2 5)由来であるか、またはC D 2 8タンパク質 (例えば、GenBank登録番号N P _ 0 0 6 1 3 0)由来である。キメラ構築物の膜貫通ドメインは、次いで、そのC末端でC D 3ゼータ鎖 (例えば、GenBank登録番号N P _ 0 0 0 7 2 5)のシグナル伝達ドメインに融合され得る。

【0052】

一部の実施形態では、C E A結合ドメインは、C E Aを結合させる抗体由来のs c F vドメインまたはF a bドメインであり、キメラ受容体構築物は、N末端からC末端の方向に、C E A結合ドメイン (例えば、配列番号1)と、C D 8ヒンジドメインと、ゼータ膜貫通ドメインと、ゼータ細胞質シグナル伝達ドメインとを含んでいる。他の実施形態では

、キメラ受容体構築物は、N末端からC末端の方向に、CEA結合ドメイン（例えば、配列番号1）と、CD8ヒンジドメインと、CD28細胞外ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、及びCD28細胞質共刺激ドメインの各一部分を（N末端からC末端の方向に）備えたドメインと、ゼータ細胞質シグナル伝達ドメインとを含んでいる。

【0053】

代替的な実施形態では、腫瘍細胞の表面に発現したタンパク質に対する既知のリガンドを、T細胞受容体シグナル伝達ドメインに融合して、本明細書で代替的に「キメラリガンドT細胞受容体」または「キメラリガンド受容体」と称されるものを產生する。CAR-T細胞と同様に、キメラリガンドT細胞受容体タンパク質を発現するT細胞は、標的リガンド受容体タンパク質を発現する細胞の存在下で活性化され、その活性化されたT細胞によって、MHCに依存することなく標的細胞を攻撃するようになる。一部の実施形態では、キメラリガンド受容体は、消化管間質腫瘍（GIST）細胞の表面に発現したチロシンプロテインキナーゼKITタンパク質（cKIT受容体またはCD117）に結合するサイトカインであるKITリガンドの細胞外ドメインを含むように、特別に設計されたものである。キメラT細胞受容体は、PCT出願国際公開第2014/121264号（Katzら、J Transl Med., 2013, 11:46も参照）に記載のとおりに操作された。抗KITキメラ受容体がT細胞の表面に発現し、その操作された細胞は、KIT+腫瘍細胞と共に共培養された際に増殖し、IFNを产生することが可能であった。さらに、既定のGIST異種移植片を有し、かつ抗KITキメラリガンド受容体T細胞で処置されたマウスでは、腫瘍増殖速度の有意な減少が示された。したがって、こうしたキメラリガンド受容体T細胞を、本明細書に記載した方法に従って腹腔内癌を治療するのに使用することができると理解される。本明細書に記載した方法で用いるための2つの代替的なCAR-T構築物の模式図を、図1A及び図1Bに提供する。

10

20

30

40

50

【0054】

キメラ受容体細胞内ドメイン

キメラT細胞受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、標的抗原がCARの抗原結合ドメインまたはキメラリガンド受容体のリガンド部分によって結合すると、活性化される。一般的に、内因性CD3T細胞受容体のドメインは、シグナル伝達ドメインとして用いられる。一方、最近になって、第2世代のCAR分子が、共刺激受容体（CD28、41BB、またはICOS等）由来の別の細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含むように設計されて、操作されたT細胞へのさらなるシグナルを提供し、その効力及び/または生存度を改善させることができるようにになっている。第3世代のキメラT細胞受容体は、複数のシグナル伝達ドメインまたはアクセサリー領域を組み合わせて、新規な機能性をもたらしている。さらに、一部の実施形態では、細胞質ドメインが、OX-40共刺激ドメイン、HVEM共刺激ドメイン、41BB共刺激ドメイン、ICOS共刺激ドメイン、OX40共刺激ドメイン、及びCD27共刺激ドメインからなる群から選択される1つ以上の共刺激ドメインをさらに含んでいる。一実施形態では、さらなる共刺激ドメインが、CD28共刺激ドメインとCD3-ゼータシグナル伝達ドメインの間に位置する。

【0055】

IP注入用のキメラ受容体リンパ球

極めて特異的な腫瘍認識と腫瘍致死とを可能にするようにキメラ受容体で改変されたリンパ球は、大きな注目を集めており、次に示す有望な臨床結果を得ている（Gruppら、2013, N Engl J Med, 368: 1509-1518; Porteraら、2011, N Engl J Med, 365: 725-733; Sadelainら、2009, Curr Opin Immunol, 21: 215-223）。本開示の方法で使用することができるリンパ球の種類として、以下に限定されないが、キメラ受容体を発現するように遺伝子改変された末梢ドナーリンパ球（Sadelain, M.ら、2003, Nat Rev Cancer 3: 35-45）、腫瘍生検における腫瘍浸潤リンパ球（TIL）由来のリンパ球培養液（Panel1i, M.ら、2000, J Immunol 164: 495-504; Panel1i,

M. C ら、2000 J Immunol 164: 4382 - 4392)、及び人口抗原提示細胞 (AAPC) またはパルス樹状細胞を用いて選択的に *in vitro* で増殖させた抗原特異的末梢血白血球 (Dupont, J. ら、2005 Cancer Res 65: 5417 - 5427; Papanicolaou, G. A. ら、2003 Blood 102: 2498 - 2505) が挙げられる。T 細胞は、自己由来であっても、非自己由来 (例えば同種異系) であってもよく、または改変された前駆体もしくは幹細胞から *in vitro* で得られてもよい。T 細胞は、末梢血リンパ球 (PBL) または腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を用いて通常実施されるように塊状で調製され、例えば CD4、CD8、CD62L を用いることによって精製され得る。

【0056】

10

免疫応答性細胞 (T 細胞、CTL 細胞、NK 細胞) の遺伝子改変は、実質的に同種の細胞組成物を、組み換え DNA または RNA 構築物を用いて形質導入することによって成し遂げることができる。好ましくは、レトロウイルスベクター (ガンマ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のいずれか) を、DNA 構築物または RNA 構築物を宿主細胞ゲノムに導入するのに用いる。例えば、抗原 (例えば、腫瘍抗原、またはその変異体もしくは断片) を結合させる受容体をコードするポリヌクレオチドを、レトロウイルスベクターにクローニングすることができ、その内因性プロモーター、レトロウイルスの末端長反復、または代替的な内部プロモーターから発現が駆動され得る。非ウイルスベクターまたは RNA も同様に使用することができる。ランダム染色体組み込み、もしくは標的組み込み (例えば、ヌクレアーゼである転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、及び / または CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) を用いる等)、または導入遺伝子発現 (例えば、天然または化学修飾 RNA を用いる等) を利用することができる。

20

【0057】

30

キメラ受容体発現細胞を提供するための細胞の最初の遺伝子改変として、一般的にレトロウイルスベクターが形質導入に用いられるが、任意の他のウイルスベクターまたは非ウイルス送達系を用いることもできる。少なくとも 2 つの共刺激リガンドを備えた抗原提示複合体を含む細胞を提供するための、細胞の次の遺伝子改変として、レトロウイルス遺伝子導入 (形質導入) が有効であることが同様にわかっている。また、レトロウイルスベクターと適正なパッケージング系統との組み合わせも好適であり、ヒト細胞を感染させるにはカプシドタンパク質が機能的であると考えられる。

【0058】

40

さらに別の態様では、本開示は、本明細書に記載の形質導入された T 細胞を、必要とする対象に投与することを容易にする医薬組成物を対象とする。本開示の形質導入された T 細胞は、適正な担体または希釈剤を用いて、医薬組成物か、または *in vivo* での投与に適した移植片に加工することができ、これらはなおも薬学的に許容可能であり得る。こうした組成物または移植片を作製する手段は、当該技術分野で説明されている (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980) を参照)。必要に応じて、形質導入された T 細胞は、半固体または液体の形態 (カプセル剤、溶液、注射剤、吸入剤、またはエアロゾル等) で、それぞれの投与経路に適した通常の方法により製剤化され得る。当該技術分野で既知の手段を利用して、組成物が標的の組織または臓器に到達するまで、組成物の放出や吸収を防ぐか、もしくは最小化することができ、または該組成物の徐放性を確保することができる。しかしながら、望ましくは、キメラ受容体を発現する細胞を損なうことのない薬学的に許容可能な形態が用いられる。したがって、望ましくは、形質導入された T 細胞は、緩衝塩類溶液、好ましくはハンクス液または生理食塩水を含有する医薬組成物に加工され得る。例えば、組成物は、生理学的に許容可能な担体または賦形剤と共に製剤化されて、医薬組成物を調製することができる。担体及び組成物は、無菌であり得る。製剤は、投与様式に適したものであるべきである。

50

【0059】

適切な薬学的に許容可能な担体として、以下に限定されないが、水、塩溶液（例えば、NaCl）、食塩水、緩衝食塩水、アルコール、グリセロール、エタノール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース等の炭水化物、アミロースまたはデンプン、デキストロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、珪酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等、及びこれらの組み合わせが挙げられる。医薬製剤は、所望に応じて、活性化合物と有害な反応を起こすことのない助剤、例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼす塩類、緩衝剤、着色料、香味料、及び／または芳香剤等と混合され得る。

10

【0060】

所望に応じて、組成物は、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含むこともできる。組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤、または粉末であり得る。組成物は、従来の結合剤及び担体（トリグリセリド等）を用いて座薬として製剤化され得る。経口製剤は、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的な担体を含み得る。

20

【0061】

組成物は、ヒトに対する投与に適した医薬組成物として、慣行的な手順に従って製剤化され得る。例えば静脈内投与用の組成物は、無菌等張水性緩衝液の溶液であるのが典型的である。必要に応じて、組成物はまた、可溶化剤、及び注射部位の痛みを軽減するための局所麻酔薬を含んでもよい。一般的に、成分は、例えば凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、活性化合物の量を提示するアンプルまたはサシェ（sachette）等の密封容器に、別々に、または単位剤形の形態で混合されて供給される。組成物を注入によって投与しようとする場合、無菌医薬品グレードの水、食塩水、またはデキストロース／水を含有する注入ピンを用いて調剤することができる。組成物を注射によって投与する場合、注射用の無菌水または食塩水のアンプルを供給でき、投与に先立って成分を混合できるようとする。

30

【0062】

遺伝子改変された免疫応答性細胞を含む本発明の組成物を、選択されたpHに緩衝され得る無菌液体製剤（例えば、等張水溶液、懸濁液、乳濁液、分散液、または粘性組成物）として適宜提供することができる。液体製剤は通常、ゲル、他の粘性組成物、及び固体組成物よりも調製するのが容易である。さらに、液体組成物は、投与するのに、特に注射で投与するのに幾分高い利便性がある。一方で、粘性組成物は、特定の組織とより長い期間接触させるのに適正な粘度範囲内で製剤化され得る。液体組成物または粘性組成物は担体を含むことができ、該担体は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、及びそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。

40

【0063】

当業者は、組成物の成分が、化学的に不活性であるように選択されるべきであり、本発明に記載した遺伝子改変免疫応答性細胞の生存度または効力に影響を与えるものではないことを認識するであろう。これは化学分野及び薬学分野の当業者にいかなる問題を提示するものではなく、または、本開示と本明細書に引用される文献とに基づく標準テキストの参照、もしくは簡易実験（過度の実験作業を要さない）により、問題が容易に回避され得る。

50

【0064】

治療法

本開示は、キメラ受容体T細胞を発現し、かつそれにより腹膜腔内の悪性細胞を標的とし、該悪性細胞に結合して、腫瘍細胞増殖の抑制または腫瘍細胞の死をもたらす、リンパ球の腹腔内注入のための組成物及び方法を説明するものである。腹腔内投与は、高濃度の

治療剤を腫瘍部位に供給して、治療有効性を最大化し、治療用細胞の全身毒性を最小化する。本明細書に記載のデータは、遺伝子操作されたリンパ球が、I P 注入を介して投与された場合、全身注入に比べて有意に高い有効性を有することを示している。これらの細胞の治療有効性は、免疫サプレッサー細胞の阻害剤を使用することにより高められる。

【0065】

キメラ受容体リンパ球の治療的使用は、癌と診断された対象から白血球を採取することと、リンパ球を単離し培養することと、リンパ球をキメラ受容体遺伝子を含むベクターで形質転換することと、得られた改変リンパ球を該対象に投与することと、を含む。対象への投与用に調製された細胞は、精製された細胞（例えば C D 4 + T 細胞）の集団を含み得る。当業者は、種々の周知の方法（蛍光活性化細胞選別（F A C S）等）を用いて、集団における遺伝子改変されたリンパ球の割合を容易に測定することができる。10

【0066】

キメラ受容体 T 細胞は、任意の生理学的に許容可能な媒体で投与され得る。一部の実施形態では、約 1×10^6 個 ~ 1×10^{11} 個、 1×10^6 個 ~ 1×10^{10} 個、 1×10^6 個 ~ 1×10^9 個、 1×10^7 個 ~ 1×10^{11} 個、 1×10^7 個 ~ 1×10^{10} 個、 1×10^7 個 ~ 1×10^9 個、または 1×10^8 個 ~ 1×10^9 個の細胞の用量が投与される。他の実施形態では、約 1×10^6 個、 1×10^7 個、 1×10^8 個、 1×10^9 個、 1×10^{10} 個、または 1×10^{11} 個の細胞の用量が投与される。有効量とみなされる量は、特定の対象のサイズ、年齢、性別、体重、及び状態を含めた、それぞれの対象に対する個々の要因に基づいて、正確に決定され得る。投与量は、本開示及び当該技術の知識から、当業者に容易に確認され、かつ容易に調整され得る。キメラ受容体 T 細胞を含む集団における純度の好ましい範囲は、約 70 % ~ 約 75 %、約 75 % ~ 約 80 %、約 80 % ~ 約 85 % であり、さらにより好ましくは、純度は約 85 % ~ 約 90 %、約 90 % ~ 約 95 %、及び約 95 % ~ 約 100 % である。細胞は、例えば注射またはカテーテルによって投与され得る。また、細胞は低侵襲外科技術により投与され得る。20

【0067】

キメラ受容体 T 細胞は、腹腔内注入を介して、ある一定の期間にわたって 1 回、2 回、3 回、4 回、または 5 回患者に投与される。一定の期間は約 1 か月、2 か月、3 か月、4 か月、または 5 か月であり得る。例えば、キメラ受容体 T 細胞の用量は、1 週間の期間に 1 回、2 回、3 回、または 4 回投与される。さらに、1 週間の投与計画が毎週、隔週、もしくは 3 週間毎、または毎月実行される。あるいは、1 週間の投与計画は、隔週実行される。一実施形態では、キメラ受容体 T 細胞の用量は、1 週間に 3 回、隔週で投与される。投与計画は、腫瘍負荷が、キメラ受容体 T 細胞の初回用量投与前の腫瘍負荷に比べて、少なくとも 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 95 % 減少するまで続けられる。30

【0068】

一部の実施形態では、キメラ受容体 T 細胞は、減量手術を受けた患者を、外科的に可能であるのと同等の無症候状態にするように、該患者に投与される。外科手術の直後に、または外科手術後の 1 日、2 日、もしくは 5 日以内に、患者は C A R - T 細胞の腹腔内注入を受ける。40

【0069】

有効なキメラ受容体 T 細胞治療は、一つにはキメラ受容体 T 細胞の至適用量を決定することにより実現される。キメラ受容体 T 細胞治療の治療有効量は、例えば、C T スキャン、P E T スキャン、または M R I イメージングによって患者の腹部をイメージングすることによって決定され得る。治療有効量は、イメージングにより決定される悪性腫瘍の体積及び / または数を、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、もしくは 90 %、または 100 % 減少させるものである。治療有効量は、腹部における悪性腫瘍の体積及び / または数を、キメラ受容体 T 細胞の初回用量投与後約 5 日、1 週、2 週、4 週、6 週、または 10 週以内に減少させることが予想される。あるいは、治療有効量は、悪性腹水及び / または腹腔内ムチンの量または体積を、投与期間にわ
50

たり少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または 90% 減少させるものである。治療有効量はまた、血清腫瘍マーカー値（標的の腫瘍の種類に利用できる場合）を、投与期間にわたって少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または 90% 減少させるものである。

【0070】

C E A C A R - T 細胞の腹腔内注入

キメラ受容体リノバ球の I P 注入によるキメラ受容体 T 細胞の有効性を、本明細書に記載の方法を用いて明らかにした。未変形の T 細胞または抗 C E A C A R - T 細胞の I P 注入で処置されたマウスにおいて、未処置の動物または未変形の T 細胞で処置された動物と比べて、腫瘍負荷に有意な減少が見られた。腫瘍細胞の表面に発現した標的タンパク質または抗原に、キメラ T 細胞受容体を介して特異的に結合するように操作された任意のキメラ受容体 T 細胞（例えば、C A R - T 細胞またはキメラリガンド受容体 T 細胞）を用いる、本明細書に記載した方法が、腫瘍負荷を低減させるのに有用であることを、当業者は理解するであろう。

【0071】

以下の実施例に示されるように、P C を有するマウスにおける C A R - T の直接 I P 注入は、全身注入よりも腫瘍を制御するのに有効であった。腹膜腫瘍内の C A R - T は、I P 注入後には検出される一方で、全身注射の後には、腹膜腫瘍内に見られなかった。本明細書に記載した I P C A R - T 注入法を使用して悪性腫瘍を治療することにより、有害な副作用も低減する。

【0072】

本明細書に記載の組成物及び方法は、腹腔内腫瘍と診断された患者を治療するために使用される。患者は、C A R - T の I P 注入の後に C A R - T の分布が確実に最適化されるように、最初に診断的腹腔鏡検査を受けて、いかなる腹膜癒着をも溶解させる。この診断的腹腔鏡検査はまた、疾患をアセスメントし、処置前の細胞または組織検体を得るために使用され、及び／または腹膜透析カテーテルの設置のために使用され得る。I P C A R - T 注入は、その後、同一の日か、または次の日に実施され得る。

【0073】

C A R - T の I P 注入は、腹膜腔内に約 1×10^9 個～ 1×10^{11} 個、または約 1×10^{10} 個の細胞の初回量を注入することを含む。C A R - T 細胞は、生理食塩水等の生理溶液に懸濁される。一部の実施形態では、溶液は、約 5%～15% または約 10% のジメチルスルホキシド（D M S O）を含有する。一部の実施形態では、I P C A R - T 注入の直前に、腹水が腹膜腔から排出される。他の実施形態では、C A R - T 細胞の用量を注射する前に吸引が行われて、血液及び／または腸の内容物がないことを確認する。

【0074】

C A R - T 細胞の用量の I P 注入は、手作業で室温にて行われ得る。一部の実施形態では、用量が、約 5 分～60 分、約 30 分～120 分、約 5 分～30 分、約 5 分～20 分、または約 10 分、15 分、20 分、25 分、30 分、45 分、もしくは 60 分の間にわたり注入される。注入は、外来診療で行われ得る。

【0075】

C A R - T 細胞の 1 回以上の追加用量が、初回 I P 注入の後に投与され得る。例えば、追加用量を、毎週、3 日毎、または 5 日毎に投与することができ、該追加用量は、1 回、2 回、または 3 回投与される。他の実施形態では、追加用量は、注入後の評価により悪性腫瘍が腹膜腔内で検出されなくなるまで、毎週、3 日毎、または 5 日毎に投与される。一部の実施形態では、追加用量は初回量と等しい。他の実施形態では、追加用量の各々は、C A R - T 細胞の数に関して、初回量の約 75%、90%、120%、または 150% である。好みの実施形態では、約 1×10^{10} 個の追加用量を、週に 1 回、2～3 週間の間、患者に I P で投与する。

【0076】

一部の実施形態では、腫瘍細胞が腹膜腔の外側に位置する場合の悪性腫瘍の治療方法が

10

20

30

40

50

提供される。IP CAR-T注入が、同時性PCのマウスにおける側腹部腫瘍の増殖を減じるか、または抑制することができるかどうかを判定するための試験を行った。IP CAR-T注入は、顕著なIP応答を誘発しながら、遠隔側腹部腫瘍の増殖を有意に制限することができた（実施例6を参照）。CAR-Tは側腹部腫瘍内では検出されず、このことから、この側腹部腫瘍応答が、IP CAR-T処置の4日後に検出されたIFNの急増に起因していることが示唆された（図7D）。腹膜腫瘍の甚大な破壊を伴うCAR-TのIP注入は、放射線療法で見られるアブスコパル効果と同様な現象を誘発した可能性がある（Parkら、2015，Cancer Immunol Res, 3:610-619）。あるいは、CAR-Tは、早い時点で側腹部腫瘍に浸潤した可能性がある。驚くべきことに、全身注入も、おそらく細胞のほとんどが結節、肺、及び脾臓に移行するために、有意な側腹部腫瘍応答をもたらさず、この経路による不適当なCAR-T投与を反映している可能性がある。重要なことには、血清IFNレベルの急増に付随して、遠隔皮下腫瘍の応答は、IP腫瘍の応答よりも持続性がなかった。逐次的な局所療法及び全身療法が、腹部外疾患という観点で、PCに対する有効性を改善する可能性がある。したがって、一部の実施形態では、腹膜悪性腫瘍と診断された対象が、キメラ受容体リンパ球のIP注入により処置され、続いてキメラ受容体リンパ球の全身注入により処置される治療方法が提供されている。

10

【0077】

PCは、長期の自然経過を有する場合があるので、IP CAR-T注入後のIP腫瘍増殖からの防御持続性を調べた（実施例4を参照）。反復IP CAR-T投与を行った後、マウスが、さらなる10日までの間、複数回のIP腫瘍負荷から防御された。CAR-Tは、最長28日後にPC内で検出可能であった。この所見から、可能性として、CAR-Tがエフェクターメモリーの特徴を獲得した状態で、腹膜空間内でCAR-T持続性を持つことが示唆される。エフェクターメモリー表現型（CD44+CD62L-CCR7-）を備えたCAR-Tは、10日目に比べて28日目において、より高い割合でIP腫瘍内で検出された。これらのデータは、初回IP注入の後、CAR-Tがエフェクターメモリープログラミングされることを示唆し、このことは、腹膜空間内の長期の抗腫瘍防御を説明し得る。

20

【0078】

免疫抑制剤

30

キメラ受容体T細胞注入の治療有効性は、おそらく免疫抑制（例えば、殺腫瘍細胞の抑制または抗腫瘍サイトカインの発現減少等）を引き起こす要因により影響されると考えられる。癌腫の存在下における腹腔内空間の免疫環境の影響を考慮すること、またそれに応じてキメラ受容体T細胞療法を受けている患者を治療することが重要である。

【0079】

腫瘍微小環境内の免疫抑制制御性T細胞（Treg）及び骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）の蓄積は、有効な抗腫瘍免疫療法の開発に対して大きな支障となる可能性をはらんでいる（Weissら、2014，J Immunol, 192:5821-5829）。MDSCを除去することにより、担癌マウス及び癌患者における免疫応答が有意に改善することが示されている（Ostronig-Rosenbergら、2009，J Immunol, 182:4499-4506；Talmadge, 2007, Clin Cancer Res, 13:5243-5248）。キメラ受容体T細胞療法を受けている患者において、例えばTreg及びMDSCによる免疫抑制を阻害するための方法であって、該患者に免疫抑制細胞の機能を阻害する薬剤をさらに投与する方法が、本明細書に提示されている。

40

【0080】

キメラ受容体T細胞による治療の際の免疫抑制活性の度合いを調べることを目的に、Treg及びMDSCを、MC38腫瘍細胞を有するC57BL/6マウスにおいて特性決定した。具体的には、Treg及びMDSCは、抑制活性で重要な役割を果たすと考えられている、それらの細胞表面マーカー、サイトカイン、及び酵素に関して特性決定される

50

。以下の実施例7に示すように、試験により、M D S CとT r e gの両方がI P腫瘍内で検出され得ることが示された。M D S CとT r e gのどちらも、内因性T細胞及びC A R - T抗腫瘍応答の阻害剤として詳しく記載されている(K h a l e dら、2013，I mmu n o l C e l l B i o l , 91 : 493 - 502 ; B u r k h o l d e rら、2014, B i o c h i m , B i o p h y s A c t a , 1845 : 182 - 201)。また、I P M D S Cは、C A R - T抑制の主要なメディエータであるとして前もって示されていた(B u r g a ら、2015, 64 : 817 - 829)高レベルのP D - L 1(プログラム死-1受容体リガンド)を発現した。G r 1(顆粒球性骨髓マーカータンパク質)を結合させるM D S C除去抗体、またはP D - L 1遮断抗体を用いた治療を追加することによって、I P C A R - Tの腫瘍致死という点での性能を高めた。I P C A R - T及びサプレッサー細胞標的の有望な相加効果により、固形腫瘍免疫療法を開発する際のコンビナトリアル戦略が正当化される。したがって、一部の実施形態では、腹膜癌と診断された対象を治療するための方法であって、該対象に、本明細書に記載したキメラ受容体を発現するリンパ球の集団をI P注入を介して投与し、かつ該対象に、M D S CまたはT r e g等のサプレッサーT細胞の活性を抑制する免疫抑制剤をも投与する方法が、提供されている。

10

【0081】

一部の実施形態では、免疫抑制剤は、I L 1 0、P D - 1(プログラム死-1受容体)、P D - L 1(プログラム死-1受容体リガンド1)、P D - L 2(プログラム死-1受容体リガンド2)、I D O(インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ)、S T A T 3(シグナル伝達転写活性化因子3)、G M - C S F、C D 2 5、G I T R(グルココルチコイド誘導性T N F R関連タンパク質)、T G F - 、またはC T L A 4を結合させる抗体である。他の実施形態では、免疫抑制剤は、キメラ受容体リンパ球のI P投与の前に対象に投与される。さらに他の実施形態では、免疫抑制剤は、キメラ受容体リンパ球のI P投与の後に対象に投与される。免疫抑制剤は、キメラ受容体リンパ球のI P投与後に複数回(例えば、毎日、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、または1週間に1回(7日毎))投与され得る。免疫抑制剤は、キメラ受容体リンパ球のI P投与と同日に投与され得る。免疫抑制剤は、キメラ受容体リンパ球のI P投与の1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日以上前に投与され得る。1つ以上の免疫抑制剤が患者に投与される場合があり、例えば対象は、C D 2 5を結合させる抗体と、G R 1を結合させる抗体とを同時投与され得るか、または逐次投与され得る。

20

【0082】

追加治療剤

本開示のキメラ受容体T細胞は、単独で、または他の治療法と組み合わせて使用され得る。免疫調節剤として、以下に限定されないが、インターロイキン(例えばI L - 2、I L - 3、I L - 6、I L - 1 1、I L 7、I L 1 2、I L 2 1及びその他の10種類のインターロイキン)と、顆粒球コロニー刺激因子(G - C S F)及びマクロファージコロニー刺激因子(M - C S F)等のコロニー刺激因子と、-インターフェロン及びエリスロポエチン等のインターフェロンとが挙げられ得る。他の免疫調節剤として、モノクローナル抗体、または免疫阻害経路を標的とするように設計された小分子(T G F またはI L 1 0を結合させ、それによりT G F またはI L 1 0の機能をそれぞれ阻害する抗体またはその断片等)が挙げられ得る。

30

【0083】

好みしい実施形態では、キメラ受容体T細胞の投与は、キメラ受容体T細胞サプレッサー経路を阻害する上記に列挙した1つ以上の薬剤の投与と併用される。例えば、それらを必要とする患者は、キメラ受容体T細胞と、腹腔内注入後のキメラ受容体T細胞のi n s i t u生存率を増加させる薬剤の両方を腹腔内注入される。好みしい実施形態では、患者はキメラ受容体T細胞とI L 2の用量とを投与される。キメラ受容体T細胞の生存率を増加させる薬剤との投与は、キメラ受容体T細胞の投与前、投与間、または投与後に行われ得る。

40

50

【実施例】

【0084】

以下の実施例は本質的に例示であり、何ら限定を意図するものではない。

【0085】

実施例1

CEA CAR-T細胞の調製

本明細書に記載の実施例で使用される抗CEAsclfv-CD28/CD3（タンデム）キメラ抗原受容体を、Emtageら(2008, Clin Cancer Res, 14: 8112-8122)の方法に従って事前に作製した。簡単に言うと、タンデム分子は、ヒトCD28細胞外ドメインと、CD28細胞質ドメインと、細胞質ドメインとをN末端からC末端の方向に備える細胞質ドメインをコードする構築物の上流で、CEAを特異的に結合させるモノクローナル抗体のhMN14sFv-CD8ヒンジ部分を分子的に融合することによって作製された。得られたキメラ構築物を、レトロウイルスベクターにクローニングし、制限消化及び配列決定により確認した。

【0086】

本試験には、ex vivoで組織から単離された際に識別可能なCAR-Tを產生する目的で、6~8週齢のB6.SJL-PtprcaPepcb/BoyJ(CD45.1)マウスをジャクソン研究所から購入した。マウスは、ロジャー・ウィリアムズ・メディカルセンターの動物施設に、IACUC(Intitutional Care and Use Committee)のガイドラインに従って無菌状態で収容された。CD45.1マウスの脾臓を、無菌方式で採取した後に粉碎した。赤血球を溶解し、T細胞をMACS免疫磁気ビーズ分離(Miltenyi(Miltenyi)社)を用いて単離した。T細胞を、IL-2(500IU/mL)と、抗CD3/CD28用のT-Activator Dynabeads(Life Technologies社)と共に完全培地で48時間培養して、活性化させた。hMN14sFv-CD8-CD28/CD3CARを保有するPhoenix ECO(Ecotrophic)細胞(Emtageら、2008, Clin Cancer Res, 14: 8112-8122)を使用して、形質導入用の上清を產生した。活性化T細胞をレトロウイルス上清で培養し、スピノフェクション(spinfection)を2回行った。形質導入T細胞を培養し、IL-2(500IU/mL)の存在下で増殖させ、CAR発現レベルを形質導入の48時間後に調べた。

【0087】

CD3+細胞のCAR発現を、フローサイトメトリーとCEA CAR-T分子のsFv部分を特異的に結合させる抗体とを用いて測定することによって、マウスの脾細胞の形質導入が、形質導入の48時間後に確認された。標準ゲーティング戦略を用いて、CD3とキメラ抗CEA CAR-Tとを発現する生存単一細胞を識別した。その結果、ウイルス形質導入効率は約73%であることがわかった(データは示さず)。

【0088】

実施例2

腫瘍細胞のin vitro致死

ヒトCEAとホタルルシフェラーゼとをコードする遺伝子で安定形質移入された標的細胞であるMC38細胞を用いて、形質導入CAR-T細胞による致死についてin vitroで試験した。最初に、MC38細胞をヒトCEA遺伝子で安定形質移入することにより、MC38CEA+細胞を產生した。MC38CEA+細胞をplenti-III-Ubc-Luciferase(Applied Biological Materials社、カナダのブリティッシュコロンビア州リッチモンド)で形質移入することにより、MC38-lucを產生した。エフェクター細胞は、実施例1に記載のとおりに作製したCEA CAR-T細胞であるか、または、該エフェクター細胞の陰性対照として用いられる非形質導入脾臓T細胞であるかのどちらかとした。バイオルミネッセンスアッセイを行い、CAR-Tまたは非形質導入T細胞を、MC38CEA-lucと、種々の

10

20

30

40

50

エフェクター：標的比で共培養した。アッセイに先立って、エフェクターを I L - 2 (5 0 0 I U / m L) を含む完全培地で培養した。9 6 ウェルの光学プレート内の完全培地に、種々のエフェクター：標的比で細胞を蒔き、一晩インキュベートした。インキュベートした後、培地を廃棄し、そのウェルにルシフェリン (1 5 0 μ g / m L) を加えた。プレートを I V I S 1 0 0 で分析した。上清を採取し、ルミネッセンス活性に関して測定し、溶解率 (S p e c i f i c L y s i s) % を $1 0 0 \times [(\text{実験上の致死 - 自発発光}) / (\text{最大致死 - 自発発光})]$ として計算した。図 2 に見られるように、形質導入 C A R - T 細胞は、非形質導入細胞よりも有意に高い割合で溶解をもたらした。エフェクター：標的比が 0 . 0 3 : 1 と低い場合でも、溶解率は 4 0 % であり、活性化された非形質導入 T 細胞よりも有意に高かった ($p = 0 . 0 2$) 。

10

【 0 0 8 9 】

実施例 3

C A R - T 細胞送達及び腫瘍細胞の致死

I P 送達は、全身尾静脈 (T V) 注入と比べて、腹膜癌 (P C) を有するマウスにおいて C A R - T 有効性を改善させることを明らかにするために、両方の注入方法を定着 I P 腫瘍を有するマウスにおいて試験した。C E A + P C を保有するマウスを、M C 3 8 C E A - l u c 細胞の I P 注射により作製した。

【 0 0 9 0 】

6 ~ 8 週齢の C 5 7 B 1 / 6 J マウスをジャクソン研究所 (メイン州バーハーバー) から購入し、全て i n v i v o モデルで使用した。マウスは、0 日目に $2 . 5 \times 1 0 ^ 6$ 個の M C 3 8 C E A - l u c 細胞を、1 m l のシリンジに取り付けられた 2 6 ゲージ × 1 / 2 インチの針を用いて腹腔内注射された。細胞は注射用の生理食塩水に再懸濁されており、注射は室温で行った。針は恥骨結合の 2 ~ 3 m m 上方の正中筋膜を貫通しており、また注射の前に吸引を行って、血液または腸の内容物がないことを確認した。i n v i v o 作業を 1 4 日間にわたって行った。3 日目と 6 日目とに、担癌マウスを、C A R - T ($2 . 5 \times 1 0 ^ 6$ 個の細胞) を用いて、I P 注入または T V 注入を介して処置した。全マウスには毎日 I L - 2 (1 0 0 0 I U / 注射) が投与されたが、これは 3 日目の初回 C A R - T 注射と共に開始した。対照マウスを、非形質導入脾細胞で 3 日目と 6 日目とに処置するか、または I L - 2 のみで処置した。マウスは、バイオルミネッセンス用に 1 5 m g / m L のルシフェリン 2 0 0 μ L を注射された後、i n v i v o 試験の間、I V I S 1 0 0 イメージングステーション (C a l i p e r L i f e S c i e n c e s 社) で偶数日にイメージングされた。

20

【 0 0 9 1 】

データを図 3 A と図 3 B とに示す。図 3 A では、プロットの各ラインが 4 匹のマウスの平均値を表している。腫瘍のルミネッセンスの減少倍数を、i n v i v o 試験の 4 日目と 1 4 日目の間で計算し、T V と I P の C A R - T 送達を比較した。その結果を図 3 B に示す。図 3 A 及び図 3 B におけるエラーバーは、S E M 値を表す。P 値は、スチュードントの t 検定を用いて計算された。

30

【 0 0 9 2 】

局所送達 I P C A R - T の単一治療により、腫瘍組織量が有意に減少し ($p < 0 . 0 1$) 、連続する各時点で、未処置の動物と比べた場合のこの有意性が維持された。C A R - T の I P 注入は、2 回目の C A R - T 処置後 8 日までの間、全身 T V C A R - T よりも有効性が高いままであった。I P C A R - T とは対照的に、T V C A R - T は、未処置の動物と比較した場合に、1 4 日目まで腫瘍増殖に対する有意な影響を及ぼさなかつた ($p = 0 . 0 4$) 。I P C A R - T 処置マウスは、4 日目と 1 4 日目の間、腫瘍組織量が 1 / 3 7 に減少したのに対し、T V C A R - T 処置マウスは、同一期間の間、腫瘍組織量がわずか 1 / 3 に減少しただけであった ($p = 0 . 0 5$) (図 3 B) 。局所送達 I P C A R - T で処置した 4 匹のマウスにおいて、1 4 日目の剖検の際に検出可能な腫瘍は存在しなかつた。しかしながら、同日のバイオルミネッセンスモニタリングにより、微小腫瘍は未だ検出可能であった。一方、T V で処置した全ての動物には、剖検の際に、肉

40

50

眼で見えるIP腫瘍が全体的に見られた。

【0093】

実施例4

CAR-T細胞による持続的防御

IP CAR-T注入が全身投与よりも優れていることを確認したので、IP腫瘍負荷に対する防御の持続性を評価する試験を行った。IP CAR-T注入処置の後、マウスをIP腫瘍注射を用いて再負荷し、腫瘍の進行をバイオルミネッセンスでモニタリングした。この試験では、マウスは、2日目、4日目、6日目、及び8日目に、CAR-Tを受け、10日目にMC38CEA-1ucを 2.5×10^6 個の用量で再負荷された。実施例3で説明したように、腫瘍増殖をバイオルミネッセンスで測定した。

10

【0094】

事前にCAR-T IP注入を受けたマウスは、事前にCAR-T処置を受けていないマウスに比べて、腫瘍増殖が有意に減少していた($p = 0.02$)。IP腫瘍増殖からの防御は、腫瘍再負荷の後10日までの間に及んだ($p = 0.01$)（図4A）。10日目($n = 5$)と28日目($n = 3$)の両時点におけるIP腫瘍組織から回復したCAR+リンパ球の発生頻度を比較した。少量の肉眼で見える腫瘍が採取され、CAR-Tが10日に腫瘍内白血球の69%を占め、28日目に47%を占めることがわかった（図4B）。CAR+表現型のうちのメモリー表現型を、10日目($n = 5$)と28日目($n = 3$)の両時点でフローサイトメトリーを用いて調べ、そこで腫瘍内CAR-Tを免疫表現型検査した。標準ゲーティング戦略を、CD62L(MEL-14、BD Bioscience社)、CCR7(4B12、BD Bioscience社)、及びCD44(IM7、BD Bioscience社)に対する抗体と共に使用した。エフェクターメモリー表現型(CAR+CD44+CD62L-CCR7-)を有するCAR-Tの割合の増加が腫瘍内CAR-T細胞で検出され（図4C）、このことは、初回IP注入後、CAR-T細胞がエフェクターメモリープログラミングされていることを示唆するものである。

20

【0095】

実施例5

IP CAR-T注入による腹部外腫瘍増殖に対する防御

IP腫瘍の患者が他の解剖学的部位に疾患を有し得ることを考慮して、IP CAR-T注入が皮下側腹部腫瘍増殖に対して防御するかどうかを判定するための試験を行った。マウスは、 1.0×10^6 個のMC38CEA-1uc細胞を、IPと左側腹部とに同時に注射された。側腹部腫瘍のサイズを、ノギスを用いて二次元(mm^2)で測定した。マウスは、実施例3で説明したように15mg/mLのルシフェリン200 μL を注射された後、in vivo試験の間、IVIS100で偶数日にイメージングされた。

30

【0096】

3日目及び6日目に2回の処置を行った後、IP CAR-Tは、IP及び側腹部の腫瘍組織量を、未処置の動物に比べて($p < 0.05$)、ならびに非形質導入脾臓T細胞を受けた動物に比べて（データは示さず）減少させた。腫瘍はまた、TVを介してCAR-Tを受けたマウス及びIL-2の補助のみを受けたマウスと比べて、優位に減少する傾向にあった。このことは、IP CAR-T処置マウスにおける側腹部腫瘍面積が、同日の未処置の動物に比べて有意に小さいことに符合した($p = 0.03$ 、図5A、図5B、及び図5C)。CAR-Tは、全血液、側腹部腫瘍組織、または左鼠径リンパ節内輸送用のフローサイトメトリー染色の後、回復しなかった。しかしながら、IP CAR-T注入は、処置後4日で高レベルの全身IFN- γ をもたらした。（図5D）

40

【0097】

実施例6

免疫抑制細胞によるIP腫瘍浸潤

IP CAR-T注入は、PCを有するマウスにおいて持続的応答を媒介したが、免疫抑制細胞がCAR-Tの機能を制限し得ることは考慮に値した。大腸癌LMモデルにおいてCAR-Tを抑制するとして先に示したMDSC及びTreg（非特許文献14）は、

50

I P 腫瘍内で検出されていた。

【0098】

腫瘍白血球内容物を実施例3で説明したようにフローサイトメトリーを用いて免疫表現型検査して、抑制細胞集団の存在を検出した。これらの表面マーカーに対して以下の抗体を使用した：CD4（RM4-5、BD Bioscience社）、CD11b（M1/17、BD Bioscience社）、Ly6C（AL-21、BD Bioscience社）、Ly6G（1AB、BD Bioscience社）、PD-L1（MIH5、BD Bioscience社）。細胞内FoxP3染色を、Mouse FoxP3 Permeabilization Kit（BD Bioscience社）を用いて行った。単一の染料及びアイソタイプ対照を各実験に用いた。得られたフロー試料の分析をFlow Joソフトウェア(Tree Star株式会社、オレゴン州アッシュランド）を用いて行った。10

【0099】

腫瘍白血球内容物を免疫表現型検査して、抑制細胞集団の存在を検出した。MDSCは、CD11b、Ly6C、及びLy6Gに対して染色した後の腫瘍内で見つけられた。代表的な点図は、I P 腫瘍由来のMDSCを示し、腫瘍由来のMDSC集団と、同一の未処置動物の脾臓由来のMDSC集団とを比較する棒グラフと併記されている。全生細胞中のCD11b+細胞の割合と、CD11b+細胞中のMDSC（Gr-1+）の割合とを図6A及び図6Bに示す。MDSCはまた、免疫抑制マーカーPD-L1の発現に関して免疫表現型検査された（図7A及び図7B）。代表的な腫瘍点図では、Treg（CD3+CD4+T細胞中のFoxP3+細胞の割合として表示）がI P 腫瘍内でも見つけられたことが示されている。同様の集団が、同一動物の脾臓内で見つけられた（図8A及び図8B）。棒は、1グループあたり3匹のマウスを反映している。エラーバーは、SEM値を表す。P値は、スチューデントのt検定を用いて計算された。20

【0100】

CD11b+細胞は、平均して、I P 腫瘍における白血球のうちの57%を占め、これは同一動物の脾臓由来の11%と比較された（p < 0.01）。Ly6G+顆粒球性MDSC（gMDSC）と、Ly6C+单球MDSC（mMDSC）の両方が、I P 腫瘍内（43%）及び脾臓内（41%）で見つけられた（図6A及び図6B）。免疫抑制マーカーPD-L1が、腫瘍由来か脾臓由来かにかかわらず、両MDSCサブセットに発現し、かつ同等の高レベルで発現されていた（図7A及び図7B）。Treg（FoxP3+）は、腫瘍内のCD4 T細胞のうちの82%を占めることがわかり、これは同一の動物由来の脾臓内の7%と比較された（p < 0.01）（図8A及び図8B）。30

【0101】

実施例7

サプレッサー細胞除去と併用したCAR-Tの投与

サプレッサー細胞除去、またはPD-1/PD-L1免疫抑制経路の遮断と併用した、I P CAR-T注入の予想される治療有効性を調べるための試験を行った。I P CAR-Tが、MDSC及びTregに対する除去抗体またはPD-L1経路の遮断抗体と組み合わせられ、MC38CEA-1ucを注射済みのマウスに投与された。投与された除去抗体は、抗PD-L1及び抗Gr1抗体（PD-L1タンパク質及びGr1タンパク質をMDSCの表面で結合させる抗体）、ならびに抗GITR抗体（GITRタンパク質をTreg細胞の表面で結合させる抗体）とした。腫瘍の減少を、実施例3で説明したように14日間にわたってバイオルミネッセンスによりモニタリングした。40

【0102】

棒グラフは、処置後8日目における局所的I P CAR-Tの有効性を全身TV CAR-Tと比較し（図9A）、処置後8日目におけるI P CAR-T単体を抗体併用のI P CAR-Tと比較し（図9B）、14日目の試験終了時における局所的I P CAR-Tの有効性を全身TV CAR-Tと比較し（図10A）、14日目の試験終了時におけるI P CAR-T単体を抗体併用のI P CAR-Tと比較している（図10B）。50

棒は、1グループあたり4体の動物を反映している。エラーバーは、SEM値を表す。P値は、スチュードントのt検定を用いて計算された。肉眼検査画像とバイオルミネッセンス画像とが同様に分析された（データは示さず）。

【0103】

I P C A R - T 単体により、またそれを抗P D - L 1 抗体、抗G r 1 抗体、または抗G I T R 抗体と併用して用いた場合により、未処置の動物と比べて腫瘍組織量が有意に減少した。14日目において、C A R - T 単体では、未処置のマウス、非形質導入T細胞を受けたマウス、及びI L - 2 単体の1日用量を受けたマウスと比べて腫瘍組織量が有意に減じた（図10A、 $p < 0.05$ ）。T reg除去と併用したC A R - T では、C A R - T 単体よりも腫瘍組織量がさらに減少し（図10B、 $p < 0.01$ ）、同様にC A R - T とM D S C 除去との併用でもさらに減少する（ $p = 0.017$ ）（図10A及び図10B）ことが示された。腫瘍組織量を、14日まで測定し、その結果を図11に示している。C A R - T と抗G r - 1との併用は全体として最も効果が高く、8日目と10日目にはバイオルミネッセンスが検出不可となることを示した。14日目に、I P C A R - T を受けたどのマウスにおいても、肉眼による検査では、いかなる検出可能な腫瘍も見られなかった（データは示さず）。

10

【0104】

実施例8

患者のC A R - T 細胞產生

白血球除去輸血を、認可された血液センターで行う。C A R - T は、医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準（G M P）に従う施設で、処理、製造、増殖、用量採取、ラベリング、保管、及び分配に関して標準操作手順（S O P）を用いて調製される。簡潔に述べると、患者の末梢血単核球（P B M C）を、白血球除去製剤からフィコールを用いて単離する。次に、5%無菌ヒトA B 血清と、50ng/m Lの抗C D 3 モノクローナル抗体と、300~3000U/m LのI L 2とを添加した、A I M V 培地（L i f e T e c h n o l o g i e s社、ニューヨーク州グランドアイランド）を入れた組織培養フラスコで、P B M Cを48時間~72時間活性化する。

20

【0105】

スピノキュレーション法（例えば、Q u i n t a s - C a r d a m a ら、2007, H u m G e n e T h e r , 18 : 1253 - 1260）を用いて、 7.2×10^8 個~ 14.4×10^8 個のT細胞を、レトロネクチンがコーティングされた6ウェルプレートにて、5%ヒトA B 血清と、3000U/m LのI L 2と、プロタミンとを含有するA I M V 培地で、室温での低速遠心分離により1時間形質導入する。形質導入工程は、24時間にわたって合計2回~3回行う。形質導入の後、細胞を培養液で洗浄し、37

30

で48時間~72時間インキュベートする。C A R - T を、L i f e c e l l 純粋培養バッグ（B a x t e r社、イリノイ州ディアフィールド）内で10日間~14日間さらに増殖させる。C A R - T 増殖曲線及び細胞生存率を定期的に調べ、細胞増殖培地を必要に応じて交換する。C A R - T を、フローサイトメトリーにより、C D 3 抗体、C D 4 抗体、C D 8 抗体、及び抗C A R 抗体に対して特異的な蛍光標識抗体を用いて調べる。フローサイトメトリーを、C y A n（ベックマン・コールター社、カリフォルニア州ブレア）装置またはL S R - I I (B D B i o s c i e n c e s社、カリフォルニア州サンノゼ）装置で行う。患者産物のin vitro活性をバイオルミネッセンス細胞毒性アッセイにより測定する。適正な標的を備えたルシフェラーゼ発現腫瘍細胞を、特異的C A R - T と、種々の割合で96ウェル丸底プレートにて混合し、各ウェルからのバイオルミネッセンスの減少を測定する（K a r i m i ら、2014, P l o S O n e , 9 : e 8 9 3 5 7）。

40

【0106】

臨床用量を、F e n w a l lセルハーベスターシステム（B a x t e r社、イリノイ州ディアフィールド）を用いて、P l a s m a L y t e (B a x t e r社)、20%ヒトウシアルブミン、10%D M S O、及びI L 2を含む凍結培地で調製する。細菌培養及び真菌

50

培養を、それぞれ 14 日間及び 28 日間モニタリングする。細菌内毒素に関するアッセイを、LAL エンドトキシンアッセイキット（ロンザ社、メリーランド州ウォーカーズビル）を用いて行う。臨床用量を液体窒素中に保管し、注入の直前に解凍する。

【0107】

実施例 9

マウスモデルにおける用量の決定

動物試験を行って、IP 腫瘍細胞の致死を達成するのに必要な CAR-T 細胞の最小量を特定する。癌腫症のマウスモデルを、C57BL/6 マウスに腫瘍抗原発現腫瘍細胞を注射することによって作製する。抗原発現腫瘍細胞を、初代マウスの大腸癌由来の結腸直腸癌細胞株である MC38 細胞株から作製する（Rosenbergら、1986, Science, 233: 1318-1321）。MC38 細胞を、レトロウイルス発現ベクターを用いて完全長ヒト抗原 cDNA で形質導入する。また、MC38 細胞を、ルシフェラーゼ遺伝子で安定形質移入する。C57BL/6 マウスに、 2.5×10^6 個のマウス結腸直腸癌細胞を腹腔内注射する。腫瘍細胞の注射の 7 日後、マウスに、 2.5×10^6 個、 2.5×10^7 個、または 2.5×10^8 個の特異的 CAR-T 細胞を、腹膜腔に直接挿入される針を用いて注入する。各マウスは、CAR-T 注入の後、毎日 IL2 ($1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の $200 \mu\text{l}$) の皮下注射を受ける。

【0108】

CAR-T 細胞の注入後、例えば、IVIS システム（パーキンエルマー社）を用いてバイオルミネッセンスを測定することにより、腫瘍増殖及び処置応答に関してマウスをモニタリングする。腹腔外またはオフターゲットの CAR-T 送達を評価するために、フローサイトメトリーを、末梢血、肝臓、肺、腎臓、結腸、及び胃で行い、これらの部位での CAR+T 細胞の頻度を測定する。さらに、動物の生存時間を慎重にモニタリングし、チャートに表す。

【0109】

実施例 10

CAR-T 持続期間及び複数回 CAR-T 注入

実施例 3 で説明した試験に従って処置されたマウスが、単回の IP CAR-T 注入に対して完全寛解を達成できない場合、単回 IP 注入後の IP 腫瘍における CAR-T 持続期間を算出し、かつ複数回の CAR-T 注入の治療効果を調べるための試験を行う。

【0110】

単回 IP 注入後の IP 腫瘍における CAR-T 持続期間を、実施例 3 で説明したマウスモデルを用いて算出する。実施例 3 で算出した至適用量を用いて、定着 MC38 IP 腫瘍を有する 10 匹のマウスを、特異的 CAR-T の IP 注入で処置する。フローサイトメトリーにより、CAR に特異的なモノクローナル抗体を用いて、処置後 1 日目、2 日目、4 日目、7 日目、14 日目、及び 21 日目に腫瘍及び腹水を分析する。

【0111】

CAR-T 持続期間と、実施例 3 で明らかにした抗 CAR-T の単回投与が腫瘍進行に及ぼす影響とに基づいて、複数回 CAR-T 注入の投与計画を設定し、複数回注入治療レジメンで用いる。

【0112】

IP 腫瘍における CAR-T 持続性が特に短期（2 日～3 日以内）である場合、全身照射プレコンディショニング戦略を利用して、宿主動物での CAR-T 生着を促進する。

【0113】

実施例 11

化学療法剤を併用した IP CAR-T 治療

患者への CAR-T の IP 送達は、医薬品の臨床試験の実施に関する基準（GCP）ガイドラインに従って行われる。患者は最初に、腹膜癒着の溶解、疾患アセメント、処置前の生物検体の取得、及び腹膜透析カテーテルの設置のために、手術室で診断的腹腔鏡検査を受ける。手術後 1 日目に、約 1×10^{10} 個の CAR-T を、10% のメチルスルホ

10

20

30

40

50

キシドを含む200mlの生理食塩水(NS)で注入する。この注入は、ベッドサイドで、バイタルサインを継続的にモニタリングしながら、15分間にわたる手動注射により行われる。追加のCAR-T用量である 1×10^{10} 個の細胞を、1週間間隔で2回投与する。

【0114】

初回CAR-T投与の6週後、患者を診断的腹腔鏡検査のために手術室に戻して、疾患応答をアセスメントし、治療後の生物検体を得る。

【0115】

実施例12

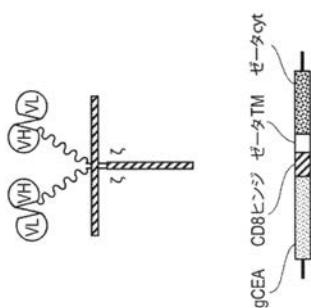
化学療法剤を併用したIP CAR-T処置

マウスモデルにおいて、化学療法剤であるシクロホスファミドがCAR-T細胞の治療有効性に及ぼす影響を、上述と同様の方法を用いて調べる。C57BL/6マウスに、 2.5×10^6 個の腫瘍細胞を腹腔内注射する。この注射の7日後、マウスは、実施例1で説明したとおりに作製したCAR-T細胞のIP注射を受ける。マウスはまた、シクロホスファミドのIP注射を受ける。シクロホスファミドは、CAR-T注入の1日前に投与され、次いで、総計4回の抗体投与向けにCAR-T投与後2日毎に投与される。マウスの対照群は、CAR-T注入に対して、同一の投与計画を用いて食塩水の注射を受ける。各処置の有効性は、バイオルミネッセンス及びマウスの生存時間を測定することにより評価する。

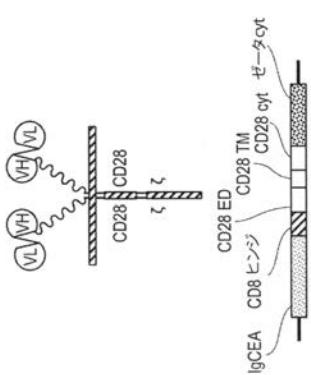
【0116】

多くの典型的な態様及び実施形態を上記に論じてきたが、当業者は、その特定の変更、置換、付加、及びサブコンビネーションを認識するであろう。したがって、以下の添付の特許請求の範囲及び以下に記載される特許請求の範囲は、こうした変更、置換、付加、及びサブコンビネーションの全てを、その真の趣旨及び範囲内にあるものとして含むと解釈されることが意図される。

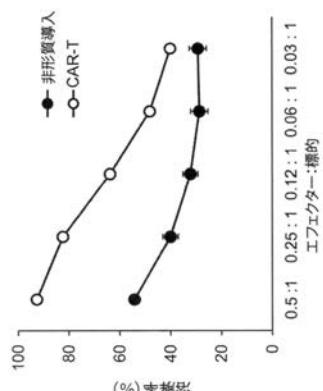
【図1A】



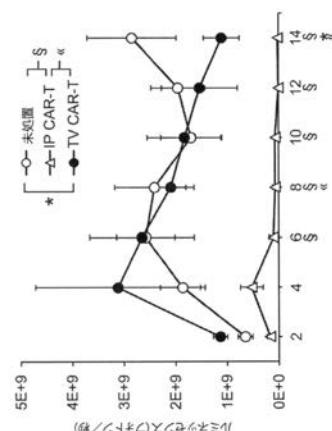
【図1B】



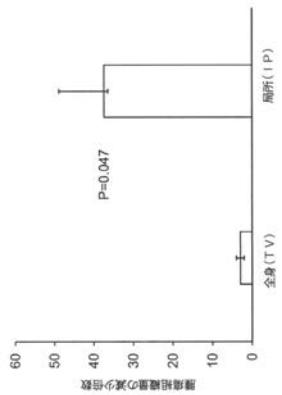
【図2】



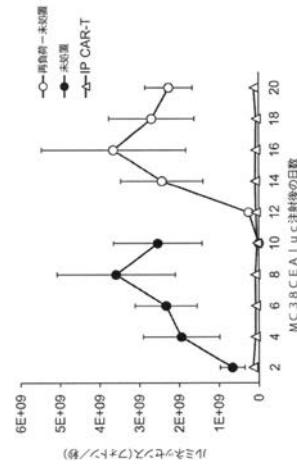
【図3A】



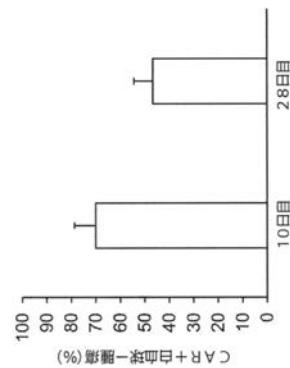
【図 3 B】



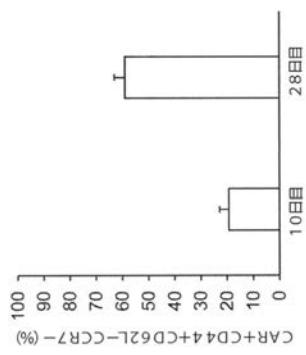
【図 4 A】



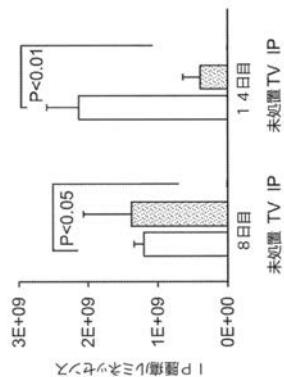
【図 4 B】



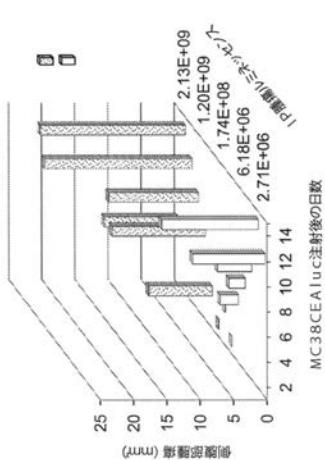
【図 4 C】



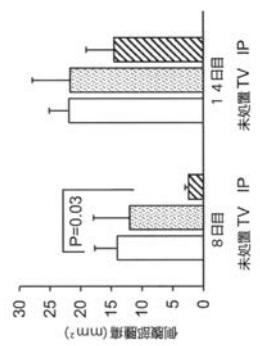
【図 5 B】



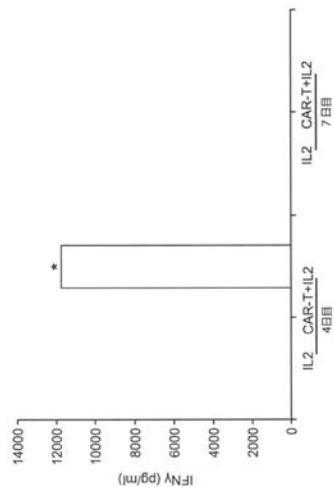
【図 5 A】



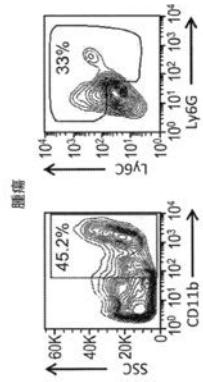
【図 5 C】



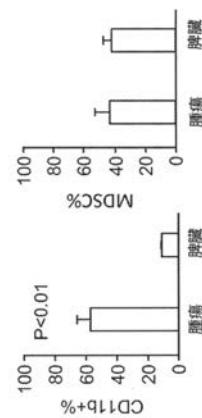
【図 5 D】



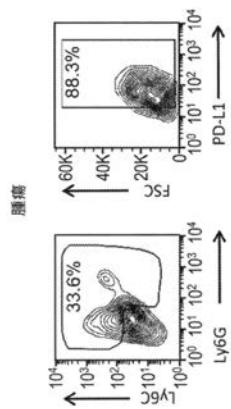
【図 6 A】



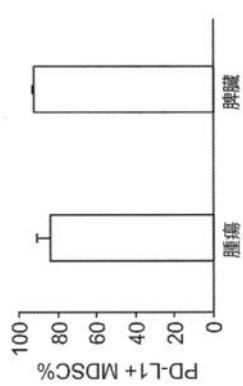
【図 6 B】



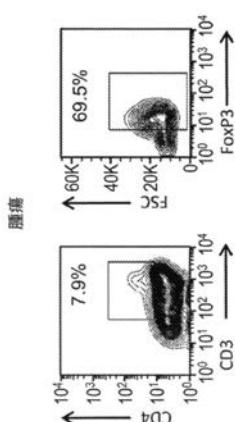
【図 7 A】



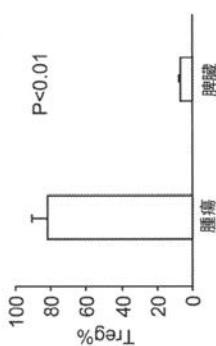
【図 7 B】



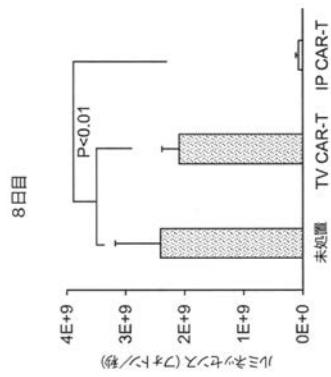
【図 8 A】



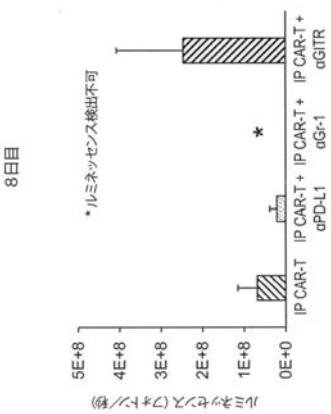
【図 8 B】



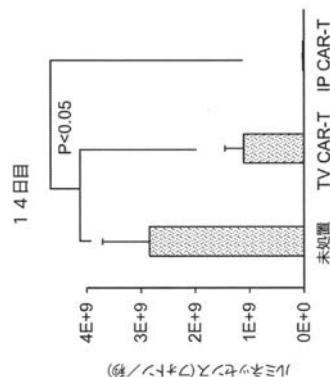
【図 9 A】



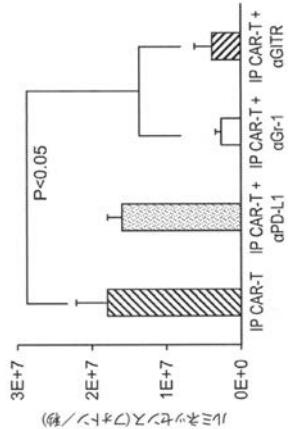
【図 9 B】



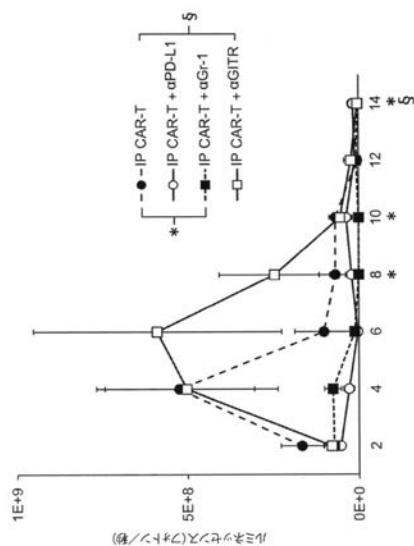
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 11】



【配列表】

2018521069000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/042302
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00; A61P 35/00; C07K 14/725; C07K 16/28; C12N 5/0783; C12N 5/10 (2016.01) CPC - A61K 35/17; A61K 39/0011; A61K 2039/5158 (2016.09) 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 - A61K 39/00; A61P 35/00; C07K 14/725; C07K 16/28; C12N 5/0783; C12N 5/10 CPC - A61K 35/17; A61K 39/0011; A61K 2039/5158		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/155.1; 435/325; 530/388.8 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, PubMed Search terms used: chimeric antigen receptor T cell CAR-T cell peritoneal cancer Pseudomyxoma peritoneal carcinomatosis		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -	POINT et al. "Anti-CEA chimeric antigen receptor T cells in combination with suppressor cell targeting for the treatment of colorectal cancer peritoneal metastases (VACTP-1043)." The Journal of Immunology, 01 May 2015 (01.05.2015), Vol. 194, No. 1, Meeting Abstract, entire document	1, 2, 4a, 5a ----- 3
Y	US 2014/0050708 A1 (POWELL et al) 20 February 2014 (20.02.2014) entire document	3
A	CHEKMASOVA et al. "Successful eradication of established peritoneal ovarian tumors in SCID-Beige mice following adoptive transfer of T cells genetically targeted to the MUC16 antigen," Clin Cancer Res, 13 July 2010 (13.07.2013), Vol. 16, Pgs. 3594-606, entire document	1-3, 4a, 5a
A	US 2007/0031438 A1 (JUNGHANS) 08 February 2007 (08.02.2007) entire document	1-3, 4a, 5a
P, X	KATZ et al. "Regional CAR-T cell infusions for peritoneal carcinomatosis are superior to systemic delivery," Cancer Gene Ther. 15 April 2016 (15.04.2016), Vol. 23, Pgs. 142-8 entire document	1-3, 4a, 5a
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* 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 23 September 2016		Date of mailing of the international search report 20 OCT 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/042302						
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:								
<ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> 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. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4b, 5b, 6, 7 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:								
<ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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.: 								
Remark on Protest <table style="margin-left: 20px; border: none;"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>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.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	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.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	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.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/16 (2006.01) C 1 2 N 5/16

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,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,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74) 代理人 100068755
弁理士 恩田 博宣

(74) 代理人 100142907
弁理士 本田 淳

(74) 代理人 100152489
弁理士 中村 美樹

(72) 発明者 カツ、スティーブン シー。
アメリカ合衆国 02906 ロードアイランド州 プロビデンス メドウェイ ストリート
156 ユニット 1

(72) 発明者 ユンハンス、リチャード
アメリカ合衆国 02116 マサチューセッツ州 ボストン リンデボロ プレイス 1
F ターム(参考) 4B065 AB01 BA02 CA44
4C084 AA02 AA19 BA44 DA08 MA16 MA21 MA56 NA05 NA13 ZB261
ZC412
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 CA04 CA12 MA56 NA13 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 EA20 FA74