

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第6996772号**  
**(P6996772)**

(45)発行日 令和4年2月21日(2022.2.21)

(24)登録日 令和3年12月20日(2021.12.20)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/12 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/46 (2006.01)		C 0 7 K	14/46	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)		C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)		C 1 2 N	5/10	

請求項の数 8 (全31頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-512782(P2019-512782)  
 (86)(22)出願日 平成29年8月11日(2017.8.11)  
 (65)公表番号 特表2019-530441(P2019-530441)  
 A)  
 (43)公表日 令和1年10月24日(2019.10.24)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/046630  
 (87)国際公開番号 WO2018/052594  
 (87)国際公開日 平成30年3月22日(2018.3.22)  
 審査請求日 令和2年8月7日(2020.8.7)  
 (31)優先権主張番号 62/383,139  
 (32)優先日 平成28年9月2日(2016.9.2)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/419,817  
 (32)優先日 平成28年11月9日(2016.11.9)  
 最終頁に続く

(73)特許権者 508057896  
 コーネル・ユニバーシティ  
 CORNELL UNIVERSITY  
 アメリカ合衆国 14850 ニューヨーク  
 州イサカ、パイン・トゥリー・ロード 3  
 95番、スヴィート310  
 (74)代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74)代理人 100123582  
 弁理士 三橋 真二  
 (74)代理人 100117019  
 弁理士 渡辺 陽一  
 (74)代理人 100141977  
 弁理士 中島 勝  
 (74)代理人 100150810

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I C A M - 1 に特異的な I ドメインキメラ抗原受容体

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

N末端からC末端にかけて、

( i ) ヒトリンパ球機能関連抗原1の L サブユニットの I ドメインと、

( i i ) 膜貫通ドメインと、

( i i i ) 少なくとも1つの共刺激ドメインと、

( i v ) 活性化ドメインと、

を含み、前記 I ドメインが、配列番号1の130～310アミノ酸の配列を含み、F 2 9  
 2 A、F 2 9 2 S、L 2 8 9 G、F 2 9 2 G、またはF 2 6 5 Sのうちの1つの変異を有する、キメラ抗原受容体(CAR)。

**【請求項 2】**

前記共刺激ドメインが、CD28、4-1BB、ICOS-1、CD27、OX-40、GITR、およびDAP10からなる群より選択される、請求項1に記載のCAR。

**【請求項 3】**

前記活性化ドメインがCD3ゼータである、請求項1に記載のCAR。

**【請求項 4】**

請求項1に記載のCARをコードする単離された核酸。

**【請求項 5】**

請求項1に記載のCARを発現するように改変されたT細胞またはナチュラルキラー細胞。

**【請求項 6】**

請求項5に記載のC A R - T 細胞を含む、癌を治療するための養子細胞療法のための医薬組成物であって、

癌に罹患している対象に投与され、

前記対象の前記癌細胞はI C A M - 1 を過剰発現し、前記C A R - T 細胞は、前記癌細胞を死滅させるために、前記癌細胞へ結合する、医薬組成物。

**【請求項 7】**

前記癌が甲状腺癌、胃癌、肺癌、または乳癌である、請求項6に記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

N末端からC末端にかけて、

(i) ヒトリンパ球機能関連抗原1のLサブユニットのエドメインと、

10

(ii) 膜貫通ドメインと、

(iii) 少なくとも1つの共刺激ドメインと、

(iv) 活性化ドメインと、を含み、

前記エドメインが、配列番号1の130～310アミノ酸の配列を含み、F265S/F292G/G311Cの3つの変異を有する、キメラ抗原受容体(C A R)。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

配列表、表またはコンピュータプログラムへの参照

配列表は、作成日2017年7月17日、サイズ9.89キロバイトの、「Sequence Listing.txt」というファイル名を有する、E F S - W e bを介したA S C I I形式のテキストファイルとして、本明細書と同時に提出される。E F S - W e bを介して提出された配列表は、本明細書の一部であり、その全体が参考により本明細書に組み込まれる。

20

**【0002】**

本発明は、ヒトエドメインを含むI C A M - 1 に特異的なキメラ抗原受容体に関する。本発明は特に、I C A M - 1 に対して異なる親和性(1mM～1nM)を有するヒトエドメインを含むキメラ抗原受容体に関する。

**【背景技術】**

**【0003】**

30

免疫療法は、癌の治療のための非常に有望なアプローチとして浮上している。

**【0004】**

T細胞をC A Rで遺伝子改変することは、腫瘍特異的T細胞を設計するための一般的なアプローチである。腫瘍関連抗原を標的とするC A R(キメラ抗原受容体)-T細胞は、効率的な免疫療法アプローチを代表して、患者に注入することができる(養子細胞移植またはA C T)。化学療法または抗体と比較したC A R - T技術の利点は、再プログラムされた操作されたT細胞が患者内で増殖および持続することができ、生きた薬のように作用することである。

**【0005】**

C A R分子は、T C Rゼータ鎖とC D 2 8 および/または4 - 1 B B のような共刺激分子とからなる細胞内シグナル伝達ドメインへ融合した合成結合部分、典型的には抗体由来一本鎖フラグメント可変(s v F v)要素または任意の天然抗原感知要素からなる1、2。C A R媒介性標的化の利点には、以下のものが含まれる：1) 天然の非統合型T C Rおよび共刺激シグナル伝達と比較した場合の、単一の結合事象を介した活性化、増殖、および生存シグナルのシス内での提供、2) M H C非依存性抗原認識を介した腫瘍細胞によるM H Cの下方調節を迂回する能力、ならびに3) C A Rと抗原との間の高親和性相互作用によって可能となる活性化閾値の低下および低い抗原密度の腫瘍細胞の認識3、4。

40

**【0006】**

理想的なC A R標的抗原は、多量に発現し、健常組織においては検出できない、天然の表面露出腫瘍新抗原であろう。しかしながら、このような抗原の絶対的な希少性のために、

50

多くの一般的に標的とされる固体腫瘍抗原は、低レベルではあるにもかかわらず、非腫瘍組織によっても発現する。このような抗原に対して高い親和性を有するCAR分子は、健常組織の付帯的な標的化をもたらし得、その結果、これまでのCAR-T細胞療法の進歩に対する主要な制限要因である、オンターゲットオフ腫瘍毒性が生じる。

#### 【0007】

従来のCARは、一本鎖抗体フォーマットを使用して構築されており、標的抗原に対してナノモル濃度未満から低ナノモル濃度の親和性を有するように選択的に操作されている。しかし、CAR-T細胞の感度の上昇は、眞の腫瘍抗原または最高レベルの制限を有する腫瘍抗原を標的とするときにだけ利点であり得る<sup>17, 36</sup>。そうでなければ、感度の上昇は、抗原密度にほとんど敏感ではない様式で、標的発現細胞の溶解による選択性の低下という代償を払う<sup>18</sup>。

10

#### 【0008】

改善された治療指数を有するCAR、すなわち全身レベルの毒性を最小限にしながら腫瘍を殺滅することができるCARに対する需要が存在する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0009】

【図1A】段階的に $10^6$ 倍の親和性の変化を有するICAM-1特異的CARの構造およびこのCARの試験管内での結果を示す。ICAM-1との複合体におけるLFA-1の概略図。および鎖、およびLFA-1インテグリンのモジュールドメインが標識される。LFA-1とICAM-1との相互作用に必要な金属イオンは円で示される。

20

【図1B】段階的に $10^6$ 倍の親和性の変化を有するICAM-1特異的CARの構造およびこのCARの試験管内での結果を示す。ICAM-1(D1)のLFA-1 IDメインとN末端ドメインとの構造モデルがリボン図で描かれている。N末端およびC末端、ならびに変異ホットスポットが示されている。

【図1C】段階的に $10^6$ 倍の親和性の変化を有するICAM-1特異的CARの構造およびこのCARの試験管内での結果を示す。マウスICAM-1上に流されたF265S/F292G<sup>\*</sup>を除く、固定化ヒトICAM-1に結合するIDメイン変異体のSPRセンサーグラム(Jinら<sup>54</sup>の図2、およびWongら<sup>55</sup>の図1を改変)。

【図1D】段階的に $10^6$ 倍の親和性の変化を有するICAM-1特異的CARの構造およびこのCARの試験管内での結果を示す。IDメインCARをコードするレンチウイルスベクターの概略図。LTR=長い末端反復、SD=スプライスドナー、SA=スライスアクセプター、+ = パッケージングシグナル、SS=シグナル配列、TM=膜貫通、Cyt=サイトゾルドメイン。

30

【図1E】段階的に $10^6$ 倍の親和性の変化を有するICAM-1特異的CARの構造およびこのCARの試験管内での結果を示す。Myctag付きCAR(TM、F292G、F292A、WT IDメイン)を形質導入したジャーカットT細胞へ結合する抗Myctag抗体。NT=形質導入されていない。

【図1F】段階的に $10^6$ 倍の親和性の変化を有するICAM-1特異的CARの構造およびこのCARの試験管内での結果を示す。HEK293T細胞で発現したCARに対する組換えICAM-1-Fcの結合。

40

【図1G】段階的に $10^6$ 倍の親和性の変化を有するICAM-1特異的CARの構造およびこのCARの試験管内での結果を示す。ジャーカットT細胞で発現したIDメインCARと可溶性ヒト(上)およびマウス(下)ICAM-1(CD54)被覆表面との間の相対的な結合親和性を測定するV底接着アッセイ。n=3、ダネットの多重比較検定による\*対NTについてp<0.01。

【図2A】初代CAR-T細胞の試験管内での親和性および抗原密度依存的活性化を示す。異なるIDメインCARを形質導入された初代T細胞による標的死滅を測定するためのエフェクター：標的(E:T)アッセイ。各標的を5:1のE:T比でTM、F292G、F292AまたはWT CAR-T細胞とともに個別にインキュベートした。生存百分率をNT-T細胞とともにインキュベートした標的細胞からの発光に対して正規化した(n

50

= 3、 $\pm$  = 標準偏差 ( S D ) )。可変傾斜シグモイド曲線式を使用して、データを当てはめた。<sup>\*</sup>は、ダネットの多重比較検定により、N T に対して  $p < 0 . 0 1$  である。

【図 2 B】初代 C A R T 細胞の試験管内での親和性および抗原密度依存的活性化を示す。50%殺滅とシグモイド式のヒル傾斜との最適当てはめ値を I D M E I N C A R の親和性に対してプロットした。0 . 8 5 よりも大きな r 二乗値を有する最適当てはめ値をプロットした。

【図 2 C】初代 C A R T 細胞の試験管内での親和性および抗原密度依存的活性化を示す。H e L a 細胞と比較した初代 T 細胞における I C A M - 1 の発現。灰色および黒色のヒストグラムはそれぞれ、非標識細胞および R 6 . 5 抗体標識細胞に対応する。

【図 2 D】初代 C A R T 細胞の試験管内での親和性および抗原密度依存的活性化を示す。I F N - 放出を、24時間の異なる標的細胞との共インキュベーション後に、各 C A R 变異体についての E L I S A により測定した ( n = 3 ) 。<sup>\*</sup>は、ダネットの多重比較検定により、8505C / - I C A M - 1 に対して  $p < 0 . 0 1$  である。

【図 3 A】マイクロモル濃度レベルの親和性を示す C A R T 細胞が、優れた腫瘍根絶、腫瘍の再発の抑制、および生存の利益を提供することを示す。全身発光撮像を用いて、腫瘍植込みの8日後に、異なる C A R T 細胞变異体を注入したマウスにおける腫瘍量を推定した。Tなし = T 細胞を注入していないマウス。

【図 3 B】マイクロモル濃度レベルの親和性を示す C A R T 細胞が、優れた腫瘍根絶、腫瘍の再発の抑制、および生存の利益を提供することを示す。腫瘍植込み10日後にマウスを C A R T 細胞で処置した。N T = 形質導入されていない T 細胞。

【図 3 C】マイクロモル濃度レベルの親和性を示す C A R T 細胞が、優れた腫瘍根絶、腫瘍の再発の抑制、および生存の利益を提供することを示す。異なる処置を受けたマウスの生存曲線。N T に対する対数階級 ( M a n t e l - C o x ) 検定の P 値は、Tなしおよび T M では有意ではなく、F 2 9 2 G では  $p = 0 . 0 0 8$  、R 6 . 5 では  $p = 0 . 0 2 5$  、および F 2 9 2 A では  $p = 0 . 0 0 1 6$  である。

【図 4 A】腫瘍量、T 細胞分布、およびサイトカイン放出の縦断的な同時測定を示す。S S T R 2 - I D M E I N ベクターの概略図。

【図 4 B】腫瘍量、T 細胞分布、およびサイトカイン放出の縦断的な同時測定を示す。P E T / C T による N O T A O C T の取り込み ( 各パネルの上半分 ) 、および全身発光撮像による腫瘍量 ( 各パネルの下半分 ) の縦断的測定。画像は各コホートにおける4匹のマウスを代表するものである。トレーサーの最大取り込み当日に撮影された全身の P E T / C T 画像を一番右に示す。撮像時点は下半分のパネルの下に示す。例えば、15は、腫瘍異種移植の15日後 ( および T 細胞注入の7日後 ) を表す。

【図 4 C】腫瘍量、T 細胞分布、およびサイトカイン放出の縦断的な同時測定を示す。示す通りに処置したマウスの肺における発光およびトレーサー取り込みの定量。上のパネル : N T ( 非形質導入 ) T 細胞。下のレベル : C A R - F 2 9 2 A 。

【図 4 D】腫瘍量、T 細胞分布、およびサイトカイン放出の縦断的な同時測定を示す。「b」および「c」の同じマウスから種々の時点で採取された血液から測定されたサイトカインレベルをプロットする ( 平均  $\pm$  S D 、二つ組測定 ) 。上のパネル : N T ( 非形質導入 ) T 細胞。下のレベル : C A R - F 2 9 2 A 。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0010】

###### 定義

本明細書で使用する場合、「約」は、列挙された値の  $\pm 1 0 \%$  を指す。

##### 【0011】

本明細書で使用する場合、「養子 T 細胞療法」は、ワクチン接種単独で得られ得るものよりも多数の T 細胞を達成するための腫瘍特異的 T 細胞の単離および生体外増殖を含む。次に、癌を攻撃し殺滅することができる T 細胞を介して、癌患者の免疫系に、腫瘍を留まらせるのを圧倒する能力を与える試みで、腫瘍特異的 T 紹介細胞を癌患者へ注入する。

##### 【0012】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用される場合、「親和性」は、單一分子（例えば、**Iドメイン**）のそのリガンド（例えば、**ICAM-1**）への結合の強度である。親和性は、典型的には、平衡解離定数（**KD**または**Kd**）によって測定および報告され、この平衡解離定数を使用して、二分子間相互作用の強度を評価して順位決定する。

#### 【0013】

本明細書で使用する場合、「キメラ抗原受容体（CAR）」は、抗原へ結合することができる細胞外ドメインと、細胞外ドメインが由来するポリペプチドとは異なるポリペプチドに由来する膜貫通ドメインと、少なくとも1つの細胞内ドメインと、を含む、融合したタンパク質を意味する。「抗原へ結合することができる細胞外ドメイン」は、ある特定の抗原へ結合することができる任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。「細胞内ドメイン」は、細胞中の生物学的プロセスの活性化または抑制を引き起こすためのシグナルを伝達するドメインとして機能することが既知である任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。

10

#### 【0014】

本明細書で使用する場合、「ドメイン」は、1つの領域とは無関係に特定の構造へと折り畳まれたポリペプチド中の他の領域を意味する。

#### 【0015】

本明細書で使用する場合、「インテグリン」または「インテグリン受容体」（相互互換可能に使用される）は、細胞外マトリックスリガンドまたは他の細胞接着タンパク質リガンドへ結合して、それにより細胞間および細胞-マトリックス間接着プロセスを仲介する接着受容体とも呼ばれる多くの細胞表面受容体タンパク質のうちのいずれかを指す。インテグリンがそれらのリガンドへ結合する親和性は、インテグリンの立体配座の変化によって調節される。インテグリンは、例えば、胚発生、止血、創傷治癒、免疫応答および組織構造の形成／維持などの生理的プロセスに関与している。インテグリンサブファミリーは、異なる特異性を有する接着タンパク質受容体を形成するために、異なるアルファサブユニットと組み合わされたベータサブユニットを含む。

20

#### 【0016】

「細胞間接着分子1」または「ICAM-1」、すなわち、GenBank受入番号NM\_000201、NP\_000192とは、L2インテグリンのリガンドであり、そのN末端ドメイン（D1）は、MIDAS金属に対するICAM-1残基G1u-34の配位を通じてL1ドメインへ結合する。ICAM1は典型的には、内皮細胞および免疫系細胞の上に発現する。ICAM1は、L2およびM2型のインテグリンへ結合する。ICAM-1は、いくつかの癌腫および関連する間質24ならびに炎症性容態25において上方調節されている。罹患組織とは別に、ICAM-1は内皮細胞、免疫細胞、およびいくつかの上皮細胞を含むいくつかの細胞型において基本的に発現する25。

30

#### 【0017】

「リンパ球機能関連抗原1」、「LFA-1」、「L2インテグリン」または「CD18/CD11a」は、白血球インテグリンサブファミリーのメンバーを指す。LFA-1はすべてのT細胞上で、ならびにB細胞、マクロファージ、好中球およびNK細胞の上でも認められ、感染部位への動員に関与している。LFA-1は、抗原提示細胞上のICAM-1へ結合し、接着分子として機能する。

40

#### 【0018】

本明細書で使用する場合、「Iドメイン」は、LFA-1のLサブユニットの挿入されたドメインまたはIドメインを指し、LFA-1へ結合するリガンドのアロステリックメディエーターである。Iドメインとは、ICAM-1の天然リガンドである。金属イオン依存性接着部位（MIDAS）として既知のIドメインのリガンド結合部位は、C末端7らせんによってアロステリックに調節される2つの異なる立体配座として存在する。野生型（WT）Iドメインは、1145アミノ酸長の成熟Lインテグリンサブユニットタンパク質（配列番号1、GenBank受入番号NP\_002200のアミノ酸残基26～1170である）のアミノ酸残基130～310を包含する。本明細書で使用する場合

50

のアミノ酸残基のすべての番号付けは、成熟した L インテグリン（配列番号 1）のアミノ酸配列を指し、ここで配列番号 1 の残基 1 は、GenBank 受入番号 NP\_002200 の配列の残基 26 に相当する。

#### 【 0 0 1 9 】

本明細書で使用する場合、「腫瘍抗原」は、その発現が癌を引き起こす抗原性を有する生物学的分子を意味する。

#### 【 0 0 2 0 】

##### 説明

本発明は、広範な腫瘍のバイオマーカーである ICAM - 1 の生理的リガンドである LFA - 1 を用いて、ICAM - 1 を標的とする、キメラ抗原受容体を提供する。本発明者らは、ヒト I ドメインを含み、ICAM - 1 に対して 1 mM ~ 1 nM の親和性を有する、親和性変異体 CAR のパネルを構築した。本発明は、広範な抗腫瘍適用性を有する ICAM - 1 特異的 CAR を提供する。ICAM - 1 を標的とするマイクロモルレベルの親和性を有する I ドメインを含む CAR T 細胞は、はるかに低い密度で正常細胞を節約しながら、標的抗原を過剰発現している細胞を溶解することができるので、従来の CAR よりも改善された効能および安全性を有する。

10

#### 【 0 0 2 1 】

本発明は、N 末端から C 末端にかけて、( i ) リンパ球機能関連抗原 1 の L サブユニットのヒト I ドメインと、( ii ) 膜貫通ドメインと、( iii ) 少なくとも 1 つの共刺激ドメインと、( iv ) 活性化ドメインと、を含む、キメラ抗原受容体融合タンパク質を対象とする。

20

#### 【 0 0 2 2 】

本発明の CAR は、( i ) ICAM - 1 へ特異的に結合するヒト I ドメインを含む。ICAM - 1 に特異的な I ドメインは、LFA - 1 由来の I ドメインを用いて構築することができる（図 1 A および 1 B）。I ドメイン中の種々の活性化点変異は、金属イオン依存性接着部位（MIDAS）として既知の領域を含む結合界面の外側に局在する（図 1 B）。1 mM ~ 1 nM の ICAM - 1 に対する I ドメイン親和性の段階的上昇を含む変異体は、ICAM - 1 で被覆した表面、ビーズまたはセルに対するこれらの変異体のより高い結合について変異体のライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。例えば、異なる親和性の変異体は、酵母ディスプレイシステムを用いて単離することができる（Jinら 27 を参照されたい）。親和性を表面プラズモン共鳴（例えば、Biacore）によってまず測定して、I ドメインと ICAM - 1 との 1 : 1 結合親和性を評価する。細胞上に発現した CAR に対する ICAM - 1 の親和性は、フローサイトメトリーおよび Langmuir の等温式を用いて測定することができる。同様に、遊離リガンドおよび細胞表面結合リガンド（この場合、放射性標識または蛍光標識した ICAM - 1）の量を測定することによって、Scatchard 解析を行って、CAR 親和性を推定することができる。

30

#### 【 0 0 2 3 】

表 1 は、ICAM - 1 に対する野生型および変異体の LFA - 1 の I ドメインの測定された親和性を示す。大部分の変異は、疎水性のかさ高い側鎖（F、L、I）をより親水性（A、S、T）へと変化させ、それによってよりコンパクトで低親和性の I ドメイン立体配座の構造を崩壊させる。例えば、C 末端の 7 らせんに位置する Phe - 292 の、Ala (F292A) および Gly (F292G) との置換は、それぞれ約 20 μM および 0.1 μM の親和性 (KD) を提供する（表 1）。F292G と Phe - 265 における他の同等に活性化型変異 (F265S / F292G) との組み合わせは、6 nM の親和性を提供し、野生型 (WT) I ドメイン (KD = 1.5 mM) よりもおよそ 200,000 倍高い（図 1 C）。F265S / F292G の C 末端 7 らせんを開いた位置に固定するために（図 1 A）、F265S / F292G 変異体において Gly - 311 を Cys と置き換えて (G311C) (F265S / F292G / G311C、ダビング三重変異体 (TM))、天然に不対の Cys - 125 とジスルフィド結合を形成することができる（表 1

40

50

）。それゆえ、ICAM-1に対する個々のIドメイン変異体の一価の親和性は、表面PLAズモン共鳴(SPR)によって測定されるように、またはフローサイトメトリーによって推定されるように、およそ6桁の程度(約1nM~1mMのKD)に及ぶように設計することができる(図1C、表1)。表1中の変異体は、説明目的のためにあるのであって、本発明のCARはこれらの具体的な変異体に限定されない。他の変異を有し、1mM~1nMのICAM-1に対する親和性を有する変異体は、当業者に既知の方法によって作製、検査および選択することができる。

【表1】

表1.

名称	配列番号1の配列	親和性
野生型(WT)	G128-G311	1.5 mM*
I288N	G128-G311	202 μM**
I309T	G128-G311	127 μM**
L295A	G128-G311	37 μM**
F292A	G128-G311	20 μM*
F292S	G128-G311	1.24 μM**
L289G	G128-G311	196 nM**
F292G	G128-G311	119 nM*
F265S	G128-G311	145 nM*
F265S/F292G(DM)	G128-G311	6 nM*
F265S/F292G/G311C(TM)	E124-S313	約1nM*
R6.5	scFv	10 nM***

\*SPRの測定値、\*\*フローサイトメトリーから推定した、Iドメイン変異体を発現する酵母細胞へのICAM-1-Fc結合の平均蛍光強度(MFI)値<sup>5</sup>。使用式は、 $K_d(M) = 0.00175 \times \exp(-0.1542 \times MFI)$ とし、\*\*\*HeLa細胞への滴定したR6.5抗体の結合から推定<sup>34</sup>。

## 【0024】

一実施形態において、本発明のCARは、野生型ヒトIドメイン、1~3個のアミノ酸変異を有する野生型ヒトIドメインの変異体、または野生型Iドメインもしくはこの変異体の配列と少なくとも95%、もしくは少なくとも96%の同一性、もしくは少なくとも97%の同一性、もしくは少なくとも98%の同一性、もしくは少なくとも99%の同一性を有する配列であって、1mM以上の強さのヒトICAM-1の結合親和性を有する、Iドメインを含む。一実施形態において、変異体は、野生型Iドメインのアミノ酸残基265、288、289、292、295、309、または311において1つ以上の変異を有し得る。例えば、変異体は、野生型IドメインのI288N、I309T、L295A、F292A、F292S、L289G、F292G、F265S、F265S/F292G、またはF265S/F292G/G311Cのうちの1つ以上の変異を有し得る。一実施形態において、2つのIドメイン変異を組み合わせることにより、それぞれの親変異体よりも高い親和性を有する変異体が生じる。例えば、約100μMのKDをそれぞれ有する2つの変異体を組み合わせることにより、典型的には約1~約10μMのKD範囲を有する変異体が生じる。F292Gは非常に強力な点変異であり、F292Gを他の変異と組み合わせると、ICAM-1に対するIドメイン親和性が100nMのKDよりも高くなる。上述のアミノ酸残基の番号付けは、配列番号1の成熟アミノ酸配列に関するものであり、残基番号1は、GenBank受入番号NP\_002200のアミノ酸残基26に相当する。

## 【0025】

10

20

30

40

50

一実施形態において、本発明のCARは、1 mM～1 nMのKd、好ましくは1～200 μMのKdまたは1～20 μMのKdの親和性でICAM-1を結合させるイドメインを含む。

#### 【0026】

一実施形態において、本発明のCARは、約120 nM～約1 nMのKdの親和性でICAM-1へ結合するイドメイン、例えばF292G、F265S、F265S/F292G、およびF265S/F292G/G311Cを含む。

#### 【0027】

一実施形態において、本発明のCARは、約20 μM～約120 nMのKdの親和性でICAM-1へ結合するイドメイン、例えばF292A、F292S、およびI289Gを含む。 10

#### 【0028】

一実施形態において、本発明のCARは、約200 μM～約20 μMのKdの親和性でICAM-1へ結合するイドメイン、例えばI288N、I309T、L295A、およびF292Aを含む。

#### 【0029】

一実施形態において、本発明のCARは、約1 μM～約100 μMのKdの親和性でICAM-1へ結合するイドメイン、例えばL296A、F292AおよびF292Sを含む。

#### 【0030】

一実施態様において、本発明のCARは、約1 mM～約200 μMのKdの親和性でICAM-1へ結合するイドメイン、例えば野生型およびI288Nを含む。 20

#### 【0031】

一実施形態において、本発明のCARは、約1 mM～約100 μMのKdの親和性でICAM-1へ結合するイドメイン、例えば野生型、I288N、およびI309Tを含む。

#### 【0032】

上述の実施形態における親和性は、溶液中のイドメインとICAM-1との相互作用を指す。

#### 【0033】

CAR構造においてヒトイドメインを使用する1つの利点は、ヒトイドメインがマウスICAM-1をヒトICAM-1と同程度の親和性で結合させることである（それぞれ2nM対6nM）。ヒトICAMのマウス相同体との交差反応性により、ヒト腫瘍異種移植片を有する前臨床マウスモデルにおいて、オントーゲットオン腫瘍効能と同時にイドメインCAR-T細胞のオントーゲットオフ腫瘍毒性の試験が可能となる。これは、前臨床モデルにおいて臨床毒性を予測するまでのヒトイドメインの利点である。対照的に、R6.5scFv（マウスハイブリドーマクローンR6.533由来）は、ヒトICAM-1について10nMのKdを有する（表1）が、マウスICAM-1とは交差反応しない。 30

#### 【0034】

本発明のCARは、(i)膜にまたがる膜貫通ドメインを含む。膜貫通ドメインは、天然ポリペプチドに由来してもよく、または人工的に設計されてもよい。天然ポリペプチド由来の膜貫通ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質から得ることができる。例えば、T細胞受容体鎖もしくは鎖、CD3ゼータ鎖、CD28、CD3-イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、またはGITRの膜貫通ドメインを使用することができる。人工的に設計された膜貫通ドメインは、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主として含むポリペプチドである。好ましい実施形態において、膜貫通ドメインはCD28またはCD8に由来し、これらは良好な受容体安定性を与える。 40

#### 【0035】

本発明のCARは、(ii)ヒトCD28、4-1BB(CD137)、ICOS-1、CD27、OX40(CD137)、DAP10、およびGITR(AITR)からな

10

20

30

40

50

る群より選択される 1 つ以上の共刺激ドメインを含む。実施形態において、C A R は C D 2 8 および 4 - 1 B B の 2 つの共刺激ドメインを含む。

#### 【 0 0 3 6 】

エンドドメイン（活性化ドメイン）は、C A R のシグナル伝達部分である。抗原認識後、受容体がクラスター化し、シグナルが細胞へ伝達される。最も一般的に使用されるエンドドメイン成分は、3 つの I T A M を含有する C D 3 - ゼータ（ C D 3 Z または C D 3 ）のそれである。これは、抗原が結合した後に活性化シグナルを T 細胞へ伝達する。C D 3 - ゼータは、十分に応答能のある活性化シグナルを提供しないことがあり、追加の共刺激シグナル伝達が必要とされることがある。例えば、増殖 / 生存シグナルを伝達するために 1 つ以上の共刺激ドメインを C D 3 - ゼータとともに使用することができる。

10

#### 【 0 0 3 7 】

本発明の C A R は、C A R が T 細胞などの細胞内で発現する場合、新成タンパク質が小胞体に向けられ、その後、細胞表面へと向けられ、そこで発現するように、I ドメインの N 末端にシグナルペプチドを含み得る。シグナルペプチドのコアは、単一のアルファヘリックスを形成する傾向を有する長鎖疎水性アミノ酸を含有し得る。シグナルペプチドはアミノ酸の正に帯電した短鎖で始まることができ、これは、転位の間にポリペプチドの適切なトポロジーを強化するのを助ける。シグナルペプチドの末端には、典型的にはシグナルペプチダーゼによって認識され切断されるアミノ酸鎖がある。シグナルペプチダーゼは、遊離のシグナルペプチドおよび成熟タンパク質を生成するために、転位の完了中または完了後のいずれかで切断し得る。遊離シグナルペプチドは次に特異的プロテアーゼにより消化される。一例として、シグナルペプチドは、シグナルペプチドが依然として C A R の細胞表面発現を引き起こすように機能することを条件として、ヒト C D 8 もしくは G M - C S F 、または 1 もしくは 2 個のアミノ酸変異を有するそれらの変異体に由来し得る。

20

#### 【 0 0 3 8 】

本発明の C A R は、I ドメインを膜貫通ドメインと接続し、抗原結合ドメインをエンドドメインから空間的に分離するためのヒンジとしてスペーサー配列を含み得る。可撓性のあるスペーサーは、腫瘍抗原への結合を可能にするために結合ドメインが異なる方向に向くことを可能にする。スペーサー配列は、例えば、I g G 1 F c 領域、I g G 1 ヒンジもしくは C D 8 柄、またはそれらの組み合わせを含み得る。ヒト C D 2 8 または C D 8 柄が好ましい。

30

#### 【 0 0 3 9 】

本発明は、上述の C A R をコードする核酸を提供する。C A R をコードする核酸は、指定した C A R のアミノ酸配列から従来法により調製することができる。アミノ酸配列をコードする塩基配列は、それぞれのドメインのアミノ酸配列について、上述の N C B I R e f S e q I D または G e n B e n k の受入番号から得ることができ、本発明の核酸は、標準的な分子生物学的および / または化学的手順を用いて調製することができる。例えば、塩基配列に基づいて核酸を合成することができ、本発明の核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（ P C R ）を用いて c D N A ライブライリーから得られる D N A フラグメントを組み合わせることによって調製することができる。

#### 【 0 0 4 0 】

本発明の C A R をコードする核酸は、ベクターへと挿入することができ、このベクターは細胞へと導入することができる。例えば、レトロウイルスベクター（オンコアレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、および擬似型ベクターを含む）、アデノウイルスベクター、アデノ隨伴ウイルス（ A A V ）ベクター、サルウイルスベクター、ワクシニアウイルスまたはセンダイウイルスベクター、エピスタン - バーウィルス（ E B V ）ベクター、および H S V ベクターのようなウイルスベクターを使用することができる。ウイルスベクターとしては、感染細胞内で自己複製しないように複製能を欠いているウイルスベクターが好ましくは使用される。

40

#### 【 0 0 4 1 】

例えば、レトロウイルスベクターを使用する場合、そのベクターが有する L T R 配列およ

50

びパッケージングシグナル配列に基づいて、適切なパッケージング細胞を選択し、そのパッケージング細胞を用いてレトロウイルス粒子を調製することにより本発明の方法を実施することができる。パッケージング細胞の例としては、PG13(ATCC CRL-10686)、PA317(ATCC CRL-9078)、GP+E-86およびGP+envAm-12、ならびにPsi-Cripが挙げられる。高いトランスフェクション効率を有する293細胞または293T細胞を用いてレトロウイルス粒子を調製することもできる。レトロウイルスとレトロウイルスペクターのパッケージングに使用することができるパッケージング細胞とに基づいて産生される多くの種類のレトロウイルスペクターが、多くの企業から広く市販されている。

## 【0042】

10

本発明は、上述のようにCARを発現するように改変されたT細胞またはナチュラルキラー細胞(NK細胞)を提供する。本発明のCAR-T細胞またはCAR-NK細胞は、CARのIドメインを介してICAM-1へ結合し、それにより細胞内にシグナルが伝達され、その結果、細胞が活性化される。CARを発現する細胞の活性化は、宿主細胞の種類およびCARの細胞内ドメインによって異なり、例えば、サイトカインの放出、細胞増殖速度の向上、細胞表面分子の変化、標的細胞を殺滅することなどに基づいて、指標として確認することができる。

## 【0043】

Iドメイン-CARを発現するように改変されたT細胞またはNK細胞は、疾患のための治療薬として使用することができる。治療薬は、Iドメイン-CAR有効成分として発現するT細胞を含んでおり、さらに適切な賦形剤を含んでいてもよい。賦形剤の例としては、当業者に既知の医薬として許容され得る賦形剤が挙げられる。

20

## 【0044】

本発明はさらに、癌を治療するための養子細胞療法の方法を提供する。この方法は、本発明のCAR-T細胞またはCAR-NK細胞を癌に罹患している対象へ投与するステップを含み、ここで対象の癌細胞はICAM-1を過剰発現し、CAR-T細胞またはCAR-NK細胞は癌細胞へ結合して癌細胞を殺滅する。「過剰発現する」は、本明細書で使用する場合、癌細胞が細胞1個あたり少なくとも105個の分子のICAM-1の表面発現を有することを指す。一実施形態において、CARは、約1～約1000μM、好ましくは約1～約200μM、または約1～約20μMのICAM-1に対する親和性を有するIドメインを含む。本発明によって治療されるのに適した癌には、甲状腺癌、胃癌、膀胱癌、および乳癌が含まれるが、これらに限定されない。

30

## 【0045】

様々なレベルの抗原発現を有する標的細胞と同時に、10<sup>6</sup>倍の範囲にわたって段階的に及ぶCAR親和性を機能的に調べることによって、試験管内および生体内でT細胞の有効性に対するCAR親和性および抗原密度の影響を系統的に検討した。CD25、サイトカイン放出、および細胞毒性によって測定される試験管内のT細胞活性化状態は、親和性および標的抗原密度に依存し、結果的に、CAR親和性および抗原密度の増大とともににより強力なT細胞活性化および標的殺滅に至った。ナノモルレベルの親和性のCAR-T細胞(TM、F292G)の活性化閾値は、マイクロモルレベルの親和性のCAR-T細胞(F292A)と比較して抗原密度に関して依存性が低く、10<sup>4</sup>個の分子/1個の細胞という低い抗原密度に反応した。対照的に、F292A CAR-T細胞は10<sup>5</sup>個の分子/1個の細胞未満の標的抗原を発現する細胞を溶解する能力を急速に失った。ミリモルレベルの親和性のCAR-T細胞(ワイドタイプ、WT)は、低～中等度のレベルの抗原を有する標的細胞に対してほとんど反応性がなく、検出可能な活性化、サイトカイン放出、および標的溶解が生じるために、10<sup>6</sup>個の分子/1個の細胞の閾値抗原密度を必要とした。

40

## 【0046】

表2は、特定のICAM-1抗原密度を有する細胞を標的とするための、ICAM-1に対するIドメイン含有CAR-T細胞の所望の親和性の範囲を示す。

50

## 【表2】

表2.

I C A M - 1 密度 (分子／1個の細胞)	適切な I ドメイン親和性
$< 10^4$	約 $120 \text{ nM} \sim 1 \text{ nM}$ (例えば、TM、F292G)
$10^4 \sim 10^5$	約 $20 \mu\text{M} \sim 120 \text{ nM}$ (例えば、F292S、F265S)
$10^5 \sim 10^6$	約 $200 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ (例えば、F292A)
$\geq 10^6$	約 $1.5 \text{ mM} \sim 200 \mu\text{M}$ (例えば、WT)

## 【0047】

試験管内でのC A R 親和性と抗腫瘍効力との間にある定量的調和は、定量的な生体内での観察と一致しておらず、それにより、マイクロモルレベルの親和性（ $1 \sim 200 \mu\text{M}$ または $1 \sim 20 \mu\text{M}$ ）のC A R - T 細胞またはC A R - N K 細胞は、腫瘍部位での増殖速度、腫瘍根絶率、腫瘍再発の頻度、およびオントーゲットオフ腫瘍毒性のレベルによって測定されるように、より高い親和性のC A R - T 細胞またはC A R - N K 細胞よりも優れている。

## 【0048】

I ドメインC A R - T 細胞またはC A R - N K 細胞がマウスI C A M - 1と交差反応する能力は、ヒト腫瘍細胞に対するC A R - T 細胞またはC A R - N K の有効性、および健常組織上のマウスI C A M - 1に対するオントーゲットオフ腫瘍毒性の厳密かつ同時の評価を可能にする。T 細胞上でのレポーター遺伝子、ヒトソマトスタチン受容体2（S S T R 2）、およびI ドメインC A R の同時発現とそれに続く縦断的位置放射断層撮影（P E T）法によって、養子移入T 細胞の生体内での時空間マッピングを達成することができる。

## 【0049】

最高親和性（TM）C A R - T 細胞で処置したマウスにおける一様な致死率、より多量の腫瘍量を有するF292G C A R 処置マウスにおいて観察された毒性率の増大、およびマイクロモルレベルの親和性のF292A C A R - T 細胞を用いた処置後の検出可能な毒性の欠如によって実証されているように、毒性の開始はC A R 親和性および腫瘍量に依存するようである。

## 【0050】

高親和性変異体（約  $120 \text{ nM} \sim 1 \text{ nM}$ ）を含むC A R は高い効力を有し、このC A R は細胞1個当たり  $10^4$  未満という低いI C A M 密度でT 細胞を結合させることができる。

## 【0051】

マイクロモルレベルの範囲（例えば、約  $1 \sim 200 \mu\text{M}$  のK d）の親和性を有するC A R は、正常組織において基本的に発現する抗原に対するオフ腫瘍毒性を最小限にし、またナノモルレベルの範囲の親和性を有するC A R（例えば、約  $1 \sim 200 \text{ nM}$  のK d）と比較して治療指標を高める。マイクロモルレベルの範囲の標的親和性を有するC A R - T 細胞は、高い標的発現を有する腫瘍組織に対する効力の増大および長期的な有効性を同時に呈しながら、基本的な抗原発現を有する健常組織の標的化を回避することができる。マイクロモルレベルの親和性のC A R（F292A - I ドメインなど）は、T 細胞が、未分化甲状腺腫瘍が健常組織を典型的には超えない閾値である  $10^5$  個の分子 / 1 個の細胞を下回って発現する組織を無視することを可能にする。ナノモルレベルの親和性のC A R - T 細胞（例えば、TM、F292G、およびR6.5 C A R）による標的抗原の関与は、T C

10

20

30

40

50

RとpMHCとの間に本来認められる相互作用の一過性かつ動的な性質から逸脱して、不自然に低い解離速度をもたらし得る<sup>48</sup>。CARによる高親和性および結合活性の相互作用は、T細胞が連続的に殺滅する傾向を低下させ、消耗または、活性化誘導性細胞死に対する感受性の上昇を引き起こすことができる<sup>49</sup>。ICAM-1に対してナノモルレベルの親和性を有するCAR-T細胞は作用しているかもしれないが、このCAR-T細胞は至適レベルを下回って作動している可能性があり、消耗および過剰なサイトカイン放出をより受けやすく、最終的にオフ腫瘍毒性または腫瘍再発を促進し得る。

#### 【0052】

以下の実施例は、本発明をさらに説明するものである。これらの実施例は、単に本発明を説明するよう企図されており、本発明を限定するものとして解釈されることにはなっていない。

10

#### 【実施例】

#### 【0053】

#### 材料および方法

##### 実施例1. 細胞株および初代ヒトリンパ球

ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HMEC-1)はCenter for Disease Controlから入手し、10%(v/v)ウシ胎児血清(FBS、Atlanta Biologicals)、10mMのL-アラニル-L-グルタミンジペプチド(Gibco)、100単位/mlのペニシリン-ストレプトマイシン(Pen-strep)、1μg/mlのヒドロコルチゾーム(MP Biomedical)、および10ng/mlの組換えヒト表皮成長因子(Invitrogen)を補充したMCDB 131培地(Invitrogen)中で培養した。マウス脳微小血管内皮細胞(bEnd.3、ATCC)を、4mMのL-グルタミン、100単位/mlのPen-strep、および10%のFBSを補充した応用Dulbecco変法イーグル培地(ADMEM、Invitrogen)中で維持した。HeLa細胞(ATCC)を、10%FBS、2mMのL-グルタミン、および100単位/mlのPen-strepを含有するADMEM中で培養した。8505C細胞(DSMZ)を、10%FBS、2mMのL-グルタミン、および100単位/mlのPen-strepを含有する RPMI-1640培地(Invitrogen)中で培養した。HMEC-1、bEnd.3、HeLa、および8505c細胞に、ホタルルシフェラーゼ-F2A-GFPをコードするレンチウイルス(Biosettia)を形質導入し、蛍光に基づいて分類した。

20

#### 【0054】

ヒト末梢血は、静脈穿刺によって健常ボランティアドナーから得た。末梢血単核球を、Ficoll-Plus(GE Healthcare)を用いて単離し、5%ヒトAB血清(Sigma)、2mMのL-アラニル-L-グルタミンジペプチド、および30IU/mlのヒトIL-2(Cell Sciences)を補充したOptimizer CTS T細胞増量SFM(Thermo)(T細胞培地)中で培養した。非接着細胞を24時間後に除去し、2:1のビーズ対T細胞比でDynabeads CD3/CD28 T細胞増量剤(Thermo)を用いてT細胞を濃縮した。続いて、Dynabeads結合T細胞をIL-2含有培地中で1×10<sup>6</sup>個/mlの密度で培養した。すべての細胞を5%CO<sub>2</sub>加湿インキュベーター中、37℃でインキュベートした。

30

#### 【0055】

##### 実施例2. イドメインCARベクターの構築

ICAM-1に対して様々な親和性のLFA-1のイドメインをコードする遺伝子配列は、先行研究<sup>27</sup>から得られた。イドメイン変異体は、CD8ヒンジと、CD28膜貫通ドメインと、CD28、CD137、およびCD3の細胞質ドメインを組み込んだ第3世代CAR構造の細胞内部分とに直接的にC末端で融合した。次いで、完全なCARインサートをpLenti骨格へとサブクローニングした<sup>29</sup>。CAR-T細胞撮像のためのレポーター遺伝子であるSSTR2を、「リボソームをスキップする」プラテッショウウイルス(teschovirus)-12A(P2A)配列を用いてN末端のイドメイン

40

50

に連結して、同じmRNAからのCARおよびSSTR2の同程度の産生を確実にした。

#### 【0056】

##### 実施例3.T細胞のレンチウイルス産生および形質導入

レンチウイルスは、リン酸カルシウムを用いてHEK293T細胞を一過性にトランスフェクトすることによって産生した。簡潔には、 $10\text{ }\mu\text{g}$ の伝達遺伝子、 $7.5\text{ }\mu\text{g}$ のpCMV-dR8.2(Addgene)および $5\text{ }\mu\text{g}$ のpCMV-VSVG(Addgene)を混合し、2MのCaCl<sub>2</sub>、次いで $2\times$ HBSととともにインキュベートした。得られた溶液を、 $10\text{ ml}$ のDMEM中に $3.2\times10^6$ 個のHEK293T細胞を24時間前に播種しておいた $10\text{ cm}^2$ の細胞培養皿へ滴下した。トランスフェクション培地を6時間後に交換した。レンチウイルスを含有する培地をトランスフェクションの48時間後および72時間後に収集し、 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ フィルターで濾過し、 $4$ 、 $75,000\times g$ で2時間の超遠心分離により濃縮した。次に、レンチウイルスを血清含有培地中に再懸濁し、-80で凍結した。活性化の24~72時間後に、ヒトT細胞に抗CD3/CD28 Dynabeadsを、スピノ感染( $1,000\text{ g}$ 、32で1時間)またはレンチウイルスとの一晩のインキュベーションのいずれかにより形質導入した。T細胞を初回の形質導入の24時間後にもう一度形質導入した。形質導入中および形質導入後、IL-2を含有する培地を、ヒトIL-7( $10\text{ ng}/\text{ml}$ )およびIL-15( $5\text{ ng}/\text{ml}$ )を含有する培地(Peprotech)と交換した。ジャーカットT細胞をレンチウイルスとの単回の一晩のインキュベーションにより形質導入した。

10

#### 【0057】

##### 実施例4.試験管内標的細胞殺滅アッセイ

GFPおよびホタルルシフェラーゼを発現するように安定して形質導入された $2\times10^5$ 個の標的細胞(HMEC-1、bEnd.3、HeLa、および8505c)を、非形質導入型またはIDメインCAR-T細胞とともに、様々なエフェクター対標的比(E:%)で共培養した。ある特定の条件において、ICAM-1遺伝子は、CRISPR/Cas9(Santa Cruz、#sc-400098)を用いて8505C細胞中で破壊された(8505C/-ICAM-1として示す)か、あるいは8505C細胞を $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ リポ多糖(LPS;大腸菌Escherichia coli)O26:B6、Sigma)へ12時間曝露して、ICAM-1の過剰発現を誘導した(8505C/LPSと示す)。共培養は、 $150\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のD-ルシフェリン(Gold Biotechchnology)を含有しつつサイトカイン補充のないT細胞培地中で行った。プレートリーダー(TECAN infinite M1000 PRO)を用いて発光を測定し、それぞれのE:T条件での読み取りを、非形質導入T細胞:標的共培養対照に対して正規化した。

20

#### 【0058】

##### 実施例5.8505Cマウスモデル、全身腫瘍撮像、および血清サイトカイン分析

$7.5\times10^5$ 個の8505C細胞を、尾静脈を介してNSGマウスへと注射した。腫瘍細胞注射の8~10日後に、 $1\sim3\times10^6$ 個のT細胞を、尾静脈を介して注射した。異種移植後最長10日間、同様のCAR投与量を用いて腫瘍の除去を実証したR6.5CAR-T細胞を用いた従来の研究に基づいて注射のタイミングを選択した<sup>29</sup>。生きているマウスにおける腫瘍異種移植片の発光撮像は、全身光学撮像装置(In-Vivo Extreeme、Bruker)を用いて行った。マウスを $2\text{ L}/\text{分}$ のO<sub>2</sub>中2%イソフルランで麻酔した。腫瘍量は、胸腔およびマウスの全身にわたる発光の積分によって定量化した。血清サイトカイン分析のために、 $50\sim100\text{ }\mu\text{l}$ の血液を、尾静脈を介して氷上のエッペンドルフチューブへと回収した。4で10分間、 $2,000\text{ g}$ で遠心分離することによって細胞ペレットを除去した後、血漿を直ちに単離し、-80で保存した。製造元の説明書により、Bio-Plex MAGPIX(Bio-Rad)を用いてヒトサイトカイン(GM-CSF、IL-2、IL-6、IFN-、TNF-、CXCL10)を2つ組で測定した。

30

#### 【0059】

40

50

### 実施例 6 . 生体外細胞分析

腫瘍異種移植片を適切な時点でマウスから摘出した。摘出した腫瘍をさいの目に切って 80  $\mu\text{m}$  セルストレーナーに流して単細胞懸濁液を得た。赤血球を 1 × RBC 溶解緩衝液 (e Bi o s c i e n c e s) とのインキュベーションにより溶解した。残存細胞を洗浄し、2 % 正常ヤギ血清を含有する 1 × HBSS 中に再懸濁し、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のマウス IgG で 10 分間ブロッキングした。これに続いて、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のマウス抗ヒト CD3 - A1 exa Fluor 647 (Bi o legend) または 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のウサギ抗 c-myc - Alexa Fluor 647 (Bi o legend) との組み合わせにおける 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のヨウ化プロピジウム (In vitrorogen) を用いた染色を行った。結果として生じる細胞を Galloos フローサイトメーター (Beckman Coulter) で取得した。初期フローサイトメトリーゲートは、生細胞ゲート処理 (ヨウ化プロピジウム陰性) に基づいて決定した。

#### 【0060】

### 実施例 7 . ICAM - 1 および CAR 発現の定量化

ハイブリドーマ (ATCC) から得たマウス抗ヒト R6.5 モノクローナル抗体 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を用いて、種々の細胞株における ICAM - 1 発現を測定した。T 細胞上の IDメイン CAR 発現は、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のウサギ抗 c-myc - Alexa Fluor 647 (Bi o legend) を用いて検出した。IDメインジャーカット T 細胞変異体を、ヒト Fc に融合した 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の組換えヒト ICAM - 1 (R&D Systems) とともにインキュベートした。次に、細胞を洗浄し、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のウサギ抗ヒト PE (Santa Cruz Biotechnology) 中に再懸濁した後、フローサイトメトリー分析を行った。

#### 【0061】

### 実施例 8 . IFN - の試験管内での測定

標的細胞を洗浄し、サイトカインを含まない T 細胞培地中に 1 × 10<sup>6</sup> 個 / ml で懸濁した。100  $\mu\text{l}$  のそれぞれの標的細胞を 96 ウェル丸底プレート (Corning) へ 3 つ組で入れた。T 細胞培地中に 5 × 10<sup>6</sup> 個 / ml で再懸濁した T 細胞を適切なウェル中で標的細胞と組み合わせた。プレートを 37 °C で 24 ~ 48 時間インキュベートした。インキュベーション後、上清を ELISA のために回収して IFN - (Bi o legend) を検出した。

#### 【0062】

### 実施例 9 . CD25 および CD69 染色

IDメイン CAR で改変したジャーカット細胞を、96 ウェルプレート中で 1 : 1 のエフェクター対標的の比 (1 × 10<sup>5</sup> 個のエフェクター : 1 × 10<sup>5</sup> 個の標的) で標的細胞と共に培養した。プレートを 37 °C で 6 時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄した後、氷上で 30 分間、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗ヒト CD25 - アロフィコシアニン (APC, Bi o legend) で標識した。インキュベーション後、試料を洗浄し、フローサイトメトリーによって分析した。ICAM - 1 発現細胞に対する代替物として、本発明者らは、既知量の ICAM - 1 でコーティングしたマイクロビーズも使用した。1 × 10<sup>6</sup> 個の硫酸塩ラテックスマイクロビーズ (8  $\mu\text{m}$ , Thermo Fisher Scientific) を、Cy5.5 (Sulfo-Cyanine5.5 NHS エステル、Lumiprobe) と結合した指示量のヒトまたはマウス組換え ICAM - 1 - Fc (R&D Systems) を含有する 100  $\mu\text{L}$  の PBS 中に、室温で一晩緩徐に混合しながら再懸濁した。タンパク質標識粒子をペレット化し、0.1 M グリシン pH 7.4 を含有する新鮮な PBS 中に 1 時間再懸濁し、その間上清を使用して、蛍光によるビーズ吸着効率を測定した (TECAN infinite M1000 PRO)。グリシンを用いたビーズ表面の飽和の後、ビーズをペレット化し、5 mM の MgCl<sub>2</sub> を含有する PBS 中に再懸濁した。それぞれの IDomain CAR 変異体で改変したジャーカット細胞を、ICAM - 1 結合ラテックスビーズとともに 1 : 3 (細胞 : ビーズ) の比で、37 °C で一晩インキュベートした。次いで細胞を収集し、フローサイトメトリーによる分析の

10

20

30

40

50

ために $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒトCD69-APC(Biolegend)で標識した。

#### 【0063】

##### 実施例10.V底接着アッセイ

V底96ウェルプレート(Corning)を、マウスもしくはヒトICAM-1-Fc(PBS中 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、pH7.4)または2%BSAのいずれかで4度一晩コーティングした。次いで、プレートを2%BSAで、37度1時間ブロッキングした。製造元のプロトコルにより、IDメインCAR-TクローニングをまずCell Tracker Orangeで染色し、次いで5mMのMgCl<sub>2</sub>および1%BSAを含有する50μlのPBS中のICAM-1でコーティングしたウェルへ入れた。プレートを直ちに室温で15分間、200gで遠心分離した。V底プレートの底に蓄積した非接着細胞を蛍光プレートリーダー(TECAN infinite M1000 PRO)により定量した。ICAM-1への細胞結合を実験測定の蛍光強度値(FCARおよびFNT)から計算し、BSA単独でコーティングしたウェルからの蛍光(FBSA)に対して正規化した:  $100 \times ((\text{FCAR} - \text{FBSA}) / \text{FBSA}) / ((\text{FNT} - \text{FBSA}) / \text{FBSA})$ 。

#### 【0064】

##### 実施例11.18F-NOTA-オクトレオチド(NOTA OCT)の標識

NOTA OCT(1,4,7-トリアザシクロノナン-1,4,7-三酢酸-オクトレオチド30、GMP等級)を1mgの凍結乾燥粉末(カタログ番号9762、ABX Pharmaceuticals)として得た。NOTA OCTバイアル内容物を18MWの水で200μl(5mg/ml溶液)へ希釈し、ストック溶液として4度保存した。フッ素-183Iを用いたNOTAのキレート化のために、5μlのNOTA OCTを10μlの0.1M酢酸ナトリウム(pH4)、6μlの2mM AlCl<sub>3</sub>、および約30mCiの<sup>18</sup>Fを含有する100μlへ添加した。溶液を直ちに100のThermomixer(Eppendorf)に入れ、15分間インキュベートした後、室温へ冷却し、15mlのddH<sub>2</sub>O中に希釈した。Sep-Pak light C18カラムを3mlの100%エタノール中で再生し、毎分10滴の観察された流量で5mlのddH<sub>2</sub>O中で2回洗浄した。次に、NOTA OCTをSep-Pakカラムへ負荷し、これを後で15mlの18MWの水中で洗浄して、いかなる残存遊離<sup>18</sup>Fも除去した。捕捉されたNOTA OCTを300μlのエタノールを用いてカラムから溶出し、注射用PBSで1.5mlに希釈し、最終生成物を約15%エタノール等張注射用溶液中に提供した。溶離液を0.2μmフィルターで濾過した。最終生成物の純度を逆相HPLCにより確認した。

#### 【0065】

##### 実施例12.PET/CT撮像

登録されたCT画像は、NOTA OCT注射の1~2時間後にマイクロPET/CTスキャナ(Inveon、Siemens)を使用して取得した。投影データは、1度の角度増分である1秒のステップで、コーンビーム形状で取得した。250~750keVのエネルギー範囲および6ナノ秒の調時範囲を使用して、1回の試験につき少なくとも1000万件の同時事象をPETについて取得した。生体内でのNOTA OCT取り込みの定量化のために、100μlの10%ID/cm<sup>3</sup>当量を含有する参照チューブ。マウス肺内でのNOTA OCT取り込みを計算するために、橢円形を肺の左右両側に個別に描いて、それらの足跡の大部分を囲んだ。参照チューブに得られた計数に対して計算した%ID/cm<sup>3</sup>値は、%ID/cm<sup>3</sup>を4で除することによって標準的な取り込み値(SUV32)へ近似して、100%の注射効率および体重25gを想定した。PET/CT画像の可視化および解析は、AMIDEソフトウェア(<http://amide.sourceforge.net>)を用いて行った。

#### 【0066】

##### 実施例12.組織学的特徴

安樂死の後、マウスの肺に気管を介して4%パラホルムアルデヒドを灌流し、5つの葉のそれぞれを固定後に分離してパラフィン中に包埋した。組織を切断して5μmの切片を作

10

20

30

40

50

製した（Microtome、Leica）。パラフィン包埋切片を、CD3およびGF-Pの免疫染色のために、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）またはヘマトキシリンのみで染色した（Histowiz, Inc.により実施）。組織学的解析は経験豊富な病理学者によって行われた。

#### 【0067】

##### 結果

##### 統計解析

示されたデータにPrism（GraphPad）を用いて、一元配置分散分析、ダネットの多重比較検定、および対応のないスチュードントのt検定を行った。

#### 【0068】

実施例13. 親和性が10<sup>6</sup>倍に段階的に変動するICAM-1特異的CAR-T細胞 ICAM-1に特異的なCAR構築物は、Jinら27および米国特許第8,021,668号により、LFA-1由来のIDメインを用いて構築した（図1A～B、表1）。

#### 【0069】

変異体IDメインの親和性が、CARの親和性と関するかどうかを試験するために、HEK293T細胞およびジャーカットT細胞をTM、F292G、F292A、またはWTのIDメインを含有する第3世代CARをコードするレンチウイルスを形質導入し、ICAM-1の結合についてアッセイした。mycタグをそれぞれのIDメイン変異体のN末端へ付加して、CAR発現の測定を支援した（図1D～E）。ジャーカットT細胞における内在性LFA-1への背景のICAM-1結合を回避するために、ICAM-1に対するCAR親和性を、IDメインCAR形質導入HEK293T細胞を用いて概算した。IDメインCAR発現HEK293T細胞への組換えヒトICAM-1の結合のレベルは溶液親和性測定と相關しており、TMが最も強い結合を呈し、それにF292GおよびF292Aが続き、非形質導入（NT）T細胞と比較してWTへの検出可能な結合はなかった（図1F）。ICAM-1に対する差次的CAR親和性およびマウスICAM-1との交差反応性も、組換えヒトまたはマウスICAM-1でコーティングしたV底プレートへの細胞接着を測定することによって調べた（図1G）。TMおよびF292GのCARを形質導入したジャーカット細胞は、非形質導入細胞と比較して、ヒトおよびマウスの両ICAM-1への高レベルの結合を実証した。しかしながら、WT IDメイン発現対応物と比較してF292A CAR発現HEK293T細胞への組換えICAM-1の結合の増大にもかかわらず（図1F）、F292A CAR-ジャーカット細胞はNTまたはWTのIDメイン発現細胞と比較して、プレート結合ICAM-1への任意のさらなる結合を欠いていた（図1G）。F292Gに匹敵する可溶性ICAM-1結合を実証したF265S IDメインの場合（145nM対119nM、表1）、F265S CAR-T細胞は、上昇した結合がマウスICAM-1にとってより明白であったのに対し、プレートに結合したヒトICAM-1への任意のさらなる結合を実証し損ねた。予想したように、ヒトICAM-1にのみに特異的であるR6.5CARを発現するように形質導入されたT細胞は、ヒトICAM-1への結合上昇を呈したが、マウスICAM-1への結合上昇は呈さなかった（図1G）。

#### 【0070】

実施例14. 試験管内でのCAR-T細胞活性化に及ぼすCAR親和性および標的抗原密度の影響

IDメインCARを発現するジャーカットT細胞を用いて、CAR-T細胞活性化が標的細胞におけるCAR親和性およびICAM-1抗原密度によって影響を受ける程度を調べた。ジャーカットT細胞を、異なるICAM-1発現レベルを有する種々の標的細胞株とともにインキュベートした。標的細胞株のICAM-1表面密度は、まず標的細胞株へ結合する抗ICAM-1抗体のレベルをアッセイし、これらのシグナルを、Cy5.5と結合した既知量のR6.5抗体（ビーズ1個当たり10<sup>3</sup>～10<sup>7</sup>の抗体）とカップリングした8μmのラテックスビーズを用いて得られたシグナルと比較することによって調べた。非標識の（灰色）からR6.5（黒色）とともにインキュベートした後のシフトのレベ

10

20

30

40

50

ルを使用して、それぞれの指示された標的細胞株における I C A M - 1 密度を推定した。

#### 【 0 0 7 1 】

標的細胞のパネルには、以下が含まれる：それぞれ生理的レベルの I C A M - 1（細胞 1 個当たり約  $10^4$  分子）を有する健常なヒトおよびマウスの細胞を提示する H M E C - 1 および b E n d . 3、中程度のレベル（細胞 1 個当たり約  $10^5$ ）を発現する未分化甲状腺癌（8 5 0 5 C）、高レベルの I C A M - 1（細胞 1 個当たり約  $10^6$ ）を発現する子宮頸癌（He L a）細胞株。さらなる比較のために、本発明者らは、C R I S P R / C a s 9 仲介性 I C A M - 1 遺伝子不活性化を有する 8 5 0 5 C（8 5 0 5 C / - I C A M - 1）および I C A M - 1 発現を上方調節するために L P S で処理した 8 5 0 5 C（8 5 0 5 C / L P S）を含めた。表 3 は、本明細書で使用した標的細胞における I C A M - 1 部位密度を要約する。

【表 3】

表 3.

標的細胞	I C A M - 1 密度（分子／細胞 1 個）
b E N D . 3	$< 10^4$
H M E C - 1	$< 10^4$
8 5 0 5 C	$10^5$
8 5 0 5 C / L P S	$10^5 \sim 10^6$
8 5 0 5 C / - I C A M - 1	検出不可能
He L a	$10^6$

#### 【 0 0 7 2 】

標的細胞との相互作用の際の C A R T 細胞の活性化は、C D 2 5（I L - 2 受容体）および C D 6 9 の発現を測定することによって調べた。ジャーカット C A R T 細胞（W T、F 2 9 2 A、F 2 9 2 G、および T M）における C D 2 5 発現を、異なる標的細胞株との 24 時間の共インキュベーション後に調べた（n = 3 ~ 4）。C D 6 9 は、 $10^6$  個の組換えヒト I C A M - 1 - F c 分子でコーティングしたラテックスビーズとのインキュベーション後に誘導した。C D 2 5 レベルの上昇は、L P S 刺激 8 5 0 5 C とインキュベーション後の W T I ドメイン C A R T 細胞で観察されたが、より低レベルの I C A M - 1 を発現する他の細胞株とのインキュベーションでは観察されなかった。対照的に、高親和性 T M C A R T 細胞を高 I C A M - 1 発現細胞、ならびに基線レベルの I C A M - 1 を発現する H M E C - 1 細胞および b E n d . 3 細胞とともにインキュベートしたとき、C D 2 5 発現の上昇が見られた。I C A M - 1 発現を欠く標的細胞（8 5 0 5 C / - I C A M - 1）とのインキュベーション後の T M C A R T 細胞上で、低レベルの C D 2 5 発現が検出され、これはおそらく、T M C A R とジャーカット細胞上の I C A M - 1 の基線レベルの発現（約  $10^4$  分子 / 個）との分子相互作用によって仲介される同型細胞接触によるものである。F 2 9 2 G を発現する T 細胞は、8 5 0 5 C / - I C A M - 1 との共インキュベーション後に C D 2 5 発現が背景レベルに近いことを除いて、T M と同様に拳動した。マイクロモルレベルの親和性の F 2 9 2 A T 細胞は、8 5 0 5 C および 8 5 0 5 C / L P S 細胞とのインキュベーションの際にのみ、C D 2 5 発現の上昇を示す選択的活性化を実証した。これは、F 2 9 2 A C A R T 細胞活性化のために、細胞 1 個あたり  $10^5$  個超の I C A M - 1 分子の閾値標的抗原密度が必要であったことを示している。C D 2 5 の I C A M - 1 密度依存的活性化とは対照的に、C D 6 9 の発現上昇は、標的細胞の非存在下でさえ観察され、発現レベルは、I C A M - 1 に対する C A R 親和性と密接に整合しており、これは、I C A M - 1 でコーティングしたラテックスビーズとのインキュベーションによってさらに増強されることはない。C D 2 5 と比較して、C D 6 9 誘導は、活性化のためのより低レベルの抗原密度閾値を必要としているようであり、これは C A R T 細胞間の同型相互作用によって提供された。

10

20

30

40

50

## 【0073】

実施例15. 試験管内でのCAR-T細胞の細胞毒性に及ぼすCAR親和性および標的抗原密度の影響

CAR改変ジャーカットT細胞の親和性および抗原依存的活性化を検証した後、試験管内の初代T細胞の活性化および細胞毒性に及ぼすCAR親和性および抗原密度の影響を調べることを試みた。初代T細胞にTM、F292A、F292G、およびWT イドメインのCARを形質導入し、種々の標的細胞へ添加してそれらの試験管内での細胞毒性の有効性を測定した。全体として、標的細胞溶解速度とすべてのイドメイン変異体CAR-T細胞にわたるICAM-1発現(HeLa > 8505C/LPS > 8505C > HMEC-1 > bEND.3)との間には正の相関があった(図2A)。T細胞がICAM-1に対してより高い親和性を有するCARを発現したとき、殺滅速度もより大きかった(TM > F292G > F292A > WT)。

10

## 【0074】

親和性変異体CAR-T細胞による殺滅の有効性を定量的に比較するために、可変傾斜シグモイド曲線(生存率(%) = 100 / [1 + 10(t - 50%) \* 傾斜])を用いて、50%殺滅(50%)およびヒル傾斜を達成するのに必要とされる時間を説明する最適値を見つけた(図2B)。50%の標的殺滅までの時間は、同じCAR-T細胞について、より低い親和性のCAR-T細胞か、またはより低い抗原密度のいずれかでより長かった。CAR-T細胞による標的殺滅の速度に対応するヒル傾斜は、同じ標的細胞に対する親和性の増大とともにより高かった(より低いKd)。ヒル傾斜はまた、同じCAR-T細胞について抗原密度が増大するにつれて大きくなったり。標的細胞のCAR-T細胞殺滅は、TMを除くイドメイン変異体CAR全部によるICAM-1陰性8505C細胞の殺滅が観察されないことによって証明されるように、特異的であった。TM-T細胞による8505C/-ICAM-1の低いが漸次的な殺滅は、T細胞中のTMとICAM-1との相互作用によって仲介される同型細胞接触によって引き起こされる細胞毒性活性化による可能性が高かった。表4は、可変傾斜シグモイド曲線にデータを適合させることによって決定された50%殺滅までの時間(時間)を要約する。

20

## 【表4】

表4.

CAR T	HMEC	bEND3	8505C/-		8505C/	
			ICAM-1	8505C	LPS	HeLa
WT	非決定	非決定	非決定	非決定	非決定	30.23
F292A	非決定	非決定	非決定	41.55	30.81	18.66
F292G	21.05	16.23	非決定	27.32	23.98	14.93
TM	13.45	13.03	32.63	17.12	15.05	10.84

0.85より大きなr二乗値を持つ最適値のみが示されており、そうでない場合は非決定(n.d.)と示される。

30

40

## 【0075】

表5は、データを可変傾斜シグモイド曲線に当てはめることによって決定されたヒル傾斜値を示す。

50

## 【表 5】

表 5.

8505C/-						
CAR T	HMEC	bEND3	ICAM-1	8505C	8505C/LPS	HeLa
WT	非決定	非決定	非決定	非決定	非決定	0.09894
F292A	非決定	非決定	非決定	0.04424	0.04976	0.1096
F292G	0.07538	0.05292	非決定	0.06098	0.05872	0.1059
TM	0.08384	0.05793	0.05493	0.08686	0.08695	0.1099

0.85 より大きな  $r^2$  乗値を持つ最適値のみが示され、そうでない場合は非定義(n.d.)と示される。

10

## 【0076】

一次 T 細胞における ICAM - 1 発現は、CD3 / CD28 ピーズ（約 10<sup>5</sup> 分子 / 細胞 1 個）とのインキュベーションなどによって T 細胞活性化後に誘導することができる。対照的に、ミリモルレベルの親和性 ( $K_d = 1.5 \text{ mM}$ ) を有する WT CAR T 細胞は、HeLa 細胞のみを特異的に溶解し得、これは、約 1 mM の  $K_d$  の CAR T 細胞について細胞 1 個あたりおよそ 10<sup>6</sup> 分子の閾値抗原密度を示す。重要なことに、F292A および WT イドメイン CAR T 細胞 ( $K_d > 10 \mu \text{M}$ ) は、ヒトおよびマウスの健常対照細胞、HMEC - 1 および b. END3 と非反応性であった（細胞 1 個あたり約 10<sup>4</sup>、図 2 A）。

20

## 【0077】

CAR T 細胞による IFN -  $\gamma$  放出は標的細胞死の速度と密接に整合しており、ここで、より高い親和性の CAR T 細胞を含有する共培養物における漸増レベルおよび / またはより高いレベルの標的抗原発現が認められた（図 2 D）。標的抗原密度依存的 IFN -  $\gamma$  放出に対する 1 つの例外は、TM および F292G であり、これらは標的分子の非存在下 (8505C / - ICAM - 1) で有意な量の IFN -  $\gamma$  放出 (1 ng / ml 超) を示した。これもまた、T 細胞間の同型相互作用によるものであり、これは、特に CAR 発現のレベルが高かったとき、TM CAR T 細胞を増殖させることの困難性の観察によっても支持されている。マイクロモルレベルの親和性の CAR T 細胞 (F292A) による IFN -  $\gamma$  の放出は、標的細胞中の ICAM - 1 密度に比例しており、8505C / - ICAM - 1 とのインキュベーションの際の放出の欠如、ならびに HMEC - 1、8505C、8505C / LPS、HeLa とのインキュベーションとともに、この順で漸増していることによって実証された（図 2 D）。HeLa 細胞に対する WT イドメインの細胞毒性と一致して、HeLa とのインキュベーションの際の IFN -  $\gamma$  放出は、他のより親和性の高い CAR T 細胞によって分泌されたレベルに匹敵した。

30

## 【0078】

実施例 16. 親和性調整イドメイン CAR T 細胞の生体内での有効性

40

本発明者らは、試験管内での親和性依存性 CAR T 細胞の細胞毒性パターンが生体内で腫瘍異種移植モデルにどのように変換されるのかを調べた。固形腫瘍において、CAR T 細胞の有効性は、腫瘍部位に移動し、浸透し、腫瘍細胞を連続的に溶解し、腫瘍量に従って膨張および収縮を受ける能力によって影響される。ここでは、0.75 × 10<sup>6</sup> 個の 8505C - FLuc + GFP + 細胞の全身静脈内注射、続いて異種移植 8 ~ 10 日後 (5 ~ 20 % の CAR 発現) の約 1 ~ 3 × 10<sup>6</sup> 個のイドメイン CAR T 細胞 (WT、F292A、F265S、F292G、および TM)、SSTR2 - R6.5 CAR29、NT (非形質導入) T 細胞、および T 細胞なしによる処置によってマウスを異種移植した。腫瘍量は、ホタルルシフェラーゼ活性の全身発光撮像によって評価した。原発腫瘍は肺および肝臓に局在し、遠隔転移巣が全身に明らかであった（図 3 A）。T 細胞を投与し

50

なかったコホートまたはNT T細胞を投与したコホートでは、腫瘍接種の3～4週間以内に腫瘍量に屈した。TM CAR T細胞で処置したマウスは、腫瘍量の急激な初期減少を示したが、T細胞注射のおよそ7日後に、マウスは昏睡および体重減少によって示される全身毒性の症状を示し始め、処置15日後までに死に至った(図3A～B)。F292G CAR T細胞は一貫した毒性の発症がないまま、腫瘍を除去することができたが、これはCAR T細胞処置時の腫瘍量に部分的に依存するように思われた。例えば、F292G(119nM親和性)CAR T細胞の注入の遅延(10日後)または治療時により多量の腫瘍量のいずれかは、より高頻度の死亡をもたらした。F265S(145nM Kd)CARを発現するT細胞は、観察可能な毒性なしに腫瘍を排除した。これは、約100nMのKdのIDメインCAR親和性があおよその閾値親和性を定義し、それを超えると(100nM未満、例えば、1～10nMのKd)、処置は、高いおよび低い抗原密度と、オントーゲットオフ腫瘍毒性の尤度の上昇との間の識別の低下をもたらす。試験管内でのWT CAR T細胞による8505Cの殺滅の制限または欠如と一致して、生体内での腫瘍の進行は、NT T細胞と同様に、WT CAR T細胞の処置によって妨げられることはなかった(図3B)。対照的に、より高い親和性の対応物と比較してはるかに低い試験管内での8505C殺滅速度を呈したF292A CAR T細胞は、処置の時期にかかわらず明白な毒性なしに腫瘍量の急速な減少を達成した(図3A～3B)。その上、より高い腫瘍クリアランス速度および腫瘍再発の耐久可能な抑制によって証明されるように、ICAM-1に対する>1,000倍低い親和性にもかかわらず、F292A CAR Tの生体内での有効性は、scFv系のR6.5 CARよりも優れていた(10nM対20μM)(図3A)。

#### 【0079】

全体として、IDメインCAR T細胞の抗腫瘍有効性は、T細胞またはNT T細胞で処置されていないマウスと比較して、コホート生存の統計的に有意な増加をもたらした(図3C)。しかしながら、CAR T細胞処置マウスは、腫瘍量が全くまたはほとんどない場合でさえ、毒性の徴候(例えば、体重減少、毛皮の減少)を示し始め、最終的にT細胞注射後約10週間で頻繁に死に至る。これは、移植片対宿主病34に関連し、ヒトICAM-1のみを標的とするR6.5CAR T細胞で処置したマウスにおいて同様の毒性が観察されたため、オントーゲットオフ腫瘍毒性ではないと考えられた。

#### 【0080】

実施例17.CAR T細胞の動態、有効性、および毒性のリアルタイム撮像

PET/CTによってリアルタイムでT細胞分布を時空間的に監視するために、本発明者らは、撮像レポーター遺伝子であるSSTR2をIDメインCARベクターへと、リボソームスキップP2A配列を用いて、T細胞表面上でのCARおよびレポーターの等しい発現を確実にした(図4A)。SSTR2の発現は、注入された陽電子放出SSTR2特異的放射性トレーサーである<sup>18</sup>F-NOTA-オクトレオチド30の結合および細胞内蓄積を可能にした。次いで、マイクロPETスキャナーにより、組織貫通の問題なしに、放出されたシグナルを高解像度で検出した。SSTR2レポーター遺伝子のフローサイトメトリー測定および初代ヒトT細胞表面上のCARを表すMycタグ発現。SSTR2およびMycタグ付きIDメインの発現は、SSTR2レポーター遺伝子のフローサイトメトリー測定による抗体染色、および初代ヒトT細胞の表面上のCARを表すMycタグ発現によって確認された。

#### 【0081】

上述のように、マウスに8505C腫瘍を異種移植し、NTまたはF292A CAR T細胞で処置した。全身発光撮像を実施して腫瘍量を推定する一方で、PET/CT撮像をCAR T細胞分布を追跡するために同日実施した(図4B)。各時点で、T細胞動態との相関についてヒトサイトカインを測定するために血液を採取した。マウスにおけるPET/CT画像は、放射性トレーサー排泄によって引き起こされる胆嚢、腎臓および膀胱における予想される背景レベルを示した(図4B、右端)。NT処置対照コホートでは、腫瘍量の増加およびそれに伴う血液プールの増加のため、非特異的トレーサー取り込みのわ

10

20

30

40

50

ずかではあるが漸次増加が観察された(図4B)。対照的に、S S T R 2 - F 2 9 2 A C A R T細胞で処置したマウスでは、特異的なトレーサーの取り込みが観察され、肺における膨張期および収縮期を示し、ピークC A R T細胞シグナルは異種移植のおよそ2日後に生じ、これはピーク腫瘍量後4日間であり(異種移植後18日間)、背景レベルまで漸減した(図4B~4C)。これは、二相性のT細胞の膨張および収縮の現象を示す。

#### 【0082】

処置マウスから得られた血清のサイトカイン分析は、ピークT細胞膨張の前にI F N - 10 I L - 6、およびC X C L 1 0 の濃度の急上昇を示し、これはまた、背景レベルまで肺のT細胞密度の腫瘍除去後およびそれに続く背景レベルまでの収縮後に背景レベルへ戻った(図4D)。

#### 参考文献

1. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta/CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 20, 70-75 (2002).
2. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10024-10028 (1989). 20
3. Hudecek M, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res* 19, 3153-3164 (2013).
4. Watanabe K, et al. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 zeta chimeric antigen receptor-modified effector CD8+ T cells. *J Immunol* 194, 911-9 30 20 (2015).
5. Kochenderfer JN, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 116, 4099-4102 (2010).
6. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine* 365, 725-733 (201 40 1).
7. Grupp SA, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 368, 1509-1518 (2013).
8. Brentjens RJ, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5, 177ra138 (2013).
9. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of 50

- chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* 127, 3321-3330 (2016).
10. Cheever MA, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15, 5323-5337 (2009).
11. Kakarla S, Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? *Cancer J* 20, 151-155 (2014). 10
12. Lamers CH, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-1 lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* 24, e20-22 (2006).
13. Parkhurst MR, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther* 19, 620-626 (2011). 20
14. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 18, 843-851 (2010).
15. Tian S, Maile R, Collins EJ, Frelinger JA. CD8+ T cell activation is governed by TCR-peptide/MHC affinity, not dissociation rate. *J Immunol* 179, 2952-2960 (2007). 30
16. Hebeisen M, Allard M, Gannon PO, Schmidt J, Speiser DE, Rufer N. Identifying Individual T Cell Receptors of Optimal Avidity for Tumor Antigens. *Front Immunol* 6, 582 (2015).
17. Zhong S, et al. T-cell receptor affinity and avidity defines antitumor response and autoimmunity in T-cell immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 6973-6978 (2013).
18. Liu X, et al. Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res* 75, 3596-3607 (2015). 40
19. Caruso HG, et al. Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity. *Cancer Res* 75, 3505-3518 (2015).
20. Arcangeli S, et al. Balance of Anti-CD12 50

- 3 Chimeric Antigen Receptor Binding Affinity and Density for the Targeting of Acute Myeloid Leukemia. *Mol Ther*, (2017).
21. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol* 173, 7647-7653 (2004). 10
22. Schmid DA, et al. Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function. *J Immunol* 184, 4936-4946 (2010).
23. Corse E, Gottschalk RA, Krogsgaard M, Allison JP. Attenuated T cell responses to a high-potency ligand in vivo. *PLoS Biol* 8, (2010).
24. Park S, et al. Tumor suppression via paclitaxel-loaded drug carriers that target inflammation marker upregulated in tumor vasculature and macrophages. *Biomaterials* 34, 598--605 (2013). 20
25. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137, 245-254 (1986).
26. Shimaoka M, et al. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alpha L I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6009-6014 (2001). 30
27. Jin M, et al. Directed evolution to probe protein allosteric and integrin I domains of 200,000-fold higher affinity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 5758-5763 (2006).
28. Wong R, Chen X, Wang Y, Hu X, Jin MM. Visualizing and Quantifying Acute Inflammation Using ICAM-1 Specific Nanoparticles and MRI Quantitative Susceptibility Mapping. *Ann Biomed Eng* 40, 1328-1338 (2011). 40
29. Vedvyas Y, et al. Longitudinal PET imaging demonstrates biphasic CAR T cell responses in survivors. *JCI Insight* 1, e90064 (2016).
30. Laverman P, et al. A novel facile method of labeling octreotide with (18)F-fluorine 50

- . J Nucl Med 51, 454 - 461 (2010).  
31. McBride WJ, et al. A novel method of <sup>18</sup>F radiolabeling for PET. J Nucl Med 50, 991 - 998 (2009).  
32. Kinahan PE, Fletcher JW. Positron emission tomography-computed tomography standardized uptake values in clinical practice and assessing response to therapy. Semin Ultrasound CT MR 31, 496 - 505 (2010).  
33. Leelawattanachai J, Kwon KW, Michael P, Ting R, Kim JY, Jin MM. Side-by-Side Comparison of Commonly Used Biomolecules That Differ in Size and Affinity on Tumor Uptake and Internalization. PLoS One 10, e0124440 (2015). 10  
34. Poirot L, et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies. Cancer Res 75, 3853 - 3864 (2015).  
35. Kang S, et al. Virus-mimetic polyplex particles for systemic and inflammation-specific targeted delivery of large genetic contents. Gene Ther 20, 1042 - 1052 (2013). 20  
36. Hinrichs CS, Restifo NP. Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy. Nat Biotechnol 31, 999 - 1008 (2013).  
37. Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. Annu Rev Med 68, 139 - 152 (2017).  
38. Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. J Biol Chem 270, 933 - 943 (1995). 30  
39. Usami Y, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. Int J Cancer 133, 568 - 578 (2013).  
40. Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC, Jr. ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. Surgery 141, 705 - 707 (2007). 40  
41. Guo P, et al. ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA 111, 14710 - 14715 (2014).  
42. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? Curr Opin Cel 50

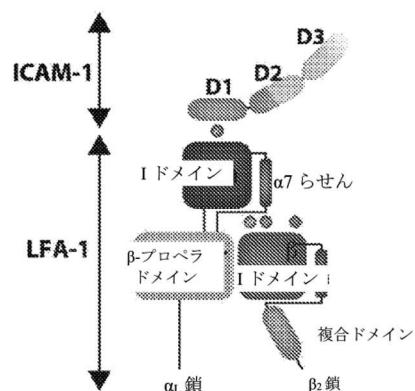
- 1 Biol 15, 547 - 556 (2003).
43. Boissonnas A, Fetler L, Zeelenberg IS, Hugues S, Amigorena S. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. J Exp Med 204, 345 - 356 (2007).
44. Porter BB, Harty JT. The onset of CD8<sup>+</sup>-T-cell contraction is influenced by the peak of *Listeria monocytogenes* infection and antigen display. Infect Immun 74, 1528 - 1536 (2006). 10
45. Keu KV, et al. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma. Sci Transl Med 9, (2017).
46. Yaghoubi SS, et al. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with <sup>18</sup>F-FHBG PET in a patient with glioma. Nat Clin Pract Oncol 6, 53 - 58 (2009).
47. Drent E, et al. A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization. Mol Ther, (2017). 20
48. Kalergis AM, et al. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. Nat Immunol 2, 229 - 234 (2001).
49. Valitutti S. The Serial Engagement Mode 1 17 Years After: From TCR Triggering to Immunotherapy. Front Immunol 3, 272 (2012).
50. McMahan RH, McWilliams JA, Jordan KR, Dow SW, Wilson DB, Slansky JE. Relating TCR-peptide-MHC affinity to immunogenicity for the design of tumor vaccines. The Journal of clinical investigation 116, 2543 - 2551 (2006). 30
51. Robbins PF, et al. Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. J Immunol 180, 6116 - 6131 (2008).
52. Co MS, Deschamps M, Whitley RJ, Queen C. Humanized antibodies for antiviral therapy. Proc Natl Acad Sci USA 88, 2869 - 2873 (1991). 40
53. Leelawattanachai J, Kwon K-W, Michael P, Ting R, Kim J-Y, Jin MM. Side-by-Side Comparison of Commonly Used Biomolecules That Differ in Size and Affinity on Tumor Uptake and Internalization. PLoS One 10, e0124440 (2015).
54. Jin M, et al. Directed evolution to probe protein allostery and integrin I domains of 200,000-fold higher affinity. Proc Natl 50

Acad Sci USA 103, 5758 - 5763 (2006).  
 55. Wong R, Chen X, Wang Y, Hu X, Jin MM. Visualizing and quantifying acute inflammation using ICAM-1 specific nanoparticles and MRI quantitative susceptibility mapping. Ann Biomed Eng 40, 1328 - 1338 (2012).

【図面】

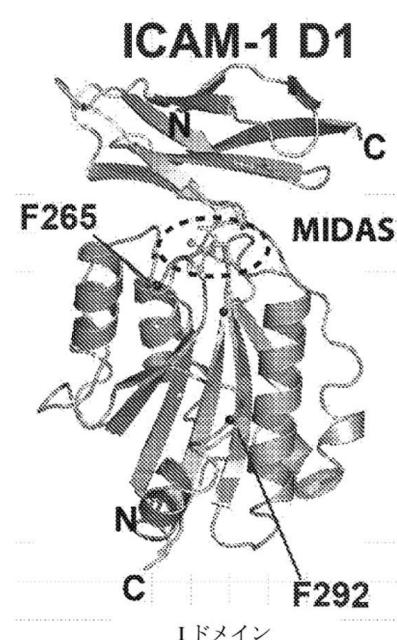
【図1A】

図1A



【図1B】

図1B



10

20

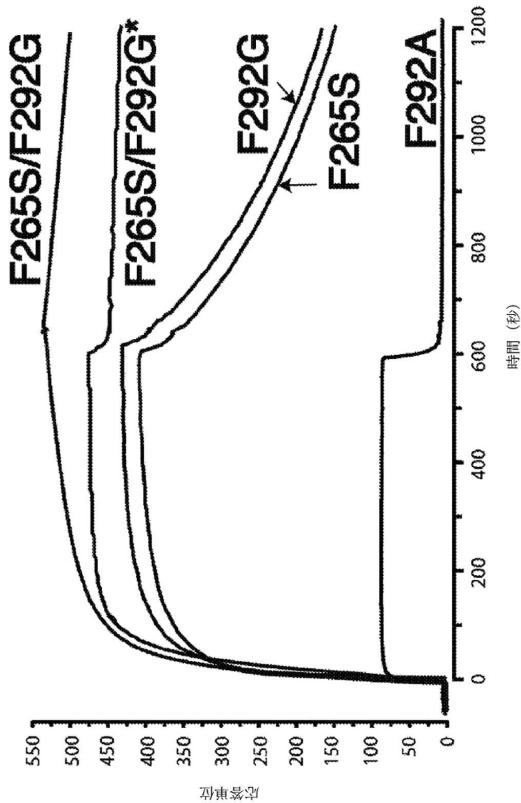
30

40

50

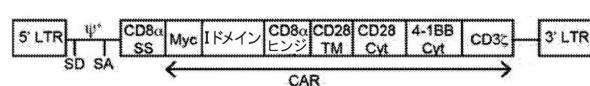
【図 1 C】

図 1 C



【図 1 D】

図 1 D



10

20

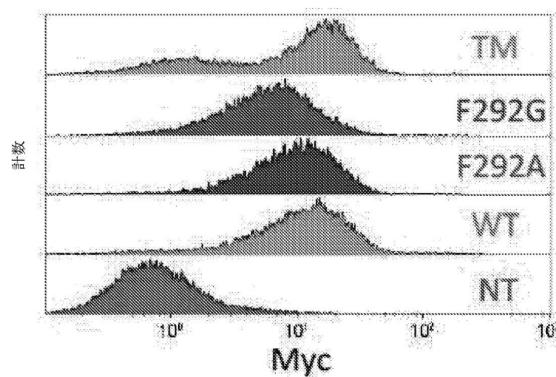
30

40

50

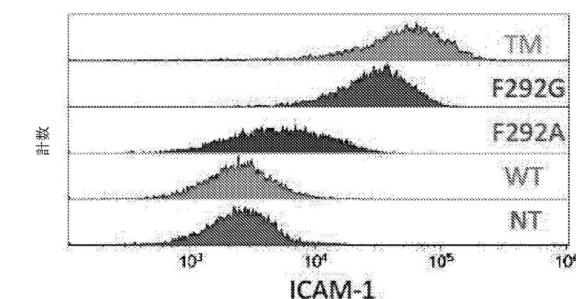
【図 1 E】

図 1 E



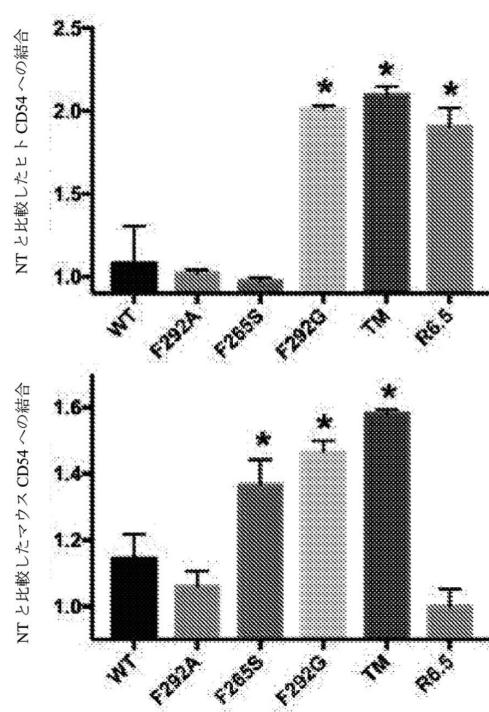
【図 1 F】

図 1 F



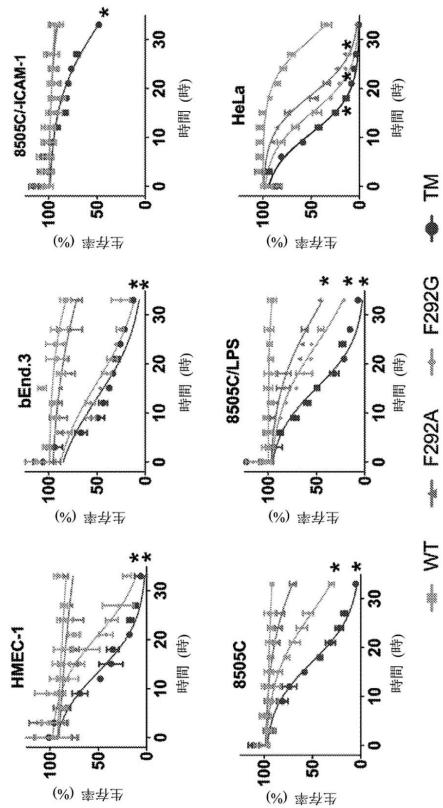
【図 1 G】

図 1 G



【図 2 A】

図 2 A



10

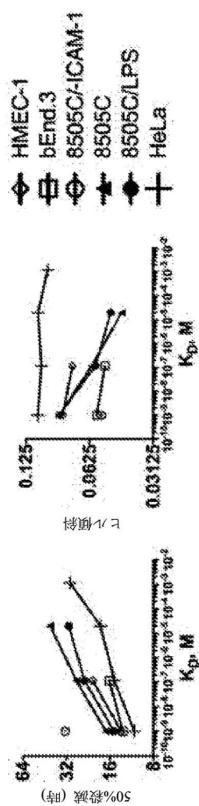
20

30

40

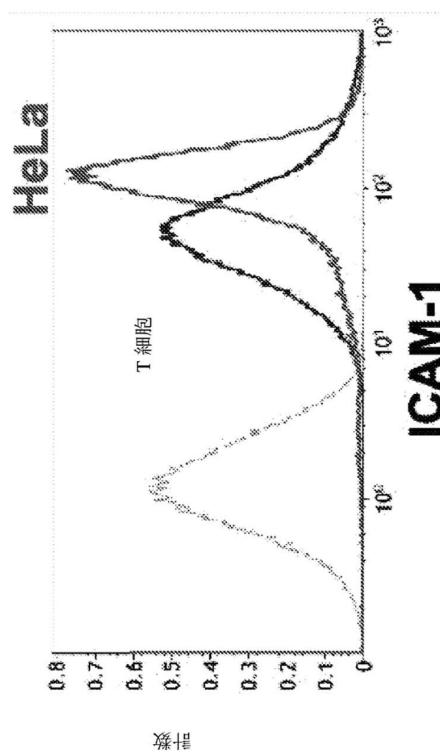
【図 2 B】

図 2 B



【図 2 C】

図 2 C



50

【図 2 D】

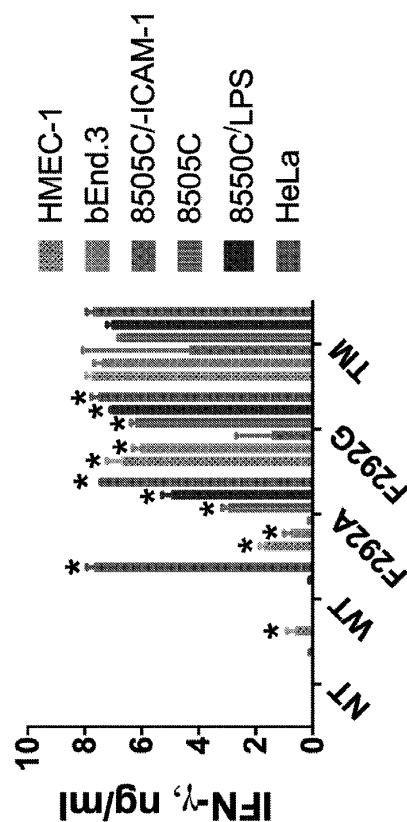
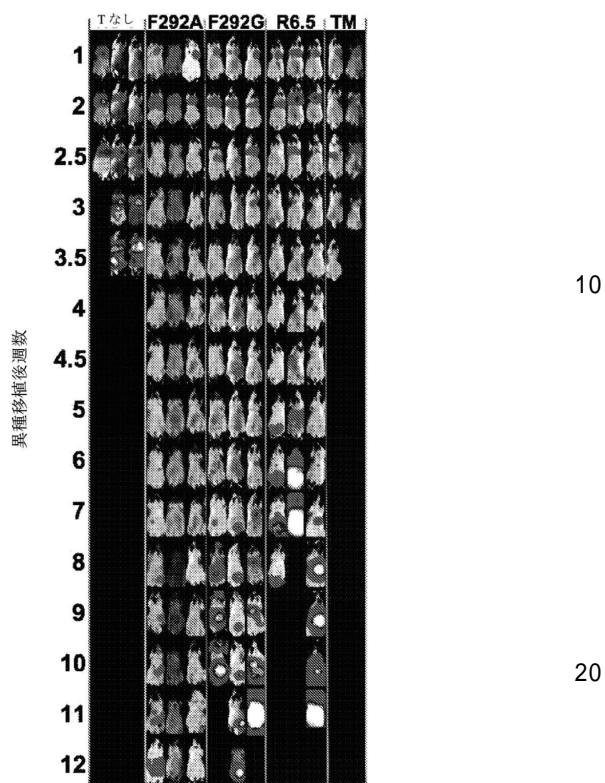


FIG. 2D

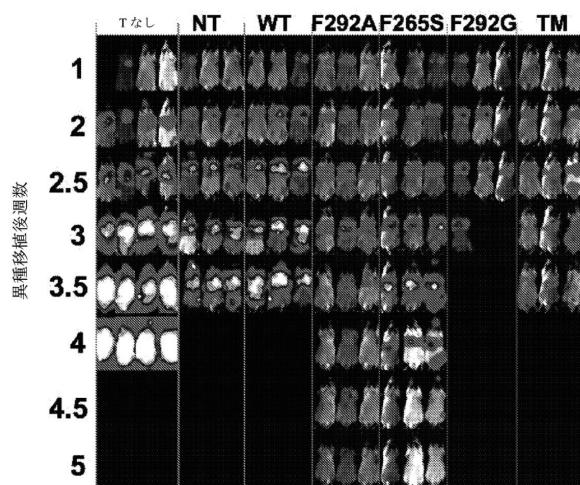
【図 3 A】

図 3 A



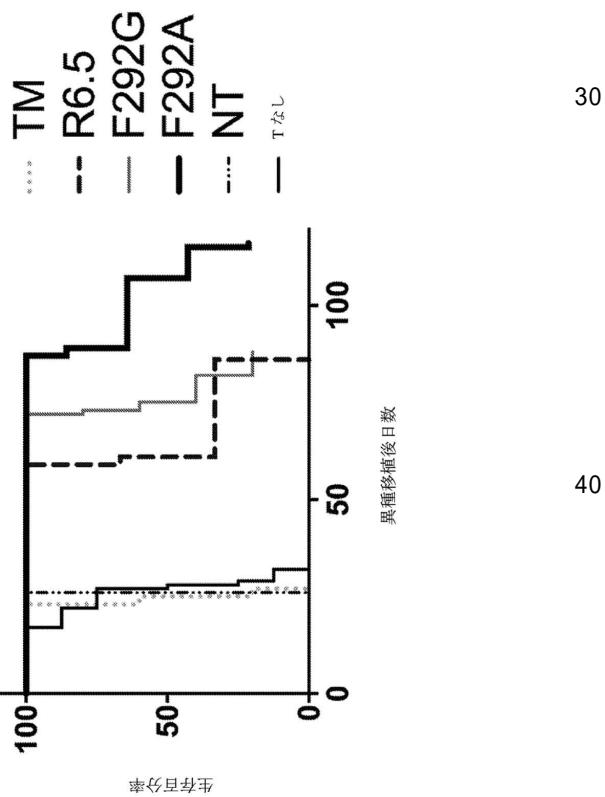
【図 3 B】

図 3 B



【図 3 C】

図 3 C



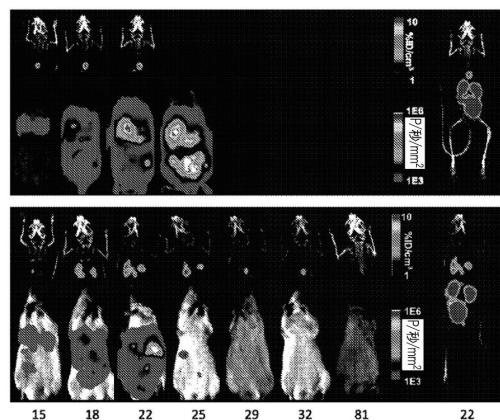
【図4 A】

図4 A



【図4 B】

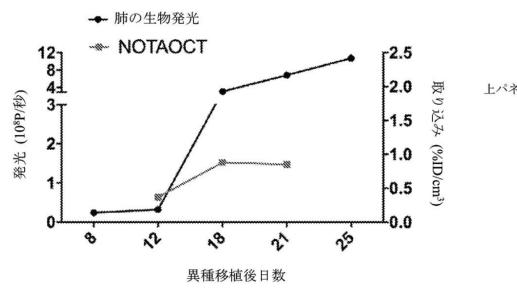
図4 B



10

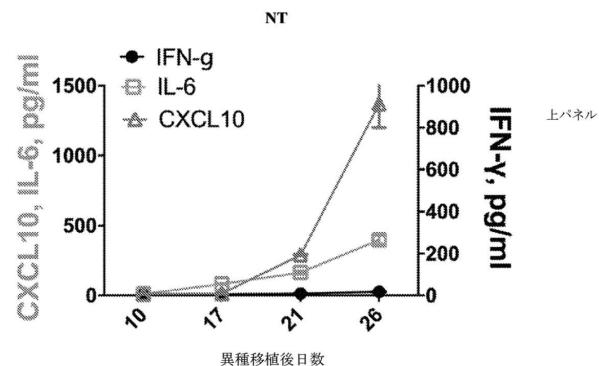
【図4 C】

図4 C



【図4 D】

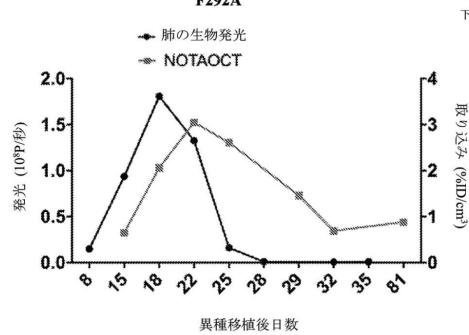
図4 D



20

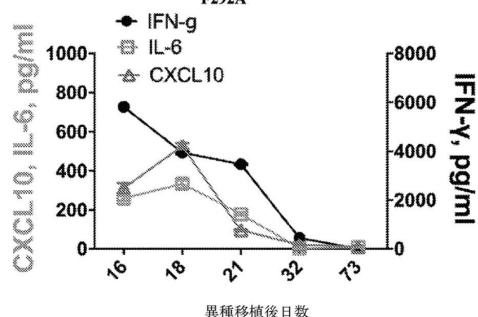
F292A

下パネル



F292A

下パネル



30

40

【配列表】

0006996772000001.app

50

---

フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 61 K    35/17 (2015.01)	F I	A 61 K    35/17	Z
A 61 P    35/00 (2006.01)		A 61 P    35/00	

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 武居 良太郎

## (74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

## (72)発明者 チン ムンソ

アメリカ合衆国, ニューヨーク 14850, イサカ, パイン ツリー ロード 395, スイート  
310, センター フォー テクノロジー ライセンシング (シーティーエル)

審査官 山本 匡子

## (56)参考文献 米国特許第08021668(US, B1)

国際公開第2013/051718(WO, A1)

特表2004-503507(JP, A)

Jin, M., et al., Directed evolution to probe protein allostery and integrin I domains of 200,000-fold higher affinity, PNAS, 2006年, 103 (15), 2758-5763

Sadelain, M., et al., The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design, Cancer Discovery, 2013年, 3, 388-398

Kang, S., et al., Complex Structure of Engineered Modular Domains Defining Molecular Interaction between ICAM-1 and Integrin LFA-1, PLOS ONE, 7 (8), 2012年, e44124

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 00 - 90

C 07 K

C 12 Q

MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / CAPLUS / REGISTRY (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)